Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

MHC class I molecules are incorporated into human herpesvirus-6 viral particles and released into the extracellular environment

Ota, Megumi

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2014-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲第6043号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006043

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

MHC class I molecules are incorporated into human herpesvirus-6 viral particles and released into the extracellular environment

MHC クラス Ⅰ分子はヒトヘルペスウイルス 6 のウイルス粒子に取り込まれ、
細胞外へ放出される

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
臨床ウイルス学
（指導教員：森　康子　教授）

太田　惠美

【背景】

ヒトヘルペスウイルス 6 (Human herpesvirus-6; HHV-6) は 1986 年に、HIV 患者から分離されたウイルスである。HHV-6 はβヘルペスウイルス亜科に属し、2011 年、塩基配列や抗原性、細胞向性などの違いにより HHV-6A と HHV-6B の 2 種に分類された。HHV-6B は、T リンパ球で主に増殖し、初感染時に突発性発疹を引き起こす。HHV-6B は 90％以上の成人に潜伏感染しており、移植時など、免疫抑制状態時に再活性化し、脳炎・脳症など重篤な疾患を引き起こす。HHV-6A の疾患との関係は、未だ不明である。

ヘルペスウイルスは、さまざまな戦略で宿主免疫応答から逃れ、その感染を成立させている。その一つとして、細胞膜表面での MHC クラス Ⅰ分子の発現減少が知られている。その詳細な機構として、細胞質から小胞体への抗原ペプチド輸送のウイルスタンパクによる阻害や、ウイルスタンパクによる MHC クラス Ⅰ分子の輸送阻害およびリソソームへの輸送による分解などが報告されている。

HHV-6 の宿主免疫応答からの回避に関しても、HHV-6A 感染樹状細胞における細胞膜表面での MHC クラス Ⅰ分子の発現減少や、MHC クラス Ⅰ と HHV-6 がコードする糖タンパク U21 との結合によるリソソームへの輸送および分解など、複数の機構が報告されている。

我々は今回、HHV-6 ウイルス粒子中に存在する宿主因子の同定を試みたところ、複数の宿主因子が同定された。その中に、MHC クラス Ⅰ分子が含まれていることが明らかとなった。

【目的】

MHC クラス Ⅰ分子の HHV-6 感染における役割の解析を行う。

【方法】

HHV-6 感染 T 細胞上清中からウイルス粒子を精製し、LC-MS/MS 解析に供した。

同定した宿主因子、MHC クラス Ⅰ について、ウェスタンブロットおよび電子顕微鏡解析により、ウイルス粒子中におけるその存在の確認を行った。

また、MHC クラス Ⅰ 分子の感染細胞内における動態を、フローサイトメトリー、ウェスタンブロットおよび蛍光抗体法にて解析した。

【結果】

[1] HHV-6 ウイルス粒子に含まれる宿主因子、MHC クラス I 分子を同定した。

まず、HHV-6 感染細胞の培養上清中からウイルス粒子を含む画分を精製した。精製した画分にウイルス粒子が含まれていることを、HHV-6 のウイルス粒子上に存在するエンベロープ糖タンパクである glycoprotein B (gB) の抗体を用いたウェスタンブロットで確認し、その画分を、LC-MS/MS 解析に供したところ、HHV-6 ウイルス粒子中に、さまざまな宿主因子が含まれていることが明らかになった。その中には、MHC クラス I 分子が含まれていた。

[2] HHV-6 ウイルス粒子中およびエクソソーム中に、MHC クラス I 分子が含まれることを明らかにした (Fig. 1)。

次に、LC-MS/MS 解析により同定された MHC クラス I 分子が、HHV-6 ウイルス粒子中に含まれているか確認を行った。

HHV-6 感染 T 細胞の上清を回収し、ショ糖密度勾配遠心によりウイルス粒子を精製した。得られたフラクション 1-12 のうち、3-10 をウェスタンブロット解析に供したところ、MHC クラス I 分子は、ウイルス粒子が存在する画分に含まれていた (Fig. 1a, 1b)。

HHV-6 の成熟粒子は、MVB (Multivesicular body) のマーカー分子である CD63 を含む小胞 (エクソソーム) とともに 細胞外へ放出されることを、我々は既に報告している (Mori Y, et. al. Traffic. 2008 Sep;9(10):1728-42)。そこで、CD63 抗体を用いた検出も行ったところ、CD63 は、MHC クラス I と同じ画分に含まれていた (Fig. 1c)。

実際にウイルス粒子上に MHC クラス I 分子が存在することを確認するため、得られたウイルス粒子画分を用いた免疫電子顕微鏡観察を行った。その結果、MHC クラス I 分子は、HHV-6 ウイルス粒子上に存在していることが明らかになった (Fig. 1e)。また、MHC クラス I 分子は、エクソソーム上にも存在していることが明らかになった (Fig. 1f)。

[3] HHV-6B 感染細胞膜表面から、MHC クラス I 分子が発現低下していることを明らかにした (Fig. 2)。

次に、MHC クラス I 分子の HHV-6 感染細胞における動態の解析を行った。

【背景】で述べたように、HHV-6 において、細胞膜表面の MHC クラス I 分子が発現減少しているという報告がある。そこで我々は、HHV-6 感染においても MHC クラス I 分子の細胞膜表面からの発現低下が見られるかをフローサイトメトリーで解析した。その結果、MHC クラス I 分子は、HHV-6B 感染細胞の膜表面から発現低下していた (Fig. 2a)。

MHC クラス I 分子の HHV-6 感染細胞における総発現量を調べるため、感染 72 時間後の細胞を用いてウェスタンブロット解析を行った。その結果、MHC クラス I 分子は、感染細胞内においても発現の低下が認められた (Fig. 2b)。

MHC クラス I 分子の HHV-6 感染細胞での局在を調べるため、HHV-6B 感染 72 時間後の T 細胞をアセトン・メタノール (7:3) で固定し、蛍光抗体法による染色を行った。その結果、MHC クラス I 分子は HHV-6 感染細胞内にて細胞質内に存在し、gB との共局在を示した (Fig. 2c)。

【考察】

[1] MHC クラス I 分子は HHV-6 ウイルス粒子およびエクソソームに取り込まれて細胞外へ放出されること、HHV-6B 感染細胞の膜表面から発現低下することが明らかになった。このことから、HHV-6 は MHC クラス I 分子による抗原提示を阻害し、宿主の免疫応答から回避していることが示唆された。

[2] HHV-6 の未成熟なウイルス粒子は、感染細胞内のトランスゴルジ網 (*trans*-Golgi network; TGN) 由来の小胞で出芽し、成熟した粒子となる。この小胞は MVB へと変化し、成熟ウイルス粒子は宿主細胞におけるエクソソーム放出経路を利用して細胞外へ放出されることを、我々は既に報告している (Mori Y, et. al. Traffic. 2008 Sep;9(10):1728-42)。このことから、MHC クラス I 分子もウイルス粒子が出芽した TGN 由来の小胞へ輸送され、HHV-6 の粒子中に取り込まれて細胞外へ放出されていることが示唆された (Fig. 3)。

[3] MHC クラス I 分子は、感染細胞内においてウイルス粒子中に存在するエンベロープ糖タンパクである gB と共局在することが明らかになった。このことから、MHC クラス I 分子は、ウイルスのエンベロープ糖タンパクのように、TGN 由来の小胞へと選別されている可能性が示唆された。

[4] MHC クラス I 分子が HHV-6 感染細胞内でも発現低下していた。このことから、HHV-6 感染細胞内において、リソソームへと輸送され、分解される MHC クラス I 分子もあることが示唆された。

【結論】

MHC クラス I 分子は、ヒトヘルペスウイルス 6 のウイルス粒子に取り込まれ、エクソソーム放出経路を利用して細胞外へ放出されることが示された。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第 2403号	氏 名	太田 惠美
論文題目 Title of Dissertation	MHC class I molecules are incorporated into human herpesvirus-6 viral particles and released into the extracellular environment MHC クラス I 分子はヒトヘルペスウイルス 6 のウイルス粒子に取り込まれ、細胞外へ放出される		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 川崎 愛人 副 査 Vice-examiner 堀田 博 副 査 Vice-examiner 匂坂 敏朝		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

【背景と目的】

ヒトヘルペスウイルス 6 (Human herpesvirus-6; HHV-6) は 1986 年に、HIV 患者から分離されたウイルスである。ヘルペスウイルスは、さまざまな戦略で宿主免疫応答から逃れ、その感染を成立させている。その一つとして、細胞膜表面での MHC クラス I 分子の発現減少が知られている。我々は今回、HHV-6 ウイルス粒子中に存在する宿主因子の同定を試みたところ、複数の宿主因子が同定され、その中に MHC クラス I 分子が含まれていることが明らかとなった。そこで、MHC クラス I 分子の HHV-6 感染における役割の解析を行った。

【方法】

HHV-6 感染 T 細胞上清中からウイルス粒子を精製し、LC-MS/MS 解析に供した。

同定した宿主因子、MHC クラス I について、ウェスタンブロットおよび電子顕微鏡解析により、ウイルス粒子中におけるその存在の確認を行った。

また、MHC クラス I 分子の感染細胞内における動態を、フローサイトメトリー、ウェスタンブロットおよび蛍光抗体法にて解析した。

【結果】

[1] HHV-6 ウイルス粒子に含まれる宿主因子、MHC クラス I 分子を同定した。

まず、HHV-6 感染細胞の培養上清中からウイルス粒子を含む画分を精製した。精製した画分にウイルス粒子が含まれていることを、HHV-6 のウイルス粒子上に存在するエンベロープ糖タンパクである glycoprotein B (gB) の抗体を用いたウェスタンブロットで確認し、その画分を、LC-MS/MS 解析に供したところ、HHV-6 ウイルス粒子中に、さまざまな宿主因子が含まれていることが明らかになった。その中には、MHC クラス I 分子が含まれていた。

[2] HHV-6 ウイルス粒子中およびエクソソーム中に、MHC クラス I 分子が含まれることを明らかにした。

次に、LC-MS/MS 解析により同定された MHC クラス I 分子が、HHV-6 ウイルス粒子中に含まれているか確認を行った。

HHV-6 感染 T 細胞の上清を回収し、ショ糖密度勾配遠心によりウイルス粒子を精製した。得られたフラクション 1-12 のうち、3-10 をウェスタンブロット解析に供したところ、MHC クラス I 分子は、ウイルス粒子が存在する画分に含まれていた。

HHV-6 の成熟粒子は、MVB (Multivesicular body) のマーカー分子である CD63 を含む小胞 (エクソソーム) とともに 細胞外へ放出されることを、我々は既に報告している (Mori Y, et. al. Traffic. 2008 Sep;9(10):1728-42)。そこで、CD63 抗体を用いた検出も行ったところ、CD63 は、MHC クラス I と同じ画分に含まれていた。

実際にウイルス粒子上に MHC クラス I 分子が存在することを確認するため、得られたウイルス粒子画分を用いた免疫電子顕微鏡観察を行った。その結果、MHC クラス I 分子は、HHV-6 ウイルス粒子上に存在していることが明らかになった。また、MHC クラス I 分子は、エクソソーム上にも存在していることが明らかになった。

[3] HHV-6B 感染細胞膜表面から、MHC クラス I 分子が発現低下していることを明らかにした。

次に、MHC クラス I 分子の HHV-6 感染細胞における動態の解析を行った。

【背景】で述べたように、HHV-6 において、細胞膜表面の MHC クラス I 分子が発現減少しているという報告がある。そこで我々は、HHV-6 感染においても MHC クラス I 分子の細胞膜表面からの発現低下が見られるかをフローサイトメトリーで解析した。その結果、MHC クラス I 分子は、HHV-6B 感染細胞の膜表面から発現低下していた。

MHC クラス I 分子の HHV-6 感染細胞における総発現量を調べるため、感染 72 時間後の細胞を用いてウェスタンブロット解析を行った。その結果、MHC クラス I 分子は、感染細胞内においても発現の低下が認められた。

MHC クラス I 分子の HHV-6 感染細胞での局在を調べるため、HHV-6B 感染 72 時間後の T 細胞をアセトン・メタノール (7:3) で固定し、蛍光抗体法による染色を行った。その結果、MHC クラス I 分子は HHV-6 感染細胞内にて細胞質内に存在し、gB との共局在を示した。

【結論】

MHC クラス I 分子は、ヒトヘルペスウイルス 6 のウイルス粒子に取り込まれ、エクソソーム放出経路を利用して細胞外へ放出されることが示された。

本研究はヒトヘルペスウイルス 6 (human herpesvirus-6, HHV-6) 感染について、その MHC クラス I の動向を研究したものであるが、MHC クラス I の動向を研究したものであるが、従来ほとんど行われていなかった、ウイルス粒子に取り込まれ、細胞外へ放出される重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。