

氏名（本籍）	井上 真紀（群馬県）			
学位の種類	博士（医学）			
学位記番号	博甲第 7504 号			
学位授与年月	平成 27 年 5 月 31 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
審査研究科	人間総合科学研究科			
学位論文題目	Glucocorticoids facilitate the transcription from the human cytomegalovirus major immediate early promoter in glucocorticoid receptor- and nuclear factor-I-like protein-dependent manner. （グルコルチコイドはグルコルチコイド受容体と NF-I 様タンパク質依存的にヒトサイトメガロウイルス major immediate early プロモーターの転写を促進する）			
主査	筑波大学教授	医学博士	須磨崎 亮	
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	長谷川 雄一	
副査	筑波大学講師	博士（医学）	大城 幸雄	
副査	筑波大学講師	博士（医学）	田原 聡子	

論文の内容の要旨

（目的）

ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）は、免疫不全状態にある患者において、初感染または潜伏感染から増殖感染へ移行（再活性化）することで重篤な症状を引き起こす。母子感染では母体の HCMV 感染に起因する胎児への経胎盤感染または産道感染、乳児への母乳感染がある。とくに産科臨床においては、HCMV は妊娠第 3 三半期に、再活性化により産道での検出率が増加することが報告されてきたが、その機構は明らかでない。

HCMV の major immediate early（MIE）遺伝子産物は増殖感染におけるウイルス遺伝子発現の段階的な進行に重要な役割を果たしている。また、グルコルチコイドはグルコルチコイド受容体（GR）を介した転写制御により多彩な作用を生体にもたらす。興味深いことに、妊娠第 3 三半期には血中コルチゾール濃度が上昇することが報告されている。さらに、HCMV 再活性化のトリガーの一つとして、血中コルチゾール濃度の上昇を示唆する報告もあるが、詳細は明らかでない。そこで本研究では、HCMV 再活性化とグルコルチコイドの関連性を解明することを目的とし、グルコルチコイドによる HCMV の MIE 遺伝子発現制御機構について解析を行った。

(対象と方法)

ヒト上皮線維芽細胞 (BJ-TERT 細胞) に HCMV AD169 株を感染後、合成グルココルチコイドであるデキサメサゾン (DEX) 処理を行い、定量 RT-PCR により MIE 遺伝子の転写量を解析した。MIE 遺伝子の転写制御領域をルシフェラーゼ遺伝子に連結したレポータープラスミド pMIEP-Luc を作製して HeLa 細胞に導入し、ルシフェラーゼアッセイおよび定量 RT-PCR により DEX の転写への影響を解析した。また pMIEP-Luc の欠損変異体を用いて、DEX 依存的な転写活性化に関わる領域を同定した。GR のアンタゴニストである RU486 を用いて、MIE 転写促進における GR の依存性を検討した。DEX 応答性の転写調節領域に結合する因子を、ゲルシフトアッセイ (EMSA) により解析した。DEX 応答性領域に結合する因子の依存性について、この領域に点変異を導入したレポータープラスミドを作製して検証した。

(結果)

HCMV 感染細胞における MIE 遺伝子の mRNA 量は、DEX 処理により約 2 倍に増加した。また pMIEP-Luc 欠損変異体を用いたルシフェラーゼアッセイにより、MIE 遺伝子転写開始点から上流約 200 bp にある 17 塩基反復配列を含む領域が DEX による転写促進に重要であることが分かった。またこの 17 塩基反復配列を持つレポーターにおける DEX 依存的な転写促進は、RU486 の添加により抑制された。以上の結果より、17 塩基反復配列を含む領域が、GR および DEX 依存的な MIE 遺伝子の転写促進に関与することが示された。

EMSA による解析から、DEX 応答性の 17 塩基反復配列に結合する因子が Nuclear factor-I (NF-I) 様の性質を持つことが示唆された。ただし、DEX 処理の有無によって、NF-I 様タンパク質の結合に変化はみられなかった。また DEX 応答性の 17 塩基反復配列内に、NF-I 様タンパク質が結合できない変異を導入したところ、DEX による転写促進が観察されなくなった。以上の結果より、NF-I 様タンパク質は 17 塩基反復配列を通して DEX 依存的な MIE 遺伝子の転写促進に関与することが示された。

(考察)

HCMV MIE 遺伝子の転写が、DEX 存在下において GR および NF-I 様因子依存的に促進されることが明らかとなった。おそらく細胞内では、NF-I と未知の応答配列に結合した GR がクロマチン様構造をとった HCMV ゲノム DNA 上で近接することで、協調的に MIE 遺伝子の転写を促進すると考えられる。我々の結果は、グルココルチコイド代謝が HCMV 生活環とそれに関連した疾患に関与することを強く裏付けるものと考えられる。今後は、産道における GR および NF-I の機能に着目することで、妊娠第 3 三半期における血中コルチゾール濃度の上昇と局所での HCMV 再活性化の関連性の解明に迫れる可能性があり、産科臨床の発展にも貢献できると期待される。

(結論)

グルココルチコイドが、GR と NF-I 様タンパク質依存的に HCMV MIE 遺伝子の転写を促進することにより、ヒトサイトメガロウイルスが再活性化する可能性が示された。

審査の結果の要旨

(批評)

井上真紀氏は、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) の増殖に必要な major immediate early (MIE) 遺伝子の発現が、グルココルチコイド受容体と Nuclear factor- κ B 様タンパク質による協調的な MIE 遺伝子の転写促進によって起こることを証明した。従来から産科的な知見として、妊娠末期に産道で HCMV の再活性化が起こりやすい事が知られていたが、本研究の結果はこの現象が妊娠母体中のグルココルチコイド増加によって起こることを示唆している。先天性サイトメガロウイルス感染症は臨床的に重要な課題であり、その発生病態を分子生物学的に解析した点が高く評価される。

平成 27 年 3 月 23 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。