

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20304

研究課題名(和文) サイトメガロウイルス角膜内皮炎ex vivo感染モデル確立とウイルス遺伝子型解析

研究課題名(英文) Analysis of cytomegalovirus replication in organ-cultured cornea and genotypes of cytomegalovirus corneal endotheliitis

研究代表者

細貝 真弓 (Hosogai, Mayumi)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20760177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：サイトメガロウイルス(CMV)が免疫正常者の角膜内皮炎に関連することが報告されているが、CMVが角膜内皮で増殖するかどうかは不明であった。これまでに初代培養角膜内皮細胞でCMV実験室株が非常に効率よく増殖できるという知見を得た。本研究では、器官培養したヒト角膜を用いて、角膜上皮、実質、内皮におけるCMVの増殖パターンを検討した。その結果、全てのCMV実験室株が複製し、角膜内皮における水平方向および角膜実質への垂直方向への増殖拡大が明らかとなった。また、CMV実験室株の遺伝子型との相同性を検討することを目的に、眼内液から抽出したDNAを用いて全ゲノム解析を試み、新たな知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The clinical evidence for cytomegalovirus (CMV) corneal endotheliitis in immunocompetent patients has continued to accumulate, but it remains to be confirmed whether CMV can replicate in corneal endothelial cells. We have obtained the finding that CMV laboratory strains could replicate efficiently in primary cultured corneal endothelial cells. In this study, we examined growth pattern of CMV in corneal epithelium, stroma, and endothelium using organ-cultured human corneas. All CMV laboratory strains could replicate, and expand horizontally in the corneal endothelium and perpendicularly to the corneal stroma. In order to compare the genotype of the CMV laboratory strains, we attempted to sequence for the CMV genotyping using the small amount of DNA extracted from intraocular fluid of the patients. So far, we have amplified the CMV genome and accumulated sequence data. We are continuously analyzing the genotyping of CMV focusing on the indispensable genes.

研究分野：眼科学

キーワード：サイトメガロウイルス 角膜内皮炎 眼感染症 ぶどう膜炎 次世代シーケンス 器官培養 PCR 遺伝子型

1. 研究開始当初の背景

角膜内皮炎は、角膜の透明性維持に必須の役割を果たす角膜内皮の炎症によって、角膜の浮腫と混濁を生じる重症疾患である。2006年にサイトメガロウイルス (cytomegalovirus:CMV)が原因の一部であることが報告されてから (Koizumi N, et al., *Am J Ophthalmol*, 2006) 臨床報告が蓄積し、近年厚生労働省の研究班より診断基準が提唱された (Koizumi N, et al., *Br J Ophthalmol*, 2015)。CMV は多くの成人に不顕性に潜伏感染し、免疫不全状態で再活性化して日和見感染症をおこすことが知られてきたが、CMV 角膜内皮炎は免疫正常者において発症する。角膜内皮の炎症所見と PCR による前房水からの CMV ゲノム検出により「CMV 角膜内皮炎」と診断しているが、角膜内皮細胞に CMV が感染していること自体は証明されておらず、CMV が角膜内皮細胞に感染を生じるのか、増殖することができるのかなど病態は不明であった。

ヒトサイトメガロウイルス (human cytomegalovirus:HCMV)の感染様式には、ウイルス粒子産生が停止した潜伏感染と、ウイルスの複製に必要なウイルス遺伝子が全て発現してウイルスが増殖する溶解感染がある。ヒト包皮線維芽細胞 (human foreskin fibroblasts : HFF) ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells : HUVEC) などの初代培養細胞での効率的な増殖が報告されているが、初代培養ヒト角膜内皮細胞 (human corneal endothelial cells : HCEC) での検討はまだなされていなかった。そこで、初代培養 HCEC に HCMV を接種し、HCMV が増殖できるのか、HCMV の感染様式を検討した結果、初代培養 HCEC で HCMV が非常に効率よく増殖できる (溶解感染する) という知見を得た (Hosogai M, et al., *Br J Ophthalmol*, 2015)。

初代培養 HCEC と既に効率的に溶解感染することが知られている HFF に、HCMV 臨床分離株由来 TB40/E 株および実験室株 Towne 株を接種した。両株ともに初代培養 HCEC と HFF でほぼ同等に、HCMV 遺伝子・蛋白を経時的に発現し、感染細胞の核内に「ウイルス DNA 複製の場」が形成され、ウイルスゲノムの効率的な複製を認めた。光学顕微鏡下で CMV 感染細胞に特徴的な「ふくろうの目」のような細胞変性効果を認め、透過型電子顕微鏡ではウイルス粒子を感染細胞内に観察することができた。

初代培養 HCEC は培養条件によって線維化するといわれており (Lee H.T, et al., *J Biol Chem*, 2004)、感染許容性に影響を与えた可能性がある。遺伝子レベルでの形質転換を完全に抑制する方法は報告されていないため、角膜の器官培養をして HCMV を感染させ CMV 角膜内皮炎の *ex vivo* 感染モデルを確立しようと考えた。

また、HCMV には遺伝子多型があり、一

個体に様々な株が感染しているといわれている (Renzette N, et al., *PLoS Genet*, 2013)。TB40/E 株は、骨髄移植後の免疫不全者の咽頭拭い液から分離された株由来であり (Sinzger C, et al., *J Gen Virol*, 2008)、角膜内皮炎を来す株とは限らない。さらに、眼科領域での CMV 日和見感染症として網膜炎が従来より知られてきたが、角膜内皮炎は免疫正常者に発症し、両疾患を併発する例は少ない。患者背景の異なる症例に発症する要因の1つとして、網膜炎と角膜内皮炎を来す HCMV の遺伝子型が異なる可能性を推測し、HCMV 遺伝子型と各疾患との関連および TB40/E 株などの HCMV 実験室株の遺伝子型との相同性を検討しようと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、

CMV 角膜内皮炎の *ex vivo* 感染モデルの確立

角膜の器官培養の系で、HCMV が HCEC で増殖できるかどうかを検討する。

CMV 眼感染症における HCMV 遺伝子型の解析

CMV 眼感染症患者の眼検体より検出された HCMV の遺伝子型を解析し、各疾患と HCMV 遺伝子型との関連や、感染実験で用いた HCMV 実験室株の遺伝子型との相同性を検討する。

以上の2点を達成することを目的とし、「HCMV が器官培養した HCEC で増殖できるのか」、「HCMV の遺伝子型と臨床病型との違いに関連はあるのか」を検討した。

3. 研究の方法

CMV 角膜内皮炎の *ex vivo* 感染モデルの確立

米国アイバンク Sight Life より購入した研究用角膜を用いて、角膜の器官培養をした (Armitage WJ, et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014)。これまでの *in vitro* 感染実験において初代培養 HCEC で効率よく増殖した HCMV TB40/E 株および Towne 株に加え、FIX 株を、器官培養角膜の内皮側に接種した。HCMV の遺伝子・蛋白の発現、ゲノム複製を経時的に解析し、培地を経時的に回収しウイルス感染価を測定した。HCMV 接種後角膜全層組織のホルマリン固定パラフィン包埋切片を作製し、免疫染色で組織中の HCMV 蛋白を、HCMV に特異的なプローブを用いた FISH (蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション) 法で組織中の HCMV ゲノムの有無・局在を調べた。上記結果から HCMV が器官培養した HCEC で増殖できるのか、株間の違いはあるのかを検討した。

CMV 眼感染症における HCMV 遺伝子型の解析

眼検体 (前房水もしくは硝子体液) から

PCRでHCMV-DNAが検出され、CMV角膜内皮炎もしくはCMV網膜炎の診断に至った症例のうち、ホームページ上の公示に対して撤回の申し出がなかった症例の保存DNA検体を用いた。

眼検体から抽出されるDNAは微量であるため、MiSeq(イルミナ株式会社)、Ion PGMTMシステム(Life Technologies社)それぞれの次世代シーケンサーで解析可能なライブラリー作製法を検討した。得られたHCMV遺伝子配列の情報から、HCMVの細胞への感染に必要なウイルス遺伝子を中心にHCMVの遺伝子型の解析を行い、臨床病型(CMV角膜内皮炎かCMV網膜炎か)とHCMV遺伝子型との関連、初代培養HCECと器官培養した角膜の感染実験で用いたHCMV実験室株TB40/E株、Towne株、FIX株の遺伝子型との同相性の検討を試みた。

4. 研究成果

研究用ヒト角膜全層を器官培養し、角膜内皮側にそれぞれHCMV TB40/E株、Towne株、FIX株を接種した。経時的に器官培養角膜を回収し、角膜上皮、実質、デスメ内皮に分離して、DNA、RNA、蛋白を抽出した。HCMV前初期、初期、後期遺伝子をreal-time RT-PCR法で、HCMV前初期、初期、後期蛋白をWestern blot法で解析したところ、いずれの株も経時的な発現を認めた。また、real-time PCR法でHCMVゲノムの複製を確認することができた。経時的に回収した培地のTCID₅₀法によるHCMV感染価は、TB40/E株が高い傾向にあった。

HCMV遺伝子・蛋白・ゲノムは全層角膜組織を分離しホモジナイズして解析をしたため、組織でのHCMVの局在は検討できない。そこで、HCMV各株を接種した全層角膜組織のホルマリン固定パラフィン包埋切片を作製し、免疫染色で組織中のHCMV蛋白を、HCMVに特異的なプローブを用いたFISH法で組織中のHCMVゲノムの検出を試みた。

免疫染色は、アビジン-ビオチンシステム(SAB法)により、抗CMV抗体(Dako)を用いて行った。FISH法のCMV特異的プローブは、HCMV-BAC-DNA全長にNick Translation Kit(Abbott Molecular)を用いてラベリングをして作成した。免疫染色およびFISH法の陽性コントロールとして、CMV肺炎標本を用いた。その結果、3つ全てのHCMV実験室株が複製し、角膜内皮における水平方向および角膜実質への垂直方向への増殖拡大が明らかとなった。

また、これらHCMV実験室株と、患者から検出されたCMVの遺伝子型の同相性や、臨床病型(角膜内皮炎か網膜炎か)との関連を検討することを目的に、眼内液から抽出した微量なDNAを用いてCMV全ゲノム解析を試みた。

まず、MiSeq、Ion PGMTMシステム、それぞ

れの次世代シーケンサーで解析可能なライブラリー作製法を検討した。その一例として、Ovation[®] SP+ Ultralow DR Multiplex System 1-8キット(タカラバイオ)によりシーケンスライブラリーを作製し、MiSeqで75-base paired-end readシーケンシングを1ラン施行した。その結果、DNA量が0.27 ngの検体以外で、シーケンス可能なシーケンスライブラリーを得ることができ、本法では総DNA量の下限値はおよそ0.3~1 ngと考えられた。シーケンスの結果、トリミング後のリード数は十分であったが、参照配列HCMV Merlin株(Gen Bank Accession No. AY446894.2)へのマップ率は0.011%から1.063%と低値であり、解析データの多くをヒトゲノムが占めた。平均カバレッジは0.098から14.349倍で、8倍以上のサンプルはCMVコピー数が10⁵コピー/ml以上の検体だったことから、概ねCMVコピー数は10⁵コピー/ml以上必要であることが示唆された。

これらの検討から、検体中の総DNA総量(患者のヒトDNA+HCMV DNA)が少ない検体は、REPLI-g Mini Kit(QIAGEN)を用いて全ゲノム増幅をした。さらに、HCMV各株に同相性が高い配列を選択してプライマーを設計し、HCMV全ゲノムをロングPCRで特異的に増幅した後に、順次シーケンスを行った。引き続き、HCMVシーケンスデータを蓄積し、細胞への感染に必要な遺伝子を中心にHCMV遺伝子型の解析を行い、HCMV実験室株TB40/E株、Towne株、FIX株の遺伝子型との同相性や、臨床病型との関連について検討している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Miyazaki Dai, Uotani Ryu, Inoue Michiko, Haruki Tomoko, Shimizu Yumiko, Yakura Keiko, Yamagami Satoru, Suzutani Tatsuo, Hosogai Mayumi, Isomura Hiroki, Inoue Yoshitsugu, Corneal endothelial cells activate innate and acquired arm of anti-viral responses after cytomegalovirus infection, *Experimental Eye Research*, 査読有、161巻、2017、143 - 152

DOI: 10.1016/j.exer.2017.06.017

Hosogai Mayumi, Nakatani Yoko, Mimura Kensuke, Kishi Shoj, Akiyama Hideo, Genetic analysis of varicella-zoster virus in the aqueous humor in uveitis with severe hypphema, *BMC Infectious Disease*, 査読有、17(1)、2017、427

DOI: 10.1186/s12879-017-2518-2

Yanagisawa Kunio, Ogawa Yoshiyuki,

Hosogai Mayumi, Todokoro Daisuke, Mitsui Takeki, Yokohama Akihiko, Cytomegalovirus retinitis followed by immune recovery uveitis in an elderly patient with rheumatoid arthritis undergoing administration of methotrexate and tofacitinib combination therapy、*Journal of Infection and Chemotherapy*、査読有、23(8)、2017、572 - 575
DOI : 10.1016/j.jiac.2017.03.002
細貝真弓、サイトメガロウイルス感染と眼疾患、眼科、査読無、59 巻、2017、37 - 46
<https://www.kanehara-shuppan.co.jp/magazines/detail.html?kubun=02453&code=024532017010>

〔学会発表〕(計 5 件)

細貝真弓. 眼炎症性疾患におけるヘルペスウイルス研究奮闘記. 第 15 回新潟女性眼科医の会. 2017 年 11 月 4 日、ホテル日航新潟 (新潟県新潟市)

細貝真弓、中谷陽子、鈴木崇、高瀬博、杉田直、白石敦、秋山英雄. サイトメガロウイルス前部ぶどう膜炎におけるガンシクロビル耐性変異株の検索. 第 71 回日本臨床眼科学会. 2017 年 10 月 13 日、東京国際フォーラム (東京都千代田区)

細貝真弓、中谷陽子、濱中輝彦、高瀬博、横尾英明、秋山英雄. サイトメガロウイルス陽性続発緑内障の隅角組織におけるウイルス DNA 検出と病理組織学的検討. 第 64 回 北関東医学会総会. 2017 年 9 月 21 日、刀城会館 (群馬県前橋市)

細貝真弓、濱中輝彦、高瀬博、横尾英明、秋山英雄. サイトメガロウイルス陽性続発緑内障の病理学的検討. 第 121 回日本眼科学会総会. 2017 年 4 月 8 日、東京国際フォーラム (東京都千代田区)

清水大輔、宮崎大、清水由美子、細貝真弓、磯村寛樹、井上幸次. サイトメガロウイルスは線維柱帯細胞に感染するか?. 第 121 回日本眼科学会総会. 2017 年 4 月 8 日、東京国際フォーラム (東京都千代田区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織
(1)研究代表者
細貝 真弓 (HOSOGAI, Mayumi)
群馬大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 : 20760177

(2)研究分担者 ()

研究者番号 :

(3)連携研究者 ()

研究者番号 :

(4)研究協力者 ()