

機関番号：13802
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590396
 研究課題名（和文）ウイルス性脳症におけるウイルスの抗アポトーシス作用と脳障害発生機構の解析
 研究課題名（英文）A study of the participation of viral anti-apoptotic factor in the pathogenesis of developmental brain disorders induced by viral infection
 研究代表者
 小杉 伊三夫 （KOSUGI ISAO）
 浜松医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：10252173

研究成果の概要（和文）：ウイルス由来の抗アポトーシス(細胞死)蛋白は、宿主細胞のアポトーシス関連蛋白に作用し細胞死を抑制する。同時に、持続感染を成立させ細胞の機能障害や癌化を生ずると考えられている。発育期の脳神経細胞におけるサイトメガロウイルス(CMV)の持続感染は、精神発達遅滞や精神障害の要因として重要である。本研究では、CMV が持続感染している神経細胞において、CMV の抗細胞死蛋白である M45 蛋白が、どのような病的作用を持つか検討した。野生型の CMV と M45 蛋白が欠損した CMV が感染した神経細胞の突起を比較すると、野生株では突起の成長が阻害されるが M45 欠損 CMV では見られなかった。この結果から、M45 蛋白は細胞死を抑制すると共に、神経細胞の発達を障害すると推測された。

研究成果の概要（英文）：Virus-derived anti-apoptotic protein not only blocks cell death, but also establishes persistent infection, resulting in functional disturbances and malignant transformation of host cells. Cytomegalovirus (CMV) persistently infects developing cerebral neurons, and is the leading viral cause of developmental brain disorders in humans. In this study, we have investigated the impact of M45 protein, a representative of CMV-derived anti-apoptotic proteins, on the development of cerebral neurons. Wild type CMV inhibited the arborization of dendrites in developing neurons, however, M45-deleted CMV did not. This result indicates that M45 protein not only blocks cell death, but also disturbs neuronal development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学
キーワード：発生病理

1. 研究開始当初の背景

ウイルス由来の抗アポトーシス蛋白は、宿主細胞のアポトーシス関連蛋白に作用し細胞死を抑制する。同時に、持続感染を成立させ細胞の機能障害や癌化を生ずると考えられている。発育期の脳神経細胞におけるウイルスの持続感染は、精神発達遅滞や精神障害の要因として重要である(小杉, 細胞工学 2007)。この場合もウイルスの抗アポトーシス作用の関与が推測される。

研究代表者らは、マウスサイトメガロウイルス(MCMV)が発育期の海馬・大脳皮質の神経細胞に持続感染し、感染神経細胞が高濃度グルタミン酸によるアポトーシス(興奮毒性細胞死)に対して抵抗性を示すことを初めて明らかにした(Kosugi et al, Acta Neuropathol 1998, Am J Pathol 2002)。さらに、感染神経細胞においてシナプス可塑性等の重要な神経機能に関わるNMDA受容体の発現が低下することを報告した(Kosugi et al, Acta Neuropathol 2005)。これらの結果から、CMV感染神経細胞では、ウイルスの抗アポトーシス作用による細胞死の抑制がウイルスの持続感染を成立させると共に、NMDA受容体等の神経細胞機能の障害を生じ発達障害を引き起こすのではないかという仮説を呈示するに至っている(仮説図)。これらの現象にはウイルス由来の抗アポトーシス蛋白が関与すると考えられるが詳細は明らかでない。

MCMV由来の抗アポトーシス蛋白としては、M36、M37、M45 が報告されている。前二者はそれぞれカスパーゼ8とミトコンドリアに作用してアポトーシスを抑制する(McCormick et al, Virology 2003)。M45はマクロファージと血管内皮でアポトーシスを抑制することが知られているが(Brune et al, Science 2001)、詳細な分子機構は未だ不明である。一方、研究代表者らは、MCMVの細胞質抗原に対する単クローン抗体(clone Q3)を樹立し、この抗原を発現する神経細胞で細胞死の抑制を観察したが(Kosugi et al, Acta Neuropathol 1998)、最近Q3がM45蛋白に対

する抗体であることを確認できた。

2. 研究の目的

MCMV由来抗アポトーシス蛋白の感染神経細胞におけるアポトーシス抑制と機能障害への関与について、特にM45蛋白を中心に検討する。具体的には、1) M45遺伝子を欠失した組換えMCMVを作製する。2) 神経細胞への*in vivo*並びに*in vitro*感染実験によってアポトーシスに及ぼす影響を観察する。3) MCMV感染及びM45遺伝子導入された神経細胞において、M45蛋白の抗アポトーシス作用以外の機能障害について検討する。

3. 研究の方法

(1) M45遺伝子を欠失した組換えMCMVの作製。MCMVゲノムのM45遺伝子をMCMVe1プロモーター-EGFPカセットで置き換えることで、M45遺伝子欠失MCMV(rMCMV-ΔM45)を作製する。具体的には、e1Pro-EGFPカセットをMCMV-M45遺伝子上流域及び下流域のflanking配列で挟んだ直鎖DNAを作製し、MCMV Smith株を用いた相同組換えによってrMCMV-ΔM45株を樹立する。さらに、rMCMV-ΔM45に欠失したM45遺伝子を組み込んだRescue Virusを作製する。

(2) 神経細胞への*in vitro*感染実験による観察。初代培養神経細胞にrMCMV-ΔM45を感染させ、M45遺伝子を持ちEGFPを発現するrMCMV-EGFPを感染させた神経細胞と比較する。

(3) MCMVが発育期大脳神経細胞の樹状突起形成に及ぼす影響の解析。共焦点レーザー顕微鏡を用いて感染神経細胞を観察し、神経突起の面積を画像解析によって計測する。

4. 研究成果

(1) M45遺伝子を欠失した組換えMCMVの作製。MCMVゲノムのM45遺伝子をMCMVe1プロモーター-EGFPカセットで置き換えたM45遺伝子欠失MCMV(rMCMV-ΔM45)に加え、hEFプロモーター-EGFPカセットで置き換えたrMCMV-ΔM45も作製した。さらに、挿入カセットの両端にloxP siteを組み込み、組換えウイルス感染細胞をCre recombinase処理することでhEFプロモーター-EGFPカセットを容易に除去出来るようにした。その結果、EGFPを発現しないrMCMV-

ΔM45とRescue Virus を作製することに成功した。人工的に組み込まれたEGFPの影響の無い組み換えウイルスを用いた実験が可能となった。

(2) 神経細胞への *in vitro* 感染実験による観察。初代培養神経細胞にrMCMV-ΔM45を感染させ、M45遺伝子を持ちEGFPを発現するrMCMV-EGFPを感染させた神経細胞と比較した。rMCMV-EGFP感染神経細胞は感染のみでは細胞死は生じなかった(図1)。また、感染神経細胞では、以前報告したように高濃度グルタミン酸暴露による興奮毒性細胞死に対して抵抗性を認めた。一方、rMCMV-ΔM45感染神経細胞では、細胞死を抑制するM45蛋白の発現が欠失している事を、抗M45抗体(Q3抗体)を用いて確認できた。従って、rMCMV-ΔM45感染神経細胞では細胞死を生ずることが予想されたが、rMCMV-EGFP感染神経細胞と同様に細胞死を生ずることは無かった。rMCMV-ΔM45はM45以外の細胞死抑制遺伝子をまだ保有していることから、これらの遺伝子産物が細胞死を抑制している可能性が高いと考えられた。従って、神経細胞ではM45蛋白は細胞死への関与は少なく、他の神経細胞機能障害に関与することが予想された。

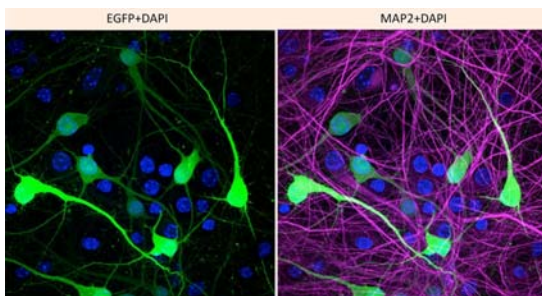


図1 MCMV-EGFP感染4日後の神経細胞

(3) MCMVが発育期大脳神経細胞の樹状突起形成に及ぼす影響をより詳細に行なった。マウス胎児から採取した初代培養神経細胞に上記の組換えウイルスを感染させ、感染後4〜6日で固定した培養細胞において樹状突起マーカーであるMAP2蛋白を免疫染色した。画像解析ソフトウェア(Image J)を用いて感染細胞と非感染細胞のMAP2陽性樹状突起面積を別々に計測する画像解析法を開発した(図2)。その結果、MCMV(Smith株)及びrMCMV-EGFP何れにおいても感染神経細胞の形状は、太さ3μm以上の樹状突起が1〜2本と非感染細胞に比べ突起数が少ない傾向を呈した。細胞一個あたりのMAP2陽性領域の面積は、MCMV(Smith株)、rMCMV-EGFP感染神経細胞、非感染神経細胞で、440、390、890 μm²

であった(図3)。さらに、rMCMV-ΔM45が感染した神経細胞では樹状突起面積の減少を殆ど認めなかった(790 μm²)(図4)。以上から、CMVが発育期神経細胞の樹状突起形成を障害し、この障害にウイルス由来のM45蛋白が関わる可能性が推測された。また、これらの実験結果からウイルスの抗細胞死蛋白が細胞死抑制とは異なる新たな病原性作用を持つことが示唆された(図5)。

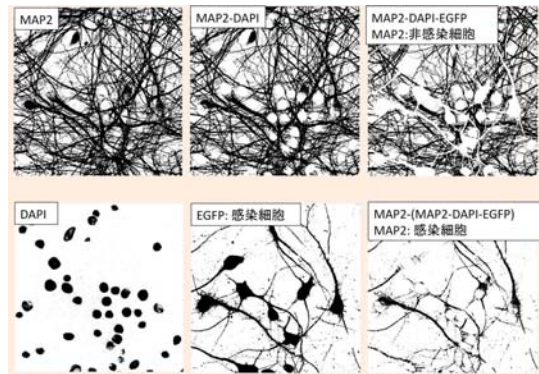


図2 MCMV感染・非感染細胞におけるMAP2陽性領域の画像解析

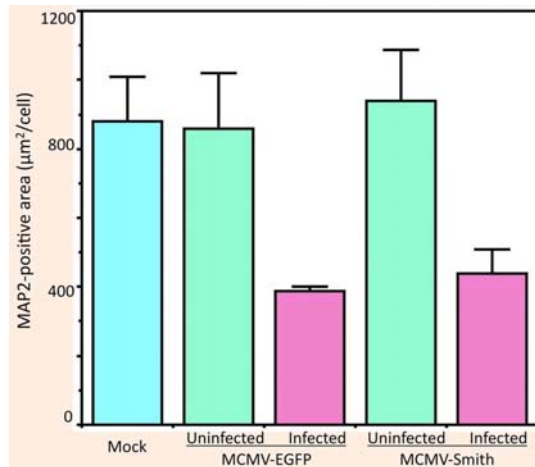
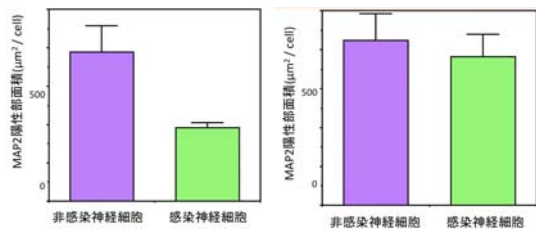


図3 神経細胞におけるMCMV感染によるMAP2陽性領域の減少



MCMV-EGFP MCMV-ΔM45

図4 rMCMV-ΔM45が感染した神経細胞では樹状突起面積の減少を認めない

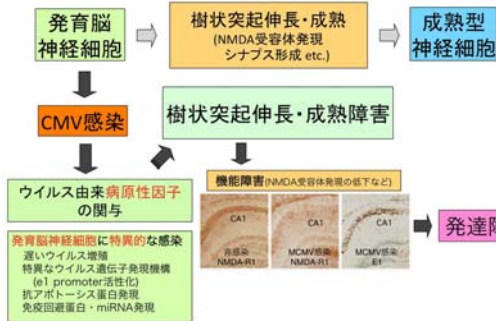


図5 まとめと考察

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 10 件)

- ①. Suzuki, M., Kosugi, I., Terada, T., et al. A case of Epstein-Barr virus associated post-transplant lymphoproliferative disorder with central nervous system involvement. *Neuropathology* 査読有 31, 2011
- ②. Kawasaki H, Kosugi I, Arai Y, Iwashita T, Tsutsui Y. Mouse Embryonic Stem Cells Inhibit Murine Cytomegalovirus Infection through a Multi-Step Process. *PLoS One* 査読有 6, e17492, 2011
- ③. Yamada, S., Kosugi, I., Katano, H., Fukui, Y., Kawasaki, H., Arai, Y., Kurane, I., Inoue, N. In vivo imaging assay for the convenient evaluation of antiviral compounds against

cytomegalovirus in mice. *Antiviral Res* 査読有 88, 45-52, 2010

- ④. Kawasaki, H., Ogura, H., Arai, Y., Baba, S., Kosugi, I. et al. Aggressive progression of breast cancer with microscopic pulmonary emboli possessing a stem cell-like phenotype independent of its origin. *Pathol Int* 査読有 60, 228-234, 2010
- ⑤. 小杉伊三夫. 特集: ヘルペスウイルス HHV-5(CMV). *ウイルス* 査読無 66, 209-220, 2010
- ⑥. Isobe T, Hattori T, Kitagawa K, Uchida C, Kotake Y, Kosugi I, Oda T, Kitagawa M. Adenovirus E1A inhibits SCF(Fbw7) ubiquitin ligase. *Journal of Biological Chemistry* 査読有 284, 27766-79, 2009
- ⑦. 小杉伊三夫, 梁明秀. 幹細胞とウイルス感染症. *医学のあゆみ* 査読無 229, 720-25, 2009
- ⑧. Li L, Kosugi I, Han GP, Kawasaki H, Arai Y, Takeshita T, Tsutsui Y: Induction of cytomegalovirus-infected labyrinthitis in newborn mice by lipopolysaccharide, a model for hearing loss in congenital CMV infection. *Lab Invest.* 査読有 88(7), 722-30, 2008
- ⑨. Fukui Y, Shindoh K, Yamamoto Y, Koyano S, Kosugi I, Yamaguchi T, Kurane I, and Inoue N: Establishment of a Cell-Based Assay for Screening of Compounds Inhibiting Very Early Events in the Cytomegalovirus Replication Cycle and Characterization of a Compound Identified Using the Assay Antimicrob Agents Chemother 査読有, Vol. 52, No. 7:2420-2427, 2008
- ⑩. Tsutsui Y, Kosugi I, Kawasaki H, Arai Y, Han GP, Li L, Kaneta M: Roles of neural stem progenitor cells in cytomegalovirus infection of the brain in mouse models. *Pathol Int*, 査読有 58(5), 257-267, 2008

[学会発表] (計 12 件)

- ①. Yamada, S., Kosugi, I., Katano, H., Fukui, Y., Kawasaki, H., Arai, Y., Kurane, I., N. Inoue. : In vivo imaging assay for the convenient evaluation of antiviral compounds against cytomegalovirus in mice: 2010 Congenital Cytomegalovirus Conference, France (2010.9)
- ②. 小杉伊三夫、発育期大脳神経細胞におけるサイトメガロウイルス持続感染と脳発達障害:感染神経細胞における樹状突起の解析、第99回日本病理学会総会、平成22年4月28日、東京
- ③. 小杉伊三夫、発育期大脳神経細胞におけるマウスサイトメガロウイルス感染と脳発達障害 第25回ヘルペスウイルス研究会、平成22年5月27日、浜松
- ④. 小杉伊三夫、発育期大脳神経細胞におけるマウスサイトメガロウイルス感染と脳発達障害、第58回日本ウイルス研究会、平成22年11月5日、徳島
- ⑤. Isao Kosugi, Yoshifumi Arai, Hideya Kawasaki, Yoshihiro Tsutsui: Differential activation of murine cytomegalovirus *el* promoter in neurons during infection of the developing mouse brain and primary neuronal culture 第12回国際サイトメガロウイルスワークショップ、米国, 2009.5
- ⑥. 小杉伊三夫、発育期大脳神経細胞におけるサイトメガロウイルス持続感染と脳障害発症機構の解析、第98回日本病理学会総会、平成21年5月1日、京都
- ⑦. 小杉伊三夫、発育期大脳神経細胞におけるマウスサイトメガロウイルス感染と脳障害発症機構の解析、第24回ヘルペスウイルス研究会、平成21年7月2日、裾野
- ⑧. 小杉伊三夫、発育期大脳神経細胞におけるマウスサイトメガロウイルス感染と脳障害発症機構の解析、第57回日本ウ

イルス研究会、平成21年10月26日、東京

- ⑨. Kosugi I., Arai Y, Kawasaki H, Li L, Tsutsui Y: A unique activation of murine cytomegalovirus *el* promoter in neurons during the infection of the developing mouse brain and primary neuronal culture, 第33回国際ヘルペスウイルスワークショップ, ポルトガル, 2008.7
- ⑩. 小杉伊三夫、発育期大脳神経細胞におけるサイトメガロウイルス持続感染と脳障害発症機構の解析、第97回日本病理学会総会、平成20年5月12日、金沢
- ⑪. 小杉伊三夫、発育期大脳神経細胞におけるマウスサイトメガロウイルス感染と脳障害発症機構の解析、第23回ヘルペスウイルス研究会、平成20年6月10日、鳥取
- ⑫. 小杉伊三夫、発育期大脳神経細胞におけるマウスサイトメガロウイルス感染と脳障害発症機構の解析、第56回日本ウイルス研究会、平成20年10月26日、岡山

[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

小杉 伊三夫 (KOSUGI ISAO)
浜松医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10252173

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

河崎 秀陽 (KAWASAKI HIDEYA)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号：90397381

新井 義文 (ARAI YOSHIFUMI)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号：30381784