

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790301

研究課題名（和文）幹細胞でのサイトメガロウイルス再活性化におけるシクロフィリンの役割

研究課題名（英文）ENROLEMENT OF THE CYCLOPHILIN IN THE REACTIVATION OF CYTOMEGALOVIRUS IN STEM CELLS

研究代表者

河崎 秀陽 (KAWASAKI HIDEYA)

浜松医科大学 医学部病理学第二講座 助教

研究者番号：90397381

研究成果の概要（和文）：CMV 感染感受性は細胞の分化過程に依存しており、CMV 前初期 promoter 活性の違いに依存している可能性が高いと予想した。その仮説をもとに、ES 細胞を使って CMV 感染におけるクロマチンリモデリングとシクロフィリンの研究をすすめていたが、実験の過程で ES 細胞は CMV が入りにくい細胞であることがわかり、ES 細胞の CMV 感染抵抗性の機序を詳細に解明することとなった。

研究成果の概要（英文）：Susceptibility of CMV depends on differentiation process of the cells. We hypothesized that the susceptibility to CMV may highly dependent on CMV IE promoter. According to the hypothesis we have proceeded the experiment to reveal the relationship between cyclophilin and MCMV IE promoter. Unexpectedly we have found that ES is the cell showing the resistance to CMV genome entry into the cell nucleus. Now we are doing the experiment to find the mechanism of the resistance to CMV in ES.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：サイトメガロウイルス、シクロフィリン、幹細胞

1. 研究開始当初の背景

CMV は胎生期の幼弱な脳へ感染すると脳障害を起すことが知られている。また成人においては免疫不全状態、特に AIDS において CMV 脳炎を合併する。これらは脳における CMV 感

染感受性が感染感受性細胞の量と免疫状態の両方に依存していることを示している。我々はマウス神経幹・前駆細胞がマウスサイトメガロウイルス(MCMV)に感受性を示すこ

と (Lab Invest, 80:1373-1383)、マウス大脳での MCMV 感受性は神経前駆細胞の量により規定される可能性 (Lab Invest, 82:1347-1358. 2002) や神経幹・前駆細胞に CMV が潜伏感染する可能性 (J Virol. 76: 7247-7254. 2002) を発表した。

CMV 感染感受性のある神経幹・前駆細胞を脳へ移植することは、拒絶反応を引き起こし、その炎症刺激 (拒絶反応) により CMV 再活性化の問題をおこす可能性が高い。そこでわれわれは免疫抑制剤が神経幹・前駆細胞において、CMV 感染へいかなる影響を及ぼすのか検索する必要があった。そして神経幹・前駆細胞において免疫抑制剤であるシクロスポリン A (CsA) が CMV 増殖抑制を認めることを発見した。神経幹・前駆細胞は MCMV 感染後 CsA 存在下で 2 ヶ月以上感染抑制状態を保持することができ、その後 CsA を除去すると CMV 感染が再び増加した。これは神経幹・前駆細胞における CMV の潜伏感染と再活性化の一機序を示している可能性がある。CsA 同様の calcineulin 阻害剤である FK506 では CMV 感染抑制効果はみられず、シクロスポリン A と FK506 の作用機序が異なる可能性が示された。そこでシクロスポリン A の結合タンパクであるサイクロフィリン (cyclophilin) に着目し、このタンパクの特異的阻害剤である NIM811 が MCMV の増殖を抑制することを明らかにした (図)。cyclophilin A に対する siRNA を用いても同様の CMV 抑制効果がみられた。これらの結果は神経幹・前駆細胞において MCMV 感染感受性は cyclophilin と関連することが示唆され、cyclophilin の抑制は CMV 前初期蛋白発現抑制や CMV 前初期 mRNA の発現抑制にも影響を与えていた (図)。これは cyclophilin が CMV 前初期遺伝子プロモーターにおけるクロマチンリモデリングに関わる可能性を示唆した

ES 細胞、神経幹細胞移植は Parkinson 病、脳梗塞、ALS などの難病神経疾患、糖尿病、心筋梗塞の治療にますます盛んに適用されることが予想される。今回の実験を通して、cyclophilin と CMV 再活性化との関わりを分子学的に明らかにできれば、幹細胞移植における CMV 再活性化病理機序の一部を解明することができる可能性のみならず、再生治療や神経幹細胞移植における CMV 再活性化の予防の基礎研究となりうると予想した

2. 研究の目的

神経幹・前駆細胞、ES 細胞における cyclophilin とクロマチンリモデリングとの関係を解析し、CMV 再活性化の病理機序と潜伏感染機序を明らかにすることである。具体的には

- 1) 幹細胞における cyclophilin とクロマチンリモデリングに関係する分子との関わりを明らかにする。MCMV IE promoter 活性を決定する分子機序を解明することであり、HDAC、クロマチンのアセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化と cyclophilin との関係性を明らかにし、それらの CMV IE promoter への影響を明らかにする。
- 2) cyclophilin 発現量変化が、HDAC 分子をはじめとするクロマチンリモデリングに関わる分子の働きをどのように制御し CMV 活性化に誘導するのか、その具体的な機序を明らかにする。
- 3) マウスを使用した *in vivo* 実験系で、神経幹細胞移植後、cyclophilin の発現をおさえることで CMV の再活性化を抑制するか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

CMV 感染におけるクロマチンリモデリングとサイクロフィリンの研究をすすめていたが、実験の過程で ES 細胞は CMV が入りにくい細

胞であることがわかり、ES 細胞の CMV 感染抵抗性の機序を詳細に解明することとなった。

1) ES 細胞分離、培養: ES/KSR 培地 (600ml) DMEM 500ml, KSR 100ml, ビルビン酸溶液 6ml, non essential amino acids 6ml, 2ME 600 μ l (10^{-4} M), LIF 600 μ l (1000U/ml), 抗生剤

2) Alcaliphosphatase (ALP) 染色、Nanog2, Sox2, Oct3/4 免疫染色にて ES 細胞の同定

3) MCMV e1(1.4)-GFP promoter recombinant virus, MCMV human elongation factor (hEF)-GFP promoter recombinant virus の作製。MCMV smith 株由来の E1 promoter-GFP、plasmid 由来の hEF promoter を MCMV のゲノム 184443 と 187158 にホモログスリコンビネーションにてウイルス作成し、分離増殖。

4) ES, MEF に各ウイルス濃度で感染し、経時的に細胞を採取。抗 MCMV IE1 抗原特異的抗体 (N2)、GFP 標識抗ラット抗体にて反応後、フローサイトメトリーにて解析。plaque assay にてウイルス増殖を確認

5) iel mRNA 定量: *iel*-specific RT-PCR, probe iel-taq1-FAM 標識 (exon 3/4 splicing junction comprised nucleotides 5'-6,338 to 6,328 on exon 4 and 5'-6,205 to 6,192 on exon 3 (GenBank accession no. L06816).

Forward primer iel_taq_forw1 (Oligonucleotide 5'-6,393 to 6,367), reverse primer iel_taq_rev1 (oligonucleotide 5'-6,139 to 6,156) 133bp のプロダクトができる。細胞 mRNA の 18S にて標準化。ES, MEF から感染 3, 6hr 後の mRNA を採取し、TaqMan にて定量化した。

6) forskolin (FSK) を DMSO に溶解、stock とする。それぞれの濃度に希釈し使用する。

7) FSK 処理の前に MEF を 15hr、血清 free の状態で培養。その後 FSK 処理をする

8) ES 細胞における FSK 後の CREB, pCREB の変化を western blotting にて確認

9) ES 細胞を MOI 5 で感染し、24hr 後に Trichostatin A (TSA), sodium butylate (SB), FSK をそれぞれの濃度で処理、24hr 後に medium change。感染 72 時間後の細胞を採取し、フローサイトメトリーにて解析

10) MCMV の吸着は 4 度にて 1hr。PBS 洗浄 2 回後に細胞回収。MCMV の侵入は 4 度 1hr 吸着後、37 度へ移す。移動後 2hr 後に PBS 洗浄 2 回後、EDTA-トリプシンで細胞剥離後、回収。

M55/gB (135bp): LCgB-forw (5'-GAAGATCCGCATGTCCTCAG-3'), LCgB-rev (5'-AATCCGTC

CAACATCTGTGCG-3'), 84,017 to 84,037 and 84,151 to 84,131 (GenBank accession no. NC_004065) と b-tubulin にて Cybergreen にて MCMV ゲノムの標準化を行う

11) MCMV 感染 2hr 後にて固定。電子顕微鏡にて観察

12) In situ hybridization: MCMV genome の入った BAC plasmid (pSM3fr) の BAC を使用し、nick translation kit にて FITC ラベルの probe を作製する。その後感染後 3hr の MEF と ES をプローブ

と反応させる。また FITC に対する抗体にて免疫染色を行い、DAB にて発色した

4. 研究成果

1) ES 細胞と MEF 比較においてはウイルス増殖、前初期蛋白発現、mRNA (*iel*) のどのレベルにおいても ES 細胞での発現は有意に低い

2) ES 細胞において高濃度のウイルスでは感染感受性は低濃度の感染よりあがる

3) FSK 単独では ES 細胞における MCMV 感染感受性比率の増加はほとんどみられないが、TSA, SB 単独投与においては MOI 1 では約 2% まで、TSA+FSK においては約 4% まで MCMV 感

感染感受性の増加をみる。

4) ES では hEF promoter 活性は taransfection レベルはで活性があるにも関わらず、hEF promoter を組み込んだ変異ウイルス MCMV において、GFP 発現は MEF よりも有意に低い。

5) ES における MCMV の細胞吸着、侵入、核内移行は、MEF と比較すると細胞吸着のレベルで約 1/2、細胞内侵入で約 1/10、核内移行で約 1/20 のレベルで低下している

6) iPS における MCMV 感染感受性は MEF よりも低く、ES よりも高かった

7) In situ hybridization においては、核内における MCMV genome を認識するシグナルは、ES では MEF と比較すると有意に少ない。iPS ではその中間のシグナル量である

8) MCMV の感染感受性と関係する heparan sulfate, integrin β 1, vimentin, 核膜孔の数は ES では MEF より低下していた

今回の結果から、ES 細胞の MCMV 感染感受性低下の原因は、ES 細胞ではウイルス genome の核内への移行が多段階的に抑制されていることが大きな影響であると考えた。

ES 細胞における TSA, SB, FSK 処理後の感染感受性の変化は、ES 細胞の核の中に MCMV ゲノムはわずかではあるが侵入し、増殖 process に入り、そこで ie promoter の発現抑制を含めた epigenetics の働きがあることが考えられた。

これらの機序によって ES 細胞の MCMV 感染感受性は MEF と比較して大変低いものとなっているのであろう。

iPS 細胞は MEF から脱分化によって MCMV 感染抵抗性を獲得するが、ES 細胞ほどの感染抵抗性はみられなかった。これは iPS は ES とは異なる性質をもっている間接的な証拠といえる。

今回の実験を通してこの感染感受性の違いは heparan sulfate, integrin β 1, vimentin, 核膜孔数に依存している可能性が高いことが示唆された。

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)

1. Aggressive progression of breast cancer with microscopic pulmonary emboli possessing a stem cell-like phenotype independent of its origin. Kawasaki H, Ogura H, Arai Y, Baba S, Kosugi I, Tsutsui Y, Iwashita T. *Pathol Int.* (査読あり) 2010 Mar;60(3):228-34.

2. Induction of cytomegalovirus-infected labyrinthitis in newborn mice by lipopolysaccharide: a model for hearing loss in congenital CMV infection. Li L, Kosugi I, Han GP, Kawasaki H, Arai Y, Takeshita T, Tsutsui Y. *Lab Invest.* (査読あり) 2008 Jul;88(7):722-30. 2008 May 12.

3. A case of primary cutaneous natural killer/T-cell lymphoma, nasal type, directly invading to the heart. Kawasaki H, Shigeno K, Ohnishi K, Tsuchida T, Miura K, Kato T, Kosugi I, Tsutsui Y. *Leuk Lymphoma.* (査読あり) 2008 May;49(5):1008-11.

4. Roles of neural stem progenitor cells in cytomegalovirus infection of the brain in mouse models. Tsutsui Y, Kosugi I, Kawasaki H, Arai Y, Han GP, Li L, Kaneta M. *Pathol Int.* (査読あり) 2008 May;58(5):257-67.

Review.

[学会発表] (計 2 件)

(1) 河崎秀陽, ES 細胞におけるサイトメガロ

ウイルス感染感受性獲得への多段階的制御,
病理学会, 平成 21 年度 5 月 2 日, 国立京都
国際会館

(2) 河崎秀陽, ES 細胞におけるサイトメガロ
ウイルス感染感受性獲得への多段階的制御,
ウイルス学会, 平成 21 年 10 月 25 日, 都市
センターホテル

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河崎 秀陽 (KAWASAKI HIDEYA)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号: 90397381