

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 18 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：22590426

研究課題名（和文） サイトメガロウイルスの細胞指向性、個体での病態、防御抗体誘導に関する研究

研究課題名（英文） Study on cytomegalovirus: cell tropism, pathogenesis, and induction of protective antibodies.

研究代表者 井上 直樹 (INOUE NAOKI)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・室長

研究者番号：90183186

研究成果の概要（和文）：

モルモットサイトメガロウイルス (GPCMV)は、先天性CMV感染を小動物で唯一起こす。我々は、線維芽細胞での増殖に不要だが個体での増殖に必須な1.6kbのゲノム領域を同定し、この領域が細胞指向性に関与するヒトCMV UL128及びUL130蛋白に相同性を有するGP129及びGP131をコードすることを明らかにしてきた。本研究では、線維芽細胞で正常に増殖できるGPCMVゲノムがクローニングされたBACの構築に成功し、BAC改変系を用いて、GP129、GP131及びGP133に変異を導入したGPCMVをそれぞれ作製し、これらの糖蛋白がGPLや上皮細胞株GPC16での増殖には不要であるが、単球・マクロファージへの感染に必須であることを明らかにした。線維芽細胞と感染マクロファージを共培養すると線維芽細胞でウイルスが増殖した。マクロファージは、個体内での感染伝播に重要な役割をもつことから、その細胞指向性は個体での効率的な感染成立に密接に関連していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

In contrast to murine and rat CMVs, guinea pig CMV (GPCMV) crosses the placenta and causes infection in utero, which makes GPCMV animal models useful for studies on the mechanisms of transplacental transmission of CMV. Previously, we reported that the GPCMV stock purchased from the ATCC contained two types of strains, one containing and the other lacking a 1.6 kb locus that encodes human CMV UL128 and UL130 homologs, GP129 and GP131, and that the 1.6 kb locus was required for efficient viral growth in animals but not in cell culture. HCMV UL128/130/131A form a pentamer complex with gH/gL and play a role in the endothelial/epithelial-tropism. In this study, we constructed a BAC containing a GPCMV genome, the virus from which grew normally in guinea pig fibroblast cells GPL. Using the RedET recombination system for BAC, mutations were introduced into each of GP129, GP131, and GP133 ORFs. Although all mutants grew in GPL and epithelial cell line GPC-16 at the level similar to a virus derived from the BAC with the wild-type sequence, they could not infect monocytes/macrophages. GPCMV was transmittable to fibroblast from infected macrophages by co-culturing. Since macrophages play an important role in dissemination of virus to the organs, the macrophage tropism may associate with efficient viral growth in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	0	1,300,000
2011年度	1,100,000	0	1,100,000
2012年度	1,100,000	0	1,100,000
総計	3,500,000	0	3,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：サイトメガロウイルス、モルモット、感染防御、糖蛋白、細胞指向性

## 1. 研究開始当初の背景

サイトメガロウイルス(CMV)はヘルペスウイルス科に属し、約 240Kb の二本鎖 DNA ゲノムを持つウイルスである。幼少期に不顕性感染後、宿主に潜伏感染する。免疫抑制下にある臓器移植患者や HIV 感染患者などにおいて再活性化し、重篤な病態を引き起す。妊婦の初感染に伴い経胎盤感染により胎児が先天性感染を受け、流産や出生児の発達障害の原因となることが知られる。我々は、先天性感染が新生児の 300 人に 1 人に起り、感染児の 2 割程度が出生時症候性であることを明らかにした (Koyano et al. 2011)。新生児の発達障害の大きな原因を成してきた風疹ウイルスによる先天性感染は、ワクチンの浸透に伴い激減した。しかしながら、CMV の場合、ワクチン開発が遅れている。糖蛋白 B(gB)を用いたサブユニットワクチンの臨床試験で妊婦の初感染防御に有効であることが最近示されたが、その効果は実用には程遠いものであり、妊婦を CMV 初感染から守る方法が依然としてない。CMV の経胎盤感染機序の詳細は不明であり、先天性感染における病原性を決定するウイルス側因子も同定されていない。さらに、中和や CTL の主要な標的蛋白の同定、培養細胞レベルでは不必要でも個体での増殖に必須である遺伝子群の同定など、ワクチン開発の基礎となる様々な知見の集積も不十分である。病原性を研究するには感染動物モデルが必須であるが、小動物ではモルモットのみがヒトと同様な胎盤構造をもつため、モルモット CMV(GPCMV)のみが経胎盤感染機構の解析や先天性感染防御を担うワクチンの開発に有効なモデルであり、我々の研究室ではこのモデルを用いた研究を進め、これまでに以下のことを明らかにしてきた。

(1) GPCMV を妊娠モルモットに感染させると、出生仔にヒトと同様な難聴が発生した。仔の内耳で GPCMV が増殖していた。その病理像はヒトの場合と類似していた (Katanao 他, 2007)。

(2) ATCC から購入した GPCMV ストックが、ゲノムの 200kb 付近に 1.6kb の欠失を有する株と欠失していない株の 2 種類の株から成っていた。2 種類が混じったストックを接種したモルモット個体内での両ウイルスの増殖性を比較したところ、1.6kb 領域があるウイルスは、欠失したもの比べ、脾臓で 5 倍、肺で 10 倍、唾液腺で 200 倍増殖効率が良かった。限界希釈法により得た独立クローンをを用いても同様の結果を得た。一方、両者に線維芽細胞での増殖能に差はなかった。(Nozawa 他, 2008)

(3) RACE 解析により 1.6kb 領域には、マウス CMV (MCMV) ie2 に相当する GP128 に一部オーバーラップする形で 4 つの転写物が存在すること、

Northern 解析及び RT-PCR 解析から GP129 と GP131 が感染後期に発現することを明らかにした。両遺伝子のアミノ酸配列は、粒子構成糖蛋白として上皮及び内皮細胞指向性に関与する HCMV UL128 及び UL130 蛋白に高い相同性を示した。なお、MCMV にこれらのホモログはない。生化学的解析により、GP131 蛋白は HCMV UL130 蛋白と同様に、gH 及び gL 蛋白と複合体を形成すること、複合体としてのみ細胞表面に発現されること、及び粒子構成蛋白であることを明らかにし、機能として UL130 と同様に細胞指向性に関与する可能性が高いと考察した (Yamada 他, 2009)。なお、内皮細胞を用いてヒトの中和抗体の解析を行うと、従来中和の主要な標的とされてきた gB 蛋白以上に UL128 及び UL130 蛋白が重要であることが最近報告され、UL128 及び UL130 蛋白はサブユニットワクチン候補として注目を集めつつある。

(4) McVoy らのグループは、組換え GPCMV を作製すると必ずゲノム中に欠失が発生することを報告するとともに、BAC 部分を細胞内で除去してウイルスを回収できる系を構築した (Cui 他, 2008)。しかし、この BAC を入手し検討したところ、GP129 遺伝子にフレームシフト変異が存在するなど様々な問題があることが明らかとなった。

## 2. 研究の目的

本研究では、我々の最近の知見を掘り下げ、GPCMV のホモログの解析を通して、UL128 及び UL130 について、1) 細胞指向性の分子機序、2) 個体での増殖及び病態における役割、3) サブユニットワクチンとしての可能性、を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 組換えアデノウイルス(rAd)の作製と精製

pENTR3C (Invitrogen) に、GPCMV の gB, gH, gL, gO, GP129, GP131 などの抗原の ORF 領域をクローニングした。次に、LR clonase (Invitrogen)を用いた att 間の組換え反応を用いて、pAd-CMV/V5-DEST (Invitrogen)に ORF 領域を移しかえた。このプラスミドより PacI 制限酵素による切断で、Ad の ITR 領域を両末端とする DNA 断片を調製し、293A 細胞に遺伝子導入し、培地交換を続けながら 2-4 週プラーク形成が見られるまで培養し、培地ごと細胞を回収した。−80°Cでの凍結 37°Cでの融解を 2 回行い、低速遠心後、上清を 293A 細胞に接種し、ウイルス増殖により細胞が剥がれてきた頃合いに上と同じ操作を行い、ウイルス上清液を初期ストックとして調製した。なお、GP131 については、シグナルペプチドをアミノ端に有する GP131 を発現する Ad-sg131 や細胞表面抗原(Display)と GP131 の融合蛋白を発現する Ad-Dg131 も作製した。

rAdの精製にはMOI 0.6-0.8感染3日後の293A細胞を回収し、凍結融解を2回行った後、遠心により細胞片を除いた上清を得、Benzonaseを加え37°C30分反応後、4M CsCl, 2.2M CsClのステップグラジエントに上清をのせ、SW28ローター、25,000rpm、4°Cで2時間遠心した。形成されたウイルスバンドを採り、等量の飽和CsClを加え、超遠心管用チューブに入れ、その上に4M CsCl, 2.2M CsClと重層し、35,000rpm、4°Cで3時間遠心した。得られたウイルスバンドを回収後、10%グリセロールを含むPBSに透析しCsClを除いた。rAdの力価は、293A細胞に感染後3日目に抗Adポリクローナル抗体を用いてDAB発色させる免疫染色法により行った。

gB、gH、GP129及びGP131の発現は、GPCMV感染モルモット血清ないしは、蛋白特異的血清を用いて蛍光抗体法で確認した。

## (2) BAC-GPCMVの構築(図1)とウイルス回収

GPCMVゲノム2642-4247と13030-14482の両領域をpBluescript II(+)にクローニング後、3993のNsiI切断部位にオリゴDNAを用いてloxP配列を挿入した。GFP発現カセットとloxP配列を有するBACを試験管内Cre反応により、上記プラスミドのloxP配列に挿入した。構築したプラスミドを、精製したGPCMVゲノムとともに、GPL細胞に遺伝子導入後、アガロスを重層し、相同的組換えによりGFPを発現するようになったプラークを先太チップでアガロースごと採取しプラーク精製する作業を数回繰り返した。ウイルスは大量に培養した後、ショ糖密度勾配で精製した。得られたウイルス(GPCMV-BACΔ9K)は、4247-13030の約9kbが欠失し、3993に8.6kbのBAC-GFPカセットを有する。

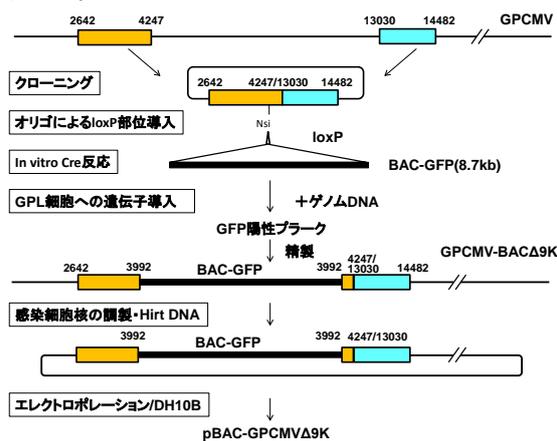


図1 BAC-GPCMVの構築

GPCMV-BACΔ9K 感染細胞の核を調製し、Hirt法により環状DNAを回収し、フェノール抽出により精製後、エタノール沈殿した。エレクトロポレーションにより、このDNAをDH10Bに導入し、クロラムフェニコール耐性のコロニー(pBAC-

GPCMVΔ9K)を得た。

pBAC-GPCMVΔ9Kを、BAC用DNA精製キットを用いて精製し、GPL細胞にFugene 6を用いて遺伝子導入することで、元のウイルスを回収した。

## (3) BAC-GPCMVへの変異導入

オリゴDNAによる変異導入キット(Quick Change II XL kit, Agilent)を用いて、プラスミドにクローニングしたGPCMVゲノム196824-202454領域中の2ないし3塩基を置換することにより、終始コドンとともにフレームシフト変異をGP129、GP131、GP133に導入したプラスミドを作製した(図2)。親及び変異プラスミドを鋳型として、PCRにより196974-198605領域を増幅した。

	1st ATG	変異(小文字)
GP129Stop	(元) ATG/CGT/ <21bp> /TTT/TAC/TAT	(変異) ATG/CGT/ <21bp> /TgT/Taa/CTA/T
GP131Stop	(元) ATG/ATG/ <33bp> /TTT/TAC/GCC	(変異) ATG/ATG/ <33bp> /TgT/Taa/CGC/C
GP133Stop	(元) ATG/TTT/TGG/CGT/CTT/GTA	(変異) ATG/TTT/TGG/CGT/taa/cGT/A

図2 導入した変異の配列

pBAC-GPCMVΔ9Kを有する大腸菌DH10Bに、pRedETプラスミドを導入した。次に、L-arabinoseを用いて、RedETを発現させ、rpsL-neoカセットを遺伝子導入してカナマイシン耐性を指標として、GPCMVゲノム197336-198568領域と置換したBACを得た(3C3)。RedET法により、このBACのrpsL-neo領域を上記のPCR断片と置換し、変異が導入されたpBAC-GPCMVΔ9Kを作製した。最終的にGPL細胞に遺伝子導入し、変異ウイルスを回収した(図3)。

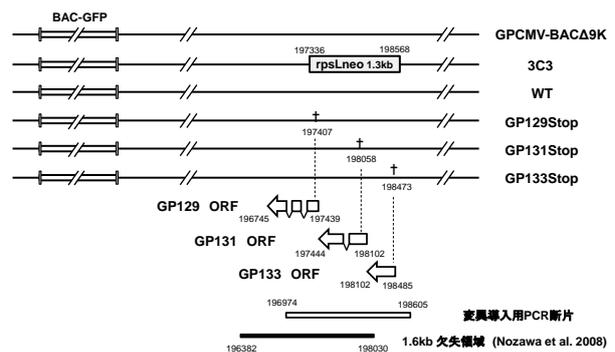


図3 GP129-133領域の変異ウイルスの構築

## (4) 線維芽細胞での増殖性の検討

線維芽細胞に感染後適当な時間に細胞及び培養上清からDNAを精製し、ウイルス及び細胞遺伝子のコピー数をリアルタイムPCR法で求めた。また、上清を希釈しGPL細胞に感染3日後に浮きウイルス特異的抗体により免疫染色し、ウイルス力価を測定した。

## (5) 単球・マクロファージの調製

8週齢モルモットに流動パラフィンと1µm径の磁気ビーズ(Magnetic Microspheres, ProMag)を腹腔内投与し、5-6日後に腹腔内液を回収するとともに、脾臓の採取と採血を行った。磁気ビーズを貪食した腹腔内単球・マクロファージ(MΦ)を、磁気プレートを用いて回収した。単球・マクロファージマーカーであるCD68を認識するモノクローナル抗体と反応させたところ、90%以上の細胞が反応した。

脾臓内の細胞を回収し、赤血球を溶解したのち、プレートに巻き込み、翌日、プレートに接着していない細胞を除き、単球・マクロファージを濃縮した。また、血液よりLympholyte免疫細胞濃縮キット(ウサギ用, Cedarlane Lab Ltd)を用いて末梢血単核球を調製した。

#### (6) モルモットの免疫と抗体誘導の検討

GPCMVの糖蛋白を発現するrAd各種を用いて、4週齢のモルモットを免疫し、3週間後に採血し、抗体の誘導を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) GPCMV-BACの構築

約9kbの欠失を有するが、線維芽細胞において正常に増殖できるGPCMVゲノムを有し、GFPを発現可能なBACの構築に成功した。

#### (2) GP129/131/133変異ウイルスの細胞指向性

線維芽細胞に感染後の細胞内でのウイルスのDNA複製は、野生型と変異ウイルスで差はなかった(図4左)。培養上清中のウイルスDNA量にも差はなかった(図4右)。また、感染72時間後の培養上清中の感染性ウイルスカ価にも差はなかった。これらのことから、GP129/131/133のいずれの産物も、感染効率に影響しないことが示された。

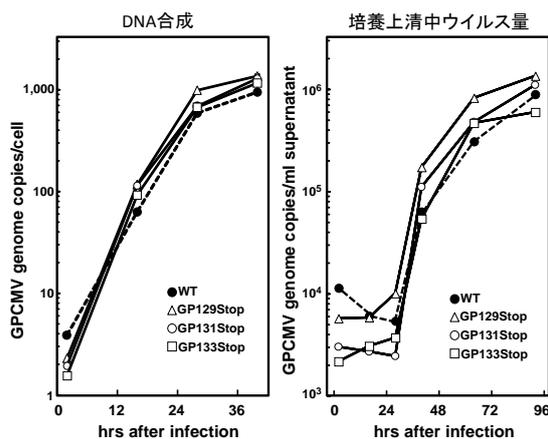


図4 GP129-133のGPL細胞での増殖

次に、野生型及び変異ウイルスを上皮細胞株GPC16に感染し、GFP発現を指標に、感染の成立を検討した。その結果、変異ウイルスを含め、GPC16への感染は成立したことから、GP129,

GP131, GP133のいずれも、上皮細胞への感染には不要であることが明らかとなった。

一方、脾臓及び腹腔内の単球・マクロファージへの感染は、野生型ウイルスに見られるものの、

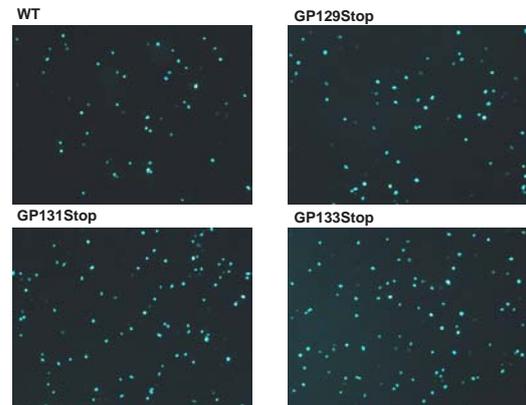


図5 上皮細胞GPC16への感染

GP129/131/133のいずれの変異ウイルスでも見られなかった(図6)。また、末梢血単核球の一部の細胞にGPCMV感染が見られるが、GP129, GP131, GP133いずれの変異ウイルスでも感染がなかった。

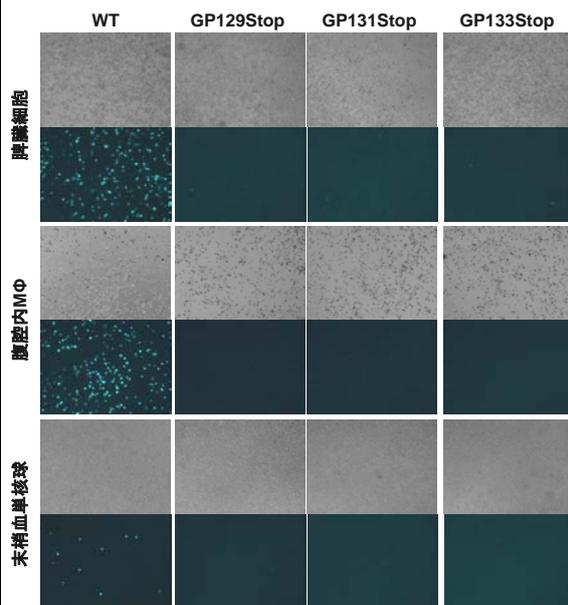


図6 単球・マクロファージへの感染  
上段: 明視野 下段: 蛍光

感染5日後のマクロファージを電顕で解析すると、1.6kbの欠失を有する株では、粒子形成が見られないのに対して、野生型のウイルス株では、数は少ないもののGPCMVのサイズに当てはまるカプシドが核内に見られた(図7)ことから、少なくとも粒子形成の途中までは正常に進行していると思われた。

野生型のGPCMVが感染したマクロファージを線維芽細胞と共培養するとウイルス増殖が線維芽細胞で見られた(図8)。

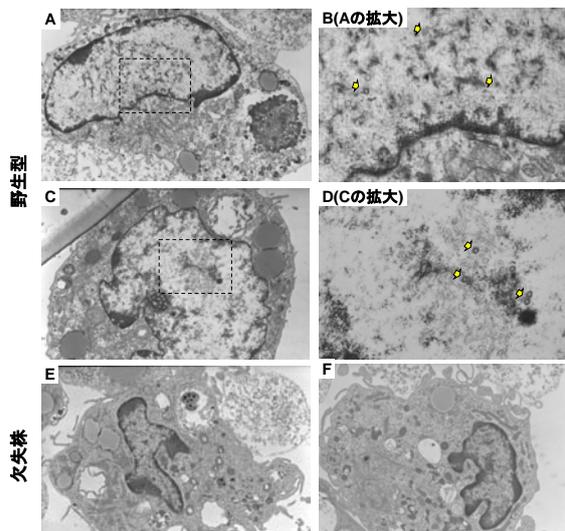


図7 MΦ感染細胞の電顕像



図8 MΦから線維芽細胞への伝播

マクロファージは、個体内での感染伝播に重要な役割を担っていることから、その細胞指向性は個体での効率的な感染の成立に密接に関連していると考えられる

#### (4)マクロファージへの感染様式の検討

エンドサイトシス後の細胞内での酸性化を阻害する塩化アンモニウムやバフィロマイシンなどによる処理を行っても、感染の阻害は生じなかった。従って、細胞表面での膜融合により、感染が成立していると考えられる。

#### (5) GP131 に対する抗体誘導

gB 発現 rAd により、モルモットで十分な抗体誘導が見られ、中和能も持っていた。しかし、GP131 を発現する rAd を 3 種類作製し、同様にモルモットを免疫したが、十分な抗体は誘導されなかった。他の蛋白との複合体形成が必要と思われた。

マウス CMV では、UL128, UL130 に相当する遺伝子は、サイトカインをコードしマクロファージの分化・遊走に関与する形で個体での感染効率に寄与している。一方、ヒト CMV では、内皮細胞や上皮細胞への感染に必須であり、感染血清中の抗体価も高い。これに対してモルモット CMV では、上皮細胞への感染には関与せず抗体誘導も弱い一方、マクロファージへの感染に必須である。このことから、モルモットの遺伝子産物は、マウ

ス CMV とヒト CMV の中間的な機能を持っていると考えられ、ウイルスの進化の過程とも考えられた。

#### 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 5 件)

- ① Hashimoto K, Yamada S, Katano H, Fukuchi S, Sato Y, Kato M, Yamaguchi T, Moriishi K, Inoue N. Effects of immunization of pregnant guinea pigs with guinea pig cytomegalovirus glycoprotein B on viral spread in the placenta. *Vaccine* 31: 3199-205, 2013. 査読有 DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.04.078
- ② Tabata T, Pettit M, Fang-Hoover J, Rivera J, Nozawa N, Shiboski S, Inoue N, Pereira L. Cytomegalovirus impairs CTB-induced lymph-angiogenesis and vascular remodeling in an in vivo human placentation model. *Am. J. Pathol.* 181: 1540-59, 2012. 査読有 DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.08.003
- ③ Ikuta K, Ishioka K, Sato Y, Imamura T, Asano K, Koyano S, Inoue N, Suzutani T. A novel real-time PCR method for the determination and quantification of each cytomegalovirus (CMV) gH-subtype in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 50:499-501, 2012. 査読有 DOI: 10.1128/JCM.06032-11
- ④ Ishibashi K, Tokumoto T, Shirakawa H, Hashimoto K, Ikuta K, Kushida N, Yanagida T, Shishido K, Aikawa K, Toma H, Inoue N, Yamaguchi O, Tanabe K, Suzutani T. The lack of antibodies against the AD2 epitope of cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B (gB) is associated with CMV disease after renal transplantation in recipients having gH serotypes same as their donors. *Transplant. Infect. Dis.* 13: 318- 28, 2011. 査読有 DOI: 10.1111/j.1399-3062.2010.00563.x
- ⑤ Kanai K, Yamada S, Yamamoto Y, Fukui Y, Kurane I, Inoue N. Re-evaluation of guinea pig cytomegalovirus complete genome sequence. *J. Gen. Virol.* 92: 1005-20, 2011. 査読有 DOI: 10.1099/vir.0.027789-0

〔学会発表〕 (計 9 件)

- ① Hashimoto K, Yamada S, Fukuchi S, Katano H, Sato Y, Kato M, Moriishi K, Inoue N. Immunization of pregnant guinea pigs with glycoprotein B (gB). 4th Congenital CMV Conference/the International Betaherpesvirus Workshop San Francisco, Oct. 2012
- ② Tabata T, Pettit M, Fang-Hoover J, Rivera J, Nozawa N, Shiboski S, Inoue N, Pereira L. Congenital cytomegalovirus infection identified in pregnancies complicated by idiopathic intrauterine growth restriction. 4th Congenital CMV Conference & 14th International CMV/beta-herpesvirus Workshop, San Francisco, Oct. 2012.
- ③ 橋本楓、山田壮一、片野晴隆、福地早希、佐

藤由子, 森石恆司, 井上直樹. モルモット妊娠動物モデルを用いたサイトメガロウイルス糖蛋白Bサブユニットワクチンの効果機序の解析 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月

- ④ 福地早希, 山田壮一, 橋本楓, 片野晴隆, 佐藤由子, 森石恆司, 井上直樹. モルモットサイトメガロウイルス (GPCMV) を用いた先天性感染病態の解析 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月
- ⑤ 橋本楓, 井上直樹 「モルモット感染動物モデルを用いたサイトメガロウイルスワクチン開発の基礎検討」第15回日本ワクチン学会学術集会、東京、2011年12月
- ⑥ Huanan Kiao, Jung-Hyun Lee, Naoki Inoue, Kenji Miyado, Shigeyoshi Fujiwara. Characterization of human cytomegalovirus UL136 gene product. XV International Congress of Virology. Sapporo, Sep. 2011.
- ⑦ Kazufumi Ikuta, Ken Ishioka, Takashi Imamura, Kimisato Asano, Tetsushi Yoshikawa, Hiroyuki Moriuchi, Shigeyoshi Fujiwara, Takahiko Kubo, Shin Koyano, Naoki Inoue, Tatsuo Suzutani. A genotypic and serologic study of cytomegalovirus (CMV) reinfection in mothers and neonates with congenital CMV infection in Japan. XV International Congress of Virology. Sapporo, Sep. 2011.
- ⑧ 廖華南, Jung-Hyun Lee, 井上直樹, 宮戸健二, 藤原成悦, 中村浩幸. ヒトサイトメガロウイルス UL136 領域に見出された新規遺伝子産物、第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月
- ⑨ 金井亨輔, 山田壮一, 山本由美子, 福井良子, 倉根一郎, 井上直樹. In vivo で増殖可能な Guinea pig (GPCMV) のゲノム配列の解析、第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

井上 直樹 (INOUE NAOKI)  
国立感染症研究所・ウイルス第一部・室長  
研究者番号：90183186

### (2)研究分担者 なし

### (3)連携研究者 なし

### (4)研究協力者

橋本 楓 (HASHIMOTO KAEDE)  
国立感染症研究所・ウイルス第一部・研究生  
(山梨大学大学院医学工学総合教育部医科学専攻修士課程大学院生)

福地 早希 (FUKUCHI SAKI)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・研究生 (山梨大学大学院医学工学総合教育部医科学専攻修士課程大学院生)

福井 良子 (FUKUI YOSHIKO)  
国立感染症研究所・ウイルス第一部・非常勤職員

津田 美穂子 (TSUDA MIHOKO)  
国立感染症研究所・ウイルス第一部・非常勤職員