

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390382

研究課題名(和文)胎盤由来組織幹細胞を用いたウイルス垂直感染の解析

研究課題名(英文)Analysis of placental barrier functions for intra uterine viral infections

研究代表者

早川 智 (HAYAKAWA, Satoshi)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：30238084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：分化を誘導したヒト胎盤由来絨毛幹細胞、羊膜幹細胞、不死化初期絨毛、血管内皮細胞を用いてHIV、インフルエンザ、風疹ウイルス感受性を検討した。風疹ウイルスは垂直感染株、ワクチン株いずれも種々の分化段階の栄養膜細胞、羊膜細胞、不死化初期絨毛に感受性がみられず、血管内皮細胞には感受性があった。インフルエンザとHIVは合胞体細胞に感受性があるが、血管内皮への感受性は見られなかった。また細菌由来産物や核酸などの炎症性刺激により胎盤のバリア機能が低下しウイルスの胎児への侵入が容易になることが判明した。

研究成果の概要(英文)：In order to analyze the mechanisms of intrauterine viral transmission, viral susceptibility of trophoblastic cells, yolk sac cells, immortalized trophoblasts and endothelial cells in various differentiation stages were examined. Trophoblasts and endothelial cells were highly resistant to rubella viruses cloned from both clinical isolates and vaccine strains while endothelial cells were easily and persistently infected. Influenza A viruses replicates in immortalized human early trophoblasts and induce apoptosis but their release was highly restricted. HIV replicated in syncytial trophoblasts but do not replicates in cellular and invasive trophoblasts. Interestingly, TLR signals induces endothelial mesenchymal transition (EMT) of trophoblastic layers and enable viral entry into villous mesenchyma and subsequently fetal circulations.

研究分野：産婦人科学

キーワード：母子感染 胎盤関門 風疹 インフルエンザ HIV 上皮間葉移行

1. 研究開始当初の背景

- (1)胎児へのウイルス感染は流産や奇形,永続的な神経障害の原因となる。大部分のウイルス感染症において,胎盤は関門として一定の役割を果たすがサイトメガロウイルス (CMV) や風疹ウイルス (RV) の場合には十分に機能しない。しかし,子宮内感染の機序は未だに不明な点が多い。その理由として胎盤には様々な分化段階の細胞が存在しウイルス感受性が異なるため十分な解析ができないこと,動物モデルではヒトの病態を十分に再現できないことがある。
- (2)HIV や HSV の産道感染は選択的帝王切開により, 防御可能であるが子宮内感染の完全なコントロールは困難である。
- (3)多くの日本人が罹患している歯周病が流産, 妊娠高血圧症候群などの妊娠合併症のみならずウイルスの垂直感染委関与している可能性がある。

2. 研究の目的

様々な分化段階の胎盤絨毛細胞に *in vitro* で分化を誘導し,ウイルスを感染させる実験系で,経胎盤感染を解析しその予防を図ることを目的とする。とともに,歯周病病原菌 *P.gingivalis* を処理し,胎盤関門の変化を検討する。

3. 研究の方法

- (1)胎盤・羊膜からの幹細胞の分離と初代培養の確立とウイルス感染
- (2)絨毛癌細胞株 BeWo, JEG-3, 不死化初期絨毛細胞株 HTR8, ヒト臍帯血管内皮細胞 HUVEC へのウイルス感染
- (3)これらの系に *P.gingivalis* 由来 LPS あるいは生菌, 不活化菌体抽出物を処理し,ウイルス感受性を検討
- (4)ウイルスタンパクの検出, RT-PCR によるウイルス遺伝子発現の検討
- (5)マイクロアレイによる絨毛細胞 RNA 発現

プロファイルの解析

- (6)蛍光抗体法による絨毛細胞のウイルスタンパク, 接着分子発現解析

4. 研究成果

HIV の経胎盤感染

ベトナムにおいて, HIV の母子感染をきたした児からウイルス 104 例を分離し,母体の血中に存在するウイルスのサブクローンを分子疫学的に解析した。

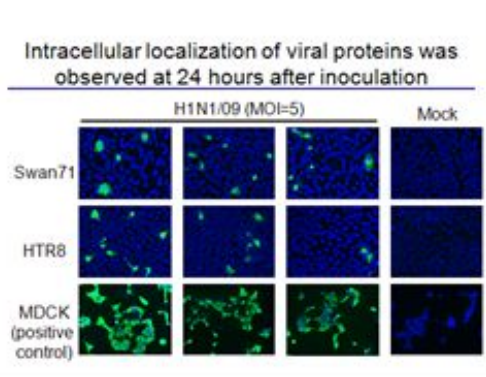
その結果,(1)全例が HIV-1 CRF01-AE,79 であったが母体に感染した HIV の複数のサブクローンの中で垂直感染を来すものはごく少数である。(2)垂直感染を来したウイルスには共通する変異が存在する。(3)母体が受けた不十分な抗レトロウイルス治療によって耐性変異が受け継がれる。(4)HIV 垂直感染児には *Chlamydophilia* 混合感染が著しく高い。以上4点が判明した。

そこで,変異したウイルスサブクローンの *in vitro* での絨毛細胞への感染効率を検討したが, *in vivo* での感染の差を説明できるような差は見いだせなかった。

免疫組織化学的に syncytial trophoblast のみに局在が認められることから, syncytium と cytotrophoblast のプロテーム解析を行い, Cytotrophoblast では HIV の Vpx に強く結合してこれを不活化する機構が存在することを明らかにした。

インフルエンザの経胎盤感染

インフルエンザは基本的に上気道あるいは消化管の局所感染症であるが,病初期に一過性のウイルス血症を来することが知られている。また,疫学的にインフルエンザ感染妊婦から生まれた児には自閉症や統合失調症などの神経学的合併症が多いことが知られている。そこで, *in vitro* の系で様々な分化段階の絨毛細胞に A 型インフルエンザウイルス H3N2 あるいは H1N1 2009 を感染させて複製高率と培養上清中へのウイルス粒子の放出を検討した。その結果, H3N2 に比較して H1N1 は感染効率は同等であるが,培養上清中へのウイルスの放出とアポトーシス誘導活性が非常に低いことが明らかになった。(図1)

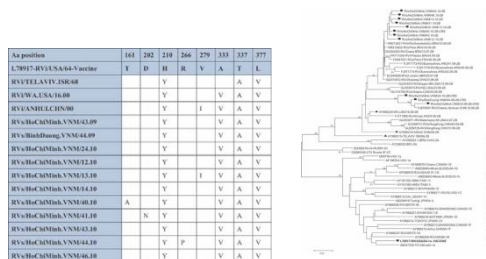


Influenza AH1N12009 の不死化初期絨毛細胞における発現 (図 1)

風疹の経胎盤感染

風疹は妊娠初期に罹患すると高い確率で先天異常をきたすことが知られている。しかしながら、風疹ウイルスの胎盤あるいは絨毛への感染を検討した研究は 1980 年代に数本の報告を見るのみで、その再現性に疑問が持たれている。そこで、様々な分化段階の絨毛細胞、絨毛癌細胞、血管内皮細胞に母子感染を来したウイルス株およびワクチン株を感染させてその効率を検討した。しかし、検討した範囲では初代培養胎盤幹細胞、あるいは *in vitro* で不死化した初期絨毛細胞を分化誘導し、風疹に対する感受性は見られなかった。また、風疹ウイルスのレセプターである myelin oligodendrocyte glycoprotein はいずれの段階でも発現が認められなかった。現時点では胎盤の分化に伴う特定のレセプター発現の変化よりは、何らかの外的因子による細胞間接着分子の変化を伴う絨毛組織の上皮間葉移行 (EMT) が重要であるという知見を得た。

実際の垂直感染例でも先天風疹症候群患者と、水平感染患者のウイルスはすべて 2B 型で特定の変異は認めず、ウイルス側の要因ではない可能性が示唆された。



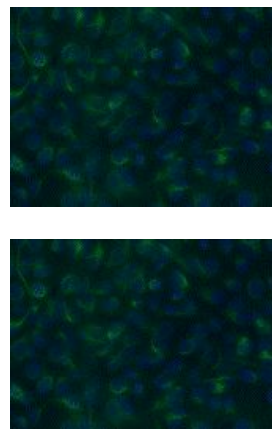
母子感染を来した風疹ウイルス株の分子系統樹 (図 2)

EMT と口腔内細菌

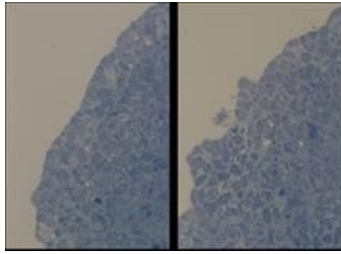
近年、子宮内特に胎盤には細菌叢 (マイクロビーム) が存在し、その由来は母体の口腔であるとする知見が報告されている。

そこで、歯周病細菌歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* (P.g) 由来 LPS とニコチンが trophoblast の浸潤を抑制すること、さらに歯周病菌の培養上清が絨毛の基質への浸潤能を低下させること。しかし処理濃度では、増殖能に影響はなくアポトーシスも誘導しないことを明らかにした。さらにマイクロアレイ解析で遺伝子発現の変動を網羅的に解析したところ、携態や分化に關与する遺伝子の変動を認めた。また、形態学的な変化を観察したところ、微絨毛の短縮、細胞間隙の拡大が見られた。trophoblast の浸潤は、妊娠初期に cytotrophoblast が上皮間葉移行 epithelial mesenchymal transition (EMT) を起こして invasive trophoblast となり、ラセン動脈の内皮細胞と置換し再構築を行う。浸潤の抑制に EMT の障害が關与していると考え、マーカーである Vimentin の免疫染色を行い、P.g sup によって発現が減少することを明らかにした。

絨毛組織において最外側の大部分を被覆する syncytium 層は細胞間隙のない多核細胞であり外的因子による傷害やウイルス感染に抵抗性であるが、これを裏打ちする cytotrophoblast 間隙は重層扁平上皮や消化管の円柱上皮に比較して疎であり、特に母体筋層に付着・浸潤する trophoblastic column や anchoring villi では cytotrophoblast が母体血に直接接触する。この部位における EMT 異常が風疹ウイルスなどの絨毛内への侵入の門戸となる可能性が示唆された。(図 3.4)



Vimentin 発現の変化 (図 3)



PGLPS による EMT の誘導 (図 4)

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 20 件)

1. Mikami Y, Fukushima A, Komiyama Y, Iwase T, Tsuda H, Higuchi Y, Hayakawa S, Kuyama K, Komiyama K. Human uterus myoma and gene expression profiling: A novel in vitro model for studying secretory leukocyte protease inhibitor-mediated tumor invasion. *Cancer Lett.* 2016 May 26. pii: S0304-3835(16)30341-X (査読有)
2. Chuchaona W, Khamrin P, Yodmeeklin A, Saikruang W, Kongsricharoen T, Ukarapol N, Okitsu S, Hayakawa S, Ushijima H, Maneekarn N. Detection and characterization of a novel human parechovirus genotype in Thailand. *Infect Genet Evol.* 2015 Apr;31:300-4. (査読有)
3. Ushijima H, Thongprachum A, Tran DN, Fujimoto T, Hanaoka N, Okitsu S, Takanashi S, Mizuguchi M, Hayakawa S. Rapid diagnostic tests apply for pediatric infections at outpatient clinic setting. *Clin Lab.* 2015;61(1-2):195-9. (査読有)
4. Thongprachum A, Takanashi S, Kalesaran AF, Okitsu S, Mizuguchi M, Hayakawa S, Ushijima H. Four-year study of viruses that cause diarrhea in Japanese pediatric outpatients. *J Med Virol.* 2015 Jul;87(7):1141-8. (査読有)
5. Thongprachum A, Chan-It W, Khamrin P, Saparpakorn P, Okitsu S, Takanashi S, Mizuguchi M, Hayakawa S, Maneekarn N, Ushijima H. Molecular epidemiology of norovirus associated with gastroenteritis and emergence of norovirus GII.4 variant 2012 in Japanese pediatric patients. *Infect Genet Evol.* 23C: 65-73. 2014 (査読有)
6. Tran DN, Nguyen TQ, Nguyen TA, Hayakawa S, Mizuguchi M, Ushijima H. Human bocavirus in children with acute respiratory infections in Vietnam. *J Med Virol.* 86(6):988-94. 2014 (査読有)
7. Suzaki A, Komine-Aizawa S, Hayakawa S. Suppression of osteoblast Toll-like receptor 2 signaling by endothelin-1. *J Orthop Res.* 32(7):910-4. 2014 (査読有)
8. Okitsu S, Khamrin P, Thongprachum A, Kalesaran AF, Takanashi S, Shimizu H, Maneekarn N, Mizuguchi M, Hayakawa S, Ushijima H. Molecular characterization and sequence analysis of the 2B region of Aichivirus C strains in Japan and Thailand. *Infect Genet Evol.* 26:89-94. 2014 (査読有)
9. Okitsu S, Khamrin P, Thongprachum A, Nishimura S, Kalesaran AF, Takanashi S, Shimizu H, Hayakawa S, Mizuguchi M, Ushijima H. Detection and molecular characterization of human cosavirus in a pediatric patient with acute gastroenteritis, Japan. *Infect Genet Evol.* 28:125-9. 2014 (査読有)
10. Ushijima H, Nishimura S, Thongprachum A, Shimizu-Onda Y, Tran DN, Pham NT, Takanashi S, Dey SK, Okitsu S, Yamazaki W, Mizuguchi M, Hayakawa S. Sensitive and rapid detection of campylobacter species from stools of children with diarrhea in Japan by the loop-mediated isothermal amplification method. *Jpn J Infect Dis.* 67(5):374-8. 2014 (査読有)
11. Khamrin P, Thongprachum A, Okitsu S, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H. Comparison of three rapid tests for detection of

- norovirus in stool samples of acute gastroenteritis pediatric patients. *J Trop Pediatr.* 60(6):481-3.2014 (査読有)
12. Saikruang W, Khamrin P, Suantai B, Okitsu S, Hayakawa S, Ushijima H, Maneekarn N. Detection of diarrheal viruses circulating in adult patients in Thailand. *Arch Virol.* 159(12):3371-5.2014 (査読有)
13. Ushijima H, Fujimoto T, Muller WEG, Hayakawa S. Norovirus and Foodborne Disease: A review. *Food safety Food Safety* 2(3), 37-54, 2014 (査読有)
14. Tran DN, Pham TM, Ha MT, Tran TT, Dang TK, Yoshida LM, Okitsu S, Hayakawa S, Mizuguchi M, Ushijima H. Molecular epidemiology and disease severity of human respiratory syncytial virus in Vietnam. *PLoS One.* 2013;8(1):e45436 (査読有)
15. Shimizu-Onda Y, Akasaka T, Yagyu F, Komine-Aizawa S, Tohya Y, Hayakawa S, Ushijima H. The virucidal effect against murine norovirus and feline calicivirus as surrogates for human norovirus by ethanol-based sanitizers. *J Infect Chemother.* 2013 Aug;19(4):779-81. (査読有)
16. Trinh QD, Pham NT, Le Nguyen NT, Lam BQ, Le Phan KT, Truong KH, Le TQ, Nguyen HT, Tang TC, Izumi Y, Komine-Aizawa S, Ushijima H, Hayakawa S. Seroprevalence of *Chlamydia pneumoniae* in HIV-infected children in Vietnam. *J Infect Chemother.* 2013 Jun;19(3):538-41. (査読有)
17. Thongprachum A, Chan-It W, Khamrin P, Okitsu S, Nishimura S, Kikuta H, Yamamoto A, Sugita K, Baba T, Mizuguchi M, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H. Reemergence of new variant G3 rotavirus in Japanese pediatric patients, 2009-2011. *Infect Genet Evol.* 2013 Jan;13:168-74. (査読有)
18. Trinh QD, Pham NT, Le Nguyen NT, Lam BQ, Le Phan KT, Truong KH, Izumi Y, Komine-Aizawa S, Mizuguchi M, Ushijima H, Hayakawa S. Short communication: Drug resistance mutations in the HIV type 1 protease and reverse transcriptase genes in antiretroviral-naive Vietnamese children. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2012 Oct;28(10):1305-7. (査読有)
19. Komine-Aizawa S, Suzuki A, Trinh QD, Izumi Y, Shibata T, Kuroda K, Hayakawa S. H1N109 influenza A virus infection of immortalized first trimester human trophoblast cell lines. *Am J Reprod Immunol.* 2012 Sep;68(3):226-32 (査読有)
20. Tran DN, Pham NT, Tran TT, Khamrin P, Thongprachum A, Komase K, Hayakawa S, Mizuguchi M, Ushijima H. Phylogenetic analysis of rubella viruses in Vietnam during 2009-2010. *J Med Virol.* 2012 Apr;84(4):705-10 (査読有)

〔学会発表〕(計3件)

1. 相澤志保子、本多三男、Trinh Duy Quang、早川 智 女性の各ライフステージでの感染症の実態と対策 HIV と抗酸菌感染症 第29回女性医学会総会シンポジウム (東京都千代田区)都市センターホテル 2014年11月1日
2. 早川 智、相澤志保子、伊田英恵、陳旺全、鄭瑞棠 未病と自然免疫 粘膜における免疫応答と漢方 メタゲノムの視点から 第65回日本東洋医学会シンポジウム (東京都千代田区)東京フォーラム 2014年6月27日
3. 相澤志保子・早川 智 2009年に発生した新型インフルエンザウイルス A(H1N1)の胎盤傷害性について 第65回日本産科婦人科学会総会学術集会 ロイトン札幌 (北海道札幌市) 2013年5月12日

〔図書〕(計5件)

- 1 早川 智 戦国武将を診る 朝日新聞
出版 2016
- 2 矢崎義雄 総編集 内科学書 第10版
早川 智 HPV感染症 朝倉書 2015
- 3 山口 徹 他 総編集 今日の治療指針
2015年版 早川 智 女性の性感染症
医学書院 2015
- 4 中込 治,神谷 茂 (編)標準微生物学 12
版 早川 智 パピローマウイルス,
ポリオーマウイルス 医学書院 2015
- 5 金澤 一郎, 永井 良三 編 今日の診断
指針 デスク判 第7版 早川 智 女性
の性感染症- 2015 医学書院

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nihon-u.med-microbe.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

早川 智 (HAYAKAWA, Satoshi)
日本大学・医学部・教授
研究者番号：30238084

(2)研究分担者

牛島 廣治 (USHIJIMA, Hiroshi)
日本大学・医学部・客員教授
研究者番号：10091068

本多 三男 (HONDA, Mitsuo)
日本大学・医学部・客員教授
研究者番号：20117378

相澤 志保子 (AIZAWA, Shihoko)
日本大学・医学部・准教授
研究者番号：30513858