

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791126

研究課題名(和文) サイトメガロウイルス感染胎盤病態関連遺伝子の包括的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of the gene expression changes related to cytomegalovirus infection in the placenta

研究代表者

山田 壮一 (yamada, souichi)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任研究官

研究者番号：10514119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：妊娠母体へのヒトサイトメガロウイルス(HCMV)感染は、胎盤を経て胎児へ先天性感染を引き起こす。これまでモルモットとモルモットCMV(GPCMV)を用いて胎盤病態の解析を行っている。本研究では、感染個体胎盤を用いたマイクロアレイ解析で変動の見られた遺伝子に関して定量的測定系の構築、また、GPCMVが感染可能なモルモット胎盤組織培養系を樹立した。胎盤及び培養細胞での遺伝子発現動態の定量解析で、GPCMV感染により発現量が変動しており、同定遺伝子とGPCMV感染との関連性が明らかとなった。培養細胞でのウイルス感染時におけるある遺伝子の発現変動を解析すると、感染初期に変動が認められる事が分かった。

研究成果の概要(英文)：Human cytomegalovirus (HCMV) infection to pregnant women causes congenital infection to the fetus through the placenta. The virological analysis in placenta was performed using guinea pig and guinea pig CMV (GPCMV) model. In this study, the guinea pig placental tissue culture system and the system of quantitative measurement of changes in the gene in infected guinea pig placenta were established. By the quantitative analysis of the gene expression change in the infected placenta and cultured cell, the gene expression change was associated with the GPCMV infection. A gene expression change was recognized early in infection in the cultured cell.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 胎児・新生児医学

キーワード：胎盤 サイトメガロウイルス モルモット

## 1. 研究開始当初の背景

妊娠母体への HCMV(初)感染は、胎盤を経て血行性に胎児への先天性感染を引き起こし、流産や死産、更に新生児の発達障害などを引き起こす。死産の 15% (Iwasenko et al. 2011)、また、難聴や発達遅滞の約 20%(Ogawa et al. 2007; Koyano et al. 2009)の原因となるなど、ヒトの先天性感染症において HCMV は大きなウエイトを占めている。しかしながら、感染経路であり、かつ流産や死産また発達遅滞といった妊娠中の胎児へ大きな影響を及ぼす胎盤感染に伴う病態に関しては、あまり解析は進んでいない。これは胎盤が妊娠期のみに形成される特殊な臓器であり、胎盤形成の分子機構自体不明な点が多く着手の遅れている研究領域であるとともに、CMV は種特異性が高く、HCMV はヒト以外に感染しないため、個体を用いた解析が行えないことが大きな原因である。近年、HCMV においては、培養胎盤由来細胞 (cytotrophoblast) や生検 (biopsy) による解析が行われ、IgG およびマクロファージを利用したウイルスの経胎盤移行 (Maidji et al. 2006) やインテグリンなどの感染関連因子 (Maidji et al. 2007) などが報告され、徐々に胎盤における動態が明らかになってきている。また、線維芽細胞及びヒトの培養胎盤由来細胞を用いて感染に伴う細胞遺伝子の発現変動の解析が報告されている (Schleiss et al. 2007)。一方で、HCMV を用いた胎盤細胞培養系での解析は、1) 多くの妊婦が HCMV 陽性である、2) 胎盤細胞の採取が流産時などに限られる、3) 検体の性格上厳しい倫理管理が求められる、などから、培養細胞を使用する実験には限界がある。また、*in vitro* で得られた結果がヒト個体での現象を反映しているかを確認解析できない。先天性感染の個体での病態を解析する手段としては、サル類やげっ歯類の CMV を用いた動物モデルによる研究が行われている。しかし、サル類を用いた実験はその飼育や実験が煩雑であり、また、マウス CMV は経胎盤感染を起こさないことが知られている。そこで、小動物で唯一経胎盤感染により先天性感染を成立させるモルモットとモルモット CMV (GPCMV) を用いた動物モデルで先天性感染における胎盤病態の解析を行っている。モルモットの系は、GPCMV 感染において、流産や死産とともに、低体重胎仔や新生仔におい

て難聴が認められる (Katano et al. 2007) など、先天性感染モデルとしてヒトとよく似た病状を示す。また、そうした病状の原因ともなる胎盤病態を明らかにするため、様々な妊娠時期の GPCMV 感染モルモットの胎盤を用いたマイクロアレイ解析により、主に細胞分化や細胞周期などの胎盤の成長や維持に関わる遺伝子が感染時に変動していることを示すデータを得ている。

## 2. 研究の目的

モルモット胎盤由来細胞培養系がないため、培養細胞と個体間での結果を相互検証できるという感染動物モデルのメリットが生かし切れていない。そこで、本研究では、1) モルモット胎盤由来細胞培養系を確立し、個体で得られた網羅的な検索 (マイクロアレイ) 結果の検証を行う。2) ウイルス感染により変動する特徴的遺伝子を抽出し、*in vitro* の培養系でその遺伝子の詳細を調べることにより、胎盤での病態に関与する遺伝子を同定する。3) 最終的に、個体での結果やヒト培養細胞系とも比較解析をすることにより、感染胎盤で何が起きているのかという病態像を明確にする。

## 3. 研究の方法

### (A) RNA 定量的測定系の構築

#### 1) RNA 抽出

妊娠 2 週齢で接種し 3 週後採材、妊娠 3 週齢で接種し 3 週後採材、妊娠 4 週齢で接種し 3 週及び 5 週後に採材した胎盤について、DNA 定量により陽性となったものをそれぞれ 3-7 検体、対応する週齢の非感染個体胎盤をそれぞれ 3 検体ずつを用いた。胎盤を ~50mg になるように細切し、Maxwell 16 LEV Simply RNA Tissue kit 及び Maxwell 16 Firmware v4.0 (Promega) を用い、添付のプロトコールに従って抽出した。

#### 2) 定量的測定系の構築

GPCMV 感染により変動の認められたいくつかの遺伝子に関して Ensemble (<http://www.ensembl.org/index.html>) に登録されているモルモットのゲノム情報を元にプライマー及びプローブを作成し、TaqMan One-Step RT-PCR

Muster Mix Reagents(ABI)を用いてreal-time PCRの系の構築を行った。

### (B)胎盤組織培養系の構築

#### 1)胎盤の採材およびスライス培養

妊娠 4 週齢モルモット(Hartley,SLC)を安楽殺後、胎盤を採材およびスライサーにて細切し、シャーレ上に静置し、培養液(DMEM+F12(1:1),10%FBS)に浸して培養した。異なる妊娠週齢の胎盤を用いても同様に行った。同時に、胎盤から酵素により胎盤細胞(trophoblast)を分離し培養を試みた。胎盤細胞の確認は上皮細胞マーカーであるcytokeratin7 に対する抗体を用い蛍光抗体法(IFA)により行った。

#### 2)GPCMV 感染実験

培養翌日~2 日後に赤色蛍光蛋白(RFP)を発現する組換え GPCMV-RFP、野生株であるGPCMV-SG を接種し、経日的に蛍光の観察及び胎盤組織片の回収を行った。

#### 3)培養胎盤組織片からの DNA 抽出

Maxwell 16 Tissue DNA Purification kit 及び Maxwell 16 Firmware v4.0 (Promega) を用い、添付のプロトコールに従い抽出した。

#### 4)GPCMV DNA の定量解析

Taqman universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)、GPCMV GP83 遺伝子特異的なプライマーセット(5' -cgacgacgacgatgacgaaac-3' と 5' -tcctcggctctcaacgaagggtc-3' ) 及び probe (5' -FAM-ATCCGA GTTAGGCAGCG -MGB-3' )を用いて、7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems)で測定し、細胞当たりのGPCMV コピー数として示した。

### (C)胎盤組織培養系を用いた解析

#### 1)GPCMV 感染実験

培養翌日~2 日後に赤色蛍光蛋白(RFP)を発現する組換え GPCMV-RFP、野生株であるGPCMV-SG または細胞指向性に関与すると考えられる遺伝子の欠失組換え GPCMV を接種し、経日的に蛍光の観察及び胎盤組織片の回収を行った。

#### 2)GPCMV 感染培養胎盤組織からの RNA 抽出

Maxwell 16 LEV Simply RNA Tissue kit 及び Maxwell 16 Firmware v4.0(Promega)を用い、添付のプロトコールに従って抽出した。

#### (D)培養細胞を用いた GPCMV 感染による遺伝子変動解析

モルモット線維芽細胞(GPL)及び上皮細胞(GPC)へ GPCMV を接種し、経時的に RNA を抽出し、個体胎盤のマイクロアレイ解析により変動が認められた遺伝子に関して、構築した定量測定系を用いて RNA の変動を調べた。

#### (E)ヒトにおけるホモログ遺伝子の解析

ヒト細胞での影響を解析するため、HEL 細胞に HCMV を接種し、経時的に RNA を回収した。(倫理面に対する配慮)

動物実験は国立感染症研究所動物実験委員会の審査、承認を得て、動物愛護の精神に基づき適切に行った。

### 4 . 研究成果

マイクロアレイ解析により同定された遺伝子のいくつかに関してreal-time RT-PCRによる定量的測定系を構築した。胎盤及び培養細胞における遺伝子発現動態を定量解析したところ、GPCMV感染により発現量に変動することから、同定遺伝子とGPCMV感染との関連性が明らかとなった(図1)。

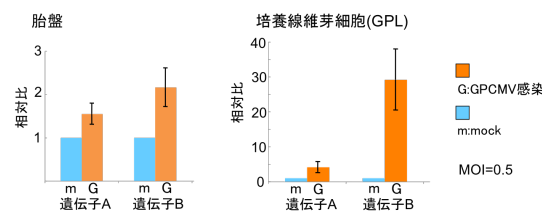


図1real-time RT-PCRによる定量的解析

また、GPCMVが感染可能なモルモット胎盤組織培養系を樹立した。胎盤組織の培養条件の検討により、長期(3週以上)にわたり培養可能な系を構築した。この培養胎盤組織片に、蛍光を発現する組換えGPCMVを感染させ、経時的に観察すると島状に感染領域が拡大するのが観察された(図2)。

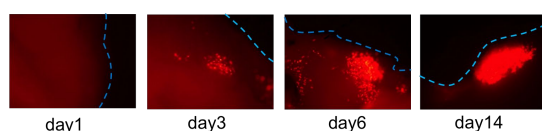


図2 GPCMV-RFP感染培養胎盤組織片

また、経時的なreal-time PCRによりウイルスDNA量の増加が確認され(図3)、

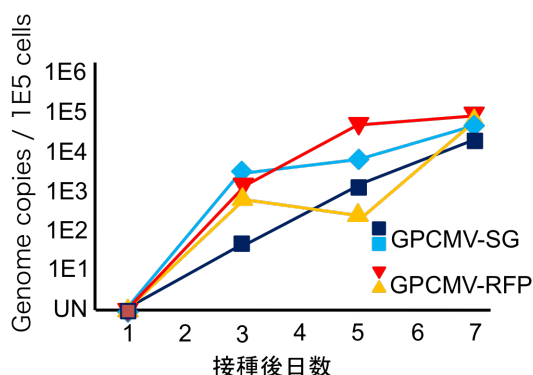


図3 培養胎盤組織片におけるGPCMVDNAの経時的変動

病理学的解析によりウイルス抗原がtropho-blast、yolk sac及び血管内皮細胞に検出された。異なる妊娠時期から分離培養された胎盤組織の比較では、妊娠後期胎盤において感染性または増殖性の低下が示唆された。このように、in vitroおよびin vivoに近い培養胎盤組織を用いた詳細な解析が可能となった。胎盤組織培養を用い、GPCMV及び細胞指向性に関わるとされる遺伝子を欠失させた組換えGPCMVを感染させ、経時的にRNAを回収した。また、変動の認められた遺伝子の一つについて、培養細胞(線維芽細胞及び上皮細胞)を用いて、ウイルス感染または非感染時における発現の変動を解析し、感染初期に変動が認められる事が分かった(図4)。

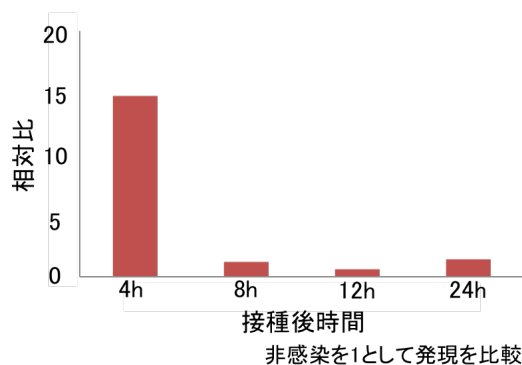


図4 GPCMV感染GPLIにおける遺伝子Aの発現変動

ヒトでのホモログ遺伝子とHCMVを用いての解析も行った。一方で、trophoblast等の培養胎盤細胞樹立には至らなかった。

##### 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 1件)

- 1) Kaede Hashimoto, Souichi Yamada, Harutaka Katano, Saki Fukuchi, Yuko Sato, Minami Kato, Toyofumi Yamaguchi, Kohji Moriishi, Naoki Inoue. Effects of immunization of pregnant guinea pigs with guinea pig cytomegalovirus glycoprotein B viral spread in the placenta. Vaccine 2013 31 3199-3205

(学会発表)(計 5件)

- 1) 山田壮一、福地早希、金井亨輔、片野晴隆、佐藤由子、井上直樹 モルモット胎盤組織培養系の樹立とウイルス局在解析 第27回ヘルペスウイルス研究会 2012 愛知
- 2) Souichi Yamada, Saki Fukuchi, Kaede Hashimoto, Harutaka Katano, Yuko Sato, Yoshiko Fukui, Naoki Inoue Effects of cytomegalovirus infection on placenta in a guinea pig model. International Federation of Placenta Associations Meeting 2012 Hiroshima
- 3) Souichi Yamada, Saki Fukuchi, Kaede Hashimoto, Harutaka Katano, Yuko Sato, Naoki Inoue Establishment of an ex vivo culturing method for guinea pig placental tissues and analysis of virus spread in the tissue. Congenital Cytomegalovirus Conference 4<sup>th</sup> 2012 USA
- 4) 山田壮一、橋本楓、福地早希、片野晴隆、佐藤由子、金井亨輔、井上直樹 モルモット胎盤組織培養系の樹立とウイルス感染動態の解析 第60回日本ウイルス学会学術集会 2012 大阪
- 5) 山田壮一、橋本楓、福地早希、片岡紀代、片野晴隆、井上直樹 ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)UL128/130/131A のホモログであるモルモットCMV GP129/131/133 遺伝子群は細胞指向性の決定因子である 第61回日本ウイルス学会学術集会 2013

神戸

〔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

特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 壮一 (YAMADA, Souichi)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任

研究官

研究者番号: 10514119

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号: