

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：84407

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861351

研究課題名(和文) 周産期における麻疹ウイルス胎盤感染がもたらす胎児への影響に関する研究

研究課題名(英文) A study on the mechanism by which measles virus infection in placental tissue causes the prematurity or death of the fetus

研究代表者

倉田 貴子 (Kurata, Takako)

大阪府立公衆衛生研究所・感染症部・主任研究員

研究者番号：70435890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：麻疹ウイルス(MeV)はワクチンで予防できる病気である。近年ワクチン接種率の上昇に伴い日本国内での患者数は減少し、2015年には国内からの排除が認められたが、国内では輸入麻疹による成人麻疹の散発事例が相次いでいる。MeVは妊婦に感染すると早産や流産を起こすことが知られているが、その機序については不明であった。本研究では、ヒト胎盤由来の培養細胞を用いてMeVの胎盤感染モデルを作成し、感染が胎盤にもたらす影響を検討した。その結果、MeVは胎盤細胞へ持続的に感染し、代謝の障害、局所でのホルモンの分泌増加、インターフェロンの産生を引き起こし、胎盤の機能を障害することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Measles is vaccine preventable disease. Recent years, the number of measles patients was decreasing due to high vaccination coverage in Japan, and the measles elimination was achieved in 2015. However, sporadic cases and small outbreaks associated with imported measles have been still reported. Measles virus (MV) infection during pregnancy increases the risk of fetal prematurity and death. However, pathophysiology of MV infection in placenta has been largely unknown. In this study, we established an in vitro model of MV infection in human placenta using human trophoblast cell lines, and examined the effect of MV infection on the placental physiology. We demonstrated that MV established a persistent infection in a trophoblast cell line JAR, and dysregulated gene expression and cell physiology through which the maintenance of pregnancy was likely interfered by MV.

研究分野：ウイルス学

キーワード：麻疹ウイルス 胎盤由来細胞

1. 研究開始当初の背景

ヒトの胎児の死産、流産の原因の多くは、胎児の染色体異常や発育不全であり、微生物の感染に起因するものは十分に明らかにされていない。TORCH 症候群を代表として、妊娠期間中の感染症が胎児に影響することも多い。麻疹 (MV) は現在も世界的に 15 万人以上の患者発生が報告されており、世界の 5 歳以下の乳幼児死亡の 2% を占めるウイルスである。妊婦に感染すると早産や流産のリスクが報告されている。日本では、これまでに妊婦の MV 感染症例で胎盤組織にウイルスが感染して胎児が死亡したと考えられる症例と、早産になったそれぞれ 2 症例、合わせて 4 症例が報告されている。感染後 2 週間以内の流産及び早産の報告が主だが、1 例は胎盤に数ヶ月間ものあいだ MV が持続感染したことが確認されている。MV の周産期感染が胎児にあたえる影響についての症例報告は希少であるが、実際には MV が流行していた当時に十分な調査が実施されていなかったこともあり、周産期における MV 感染の影響は過小評価されていると推定される。

MV 感染は呼吸器における免疫系細胞 (樹状細胞や肺胞マクロファージ等) への SLAM/CD150 分子を介した感染により始まる。感染した細胞が血流によって全身へと広がり、全身の免疫組織を中心に増殖してウイルス血症となる。血中の MV は Nectin4 分子を介して基底膜側から呼吸器上皮に感染し管腔側へ出芽することにより、効率よくウイルスを体外に排泄する。SLAM、Nectin4 以外の MV 侵入レセプターには、ワクチン株が主に使用する CD46 が知られている。しかし、これまでに胎盤への MV 感染機構に関する報告は殆どなく、胎盤での MV 感染が流産や早産を引き起こすメカニズムは不明である。

2. 研究の目的

本研究では周産期の MV 感染が胎盤の機能かく乱を介して妊娠継続にどのような影響を与えるかを明らかにする。in vitro MV 胎盤感染モデルを構築して、野生株およびワク

チン株 MV が持つ胎盤絨毛由来細胞に対する感染性、持続感染の有無、細胞変性効果、細胞生理に与える影響とその分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

1) 使用するウイルスと細胞

当研究所で感染者の臨床検体から分離された MV 野生株と、ワクチン株 (CAM-70: 阪大微研、AIK-C: 北里第一三共、Schwarz 株: 武田薬品) を使用する。それぞれ B95a 細胞にてウイルスを増幅し、TCID₅₀ を評価して感染実験に供する。細胞は、培養細胞として樹立されているヒト胎盤由来絨毛細胞 (JAR) を用いている。

2) ワクチン株および野外株麻疹ウイルスの絨毛細胞への感染の評価

上記の各 MV 株を JAR 細胞に暴露し経時的に感染細胞の観察・培養上清及び感染細胞の回収を行う。ウイルス感染の有無は細胞変性効果 (CPE) の観察、ウイルス抗原に対する抗体を用いた間接蛍光抗体 (IF) 法、ウエスタン (WB) 法、ウイルスゲノムを標的にした RT-PCR 等により確認する。細胞の生理学的な変化は、細胞内在性 ATP 量、各種胎盤性ホルモン (progesterone (PG), estrogen E3, human chorionic gonadotropin (hCG)) 産生量、LDH 漏出量、IFN 産生量を測定する。

3) 侵入レセプターの特定

RT-PCR 法、IF 法及びフローサイトメトリ法を用いて、既知の MV 受容体 (CD46, CD150, Nectin4) の発現プロファイリングを行う。各受容体に対するモノクローナル抗体が MV 感染を阻害するかを評価し、MV 感染への寄与を明らかにする。

4) in vitro 胎盤感染モデルの構築

JAR に CAM70 株と野生株を感染させた後、1 週間に 1 度 1/3 量を 20 代以上継代し、持続感染細胞の樹立が可能かを検討する。MV 持続感染細胞が樹立できた場合には、持続感染に寄与する候補因子を特定するために感染細

胞と非感染細胞のマイクロアレイ (アジレント社 Whole Human Genome DNA マイクロアレイ 4x44K) を用いて比較する。

5) MV 感染胎盤組織の免疫染色

MV 感染後早産した妊婦の胎盤組織における MV 感染の有無を検討する。胎盤組織の病理所見および抗 MV 抗体を用いた免疫染色 (IHC) により胎盤での感染状況を確認する。また、マイクロアレイの結果感染により惹起されることが想定された宿主因子に対する IHC を行い、*in vitro* MV 胎盤感染モデルで得られた知見の *in vivo* での再現性を検討する。

4. 研究成果

1) 胎盤由来細胞での MV 感染の評価

JAR 培養上清中のワクチン株と野生株 MV のゲノムはいずれも暴露後経時的に増加し 7 日目にピークとなった。ワクチン株 MV ゲノムは感染翌日の培養上清中に 2.8×10^3 copy/ul 検出され、これは野生株の約 20 倍であった。感染 7 日目には共に約 10^6 copy/ul まで増加した。感染後 2 日目の JAR 凍結融解調整液に含まれる感染性 MV はワクチン株で約 10^4 TCID₅₀/ml で、これは野生株の約 10 倍であった。JAR への MV 感染では、培養上清中及び細胞中に含まれる MV 感染価はいずれもワクチン株が高く推移した。

感染細胞の形態の観察では、合胞体形成が著しく観察される Vero/SLAM 細胞に比べて、JAR では合胞体形成やその他明瞭な CPE は乏しかった。

生理学的な変化としては、MV 感染後に野生株、ワクチン株とも細胞内 ATP 量の減少がみられ、CAM 株で最大 55% 減少した。LDH の漏出量は CAM 株で非感染細胞の 1.1 倍、野生株で 1.3 倍となった。形態学的観察や LDH マーカーを指標としたアッセイで顕著な細胞障害性が見られなかったが、培養上清中の hCG 産生量は有意に増加した。PG 産生量は CAM 株感染のみで増加がみられたが、E3 は野生株、

CAM 株ともに感染の有無で分泌量の変化はみられなかった。

2) MV 侵入レセプターの同定

JAR の表面に発現している MV 侵入レセプターをフローサイトメトリー法で確認したところ、CD46 及び Nectin4 の発現が見られた一方で、CD150 の発現は確認されなかった。Nectin4 の発現は CD46 に比して弱かった。RT-PCR 法及び IF 法においても同様の結果が得られ、JAR では CD46 と Nectin4 が発現していることが確認された。CD46 と Nectin4 に対するモノクローナル抗体を使った中和試験では、anti-Nectin4 抗体で濃度依存的にウイルスの感染が有意に抑制されたが、CD46 に対する抗体では感染抑制は検出感度以下であった。

3) *in vitro* 胎盤感染モデルの樹立

野生株及び CAM70 株 MV を用いて JAR 細胞での持続感染株の樹立を試みた。65 代継代を行った細胞の凍結融解調整液を用いたタイトレーションでは、野生株で 11.2 TCID₅₀/mL、CAM 株では 13.9 TCID₅₀/mL、でいずれも感染性のウイルスが検出された。WB 法によってウイルス抗原が確認され、IF でほぼ全ての細胞に抗原の発現が確認できたことから、持続感染細胞が樹立されたことが強く示唆された。持続感染細胞では非感染細胞と比べて、細胞内在性 ATP 量が CAM 株で 85%、野生株で 91% に減少した一方で、胎盤性ホルモン分泌量はいずれも 20 倍に増加した。また感染細胞の IFN β と IFN γ の産生が ELISA により確認されたが、IFN α と IFN δ は検出できなかった。IFN 産生は、ワクチン株で野生株よりも IFN β で 3 倍、IFN γ で 14 倍高かった。

胎盤持続感染に関与する因子の検索のために行ったマイクロアレイでは、対象とした全 2 万遺伝子中、10 倍以上の変動を示す遺伝子は CAM が 84、FI が 73 種類で、共通した遺伝子変動は 25 種類であった。CAM が野生株より 10 倍以上発現を変動させた遺伝子は 17 種

類、その反対は 28 種類であった。抗ウイルス因子は IFN β 、IFN γ /IL28A、IFN γ /IL29、BST-2、IFITM1/3、TNF 等が同定され、持続感染成立への寄与が疑われた。一方、IFN α 、IFN β は有意な転写上昇が認められず、ELISA データともよく一致した。hCG の産生に関わる酵素 CGA は 5-11 倍、CGB は 0.5-3 倍の転写増が認められ、MV 感染による hCG 分泌増はおもに CGA の転写増強によるものと考えられた。progesteron 分泌増の明確な責任因子は同定できなかった。

代表的な抗ウイルス因子として知られる IFITM1-3、BST-2 について 293T 細胞へそれぞれ導入し、CAM 株の感染実験を行った。各因子を導入した細胞での MV 増殖性はコントロール細胞と同等であり、上記の 2 因子が JAR での持続感染成立に積極的に関与する可能性は高くないと考えられた。

4) MV 感染胎盤組織を用いた評価

MV 感染胎盤組織切片と正常胎盤組織切片を anti-MV、anti-IL-28/29、anti-IFITM1 ポリクローナル抗体でそれぞれ免疫染色をおこなった。anti-MV ポリクローナル抗体での染色は、胎盤組織内で見られた合胞体形成領域を中心に染色された。MV 感染組織における IL-28/29 および IFITM の発現レベルは正常組織よりも高く、IL-28/29 は血清、IFITM は血管内皮細胞で主に発現していた。それぞれの因子は、MV 感染細胞での発現は認められなかったが、MV 感染胎盤組織での発現量上昇が確認された。

本研究では、MV 胎盤感染により生じる影響の評価と MV 胎盤感染モデルの作出を試み、MV 野生株及びワクチン株はいずれも Nectin4 を介してヒト胎盤由来細胞に侵入し、持続感染を成立させる事が示唆された。MV の持続感染を胎盤由来細胞で詳細に解析した報告としては我々の調査した範囲では初めてになると思われる。MV による細胞障害性は緩徐なもの細胞内 ATP 量を減少させること、IFN β 、

IFN γ 産生と hCG 分泌亢進を引き起こすことを明らかにできた。MV の胎盤感染は細胞内の代謝を低下させるが、IFN と局所での hCG の産生亢進は、胎児への感染阻止と局所での胎盤機能障害に影響する可能性が考えられた。また、JAR での持続的な MV 感染ではマイクロアレイの結果から、複数の抗ウイルス分子を誘導することが示され、それらのうち IFITM 1 及び IFN α については実際の MV 感染ヒト胎盤組織での発現も確認できた。

in vitro の MV 感染実験で得られたデータは、実際の妊娠胎盤の MV 感染で部分的に反映されている。従って、本研究でヒト胎盤由来細胞を使い in vitro MV 胎盤感染モデルを作出したことは意義深い。今後は MV 感染により転写活性が上昇した抗ウイルス分子を中心に検討を進め、MV の長期的な胎盤持続感染成立のメカニズムを探る予定である。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 10 件)

1. Kanbayashi D, Kurata T, Takahashi K, Kase T, Komano J. Serological Discordance between Vaccine and Circulating Strains of Rubella Virus - Risk of Rubella Outbreak in the Human Population Naïve to Genotype 2B. BMC Infectious Diseases. (in revision)
2. 倉田貴子 山元誠司 弓指孝博 久米田裕子 本村和嗣 他 14 名 関西国際空港の麻疹事例の検査結果から得られた知見 病原微生物検出情報. 2017; 38 : 49-51 (査読無)
3. 倉田貴子 周産期における麻疹ウイルス胎盤感染がもたらす胎児への影響に関する研究 産科と婦人科 2016.9 (83); 1075-1077 (査読無)
4. Kurata T, Kanbayashi D, Nishimura H, Komano J, Kase T, Takahashi K. Increased reports of measles in a low endemic region during a rubella outbreak in adult populations. Am J Infect Control. 2015 Jun; 43(6): 653-5. doi: 10.1016/j.ajic.2015.02.022. (査読有)
5. 大阪府における風しん流行と先天性風しん症候群の発生動向
倉田貴子、上林大起、弓指孝博、加瀬哲男、小林和夫、田邊雅章、木下優、松本治子、安井良則、塩見正司、東野博彦、

- 八木由奈、吉田英樹、奥町彰礼、廣川秀徹、狭間礼子、入谷展弘、信田真里、谷本芳美、松浪桂 病原微生物検出情報.2015; 36: 120-122. (査読無)
6. Kurata T, Kanbayashi D, Komano J, Kase T, Takahashi K. The reply. Pitfalls of National Surveillance Systems for Vaccine-associated Measles. *Am. J. Med.*127(8):e19(2014) doi: 10.1016/j.amjmed.2014.04.027. (査読有)
 7. Kurata T, Kanbayashi D, Kinoshita H, Arai S 他 13 名 Late onset of vaccine-associated measles in an adult with severe clinical symptoms: a case report.*Am J Med.* 2014 Apr;127(4):e3-4. doi: 10.1016/j.amjmed.2013.10.015. (査読有)
 8. Takeda S, Kanbayashi D, Kurata T, Yoshiyama H, Komano J. Enhanced susceptibility of B lymphoma cells to measles virus by Epstein-Barr virus type III latency that upregulates CD150/signaling lymphocytic activation molecule.*Cancer Science.* 2014; 105(2): 211-218. (査読有)
 9. Abo H, Okamoto K, Anraku M, Otsuki N, Sakata M, Icenogle J, Zheng Q, Kurata T, Kase T, Komase K, Takeda M, Mori Y. Development of an improved RT-LAMP assay for detection of currently circulating rubella viruses.*J Virol Methods.* 2014 Oct;207:73-7. (査読有)
 10. Kawabuchi-Kurata T, Misaki T, Suehiro Y, Komano J, Kase T, Takahashi K. Longitudinal Study on Respiratory Viral Co-Infections in the Presence or Absence of Clinical Manifestation in Infants Aged 0-2 Years Released: *Jpn J Infect Dis. Vol. 67 (2014) No. 3 p. 216-220* (査読有)
- [学会発表](計 10 件)
1. IFN- λ 2 による風疹ウイルスの感染制御, 上林大起、倉田貴子、弓指孝博、駒野淳, 第 39 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 2016.11.30
 2. 麻疹ウイルス持続感染によるヒト絨毛膜細胞の mRNA の発現変動, 倉田貴子、上林大起、弓指孝博、吉田剛、駒野淳第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌コンベンションセンター, 2016.10.24
 3. An in vitro experimental model of measles virus persistence in placenta. 倉田貴子、上林大起、弓指孝博、加瀬哲男、駒野淳, 第 63 回日本ウイルス学会学術集会, 福岡国際会議場, 2015.11.22-24.
 4. 麻疹と修飾麻疹について~MR ワクチン 2 回接種の重要性~ 上林大起、倉田貴子、福村和美、畑中己穂、田邊雅章、松本治子、駒野淳、加瀬哲男、高橋和郎 第 18 回日本ワクチン学会学術集会, 福岡国際会議場, 2014.12.6
 5. ヒト胎盤由来細胞における麻疹ウイルスの増殖 kinetic, 倉田貴子、上林大起、駒野淳、加瀬哲男、高橋和郎, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014, パシフィコ横浜, 2014. 11.10-12.
 6. 大阪府における風疹の流行と先天性風疹症候群の検査診断. 倉田貴子、上林大起、加瀬哲男、高橋和郎、福村和美、畑中己穂、田邊雅章、松本治子、五十嵐愛子、北島博之、駒野淳 第 18 回日本ワクチン学会学術集会, 福岡国際会議場 2014.12.6
 7. HI 抗体価で評価されてきた風疹に対する感染防御力は流行ウイルスに対して正しい判断をあたえるのか? 上林大起、倉田貴子、駒野淳、加瀬哲男、高橋和郎 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, パシフィコ横浜, 2014.11.10
 8. 水面下における麻疹の流行レベル推定 倉田貴子、上林大起、西村公志、加瀬哲男、駒野淳 第 73 回日本公衆衛生学会総会, 栃木県総合文化センター, 2014.11.5
 9. 生物発光を利用した風疹ウイルス検出系の実験室診断への応用~流行要因解明に向けて~ 上林大起、倉田貴子、駒野淳 第 73 回日本公衆衛生学会総会, 栃木県総合文化センター 2014.11.5
 10. Cross-Neutralization of Rubella Virus Strains with Human Sera Measured by A Novel High-Throughput Neutralization Assay. Kanbayashi D, Kurata T, Kase T, Takahashi K, Komano J. The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity 2014.9.23
- [図書](計 3 件)
- 1 病原体検出マニュアル 麻疹第 3.3 版 駒瀬勝啓、染谷健二、關文緒、中津祐一郎、田原舞乃、酒井宏治、竹田誠、長野秀樹、三好正浩、青木洋子、小川知子、七種美和子、児玉洋江、皆川洋子、安井善宏、加瀬哲男、倉田貴子、佐倉千尋、村田祥子、濱崎光宏、世良暢之、加藤峰史、平良勝也 他 病原体検出マニュアル (国立感染症研究所); 1-33; 2015 年 8 月
 - 2 病原体検出マニュアル 風疹第三版 森嘉生、大槻紀之、岡本貴世子、坂田真史、竹田誠、安井善宏、皆川洋子、倉田貴子、上林大起、加瀬哲男 病原体検出マニュアル (国立感染症研究所); 1-48; 2015 年 3 月

- 3 病原体検出マニュアル 先天性風疹症候群第三版
森嘉生、大槻紀之、岡本貴世子、坂田真史、竹田誠、安井善宏、皆川洋子、倉田貴子、上林大起、加瀬哲男
病原体検出マニュアル (国立感染症研究所) ; 1-8; 2015年3月

〔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

倉田 貴子 (KURATA, Takako)
大阪健康安全基盤研究所・ウイルス課・主任
研究員

研究者番号：70435890

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()