

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460487

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来3次元培養組織を用いたウイルス大脳感染機序の解析

研究課題名(英文) Analysis of pathogenesis of virus encephalitis using human iPS 3D culture system

研究代表者

河崎 秀陽 (Hideya, Kawasaki)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：90397381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究ではヒトCMV中枢神経感染特有の新たな病理機序を研究することを目的としていた。実験を進めるにあたって、iPS細胞から3次元大脳培養組織を作成することが難しく、当初の計画通りに実験は進まなかった。しかしその過程でCMV血行感染における初期感染病理機序の解明が進み、感染初期には血液脳関門がCMV粒子に対して機能的に働き、Integrin 1の分布が大切であることがわかった。これらの結果はAmerican Journal of Pathology誌、Journal of Visualized Experiments誌、Pathology International誌に論文を発表した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this project is to find out new pathogenesis of CMV encephalitis. Unfortunately, we found that it was difficult to establish the 3-D culture of cerebrum from human iPS. We could not achieve the primary goal of this project. But to elucidate the mechanisms of CMV susceptibility in the developing brain, cell tropism and the infectious dynamics of CMV infection were investigated. We evaluated intraventricular and intravascular infections from the perspective of the distribution of CMV and its receptor in the earliest phase of infection. Murine CMV (MCMV) positive cells were colocalized mainly with meninges and choroid plexus or with endothelial cells and pericytes. Therefore, our data demonstrated that the initial distributions of MCMV particles and 1 integrin determine the distinct pattern of infection in the brain in the acute phase. We have published these results in the American Journal of Pathology, Journal of Visualized Experiments, and Pathology International.

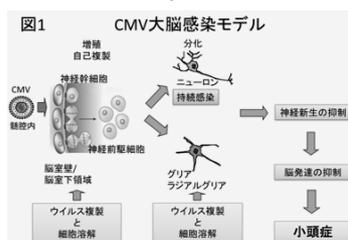
研究分野：実験病理、人体病理、ウイルス学

キーワード：サイトメガロウイルス 大脳 iPS細胞 neurovascular unit

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

母子感染、特に TORCH 症候群の中で、CMV は最も高頻度に胎内感染を引き起こす。先天 CMV 感染においては約 1% の胎児が感染し、CMV に感染した胎児の約 5~10% に小頭症、小脳低形成、小眼症などの重篤な神経症状を認める。申請者らは今まで幹細胞、動物実験を用いて CMV 大脳感染の病理機序を明らかにしてきた。神経幹細胞がマウス CMV (MCMV) に感受性を示すこと (Kosugi, Kawasaki et al. Lab Invest 2000)、大脳において神経幹/前駆細胞の量が CMV 感染感受性にとって重要な因子であることを発表した (Kawasaki et al. Lab Invest 2002) (Tsutsui, Kawasaki et al. J Virol 2002)。その一方で胎生初期やマウス ES 細胞/iPS 細胞の段階では MCMV の感染感受性は極めて低いことも明らかにした (Matsukage, Kawasaki et al. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2006) (Kawasaki et al. PLoS One 2011)。これらの結果から胎生中期~後期における神経幹・前駆細胞への CMV 感染が細胞の増殖・神経新生を抑制し、小頭症を引き起こすというモデル (図 1) を提唱した (Tsutsui, Kosugi, Kawasaki, Rev Med Virol. 2005)。



2. 研究の目的  
日本では毎年約 1000 人の神経障害をもった症候性サイト

メガロウイルス (CMV) 患者が発生している。ダウン症につぐ大きな先天異常であり毎年膨大な医療費を必要とする。CMV 先天異常の新たな感染機序を解明することは将来の先天 CMV 感染の予防・治療にとって必要不可欠である。今まで大脳 CMV 感染機序の解析はマウスモデルを中心に行われた。ヒト大脳での CMV 感染実験には限界があるため、ヒト CMV 中枢神経感染機序はほとんどわかっていない。2013 年にヒト iPS/ES 細胞から大脳立体組織を作成するという画期的な方法が報告された。2012 年にはヒト iPS 細胞から血液脳関門 (BBB) を *in vitro* で再現する新しい技術も発表された。今回の研究ではこれらの新しい技術を用いて、申請者らが提唱してきたマウス大脳 CMV 感染モデルをヒトモデルで検証し、ヒト CMV 中枢神経感染特有の新たな病理機序の解明や治療法につなげることを目的とする。

### 3. 研究の方法

今まで CMV 大脳感染機序はマウスモデルを中心に解析されてきた。今回はヒトで起きている HCMV 大脳感染機序を解明するためにヒト iPS 細胞を利用する計画である。2013 年にヒト iPS/ES 細胞から 3 次元大脳組織が作

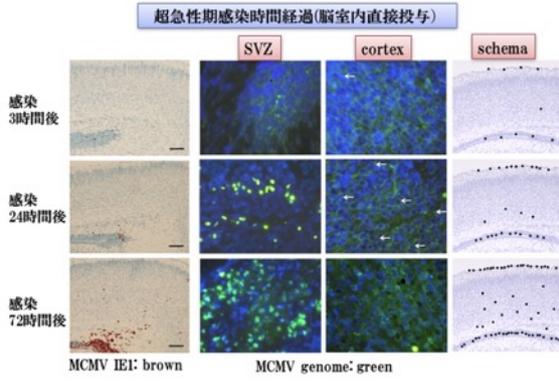
成可能との画期的な報告がされた。まず申請者らはヒト iPS 細胞より 3 次元大脳組織を安定的に作成するための技術を獲得する計画である。作成されたヒト 3 次元大脳組織を用いて HCMV の感染実験を行い、今まで申請者らが提唱してきたマウス CMV 大脳感染モデルがヒト大脳モデルにおいても成り立つかを検証、解析する。次に血行性大脳感染時において HCMV がいかにして brain blood barrier (BBB) の破綻を引き起こし、脳実質に侵入するのかを検索する予定である。そのためにヒト iPS 細胞より血管内皮細胞、血管周皮細胞を分化・分離後に *in vitro* ヒト BBB 3 次元モデルを作成し、CMV 感染実験を行う計画である。

ヒト iPS 細胞から 3 次元モデルがうまくいかなかった時のために、マウスモデルを用いた大脳初期感染における MCMV 粒子動態や血管 BBB と MCMV 粒子との関係の研究も同時に行った。こちらの実験では 1: 新生仔マウスに MCMV を静脈内/頭蓋内投与し、感染後に経時的に MCMV IE1 の発現を観察。mannitol 投与による破壊と感染感受性との比較もおこなった。2: 蛍光 microbeads を静脈内/頭蓋内投与し、MCMV 感染分布と比較。3: MCMV genome の *in situ* hybridization を行う。4: ウィルス粒子自体が光る M32-GFP 発現 MCMV を作製し、血行性感染における大脳急性感染を観察。5: NIH3T3 細胞の CD29 knockdown や抗体による functional blocking での MCMV 感染感受性の比較。6: *in vivo*, 大脳スライスで CD29 の発現分布と MCMV 感染との相関を比較。7: 電子顕微鏡でウイルス感染後の血管表面の状態を観察。8: 新生仔マウス脳を透明化法 (CUBIC 法) にて大脳を透明化し、血管の走行とウィルスの分布を検索した。

### 4. 研究成果

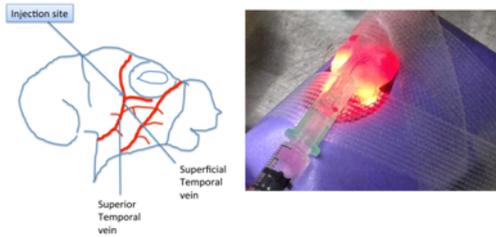
感染超初期の感染分布を調べるために、MCMV の頭蓋内 (脳室内) 投与をまずおこなった。経時的に大脳での MCMV 抗原陽性細胞の分布変化を調べたところ、感染は、脈絡叢、髄膜、ventricular zone (VZ), subventricular zone (SVZ) からはじまり、感染経過とともに皮質にひろがっていくことがわかった。*in situ* hybridization で調べた MCMV genome の分布でもその傾向は一致しており、シェーマのような感染の拡がりを示している。この感染様式は髄腔内感染モデルとなることがわかった (図 2)。

図 2



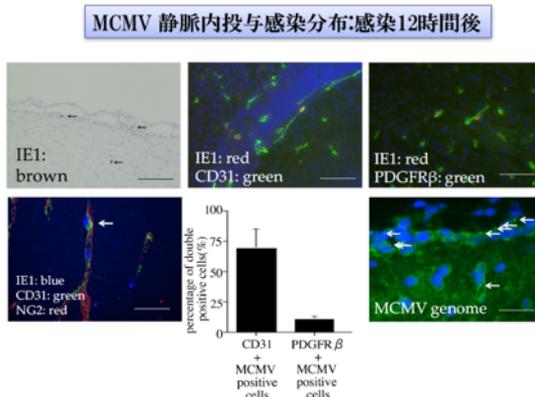
次に MCMV の静脈内投与(図 3)を行ったところ感染後 12 時間では、感染細胞(IE1 陽性細胞)は血管内皮細胞(CD31 陽性細胞)、血管周皮細胞(PDGFR $\beta$  陽性細胞、NG2 陽性細胞)、髄膜細胞であった。フローサイトメトリの解析においては、その比率は約 70%

図 3



程度は血管内皮細胞で、約 10%程度が血管周皮細胞でした。In situ hybridization においてもほぼ同様の分布で、MCMV 粒子が感染初期では BBB で捕らえられていることがわかった(図 4)。

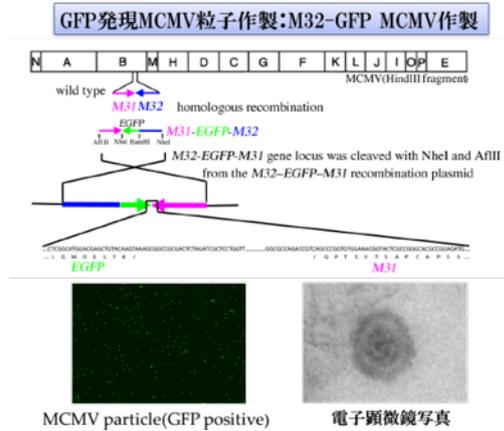
図 4



ウイルス粒子そのものの拡がりを知るために、GFP 発現ウイルス粒子を作製することにした。M32 蛋白の下流に GFP の融合蛋白ができるようにデザインし、homologous recombination で変異ウイルスを作成した。電子顕微鏡でみるとウイルスの構造をもっていた(図 5)。この GFP 発現 MCMV で実験を行った。

まずウイルス粒子がどれくらいもれやすいのか観察することにした。血行感染後 2 時間で、CD31 陽性の血管の近傍にウイルス粒子がみられたが、髄膜では

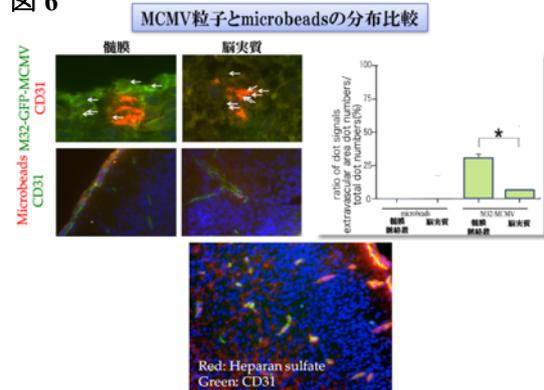
図 5



脳実質より血管の外側にウイルス粒子が多くみられた。これをカウントした像が右の図で、有意の差があった。これは感染が比較的弱い時は髄膜への感染を起こしやすいことを示している。これは血管の構造が脳の部位によって異なることを示している図である。この血管構造の違いがウイルスのもれやすさの原因かどうか調べるためにウイルス粒子と同様の直径をもっている蛍光 microbeads を静脈内に注入させたところ、同様に血管の周囲に microbeads がみられるが、microbeads のほうが血管の外側に漏出される比率が有意に高いことがわかった。

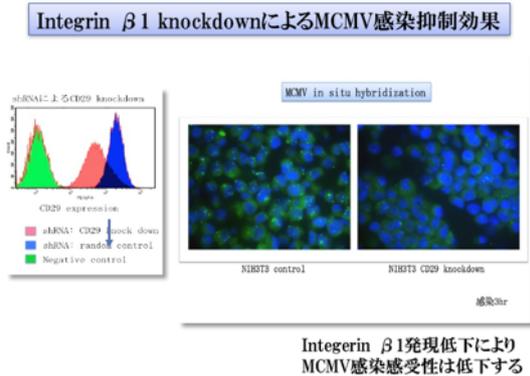
ウイルス粒子が microbeads よりも血管に trap されやすい理由は、このようにウイルスと接着に関連する heparan sulfate が血管内皮、髄膜に高発現をしているためである(図 6)。

図 6



ウイルス粒子はそばにあっても細胞が中に入らないといけないため、CMV の細胞の侵入に関わる receptor である integrin  $\beta 1$  に着目した。integrin  $\beta 1$  と CMV の関係を確認するために、shRNA によって integrin  $\beta 1$  の発

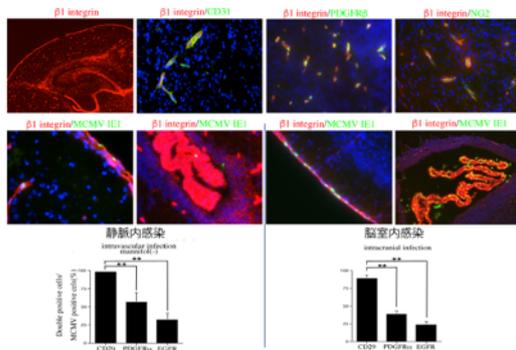
図 7



現を NIH3T3 細胞で低下した。その細胞に感染させると、感染 3 時間の in situ hybridization で MCMV の細胞内侵入の低下を認めた (図 7)。そこで脳内の integrin  $\beta 1$  の分布を観察することにした。

脳内の integrin  $\beta 1$  は SVZ, marginal area のみならず、脳実質の血管様構造に強発現がみられることがわかった。拡大すると integrin  $\beta 1$  は CD31 血管内皮細胞 PDGFR  $\beta$ , NG2 陽性 pericyte 陽性細胞と共在を認めた。integrin  $\beta 1$  陽性細胞が BBB の重要な構成因子となっていることが知られている。感

図 8

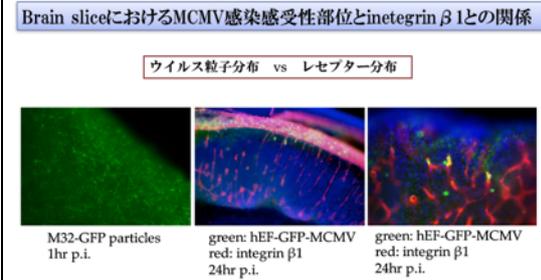


染 12 時間後には静脈内感染、脳室内感染いずれにおいても感染細胞は integrin  $\beta 1$  発現陽性細胞との co localization を認めた。フローサイトメトリーでは感染細胞と integrin  $\beta 1$  の colocalization は他の PDGFR  $\alpha$  や EGFR よりも有意に高く、約 90% と高い相関を認めた (図 8)。

ウイルス粒子の分布が大事なのかレセプター分布が大事なのか brain slice を用いて解析した。大脳スライスでは感染直後にはウイルス粒子がびまん性に分布するにもかかわらず、MCMV IE1 発現細胞は integrin  $\beta 1$  発現細胞と一致した。そして大脳スライスにおいて CD29 発現部位と MCMV 感染部位はほぼ一致した (図 9)。

それでは integrin  $\beta 1$  を blocking 抗体で直接阻害して、感染抑制効果を調べることにしました。培養細胞に integrin  $\beta 1$  blocking 抗体を処理して、感染させると感染が濃度依存性に有意に抑制されます Brain slice においても integrin  $\beta 1$  blocking 抗

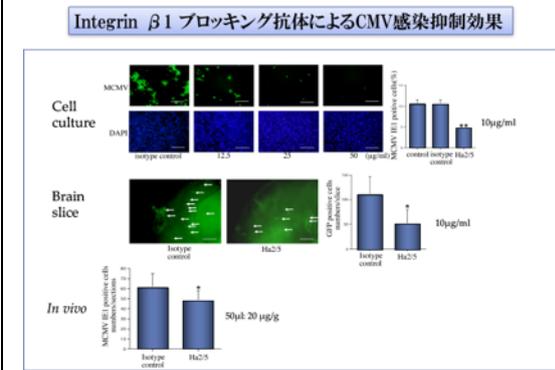
図 9



体を処理すると感染が抑制された。in vivo における integrin  $\beta 1$  blocking 抗体は facial temporal vein に注入した後に、感染させると軽度ではあったが、有意に低下した。integrin  $\beta 1$  blocking 抗体は BBB の破壊を促進するので、このような微妙な結果となったと考えた (図 10)。

感染 24 時間では血管に trap されることが

図 10

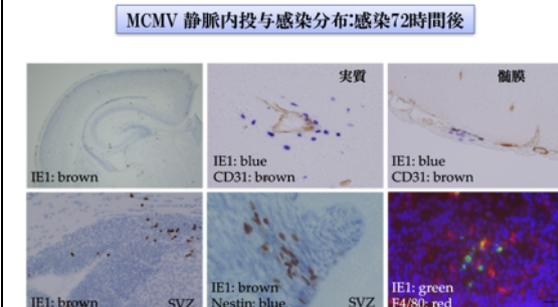


多いが、感染 72 時間では血管の外側に感染細胞がみらる。これは BBB の破綻を示唆する結果であった。

ウイルスは脳の様々部分に感染がひろがっていくが、脳室周囲にも感染が広がる。そこは nestin 陽性細胞との共在を認めた。また F4/80 陽性細胞が IE1 陽性細胞周囲に集まってくることもわかった (図 11)。

BBB 破綻に影響を与える因子を探索するこ

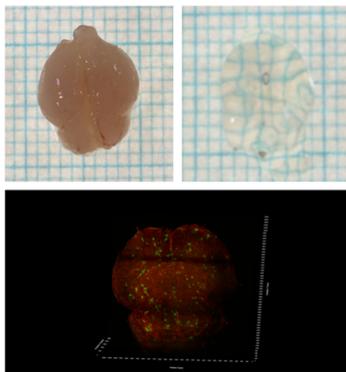
図 11



とにした。最近では透明化技術が開発され、透明化法の一つである CUBIC 法で透明化し、ウイルスの拡がりを三次元的に観察した。

感染 72 時間後の新生仔マウスの静脈内に lectin を注入し、血管をラベリングした (赤色)。感染細胞は GFP 陽性細胞として判

図 12

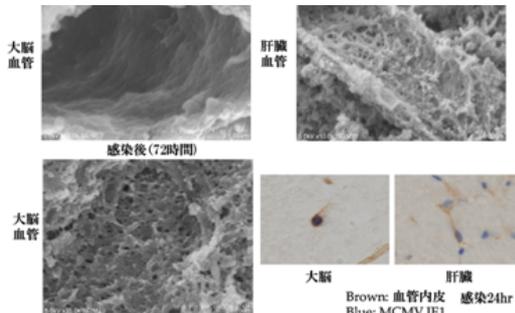


別できる。このように三次元の感染細胞の拡がりや、血管周囲に感染がひろがっていく様子や、髄膜への感染がみられる像もあった (図 12)。

BBB 破綻に影響のあるマ

トリックスメタロプロテアーゼの活性化を調べた。感染 72 時間で MMP の活性化を認めた。そして炎症によって誘導される MMP9 に注目した。western blotting では感染 24, 72 時間で、ごくわずかの MMP9 の増加をみとめ、BBB の構成因子である claudin-5 の発現変化はみとめなかった。しかし免疫染色で観察すると感染 72 時間では感染細胞周囲に MMP9 の増加を認めた。

図 13

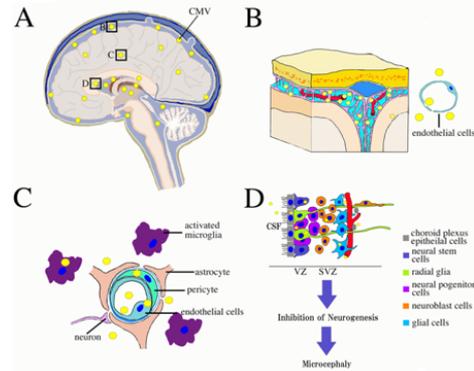


claudin-5 の発現は BBB の integrity を観察することができる。感染 12 時間では claudin-5 の配列の乱れはなかったが、72 時間では claudin-5 の配列の乱れを認めた。

図 13 は血管内腔の SEM 像である。脳の血管内腔はスムーズな構造をとっています。しかし肝臓の血管内皮は疎で穴を多く認めました。感染 24 時間でみると、血管に trap される量や外に漏れ出す量は肝臓で圧倒的に高くなる。このような血管の構造の違いは初期感染においてウイルス粒子に拘束される率や血管のもれやすさに影響をあたえます。感染後 72 時間後には血管が疎で穴が多くみられるようになった。感染というプロセスを通してより脳に感染しやすくなるということがわかった。

これらの結果を総説に書き、pathology international に掲載され表紙を飾ることができた。そのシェーマを図 14 のようにまとめることができた。

図 14



## 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 8 件)

- ① Kawasaki H, Kosugi I, Meguro S, Iwashita T. Pathogenesis of developmental anomalies of the central nervous system induced by congenital cytomegalovirus infection. *Pathol Int*, 67(2):72-82, 2017(査読有り)
- ② Yasuharu Takaku, Hiroshi Suzuki, Hideya Kawasaki, Isao Ohta, Daisuke Ishii, Satoshi Hirakawa, Takami Tsutsui, Haruko Matsumoto, Sayuri Takehara, Chinatsu Nakane, Kana Sakaida, Chiaki Suzuki, Yoshinori Muranaka, Hirotohi Kikuchi, Hiroyuki Konno, Masatsugu Shimomura, Takahiko Hariyama. A modified 'NanoSuit®' preserves wet samples in high vacuum: direct observations on cells and tissues in field-emission scanning electron microscopy. *R Soc Open Sci*. 1;4(3):160887. 2017(査読有り)
- ③ Meguro S, Akamatsu T, Matsushima S, Kosugi I, Kawasaki H, Arai Y, Baba S, Tsuchida T, Shido Y, Suda T, Iwashita T. Phenotypic characterization of perivascular myoid cell neoplasms, using myosin 1B, a newly identified human pericyte marker. *Human pathology*, 62:187-198. 2017(査読有り)
- ④ Kiyoshi Misawa, Hideya Kawasaki, Rieko Matsuo, Kenichi Sugiyama, Daiki Mochizuki, Shiori Endo, Atushi Imai, Yuki Misawa, Takashi Yamatodani, Kunihiro Mizuta, Hiroyuki Mineta. Human papillomavirus-associated small cell carcinoma/neuroendocrine carcinoma of the oropharynx: a report of two cases, *Springerplus*, 5(1): 1847, 2016(査読あり)
- ⑤ KIYOSHI MISAWA, HIDEYA KAWASAKI, SHIORI ENDO, DAIKI MOCHIZUKI, KOTARO MORITA, YUICHI HASHIMOTO, YUKI MISAWA, HIROTOSHI KIKUCHI, TAKEHARU KANAZAWA, TOSHIHIDE IWASHITA, and

HIROYUKI MINETA. Primary combined small and squamous cell carcinoma of the hypopharynx: A case report, Mol Clin Oncol, 4(5): 709-714, 2016(査読有り)

⑥ Kawasaki H, Kosugi I, Sakao-Suzuki M, Meguro S, Tsutsui Y, Iwashita T.

Intracerebroventricular and intravascular injection of viral particles and fluorescent microbeads into the neonatal brain. J Vis Exp. 24; (113). 2016 (査読有り)

⑦ Kawasaki H, Kosugi I, Sakao-Suzuki M, Meguro S, Arai Y, Tsutsui Y, Iwashita T. Cytomegalovirus initiates infection selectively from high-level  $\beta 1$  integrin-expressing cells in the brain. Am J Pathol. 185(5):1304-23. 2015 (査読有り)

⑧ Sakao-Suzuki M, Kawasaki H, Akamatsu T, Meguro S, Miyajima H, Iwashita T, Tsutsui Y, Inoue N, Kosugi I. Aberrant fetal macrophage/microglial reactions to cytomegalovirus infection. Ann Clin Transl Neurol. 1: 570-88, 2014 (査読有り)

[学会発表] (計 9 件)

① 河崎秀陽 NanoSuit 法による迅速なナノ粒子同定・定量法の開発バイオテック展、東京、2016 年 5 月 11 日～13 日、口頭発表

② 河崎秀陽 NanoSuit 法による迅速なナノ粒子同定・定量法の開発、新技術説明会、東京、2016 年 12 月 8 日、口頭発表

③ Hideya Kawasaki, Cytomegalovirus Initiates Infection Selectively from High-Level  $\beta 1$  Integrin-Expressing Cells in the Brain, The 16th Kyungpook-Hamamatsu Joint Medical Symposium, Hamamatsu Meeting, Japan, December 2016

④ 河崎秀陽、高久康春、太田勲、小杉伊三夫、目黒史織、筒井祥博、針山孝彦、岩下寿秀、NanoSuit 法を利用した高精度な迅速ウイルス粒子定量・同定法の開発、第 105 回日本病理学会、2016 年 5 月 14 日、仙台

⑤ 河崎秀陽、高久康春、太田勲、小杉伊三夫、目黒史織、岩下寿秀、針山孝彦、NanoSuit 法を利用した高精度な迅速ウイルス定量・同定法の開発、第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年 10 月 23 日～25 日、札幌

⑥ 河崎秀陽 病理学会学術研究賞 (A 演説) 2015 年 幹細胞に着目した中枢神経系サイトメガロウイルス感染症の病理発生

⑦ 河崎秀陽、高久康春、太田勲、小杉伊三夫、目黒史織、岩下寿秀、針山孝彦 ナノスーツ法を用いたウイルス濃度の迅速測定法の検討、日本病理学会、ポスター発表、2014 年 4 月 24 日、広島

⑧ 河崎秀陽、小杉伊三夫、目黒史織、岩下寿秀、急性期サイトメガロウイルス大脳感染における血行性/髄腔内感染標的細胞と integrin  $\beta 1$  との関係、神経ウイルス研究会、口演、2014 年 6 月 20 日、浜松

⑨ 河崎秀陽、高久康春、太田勲、小杉伊三夫、目黒史織、岩下寿秀、針山孝彦、ナノスーツ法を用いたウイルス濃度の迅速測定法の検討、日本ウイルス学会、ポスター発表、2014 年 11 月 9 日、横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：電子顕微鏡によるナノ粒子の直接的な同定・定量のための検出キットおよび方法

発明者：河崎秀陽、針山孝彦

権利者：浜松医科大学、河崎秀陽、針山孝彦

種類：知的財産権

番号：特願 2016-91820

出願年月日：2016 年 4 月 28 日

国内外の別：国内特許

○取得状況 (計 1 件)

名称：含水状態の生物試料の電子顕微鏡観察用保護剤、電子顕微鏡観察用キット、電子顕微鏡による観察、診断、評価、定量の方法並びに試料台

発明者：針山孝彦、高久康春、鈴木浩司、平川聡史、河崎秀陽、下村政嗣、石井大祐、太田勲、村中祥悟

権利者：独立行政法人科学技術振興機構

種類：知的財産権

番号：PCT/JP2015/052404

出願年月日：2015 年 1 月 28 日

国内外の別：国内特許，国際特許

[その他]

ホームページ等

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

(2) 研究分担者

小杉伊三夫 (Kosugi Isao)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10252173

岩下寿秀

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：00283432

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )