

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09709

研究課題名(和文) サイトメガロウイルス感染による絨毛間質血管リモデリング異常と胎盤・胎仔障害の解析

研究課題名(英文) Disorders of placental villus vascular remodeling induced by human cytomegalovirus infection

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠中期以降のヒトサイトメガロウイルス(HCMV)母子感染における胎盤では、HCMVの絨毛間質血管内皮細胞への感染が血管リモデリングに深刻な影響を及ぼし胎盤障害を来すと考えられている。しかし、血管リモデリングに深く関わる血管周囲細胞に対するHCMV感染の影響は全く検討されていない。本研究において、研究代表者らは、絨毛間質血管内皮細胞と血管周囲細胞がウイルスの主な感染細胞であり、さらに、HCMV感染した血管周囲細胞がDesmin異常発現を伴って間質細胞に形質転換することを明らかにした。この形質転換によるリモデリング異常が血管消失と間質線維化を同時に生ずる要因ではないかと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Human cytomegalovirus (CMV) is the leading viral cause of birth defects by congenital infection. Here we investigated HCMV infection of the placenta during the late phase of the infection. HCMV antigen-positive cells were exclusively found in the villus stroma but very rarely in the trophoblast. Most of HCMV-infected cells in the villus stroma were endothelial cells, pericytes and myofibroblasts. The number of viral antigen-positive cells closely correlated with the amount of viral DNA in the sections, suggesting that villus stromal cells, especially capillary endothelial cells and pericytes, are major sites for HCMV replication. In HCMV-infected villi, the disappearance of endothelial cells correlated with the increase in the number of HCMV-infected myofibroblasts. These data indicate that infectious damages of villus capillary vessels cause the fibrosis and the failure of vascular remodeling, resulting in the disturbances of placental functions and the fetal developmental disorders.

研究分野：ウイルス感染病理学、人体病理学

キーワード：サイトメガロウイルス 母子感染 胎盤

## 1. 研究開始当初の背景

先天性 HCMV 感染症は、病原微生物による先天異常の原因として最も多い(Cannon, BMC Public Health 2005)。母体から胎児へのウイルスの移行には、まず、胎盤感染の成立が要件となり、感染による胎盤機能障害は胎児発育障害の要因となる(Kosugi, Uirusu 2010;産科と婦人科 2011)。HCMV は妊娠初期に絨毛の浸潤性栄養膜細胞に感染後、絨毛間質細胞及び血管に感染し、胎児血中の細胞に感染伝播する(Pereira, Trends Microbiol 2005, 下図参照)。この時期の胎盤では、幼若絨毛の血管発生(vasculogenesis)と栄養膜細胞が障害される(Tabata, Am J Pathol 2012)。一方、妊娠中期から後期では、胎児の急速な発育に呼応して、終末絨毛における血管内皮細胞と血管周囲細胞のリモデリングによる血管新生(angio genesis)が加速し、血管総延長は指数関数的に増大し 500km に達する(Burton, Reproduction 2009)。この時期の胎盤では、HCMV の血管内皮細胞への感染が血管リモデリングに深刻な影響を及ぼし胎盤障害を来すと考えられている。しかし、胎盤病変の全体像(血管消失・線維化・絨毛破壊など)を理解するには障害発生機構の解明は未だ不十分で、特に血管リモデリングに深く関わるもう一つの細胞である血管周囲細胞に対する HCMV 感染の影響は全く検討されていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、CMV 感染による絨毛間質血管リモデリング異常における血管周囲細胞障害の発生機構の解明、並びに、これに関連した胎盤・胎仔障害の解析を以下の項目を中心に試みた。

- 1) HCMV 感染ヒト胎盤組織において、血管リモデリング異常に関与すると推測される要因(マクロファージ等の免疫細胞・サイトカイン・血管増殖因子等)の免疫組織学的解析を行う。
- 2) ヒト胎盤血管周囲細胞初代培養系において、HCMV 感染による血管周囲細胞の形質変化を解析した。形質変化のマーカーとして Desmin,  $\alpha$ -SMA, NG2, PDGFR- $\beta$  の蛋白及び mRNA 発現を解析する。
- 3) 研究代表者らが既に確立したマウス CMV(MCMV)胎盤内感染モデル系を用いて(Sakao-Suzuki, Ann Clin Transl Neurol 2014)、CMV 感染胎盤を解析する。

## 3. 研究の方法

### 1) 胎盤連続切片における免疫組織化学

HCMV 感染胎盤パラフィンブロックから連続切片を作製した。ウイルス抗原及び各種細胞マーカーを免疫染色によって検出した。

ウイルス抗原の検出には、抗 UL123(IE1) マウス単クローン抗体を用いた。細胞マーカーの染色では、血管内皮細胞を抗 CD31、血管内皮・周囲細胞を抗 CD146、血管周囲細胞を抗 NG2 ウサギ抗体、血管周囲・間質細胞を抗 PDGFR- ウサギ抗体、血管周囲・筋線維芽細胞を抗平滑筋アクチン(抗  $\alpha$ -SMA)と抗 Desmin、血管平滑筋細胞を抗 Caldesmon、マクロファージを抗 Iba-1 ウサギ抗体で検出した。HE 染色及びウイルス抗原と各種マーカーを二重染色した連続切片標本において、各切片のスキャン画像を NanoZoomer(浜松ホトニクス)で作製した。HE 染色像と IE1 染色像から HCMV 感染絨毛を間質血管腔が存在するものと存在しないものに大別し、それぞれ 1 症例あたり 10~20 個の感染絨毛において HCMV 感染細胞におけるマーカー抗原陽性率を算出した。

### 2) 初代培養ヒト胎盤血管周囲細胞を用いた HCMV 感染実験

ヒト胎盤由来の血管周囲細胞(human pericytes from placenta: hPC-PL, PromoCell)を専用培地(pericyte growth medium, PromoCell)で継代培養し、HCMV AD169 株を MOI 0.3~10 で感染させ、感染後 2 日で、蛍光免疫染色解析、フローサイトメトリー(FACS)解析、転写解析に用いた。Mock infection には紫外線照射で失活したウイルスを用いた。蛍光免疫染色・FACS 解析では、ウイルス抗原を Alexa488 標識抗 HCMV-IE1 で、細胞マーカー(Desmin,  $\alpha$ -SMA, CD146, NG2)は前述の一次抗体と Alexa546 もしくは Alexa647 標識二次抗体で染色した。蛍光免疫染色標本は共焦点レーザー顕微鏡 FV-1000(オリンパス)で観察し、FACS 解析には BD FACS Aria を用いた。転写解析では、Isogen 処理後精製した mRNA から Superscript III kit(Invitrogen)で cDNA を作製し、Desmin,  $\alpha$ -SMA, NG2, PDGFR- 遺伝子の cDNA 量を Applied Biosystems StepOne System と SYBR Green PCR kit を用いた real time PCR 法によって定量した。

### 3) MCMV 胎盤内感染モデル

ネブタール麻酔下で妊娠 13.5 日の C57BL/6 マウス胎盤胎仔側の labyrinth zone に、マイクロインジェクションポンプとガラス毛細管針を用いて、 $1\mu\text{l}(10^5\text{PFU})$ の緑色蛍光蛋白を発現する MCMV-EGFP を接種した。Mock infection には紫外線照射で失活したウイルスを用いた。1, 3, 5 日後に感染胎盤を採取し免疫組織化学的な解析を行った。

## 4. 研究成果

### 1) HCMV 感染胎盤における絨毛間質血管の消失と Desmin 陽性感染細胞の増多

HCMV 非感染の絨毛間質において、CD31 は血管内皮細胞、CD146 は血管内皮細胞と血管周囲細胞、PDGFR- は血管周囲細胞と間

質細胞、 $\alpha$ -SMA は血管周囲細胞と間質細胞、Desmin は血管内皮・周囲細胞では陰性で間質細胞に陽性であった。以上から、胎盤絨毛間質においては、CD31 陽性細胞を血管内皮細胞、CD146、PDGFR- $\beta$  もしくは  $\alpha$ -SMA 陽性細胞で血管周囲に密着する細胞を血管周囲細胞、Desmin 陽性細胞を筋線維芽細胞とした (図 1)。

HE 染色で血管腔が確認される感染絨毛では、IE1 陽性細胞の 20%が血管内皮細胞、40%が血管周囲細胞、残りが間質細胞であった。

$\alpha$ -SMA 及び Desmin 陽性細胞は 10%と少数であった。一方、血管腔が確認されない感染絨毛では IE1 陽性細胞の 80~90%が Desmin 陽性細胞であった。CD146 及び PDGFR- $\beta$  陽性細胞数は血管存在絨毛群と大差なく 40~50%で、Desmin 陽性感染細胞の約半数は血管周囲細胞、残りは筋線維芽細胞であった。また、PDGFR- $\beta$  が弱陽性で Desmin 強陽性の感染細胞が見られ、これらは感染によって血管周囲細胞が筋線維芽細胞に変化(形質転換)したと推測された(図 2)。さらに、血管消失した絨毛間質では非感染の Desmin 陽性筋線維芽細胞も増加する傾向を示した。

図 1

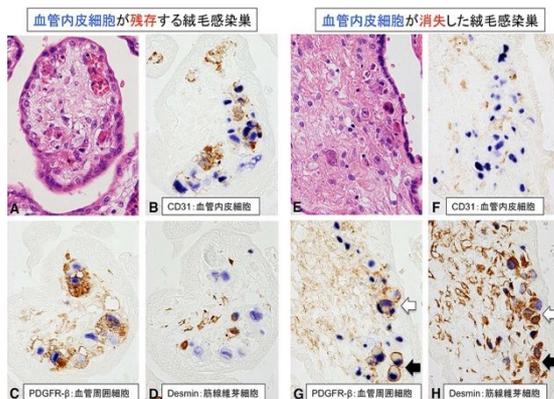
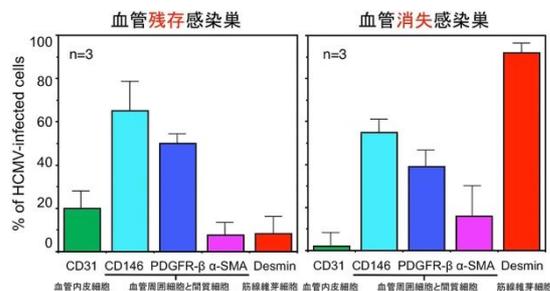


図 2

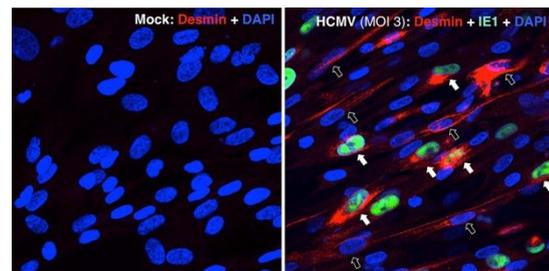


以上から、HCMV 感染による絨毛間質血管の消失に伴って、HCMV 感染血管周囲細胞において非感染状態では発現しない Desmin 蛋白が異常発現すると考えられた。さらに、この異常発現が HCMV 感染筋線維芽細胞の増多と絨毛間質線維化に関連すると推測された。

## 2) 初代培養ヒト胎盤血管周囲細胞における HCMV 感染による Desmin 異常発現

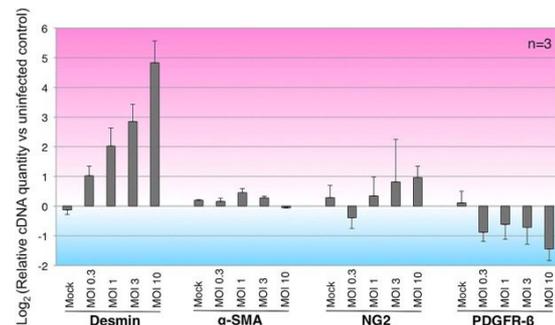
培養胎盤血管周囲細胞は、血管内皮マーカーの CD31 は陰性で、血管周囲細胞マーカーの CD146 及び NG2 が陽性であった。HCMV 非感染培養系では Desmin 陽性細胞は殆ど観察されないが (1%未満)、感染培養系では細胞質に劇的な Desmin 蛋白の発現を認めた (図 3)。染色像は繊維状物の集合体を呈し、中間系フィラメント蛋白の形状として矛盾しない所見であった。また、 $\alpha$ -SMA の発現は非感染では僅かで、感染による発現の誘導は認めなかった。FACS 解析では Desmin 陽性細胞数は感染価に伴って増加し、MOI 10 では陽性率は 10%で Desmin 陽性細胞の 90%に IE1 の発現を認めた。しかし、中程度までの感染価 (MOI 3)では、Desmin 陽性細胞の約半数が IE1 陰性であった。一方、IE1 陽性細胞に占める Desmin 陽性細胞の比率は何れの感染価においても 15%前後と一定し、MOI 10 でも IE1 陽性細胞の約 80%が Desmin 陰性であった。以上から、HCMV 感染による Desmin 蛋白発現の誘導機構には、ウイルス感染血管周囲細胞で生ずるウイルスの直接的作用と非感染細胞で生ずる間接的作用が存在すると推測された。

図 3



Desmin、 $\alpha$ -SMA、NG2、PDGFR- $\beta$  遺伝子の転写解析では、興味深いことに Desmin 遺伝子の転写のみが感染価の増加に伴って上昇し、MOI 10 では Mock infection の約 30 倍であった(図 4)。その他の遺伝子の転写は何れの感染価でも Mock infection の 4 倍以内の変動であった。また、PDGFR- $\beta$  遺伝子の転写は感染によって軽度低下する傾向を示した。

図 4

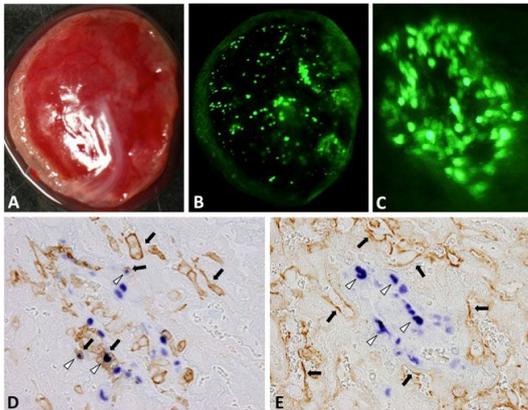


### 3) MCMV 感染胎盤の病理組織解析

胎盤において MCMV 感染細胞は、主に胎仔側の labyrinth zone と羊膜上皮・上皮下の間質に認められ、母体側の基底脱落膜では極僅かであった(図 5A, B)。MCMV-EGFP 感染胎盤を実体顕微鏡で観察すると、感染 1 日では 1 ~ 数個の感染細胞からなる感染巣が散在するのみであるが、3 日以降では感染細胞が”mirror ball”状に増加した多数の感染巣を認めた(図 5B, C)。

感染胎盤パラフィン切片の免疫染色では、labyrinth zone において、MCMV-IE1 抗原陽性細胞は主に血管周囲に認められた。IE1 陽性細胞の 2~3 割は Iba-1 抗原陽性のマクロファージであった(図 5D)。また、cytokeratin 陽性の栄養膜細胞には IE1 の発現を認めず。HCMV 感染ヒト胎盤と同様の結果であった(図 5E)。

図 5

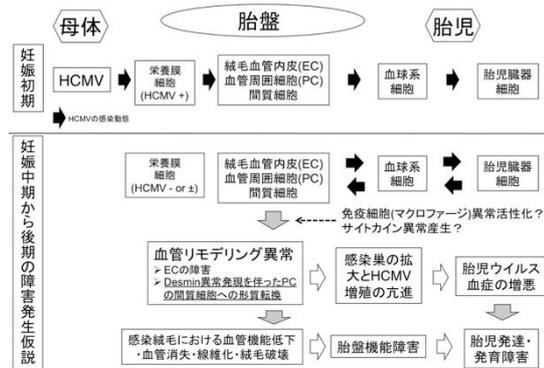


### 4) 総括 (図 6)

HCMV は主に絨毛毛細血管内皮細胞と血管周囲細胞に感染し、栄養膜細胞には感染を殆ど認めなかった。また、感染により血管内皮細胞が消失した絨毛では、中間径フィラメント蛋白である Desmin を異常発現する HCMV 感染血管周囲細胞を多数認め、このような絨毛では、感染巣周囲に Desmin 陽性間質細胞の増加を伴う線維化を生じていた。また、Desmin 陽性感染細胞を認める胎盤ではウイルス DNA 量も多く、胎児障害も重篤化していた。以上から、HCMV 感染による血管リモデリング異常には血管内皮細胞障害と共に血管周囲細胞の間質細胞への形質転換が関与すると考えられた。この形質転換が血管統合性(vascular integrality)破綻による血管消失を生じ、同時に、間質線維化を誘導し(fibrogenesis)、ウイルス感染巣の拡大と胎児

ウイルス血症の増悪に至ると推測された。

図 6



### 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 10 件)

Murakami G, Edamura M, Furukawa T, Kawasaki H, Kosugi I, Fukuda A, Iwashita T, Nakahara D. MHC class I in dopaminergic neurons suppresses relapse to reward seeking. **Sci Adv**. 査読有, 2018 Mar 14;4(3): eaap7388. doi: 10.1126/sciadv.aap7388. eCollection 2018 Mar. PubMed PMID: 29546241; PubMed Central PMCID: PMC5851664.

Enomoto Y, Matsushima S, Meguro S, Kawasaki H, Kosugi I, Fujisawa T, Enomoto N, Inui N, Nakamura Y, Suda T, Iwashita T. Podoplanin-positive myofibroblasts: a pathological hallmark of pleuroparenchymal fibroelastosis. **Histopathology**. 査読有, 2018 Feb 22. doi: 10.1111/his.13494. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29468722.

Meguro S, Yamazaki S, Matsushima S, Kawata K, Kawasaki H, Tsuchida T, Kosugi I, Kobayashi Y, Baba S, Iwashita T. A case of a primary hepatic so-called adenocarcinoma with heterotopic ossification: possibly of biliary adenofibroma origin. **Hum Pathol**. 査読有, 2018 Mar;73:108-113. doi: 10.1016/j.humpath.2017.10.009. Epub 2017 Oct 24. PubMed PMID: 29079182.

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. **Hum Pathol**. 査読有, 2017 Apr;62:187-198.

doi:10.1016/j.humpath.2016.12.024. Epub 2017 Jan 11. PubMed PMID: 28088345.

Tani S, Takano R, Tamura S, Oishi S, Iwaizumi M, Hamaya Y, Takagaki K, Nagata T, Seto S, Horii T, Kosugi I, Iwashita T, Osawa S, Furuta T, Miyajima H, Sugimoto K. Digoxin Attenuates Murine Experimental Colitis by Downregulating Th17-related Cytokines. **Inflamm Bowel Dis**. 査読有, 2017 May;23(5):728-738. doi:10.1097/MIB.0000000000001096.

PubMed PMID: 28426455.

Kudoh A, Miyakawa K, Matsunaga S, Matsushima Y, Kosugi I, Kimura H, Hayakawa S, Sawasaki T, Ryo A. H11/HSPB8 restricts HIV-2 Vpx to restore the anti-viral activity of SAMHD1. **Front Microbiol**. 査読有, 7:883, 2016.

Kawasaki H, Kosugi I, Meguro S, Iwashita T. Pathogenesis of developmental anomalies of the central nervous system induced by congenital cytomegalovirus infection. **Pathol Int**. 査読有, 67:72-82, 2017

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**. 査読有, Jul 24;(113), 2016

Ikuta K, Ogawa H, Hashimoto H, Okano W, Tani A, Sato E, Kosugi I, Kobayashi T, Omori K, Suzutani T. Restricted infection of murine cytomegalovirus (MCMV) in neonatal mice with MCMV-induced sensorineural hearing loss. **J Clin Virol**. 査読有, 2015 Aug;69:138-45.

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**. 査読有, 2015 May;185(5):1304-23.

〔学会発表〕(計6件)

小杉伊三夫、河崎秀陽、岩下寿秀：発育脳マクロファージ/ミクログリア細胞群におけるサイトメガロウイルス感染に対する応答の相違：第65回日本ウイルス学会学術集会、大阪(2017.10)

小杉伊三夫、河崎秀陽、目黒史織、岩下寿秀、筒井祥博：発育脳マクロファージ/ミクログリア細胞群におけるサイトメガロウイルス感染に対する応答の相違：第106回日本病理学会総会、東京(2017.4)

小杉伊三夫、坂尾万幾子、河崎秀陽、岩下寿秀：発育脳におけるサイトメガロウイルス感染に対するマクロファージ/ミクログリア反応の解析：第64回日本ウイルス学会学術集会、札幌(2016.10)

小杉伊三夫、坂尾万幾子、河崎秀陽、目黒史織、岩下寿秀、筒井祥博：発育脳におけるサイトメガロウイルス感染に対するマクロファージ/ミクログリア反応の解析：第105回日本病理学会総会、仙台(2016.5)

坂尾万幾子、河崎秀陽、岩下寿秀、宮嶋裕明、筒井祥博、小杉伊三夫：マウスサイトメガロウイルス胎盤内感染モデルを用いた大脳皮質形成障害発生機構の解析：第63回日本ウイルス学会学術集会、博多(2015.11)

坂尾万幾子、河崎秀陽、岩下寿秀、宮嶋裕明、筒井祥博、小杉伊三夫：サイトメガロウイルス感染に対する胎生期マクロファージ/ミクログリア異常反応と大脳皮質形成障害：第104回日本病理学会総会、名古屋(2015.4)

〔図書〕(計1件)

大森孝一 他 編、医歯薬出版、言語聴覚士テキスト 第3版、2018、56

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小杉 伊三夫 (KOSUGI, Isao)

浜松医科大学・医学部・再生感染病理学・准教授

研究者番号：10252173

(2) 研究分担者：無し

(3) 連携研究者：無し