

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20271

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた網膜色素上皮細胞のCMV抗原特異的な免疫応答と恒常性維持の解明

研究課題名(英文) Study on CMV antigen-specific immune response and homeostatic maintenance of retinal pigmented epithelial cells using iPS cells

研究代表者

小林 敬広 (KOBAYASHI, Takahiro)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00708745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：サイトメガロウイルス(CMV)感染は生涯に渡って潜伏感染を持続するが健常人には疾患を起こさない一方で、胎児に感染した場合や重度の免疫不全患者には日和見感染症として致死的な疾患を起こす。そこで、CMVの感染ターゲットとなる網膜色素上皮細胞あるいは造血幹細胞の感染モデルを用いてCMV特異的な免疫応答と恒常性維持のメカニズムを検討した。本研究によって、網膜色素上皮細胞はCMV感染による眼内の恒常性を保つために、T細胞を遊走させウイルスに対する免疫応答を誘導することで感染細胞の排除をする一方で、過剰な炎症反応による眼内の濁り等を抑制するために制御性T細胞の分化を誘導していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cytomegalovirus (CMV) infection in healthy individuals is asymptomatic and results in latent infection, but it causes severe disease in infected fetuses and premature infants or in immunocompromised patients. Thus, we studied CMV-specific immune response and mechanism of homeostatic maintenance using the infection model of retinal pigment epithelial cells or hematopoietic stem cells which are infection targets of CMV. This study suggest that CMV-infected retinal pigment epithelial cells migrate T cells to eliminate infected cells and induce inflammatory reactions, while maintaining homeostasis by inducing differentiation of regulatory T cells and suppressing inflammatory reactions.

研究分野：免疫学・ウイルス学

キーワード：サイトメガロウイルス 網膜色素上皮細胞 恒常性 造血幹細胞 潜伏感染

## 1. 研究開始当初の背景

網膜色素上皮細胞 (retinal pigment epithelium; RPE) は視細胞を中心とした網膜外層の生存や機能を支える重要な細胞である。その機能は実に多彩で、脈絡毛細血管板からレチノールをはじめとする様々な栄養因子を選択的に視細胞に供給すること、血管内皮増殖因子を分泌して脈絡毛細血管板を維持する一方、血管新生抑制因子を眼球内に分泌し、眼の透明性を確保すること、視細胞外節先端から脱落する円盤膜を貪食すること、そして抗原提示細胞として眼内の免疫を制御することなどである。

中枢神経から発生する眼は全身の免疫からは隔離されており、眼内局所で免疫反応を起こす必要がある。その中心となっているのが RPE であり、この細胞の機能を検討することが眼内の免疫を理解するために必須である。眼内に抗原が侵入した時、RPE は様々なインターロイキンやケモカインを分泌して Blood-retinal barrier を超えて細胞の遊走を促す一方、自身が抗原提示細胞となり眼内の免疫活性化に参与する。同時に、過度の炎症反応による眼の混濁を避けるため、anterior chamber associated immune deviation (ACAID) とよばれる免疫寛容をおこすことも知られている。このような一連の免疫反応には脾臓が関与することも明らかにされており、眼内で起こる免疫反応はただ単に免疫隔離された眼内でのみ起こっているのではなく、全身の免疫とも密接に cross-talk しながら巧妙に行われている。眼の免疫反応の解明は眼科領域の研究としてはもちろん、中枢神経系全体の免疫を理解するための重要な分野でもある。

## 2. 研究の目的

本研究では RPE 自体が感染のターゲットともなるサイトメガロウイルス (Cytomegalovirus; CMV) 網膜炎のモデルを使って眼の免疫、特に RPE の機能を探る計画を立てた。CMV は人類の 80% 以上に感染し、宿主の生涯にわたって潜伏感染を持続するが、健康人に疾患は起こさない。ところが、免疫能が発達していない胎児 (先天性 CMV 感染)、未熟児に感染した場合や極度の免疫不全患者には日和見感染症として致死的な疾患や障害を起こし、医学上問題となっている。

CMV の日和見感染が最も問題となったのは造血幹細胞移植時に起こる CMV 肺炎であろう。1980 年代、抗ウイルス剤・ガンシクロビルが臨床応用されていなかったこの時代、造血幹細胞移植の半数以上が CMV 肺炎によって死亡し、CMV 肺炎が移植の失敗の第 1 の原因であった。その後問題となってきたのが AIDS 患者に起こる CMV 網膜炎である。AIDS が蔓延する以前、CMV 網膜炎が認められるのは先天性 CMV 感染にほぼ限られていた。ところが AIDS 末期患者にも CMV

網膜炎が発症し、AIDS 患者の 1/3 が死亡する数か月前に失明することが問題となっていた。なぜ造血幹細胞移植時の日和見感染では CMV 肺炎を起こし、AIDS 患者では CMV 網膜炎となるのであろうか？

基礎疾患によって CMV 感染症の発症頻度が大きく異なる例は他にも知られている。たとえば、ステロイドに反応しない重症の潰瘍性大腸炎にはしばしば CMV 腸炎が合併する。慢性炎症性腸疾患であるクローン病に CMV 腸炎が合併することは少ない。

このような事実は、CMV の日和見感染症は免疫能の低下によって CMV が増殖し、細胞・組織を破壊して疾患をおこすという単純なものではなく、発症の背景には組織レベルや個体レベルでの免疫の状態が大きく関与することを示すものである。

また、CMV が潜伏・維持感染するとされる造血幹細胞におけるメカニズムについては未だ不明な点が多く、再活性化の機序についても一部報告はされているが詳細は明らかになっていない。この潜伏・再活性化のメカニズムを明らかにすることは重要な課題である。

さらに、日本で開発された NOG マウスは高度の免疫不全を示し、ヒトの正常細胞でも移植可能なマウスである。このマウスにヒト組織を移植してウイルス感染を解析する試みは Epstein-Barr Virus などで成功しているが、CMV の感染系で使われたことはない。本研究では、RPE と造血幹細胞移植を行い、ウイルス感染のターゲットとなる細胞と免疫にかかわる細胞の両方をヒト化したモデルを作成し、眼内の免疫を研究するための系を提供する。さらに、このモデルはワクチン開発や抗ウイルス剤の開発にも応用できる動物実験系に発展させていく基礎研究となることを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では CMV 感染に対する RPE の機能を解析するとともに、iPS 細胞を用いて分化誘導した細胞を用いることで、眼における恒常性維持のメカニズムの解析を行った。また、潜伏感染すると報告されている造血幹細胞を用いて感染系を樹立することで、潜伏感染・再活性化のメカニズムについて解析を行った。さらに、NOG マウスを用いたヒト化の系を樹立し、CMV に対する免疫応答の解析を行った。

以下のような手順で研究を行った。

### 《Step 1》

CMV に対する細胞性免疫の主たる抗原として UL83 がコードする pp65 タンパクと UL123 がコードする Immediate Early (IE) タンパクが知られている。このタンパクを網膜色素上皮細胞株の ARPE-19 細胞に抗原提示させるため、CMV の pp65 および IE 遺伝子をクローニングし、レトロウイルスベクターを用いた感染法による遺伝子導入を行う

ことで、定常的に CMV 抗原を提示した ARPE-19 細胞を作製した。

この CMV 抗原提示細胞 ARPE-19 細胞と通常の ARPE-19 細胞を共培養することで産生されたサイトカインを ELISA 等の測定法で同定した。

#### 《Step2》

末梢血中の T 細胞を磁気ビーズ等で精製し、《Step1》で作成した細胞と共培養することで、RPE が恒常性維持のための免疫寛容応答として、制御性 T 細胞への分化誘導能をもつかどうか、あるいは細胞分裂を促進させるかどうかを解析した。

#### 《Step3》

臍帯血由来の造血幹細胞および iPS 細胞由来の造血幹細胞に対して、CMV 臨床分離株の感染実験と潜伏感染への移行メカニズム、再活性化した際の造血幹細胞の状態などの解析を経時的に行った。

#### 《Step4》

重度免疫不全マウスに対して造血幹細胞を移植することで、ヒト化の系を樹立するための研究を行った。

### 4. 研究成果

《1》CMV に対する網膜色素上皮細胞の免疫応答の解析

CMV 抗原である pp65 タンパクを提示した ARPE-19 細胞と通常 ARPE-19 細胞を 1:5 で 7 日間共培養した際に産生されるサイトカインをマルチプレックス解析により同定したところ、炎症性サイトカインである IFN- $\gamma$  と IL-12、T 細胞遊走ケモカインである MIP-1 と、抗炎症性サイトカインである TGF- $\beta$  の産生が認められた(図1)。

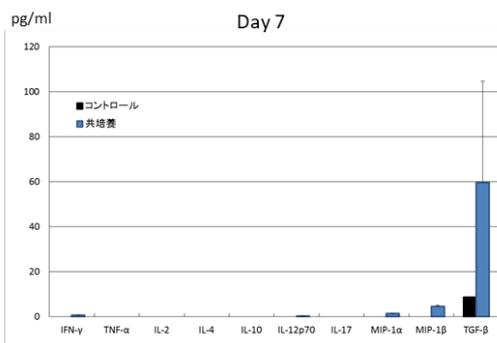


図1 共培養によるサイトカイン産生

そこで、CMV 抗原である pp65 と IE タンパクを提示させた ARPE-19 細胞と通常の ARPE-19 細胞を、共培養する細胞の割合を変えた場合と経時的な変化について検討を行ったところ、MIP-1 と、TGF- $\beta$  において産生が確認された(図2)。これは、網膜色素上皮細胞が CMV 感染によって T 細胞を遊走させて炎症性の免疫応答を誘導すると同時に、制御性 T 細胞の誘導因子でもある TGF- $\beta$  を産生することで、抗炎症反応も誘導し、過剰な炎症反応を抑制していることが示唆された。

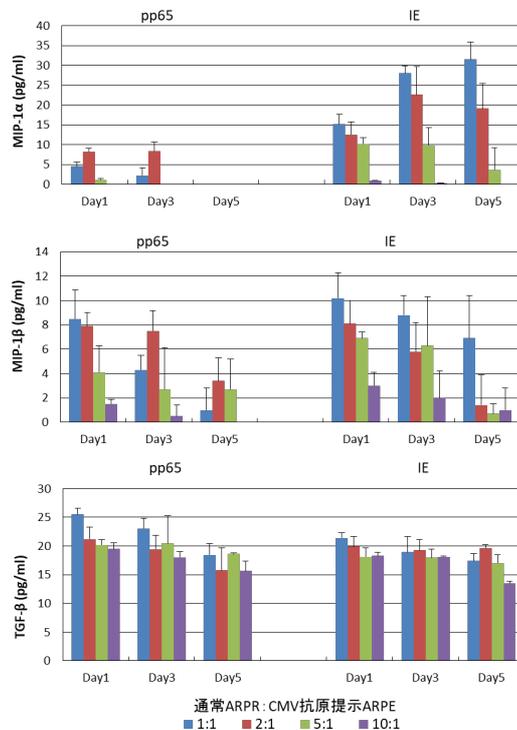


図2 産生サイトカインの経時的変化

《2》制御性 T 細胞への分化誘導能の検討

末梢血中の T 細胞と CMV 抗原提示 ARPE-19 細胞を共培養し、制御性 T 細胞への分化誘導能を持つかどうかを検討したところ、期間中に有意なデータを得ることが出来なかった。そのため、引き続き解析を行っているところである。

《3》造血幹細胞に対する CMV の潜伏感染・再活性化メカニズムの解析

臍帯血由来の造血幹細胞および iPS 細胞由来の造血幹細胞に対して CMV 臨床分離株を感染させ、経時的に IE および潜伏感染に必須とされる UL138 の発現を経時的に観察したところ、どちらの細胞でも 7 日目では IE は大きく発現が低下し、UL138 は低下するが発現は維持されていた(図3)。

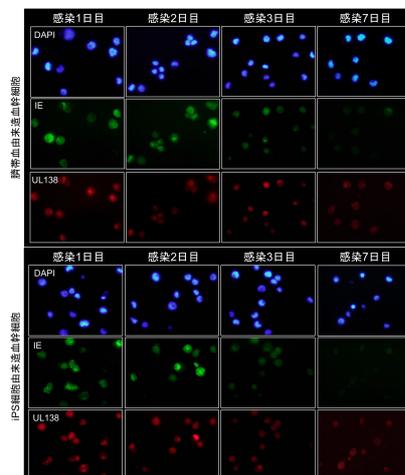


図3 CMV 感染による経時的変化

また、再活性化に重要な因子とされる TNF- $\alpha$  を感染 14 日目の細胞に添加して、さらに 7 日間培養したところ、IE と UL138 の発現が上昇した (図 4)。

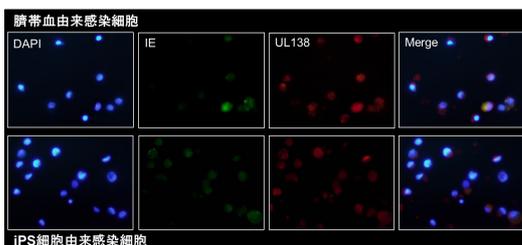


図 4 TNF- $\alpha$  添加培養による発現上昇

これらの結果から、造血幹細胞における CMV 感染は 3 日目以降に潜伏感染の状態に移行し、炎症部位において TNF- $\alpha$  による刺激によって再活性化することが示唆された。

#### 《4》ヒト化マウスの系樹立

重度免疫不全マウスに対して造血幹細胞を移植することでヒトの免疫系を持つヒト化マウスの系を樹立することを目指し、研究を行った。その結果、末梢血中には分化した T 細胞あるいは B 細胞は検出できなかったが、骨髄中に移植した造血幹細胞が定着し、一部リンパ球の前駆細胞へ分化していることが確認できた。今後も継続的に分画を解析することで、ヒト化マウスの樹立を目指す。

#### 《まとめ》

網膜色素上皮細胞は CMV 感染による眼内の恒常性を保つために、T 細胞を遊走させウイルスに対する免疫応答を誘導することで感染細胞の排除をする一方で、過剰な炎症反応による眼内の濁り等を抑制するために制御性 T 細胞の分化を誘導していることが示唆される。しかしながら、実際に制御性 T 細胞への分化や機能を確認することが出来なかった。これは HLA のミスマッチによる排除免疫が起こってしまった可能性などが考えられる。今後 iPS 細胞から網膜色素上皮細胞ならびに Th0 細胞への分化誘導法を検討し、同一 HLA によってミスマッチが起こらない系において研究を進める必要がある。

また、造血幹細胞においては臨床分離株を用いることで潜伏感染の系を樹立することができ、潜伏感染・再活性化に至る経時的な変化を観察することが出来た。これによって、さらに解析を進めこれらメカニズムを明らかにすることが期待できる。

#### 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)

[学会発表](計 4 件)

1. 小林敬広, 野本芽衣, 腰塚哲朗, 生田和史, 石岡賢, 錫谷達夫. ヒトサイトメガロウイルスの潜伏感染マーカー UL138 の経時的検討. 第 69 回日本細菌学会東北支部会(福島県郡山, 2015-08-21).
2. 小林敬広, 野本芽衣, 松岡亮, 腰塚哲朗, 生田和史, 石岡賢, 錫谷達夫. HCMV の潜伏感染マーカー UL138 の発現と再活性化における経時的検討. 第 30 回ヘルペスウイルス研究会(東京都府中市, 2016-06-16).
3. 小林敬広, 腰塚哲朗, 生田和史, 石岡賢, 錫谷達夫. HCMV の潜伏感染マーカー UL138 の発現と再活性化における経時的検討. 第 70 回日本細菌学会東北支部総会(青森県十和田市, 2016-08-18).
4. Takahiro Kobayashi, Tetsuo Koshizuka, Kazufumi Ikuta, Ken Ishioka, Tatsuo Suzutani. The investigation of time-dependent change to latent-infection marker UL138 and reactivation of human cytomegalovirus. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会(北海道札幌市, 2016-10-23).

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

小林 敬広(KOBAYASHI, Takahiro)  
福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00708745