

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18390293

研究課題名 (和文) ウイルスケモカインホモログを標的としたヒトサイトメガロウイルス感染モデルの開発

研究課題名 (英文) Study for the viral chemokine-associated pathogenesis in cytomegalovirus infection

研究代表者

野田 敏司 (NODA SATOSHI)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：10297260

研究成果の概要：

- 1) マウスサイトメガロウイルス(MCMV)由来ケモカインホモログ MCK-2 は、後期骨髄細胞をその標的細胞として、当該ウイルスの病原性の増大に寄与している知見を得た。
- 2) ヒトヘルペスウイルス潜伏感染/再活性化の動物モデルの構築へむけ、コモンマーモセットにおける CODEHOP 法を用いた内因性ヘルペスウイルスの検出ならびに同定を確立した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	7,300,000	2,190,000	9,490,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：感染症学

1. 研究開始当初の背景

MCK-2 (murine chemokine-2) は、murine cytomegalovirus (MCMV) の病原性を規定する一増悪因子として同定されたCCケモカインホモログ (CC-chemokine homolog) である。本ホモログは、同ウイルスゲノム上にコードされており、ウイルス感染細胞あるいは組織より産生される。申請者は、米国スタンフォード大学医学部 Mocarski教授との共同研究において、同ホモロ

グが感染部位に、骨髄細胞の分化後期に位置する未熟な形質のCD31⁺Mac-1⁺Gr-1^{int}細胞群を誘導してくることを見出し、これを未熟骨髄細胞：LMPs (late myeloid progenitors)と命名した。LMPsは感染性ウイルス粒子の運搬体として機能しうること、また、MCK-2自身が白血球依存性のウイルス血症レベルを亢進させることによって、生体内におけるウイルス量 (viral dissemination) を増大させ、その結果、唾液を介してのウイルス

伝播 (viral transmission) を増強させる機能を有することから、同ホモログによって動員された LMPs が同ウイルス病原性惹起の上流に位置することが強く示唆された。本知見は、ウイルスがコードするケモカインホモログの増悪要因を、細胞論的かつ分子論的に解明したフロンティア的知見と認識されている。興味深いことに、多様な CC ケモカインホモログが、動物種を超えて各 CMV ゲノム (HCMV, chimpanzee CMV: CCMV, simian CMV: SCMV, MCMV, rat CMV: RCMV, など) に高頻度に保存されていることが近年明らかにされ、virulence factor としての同ホモログが高い注目を集めている。

2. 研究の目的

ウイルスケモカインホモログを標的とした動物モデルとしては、マウスあるいはラットが従来これに当てられてきた。ところが、これらげっ歯類はヒトとの系統学的・遺伝学的差異が著しいため、感染免疫動態のための基礎研究には十分ではあっても、臨床レベルにおけるヒト疾患モデルの作成や治療薬のスクリーニングには不適切とされる。ヒトに近縁な霊長類であるチンパンジー (Chimpanzee) や赤毛ザル (Rhesus) の使用も散見される。ところが、本当該動物は高コストかつ低繁殖である上、マウスのように目的繁殖 (purposed bred) されておらず品質規格が不揃いであり、動物愛護の観点からも問題が多い。一方、同じく真猿類であるマーモセット (marmoset) は、遺伝学的にもヒトに近い実験動物としての資質を備え、性格も温和で小型 (~300g)、かつ目的繁殖されていることから、世界的に有用視されては始めている。ところが、同感染疾患モデルの基盤整備については、代表的な真猿類の中では唯一マーモセットのみが同動物に特異的な CMV が同定されていないため、研究整備環境が遅延した状況にある。本背景に

鑑み、当該研究では、げっ歯類のヒト感染モデルとしてのマウスにおける MCK-2-induced LMPs の生理的機能の解析を実施した。ならびに、本知見をヒトモデルに還元するため、ヒトサイトメガロウイルスをはじめとするヘルペスウイルス潜伏感染・再活性化動物モデルの基盤として、コモンマーモセットを用いての内因性ヘルペスウイルスの検出系を構築した。

3. 研究の方法

(1) マウスサイトメガロウイルス実験系について: MCMV-encoded chemokine homolog: MCK-2 は、LMPs を感染・発現局所に動員する。LMPs は $CD31^+Mac-1^+Gr-1^{int}$ のフェノタイプを提示する。本後期末熟骨髄細胞は、MCMV の格好の標的細胞と推測され、感染個体の病原性の発揮に関与していると考えられている。本研究では、HCMV-IE1 プロモーター制御下に GFP (green fluorescence protein) をマーカーに発現する MCMV-mutants (RM4503; MCK-positive virus, RM4511; MCK-negative virus) を作成、LMP が MCMV の標的細胞の一つであるのか、ならびに MCK 動員性 LMP の宿主における病原性発揮への貢献についての検討を実施した。さらに、本病原性を緩解させる有用微生物のスクリーニングを並行して行った。

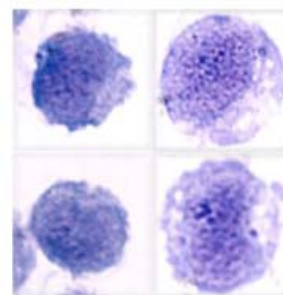


図1 LMPs の細胞像

(2) マーモセットヘルペスウイルス感染系について: 潜伏モデル構築のさきがけ研究として、

当該動物における内因性ヘルペスウイルスの検出系を確立した。本主旨に鑑み、CODEHOP(consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers)を用いた PCR 法によりこれを実施した。

4. 研究成果

(1) マウスの足裏に RM4503 あるいは RM4511 を接種2日目に当該肉趾を切除、これをコラゲナーゼ処理にて single cell 化後、密度勾配遠心法を用いて白血球分画を分離した。同分離細胞を用いて、FACS による LMPs サブセットのウイルス感染率 (GFP-positive cells) を検定した。MCK-positive virus における感染率が、MCK-negative virus のその 10 倍を提示した。MCK 発現によって、感染局所に高率に動員されてくる LMPs が、ウイルスの標的細胞群の一サブセットであることが示唆された。

(2) 上述の結果は、LMPs がウイルスの格好のキャリアーであること、かつ、個体のウイルス感染病原性の発揮に、何らかの役割を担っているものと考えられた。LMPs は放射線に感受性が高く、同処理によって著明に減少する(Noda and Mocarski, unpublished data)。そこで、ウイルス(RM4503 あるいは RM4511)を肉趾感染後、ガンマ線処理を施したマウスを用いて、ウイルス標的臓器(脾臓:急性感染期、唾液腺:持続感染期)におけるウイルス価を検定し、MCK-2-induced LMPs について検討を加えた。結果、いずれの変異ウイルスのマウス標的細胞感染価間でも相違が認められなかった(Smith, Noda, and Mocarski, unpublished data)。放射線処理は LMPs に高感受性とはいえ、他の造血系の細胞にも影響があることが推測される。そこで次に細胞移入実験による検討を行った。

(3) 細胞移入実験におけるLMPsの感性感増悪の役割について:マウスの足裏に変異MCMV(RM4503:GFP-positive mutant)を接種2日目に当該肉趾を切除、これをコラゲナーゼ処理にて single cell 化後、密度勾配遠心法を用いて白血球分画を分離した。同分離細胞をさらに cell sorting し、本サブセットの増悪性における役割を in vivo 細胞移入実験によって検討した。In vitro では、同サブセットの他細胞群(上皮細胞、血管内皮細胞などの標的細胞)への cell-to-cell spread の動態解析および観察を、変異ウイルスを用いて行った。本解析の結果、LMPs がウイルス伝播の一役割を担っていることが示された。MCK-2 による本細胞群を介した病原性増悪のメカニズムを強く補完するものである。

(4) MCK-2 の LMP 動員における CXCR4 の機能について: CXCR4 遺伝子欠損マウス (CXCR4 KO) における LMPs 動員効率ならびにウイルス病原性の増悪率を分析し、CXCR4 の LMPs 誘導における機能を、同野生型マウスと比較・検討した。結果、同 NO マウスと野生株では LMPs の動員率に大きな差異は認められなかった。MCK-2 の LMPs 動員機序には、構成的に未熟骨髄細胞の動員に関わるとされる本ケモカインレセプターは本病原性の規定因子としては大きく貢献していないことが示唆される。

(5) LMPs の動員に indispensable な MCK-2 リガンドの同定: マウスサイトメガロウイルスがコードしているケモカインホモログ MCK-2 の recombinant fusion proteins を用いて、現在迄に同定されているヒト及びマウスのケモカインレセプターについて avidity analysis を検討した。結果、既存の同レセプターへの親和性は検出されなかった(Noda and Mocarski, unpublished observation)。この事実は、MCK-2 が未知のリガンドに結合し、LMP 動員のキーファクターとなっ

ていることを示唆するものである。

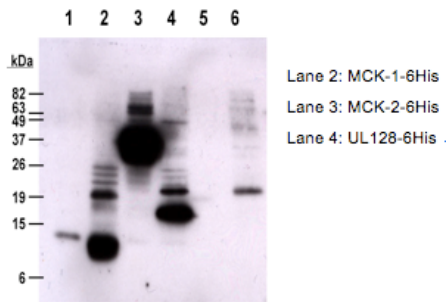


図2 リコンビナントMCK-2の作成

(6) MCK-2-induced LMPs の動員および病原性増悪の抑制性因子の探索: 申請者らは、微生物の重複感染あるいは生体内定住によって、免疫学的機能を修飾する因子について従来研究を担ってきた(Tanaka et al, J. Immunol. 2007)。そこで、当該ヒト感染動物モデルにおける将来的な治療基盤の初端として、本病原性の増悪抑制のための微生物因子の検索についての検討を実施した。結果、バチラス属の細菌の一つが同ウイルス感染で惹起される病原性を抑制することを見いだした(Noda et al, in preparation)。病原性の改善とLMPsとの関連性について今後詳細な検討を実施する。

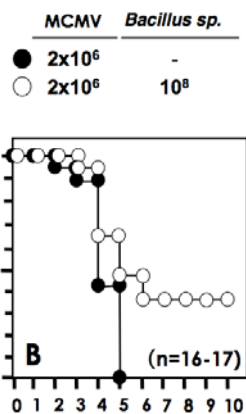


図3 バチラスによる経時的感染防御効果

(7) マーモセットヘルペスウイルス感染系について: 内因性ヘルペスウイルスの検出・同定を目的として、内因性ヘルペスウイルスの特異的PCR産物を検出可能なCODEHOP法を用い、

当該ウイルスの検出・同定、および当該動物への潜伏頻度感染についての解析を行った。その結果、ヘルペスウイルスの標的臓器において、本法によるウイルス特異的なPCR産物を認めた。X%のマーモセットに当該潜伏ウイルスを認めた。潜伏感染マーモセットにこれほどの高頻度で当該ウイルスが潜伏感染している事実は、ヒトヘルペスウイルス感染モデル(再活性化)として有用であることを示唆している。

Several marmosets are latently infected with herpesviruses in the salivary glands

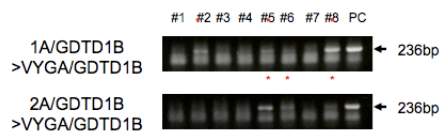


図4 内因性ヘルペスウイルスの検出

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14件)

欧文

① Noda, S., Aguirre SA, BitMansour A, Brown JM, Sparer TE, Huang J, Mocarski ES. (2006) Cytomegalovirus MCK-2 controls mobilization and recruitment of myeloid progenitor cells to facilitate dissemination. *Blood* 107:30-38. 査読有

② Noda, S., Hata, A., Mocarski E. S. (2006) Myeloid cell recruitment and function by a virus-encoded chemokine homolog in cytomegalovirus infection. *Report Jpn. Assoc. Biol. Func. Res.* 10:1-8. 査読有

③ Tanaka, K., Sawamura, S., Satoh, T., Kobayashi, K., Noda, S. (2007) Role of the indigenous microbiota in maintaining the virus-specific CD8 memory T cells in the lung

of mice infected with murine CMV. *J. Immunol.* 178: 5209-5216.査読有

④ Iizuka, K., Nakajima, K., Iizuka, Y.M., Takase, K., Kato, S., Noda, S., Tanaka, K., Kanagawa, O. (2007) Protection from lethal viral infection by adoptive transfer of CD8 T cells genetically engineered to express viral-specific innate immune receptor. *J. Immunol.* 179:1122-1228.査読有

⑤ Noda, S., Mocarski E. S., Hata, A., Ito, H., Tanaka, K. (2007) Myeloid cell contribution to cytomegalovirus pathogenesis and latency. *Report Jpn. Assoc. Biol. Func. Res.* 11:12-18. 査読無

⑥ Tanaka, K., Noda, S., Ishikawa, H., Hata, A., Sawamura, S. (2008) Role of microbiota in oral tolerance induction and infection. *Int. J. Prob. Preb.* 3:47-52.査読有

邦文

⑦ 野田敏司, 相場勇志 (2007) プロバイオティクスとウイルス感染、*日本医事新報* 4347, 95-97.査読無

⑧ 畑明宏, 田中和生, 野田敏司(2007) メモリーCD8+T細胞:生体内における細胞分化ならびに増殖・維持について、*生物機能研究会会誌* 11, 22-24.査読無

⑨ 田中和生, 畑明宏, 野田敏司(2008) 常在細菌叢によるサイトメガロウイルス特異的CD8+メモリーT細胞の維持:生体内における細胞分化ならびに増殖・維持について、*臨床免疫・アレルギー科* 49, 330-336.査読無

⑩ 野田敏司, 田中和生(2008) HCMV関連皮膚疾患の診断と治療、*MB Derma* 147, 71-76.査読無

⑪ 畑明宏, 田中和生, 野田敏司(2008) In vivo killing assay. *生物機能研究会会誌* 12, 19-21.査読無

⑫ 野田敏司, 畑明宏, 石川裕樹, 前田康行, 志水恵子, 亀谷美恵, 伊東秀記, 田中和生(2008) サイトメガロウイルス感染症と検査と治療 *生物機能研究会会誌* 12, 1-6.査読無

[学会発表](計7件)

① Kato, T., Nakajima, C., Iizuka-Matsubayashi, Y., Takase, M., Noda, S., Tanaka, K., Kanagawa, O., Iizuka, K. Protection of mice from lethal viral infection by CD8 T-cells expressing virus-specific innate immune receptor、第36回日本免疫学会 大阪 2006

② 田中和生, 野田敏司, 澤村貞昭:サイトメガロウイルス特異的CD8陽性メモリーT細胞の維持における常在細菌叢の役割、第40回日本無菌性物ノートバイオロジー学会 横浜 2007

③ 野田敏司, 志水恵子, 畑明宏, 相場勇志, 田中和生:Protective role of the oral administration of *Bacillus coagulans*, a spore-forming lactic acid bacteria, against murine CMV (MCMV) infection、第55回日本ウイルス学会 札幌 2007

④ 田中和生, 畑明宏, 澤村貞昭, 野田敏司 サイトメガロウイルス特異的CD8陽性メモリーT細胞の維持における常在細菌叢の役割、

第55回日本ウイルス学会 札幌 2007

⑤ 畑 明宏, 野田敏司, 石川裕樹, 田中和生 マウスサイトメガロウイルス特異的CD8 陽性メモリーT細胞in vivoでの細胞傷害活性の検討、第56回日本ウイルス学会 岡山 2008

⑥ Ishikawa, H, Kutsukake, E, Fukui, T, Hata, A, Noda, S, Tanaka, K., Masthumoto, T. NKT cell deficient mice increases susceptiblity to influenza virus infection. The 38th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Kyoto, 2008.

⑦ 田中和生, 畑 明宏, 幸田 力, 柳川容子, 野田敏司 マウスサイトメガロウイルス特異的CD8 陽性メモリーT 細胞の維持における腸内細菌叢の役割、日本無菌生物ノートバイオロジー学会 大阪 2009

[図書](計3件)

① Mocarski, E.S., G. Hahn, K.L. White, J. Xu, B. Slobedman, L. Hertel, S.A. Aguirre, S. Noda. (2006) Myeloid cell recruitment and function in pathogenesis and latency. In: Reddehase, M.J., ed. Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology. Hethersett, Norfolk, United Kingdom: Caister Academic Press, p465-481

② 野田敏司, 田中和生 (2006) サイトメガロウイルス感染における免疫応答、*日本臨床*, 東京, 日本臨床社, 64, p404-414.

③ 竹腰正隆, 前田史子 (2006) ヘルペスウイルス学-基礎・臨床研究の進歩-:ヒト型モノクローナル抗体の開発、*日本臨床*, 東京, 日本臨床社, 64, 512-517.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野田 敏司(NODA SATOSHI)

東海大学・医学部・講師

研究者番号:10297260

(2) 研究分担者

佐藤 正宏(SATO MASAHIITO)

鹿児島大学・フロンティアサイエンス研究推進センター・教授

(2007)

研究者番号 : 30287099

田中 和生(TANAKA KAZUO)

昭和大学・医学部・教授

(2007)

研究者番号:50236569

竹腰 正隆(TAKEKOSHI MASATAKA)

東海大学・医学部・講師

研究者番号:80221373

(2007)

(3) 連携研究者

佐藤 正宏(SATO MASAHIITO)

鹿児島大学・フロンティアサイエンス研究推進センター・教授

(2008)

研究者番号 : 30287099

田中 和生(TANAKA KAZUO)

昭和大学・医学部・教授

(2008)

研究者番号:50236569

竹腰 正隆(TAKEKOSHI MASATAKA)

東海大学・医学部・講師

研究者番号:80221373

(2008)