

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590445

研究課題名(和文) iPSおよびES細胞における新たなサイトメガロウイルス感染抑制因子の解析

研究課題名(英文) The analysis of the new inhibitory factor for cytomegalovirus in ES/iPS cells

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：CMVは多能性幹細胞には感染抵抗性を示す。我々はヒトiPS細胞の樹立に成功し、ヒトiPS細胞ではHCMVに対する感染感受性は著明に低下した。これは申請者がPlos One(2011)で発表したマウスES/iPS細胞でのCMV感染実験結果と同様であった。未だ新規レセプターへの発見には至っていないが、現在は既知のレセプターであるintegrin 1を中心にマウス大脳におけるMCMV急性感染期感受性の機序を調べている。急性期MCMV血行性/髄腔内感染どちらにおいてもintegrin 1高発現細胞にMCMV感染感受性があった。

研究成果の概要(英文)：Pluripotent stem cell (iPS/ES cells) showed resistance to CMV. We established iPS cells from human fibroblast using Yamanka factors. iPS showed remarkable resistance to CMV infection. This is compatible with previous report (Plos one: 10.1371/journal.pone.0017492). We tried to investigate the new factor for this inhibitory phenomenon. The new factor has not been found yet. Instead, we tried to find known receptor (CD29) distribution for CMV in brain. Endothelial cells, pericytes, meninges, choroid plexus and NSPC all express higher level of CD29 than other area of the brain. Co-expression of higher level of CD29 expressing cells and MCMV infected cells were highly correlated. In the brain. We concluded that at cytomegalovirus infection primarily initiates infection from high-level CD29 expressing cells in acute infection phase.

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：ES iPS サイトメガロウイルス

1. 研究開始当初の背景

母子感染、特に TORCH 症候群の中で、CMV (サイトメガロウイルス) 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% の胎児が感染するといわれ、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、他の約 10% の CMV 感染新生児は、無症候期を経た後に知能遅延、聴覚障害、視覚障害などがあらわれてくる。われわれは今まで幹細胞を用いて CMV 感染を研究し、その病理機序を明らかにしてきた。その中で神経幹細胞がマウスサイトメガロウイルス (MCMV) に感受性を示すことを発表し、大脳の MCMV 感染においては神経幹/前駆細胞の量が感染感受性にとって重要な因子であることを発表した (Lab Invest, 80:1373-1383, 2000) (Lab Invest, 82:1347-1358.2002) (J Virol, 76:7247-7254.2002)。その一方で胎生早期にはマウス胎児は MCMV には感染しないことや ES 細胞の段階で MCMV の感染感受性はないことを発表した (Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 6(2):115-25.2006)。この発表の中で ES 細胞では MCMV への感染感受性はないが、ES 細胞から分化誘導した細胞は MCMV 感染感受性を獲得することを明らかにした。なぜ神経幹細胞や分化した細胞と ES 細胞で CMV に対する感染感受性が違うのかは未だわかっていない。他の研究グループは未分化細胞の代表である NTera-2 (human embryonic carcinoma) 細胞を用いて CMV 感染感受性の解析をしているが、その感染抵抗性は CMV Immediately Early promoter (IE promoter) の活性抑制に依存していると報告している。そして世界の研究は未分化細胞における CMV ウイルスゲノムの epigenetics な働きに関心が集まっており、未分化細胞と分化した細胞の間では細胞内への CMV ゲノムの侵入レベルの差はないと報告されていた。しかしわれわれは CMV が ES 細胞内へ侵入しにくいことを世界ではじめて発見した。

2. 研究の目的

日本では毎年約 1000 人の難聴や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。いまだに実用ワクチンはなく、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、ワクチン開発にとって必要不可欠である。本研究は ES 細胞/iPS 細胞が CMV 感染に対して高度の抵抗性を示すという実験結果を基礎に、新たな CMV 感染感受性因子を探索することを目的とする。そしてヒト先天 CMV 感染の予防と治療、ヒト ES/iPS を用いた再生治療における CMV 感染の予防へとつな

げていくことが目的であった。

当初の予定で新規のレセプター因子が同定されなかった場合、発達段階における大脳においてウイルスゲノムが入りやすい細胞の分布と既知のレセプターである 1 integrin の分布を in vivo で比較検討していく予定であった。

3. 研究の方法

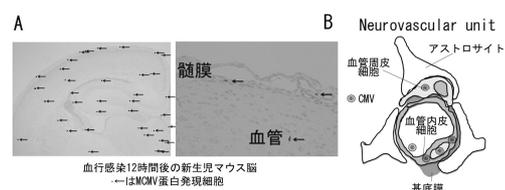
今回は論文で発表した実験結果を基礎にマウス ES/iPS、マウス線維芽細胞の感染感受性の差がウイルス侵入機序に依存していることを蛍光変異 MCMV ウイルスで再確認する。そしてウイルス粒子の細胞接着や侵入に関わる未知の receptor 因子を探索する予定である。膜蛋白の分画をそれぞれの ES, iPS, MEF の細胞から採取し、VOBPA 法 (Virus overlay protein blotting assays) 法、質量分析法によりウイルスレセプターを同定する。その後既知、未知の因子が ES/iPS 細胞、胎児の成長過程でどのような分布し、CMV ゲノムの局在と一致しているか否かを flow cytometry, 免疫染色、in situ hybridization で確認していく予定である。また新規に同定された因子をヒト ES/iPS 細胞、ヒト線維芽細胞を用いて HCMV でも追試していく計画であった。実験は以下のおこなった。

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 brain blood barrier 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: 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。

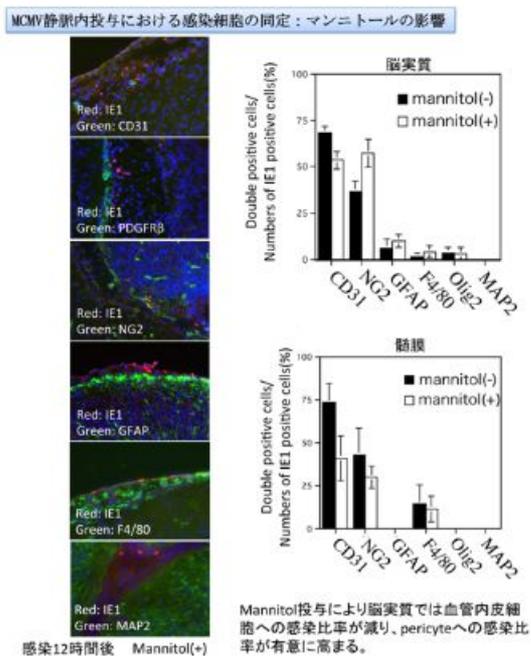
4. 研究成果

今回は neurovascular unit (下図 B) における CMV 感染機序にも焦点を当てている。申請者は CMV の中枢神経侵入機序の研究をマウスモデルで行っている。新生児マウスの MCMV 血行感染では感染細胞は大脳全体に広がっている (下図 A 左)。

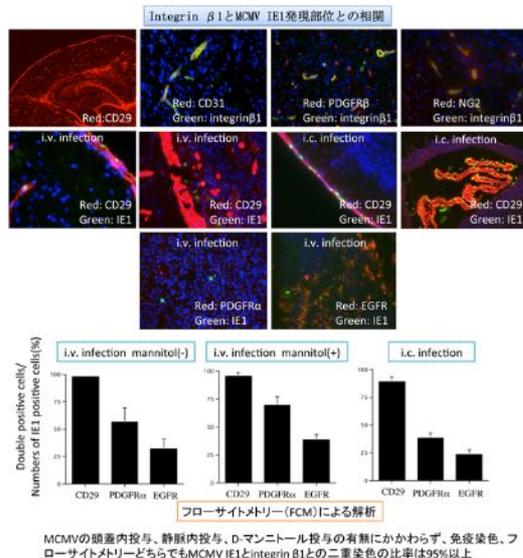
図2 血行感染による CMV 感染分布



MCMVの髄腔内/静脈内投与による超急性期感染脳では、MCMV粒子・蛍光microbeads (ウイルス粒子とほぼ同径のbeads)・MCMV感染分布は大まかには一致したが、microbeads粒子の分布と感染細胞の分布には有意な差がみられた。これはウイルス感染感受性を規定する因子はウイルス粒子の大きさ以外に存在することを示している。急性期血行感染におけるCMV感染細胞は血管内皮細胞、血管周皮細胞、髄膜細胞であり、mannitol投与によりBBBを破壊すると血管内皮細胞から血管周皮細胞への感染比率の増加を示した。



髄腔内感染においてMCMV感染部位は主に髄膜、脈絡叢であった。急性期MCMV血行性/髄腔内感染どちらにおいても integrin 1高発現細胞にMCMV感染感受性があり、その相関は90%以上であった。



さらに大脳スライスにおいても integrin 1 発現部位とMCMV 感染部位はほぼ一致した。この結果は現在論文作成中で近々投稿予定である。

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)

[雑誌論文](計 7 件)

Matsumura K, Nakase H, Kosugi I, Honzawa Y, Yoshino T, Matsuura M, Kawasaki H, Arai Y, Iwashita T, Nagasawa T, Chiba T. Establishment of a novel mouse model of ulcerative colitis with concomitant cytomegalovirus infection - *in vivo* identification of cytomegalovirus persistent infected cells, Inflammatory Bowel Disease, 査読有, 2013 19(9):1951-1956

Akamatsu T, Arai Y, Kosugi I, Kawasaki H, Meguro S, Sakao M, Shibata K, Suda T, Chida K, Iwashita T. Direct isolation of myofibroblasts and fibroblasts from bleomycin-injured lungs reveals their functional similarities and differences. Fibrogenesis Tissue Repair. 2013, 査読有, 6(1): 15, DOI: 10.1186/1755-1536-6-15

Suzuki M, Kawasaki H, Masaki K, Suzuki S, Terada T, Tsuchida T, Tokuyama T, Kono S, Komori T, Baba S, Kira J, Miyajima H. An autopsy case of the marburg variant of multiple sclerosis (acute multiple sclerosis). Intern Med., 査読有, 2013, 52(16): 1825-1832

Otsuka A, Kawasaki H, Matsumoto R, Shinbo H, Kurita Y, Iwashita T, Ozono S. Expression of α -adrenoceptor subtypes in urothelium, interstitial cells and detrusor of the human urinary bladder. LUTS; 2013, 査読あり, 5: 173-180

Kawasaki H. Pluripotent stem cells are protected from cytomegalovirus infection at multiple points: implications of a new pathogenesis for congenital anomaly caused by cytomegalovirus. Congenit Anom (Kyoto) 査読有, 2012, 52; 147-154, Review.

Arai Y, Tsuchida T, Kosugi I, Kawasaki H, Meguro S, Kinoshita M, Baba S, Maeda M, Shinmura Y, Tsutsui Y, Iwashita T. Effects of intrapulmonary viral tropism and cytokine expression on the histological patterns of cytomegalovirus pneumonia. Pathol Int. 査読有, 2012, 62; 628-639.

. Kawasaki H, Kosugi I, Arai Y, Iwashita T, Tsutsui Y. Mouse embryonic stem cells inhibit murine cytomegalovirus infection through a multi-step process. PLoS One, 査読有, 2011, 6; e17492, DOI: 10.1371

〔学会発表〕(計 6 件)

河崎 秀陽、鈴木 万幾子、小杉 伊三夫、新井 義文、筒井 祥博、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 1との関係、第102回日本病理学会、2013年6月6日、札幌

河崎 秀陽、鈴木 万幾子、小杉 伊三夫、新井 義文、筒井 祥博、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 1との関係、第61回ウイルス学会、2013年11月10日、神戸

河崎秀陽、小杉伊三夫、新井義文、筒井祥博、岩下寿秀、サイトメガロウイルス大脳急性感染期におけるintegrin 1発現と感染分布、第101会日本病理学会、2012年4月26日、東京

河崎秀陽、小杉伊三夫、鈴木万幾子、新井義文、筒井祥博、岩下寿秀、サイトメガロウイルス大脳急性感染期におけるintegrin 1発現と感染分布、第52回日本先天異常学会、2012年7月6日、東京

河崎秀陽、幹細胞に着目したサイトメガロウイルス感染感受性の解析、第100回病理学会、2011年4月28日、パシフィコ横浜

Kawasaki H, Kosugi I, Arai Y, Iwashita T, Tsutsui Y. Mouse Embryonic Stem Cells inhibit Cytomegalovirus Infection Through a Multi-Step Process, International Congress of Virology, 2011年9月15日、Sapporo

〔図書〕(計 0 件)

〔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

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

研究分担者

新井 義文 (Arai Yoshihumi)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号：30381784

研究分担者

岩下 寿秀 (Iwashita Toshihide)
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：