

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591876

研究課題名(和文) 移植後のサイトメガロウイルス再活性化の機序

研究課題名(英文) Mechanism of Cytomegalovirus reactivation after organ transplantation

研究代表者

田中 和生 (Tanaka, Kazuo)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：50236569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はサイトメガロウイルス(CMV)が移植後に再活性化する機序を明らかにすることである。そのためにはCMV再活性化のモデルを作成する必要がある。我々はマクロファージ系の細胞株を用いた試験管内実験系でCMV再活性化には感染細胞の分化度及びヒストンのアセチル化が重要であることを観察した。つぎに動物を用いたCMV再活性化のモデルの作成を試みた。CMV潜伏感染BALB/cマウスとBALB/cマウスと交配させたところの母乳からCMVが検出された。一方、C57BL/6マウスと交配させた群でもCMVが検出されたがウイルス価はBALB/cマウスと交配させた群と比較し有意に低値を示していた。

研究成果の概要(英文)：Aim of this study is to clarify the mechanism of cytomegalovirus (CMV) reactivation after organ transplantation. For this purpose, we developed in vitro and in vivo CMV reactivation models. In in vitro model, two macrophage-derived cell lines were used, and then the cell differentiation and acetylation of histone in CMV infected cells were demonstrated to be critical in CMV reactivation. In in vivo model, we demonstrated the CMV reactivation in the milk of breast-feeding female mice. Interestingly, reactivated CMV titers in the breast milk was much higher in syngeneic pregnancy than those in allogeneic pregnancy, suggesting that allogeneic stimuli is unnecessary in CMV reactivation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：サイトメガロウイルス ウイルス再活性化 臓器移植

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景・着想に至った経緯：臓器移植法の改正により我が国でも臓器移植が治療法として定着してきたが、サイトメガロウイルス(CMV)抗体陽性レシピエントでは移植後 45-85%のレシピエントに CMV 再活性化が認められ、適切な抗ウイルス剤を投与しないと再活性化が認められたレシピエントの 25-30%に CMV 感染症が発症する(Hebart et al. Human Immunol. 65.432:2004)。従って CMV 再活性化による CMV 感染症発症は臓器移植の大きな課題である。我々は MCMV 感染マウスにおける CMV 特異的 CD8+メモリーT細胞の維持に関する研究から、マクロファージ(M)の分化・活性化が CMV 再活性化の要因ではないかと考えるに至った。即ち、BALB/c マウスに 0.2LD50 のマウス CMV(MCMV)を投与し、ウイルス量をリアルタイム PCR 法によって測定した。その結果、感染 2 週後をピークにウイルス量は急速に低下し、感染 6 ヶ月には検出限界(1 コピー/検体、n=6-7)になったが、感染 9 ヶ月には再び検出されるようになった。MCMV 感染 SPF マウスの肺では MCMV の再活性化が周期的に起こっているのではないかと考えた。即ち、CMV 再活性化は免疫抑制によるものではなく、潜伏感染細胞での細胞生物学的な変化が再活性化の原因ではないかと考えた。

2. 研究の目的

サイトメガロウイルス(CMV)は代表的な日和見病原体であり、健常状態ではウイルスは潜伏している。しかし、臓器移植、骨髄移植後、AIDS などでは潜伏ウイルスの再活性化がみられ、CMV 感染症が発症する。CMV 再活性化については多くの研究がなされているが、その機序に関するコンセンサスは得られていない。我々は CMV 特異的 CD8+メモリーT細胞の維持に関する研究から、CMV 再活性化は免疫抑制によるものではなく、CMV 潜伏感染細胞の分化・活性化が CMV 再活性化の要因ではないかと考えるに至った。そこで、本研究はマウス CMV(MCMV)が潜伏するマウスを用いて MCMV 再活性化モデルの作成及び再活性化の仕組みを明らかにし、移植後 CMV 感染症の発症機序の解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 試験管内感染実験系

マクロファージ系の細胞が CMV の潜伏感染細胞と考えられている。そこで、マウスサイトメガロウイルス(MCMV)潜伏感染から再活性化し、MCMV-IE が発現すると細胞が緑色を発色する Green Fluorescent Protein(GFP)標識 MCMV をマクロファージ系の細胞株である M1 細胞(M 前駆体)および Mm1 細胞(M)に MCMV を潜伏感染させ、再活性化を調べた。

(2) 母乳に関する実験

免疫抑制を伴わないアロ刺激の臨床例として妊婦に注目した。出産直後の女性の母乳を採昭和大 NICU に入院中の新生児の母親より採取し、リアルタイム PCR 法にて母乳中の CMV 量を測定した。

(3) マウスを用いた CMV 感染実験

出産後の母乳中に HCMV の再活性化が認められることから、マウスモデルを作成した。BALB/c マウス 7 週齢の腹腔内にマウスサイトメガロウイルス(MCMV、Smith 株)を感染させた(1500pfu/マウス)。感染 4 週間には唾液腺、乳腺、脾臓、肺には感染性ウイルスは存在しておらず潜伏感染が成立していることを確認した。この MCMV 感染 4 週マウスに BALB/c 及び C57BL/6 を交配させ、出産後の母乳中の CMV 量をリアルタイム PCR にて測定した。

4. 研究成果

(1) 試験管内実験系

マクロファージ系の細胞株である M1 細胞(M 前駆体)および Mm1 細胞(M)の表面抗原調べた。その結果、Mm1 では M1 に比べ CD11b、F4/80 の発現が増強しており、Mm1 がより分化していることを確認した。マウスサイトメガロウイルス(MCMV)潜伏感染から再活性化し、MCMV-IE が発現すると細胞が緑色を発色する Green Fluorescent Protein(GFP)標識 MCMV を M1 細胞、Mm1 細胞に感染させた。しかし、M1、Mm1 のいずれにおいても MCMV 再活性化は認められなかった。しかし、上記 2 の実験系において培養細胞に脱アセチル化阻害剤であるトリ

コスタチン A を添加したところ、Mm1 細胞では発色が認められたが、M1 細胞では認められなかった。即ちヒストンが非アセチル化している状態では major IE promoter/enhancer (MIEP) が働かないが、トリコスタチン A の作用でアセチル化すると MIEP が活性化し、MCMV が再活性化することを確認した。即ち、MCMV 再活性化には感染細胞の分化度及びヒストンのアセチル化が重要であることを観察した。

(2) 臨床例 (妊婦) における検討

そこで、免疫抑制を伴わないアロ刺激の臨床例として妊婦に注目した。その結果出産直後の女性の母乳を採取したところ高率 (11 例中 7 例) に母乳中に再活性化ヒト CMV (HCMV) が存在することを観察した。この結果から、CMV の再活性化は免疫抑制によるものではなく allogeneic stimuli によるものではないかと考えた。そこで免疫抑制を伴わないアロ刺激の臨床例として妊婦に注目した。その結果出産直後の女性の母乳を採取したところ高率 (11 例中 7 例) に母乳中に再活性化ヒト CMV (HCMV) が存在することを観察した。出産後 2 週目より母乳中に HCMV が検出される事を観察し、この臨床研究から CMV 再活性化のモデルとして妊娠、出産のモデルが使えるのではないかと考えた。

(3) 動物実験系

出産後の母乳中に HCMV の再活性化が認められることから、マウスモデルを作成した。BALB/c マウス 7 週齢の腹腔内にマウスサイトメガロウイルス (MCMV、Smith 株) を感染させた (1500pfu/マウス)。感染 4 週間には唾液腺、乳腺、脾臓、肺には感染性ウイルスは存在しておらず潜伏感染が成立していることを確認した。この MCMV 感染 4 週マウスに BALB/c 及び C57BL/6 を交配した。その結果、BALB/c マウスと交配させた群 (n=10) では出産 5,10,15 日のいずれの母乳から 8,000-20,000 コピー/ml の MCMV

が検出された。同様に出産後の尿中にも MCMV の排出が認められた。さらに仔マウスは立毛、運動低下などの MCMV 感染の症状が認められた。以上より妊娠により母マウスにおいて MCMV が再活性化することが明らかとなった。一方、C57BL/6 マウスと交配させた群でも出産 5,10,15 日のいずれの母乳から MCMV が検出されたがウイルス価は 6,000-15,000 コピー/ml と BALB/c マウスと交配させた群と比較し、ウイルス価は有意に低値を示していた。また尿中への MCMV 排出は認められなかった。以上、妊娠、出産に伴う変化により MCMV が再活性化することが明らかになった。即ち、CMV 再活性化には免疫抑制やアロ抗原刺激が関与していないことが示唆された。さらに、妊娠、出産に伴う CMV 再活性化は CMV 再活性化の動物モデルとなりうると考えた。さらに MCMV 潜伏 BALB/c マウスと BALB/c マウスを交配させ、出生後 1 時間以内に新生児マウスを MCMV 非感染 BALB/c マウスの母乳にて飼育したところ仔マウスには MCMV は検出されなかった。これにより仔マウスへの感染ルートは経胎盤ではなく経母乳であることを確認した。

以上より、妊娠、出産に伴う変化により MCMV が再活性化することが明らかになった。即ち、CMV 再活性化には免疫抑制やアロ抗原刺激が関与していないことが示唆された。

(4) 今後の展開

CMV 再活性化に関する知見の多くは HCMV 感染 THP1/NT2D1 細胞株で得られており、動物レベルでの解析は殆どない。今迄のマクロファージ細胞株で得られた in vitro 実験の結果、およびマウス母乳における MCMV 再活性化モデルを参考にして、今後以下のような方法で CMV 再活性化の仕組みを解明したい。第一に再活性化組織を同定する。CMV は当初、唾液腺ウイルスと呼ばれ、腺組織に

特異性が高いと言われている。そこで、乳腺と唾液腺から DNA を抽出し、リアルタイム PCR、ブラック法にて CMV の有無を確認する。また、再活性化ウイルスの腺組織での局在を in situ PCR にて確認する。第二には再活性化に関与しているとされる転写因子 (NF- κ B、CREB、AP1) の妊娠中の動態を調べる。

CMV 再活性化に関する知見の多くは HCMV 感染 THP1/NT2D1 細胞株で得られている。これらの報告をまとめると CMV の再活性化は次の 2 つのステップから成る (J.Sinclair. Biochim.Biophys.Acta., 2009, doi:10.1016/j.bba.2009.05.011)。

1 . Major Immediate /Early promoter (MIEP) 領域の非アセチル化ヒストンがアセチル化され、この領域の遺伝子が活性化される。

2 . さらにこの MIEP 領域に NF- κ B (Nuclear Factor - κ B)、CREB (Cyclic AMP response element binding protein)、AP-1 (Activator Protein-1) などが結合すると、下流にある I/E 遺伝子が活性化され潜伏 CMV ゲノムが再活性化する。

第三には CMV 再活性化に伴い CMV に対する宿主側の応答を調べ、再活性化と宿主側免疫担当因子 (特に HCMV 特異的メモリー T 細胞) との関係を明らかにする。最後に CMV 再活性化に関与している転写調節のノックアウトマウスあるいはトランスジェニックマウスの作成を行い、これらのマウスでの CMV 再活性化の程度を調べる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

Akiyam A, Miyamoto Y, Yoshimura K, Yamada A, Takami M, Suzawa T, Hoshino M, Imamura T, Akiyama C, Yasuhara R, Mishima K, Maruyama T, Kohda C, Tanaka K, Potempa J, Yasuda H, Baba K, and Kamijo R.

Porphyromonas gingivalis-derived lysine gingipain enhances osteoclast differentiation induced by tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β , but suppresses that by interleukin-17A. □ Importance of proteolytic degradation of osteoprotegerin by lysine gingipain. J.Biolol. Chemi. 2014 査読あり in press

<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M113.520510>

Shoji H, Shirakura T, Fukuchi K, Takuma T, Hanaki H, Tanaka K, Niki Y. A molecular analysis of quinolone-resistant *Haemophilus influenzae*: Validation of the mutations in Quinolone Resistance-Determining Regions. J Infect Chemother. 2014 Vol.20, No.4, 250-255 査読あり doi: 10.1016/j.jiac.2013.12.007. [Epub ahead of print]

田中和生 : 成人におけるサイトメガロウイルス(CMV)感染症 (特集 サイトメガロウイルス(CMV)感染症) 昭和学会雑誌 査読なし Vol.73, 145-147 2013

Wakabayashi H, Mizuno K, Kohda C, Negoro T, Maekawa C, Sawato S, Tanaka K, Nakano Y, Murayama J, Taki M, Miyazawa T, Murase M, Aizawa M, Nakano Y, Sakurai M, Takahashi K, Itabashi K. Low HCMV DNA Copies Can Establish Infection and Result in Significant Symptoms in Extremely Preterm Infants: A Prospective Study. Am J Perinatol. 査読あり 2012 May; 29(5):377-82.

[学会発表] (計 3 件)

田中和生, 千葉奈穂, 幸田力, 柳川容子 : 「Smart Amplification 法を用いたサイトメガロウイルスの迅速検出キットの開発」 第 61 回 日本ウイルス学会 2013 年 神戸

K.Tanaka, C.Kohda, T.Negoro,
Y.Nakano, N.Chiba and K.Mizuno.

“Rapid detection of HCMV for
diagnosis of congenital/neonatal CMV
infection” 14th. International
CMV/Beta herpes Workshop. 2012 San
Francisco, USA

田中和生、柳川容子、千葉奈穂、幸田力：
「経母乳感染による新生児ヒトサイトメ
ガロウイルス感染症」 第 60 回 日本ウ
イルス学会 大阪

[産業財産件]

取得状況 (計 1 件)

名称：核酸の検出又は定量方法及び検出
又は定量用試薬キット

発明者：田中和生

権利者：田中和生

種類：特許

番号：特願 2012-077174

取得年月日：2012 年 3 月 29 日

国内外の別：国内

[その他]

特記事項なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

田中 和生 (Tanaka, Kazuo)
昭和大学・医学部・教授
研究者番号：50236569

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし