

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32622
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26461928
研究課題名(和文) 潜伏サイトメガロウイルスの再活性化の機序

研究課題名(英文) Reactivation of latent cytomegalovirus

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：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、従来、免疫不全状態で潜伏ウイルスの再活性化がみられ、CMV感染症が発症すると考えられた。本研究はCMV再活性化の要因を明らかにする事を目的とした。

MCMV潜伏感染マウスを妊娠させると母乳中に再活性化MCMVが検出されることを観察し、免疫不全とは関係なくCMV再活性化がおこることを示した。さらに、この系を用いて、腸内細菌除菌マウスではCMV再活性化が見られないことを観察した。妊娠、出産、及び腸内細菌によるNF- κ B, CREB, AP-1などの転写因子の調節がCMV再活性化の要因であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Cytomegalovirus (CMV) is a typical opportunistic pathogen, and latently infected CMV is reactivated in an immuno-compromized host. Purpose of this study is to make clear the factors concerning reactivation of CMV.

CMV reactivation was noted in breast milk of pregnant and delivered mice latently infected with CMV. This data clearly demonstrated that reactivation of latently infected CMV was non-related to immunosuppression. In addition, such reactivation was abrogated by treatment of the breast-feeding mice with non-absorbable antibiotics. Thus, indigenous microbiota plays a role in reactivation of CMV. Our results showed that reaction of CMV was caused not by immunosuppression but by alteration of other factors. It is possible that expression levels of such translation factors as NF- κ B, CREB and/or AP-1 may participate in reactivation of CMV.

研究分野：ウイルス学

キーワード：サイトメガロウイルス 再活性化 母乳 腸内細菌叢

1. 研究開始当初の背景

- (1) 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、その機序に関してのコンセンサスは得られていない。
- (2) 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、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。
- (3) 従来、移植後の CMV 再活性化については免疫抑制が関与しているとされていたが、現在では炎症その他の要因により CMV が再活性化されると考えられているが、具体的にはどのような因子が関与しているかは明らかではなかった。我々はマウス CMV (MCMV) を用いて CMV 再活性化の動物モデルの作成を試みてきたが適切な再活性化動物モデルは作成出来なかった。しかし、臨床研究の過程で HCMV 既感染の母親が妊娠、出産すると母乳では潜伏 HCMV が再活性化し、感染性 HCMV が検出できることを示した。そこで、このモデルがマウスにおける MCMV 再活性化モデルとなるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

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。本研究はマウスを用

いた実験結果を参考にして、CMV 再活性化の仕組みを解明したい。

3. 研究の方法

- (1) マウスサイトメガロウイルス (MCMV) 潜伏感染マウス (MCMV ip 4 週) のマウスを妊娠させ、出産 12 週目の母乳を採取し、PCR 法にて MCMV のゲノムの有無を調べた。さらに、この母乳を与えた新生児マウスでの MCMV ゲノムの有無を調べ、母乳中の MCMV の感染性について調べた。
- (2) CMV 再活性化に関する多くの知見は HCMV 感染ヒト単球性白血病細胞株を用いた系で得られている。そこで CMV 再活性化」を調べる手段として MCMV (Smith strain), HCMV (AD169) の IE 領域に GFP 遺伝子を挿入した変異ウイルスの作成を行った。さらに HCMV の臨床分離株の供与を受け、UL122-123 と UL-128-131 の間に GFP のみ、及び GFP+promoter を挿入した変異ウイルスの作成を行った。
- (3) 変異 HCMV (再活性化すると GFP が発現し緑色を発色する) を THP-1 細胞に感染させ、トリコスタチン A (脱アセチル化阻害剤) を添加し、HCMV の再活性化の有無、NF- κ B, CREB, AP-1 の動態を調べた。
- (4) NF- κ B, CREB, AP-1 などの転写因子の発現に影響を及ぼすものとして腸内細菌叢が知られている。MCMV 潜伏感染雌マウスの飲水中に非吸収性の抗生物質を加え、腸内細菌除去マウスを作成する。このマウスを腸内細菌除去雄マウスと交配させて、出産後の母乳中の再活性化 MCMV の有無を調べた。

4. 研究成果

- (1) MCMV 潜伏感染マウスを妊娠させると母乳中に再活性化 MCMV が検出された (図 A)。経母乳感染により新生仔マウスが感染することを示し、母乳中の MCMV は感染性があることを示した (図 B)。

図 A

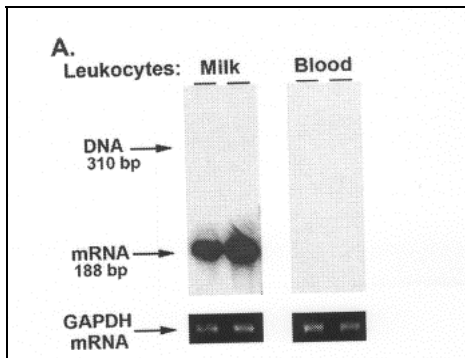
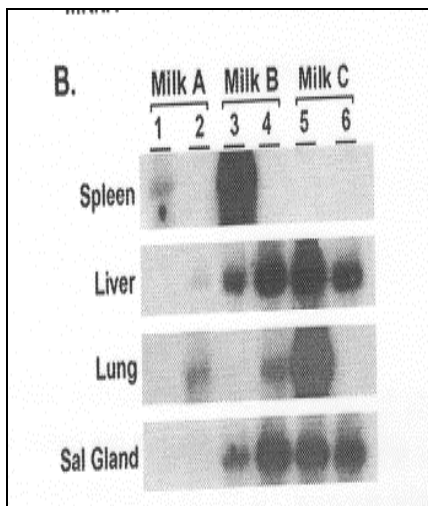


図 B



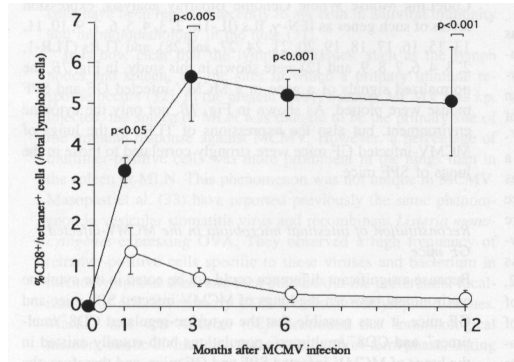
- (3) In vitro の再活性化機序の解明に必要な変異ウイルスの作成については十分な結果が得られなかった。CMV の再活性化の第一のステップは CMV の Major Immediate/Early Promoter (MI/EP) の非アセチル化ヒストンがアセチル化され、この領域の遺伝子が活性化される。その後、MI/EP 領域に NF- κ B, CREB, AP-1 などが結合して、MI/EP の下流にある I/E 遺伝子が活性

化され、CMV 再活性化が起こるものと考えられている MCMV (Smith strain), HCMV (AD169) の IE 領域に GFP 遺伝子を挿入した変異ウイルスの作成を試みた。しかしこの変異ウイルスは共に感染効率が悪く、実験に用いることが出来なかった。そこで、GFP 遺伝子を挿入しても感染効率には影響を与えないとされる HCMV の臨床分離株の供与を受け、UL122-123 と UL-128-131 の間に GFP のみ、及び GFP+promoter を挿入した変異ウイルスを作成した。しかし、この変異ウイルスも感染効率が悪く、試験管内の感染実験は行えなかった。

- (4) NF- κ B, CREB, AP-1 などの発現には常在細菌叢が関与していることが示唆されていた。また、我々は MCMV 潜伏感染マウスでは MCMV 特異的メモリー T 細胞がウイルス排除後も長期に渡って宿主体内に残存する (図 C:) のに対して、腸内細菌を欠く無菌マウスでは MCMV 特異的メモリー T 細胞は殆ど検出されない (図 C:) ことを観察していた (Tanaka et al. J. Immunol. 2007, Vol.178, 5209-5216)。非吸収性の抗生物質(ネオマイシン、アンピシリン、ネオマイシン、バンコマイシン)の経口投与により腸内細菌の除菌を行った。抗生物質を 1 週間経口投与することにより、好気性菌は 2.2×10^9 9.0×10^2 (/g)、嫌気性菌は 1.5×10^9 5.9×10^3 と著明な腸内細菌数の減少が見られた。また、投与 1 週間後には無菌マウスと同様の盲腸の肥大が認められ、腸内細菌が除菌されていることが確認された。抗生物質非投与 MCMV 潜伏マウスでは出産 5 日目の尿、唾液腺、母乳、乳腺組織での MCMV 価の平均値

はそれぞれ 1850, 1218, 14780, 927.5 (n=5, copy/ml)であったのが、腸内細菌除菌 MCMV 感染マウスではいずれの組織においても MCMV 再活性化は認められなかった。

図 C



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6件)

1. Satoshi Ino, Chikara Kohda, Kosuke

Takeshima, Kazuo Tanaka, et al. (9人中9番

目) Oral tolerance is inducible during active

dextran sulfate sodium-induced colitis. World

Journal of Gastrointestinal Pharmacology and

Therapeutics. 7:242-253; 2016 (査読有り)

2. Hiroki Ishikawa, Toshie Fukui, Satoshi Ino,

Kazuo Tanaka, et al. (7人中7番目) Influenza

virus infection causes neutrophil dysfunction

through reduced G-CSF production and an

increased risk of secondary bacteria infection in

the lung. Virology, 499:23-29; 2016 (査読あ

り)

3. Hiroki Ishikawa, Satoshi Ino, Hiraku

Sasaki, Toshie Fukui, Kazuo Tanaka, et al.

(6人中6番目) The protective effects of intranasal administration of IL-12 given before influenza virus infection and the negative effects of IL-12 treatment given after viral infection.

J.Med. Virol. 88:1487-1496; 2016 (査読有り)

4. Kohda C, Chiba N, Shimokoba K, Mizuno K,

Tanaka K, et al. (7人中7番目) A simple smart

amplification assay for the rapid detection of

human cytomegalovirus in the urine of neonates. J

Virol Methods. vol.208: p.160-165. 2014(査読有

り)

5. Tomohito Akiyama, Yoichi Miyamoto,

Kentaro Yoshimura, Kazuo Tanaka, et al.

(18人中14番目) *Porphyromonas*

gingivalis-derived lysine gingipain enhances

osteoclast differentiation induced by tumor

necrosis factor- and interleukin-1, but

suppresses that by interleukin-17A. Importance of

proteolytic degradation of osteoprotegerin by

lysine gingipain. J.Biol.Chem. Vol/289,

p.15921-15630, 2014 (査読有り)

6. 石川裕樹・田中和生:「インフルエンザウ

イルスに対するIL-12経鼻投与の予防的効果

と病態増悪効果」臨床免疫・アレルギー科

62巻、p.84-89, 2014 (査読なし)

[学会発表](計2件)

1. 柳川容子・竹島功高・田中和生:「マウ

スサイトメガロウイルス経母乳感染モ

デルマウス作成の試み」第62回日本ウ

イルス学会 2014年11月30日 横浜国

際会議場(横浜)

2. 幸田力・千葉奈穂・田中和生:「早産児

における母乳を介した症候性サイトメ

ガロウイルス感染症」第62回日本ウ

イルス学会 2014年11月30日 横浜国際

会議場(横浜)

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

(4)研究協力者

森 扶美代 (Mori, Fumiyo)