

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860857

研究課題名(和文) サイトメガロウイルスの経胎盤感染におけるウイルス動態解析

研究課題名(英文) Analysis of the spread of cytomegalovirus in the placenta

研究代表者

山田 壮一 (Yamada, Soichi)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任研究官

研究者番号：10514119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠母体へのヒトサイトメガロウイルス(HCMV)感染は、胎盤を経て胎児へ先天性感染を引き起こす。これまでモルモットとモルモットCMV(GPCMV)を用いて胎盤病態の解析を行っている。本研究では、胎盤由来細胞及び培養胎盤組織片を用いた、マクロファージとの共培養による、ウイルス感染伝播様式の解析を行った。胎盤由来上皮細胞(trophoblast)の培養系の樹立には至らず、胎盤由来細胞(上皮系及び線維芽細胞)及び胎盤組織を用いて解析を行ったが、本研究においては、明らかなウイルスの伝播像は観察されなかった。

研究成果の概要(英文)：Human cytomegalovirus (HCMV) infection to pregnant women causes congenital infection to the fetus through the placenta. The virological analysis in placenta was performed using guinea pig and guinea pig CMV (GPCMV) model. In this study, construction of a guinea pig placental trophoblast cells culture system, and co-culture system of placental cells and macrophages using the chamber system were conducted to analyze the virus spread in the placenta. The culture system of trophoblast cells was not established, and the clear image of viral spread was not observed in this study.

研究分野：ウイルス学

キーワード：経胎盤感染

1. 研究開始当初の背景

妊娠母体への HCMV(初)感染は、胎盤を経て血行性に胎児への先天性感染を引き起こし、流産や死産、更に新生児の発達障害などを引き起こす。死産の 15% (Iwasenko et al. 2011)、また、難聴や発達遅滞の約 20% (Ogawa et al. 2007; Koyano et al. 2009) の原因となるなど、ヒトの先天性感染症において HCMV は大きなウエイトを占めている。しかしながら、感染経路であり、かつ流産や死産また発達遅滞といった妊娠中の胎児へ大きな影響を及ぼす胎盤感染に伴う病態に関しては、あまり解析は進んでいない。これは胎盤が妊娠期のみに形成される特殊な臓器であり、胎盤形成の分子機構自体不明な点が多く着手の遅れている研究領域であるとともに、CMV は種特異性が高く、HCMV はヒト以外に感染しないため、個体を用いた解析が行えないことが大きな原因である。近年、HCMV においては、培養胎盤由来細胞 (trophoblast) や生検 (biopsy) による解析が行われ、IgG およびマクロファージを利用したウイルスの経胎盤移行 (Maidji et al. 2006) やインテグリンなどの感染関連因子 (Maidji et al. 2007) などが報告され、徐々に胎盤における動態が明らかになってきている。また、線維芽細胞及びヒトの培養胎盤由来細胞を用いて感染に伴う細胞遺伝子の発現変動の解析が報告されている (Schleiss et al. 2007)。一方で、HCMV を用いた胎盤細胞培養系での解析は、1) 多くの妊婦が HCMV 陽性である、2) 胎盤細胞の採取が流産時などに限られる、3) 検体の性格上厳しい倫理管理が求められる、などから、培養細胞を使用する実験には限界がある。また、*in vitro* で得られた結果がヒト個体での現象を反映しているかを確認解析できない。先天性感染の個体での病態を解析する手段としては、サル類やげっ歯類の CMV を用いた動物モデルによる研究が行われている。しかし、サル類を用いた実験はその飼育や実験が煩雑であり、また、マウス CMV は経胎盤感染を起こさないことが知られている。そこで、小動物で唯一経胎盤感染により先天性感染を成立させるモルモットとモルモット CMV (GPCMV) を用いた動物モデルで先天性感染における胎盤病態の解析を行っている。モルモットの系は、GPCMV 感染において、流産

や死産とともに、低体重胎仔や新生仔において難聴が認められる (Katano et al. 2007) など、先天性感染モデルとしてヒトとよく似た病状を示す。また、マイクロアレイによる感染胎盤の解析や、マクロファージや上皮細胞におけるウイルス動態の解析を行い、胎盤感染における病態解析を進めている。

2. 研究の目的

モルモット胎盤由来細胞培養系がないため、培養細胞と個体の間での結果を相互検証できるという感染動物モデルのメリットが生かし切れていない。そこで、本研究では、1) モルモット胎盤由来細胞培養系を確立する 2) マクロファージを介した経胎盤感染動態を解析する 3) 以前構築した胎盤組織培養系を用いた感染マクロファージを介したウイルス動態解析も行い、最終的に、マクロファージの経胎盤感染への関わりを明らかにする。

3. 研究の方法

(A) モルモット由来細胞培養系の構築

1) trophoblast 分離培養

妊娠 4 週齢モルモットから胎盤を採材し、既報 () に基づき collagenase 等の酵素を用い trophoblast 細胞の分離培養を行った。Trophoblast 細胞の確認には、上皮細胞マーカーである cytokeratin7 に対する抗体を用い蛍光抗体法 (IFA) により行った。

2) マクロファージ分離培養

8 週齢モルモットから全採血を行い、既報 (Yamada S et al. 2014) に基づきマクロファージの分離を行った。

3) モルモット胎盤組織培養

妊娠 4 週齢モルモット (Hartley, SLC) を安楽殺後、胎盤を採材およびスライサーにて細切し、シャーレ上に静置し、培養液 (DMEM+F12 (1:1), 10%FBS) に浸して培養した。

(B) chamber system 系の構築

a) 胎盤由来細胞を用いた解析

1) 胎盤由来分離細胞培養

感染または非感染の細胞を下方の well に、上方の well に感染または非感染 (刺激) マクロファージを培養し、動態及び細胞間伝播を

観察した。

2)GPCMV 伝播様式の解析

赤色蛍光蛋白(RFP)を発現する組換え GPCMV-RFP または野生株である GPCMV-SG を、培養翌日~2日後の細胞、または分離直後のマクロファージに接種し、chamber system を用い共培養を行い、ウイルスの伝播様式の解析に用いた。経日的に蛍光の観察を行った。

b)培養胎盤組織片を用いた解析

1)胎盤組織培養

感染または非感染の胎盤組織片を下方の well に、上方の well に感染または非感染(刺激)マクロファージを培養した。

2)GPCMV 伝播様式の解析

赤色蛍光蛋白(RFP)を発現する組換え GPCMV-RFP または野生株である GPCMV-SG を、培養翌日~2日後の胎盤組織片または分離直後のマクロファージに接種し、chamber system を用い共培養を行い、ウイルスの伝播様式の解析に用いた。経日的に蛍光の観察を行った。

(倫理面に対する配慮)

動物実験は国立感染症研究所動物実験委員会の審査、承認を得て、動物愛護の精神に基づき適切に行った。

4 . 研究成果

モルモット胎盤由来上皮細胞(trophoblast)の分離培養を試みた。分離法をいろいろと工夫したが(酵素、反応時間、播種のやり方等)、単一の上皮細胞(trophoblast)のみの分離培養には至らなかった。胎盤由来細胞(上皮系及び線維芽細胞)とマクロファージを用いて chamber system により GPCMV 感染マクロファージから胎盤由来細胞への GPCMV の移行動態解析を行ったが、継時的な観察において明らかな感染伝播は観察されなかった。さらに、胎盤組織片を用いても同様な実験を行ったが、感染伝播は認められなかった。胎盤組織片及び GPCMV 感染マクロファージの共培養による解析も行ったが、同様な結果であった。HCMV の研究においては、マクロファージが感染伝播に役割を担っていることが示唆されており、本結果は、ヒトとモルモットの違いの可能性もあるが、共培養における培養条件の検討、マクロファージへの適切な刺激やサ

イトカイン等の添加など、条件の面で工夫する余地が多々あると考えられる。また、本研究では至らなかったが、今後 in vivo での検討も必要になると考えられる。

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 2件)

1) Yamada S, Katano H, Sato Y, Fukuchi S, Hashimoto K, Inoue N. 2016. An Ex vivo culture model for placental cytomegalovirus infection using slices of Guinea pig placental tissue. Placenta 37:85-88

2)Yamada S, Fukuchi S, Hashimoto K, Fukui Y, Tsuda M, Kataoka M, Katano H, Inoue N. 2014. Guinea pig cytomegalovirus GP129/131/133, homologues of human cytomegalovirus UL128/130/131A, are necessary for infection of monocytes and macrophages. J Gen Virol. 95:1376-82

[学会発表](計 1件)

1) Souichi Yamada, Saki Fukuchi, Kaede Hashimoto, Harutaka Katano, Yuko Sato, Yoshiko Fukui, Naoki Inoue Effects of cytomegalovirus infection on placenta in a guinea pig model. International Herpesvirus Workshop 2014 Kobe

[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

特になし

6．研究組織

(1)研究代表者

山田 壮一 (YAMADA, Souichi)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任

研究官

研究者番号：10514119

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：