

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目

発育期脳神経細胞におけるマウスサイトメガロウイルス前初期蛋白 IE2 の持続的発現

指導教官 上妻 志郎 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 石渡 瑞穂

【背景】

サイトメガロウイルス (CMV) は母子感染を起こす病原微生物として近年注目されている。その胎内感染は、妊娠中の初感染や再活性化、再感染などのときおこり、主に経胎盤的にウイルスが胎児に感染すると考えられている。発生頻度は全出産の約 0.4-1.0%といわれており、そのうち 5-10%が重篤な巨細胞封入体症であり、残り約 10%は発育期に神経学的後障害をおこすといわれている。この機序については、ウイルスが脳に持続感染を起こすことによって出現すると推測されているが、現在までのところ機序の解析に結びつく報告は極めて少なく、残念なことに現状ではこの神経学的後障害を治療および予防する方法は報告されていない。ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) は種特異性が極めて高く動物実験が行えないため、この機序の解析のためにヒトの感染系のモデルになりうることを確認の上で、HCMV と特徴がよく類似しているマウスサイトメガロウイルス (MCMV) の実験系を用いて研究を行った。

CMV は 200 近い蛋白質をコードする大きな DNA ウイルスで、前初期、早期、および後期遺伝子がカスケードをなして発現する。前初期 (IE) 抗原は、早期およ

び後期遺伝子の発現を制御するだけでなく、細胞特異的感染感受性、潜伏感染と再活性化などにも関わり CMV の病原性に関与していると考えられている。HCMV と MCMV の主要前初期遺伝子は HCMV の ie1 と ie2 が MCMV の ie1 と ie3 に相当し、enhancer/promoter (E/P) から 5' 方向に発現する。MCMV にはこれに加えて、E/P から 3' 方向に発現する ie2 遺伝子があり HCMV に対応する遺伝子が分かっていない。MCMV の ie2 遺伝子は in vitro および in vivo におけるウイルス増殖にとって必須遺伝子でないことが知られているがその役割は明らかでない。

CMV の脳への感染では、急性期感染においてはグリア系細胞に許容感染し、感染が慢性期に移行すると神経細胞に持続感染を起こすといわれている。よって CMV による発育期脳障害の病理発生を明らかにする上で、ウイルス感染の細胞特異性は非常に重要な点である。現在までの報告では発育期脳の神経細胞およびグリア細胞で MCMV の遺伝子発現の動態が異なることが示されており、前初期蛋白 IE1 がグリア細胞における許容感染に関与しているのと対照的に、早期蛋白 E1 が CMV の神経細胞への持続感染に重要な役割があるといわれている。また、MCMV 早期遺伝子 e1 promoter を導入したトランスジェニックマウスを作成した報告によると、e1 promoter が神経細胞に局限して発現しているとのことであった。

グリア細胞では前初期遺伝子 promoter が活性化され、IE1 蛋白を発現、その結果としてカスケード的に早期蛋白、後期蛋白が発現していき許容感染が成立すると考えられる。しかし神経細胞では IE1 蛋白の発現がなくても E1 蛋白が発現して持続感染を維持できる何らかの機構が存在することが考えられるが、その機構の詳細は未だに不明である。

【目的】

以上をふまえた上で、現在までその機能についての報告がほとんどされていなかった MCMV 主要前初期遺伝子 ie2 および ie3 遺伝子産物に対する抗体を作成し、その特異性を実験的に確認した上で、培養細胞系および MCMV 周産期感染マウス脳において、前初期蛋白 IE2 と IE3 の発現動態を免疫組織化学的に解析した。これにより、サイトメガロウイルスの胎内感染後の神経細胞への持続感染の成立における前初期蛋白 IE2 と IE3 の役割を示唆した。

【材料と方法】

ウイルスと感染 : MCMV は Smith 株を用いマウス胎仔線維芽細胞 (MEF) で増殖させた。MCMV は出生直後 (24 時間) の BALB/c マウス脳へハミルトン注射器を用いて 2×10^4 PFU (plaque forming units) を注入し、感染後 3 日 (dpi)、7 dpi、11 dpi、14 dpi に屠殺して脳を取り出し、下記に述べる今回作成した抗体により

免疫染色を行い解析した。

抗体の作成：1) MCMV IE2 抗原に対する抗体の作成；MCMV 前初期遺伝子を PCR で増幅し、発現ベクターにつなぎ pGEX2T-GST-IE2 を作成した。これを大腸菌で GST との融合蛋白として発現させ、SDS-ポリアクリアミドゲルで分離精製しラットに免疫した。脾細胞をマウスミエローマ細胞 (SP2) と融合し、ハイブリドーマを作成した。感染および非感染培養細胞でスクリーニングして特異的ハイブリドーマを分離した。

2) MCMV IE3 抗原に対する抗体の作成；おなじく ie3 exon5 の一部を PCR で増幅し、発現ベクターに挿入し pET-28-IE3Rx5 を大腸菌で発現させ、上記と同様に分離精製してラットに免疫し血清をとって、ポリクローナル抗体とした。

抗体の特異性：MCMV の IE 遺伝子 ie1, ie2, ie3 および早期遺伝子 e1 cDNA を RT-cDNA のライブラリーから PCR で増幅し、発現ベクター pDNA3.1 につないだ作成したプラスミドを 293 細胞に PolyFect で移入した発現させそれぞれの抗体で免疫染色を行った。抗 IE1 抗体および抗 E1 抗体は既に作成し報告した。

Western blot：MEF を感染価 MOI 5 で感染し、感染後 2 時間 (h), 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h 及び 72 h に細胞を取り、SDS-PEGE で泳動し、PVDF 膜に移し、抗体と反応させ、enhanced chemiluminescence 法でバンドを検出した。

免疫二重染色：4%PFA で固定しパラフィン包埋した脳切片について、はじめに抗 IE2 及び抗 IE3 抗体で反応させ、DIG-標識 Fab fragment および抗 DIG peroxidase-標識 Fab で反応させ AEC で赤く発色し、続いて神経前駆細胞の抗体である抗 nestin 抗体、神経細胞のマーカーである抗 NeuN 抗体あるいはグリア細胞のマーカーである抗 GFAP 抗体を反応させ、ALP 標識 streptavidin と反応させ、Fast blue BB で青く発色させた。

【結果】

- 1) 融合蛋白法で大腸菌に発現させた MCMV IE2 及び IE3 抗原によって特異抗体を作成し、その特異的発現を検出することが出来た。
- 2) Western blot で IE2 は 46 kDa、IE3 は 88 kDa のバンドを認め、IE2 抗原は前初期抗原発現状態で発現するが感染の経過とともにその発現は強まった。IE 抗原は感染早期にその発現が強く、感染後期に再び強まる二相性を示した。
- 3) 感染培養細胞においては IE2 抗原は核内にびまん性に発現し、感染後期は細胞質にも顆粒状に発現した。IE3 抗原は感染早期には核内に点状に発現し、感染の経過とともに点状構造の増大と数の減少を認め、感染後期には核内封入体にも発現を認めた。
- 4) 出生 24 時間後 MCMV 感染マウス脳においては、IE3 抗原は感染早期に脳室壁に発現しやすく、感染後期にはその発現が検出出来ないのに対して、IE2 抗原は

感染初期には発現しにくく、感染後期の大脳皮質および海馬で持続的に発現しやすい傾向を示した。

5) 二重染色の結果、IE2 抗原は NeuN 陽性細胞（神経細胞）で感染初期から感染後期にわたり持続的に発現しやすく、IE3 は感染初期に GFAP 陽性細胞（グリア細胞）で発現し、その後減弱していく傾向を示した。感染初期では特に IE3 は脳室壁の神経前駆細胞のマーカである nestin 陽性細胞で発現しやすい傾向を示した。

【考察】

CMV の前初期 (IE) 遺伝子は転写因子として働き、早期遺伝子、後期遺伝子の発現を調節し、感染感受性、細胞特異性に関与することによって多様な病変を生ずると考えられている。MCMV ie2 遺伝子は *in vitro* においても *in vivo* においてもウイルスの増殖に必須ではないとされてきたが、その機能と役割は明らかでなかった。本研究は IE2 抗原に対する特異抗体を大腸菌を用いた融合蛋白発現法によって作成し、その発現を免疫染色によって初めて示した。感染培養細胞において核内にびまん性に発現し、IE3 抗原の点状の発現と全く異なった発現様式を示した。今回 IE3 抗原の免疫染色による発現パターンをみたのは初めてであるが、予想したようにすでに報告されている HCMV の IE2 抗原の発現パターンと同じであった。

MCMV が感染した発育期マウス脳において、IE2 抗原は神経細胞特異的に発現しやすい傾向を示し、感染が遷延化するとその発現が神経細胞に持続する傾向を示した。これに対して IE3 抗原は感染初期に脳室壁の ventricular zone の神経前駆細胞で発現しやすく、感染早期にグリア細胞で特異的に発現しやすい傾向を示し、感染が遷延化するとその発現は検出できないことが分かった。このことは、既に報告した前初期抗原 IE1 と同様に、IE3 抗原は感染早期にグリア細胞での溶解感染する時に発現しやすく、IE2 抗原は神経細胞に持続的に発現して持続感染の成立に関与している可能性があると考えられる。

MCMV ie2 はヒトサイトメガロウイルスにおけるカウンターパートがみつかっていない遺伝子のため、この結果をそのまま人体へ臨床的に応用することは難しいと思われるが、今後の HCMV に関する研究の発展次第では、MCMV の前初期遺伝子 ie2 に相当する部分がワクチンや遺伝子治療などのターゲットとして認識され、胎内感染による神経障害の予防もしくは治療に役立つ可能性がある。