

博士論文(要約)

ヒトサイトメガロウイルス感染が
ヒト栄養膜細胞の細胞機能・分化に与える影響

三村 暢子

[序論]

ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) による母子感染は先天性感染症の中でも頻度が高く、日本では年間約 1000 人の出生児に難聴や精神発達遅滞などの後遺症を起こすと推定されているが、妊娠中の母体から胎児への感染を防ぐ方法や胎児の治療は確立していない。また若年女性では抗体保有率が低下しており、今後さらなる母子感染発生の増加が懸念されている。

胎盤機能不全は先天性 HCMV 感染による胎児発育不全の原因の一つと考えられている。胎盤の中心的な構成要素である栄養膜細胞は、細胞性栄養膜細胞 (CTB)、合胞体性栄養膜細胞 (STB)、絨毛外性栄養膜細胞 (EVT) の 3 種類ある。また、CTB は STB、EVT への分化能を持つ。ヒト胎盤の形成発達過程では、単核の CTB が細胞融合して、多核の STB が絨毛表面をシート状に被覆した構造となる。CTB から STB への分化ではそうした形態学的変化に伴いホルモン産生や物質代謝を含めた細胞機能の変化が生じる。

HCMV の母子感染の感染経路の中心的要因は経胎盤感染であると推定されている。そのため、HCMV が栄養膜細胞に感染する機序に関する研究がこれまで行われてきた。行われてきたその中では、CTB や EVT では HCMV の感染効率が高いが STB は HCMV 感染に抵抗性があることや、HCMV 感染により栄養膜細胞の分化が障害されることが示唆されているが、その抵抗性や分化障害の機序は不明である。

また、オートファジーはリソソームにより細胞内のタンパク質や細胞内小器官を分解するシステムであり、胎盤における病原体の感染に対する防御機構の役割を担うことが示されてきたが、HCMV 感染による胎盤のオートファジーの関与については知見が乏しい。

今回、栄養膜細胞の初代培養における HCMV 感染モデルを作成し、HCMV 感染がヒト栄養膜細胞の分化や宿主防御機構にどのような影響を与えるか検討した。

[目的]

本研究は、HCMV 感染が、栄養膜細胞の細胞機能や分化に与える影響について多面的に検討を行い、HCMV 先天感染における胎盤機能不全の背景機序を解明することを目的とした。

[方法および結果]

本研究は、東京大学医学部研究倫理委員会の承認に基づき行った。(承認番号：10580)
全ての実験で使用した胎盤は、既往帝王切開後妊娠または既往子宮術後妊娠、骨盤位妊娠の適応で、妊娠 37 週 0 日～38 週 6 日までに選択的帝王切開術を施行された妊婦を対象として、収集を行った。本研究では、胎盤から CTB を単離し、STB へと分化させるモデルを使用した。このモデルでは、単離された CTB は、自発的に細胞融合を開始し、播種後 72 時間で合胞体化の過程を完了し STB へと分化する。上皮細胞にも感染しうるように遺伝子変異させた AD169rev という HCMV 株を MOI (multiplicity of infection: 多重感染度 (細胞 1 個に対するウイルスの数)) = 0.1 で CTB に感染させた。

検討1 CTB および STB における HCMV の感染効率の違いについての検討

抽出した CTB に培養開始からそれぞれ 24 時間後と 72 時間後の時点で HCMV を感染させ、HCMV IE タンパク質の免疫細胞染色により、感染効率を評価した。その結果、培養開始後 72 時間の合胞体化した状態でウイルス添加した場合よりも、培養開始後 24 時間の単核の非融合状態でウイルス添加した場合の方が、感染細胞数が多かった。

検討2 CTB から STB への分化に対して HCMV 感染が与える影響の評価（ホルモンの産生能、細胞融合）

1. 栄養膜細胞分化の評価のための免疫蛍光染色

細胞間の境界線を可視化するため細胞表面タンパク質であるデスマブラキンの免疫蛍光染色を行い、細胞融合状態を確認した。CTB 培養開始後 24 時間で HCMV を感染させた培養細胞と非感染の培養細胞を、培養開始後 24 時間、48 時間、96 時間の時点でそれぞれ染色した。非感染の CTB は次第に融合し、96 時間の時点で多核の STB に形態を変えたのに対し、HCMV を感染させた CTB では単核のまま細胞融合は抑制されていた。

2. HCMV 感染が栄養膜細胞の細胞分化関連分泌タンパク質の生成に及ぼす影響

ヒト絨毛性ゴナドトロピン（HCG）の生成能は、CTB から STB への細胞分化で増強されることが知られており、栄養膜細胞の HCG 分泌に対する HCMV 感染の影響を評価した。HCMV を CTB の播種後 24 時間で感染させ、播種後 24、48、72 および 96 時間の異なる時点で収集された上清中の HCG の濃度を測定した。HCG 分泌量は、感染のない培養上清と比較して、HCMV に感染させた培養上清で減少を認めた。

3. HCMV 感染による血管新生関連分子の発現の変化

血管新生関連分子である胎盤成長因子（placental growth factor : PlGF）や可溶性 fms 様チロシンキナーゼ 1（soluble fms-like tyrosine kinase-1 : sFlt-1）の産生能は、CTB から STB への分化過程で増強されると報告されている。PlGF と sFlt-1 の、培養細胞の mRNA 発現レベルと培養上清中の濃度を、HCG 分泌能の評価と同じ培養プロトコルでリアルタイム PCR および ELISA 法を使用して測定した。播種後 72 時間で、HCMV 感染群と非感染群それぞれの培養細胞で mRNA および培養上清を回収した。培養細胞の PlGF の mRNA 発現レベルと培養上清中の PlGF 濃度は、いずれも非感染群よりも HCMV 感染群で有意に低かった ($p < 0.05$)。sFlt-1 に関しては、2 群間で mRNA 発現レベルと培養上清中の濃度に有意差は認めなかった。

検討3 HCMV 感染に伴う栄養膜細胞における遺伝子発現変化の確認と、その影響を受けるパスイの同定

1. HCMV 感染が CTB から STB への分化の遺伝子発現に与える影響

CTB 播種後 24 時間で HCMV を CTB に感染させた。CTB 播種後 96 時間で HCMV 感染群と非感染群の RNA をそれぞれ回収し CAGE 法を使用し、遺伝子発現解析を行った。CAGE 法の結果より 307 個の発現変動遺伝子（DEG）は HCMV 感染により有意に増加し、168 個の DEG は有意に低下して

いることが示された。また細胞分化マーカー遺伝子の分化に伴う発現変化に対して HCMV 感染がそれらを抑制することが確認された。

2. 遺伝子発現解析において HCMV 感染により影響を受けるパスウェイ

HCMV 感染により栄養膜細胞で活性化および抑制されるパスウェイを特定するために、HCMV により増加および低下した DEG の KEGG エンリッチメント解析を行った。HCMV 感染により「細胞周期」、「p53 シグナル伝達」および「不飽和脂肪酸の生合成」に関与する遺伝子の発現が上昇し、「ケモカインシグナル伝達」、「TGF- β シグナル伝達」、「IL-17 シグナル伝達」に関与する遺伝子の発現が低下していた。

検討 4 栄養膜細胞のオートファジー機能と HCMV 感染との関係

HCMV 感染が栄養膜細胞のオートファジー機能に与える影響を調べるため、CTB 播種後 24 時間で HCMV を感染させ、感染後 1 日目と 3 日目の細胞のタンパクを抽出し、Western blot 法でオートファジーのマーカーである LC3B I と LC3B II の発現量の比 (LC3B II/LC3B I) を非感染の細胞と比較し解析した。LC3B II/LC3B I 比は非感染細胞と比較して HCMV 感染では感染後 1 日目、3 日目で有意に低下していた ($p < 0.05$)。

検討 5 オートファジー誘導作用を有するトレハロースの投与が HCMV 感染に伴う細胞機能障害を改善しうるかどうかの検討

1. トレハロース投与が HCMV 複製能へ与える影響

CTB 播種後 24 時間で HCMV を感染させ 100mM のトレハロースを投与し、播種後 96 時間で、無治療 (NT) 群とトレハロース投与 (Tre) 群、それぞれの培養細胞の RNA を抽出し、リアルタイム PCR で HCMV のコピー数を測定した。HCMV コピー数は NT 群と Tre 群で比較しても有意差は認めなかった。

2. トレハロース投与による血管新生関連分子の発現変化

CTB 播種後 24 時間で HCMV を感染させ 100mM のトレハロースを投与し、播種後 72 時間で、無治療 (NT) 群とトレハロース投与 (Tre) 群、それぞれの培養細胞で mRNA および培養上清を回収し、PlGF と sFlt-1 を、リアルタイム PCR および ELISA 法を使用して測定した。Tre 群では、培養細胞の PlGF の mRNA 発現レベルと培養上清中の PlGF 濃度は、NT 群よりも有意に高かった ($p < 0.05$) が、sFlt-1 に関しては、mRNA 発現レベルと培養上清中の濃度に有意差は認めなかった。

3. トレハロース投与による HCMV 感染 CTB のオートファジーへの影響

CTB 播種後 24 時間で HCMV を感染させ、100mM のトレハロースを投与した後、感染後 3 日目の細胞のタンパクを抽出し、Western blot 法でオートファジーのマーカーである LC3B II/LC3B I 比および p62/SQSTM1 の発現量を非投与群の細胞と比較し解析した。

トレハロース投与によって非感染群では LC3B II/LC3B I 比が増加する傾向を認め、感染群では有意な LC3B II/LC3B I 比の増加を認めた ($p < 0.05$)。また、p62/SQSTM1 の発現量もトレハロ-

ス投与により非感染群、感染群共に増加していた。

[考察]

この研究は、HCMV 感染による CTB の STB への形態変化及び STB 特異的タンパク質の分泌を阻害し、合胞体化に関連する遺伝子発現変化を抑制することによって CTB への HCMV 感染が STB への分化を阻害することを示した。また、CTB は STB よりも HCMV 感染の影響を受けやすいことも確認した。したがって、HCMV は CTB の状態で維持されることにより栄養膜細胞で効率的に増殖できる可能性がある。さらに、栄養膜細胞のオートファジーを低下させることで、胎盤の防御機構を低下させ持続感染しやすい状態にすることも示唆された。総合すると、栄養膜細胞の分化およびオートファジーの阻害は、ウイルス増殖に有利な環境を作り出す HCMV の生存戦略であると推測される。また、HCMV のオートファジー抑制に拮抗し、血管新生能を改善させたトレハロースは HCMV 感染に伴う胎盤機能不全の治療薬候補となることが示唆された。