

# Aberrant fetal macrophage/microglial reactions to cytomegalovirus infection

|       |                                                                                                            |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| メタデータ | 言語: jpn<br>出版者: 浜松医科大学<br>公開日: 2016-05-21<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: 鈴木, 万幾子<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/10271/3008">http://hdl.handle.net/10271/3008</a>                            |

博士(医学) 鈴木 万幾子

論文題目

Aberrant fetal macrophage/microglial reactions to cytomegalovirus infection

(サイトメガロウイルス感染に対する胎生期マクロファージ/ミクログリア異常反応)

論文の内容の要旨

[はじめに]

先天性サイトメガロウイルス(CMV)感染症は、病原微生物による脳発達障害の原因として最多で、ダウン症や胎児性アルコール症候群等の主な脳発達障害の原因を上回る。先天性 CMV 感染症による最も重症な後遺症は、大脳原基への感染に起因し、小頭症、精神発達遅滞、てんかん等を生ずる。胎生期の炎症・免疫応答と脳発達障害、精神神経疾患の関連が着目されており、先天性CMV感染症と統合失調症、自閉症の関わりが示唆されている。しかし、従来の研究手法では、胎仔脳におけるウイルス感染とその炎症・免疫応答は明らかにされていない。そこで、ヒト CMV 経胎盤感染に類似したマウスCMV(MCMV)胎盤内感染モデルを確立し、CMV感染の時空間的感染動態、胎仔脳における初期免疫応答を解析し、これらが脳原基へ与える影響を明らかにすることを試みた。

[対象ならびに方法]

本研究は、本学実験動物センターの定める基準に準じて行い、遺伝子組み換えウイルスならびにこれを用いた動物実験に関しては、本学バイオセーフティー委員会、動物実験委員会に申請し、その承認の下で行った。

ネンブタール麻酔下で妊娠 13.5 日目の C57BL/6 マウス胎盤内に、ガラス毛細管針を用いて、MCMV-Smith 株 1  $\mu$ l ( $10^5$  PFU)、緑色蛍光蛋白を発現する MCMV 1  $\mu$ l ( $10^5$  PFU)、対照として不活化ウイルスを接種。感染 1、3、5 日に胎盤及び胎仔をサンプリングし、以降の解析に用いた。

- ・ プラークアッセイ及びMCMV-前初期遺伝子の RT-PCR による胎盤・胎仔各臓器の感染性ウイルス粒子量及びウイルス DNA 量の経時的定量
- ・ 多重免疫染色による、MCMV 感染細胞の同定とマクロファージ(M $\phi$ )、ミクログリア(Mi)の解析
- ・ Fluorescence activated cell sorting (FACS) による脳内免疫細胞の同定と、同細胞群及び大脳全体における inducible nitric oxide synthase (iNOS)、各種サイトカイン、ケモカイン発現の RT-PCR による定量
- ・ Bromodeoxyuridine (BrdU) 細胞増殖アッセイ、大脳皮質第 II/III 層マーカー(Brn2)、第 VI 層マーカー(Tbr1)による MCMV 感染大脳の免疫組織学的解析

[結果]

- ・ 胎盤に接種した MCMV は胎盤、胎仔各臓器で経時的に増殖し、かつ、胎盤、肝臓での増殖は脳の増殖を上回った。

- ・ 胎盤に接種した MCMV は胎盤、胎仔各臓器で経時的に増殖し、かつ、胎盤、肝臓での増殖は脳の増殖を上回った。
- ・ 主な MCMV 感染細胞は血管周囲に存在する Mφ、神経幹/前駆細胞であった。感染巣には iba-1 陽性 Mφ の集簇を認め、これらは、CD45 陽性 F4/80 陽性で、MHC class II、iNOS を発現しており、活性化状態であった。さらに、MCMV 感染脳では、非感染部及び生理的には Mi が存在しない大脳皮質板においても Mi が増加し、感染巣 Mφ と異なり非活性化状態であった。これらの Mi は BrdU 摂取率が減少し、外部からの動員が示唆された。
- ・ FACS による解析では、MCMV 感染脳では、CD45<sup>high</sup> Mφ、CD45<sup>low</sup> Mi の増加を認め、他の脳内免疫細胞数は優位な増加を認めなかった。
- ・ MCMV 感染脳では、iNOS、TNF-α、IL-1β が経時的に増加し、Mφ が主要な産生細胞であった。
- ・ MCMV が感染した神経幹/前駆細胞では BrdU 摂取が完全に抑制され、細胞増殖の停止が示唆された。また、MCMV が感染していない神経幹/前駆細胞でも BrdU 摂取の減少をみとめ、大脳皮質上層に到達する BrdU 陽性細胞の減少及び上層における Brn2 陽性細胞数の減少が広範に認められた。

#### [考察]

MCMV による病原性機構として、MCMV が感染した神経幹/前駆細胞での細胞増殖停止のみならず、感染脳全体で広範かつ間接的に神経幹/前駆細胞の増殖が障害され、大脳皮質上層形成障害を生じると考えられた。Mφ は MCMV の感染細胞 (伝播細胞) であるとともに、胎仔脳における初期免疫応答の主役であると考えられた。活性化 Mφ は iNOS、炎症性サイトカインの主要な産生細胞で、これらの液性因子による神経幹/前駆細胞への間接的影響が示唆された。さらに、MCMV 感染による胎生期 Mi の異常な増加と分布が脳形成障害の要因となる可能性が考えられた。

#### [結論]

本研究により、胎盤から中枢神経系に至る胎生期 CMV 感染と、それによる大脳原基への影響を明らかにしていくことが可能となった。CMV は、神経幹/前駆細胞への感染による直接的機序のみならず、炎症・免疫応答を介すると推測される間接的機序によっても、大脳原基へ影響を与えることが示された。その中で、大脳皮質上層形成障害は、胎児性アルコール症候群や統合失調症への関与も示唆されており、脳発達障害による一つの重要なエンドフェノタイプと推測され、精神神経疾患の病因を解明する上で重要な知見である。