



Enhancement of susceptibility of adult mouse brains to cytomegalovirus infection by infusion of epidermal growth factor

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 韓, 桂萍 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/333

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 4 7 6 号	学位授与年月日	平成 1 9 年 3 月 1 4 日
氏 名	韓 桂 萍		
論文題目	<p>Enhancement of susceptibility of adult mouse brains to cytomegalovirus infection by infusion of epidermal growth factor (上皮増殖因子の脳内注入による成獣マウス脳のサイトメガロウイルス感受性の亢進)</p>		

博士(医学) 韓 桂 萍

論文題目

Enhancement of susceptibility of adult mouse brains to cytomegalovirus infection by infusion of epidermal growth factor

(上皮増殖因子の脳内注入による成獣マウス脳のサイトメガロウイルス感受性の亢進)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

サイトメガロウイルス(CMV)は胎生期に感染して脳障害を起こす最も頻度の高い病原微生物である。健康な成人においてはCMVの感染は無症状であるが、AIDS患者、臓器移植あるいは化学療法に伴う免疫不全状態において、日和見感染による重篤な肺炎や脳室脳炎を生ずることがある。第二病理学教室では、CMVは種特異性が強いので、ヒトのCMV(HCMV)にゲノム構造、遺伝子発現、感染様式などの類似したマウスCMV(MCMV)を用いて動物実験モデルで神経病原性を研究してきた。MCMVは発育期脳への感染において脳室壁の未分化な神経系細胞に感受性が高く、培養神経幹・前駆細胞の感染においても感受性が高いことを明らかにした。また、MCMVの感染がこれらの細胞の増殖と分化を抑制することを報告した。上皮増殖因子(EGF)や線維芽細胞増殖因子(FGF)はneurospheresの増殖に必須であり、in vivoで脳内注入することによって成獣マウス脳の神経再生を活性化することが知られている。本研究は成獣マウス脳への増殖因子の注入がMCMVの脳への感染感受性に与える影響を調べた。

〔材料ならびに方法〕

雌BALB/cマウスを飼育し、10週(若成獣)、25週(中期成獣)および70週(高齢成獣)マウスを用いて実験した。増殖因子であるEGF、FGFおよび神経増殖因子(NGF)をPBSに溶かし、脳定位固定装置を用いて、右大脳半球の脳室内へ頭頂部からチューブを挿入し、マイクロ浸透ポンプを手術的に装着し、33 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で100 μl を3日間注入した。対照として同様にPBSを注入した。3日目に同じチューブから変異MCMV(RM 4503)を 1×10^4 PFU注入し、5日間感染後、脳を取り出して解析した。RM4503は緑色蛍光蛋白を発現するenhanced green fluorescence(EGFP)遺伝子が挿入されている。取り出した脳を未固定で500 μm の大脳スライスを6枚ずつ作成し、倒立蛍光顕微鏡でEGFPを発現する感染細胞を観察した。大脳スライスは固定後、パラフィン包埋し、ウイルス抗原に対する抗体および細胞マーカーに対する抗体で免疫染色した。ウイルス抗原と細胞マーカーの二重染色はウイルス抗原を3-amino-9-ethylcarbazole(AEC)で赤く、細胞マーカーをfast blueで青く染色した。ウイルス感染価の定量は全脳をホモジネートにして、プラークアッセイを行った。

〔結果〕

- 1) 10週マウス脳への感染においてEGF注入脳がPBS注入脳に比して、大脳スライスにおける蛍光蛋白発現においても、パラフィン切片による免疫染色においても感染が増強した。プラークアッセイによるウイルス感染価はFGFの注入でも同様に増強したが、NGFの注入では増強しなかった。
- 2) 成獣マウス脳を10週、25週、70週マウスで比較すると、ウイルス感染価は10週脳で高く、25週、70週で低下したが、その低下の程度は約50%で、高齢マウス脳でもMCMVに感受性があり、EGFで感染が

増強することが分かった。

- 3) MCMVの核抗原の免疫染色と、未分化な神経系細胞のマーカーであるnestin発現細胞を比較すると、両者ともに脳室壁および脳室壁外側帯(SVZ)に主として分布し、EGFの投与によってそれぞれの発現細胞の数が増加し、両者の発現は相関した。高齢マウス脳ではウイルス抗原およびnestin発現細胞はともに脳室壁の近くに局在する傾向を示した。
- 4) ウイルス抗原とnestin、グリア系細胞マーカーであるGFAPあるいは細胞増殖のマーカーであるPCNAの二重染色では、ウイルス感染細胞のうち約60%がnestin陽性、約80%がGFAP陽性、約90%がproliferating cell nuclear antigen (PCNA)陽性であった。

〔考察〕

近年の研究によると脳における神経発生は生涯にわたって持続するとする実験的証拠が提出されてきた。神経発生は脳室壁あるいは隣接したSVZで生じ、そこから未分化神経幹・前駆細胞の分離培養が可能となった。発育期の脳において脳室壁の未分化な神経系細胞がCMVに感受性が高いことが示されてきたが、今回MCMVに感受性が低いと考えられていた成獣マウス脳においても感受性があり、EGF、FGFなどの神経再生を促進する因子によって感受性が増強することを示した。この感受性の増強は高齢老化マウス脳においても起こることが明らかになった。また感受性の増強は未分化な神経系細胞の増生と関連することから、神経増殖因子がMCMVに直接作用して感受性が上がるというより、神経再生によるものと考えられる。今後脳における神経変性疾患あるいは脳血管障害のために、神経再生の促進が有望な治療法として期待されているが、神経再生に伴う未分化な神経系細胞へのCMVの感受性の亢進、CMVの潜伏感染からの再活性化の危険性などを考慮し、対策を講じていく必要があると考える。

〔結論〕

EGFの脳室内注入によって、高齢成獣マウスにおいてもMCMVに対する感染感受性が増強する。この感染感受性の増強は脳室壁の神経再生と関連することが明らかとなった。このことは今後の神経変性疾患あるいは脳血管障害のための神経再生治療において考慮すべき課題であると考ええる。

論文審査の結果の要旨

ヘルペス属ウイルスの一種であるサイトメガロウイルス(CMV)は、胎生期に感染して乳幼児に脳障害を発生させる頻度が最も高い病原微生物である。ヒトのCMV(HCMV)にゲノム構造、遺伝子発現、感染様式などの類似するマウスCMV(MCMV)を用いた動物実験から、MCMVに対する感受性は胎仔脳の脳室壁にある神経幹・前駆細胞が最も高いことが知られている。また、これらの未分化神経系細胞は脳から取り出した後、上皮増殖因子(EGF)存在下で培養するとneurospheresを形成するが、neurospheresがMCMVに感染することも見いだされている。一方、最近になって、成体脳においても自己複製能と多分化能をもつ神経幹・前駆細胞が脳室下帯や海馬の顆粒細胞層下帯に存在して細胞新生が起こること、また神経前駆細胞の増殖がEGFや線維芽細胞成長因子(FGF)などの成長因子によって促進されることが明らかにされている。したがって、これらの知見から、成体脳の脳室壁に存在する神経幹・前駆細胞もCMVに感染し、その感受性が成長因子によって調節される可能性がある。なお、マウス個体のMCMV感染感受性は加齢とともに低下することが報告されている。そこで、申請者は、ヒトの青年期、成人期および老年期

の各々の発達段階に相当する成獣マウスを用いて、脳におけるMCMV感染感受性に対する成長因子の効果について調べた。

対象の選定と方法は以下の通りである。

生後10、25および70週齢のBALB/c系雌性マウスを用いた。脳定位固定装置を用いて、右側側脳室にカニューレを留置した。カニューレに接続したミニ浸透圧ポンプを用いて、リン酸緩衝食塩水(PBS)あるいはPBSに溶かした33 $\mu\text{g/ml}$ の濃度の成長因子(EGF、FGFまたは神経成長因子(NGF) 100 μl を脳室内に3日間掛けてゆっくりと注入した。その後、同じカニューレから、緑色蛍光蛋白を発現するenhanced green fluorescence (EGFP) 遺伝子を組み込んだ変異MCMV(RM4503, 1×10^4 PFU)を注入し、5日間感染させ、脳を取り出した。取り出した脳から作成したスライス標本(厚さ500 μm)について、感染(EGFP 陽性)細胞の有無を倒立顕微鏡下で観察した。また、スライス標本はパラフィン包埋後、ウイルス抗原および細胞マーカーに対する抗体を用いて二重免疫染色を施した。ウイルス感染価の定量にはプラークアッセイを用いた。

おもな結果は以下の通りである。

- (1) プラークアッセイにより10、25および70週齢のいずれのマウス脳においてもウイルス感染が観察された。ウイルス感染価は10週齢で最も高く加齢とともに低下した。また、いずれの週齢脳においてもEGFはウイルス感染価を増強した。ウイルス感染価はFGFでも同様に上昇したが、NGFでは影響が認められなかった。
- (2) 10週齢感染脳におけるスライス標本を用いた蛍光蛋白発現とパラフィン切片を用いた免疫染色によって、主として脳室壁の上皮細胞と脳室下帯において感染細胞マーカーが観察された。感染は、PBS注入脳に比べ、EGF注入脳においてより著明であった。
- (3) いずれの週齢脳においても、MCMVの核抗原陽性細胞とnestin(未分化神経系細胞マーカー)陽性細胞の発現は共にEGFによって増加し、両者に相関が認められた。
- (4) ウイルス抗原とnestinおよびGFAP(グリア細胞マーカー)あるいはPCNA(細胞増殖マーカー)との二重染色により、ウイルス感染細胞の約60%がnestin陽性、約80%がGFAP陽性、約90%がPCNA陽性を示すことがわかった。

以上のように、申請者は、従来MCMVに対する感受性が低いと考えられてきた成体脳のSVZ神経前駆細胞においても感染が起こり、その感染感受性は成長因子EGFにより増強されること、また感受性の増大は未分化神経系細胞の増生と相関することを初めて明らかにした。

審査委員会では、本研究が、今後の神経再生治療において、神経新生に伴う未分化神経系細胞のCMV感受性の亢進とCMVの潜伏感染からの再活性化の危険性に対する新たな対策の必要性を強く示唆する知見を提供している点を高く評価した。

本論文の審査過程において、主として次のような質疑が行われた。

- 1) 成長因子の濃度はどのようにして決めたか
- 2) MCMVの感染期間を5日間とした理由は何か
- 3) MCMV感染感受性に対するマウスの系統差はあるか
- 4) MCMV感染感受性に性差はあるか

- 5) PBS投与群のウイルス感染感受性に週齢差は見られたか
- 6) ウイルス感染感受性に対する週齢依存性の増強効果はFGFにも見られたか
- 7) 成熟細胞と比べ未分化細胞においてMCMV感染感受性が高い理由は何か
- 8) 海馬の顆粒細胞層下帯においてMCMV感染細胞は見られたか
- 9) 有意差検定にはいかなるテストを用いたか

これらの質問に対する申請者の解答は適切であり、問題点もよく把握しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査委員全員一致で評価した

論文審査担当者	主査	中	原	大	一	郎	
	副査	難	波	宏	樹		副査 佐 藤 康 二