



Susceptibility of neural progenitor cells in the ventricular wall to murine cytomegalovirus infection in organotypic brain slice cultures

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 河崎, 秀陽 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1171

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 318号	学位授与年月日	平成13年 3月27日
氏名	河崎秀陽		
論文題目	Susceptibility of neural progenitor cells in the ventricular wall to murine cytomegalovirus infection in organotypic brain slice cultures (大脳スライス培養における脳室壁神経前駆細胞のマウスサイトメガロウイルスへの感受性)		

博士(医学) 河崎 秀陽

論文題目

Susceptibility of neural progenitor cells in the ventricular wall to murine cytomegalovirus infection in organotypic brain slice cultures

(大脳スライス培養における脳室壁神経前駆細胞のマウスサイトメガロウイルスへの感受性)

論文の内容の要旨

[はじめに]

サイトメガロウイルス (CMV) は胎生期の感染によって脳発達障害を生じることが知られている。成人においても免疫不全状態において、特にHIV-1感染によるAIDSでは約16%にCMV脳炎を合併することが知られており、大きな問題となっている。CMVは脳室壁に感染しやすく、脳室壁から皮質に向けて感染が広がるため、脳室壁の未分化神経前駆細胞がCMVに強い感受性を示す可能性が示唆されている。さらに宿主免疫応答の成熟度も感染感受性において重要な因子と考えられている。発育期マウス脳へのマウスサイトメガロウイルス (MCMV) 感染は週齢増加とともに感受性の低下を示すことが知られているので、その機序を明らかにするために、我々は発育期大脳スライスを用いてMCMV感染実験を行った。大脳スライスは*in vivo*の感染をほぼ反映し、培養系で感染の条件を操作できる利点がある。今回は発育期マウス大脳スライスにおけるCMV感染感受性がいかなる因子と関連するのか解析した。

[材料ならびに方法]

1. 週齢別感染実験

- (1) マウス：生後0,1,2,3週BALB/cマウスを準備した。
- (2) 大脳スライス培養：各発育段階のマウスから大脳を摘出し、マイクロライザーで400 μ mにスライスし、多孔膜上で培養した。
- (3) ウイルス：MCMV組換えウイルスRM461(感染後期に発現する γ 0.85遺伝子にlacZ遺伝子を挿入した変異ウイルスでDr. Mocarskiより供与された)を使用した。
- (4) 大脳スライスへの感染：0, 1, 2, 3週発育期マウス大脳スライスにRM461ウイルス(5×10^6 PFU/ml)を1時間吸着させた後、2回洗浄。感染後、37 $^{\circ}$ Cで3日または5日培養した。
- (5) X-gal染色：感染培養後、大脳スライスは4%paraformaldehydeで4 $^{\circ}$ C、20分固定し、洗浄後X-gal染色でウイルス感染陽性細胞を検出した。

2. 培養後感染実験

- (1) マウス：生後3週BALB/c, Beige-SCIDマウスを準備した。
- (2) 大脳スライス培養：大脳スライスを作製後、37 $^{\circ}$ C、多孔膜上で4時間、7日、14日、21日とそれぞれ培養した。
- (3) 大脳スライスへの感染：培養後大脳スライスにRM461を上記と同様の方法で全体感染させた。
- (4) X-gal染色：感染後3日で上記と同様の方法でX-gal染色を行った。

3. 遺伝子銃によるIE promoter遺伝子導入実験

- (1) MCMV前初期遺伝子プロモータ導入プラスミド：MCMV DNAをHINDIIIで切り出したライブラリーから、IE遺伝子のielおよびie3のプロモーターを含む断片を切り出し、lacZおよび核移行シグナ

ルのついたpnlacFへ連結し、pnlacFproIプラスミドを作製した。

- (2) 遺伝子銃による遺伝子導入：遺伝子銃(日本医科、PIGG-1)を用いて、金粒子に付着したpnlacFproIを大脳スライスへ導入。各発達段階(0,1,2,3週)の大脳スライスを作製し、遺伝子導入を行い、発現陽性細胞数の比較をおこなった。

4. 免疫染色

nestin、GFAP、Musashi-1、MAP2に対する抗体を用いて免疫染色をし、X-gal染色で検出したCMV感染陽性細胞やIEプロモータ発現陽性細胞との二重染色をおこなった。

[結果]

1. 週齢別感染実験

- (1) 大脳スライスにおいて週齢増加とともに感染感受性の低下がみられ、in vivoの感染感受性と相関を示した。
- (2) 大脳スライスMCMV全体感染では脳室壁周囲と大脳辺縁に強い感受性を示した。
- (3) 免疫染色の結果、MCMV感染細胞は神経前駆細胞に感受性が高く、感染感受性は神経前駆細胞の量と相関した。

2. 培養後感染実験

- (1) 生後3週大脳スライスへのMCMV感染実験では、感染前の培養期間を長くするほどウイルス感受性が増加する傾向を示し、それは神経前駆細胞数の増加と相関した。
- (2) 免疫不全マウス(Beige-SCID)とBALB/cマウスの大脳スライスへの感染感受性比較実験では、免疫不全マウスはBALB/cより感受性が低く、神経前駆細胞数の量と相関を示した。

3. 遺伝子銃によるIE promoter遺伝子導入実験

- (1) MCMV前初期遺伝子(IE)プロモーターを遺伝子銃を用いて大脳スライスへ導入した。プロモーター活性は主に脳室壁周囲に発現が多くみられ、発育とともに低下した。免疫染色の結果、発現細胞は神経前駆細胞である可能性が示唆された。

[考察]

発育期脳や、免疫不全成人脳においてCMVが脳障害を生ずることは重要な問題である。マウス個体レベルのCMV感染感受性は発育とともに低下するが、脳における感染感受性を決定する要因は明らかになっていない。今回比較的脳の3次元的構築を保った大脳スライスを用いて、CMV感染感受性を部位的要因と免疫的要因の観点から解析した。その結果、脳室壁の神経前駆細胞はCMV感染に感受性が高く、その感受性は発育段階の神経前駆細胞の量に依存して減少していくことが明らかとなった。遺伝子銃を用いた大脳スライスへのCMV前初期遺伝子プロモーター発現実験でも、IEプロモーター活性は神経前駆細胞で発現が強いことが分かり、その発現は発育段階に依存して減少がみられた。この結果からCMV感染感受性は転写レベルで調整されている可能性が示唆された。

生後3週マウス大脳スライスを一定期間培養してからCMVに感染させると、培養期間が長いほど感染感受性が高まった。これは脳室壁の神経前駆細胞の増殖と相関した。同様の実験を複合免疫不全(Beige-SCID)マウスを用いて行い、感受性の増強を予測したが、BALB/cマウスより感受性が低かった。これはBeige-SCIDマウス大脳スライスでは免疫学的防御が働きにくく、神経前駆細胞の増殖が悪いことに起因する可能性が示唆された。近年、成人においても神経細胞の脱落消失が神経再生を誘導することが知られている。AIDS脳症などの脳障害において、神経細胞脱落が神経前駆細胞の増殖を促し、その結果とし

てCMVへの感染感受性が亢進する可能性が示唆された。

[結論]

CMVの個体レベルの感染において、発育が進むに従って感染感受性が低下することが知られている。大脳スライス培養にCMVを感染すると脳室壁の神経前駆細胞に感受性が強く、発育の進行とともに神経前駆細胞が減少することと感染感受性低下が相関した。大脳スライスを長期間培養するほど神経前駆細胞が増加し、感染感受性も増加した。発育期脳およびAIDS脳症などの脳障害において、脳室壁の神経前駆細胞がCMV感染感受性を左右する重要な要因である可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、病理学第二講座で精力的に研究されているサイトメガロウイルス(CMV)の感染メカニズムに関する研究の一つとしてなされた。CMVの胎生期の感染によって脳発達障害が生じることが良く知られているが、成人においても免疫不全状態において、特にHIV-1感染によるAIDSでは約16%に、CMV脳炎を合併することが知られており大きな問題となっている。このことは、個体のCMVに対する感染感受性は脳の成熟度のみならず、免疫の応答性とも密接な関係を有することを示唆している。そこで、申請者は、*in vivo*の感染をほぼ反映し、培養系であるため感染の条件を操作できるという利点を有する大脳スライスへのMCMV感染実験、及び遺伝子銃を用いてのマウスCMV(MCMV)前初期遺伝子(IE)プロモーターコンストラクトの大脳スライスへの導入実験を行い、発育期マウス脳におけるCMV感染感受性がいかなる因子と関連するのかを解析した。更に免疫不全マウスを用いての検討も行った。

大脳スライスを用いたMCMV感染実験においては、①脳室上衣下領域の神経前駆細胞及び大脳皮質の浅層に強い感染が見られること、②大脳スライスを採取したマウスの週齢増加と共にCMV感染感受性の低下がみられ、その傾向は同部位での神経前駆細胞数の減少に一致すること、③大脳スライスの培養期間の増加とともに脳室壁周囲神経前駆細胞の増加がみられ、それに伴ってCMVの感染感受性も増加する傾向を示すこと等が明かとなった。

遺伝子銃を用いたIEプロモーター活性の検討では、IEプロモーター活性の高い細胞は主に脳室上衣下領域に多くみられ、免疫染色の結果、活性の高い細胞は神経前駆細胞である可能性が示唆された。また、発育と共に同部位でのプロモーター活性は低下した。

免疫不全マウス(Beige-SCID: T cellとB cellの機能不全、及びnatural killer cell活性の低下を呈す)を用いた実験では、免疫不全マウスとBALB/cマウスの大脳スライスへの感染感受性を比較した。その結果は、予想に反して、免疫不全マウスではBALB/cより感受性が低かった。

以上のことから、脳内において、神経前駆細胞がCMVにたいする最も高い感染感受性を有していることが明らかになった。また、その現象の一因として、神経前駆細胞の示す高いIEプロモーター活性が働いている可能性が示唆された。免疫不全マウスを用いた実験では、複合免疫不全のBeige-SCIDマウスでは感染増強が予測されたが、実際にはBALB/cマウスより感受性が低かった。この現象の説明としては大脳スライスでは実際の生体内より免疫学的防御は働きにくいことや、何らかの原因で免疫不全状態が神経前駆細胞の増殖を阻害することに起因する可能性が示唆された。

本研究は、最先端の技術を用いてCMVの脳への感染メカニズムを明らかにしようという意欲的な研究であり、ほぼ、脳においては、神経前駆細胞がCMVの一次標的細胞であることを確定的にした点は大き

く評価できる。また、免疫不全状態のCMV感染に対する影響について調べるなど臨床的な視点も併せ持ち、今後の臨床応用が強く期待できる研究である。

審査の過程において、申請者に次のような質問がなされた

- 1) 脳室までのウイルスの侵入経路
- 2) CMVの感染率の地域的差異
- 3) CMVにはどのような株があるのか
- 4) 一回感染すると終生免疫ができるのか
- 5) 大脳スライス培養における組織の経時変化について
- 6) 用いられた各種細胞マーカーの選択性
- 7) Beige-SCIDマウスの免疫学的特性
- 8) 他の免疫不全マウスでの実験は行われたか
- 9) Beige-SCIDマウスでCMVの感染率が低いことに対する考察
- 10) 大脳スライス培養には虚血による影響はないのか
- 11) 遺伝子銃の原理
- 12) CMVのレセプターについて
- 13) CMVの予防の視点からどのような考察ができるか
- 14) AIDSで神経前駆細胞が実際に増えているのか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	佐藤康二			
	副査	寺川進	副査	難波宏樹	