



## Activation of murine cytomegalovirus immediate-early promoter in cerebral ventricular zone and glial progenitor cells in transgenic mice

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: 李, 仁勇 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1172">http://hdl.handle.net/10271/1172</a>

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 319号	学位授与年月日	平成13年 3月27日
氏名	李 仁 勇		
論文題目	<p>Activation of murine cytomegalovirus immediate-early promoter in cerebral ventricular zone and glial progenitor cells in transgenic mice                      (トランスジェニックマウスの大脳脳室壁領域およびグリア前駆細胞におけるマウスサイトメガロウイルス前初期遺伝子プロモーターの活性化)</p>		

博士(医学) 李 仁 勇

## 論文題目

Activation of murine cytomegalovirus immediate-early promoter in cerebral ventricular zone and glial progenitor cells in transgenic mice

(トランスジェニックマウスの大脳脳室壁領域およびグリア前駆細胞におけるマウスサイトメガロウイルス前初期遺伝子プロモーターの活性化)

## 論文の内容の要旨

### [はじめに]

サイトメガロウイルス(CMV)の胎生期の感染によって脳障害が生ずることが知られている。CMVの胎内感染は全出産の約1%に認められ、そのうち5-10%は小頭症を伴う重篤な巨細胞性封入体症として生まれ、残りの約10%は出生時は無症状であるが、やがて精神発達遅滞、視力障害、難聴、癲癇などの脳障害が生ずると報告されている。しかし、これらの脳障害の発生機序はまだ十分に分かっていない。人の症例の解析のみでは限界があり、適切な動物実験モデルが必要である。私達はマウスを用いて、胎生期の胎盤に直接マウスCMV(MCMV)を感染させることによって脳障害が生ずることを解析してきた。CMV遺伝子の発現は前初期、初期、後期の3期に分けられる。私達は宿主細胞の転写因子に依存して発現し、感染の細胞特異性を決定していると考えられているマウスCMV前初期遺伝子のプロモーター導入トランスジェニック(Tg)マウスを作成した。その活性の発育に伴う細胞特異性の変化を解析し、神経前駆細胞及びグリア系細胞の維持或は分化に関与していると考えられるmusashi遺伝子の発現と比較した。

### [材料ならびに方法]

- 1) Tgマウスの作成：MCMV IE遺伝子のie1およびie3のプロモーター(pro)をlacZおよび核移行シグナルのついたベクターpnlacFに連結し、5.1Kbpの組換え体nlacF-IEpro1を用いてTgマウスを作成した。
- 2) X-gal染色：胎仔のwhole mountあるいは生後のTgマウスの各臓器を0.2% glutaraldehyde(GA)を含む2% paraformaldehyde(PFA)で2時間固定し、X-galで一晩発色した。
- 3) 神経幹細胞培養：胎生14.5日と胎生18.5日胚の脳皮質を取り出し、20ng/ml EGF存在下で浮遊培養し、5日ごとに継代した。100  $\mu$ g/ml poly-D-lysineでコートしたcoverslipにneurosphereを付着させ、EGFを除去し、1%のFCSを入れた培養液で分化誘導を行った。
- 4) 免疫染色：lacZの発現産物である $\beta$ -galactosidase( $\beta$ -gal)の免疫染色のために組織を4%PFAで一晩固定し、ウサギの抗 $\beta$ -gal抗体で反応し、カルバゾール(AEC)で発色した。その他の抗体はNestin(ウサギ)、GFAP(ウサギ)、mouse Musashi-1(Msi-1マウス)、MAP2(マウス)、MAG(マウス)を用いた。蛍光の二重染色はレーザー顕微鏡のOlympus Fluoview-KRAR-BXSP1を使った。
- 5) IE promoterの発現の誘導：young adultマウス脳の片方に針を刺し、一週間後に脳を取り出し、4%PFAで一晩固定し、 $\beta$ -galとMsi-1の発現を比較した。

### [結果]

- 1) MCMV IE promoter導入Tgマウスでは、胎齢10日から脳と脊髄に接した間質の血管内皮細胞にlacZの発現を認めた。また、血液の単球細胞と胎盤にもlacZの発現を認めた。この時期にはmusashiは神経上

皮細胞に限局して発現していた。

- 2) 神経発生後期では脳室壁領域の神経前駆細胞にMCMV IE promoterの活性を認めた。
- 3) 神経幹細胞の培養においては、in vivoと同様にIE promoterの活性が認められ、その活性は胎齢14.5日胚からより18.5日胚から分離した神経幹細胞の方がより早く、より強い活性を認めた。継代とともにMsi 1の発現が持続するのに対し、IE promoterの活性は有意義に減少した。また、神経幹細胞を分化誘導すると、グリア系前駆細胞に活性を認め、神経細胞やオリゴデンドロサイトには活性を認めなかった。
- 4) 生後の脳室壁領域において、IE promoterの活性は減少し、脳のアストログリア系細胞に特異的に活性が増強した。
- 5) young adultマウスの脳に傷をつけることによって、Msi-1の発現は誘導されたが、 $\beta$ -galの発現は誘導されなかった。

#### [考察]

このTgマウスでは、MCMV IE promoterの活性が神経発生早期では血管内皮細胞、後期では脳室壁領域の神経前駆細胞に認められ、これはヒトの先天性CMV感染症における感受性細胞の分布とほぼ一致した。神経幹細胞の培養において、IE promoterの活性は継代とともに有意義に減少し、分化するとグリア前駆細胞に活性化することが明らかになった。生後はマウスの発育とともにアストログリア系細胞に特異的に活性が増強し、Msi 1の発現と類似していた。しかし、脳に傷をつけることによる活性の誘導はMsi 1のそれとは異なった。MCMV IE promoterがグリア前駆細胞とアストロ系細胞に特異的活性化することはin vivoの感染実験でMCMVがアストログリア細胞に許容感染しやすいことと一致した。

#### [結論]

MCMV IE promoter導入Tgマウスは神経発生の早期では血管内皮細胞、後期では脳室壁領域のグリア前駆細胞にプロモーターが優位に活性化し、マウスの発育が進むとアストログリア系細胞に特異的に活性が増強し、その様式はmusashi遺伝子の発現と類似していた。このTgマウスの胎生期のプロモーターの活性はヒトの先天性CMV感染症における感受性細胞の分布とほぼ一致した。このTgマウスはCMV感染による発育期脳の病態解析および神経系細胞の分化に伴う遺伝子発現の機構を解析する良いモデルになり得ると考える。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、病理学第二講座でここ数年精力的に研究されてきたサイトメガロウイルス(CMV)の胎生期の感染によって脳障害が生ずるメカニズムの解明の一つとしてなされた。CMVの胎内感染は全出産の約1%に認められ、そのうち5-10%は小頭症を伴う重篤な巨細胞性封入体症として生まれ、約10%は出生時無症状であるがやがて精神発達遅滞、難聴などの脳障害が生ずると報告されている。しかし、これらの脳障害の発生機序はまだ十分に分かっていない。ヒトの解析のみでは限界があるので、李氏らはマウスを用いて胎生期の胎盤に直接マウスCMV(MCMV)を感染させ脳障害が生ずることを解析してきている。CMVの感染は受容体レベルよりもむしろ細胞内でのウイルスの増殖過程に依存している。CMV遺伝子の

発現は前初期、初期、後期の3期に分けられる。新村らは、MCMVを感染させたマウスの脳細胞の解析を行い、前初期抗原IE89Kが脳室および脳室周囲の細胞とアストロサイトに発現し、初期抗原は皮質全体の神経細胞に発現していることを明らかにしている。また、小杉らはマウス胎児から神経幹細胞を細胞培養し、そこにMCMVを感染させると細胞増殖の抑制と神経細胞、グリア細胞への分化が抑制されることを報告した。さらに、真砂らは1.3kbpのMCMV IEプロモーターをLacZ遺伝子に連結したトランスジーンをもつトランスジェニックマウスを作製し、前初期プロモーターの活性を全身臓器で検討した。活性は、脳、腎臓遠位尿管、胃、骨格筋などに認められた。脳では、神経細胞ではなくアストロサイトに発現していることが明らかになった。さらに、李らはMCMVを胎生12.5日のマウス胎盤に感染させた実験を行い、胎生18.5日で60%の胎児が胎盤感染を認め、約30%の胎児が脳や肝臓に感染していることが観察された。ウイルス抗原陽性細胞は主に脳室および脳室周囲細胞に分布し、一部皮質にも見いだされた。

本研究では、MCMV IEプロモータートランスジェニックマウスにおけるプロモーターを活性化する細胞の分布を、特に神経幹細胞のマーカーと考えられるMusashi (Msi1)発現細胞と詳細に比較検討することで、胎生期におけるCMV増殖を担う脳細胞の時間的空間的分布を明らかにしている。胎生12.5日から14.5日では主に血管内皮細胞にプロモーター活性が認められたが、脳には活性が検出されなかった。胎生18.5日には脳全体、主に脳室周囲内層と脈絡叢にプロモーター活性が検出された。Msi 1染色との二重染色から、プロモーター活性はMsi 1陽性細胞の一部に認められ、出生後はMsi 1陽性細胞は脳室周囲に残るが、プロモーター活性は脳室周囲ではなく皮質のGFAP陽性グリア細胞や小脳のBergmann gliaに認められるようになる。また、神経幹細胞のどの分画にプロモーターを活性化する細胞が出現するかを神経幹細胞を用いたneurosphere法によりシャーレ内で分化させる系で検討した結果、プロモーター活性を示す細胞は、Msi 1陽性細胞が75%、GFAP陽性細胞が97%、MAP2あるいはMAG陽性細胞が0%であった。これらの事実から、IEプロモーターを強く活性化することができる細胞は胎生12.5日から18.5日の血管内皮細胞と胎生18.5日以降の神経幹細胞がアストロサイトに運命づけられたグリア前駆細胞とアストロサイトであることが明らかになった。本研究により、胎生期のCMV感染は、まず胎盤の胎児血管に感染し、次いで脳脈絡叢血管から脳室内に進入し、そして脳室周囲の神経幹細胞に感染する。この細胞ではIEプロモーター活性が強いため、幹細胞で増殖が起り幹細胞および由来する神経細胞・グリア細胞が死滅するため、小脳症となる。一方、神経細胞への前駆細胞に感染したウイルスは持続感染型となるため、神経細胞にウイルス初期抗原が陽性となる。本研究は、今までのマウス胎児へのウイルス感染で得られた結果を説明できる立派な研究であり、CMV感染の胎児の脳障害機構の概要を明らかにした点が大きく評価できる。

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) なぜMusashiに注目したのか
- 2) stem cellではなくprogenitor cellという根拠は何か
- 3) 巨細胞封入体症とは何か
- 4) CMV感染時期と脳症状の程度の関係はあるか
- 5) CMV受容体の細胞特異性は
- 6) 前初期、初期、後期遺伝子はどのような蛋白をコードしているか
- 7) トランスジェニックマウスの他の臓器での発現はどうか
- 8) ウイルス感染では神経細胞にウイルス抗原が検出されるのはなぜか
- 9) 持続感染のメカニズムは

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いると判断されたので、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 三浦直行  
副査 佐藤康二 副査 金山尚裕