



Differential expression of the immediate-early and early antigens in neuronal and glial cells of developing mouse brains infected with murine cytomegalovirus

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード: 作成者: 新村, 祐一郎 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1607

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	医博論第 330号	学位授与年月日	平成13年 2月14日
氏名	新村 祐一郎		
論文題目	Differential expression of the immediate-early and early antigens in neuronal and glial cells of developing mouse brains infected with murine cytomegalovirus (マウスサイトメガロウィルスの胎生期マウス脳感染における神経細胞とグリア細胞での前初期抗原、早期抗原の発現の相違)		

博士(医学) 新村 祐一郎

論文題目

Differential expression of the immediate-early and early antigens in neuronal and glial cells of developing mouse brains infected with murine cytomegalovirus

(マウスサイトメガロウイルスの胎生期マウス脳感染における神経細胞とグリア細胞での前初期抗原、早期抗原の発現の相違)

論文の内容の要旨

[はじめに]

サイトメガロウイルス(CMV)の胎児への感染は中枢神経系の先天異常をきたす原因として知られるが発症機構は解明されていない。今回マウスCMV(MCMV)の前初期抗原を認識する抗体(N2)を作製した。先に作製されたMCMV早期核抗原を認識する抗体(D5)との免疫染色による比較により発育期脳におけるMCMVの感染動態を解析し、CMVによる脳障害の発生機序を考察した。

[材料ならびに方法]

- 1) ウイルス：MCMVSmith株とMCMV変異株(RM461)を使用した。RM461は感染後期遺伝子に β -ガラクトシダーゼ(β -gal)を挿入した組換えウイルスである。
- 2) 抗体の作製：MCMVを6週齢のラットに感染させ脾臓を採取しマウスミエローマ細胞(Sp2)と融合した。マウス線維芽細胞(MEF)をサイクロヘキサミド($50\mu\text{g/ml}$)で処理してMCMV前初期抗原のみを発現する状態にし、各Sp2融合株の上清をMEFに反応させて蛍光染色により陽性のものを選択した。陽性株について限界希釈によりクローニングを2回行った。また免疫沈降によりMCMV前初期抗原を認識する抗体であることを確認した。
- 3) マウス胎児へのMCMV感染と免疫染色：妊娠15.5日のICRマウスの胎児の脳室内にMCMVを注入し、生後7日後の脳を採取した。脳は4%パラホルムアルデヒド(PFA)で固定後パラフィンで包埋し冠状断の切片を作製した。隣接切片をそれぞれD5(先に共同研究者が作製したMCMV早期抗原を認識する抗体)とN2を用いてABC法により染色した後、抗NSE抗体、抗GFAP抗体、抗ネスチン抗体を用いてジゴキシゲン法により二重染色した。
- 4) *in situ hybridization*：MCMV前初期遺伝子に相同性のある30bpのオリゴプローブを用いた。

[結果]

MCMV前初期抗原を認識する抗体(N2)を作製し、この抗体を用いた免疫染色を行った。MEFへのMCMV感染(*in vitro*)ではMCMVの前初期抗原のみ発現する状態にある感染細胞の核が染色された。感染24時間後では核と細胞質が染色され、72時間後では染色性が低下する傾向を示した。マウス胎児脳の脳室にMCMV(Smith株)を感染させた後、生後7日に取り出した脳(*in vivo*)では、MCMV前初期核抗原(N2)陽性細胞が脳室周囲に多く分布する傾向やMCMV早期核抗原(D5)陽性細胞が大腦皮質や海馬に多く分布する傾向を示した。*in situ hybridization*ではウイルスDNA陽性細胞がN2陽性細胞と同様に脳室周囲に多く分布する傾向を認めた。ウイルス抗原と細胞特異的なマーカーとの二重染色では、N2陽性細胞の多くがGFAP陽性のグリア細胞であるのに対しD5陽性細胞の多くはNSE陽性の神経細胞である傾向を認めた。

MCMV変異株(RM461)を感染させた場合もSmith株を用いた場合と同様の傾向を示した。RM461の感染ではMCMV後期遺伝子を発現した β -gal陽性細胞がグリア細胞に多い傾向を認めた。

〔考察〕

免疫染色によりマウス発育期脳のマCMV感染におけるMCMV前初期抗原と早期抗原発現細胞の分布の違いを認めた。脳室周囲のグリア細胞ではMCMV前初期抗原および後期遺伝子発現をみるものが多く、ウイルスDNA陽性細胞も多い傾向を示した。このことは脳室周囲で溶解感染が進みウイルスが増殖することを示唆する。脳室周囲の組織は発育期脳における神経系細胞の供給源であることが知られており、同部位のCMVによる傷害は胎生期または新生児期の脳の発達障害の一因になりうることが考えられた。一方、皮質や海馬の神経細胞ではMCMV早期核抗原の発現が多い傾向を示し溶解感染の指標となるMCMV後期遺伝子発現をみるものが少なく、ウイルスDNA陽性細胞も少ない傾向を示した。このことからMCMVが神経細胞で持続感染あるいは潜伏感染し生後の脳に障害を与える可能性が与えられた。

〔結論〕

MCMV前初期抗原を認識する抗体を作製し免疫染色による発育期脳のマCMVの感染動態の解析を行った。MCMVは脳室周囲のグリア細胞では溶解感染となり皮質や海馬の神経細胞では持続感染あるいは潜伏感染になる可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

サイトメガロウイルス(CMV)は経胎盤性に胎児に感染し、感染した胎児の5~10%に先天性巨細胞封入体症を引き起こす。中でも、中枢神経系へ感染は持続感染、潜伏感染の再燃の結果、生後さまざまな脳障害を引き起こすことが知られている。申請者らは、マウス胎児脳にマウスCMV(MCMV)を感染させることにより、発育期脳におけるMCMVの感染動態を解析し、MCMVによる脳障害の発症機序を考察した。得られた主な結果は以下の通りである。

(1)MCMV前初期抗原を認識する単クローン抗体(N2)の作製：MCMVを感染させたマウス線維芽細胞(MEF)の細胞溶解物をラットに免疫し、単クローン抗体N2を作製した。N2を用いて免疫染色を行ったところ、cycloheximideで処理し、MCMV前初期抗原のみを発現する状態にある感染MEF細胞の核が染色された。感染24時間後には核と細胞質が染色され、72時間後には染色性が低下した。このことより、IE抗原の発現は感染後期に減弱することが判明した。免疫沈降法で、N2反応抗原は89kdの分子であることが判明した。また、MCMV早期核抗原を認識する抗体(D5)は32~35kdの少なくとも4種のバンドを検出した。(2)MCMV感染胎児脳におけるIE抗原と早期核抗原の発現：MCMV(Smith株)を胎児脳の脳室内に注入感染させ、生後7日目の脳をN2抗体およびD5抗体を用いて免疫染色したところ、IE抗原陽性細胞は脳室周囲に多く分布し、早期核抗原陽性細胞は大脳皮質や海馬に多く分布する傾向を認めた。(3)ウイルスDNA陽性細胞の検出：in situ hybridizationにより、MCMV DNA陽性細胞は脳室周囲に多く分布することが判明した。(4)二重免疫染色による各ウイルス抗原陽性細胞の同定：IE抗原陽性細胞の多くはGFAP(glial fibrillary acidic protein)陽性のグリア細胞であり、早期核抗原陽性細胞の多くは、NSE(γ -neuron-specific enolase)陽性の神経細胞であった。(5)MCMV変異株(RM461)によるMCMV後期遺伝子発現細胞の検出：後期遺伝子に β -ガラクトシダーゼ(β -gal)を挿入した組換えウイルスRM461を胎児脳に感染させたとこ

ろ、 β -gal陽性細胞は脳室周囲に多く、中でもグリア細胞に多い傾向を示した。

以上より、申請者らは脳室周囲のグリア細胞でMCMVの溶解感染が進みウイルスが増殖することを示唆した。そして、脳室周囲の組織は発育期脳における神経細胞の供給源であることから、同部位のウイルスによる傷害が脳の発達障害の一因となりうると推察した。一方、皮質や海馬の神経細胞では持続感染または潜伏感染し、生後の脳に障害を与える可能性も示した。

審査委員会では、胎児脳にMCMVを感染させ、各ウイルス抗原の発現を詳細に検討することにより、発育期脳におけるMCMVの感染動態を明らかにした点、およびこれにより脳の発達障害の機序に示唆を与えた点を高く評価した。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑を行った。

- 1) CMVの脳室内感染法の妥当性について
- 2) 妊娠15.5日の胎児脳に感染させる妥当性について
- 3) CMVはBBBを通過しないか
- 4) 小脳への感染の程度について
- 5) 海馬のどの部分に感染が多いか
- 6) CMV感染によりグリオシスは起こすか
- 7) 非感染細胞のapoptosisの機序について
- 8) CMV感染により神経前駆細胞が皮質に移行できないのか、または正常な神経細胞ができないのか
- 9) CMVに対する脳の感染感受性が胎生期から新生児期になるに従い低下する理由は
- 10) D5陽性細胞が溶解感染にならない理由は
- 11) 脳室周囲のグリア細胞で増殖したCMVは皮質神経細胞に感染しないか
- 12) TNF- α によるCMVに対する感受性増加の機序は

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 小 出 幸 夫
副査 中 原 大 一 郎 副査 武 井 教 使