


サイトメガロウイルス感染症における神経病原性の発生機序

Cytomegalovirus infection

Cytomegalic inclusion disease (CID) was known in the early 20 century and the virus was isolated in 1958 by Smith, and named as cytomegalovirus by Weller et al.



- Central nervous system
 - Microcephaly
 - Periventricular calcification
 - Neuronal migration disorders
 - Polymicrogyria
 - Microphthalmia
 - Sensorineural hearing loss
 - Optic nerve atrophy
 - Mental retardation
 - Epilepsy
- AIDS encephalopathy
- Rasmussen's encephalitis
- Guillain-Barre syndrome
- Lung
 - Interstitial pneumonia
- Gastrointestinal
 - CMV related gastrointestinal ulcer
 - CMV related inflammatory bowel disease
- Liver and spleen
 - Hepatitis
 - Hepatosplenomegaly
- Kidney
 - Renal dysfunction (glomerulopathy)
- Bone marrow
 - Thrombocytopenia
 - HCMV mononucleosis
- Placenta
 - Invasion of cytomegalovirus
- Others
 - Chronic fatigue syndrome

図 1

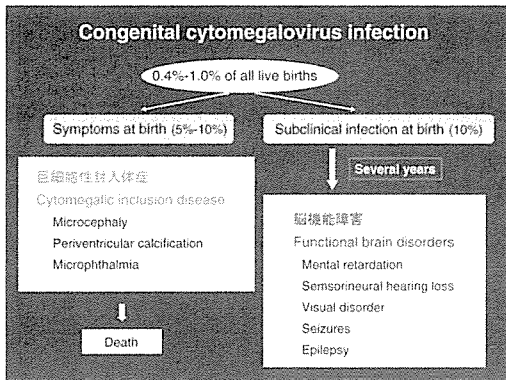


図 2

剖検情報データベース (日本病理学会剖検情報委員会)
(Data base of Japanese autopsy file)

	1974年—2000年 (27年間)	年平均 (cases per year)
巨細胞性封入体症 (CID)	339	12.5
サイトメガロウイルス (CMV)		
風疹 (Rubella)	22	0.81
トキソプラズマ症 (Toxoplasmosis)	18	0.67

(年齢: 胎生期から10歳まで)

	先天性CMV感染症 (congenital CMV infection)	後天性CMV感染症 (acquired CMV infection)	全剖検数 (0-10歳)
例数	265 例	74 例	31,122 例
年平均剖検数	9.8 例/年		1,152 例

図 3

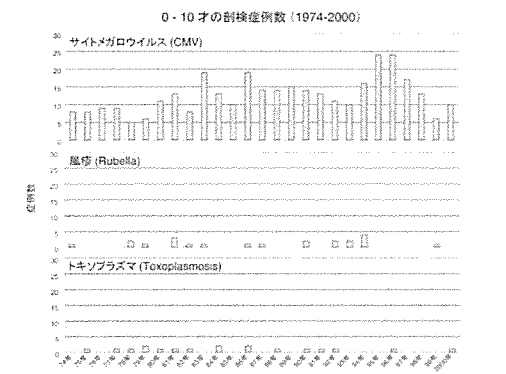


図 4

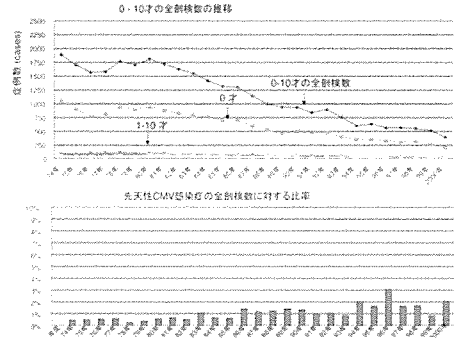
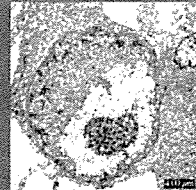
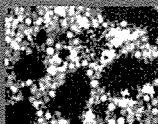



図 5

ヒト目のCMV感染細胞 (石原好弘先生提供)

CMV感染原菌管上皮 (愛知医科大学例)

Cytomegalovirus

二重鎖 DNAウイルス
ゲノムサイズ: 230 - 250kbp
200 近い蛋白質コード

種特異性強い
ヒトCMV (HCMV)サル
CMV (SCMV)
マウス CMV (MCMV)
モルモットCMV (GPCMV)
ラット CMV (RCMV)

図 6

マウスサイトメガロウイルス (MCMV)とヒトサイトメガロウイルス(HCMV)の比較

	MCMV	HCMV
ウイルス属	βヘルペス属	βヘルペス属
DNA	2本鎖	2本鎖
DNA size	235kb	229kb
構造	UL	UL + US
GFP	170	200
GD content	58%	67%
種特異性	マウス	ヒト
臓器特異性	脳, 皮下脂肪, 脾臓, 腎臓, 心臓, 肺, 骨髄, 肝臓, 膵臓, 脾臓	脳, 皮下脂肪, 脾臓, 腎臓, 心臓, 肺, 骨髄, 肝臓, 膵臓, 脾臓
細胞特異性	神経芽細胞, マウスアストロサイト, 骨髄細胞, グリア細胞	神経芽細胞, マウスアストロサイト, 骨髄細胞, グリア細胞
Growth speed	24-30 hours	48-72 hours
Ganciclovir	Effective	Effective

図 7

ES細胞へのMCMVの感染

Blastocyst → ES cells → Mutant MCMV infection

分化(-) → 感染細胞
分化(+) → 非感染細胞

初期胚およびES細胞はMCMVに感受性を示さない

図 8

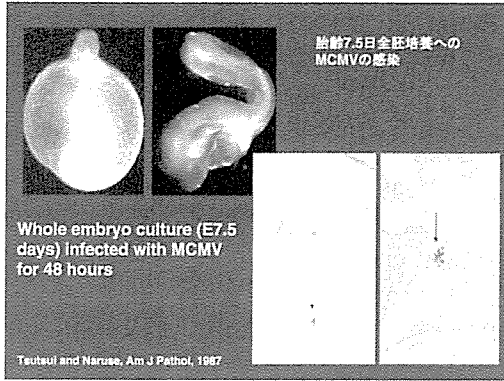


図 9

Age-dependent changes of β -galactosidase (β -Gal) expression in the brain slices from different age-mice infected with mutant MCMV

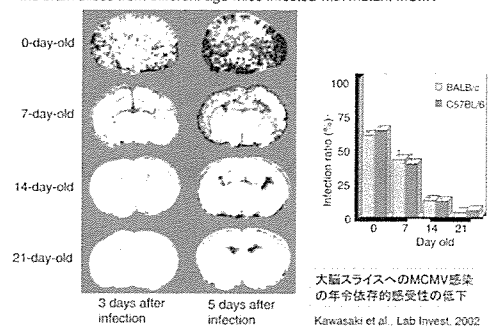


図 13

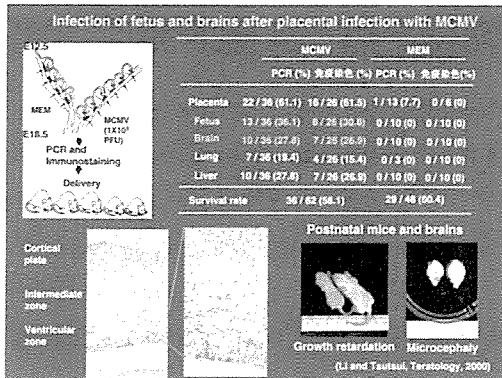


図 10

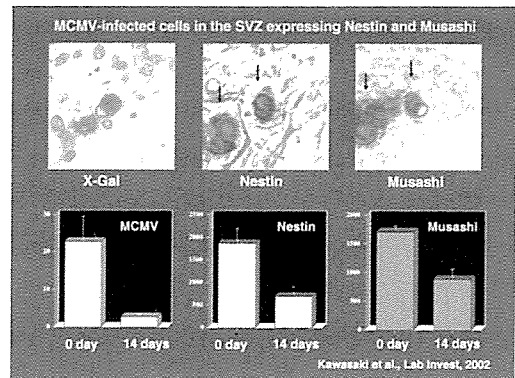


図 14

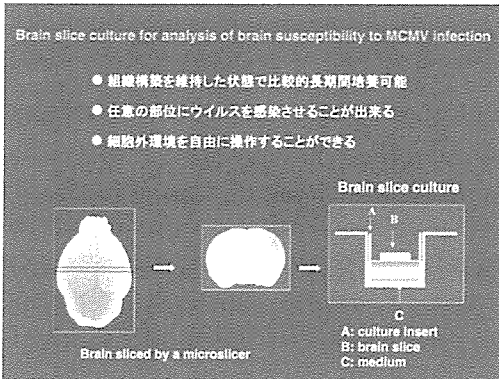


図 11

Increase of infected cells by prolonged period of brain slice culture before MCMV infection

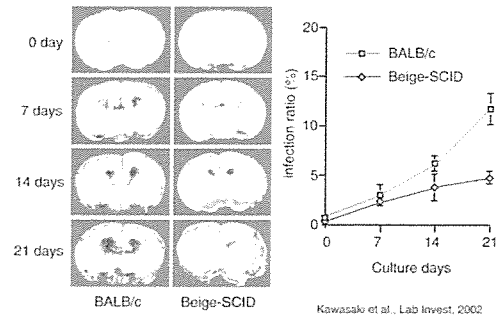


図 15

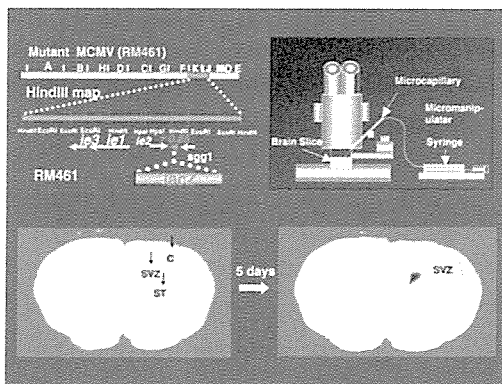


図 12

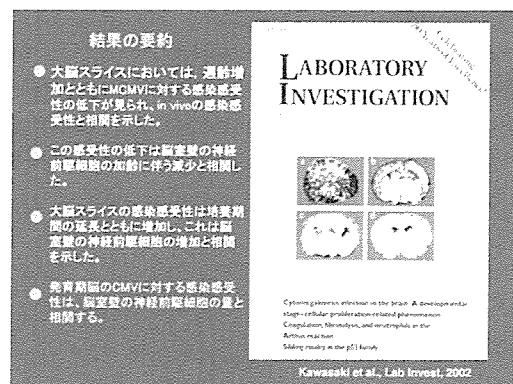


図 16

カーである nestin および Musashi^{27,28} で二重染色すると、 β -gal 陽性細胞はこれらのマーカーと二重染色されることから、未分化な神経前駆細胞であることが分かった(図 14)。これらの細胞マーカーは脳の発育に伴って脳室壁の感染細胞と相関して減少した(図 14 下)。CMV に感受性のある脳室壁の未分化な神経前駆細胞が、大脳スライス培養を続けることによって増えるかどうか調べた。既に感染感受性が低下している生後 3 週齢のマウス脳から大脳スライスを作成し、培養直後、7 日、14 日、21 日間培養してから変異ウイルスを感染すると、培養期間が長くなるほどウイルス感受性細胞が増加することが分かった(図 15)。免疫不全マウスである Beige-SCID マウスからの大脳スライスでは、感染感受性が促進すると予想したが、かえって感受性が低く、大脳スライスにおいて未分化な神経前駆細胞の感染感受性に宿主の免疫は関与していないと考えた(図 15)²⁴。以上、大脳スライス培養においても MCMV は発育期脳室の脳室壁の未分化な神経前駆細胞に感染感受性があり、この感染感受性は神経前駆細胞の量と相関することが明らかとなった²⁴。この論文は Lab. Invest. の表紙に、“Cytomegalovirus infection in the brain: A developmental stage- and cellular proliferation-related phenomenon” として掲載された(図 16)。

2) 神経幹・前駆細胞の培養による感染感受性の解析

発育期脳の神経前駆細胞が感染感受性を決める重要な要因であることが明らかになったので、この神経前駆細胞の CMV への感受性をもう少し詳しく解析するために、Reynold と Weiss の方法³⁰に従って、神経幹細胞を培養し、MCMV を感染させてその影響を解析した。神経幹細胞の特徴は、自己増殖能、自己再生能、多分化能を有することである²⁷。マウス胚から脳を取り出し、epidermal growth factor (EGF) 存在下で培養すると、マリモのように浮遊状態の neurospheres として培養することが出来る(図 17)。この neurospheres は当初は神経幹細胞(neural stem cells)の培養と考えられたが、神経前駆細胞(neural progenitor cells)も含まれることが知られている。これらの細胞をバラバラにして播き直すと、自己増殖、自己再生し、分化へと誘導すると神経細胞、グリア細胞、オリゴデンドロサイトに分化する能力を持っている(図 17)。私達は胎生期マウス脳から分離した neurospheres に MCMV の感染が如何に影響を与えるか解析した³¹。MCMV は neurospheres に感染し、そのマリモ状構造が崩れ、ウイルス抗原が発現し、感染性のウイルスを放出することが分かった(図 18)。このように neural stem cells は ES 細胞と異なり MCMV に感染感受性を示すことが明らかになった。神経幹・前駆細胞の増殖力、BrdU の取込みおよび自己再生能がウイルスの感染価の増加とともに低下した(図 19)。Neurospheres は培養液から EGF を除いて 2% horse serum 存在下で培養すると神経細胞、グリア系細胞へ分化誘導することができる。MCMV を感染してから分化へと誘導し、神経幹・前駆細胞のマーカーである nestin、グリア系細胞のマーカーである GFAP、神経細胞のマーカーである neurofilament (NF) に対する抗体で免疫染色を行い、さらに

flow cytometry による定量的解析を行った(図 20)。非感染 neurospheres は nestin のみを発現し、GFAP や neurofilament は発現せず、分化へと誘導すると、nestin の発現は減少し、GFAP, neurofilament の発現が増強した。ウイルスを感染してから分化へと誘導すると、nestin の発現は軽度増加し、GFAP の発現はほぼ保持されたが、neurofilaments の発現は強く抑えられた³¹。これらの結果は、MCMV の感染によって neurospheres の細胞は分化へと誘導されにくく、特に神経細胞への分化が抑制されることが明らかとなった(図 20)。以上をまとめると、MCMV は発育期脳の脳室壁の神経幹・前駆細胞に感受性を示し、グリア系細胞への分化は保持されるが、神経細胞への分化が抑制される。グリア系細胞では溶解感染しやすく、neurogenesis は抑制される。このことが脳の形成を抑制し、小頭症などの脳形成障害の原因になると考えた(図 21)。この論文は Lab. Invest. の表紙に“The beginnings of stem cell pathology”として紹介された(図 22)³¹。Editorial で neural stem cell の生理機能に関する研究は進んでいるが、病態あるいは疾患との関連を示唆した初めての論文であると紹介された。始めに述べたように、初期胚や ES 細胞は MCMV に感受性を示さず、neural stem cell は感受性を示す点は興味ある事実であると考ええる。現在教室の河崎が神経幹・前駆細胞の如何なる要因が MCMV の感受性と関連しているか解析し、cyclophilin が標的である可能性を示唆する結果を得た(投稿準備中)。

4. グリア細胞と神経細胞の感染動態の相違

胎生期に脳室壁の ventricular zone (VZ) で、未分化神経上皮細胞が増殖を続けている。脳の発育とともに未分化神経細胞は VZ を離れて radial glia の繊維に沿って脳室壁から皮質板 cortical plate (CP) へと移動し、その間に神経細胞、グリア系細胞へと分化する。そして将来の皮質の層形成、神経回路形成へと進行する(図 23)³²。発育期脳において脳室壁の SVZ に感染した CMV が、その後の神経細胞の分化、移動、層形成などに如何に影響を与えるかが問題である。発育期マウス脳への MCMV の感染において、未分化な神経系感染細胞が脳室壁から CP へと移動し³³、大脳スライス培養に移しても感染細胞が移動することが明らかになった²³。発育期脳で CMV が急性感染から感染が遷延化すること、ウイルス感染の細胞特異性、特にウイルス遺伝子発現の細胞特異性が、感染動態の相違を引き起こし、脳機能障害などの病態に関与すると考えられる。特にグリア細胞と神経細胞で、ウイルス遺伝子発現が如何に異なるかを明らかにすることが病態の解明に重要である(図 23)。CMV は 200 近い蛋白質をコードする大きな DNA ウイルスである。前初期遺伝子は宿主の転写因子によって細胞特異的に発現し、その転写産物は早期遺伝子を活性化し、早期遺伝子産物は viral DNA replication に関与する。前初期および早期遺伝子産物は後期遺伝子の発現を活性化する(図 24)。このように CMV の前初期、早期、後期遺伝子がカスケードをなして発現を

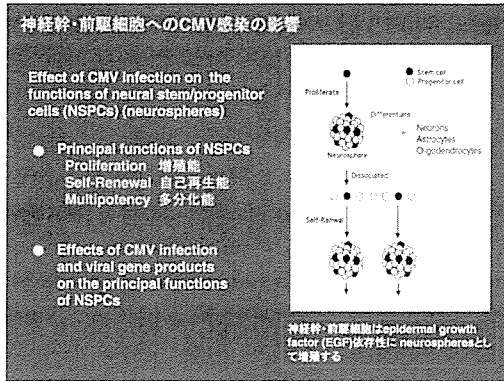


図 17

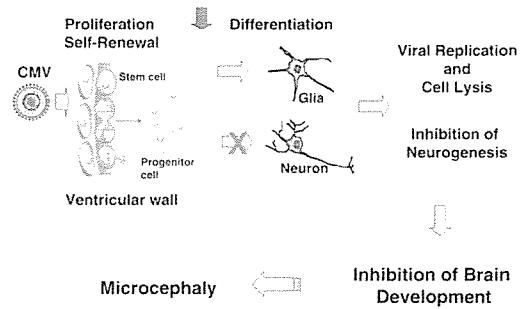


図 21

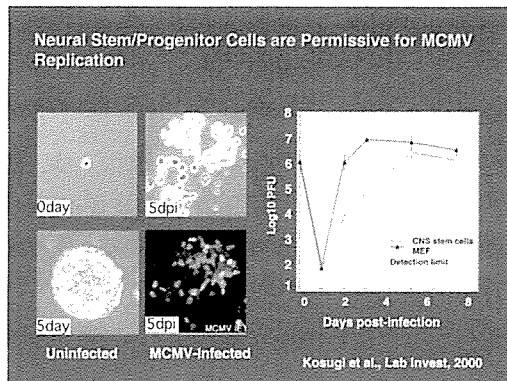


図 18

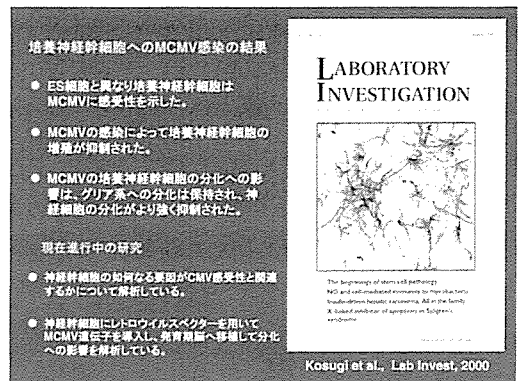


図 22

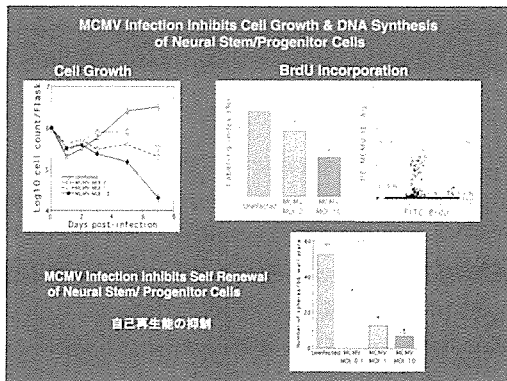


図 19

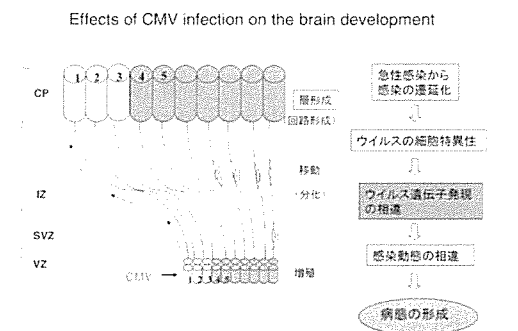


図 23

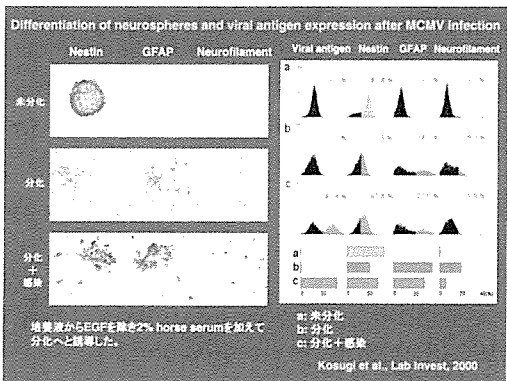


図 20

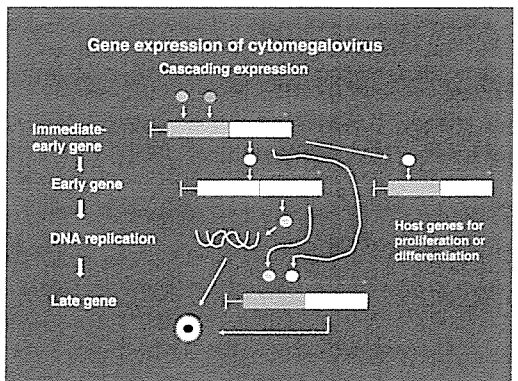


図 24

する。また前初期抗原は宿主の増殖や分化に関する遺伝子を trans-activation することが知られている (図 24)⁶。

私達は MCMV 前初期遺伝子 IE1, IE2, IE3 および早期遺伝子 E1 の遺伝子産物に対する特異抗体 (Ab) を作成した (図 25)。MCMV を感染させた発育期マウス脳での発現を免疫染色で解析した。出生直後のマウス脳に MCMV を感染させ、これらの抗体を用いて免疫染色すると、前初期抗原 IE1 は脳室壁の細胞で発現しやすく、早期抗原 E1 は大脳皮質の神経細胞で発現しやすい傾向を示した。海馬においても IE1 は脳室壁で、E1 は錐体細胞で発現しやすい傾向を示した³⁴。このように MCMV の前初期抗原 IE1 と早期抗原 E1 は、感染脳における発現の局在が異なる傾向を示した (図 26)。前初期抗原 IE1 は GFAP を発現するグリア系細胞で発現しやすく、早期抗原 E1 は neuron-specific enolase (NSE) を発現する神経細胞で発現しやすい傾向を示した (図 27 上)。脳の部位を cortex, ventricular zone, hippocampus に分けてその発現を定量的に比較すると、前初期抗原 IE1 は脳室壁のグリア系細胞で、早期抗原 E1 は大脳皮質および海馬の神経細胞で発現しやすい傾向を示した (図 27 下)³⁴。脳の発達に伴って、脳室壁の神経幹細胞は前駆細胞、未分化なグリア系細胞あるいは神経細胞へと分化しながら移動して脳が形成されるが、MCMV 感染マウス脳において、前初期抗原 IE1 はグリア系細胞で、早期抗原 E1 は神経細胞で発現しやすいことが分かった (図 28)。このことは、グリア細胞と神経細胞でウイルス遺伝子プロモーターの活性化が異なると考えた。このことを明らかにするためにトランスジェニックマウスを作成して解析した。

5. トランスジェニック (Tg) マウスによるウイルス遺伝子発現の細胞特異性

MCMV の前初期 (IE) 遺伝子は enhancer-promoter (ie-promoter) を挟んで 5' 方向へ ie1, ie3 遺伝子が発現し、3' 方向へは ie2 遺伝子が発現することが知られている⁶ (図 29)。HCMV と同様に、MCMV の前初期遺伝子の遺伝子産物、特に IE3 は *in vitro* の transfection の実験の結果より、早期遺伝子 e1 を強く活性化した。そこで、前初期遺伝子 ie-promoter プロモーターと、早期遺伝子 e1-promoter にレポーター遺伝子である LacZ をつないだ組換え体を作成し (図 29 右)、それぞれ Tg マウスを作成して、これらのウイルス遺伝子プロモーターの個体レベルでの発現における細胞特異性を解析した。

1) MCMV 前初期遺伝子プロモーターを発現する Tg マウス

MCMV の前初期遺伝子は宿主の転写因子に依存して細胞特異的に発現することが知られている。前初期遺伝子 IE-promoter (1338 bp) に lacZ を繋いだ組換え体は核移行シグナルがついており、 β -galactosidase (β -gal) が核で発現する。この組換え体を挿入した Tg マウスを作成した³⁵。PCR と Southern blot でスクリーニングした結果、数系統に integration を認め

た (図 30)。 β -gal を発現する Tg マウスについて抗 β -gal 抗体による免疫染色でアグルトマウスの全身臓器の発現を調べたところ、脳以外の臓器では腎臓の遠位尿細管、唾液腺の腺細胞、肝細胞の一部、胃粘膜の固有細胞などで発現した (図 31)。これらの部位はヒトにおける CMV の感染感受性部位と一致した。脳においては、大脳の GFAP を発現するグリア系細胞で発現したが、神経細胞、オリゴデンドロサイト、ミクログリアではその発現を認めなかった。小脳においては Bergmann glia で発現を認めたが、プルキンエ細胞や顆粒細胞では発現しなかった (図 32)。このように脳においては ie-promoter はアストロサイト特異的に発現することが分かった³⁵。この Tg マウスの全身における発現様式はヒトにおける CMV の感染感受性細胞の分布と類似していた。HCMV の IE-promoter/enhancer は *in vitro* で種々の遺伝子発現の発現ベクターとして使用されているが、CMV の前初期遺伝子プロモーターは個体レベルにおいては明確な細胞特異性をもって発現することが明らかになった。

この Tg マウスの脳における発現様式は Musashi の発現に類似していたため、この MCMV ie-promoter 導入 Tg マウスの脳における発育段階での発現を Musashi と比較した³⁶。Musashi は RNA-binding protein で、神経幹・神経前駆細胞のマーカーとして知られている³⁷。Musashi に対する抗体は慶応大学岡野栄之教授から供与された²⁸。胎齢 12.5 日の Tg マウス胚を whole mount で X-Gal 染色すると、血管で発現を認めた (図 33)。矢状断で見ると、この時期ではまだ終脳の神経系細胞では ie-promoter の発現は認められず、神経上皮に隣接した血管内皮で発現を認めた。Musashi との二重染色では、この時期に Musashi は神経上皮細胞に既に発現を認めたが、 β -gal の発現は血管内皮に限局していた (図 33)。神経発生の後期では、ie-promoter の発現は脳で顕著になり、特に脳室壁の VZ の細胞や、第三脳室の神経上皮の一部で強い発現を認めた (図 34)。この発現パターンは、MCMV の胎生期脳への感染において、脳室壁の細胞に感受性が高いことと一致していた。共焦点レーザー顕微鏡を用いて二重染色で、脳室壁における ie-promoter と Musashi の発現を比較したところ大部分の細胞が一致していた。また、 β -gal 陽性細胞は PCNA 陽性で BrdU を取り込むことから、神経幹・前駆細胞であると考えた (図 34 下)。Tg マウスの胎生期の脳から neurospheres の培養を試みた。ie-promoter による β -gal の発現は、胎齢の早い時期の neurospheres では発現しにくく、胎齢が進んだ neurospheres では発現しやすことが分かった (図 35 左)。赤く染色されている Musashi は培養のはじめから発現し、青く染色されている β -gal の発現は培養初期では発現が認められず、時間が経過すると発現して行くことが分かった (図 35 右)。さらに neurospheres の継代を繰り返すことによって発現しなくなることから、ie-promoter の発現は神経幹細胞では発現せず、分化へと commit した神経前駆細胞の段階で発現すると考えた。この Tg マウスの neurospheres の培養液から EGF を除いて分化へと誘導した (図 36)。 β -gal を発現する細胞の大部分は GFAP, nestin を発

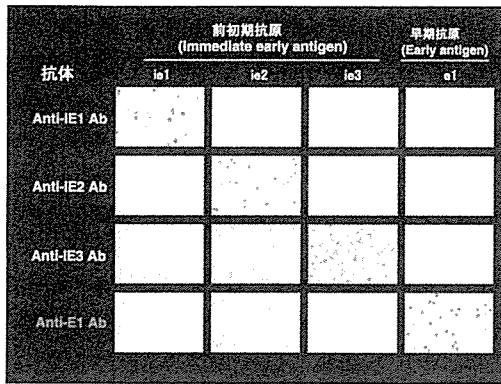


図 25

Tg マウスを用いたMCMV遺伝子プロモーターの個体レベルでの発現 (Activation of the immediate-early and early promoters in transgenic mice)

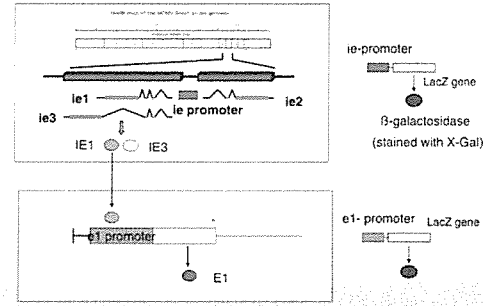


図 29

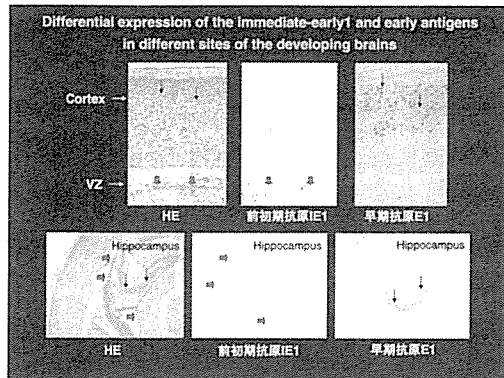


図 26

Schema of the MCMV IE promoter-lacZ transgene DNA

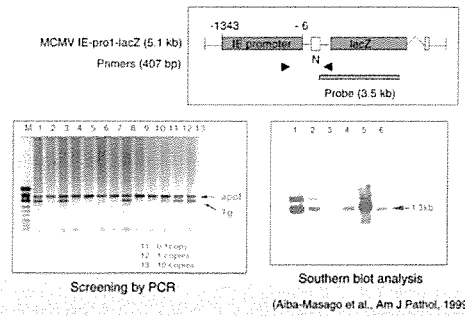


図 30

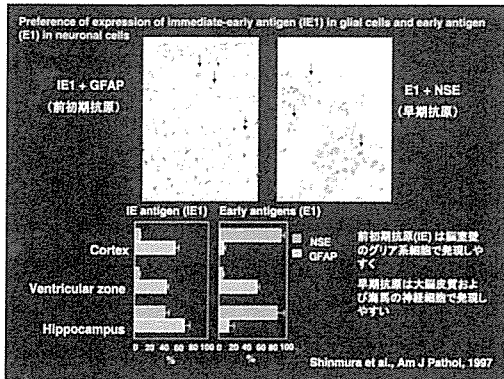


図 27



図 31

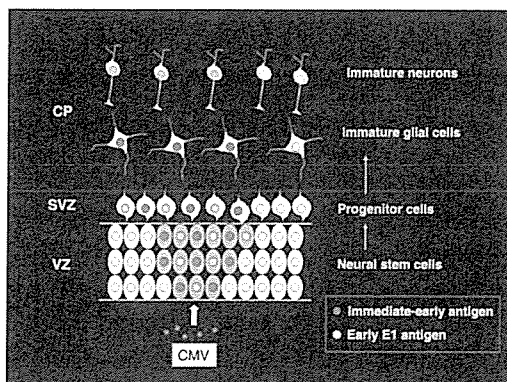


図 28

Expression of beta-galactosidase in the adult brain of MCMV-IE-pro1 Tg mice

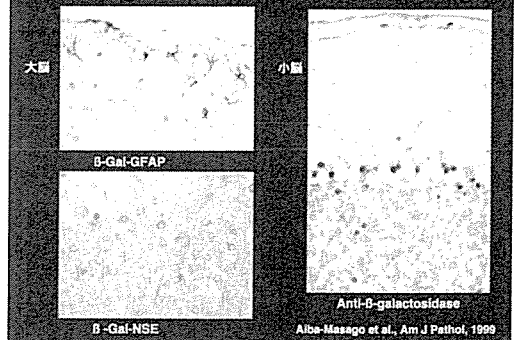


図 32

サイトメガロウイルス感染症における神経病原性の発生機序

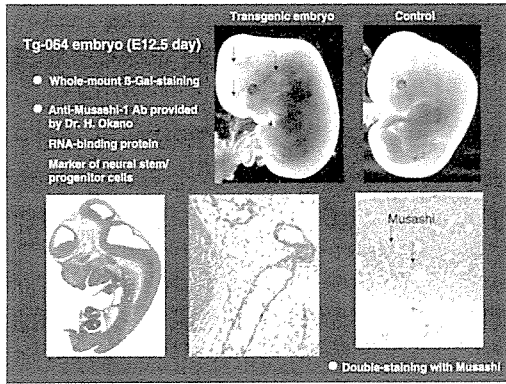


図 33

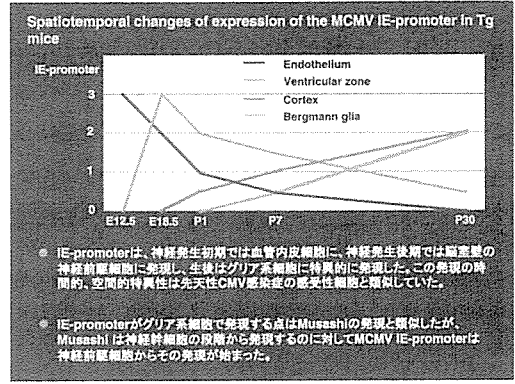


図 37

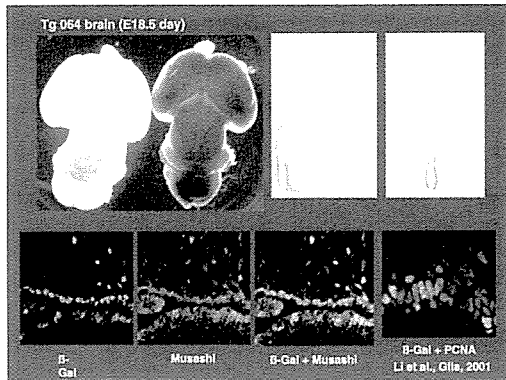


図 34

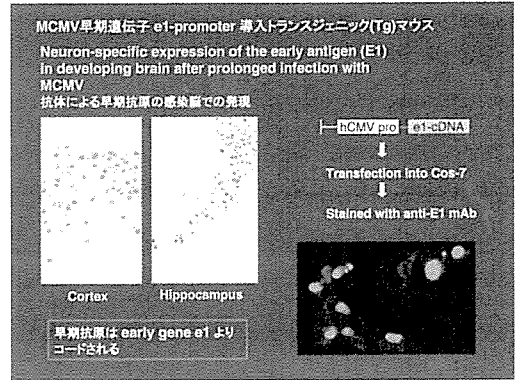


図 38

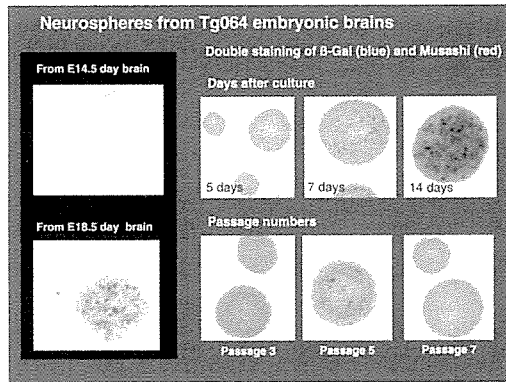


図 35

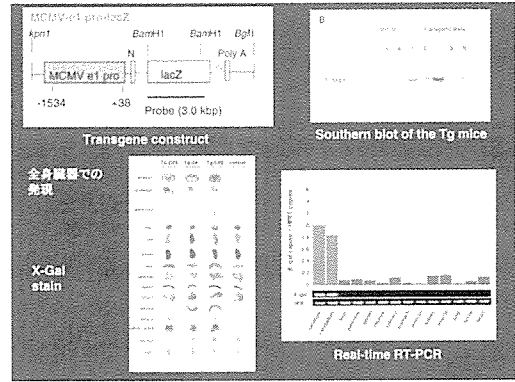


図 39

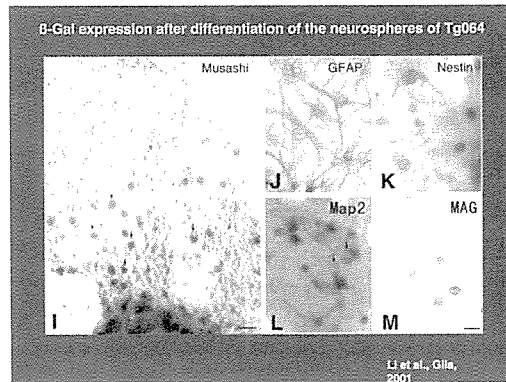


図 36

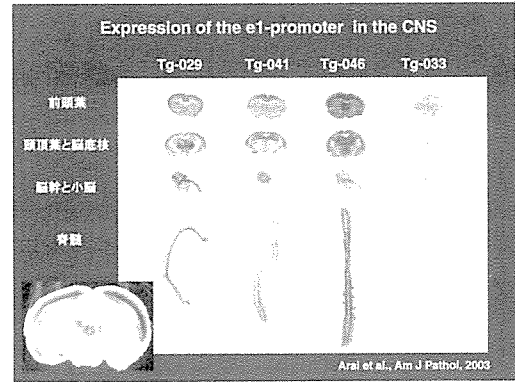


図 40

現し、約75%はMusashiを発現した。しかし神経細胞のマーカーであるMAP-2やオリゴデンドロサイトのマーカーであるmyelin-associated glycoprotein (MAG)を発現する細胞では発現しなかった(図36)³⁶。このことから、 β -galを発現する細胞はグリア系の神経前駆細胞であると考えた。このTgマウスのneurospheresを発育期マウス脳へ移植したところ*in vitro*における分化と同様なie-promoterの活性化を観察した³⁸。ie-promoterの脳の発育段階での発現の変化を、 β -gal陽性細胞を数えて半定量的に比較すると、神経発生の初期では血管内皮で発現し、神経発生の後期から脳室壁のVZでその発現が目立ち、生後においては神経細胞では発現せず、グリア細胞でその発現が強まるのが分かった(図37)³⁶。このel-promoterの発現の時間的・空間的变化は、胎生期マウスにおけるMCMV感染および先天性CMV感染症の脳における感染感受性の変化と類似していた。グリア系細胞の如何なる要因がie-promoterを活性化するか明らかにすることは今後の課題である。

2) MCMV 早期遺伝子プロモーターを発現する Tg マウス

私達は既にMCMV早期核抗原に対するモノクローナル抗体(D5)を作成した⁹。この抗体を用いて免疫染色を行った結果、MCMVが感染した発育期脳において、この早期核抗原は大脳皮質および海馬の神経細胞で発現しやすいことが分かった(図38左)^{21,34}。この抗体は、既に同定されている早期遺伝子e1のcDNAをCos-7細胞にトランスフェクションした細胞を認識することから、早期遺伝子e1よりコードされていることが明らかになった(図38右)。この早期遺伝子e1-promoterが個体レベルで如何に発現するかを知るために、Tgマウスを作成して解析した³⁹。e1-promoterにlacZを繋いだ組換え体を作りTgマウスを作成した。組換え体がintegrationした10系統のfoundersの中で、3系統のTgマウスがe1-promoterを発現していた(図39)。全身臓器をX-Gal染色したところ、驚いたことに中枢神経系でのみ発現することが分かった³⁹。各臓器からmRNAを抽出して、real-time RT-PCRで定量的に比較したところ、中枢神経系の発現量が圧倒的に多いことが明らかになった(図39右下)。X-Gal染色で調べたところ中枢神経系では大脳皮質、脳幹部、小脳、脊髄で発現していた³⁹。Tg-033はMCMVを感染しないと発現せず、感染すると発現が誘導される系統であることが分かった(図40)。大脳皮質では層状に発現し、脳底核でも発現しており、神経細胞の分布と一致していた(図40挿入)。抗 β -gal抗体を用いた免疫染色において、大脳皮質において神経細胞の分布と一致して層状に陽性細胞が認められた。海馬では錐体細胞の一部で発現し、小脳ではプルキンエ細胞の一部で発現した(図41)。Tgマウスの系統によって発現の分布に多少の違いは認められたが、共通している点は神経細胞の一部でのみ発現することである。このe1プロモーターの発現をTgマウスの発育段階でみると(図42)、胎生後期脳の神経細胞ではじめて発現を認め、生後大脳皮質および海馬において神経細胞の成熟とともに陽性細胞の発現が増強し、その分布が

拡大した³⁹。

図43に示すように、アストロサイトのようにCMVが許容感染あるいは溶解感染する細胞では、最初に前初期遺伝子が発現し、その遺伝子産物(IE3)が早期遺伝子e1-promoterを活性化することが知られている。このTgマウスの結果から、神経細胞においては前初期遺伝子産物が発現しなくても、それに類似した何らかの因子が存在し、それによってe1-promoterは神経細胞特異的に発現すると考えられる(図43)。CMVがなぜ中枢神経系に病変を起しやすいかまだ分かっていない。このe1-promoterの神経特異的発現は、CMVが神経細胞に感染して、その後持続感染に移行しやすいひとつの遺伝子的根拠であると考えられる。神経細胞の如何なる因子がe1-promoterを活性化するか明らかにすることは今後の課題である。

6. 感染神経細胞の持続感染への移行の可能性

1) 感染神経細胞の innate immunity の回避

ウイルスと宿主の共存は、ウイルスの増殖と宿主の免疫反応との間に進化的に緊張関係を保ってきた。宿主はウイルス感染細胞を攻撃して排除しようとし、ウイルスは宿主の免疫監視機構を回避して生き延びようと進化してきた。宿主のCMVに対する感染防御には、Innate immunityとAdaptive immunityがある(図44)⁴⁰。Innate immunityはウイルス感染の初期の段階の防御として働き、natural killer (NK)細胞とマクロファージとが主役である⁴¹。NK細胞はperforinを産生してウイルス感染細胞を攻撃するだけでなく、IFN- γ を産生し、マクロファージに作用してnitric oxide (NO)を産生するnitric oxide synthase2 (NOS2)の発現を促進する。NOはCMVを含めて種々のウイルス複製を抑制することが知られている⁴²。特に周産期から新生児期にかけて、adaptive immunityがまだ充分発達していないので、innate immunityが感染防御のために重要である。脳は感染防御の観点から特殊な場所と考えられ、免疫学的聖域と考えられている(図44)。すなわち血液・脳関門によって免疫細胞から隔離された特殊な領域と見なされている⁴³。CMV感染におけるinnate immunityについて肝臓、脾臓、肺などについて報告があるが⁴⁴、発育期脳については明らかではなかった。

発育期マウスへMCMVを感染させて、脳におけるinnate immunityについて解析した⁴⁵。出生直後のC57BL/6マウスの脳内へLD50の半分のウイルスを注入し、感染後、3日、7日、11日に脳を取り出しウイルス感染価を調べた。感染後7日がピークで、その後ウイルス量は減少した(図45)。NK細胞のinhibitorであるanti-asialo GM1抗体を前もって腹腔内投与して、感染6日後の脳におけるウイルス量をplaque assayでみると、抗体を投与した群においてウイルス量が増強した。同様にNOS2のinhibitorであるL-NILの投与においても感染が増強した(図45左下)。そして脳にIL-12とINF- γ が誘導された(図45右)。このことは、発育期マウスへのCMV感染にお

いて、脳においても innate immunity による感染防御が働いていることを示している。感染後、経時的に脳を取り出し、ウイルス早期抗原 E1 の発現を免疫染色で、ウイルス DNA を *in situ* hybridization でみた (図 46)。早期抗原 E1 の発現は、感染が遷延化すると脳室壁から海馬および大脳皮質の神経細胞へその局在が移るが、ここではウイルス DNA は増加しないことが分かった。これを模式化して示すと (図 47)、感染の初期ではウイルス抗原もウイルス DNA も脳室壁に局在し、感染がピークになるとウイルス DNA および前初期抗原 IE1 は脳室壁でその発現が強く、早期抗原 E1 は大脳皮質および海馬の神経細胞で発現するようになり、感染が遷延化すると、ウイルス DNA および前初期抗原 IE1 はほとんど発現しなくなるのに対して、早期抗原 E1 のみ神経細胞で持続的に発現する傾向を示した⁴⁵。このことは MCMV が神経細胞で持続感染しやすく、しかし、ここではウイルス DNA の複製は起こりにくいことを示している。感染脳の脳室壁と海馬の神経細胞の部位について、活性化マクロファージのマーカーである F4/80 と NOS2 の発現を比較した (図 48)。ウイルス抗原を青く、細胞マーカーを赤く 2 重染色すると、脳室壁では F4/80 や NOS2 が発現するが、海馬では神経細胞がウイルス抗原を発現しているにもかかわらず、これらのマーカーはほとんど発現しなかった。脳室壁 (LV) と海馬 (HP) では、両方の部位で感染細胞が存在しているにも関わらず、innate immunity の反応が異なっていた (図 49)。asialo-GM1, NOS2, F4/80 は、ともに脳室壁の感染部位では発現したが、海馬の感染神経細胞の部位ではほとんど発現しないことが分かった。感染神経細胞では innate immunity もウイルスの増殖も起こり難いことが明らかになった⁴⁵。以上を要約すると (図 50)、CMV の感染によって、脳室壁の感染グリア系細胞の何らかのシグナルが NK 細胞とマクロファージを活性化し、NK 細胞の IFN- γ がマクロファージの NOS2 の発現を増強し、活性化マクロファージの IL-12 が NK 細胞をさらに活性化すると考える。感染細胞は活性化した NK 細胞の攻撃を受けて溶解する。これに対して感染が遷延化した神経細胞は、これらの innate immunity を回避する何らかの機構によって、持続感染へ移行すると考えられる。

2) 感染神経細胞の抗アポトーシス効果

一般的にウイルス感染とアポトーシスとの関係について要約すると (図 51)、ウイルスが宿主細胞に感染して増殖し、ウイルスを放出して感染細胞は崩壊壊死に陥り、感染が拡大する。これに対して宿主細胞はアポトーシス遺伝子を発現して、自らはアポトーシスに陥ってウイルスの増殖を阻止しようとする。さらにウイルスは抗アポトーシス遺伝子を発現して、感染細胞で生き続けようとして、持続感染に移行すると考えられている⁴⁶。私達は発育期マウス脳へ MCMV を感染し、ウイルス感染とアポトーシスの誘導との関係を、免疫染色と TUNEL 法を用いて解析した (図 52)⁴⁷。MCMV の感染によって発育期脳にアポトーシスが誘導された。青く染色されているのがアポトーシスに陥った細胞で、ウイルス抗原陽性細胞は赤く染色されている。二

重染色の結果、ウイルス感染細胞ではアポトーシスが起こりにくく、アポトーシスを起こしている細胞は非感染細胞である可能性が示唆された。初代培養神経細胞はグルタミン酸の過剰投与によってアポトーシスを誘導することが出来る⁴⁸。初代培養神経細胞に MCMV を感染してから、グルタミン酸を投与すると、アポトーシスの誘導が抑制された (図 53)。従って、*in vivo* および *in vitro* の実験によって、MCMV の感染によって感染神経細胞でアポトーシスが抑制されることが明らかになった⁴⁷。

3) CMV 感染による神経細胞の持続感染への移行

多くの神経向性ウイルスは細胞傷害効果を示さずに神経細胞で持続感染することが知られている⁴⁹。持続感染への移行は、ウイルス自身の変異したり、細胞内環境が変化することによってウイルスが複製が抑制された状態が生ずると考えられている。ここではウイルスは非常にゆっくり増殖し、感染細胞は溶解することなく生きつづけ、その機能が変化すると考えられる⁵⁰。今まで述べてきた幾つかの観点から、CMV は神経細胞で持続感染に移行しやすいと考える (図 54)。Tg マウスの結果より、MCMV e1-promoter は神経細胞特異的に活性化しやすく、感染によって抗アポトーシス遺伝子が発現すると考えられる。さらに感染神経細胞ではウイルス DNA の複製が起り難く、また NK 細胞による innate immunity を回避する傾向があることを示した。これらの結果より、CMV の感染によって神経細胞は持続感染へ移行しやすく、さらに神経機能障害の原因になる可能性があると考えられる (図 54)。

7. 大脳スライス培養を用いた脳における潜伏感染の実証

先天性 CMV 感染症や AIDS などの免疫不全の脳において、脳は CMV 感染の主要な標的であるにも関わらず、CMV が脳で潜伏感染するかどうか明らかではなかった。CMV は骨髄、脾臓、肺などで潜伏感染することが報告され、発育段階が若い個体への感染ほど潜伏感染しやすく、単球やマクロファージで潜伏感染すると考えられている⁵¹。私達は MCMV がマウス脳で潜伏感染することを大脳スライス培養法を用いて実証した⁵²。出生直後の周産期マウスおよび生後 6 週の young adult マウスの脳へ変異ウイルス RM461 を感染させ、潜伏感染状態と考えられる 180 日間飼育した。脳を取り出し、大脳スライス培養することによって再活性化するかどうか調べた (図 55)。周産期マウスに感染後、1 週、2 週目のマウスから脳を取り出し、X-Gal 染色すると、主として脳室壁に感染細胞を認めたが、感染後 3 週を過ぎると認めなくなった (図 56)。これらの脳のウイルス感染価を plaque assay で測定すると、感染 1 カ月後までに感染性のウイルスは脳から消失することが分かった (図 56 左下)。感染後 180 日間の体重増加曲線では、周産期感染では平均体重が低く、バラツキが強いものに対して、young adult マウスでは感染させても体重は非感染群と差がなかった (図 56 右)。周産期マウ

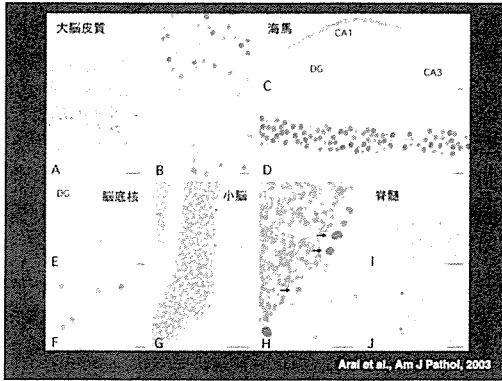


図 41

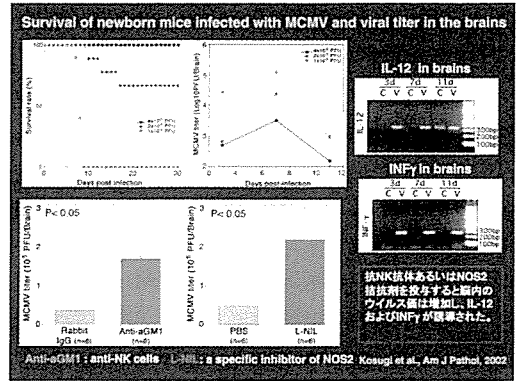


図 45

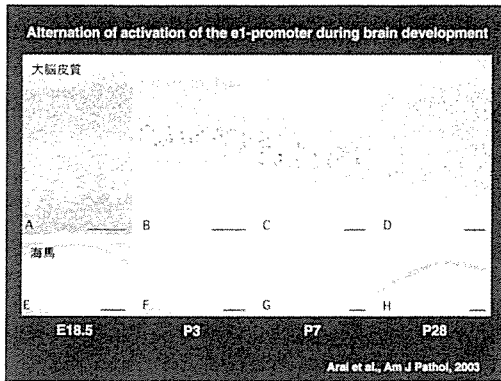


図 42

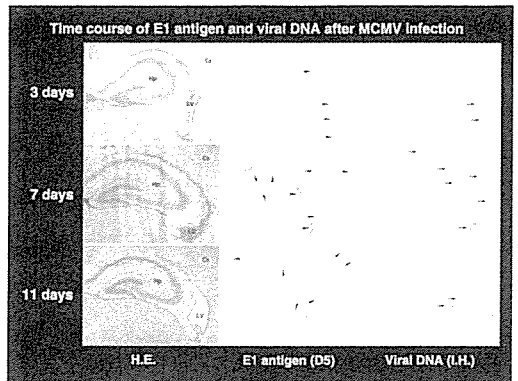


図 46

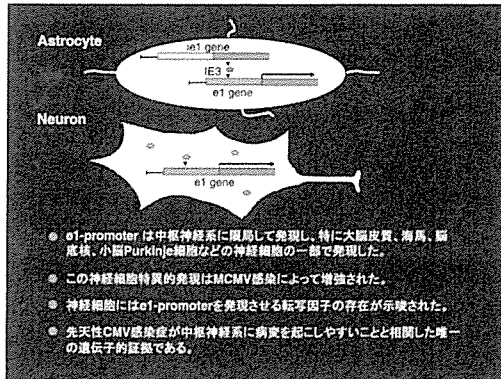


図 43

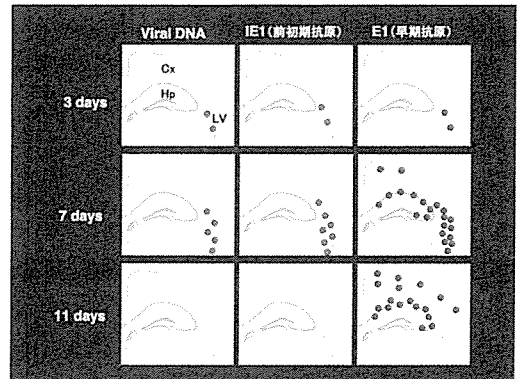


図 47

Host defense reaction against CMV infection

Innate immunity

NK cells

- INF- γ : Inhibition of viral replication
- Activation of macrophages (Induction of NOS2 in macrophages)
- Perforin: Lysis of virus-infected cells

Macrophages

- IL-12: Enhancement of IL-12 secretion in NK cells
- Nitric oxide: Inhibition of viral replication via nitrosylation

Adaptive immunity

- CMV-specific cytotoxic T cells and Antibodies

Defense system in brain

- Brain is an immunologically "privileged" site into which immune cells do not readily enter.
- Blood-brain barrier
- There is no lymph nodes or lymphatics except Virchow-Robin space

図 44

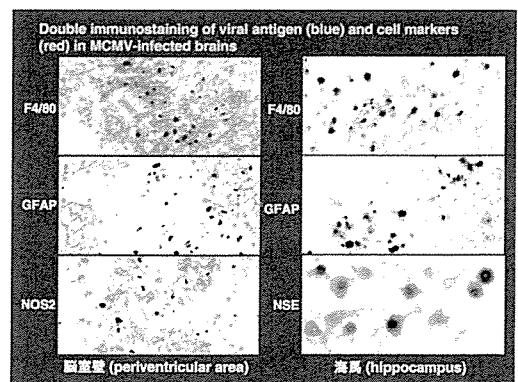


図 48

サイトメガロウイルス感染症における神経病原性の発生機序

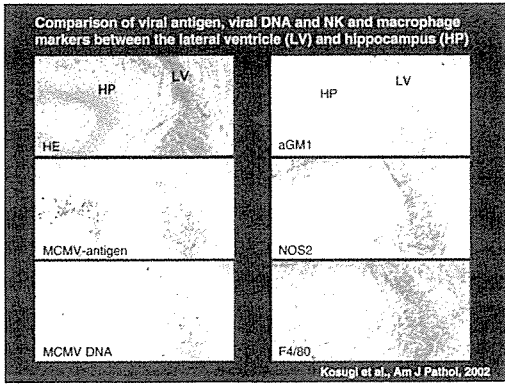


図 49

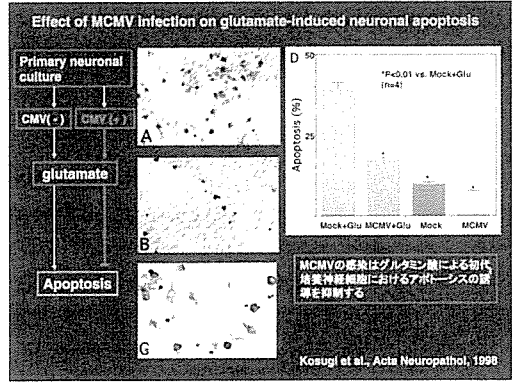


図 53

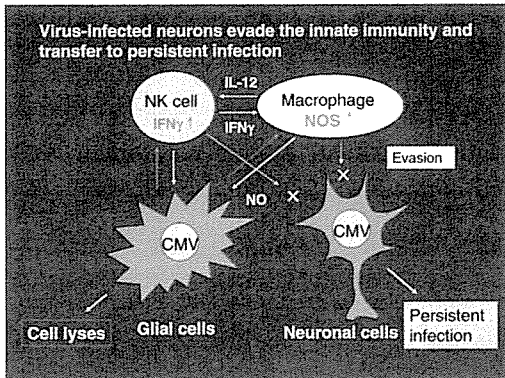


図 50

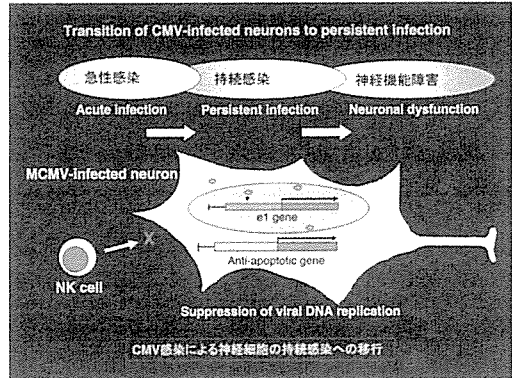


図 54

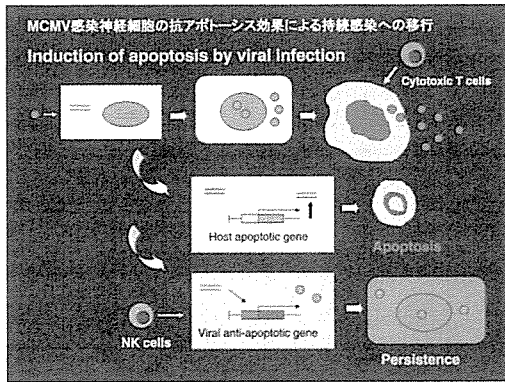


図 51

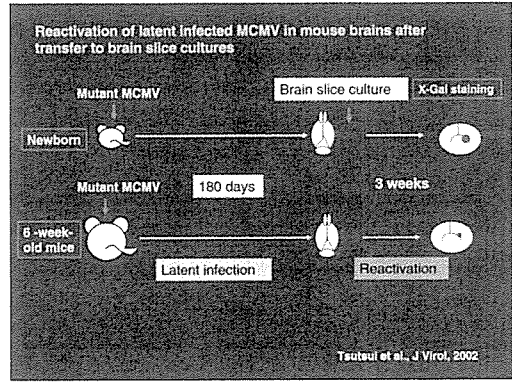


図 55

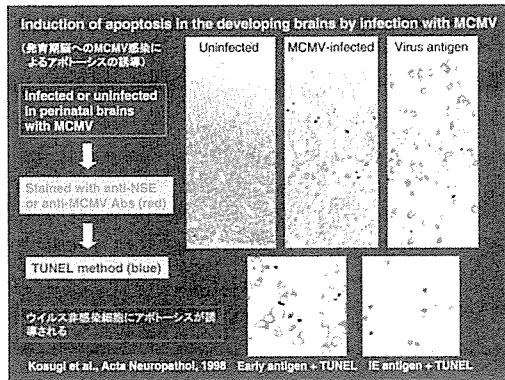


図 52

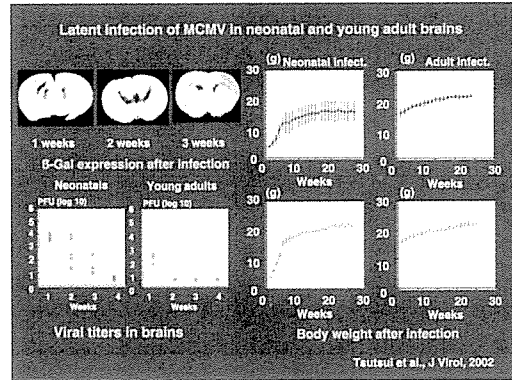


図 56

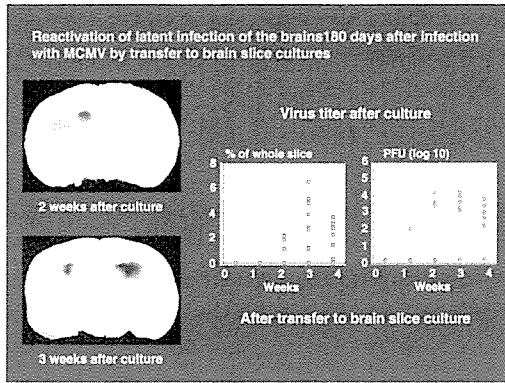


図 57

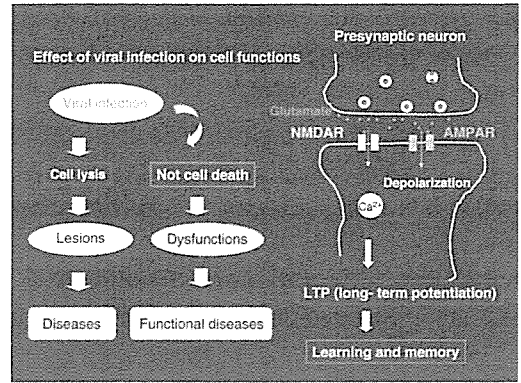


図 61

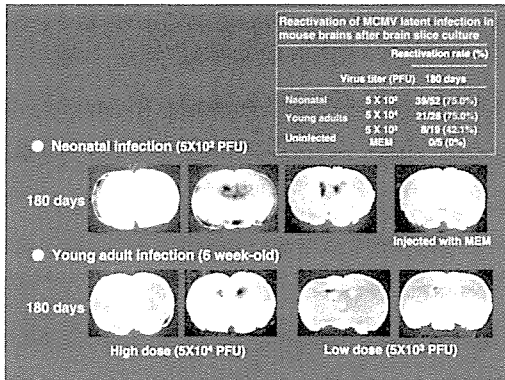


図 58

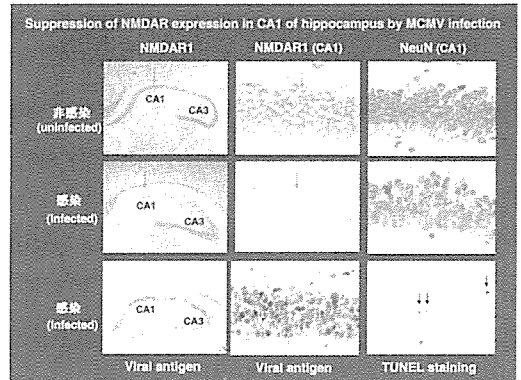


図 62

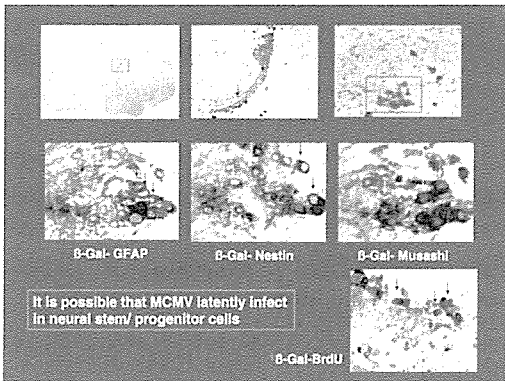


図 59

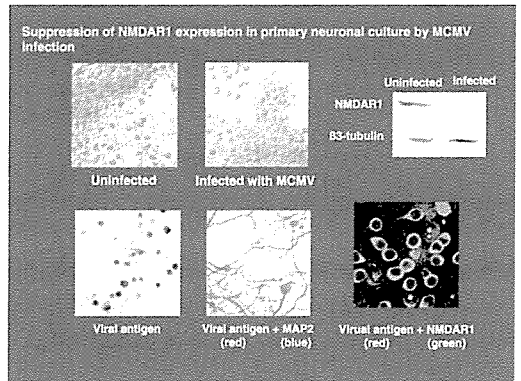


図 63

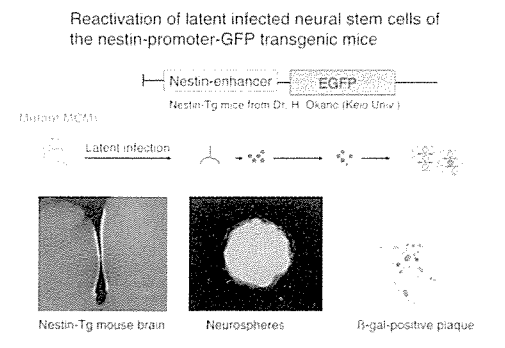


図 60

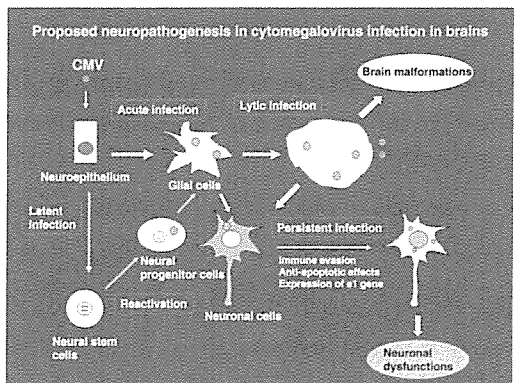


図 64

ス脳に変異ウイルスを感染し、180日飼育し、脳を取り出し大脳スライスを2週間、3週間培養し、X-Gal染色すると、ウイルス感染細胞は主として脳室壁で検出された(図57)。再活性化した大脳スライスから感染性のウイルスが放出していることが分かった(図57右)。周産期感染マウスでは、180日飼育後、大脳スライス培養することによって強く再活性化したが、young adultに感染したマウスでも弱く再活性化してくることが分かった(図58下)⁵²。周産期感染マウス群でもyoung adult感染マウス群でも、感染した75%のマウスにおいて再活性化が認められた(図58表)。このことは先天感染だけでなく、成人におけるAIDSなどの免疫不全状態においても、CMVは脳で潜伏感染する可能性を示唆している。大脳スライスにおいて再活性化する細胞は、脳室壁のSVZに局在する傾向を示した。X-Gal染色したウイルス感染細胞を、GFAP, nestin, Musashiと二重染色すると、再活性化してくる細胞はこれらの神経マーカーを発現し、BrdUを取り込むことが分かった(図59)⁵²。従って、潜伏感染している細胞は神経幹・前駆細胞である可能性が高いと考えた。このことを確かめるために、nestin-enhancerが導入されたTgマウスを慶応大学の岡野栄之先生から供与して頂いた。このTgマウスはnestin-enhancerに蛍光蛋白を発現するGFP遺伝子を繋いだ組換え体が導入されており、脳室壁で蛍光蛋白を発現する。このTgマウス脳へLacZを発現するmutant MCMVを感染し、潜伏感染状態とした。この脳からgreen fluorescenceで光るneurospheresを集めて、感受性細胞である線維芽細胞と共存培養すると、 β -galactosidaseを発現するプラークが出現した(図60)。このことはCMVが神経幹・前駆細胞で潜伏感染する可能性を強く示唆している(投稿準備中)。

8. 感染神経細胞の神経機能への影響

一般的に、ウイルス感染によって感染細胞が崩壊して病変を形成し、そのことが疾患の原因になるという観点で研究されてきた。一方では、ウイルス感染によって感染細胞が死ぬことなく、その機能が変化することが疾患につながるという考え方が、viral pathogenesisの新しい観点として注目されている⁵³。ある種のウイルスは神経細胞に持続感染してシナプス可塑性の変化を来し、神経機能を変えると報告されている。シナプスにおいてNMDAレセプターはグルタミン酸レセプターとして働き、long term potentiationを起し、記憶や学習に関与すると考えられている(図61)⁵⁴。発育期マウス脳へのMCMVの感染によって、NMDAレセプターの発現が如何に影響を受けるか解析した(小杉他：投稿中)。非感染状態では海馬のCA1およびCA3領域の錐体細胞はともにNMDAレセプターを発現し、神経細胞のマーカーであるNeuNも発現する。MCMVを感染させた脳では、CA1領域のNMDAレセプターの発現は減少するが神経細胞は保存されている(図62)。CA1領域にはウイルス抗原が発現しているが、アポトーシスはほとんど生じていな

い。MCMVの感染によって、CA1の神経細胞は生きているにも関わらずNMDAレセプターの発現は抑制されることが分かった。一方、初代培養神経細胞へMCMVを感染させてNMDAレセプターの発現を調べた(図63)。同様にウイルスを感染させることによってNMDAレセプターの発現は免疫染色においてもWestern blotにおいても抑制されることが分かった。MCMVが感染してもMAP-2は発現しており神経細胞は生きていた。ウイルス抗原とNMDAレセプターの二重染色をすると、ウイルス感染細胞に限局してNMDAレセプターの発現が抑制された(図63)。以上、*in vivo*および*in vitro*の実験の結果より、NMDAレセプターのような神経機能に関する遺伝子発現が抑制されることは、MCMVの神経細胞への感染によって神経機能障害が生ずる可能性が高く、さらには精神発達遅滞などの精神機能障害に関連すると考えられる。CMVの神経細胞への感染が、感染細胞を溶解することなくその細胞の運命を変えることが疾患の原因に繋がる可能性があると考えられる。

9. まとめ：CMVによる神経病原性の発生機序

以上CMVによる神経病原性の発生機序について要約すると(図64)、発育期脳において、脳室壁の神経幹細胞を含む神経上皮細胞がCMVに感受性を示し、細胞の分化に伴ってグリア系細胞に急性感染し、溶解感染して脳形成障害が生ずると考える。神経細胞への感染においては、innate immunityの回避、抗アポトーシス効果、e1遺伝子の神経特異性などにより持続感染に移行して、神経機能障害が生ずると考える。一方、発育期脳の脳室壁の神経上皮細胞に感染したCMVは、神経幹細胞で潜伏感染に移行して長期間留まると考える。免疫不全などの何らかの誘因で再活性化され、神経前駆細胞、グリア系細胞で溶解感染し、脳室脳炎などの病変を引き起こし、さらに、神経細胞に持続感染し、神経機能障害が生ずると考える。

おわりに

胎生初期はES細胞を含めてCMVに感染感受性を示さないが、発育期脳はCMVに感受性が高いことが分かった。その担い手は脳室壁の神経幹・前駆細胞である。急性感染ではグリア系細胞に溶解感染しやすく、このことが脳形成障害の原因になると考えられる。感染が遷延化すると神経細胞に持続的に感染しやすくなり、神経細胞へのCMVの感染はNMDAレセプターの発現の抑制などの神経機能の変調をきたす可能性を示唆した。CMVによる神経細胞障害によって、如何に神経機能障害を伴う疾患が生ずるか明らかにし、予防法に示唆を与えていくことが今後の課題である。

脳に潜むウイルスが人間の行動と思考に如何に影響を与えるかを明らかにしていくことが今後の魅力ある課題である。



図 65



図 66

謝 辞

本研究は、浜松医科大学病理学第二講座にこの10年間に在籍した研究者および技術員によってなされました(図65)。研究者として小杉伊三夫、馬場聡、河崎秀陽、新井義文、土田孝、松影昭一、三浦克敏、新村祐一郎、李仁勇、石渡瑞穂、真砂園真、韓桂萍が参加し、技術員として金田正昭、宮崎一夫、川島充詠、鈴木弘美、戸塚真智子の協力を得ました。本研究の基礎は、私が1983年から11年間在籍した愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所形態学部において、当時の研究室の皆さんの協力によってなされました。

私が大学院生として名古屋大学医学部病理学教室へ入局した時の恩師宮川正澄先生からは、困難な時に研究に夢をもって頑張ること、独自の研究領域を開拓することの重要性を学びました。飯島宗一先生(名古屋大学)からは広い視野に立って研究をすることの重要性を教えられ、1978年に一緒に先天性CMV感染症の剖検例のCPCを行ったことも、この様な研究をするひとつの切掛けになりました。星野宗光先生(名古屋大学)からウイルスを用いた病理学的研究へ導いて頂き、また新しい方法に臆せずに挑戦することの重要性を教えてくださいました。愛知県コロニーにおいて、水谷昭先生から発育期脳に眼を向けた研究を始める切掛けを与えて頂きました(図66)。元金沢医科大学微生物学教授古川宣先生、宮崎医科大学微生物学名誉

教授南嶋洋一先生からはウイルス学的指導と研究に関するアドバイスを頂きました。1976~1977年に留学した米国テンプル大学病理学教室のDr. Renato Basergaからは細胞生物学の基礎を学びました。あらためて心より厚くお礼申し上げます。

文 献

1. Weller TH. The cytomegalovirus: Ubiquitous agents with protean clinical manifestations. *N Engl J Med* 1971; **285**: 203-214.
2. Britt WJ, Alford CA. Cytomegalovirus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al. eds. *Fields Virology*, 3rd edn. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996; 2493-2523.
3. Demmler GJ. Infectious Diseases Society of America and Centers for Disease Control. Summary of a workshop on surveillance for congenital cytomegalovirus disease. *Rev Infect Dis* 1991; **13**: 315-329.
4. Perlman JM, Argyle C. Lethal cytomegalovirus infection in premature infants: Clinical, radiological, and neuropathological findings. *Ann Neurol* 1992; **13**: 64-68.
5. Conboy TJ, Pass RF, Stagno S, Britt WT, Alford CA, McFarland CE, Boll TJ. Intellectual development in school-aged children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics* 1986; **77**: 801-806.
6. Mocarski ES Jr. Cytomegalovirus and their replication. In: Field BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*, 3rd edn. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996; 2447-2449.
7. Staczek J. Animal cytomegalovirus. *Microbiol Rev* 1990; **54**: 247-265.
8. Rawlinson WD, Farrell HE, Barell BG. Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J Virol* 1996; **70**: 8833-8849.
9. Tsutsui Y, Naruse I. Murine cytomegalovirus infection of cultured embryos. *Am J Pathol* 1987; **127**: 262-270.
10. Naruse I, Tsutsui Y. Brain abnormalities induced by murine cytomegalovirus injected into the ventricles of mouse embryos exo utero. *Teratology* 1989; **40**: 181-189.
11. Tsutsui Y, Kashiwai A, Kawamura N, Nagahama M, Mizutani A, Naruse I. Susceptibility of brain cells to murine cytomegalovirus infection in the developing mouse brain. *Acta Neuropathol* 1989; **79**: 262-270.
12. Tsutsui Y. Developmental disorders of the mouse brain induced by murine cytomegalovirus: Animal models for congenital cytomegalovirus infection. *Pathol Int* 1995; **45**: 91-102.
13. Ebihara K, Minamishima Y. Protective effect of biological response modifiers on murine cytomegalovirus infection. *J Virol* 1984; **51**: 117-122.
14. Kashiwai A, Kawamura N, Kadota C, Tsutsui Y. Susceptibility of mouse embryo to murine cytomegalovirus infection in early and mid-gestation stages. *Arch Virol* 1992; **127**: 37-48.
15. Gonczol E, Andrews PW, Plotkin SA. Cytomegalovirus

- replicates in differentiated but not in undifferentiated human embryonal carcinoma cells. *Science* 1984; **224**: 159-161.
16. Kadota C, Nagahama M, Tsutsui Y. Relationship between HOX2 homeobox gene expression and the human cytomegalovirus immediate early genes. *J Gen Virol* 1992; **73**: 975-981.
 17. Murphy JC, Fischle W, Sinclair JH. Control of cytomegalovirus lytic gene expression by histone acetylation. *EMBO J* 2002; **21**: 1112-1120.
 18. Jaenisch R. Mammalian neural crest cells participate in normal embryonic development on microinjection into post-implantation mouse embryos. *Nature* 1985; **318**: 181-183.
 19. Tsutsui Y, Kashiwai A, Kawamura N, Kadota C. Microphthalmia and cerebral atrophy induced in mouse embryos by infection with murine cytomegalovirus in midgestation. *Am J Pathol* 1993; **143**: 804-813.
 20. Li RY, Tsutsui Y. Growth retardation and microcephaly induced in mice by placental infection with murine cytomegalovirus. *Teratology* 2000; **62**: 79-85.
 21. Tsutsui Y, Kashiwai A, Kawamura N, Aiba-Masago S, Kosugi I. Prolonged infection of mouse brain neurons with murine cytomegalovirus after pre- and perinatal infection. *Arch Virol* 1995; **140**: 1725-1736.
 22. Stoppini L, Buchs P-A, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Meth* 1991; **37**: 173-182.
 23. Shinmura Y, Kosugi I, Kaneta M, Tsutsui Y. Migration of virus-infected neuronal cells in cerebral slice cultures of developing mouse brains after *in vitro* infection with murine cytomegalovirus. *Acta Neuropathol* 1999; **98**: 590-596.
 24. Kawasaki H, Kosugi I, Arai Y, Tsutsui Y. The amount of immature glial cells organotypic brain slices determines the susceptibility to murine cytomegalovirus infection. *Lab Invest* 2002; **82**: 1347-1358.
 25. Stoddart CA, Cardin RD, Boname JM, Manning WC, Abenes GB, Mocarski ES. Peripheral blood mononuclear phagocytes mediate dissemination of murine cytomegalovirus. *J Virol* 1994; **68**: 6243-6253.
 26. Scalzo AA, Fitzgerald NA, Wallace CR, Gibbons AE, Smart YC, Burton RC, Shellam GR. The effect of the Cmv-1 resistance gene, which is linked to the natural killer cell gene complex, is mediated by natural killer cells. *J Immunol* 1992; **149**: 581-589.
 27. McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science* 1997; **276**: 66-71.
 28. Kaneko Y, Sakakibara S, Imai T, Suzuki A, Nakamura Y, Sawamoto K, Ogawa Y, Toyama Y, Miyata T, Okano H, Musashi H. An evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells. *Dev Neurosci* 2000; **22**: 139-153.
 29. Kawasaki H, Tsutsui Y. Brain slice culture for analysis of developmental brain disorders with special reference to congenital cytomegalovirus infection. *Congenit Anom Kyoto* 2003; **43**: 105-113.
 30. Reynolds BA and Weiss S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Develop Biol* 1996; **175**: 1-13.
 31. Kosugi I, Shinmura Y, Kawasaki H, Arai Y, Li R-Y, Baba S, Tsutsui Y. Cytomegalovirus infection of the central nervous system stem cells from mouse embryo: A model for developmental disorders induced by cytomegalovirus. *Lab Invest* 2000; **80**: 1373-1383.
 32. Rakic P. Specification of cerebral cortical area. *Science*. 1988; **241**: 170-176.
 33. Shinmura Y, Kosugi I, Aiba-Masago S, Baba S, Li RY, Tsutsui Y. Disordered migration and loss of viral-infected neuronal cells in developing mouse brains infected with murine cytomegalovirus. *Acta Neuropathol* 1997; **93**: 551-557.
 34. Shinmura Y, Aiba-Masago S, Kosugi I, Li RY, Baba S, Tsutsui Y. Differential expression of the immediate-early and early antigens in neuronal and glia cells of developing mouse brains infected with murine cytomegalovirus. *Am J Pathol* 1997; **151**: 1331-1340.
 35. Aiba-Masago S, Baba S, Li RY, Shinmura Y, Kosugi I, Arai Y, Nishimura M, Tsutsui Y. Murine cytomegalovirus immediate-early promoter directs astrocyte-specific expression in transgenic mice. *Am J Pathol* 1999; **154**: 735-743.
 36. Li RY, Baba S, Kosugi I, Arai Y, Kawasaki H, Shinmura Y, Sakakibara S, Okano H, Tsutsui Y. Activation of murine cytomegalovirus immediate-early promoter in cerebral ventricular zone and glial progenitor cells in transgenic mice. *Glia* 2001; **35**: 41-52.
 37. Sakakibara S, Okano H. Expression of neural RNA-binding proteins in the postnatal CNS: implication of their roles in neural and glial cells development. *J Neurosci* 1997; **17**: 8300-8312.
 38. Li R-Y, Kosugi I, Tsutsui Y. Activation of murine cytomegalovirus immediate-early promoter in mouse brain after transplantation of the neural stem cells. *Acta Neuropathol* 2004; **107**: 406-412.
 39. Arai Y, Ishiwata M, Baba S, Kawasaki H, Kosugi I, Li R-Y, Tsuchida T, Miura K, Tsutsui Y. Neuron-specific activation of murine cytomegalovirus early gene e1 promoter in transgenic mice. *Am J Pathol* 2003; **163**: 643-652.
 40. Koszinowski UH, Jonjic S, Lucin P. Cytomegalovirus persistence by evasion from immune control. *Semi Virol* 1994; **5**: 297-305.
 41. Biron CA, Brossay L. NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. *Curr Opin Immunol* 2001; **13**: 458-464.
 42. Reiss CS, Komatsu T. Does nitric oxide play a critical role in viral infections? *J Virol* 1998; **72**: 4547-4551.
 43. Hickey WF. Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia* 2001; **36**: 118-124.

44. Noda S, Tanaka K, Sawamura S, Sasaki M, Matsumoto T, Mikami K, Aiba Y, Hasegawa H, Kawabe N, Koga Y. Role of nitric oxide synthase type 2 in acute infection with murine cytomegalovirus. *J Immunol* 2001; **166**: 3533-3541.
45. Kosugi I, Kawasaki H, Arai Y, Tsutsui Y. Innate immune response to cytomegalovirus infection in the developing mouse brain and their evasion by virus-infected neurons. *Am J Pathol* 2002; **161**: 919-928.
46. Shen Y, Shenk TE. Virus and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 1995; **5**: 105-111.
47. Kosugi I, Shinmura Y, Li RY, Aiba-Masago S, Baba S, Miura K, Tsutsui Y. Murine cytomegalovirus induces apoptosis in non-infected cells of the developing mouse brain and blocks apoptosis in primary neuronal culture. *Acta Neuropathol* 1998; **96**: 239-247.
48. Ankacrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zivotovski B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. Glutamate-induced neuronal death: A succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 1995; **15**: 961-973.
49. Sharpe AH, Fields BN. Pathogenesis of viral infections. Basic concepts derived from the reovirus model. *N Engl J Med* 1985; **312**: 486-97.
50. Oldstone MBA. Virus persistence. *Cell* 1989; **56**: 517-520.
51. Soderberg-Naucler C, Nelson JA. Human cytomegalovirus latency and reactivation — a delicate balance between the virus and its host's immune system. *Intervirology* 1999; **42**: 314-321.
52. Tsutsui Y, Kawasaki H, Kosugi I. Reactivation of latent cytomegalovirus infection in mouse brain cells detected after transfer to brain slice culture. *J Virol* 2002; **76**: 7247-7254.
53. Oldstone MBA. Viruses and diseases of the twenty-first century. *Am J Pathol* 1993; **143**: 1241-1249.
54. Choi DW, Koh JY, Peters S. Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonist. *J Neurosci* 1988; **8**: 185-196.

質疑応答

長嶋和郎(座長: 北海道大学): 唯今からこの演題の討論に移りたいと思います。それではどうぞ質問をお願いします。

石原好弘(東京都神経科学総合研究所客員研究員): 非常に多義に渡るサイトメガロウイルスのマウスでの実験の発表をありがとうございました。1972年以降の統計に出ていました先天性CMV感染症の剖検例の1例だと思いましたが、私はCMVに感染して3カ月で死亡した症例を経験しまして、脳についてはnecrotizing encephalo-ventriculo-myelitisという診断をつけました。先生は実験の中でMCMV ie-promoterの発現の脳における時間的空間的分布が、特に妊娠の後期で病理的histopathogenesisが一致するという事をご教授下さいまして、剖検をする者には非常に参考になりました。ひとつ質問をさせ

て頂きますが、先生の *in vivo* の実験で、CMVの感染で死を免れて young adult まで生き延びたマウスで、行動異常や脳形態の異常があるような経験が有りましたら、新生児の脳の病理を見ている者にとりまして参考になりますのでお教え願いたいと思います。

筒井: マウスはヒトと違って出生直後はまだ胎生後期に当たりますが、出生直後のマウスにMCMVを感染させ、何カ月も飼育して観察したことがあります。MCMVの感染価によって違いますが、足を引きずるような神経症状とか、小頭症とか、脳室壁の石灰沈着などが感染後1カ月くらいから出現してくるのがありヒトの新生児期の脳障害と類似していることが分かりました。

丹下 剛(国際医療福祉大学): 先生がCMV感染の神経系感染に関する膨大なお仕事を発表して頂きまして、私自身はこの分野は素人でございますが、先生がご指摘頂いた脳室のneural stem cellsが潜伏感染のtarget cellsであろうというお考えだと思いますが、先天性の免疫不全の場合にもそこに潜伏するというようなご発言であったかと思えます。その場合、脳が発育不全になって免疫不全になってくるという論点があると思えますが、一方では免疫不全は骨髄の造血幹細胞を介して起ると考えられていますが、そのようなご指摘はなかったと思えます。その点について質問させて頂きます。

筒井: 私達の研究は免疫不全状態を直接解析していませんが、文献的にはヒトにおけるAIDS脳症のような場合においても、神経幹細胞のある脳室壁がCMVに感受性高く、感染はventriculofugalに大脳皮質に向かって広がると報告されています。もちろんアダルトは脳室壁だけでなく血管内皮の感受性を介した病変の形成も問題になりますが、発育期脳におきましては脳において脳室壁がCMVの主要な標的であると考えます。

丹下: この点に関して骨髄の造血幹細胞もCMVの標的であるというご指摘があったかと思えますが、骨髄にCMVが潜伏するという事ですね。この点と関連して、2000年頃のScienceに論文がでていますが、神経幹細胞が造血幹細胞に変換出来るという論文です。つまり脳室壁にある神経幹細胞が造血細胞培養系をつかいますと造血幹細胞に成りうるという論文であります。神経幹細胞を造血幹細胞の培養環境のアッセイ法へ移して播きますと、骨髄系のコロニーつまりヘモグロビンを作ったり、巨核球のマーカーを出したり、顆粒系のマーカーを出したりする機能があって、しかも神経系への分化の機能も有しているという論文があります。そのようなことについてどのように考えていますか。

筒井: 私もその論文を読んだことがあります。造血幹細胞が神経幹細胞になり、神経幹細胞が造血幹細胞の性格に変換するという論文もあったと思えます。stem cellsは相互に置かれている環境によって変換し得ると考えます。従ってCMVは骨髄の造血幹細胞に潜伏感染し、脳へ行って神経幹細胞に変換し、そこで再活性化してくるという可能性は否定はできないと思

ます。私達の実験は、骨髄へも感染すると考えられる腹腔内感染や胎盤感染も行いましたが、潜伏感染の実験は脳へ直接感染させましたので造血幹細胞での潜伏感染の要因はあまり関与していないのではないかと考えます。

渡辺里仁（創価大学）：latent infectionあるいはpersistent infectionについてお伺いします。確かに再活性化は脳室壁の細胞で起こっていると思います。しかし、遺伝子発現の残り方などから、多分latent infectionは感染して分化した神経細胞でも引き続き起こっているように思います。感染神経細胞でSSPEのように遺伝子が欠損したりmutationを起こしたりしているかどうかは観察されていますでしょうか？

筒井：神経細胞のMCMVな感染における遺伝子の欠損やmutationは調べておりません。神経細胞で早期遺伝子が比較的長期間発現しやすいけれどlatencyには移っていかないだろうと思います。大脳スライス培養での再活性化の部位と細胞マーカーの結果からは神経細胞からは再活性化してこないと考えました。CMVは増殖が静止状態にあるマクロファージでlatency起ることは文献的に明らかですので、神経細胞で起るかどうかはこれから検討する必要があります。

黒岩俊彦（東京医科歯科大学）：海馬の錐体神経細胞層のNMDA receptorの発現が強く落ちていたと思いますが、あのようになると強い記憶力の障害がでるのではないかと思います

が、実験の動物ではどうであったかということ、臨床症状との対応ではいかがでしょうか？

筒井：現在の研究は感染後2週間くらいまでしか調べてありませんので、臨床症状がどうなるかといった解析はまだやってありません。

長嶋（座長）：いまの質問に関連して、CMVにはたくさんの蛋白をコードしていますが、その中のどのような蛋白がNMDA receptorのdown regulationに関与しているか分かりませんか？

筒井：まだわかりません。これからそのような問題に取り組んでいきたいと思っています。

長嶋（座長）：会員を代表しまして筒井先生に一言お礼を申しあげたいと思います。先生は最初にお示しになりましたように、人体病理の症例からサイトメガロウイルス感染に関する疑問に関しまして非常に多数の実験系を組みまして、ひとつひとつをみごとに解明されました。そして今日はその結果を我々にお話し下さいました。このことは我々病理学者にとりまして、また多くのサエンティストに深い感銘を受けました。また多くの若い研究者に対して多数の教訓そして勇気を与えて下さいました。先生がこれからもお元気で研究を続けて下さいますようお願いいたします。

Transgenic Tobacco Cells Producing the Human Monoclonal Antibody to Hepatitis B Virus Surface Antigen

Akira Yano,^{1*} Fumiko Maeda,² and Masataka Takekoshi²

¹Department of Oral Health, National Institute of Public Health, Tokyo, Japan

²Department of Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine, Isehara, Japan

The recombinant human monoclonal antibody (MAb) against hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg) was expressed in tobacco suspension cultures. The parental CL4MAb was produced by the Epstein–Barr virus (EBV) transformed human cell line TAPC301-CL4. The CL4MAb cDNA was introduced into tobacco suspension cells by *Agrobacterium* mediated transformation. The monoclonal antibodies (MAbs), B294 and B303, which were derived from CL4 and subsequently produced in plant cells were selected for study. After purification on Protein A columns, B294 and B303 MAbs had anti-HBs relative affinity constants similar to the parental CL4MAb. B303 MAb interacted with cell surface HBsAg and showed complement-dependent cytotoxicity in a manner that was similar to anti-HBs human immunoglobulins (HBIg) that are used clinically. The results of this study point to the feasibility of producing MAbs to HBsAg in plants as an alternative to HBIg. **J. Med. Virol.** 73:208–215, 2004. © 2004 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: recombinant antibody; transgenic plant; HBV; HBs

INTRODUCTION

Immune serum has been an important therapeutic agent for many infectious diseases since early in the 20th century [Casadevall and Scharff, 1994]. The administration of antibodies to rabies virus and respiratory syncytial virus are typical examples of passive immune therapy [Keller and Stiehm, 2000]. High titer hepatitis B virus (HBV)-neutralizing serum is also administered prophylactically against hepatitis B viral infection. The transmission of HBV occurs on sexual contact, parenteral exposure, such as accidental exposure to HBV in clinical settings, or maternal–neonatal transmission [Centers for Disease Control and Prevention, 2002]. Among the different transmission scenarios, it is the most important to prevent maternal–neonatal

transmission for control of HBV and a vaccination program for newborns is ongoing [Kane and Brookes, 2002]. The use of a combination of anti-HBs human immunoglobulins (HBIg) and subunit HBV vaccine effectively prevented the transmission and subsequent infection of infants [Beasley et al., 1983]. HBIg is also used prophylactically for prevention of hepatitis B recurrence in hepatitis B-seropositive liver transplantation recipients [Muller et al., 1991]. HBIg is prepared from the sera of HBsAg antibody positive donors and the safety is guaranteed by rigorous product standards. The pharmaceuticals derived from human plasma or animal cell cultures are produced by new technologies in developed countries, however, production standards have increased both manufacturing costs and prices to the consumer. The high-sensitive viral detection system is recommended for selection of healthy donors for human blood derived pharmaceuticals [Burnouf and Radosevich, 2000]. Donor and production controls HBIg of that use costly technologies are not practical for developing countries. Genetically modified plants, capable of producing recombinant protein therapeutics, such as human monoclonal antibodies (MAbs), would be good choices for a number of reasons. Plant cells have fewer human infectious agents than human plasma and mammalian cells. Only sucrose, minerals, and some plant hormones are needed to grow the plant tissue cultures. Plants grown in either the field or greenhouses require only light, water, and a few agrochemicals. Because plants do not need animal serum or other animal-derived nutrients, they are safe and inexpensive hosts for production of the recombinant pharmaceutical proteins such as MAbs [Fischer et al., 2003]. The steps

Grant sponsor: Japan Health Science Foundation.

*Correspondence to: A. Yano, Department of Oral Health, National Institute of Public Health, Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan. E-mail: akiray@nih.go.jp

Accepted 17 February 2004

DOI 10.1002/jmv.20077

Published online in Wiley InterScience
(www.interscience.wiley.com)

that are required in mammalian cells for expression of full-length antibodies, such as protein folding, assembly, endoplasmic reticulum (ER)-mediated glycosylation and Golgi-mediated glycan processing, also occur in plants [Ma and Hein, 1995; Rayon et al., 1998; Sanderfoot and Raikhel, 1999; Vitale and Denecke, 1999]. Many recombinant biopharmaceuticals, including antibodies, have been developed in recent years [Breedveld, 2000; Raskin et al., 2002; Davidov et al., 2003]. In theory, the production of these new drugs could be shifted from animal to plant cells and scaled to the desired level. However, the transgenic technology for generation of biopharmaceuticals requires additional research before it becomes acceptable in our society.

The human cell line TAPC301-CL4 originated from Epstein-Barr virus (EBV) transformed B-cell lines that were derived from peripheral blood of a healthy human volunteer with high titer anti-HBs (adr subtype). The CL4MAb (IgG1/kappa) produced by the TAPC301-CL4 cells neutralized the HBV (adr subtype) activity in vivo [Matsui, 1982]. However, the MAbs from EBV transformed cells are not recommended for human use. In this report, the cDNA of the whole CL4MAb was cloned and introduced into the genome of suspension cultures of tobacco cells. The CL4MAb was expressed in tobacco plant cultures, purified, and the properties were compared with those of the original CL4MAb secreted by the TAPC301-CL4 cells.

MATERIALS AND METHODS

Binary Vector Constructions

The three constructs used in this study are shown in Figure 1. Only the signal sequences differ among the three plasmids. The p29 contained the original leader sequences (LS) of CL4MAb gene. In p30, the LSs were

replaced with the synthesized DNA coding for the secretion sequence (SS) of calreticulin of *Nicotiana glauca* [Borisjuk et al., 1998, 1999] that sorts proteins to the apoplastic spaces. In p31, the LSs were synthesized DNA coding for the SS of hordothionin of barley [Florack et al., 1994] that directs proteins to the ER pathways. All immunoglobulin chains were cloned between the cauliflower mosaic virus 35S promoter (35S) with the omega sequence (Ω : translational enhancer) and nopaline synthase terminator (NosT) [Luehrsen et al., 1992; Sheen et al., 1995]. The translation initiation sequences (IS) were changed from GTCGA-CATG to AACAATG for enhancement of antibody expression [Guerineau et al., 1992]. The heavy- and light-chain expression cassettes, arranged in tandem, constituted the antibody expression cassette (Ab cassette). The β -glucuronidase-NosT of pBI101 vector [Datla et al., 1992] was replaced with the Ab cassettes.

Transformation of Tobacco Suspension Culture

Recombinant binary vectors, p29, p30, and p31 were used to transform ElectroMAX™ *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 cells (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) by electroporation. Suspension cultures of BY-2 tobacco cells [Nagata et al., 1981] were transformed by standard methods [An, 1985] using co-cultivation with *A. tumefaciens* that had been transformed by p29, p30, and p31. Kanamycin resistant cells were selected on Murashige and Skoog (MS) plates containing 100 μ g/ml kanamycin [Nagata et al., 1981]. Between 10 and 20 colonies from each of the transgenic lines, designated as the B29, B30, or B31 series, were inoculated into the MS medium. The transgenic cells were propagated for 7 days at 26°C in the dark, under the same conditions used for BY-2 cells [Nagata et al., 1981].

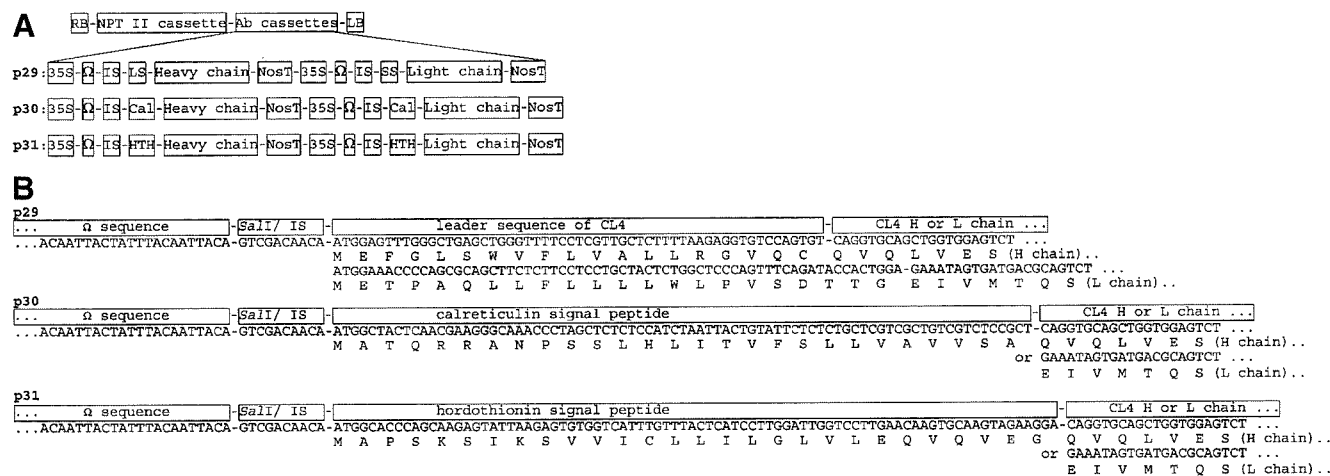


Fig. 1. Schematic representation of expression cassettes of the CL4 antibody. **A**: The antibody cassettes (Ab cassettes) were cloned into the T-DNA region separated from the binary vector, pBI101, by the right border (RB) and left border (LB) sequences. The Ab cassette of p29 binary vector contained original leader sequences (LSs) in the light and heavy chain of CL4 cDNA. Those LSs were replaced with secretion sequence (SS) of plants (p30: calreticulin (Cal) of *Nicotiana*

plumbaginifolia, p31: hordothionin (HTH) of barley). The Ab cassettes contained cauliflower mosaic virus 35S promoter (35S) with omega sequence (Ω), restriction endonuclease *SalI* recognition site, initiation sequence (IS: AACA), nopaline synthetase terminator (NosT). **B**: DNA and deduced amino acid sequences of N-terminal region of the antibodies are indicated.

Small-Scale Extraction of Transgenic Tobacco Cells

To measure both the levels of total soluble protein (TSP) and expression of antibody, 1 ml of suspension culture was transferred into a 2 ml microtube. One-tenth ml of 10× complete protease inhibitor mix (Roche Diagnostics K.K., Tokyo, Japan) in 0.5 M Tris pH 7.5 and 0.15 g each of 0.1 and 1 mm diameter glass beads (Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan) were added. Tubes were shaken at 30 Hz for 5 min by Mixer Mill MM300 (Qiagen K.K., Tokyo, Japan) and centrifuged at 15,000g for 10 min to obtain the plant extract supernatants. TSP concentrations were determined by Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Preparative Scale Extraction of Transgenic Tobacco Cells

For antibody purification, large-scale (100 ml × n) tobacco suspension cultures were sampled at 10 days after initiation of culture. The cells and media were separated by vacuum filtration through the filter paper (Advantec, ToyoRoshi, Tokyo, Japan). Media were centrifuged for 60 min at 18,000g and the supernatants were filtered through 0.45 µm filters for loading to the liquid chromatography. Cells were frozen overnight and thawed in 2 volumes of (v/v) extraction buffer (50 mM Tris pH 7.5, 200 mM NaCl, 1× complete protease inhibitor cocktail). Cells were homogenized (Physcotron, Microtech Co., Tokyo, Japan) until over the 80% of cells were disrupted, as determined by microscopic observation. Cell debris was removed by centrifugation at 18,000g for 30 min. The protein in the supernatant was concentrated by 50% ammonium sulfate precipitation and the resulting pellet was suspended in phosphate-buffered saline (PBS). The suspension was filtered through 0.45 µm filters before liquid chromatography.

Liquid Chromatography

The filtered protein solutions were loaded onto a 10 ml Poros Protein A Plastic column (Applied Biosystems Japan Ltd., Tokyo, Japan) at a flow rate of 10 ml/min using a chromatography system (BIO CAD sprint, Applied Biosystems Japan Ltd.). After washing with 10 column volumes of PBS, bound protein was eluted with 5 column volumes of 0.1 M citrate pH 3.0/0.1 M NaCl and collected in 0.2 volumes of 1 M Tris for readjustment to a neutral pH. The buffer was changed to PBS, the eluate was concentrated using a 100 kDa molecular size cut-off filter (CentriPlus, Millipore Co., Billerica, MA), and filtered through 0.22 µm filters.

ELISA

ELISA plates (E.I.A./R.I.A; Costar, Corning, Inc., Acton, MA) were coated with 0.2 µg/well of purified adr subtype HBsAg (Meiji Dairies Corp., Tokyo, Japan) derived from huGK-14 hepatoma cells. Plates were

blocked overnight with 3% skim milk (Wako, Tokyo, Japan) in PBS to inhibit non-specific binding. After washing with PBS containing 0.05% Tween-20 (PBST), 100 µl of either twofold serially diluted plant extracts or purified antibodies were added to the plates for 1 hour incubation at room temperature. Plates were rewashed with PBST, 100 µl of either horseradish peroxidase (HRP) or alkaline phosphatase (AP)-conjugated goat anti-human IgG specific antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) at a dilution of 1:5,000 was added, and the plates were incubated for an additional 1 hr at room temperature. Unbound HRP-conjugate was washed away with PBST. Bound antibodies were detected by incubation for 30 min with tetramethylbenzidine base (TMB, Bio-Rad) and the optical density at 650 nm (OD₆₅₀) in each well was read. When AP conjugate was used, unbound conjugate was washed away with PBST, bound antibodies were detected by incubation for 1 hr at 37°C with *p*-nitrophenyl phosphate (*p*NPP) substrate (Bio-Rad), and the OD₄₀₅ was read. The ELISA antibody titer was expressed as the highest dilution giving an OD₄₀₅ of 0.1 U above that of the control wells without antigen.

ELISA Quantification of the Human IgG in Plant Extracts

ELISA plates were coated with anti-human IgG (0.5 µg/well; Jackson ImmunoResearch) then the test samples were added to the plates for 1 hr at 37°C following by blocking with 3% skim milk in PBS. Serially diluted human IgG (Jackson ImmunoResearch) was used as standard in all assays. After incubation, AP-conjugated anti-human IgG (Jackson ImmunoResearch) at a dilution of 1:5,000 was added and the plates were incubated for an additional 1 hr at room temperature. Plates were washed and incubated with *p*NPP substrate (Bio-Rad) for 1 hr at 37°C and the OD₄₀₅ was read.

Inhibition ELISAs

Affinity measurement was carried out by inhibition ELISA [Burton et al., 1991]. ELISA plates were coated overnight at 4°C with 0.2 µg/well of purified HBsAg. Wells were blocked with 3% skim milk in PBS. The amount of each MAb that gave half-maximum binding to HBsAg-coated plates was determined by ELISA. HBsAg was diluted by twofold steps from 2 µg/ml (the average MW of the proteins in the HBsAg manufactured by Meiji Dairies Corp. is 25.5 kDa) to 62.5 ng/ml in PBS with 3% skim milk and mixed with the same volume of 2× antibody solution. A 50 µl/well aliquot of the HBsAg-antibody mixture was added to the plates. The plates were incubated for 90–120 min at room temperature and washed three times with PBST before addition of a 1:5,000 dilution of HRP-conjugated goat anti-human IgG specific antibody (Jackson ImmunoResearch). After 1 hr of incubation, followed by washes, TMB (Bio-Rad) was added. The OD₆₅₀ was read after 30 min. The HBsAg concentration that gave 50% inhibition of maximum binding reflected the mAb affinity, which is