

ウイルス抗原の検出には、抗 UL123(IE1) マウス単クローン抗体(8B1.2)を用いた。細胞マーカーの染色では、血管内皮細胞を抗 CD31(JC70A,)、血管内皮・周囲細胞を抗 CD146(N1238)、血管周囲細胞を抗 NG2 ウサギ抗体、血管周囲・間質細胞を抗 PDGFR- β ウサギ抗体、血管周囲・筋線維芽細胞を抗平滑筋アクチン(抗 α -SMA, 1A4)と抗 Desmin(D33)、血管平滑筋細胞を抗 Caldesmon(h-CD)、マクロファージ(M Φ)を抗 Iba-1(ウサギ抗体)で検出した

ヒト胎盤由来の血管周囲細胞 hPC-PL(Promo Cell)を専用培地で継代培養し、実験には4~8継代の細胞を用いた。HCMV AD169株をMOI 0.3-10で感染させ、2日後に固定し、蛍光免疫染色及びフローサイトメトリーで解析した。Isogen処理した検体も調製し、Applied Biosystems OneStep SystemとSYBR Green PCR kitを用いたreal time PCR法により転写解析を行った。

3. SCID-huを用いた解析(Pereira)

妊娠8-10週の中絶胎盤を細切し、C.B-17 scid/scid マウス(Taconic)の腎カプセルに移植した。移植直後もしくは移植3週後に 10^6 PFUのヒトCMVを感染させ、3週後に病理解析及びCMV力価測定を行った。免疫染色には以下の抗体を用いた。抗cytokeratin 7単クローン抗体(OV-TL12/30)、ウサギ抗lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor (LYVE-1)抗体 (Fitzgerald Industries International)、ウサギ抗ヒトVEGF-A (A-20)、ウサギ抗ephrin B2 (P-20) (Santa Cruz)、ヤギ抗ヒトVEGF-C、ヤギ抗ヒトCEACAM1/CD66a (R&D)、ラット抗マウスCD31単クローン抗体 (MEC13.3, BD Pharmingen)。アポトーシスの検出には市販キット (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche)を用いた。

4. マウス胎盤内感染モデル(小杉)

C57BL/6マウス胎盤胎仔側のlabyrinth zoneに麻酔下で微量インジェクションポンプとガラス毛細管針を用い、 $1\mu\text{l}$ (10^5 PFU)の緑色蛍光蛋白発現マウスCMVを接種し、1,3,5日後に胎盤・胎仔を採取した。

5. 妊娠モルモット感染モデル(井上・片野)

妊娠モルモットにGPCMVを 2.0×10^6 PFU皮下接種し、一定期間後に胎盤・胎仔を採取し、ウイルス定量、マイクロアレイ解析、病理解析等を行った。また、gB発現アデノウイルス(rAd-gB)による免疫3週後にウイルス接種を行い、その3週後

に解析した。非感染胎盤をスライサーで薄切し、10%FBS添加F12/DMEM (1:1)で培養後ウイルスを接種した。

6. マイクロアレイによる遺伝子発現解析(井上)

annotation情報と共にEnsemblより入手したモルモットcDNA配列を基にスライドをカスタム合成した。胎盤RNAを標識・精製後、アレイと反応させ、Microarray Scannerによる読取・数値化を行い、GeneSpringX11.0.4で解析した。遺伝子機能はIPAで解析した。

(倫理面への配慮)

- 1)胎盤組織の利用は、関係機関の倫理委員会承認を得た。研究の必要性和匿名性を明確にし、インフォームドコンセントを得た。
- 2)感染動物実験は、実験動物委員会の認可を受け、動物愛護の精神に基づき実験を行った。
- 3)組換えCMVの作製・利用など組換え生物の第二種使用等は、大臣確認申請承認並びに機関承認を得て実施した。

C. 研究結果

1) IUGR症例における先天性感染の解析(Pereira)

解析した19人の母親中14人が抗体陽性で、その中の12人が感染防御可能な抗体avidity、中和抗体、イムノブロットプロファイルを有していた。IUGRで抗体陽性6人の母親中2人がCMV初感染、3人が再感染・再活性化であった。6人中3例の胎盤にウイルスDNA・抗原が検出され、同時に、臍帯血中にウイルス後期蛋白cmvIL-10が検出された。先天性感染の胎盤では、合胞体栄養膜細胞の発達停止、絨毛を包む線維性沈着、Tenny-Parker changeと呼ばれる胎盤栄養膜の微細構造の変化により合胞体栄養膜細胞の輸送機能が損なわれたと考えられた。血中のcmvIL-10及び血管内皮細胞増殖因子に対し阻害的に働く可溶性レセプターsFlt1のレベルが、先天性感染によるIUGRの生物学的指標として、母体・新生児両者で有効である知見を得た。臍帯血中に抗血管新生因子が見られることは、細胞培養系での結果と一致し、低酸素環境となっていると考えられた。

2) HCMV感染胎盤組織の病理解析(小杉)

ヒト胎盤組織の病理解析の結果、未熟な胎盤ほどウイルス抗原・DNAが高頻度に見られ、ウイルス感受性と増殖が高度であった。絨毛間質が最も重要なCMV増殖巣であり、感染細胞の多くは、

血管内皮細胞、血管周囲細胞、筋線維芽細胞であった。感染絨毛では血管内皮細胞の消失に伴い筋線維芽細胞が増加していた。後者の一部は血管周囲細胞マーカーを発現することから、感染血管周囲細胞が筋線維芽細胞に形質変化し、絨毛間質の線維化に関与すると推測された。初代培養ヒト胎盤血管周囲細胞でも、感染による Desmin 遺伝子の高発現を認めた。感染に伴う血管内皮細胞消失と血管周囲細胞の Desmin 異常発現が、絨毛間質血管消失と線維化に関与し、低酸素症等の胎盤機能障害に繋がると考えられた。

3) 胎盤片移植 SCID-hu 感染モデル(Pereira)

HCMV 強毒株 VR1814、弱毒株 AD169 をヒト胎盤栄養膜細胞培養系で感染させると、前者が後者に比してウイルス産生が大きい。胎盤を腎臓被膜下に移植した SCID マウス(SCID-hu)モデルにおいては、胎盤片中の栄養膜細胞が子宮の代わりにマウス腎実質組織に侵入し、血管再構成を誘導した。強毒株のみが、組織侵入と血管再構成を阻害し、VEGF-C と bFGF の発現が胎盤片中では増加した。従って、ウイルス増殖とパラクラインな蛋白により血管再構成が抑制され、出血・低酸素症・水腫を起こすと示唆された。

4) 妊娠マウス胎盤内直接感染モデル(小杉)

マウス胎盤は、ヒト胎盤に比較してバリア機能が強固で母体血中から胎仔側への経胎盤感染が殆ど生じない。しかし、胎盤内に直接 GFP 発現 MCMV を接種したところ、胎生 12 日以前では胎仔生存率が 50%以下だが、13 日では 80-90%であったことから、この条件で胎内感染動態を解析した。ウイルス価は感染 3 日までにピークに達し、胎盤≧心>肝>脳の順であった。胎盤では胎仔側の labyrinth zone と羊膜上皮・上皮下の間質に、主に感染を認めた。免疫染色では、主に血管周囲に感染が認められ、2~3 割は MΦ であった。胎仔の脳に感染が至った場合、髄膜・脳室壁・実質内血管周囲に感染細胞が見られ、脳への侵入経路と考えられた。細胞マーカーを用いた解析から、脳室周囲では神経前駆細胞が主な感染細胞であった。一方、出生後に大脳皮質神経細胞層を形成する皮質板には感染細胞を全く認めなかった。従って、血行性に胎盤から胎仔脳に到達した MCMV は、血液髄液関門及び血液脳関門を介して脳内に侵入すると推測された。抗 Iba-1 抗体でミクログリア/MΦ を染色すると、感染巣・非感染部ともにミクログリア/MΦ 抗原の発現増強と同細胞の増多を

認めた。また、MΦ 活性化に関与する TNF- α , INF- γ の遺伝子発現の亢進も見られた。

5) 妊娠モルモット感染動物モデル(井上, 片野)

a) 分子生物学的ツールの確立

個体で増殖するモルモット CMV(GPCMV)の全配列 240kb を決定した。また、ORF のない 9kb 領域を GFP-BAC 配列と置換した GPCMV ゲノムをクローニングした BAC を作製し、大腸菌内でウイルス遺伝子の改変ができる系を確立した。

b) 胎盤における感染機序の解析

妊娠モルモットに GPCMV 感染後、胎盤・胎仔を採材し、免疫染色及びリアルタイム PCR により、CMV の局在や量的変動を解析した。その結果、ヒトと同様に病態が妊娠週齢に依存することが明らかになった。即ち、妊娠 1 週(ヒトの妊娠 1 ヶ月相当)では、胎盤の発達が未熟で胎仔が流産となる一方、妊娠 5 週以降(ヒトの妊娠 5 ヶ月相当以降)では、親への感染は成立するが胎仔には至らなかった。

病理解析により、胎盤では spongiotrophoblast 層でスポット状に感染が広がることから、cell-to-cell での感染伝播様式が示唆された。

モルモット胎盤片の組織培養系を確立することに成功し、赤色蛍光蛋白(RFP)発現組換え GPCMV を接種して詳細な感染像の解析を行った。RFP 発現細胞が胎盤組織上に接種 3 日後より、cell-to-cell での広がりをもって散見されるのに合わせ、ウイルス DNA も増加していた。病理組織学的解析により、ウイルス抗原は、syncytio trophoblast、spongiotrophoblast 層及び parietal trophoblast giant cell 等に認められた。一部に血管内皮細胞への感染も認められた。こうした胎盤組織培養系での感染の広がり、母体中の胎盤での感染様式に良く似たものであった。

c) 感染動物胎盤での遺伝子発現解析

アレイ解析により感染による変動が認められた遺伝子は、主に細胞代謝や分化、細胞周期に関するものであり、炎症に関連するものはなかった。

d) 妊娠モルモットを用いたワクチン開発

gB を発現する Ad ベクターを用いて妊娠モルモットを免疫すると、十分な gB 抗体が誘導され、GPCMV 感染により抗体価のブーストが見られ、avidity index も上昇していた。同様に、胎仔についても、親個体とほぼ同程度の抗体価・avidity の gB

抗体の移行が見られた。

対照として rAd-LacZ 免疫 3 週後に GPCMV 感染した場合、親個体の体重減少や脱毛などが見られたのに対して、rAd-gB 免疫群では、そうした現象は認めなかった。また、LacZ 群の胎仔の体重は、gB 免疫群の 78%と有意に少なかった。免疫や感染などの処理を行わなかった場合の胎仔の（平均 -1.5SD）の体重以下を IUGR と定義すると、gB 免疫群では IUGR 率は 0%であったのに対して、LacZ 群では 42%であった。一方、胎盤の重さには有意な差は無かったが、胎盤への感染頻度は、有意に gB 群で低下していた。gB 免疫群では spongiotrophoblast 層にのみ感染が見られるが、対照では parietal trophoblast giant cell や yolk sac にも感染を認めた。Spongiotrophoblast 層では、LacZ 群・gB 群共に cell-to-cell で広がっており、その広がり方にも差はなかった。胎仔感染率は gB 免疫群で 15%であり、LacZ 群 75%と比べ gB 免疫により有意に感染が防御された。しかし、gB 免疫群で胎仔への感染が起こった例を見ると、胎仔の gB 抗体価や avidity index は、同腹と変わらないにも関わらず、ウイルス量は対照群の胎仔と同レベルであった。

gB 以外の糖蛋白数種の免疫も試みたが、gB に相応する感染制御は見られなかった。

6) ヒト型抗 CMV 抗体の作製(竹腰)

大腸菌無細胞発現系を用いて、HCMV UL128, UL130, UL131A を効率的に発現することに成功した。His タグを利用して精製した蛋白を抗原として ELISA を行うと、多くのヒトの血清と強く反応し、HCMV 感染細胞を抗原とした場合と相関が見られた。5 種類の抗体遺伝子ライブラリーを大腸菌に導入・発現させて Fab 抗体を産生させ、精製蛋白を抗原として特異的に反応するクローンを検索した。その結果、現在までに UL128 について 2 クローン、UL131A について 5 クローンを同定し、さらにスクリーニングを継続中である。

D. 考察

先天性感染症例の胎盤、胎盤組織を移植した SCID-hu マウス感染モデル、ヒト胎盤組織培養感染系などを用いて、HCMV の感染・増殖とそれに伴う胎盤機能の障害の発生機序を解析し、以下の重要な知見を得た。CMV 感染により、血管再構成が抑制されるとともに、感染により栄養膜細胞の子宮実質組織への組織侵入の機能が阻害されることから、胎盤の形態形成に障害が発生する。さ

らに、胎盤への感染に伴い、a)細胞分化に関与する HLA-G の発現の抑制、b)ウイルスの IL10 ホモログの産生、c)血管内皮細胞増殖因子に対し阻害的に働く可溶性レセプター sFlt1 などパラクラインな蛋白の誘導、d)Desmin などの異常発現による血管周囲細胞の筋線維芽細胞への形質変化、等が引き起される。こうした現象により、胎盤機能の障害が発生し、結果として、出血・低酸素症・水腫を起こすと考えられる。

胎盤から各臓器への感染の広がり方や脳内での増殖などによる神経学的障害発生機序については、ヒト胎盤などの組織材料を得ることに制約があるため、知見の蓄積が希薄であった。マウス胎盤直接感染モデルや妊娠モルモット感染モデルを用いることで、a)胎盤での増殖が cell-to-cell 様式であること、b)胎盤で増殖したウイルスは血行性に血液髄液関門及び血液脳関門を介して脳内に侵入し、特に前者を介して脳室壁神経前駆細胞への感染が成立すること、c)感染に伴い、ミクログリアの数的増多・特異抗原の発現亢進、炎症性サイトカイン・iNOS 遺伝子の転写亢進など脳形成に何らかの影響を及ぼす異常活性化が起こることなどを明らかにした。ミクログリア/MΦ 異常活性化による間接的細胞障害が、神経学的障害の機序のひとつとなっていると考えられる。

胎盤の感染増殖が cell-to-cell 様式であるため、gB 免疫は胎盤表層部での感染防御に有効だが、胎仔に感染が至ると効果がないことが、gB サブユニットワクチンの限界に繋がっており、今後、胎盤への感染を完全に防御できるレベルの gB 免疫を誘導できる方法を確立すること、あるいは、cell-to-cell での増殖に関与するような他の蛋白、例えば UL128, UL130, UL131A など、に対する免疫誘導の効果を試みる必要がある。近年、ヒト血清は、線維芽細胞よりも上皮・内皮細胞への CMV 感染防御 (中和) を誘導することが分かり、UL128, UL130, UL131A が gB 以上に中和抗体の標的として重要であることも判明した。本研究では、各蛋白の精製標品を用いて抗体ライブラリーをスクリーニングし、有望なクローンをいくつか得たことで、gB に加えて HCMV の感染防御に効果的なヒト型モノクローナル抗体の開発を進めることが可能となった。各候補抗体の中和能などを検討し、臨床応用可能な段階に早急に到達したい。

E. 結論

1) 原因不明 IUGR 症例において、先天性 CMV 感染の頻度が高いことから血清学検査を実施す

る必要がある。

- 2) ヒト胎盤組織、胎盤組織移植 SCID-hu マウス感染モデル、モルモット胎盤組織培養系、妊娠モルモットモデルを用いて、CMV 感染は、栄養膜細胞の実質組織への侵入・血管再構成能力阻害や sFlt1、VEGF-C、bFGF、Desmin の発現亢進等により低酸素症等が引き起こされ、胎内発達遅滞等の胎盤機能障害に至る機序を明らかにした。
- 3) CMV は、胎盤内では cell-to-cell 様式で増殖し、その後、血行性に血液髄液関門及び血液脳関門を介して胎児脳内に侵入し、特に前者を介して脳室壁神経前駆細胞への感染が成立する。
- 4) 感染による胎生期脳ミクログリアの異常活性化が、神経学的障害に関与すると思われる。
- 5) 胎盤では感染が cell-to-cell で広がるため、gB ワクチンは胎盤表層部での感染阻害には有効であるが、胎盤内及び胎児への伝播阻止に効果がない。従って、胎盤への感染を完全に防御する、ないしは、cell-to-cell 伝播を阻害する方法論の開発が必要である。
- 6) 中和能を示す抗 gB ヒト Fab 抗体を作製した。また、上皮・内皮細胞への CMV 感染防御に重要な UL128 及び UL131A 蛋白に対する抗体遺伝子クローンをいくつか同定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Maidji E, Nigro G, Tabata T, McDonagh S, Nozawa N, Shiboski S, Muci S, Anceschi MM, Aziz N, Adler SP, Pereira L. Antibody treatment promotes compensation for human cytomegalovirus-induced pathogenesis and a hypoxia-like condition in placentas with congenital infection. *Am J Pathol* 177:1298-310, 2010.
- 2) Kanai K, Yamada S, Yamamoto Y, Fukui Y, Kurane I, Inoue N. Re-evaluation of guinea pig cytomegalovirus complete genome sequence. *J Gen Virol* 92:1005-20, 2011.
- 3) Tabata T, Petitt M, Fang-Hoover J, Rivera J, Nozawa N, Shiboski S, Inoue N, Pereira L. Cytomegalovirus impairs cytotrophoblast-induced lymphangiogenesis and vascular remodeling in an in vivo human placentation model. *Am J Pathol*. 181:1540-59, 2012.
- 4) Yamada S, Taniguchi R, Kosugi I, Inoue N. pp.273-312. Cytomegalovirus, In:(Eds) Singh SK, Ruzek D. "Neuroviral Infection", Taylor & Francis

CRC Press, 2012

- 5) Yasuda K, Sugiura K, Ishikawa R, Kihira M, Negishi Y, Iwayama H, Ito K, Kimura H, Kosugi I, Akiyama M. Perinatal cytomegalovirus-associated bullae in an immunocompetent infant. *Arch Dermatol*. 148:770-2, 2012.
- 6) Pereira L, Tabata T, Petitt M, Fang-Hoover J. Cytomegalovirus replication in the developing placenta. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: From Molecular Pathogenesis to Intervention*, vol. 2. Caister Academic Press, 2013.

2. 主な国際学会発表

- 1) Yamada S, Kosugi I, Katano H, Fukui Y, Kawasaki H, Arai Y, Kurane I, Inoue N. In vivo imaging assay for the convenient evaluation of antiviral compounds against cytomegalovirus in mice. 2010 Congenital Cytomegalovirus Conference, Paris, 2010.
- 2) Yamada S, Saki F, Hashimoto K, Katano H, Sato Y, Fukui Y, Inoue N. Effect of cytomegalovirus infection on placenta in a guinea pig model. International Federation of Placenta Associations Meeting 2012, Hiroshima, 2012.
- 3) Hashimoto K, Yamada S, Fukuchi S, Katano H, Sato Y, Kato M, Moriishi K, Inoue N. Immunization of pregnant guinea pigs with glycoprotein B. 4th Congenital CMV Conference, San Francisco, 2012.
- 4) Tabata T, Petitt M, Fang-Hoover J, Rivera J, Nozawa N, Shiboski S, Inoue N, Pereira L. Congenital cytomegalovirus infection identified in pregnancies complicated by idiopathic intrauterine growth restriction. 同上
- 5) Pereira L, Fong A, Petitt M, Maidj E, Fang-Hoover J, Nozawa N, Zydek M, Tabata T, Finke D, Logahvi S, Pepkowitz S, Inoue N, Ogunyemi D. Congenital cytomegalovirus infection identified in pregnancies complicated by idiopathic intrauterine growth restriction. 同上
- 6) Kosugi I, Sakao M, Kawasaki H, Arai Y, Iwashita T, Ohtsuki Y, Shimizu S, Tsutsui Y. Human cytomegalovirus infection of placental villus endothelial cells and pericytes during the late phase of congenital infection. 同上

G. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む) HCMV UL128-131A 抗体(出願予定)

感染動物モデル及び胎盤組織培養系を用いた先天性サイトメガロウイルス感染機構の解析と中和抗体及びワクチンの開発

国立感染症研究所ウイルス第1部
井上 直樹

研究要旨 本年度計画は順調に実施され、以下の結果を得た。1)原因不明の胎内発達遅滞症例において、先天性サイトメガロウイルス(CMV)感染の頻度が高いことから、こうした症例でCMVに対する血清学検査を確実に実施する必要性がある。2)感染により、胎盤の合体栄養膜細胞の輸送機能の障害やDesmin蛋白の異常発現などによる血管形成の変質が起こる。3)胎盤で増殖したウイルスは血行性に血液髄液関門及び血液脳関門を介して脳内に侵入し、特に前者を介して脳室壁神経前駆細胞への感染が成立する。また、CMV感染により胎生期脳ミクログリアが異常活性化する。4)胎盤では、cell-to-cell様式でウイルスは広がることから、gBワクチンにより胎盤への感染を一定程度減少させても、胎盤内でのウイルス増殖を阻害できないという限界がある。5)上皮・内皮細胞へのCMV感染防御に重要なUL128及びUL131A蛋白に対する抗体遺伝子クローンをいくつか同定し、ヒト型モノクローナル抗体の開発を可能にした。

研究分担者

- (1) 国立感染症研究所感染病理部 片野 晴隆
- (2) 浜松医科大学医学部 小杉伊三夫
- (3) 東海大学医学部 竹腰 正隆

外国側研究者(研究委託)

- (4) カリフォルニア大学 サンフランシスコ校
Lenore Pereira

A. 研究目的

サイトメガロウイルス(CMV)は小児期に無症候感染し生涯続く潜伏感染を樹立するが、健康人に疾病を起ささない。しかし、妊婦のCMV感染は胎盤を経て胎児に感染を起こし、胎盤・胎児の形態形成や機能阻害から流産・死産、更に出生児の発達障害等を引き起こす。我々は、先天性CMV感染が新生児300人当たり1人に見られ、感染児の2割以上に遅発性後遺症が発生するなどダウン症と並び先天性中枢神経系障害の最大の原因であることを明らかにしてきた(Ogawa他2007;Koyano他2009,2011)。少子化の現代において、先天性CMV感染は重篤な神経学的後遺症をもたらすため、ワクチン導入以前には問題であった風疹による先天性感染症に相当する対策が必要と考えられる。

先天性感染は、異なる遺伝子型株の再感染や再活性化によっても起こるが、十分な中和抗体により相当程度感染を制御できることから初感染が主な原因であることが疫学的に知られる。CMVがコードする糖蛋白B(gB)が、中和抗体の主要な標的のひとつであることが長く知られている。膜貫通ドメインを取り除いたgB蛋白をアジュバント

とともに投与するサブユニットワクチン候補を用いた臨床試験が最近行われ、50%程度の効果があったが、実用化には、まだほど遠い状況にある。十分な抗体が誘導されたにも関わらず感染防御効果に限界があった理由を明らかにして、ワクチン開発の方向性を明らかにする作業が必要である。さらに、高力価抗体を用いた胎児治療などの臨床的検討が進んでいるが、高力価抗体には使用の制約もあり、CMV特異的抗体薬の開発が課題となっている。

そもそも胎盤は妊娠期にのみ形成される特殊な臓器であり、妊娠の維持や胎児発達に重要な役割を担っているが、経胎盤感染や胎盤での感染防御機構など不明な点が多い。従って、経胎盤感染機構を解明するとともに、基盤的研究成果をもとにワクチンや抗体を用いた感染防御・治療法を開発することが求められている。

本研究は、感染防御・治療法の前臨床試験にとって必須である感染動物モデルとその組織培養系を確立し、抗体治療の科学的根拠やサブユニットワクチンの動物モデルでの評価法を確立することにより、ヒトでの臨床試験への方向性を示すとともに、学術的には、ヒト及び小動物での感染機構の解析から、神経学的後遺症の発生機序の解明や胎盤・胎児の分化・発達に関する科学に貢献することをめざすものである。本研究は、大きくヒト胎盤材料を用いた解析(小杉, Pereira)、ヒト胎盤片を移植したSCIDマウスでの感染の解析(Pereira)、マウス胎盤内感染モデル(小杉)やモル

モット先天性感染モデル(井上, 片野)を用いた感染機構の解析とワクチン開発、ヒト CMV(HCMV)に対する中和抗体の開発(竹腰)から成る。

B. 研究方法 (本研究に特徴的方法のみを記載)

1. HCMV 感染胎盤及び臍帯血の解析(Pereira)

原因不明の胎内発達遅滞(IUGR)7 例、妊娠高血圧腎症 3 例、及び何らの病状も無い対照 9 例の妊婦から得られた母体血及び臍帯血や胎盤の生検を解析した。CMV に対する IgG avidity、中和抗体価、HCMV 蛋白に対するイムブロットのプロファイルを解析するとともに、胎盤中のウイルス DNA の検出や病理解析を行った。

2. HCMV 感染胎盤組織ブロックの解析(小杉)

CMV 感染が確認された 6 例の胎盤組織パラフィンブロック及び双胎分娩時に双胎羊膜構造を確認する目的で病理検査用に提出された非感染の妊娠後期胎盤を正常対照として解析した。

3. 初代培養胎盤血管周囲細胞感染実験(小杉)

ヒト胎盤由来の血管周囲細胞 hPC-PLI を専用培地で 4~8 継代培養し、実験に用いた。HCMV AD169 株を感染 2 日後に 4%パラホルムアルデヒド固定し蛍光免疫染色解析、フローサイトメトリー解析、及び転写解析に用いた。

4. マウス胎盤内感染モデル(小杉)

麻酔下で妊娠 13.5 日の C57BL/6 マウス胎盤胎仔側の labyrinth zone に、マイクロインジェクションポンプとガラス毛細管針を用いて、1 μ l (10⁵PFU) の緑色蛍光蛋白発現マウス CMV を接種した。1,3,5 日後に胎盤・胎仔を採取し、蛍光観察、病理解析及びウイルス力価測定を行った。胎仔脳を実体蛍光観察後、連続凍結切片を作成し、MCMV 感染細胞は EGFP 蛍光で同定し、ミクログリア/マクロファージ(抗 Iba-1 抗体, 抗 F4/80 抗体)及びその他の細胞は蛍光免疫染色で検出した。また、炎症性サイトカイン(TNF- α , INF- γ)及び iNOS の転写をリアルタイム PCR で定量した。

5. 妊娠モルモット感染モデル(井上・片野)

妊娠 1 週齢のモルモット(Hartley)に、gB もしくは β -galactosidase(LacZ)を発現する非増殖型組換えアデノウイルス 10¹⁰ 感染性粒子を接種し、その 3 週後に GPCMV を個体当たり 10⁶ pfu 皮下接種し、さらに 3 週後に炭酸ガスで安楽殺し、血液、諸臓器、胎盤・胎仔を採材した。胎盤は細切し、ウイ

ルス DNA 定量、マイクロアレイ解析、病理解析に用いた。

妊娠 4 週齢のモルモットより胎盤を採取し、スライサー(図 2)を用いて胎盤片を作製した。

6. ヒト型抗 CMV 抗体の作製(竹腰)

HCMV UL128,UL130,UL131A の各遺伝子を大腸菌型コドン利用となるように人工合成した遺伝子を、N 末端に His タグを付加する pEXP5-NT ベクターにクローニングし、大腸菌無細胞発現系(Expressway システム, Invitrogen)を用いて 30°C で反応させた。

(倫理面などに対する配慮)

- 1) 胎盤組織の利用には、関係機関の倫理委員会の承認を得た。なお、胎盤は出産後の不要組織であることから、匿名化した利用は、提供者に対する不利益をもたらさない。その提供に当たっては、研究の必要性和匿名性を明確にし、インフォームドコンセントを得た。
- 2) 妊娠モルモットを用いた経胎盤感染実験及び組換えアデノウイルス(rAd)を用いた免疫実験は、国立感染症研究所動物実験委員会より、妊娠マウスを用いた胎盤感染実験は、浜松医大よりそれぞれ実験認可を受け、承認内容を遵守し、動物愛護の精神に基づき実験を行った。
- 3) 蛍光蛋白を発現する組換えモルモット及びマウス CMV の作製・利用など遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置については、大臣確認申請に対し承認が得られている(井上直樹、平成 20 年 1 月 28 日付 19 国文科振第 39 号; 小杉伊三夫、平成 18 年 4 月 4 日付 17 学文科振第 600 号)。非増殖型 rAd の作製、ヒト型モノクローナル抗体の産生に関わる DNA 組換え実験は、それぞれ機関承認されている。カルタヘナ条約を遵守し適正に各実験を実施した。

C. 研究結果

1. IUGR 症例における先天性感染の解析(Pereira)

解析した 19 人の母親中 14 人が抗体陽性で、その中の 12 人が感染防御可能な抗体 avidity、中和抗体、イムブロットプロファイルを有していた。IUGR で抗体陽性 6 人の母親中 2 人が CMV 初感染、3 人が再感染・再活性化であった。6 人中 3 例の胎盤にウイルス DNA・抗原が検出され、同時に、臍帯血中にウイルス後期蛋白 cmvIL-10 が検出された。先天性感染の胎盤では、合胞体栄養膜細胞の

発達停止、絨毛を包む線維性沈着、Tenny-Parker change と呼ばれる胎盤栄養膜の微細構造の変化により、合胞体栄養膜細胞の輸送機能が損なわれたと考えられた。臍帯血中に抗血管新生因子が見られることは、細胞培養系での結果と一致し、低酸素環境となっていると考えられた。

2. HCMV 感染胎盤組織の病理解析(小杉)

CMV 感染ヒト胎盤組織のパラフィンブロックの病理解析において主な感染細胞種を特定した結果、血管周囲細胞であることが明らかとなった。また、感染部では血管の破壊・消失が認められた。

血管腔が確認される感染絨毛では、IE1 陽性細胞の 20%が血管内皮細胞、40%が血管周囲細胞、残りが間質細胞であり、Desmin 陽性細胞は 10%と少数であった。一方、血管腔が確認されない感染絨毛では IE1 陽性細胞の 80~90%が Desmin 陽性細胞であった。Desmin 陽性感染細胞の約半数は血管周細胞、残りは筋線維芽細胞であった。従って、感染によって血管周囲細胞が筋線維芽細胞に、絨毛間質の非感染細胞も Desmin 陽性筋線維芽細胞に置き換わると思われる。

3. 感染による Desmin の異常発現(小杉)

初代培養ヒト胎盤血管周囲細胞は、血管内皮マーカーの CD31 は陰性で、血管周囲細胞マーカーの CD146 及び NG2 が陽性であった。CMV 非感染培養系では筋線維芽細胞のマーカーと思われる Desmin の発現は殆ど観察されないが、感染により細胞質に劇的な発現を認めた。Desmin 陽性細胞数は感染価に伴って増加し、MOI=10 で 10%程度が陽性で、その 90%に HCMV IE1 の発現を認めた。一方、平滑筋アクチン α -SMA の発現は非感染では僅かで、感染による誘導も認めなかった。転写解析では、Desmin 遺伝子の転写のみが感染価の増加に伴って上昇し、MOI 10 では Mock 感染の約 30 倍であった。

4. 妊娠マウス胎盤内直接感染モデル(小杉)

マウス胎盤は、ヒト胎盤に比較してバリア機能が強固で母体血中から胎仔側への経胎盤感染が殆ど生じない。昨年度、胎盤内に直接ウイルス接種を行うことで胎仔への感染を解析できるモデル系を構築した。本年度は、そのモデルを用いて先天性 CMV 感染に伴う神経学的障害発生の機序を明らかにするため、胎仔の脳への感染を中心に検討した。感染細胞は、髄膜、脈絡叢・脳室周囲、脳実質に認められ、髄膜に最も高頻度であった(図

1)。細胞マーカーを用いた解析から、脳室周囲では神経前駆細胞が主な感染細胞であった。一方、出生後に大脳皮質神経細胞層を形成する皮質板には感染細胞を全く認めなかった。従って、血行性に胎盤から胎仔脳に到達した MCMV-EGFP は、血液髄液関門及び血液脳関門を介して脳内に侵入すると推測された。

胎仔脳において、抗 Iba-1 抗体でミクログリア/マクロファージを染色すると、感染脳において劇的な Iba-1 抗原の発現増強と細胞数の増多を認めた。マクロファージ活性化に関与する TNF- α 、INF- γ の遺伝子発現の亢進も見られた。

5. 妊娠モルモット感染動物モデル(井上・片野)

1) 胎盤における感染機序の解析

胎盤における感染機序を明らかにするために、培養細胞系と感染動物モデルの間をつなぐ胎盤組織培養法の確立が必要である。昨年度、様々な妊娠週齢の胎盤を採取し、胎盤スライスを培養する方法を確立した。本年度は、この系を用いて、妊娠 4 週齢個体より胎盤スライスを作製し、RFP 発現組換え GPCMV を接種して詳細な感染像の解析を行った。赤色蛍光発現細胞が胎盤組織上に接種 3 日後より散見されるのに合わせ、ウイルス DNA も増加していた(図 2)。病理組織学的解析により、ウイルス抗原は、syncytiotrophoblast, spongiotrophoblast layer 及び parietal trophoblast giant cell 等に認められた。一部に血管内皮細胞への感染も認められた。こうした胎盤スライスでの感染の広がり、母体中の胎盤での感染様式に良く似たものである。

2) 妊娠モルモットモデルによるワクチン評価

rAd-gB または rAd-LacZ を接種した妊娠モルモットに GPCMV を感染し、GPCMV 初期タンパクに対する抗体 g-1 を用いて、胎盤中の感染細胞を検出した。rAd-gB 接種妊娠モルモットでは検索した胎盤 23 個中 8 個 (34%) に感染が見られたのに対し、rAd-LacZ を接種した妊娠モルモット (コントロール群) では 18 個中 12 個 (67%) であった。従って、gB 免疫により、胎盤における GPCMV 陽性率が有意に減少した ($P<0.05$) (図 3A)。GPCMV 陽性細胞は島状 (スポット状) に感染細胞巣を形成し、cell-to-cell での増殖が示唆された。この感染細胞巣の数は、gB 免疫群で有意に少なかった (図 3B)。これらの結果は、gB 免疫により有意に胎盤内の感染防御がなされたことを示唆する。

rAd-LacZ を接種した妊娠モルモットの胎盤では、GPCMV 感染細胞は主に spongiotrophoblast 層に見られたが、その他にも parietal trophoblast giant

cell や、yolk sac などの細胞に見られた。一方で、rAd-gB 接種妊娠モルモットの胎盤では、spongio-trophoblast 層に同様の感染細胞巣を認めたが、その他の領域では感染細胞はほとんど認められなかった。感染細胞巣の大きさには 2 群間で違いはなかった。

親と胎仔の血清学検査を行った結果、LacZ 免疫に比較して gB 免疫により、GPCMV 感染により抗体価のブーストが見られ、avidity index も上昇していた。同様に、胎仔についても、親個体とほぼ同程度の抗体価・avidity の gB 抗体の移行が見られた(図 4)。両群において、同腹でありながら胎仔で感染の有無の差が出たケースが、それぞれ親 2 匹ずつあったが、胎仔への感染の有無に関わらず、同腹内では胎盤・胎児の重量、gB 抗体価・avidity に差はなかった。従って、十分な gB 抗体存在下でも先天性感染が発生することが示された。

その原因を検討するため、rAd 免疫による抗体価、avidity、抗体誘導時期を GPCMV 感染の場合と比較したが、前者は後者と同等、ないしは、それ以上の免疫効果があることが示された。一方、組換え GPCMV の蛍光発現を指標として、血清の中和抗体価を比較すると同じ gB 抗体価があるにも関わらず、rAd-gB 血清の中和抗体価は、GPCMV 感染血清に比べ低く、同一の血清希釈で比較すると 20-30%程度プラーク減少率であった(図 2)。従って、gB 以外のウイルス抗原に対する抗体が中和において重要であることが示唆された。

6. ヒト型抗 CMV 抗体の作製(竹腰)

HCMV UL128,UL130,UL131A を大腸菌無細胞発現系を用いて効率的に発現することに成功した。His タグにより精製することで、抗体ライブラリーの検索が可能となった。

得られた精製蛋白を抗原とした場合に、多くのヒトの血清で強い反応が見られ、HCMV 感染細胞を抗原とした場合と相関が見られた。

そこで、5 種類の抗体遺伝子ライブラリーを大腸菌に導入・発現させて Fab 抗体を産生させ、精製蛋白を抗原として特異的に反応するクローンを検索した。その結果、現在までに UL128 について 2 クローン、UL131A について 5 クローンを同定し、さらにスクリーニングを継続中である。

D. 考察

原因不明の IUGR 症例の先天性 CMV 感染の頻度が高いことから、HCMV 感染に対する血清学検査を実施し、胎盤でのウイルス増殖・病原性の抑

制を考えた治療を考慮する必要がある。

感染胎盤では、合胞体栄養膜細胞の輸送機能の障害が発生していた。また、血管周囲細胞に CMV が感染し、感染細胞のみならず、非感染細胞においても Desmin の異常発現に見るように血管構造の変質が見られたことも、そうした胎盤機能障害の要因となっていると考えられる。

胎盤から各臓器への感染の広がり方や脳内での増殖などによる神経学的障害発生機序については、ヒト胎盤などの組織材料を得ることに制約があるため、知見の蓄積が希薄であった。マウス胎盤直接感染モデルや妊娠モルモット感染モデルを用いることで、1)胎盤での増殖が cell-to-cell 様式であること、2)胎盤で増殖したウイルスは血行性に血液髄液関門及び血液脳関門を介して脳内に侵入し、特に前者を介して脳室壁神経前駆細胞への感染が成立すること、3)ウイルス感染に伴い、ミクログリアの数的増多・特異抗原の発現亢進、炎症性サイトカイン・iNOS 遺伝子の転写亢進など脳形成に何らかの影響を及ぼす異常活性化が起こることなどを明らかにした。

胎盤の感染増殖が cell-to-cell 様式であることは、gB サブユニットワクチンの限界に繋がっており、今後、胎盤への感染を完全に防御できるレベルの gB 免疫誘導できる方法を確立すること、あるいは、cell-to-cell での増殖に関与するような他の蛋白、例えば UL128・UL130・UL131A など、に対する免疫誘導の効果を試みる必要がある。近年、ヒト血清は線維芽細胞よりも上皮・内皮細胞への CMV 感染防御(中和)を誘導することが分かり、UL128-131 糖蛋白が gB 以上の中和抗体誘導能を持つことも判明した。本研究では、各蛋白の精製標品を用いて抗体ライブラリーをスクリーニングし、有望なクローンをいくつか得たことで、gB に加えて HCMV の感染防御に効果的なヒト型モノクローナル抗体の開発を進めることが可能となった。各候補抗体の中和能などを検討し、臨床応用可能な段階に早急に到達したい。

E. 結論

- 1) 原因不明 IUGR 症例においては、先天性 CMV 感染の頻度が高いことから血清学検査を実施する必要がある。なお、感染胎盤では、合胞体栄養膜細胞の輸送機能の障害が発生していた。
- 2) 先天性感染症例の胎盤の病理解析及び血管周囲細胞の培養系を用いて、HCMV 感染血管周囲細胞で Desmin 蛋白の異常発現が生ずることを胎盤組織(*in vivo*)と初代培養細胞(*in vitro*)を用い

て初めて明らかにした

- 3) 妊娠マウス胎盤内直接感染モデルを用いて、胎盤で増殖したウイルスが血行性に血液髄液関門及び血液脳関門を介して脳内に侵入し、特に前者を介して脳室壁神経前駆細胞への感染が成立することを明らかにした。また、CMV 感染による胎生期脳ミクログリアの異常活性化を *in situ* で初めて明らかにした。
- 4) モルモット胎盤片培養系での感染は、cell-to-cell での増殖様式や感染細胞種など、個体における感染像と同様であることを示した。
- 5) GPCMV 感染と同等な抗体価・avidity レベルの gB 抗体誘導があっても、gB のみの免疫では GPCMV 感染に匹敵する中和能が形成されない。また、十分な gB 抗体存在下でも先天性感染を防御できない場合がある。
- 6) 胎盤では感染が cell-to-cell で広がるため、糖蛋白 B による免疫は、胎盤での感染制御による先天性感染防御に有効であるが、胎盤から胎児への感染防御には作用していないと思われる。従って、胎盤への感染そのものを完全に防御できるワクチンを開発するか、cell-to-cell での広がりを阻害する方法論が必要と思われる。
- 7) 上皮・内皮細胞への CMV 感染防御に重要な UL128 及び UL131A 蛋白に対する抗体遺伝子クローンをいくつか同定し、ヒト型モノクローナル抗体の開発を可能にした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamada S, Taniguchi R, Kosugi I, Inoue N. (2012) Cytomegalovirus, pp. 273-312. *In*: (Eds) Singh SK & Ruzek D. "Neuroviral Infection" Taylor & Francis CRC Press.
- 2) Ikuta K, Ishioka K, Sato Y, Imamura T, Asano K, Koyano S, Inoue N, and Suzutani T. (2012) A novel real-time PCR method for the determination and quantification of each cytomegalovirus (CMV) gH-subtype in clinical samples. *J Clin Microbiol* 50:499-501.
- 3) Tabata T, Petitt M, Fang-Hoover J, Rivera J, Nozawa N, Shiboski S, Inoue N, Pereira L. (2012) Cytomegalovirus impairs cytotrophoblast-induced lymphangiogenesis and vascular remodeling in an *in vivo* human placentation model. *Am J Pathol*. 181: 1540-59.
- 4) Hashimoto K, Yamada S, Katano H, Fukuchi S, Sato Y, Kato M, Yamaguchi T, Moriishi K, Inoue N.

Effects of immunization of pregnant guinea pigs with guinea pig cytomegalovirus glycoprotein B on viral spread in the placenta. *Submitted*.

- 5) Pereira L, Tabata T, Petitt M, Fang-Hoover J. (2013) Cytomegalovirus replication in the developing placenta. *In* M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: From Molecular Pathogenesis to Intervention*, vol. 2. Caister Academic Press.
- 6) Ogawa-Goto K, Ueno T, Oshima K, Yamamoto H, Sasaki J, Fujita K, Sata T, Taniguchi S, Kanda Y, Katano H. (2012) Detection of active human cytomegalovirus by the promyelocytic leukemia body assay in cultures of PBMCs from patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation, *J Med Virol* 84:479-86
- 7) 片野晴隆, 佐藤由子, 佐多徹太郎, 長谷川秀樹 (2012) 病原体の同定. *病理解剖マニュアル病理と臨床* 30: 269-77.
- 8) Yasuda K, Sugiura K, Ishikawa R, Kihira M, Negishi Y, Iwayama H, Ito K, Kimura H, Kosugi I, Akiyama M. (2012) Perinatal cytomegalovirus-associated bullae in an immunocompetent infant. *Arch Dermatol*. 2012, 148:770-2.
- 9) Arai Y, Tsuchida T, Kosugi I, Kawasaki H, Meguro S, Kinoshita M, Baba S, Maeda M, Shinmura Y, Tsutsui Y, Iwashita T. (2012) Effects of intrapulmonary viral tropism and cytokine expression on the histological patterns of cytomegalovirus pneumonia. *Pathol Int*. 62:628-39.

2. 学会発表

- 1) Yamada S, Fukuchi S, Hashimoto K, Katano H, Sato Y, Fukui Y, Inoue N. Effect of cytomegalovirus infection on placenta in a guinea pig model. International Federation of Placenta Association Meeting 2012, Hiroshima, 2012.9.
- 2) Hashimoto K, Yamada S, Fukuchi S, Katano H, Sato Y, Kato M, Moriishi K, Inoue N. Immunization of pregnant guinea pigs with glycoprotein B (gB). 4th Congenital CMV Conference & 14th International CMV/beta-herpesvirus Workshop, San Francisco, 2012.10.
- 3) Yamada S, Fukuchi S, Hashimoto K, Katano H, Sato Y, Inoue N. Establishment of an *ex vivo* culturing method for guinea pig placental tissues and analysis of virus spread in the tissues. 同上.
- 4) Tabata T, Petitt M, Fang-Hoover J, Rivera J, Nozawa N, Shiboski S, Inoue N, Pereira L. Cytomegalovirus impairs cytotrophoblast-induced lymphangiogenesis and vascular remodeling in an *in vivo* human placentation model. 同上.
- 5) Pereira L, Fong A, Petitt M, Maidj E, Fang-Hoover J, Nozawa N, Zydek M, Tabata T, Finke D, Logahvi S, Pepkowitz S, Inoue N, Ogunyemi D. Congenital cytomegalovirus infection identified in pregnancies complicated by idiopathic intrauterine growth restriction. 同上.
- 6) Pereira L. Models for Study of HCMV Replication and Rescue of the Developing Placenta. 同上.

- 7) Kosugi I, Sakao M, Kawasaki H, Arai Y, Iwashita T, Ohtsuki Y, Shimizu S, and Tsutsui Y. Human cytomegalovirus infection of placental villus endothelial cells and pericytes during the late phase of congenital infection. 同上.
- 8) 橋本楓、山田壮一、福地早希、片野晴隆、佐藤由子、加藤みなみ、森石恆司、井上直樹. モルモット妊娠動物モデルを用いたサイトメガロウイルスワクチン開発の基礎検討 第 27 回ヘルペスウイルス研究会、愛知、2012.6.
- 9) 山田壮一、福地早希、金井亨輔、片野晴隆、佐藤由子、井上直樹. モルモット胎盤組織培養系の樹立とウイルス局在解析. 同上.
- 10) 橋本楓、山田壮一、片野晴隆、福地早希、佐藤由子、森石恆司、井上直樹. モルモット妊娠動物モデルを用いたサイトメガロウイルス糖蛋白 B サブユニットワクチンの効果機序の解析 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012.11.
- 11) 福地早希、山田壮一、橋本楓、片野晴隆、佐藤由子、森石恆司、井上直樹. モルモットサイトメガロウイルス (GPCMV) を用いた先天性感染病態の解析 同上.
- 12) 山田壮一、福地早希、金井亨輔、片野晴隆、佐藤由子、井上直樹. モルモット胎盤組織培養系の樹立とウイルス局在解析 同上.
- 13) 中村浩幸、廖華南、南佳ほり、阿久津英憲、梅沢明弘、井上直樹、藤原成悦. ヒト人工多能性幹細胞を用いた神経幹細胞への実験的 HCMV 感染系の確立. 同上.
- 14) 佐々木純、上野智規、片野晴隆、佐多徹太郎、後藤希代子. HCMV 臨床分離株の上皮細胞-細胞間感染の PML 法による機構解析 同上.
- 15) 藤田 和将、上野 智規、片野晴隆、後藤 希代子. リアルタイム PCR 法を用いた HCMV UL144 遺伝子の遺伝子型識別および定量法の開発 同上.
- 16) 片野晴隆. エイズ剖検例における日和見感染症と腫瘍の実態. 第 26 回 日本エイズ学会学術集会総会、横浜、2012.11.
- 17) 小杉伊三夫、鈴木万幾子、河崎秀陽、新井義文、大月寛郎、岩下寿秀、筒井祥博. ヒトサイトメガロウイルス感染胎盤における絨毛血管内皮細胞及び間質細胞の解析 第 101 回日本病理学会総会、東京、2012.4.
- 18) 新井義文、小杉伊三夫、河崎秀陽、岩下寿秀、筒井祥博. サイトメガロウイルス肺炎の病変形成に関する考察 同上.
- 19) 河崎秀陽、小杉伊三夫、新井義文、岩下寿秀、筒井祥博. サイトメガロウイルス大脳急性感染期における integrin $\beta 1$ 発現と感染分布との関係. 同上
- 20) 小杉伊三夫、坂尾万幾子、河崎秀陽、新井義文、大月寛郎、岩下寿秀. ヒトサイトメガロウイルスの胎盤血管内皮細胞及び血管周囲細胞への感染と胎盤障害の病理. 第 27 回ヘルペスウイルス研究会、愛知、2012.6.
- 21) 河崎秀陽、小杉伊三夫、新井義文、岩下寿秀、筒井祥博. マウスサイトメガロウイルス大脳急性感染期における感染分布の解析：ウイルス粒子動態と integrin $\beta 1$ 発現の関係. 同上.
- 22) 坂尾万幾子、小杉伊三夫、新井義文、河崎秀陽、岩下寿秀、宮嶋裕明、筒井祥博. マウスサイトメガロウイルス胎盤内感染モデルを用いた胎仔脳におけるウイルス感染動態とミクログリア/マクロファージ反応の解析：第 53 回日本神経病理学会総会学術研究会、新潟、2012.6.
- 23) 松村佳代子、小杉伊三夫、新井義文、河崎秀陽、岩下寿秀、仲瀬裕志. サイトメガロウイルス感染合併炎症性腸疾患マウスモデルを用いた病態解析：第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012.11.
- 24) 坂尾万幾子、小杉伊三夫、新井義文、河崎秀陽、岩下寿秀、宮嶋裕明、筒井祥博. マウスサイトメガロウイルス胎盤内感染モデルを用いた胎仔脳におけるウイルス感染動態とミクログリア/マクロファージ反応の解析. 同上.
- 25) 小杉伊三夫、坂尾万幾子、河崎秀陽、新井義文、大月寛郎、岩下寿秀. ヒトサイトメガロウイルスの胎盤血管内皮細胞及び血管周囲細胞への感染と胎盤障害の病理 同上.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
得られたヒト型抗体について申請予定
2. 実用新案登録・その他
なし

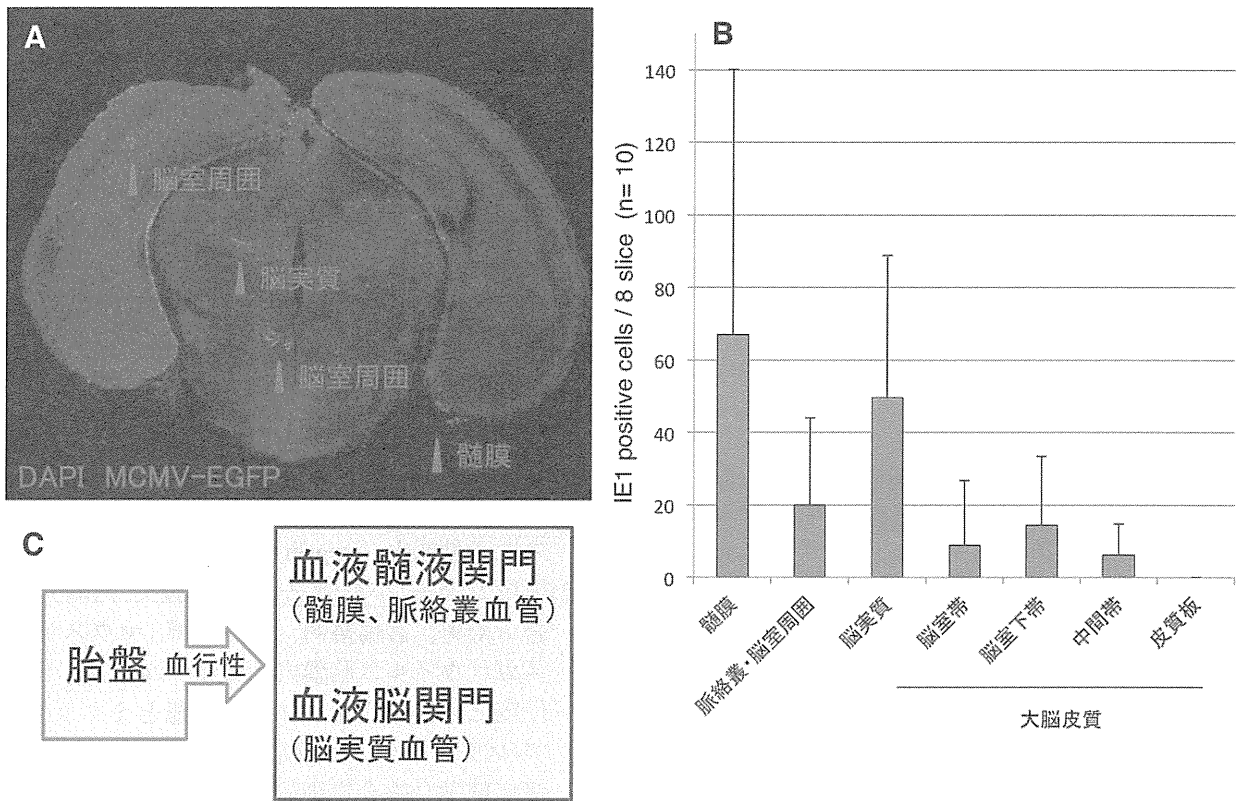


図1 マウス胎盤内直接接種モデルにおける脳内感染細胞の分布と予想される感染経路 (A: EGFP の緑色を観察し易い赤色に変換)

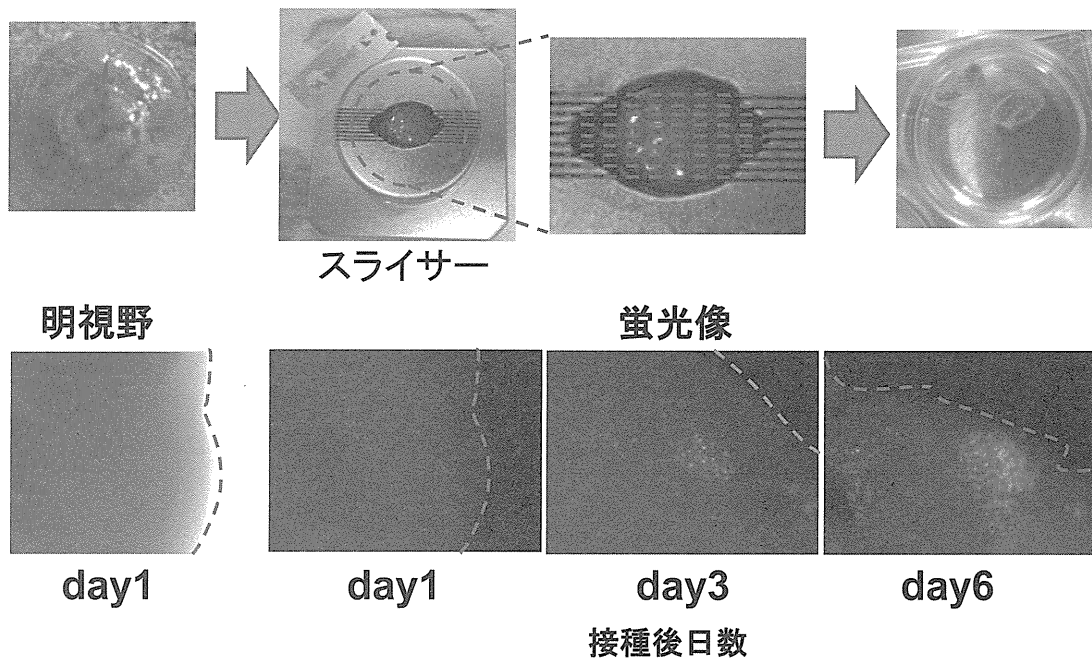


図2 培養胎盤組織片の作製と GPCMV 増殖像。赤色蛍光蛋白発現 GPCMV 感染後の cell-to-cell 様での増殖を赤色蛍光で観察した。

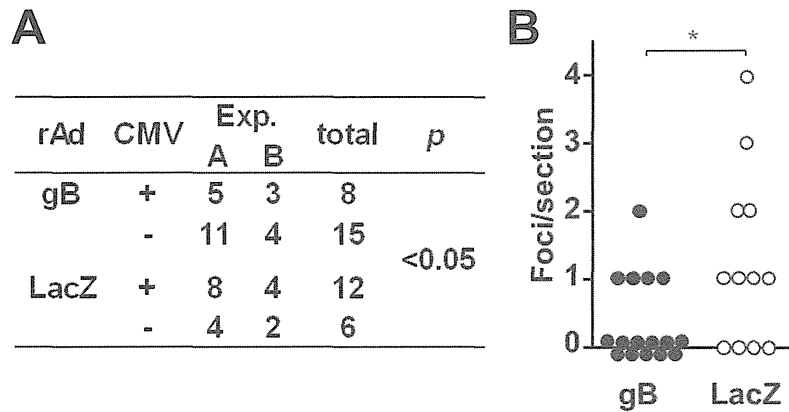


図3 A. rAd-gB- と rAd-LacZ で免疫した妊娠モルモットの胎盤内における GPCMV 感染細胞巢の陽性率(A)と切片ごとの GPCMV 感染細胞巢の数 (B) の比較。(A) 実験は A, B の2回行い、total にはその合計を示した。(B) Exp.A で得られた結果。*は gB と LacZ の2群で有意差があることを示す。(Mann-Whitney 検定)

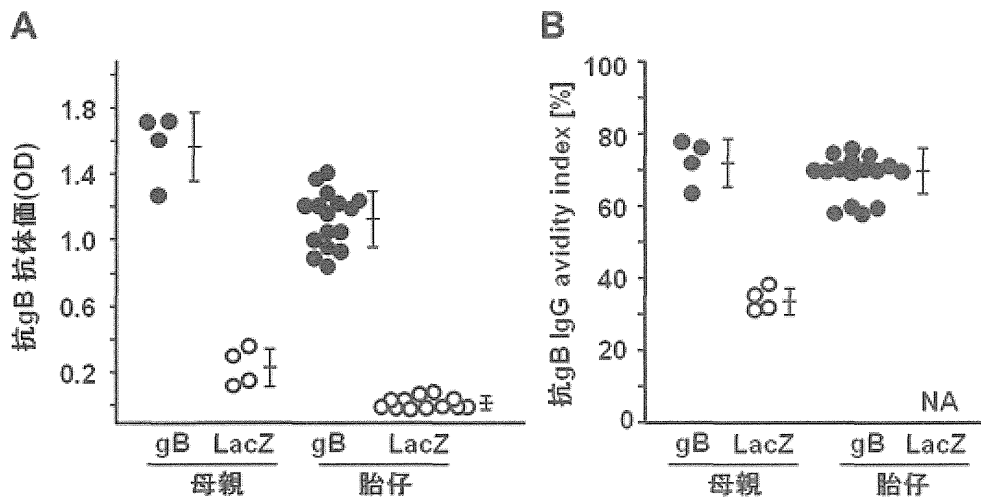


図4 gB 免疫群と LacZ 免疫群母仔の抗 gB 抗体の抗体産生の確認: (A)gB 群●及び LacZ 群○の母親各 4 個体及びその胎仔について、抗 gB 抗体の抗体価を ELISA にて測定し吸光度(414nm)で比較した。(B)同様に、抗 gB 抗体の avidity を測定し、avidity index を算出した。

創薬研究における人由来初代細胞および幹細胞の利用円滑化に向けた研究

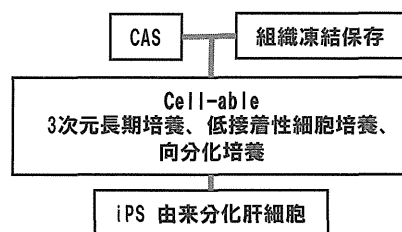
国立成育医療研究センター
臨床研究センター
絵野沢 伸
平成22年4月～平成25年3月

研究要旨 手術摘出検体からのヒト初代肝細胞の研究利用方法の拡大と、幹細胞分化肝細胞の創薬研究への応用可能性を検討した。本研究において官民共同研究のコアである細胞アレイ (Cell-able) 培養では、接着性が低く培養には適さないが個人差を打ち消すことができる 50 人の肝臓由来プールド肝細胞の培養が可能となり、経日的に薬物代謝活性を検出することに成功した。また長期培養時における網羅的遺伝子解析の結果、平面培養よりも初期遺伝子発現を維持できることがわかった。当初、細胞アレイ (Cell-able) 培養では牛血管内皮細胞あるいはマウス線維芽細胞といったフィーダー細胞の使用が推奨されたが、培地の改良により、無フィーダー細胞での長期培養も可能となった。一方、新しいフィーダー細胞として羊膜上皮細胞も優れることがわかった。わが国のヒト由来研究資源の柱である手術摘出肝組織からのヒト初代肝細胞分離技術の開発ではクエン酸加ユーロコリンズ液による初期灌流が分離生肝細胞数を増加させることを見出した。またブタ肝組織と CAS 装置を用いて開発した凍結肝組織から肝細胞を分離する技術をヒト肝組織に応用し、薬物代謝活性を有する生肝細胞の分離に成功した。同じく手術摘出肝組織の研究利用で問題となるがん細胞の微小転移について、マクロからミクロまでの連続的な観察が可能となる全肝 thin slice 法の開発により化学療法後では微小転移内に生きたがん細胞はほとんどないことがわかった。ヒト iPS 細胞の肝細胞様細胞への分化誘導研究では、ヒト iPS 細胞で、分化誘導後 day 3 もしくは day 4 に PI3K 阻害剤の LY294002 を添加することで、胚体内胚葉で発現する SOX17 及び GSC の mRNA 発現が増加し、胚体内胚葉の効率的な分化に成功、肝細胞分化培養時における継代と凍結保存条件の最適化を行なった。また細胞内因子の視点から分化誘導を規定する可能性のある肝臓発生初期過程の non-coding RNA 候補について検討を行なった。

研究分担者

- | | |
|-------------------|-------|
| (1) 国立がん研究センター | 落谷孝広 |
| (2) 名古屋市立大学 | 松永民秀 |
| (3) 東京医科大学 | 土田明彦 |
| (4) 株式会社アビー | 大和田哲男 |
| (5) 田辺三菱製薬株式会社 | 山田泰弘 |
| (6) 東洋合成工業株式会社 | 池谷武志 |
| (7) 株式会社トランスパレント | 城村友子 |
| (8) (株) 生物資源応用研究所 | 桜川宣男 |

の肝細胞様細胞分化誘導法を開発・改良し、創薬研究に使用可能な水準の薬物代謝活性、同誘導能、実用に耐えうる細胞数の確保をめざす。また、分化細胞を用いた肝がん発症を薬効薬理試験モデルとして検討し、新たな動物実験代替法をめざすものである。



A. 研究目的

創薬研究に必須のヒト由来初代肝細胞・組織の保存と長期培養技術を、国立成育医療研究センターの手術摘出肝組織および市販凍結人肝細胞を用い、開発・改良する。保存は食品の冷凍保存の革新的技術である磁界内 CAS 凍結法を発展させる。長期培養は、東洋合成工業製作の細胞アレイ基板 Cell-able を用い、トランスパレント社が有する培養プロトコールによる肝細胞の長期機能維持培養法をヒト肝細胞向けに改良する。一方、初代肝細胞に代わり発展性が期待される幹細胞から

B. 研究方法

- 1) プールド肝細胞の長期培養 (山田、絵野沢)
50 ドナーをプールした凍結ヒト肝細胞 (Lot No. 0901227) と浮遊型凍結ヒト肝細胞 (Lot No. 694、713、763) は XenoTech LLC から購入した。培養は三次元培養用細胞アレイ、Cell-able (トランスパレント) を用いた。凍結ヒト肝細胞の解凍な

らびに死細胞除去は XenoTech 社のプロトコールによった。

Cell-able の使用に際してトランスパレント社のプロトコールに従い、48 時間前に牛大動脈内皮細胞株 HH 細胞を 1 穴当たり 8×10^3 細胞播種した。その後、各肝細胞を 1 穴当たり生細胞として 2×10^4 細胞播種した。3 ロットを混合する場合は、それぞれのロットについて生細胞が均等に 1/3 づつとなるように調整した。肝細胞播種後 24 時間は肝細胞プレート接着用培地 (KHEM5310、株式会社ケー・エー・シー) を用いた。その後は Williams E 培地 (GIBCO) を基本とし、5%FCS、 $0.1 \mu\text{mol/L}$ デキサメタゾン、 $1 \mu\text{mol/L}$ インシュリン、 $6.25 \mu\text{g/mL}$ トランスフェリン、 6.25ng/mL セレニウム、 $50 \mu\text{g/mL}$ マトリゲルを含む培地を用いた。

2) 三次元培養ならびに混合培養の創薬研究上の価値評価 (池谷、城村、絵野沢)

凍結ヒト肝細胞は Xenotech (lot HC1-18) を使用した。培養には三次元培養用細胞アレイ、Cell-able (96 穴) を使い、対照として 96 穴コラーゲンコートプレート (住友ベークライト) を用いた。Cell-able の使用に際してフィーダー細胞としてマウス 3T3 細胞を 1 穴当たり 8×10^3 細胞播種した。その後、肝実質細胞は 1 穴当たり生細胞として 2×10^4 細胞播種した。培地は RM101 (トランスパレント社) を用いた。

培養は 14 日間行い、遺伝子発現を Agilent 社製 microarray によって測定した。

3) 新しいフィーダー細胞の検討 (桜川、絵野沢)

細胞アレイ (Cell-able) の使用に際して製造元のトランスパレント社のプロトコールに従い、48 時間前に各種フィーダー細胞を 24 穴プレート 1 穴当たり 1×10^5 細胞播種した。フィーダー細胞として、牛大動脈内皮由来細胞株 HH、正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF; Neonatal normal human dermal fibroblast)、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC; Human umbilical vein endothelial cell)、不死化ヒト羊膜上皮細胞 1 を用いた。対照としてフィーダー細胞を播種しない条件を置いた。肝実質細胞は国立成育医療研究センターにおいて得られる手術摘出検体から分離した。肝細胞は 1 穴当たり生細胞として 1×10^5 細胞播種した。

4) 手術摘出肝組織からの肝実質細胞採取効率化 (絵野沢)

雄性 SD ラット (200~300g) を使い、エンフルラン麻酔下で開腹の後、門脈から灌流液、コラゲナーゼ液を流し、肝細胞を分離した。肝実質細胞の生細胞率、生細胞数はトリパンプルー排除法により計測した。温阻血は門脈カニューレシヨンの

後に肝門部の門脈、肝動脈を結紮することによった。灌流液は、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} free-Hanks 液、ユーロコリンズ液、CPD (Citrate-Phosphate-Dextrose) 加ユーロコリンズ液を用いた。

5) 人組織・細胞の凍結における CAS 装置の評価 (大和田、絵野沢)

家畜ブタ (Large-Yorkshire, Landrace, Duroc 3 系統混合系) 2kg、生後 10 日前後を使用した。吸入麻酔下で腹部切開の後、門脈にカニューレシヨンをし、脱血後、全肝を取り出した。取り出した全肝 (120g 前後) に 10% dimethylsulfoxide、10% 牛胎仔血清を含む DMEM 培地を 200mL 灌流し、4 つに分割した。それぞれを丈夫なビニール袋 (フリーザー用のジッパー付袋) に入れブライン CAS 槽、 -30°C 低温槽、 -80°C 超低温槽で凍結した。その後、液体窒素中で 3~15 日間保存した後に解凍し、コラゲナーゼ灌流法で肝実質細胞を分離した。組織内温度はデータロガーによって測定した。肝実質細胞の生細胞率はトリパンプルー排除法によった。

生体肝移植時の余剰肝組織 (120g 前後) に 10% dimethylsulfoxide、10% 牛胎仔血清を含む DMEM 培地を 200mL 灌流し、ビニール袋 (フリーザー用のジッパー付き袋を使用) に入れ上記の方法で凍結した。その後、液体窒素中で 7 日間保存した後に解凍し、コラゲナーゼ灌流法で肝実質細胞を分離した。解凍は急速解凍方法、すなわち、液体窒素保管容器から室温下に取り出し 1 分間放置の後、温浴中で 1 分間加温、さらにビニール袋内に予め 38°C に温めた生理的食塩水 250mL を流し込んだ。肝組織の消化は通常のコラゲナーゼ消化法に加え、DNase I (162.5unit/mL) を添加した。

肝実質細胞の生細胞率はトリパンプルー排除法によった。薬物代謝活性はテストステロン 6β 水酸化によった。

6) 手術摘出肝組織における微小転移の診断に向けた標本作製法の開発 (土田)

多発性両葉肝転移に対し、肝区域切除以上を施行した 5 例を対象とした。症例 1 と 4 は二期的に肝右葉切除を行った。術前の肝臓の画像診断は、造影 CT は 1mm 厚、EOB-MRI は 3mm 厚で撮像し、化学療法前後に撮影したすべての造影 CT と EOB-MRI 画像を参考に、対象となる肝区域または葉切除部位の転移個数を算出した。切除肝区域または肝葉は以下の方法で薄切検体を作成した。まず切除肝は割を入れずに Whole でホルマリンに浸け、肝動脈または胆管よりホルマリンを 4 週間灌流した。その後 50%、70% のアルコールの持続注入を 1 週間行い十分に脱水した。食用寒天粉末を用い、沸騰溶解させて 3.5% 寒天溶液を作成した。肝臓は直

方体のプラスチック容器に移し、粗熱をとった寒天溶液で満たし、1夜、冷蔵庫にて寒天を固めた。翌日、直方形に固定された寒天に撮影位置マーカーとして径1mmの穴を2か所開けた。その後、市販のミートスライサーを用い0.5-1mm厚に均等にスライスした。スライスした肝は定位置より写真撮影し、連続画像として記録した。その後、スライスした肝は裸眼またはルーペを用いて肉眼観察し、転移巣の存在する可能性のある部位をpoint outした。同部位をパラフィン包埋し、HE染色にて検鏡、最終病理診断とした。

7) LY294002によるiPS細胞の内胚葉分化(松永、山田)

ヒトiPS細胞(#25:Tic)は、ヒト胎児肺線維芽細胞MRC-5にOCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYCを導入して樹立されたものであり、国立成育医療研究センター研究所梅澤弘明博士より供与された。フィーダー細胞はMEFを使用した。

ヒトiPS細胞の内胚葉への分化は、ヒトiPS細胞が培養ディッシュに対し、未分化コロニーの占める割合が約70%になった状態で開始した。また、分化は0.5%FBS、100ng/mLactivinAを含むRPMI+GlutaMaxmediumで3日間培養後、2%KnockoutSerumReplacement(KSR)、100ng/mLactivinAを含むRPMI+GlutaMaxmediumで2日間培養することで行った。また、LY294002をdimethylsulfoxide(DMSO)に溶解したものを最終濃度1、10、25、50μMとなるように培地に添加した。なお、activinA処理開始日をday0とし、50μMはday0で、その他の濃度はday1で添加を開始した。Controlは、DMSOが最終濃度0.1%となるように加えたものを用いた。なお、activinA処理開始日をday0とし、LY294002を添加するタイミングをday2、3、4と分け、分化を行った。ControlとしてはDMSOが最終濃度0.1%となるように加えたものを用いた。またbFGF添加群には、最終濃度5ng/mLとなるように、培地にbFGFを添加した。

8) ヒトiPS細胞由来肝細胞に至適な剥離・凍結保存法の検討(松永、山田)

国立成育医療研究センターにおいて樹立されたヒトiPS細胞株(Windy)を用いた。ヒトiPS細胞をactivinA処理することで内胚葉に、続いてdimethylsulfoxideにて肝芽細胞に分化させ、oncostatinM、dexamethasone、hepatocytegrowthfactorによって成熟させる方法にて肝細胞に分化誘導した。

立体培養、培地及び低分子化合物X添加による肝細胞への分化誘導に与える影響の検討は、上記分化法を基に行った。立体培養の効果の検討は、

肝細胞の分化誘導開始12日目にcollagenasetypeIVとAccutaseを併用して剥離を行い、MatrigelもしくはCell-Able上に播種して行った。培地の検討は、肝細胞への分化誘導に使用する培地としてプライマリーセル社のCOSmedium004forHepatocyte/F12basedもしくはトランスパレント社のRM101を用いて行った。低分子化合物X添加の検討は、分化誘導時に低分子化合物Xを添加し行った。分化誘導終了後、薬物代謝酵素活性の測定を行った。

剥離及び凍結保存の条件検討は、以下の通り行った。内胚葉への分化誘導後、細胞外マトリックスとしてゼラチンもしくはMatrigel上に継代した。剥離・凍結保存は肝芽細胞誘導後に行い、Matrigel上に継代・播種した。剥離はcollagenasetypeII、collagenasetypeIV(IV)もしくはdispaseとAccutase(A)の併用もしくはtrypsin-EDTAを、保存はCellReservoirOne、霊長類ES/iPS細胞用凍結保存液もしくはセルバンカーを用いた。分化後の細胞について、mRNA発現解析及び薬物代謝酵素活性の測定を行った。尚、代謝物測定は田辺三菱製薬株式会社薬物動態研究所にて行った。

9) 肝細胞の分化誘導技術の効率化(落谷)

すでに開発したHIFC分化誘導方法を改良してヒトiPS細胞からの肝細胞分化及び成熟化促進を計る。本年度は分化誘導の過程を大幅に効率化する目的で、従来の増殖因子による分化誘導効率を促進する因子を検索する事に重点をおき、特に本年度は初年度の成果で見いだされた肝臓の分化成熟に関与するmicroRNA148aに焦点を絞り、マウス幼若肝細胞の成熟化促進の有無を様々なパラメーターから検討した。さらに、このマイクロRNAの効果も、従来のHIFCサイトカインカクテルで誘導した未成熟肝細胞様細胞に導入し、分化成熟等を検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験およびヒト由来検体利用実験については各研究機関においてそれぞれ研究計画申請を行い、許可を受けて行った。

C. 研究結果

1) プールド肝細胞の長期培養

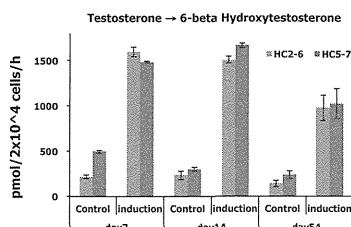
6種のCYP活性および2種の抱合酵素活性の経日変化を記した。解凍時(Day0)活性はすべての場合で3ドナープール検体の方が50ドナープール検体より高い値を示した。CYP1A2活性(A)、CYP2B6活性(B)、CYP2C19活性(D)は7日目以降活性および誘導剤に対する反応性が認められなかった。CYP2C9活性(C)は3ドナープール検

体で検出する活性が持続し、Day14 ではリファンピシンによる活性誘導が見られた。CYP2D6 活性 (E) も 3 ドナープール検体では活性が Day14 まで認められ、さらに CYP3A4/5 活性 (F) は 3 ドナー、50 ドナーそれぞれのプール検体で Day28 まで活性が持続、また Day14 ではリファンピシンによる活性誘導が見られた。薬物代謝第 II 相反応である抱合酵素活性 (UDP グルクロン酸抱合活性 (G)、硫酸抱合活性を (H)) はさらに高い活性が Day28 まで持続した。

2) 三次元培養ならびに混合培養の創薬研究上の価値評価 (池谷、城村、絵野沢)

凍結肝細胞 4 ロットを用いてフィーダーなしの状態と従来のように HH 細胞をフィーダー細胞として用いた場合の CYP 活性の比較をした。テストステロン 6 β 水酸化活性、テストステロングルクロン酸抱合、フェナセチン脱エチル化のほぼすべての場合でフィーダーなしの状態の方が高い活性を示した。CYP 誘導能も同じくフィーダーなしの場合の方が絶対値として高かった。すなわち従来のフィーダー細胞使用下でなくとも高い活性を維持することがわかった。この理由のひとつとして、トランスパレント社がヒト肝細胞用に開発した新規培地、RM-101 の使用が挙げられる。本培地は複数の使用者からも高い評価を得ているので、今後、Cell-able とともにヒト肝細胞培養系の一翼を担うものと期待される。下の図はさらに 54 日間培養した時のデータである。

Long-lasting CYP Activity of Cryopreserved Human Hepatocytes Cultured on Cell-able



各種フィーダー細胞との共培養の場合、CYP 活性は、ほぼすべての凍結ヒト肝細胞ロットにおいて牛大動脈内皮由来細胞 HH よりマウス線維芽細胞 3T3 の方の維持と誘導に優れることがわかった。牛由来細胞は家畜牛の防疫対策のため、米国には輸出ができない。一方、マウス 3T3 細胞は米国の細胞バンク、ATCC から譲渡を受けられる。今回の結果は Cell-able を米国で販売する際に極めて有用なものである。

網羅的遺伝子解析では 14 日間培養した肝細胞において 2 倍以上の変化 (2 倍以上の発現上昇あるいは 0.5 倍以下の発現低下) を起こした遺伝子数は、Cell-able で 6,900、対照の平面培養群で

8,586 と、明らかに Cell-able 群で少なかった。すなわち 14 日間の培養を経ても Cell-able による培養は、初期発現値との相違が少なかった。

また、14 日間培養した肝細胞において培養穴 (Well) 間の発現を比較したところ、明らかに Cell-able 群でばらつきが少なく抑えられていた。すなわち 14 日間の培養を経ても Cell-able による培養は、各試験穴間の誤差が少なく、均一に保たれていた。

3) 新しいフィーダー細胞の検討 (桜川、絵野沢)

3 回の予定手術において、32 歳男性、28 歳男性、39 歳女性の肝組織を得て肝実質細胞を分離することができた。それぞれ生細胞率は 88.2%、86.9%、82.5%であった。これらを 4 種類のフィーダー細胞上ならびにフィーダーのない環境下で 13 日間培養したが、各フィーダー細胞上ならびに無フィーダー細胞培養で大きな相違はなかった。この中で、不死化羊膜細胞との共培養は、ヒト肝実質細胞のアルブミン合成能を比較的高く維持した。不死化羊膜上皮細胞のアルブミン合成能は、 $0.010 \pm 0.001 \mu\text{g}/\text{well}/24\text{hr}$ で、ヒト肝細胞が産生するアルブミンの概ね 1/100 であった。形態観察では、NHDF と不死化ヒト羊膜上皮細胞が肝細胞の生着に優れるようであった。ただし、不死化ヒト羊膜上皮細胞は増殖能が高く、細胞アレイの円形枠内を超して隣接する細胞集団と交通 (Bridging) することがあった。

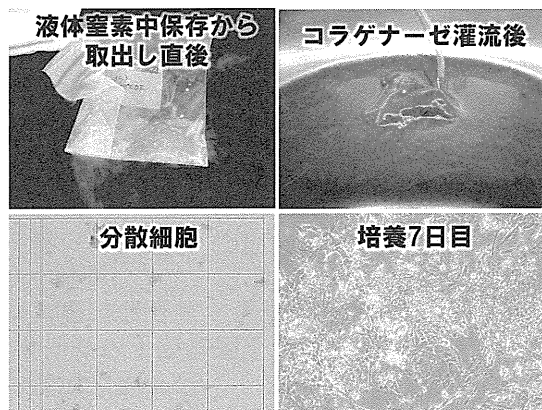
4) 手術摘出肝組織からの肝実質細胞採取効率化 (絵野沢)

30 分の温阻血後の肝細胞分離で、生細胞率は 83.5% から 61.6% に低下し、生細胞数は著しく低下した (対照 4.57 ± 0.39 vs 温阻血群 0.76 ± 0.21 、それぞれ $\times 10^8$)。温阻血肝を CPD 加ユーロコリンズ液で灌流すると生細胞数は $2.37 \pm 0.12 \times 10^8$ に増加した。CPD を加えないユーロコリンズ液ではそれほど顕著な改善は見られなかった。さらに 60 分の温阻血後に分離すると、生細胞率は 52.2%、生細胞数は $0.70 \pm 0.04 \times 10^8$ に低下した。この時も CPD 加ユーロコリンズ液で灌流すると生細胞数は $1.68 \pm 0.34 \times 10^8$ に改善した。すなわち 60 分温阻血という過酷な条件下においても対照の 36.8% の回収率で生肝実質細胞が得られた。

5) 人組織・細胞の凍結における CAS 装置の評価 (大和田、絵野沢)

凍結方法、解凍方法を改良することによって肝組織が割れることなく常温に戻すことが可能となった。コラゲナーゼによる組織消化率は $59.9 \pm 16.6\%$ ($n=32$) で、生細胞率は $42.1 \pm 14.9\%$ ($n=32$)、最高で 80.2% に達した。生細胞数は 6.72

±9.84×10⁶ 個、0.90±1.07×10⁶ 個/g 消化肝重量であった。分離細胞のアンモニア除去能は、調べた8例のうち3例で検出できた。凍結保存用溶液にDMSOを入れない場合も組織消化はなされたが、懸濁液中に細胞の形態を保つものがほとんどなかった。凍結方法別では、有意な差はなかったが、A群でPower Setting 3とした場合に、生細胞率が50.4±15.3% (n=9) と最も高かった。また一部の細胞は培養が可能であった。



ヒト肝組織を用いた実験では、得られた細胞の生細胞率は72.4%で形態的にも膜表面の状態がよく保たれていた。コラゲナーゼによる組織消化率は12.0%で、生細胞数1.8×10⁷ 個、3.0×10⁶ 個/g 肝湿消化重量、分離細胞の薬物代謝活性は3.7fmol/hr/cellであった。この値は市販凍結ヒト肝細胞の活性平均値(15.7±4.6fmol/hr/cell)の23.6%であった。

6) 手術摘出肝組織における微小転移の診断に向けた標本作製法の開発 (土田)

化学療法前後、薄切肝標本の病理診断での転移数について、造影CTとEOB-MRIではEOB-MRの検出感度が優れていた。症例1はEOB-MRI上の転移個数は化学療法前の19個から化学療法により12個の減っていた。薄切標本の肉眼所見では12個がpoint outされ、すべてが病理組織で癌であった。術後に化学療法を施行したが、4カ月後に残肝再発し、8カ月後に皮膚と脾臓に転移を来した。症例2では化学療法前には単純CTのみが施行されており、転移個数をカウントは出来なかった。化学療法後のEOB-MRIでは12個、薄切標本の肉眼所見では16個がpoint outされ、そのうち13例が癌であった。術前にEOB-MRIで描出されず、かつ薄切検体にて肉眼的に転移巢の可能性のある部位として4か所をpoint outした。うち1個に微小転移を認めた。病巣の大きさは径3mmで肉眼的に白色調を呈しており、病理組織学的には癌細胞の壊死は少なくviableであった。他の3か所の径は1mm程度であり癌細胞を認めなかった。同部は単一細胞レベルでの肝細胞壊死とグリソ

ン鞘の限界板の乱れ、細胆管の増生所見、脂肪化がみられ、薬剤性肝障害に伴う再生結節と判断された。Outcomeについては術後に化学療法は施行せず、術後11カ月で無再発生存中である。症例3は化学療法前後のEOB-MRI上の後区域病巣数はいずれも3個であった。薄切標本の肉眼所見では10個がpoint outされ、そのうち3例が癌であり、すべてがEOB-MRIで病巣を指摘された部位であった。病巣はほとんど線維化しており、辺縁にviableな癌細胞を認めた。癌でなかった7病巣の径は1mm程度であり、いずれも高度に脂肪変性を伴った小葉単位の結節であった。症例4は手術所見は肉眼的に癌の遺残があった(R2)。術前EOB-MRIで描出された結節数、薄切標本の肉眼所見、病理組織所見のいずれも4個であり、すべて一致した。癌遺残部から残肝再発した。症例5は化学療法前後のEOB-MRI上の後区域病巣数はいずれも10個であった。薄切標本の肉眼所見では14個がpoint outされ、そのうち10個が癌であり、すべてEOB-MRIで描出された病巣であった。癌でなかった残りの4病巣の径は1mm程度であり、いずれも高度に脂肪変性を伴った小葉単位の結節であった。

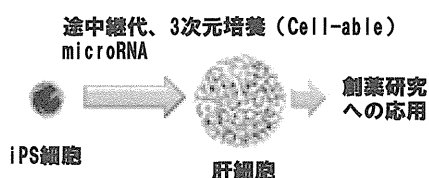
7) LY294002によるiPS細胞の内胚葉分化 (松永、山田)

ヒトiPS細胞は、50 μMのLY294002添加により細胞死が引き起こされ、mRNAの回収が不可能であった。Day 1での25 μM LY294002添加により、内胚葉マーカーであるSOX17、GATA6のmRNA発現が増加した。しかし、胚体内胚葉で発現しているマーカーであるGSCのmRNA発現は減少した。一方、1、10 μMのLY294002添加により、分化した細胞の内胚葉マーカーのmRNA発現が、controlであるactivin A単独群と比較して同等、もしくは減少が見られた。

ヒトiPS細胞は、25 μMのLY294002をday 2に添加することで、胚体内胚葉で発現しているマーカーであるSOX17のmRNA発現の増加がみられたが、同じく胚体内胚葉で発現しているマーカーのGSCのmRNA発現は減少傾向が見られた。Day 3もしくはday 4に25 μMのLY294002を添加することで、胚体内胚葉で発現しているマーカーのSOX17及びGSCのmRNA発現が増加した。また、day 2以降のLY294002の添加により、分化した細胞のmRNA発現が未分化マーカーや中胚葉マーカーでは変化なし、もしくは増加傾向が見られた。また、ヒトiPS細胞の内胚葉への分化の際、day 0からのbFGF添加により、胚体内胚葉で発現しているマーカーのSOX17及びGSCのmRNA発現の大きな差は認められなかった。

Day 12まで分化させた細胞において、25 μM

LY294002 を day 2 に添加した群では、胎児の肝細胞で発現している薬物代謝酵素である CYP3A7、肝細胞分化初期に発現する α -fetoprotein (AFP) が、control と比較して減少した。25 μ M LY294002 を day 3 に添加した群では、control と比較して uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1)、tyrosine aminotransferase (TAT) の mRNA 発現が増加したものの、CYP3A7 の mRNA 発現は減少した。25 μ M LY294002 を day 4 に添加した群では、control と比較して TAT の mRNA 発現が増加したものの、AFP、forkhead box A2 (FOXA2)、肝細胞マーカーである albumin (ALB) の mRNA 発現は減少した



8) ヒト iPS 細胞由来肝細胞に至適な剥離・凍結保存法の検討 (松永、山田)

肝細胞の分化誘導開始 12 日目に一旦継代した後、そのまま 2 次元あるいは 3 次元 (Cell-able) にて分化誘導後の細胞について、薬物代謝酵素活性測定を行った。その結果、ミダゾラム 1'-水酸化活性 (CYP3A) をはじめ、各種 CYPs による活性が認められた。フェナセチン 0-脱エチル化活性 (CYP1A)、ブプロピオン水酸化活性 (CYP2B) 及びブフラロール 1'-水酸化活性 (CYP2D) は、RM101 を用いた 3 次元培養群において高い傾向が認められた。立体培養を行い、COS medium 004 for Hepatocyte/F12based を用いて低分子化合物 X を添加した群でジクロフェナク水酸化活性 (CYP2C) 及び 7-ヒドロキシマリリングルクロン酸抱合活性 (UGT) は増加が認められたものの、ブプロピオン水酸化活性 (CYP2B) 及びミダゾラム 1'-水酸化活性 (CYP3A) は検出限界以下であった。肝細胞分化後の細胞について mRNA 発現解析を行ったところ、肝細胞マーカーである albumin (ALB)、tyrosine amino transferase (TAT)、ヒト成人の主要な薬物代謝酵素である CYP3A4 等の発現が認められた。この条件を基本とし、肝芽細胞誘導後の細胞で剥離の条件検討を行った。3 種類の剥離液 (collagenase type II、collagenase type IV もしくは dispase) と Accutase を併用し比較したところ、3 種類の剥離液の間で肝細胞マーカー及び薬物代謝酵素の発現量に大きな差異は認められなかった。しかしながら、これらの細胞剥離液では単一細胞に剥離できず、細胞同士が接着したシート状となった状態での回収であった。剥離液として trypsin-EDTA を用い、細胞外マトリッ

スの検討を行ったところ、内胚葉分化後の継代時にゼラチン上に播種した細胞は、肝芽細胞分化後にシート状ではない状態での剥離が可能であった。また、肝芽細胞分化後に剥離を行わなかった群では、ゼラチンと Matrigel の間で肝細胞マーカーの mRNA 発現に大きな差異は認められなかった。肝芽細胞誘導後の細胞の剥離・凍結保存に至適な条件を詳細に検討するため、細胞外マトリックスとしてゼラチンと Matrigel の比較、剥離液として collagenase type IV と Accutase の併用と trypsin-EDTA の比較を行った。肝芽細胞誘導後の細胞の剥離に collagenase type IV と Accutase を併用した群では、肝芽細胞誘導後の細胞の剥離を行わなかった群と比較して肝細胞マーカー発現の大幅な減少が認められたが、trypsin-EDTA を使用した群ではその減少が抑制された。剥離液として trypsin-EDTA を用い、細胞外マトリックスとしてゼラチンを用いた群では、Matrigel を用いた群と比較して肝細胞マーカーの発現は同等であった。しかし、剥離液の処理時間を比較すると、ゼラチン群は 10 分間処理によって剥離が可能であったのに対し、Matrigel 群では剥離に 30 分を要した。

細胞外マトリックスとしてゼラチンを、剥離液として trypsin-EDTA を用いた条件で剥離した細胞を、セルバンカー、霊長類 ES/iPS 細胞用凍結保存液もしくは Cell Reservoir One を用いて凍結保存し、分化させたところ、セルバンカーを用いた群では、肝細胞マーカーである ALB、 α -fetoprotein (AFP) 及び TAT の発現の大幅な減少が認められた (Fig. 5)。一方で、CYP3A4 については霊長類 ES/iPS 細胞用凍結保存液を用いた群において最も高い発現量を示したが、生存細胞数は少なかった。ALB、TAT、プレグナン X 受容体 (PXR) については Cell Reservoir One を用いた群において最も高い発現量を示した。

これらの細胞において、肝細胞の重要な機能の一つである薬物代謝酵素活性を測定したところ、内胚葉分化後にのみ継代を行った群 (control) で各々の薬物代謝酵素により生成される代謝物が検出された。これらの代謝物は肝芽細胞分化後に継代を行った群で減少し、CYP1A2 により生成される代謝物は検出限界以下であった。また、Cell Reservoir One を用いて凍結保存を行った群では UGT 活性は減少し、CYP1A2、CYP3A4/5、SULT の活性は検出できなかったものの、CYP2C9 及び CYP2D6 については凍結保存を行わなかった群と比較して同レベルの活性が認められた。CYP2B6 及び CYP2C19 に関しては、すべての群において代謝物が検出出来なかった。

9) 肝細胞の分化誘導技術の効率化 (落谷)

成熟型の肝細胞分化誘導に深く関与する microRNA148a はメチル化の維持等に重要な分子として有名な DNMT を制御する事が明らかとなった。

この microRNA を幼若肝細胞へ導入する事により、DNMT1 の発現が抑制され、同時に肝細胞特異的な成熟肝細胞マーカーである microRNA122、アルブミン、トランスサイレチンなどの遺伝子が発現上昇したことから、肝細胞の分化あるいは成熟化に microRNA148b は、DNMT を介している事が示唆された。

D. 考察

薬物代謝活性には大きな個人差、人種差があると言われている。ヒト肝細胞の場合、複数ドナーの細胞を混合したプールド肝細胞ロットは接着培養ができないことが多い。フィーダー細胞を用いた細胞アレイ培養は接着能が低いロットの長期培養もできるとされ、本来、培養実験に使用できないプールド肝細胞でも培養による薬物動態研究を行える。本研究ではそれが確認された。新薬が上市された際には、ごくまれな CYP 多型の個人に対して起きる有害事象も問題視される。まれな多型を有する凍結肝細胞は入手困難であるが、幹細胞分化肝細胞様細胞であれば、まれな多型を有するロットの継続的な使用も可能になると考えられる。まれな多型を有するロットだけの実験を組むことは創薬研究の上で現実的ではないが、実際のポピュレーションを再現するプールド細胞が安定的に供給されれば、ヒト集団が示す反応性を培養レベルで再現することも可能となり、より安全な薬剤を効率的に選択できるようになる可能性がある。本研究はそのプラットフォームとして細胞アレイが有効であろうことを示唆するものである。網羅的遺伝子発現という新たな切り口からも、平面培養より優れることがわかった。つまり、Cell-able を用いた凍結ヒト肝細胞の培養は、通常の平面培養に比べ正常肝細胞の遺伝子発現状態を維持しながら培養でき、また実験上生じる穴間差も Cell-able を用いる方が小さいことがわかった。今まで薬物代謝活性、同誘導能として評価してきたことがさらに基礎的な細胞生物学的な現象としても裏付けられたものと考えている。

手術摘出肝組織からの肝実質細胞採取効率化は、移植用臓器の研究転用ができないわが国にとって必須の課題である。温阻血処置は当初の 10 分、15 分より大幅に延長し、最終的に 30 分から 60 分とした。そのような過酷な条件においても CPD 加 Euro-Collins 液による灌流が有効であった。コラゲナーゼ灌流法が血管系を利用していることから、クエン酸含有液が微小循環を復元してい

ることが考えられた。現在、この成果をもとに、手術摘出肝組織からの肝細胞分離にもクエン酸加溶液の灌流による脱血処置を行い、好成績を得ている。

また、人組織・細胞の研究利用に極めて重要な凍結保存について、ブタ肝組織で行なってきた研究を最後にヒト肝組織で検証した。得られた細胞は生細胞率が 72.4% と、凍結を経た細胞としては非常に高く、また薬物代謝活性も十分検出できた。これらのことから組織凍結は新しいヒト由来研究資源の凍結方法になり得ると考えられた。

前述のようにわが国の研究用ヒト組織は手術摘出組織に依存している。肝組織の場合、がん手術に伴って摘出される組織から正常肝細胞を採取することが行なわれている。この時、肉眼的に正常と考えられる組織中の微小転移の診断は以前から問題になっていた。その検討をマクロ切片の作成という新規技術、全肝 thin slice 法によって行なうことができるようになった。本年度は、実際の臨床検体である肝両葉多発転移に対する術前化学療法例を対象とし、術前の画像診断と切除検体の肉眼所見と病理組織所見を詳細に対比した。その結果、術前化学療法により微小転移巣は文字通り完全奏功を得て、病巣そのものが消失している可能性を示し得た。

ヒト iPS 細胞由来肝細胞は、ソースとなる iPS 細胞が増殖可能であること、多数の個人から iPS 細胞パネルを形成できることなどから創薬への利用に期待が高まっている。しかしながら、克服すべき技術上の課題は数多い。その中で、本研究グループでは培養・分化条件の改良、継代培養時の剥離のし易さと凍結保存について検討をした。ヒト iPS 細胞は、50 μ M LY294002 の添加で細胞死を引き起こした。分化初期の培養条件は、血清の濃度が 0.5% であり、細胞の生存には過酷な環境である。さらに、PI3K 阻害剤である LY294002 は濃度依存的に細胞死を引き起こすことが報告されており、50 μ M LY294002 の添加では解析不可能であったことから、濃度を低く使用する必要があると思われた。Real-Time RT-PCR の結果より、25 μ M の LY294002 を day 1 から添加することで、control と比較して SOX17 の mRNA が増加し、GSC の mRNA が減少した。iPS 細胞から内胚葉へ分化を行う際、SOX17 を早期に誘導することで、卵黄嚢を形成する臓側内胚葉 (SOX17+, GSC-) へ、分化開始後あるタイミングで SOX17 を誘導することで、将来肝臓に分化する能力を持つ胚体内胚葉 (SOX17+, GSC+) へ分化することが報告されている。そのため、day 1 に 25 μ M LY294002 を添加し、分化を行うことで、初期の段階から SOX17 が誘導され、SOX17+, GSC- の臓側内胚葉へ分化する細胞の割合が増加したことが示唆された。LY294002 添加時

期の検討では、day 3 もしくは day 4 に LY294002 を添加することで、SOX17、GSC の mRNA 発現が control と比較して増加した。このことから、肝臓へ分化可能な、SOX17+、GSC+ の胚体内胚葉が増加していることが示唆された。

SOX17 が増加した day 2、SOX17 及び GSC が増加した day 3、4 に 25 μ M LY294002 を添加し、day 12 まで分化を行ったところ、control と比較して差がみられないだけでなく、肝芽細胞で発現している AFP などのマーカーが減少している群もあった。LY294002 添加により胚体内胚葉細胞数が増加したことが示唆されたにも関わらず、AFP などのマーカーに差がないか、減少していたことから、LY294002 添加は、ヒト iPS 細胞由来の胚体内胚葉から肝芽細胞、肝細胞への分化効率を上げることがないことが示唆された。肝臓は、胚体内胚葉の一部が近接する心臓中胚葉や横中隔間葉組織からの FGF や bone morphogenetic protein (BMP) のシグナルを受け、肝芽細胞への分化が決定されることで、その発生が開始される。本研究のプロトコルにおいて、内胚葉から肝芽細胞への誘導を行う際、DMSO 単独の処理にて誘導を行っており、FGF や BMP 等の因子を添加していない。そのため、内胚葉から肝芽細胞、肝細胞へ効率よく分化させるためには、FGF や BMP 等の因子に関してさらに検討する必要がある。培養途上においてゼラチン基質と trypsin-EDTA はヒト iPS 細胞由来肝細胞の剥離に有用であることが明らかになった。また、Cell Reservoir One はヒト iPS 細胞由来肝細胞の保存液として有用であった。これらは創薬の研究基盤を支える貴重な知見であると考えられる。

肝細胞の分化誘導技術の効率化として microRNA に着目した研究も行なった。microRNA122、microRNA148b が肝細胞の分化誘導や成熟化を制御する機能を明らかにした。ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導にこの microRNA の有効性を判定する研究に期待がかかっている。

以上述べたように、多面的なアプローチで創薬研究における人由来初代細胞および幹細胞の利用円滑化に向けた研究が達成できたと考えている。また分担研究者それぞれが有する技術を持ち寄り、相互に協力して研究を遂行してきたことをここに申し添えたい。

E. 結論

- 1) プールド肝細胞の長期培養 (山田、絵野沢)
薬物動態活性の個人差を打ち消すための方法である複数個人に由来する細胞の混合培養の技術的可能性を、50 人ならびに 3 人の混合 (プールド) 凍結ヒト肝細胞を細胞アレイ培養で検討し、実施可能であることを確認した。
- 2) 三次元培養ならびに混合培養の創薬研究上の

価値評価 (池谷、城村、絵野沢)

Cell-able を用いた凍結ヒト肝細胞の培養は、通常の平面培養に比べ正常肝細胞の遺伝子発現状態を維持しながら培養できることがわかった。また実験上生じる穴間差も Cell-able を用いる方が小さいことがわかった。

- 3) 新しいフィーダー細胞の検討 (桜川、絵野沢)

不死化ヒト羊膜上皮細胞は細胞アレイのフィーダー細胞のひとつの候補となることがわかった。

- 4) 手術摘出肝組織からの肝実質細胞採取効率化 (絵野沢)

30 分から 60 分という長時間の温阻血を経た肝組織から酵素灌流法によって肝細胞分離を行う場合にも CPD 加 Euro-Collins 液による灌流が有効であった。実際の手術において温阻血 (約 40 分) を経た肝組織からもこの方法によれば多くの生肝細胞が得られると考えられた。

- 5) 人組織・細胞の凍結における CAS 装置の評価 (大和田、絵野沢)

細胞採取を目的とした肝組織凍結の実験系を開発し、凍結し解凍した肝組織から生きた細胞を分離することができるようになった。最終的にヒト肝組織で検証し、薬物代謝活性を有する培養可能なヒト肝細胞を得ることができた。新しいヒト由来研究資源の凍結方法になり得ると考えられた。

- 6) 手術摘出肝組織における微小転移の診断に向けた標本作製法の開発 (土田)

広範囲を検索できる全肝 thin スライス法を開発し、肝両葉多発転移に対する術前化学療法例について病理学的検討を行なった。術前の画像診断と詳細に対比した結果、術前の画像診断である EOB-MRI は極めてすぐれた検査方法であり、ほぼすべての病巣を描出していることがわかった。一方、viable な癌細胞を全く認めない微小癒痕の存在が全く確認されなかったことから、術前化学療法により微小転移巣は文字通り完全奏功を得て、病巣そのものが消失している可能性を示し得た。

- 7) LY294002 による iPS 細胞の内胚葉分化 (松永、山田)

ヒト iPS 細胞の肝細胞様細胞への分化には、LY294002 を添加することで SOX17+、GSC+ の胚体内胚葉への効率的な分化に成功した。また、肝芽細胞への分化には day3 の添加が推奨された。

- 8) ヒト iPS 細胞由来肝細胞に至適な剥離・凍結保存法の検討 (松永、山田)

本研究の結果、ゼラチン基質と trypsin-EDTA はヒト iPS 細胞由来肝細胞の剥離に有用であることが明らかになった。また、Cell Reservoir One はヒト iPS 細胞由来肝細胞の保存液として有用であった。