

令和 3 年 10 月 21 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10118

研究課題名(和文)先天性CMV感染症における神経学的合併症の制御に向けた標的分子探索

研究課題名(英文) Mechanism of neurodevelopmental disabilities caused by congenital cytomegalovirus infection

研究代表者

中村 浩幸 (Nakamura, Hiroyuki)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・免疫アレルギー・感染研究部・室長

研究者番号：70256866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：先天性サイトメガロウイルス(CMV)感染症では、難聴や精神発達遅滞などをともなう場合があり、感染児の予後に重大な影響を及ぼす。本研究で、当該疾患における神経・感覚器障害の発症メカニズムを解明する目的で、発症に関与する新規細胞遺伝子を探索した。ヒト神経系細胞株にCMVを感染させ発現変動する細胞遺伝子をmicroarray法で網羅的に解析した。その結果、CMV神経・感覚器障害に関与する可能性のある細胞遺伝子発現変動を複数同定した。そのうち、遺伝性難聴の原因遺伝子であるSLITRK6については、CMVにコードされるIE2蛋白質がそのC末端領域を介してSLITRK6発現抑制に関与することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天性CMV感染症では、難聴や精神発達遅滞などの神経・感覚器障害をともなうが、その発症メカニズムについては不明な点が多い。本研究は、ヒト神経系培養細胞を用いたCMV感染モデルの確立とその活用により、神経・感覚器障害の発症メカニズムの解明を目指すとともに、得られた知見をCMV病原性の制御に向けた新たな方法の開発へ結びつけることを目標とした。本研究成果は、CMVによる神経・感覚器障害に関与する新規細胞遺伝子産物の同定を介してCMV病原性発症メカニズムの理解を深めるとともに、CMV神経病原性の新規制御法を確立する上でも有用な情報になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Congenital cytomegalovirus (CMV) infection causes sensorineural hearing loss and neurodevelopmental impairment. To understand the molecular mechanism of neuropathogenesis of CMV, we tried to identify novel cellular gene products which may be involved in the CMV neuropathogenesis. We experimentally reproduced CMV-induced neural damages in vitro using human neural cell lines infected with CMV Towne strain or AD169 strain. We analyzed cellular gene expression affected by CMV infection and identified SLITRK6 whose expression was significantly downregulated by CMV infection. We also clarified that the downregulation of SLITRK6 expression by CMV was mediated by CMV-encoded IE2.

研究分野：ウイルス学

キーワード：サイトメガロウイルス CMV 神経障害 先天性CMV感染症 SLITRK6 難聴 IE2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先天性サイトメガロウイルス (CMV) 感染症は、先天感染症として最も頻度が高く、本邦では全出生の約 0.31%、年間 3,000 人以上の先天性 CMV 感染児が発生し、そのうち約 1,000 人が神経学的合併症など何らかの症候を呈すると推定されている。近年は、若年層の妊娠可能女性における抗 CMV 抗体保有率が低下傾向にあることから、先天性 CMV 感染症のさらなる増加が危惧されている。また米国では、長期療養を必要とする新生児の原因疾患として先天性 CMV 感染症が最も多く、Down 症候群や胎児性アルコール症候群に匹敵するかそれ以上に社会的インパクトのある疾患と捉えられている。

先天性 CMV 感染児の約 10%は症候性であり、重篤な神経・感覚器合併症や乳児期死亡を呈するリスクが高い。一方、出生時には無症候性であっても、難聴や精神発達遅滞などの合併症を遅発性に発症する場合がある。この神経・感覚器合併症は、乳幼児の成長・発達や Quality of Life (QOL) に多大な影響を及ぼす。このことから、先天感染児の健全な成長・発達を確保するためには、CMV による神経障害発症機序を解明し、新規治療法開発の基盤となる研究を進めることは重要と考えられる。

2. 研究の目的

先天性 CMV 感染症は、神経・感覚器合併症 (感音性難聴や精神発達遅滞など) をともない、感染児の成長・発達に重大な影響を及ぼす場合がある。本研究では、我々が確立した CMV 感染神経系細胞モデルを用いて、当該疾患における神経・感覚器障害発症メカニズムの解明および CMV 病原性を抑制する上で有用な標的遺伝子の同定を目指す。

(1) ヒト iPS 細胞から作製した神経幹・前駆細胞あるいはヒト神経系細胞株に対して CMV を実験的に感染させることで発現変動する細胞遺伝子を網羅的に解析し、CMV 感染による神経・感覚器障害発症に関与すると考えられる細胞遺伝子を同定する。また、CMV 感染神経系細胞を用いて、神経障害制御法の標的となり得る細胞遺伝子についても同定を目指す。

3. 研究の方法

iPS 細胞由来神経幹・前駆細胞あるいはヒト神経系細胞株に対して CMV Towne 株あるいは AD169 株を実験的に感染させることで *in vitro* CMV 感染神経系細胞モデルを確立した。この感染モデルを用いて、CMV 感染にともなうどのような細胞遺伝子がどのような発現変動を示すのかを明らかにするためにマイクロアレイ法などによる網羅的発現解析を行った。また、神経系細胞における CMV 遺伝子機能を解析する目的で、ヒト神経系細胞株においてテトラサイクリン誘導性に CMV 遺伝子産物を発現できる細胞実験系を構築した。

4. 研究成果

(1) 網羅的発現解析による CMV 病原性関連細胞遺伝子の探索

サイトメガロウイルス (CMV) は胎盤を介して胎児に感染すると、精神発達遅滞や感音性難聴などの神経・感覚器障害を含めさまざまな臓器障害を呈する先天性 CMV 感染症を引き起こす場合がある。これら臓器障害は克服すべき重要課題であるが、その発症メカニズムについては不明な点が多い。

CMV 感染にともなう神経・感覚器障害の発症メカニズム解明につなげるために、iPS 細胞由来神経幹・前駆細胞およびヒト神経系細胞株に対して実験的に CMV を感染させ、細胞遺伝子発現が CMV 感染前後でどのように変動するかマイクロアレイ法による網羅的発現解析を行った。発現変動を示す細胞遺伝子群のうち、神経・感覚器系の発達や機能にとって重要な細胞遺伝子群に注目しながら解析を進めた。その結果、遺伝性難聴の原因遺伝子の一つである SLITRK6 を含め、神経系や聴覚の形成・機能に関与すると思われる複数の細胞遺伝子について CMV 感染前後で著しく発現変動していることが明らかとなった。

(2) マイクロアレイ法により得られたデータの確認

我々は、遺伝性難聴の原因遺伝子である SLITRK6 に着目し、CMV 感染前後での SLITRK6 発現変動の状況を経時的に観察した。その結果、iPS 細胞から神経幹細胞へ分化すると SLITRK6 発現が増強することが明らかとなり、SLITRK6 は神経幹細胞で何らかの機能を発現することが推測された。次に、神経幹細胞に CMV を感染させたところ、SLITRK6 mRNA および SLITRK6 タンパク質の発現が抑制されることを確認した。CMV 感染神経幹細胞で観察された SLITRK6 発現抑制が他の神経系細胞でも見られる現象かを確認する目的で、U373MG や SH-SY5Y など複数のヒト神経系細胞株を用いて同様の CMV 感染実験および SLITRK6 発現解析を行った。その結果、神経幹細胞と同様にヒト神経系細胞株においても SLITRK6 発現抑制が確認された。このことから、SLITRK6 発現抑制は CMV 感染神経系細胞で共通して観察される現象の可能性が示唆された。

(3) SLITRK6 発現抑制に関与する CMV 遺伝子産物の探索

CMV 感染にともなう SLITRK6 発現抑制のメカニズムを明らかにする目的で、SLITRK6 発現抑制に関与する CMV 遺伝子産物の同定を試みた。ヒト神経系細胞株に Flp-In/TREX システムを導入することで各 CMV 遺伝子産物をテトラサイクリン誘導性に発現できる発現系を構築した。この発現システムを用いて、CMV がコードする IE1、IE2、pp65 を発現させたところ、IE2 を発現させた場合にのみ SLITRK6 発現が抑制されることが明らかとなった。次に、IE2 欠変異体を複数作製しそれぞれを発現させた結果、IE2 の C 末端領域 (548 ~ 550 番アミノ酸) が SLITRK6 発

現抑制に関与することが明らかとなった。IE2 の 548 番アミノ酸（グルタミン）をアルギニンに置換すると SLITRK6 発現抑制能が消失したことから、548 番アミノ酸（グルタミン）が関与することが推測された。IE2 の 548 番アミノ酸（グルタミン）は chromatin assembly factor 1 を構成する p150 と会合する上で重要との報告があり、IE2 と何らかの細胞蛋白質との会合が SLITRK6 発現抑制に重要な可能性が考えられた。

今後は、同定された細胞遺伝子が CMV による神経・感覚器障害とどのように関わっているのか明らかにすることで、先天性 CMV 感染症における神経・感覚器障害の発症メカニズムの解明につながる知見を得ることが可能と考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Liao H, Sato H, Chiba R, Kawai T, Nakabayashi K, Hata K, Akutsu H, Fujiwara S, Nakamura H. Human cytomegalovirus downregulates SLITRK6 expression through IE2. J Neurovirol. 2017 Feb;23(1):79-86.

守本倫子、宮入 烈、枝吉美奈、岩瀬徳康、中村浩幸、廖 華南、齋藤昭彦、泉田亮平 . 臍帯からの風疹ウイルス検出の試み . IASR Vol. 39 p38-39: 2018

〔学会発表〕(計 4 件)

Nakamura H, Liao H, Fujiwara S. Human cytomegalovirus infection downregulates the expression of SLITRK6, one of causative genes for hereditary sensorineural hearing loss.第 64 回日本ウイルス学会学術集会 2016 年 10 月 23 日、札幌 .

Liao H, Iikura M, Fujiwara S, Nakamura H. Establishment of rubella virus infection model by using human induced pluripotent stem cells. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 2016 年 10 月 24 日、札幌 .

廖華南、渡邊拓実、藤原成悦、中村浩幸 . ヒトサイトメガロウイルスは IE2 を介して難聴原因遺伝子 SLITRK6 の発現を抑制する 第 32 回ヘルペスウイルス研究会 2018 年 6 月 8 日、福岡 .

Liao H, Watanabe T, Fujiwara S, Nakamura H. Innate immune response to Rubella virus infection in human neural cells.第 66 回日本ウイルス学会学術集会 2018 年 10 月 28 日、京都 .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

職名：室長

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。