

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10068

研究課題名(和文)先天性CMV感染症におけるSLITRK6(遺伝性難聴原因遺伝子)の役割について

研究課題名(英文)Analysis on the role of SLITRK6 in congenital CMV infection

研究代表者

藤原 成悦(Fujiwara, Shigeyoshi)

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・特任研究員

研究者番号：30173488

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)：サイトメガロウイルス(CMV)は、胎盤を介して胎児に感染し感音性難聴や精神発達遅滞などの神経・感覚器障害を含む様々な臓器障害を引き起こす。本研究では、CMV神経病原性に関連する候補分子として我々が同定したSLITRK6について、CMV病原性とSLITRK6との関連をさらに明らかにする目的で、SLITRK6発現抑制あるいは過剰発現系を構築し、SLITRK6発現抑制にともない発現変動する細胞遺伝子群をmicroarray法により同定した。また、マウスサイトメガロウイルス(MCMV)をマウス神経系細胞に感染する実験系を確立し、マウスSLITRK6遺伝子発現に対するMCMV感染の影響を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天性サイトメガロウイルス(CMV)感染は、難聴や精神発達遅滞などの神経・感覚器障害を合併する。本研究では、その発症メカニズムを理解することを目的として、CMV感染と遺伝性難聴の原因遺伝子として知られるSLITRK6との関連に着目し、神経系培養細胞を用いた新たな解析系を確立し解析を進めた。本研究で用いた実験系および得られた知見は、SLITRK6の神経系細胞における機能およびCMVによる難聴・神経障害発症に対するSLITRK6の関連性を明らかにする上で重要であり、CMV神経病原性の理解を今後深める上でも有用と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Cytomegalovirus (CMV) infection in pregnant women causes multiple organ damages in fetuses such as sensorineural hearing loss and neurodevelopmental impairment. To understand the molecular mechanism of CMV neuropathogenesis, we previously identified SLITRK6, a known causative gene for hereditary hearing loss, as a potentially important gene involved in CMV pathogenesis. To understand the relevance of SLITRK6 to CMV neuropathogenesis, we established human neural cells in which the expression of SLITRK6 was experimentally downregulated by shRNA or upregulated by SLITRK6 expression plasmid. Using the cells, we performed microarray analysis and identified cellular genes which may be regulated by SLITRK6. Further, murine cytomegalovirus (MCMV) was experimentally infected to mouse neural cells to analyze the effect of MCMV infection on mouse Slitrk6 expression. These experimental systems will be useful to understand the mechanism of CMV-induced neural damages through SLITRK6.

研究分野：ウイルス学

キーワード：先天性サイトメガロウイルス感染症 サイトメガロウイルス CMV SLITRK6 難聴

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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先天性 CMV 感染症を引き起こすことがある。先天性 CMV 感染症は、先天感染症として最も頻度が高く、本邦における最近の研究によると全出生の約 0.31% が先天性 CMV 感染児として出生するとされている (Koyano S et al, BMJ Open 2011)。先天性 CMV 感染児の一部は重篤な神経学的合併症などを出生時にもなっており乳児期死亡を呈するリスクが高い。また、出生時には無症候性であっても、感音性難聴や精神発達遅滞などを遅発性に発症する可能性がある。さらに、小児難聴の約 2 割は先天性 CMV 感染が原因との報告もある。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、乳幼児の成長・発達や Quality of Life (QOL) に対して長期間にわたり重大な影響をおよぼすと捉えられている。

先天性 CMV 感染症の代表的な合併症として神経・感覚器障害 (精神発達遅滞や感音性難聴など) が挙げられるが、先天性 CMV 感染がどのようなメカニズムで神経・感覚器障害を引き起こすかについては不明な点が多い。CMV による難聴・中枢神経障害の発症機序の解明は、新たな治療法を開発する上でも重要なステップといえる。

我々は、CMV が神経・感覚器障害を引き起こすメカニズムを明らかにする目的で、これまでにヒト神経系培養細胞を用いた *in vitro* CMV 感染モデルを構築・解析した結果、1) 遺伝性難聴の原因遺伝子の一つであり聴覚・視覚・中枢神経系の発達・機能に重要な役割を果たすと考えられている SLITRK6 遺伝子の発現を CMV が抑制すること、2) CMV がコードする IE2 が SLITRK6 発現抑制に関与すること、をこれまでに見出した。

2. 研究の目的

私たちは、ヒト神経系培養細胞を用いた CMV 感染モデルの解析により、遺伝性難聴の原因遺伝子 SLITRK6 の発現を CMV が抑制することを見出した。本研究では、先天性 CMV 感染症における難聴・神経障害発症メカニズムの理解を深めるために、神経系細胞における SLITRK6 遺伝子の機能をヒトおよびマウスの神経系培養細胞において解析するための実験系の構築とその解析を進めることで、CMV による SLITRK6 発現抑制と先天性 CMV 感染症の難聴・神経障害発症との関連性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) SLITRK6 遺伝子産物の発現を抑制あるいは過剰発現させたヒト神経系細胞株を作出した。SLITRK6 遺伝子を標的とする shRNA 発現ベクターをレンチウイルスを用いて細胞に導入し恒常的に SLITRK6 shRNA を発現する細胞を選択することで、SLITRK6 発現が抑制された細胞を作出した。また、SLITRK6 発現プラスミドを神経系細胞株に導入することで SLITRK6 過剰発現細胞を作出した。(2) マウス *Slitrk6* 遺伝子とマウスサイトメガロウイルス (MCMV) との関連性を解析するために、マウス神経系培養細胞に MCMV を感染させる実験系を構築し解析を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト神経系細胞における SLITRK6 発現低下の影響を明らかにすることを目的として、ヒト神経系細胞株および iPS 細胞由来神経幹・前駆細胞に対してレンチウイルスを用いて SLITRK6 shRNA 発現ベクターを導入することで SLITRK6 発現を抑制させた細胞を作出した。作出細胞の SLITRK6 発現変動は RT-PCR あるいはウェスタンブロット解析により確認した。SLITRK6 発現抑制した細胞を観察した結果、SLITRK6 発現抑制はヒト神経系細胞の細胞形態や増殖能に影響をおよぼす可能性が示唆された。

(2) SLITRK6 発現抑制にともなって発現変動する細胞遺伝子産物の探索

SLITRK6 発現抑制はヒト神経系培養細胞に対して形態変化や細胞増殖能に影響をおよぼす可能性が示唆された。そこで、SLITRK6 発現抑制が神経系細胞への形態や増殖に影響するメカニズムを解析する目的で、SLITRK6 発現抑制にともなって発現変動する細胞遺伝子群をマイクロアレイにより解析した。CMV 感染感受性を示すヒト神経系腫瘍細胞株および iPS 細胞由来神経幹・前駆細胞に対して SLITRK6 shRNA を導入し SLITRK6 遺伝子産物の発現を抑制させた細胞を作出した。陰性対照としてヒト細胞遺伝子発現に影響を及ぼさない shRNA を導入した細胞も同時に作出した。これらの細胞から抽出した RNA を用いてマイクロアレイ解析を行い、両細胞間で発現の違いを示す細胞遺伝子発現群を網羅的に探索した。その結果、SLITRK6 shRNA を導入したヒト神経系腫瘍細胞株と iPS 細胞由来神経系細胞の両方に共通して発現変動する細胞遺伝子を約 140 種類同定した。その中には細胞増殖や細胞表面受容体と関連して機能する細胞遺伝子が含まれていた。これらの実験により、SLITRK6 発現抑制にともなって影響を受ける細胞遺伝子プロファイルが明らかになるとともに、SLITRK6 発現抑制が細胞の形態や増殖能に対してどのようなメカニズムで影響を及ぼすかについても重要な知見が得られた。

(3) MCMV をマウス脳に感染させると神経系障害や難聴を発症することが知られている。本研究では、MCMV による神経・感覚器障害とマウス *Slitrk6* 遺伝子との関連を解析する目的で、マウス神経系培養細胞に対して実験的に MCMV を感染させた。MCMV 感染粒子の調製には NIH/3T3 細胞を用いた。MCMV を感染させたマウス神経系細胞において MCMV 遺伝子 mRNA の発現が RT-PCR

法で検出できたことから、この細胞は MCMV 感染許容性であると考えられた。一方、この細胞ではマウス Slitrk6 遺伝子 mRNA の恒常的発現量が低レベルであったことから、マウス Slitrk6 遺伝子産物の発現に対する MCMV 感染の影響の有無について結論を得るに至らなかった。今後は、ほかの複数のマウス神経系培養細胞に対しても MCMV を感染させ、マウス Slitrk6 遺伝子の発現への影響を精査する必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yonese I, Sakashita C, Imadome K, Kobayashi T, Yamamoto M, Sawada A, Ito Y, Fukuhara N, Hirose A, Takeda Y, Makita M, Endo T, Kimura S, Ishimura M, Miura O, Ohga S, Kimura H, Fujiwara S, Arai A	4. 巻 4
2. 論文標題 Nationwide survey of systemic chronic active EBV infection in Japan in accordance with the new WHO classification	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2020001451	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara Shigeyoshi, Nakamura Hiroyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Animal Models for Gammaherpesvirus Infections: Recent Development in the Analysis of Virus-Induced Pathogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 116 ~ 116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pathogens9020116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 藤原成悦, 中村浩幸, 武井正美	4. 巻 72
2. 論文標題 EBウイルス関連疾患の発症メカニズム なぜ一部の人が発症するのか？	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 425-434
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara S.	4. 巻 1045
2. 論文標題 Animal models of human gammaherpesvirus infections	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol	6. 最初と最後の頁 413-436
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-981-10-7230-7_19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Onozawa E, Shibayama H, Takada H, Imadome K, Aoki S, Yoshimori M, Shimizu N, Fujiwara S, Koyama T, Miura O, Arai A	4. 巻 9
2. 論文標題 STAT3 is constitutively activated in chronic active Epstein-Barr virus infection and can be a therapeutic target.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 31077-31089
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25780	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara Shigeyoshi	4. 巻 233
2. 論文標題 Humanized mice: A brief overview on their diverse applications in biomedical research	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 2889 ~ 2901
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1002/jcp.26022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 藤原成悦	4. 巻 68
2. 論文標題 ヒト化マウスの基本事項と様々な応用：序に代えて	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 243 ~ 248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Arai A, Yonese I, Sakashita C, Imadome K, Kobayashi T, Sawada A, Ito Y, Ohga S, Kimura H, and Fujiwara S
2. 発表標題 Nationwide survey of chemotherapy for CAEBV in Japan
3. 学会等名 International conference on EBV & KSHV (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Arai A, Yonese I, Sakashita C, Imadome K, Kobayashi T, Sawada A, Ito Y, Ohga S, Kimura H, and Fujiwara S.
2. 発表標題 A nationwide survey on chronic active Epstein-Barr virus infection in japan based on new diagnostic criteria: clinical features and treatment strategies
3. 学会等名 American Society of Hematology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Okuno Y, Murata T, Sato Y, Fujiwara, S, Kimura H and 32 other authors
2. 発表標題 The presence of defective Epstein-Barr virus (EBV) infection in patients with EBV-associated hematological malignancy
3. 学会等名 American Society of Hematology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 廖華南、渡邊拓実、藤原成悦、中村浩幸
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第32回ヘルペスウイルス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Liao H, Watanabe T, Fujiwara S, Nakamura H
2. 発表標題 Innate immune response to Rubella virus infection in human neural cells
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥野友介, 村田貴之, 佐藤好隆, 藤原成悦, 木村宏, その他32名
2. 発表標題 慢性活動性Epstein-Barrウイルス感染症における網羅的遺伝子解析
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会プレナリ - セッション
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fujiwara S
2. 発表標題 Epstein-Barr virus research and humanized mice: with a special emphasis on chronic active EBV infection
3. 学会等名 The 3rd China International Forum of Pediatric Development (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	中村 浩幸 (Nakamura Hiroyuki) (70256866)	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 (82612)	
研究 協力者	廖 華南 (Liao Huanan) (40566684)	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・研究員 (82612)	