

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08441

研究課題名(和文) サイトメガロウイルスの感染細胞指向性をエピジェネティックに型判別する方法の開発

研究課題名(英文) Development the typing for Cytomegalovirus tropism using the differences of genome methylation.

研究代表者

石岡 賢 (Ishioka, Ken)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：50305356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：先天性サイトメガロウイルス感染児の尿から分離された細胞指向性(トロピズム)の異なる2組4株のトロピズムの異なる臨床分離株についてbisulfate法を用いた次世代シーケンサーによる全ゲノムメチル化解析を試みた。トロピズムの異なる株間には塩基配列に違いが見られないにも関わらず、21の遺伝子に有意にメチル化に差が見られた。また、4株間のメチル化の系統樹解析でトロピズムの同じ株同士が近縁の位置にあることが明らかとなった。メチル化に差が見られた遺伝子産物がトロピズムに関与するかどうか検証中である

研究成果の学術的意義や社会的意義

サイトメガロウイルスは複数の細胞種に感染することで多様な感染症を引き起こす。そのため、トロピズムの変化の機構を理解することは本ウイルスによる感染症の病態生理を解明する鍵になると考えられる。業室株において、本ウイルスのエピジェネティックな変化が潜伏感染に関与するという報告はあるが、臨床分離株を用いたエピジェネティックな研究は本研究が初めてである。本研究でメチル化の違いによってトロピズムが変化することが示唆されたことは、将来的に感染者が持つウイルスのメチル化の状態を知ることによってどのような感染症を起こし得るかを予測することが可能になるとと思われる。

研究成果の概要(英文)：Cytomegalovirus clinical isolates (2 sets of 4 strains) isolated from infants with congenital cytomegalovirus infection which show different cell tropism were investigated by whole-genome methylation analysis using bisulfate method. Although there were no differences in the nucleotide sequences between the strains with different tropism, there were significant differences in methylation in 21 genes. In addition, a phylogenetic tree analysis of methylation among the four strains revealed that the strains with the same tropism are closely related to each other. Investigations have been going whether these gene product are involved in tropism.

研究分野：ウイルス学

キーワード：サイトメガロウイルス 細胞指向性 トロピズム メチル化 エピジェネティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) サイトメガロウイルス(CMV)は、初感染の後に潜伏感染に入り、宿主の免疫力が低下すると回帰感染を起こすウイルスである。本ウイルスは CD34 陽性造血幹細胞、マクロファージ、血管内皮細胞、網膜色素上皮細胞、線維芽細胞などに感染し網膜炎や肺炎、骨髄炎などの多様な疾患を引き起こす。

(2) 本ウイルスによる乳幼児期の初感染は無症候である一方で、妊婦が初感染した場合には胎児へ経胎盤感染をするリスクが高く(およそ 40 % 程度)、全出産の 0.3 % 程度で胎児期の CMV 感染(先天性 CMV 感染)が起こっている。この先天性 CMV 感染の 90 % は無症候であるが、およそ 10 % は小頭症、脈絡網膜炎、聴覚障害、精神未発達、肝炎などが認められ、出生時無症候であっても約 10 % には後に難聴が進行性に発症する。我々はこの CMV 感染児の尿から同一個人より上皮・内皮系の細胞への感染効率が 1,000 倍異なる CMV 臨床分離株のセットを分離培養することが出来た。

(3) 業室株では細胞指向性を決定する遺伝子について報告があるが、臨床分離株では報告がなく、臨床分離株における細胞指向性の違いは異なる臓器の疾患を引き起こすと考えられる。

(4) 細胞指向性の異なる CMV 臨床分離株の全ゲノムシーケンスの結果、同一個人から分離した株間の塩基配列に違いが見とれられず、ゲノムのメチル化などのエピジェネティックな制御がトロピズムの違いに関与すると考えた。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、同一個人から分離した細胞指向性の異なるウイルスのメチル化領域を次世代シーケンサーで網羅的に解析し、トロピズムの異なる株間での違いを特定すること、またその結果をもとに、細胞指向性の異なる CMV 株別に検出できるリアルタイム PCR の系などの検査法を開発することを目的とする。

(2) ここで開発した検査法によって CMV 感染の詳細を臨床検体でも解析し、CMV の細胞指向性と CMV が原因とされている感染症の病態生理を明らかにすることを目的とする。この成果は、病態に則した先制的治療法を可能にするものと期待される。

3. 研究の方法

(1) 細胞指向性の異なるウイルスの分離

先天性 CMV 感染症児の尿中の CMV をヒト網膜色素上皮細胞(ARPE)およびヒト繊維芽細胞(h-TERTBJ1)に感染させ、細胞変性効果(CPE)が出現したところで培養上清を回収する。それぞれの細胞から回収したウイルスを更に ARPE および h-TERT BJ1 細胞に感染させ、1週間以内での CPE 出現の有無で細胞指向性の指標とした。

(2) ウイルスゲノムの精製

(1) で CPE が出現した 2 組 4 株のウイルス(20270-2UA, 20270-3UB, 21558-4UA, 21558-2UB)について、更に継代培養し培養上清からはウイルス粒子を精製し、感染細胞内からはパルスフィールドゲル電気泳動および Sijmons らの方法によりウイルスゲノムを精製した。

(3) 全ゲノム Bisulfate (重亜硫酸ナトリウム)メチル化解析

精製したウイルスゲノムを適当なサイズに断片化し、bisulfate 変換により非メチル化シトシンをチミンに変換することでライブラリーを作成し、イルミナ社 HiSeq 次世代シーケンサーでシーケンス解析を行った(図1)。

得られたデータを図2に示した順に解析を行った。

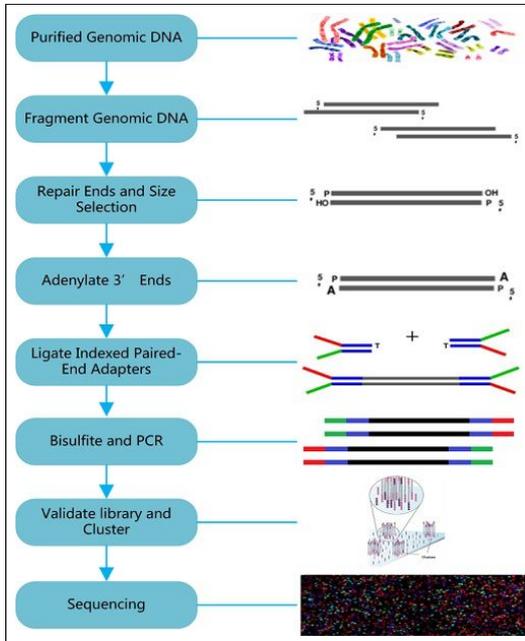


図 1. 全ゲノムメチル化解析の手順

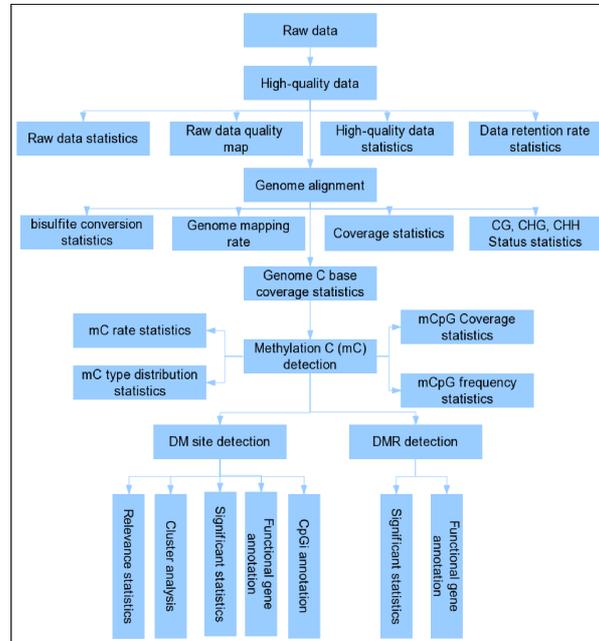


図 2. バイオインフォマティクス解析のプロセス

(3) UBJ株のARPE細胞での感染効率

メチル化解析によって、UBJ株とUAR株との間でゲノムのメチル化に有意に差があったウイルス遺伝子をARPE細胞で発現させ、UBJ株をこの細胞に感染した際の感染効率が回復するかどうかを調べた。

4 . 研究成果

(1) 先天性 CMV 感染児の尿から分離した CMV 株の細胞指向性

リアルタイム PCR により、出生後の尿から CMV ゲノムが検出された 5 名の先天性 CMV 感染児の尿から経時的に h-TERT BJ1 および ARPE 細胞を用いてウイルス株を分離し、本研究で用いたウイルス株 2 組 4 株のウイルス株の特性を以下の表に示した。

患者 ID	分離したウイルス株名	細胞指向性確認に用いた細胞	
		h-TERT BJ1	ARPE
20270	3UBJ		×
	2UAR		
21558	3UBJ		×
	4UAR		

表 1 . 先天性 CMV 感染児尿から分離したウイルス株の細胞指向性

UBJ は h-TERT BJ1、UAR は ARPE 細胞を用いて分離したウイルス株であり、その前の数字は検体を採取した日時を示す。例えば 21558-3UBJ は 21558-4UAR より前に採取した尿から分離したウイルス株を示している。また表中の は感染後 1 週間以内に CPE が出現、× は出現しなかったことを示す。この表では示していないが、h-TERT BJ1 細胞で経時的にウイルス株を分離した場合、ある時期には ARPE 細胞で増殖出来るウイルスが分離出来るが、別な時期には分離出来ないといった変動をすることがあった。

(2) 全ゲノム Bisulfate メチル化解析

全ゲノム Bisulfate メチル化解析の結果、depth は67~490回で、CMV ゲノム約 250 キロ b.p. の約 97% をカバーするリードを得られた。いずれのウイルス株ともbisulfateによる変換効率は99 %以上であり、メチル化シトシンは mCpG が99 %以上を占め、mCHGは 1%にも満たない数値となった。Methyl Kit (version 0.9.5)を用いて、各ウイルス株間のメチル化サイトの違いを解析すると図3のように細胞指向性の同じ株同士(UAR株同士、UBJ株同士)が近縁の位置にあった。

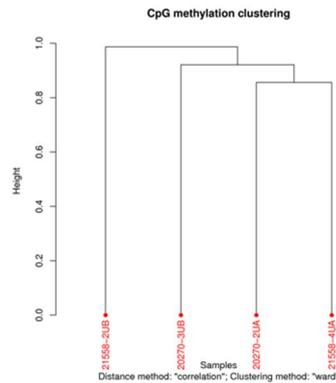


図3. クラスター解析の結果

細胞指向性の違う株同士で有意にメチル化に差があった部位、遺伝子について解析を行った結果、20270株間ではおよそ250の遺伝子のうちの21の遺伝子のエクソン内あるいはORFの上流(プロモーターを含む)に、21558株間では110の遺伝子について有意に差が見られた。それぞれの株間で共通してメチル化に有意に差があった遺伝子とその機能については下表の通りである。

UL8	膜糖タンパク、炎症性サイトカインの産生を抑制
UL9	膜糖タンパク、繊維芽細胞で継代することで変異が入りやすい
UL45	リボヌクレオチドリダクターゼ
UL48	ユビキチン特異的なプロテアーゼ活性を持つ
UL50	ウイルス感染時のウイルス粒子の核放出に関与
UL56	ウイルスゲノムのパッケージング時のターミナーゼ
UL57	一本鎖DNA結合タンパク
UL69	一本鎖DNA結合タンパク
UL80	カプシドの成熟を行うプロテアーゼ
UL86	カプシドタンパク
UL95	後期遺伝子の転写調節因子
UL102	ヘリカーゼ/プライマーゼのサブユニット
UL114	ウラシル DNA グリコシラーゼ
UL116	gH、UL148と複合体を形成し、細胞への吸着に関与
UL122	IE-2、転写調節因子
UL136	5つのisoformがあり、そのバランスによって潜伏感染か再活性化かに別れる 繊維芽細胞の増殖には不要との報告がある
UL138	潜伏感染マーカー
UL139	膜糖タンパク
US30	膜タンパク、本遺伝子の欠損株は繊維芽細胞での増殖が上昇する
US33A	不明
US34	不明

(3) UBJ株のARPE細胞での感染効率

CMV IE-1およびIE-2遺伝子はウイルス感染後最初に発現する前初期(IE: immediate early)遺伝子であるが、IE-2遺伝子のエクソン内に細胞指向性の異なる株間でメチル化に差が見られたことから、この遺伝子を恒常的に発現するARPE細胞株を作成し、UBJ株を感染させた。その結果、IE-1およびIE-2遺伝子の発現はARPE細胞におけるUBJ株の感染効率を改善しなかった。IE遺伝子以外については現在検討中である。

(4) トロピズムの異なるCMV臨床分離株の全ゲノムメチル化解析の結果、ゲノムのメチル化による遺伝子発現の違いがトロピズムに関与することが示唆された。今後はトロピズムを決定する遺伝子とそのメチル化領域の特定を行い、この領域をターゲットに株別にウイルスを検出で

きる検査法を開発し、臨床像と照らしあわせることで本ウイルスによる感染症の病態生理を明らかにしたいと考えている。

<引用文献>

Sijmons S, Thys K, Corthout M, Van Damme E Van Loock M, Bollen S, Baguet S Aerssens J, Van Ranst M, Maes P, A Method Enabling High-Throughput Sequencing of Human Cytomegalovirus Complete Genomes from Clinical Isolates, PLoS One, 2014, 22;9(4)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nishiyama K, Kobayashi T, Sato Y, Watanabe Y, Kikuchi R, Kanno R, Koshizuka T, Miyazaki N, Ishioka K, Suzutani T.	4. 巻 10
2. 論文標題 A Double-Blind Controlled Study to Evaluate the Effects of Yogurt Enriched with Lactococcus lactis11/19-B1 and Bifidobacterium lactis on Serum Low-Density Lipoprotein Level and Antigen-Specific Interferon- Releasing Ability.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1778
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu10111778	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 Uemura M, Hayashi F, Ishioka K, Ihara K, Yasuda K, Okazaki K, Omata J, Suzutani T, Hirakawa Y, Chiang C, Aoyama A, Ohira T.	4. 巻 58
2. 論文標題 Obesity and mental health improvement following nutritional education focusing on gut microbiota composition in Japanese women: a randomised controlled trial.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur J Nutr	6. 最初と最後の頁 3291-3302
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00394-018-1873-0	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 Ishioka K, Nishiyama K, Suzutani T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Draft Genome Sequence of the Lactococcus lactis 11/19-B1 Strain, Isolated from Kiwifruit.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiol Resour Announc	6. 最初と最後の頁 e00793-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.00793-20	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 Iguchi A, Yamamoto S, Oda A, Tanaka K, Kazama JJ, Saeki T, Yamazaki H, Ishioka K, Suzutani T, Narita I.	4. 巻 24
2. 論文標題 Effect of sucroferic oxyhydroxide on gastrointestinal microbiome and uremic toxins in patients with chronic kidney disease undergoing hemodialysis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Exp Nephrol	6. 最初と最後の頁 725-733
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10157-020-01892-x	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 Yokouchi Y, Suzuki S, Ohtsuki N, Yamamoto K, Noguchi S, Soejima Y, Goto M, Ishioka K, Nakamura I, Suzuki S, Takenoshita S, Era T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Rapid repair of human disease-specific single-nucleotide variants by One-SHOT genome editing.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 13927
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-70401-7	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 Kanno R, Koshizuka T, Miyazaki N, Kobayashi T, Ishioka K, Ozaki C, Chiba H, Suzutani T	4. 巻 10
2. 論文標題 Protection of Fatty Liver by the Intake of Fermented Soybean Paste, Miso, and Its Pre-Fermented Mixture.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Foods	6. 最初と最後の頁 291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/foods10020291	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	生田 和史 (Ikuta Kazufumi) (60512184)	東北医科薬科大学・医学部・准教授 (31305)	

	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
連携研究者	錫谷 達夫 (Suzutani Tatsuo) (40196895)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	

6. 研究組織（つづき）

	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
連携研究者	宮崎 希 (Miyazaki Nozomu) (40725876)	福島県立医科大学・医学部・助教 (21601)	
連携研究者	小林 敬広 (Kobayashi Takahiro) (00708745)	福島県立医科大学・医学部・助教 (21601)	
連携研究者	腰塚 哲朗 (Koshizuka Tetsuo) (20416267)	岐阜薬科大学・医学部・准教授 (23701)	
連携研究者	一柳 健司 (Ichianagi Kenji) (70401560)	名古屋大学・農学部・教授 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関