

令和 4 年 6 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：2019～2021

課題番号：19K08335

研究課題名(和文) CMV病原性に関与する細胞因子を介した先天性CMV感染症における神経病態制御

研究課題名(英文) Exploration of cellular factors involved in CMV neuropathogenesis in congenital CMV 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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)： サイトメガロウイルス(CMV)による病原性発現メカニズムの理解は、CMV病原性を制御する手法を新たに見出す上でも重要なステップと考えられる。CMV神経病原性に関与する細胞因子の新規同定を介して病原性メカニズムの理解を深めることを目的として、shRNA発現ヒト神経系細胞ライブラリーを作製し、その網羅的スクリーニングによって新規細胞因子を探索した。見出された複数のshRNAおよび標的細胞因子について、shRNAによるCMV病原性の抑制効果について検証実験を進めた。また、本研究で同定された細胞因子の発現抑制を介したCMV神経病原性抑制メカニズムについては、さらに解析を進める必要があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天性CMV感染が引き起こす神経・感覚器障害の発症に関連する細胞因子の同定は、ウイルス因子が細胞因子とどのように関わりながら病原性を発現し発症に至るのかについて理解を深めることにつながると期待される。また、本研究で得られる知見は、CMV病原性発現および神経・感覚器障害発症の抑制を可能にするような治療標的分子の同定につながる可能性もある。当該疾患の神経・感覚器障害の発症メカニズムに基づく新たな制御法開発によって、先天性CMV感染症におけるさまざまな合併症の制御を可能にすることげできれば、先天感染児の成長・発達や予後の改善につなげることが期待される。

研究成果の概要(英文)： Understanding the molecular neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus (CMV) infection is crucial to establishing novel strategies for controlling CMV neuropathogenesis. We established a cellular library in which multiple shRNAs are transduced and expressed to identify novel cellular factors involved in CMV neuropathogenesis. Using the cellular library, we performed a comprehensive screening of shRNAs, which may contribute to the attenuation of CMV neuropathogenesis. Several experiments were conducted to verify the suppressive effects of shRNAs on CMV-mediated cellular damages. Further studies are needed to clarify molecular mechanisms of how identified shRNAs are involved in the suppression of CMV-mediated cellular damages.

研究分野：ウイルス学

キーワード：サイトメガロウイルス 先天性サイトメガロウイルス感染症 CMV 神経障害 感覚器障害 難聴

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先天性CMV感染症は、先天感染症として最も頻度が高く、本邦では全出生の約0.31%が先天性CMV感染をともなっており、そのうち約1/3が何らかの異常を呈するとの報告もある (Koyano S et al, BMJ Open 2011)。当該疾患は小頭症、精神運動発達遅滞、感音性難聴などの神経・感覚器障害を含むさまざまな臓器障害をともなう場合があり、感染児の発育や予後に重大な影響をおよぼし得る。そのため、その克服に向けて予防法や診断・治療法を確立することは重要課題と考えられる。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感染症の発生頻度の増加が危惧されている。また、小児難聴の約2割は当該疾患が原因との報告もある (Morton CC and Nance WE, N Engl J Med, 2006)。一方、神経・感覚器障害の発症メカニズムについては不明な点が多い。さらに、CMVに対する抗ウイルス薬は複数あるものの、安全性・有効性両面でさらに優れた治療法の確立も望まれる状況にあるとも考えられる。

2. 研究の目的

ウイルス病原性の発現には、ウイルス因子および細胞因子両方の関与が必要と考えられている。本研究では、CMV病原性に関与する新規細胞因子をshRNA発現ライブラリーを用いた網羅的スクリーニングによって探索・同定し、同定された細胞因子を介したCMV神経病原性の新たな発症メカニズムを明らかにするとともに、CMV神経病原性の制御に向けた新たな手法につながる知見も探索することを目的とする。

3. 研究の方法

ウイルス病原性の発現にはウイルス遺伝子産物に加えて細胞遺伝子の関与も必須と考えられ、両者の相互作用に依存しながらウイルスは病原性を発揮すると考えられる。ヒト細胞遺伝子を標的とするshRNAライブラリーを発現させることで細胞遺伝子産物を介したCMVの病原性を抑制できる可能性があるかと仮定した。

本研究では、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と発症制御につながる知見を得ることを目指し、(1) CMV神経病原性に関与する新たな細胞因子を同定する、(2) 同定した細胞因子を介してCMVがどのようなメカニズムで神経病原性を発現するのか明らかにする、(3) これらの知見をもとに、CMV神経病原性の制御につながる新たな手法を探索する、ことを目指した。

4. 研究成果

(1) shRNAライブラリー発現細胞の作製とその活用: ヒト神経系細胞株に対するshRNA発現ライブラリーの導入

CMV神経病原性に関与する新規細胞因子を同定することを目的として、ヒト神経系細胞株U373MGに対してshRNA発現ライブラリーを導入した細胞集団を新たに作製した。shRNAを導入していないU373MGにCMVを実験的に感染させたところ、ウイルス複製をともなった細胞障害を引き起こしながら数週間後にはほぼすべての細胞が死滅した。一方、shRNAライブラリーを導入したU373MG細胞集団にCMVを感染させたところ、CMV感染にともなう細胞障害が起こりにくくなっている細胞が複数出現することが観察された。この細胞を増殖させ、限界希釈法により単クローン化し80クローン以上を単離した。各クローン細胞由来ゲノムDNAを用いてshRNA領域をPCRで増幅したのちshRNA配列を決定し、20種類以上のshRNA配列を同定した。この配列をもとに各shRNAが標的としている細胞遺伝子を明らかにした。

(2) 同定されたshRNAに関する機能解析 (1) : shRNA導入単クローン細胞の性状解析

各shRNAが導入されている単クローン細胞において、shRNAが標的とする細胞遺伝子の発現が抑制されていることを確認する目的で、各単クローン細胞よりRNAあるいはタンパク質を抽出しRT-PCRあるいはimmunoblottingにより標的細胞遺伝子産物の発現抑制の有無を確認した。また、各単クローン細胞を用いて、CMV細胞障害が抑制されていることを確認する目的で各単クローン細胞に再度CMVを感染させ、CMV細胞障害の抑制効果を確認した。

(3) 同定されたshRNAの機能解析(2) : shRNAの単独再導入による有効性の検証

同定された各shRNAの中から、CMV病原性との関連や細胞障害の抑制効果の強度を参考にした上で、いくつかのshRNAについて以下の解析を進めた。同定されたshRNAがCMV細胞障害を抑制する機能を有することを再度確認することを目的として、各shRNAを単独でU373MG細胞に対して再導入することで新たにshRNA導入U373MG細胞を樹立し直した。その後、この樹立細胞に対してCMVを実験的に感染させ、CMV細胞障害の抑制効果を観察することで、各shRNAを単独で発現させた場合にCMV細胞障害抑制効果をどの程度示すのか明らかにした。

(4) 同定されたshRNAの機能解析(3) : 同一細胞因子を標的とする複数のshRNAによる有効性の検証

CMV細胞障害を抑制する各shRNAの効果がオフターゲット効果でないことを検証する目的で、該当する細胞因子を標的とするshRNAを新たに複数種類用いてそれぞれ単独でU373MG細胞に導入したU373MG細胞を新たに樹立した。樹立した各細胞において標的となる細胞遺伝子発現が抑制されていることをRT-PCRで確認することで新規導入した各shRNAが標的細胞遺伝子の発現を抑制することを確認した。その後、CMV細胞障害の抑制効果について、CMV感染実験を行い検証した。これらの解析により、同一細胞因子を標的とした複数種類のshRNAがCMV病原性を抑制することを確認した場合に、shRNAによるCMV細胞障害の抑制効果はオフターゲット効果による可能性は低いものと判断した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fujiwara Shigeyoshi, Nakamura Hiroyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection: Is It Immunodeficiency, Malignancy, or Both?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3202 ~ 3202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers12113202	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 矢島広大、安藤由梨花、櫻木小百合、藤原成悦、康 宇鎮、宮戸健二、河野菜摘子、中村浩幸
2. 発表標題 1. ヒト神経系細胞におけるCMV感染と細胞外小胞との関連について
3. 学会等名 第34回ヘルペスウイルス研究会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------