

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08354

研究課題名(和文)先天性サイトメガロウイルス感染症発症機序の解明と治療・予防法の研究開発基盤の確立

研究課題名(英文)Elucidation of congenital CMV infection mechanisms and development of prevention

## 研究代表者

嶋田 和也 (Shimada, Kazuya)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：30439781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：妊婦がサイトメガロウイルスに初感染すると、胎盤を経由して胎児にウイルスが移行し、胎児は神経学的異常を呈する重篤な先天性サイトメガロウイルス感染症を発症する。しかしながら、サイトメガロウイルスが神経機能と脳の発達に与える影響は、ほとんど解明されていない。

サイトメガロウイルスを神経系細胞に感染させると潜伏感染関連タンパク質ORF152を発現し、ORF152がCAMLと結合することで、神経系細胞内カルシウム濃度を上昇させることを見出した。また、ORF152は、カルシウムシグナル伝達を修飾し、神経変性を引き起こしている可能性が示唆され、先天性サイトメガロウイルス感染症の病態の一端を解明できた。

## 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感染症は、サイトメガロウイルスの胎内感染が原因であるが、その発症機序はほとんど不明のままである。近年、妊娠中にサイトメガロウイルスの初感染を来す症例が増加傾向にあるため、先天性サイトメガロウイルス感染症に対する早急な治療法、及び予防法の確立が望まれている。

サイトメガロウイルスの潜伏感染関連タンパク質ORF152が神経系細胞内カルシウム濃度を上昇させることを見出した。カルシウムは神経機能に多大な影響を及ぼすため、ORF152の機能を解明することは、先天性サイトメガロウイルス感染症の発症機序を解明する突破口となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：When a pregnant woman is initially infected with cytomegalovirus, the virus is transferred to the fetus via the placenta, and the fetus develops a severe congenital cytomegalovirus infection with neurological abnormalities. However, the effects of cytomegalovirus on neurological function and brain development are poorly understood. Cytomegalovirus infection of nervous system cells results in the expression of the latency-associated protein ORF152. ORF152 binds to the calcium modulating cyclophilin ligand (CAML) that promotes Ca<sup>2+</sup> influx into cells, thereby increasing intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in nervous system cells. The results also suggest that ORF152 modulates calcium signaling, possibly causing neurodegeneration, and provide insight into the pathogenesis of congenital cytomegalovirus infection.

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 先天感染 胎内感染 ヒトサイトメガロウイルス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

妊婦がサイトメガロウイルスに初感染すると、胎盤を経由して胎児にウイルスが移行し、胎児は神経学的異常を呈する重篤な先天性サイトメガロウイルス感染症を発症する。また、近年、妊娠中にサイトメガロウイルスの初感染を来す症例が増加傾向にある。しかしながら、サイトメガロウイルスが神経機能と脳の発達に与える影響はほとんど解明されていない。

サイトメガロウイルスの潜伏感染は、ウイルス DNA が細胞内に長期間保持され、ごく限られた転写産物とタンパク質が発現している。長期的な脳への影響を考えると、サイトメガロウイルスの潜伏感染関連タンパク質が先天性サイトメガロウイルス感染症の発症に関与している可能性が高い。サイトメガロウイルスを神経系細胞に感染させると、潜伏感染関連タンパク質 ORF152 が発現し、ORF152 がカルシウムの細胞内への流入を促進するタンパク質 calcium modulating cyclophilin ligand (CAML) と結合することで、神経系細胞内カルシウム濃度を上昇させることを見出した。カルシウムは神経活動に多大な影響を及ぼす。従って、ORF152 はカルシウムシグナル伝達を修飾することで、神経機能と脳の発達に影響を与えることが示唆された。

### 2. 研究の目的

サイトメガロウイルスを神経系細胞に感染させると、潜伏感染関連タンパク質 ORF152 が発現し、ORF152 がカルシウムの細胞内への流入を促進するタンパク質 calcium modulating cyclophilin ligand (CAML) と結合することで、神経系細胞内カルシウム濃度を上昇させる。カルシウムは神経活動に多大な影響を及ぼすため、サイトメガロウイルス潜伏感染関連タンパク質 ORF152 の機能を解明することは、先天性サイトメガロウイルス感染症の発症機序を解明する突破口となることが期待される。

そこで、本研究は、この ORF152 が神経機能と脳の発達に与える影響を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 蛍光抗体法

神経系細胞株である、U373MG、SVGp12、A172 細胞にサイトメガロウイルス(Towne 株)を遠心法にて感染させ、24-72 時間後に細胞を固定し、感染の指標にはサイトメガロウイルスの核タンパク質である IE1/IE2 抗体を用い、ORF152 に対するウサギ抗血清で ORF152 が神経系細胞で発現するか検討した。また、細胞内局在についても検討した。

#### (2) SEAP アッセイ

HEK293T、HEK293A、U373MG に対して、分泌型アルカリフォスファターゼ(SEAP)を用いて、プロモーターアッセイを行った。

#### (3) realtime RT-PCR

ORF152 安定発現神経系細胞株 (図 1) から RNA を精製し、逆転写後、realtime RT-PCR で caml mRNA の発現量検討を検討した。

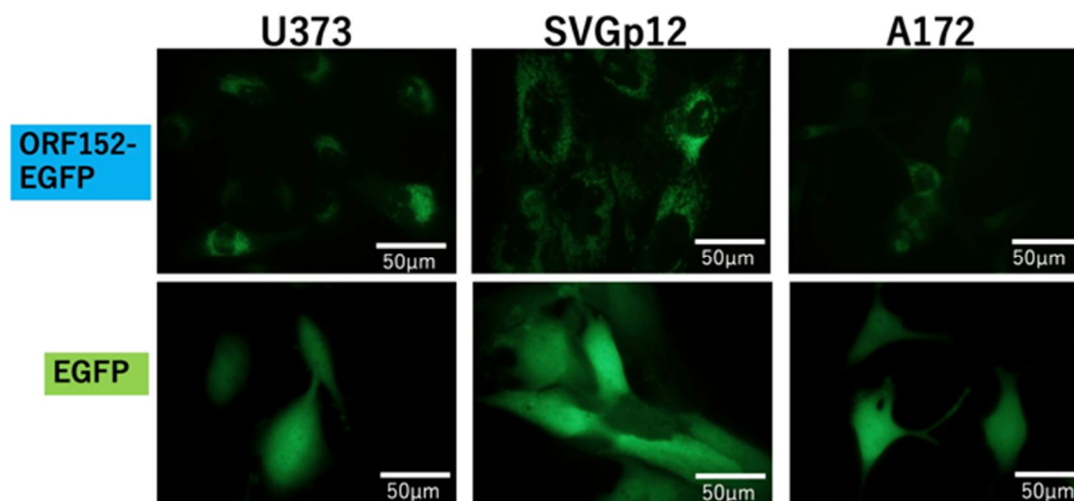


図 1. ORF152 安定発現神経系細胞株

4. 研究成果

(1) 神経系細胞株における ORF152 の発現と局在

サイトメガロウイルス感染 U373MG 細胞においては、IE1/IE2 の発現が観察され、また、ORF152 は核膜周囲に発現することが観察された(図 2)。SVGp12 細胞においては、IE1/IE2 の発現は弱いのにに対して、ORF152 は強く発現することが観察された(図 2)。A172 細胞は、サイトメガロウイルスは不稔感染することが報告されている。しかしながら、IE1/IE2 の発現は、核内に発現する細胞もごくわずかに観察されたが、ORF152 は発現量が少ないものの、核膜周囲に発現することが観察された(図 2)。

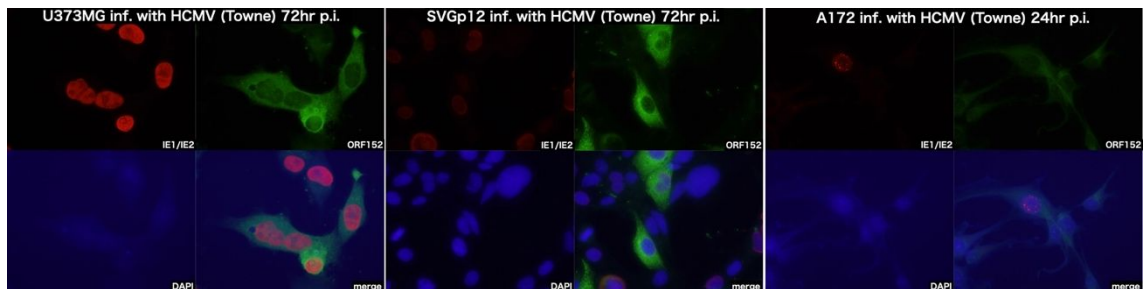


図 2. ORF152 の神経系細胞における発現

(2) ORF152 と CAML の協調作用

1. ORF152 と CAML の相互作用による細胞内カルシウム濃度上昇の生物学的意義を検討するために、SEAP を用いたレポーターアッセイを行った。HEK293T とリン酸カルシウム法を用いた検討から、ORF152 によってカルシウムシグナル伝達に関連する AP-1 と NFAT のプロモーターが活性化された(図 3)。また、ORF152 と CAML を導入することで相乗効果も一部観察された。しかしながら、HEK293A とリポフェクション法との組み合わせでは、AP-1 に関しては協調作用が観察されなかったが、ORF152 または CAML によって活性化が観察された(図 4)。また、NFAT に関しては、ORF152 と CAML との協調作用によって NFAT プロモーターが活性化されることが観察された(図 4)。

2. 神経系細胞における ORF152 と CAML の協調作用を検討した。その結果、AP-1 に関しては、相乗効果は観察されなかったが、よりカルシウムシグナル伝達に関連している NFAT プロモーターに対して協調作用が観察された(図 5)。このことは、神経系細胞内においても ORF152 と CAML の相互作用が重要な役割を持つことを示唆するものであった。

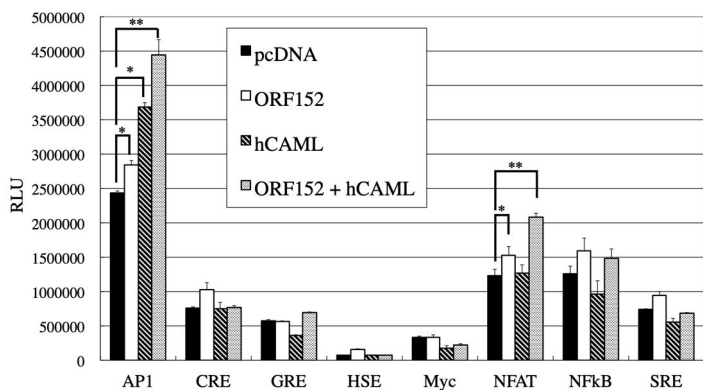


図 3. HEK293T における ORF152 と CAML の協調作用

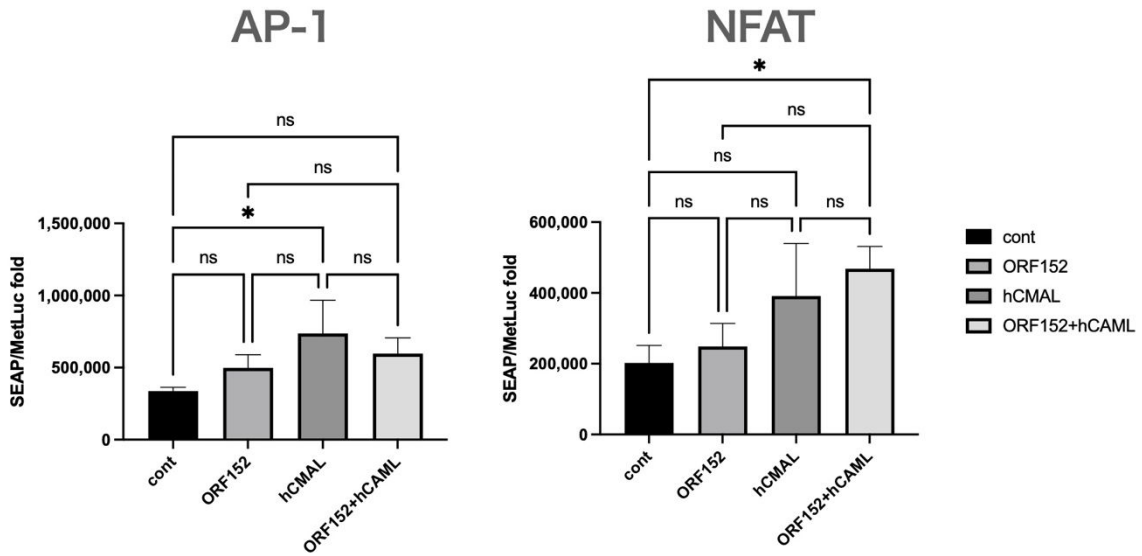


図 4. HEK293A における ORF152 と CAML の協調作用

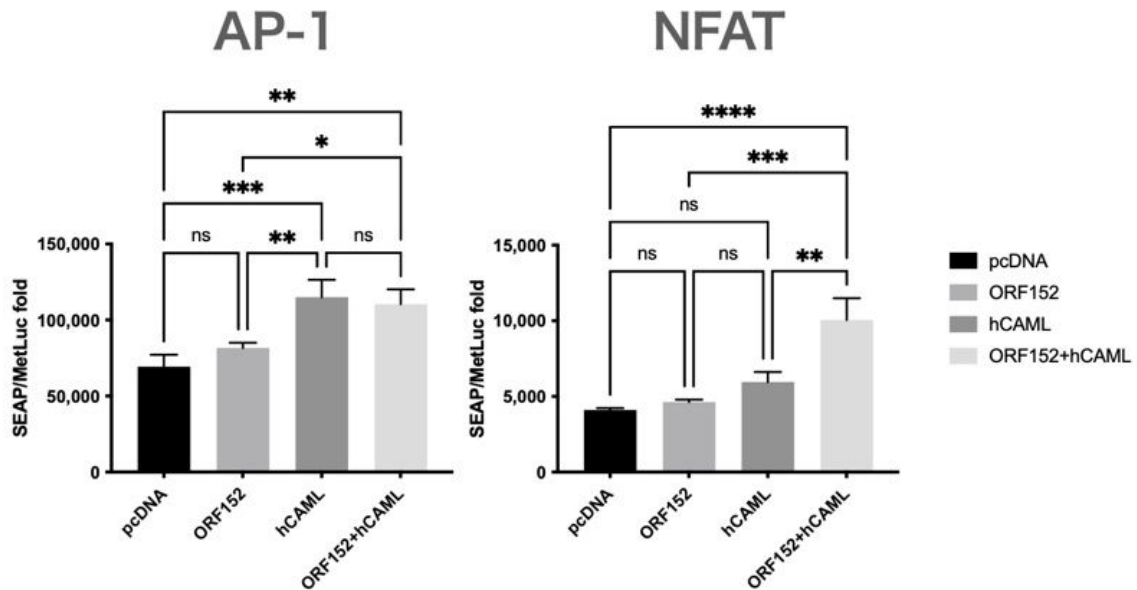
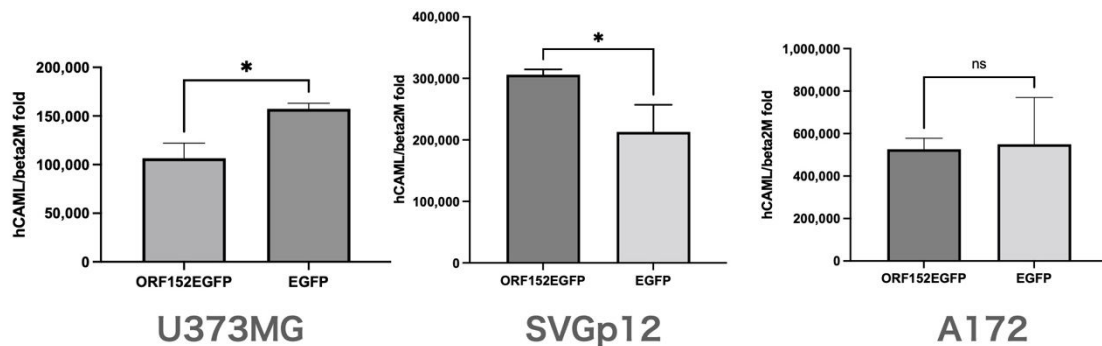


図 5. U373MG における ORF152 と CAML の協調作用

### (3) ORF152 安定発現細胞を用いた検討

ORF152 が *caml* mRNA の発現量に与える影響を、ORF152 安定発現細胞株を用いて検討した。その結果、ORF152 と control で顕著な発現量の差は観察されなかった (図 6) ことから、ORF152 による細胞内カルシウム濃度の上昇には、CAML の量的な変化よりも、質的な変化が関与していることが示唆された。



## 図 6. caml mRNA の発現量比較

以上のことから、サイトメガロウイルス ORF152 は CAML と相互作用することで、カルシウムシグナル伝達を修飾し、神経変性を引き起こしていることが示唆された。

今後は、ORF152 に関して、カルシウムシグナル伝達が神経系細胞に与える影響と、より生体を反映した系を用いて、更なる研究を継続していく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 0件）

1. 著者名 Shimada Kazuya, Kobayashi Nobuyuki, Oka Naomi, Takahashi Mayumi, Kondo Kazuhiro	4. 巻 64
2. 論文標題 Cooperative activation of the human herpesvirus 6B U79/80 early gene promoter by immediate early proteins IE1B and IE2B	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 747 ~ 761
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12844	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 Kobayashi Nobuyuki, Nishiyama Toshiko, Yamauchi Takashi, Shimada Kazuya, Suka Machi, Kondo Kazuhiro, Yanagisawa Hiroyuki	4. 巻 91
2. 論文標題 Attenuation of human herpesvirus 6B reactivation by aging	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Medical Virology	6. 最初と最後の頁 1335 ~ 1341
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jmv.25434	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 Kobayashi Nobuyuki, Oka Naomi, Takahashi Mayumi, Shimada Kazuya, Ishii Azusa, Tatebayashi Yoshitaka, Shigeta Masahiro, Yanagisawa Hiroyuki, Kondo Kazuhiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Human Herpesvirus 6B Greatly Increases Risk of Depression by Activating Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis during Latent Phase of Infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101187 ~ 101187
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2020.101187	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 Kobayashi Nobuyuki, Shinagawa Shunichiro, Niimura Hidehito, Kida Hisashi, Nagata Tomoyuki, Tagai Kenji, Shimada Kazuya, Oka Naomi, Shikimoto Ryo, Noda Yoshihiro, Nakajima Shinichiro, Mimura Masaru, Shigeta Masahiro, Kondo Kazuhiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Increased blood COASY DNA methylation levels a potential biomarker for early pathology of Alzheimer ' s disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12217
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-69248-9	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 Kobayashi Nobuyuki, Shinagawa Shunichiro, Nagata Tomoyuki, Tagai Kenji, Shimada Kazuya, Ishii Azusa, Oka Naomi, Shigeta Masahiro, Kondo Kazuhiro	4. 巻 81
2. 論文標題 Blood DNA Methylation Levels in the WNT5A Gene Promoter Region: A Potential Biomarker for Agitation in Subjects with Dementia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 1601 ~ 1611
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-210078	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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Shimada K, Kobayashi N, Oka N, Takahashi M, Kondo K.
2. 発表標題 Post-transcriptional regulation of human herpesvirus 6 immediate-early 1 and 2 genes by Immediate-Early 2 and splicing factor SART3.
3. 学会等名 The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 嶋田和也、小林伸行、岡直美、石井梓、近藤一博
2. 発表標題 CMV潜伏感染関連タンパク質ORF152による先天性CMV感染症発症機序の解明
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
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
---------	---------