

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08829

研究課題名(和文) Study on mechanisms of rubella virus infection to the fetus, possible alternative cellular receptors and factors affecting the virus infection

研究課題名(英文) Study on mechanisms of rubella virus infection to the fetus, possible alternative cellular receptors and factors affecting the virus infection

研究代表者

TRINH DUYQUANG (TRINH, DuyQuang)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：90647190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠中、特に妊娠初期の風疹感染は先天性症候群として知られていたが、ヒト初期絨毛細胞が風疹ウイルスに対する耐性の報告はあり、その妊娠初期の風疹感染の機序についてはいまだ不明な点が多い。そこで本研究では、細胞ストレスが初期絨毛細胞の風疹感染に与える影響について調べることを目的とした。その結果、初期絨毛細胞は風疹ウイルスに低感受性の特徴が理解し、低グルコースによる小胞体ストレスが初期絨毛細胞の風疹感染を上昇することを明らかにした。また上皮細胞の上皮間葉転換が、風疹感染に影響を与えることにも着目し、TGF- β 1によりヒト肺胞上皮由来細胞の上皮間葉転換が風疹ウイルスの感受性を上昇することを認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究より初期絨毛細胞は風疹ウイルスに対して低感受性を持ち、低グルコースストレス条件下では風疹感染が促進され、ウイルスの増殖が持続することを明らかにした。妊娠悪阻による絶食やコントロール不良の妊娠糖尿病における低グルコースによる小胞体ストレスは風疹の母子感染、ひいては先天性風疹症候群の原因となる可能性が示唆された。本研究の結果は、風疹ウイルスと胎盤との複雑な相互作用に関する科学的知識を提供し、風疹ウイルスが胎盤のバリアを突破し、発育中の胎児に感染するメカニズムを解明することに貢献した。このような理解は、先天性風疹症候群のリスクを軽減するための予防戦略と介入策の開発に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Rubella virus (RuV) infection in pregnant women, especially during the first trimester of pregnancy, can lead to congenital rubella syndrome. However, the mechanisms of transplacental RuV infection are not entirely understood, and it is not observed in every pregnant woman infected with RuV. In this study project, we first determined the susceptibility of the immortalized human first-trimester trophoblast cells (HTR-8/SVneo and Swan.71) against a clinical RuV strain. Secondly, using these trophoblast cells, we investigated the possible roles of hypoglycemia-related endoplasmic reticulum stress as a critical factor for vertical RuV infection. For the results, we found that these cells have low susceptibility against the RuV strain. Under low glucose stress conditions, RuV binding and infection in these cells were enhanced. We also found that TGF- β 1 could enhance viral binding and infection in human lung epithelial A549 cells.

研究分野：感染症学

キーワード：風疹ウイルス 妊娠 先天性風疹症候群 感染性 絨毛細胞 低グルコースストレス トランスフォーミング増殖因子ベータ1 上皮間葉転換

1. 研究開始当初の背景

妊娠中、特に妊娠初期の風疹感染は先天性風疹症候群として知られており、先天性心疾患、難聴、白内障などが生じる可能性がある。風疹の経胎盤感染は、妊娠の最初の8週間に最大90%の症例で発生し、妊娠後期には25%に低下する。この理由として、妊娠初期における胎児の風疹ウイルス感受性が主要な器官形成の臨界期での催奇形性に影響するとされている。一方で、妊娠期間を通じてのヒト胎盤組織の構造変化も子宮内感染に關与する要因であるため、なぜ先天性風疹症候群の発生率が、妊娠初期と後期で異なるのかを理解するためには、風疹ウイルスの経胎盤感染メカニズムを理解する必要があるが、その機序については不明な点が多い。

2. 研究の目的

妊娠中、特に妊娠初期の風疹感染は先天性症候群として知られていたが、ヒト初期絨毛細胞が風疹ウイルスに対する耐性の報告はあり、その妊娠初期の風疹感染の機序についてはいまだ不明な点が多い。そこで本研究では、細胞ストレスが初期絨毛細胞の風疹感染に与える影響について調べることを目的とする。また上皮細胞の上皮間葉転換が、風疹ウイルス感染に影響を及ぼす可能性があるため、トランスフォーミング増殖因子β1 (TGF-β1) による、上皮細胞の上皮間葉転換を誘導し、風疹ウイルスの感受性を評価することも目的とする。

3. 研究の方法

風疹ウイルス (RuV、臨床株) は Vero 細胞で増殖する。また滴定は 50%細胞培養感染量アッセイ、またはフローサイトメトリー法によって行った。

(1) 不死化絨毛細胞株 HTR-8/SVneo、Swan.71 の風疹ウイルス感受性評価

HTR-8/SVneo や Swan.71 細胞を MOI 5~10 の風疹ウイルス (臨床分離株) に感染させた。感染後 24 時間および 48 時間後 (hpi) に、フローサイトメトリー (FCM) および蛍光顕微鏡で RuV カプシドタンパク質を検出した。

(2) 低グルコースストレスによるヒト不死化絨毛細胞の風疹ウイルス感染に与える影響について研究

不死化絨毛細胞株 HTR-8/SVneo、Swan.71 を低グルコース (0.5 mM) もしくは高グルコース (25 mM) 環境下で培養し小胞体ストレスを与えた後に MOI 5~10 の風疹ウイルスに感染させた。感染後 24 hpi および 48hpi に、FCM および蛍光顕微鏡で RuV カプシドタンパク質を検出した。培養液中のウイルスを FCM で定量した。また、ウイルス結合アッセイにより細胞へのウイルス吸着性を評価した。

(3) 上皮細胞の上皮間葉転換 (EMT) が、風疹ウイルス感染に影響するかについて研究

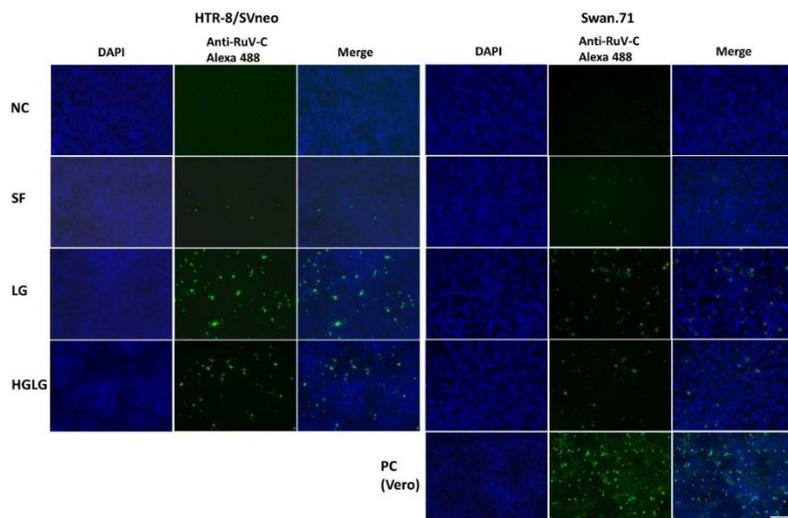
ヒト肺胞上皮由来である A549 細胞で TGF-β1 添加により EMT を誘導し、MOI 1~5 の風疹ウイルスに感染させた。感染後 24 hpi に FCM で RuV カプシドタンパク質を検出した。また、ウイルス結合アッセイにより細胞へのウイルス吸着性を評価した。

4. 研究成果

(1) 不死化絨毛細胞株 HTR-8/SVneo、Swan.71 の風疹ウイルス感受性評価

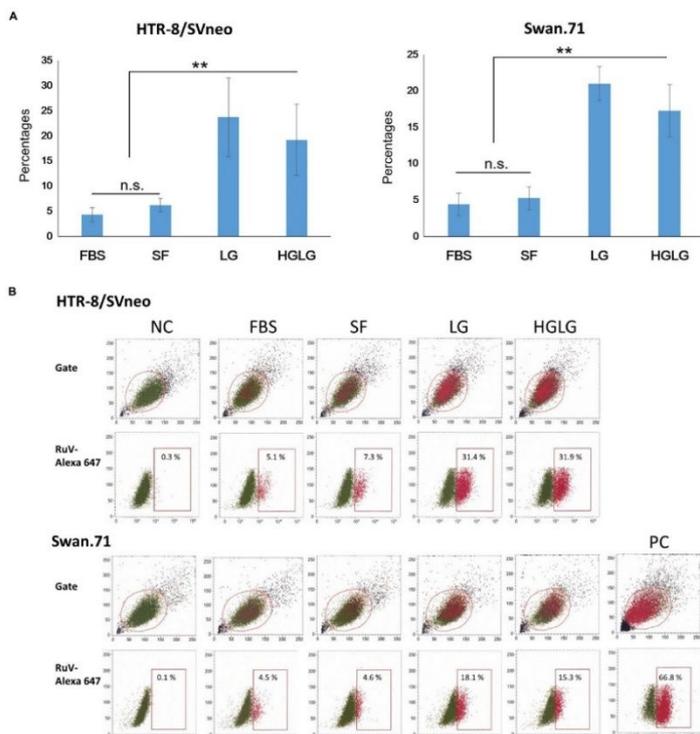
ウイルス感染結果に関して、48 時間後 (hpi) の免疫蛍光イメージングでは、胎盤絨毛細胞における風疹ウイルス感染の信号が、陽性コントロールとして Vero 細胞に比べて散在しており、はるかに低いことが観察された。この観察結果は、フローサイトメトリー解析によっても支持され、24hpi では、約 3~5%の胎盤絨毛細胞が風疹ウイルスに感染し、その後も増加しないことが示された。対照的に、24 hpi では 40%以上の Vero 細胞がこの臨床ウイルス株に感染し、48hpi では 60%以上に達した。

(2) 低グルコースストレスによるヒト不死化絨毛細胞の風疹ウイルス感染に与える影響について研究：



(図 1) 蛍光顕微鏡で風疹ウイルスのカプシドタンパク質の検出

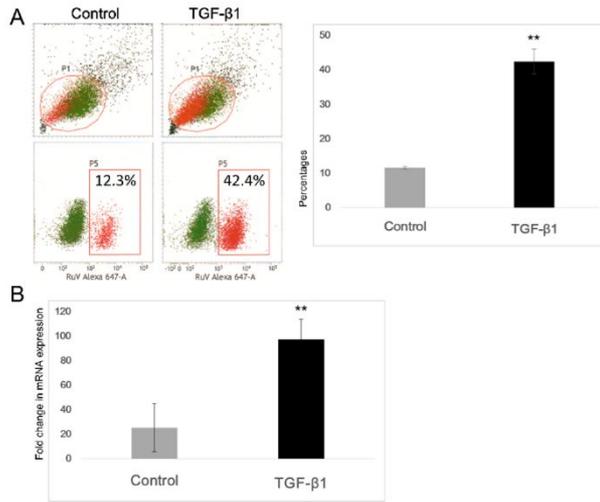
未処理のヒト不死化絨毛細胞には風疹ウイルスは低感染性であるが、低グルコースによる小胞体ストレスを受けることによって、24hpi より、FCM で、48 hpi では蛍光顕微鏡でウイルス抗原の染色を増加した。しかし 48 hpi においても風疹ウイルス感染細胞の有意なアポトーシスの増加は認めなかった。上清中へのウイルスの粒子の産生は 24 時間から 5 日間継続して認められた。



(図 2) フローサイトメトリー法により風疹ウイルスのカプシドタンパク質の検出

(3) 上皮細胞の上皮間葉転換が、風疹ウイルス感染に影響するかについて研究

ヒト肺胞上皮由来である A549 細胞で TGF- β 1 添加により上皮間葉転換が誘導され、風疹ウイルスの感受性を上昇したことを認めた。



(図3)フローサイトメトリーとリアルタイム RT-PCR 法で風疹ウイルスのカプシドタンパク質の検出

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Trinh Quang Duy, Pham Ngan Thi Kim, Takada Kazuhide, Ushijima Hiroshi, Komine-Aizawa Shihoko, Hayakawa Satoshi	4. 巻 24
2. 論文標題 Roles of TGF- 1 in Viral Infection during Pregnancy: Research Update and Perspectives	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24076489	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 Trinh Quang Duy, Pham Ngan Thi Kim, Takada Kazuhide, Takano Chika, Komine-Aizawa Shihoko, Hayakawa Satoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 TGF- 1 Promotes Zika Virus Infection in Immortalized Human First-Trimester Trophoblasts via the Smad Pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11193026	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 Trinh Quang Duy, Takada Kazuhide, Pham Ngan Thi Kim, Takano Chika, Namiki Takahiro, Ikuta Ryo, Hayashida Shingo, Okitsu Shoko, Ushijima Hiroshi, Komine-Aizawa Shihoko, Hayakawa Satoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Enhancement of Rubella Virus Infection in Immortalized Human First-Trimester Trophoblasts Under Low-Glucose Stress Conditions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 904189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2022.904189	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 Pham Ngan Thi Kim, Trinh Quang Duy, Takada Kazuhide, Komine-Aizawa Shihoko, Hayakawa Satoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Low Susceptibility of Rubella Virus in First-Trimester Trophoblast Cell Lines	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 1169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v14061169	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 Trinh Duy Quang	4. 巻 10
2. 論文標題 Recent Research in Cell Stress and Microbial Infection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms10030622	査読の有無 無
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 Takada Kazuhide, Shimodai-Yamada Sayaka, Suzuki Mayumi, Trinh Quang Duy, Takano Chika, Kawakami Kaori, Asai-Sato Mikiko, Komatsu Atsushi, Okahashi Aya, Nagano Nobuhiko, Misawa Toshiya, Yamaguchi Kyohei, Suzuki Tadaki, Kawana Kei, Morioka Ichiro, Yamada Hideto, Hayakawa Satoshi, Hao Hiroyuki, Komine-Aizawa Shihoko	4. 巻 127
2. 論文標題 Restriction of SARS-CoV-2 replication in the human placenta	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Placenta	6. 最初と最後の頁 73 ~ 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.placenta.2022.07.010	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 Takano Chika, Horie Masafumi, Taiko Isamu, Trinh Quang Duy, Kanemaru Kazunori, Komine-Aizawa Shihoko, Hayakawa Satoshi, Miki Toshio	4. 巻 18
2. 論文標題 Inhibition of Epithelial-Mesenchymal Transition Maintains Stemness in Human Amniotic Epithelial Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Reviews and Reports	6. 最初と最後の頁 3083 ~ 3091
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12015-022-10420-1	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 Pham Ngan Thi Kim, Nishimura Shuichi, Shimizu-Onda Yuko, Trinh Quang Duy, Komine-Aizawa Shihoko, Khamrin Pattara, Okitsu Shoko, Sato Shintaro, Kobayashi Takeshi, Maneekarn Niwat, Hayakawa Satoshi, Ushijima Hiroshi	4. 巻 28
2. 論文標題 Emerging norovirus GII.4 Sydney[P31] causing acute gastroenteritis outbreak in children in Japan, during COVID-19, 2021	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 1347 ~ 1351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2022.05.015	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 該当する

1. 著者名 Namiki Takahiro, Komine Aizawa Shihoko, Takada Kazuhide, Takano Chika, Trinh Quang Duy, Hayakawa Satoshi	4. 巻 48
2. 論文標題 The association of three doses of the <scp>BNT162b2 mRNA</scp> vaccine with abnormal bleeding and an irregular menstrual cycle among premenopausal females: A single institute observation study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 2903 ~ 2910
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.15400	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 Namiki Takahiro, Komine-Aizawa Shihoko, Takada Kazuhide, Takano Chika, Trinh Quang Duy, Hayakawa Satoshi	4. 巻 28
2. 論文標題 Adverse events after BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccination in health care workers and medical students in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 1220 ~ 1224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2022.05.002	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 Namiki Takahiro, Takano Chika, Aoki Ryoji, Trinh Duy Quang, Morioka Ichiro, Hayakawa Satoshi	4. 巻 62
2. 論文標題 Parenchymal calcification is associated with the neurological prognosis in patients with congenital rubella syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Congenital Anomalies	6. 最初と最後の頁 38 ~ 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cga.12442	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 Kawata Kimiko, Hoque Sheikh Ariful, Nishimura Shuichi, Yagyu Fumihito, Islam Mohammad Tajul, Sharmin Laila Shamima, Pham Ngan Thi Kim, Onda-Shimizu Yuko, Trinh Duy Quang, Takanashi Sayaka, Okitsu Shoko, Khamrin Pattara, Maneekarn Niwat, Hayakawa Satoshi, Ushijima Hiroshi	4. 巻 17
2. 論文標題 Role of rotavirus vaccination on G9P[8] rotavirus strain during a seasonal outbreak in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Vaccines & Immunotherapeutics	6. 最初と最後の頁 3613 ~ 3618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/21645515.2021.1925060	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 該当する

1. 著者名 Pham Thi Kim Ngan, Trinh Duy Quang, Takada Kazuhide, Takano Chika, Sasano Mari, Okitsu Shoko, Ushijima Hiroshi, Komine-Aizawa Shihoko, Hayakawa Satoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 The Epithelial-to-Mesenchymal Transition-Like Process Induced by TGF- 1 Enhances Rubella Virus Binding and Infection in A549 Cells via the Smad Pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms9030662	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 Pham Thi Kim Ngan, Thongprachum Aksara, Shimizu Yuko, Shiota Itoe, Hoque Sheikh Ariful, Khamrin Pattara, Takano Chika, Trinh Duy Quang, Okitsu Shoko, Komine-Aizawa Shihoko, Shimizu Hiroyuki, Maneekarn Niwat, Hayakawa Satoshi, Ushijima Hiroshi	4. 巻 90
2. 論文標題 Genetic diversity of Parechovirus A in infants and children with acute gastroenteritis in Japan during 2016-2018	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Infection, Genetics and Evolution	6. 最初と最後の頁 104776
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.meegid.2021.104776	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 該当する

〔学会発表〕 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Trinh Duy Quang、高田和秀、Pham Thi Kim Ngan、高野智圭、相澤(小峯)志保子、早川 智
2. 発表標題 小胞体ストレスは不死化絨毛細胞株の風疹ウイルス感受性を誘導する
3. 学会等名 第36回日本生殖免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相澤(小峯)志保子、高田和秀、Trinh Duy Quang、早川 智
2. 発表標題 SARS-CoV-2と胎盤関門
3. 学会等名 第36回日本生殖免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田和秀、Trinh Duy Quang、生田 稜、相澤(小峯)志保子、辻 典子、早川 智
2. 発表標題 ヒト不死化腸管上皮細胞株を用いたSARS-CoV-2複製に対するLactobacillusの影響の検討
3. 学会等名 日本食品免疫学会 第17回 学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田 和秀、Trinh Duy Quang、生田 稜、相澤(小峯)志保子、羽尾 裕之、加藤 紀子、平田 善康、大森 さゆ、佐藤 美紀子、小松 篤史、長野 伸彦、岡橋 彩、高野 智圭、馬詰 武、下屋 浩一郎、川名 敬、森岡 一朗、山田 秀人、早川 智
2. 発表標題 SARS-CoV-2 陽性妊婦における胎盤の免疫・病理学的検討
3. 学会等名 第29回日本胎盤学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Trinh Duy Quang、高田和秀、Pham Thi Kim Ngan、高野智圭、相澤(小峯)志保子、早川智
2. 発表標題 小胞体ストレスはヒト不死化絨毛細胞HTR-8 / SVneo細胞を風疹ウイルス感受性にする
3. 学会等名 第28回日本胎盤学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Trinh Duy Quang、Pham Thi Kim Ngan、Takada Kazuhide、Okitsu Shoko、Ushijima Hiroshi、Komine-Aizawa Shihoko、Hayakawa Satoshi
2. 発表標題 TGF- 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition-like process enhances rubella virus infection to human lung epithelial A549 cells
3. 学会等名 The 94th Annual Meeting of the Japanese Association for Infectious Diseases
4. 発表年 2020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	早川 智 (HAYAKAWA Satoshi) (30238084)	日本大学・医学部・教授 (32665)	
研究 分担者	相澤 志保子 (AIZAWA Shihoko) (30513858)	日本大学・医学部・准教授 (32665)	

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