

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08839

研究課題名(和文) デング出血熱の発症に関与する血管上皮細胞内の分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms in vascular epithelial cells involved in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever

研究代表者

鍋島 武 (NABESHIMA, Takeshi)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：30546859

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)：本研究計画の提案、採択後、コロナウイルスのパンデミックが発生し、海外においてウイルス感染患者からのサンプル収集に関する計画について大きな変更を余儀なくされた。そのため、研究期間の延長を申請し、当初の計画の目的を満たすデータをとる方法について検討していたが、研究代表者が所属する研究室の研究者から外部の業者にサンプルの解析を委託し、次世代シーケンズのデータを取ることを提案された。現在、アゼンタ(旧Genewiz)社にサンプルを提出し、結果の報告を待っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究のデータから、デング出血熱の患者における血管からの血漿の漏出について、in vitro系を用いた遺伝子発現プロフィールに基づいた清浄の解析が可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：After this research plan was proposed and adopted, a coronavirus pandemic broke out, forcing a major change in the plan regarding the collection of samples from virus-infected patients overseas. Therefore, we applied for an extension of the research institute and were discussing ways to take data that would meet the objectives of the original plan, when Associate Professor Takamatsu of the principal investigator's laboratory suggested that we outsource the analysis of samples to an outside contractor and take data for next-generation sequencing. Currently, the samples have been submitted to Azenta (formerly Genewiz) and we are waiting for a report on the results.

研究分野：公衆衛生学

キーワード：デング出血熱 血漿漏出 トランスクリプトーム 細胞接着

1. 研究開始当初の背景

デングウイルスに感染した患者の血管では、血小板の減少、血漿の漏出等の症状が起きる。この現象は、サイトカインや補体等、免疫系に関連する複数の遺伝子群の発現量の変化と連動していることが知られている。血管内で起きる症状の原因を解明し、治療法を確立するためには、血管組織で発現している mRNA やタンパクの動態を網羅した、総合的な研究が必要である。しかしながら、デングウイルスの宿主はヒトであり、血漿漏出等の症状をシミュレートするための動物モデルは存在しない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、培養細胞による *in vitro* の実験系を用いて、血管内皮細胞がデングウイルスの感染によって受けるストレスを再現し、次世代型シーケンサー(NGS)を用いて、細胞内で発現している全ての mRNA の定量を目的としたトランスクリプトームの解析を行い、遺伝子発現を網羅的に調べる事で、デングウイルスに感染した患者において、血漿漏出等の発症を特異的に抑制する有効な治療法の確立のために必要なデータを収集することを目的とした。デングウイルス感染患者血清を、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)に接種すると、患者の血清中の成分の影響により HUVEC 細胞の細胞膜の透過性が昂進する。予備実験の結果から、重症期の血清を接種すると、急性期、回復期血清に比べて HUVEC 細胞の細胞膜の透過性がより高くなることが解った。この結果は、血管内皮細胞の性状変化による出血等の症状に、ウイルス増殖以外の血清に含まれる因子の増減が関与している可能性を示唆している。患者血清を接種した HUVEC 細胞のトランスクリプトーム解析を行い、血漿漏出等につながる細胞の性質の変化に関わるデータを取得する。

3 . 研究の方法

当初はベトナム Hue 県の Hue 中央病院において、デングウイルス感染症患者より血清サンプルを採取する。一人の患者から、デングウイルス感染症の病態の進行に合わせて、血清を複数回採取する。血清サンプルは、長崎大学ベトナム拠点を通して長崎大学熱帯医学研究所のウイルス学研究室に集積、保管する。という予定であった。本研究計画の提案、採択後、コロナウイルスのパンデミックが発生し、海外においてウイルス感染患者からのサンプル収集に関する計画について大きな変更を余儀なくされた。そのため、研究期間の延長を申請し、当初の計画の目的を満たすデータをとる方法について検討していたが、研究代表者が所属する研究室の研究者から外部の業者にサンプルの解析を委託し、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトームのデータを取ることを提案された。2018 年以前よりベトナムの国立衛生疫学研究所(NIHE)との共同研究を行っていたため、研究室にはデングウイルス感染患者から抽出された血清サンプルが存在していた。当初の予定よりも古い血清を使い、検体数も少なくなったが、当初予定していた実験プロトコルに従ってベトナム由来の 6 人分の血清サンプルを用意して HUVEC 細胞に接種し、HUVEC 細胞を血清成分に暴露した後に血清を含む上清を取り除き、HUVEC 細胞から RNA を抽出した。

4 . 研究成果

現在、アゼンタ(旧 Genewiz)社に抽出した RNA サンプルを提出し、次世代型シーケンサーによるシーケンシングの結果の報告を待っている。アゼンタ社からは 10xGenomics 社の次世代型シーケンサーを用いてトランスクリプトームを読み配列情報をまとめた、Cell Ranger 形式の出力データを受け取る予定である。データ分析についてはすでに統計ソフトウェア R およびそのプラグインである `seurat ver5` によるワークフローを構築済みである。受領したデータから、患者血清の接種の有無、およびそれぞれの患者の病態の重篤度と、HUVEC 細胞中で発現する遺伝子の中で、特に細胞接着および炎症反応に関与する遺伝子の発現について量的な分析を行い、また Go データベースを参照しながらオントロジー分析を行って、デングウイルス感染患者の血清成分により、どのような遺伝子が上皮細胞のなかで発現量の変動を引き起こすのかを定量的、統計的に解析する。この分析からは、デング出血熱患者の血管上皮で起きている炎症反

応のシミュレーションとしての分析結果が得られると期待され、計画本来の目的である、デング出血熱患者で起きる血漿の漏出についての in vitro 系でのトランスクリプトーム解析を行うという目的を達成する見通しである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nabeshima Takeshi, Ngwe Tun Mya Myat, Thuy Nguyen Thi Thu, Hang Nguyen Le Khanh, Mai Le Thi Quynh, Hasebe Futoshi, Takamatsu Yuki, Nagasaki University Vietnam Research Group	4. 巻 95
2. 論文標題 An outbreak of a novel lineage of dengue virus 2 in Vietnam in 2022	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Medical Virology	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jmv.29255	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
---------------------------	-----------------------	----

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