

令和 6 年 4 月 16 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07761

研究課題名（和文）海馬硬化を伴う内側側頭葉てんかん発症におけるHHV-6B感染の役割解明

研究課題名（英文）Elucidation of the role of HHV-6B infection in the development of medial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis

研究代表者

河村 吉紀（Kawamura, Yoshiki）

藤田医科大学・医学部・臨床准教授

研究者番号：30581475

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）：難治性てんかんである海馬硬化（MTS）にhuman herpesvirus 6B（HHV-6B）の関与が示唆されている。本研究ではトランスクリプトームおよびプロテオーム解析を行うことで、HHV-6Bが関連したMTS発症にかかわる候補分子の同定を目指した。トランスクリプトーム解析によりMTS-HHV-6検出群に特徴的な遺伝子発現を19項目抽出し、多数検体を用いてRT-PCRで検証したところ、FOS遺伝子がHHV-6検出MTS脳で健常に比し高発現だった。プロテオーム解析では、2項目の特徴的な蛋白発現を抽出し、これらをELISAを用いて多数検体で検証予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MTSは内科的治療では難治性のてんかんで、外科的治療（選択的扁桃核・海馬切除術）が有効な治療法となっているが、侵襲性の高い治療となっている。MTS発症にはHHV-6B感染の関与が示唆されており、本研究でもMTS患者脳からはHHV-6Bが検出される事が多く、さらに、それによる宿主の遺伝子発現の変化の可能性が示唆された。MTS発症に対するHHV-6B感染が寄与する病態が明らかとなれば、それに対するHHV-6Bに対する抗ウイルス療法や病態に応じた標的治療が可能となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：It is suggested that human herpesvirus 6B (HHV-6B) has been associated in hippocampal sclerosis (MTS), an intractable form of epilepsy. In this study, we aimed to identify candidate molecules involved in HHV-6B-associated MTS by transcriptomic and proteomic analysis. We identified 19 genes that are characteristic of the MTS-HHV-6 positive group by transcriptome analysis and validated them by RT-PCR using a large number of samples, and found that the FOS gene was highly expressed in HHV-6 positive MTS brains compared to healthy controls. In the proteome analysis, two characteristic proteins were selected, and these will be verified in a large number of samples using ELISA.

研究分野：小児感染症

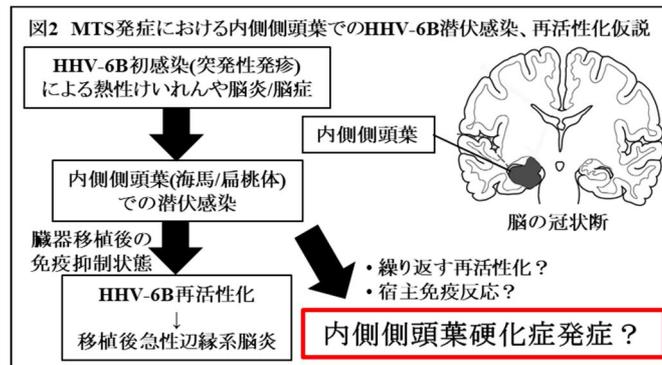
キーワード：ヒトヘルペスウイルス6 内側側頭葉てんかん 内側側頭葉硬化症 トランスクリプトーム解析 プロテオーム解析 RNA-seq

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

1. 内側側頭葉てんかん (mesial temporal lobe epilepsy, MTLE):

MTLE は薬剤抵抗性の成人難治性てんかんで、その原因として**内側側頭葉硬化症 (mesial temporal sclerosis, MTS)**が最も多い。MTS の患者数は約5万人と推定されており、**指定難病**の一つである。MTS 形成には複雑型熱性けいれんなど乳幼児期のけいれん持続が重要な役割を果たしている。患者 QOL 改善のため侵襲的外科的治療が行われており、より**低侵襲かつ効果的な内科的治療の開発**が患者予後改善のために必須である。本疾患の主要原因である MTS 発症に、HHV-6B 潜伏感染、再活性化がどのように関与しているか明確にすることで、侵襲の少ない**新規治療戦略としての抗ウイルス療法**の可能性が考えられる。



2. HHV-6BとMTLEの関連性:

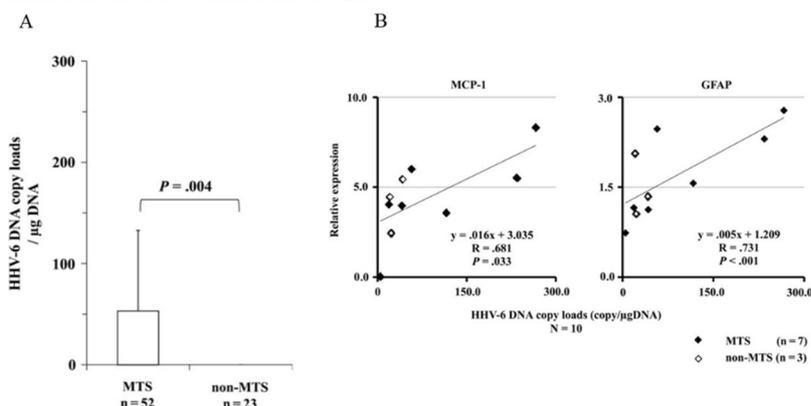
HHV-6B 初感染 (突発疹) の臨床像は一般的に予後良好だが、**熱性けいれんや脳炎・脳症などの中枢神経系合併症が大きな問題**となる。HHV-6B 初感染時の熱性けいれんは、複雑型熱性けいれんの頻度が高いことが示唆されており (Miyake M, Kawamura Y, et al. *Pediatr Neurol.* 2020) 米国の大規模コホート研究 (FEBSTAT 研究) でも **HHV-6B と熱性けいれん重積や将来の MTLE 発症との関連性**について検証中である。前述の我々の先行研究 (Kawamura Y, et al. *J Infect Dis.* 2015) でも、非 MTS 脳組織に比べ、**MTS 脳組織で HHV-6B DNA 量が有意に高かった (図 1. A)**。つまり、臨床的に複雑型熱性けいれんの合併頻度が高く、熱性けいれん重積との関連性も示唆されている **HHV-6B 感染が、MTLE の中でも特に MTS の病態形成に重要なこと**が想定された。HHV-6 再活性化による移植後急性辺縁系脳炎の患者髄液には大量のウイルス DNA が存在することが明らかになっており (Kawamura Y, et al. *J Clin Virol.* 2011) **HHV-6B が初感染後中枢神経系に潜伏感染し後に海馬領域で再活性化することは明らか**である。さらに、先の研究で**海馬中 HHV-6B DNA 量と MCP-1、GFAP-1 遺伝子発現が相関すること**も明らかになされた。

図 1. B) 以上のような研究結果から、**MTS 発症における内側側頭葉での HHV-6B 潜伏感染、再活性化仮説 (図 2)**を提唱した。

3. Proteome 解析の必要性:

切除脳組織を用いた先行研究は宿主遺伝子発現解析が一部遺伝子に限られていたこと、MTLE 患者脳のみを対象とした解析という limitation があった。この問題を解決するため、**市販の健常脳組織をコントロール検体**として追加し、次世代シーク

図1. HHV-6B DNA量は非MTS組織よりもMTS組織で有意に高値 (A) .脳組織中HHV-6B DNA量とMCP-1、GFAP1遺伝子発現は相関する (B) . Kawamura Y, et al. *J Infect Dis.* 2015.参照



エンサーを用いた RNA-Seq によって、HHV-6B DNA 高値の患者海馬とコントロール脳の網羅的な宿主遺伝子発現解析が進行中である。さらに MTS 形成にかかわる HHV-6B 感染の病態をより詳細に解析するためには、次に患者脳とコントロール脳を用いた proteome 解析が必須と考えた。病態形成に関連する宿主遺伝子に加え関連する蛋白質を同定することで、MTS 発症の詳細なメカニズム解明や MTS 診断マーカーの発見が可能となり、それを基に MTS 診療に対する小児期からの発症予測、低侵襲内科的治療戦略の構築が期待される。

2. 研究の目的

HHV-6B 感染 MTS 脳組織、HHV-6B 非感染 MTS 脳組織、HHV-6B 非感染正常コントロール脳組織について、Orbitrap fusion 質量分析計 (Thermo Fisher Scientific 社) による proteome 解析を行うことで、HHV-6B 感染に伴う MTS 発症に関与する宿主蛋白質群を同定する。

3. 研究の方法

1. **脳検体の収集**: 静岡神経・てんかん医療センターで MTLI に対し海馬切除術を施行し摘出した脳検体を -80 で保存し、凍結状態で送付。
2. **HHV-6B DNA 量の測定**: 脳検体から DNA 抽出し、real-time PCR 法で HHV-6B DNA 量を測定する。
3. **Transcriptome 解析**: Illumina 社、HiSeq1500 を使って mRNA シーケンス、その後 3 群間の mRNA 発現のトランスクリプトーム解析を行う。HHV-6B 感染脳組織で有意に発現亢進あるいは低下していた遺伝子について、real-time RT-PCR 法を用いて発現量の差異を確認する
4. **Proteome 解析**: HHV-6B DNA 量が高値 (1,000 copy/ μ gDNA 以上) の MTS 患者海馬および扁桃体、HHV-6B 陰性患者脳、コントロール脳を各 6 検体選定する。対象検体から相間移動溶解剤 (Phase-transfer surfactants 法) を利用して蛋白質を抽出、さらにトリプシン処理しペプチド化する。その後、LC system (EASY-nLC 1000; Thermo Fisher Scientific) でペプチドを分離し、Orbitrap Fusion 質量分析計 (Thermo Fisher Scientific) で質量分析を行う。
5. **質量分析データの解析**: Proteome Discoverer (Thermo Fisher Scientific) を使用してヒートマップやボルケーノプロットにより HHV-6B 感染脳組織に特異的な候補蛋白質を抽出する。
6. **多数検体を用いた候補分子の解析**: 同定された候補蛋白質について、保存されている多数の脳検体 (HHV-6B 陽性海馬/扁桃体、HHV-6B 陰性海馬/扁桃体) を用いて、ELISA 法で解析する。

4. 研究成果

海馬において、MTS22/79 検体 (27.8%)、非 MTS3/25 検体 (12.0%) で HHV-6 が検出され、既報と同様に MTS で HHV-6 の検出率が高かった。扁桃体では 6 検体 (20%) で HHV-6 が検出され、MTS3/16 検体 (18.8%)、非 MTS3/14 検体 (21.4%) で HHV-6 の検出率に差はなかった。

それぞれ海馬および扁桃体の MTS-HHV-6 検出群、非検出群、健常脳の 6 群で各 2 検体を年齢、性を一致させて抽出し、トランスクリプトーム解析を行った。主成分解析において海馬、扁桃体共に MTS-HHV-6 検出群、非検出群、健常脳で遺伝子発現の傾向に差が認められた。ヒートマップ、ボルケーノプロット解析により各群に特徴的な遺伝子発現を 19 項目抽出した。これらの遺伝子発現を多数検体で検証したところ、FOS 遺伝子が HHV-6 陽性 MTS 脳で健常に比し統計学的有意に高発現となっていた。

また、プロテオーム解析においては、それぞれ海馬の MTS-HHV-6 検出群 6 検体、非検出群 5 検体、健常脳 4 検体、扁桃体の MTS-HHV-6 検出群 3 検体、非検出群 6 検体、健常脳 3 検体を解析した。トランスクリプトーム解析と同様に主成分解析で異なるタンパク発現の傾向が認められた。上記と同様の解析により 2 項目の特徴的な蛋白発現をピック

アップしたため、これらを ELISA を用いて多数検体で検証予定である。

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 1件）

1. 著者名 Kawamura Yoshiki, Maesawa Satoshi, Numoto Shingo, Saito Ryuta, Yoshikawa Tetsushi, Okumura Akihisa	4. 巻 7
2. 論文標題 Human herpesvirus 6 <sc>DNA</sc> was not detected in a brain specimen from a patient with mesial temporal sclerosis after status epilepticus due to human herpesvirus 6 infection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Epilepsia Open	6. 最初と最後の頁 817 ~ 821
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/epi4.12634	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 Suzuki Noriko, Ihira Masaru, Enya Yasuko, Yumi Takahashi, Izuru Chisato, Rie Igarashi, Higashimoto Yuki, Hiroki Miura, Asaki Takanashi, Kaoru Fujimoto, Kawamura Yoshiki, Yoshikawa Tetsushi	4. 巻 94
2. 論文標題 Dynamics of salivary human herpesvirus 6 and 7 shedding in pregnant women	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Medical Virology	6. 最初と最後の頁 3359 ~ 3367
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jmv.27692	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	井平 勝 (Ihira Masaru) (10290165)	藤田医科大学・保健学研究所・教授 (33916)	
研究分担者	小澤 慶 (Kozawa Kei) (10837545)	藤田医科大学・医学部・助教 (33916)	

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
研究分担者	東本 祐紀 (Higashimoto Yuki) (20569701)	藤田医科大学・医療科学部・講師 (33916)	
研究分担者	吉川 哲史 (Yoshikawa Tetsushi) (80288472)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	
研究分担者	平松 裕之 (Hiramatsu Hiroyuki) (80623206)	藤田医科大学・医学研究科・研究員 (33916)	

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