

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591616

研究課題名(和文)先天性サイトメガロウイルス感染症の神経障害モデルの開発と新規バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Establishment of experimental models for the study of congenital cytomegalovirus infection

研究代表者

中村 浩幸 (Nakamura, Hiroyuki)

独立行政法人国立成育医療研究センター・その他部局等・室長

研究者番号：70256866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：先天性サイトメガロウイルス(CMV)感染症に関する新たな実験基盤を確立し、その活用により当該疾患における神経学的合併症の克服に資することを目的とした。

ヒト人工多能性幹細胞由来神経幹・前駆細胞およびヒト神経系培養細胞株を用いてCMV感染モデルを確立した。これら感染モデルを活用し、神経系培養細胞におけるCMV感染様式や細胞障害発症機序に関する知見を得た。さらに、CMV感染にともなって発現変動する細胞遺伝子群を同定する目的で、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、CMVによる神経系障害発症に関与すると推定される遺伝子群およびバイオマーカー候補遺伝子群を同定した。

研究成果の概要(英文)：Congenital human cytomegalovirus (HCMV) infection causes neurodevelopmental disorders such as mental retardation and sensorineural hearing loss. To understand the neuropathogenesis of congenital HCMV infection, we established experimental models of HCMV infection using induced pluripotent stem cells (iPSCs) and several neural cell lines. iPSC-derived neural stem/progenitor cells (NSPCs) and the cell lines were susceptible to HCMV infection and allowed the expression of viral gene products. HCMV infection induced apoptosis in NSPCs. To explore key molecules of CMV-induced neural disorders, we performed microarray analysis and assessed changes in cellular gene expression induced by HCMV infection. We identified cellular genes which may be involved in the mechanism of HCMV-induced neurological diseases.

研究分野：ウイルス学

キーワード：サイトメガロウイルス 母児感染 神経障害 iPS細胞 先天性感染症 難聴 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

先天性サイトメガロウイルス (CMV) 感染症は、ウイルスによる先天感染症として最も頻度が高く、中枢神経系障害をはじめ多様な臓器障害を引き起こす。このため、先天感染児の発育に多大な影響を及ぼすことが知られているが、先天感染児における精神発達遅滞、脳性まひ、感音性難聴など神経学的合併症の発症機序については不明な点が多かった。また、先天感染児における神経学的合併症の有無とその重症度を早期かつ正確に把握するための診断技術は十分に確立されておらず、先天感染児の病状に応じた適切な医療サポートを実現する上でも新規診断技術の確立は重要課題と考えられた。

先天性 CMV 感染症における神経学的合併症を克服する上で、CMV 感染モデルは重要な研究基盤となるが、これまでは一部の培養細胞やマウス・モルモットなどを用いた感染モデルが用いられており、さらに有用性の高い CMV 感染モデルの開発が望まれていた。

2. 研究の目的

先天性 CMV 感染症における精神発達遅滞や感音性難聴など神経学的合併症を研究する上で新たな CMV 感染モデルを確立し、その活用により神経系障害発症機序の解明、および神経系障害関連バイオマーカー探索などを推進することで、当該疾患における神経学的合併症の克服に資することを目的とする。

3. 研究の方法

ヒト線維芽細胞株 MRC5 に山中 4 因子を導入して作製されたヒト人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell; iPSC) として MRC-iPSC-25 細胞を使用した。MRC-iPSC-25 細胞から SMAD 情報伝達系の二重阻害法に基づいて分化誘導を行い、神経幹・前駆細胞 (NSPC/iPSC) を作製した。CMV 感染実験には、Towne 株あるいは AD169 株を用いた。

細胞遺伝子産物および CMV 遺伝子産物の発現状況の解析は、RT-PCR 法、ウェスタンブロット法、免疫染色法により行った。マイクロアレイ解析には、Agilent Technology 社製 SurePrint G3 Human GE Microarray 8x60K v2 を使用した。

4. 研究成果

(1) ヒト iPSC 由来 NSPC の作製

ヒト iPSC 由来神経系細胞を用いた新たな CMV 感染モデルの確立を目的として、MRC-iPSC-25 細胞から分化誘導によって神経幹・前駆細胞 (NSPC/iPSC) を作製した。NSPC/iPSC について、NSPC マーカーの発現を解析するために Nestin、Sox2、Musashi-1、Pax6 などの発現を RT-PCR 法、ウェスタンブロット法、免疫染色法により解析した。その結果、NSPC としてのマーカー発現パターンを示していることが確認された。

(2) iPSC 細胞および NSPC/iPSC における CMV 感染感受性と CMV 遺伝子発現様式に関する解析

MRC-iPSC-25 細胞および NSPC/iPSC に対して CMV を実験的に感染させ、CMV に対する感染感受性や CMV 遺伝子発現様式を解析した。その結果、CMV 感染 NSPC/iPSC は細胞変性効果と思われる細胞形態変化を示すとともに、CMV 遺伝子産物 IE1、IE2、vIL-10、pp65、UL36、UL38 の mRNA を RT-PCR 法で検出した。また、IE1、IE2、pp65、gB についてはウェスタンブロット法で各蛋白質の発現を検出した。これらの結果より、NSPC/iPSC は CMV に対する感染感受性を保持し、CMV 感染後には様々な CMV 遺伝子産物の発現が誘導されていることが明らかとなった。CMV 複製に関連する遺伝子産物の発現にともない、子孫粒子を産生し得ることも明らかとなった。

一方、分化誘導前の iPSC 細胞である MRC-iPSC-25 細胞に CMV を感染させた場合には、IE1/IE2 蛋白質など CMV 遺伝子産物の発現は著しく抑制されており、免疫染色法で IE1/IE2 蛋白質を検出することは困難であった。この結果より、iPSC 細胞 (MRC-iPSC-25) と神経幹・前駆細胞 (NSPC/iPSC) との間には、CMV に対する感染感受性や CMV 遺伝子発現を規定する細胞内環境に関して差異が生じていることが示唆された。

(3) 神経系培養細胞株を用いた CMV 感染モデルの確立

NSPC/iPSC とともに、複数のヒト神経系培養細胞株についても、CMV 感染感受性の有無および CMV 遺伝子産物発現様式を解析した。本研究では、神経系培養細胞株として SH-SY5Y 細胞、U373MG 細胞、Hs 683 細胞を用いて CMV 感染実験を行い比較検討したが、いずれの培養細胞株においても CMV 感染は成立し、CMV 複製関連遺伝子産物の発現も RT-PCR 法やウェスタンブロット法により確認された。また、CMV 感染細胞は細胞変性効果と思われる細胞形態変化を示した。これらの結果から、NSPC/iPSC に加えてこれら神経系培養細胞株も CMV 感染モデルを確立する上で有用であると考えられた。

(4) CMV 感染による神経系障害発症機序に関する解析

CMV による神経系障害発症機序として、NSPC/iPSC に CMV が感染することでアポトーシスを誘導することを TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 法により検出した。次に、CMV 感染によるアポトーシス誘導機序について解析した結果、CMV 感染細胞においてカスパーゼ 3 やカスパーゼ 9 の活性化が観察された。さらに、カスパーゼ経路活性化の機序について解析した結果、シトクロム c のミトコンドリア外漏出と思われる細胞内分布変化が観察された。加えて、小胞体ストレスのセンサー分子である

inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α)やPKR-like eukaryotic initiation factor 2a kinase (PERK) のリン酸化を認めた。C/EBP-homologous protein (CHOP)をコードする転写産物や X-box binding protein 1 (XBP1)RNA のスプライシング亢進も観察された。これらのことから、CMV 感染 NSPC/iPSC において、ミトコンドリア機能障害や小胞体ストレス応答 (Unfolded Protein Response; UPR) がカスパーゼ経路活性化にともなうアポトーシス誘導に関与していると考えられた。

(5) 先天性 CMV 感染症における神経学的合併症関連分子の探索

先天性 CMV 感染症における神経学的合併症に関連するバイオマーカー探索および神経学的合併症の発症機序解明を目的として、CMV 感染 NSPC/iPSC において、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、CMV 非感染 NSPC/iPSC と比較して、CMV 感染 NSPC/iPSC において著しく発現変動する細胞遺伝子群を同定した。これらの遺伝子群の中には、細胞増殖、細胞分化、シグナル伝達、サイトカイン、アポトーシスなどに属する遺伝子が複数含まれていた。これらの遺伝子群は、当該疾患の神経系障害発症機序に関連すると推定されるため、RT-PCR 法により発現変動の有無を確認した。また、一部の遺伝子についてはバイオマーカーとしての有用性を検討するため、ウェスタンブロット法などにより蛋白質レベルの発現変動の有無を解析した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

① Liao H, Lee JH, Kondo R, Katata M, Imadome K, Miyado K, Inoue N, Fujiwara S, Nakamura H. The highly conserved human cytomegalovirus UL136 ORF generates multiple Golgi-localizing protein isoforms through differential translation initiation. *Virus Res.* 2014 Jan 22;179:241-6.

doi:10.1016/j.virusres.2013.11.002.

② Taniguchi R, Koyano S, Suzutani T, Goishi K, Ito Y, Morioka I, Oka A, Nakamura H, Yamada H, Igarashi T, Inoue N. Polymorphisms in TLR-2 are associated with congenital cytomegalovirus (CMV) infection but not with congenital CMV disease. *Int J Infect Dis.* 2013 Dec;17(12):e1092-7. doi:10.1016/j.ijid.2013.06.004.

③ Nakamura H, Liao H, Minami K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Imadome K, Inoue N, Fujiwara S. Human cytomegalovirus induces apoptosis in neural stem/progenitor cells

derived from induced pluripotent stem cells by generating mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress. *Herpesviridae.* 2013 Oct 21;4(1):2. doi: 10.1186/2042-4280-4-2.

[学会発表] (計 4 件)

① Liao H, Lee J-H, Kondo R, Katata M, Imadome K, Miyado K, Inoue N, Fujiwara S, Nakamura H. The highly conserved human cytomegalovirus UL136 ORF generates multiple Golgi-localizing protein isoforms through differential translation initiation. 39th Annual International Herpesvirus Workshop. Kobe, 20-23 July, 2014.

② Taniguchi R, Koyano S, Suzutani T, Goishi K, Ito Y, Morioka I, Nakamura H, Yamada H, Oka A, Inoue N. A single nucleotide polymorphism in the NKG2D gene is associated with clinical outcome of congenital cytomegalovirus infection at birth. 39th Annual International Herpesvirus Workshop. Kobe, 20-23 July, 2014.

③ 廖 華南、近藤力太、堅田真礼、南佳ほり、阿久津英憲、梅澤明弘、井上直樹、藤原成悦、中村浩幸. サイトメガロウイルスによる神経幹・前駆細胞障害機構の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2013 年 11 月 10 日、神戸.

④ 中村浩幸、廖 華南、南佳ほり、阿久津英憲、梅澤明弘、井上直樹、藤原成悦. ヒト人工多能性幹細胞を用いた神経幹細胞への実験的 HCMV 感染系の確立. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 2012 年 11 月 14 日、大阪.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 浩幸 (NAKAMURA, Hiroyuki)

研究者番号 : 70256866

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :