

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 11 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870580

研究課題名(和文) 感染細胞指向性の違いにより病原性が異なるサイトメガロウイルスの型判別法開発

研究課題名(英文) Development of subtyping cytomegalovirus using cell tropism and pathogenesis

研究代表者

生田 和史 (Ikuta, Kazufumi)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：60512184

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)： 感染細胞指向性の違いにより病原性が異なると想定される臨床分離サイトメガロウイルス(CMV)に対する型判別法の開発を目指した基礎研究を行った。ソリブジン(BVara-U)感受性の異なる単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)2株を用い、ウイルス増殖に依らない組換えウイルス作成を試行した。先天性CMV感染では高率に聴覚障害が認められる。モデルマウス作製により、CMVが聴覚障害を惹起する機構を解析した。研究継続により、「CMV胎内感染防止」と「CMVによる聴覚障害の予防・治療」に結びつく成果が得られると考えている。

研究成果の概要(英文)： We performed a basic research aimed to develop the subtyping of cytomegalovirus (CMV) based on its pathogenicity related tropism. Multiple trials were performed by using two herpes simplex virus type 1 strains with difference of sorivudine (BVara-U) sensitivity. Sensorineural hearing loss (SNHL) is often observed in children with congenital CMV infection. We analyzed the CMV infecting site in ears by establishing mouse model of CMV-induced SNHL.

研究分野：ウイルス学

キーワード：先天感染 サイトメガロウイルス 単純ヘルペスウイルス

1. 研究開始当初の背景

厚生労働科学研究「新生児を対象とした先天性サイトメガロウイルス (CMV) 感染スクリーニング体制の構築に向けたパイロット調査と感染児臨床像の解析エビデンスに基づく治療指針の基盤策定」(平成 20-22 年)により新生児尿 23,757 例について CMV 検出スクリーニングが行われた結果、73 例の先天性 CMV 感染児が同定され、うち 17 例が顕性感染であった (BMJ Open 2011)。先天 CMV 感染の 80% は不顕性感染であり、発症に至る危険因子は全く分かっていない。そのため 300 の出生に 1 名存在する、頻度の高い本感染の発症予防策を考えることが困難な現状にある。我々は中和エпитープを標的とした CMV 型特異的な ELISA 法 (Clin Infect Dis 2007, Microbes Infect 2008)、TaqMan probe を用いたリアルタイム PCR 法 (科研費若手 (B) 平成 22-24 年度、J Clin Microbiol 2012) を開発し、先天性 CMV 感染 15 例中 2 例は重感染によること、ウイルス血清型と尿中ウイルスの型は同じであること (J Clin Virol 2013) などを発見してきた。しかし発症に至る危険因子を考えるうえでは、臨床分離ウイルスの性質を基にした更なる解析が求められる。我々は線維芽細胞株 (hTERT BJ-1) と網膜色素上皮細胞株 (ARPE) を用いて患者検体から CMV 分離を行い、感染効率が細胞株間で 1,000 倍の差異を有する 2 種類の CMV を単一個人より分離している。感染細胞指向性の大きく異なる CMV は異なる病気を起こす可能性がある。現在検査として行われている尿から分離した CMV が、患者に起こっている肺炎やリンパ球増多の原因ウイルス株とは限らないという事実を示唆している。この問題を明らかにするためにも臨床分離株の解析が重要であるが、培養細胞における CMV 臨床分離株の増殖は極端に悪く、BAC (bacterial artificial chromosome) システム等で組換えウイルスを作成するために必要な大量のウイルス DNA を得られないため、ほとんど研究がなされていない。本研究では PCR 法により DNA 断片を増幅し酵母内で再構築することにより、増殖能の低いウイルスでも迅速かつ確実に組換えウイルスを作成出来る手法を確立する。そして CM 臨床分離株の感染細胞指向性を決定する遺伝子を特定し、感染細胞指向性毎に CMV 型判定が出来るリアルタイム PCR 法を確立する。先天性 CMV 感染において単一個人内に感染している複数種類の CMV を定量的に追跡し、また顕性/不顕性者間の比較を行うことにより、発症リスクの解明を目指す。

2. 研究の目的

① CMV 臨床分離株における感染細胞指向性を決める遺伝子の同定

CMV 臨床分離株は増殖が極めて遅いため、ウイルス増殖に依らない遺伝子組換えウイルス作成が必要である。本研究では PCR 法によりウイルス DNA の全領域を

10-20kb 毎に増幅し、酵母内で再構築する。得られたウイルス DNA を細胞に導入し、人工的に作成したウイルスを得る。網膜色素上皮細胞株で増殖しにくい CMV 株 (CMV-BJ) を作成し、そこへ増殖しやすい CMV 株 (CMV-ARPE) の断片を挿入した遺伝子組換えウイルスのシリーズを作成する。作成ウイルスが網膜色素上皮細胞株で増殖しやすくなれば、原因遺伝子はその挿入断片内に存在することが分かる。

② CMV 臨床分離株の型別リアルタイム PCR 法の開発

同定された CMV 感染細胞指向性に関わる遺伝子領域についてリアルタイム PCR 法を設計し、型別に特異的なプローブでの検出を行う。これまでの先天性 CMV 感染児の研究により、我々は複数症例の経時的な検体を保存している。尿中と血液中のウイルス型は異なるのか、顕性感染に至りやすいウイルス型はあるのかなどの検討を行う。

③ モデル動物による病態解明

先天性 CMV 感染に起因する聴覚障害は予防・治療が急務である。しかしながら CMV がどのように聴覚障害を引き起こしているのか、その機序は全く解明されていない。マウスを用いた聴覚障害モデルにより、CMV に起因する聴覚障害の病態解明を行う。

3. 研究の方法

① PCR 法と酵母を用いたクローニング

本法による大型 DNA ウイルスの遺伝子組換え株作成系の開発には、実験が容易な単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) をモデルケースとして試行する。感染細胞において表現形質の異なる 2 株のウイルス (HSV-1 WT-R: ソリブジン感受性、VR-3: ソリブジン耐性) を単一個人より分離している。PCR により増幅したフラグメントを酵母に導入し、大腸菌内で単一化、細胞への導入を行う。CMV の感染細胞指向性についても同様の方法で行う。

② リアルタイム PCR 法によるウイルス型判別

CMV は中和エпитープの糖タンパク部位に塩基配列差異が有ることにより、CMV 血清型として 2 種類に大別できる。我々は同領域を対象としたリアルタイム PCR 法を開発し、先天性 CMV 感染児における尿中 CMV DNA の型別解析を行ってきた (科研費若手 (B) 平成 22-24 年度、J Clin Microbiol 2012)。この方法と同様にして、本研究では CMV 感染細胞指向性に関わる遺伝子領域についてリアルタイム PCR 法開発を行い、新たな CMV 型判定系を確立させる。我々は既に先天性 CMV 感染児について複数症例の経時的な検体を保存している。

③ モデル動物による病態解明

CMV 感染による聴覚障害動物モデルを作製する。ヒトサイトメガロウイルスはマウスに感染しないため、マウスサイトメガロウイルス (MCMV) を用いる。MCMV は経胎

盤感染しないため、生後 24 時間以内の新生仔マウスに MCMV を脳室内接種する。聴性脳幹反応により聴覚を評価する。

4. 研究成果

①組換えウイルス作成系を単純ヘルペスウイルスで試行した

抗ウイルス薬ソリブジンに感受性である HSV-1 WT-R 株と非感受性である VR3 株について、それぞれウイルス DNA の全領域を 10-20kb 毎に増幅し、酵母内で長断片として構築した。HSV-1 WT-R のウイルス粒子とともに VR-3 の DNA 断片を導入したところ、一部の断片導入時に於いて薬剤耐性となった。現在再現性の確認と原因遺伝子特定に向けて導入断片の限定化を行っている。本研究費助成期間中に CMV の感染細胞指向性を決定づける原因遺伝子の最終的な特定やその遺伝子領域に基づく型判別法の確立にまでは至っていない。しかしながら研究継続による本法の確立により、CMV 臨床分離株の解析が進むことが期待される。

②CMV 感染により聴覚障害モデルマウスを作製し、ウイルス感染部位の特定や外有毛細胞におけるミオシン消失を見出した

ウイルス抗原・DNA 陽性細胞は 1 週令のみ、らせん神経節等に局限して存在した。聴覚障害は週令とともに進行するにもかかわらず、ウイルス感染細胞は 2 週令以降に認められなかった。聴覚障害の進行時期には内耳の外有毛細胞に於けるミオシン発現消失が認められ、これが聴覚障害の要因と考えられる (J Clin Virol 2015)。しかしながら有毛細胞にウイルスは認められず、ミオシン発現が消失する機序解明が必要である。

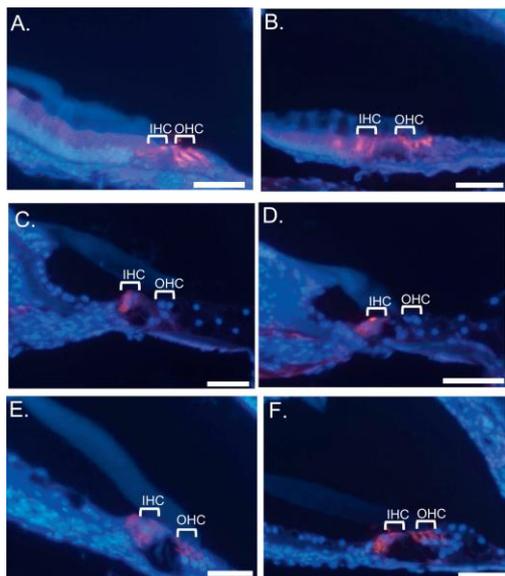


図 1. CMV 感染による聴覚障害モデルマウスにおける内耳有毛細胞ミオシン発現

A: 1 週令、B: 2 週令、
C (聴覚障害有)と E (聴覚障害無): 3 週令、
D (聴覚障害有)と F (聴覚障害無): 3 週令、

IHC: 内毛細胞、OHC: 外毛細胞
赤: ミオシン VI、青: DAPI による核染色

C と D で OHC におけるミオシン発現消失が認められる。

(図 1 は J Clin Virol 2015 より抜粋)

本研究費助成期間中では、CMV の感染細胞指向性に基づく病原性に関与した型判別法の樹立までには至らなかった。しかしながら HSV-1 を用いた準備研究に於いて、薬剤耐性遺伝子の特定に繋がる情報が集積出来た。時間を要するが同様の方法で当初の目的は達成可能であると考えられる。また CMV 感染による聴覚障害モデルマウスの解析により、ウイルス感染部位の特定や内耳機能障害の機序解明を進めることが出来た。本成果に基づく治療に向けた研究を継続中であり、実用化出来るよう努めたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Koshizuka T, Ishioka K, Kobayashi T, Ikuta K, Suzutani T.
Protection from lethal herpes simplex virus type 1 infection by vaccination with a UL41-deficient recombinant strain
Fukushima J Med Sci 2016 62 in press
査読有
- ② 錫谷達夫、生田和史
先天性サイトメガロウイルス感染症の疫学と今後の課題
小児耳鼻咽喉科 2015 36 259-263
査読無し
- ③ Ikuta K, Ogawa H, Hashimoto H, Okano W, Tani A, Sato E, Kosugi I, Kobayashi T, Omori K, Suzutani T.
Restricted infection of murine cytomegalovirus (MCMV) in neonatal mice with MCMV-induced sensorineural hearing loss
J Clin Virol 2015 69 138-45
査読有
- ④ Ikuta K, Minematsu T, Inoue N, Kubo T, Asano K, Ishibashi K, Ishioka K, Sato Y, Imamura T, Nakai H, Yoshikawa T, Moriuchi H, Fujiwara S, Koyano S, Suzutani T.
Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein H-based serological analysis in Japanese healthy pregnant women, and

- in neonates with congenital CMV infection and their mothers
J Clin Virol 2013 58 474-78
査読有
- ⑤ Ishioka K, Ikuta K, Sato Y, Kaneko H, Sorimachi K, Fukushima E, Saijo M, Suzutani T.
Herpes simplex virus type 1 virion-derived US11 inhibits type 1 interferon-induced protein kinase R phosphorylation.
Microbiol Immunol. 2013 57 426-436
査読有
- ⑥ Ikuta K, Mizuta K, Suzutani T.
Anti influenza virus activity of two extracts of the Blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) from New Zealand and Poland
Fukushima J Med Sci. 2013 59 35-38
査読有
- ⑦ Yoshida M, Sugino H, Iizuka T, Xiaofang L, Suzuki A, Oshitani H, Suzutani T, Ikuta K.
A case report of a patient in whom antibodies against the 2009 pandemic influenza A/H1N1 virus have been present since June 1999
Hum Vaccin Immunother. 2013 9 989-992
査読有
- ⑧ Sekizawa H, Ikuta K, Mizuta K, Takechi S, Suzutani T.
Relationship between polyphenol content and anti-influenza viral effects in Berries
J Sci Food Agric. 2013 93 2239-2241
査読有
- [学会発表] (計 18 件)
- ① 生田和史
先天性サイトメガロウイルス感染と聴覚障害
福島医学会学術奨励賞受賞記念講演会
福島 2016.1.28
- ② 小林敬広、野本芽衣、腰塚哲朗、生田和史、石岡賢、錫谷達夫
ヒトサイトメガロウイルスの潜伏感染マーカーである UL138 に対する経時的な検討
研究連携セミナー2015 福島
- ③ 佐藤純一、生田和史、小林敬広、錫谷達夫
サイトメガロウイルス (CMV) 特異的な細胞性免疫測定法の確立
研究連携セミナー2015 福島
2015.12.8
- ④ 佐藤純一、生田和史、小林敬広、錫谷達夫
サイトメガロウイルス (CMV) 特異的な細胞性免疫測定法の確立
第 63 回日本ウイルス学会総会 福岡
2015.11.22-24
- ⑤ Kazufumi Ikuta, Hiroshi Ogawa, Hiromi Hashimoto, Wataru Okano, Akiko Tani, Etsuko Sato, Isao Kosugi, Takahiro Kobayashi, Koichi Omori, Tatsuo Suzutani
Murine cytomegalovirus (MCMV) infection is restricted in neonatal mice with MCMV-induced sensorineural hearing loss
第 63 回日本ウイルス学会総会 福岡
2015.11.22-24
- ⑥ 佐藤純一、生田和史、小林敬広、錫谷達夫
サイトメガロウイルス (CMV) に対する細胞性免疫測定法の確立
第 69 回日本細菌学会東北支部総会 郡山 2015.8.21-22
- ⑦ 小林敬広、野本芽衣、腰塚哲朗、生田和史、石岡賢、錫谷達夫
ヒトサイトメガロウイルスの潜伏感染マーカー UL138 の経時的検討
第 69 回日本細菌学会東北支部総会 郡山 2015.8.21-22
- ⑧ 生田和史、小川洋、橋本裕美、岡野渉、谷亜希子、佐藤悦子、小杉伊三夫、小林敬広、大森孝一、錫谷達夫
聴覚障害モデルマウスにおけるマウスサイトメガロウイルス感染は限局的である
第 69 回日本細菌学会東北支部総会 郡山 2015.8.21-22
- ⑨ 生田和史、錫谷達夫
先天性サイトメガロウイルス感染におけるウイルス型判別法を用いた感染様式の検討
平成 27 年度東北乳酸菌研究会総会 仙台 2015.7.16
- ⑩ Kazufumi Ikuta, Hiroshi Ogawa, Hiromi Hashimoto, Wataru Okano, Akiko Tani, Etsuko Sato, Isao Kosugi, Takahiro Kobayashi, Koichi Omori, Tatsuo Suzutani
Restricted infection of murine cytomegalovirus (MCMV) in neonatal mice with MCMV-induced sensorineural hearing loss
5th International Congenital CMV Conference, 15th International CMV/Beta herpesvirus Workshop
Brisbane, Australia. April 20-24, 2015.
- ⑪ 生田和史、西山恭子、関澤春仁、武地誠一、錫谷達夫
カシス・ブルーベリーにおける抗ウイルス活性の解析
第 68 回日本細菌学会東北支部総会 仙台 2014.8.22-23
- ⑫ Kazufumi Ikuta, Hiroshi Ogawa, Isao Kosugi, Wataru Okano, Akiko Tani, Etsuko Sato, Hashimoto Hashimoto, Koichi Omori, Tatsuo Suzutani

Limited infection of murine cytomegalovirus (MCMV) in neonatal mice with MCMV-induced sensorineural hearing loss
39th Annual International Herpesvirus Workshop. Kobe, Japan. July 19-23, 2014.

- ⑬ 生田和史
先天性サイトメガロウイルス感染と聴覚障害
研究連携セミナー2014 福島 2014. 5. 18
- ⑭ 生田和史、西山恭子、関澤春仁、武地誠一、錫谷達夫
カシス・ブルーベリーによる抗ウイルス効果の検討
第24回抗ウイルス療法研究会 富士吉田 2014. 5. 7-9
- ⑮ 生田和史、峰松俊夫、石岡 賢、佐藤友香、石橋 啓、今村 孝、藤原成悦、久保隆彦、中井英剛、吉川哲史、森内浩幸、古谷野伸、井上直樹、錫谷達夫
サイトメガロウイルス血清型・DNA型に基づく先天感染例の検討
研究連携セミナー2014 福島 2014. 2. 18-20
- ⑯ 生田和史、峰松俊夫、石岡 賢、佐藤友香、石橋 啓、今村 孝、藤原成悦、久保隆彦、中井英剛、吉川哲史、森内浩幸、古谷野伸、井上直樹、錫谷達夫
サイトメガロウイルス血清型・DNA型に基づく先天感染例の検討
第61回日本ウイルス学会 神戸 2013. 11. 10-12
- ⑰ 生田和史、峰松俊夫、石岡 賢、佐藤友香、石橋 啓、浅野仁覚、今村 孝、藤原成悦、久保隆彦、中井英剛、吉川哲史、森内浩幸、古谷野伸、井上直樹、錫谷達夫
先天性サイトメガロウイルス感染におけるウイルス血清型・DNA型の解析
第67回日本細菌学会東北支部総会 仙台 2013. 8. 30-31
- ⑱ 生田和史、峰松俊夫、井上直樹、久保隆彦、浅野仁覚、石橋 啓、今村 孝、中井英剛、吉川哲史、森内浩幸、藤原成悦、古谷野伸、錫谷達夫
先天性サイトメガロウイルス感染におけるウイルス型の解析
第439回福島医学会学術研究集会 福島 2013. 5. 23

〔図書〕(計0件)

無し

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

無し

○取得状況(計0件)

無し

〔その他〕

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

生田 和史 (IKUTA KAZUFUMI)

福島県立医科大学・医学部

微生物学講座・講師

研究者番号：60512184

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し