

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04346

研究課題名(和文)先天性サイトメガロウイルス感染による聴覚障害の予防対策確立に向けた基礎研究

研究課題名(英文) Study for the establishment of preventive measures to sensorineural hearing loss with congenital cytomegalovirus infection

研究代表者

錫谷 達夫 (Suzutani, Tatsuo)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40196895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：先天性サイトメガロウイルス感染は聴覚障害の主たる原因の一つである。この疾患対策として新たな薬剤開発のためのスクリーニング法の確立とマウス実験系で発症病理の解明を行った。抗CMV薬スクリーニングを確立するため、UL146プロモーターの下流に分泌型ルシフェラーゼをつないだ遺伝子を組み込んだウイルス株を作成した。このウイルスを感染させた系で、培地中に分泌されるルシフェラーゼ量とウイルスのタイターは相関しており、抗ウイルス薬のスクリーニングに使えるウイルス株が作成できた。先天性CMV感染のマウスモデルを使って、内耳へのステロイド投与で聴覚障害の進行を抑制でき、新たな治療の可能性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天性サイトメガロウイルス感染はもっとも頻度の高い先天感染で、日本人では300の出生に1例起こる感染である。その20%程度では言語獲得期以前の両側性難聴が起こり、聴覚障害の原因の15%を占めることが明らかとなっている。この頻度の高い疾患の治療法の開発や発症予防法の確立は強く社会から求められている課題である。本研究はこの要請に応じるべく、治療薬のスクリーニング法の確立や病態生理に基づいた新たな治療法の可能性を検討したもので、社会的な意義は大きい。また、内耳の炎症を抑えることで聴覚障害の進行が抑えられることを示した点は、これからの聴覚障害についての学術的な研究に広く示唆を与えられるものである。

研究成果の概要(英文)：Congenital cytomegalovirus (CMV) infection is a one of the leading causes for sensorineural hearing loss. As a countermeasure against this disease, we established a screening method for the development of a new drug and studied the pathogenesis in a mouse experimental model.

For screening of anti-CMV drug, a recombinant CMV, inserted the secretable Metridia luciferase gene under UL146 promotor, was constructed. As predicted, luciferase activity was secreted into the culture medium and correlated with virus replication in host cells. Using the virus strain, we established a screening system for anti-CMV compounds.

We evaluated the effects of steroids, as an anti-inflammatory compound, on the progression of hearing loss in a mouse congenital CMV infection model. Topical treatment by intratympanic cavity injection of dexamethasone improved hearing loss significantly, suggesting a new treatment strategy for hearing loss induced by congenital CMV infection.

研究分野：ウイルス学

キーワード：サイトメガロウイルス 先天性サイトメガロウイルス感染 聴覚障害 慢性炎症 ステロイドホルモン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1990年頃より、欧米では先天性サイトメガロウイルス (Cytomegalovirus; CMV) 感染症が言語獲得期以前に発症する両側性高度難聴の 25% を占める主要な原因であることが明らかとなり、この感染に注目が集まっている。しかし、先天性 CMV 感染が関連する疾患については未解決な問題が多く、対策は全く立てられていない。そこで、聴覚障害にスポットを当て、この疾患の病態生理を理解し、治療法や予防法の開発に繋がる基礎研究を推進する。

2. 研究の目的

先天性サイトメガロウイルス感染症は言語獲得期以前の両側性高度難聴の原因の 15% を占める重要な疾患である。しかし、この疾患に対する対策は未だ立てられていない。そこで本研究では、申請者がすでに開発した独自の研究法を使って以下の課題に取り組む。

- 1) マウスサイトメガロウイルスの聴覚障害モデルを使った聴覚障害発症病理の解明
- 2) 胎児や新生児治療に使える新たな薬剤開発を目指した薬剤ライブラリーのスクリーニング
- 3) 水痘-帯状疱疹ワクチンを参考にしたサイトメガロ生ワクチン開発の理論的基盤の確立
- 4) 感染組織嗜好性の異なる臨床分離サイトメガロウイルス株の解析による病原因子の特定

3. 研究の方法

- 1) 生後 24 時間以内にマウス CMV を脳内接種する先天性 CMV 感染マウスモデルを用い、炎症を抑制するステロイドホルモンの投与によって聴覚障害の進行が予防できるか否かを検討する。
- 2) 遺伝子組換え技術を用い、増殖するとルシフェラーゼを分泌する CMV 株を作成し、ルシフェラーゼ活性の測定でウイルスの増殖をモニターできる薬剤スクリーニング用のウイルス株を樹立する。
- 3) すでに弱毒化生ワクチンが実用化されている水痘ワクチンの弱毒化機構を解析し、CMV にも応用できる弱毒化機序を明らかにする。
- 4) 同一症例から分離している上皮細胞に効率よく感染できる CMV 株と感染できない CMV 株のセットを解析し、トロピズムに関与する病原因子を明らかにする。

4. 研究成果

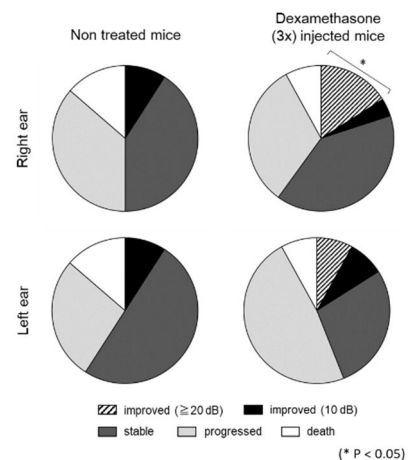
1) 聴覚障害発症病理の検討

我々ならびに中国のグループのこれまでのマウス CMV 先天性感染モデルを使った研究から、マウスの聴覚障害は) 外有毛細胞の障害で起こる、) 内耳ではインフラマソームが持続的に検出できることが明らかとなっていた。そこでマウスに抗炎症効果を期待し、ステロイドホルモンであるデキサメサゾン投与した。その結果

a) 全身投与では免疫の抑制によってマウスは CMV 感染で死亡した。

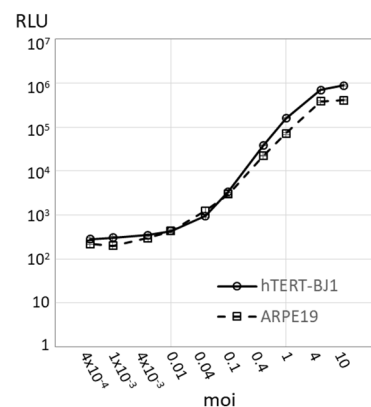
b) そこで内耳に局所投与したところ、有意に聴覚障害の進行が抑えられた。

以上の結果は慢性の炎症が有毛細胞を障害するというこれまでの結果を支持すると同時に、この炎症の抑制によって聴覚障害の進行が抑えられるという新たな治療戦略を示すものであった。(論文投稿中)



2) 抗 CMV 薬スクリーニング法の確立

CMV の UL146 プロモーターの下流に分泌型のルシフェラーゼ遺伝子を持つ CMV 株を作成した。このウイルスのタイターと培地に分泌されるルシフェラーゼ量は相関していたため、ルシフェラーゼ量を指標にウイルス増殖を迅速に測定できるアッセイ系が確立できた (Koshizuka T et al. Microbiol. Immunol. 62, 651-658, 2018)。この系を用いてこれまで 3,000 化合物のスクリーニングを行い 4 つの候補薬を発見している。(論文準備中)



3) 水痘生ワクチンの弱毒化機序

CMV ワクチンを開発するにあたって、同じヘルペスウイルスで生ワクチンが実用化されている水痘ワクチンの弱毒化機序を明らかにする必要があると考えた。水痘ワクチン株とその親株の全シーケンスを比較した結果はすでに報告されている。その報告によると水痘ワクチンは複数の弱毒株が混在しているワクチンで、そのすべての株に共通する突然変異は ORF0 遺伝子に存在する。そこ

で、この遺伝子が弱毒化に関与するものと考え、相同検索をした結果、全てのヘルペスウイルスに相同性は低いもののプロリン-プロリン-x-チロシン (PY モチーフ) という配列を持つ相同遺伝子が存在することを発見した。この PY モチーフは細胞の E3 リガーゼである Nedd4 ファミリーのタンパクに結合する配列であることが知られている。そこで、実際にヘルペスに保存されているタンパクが Nedd4 タンパクに結合するか否かを調べたところ、Nedd4 ファミリーの一つ Itch に結合し、その活性を制御していることが明らかとなった。ヒトヘルペスウイルス 6 では、この遺伝子機能によって T 細胞表面の CD3 を down regulation していることも明らかとなった (Koshizuka T et al. *Sci Rep* 8: 4447, 2018)。今後、CMV の相同遺伝子の機能解析を進めていく予定である。

4) 同一症例から分離される上皮に感染できる CMV 株と感染できない CMV 株の解析

一人の患者からトロピズムの異なる株が同時に分離出来るという経験をこれまで 4 症例で観察している。そこで、これらのセットの全塩基配列を決定した。その結果、驚くことに表現型に大きな差があるにもかかわらず、1 人から分離された 2 株の間には全く塩基配列の違いがなかった。そこで DNA のメチル化に違いがあるのではないかと考え、ゲノム全体でのメチル化を調べたところ、今度は逆に多数の違いが認められた。現在、どの違いが表現型の違いに結びついているのかを解析中である。

< 引用文献 >

Koshizuka T, Sato Y, Kobiyama S, Oshima M, Suzutani T. A two-step method utilizing secreted luciferase recombinant virus for detection of anti-cytomegalovirus compounds. *Microbiol Immunol.* 62: 651-658, 2018.

Koshizuka T, Kobayashi T, Ishioka K, Suzutani T. Herpesviruses possess conserved proteins for interaction with Nedd4 family ubiquitin E3 ligases. *Sci Rep* 8: 4447, 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Kobayashi T, Sato J, Ikuta K, Kanno R, Nishiyama K, Koshizuka T, Ishioka K, Suzutani T.	4. 巻 63
2. 論文標題 Modification of the HCMV-specific IFN- γ release test (QuantiFERON-CMV) and a novel proposal for its application	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Fukushima J Med Sci	6. 最初と最後の頁 64-74
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5387/fms.2017-01	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 Koshizuka T, Kobayashi T, Ishioka K, Suzutani T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Herpesviruses possess conserved proteins for interaction with Nedd4 family ubiquitin E3 ligases.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 4447
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-22682-2	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 Ikuta Kazufumi, Koshizuka Tetsuo, Kanno Ryoko, Inoue Naoki, Kubo Takahiko, Koyano Shin, Suzutani Tatsuo	4. 巻 63
2. 論文標題 Evaluation of the indirect and IgM capture anti human cytomegalovirus IgM ELISA methods as confirmed by cytomegalovirus IgG avidity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 172 ~ 178
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12683	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 Koshizuka Tetsuo, Toriyabe Kuniaki, Sato Yuko, Ikuta Kazufumi, Ikeda Tomoaki, Suzutani Tatsuo	4. 巻 77
2. 論文標題 Congenital cytomegalovirus infection via a re-infected mother with original antigenic sin: A case report	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 87 ~ 89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijid.2018.10.006	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 Koshizuka Tetsuo, Kobayashi Takahiro, Ishioka Ken, Suzutani Tatsuo	4. 巻 8
2. 論文標題 Herpesviruses possess conserved proteins for interaction with Nedd4 family ubiquitin E3 ligases	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 44447-44447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-22682-2	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6件(うち招待講演 3件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 腰塚哲朗、小林敬広、森康子、錫谷達夫
2. 発表標題 ヘルペスウイルスに共通した宿主ユビキチンリガーゼ制御機構
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 錫谷達夫
2. 発表標題 サイトメガロウイルス感染症の発症病理
3. 学会等名 第51回日本実験動物技術者協会総会(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 錫谷達夫
2. 発表標題 サイトメガロウイルス感染症 ~ 感染症学と難聴の発症病理 ~
3. 学会等名 第35回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 錫谷達夫
2. 発表標題 抗サイトメガロウイルス薬スクリーニングシステムの構築
3. 学会等名 第28回抗ウイルス療法学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koshizuka T, Sato Y, Kobiyama S, Oshima M, Suzutani T.
2. 発表標題 A method for detection of anti-cytomegalovirus compounds with secreted luciferase recombinant virus.
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 錫谷達夫
2. 発表標題 サイトメガロウイルス感染を再考する。
3. 学会等名 熊本血液コロキウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中込 治監修、神谷茂・錫谷達夫編集	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 657
3. 書名 標準微生物学 第13版	

〔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	小林 敬広 (Kobayashi Takahiro) (00708745)	福島県立医科大学・医学部・助教 (21601)	
研究分担者	宮崎 希 (Miyazaki Nozomu) (40725876)	福島県立医科大学・医学部・助教 (21601)	
研究分担者	石岡 賢 (Ishioka Ken) (50305356)	福島県立医科大学・医学部・講師 (21601)	
研究分担者	小川 洋 (Ogawa Hiroshi) (70264554)	福島県立医科大学・公私立大学の部局等・教授 (21601)	
研究分担者	腰塚 哲朗 (Koshizuka Tetsuo) (20416267)	福島県立医科大学・医学部・講師 (21601)	