

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08648

研究課題名(和文) サイトメガロウイルス臨床分離株の感染細胞指向性の違いによる迅速型判別方法の開発

研究課題名(英文) Development of rapid subtyping method of cytomegalovirus clinical isolates using cell tropism

研究代表者

石岡 賢 (Ishioka, Ken)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：50305356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：感染細胞指向性(トロピズム)の違いにより異なる疾患を引き起こすと想定されるサイトメガロウイルス(CMV)臨床分離株に対する型判別法の開発を目指し、全ゲノムシーケンシングを行った。計10の臨床分離株の85%前後の塩基配列を決定したが、違いは認められなかった。感染細胞指向性の違いがゲノムのメチル化などのエピジェネティックな制御によるものと考え研究を継続しており、その成果はCMVのトロピズムとCMVが原因とされている疾患との関連性について明らかにするとともに、病気の進行を正しく判断して発症の予防にも結び付く先制的な治療を可能にすると期待している。

研究成果の概要(英文)：To develop the subtyping of cytomegalovirus (CMV) based on its pathogenicity related tropism, we performed total genomic sequencing of CMV clinical isolates. Around 85% genome nucleotide sequences of 10 clinical isolates were determined. Interestingly, there were no differences within open reading frames between different tropic types of isolates. We will analyze that whether tropism of CMV clinical isolates is due to epigenetic control such as methylation of genome. The results of this study will show the relationship between tropism and diseases caused by CMV. In addition, we expect to enable preemptive treatment that properly judges the progress of disease and also leads to prevention of onset.

研究分野：ウイルス学

キーワード：サイトメガロウイルス 臨床分離株 細胞指向性 多型 病原性

1. 研究開始当初の背景

(1) サイトメガロウイルス(CMV)は、初感染の後に潜伏感染に入り、宿主の免疫力が低下すると回帰感染を起こすウイルスである。本ウイルスは CD34 陽性造血幹細胞、マクロファージ、血管内皮細胞、網膜色素上皮細胞、線維芽細胞などに感染し網膜炎や肺炎、骨髄炎などの多様な疾患を引き起こす。

(2) 本ウイルスによる乳幼児期の初感染は無症候である一方で、妊婦が初感染した場合には胎児へ経胎盤感染をするリスクが高く(およそ 40 % 程度)、全出産の 0.3 % 程度で胎児期の CMV 感染(先天性 CMV 感染)が起きている。この先天性 CMV 感染の 90 % は無症候であるが、およそ 10 % は小頭症、脈絡網膜炎、聴覚障害、精神未発達、肝炎などが認められ、出生時無症候であっても約 10 % には後に難聴が進行性に発症する。我々はこの CMV 感染児の尿から同一個人より上皮・内皮系の細胞への感染効率が 1,000 倍異なる CMV 臨床分離株のセットを分離培養することが出来た。

(3) 業室株では細胞指向性を決定する遺伝子について報告があるが、臨床分離株では報告がなく、臨床分離株における細胞指向性の違いは異なる臓器の疾患を引き起こすと考えられる。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、同一個人から分離した細胞指向性の異なるウイルスの全ゲノムシーケンシングを行い、その責任遺伝子を特定する。その結果をもとに、細胞指向性の異なる CMV 株別に検出できるリアルタイム PCR の系などの検査法を開発する。

(2) ここで開発した検査法によって CMV 感染の詳細を臨床検体でも解析し、CMV の細胞指向性と CMV が原因とされている疾患との関連性について明らかにしたい。

3. 研究の方法

(1) 細胞指向性の異なるウイルスの分離
先天性 CMV 感染症児の尿中の CMV をヒト網膜色素上皮細胞 (ARPE) およびヒト繊維芽細胞 (h-TERTBJ1) に感染させ、細胞変性効果 (CPE) が出現したところで培養上清を回収する。それぞれの細胞から回収したウイルスを更に ARPE および h-TERT BJ1 細胞に感染させ、1 週間以内での CPE 出現の有無で細胞指向性の指標とした。

(2) ウイルスゲノムの精製

(1) で CPE が出現したウイルスについて、更に継代培養し培養上清からはウイルス粒子を精製し、感染細胞内からはパルスフィールドゲル電気泳動および Sijmons らの方法によりウイルスゲノムを精製した。

(3) 全ゲノムシーケンシング

ウイルスゲノムを適当なサイズに断片化し、ロシュ社 GSJr を用いてショットガンシーケンシングを行った。得られたリードをシーケンサー付属の Reference Mapper および denovo assembler にて解析を行った。

ウイルス感染細胞から全 DNA を精製し、CMV ゲノム全体を 24 分割し、かつ、隣接するフラグメントどうしがオーバーラップするような PCR を行い、そのフラグメントをプライマーウォークによる PCR ダイレクトシーケンシングを行った。

イルミナ社 MiSeq シーケンサー、Truseq DNA ライブラリーキット、MiSeq Reagent kit v3 (600 cycles) によるシーケンシングを行った。

<引用文献>

Sijmons S, Thys K, Corthout M, Van Damme E, Van Looock M, Bollen S, Baguet S, Aerssens J, Van Ranst M, Maes P, A Method Enabling High-Throughput Sequencing of Human Cytomegalovirus Complete Genomes from Clinical Isolates, PLoS One, 2014, 22;9(4)

4. 研究成果

(1) 先天性 CMV 感染児の尿から分離した CMV 株の細胞指向性
リアルタイム PCR により、出生後の尿から CMV ゲノムが検出された 5 名の先天性 CMV 感染児の尿から経時的に h-TERT BJ1 および ARPE 細胞を用いてウイルス株を分離し、その細胞指向性を確認したのが以下の表である。

患者 ID	分離した ウイルス株名	細胞指向性確認に用いた細胞	
		h-TERT BJ1	ARPE
20026	4UBJ		×
	16UAR		
20270	2UBJ		×
	3UAR		
21558	1UBJ		×
	2UAR		
20040	4UBJ		
	4UAR		
22383	2UBJ		
	2UAR		

表 1. 先天性 CMV 感染児尿から分離したウイルス株の細胞指向性

UBJ は h-TERT BJ1、UAR は ARPE 細胞を用いて分離したウイルス株であり、その前の数

字は検体を採取した日時を示す。例えば 20040-4UBJ と 20040-4UAR は同じ日に採取した尿から分離したウイルス株であり、21558-1UBJ は 21558-2UAR より前に採取した尿から分離したウイルス株を示している。また表中の は感染後 1 週間以内に CPE が出現、×は出現しなかったことを示す。この表では示していないが、h-TERT BJ1 細胞で経時的にウイルス株を分離した場合、ある時期には ARPE 細胞で増殖出来るウイルスが分離出来るが、別な時期には分離出来ないといった変動をすることがあった。

(2) 全ゲノムシーケンス

GSJr シークエンサー

5 セット 10 株の CMV 臨床分離株を GSJr シークエンサーで解析した結果、平均 depth 約 50 回で、CMV ゲノム約 250 キロ b.p. の約 65 % をカバーするリードが得られた。CMV は糖タンパク gB、gO、gH、gL および US9、US28 遺伝子に株間での多型が見られる。同一個人から分離した細胞指向性の異なるウイルス同士でこれらの遺伝子に違いが見られなかったことから、これらのウイルスはお互いに同一株からの派生株であり、まったく異なる株の重複感染ではないと考えた。

PCR ダイレクトシーケンス

GSJr によるシーケエンシングでのエラーを考慮し、サンガー法による PCR ダイレクトシーケンスを行い、GSJr ショットガンシーケンスで決定できなかったギャップ領域のシーケンスを決定した。GSJr による結果とサンガー法での結果をあわせて 5 セット 10 株の全ゲノムの約 80 % までを決定することが出来た。この時点で同一個人から分離した細胞指向性の異なるウイルス同士で塩基配列に違いはなかった。

MiSeq シークエンサー

塩基配列が確定していないギャップ領域とリシーケンスのため MiSeq でショットガンシーケンスを行った。

3通りの方法で 5 セット 10 株の全ゲノムシーケンスを行った結果、いずれの株も全体の 85 % 前後の塩基配列を確定することが出来た。CMV の細胞指向性を決定する遺伝子についてはいくつか報告があり、臨床分離株を線維芽細胞で長期間継代することで UL128-131 領域に変異が生じやすく血管内皮への感染力を失うことが知られている。業室株である AD169 は UL133-UL151 までが欠損しており、内皮や上皮細胞への感染力を失っており、UL133-138 は線維芽細胞でのウイルスの複製には必須ではないとの報告もある。内皮や上皮細胞への感染には gH/gL/UL128, 130, 131A 複合体が重要であるとの報告もあるが、我々が保持する細胞指向性の異なる株どうしは同一個人から分離した

株どうしでは塩基配列に違いは見られなかった。業室株である Towne 株では UL10, UL16, UL24, UL64, US16, US19, US30 の変異株は特定の細胞での増殖に変化が見られとの報告もあるが、これらの遺伝子についても我々が分離した株に違いは見られなかった。サンガー法でのシーケエンシングでは同じ塩基が続いた時にその数に違いがあるようだったが、既存の ORF 内ではなく非コーディング領域にそれは見られたが、これに意味があるかどうかは現段階では分からなかった。

これまで報告のあった細胞指向性に関する遺伝子について、我々が保持する細胞指向性の異なる株間で違いは認められなかった。このことは、まだ塩基配列が決定できてない領域にまだ報告のない細胞指向性に関する遺伝子があるか、もしくは塩基配列に依存しないエピジェネティックな制御により感染細胞内での増殖が抑制されることが要因となっている可能性がある。DNA のメチル化やアセチル化、ヌクレオソーム形成時のヒストンのメチル化、アセチル化は転写を制御する。CMV もまたこれらの制御を受けることで結果として異なる細胞指向性を示している可能性がある。B型肝炎ウイルスのゲノムはこのようなエピジェネティックな修飾を受けることが報告されており、CMV の潜伏感染にはヒストンが関与するとの報告もある。今後はまだ決定できていない領域の塩基配列を決定しデータベースへの登録を行うとともに、ウイルスゲノムのメチル化領域を解析し、細胞指向性の異なる株間での違いを特定する。そして、この領域をターゲットに株別にウイルスを検出できる検査法を開発し、臨床像と照らいつけることで本ウイルスによる感染症の病態生理を明らかにしたいと考えている。

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4件)

Koshizuka T, Kobayashi T, Ishioka K, Suzutani T

Herpesviruses possess conserved proteins for interaction with Nedd4 family ubiquitin E3 ligases.

Scientific Reports, Vol.8, 2018, 査読有、article number 4447.

Kobayashi T, Sato JI, Ikuta K, Kanno R, Nishiyama K, Koshizuka T, Ishioka K, Suzutani T

Modification of the HCMV-specific IFN-release test (QuantIFERON-CMV) and a novel proposal for its application

Fukushima Journal of Medical Science, Vol. 63, No.2, 2017, 査読有、pp.64-74

Sato Y, Koshizuka T, Ishibashi K, Hashimoto K, Ishioka K, Ikuta K, Yokota S, Fujii N, Suzutani T

Involvement of herpes simplex virus type 1 UL13 protein kinase in induction of SOCS genes, the negative regulators of cytokine signaling

Microbiology and Immunology, Vol. 61, No. 5, 2017、査読有、pp.159-167

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 Journal of Medical Science, Vol. 62, No.1, 2017、査読有、pp.36-42

〔学会発表〕(計7件)

上村真由、林史和、石岡賢、井原邦夫、安田和史、岡崎可奈、小俣純一、錫谷達夫、川仁尚、江啓発、青山温子、大平哲也

腸内環境に着目した栄養教育の肥満と心理的健康の改善 効果:福島県住民女性を対象とした無作為化比較試験

日本疫学会、2018年

石岡賢、吉村萌、八木恵、錫谷達夫

単純ヘルペスウイルス1型のナンセンス変異による US9 膜貫通領域欠損タンパクが感染細胞内で発現しない機構

日本分子生物学会、2016年

小林敬広、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マーカー UL138 の発現と再活性化における経時的検討
日本ウイルス学会、2016年

小林敬広、野本芽衣、松岡亮、腰塚哲朗、生田和史、石岡賢、錫谷達夫

HCMV の潜伏感染マーカーUL138 の発現と再活性化における経時的検討
日本細菌学会東北支部総会、2016年

石岡賢、錫谷達夫

ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) 臨床分離株の細胞指向性を決定する因子の同定
東北乳酸菌研究会、2016年

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
福島医大研究連携セミナー、2015年

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

日本細菌学会東北支部総会、2015年

6. 研究組織

(1)研究代表者

石岡 賢 (ISHIOKA, Ken)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号: 50305356

(3)連携研究者

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

生田 和史 (IKUTA, Kazufumi)

東北医科薬学大学・医学部・准教授

研究者番号: 60512184

腰塚 哲朗 (KOSHIZUKA, Tetsuro)

岐阜薬学大学・生命薬学大講座・准教授

研究者番号: 20416267