

令和元年6月14日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10097

研究課題名（和文）サイトメガロウイルス胎内感染の予防と聴覚障害阻止を目指した病原因子の解明

研究課題名（英文）Basic research to prevent intrauterine Cytomegalovirus (CMV) infection and CMV-related hearing loss

研究代表者

生田 和史（IKUTA, Kazufumi）

東北医科薬科大学・医学部・准教授

研究者番号：60512184

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：サイトメガロウイルス（CMV）経胎盤感染の詳細を解明するための検討を行った。胎盤で高発現するマイクロRNA群を導入した細胞で、CMV感染効率の上昇を確認した。先天性CMV感染症では高率に難聴が認められる。動物実験により内耳におけるミオシンVI発現の消失が難聴の一因と推察されるが、機序は分かっていない。細胞株を用いた検討により、CMVタンパクとミオシンVI間で交叉抗原性を有する可能性を示唆した。研究継続により、CMV経胎盤感染の防止とCMV難聴の防止に結びつく研究成果が得られると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天性CMV感染は全出生の1/300と高頻度で生じている。顕性感染例については平成30年1月から尿を用いたウイルス検出が保険適用となった。米国では患児家族団体の働きにより、リスク新生児を対象としたウイルススクリーニング検査の義務化を可決する州が増えつつある。先天性CMV感染については厚生労働科学研究班や患者会が設立され、予防・治療に関する研究が強く求められている。本研究は胎内CMV感染と難聴の機序解明を行い、先天性CMV感染とその疾患予防に貢献することが目的である。

研究成果の概要（英文）：To clarify the etiology of congenital Cytomegalovirus (CMV) infection, we focused on the role of microRNAs (miRNAs), which are expressed at high levels in placental trophoblasts. We used C19MC, a unique group of primate-specific miRNAs, which are highly expressed in human trophoblasts from the chromosome 19 miRNA cluster. We confirmed the enhanced CMV infection in cells with C19MC-BAC. We also confirmed the possibility of cross-reactivity between myosin VI, which is known to have important role for hearing in cochlea, and CMV antigen.

研究分野：ウイルス学

キーワード：サイトメガロウイルス 先天感染

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

サイトメガロウイルス (CMV) は健康成人の約 70% に不顕性感染している。しかしながら妊婦の CMV 初感染は高率に胎児へ先天性 CMV 感染を引き起こす。先天性 CMV 感染の多くは不顕性感染であるが、一部感染児には死産、精神発達障害、聴覚障害などを生じる。我々は感染母子血中の抗 CMV 抗体血清型、感染児尿中のウイルス DNA 型を解析することにより、妊娠中の CMV 感染が初感染なのか重感染なのかを区別し、先天性 CMV 感染の 1 割は重感染によることを証明してきた。しかしながら CMV が垂直感染するメカニズムの詳細は明らかにされていない。妊婦への対応は手洗い等で感染を防ぐきわめて古典的な衛生指導のみしかない。ウイルスの垂直感染阻止機構のひとつとして、胎盤栄養膜由来エクソソームに含まれるマイクロ RNA (miRNA) によるオートファジー誘導が報告されている。多くのウイルスは胎盤由来 miRNA により経胎盤感染出来ないにもかかわらず、胎盤由来 miRNA はむしろ CMV 感染を促進させる。CMV 感染における胎盤由来 miRNA の役割を明らかにすることによりある種の胎盤由来 miRNA がリスクファクターと分かれば、これを標的とした積極的な予防法の開発に繋げることが出来る。

先天性 CMV 感染症の発症病理に関しても多くは未解明である。先天性 CMV 感染は聴覚障害を引き起こす主要因のひとつである。言語能力獲得に大きな支障をきたし、最終的な治療法である人工内耳の埋込手術は幼児への負担が極めて大きい。聴覚器官は骨で囲まれた蝸牛内に存在するために物理的なアプローチが困難であり、CMV 感染による聴覚障害の発症メカニズムは解明されていない。我々は生後 24 時間以内のマウスに CMV を脳室内接種することにより、聴覚障害モデルマウスを作製した。聴覚障害の進行時期に内耳有毛細胞の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た。しかしながらミオシン発現が消失する機序は不明である。ミオシンはモーター蛋白であり、音信号で反応する有毛細胞の運動において重要な役割を担っている。有毛細胞自身に CMV 感染は認められず、CMV がどのようにミオシン発現消失へと関わっているのかを解明する必要がある。マウス内耳有毛細胞における糖脂質欠損では聴毛脱落、糖脂質組成変化ではミオシン局在不安定化が報告されている。CMV 感染が糖脂質の分解や組成変化に関わっていることが証明できれば、CMV のみならず他の感染症による聴覚障害を解明する一助にもなる可能性が考えられる。

先天性サイトメガロウイルス感染については厚生労働科学研究班や患者会が設立され、予防・治療に関する研究が強く求められている。本研究では、先天性サイトメガロウイルス感染の予防と発症阻止を目指している。

2. 研究の目的

(1) 胎盤由来 miRNA による CMV 感染促進のメカニズム解明

miRNA はタンパク質をコードせず、メッセンジャー RNA 配列に部分相補結合することでその発現量を抑制する。胎盤では 46 種類の miRNA (胎盤由来 miRNA) が発現しており、そのうち特に高発現している 3 種類の胎盤由来 miRNA はオートファジーを引き起こすことで、複数種類のウイルス (コクサッキーウイルス、ポリオウイルス、水泡性口内炎ウイルス、ワクチニアウイルス、単純ヘルペスウイルス) の感染を抑制することが *in vitro* 実験で報告されている。しかし CMV では胎盤由来 miRNA により感染はむしろ促進されるが、詳細は明らかとなっていない。CMV が垂直感染を起こす機序の 1 つに胎盤由来 miRNA が関与している可能性が考えられる。本研究では特に胎盤で高発現している miRNA を培養細胞に導入し、CMV 感染効率が上昇することを確認する。当該 miRNA を CMV 非感染細胞に導入し、CMV 感染が効率的に起こりうるのか確認する。感染効率の上昇に食作用が関与しているのか検討を行う。将来的には先天性 CMV 感染児とその母親の血清中に当該 miRNA の有意な上昇が認められるのか検討を行う。胎盤由来 miRNA による CMV 感染促進の詳細機序が明らかとなれば、先天性 CMV 感染における垂直感染阻止の新たな手掛かりが得られることが期待できる。また垂直感染の詳細な機序解明により、CMV のみならず他の先天性感染症に対する防衛手段を講じる際の助となるものと考えている。

(2) CMV 抗体がミオシン発現に及ぼす影響解明

マウスに CMV を脳室内接種した聴覚障害モデルマウスでは、ウイルス抗原・DNA 陽性細胞はらせん神経節等に局限していた。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有毛細胞のミオシン発現の消失が認められ、これが聴覚障害の要因と考えられる。しかしながら内耳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は不明である。CMV 心筋炎では心筋ミオシンと抗 CMV 抗体の交叉反応が知られている。CMV のどのタンパクに対する抗体がミオシンと交叉しているのかを明らかにする。交叉抗体が疾患要因となる機序を探る。

3. 研究の方法

(1) 胎盤由来 miRNA による CMV 感染促進のメカニズム解明

胎盤で高発現し CMV 以外のウイルスでは高い抗ウイルス効果が認められている胎盤由来 miRNA (Dharmacon 社製) を購入した。Dharmafect をもちいて CMV 感受性培養細胞へ導入した。導入効率の確認には蛍光標識された標準 miRNA を用いた。また C19MC-BAC (chromosome 19 derived microRNA cluster-bacterial artificial chromosome; ヒト染色体 19 番に存在

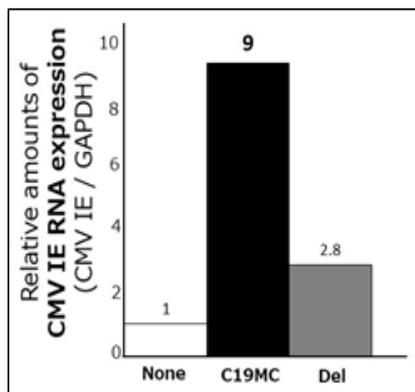
して胎盤由来 miRNA 群をコードする BAC) を保持した細胞株を入手した。これら細胞に CMV を添加し、感染効率を経時的に評価した。ウイルス抗原を免疫染色で検出し、ウイルス DNA は qPCR 法、ウイルス RNA 発現は RT-qPCR 法で定量的な評価を行った。産生ウイルス量は infectious center assay による検討を行った。

(2) CMV 抗体がミオシン発現に及ぼす影響解明

CMV 感受性培養細胞株に CMV を感染させ、抗 CMV 抗体で感染細胞を特定することと並行して、抗ミオシンポリクローナル抗体を用いた染色により交叉反応を確認した。ウエスタンブロット法により交叉に関わるウイルス抗原の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) 胎盤由来 miRNA による CMV 感染促進のメカニズム解明



ヒト線維芽細胞株 hTERT BJ-1 において、胎盤で高発現し CMV 以外のウイルスに抑制的效果を有することが知られている miRNA : miR-512-3p または miR-516b-5p を導入した。高効率に導入された細胞に対して CMV を感染させたが、感染効率に変化は認められなかった。C19MC-BAC または C19MC 欠損 BAC (Del) を導入した骨肉腫由来上皮細胞株 U2OS に CMV 感染を試みた。CMV 感染 1 日後に RT-qPCR 法により CMV 前初期遺伝子

(Immediate Early; IE) 発現を定量した。C19MC-BAC 導入により CMV IE 発現が約 9 倍上昇することを確認した(左図)。感染 2 日後の免疫染色の結果、C19MC-BAC 導入により CMV IE 発現細胞数は約 4 倍増加した。感染 6 日後に細胞を回収し、単層培養したヒト線維芽細胞株 MRC5 へ重層することで感染性ウイルス産生細胞数の評

価を行った (infectious center assay)。C19MC-BAC 導入によりウイルス産生細胞数は約 3 倍増加した。他ウイルスにおける抗ウイルス効果とは異なり、CMV 感染効率の上昇には複数の胎盤高発現 miRNA が関与している可能性が示唆された。

C19MC による CMV 感染効率上昇へのオートファジー関与を検討するために、阻害剤 3-MA を用いて同様の検討を行っているが、現在のところ有意差は得られていない。

(2) CMV 抗体がミオシン発現に及ぼす影響解明

ヒト線維芽細胞株 hTERT BJ-1 へ CMV を感染させ、抗 CMV IE 抗体と抗ミオシン VI 抗体を用いた二重蛍光染色を行った。抗 CMV 抗体ではウイルス感染細胞の核に特異的な蛍光を認めた。ミオシン VI は内耳等に特異的に発現するタンパクであり、hTERT BJ-1 では発現していないため、抗ミオシン VI モノクローナル抗体では陽性細胞を認めなかった。しかし二種類の抗ミオシン VI ポリクローナル抗体を用いたところ、ともに CMV 感染細胞の細胞質に特異的な蛍光を認めた。細胞質に存在するウイルスタンパクと抗ミオシン VI ポリクローナル抗体の交叉反応によるものと考えられる。ウエスタンブロット法により交叉抗原の探索を行っているが、特定には至っていない。

本研究により、胎盤由来 miRNA が CMV 感染を促進させる環境形成を担っている可能性が明らかとなった。感染効率上昇の詳細機序解明を目指した研究を進行中である。また CMV 難聴発症機序の一因として、交叉抗体が関与している可能性を提議することとなった。交叉反応により形成される抗原抗体複合体がどのようにミオシン発現低下を誘導しているのか検討予定である。これらの課題を明らかにすることにより、先天性 CMV 感染の撲滅と CMV 難聴の防止を目指したい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

Koshizuka T, Matsuda Y, Suzuki H, Kanno R, Ikuta K, Kobayashi T, Kondo T, Okada Y, Suzutani T.

Detection of engraftment of donor-derived antibody producing cells in a lung transplant recipient by anti-cytomegalovirus IgG avidity test.

Transpl Immunol. 2018 S0966-3274(18)30170-9.

DOI: 10.1016/j.trim.2018.12.003.

査読有

Koshizuka T, Toriyabe K, Sato Y, Ikuta K, Ikeda T, Suzutani T.

Congenital cytomegalovirus infection via a re-infected mother with original antigenic sin: A case report

Int. J. Infect. Dis. 2018 16(77)87-89.

DOI: 10.1016/j.ijid.2018.10.006.

査読有

Yajima M, Ikuta K, Kanda T.

Rapid CRISPR/Cas9-Mediated Cloning of Full-Length Epstein-Barr virus Genomes from Latently Infected Cells
Viruses 2018 10(4)171
DOI: 10.3390/v10040171.

査読有

生田和史、錫谷達夫

先天性サイトメガロウイルス感染と聴覚障害
福島医学雑誌 2017 第67巻 第1号 7-15

査読無し

- ⑤ 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 J. Med. Sci 2017 63(2):64-74.

DOI: 10.5387/fms.2017-01.

査読有

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 in the induction of SOCS genes, the negative regulator of cytokine signaling
Microbiol. Immunol. 2017 61(5):159-167.

DOI: 10.1111/1348-0421.12483.

査読有

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(1):36-42.

DOI:10.5387/fms.2015-24

査読有

[学会発表](計 15 件)

Yajima M, Ikuta K, Kanda T.

Molecular phylogenetic analysis of Epstein-Barr virus isolated in Japan
第 65 回日本ウイルス学会総会 (京都) 2018.10.28-30

Ikuta K, Yajima M, Kanda T.

Placental microRNAs as a possible trigger of congenital Cytomegalovirus infection
第 65 回日本ウイルス学会総会 (京都) 2018.10.28-30

矢島美彩子, 生田和史, 神田 輝

日本人由来 EB ウイルスゲノム塩基配列の解析
第 72 回日本細菌学会東北支部総会 (仙台) 2018.8.17-18

生田和史, 矢島美彩子, 神田 輝

先天性サイトメガロウイルス感染における胎盤栄養膜由来 miRNA 群の役割
第 72 回日本細菌学会東北支部総会 (仙台) 2018.8.17-18

- ⑤ 矢島美彩子, 生田和史, 神田 輝

日本人由来「無症候感染 EB ウイルス株」解析の試み
第 32 回ヘルペスウイルス研究会 (福岡) 2018.6.7-9

Kanda T, Ikuta K, Yajima M.

Experimental strategy to analyze EBV genome variation of Japanese
第 65 回日本ウイルス学会総会 (大阪) 2017.10.24-26

生田和史

サイトメガロウイルス感染による感音性難聴のウイルス学的検討
第 62 回日本聴覚医学会 (福岡) 2017.10.18-20

Kanda T, Ikuta K, Yajima M.

An experimental strategy to analyze EBV strain variation of Japanese individuals
第 31 回ヘルペスウイルス研究会 (松江) 2017.6.15-17

- ⑨ 関澤春仁, 生田和史, 錫谷達夫

ブルーベリーのインフルエンザウイルス増殖抑制効果 (品種比較)
第 64 回日本食品科学工学会 (神奈川) 2017.8.28-30

- ⑩ Ikuta K, Koshizuka T, Kanno R, Inoue N, Kubo T, Koyano S, Suzutani T.

Cytomegalovirus (CMV) IgG avidity test as a reliable index of CMV primary infection
42nd Annual International Herpesvirus Workshop, Ghent, Belgium. 2017.7-8.

Kobayashi T, Koshizuka T, Ikuta K, Ishioka K, Suzutani T.

The investigation of time-dependent change to latent-infection marker UL138 and

reactivation of a human cytomegalovirus

第 64 回日本ウイルス学会 (札幌) 2016.10.23-25

Ikuta K, Minematsu T, Inoue N, Kubo T, Asano K, Ishibashi K, Imamura T, Nakai H, Yoshikawa T, Moriuchi H, Fujiwara S, Koyano S, Suzutani T.

Cytomegalovirus (CMV) reinfection in neonates with congenital CMV infection and their mothers

CMV Public Health & Policy Conference, Austin, Texas. 2016.9.26-27

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

第 70 回日本細菌学会東北支部総会 (十和田) 2016.8.18-19

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

第 30 回ヘルペスウイルス研究会 (府中) 2016.6.16-18

Ikuta K, Ogawa H, Hashimoto H, Okano W, Tani A, Sato E, Kosugi I, Kobayashi T, Omori K, Suzutani T.

Murine model of cytomegalovirus-induced sensorineural hearing loss

The 11th China-Japan International Conference of Virology. Kanonji, Japan. 2016.7.1-2

[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) 研究分担者

研究分担者氏名 : 石岡 賢

ローマ字氏名 : (ISHIOKA, Ken)

所属研究機関名 : 福島県立医科大学

部局名 : 医学部 微生物学講座

職名 : 講師

研究者番号 (8 桁) : 50305356

研究分担者氏名 : 小林 敬広

ローマ字氏名 : (KOBAYASHI, Takahiro)

所属研究機関名 : 福島県立医科大学

部局名 : 医学部 微生物学講座

職名 : 助教

研究者番号 (8 桁) : 00708745

(2) 研究協力者

研究協力者氏名 : 錫谷 達夫

ローマ字氏名 : (SUZUTANI, Tatsuo)