

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10170

研究課題名(和文) ラマン分光法を用いた単純ヘルペスウイルス感染と再活性化の分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of Herpes Simplex Virus -1infection using Raman spectroscopy

研究代表者

足立 圭司 (Adachi, Keiji)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70457951

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)：口唇ヘルペス引き起こすHSV-1の感染メカニズムは不明な点が多い。ウイルスの侵入や再活性化に伴う変化を詳細に理解するには、ウイルス粒子の動態を宿主細胞内でモニタリングする必要があるが、従来の研究手法は、細胞を破壊する方法が大部分であり、宿主とウイルス間で起こるダイナミックな変化をありのままの状態でもニタリングするのは困難であった。我々は、無染色、低侵襲で分子レベルの解析ができるラマン分光法に着目した。本研究では、ラマン分光法を用い初感染や再活性化時に起こるウイルス及び神経細胞の分子レベルの変化をリアルタイムに同時に解析し、感染や再活性化に関連する分子の同定を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、HSV-1感染症の病態解明だけでなくアシクロビルに代わる新規抗ヘルペス薬やワクチンの開発に繋がることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used Raman spectroscopy to noninvasively visualize the dynamic changes in host cells and virus particles associated with herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection. Elucidate pathology. The infection mechanism of HSV-1 that causes herpes labialis is largely unknown, and it is necessary to monitor virus particle dynamics in host cells to understand in detail the changes associated with virus entry and reactivation. However, most of the conventional research methods destroy cells, and it has been difficult to monitor the dynamic changes that occur between the host and the virus as they are. We focused on Raman spectroscopy, which is non-staining, minimally invasive, and capable of molecular-level analysis. If Raman spectroscopy can be used to simultaneously analyze changes at the molecular level of viruses and neurons that occur during primary infection and reactivation in real time, it will be possible to identify molecules related to infection and reactivation.

研究分野：口腔外科学

キーワード：ラマン分光法 単純ヘルペスウイルス1型 ラマンイメージング HSV-1 ミエリン 神経伝達物質

1. 研究開始当初の背景

ヘルペスウイルスは宿主に潜伏感染と回帰発症（再発）を長期間にわたり繰り返すことが知られているが、その詳細なメカニズムは理解されていない。ヘルペスウイルスの宿主細胞内でのダイナミックな変化を理解するには、細胞を破壊し、蛍光プローブを用いる既存の解析方法では限界がある。我々のグループは、無染色、低侵襲で分子レベルの解析ができるラマン分光法に着目した。ラマンスペクトルは『分子の指紋』と呼ばれており、一度に多くに情報を得ることができる。初期感染、潜伏感染と再活性化時のウイルス粒子の細胞内でのダイナミックな変化と感染に伴う神経細胞の変化をラマン分光法で、生きた状態のまま、リアルタイムに解析することができれば、感染や神経変性に関連する分子を同定することが可能となると考えた。

2. 研究の目的

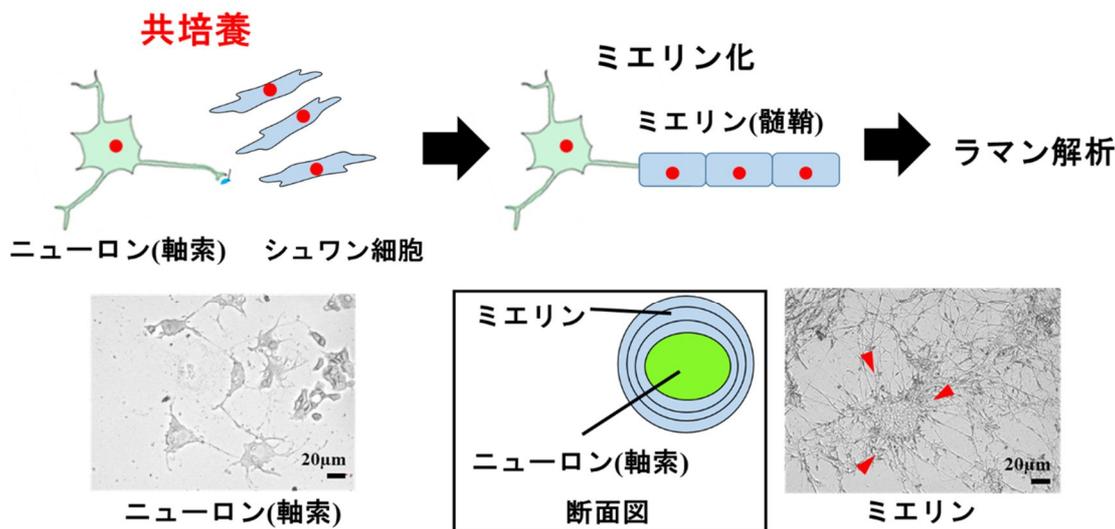
本研究は、単純ヘルペスウイルス1型（HSV-1）の神経細胞への感染に伴う、宿主細胞とウイルス粒子のダイナミックな変化をラマン分光法で非侵襲的に可視化し、HSV-1 感染症の病態解明を行う。口唇ヘルペスを引き起こす HSV-1 の感染メカニズムには不明な点が多く、ウイルスの侵入や再活性化に伴う変化を詳細に理解するには、ウイルス粒子の動態を宿主細胞内でモニタリングする必要がある。しかし、従来の研究手法は、細胞を破壊する方法が大部分であり、宿主とウイルス間で起こるダイナミックな変化をありのままの状態でのモニタリングするのは困難であった。我々は、無染色、低侵襲で分子レベルの解析ができるラマン分光法に着目した。ラマン分光法を用いて初感染や再活性化時に起こるウイルス及び神経細胞の分子レベルの変化をリアルタイムに同時に解析することができれば、感染や神経変性に関連する分子を同定することが可能となる。

3. 研究の方法

ミエリンモデルの形成

細胞の培養は、コラーゲンコーティングしたガラス底ディッシュで行う。PC12 細胞（ラット副腎褐色細胞腫細胞株、JCRB 細胞バンク）の培養は、10%の血清（5%牛胎児血清と5%ウマ血清の混合）と NGF-（50ng/ml）を添加した DMEM（神経分化誘導培地）で培養し、ニューロンに分化誘導する。神経分化マーカーである チューブリン抗体で蛍光免疫染色を行い、分化の有無を評価する。ラットシュワン細胞株 IFRS1（コスモバイオより購入）と PC12 や DRG ニューロンとの共培養系により、ミエリン形成を行う。ミエリン分化マーカーである抗 Schwann Cell/peripheral myelin 抗体（Schwann/2E）抗タウリン抗体で蛍光免疫染色を行い、ミエリンの有無を評価する。レーザーラマン顕微鏡 RAMANTOUCH（ナノフoton,大阪）の測定条件はサンプルポイントでのレーザーパワー100mW、波長 785 nm、露光時間 1 秒×10 回とする。抑制性神経伝達物質であるハイポタウリンや結合水に帰属するラマンシフト（3470 cm^{-1} ）とタンパク質に帰属するアミド（1616 cm^{-1} ）・アミド（1530 cm^{-1} ）に対するラマンシフトを取得し、神経細胞のラマンプロファイリングを行った。

図 1. 研究の概略図



ニューロンとシュワン細胞の共培養による、ミエリンモデル。

HSV-1 のラマン解析

HSV-1 は超遠心で濃縮し、HSV-1 粒子はガラス基板上に塗抹し 4%PFA で固定しラマン分光法で解析を行う。ウイルス由来の脂質に帰属するラマンシフト (1062 cm^{-1})、核酸に帰属する (1550 cm^{-1} , 1616 cm^{-1})、糖タンパク質 (1062 cm^{-1}) に帰属するに対するラマンシフトを取得する。潜伏や再活性化を繰り返す HSV-1 の感染メカニズムは不明な点が多く、ウイルスの増殖や休眠に伴う変化を詳細に理解するには、ウイルス粒子の分子動態をラマンモニタリングする必要がある。しかしながら、ラマンスペクトルは情報量が多く複雑であるため簡便かつ簡単にデータ分析できるケモトリックスが必要となる。そこで、我々が開発した新規ケモトリックスラマンバーコード法でラマンスペクトルを次元削減し、1次元バーコードにすることで、分析の簡素化・簡略化を行った。

4. 研究成果

ニューロン (PC12)、非ミエリン化シュワン細胞 (IFRS1) およびミエリン化シュワン細胞 (PC12 と IFRS1 共培養) において、スフィンゴ脂質、リン脂質、ヌクレオシド三リン酸の存在が確認できた。一方、ミエリン化したシュワン細胞は、ラマン分析により神経伝達物質であるや抗酸化物質であるグルタチオン、水 (自由水) といった分子の局在が確認できた。ニューロン (軸索) である PC12 とシュワン細胞である IFRS1 との共培養により、ハイポタウリン (緑) の発現をラマンイメージングで確認することができた。ハイポタウリンはニューロンや非ミエリンシュワン細胞では認められず、ミエリン化シュワン細胞のみで発現を認めた。また、ラマン分光法により得られた結果と蛍光免疫染色で得られたタウリンの分子イメージングを照合することで、ミエリン化を制御する分子が明らかとなった。

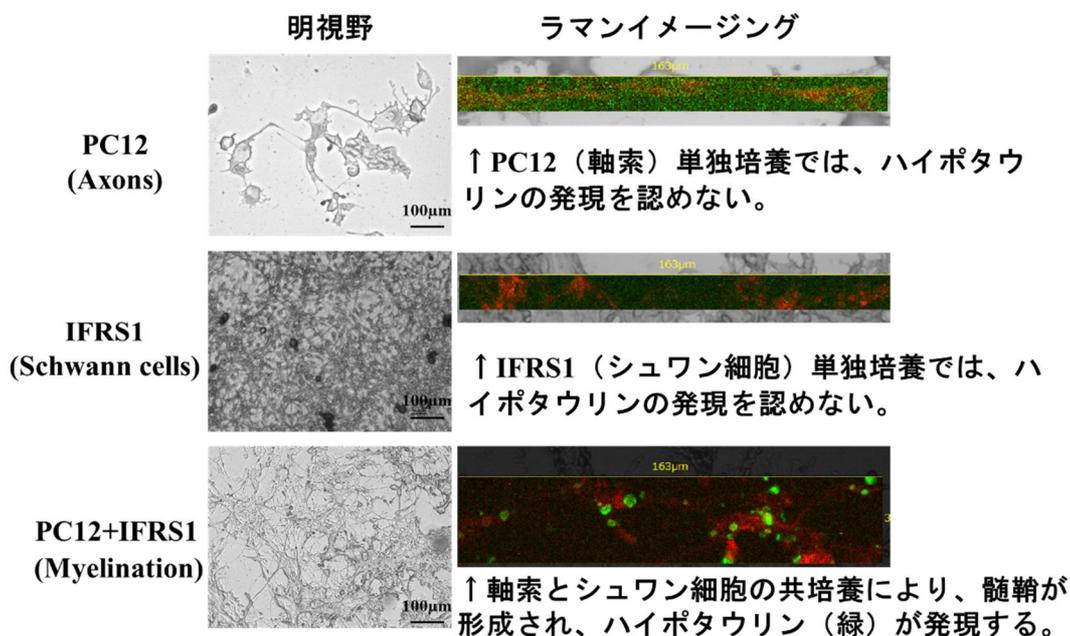


図 2. ニューロン (軸索) である PC12 とシュワン細胞である IFRS1 との共培養により、ハイポタウリン (緑) の発現をラマンイメージングで確認することができた。ハイポタウリンはニューロンや非ミエリンシュワン細胞では認められず、ミエリン化シュワン細胞のみで発現を認めた。

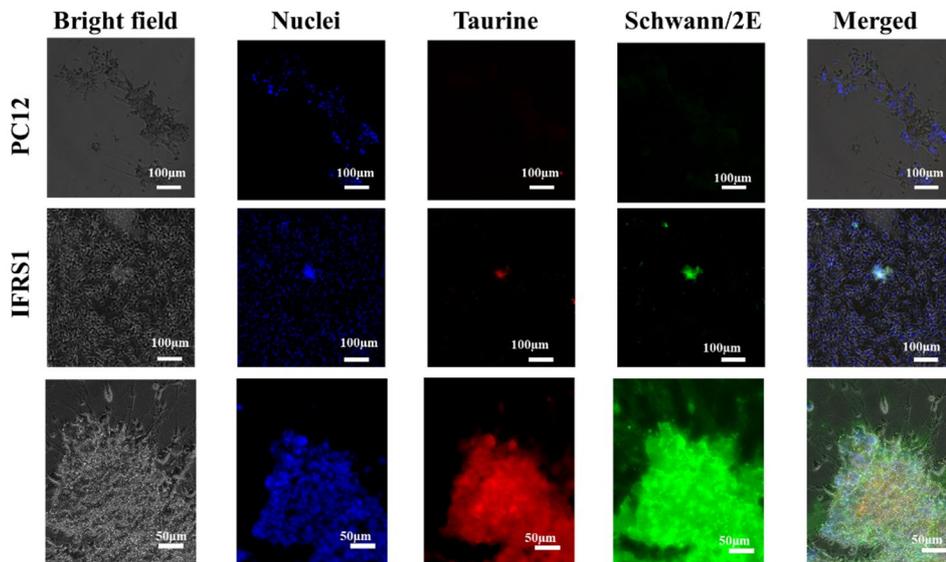
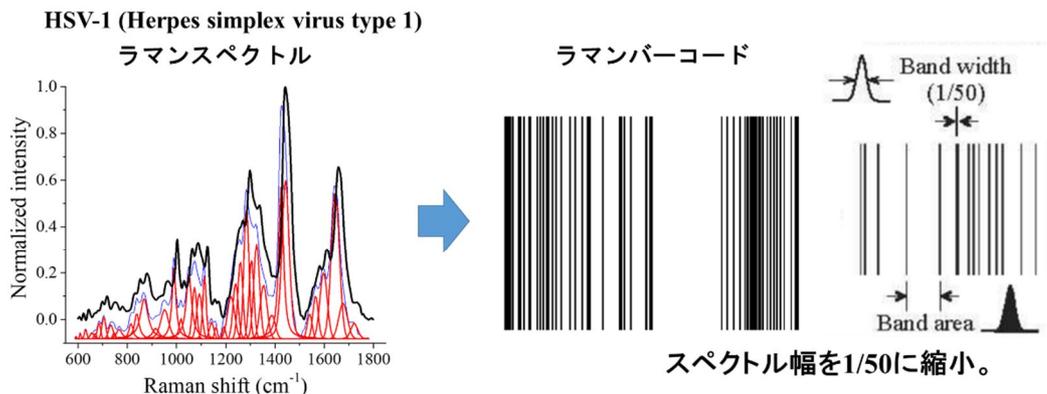


図3. ニューロン(軸索)とシュワン細胞の共培養により、ミエリンマーカである Schwann/2E (赤) 抑制性神経伝達物質であるタウリン(緑)の発現を免疫染色で確認することができた。抑制性神経伝達物質であるタウリンはニューロンや非ミエリンシュワン細胞では認められず、ミエリン化シュワン細胞のみで発現を認めた。



複雑なラマンバーコードラマンスペクトルを1次元バーコードに変換し、次元削減することで解析を簡略化・簡素化を行う。

図4. ラマンスペクトルのスペクトル幅を縮小することで、1次元バーコードに変換する。ラマン分光法を用いたラマンバーコード法で HSV-1 のバーコード化に成功した。HSV-1 のラマンバーコードは同じ口腔由来のヘルペスウイルスである EB ウイルスのラマンバーコードと容易に識別が可能である。このラマンバーコードから活性化や潜伏時の HSV-1 の分子構造の変化をモニタリングすることができる事が示唆された。

今後は、HSV-1 感染モデルを作製し、ラマン分光解析でウイルスが細胞内に侵入した際に、ウイルス・宿主双方で起こる脂質・糖タンパク質の変化をモニタリングし、ウイルスの宿主細胞侵入に関わる分子を明らかにする。本法により、ラマン分光法を元に HSV-1 感染の分子機構の全体像を明らかにすることで、新しいヘルペスの治療法・予防法の開発へ臨床応用するだけでなく、獣医学や水産学等にも応用が可能である。ラマン分光解析を用いたウイルス感染細胞の分子イメージングは、世界でも例はなく、極めて独創的で挑戦的な研究といえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Nakamura Koya, Yamamoto Toshiro, Ema Ryo, Nakai Kei, Sato Yoshiki, Yamamoto Kenta, Adachi Keiji, Oseko Fumishige, Yamamoto Yoshiaki, Kanamura Narisato	4. 巻 Sep 5
2. 論文標題 Effects of mechanical stress on human oral mucosa derived cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oral Diseases	6. 最初と最後の頁 9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/odi.13638	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 -

1. 著者名 Iwai Komei, Watanabe Isao, Yamamoto Toshiro, Kuriyama Nagato, Matsui Daisuke, Nomura Ryota, Ogaya Yuko, Oseko Fumishige, Adachi Keiji, Takizawa Shigeta, Ozaki Etsuko, Koyama Teruhide, Nakano Kazuhiko, Kanamura Narisato, Uehara Ritei, Watanabe Yoshiyuki	4. 巻 19
2. 論文標題 Association between Helicobacter pylori infection and dental pulp reservoirs in Japanese adults	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Oral Health	6. 最初と最後の頁 267
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12903-019-0967-2	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Adachi T, Miyamoto N, Adachi K, Akane M, Nishigaki M, Yamamoto Y, Matsuzawa M, Yamamoto T, Kanamura N.
2. 発表標題 Bone Regeneration by freeze-dry nanogel-crosslinked-porous gel in vivo
3. 学会等名 14th Asian Congress on Oral & Maxillofacial Surgery (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamamoto T, Adachi T, Adachi K, Asai T, Hori T, Oseko F, Kanamura N.
2. 発表標題 Biomechanical force induces the cytokine and growth factor production in human oral mucosa
3. 学会等名 14th Asian Congress on Oral & Maxillofacial Surgery (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Adachi Keiji, Adachi Tetsuya, Yamamoto Toshiro, Kanamura Narisato
2. 発表標題 Raman spectroscopy enabled non-invasive visualization of molecules forming neurites in neural cells
3. 学会等名 iADH 2020 iADH research presentations (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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	足立 哲也 (ADACHI Tetsuya) (10613573)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師 (24303)	
研究分担者	山本 俊郎 (YAMAMOTO Toshiro) (40347472)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師 (24303)	
研究分担者	金村 成智 (KANAMURA Narisato) (70204542)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (24303)	
研究分担者	PEZZOTTI G. (PEZZOTTI Giuseppe) (70262962)	京都工芸繊維大学・材料化学系・教授 (14303)	
研究分担者	扇谷 えり子 (OHGITANI Eriko) (80300820)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任准教授 (24303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------