

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08213

研究課題名（和文）胎内環境下におけるサイトメガロウイルスの新たな垂直感染機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of a novel mechanism of congenital cytomegalovirus infection

研究代表者

生田 和史（Ikuta, Kazufumi）

金沢大学・保健学系・教授

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）： サイトメガロウイルス（Cytomegalovirus, CMV）は成人の多くに感染している。高率に胎内感染を起こす病原体であり、新生児の0.3%に先天性感染を起こしている。その一部では黄疸・肝脾腫・脳内石灰化・聴覚障害などを伴っている。出生時に無症候であっても、成長に伴って障害が発生することもある。

本研究では、胎盤環境がCMV感染に及ぼす影響を検討した。胎盤特異的なマイクロRNAであるC19MCを導入した細胞において、CMVが効率的に産生されることが分かった。C19MCによって発現抑制される宿主遺伝子を同定し、当該遺伝子の直接的な抑制によりCMV増殖が選択的に誘導される可能性を見出した。

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。米国では低体重や聴覚障害等を有する新生児を対象とした、ウイルススクリーニング検査が義務化される州が増えている。先天性CMV感染についてはAMED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。

胎盤で高発現するマイクロRNAの多くはC19MCである。近年、C19MCは胎盤の形成や生理機能維持に必要であることが分かってきた。しかしウイルス感染との関わりは解明されていなかった。本研究結果により胎内CMV感染の機序の一端が解明された。

研究成果の概要（英文）： Cytomegalovirus (CMV) infects most of adults and also the most common causative agent of intrauterine infection. To clarify the etiology of congenital CMV infection, we focused on how the placental environment effects its infection. We investigated the role of micro RNAs (miRNAs), which are highly and specifically expressed in placental trophoblasts. The transfection of trophoblast-specific C19MC miRNAs, markedly enhanced the CMV production. We identified that one of the cellular gene was markedly suppressed by C19MC-BAC transfection. The suppression of its expression enhanced CMV gene expression. Here, we propose a hypothesis that the placental environment contributes to CMV-specific replication via the trophoblast-specific miRNA-mediated downregulation of one of the cellular gene expression.

研究分野：微生物学

キーワード： サイトメガロウイルス 先天性感染

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

サイトメガロウイルス (CMV) は健康成人の多くが感染しているウイルスである。しかし妊娠中に CMV 感染を起こすと、胎児では死産、流産、小頭症、肝脾腫、精神発達障害、聴覚障害などを生じる。感染児の多くは症状を起こしていないが、成長に伴って聴覚障害や発達遅延を生じる場合もある。

先天性 CMV 感染における未解決な点は「CMV がどのように経胎盤感染を起こしているのか」である。先天性 CMV 感染症例の胎盤では CMV 増殖が認められている。胎盤環境が CMV 増殖を促している可能性がある。元来胎盤は、母体由来病原体の胎児伝播を物理的に阻止している。本研究では、胎盤環境に依存した経胎盤感染の機序解明を行い、先天性ウイルス感染症を防止・治療するための手掛かりを得ることを目指している。

### 2. 研究の目的

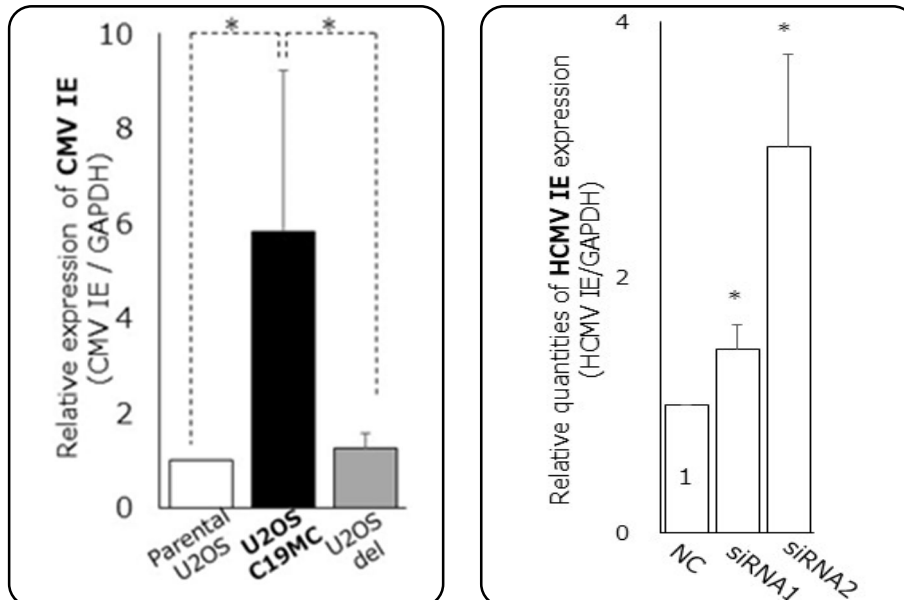
CMV 胎内感染機構の解明と、成果をもとにした先天性 CMV 感染の撲滅が本研究の目的である。研究代表者 (生田) は分担者 (石岡) と共に臨床検体から CMV 分離を試み、ウイルス増殖が極めて遅いことを経験してきた。しかし先天性 CMV 感染の胎盤栄養膜では CMV 増殖が認められている (Sinzger et al, Microbiol. Immunol. 2008)。胎盤では効率的なウイルス増殖が必須と考えるに至った。胎盤環境を CMV 増殖の適地とした着眼はされておらず、本研究の特色のひとつである。本研究により新たな垂直感染機構を解明する。

### 3. 研究の方法

胎盤特異的マイクロ RNA による CMV 増殖機構の解明

ヒト胎盤栄養膜で特異的に高発現する 46 個のマイクロ RNA は、第 19 番染色体上の約 100kbp にクラスター (Chromosome 19 micro RNA cluster; C19MC) として存在している。C19MC は哺乳類に特有なゲノムインプリンティングを受ける遺伝子である。BAC (bacterial artificial chromosome、人工染色体) を用いて C19MC を導入した細胞に CMV を感染させた。リアルタイム PCR (qPCR) 法による CMV DNA 定量、infectious center assay によるウイルス力価の定量を行い、C19MC による CMV 増殖効率の変化を検討した。C19MC によるウイルス遺伝子発現の変化は、RT-qPCR 法、ウェスタンブロット法、免疫染色法により検討した。宿主遺伝子発現の変化は、RNAseq により解析した。候補として挙げられた宿主遺伝子について、siRNA により発現抑制を行い、CMV 増殖への関与を詳細に検討した。

### 4. 研究成果



C19MC 導入細胞に CMV を感染させ、ウイルス増殖を誘導する前初期遺伝子の発現量を調べた。ウイルスの前初期遺伝子の発現は単純ヘルペスウイルスでは抑制された (data not shown)。しかし同じヘルペスウイルス科に属する CMV では促進され (上図左) それに伴うウイルス産生も亢進した。

C19MC-BAC により誘導されたマイクロ RNA は様々な遺伝子発現を変化させ、その一部が CMV 産生を促進していると考えられる。C19MC-BAC 導入による遺伝子発現変化を RNA シークエンスにより解析した。対象とした約 5 万遺伝子のうち 295 遺伝子において発現増減が認められた。CMV 受容体の遺伝子は変化しておらず、細胞へのウイルス吸着量が変化していないことも確認済である。

2 倍以上の発現増減が認められた 295 遺伝子のうち、単独の遺伝子クラスターに属したものは遺伝子 X のみであり、100 倍以上の強い発現抑制であった。siRNA により遺伝子 X の発現を抑制したのちに CMV を感染させたところ、C19MC-BAC 導入細胞と同様にウイルス前初期遺

伝子発現が促進された(上図右)。遺伝子 X は細胞内シグナルを伝達する広範な分子スイッチであり、多様な働きを有するが、ウイルスとの関係は知られていない。当該遺伝子の抑制による CMV 増殖促進機構を引き続き解明予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Kaneko Hisatoshi, Hanaoka Nozomu, Konagaya Masami, Kobayashi Masaaki, Nakagawa Hisashi, Hatano Hiroshi, Ikuta Kazufumi, Sekiryu Tetsuju, Fujimoto Tsuguto	4. 巻 73
2. 論文標題 Five Cases of Epidemic Keratoconjunctivitis Due to Human Adenovirus Type 85 in Fukushima, Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 316 ~ 319
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7883/yoken.JJID.2020.034	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 Yajima Misako, Kakuta Risako, Saito Yutaro, Kitaya Shiori, Toyoda Atsushi, Ikuta Kazufumi, Yasuda Jun, Ohta Nobuo, Kanda Teru	4. 巻 102
2. 論文標題 A global phylogenetic analysis of Japanese tonsil-derived Epstein-Barr virus strains using viral whole-genome cloning and long-read sequencing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of General Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jgv.0.001549	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, Kanno Ryoko, Bessho Tomoaki, Koshizuka Tetsuo, Suzutani Tatsuo	4. 巻 105
2. 論文標題 Evaluation of Toxoplasma gondii IgG avidity assays through a comparison of IgM serostatus	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Diagnostic Microbiology and Infectious Disease	6. 最初と最後の頁 115901 ~ 115901
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.diagmicrobio.2023.115901	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21件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yajima M, Ikuta K, Ohta N, Kanda T.
2. 発表標題 Phylogenetic analyses of asymptotically infected EBV strains derived from Japanese tonsillar tissues in comparison with worldwide non-tumor-derived EBV strains
3. 学会等名 The 19th international symposium on Epstein-Barr virus and associated diseases. (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ikuta K, Yajima M, Kitamura H, Kanda T.
2. 発表標題 Human Cytomegalovirus replication enhanced by placental microRNAs
3. 学会等名 46th Annual International Herpesvirus Workshop (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yajima M, Toyoda A, Ikuta K, Ohta N, Murakami K, Kanda T
2. 発表標題 Characterization of asymptotically infected Epstein-Barr virus strains in Japan; apparent difference against those in Asian nasopharyngeal carcinoma-endemic areas
3. 学会等名 12th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 生田和史、矢島美彩子、神田 輝
2. 発表標題 胎盤栄養膜由来miRNA群によるサイトメガロウイルス前初期遺伝子発現の増強
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神田輝、生田和史
2. 発表標題 ヒト検体由来EBウイルス陽性胃がん細胞のコンディショナルリプログラミング法による長期継代培養
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 生田和史、矢島美彩子、北村大志、神田 輝
2. 発表標題 胎盤で高発現するmicroRNA群によるサイトメガロウイルス産生の誘導
3. 学会等名 第74回日本細菌学会東北支部総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤由紀恵、生田和史、神田 輝、佐々木健郎
2. 発表標題 加美町産ムラサキの抽出物における抗インフルエンザウイルス効果
3. 学会等名 日本生薬学会第68回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 生田和史、矢島美彩子、北村大志、神田 輝
2. 発表標題 胎盤栄養膜由来microRNA群によるサイトメガロウイルス産生の誘導
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神田 輝、北村大志、生田和史、清野 透
2. 発表標題 改変コンディショナルリプログラミング法によるEBウイルス陽性胃がん細胞株化の試み
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北村大志、矢島美彩子、生田和史、神田 輝
2. 発表標題 EB ウイルスゲノムの東アジア地域間の多様性に関する系統解析
3. 学会等名 第31回EBV感染症研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北村大志、生田和史、神田輝
2. 発表標題 NRF2の転写活性を制御するRASシグナル下流因子の探索
3. 学会等名 第89回日本生化学会東北支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 生田和史、矢島美彩子、北村大志、神田輝
2. 発表標題 胎盤由来マイクロRNA群によるサイトメガロウイルス感染の誘導
3. 学会等名 第36回ヘルペスウイルス研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北村大志、矢島美彩子、生田和史、神田輝
2. 発表標題 東アジアにおけるEBウイルスゲノムの地域差に関する解析
3. 学会等名 第36回ヘルペスウイルス研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 生田和史、矢島美彩子、北村大志、神田輝
2. 発表標題 先天性サイトメガロウイルス感染における胎盤由来マイクロRNA群の役割
3. 学会等名 第75回日本細菌学会東北支部総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北村大志、矢島美彩子、生田和史、神田輝
2. 発表標題 EBウイルスゲノムの東アジアにおける地域差に関する解析
3. 学会等名 第75回日本細菌学会東北支部総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 生田和史、矢島美彩子、北村大志、神田輝
2. 発表標題 胎盤特異的マイクロRNA群が誘導するサイトメガロウイルスの産生
3. 学会等名 第70回日本ウイルス学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北村大志、矢島美彩子、生田和史、神田輝
2. 発表標題 ウイルスゲノム配列による東アジア地域EBウイルス株の系統解析
3. 学会等名 第70回日本ウイルス学会総会
4. 発表年 2023年



1. 発表者名 久下周佐、関根僚也、末永司、津野沙月、色川隼人、生田和史、神田輝、住友和弘、西村秀一、武田洸樹
2. 発表標題 ヒトコロナウイルスおよびインフルエンザAウイルスに抗ウイルス作用を示す新規オリゴヌクレオチドの創出
3. 学会等名 第70回日本ウイルス学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西山雄亮、生田和史、福田誠
2. 発表標題 Epstein-Barr virus (EBV) 核酸増幅検査法の開発
3. 学会等名 2023年度 日臨技 首都圏支部・関甲信支部医学検査学会(第59回)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西山雄亮、生田和史、福田誠
2. 発表標題 EBV 核酸増幅検査法の一次国際標準品による検証とリアルタイムPCR 検出系の開発
3. 学会等名 2023年度 日臨技 首都圏支部・関甲信支部医学検査学会(第59回)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Rumi Nakayama-Naono, Akihiro Ambo, Kazufumi Ikuta, Ryuichi Harada, Tadaho Nakamura, Hideki Funahashi, Nobuyuki Okamura
2. 発表標題 Role of tachykinin peptides in nociceptive- and pruriceptive-processing
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 生田和史	4. 発行年 2021年
2. 出版社 全日本病院出版会	5. 総ページ数 8
3. 書名 Entoni 先天性サイトメガロウイルス感染症と難聴 分担執筆部分「先天性サイトメガロウイルス感染による難聴発症メカニズム」	

1. 著者名 中山(直野)留美, 安保明博, 生田和史, 上条桂樹, 船橋英樹	4. 発行年 2023年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 4
3. 書名 アレルギーの臨床 分担執筆部分「痒み伝達におけるタキキニンペプチドの役割」	

〔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	石岡 賢  (Ishioka Ken)  (50305356)	福島県立医科大学・医学部・講師    (21601)	

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
---------	---------