

(別紙1)

総括研究報告書

課題番号：2020C-13

課題名：サイトメガロウイルスの神経病原性における細胞外小胞の役割に関する研究

主任研究者 (所属施設) 国立成育医療研究センター

(所属・職名 氏名) 免疫アレルギー・感染研究部・母児感染研究室 櫻木小百合

(研究成果の要約) 先天性サイトメガロウイルス(CMV)感染症は、精神発達遅滞、認知障害、感音性難聴などの神経・感覚器障害を合併し、感染児の発育・成長や予後に重大な影響をおよぼす。また、細胞外小胞 (extracellular vesicles; EV) は、がん、感染症、神経変性疾患など多くの疾患発症に関わっている可能性があり、細胞外小胞の機能と発症メカニズムについて精力的に研究が進められている。CMV 感染細胞から放出される細胞外小胞に内包される蛋白や RNA に関して調べる目的で、CMV 感染細胞から放出される細胞外小胞を、CMV 子孫粒子を混在させずに精製・濃縮する系を確立した。さらに、細胞外小胞の放出に深く関与する CD9 と CMV 感染との関わりについて検証する目的で、CD9 ノックダウン(KD) U373MG 細胞を作製した。

1. 研究目的

本研究では、サイトメガロウイルス (cytomegalovirus ; CMV) の神経病原性発現メカニズムを明らかにする目的で、CMV 感染神経系細胞から放出される細胞外小胞 (本研究では主にエクソソームを想定) と神経病原性との関連に着目し、CMV 感染細胞から放出される細胞外小胞の性状および機能を明らかにすることを目的とした。

2. 研究組織

研究者

櫻木小百合

所属施設

国立成育医療研究センター

3. 研究成果

ある種のウイルス感染に細胞外小胞が関与すると報告されている。また細胞外小胞の放出にある種のテトラスパニンが関与するという報告が有る。テトラスパニンはウイルスの感染に関与するという報告がある。テトラスパニンは4個の膜貫通領域と2個の細胞外ループを持つ。ヒトでは33個のテトラスパニンが存在し、多くの特性が有る。例えば、ウイルス感染以外にも、細胞接着、細胞運動、細胞増殖、がん転移などである。

(1) テトラサイクリン誘導性 EGFP-テトラスパニン発現ヒト神経系細胞(U373MG 細胞)を用いた実験系の確立。

細胞外小胞の放出に関わるテトラスパニンと CMV 感染との関わりについて解析することを目的として、EGFP-テトラスパニ

ンを強制発現できるヒト神経系細胞 U373MG を樹立した。ウエスタンブロッティングにて各テトラスペニンタンパク質の発現を確認した後、CMV 感染に伴うテトラスペニンの局在変化を観察した。その結果、CMV 感染による CD9, CD63, CD81 の局在変化は検出されなかった。

(2) 密度勾配遠心法による EV の精製

CMV 感染細胞の培養上清中に存在する EV の機能解析を行うためには、培養上清中に存在し得る CMV 粒子を混在させずに EV のみを精製する必要がある。そこで、Iodixanol 密度勾配遠心法を用いて EV の精製を試みた。

U373MG 細胞に CMV を感染させ、48 時間後に培養上清を回収して濃縮を行い、Iodixanol 密度勾配遠心法を用いて EV の精製を行った。遠心後、遠沈管の上方から 500 μ L ずつ 23 フラクシオンを回収した。各フラクシオンを等量だけ SDS-PAGE で泳動し、抗 CD9 抗体を反応させたところ、フラクシオン #2~13 で CD9 が検出され、特にフラクシオン #7~10 に強いシグナルが検出された。

次に、各フラクシオンに感染性 CMV 粒子が含まれていないことを確認する目的で、CMV に対して高い感染感受性を示すヒト胎児肺細胞 (MRC-5) へそれぞれのフラク

ションを添加した。その結果、各フラクシオンに CMV 粒子が含まれていないことが確認された。

(3) CD9 ノックダウン U373MG 細胞における CMV 感染実験

EV の放出に深く関連する CD9 と CMV 感染との関わりについて検証する目的で、CD9 ノックダウン (KD) U373MG 細胞へ CMV を感染させて感染効率に変化が見られるかどうかを検証することとした。検証を行うために、CD9 KD U373MG 細胞の樹立を試みた。CD9 発現をノックダウンする方法として、CD9 mRNA を標的とする shRNA を U373MG 細胞へ導入することで樹立した。その後、CD9 タンパクの発現レベルが下がっていることを、ウエスタンブロッティングにて確認した。

今後、この細胞を用いて、CD9 および CD9 含有 EV と CMV との関連性について解析を進める予定である。

4. 研究内容の倫理面への配慮

廃棄物の処理や実験区域については、関係法令・指針および当研究所の設けた基準に従い遂行した。また、必要に応じて遺伝子組換え安全委員会にて承認を得た。