

(別紙1)

総括研究報告書

課題番号：30-21B

課題名：先進的感染モデルの活用による母児感染症に対する新規治療法開発に関する研究

主任研究者 国立成育医療研究センター

免疫アレルギー・感染研究部・母児感染研究室 中村浩幸

(研究成果の要約) 先天性サイトメガロウイルス (CMV) 感染症や先天性風疹症候群などの母児感染症は、ウイルスが母体から胎盤を介して胎児へ感染することで引き起こされる。先天感染児は、ときに感音性難聴や精神発達遅滞などさまざまな臓器障害を合併する。本年度は、母児感染症における神経・感覚器障害の発症メカニズムに関連する分子探索研究、人工多能性幹 (iPS) 細胞などを活用した新たなウイルス感染モデルの構築とその解析、さらに、先天性 CMV 感染に起因する難聴に関する臨床学的解析を進めた。

1. 研究目的

サイトメガロウイルス (Cytomegalovirus, CMV) や風疹ウイルス (Rubella virus, RV) は、母体から胎児へと経胎盤感染することで引き起こされる。本邦では、全出生児の 0.31% が先天性 CMV 感染児と推定されている。先天感染児の一部では、精神発達遅滞や感音性難聴などの神経・感覚器障害をはじめさまざまな臓器障害を合併し、感染児の予後に大きな影響をおよぼし得る。

本研究の目的は、(1) サイトメガロウイルス (CMV) や風疹ウイルスに起因する母児感染症の発症メカニズムの解明とその制御に有用な標的分子の探索、(2) 経胎盤感染および病原性発現のメカニズム解明にどのような新規感染モデルの構築とその解析、(3) 先天性 CMV 感染に起因する難聴児の臨床学的特徴に関する研究、を進めた。

2. 研究組織

| 研究者 | 所属施設 |
|-------|--------------|
| 中村浩幸 | 国立成育医療研究センター |
| 阿久津英憲 | 国立成育医療研究センター |
| 守本倫子 | 国立成育医療研究センター |

3. 研究成果

1) CMV による神経障害に対する新規治療法開発に向けた基礎研究

これまでに、CMV 感染感受性を示すヒト神経系細胞株を用いて確立した *in vitro* CMV 感染モデルを活用し、CMV 感染にともなう神経障害性の発現に深く関与すると思われる

細胞遺伝子を約 10,000 種類以上の細胞遺伝子を対象としたゲノムワイドスクリーニングを行うことで探索した。その結果、CMV 神経病原性の発現に関与すると思われる細胞遺伝子群を同定した。次に、同定された候補遺伝子群の一部について、CMV 神経病原性との関連を確認する実験を行った。その結果、CMV 病原性に関与する可能性を強く示唆する細胞遺伝子が少なくとも 2 種類存在することが確認され、これらの細胞遺伝子産物の機能を制御することで、CMV 病原性を抑制できる可能性が示された。今後は、同定された細胞遺伝子を介する CMV 病原性の抑制メカニズムの詳細を解析する予定である。

風疹ウイルス (Rubella virus, RV) は、CMV 同様胎盤を介して胎児に感染し、難聴や白内障などをともなう先天性風疹症候群 (CRS) を引き起こす。RV が神経系細胞におよぼす影響を明らかにする目的で、iPS 細胞由来神経幹・前駆細胞やヒト神経系細胞株に対して実験的に RV を感染させた。本研究では、RV 感染にともなう自然免疫応答について解析を進めた。その結果、RV と I 型インターフェロン (Interferon, IFN) 誘導との関連、RV 感染の認識に関わるセンサー分子、自然免疫応答が RV 複製におよぼす影響などについて解析を進めた。

2) 母児感染症の基盤となる先進的ウイルス感染モデルの確立とその解析

(目的) 本研究は、ウイルス病原性発現メ

カニズムの理解と病原性制御法確立に有用な実験基盤を新たに確立するために、先進的なウイルス感染モデルをヒト iPS 細胞を用いて作製することを目的として iPS 細胞由来栄養膜細胞を用いた CMV 感染モデルの開発に関する研究を進めた。

(方法) CMV や RV は、胎盤を介して胎児へ感染するが、胎盤におけるウイルス感染の詳細なメカニズムや、ウイルス感染が胎盤機能へおよぼす影響については不明な点が多い。私たちは、ヒト iPS 細胞から効率よく栄養膜細胞を作製する方法を世界に先駆けて開発した (Kojima J et al., Lab Invest, 2017)。本研究では、iPS 細胞から作製した栄養膜細胞を用いて先進的 CMV 感染栄養膜細胞モデルを確立し、栄養膜細胞における CMV 感染様式や CMV 感染にともなう細胞機能変化について明らかにしていく。iPS 細胞由来栄養膜細胞におけるウイルス感染様式を明らかにする。栄養膜細胞におけるウイルス感染様式 (感染性の有無や感染効率、ウイルス遺伝子産物の発現様式、ウイルス増殖の有無、どの細胞に感染するか、細胞間でのウイルス感染伝播様式) を RT-PCR、蛍光免疫組織染色などにより明らかにする。また、由来の異なる複数の iPS 細胞から栄養膜細胞を作製し、細胞間でウイルス感染様式に差異があるか比較する。

(結果) ヒト iPS 細胞からのトロホブラスト分化誘導のロバスト性を検証するために、複数のヒト iPS 細胞株を用いて胎盤分化誘導能を検証した。分化誘導した胎盤組織に対して CMV 感染した結果、CMV の感染を確認することができた。CMV の母児感染モデルを構築する基盤となる成果が得られた。

(考察) iPS 細胞由来の 3 次元化胎盤組織へ CMV 感染を実証した。CMV 母児感染モデルの構築に重要な成果である。CMV 感染の細胞種の同定と感染により分子動態がどう変動するかも今後は検討していきたい。

(結論) iPS 細胞からの胎盤系組織へ CMV 感染することが確認出来た。CMV 母子感染のモデル検証として、組織および分子機序の解明を行っていく。

3) 母児感染に起因する難聴児に関する研究

(目的) 先天性サイトメガロウイルス

(CMV) 感染児の大半は出生時無症候性であるが、その一部は感音性難聴や精神発達遅滞などの合併症を遅発性にともなってくる事が知られている。そのため、先天感染児に対しては、早期から継続的に検査・フォローアップするなど適切な医療介入が必要と考えられる。しかし、出生時に難聴や他の CMV 感染を疑わせる症候がなかった場合は先天性感染を疑わず、見逃されている状況にある。本研究は、保存臍帯中から CMV ゲノムを検出することで後方視的に先天感染児を同定し、CMV 難聴の臨床像および適切な医療介入方法を探ることを目的とする。

(方法) 当センター耳鼻咽喉科を受診し、難聴と診断された児から保存臍帯の一部を採取し、ゲノム DNA を抽出したのちリアルタイム PCR 法により CMV ゲノムの検出が検出された症例について、後方視的に臨床的特徴を解析した。

(結果) 該当する症例 20 例について解析を行った。20 例中 17 例は出生直後は聴力正常であった症例であり、2 例は一側難聴、1 例は両側軽度難聴と診断されていた症例であった。

診断を受けるきっかけとなった動機については、5 歳で診断された 7 例のうち 6 例は就学時健診の時に初めて難聴を指摘され、当院を受診した症例であった。また、発達障害が契機となった 6 例は、0 歳が 2 例、5 歳 2 例、2 歳と 9 歳が 1 例ずつであった。

13 例が両側難聴 (うち 5 例は両側 90dB 以上の高度難聴) であった。一側難聴 7 例中難聴側が 90dB 以上の高度難聴であったものは 6 例であった。

難聴が進行し始めたと推測される時期については、多くは 3 歳～5 歳までの間に難聴が進行していると考えられた。

(考察) 20 例のうち 17 例は新生児聴覚スクリーニングでも発見されていないため、定期的な聴力のフォローなどを全くうけないまま、後日健診や発達の遅れなどで明らかになった症例であった。また、聴力低下は 0 歳後半から 8 歳、9 歳まで多様であり、小児の遅発性、進行性難聴が認められた場合には常に先天性 CMV 感染を疑う必要があるだ

ろう。

診断をうける契機となったのが、就学時健診であり、これは一側難聴が多く発見される結果となった。良聴耳が聞こえることによって不自由がなく過ごしていたと推測される。反対に発達障害や言葉の遅れに対する精査のルーチンとして行われた聴力検査で発見された症例は半数を占めていた。中には家族が言語発達障害の原因として難聴がある、ということを知ったという理由で検査を希望してきた症例もあった。こうした症例では、難聴によって言語発達障害が生じていたこと以外に先天性CMV感染により運動発達遅滞や精神発達遅滞、高次機能障害が生じるということを明らかにできることで、児にあった療育方法や介入方法を検討することができており、診断が明らかになることは非常に大きな意味があると考えられた。

先天性CMV感染による難聴は、小児難聴の原因として遺伝性難聴の次に多い。難聴は1000人に1～2人の発症率とされており、稀ではない疾患であること、早期に適切な介入をすることにより十分な効果が期待で

きることに、最近では抗ウイルス薬であるバルガンシクロビルによる難聴進行を予防する効果も期待できることから、本来であれば出生児全員のCMVスクリーニングが行われるべきと考える。

(結論) 新生児期に難聴と診断されていない無症候性CMV症例17例がのち3～5歳を中心に聴力低下していることが明らかになった。健診や発達の遅れなど気になる点があった場合は聴力の評価は必須であり、さらに聴力低下と発達の遅れがあった場合には臍帯などを用いたCMV感染の検査が推奨されるべきと考える。

4. 研究内容の倫理面への配慮

生体試料を用いる解析においては、成育医療研究センター倫理委員会の承認を得て行われた。また、組換えDNA実験を行う場合には、実験場所や廃棄物処理移換しては、関係法令・指針および当研究施設の設けた基準を順守しながら研究を進めた。組換えDNA実験は、当センター遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得て実施した。