

令和 3 年 9 月 24 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 令和 1 年度

受付番号 201970016

氏 名 藤村 公乃

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： ボストン （国名： 米国 ）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

感染による神経疾患発生機序についてのプロテオゲノミクスを用いた多次元的解析

3. 派遣期間： 令和 1 年 10 月 1 日 ～ 令和 3 年 8 月 27 日

4. 受入機関名及び部局名

受入機関名： Harvard Medical School

部局名： Boston Children's Hospital, F. M. Kirby Neurobiology Center

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意

書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入也可)

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10－別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

1. 背景と概要

胎児期のウイルス感染症は、脳の発生を障害するなど有害な結果をもたらす。2015年から2016年にかけてアメリカ大陸でジカウイルス（ZIKV）感染症が流行し、先天性に感染した児において小頭症を含む中枢神経系を中心とした発生異常が報告された。

派遣先の Steen 研究室は、プロテオミクスやバイオインフォマティクスを用いて、様々な生命現象をタンパク質のネットワークによる包括的なシステムとして理解する systems biology に取り組んでいる。

本研究では、先天性 ZIKV 感染症の病態生理を明らかにするために、プロテオミクスと RNA シーケンス（RNA-Seq）を併用し、正常免疫応答をもつマウスを用いて先天性 ZIKV 感染症モデルの胎仔の脳を解析した。ZIKV に感染した胎仔脳内では Janus kinase（JAK）- signal transducer and activator of transcription（STAT）経路の活性化により、MHC-I のプロセッシング、抗原提示、IFN 誘導性タンパク質の翻訳、マクロファージの浸潤が亢進した。さらに、ヒト小頭症の原因遺伝子としてすでに報告されているものの、先天性 ZIKV 感染症ではこれまでに知られていなかった複数の遺伝子/タンパク質の発現量が減少することが明らかとなった。このように、systems biology による包括的なアプローチを行うことで、先天性 ZIKV 感染症による小頭症発症の病態生理を捉えることができた。

2. 結果

結果 1 ; プロテオミクスは ZIKV 感染胎仔の脳内でウイルスタンパク質を検出した

妊娠中の CD-1 マウスに ZIKV または対照としてリン酸緩衝食塩水（PBS ; Mock）の胎盤内注射を胎生 10.5 日（E10.5）に行った（Gladwyn-Ng et al. 2018）。ZIKV に感染した胎仔では、対照群と比較して E16.5 における大脳皮質厚が 10% 減少した。小頭症の原因となる初期変動を捉えるため、E14.5 の胎仔の脳組織を用いてプロテオミクス（各群 n = 5）および RNA-Seq（各群 n = 3）を行った（図 1）。Tandem mass tag（TMT）システムを用いたプロテオミクスでは 8,000 以上のタンパク質を同定した（5% false discovery rate（FDR））。40% 以上の配列カバレッジで ZIKV ポリプロテインを検出し、シグナルペプチド 2K を除くすべての構造および非構造のウイルスタンパク質についてそれらをコードするペプチドをマッピングした。

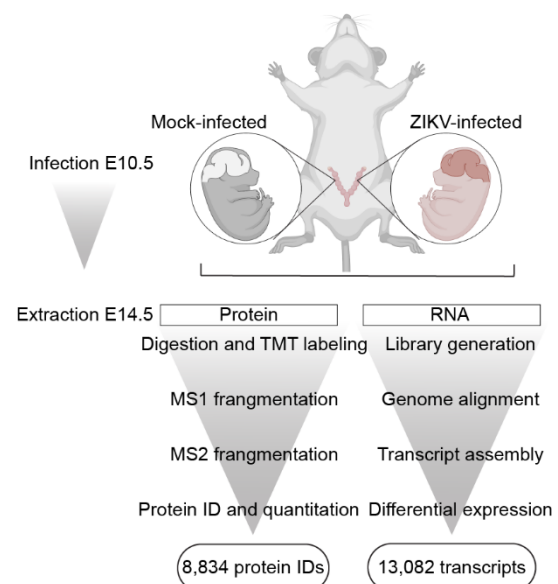


図1: プロテオミクスおよびRNAシーケンスによる先天性ジカウイルス感染胎仔脳の解析

胎生10.5日にジカウイルスまたはPBSを経胎盤投与した後、胎生14.5日に胎仔脳を摘出、プロテオミクスとRNAシーケンス（RNA-Seq）を併用して解析を行った。

結果 2 ; ZIKV 感染は胎仔の脳における自然免疫応答, 抗原提示, サイトカイン産生を亢進させた

定量的プロテオミクスの結果, E14.5 の ZIKV 感染胎仔脳では 84 のタンパク質の発現量が増加, 16 のタンパク質の発現量が減少した (図 2A). Gene ontology biological processes (GOBP) 解析の結果, 自然免疫応答, 抗原処理と提示, サイトカインへの応答など, 免疫に関わるプロセスが最も亢進していた. さらに, tumor necrosis factor (TNF) 産生やアポトーシスシグナル伝達経路も亢進されていた.

次に階層的クラスタリング解析の結果, ZIKV 感染胎仔脳で有意に発現が増加するタンパク質のサブセットが同定された (図 2B, cluster 1-1). このサブセットに含まれるタンパク質は自然免疫応答や抗原の処理と提示に関連するもので, GOBP 解析の結果と一致した (図 2C). これらの中で最も発現量が増加したのは, STAT1, bone marrow stromal cell antigen 2 (BST2), interferon (IFN) stimulated gene 15 (ISG15) であり, ZIKV 感染によって胎仔脳内で JAK/STAT 経路が活性化されたことが示唆された.

さらに, RNA-Seq の結果, ZIKV 感染胎仔脳では JAK/STAT 経路の活性化によって誘導されるサイトカインである C-C motif chemokine ligand (CCL) 2, 5, 9, C-X-C motif chemokine ligand 9 (CXCL9), colony stimulating factor 1 (CSF1), secreted phosphoprotein 1 (SPP1), TNF superfamily member 10 (TNFSF10) などが増加していた.

また, 免疫組織染色により ZIKV に感染した大脳皮質内ではマクロファージ/ミクログリアの数が増加することが示された.

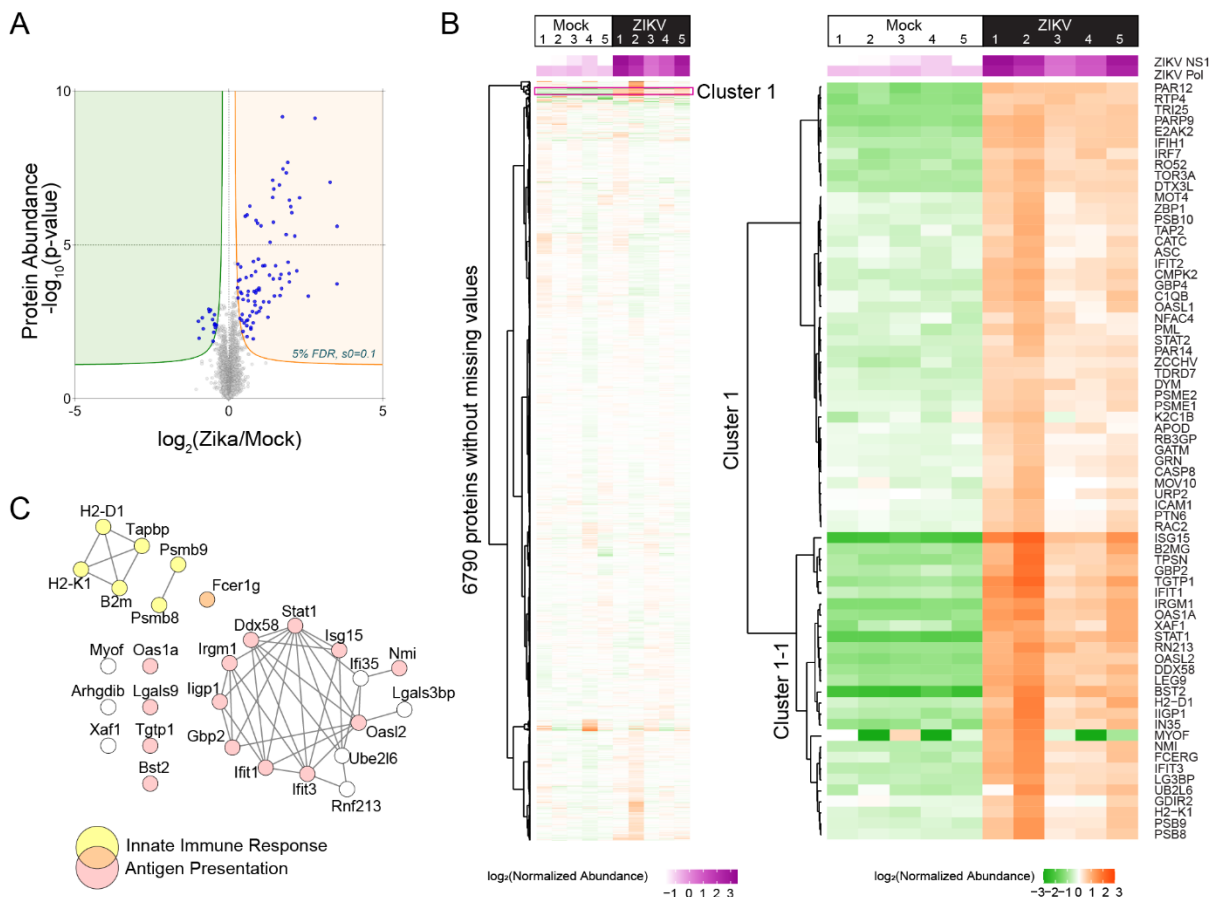


図2: プロテオミクスはジカウイルス感染胎仔脳内の自然免疫応答の亢進を捉えた

(A) 胎生14.5日の胎仔脳からタンパク質を抽出し, プロテオミクスによる定量解析を行ったところ, 対照群と比較して84のタンパク質の発現量が増加, 16のタンパク質の発現量が減少した.

(B) クラスタリング解析の結果, ジカウイルスに感染した胎仔脳で有意に発現量が増加するタンパク質のサブセット(cluster 1-1)が同定された.

(C) STRINGデータベースによるタンパク質間相互作用解析の結果, cluster 1-1に含まれるタンパク質は自然免疫応答や抗原提示に関するタンパク質であった.

結果 3 ; ZIKV 感染胎仔脳では複数の神経発生関連遺伝子/タンパク質の発現量が減少した

RNA と合成されるタンパク質のペアについて発現量を比較したところ、mRNA とタンパク質の発現量に相関を認めた (図 3A, $r=0.70$)。次に、RNA-Seq とプロテオミクスの両解析で共通して発現量が減少し、少なくとも一方でその変動が有意であった RNA-タンパク質ペアを抽出した結果、30 組が得られた (図 3B ; 3A の第 III 象限)。これら発現量が減少した RNA-タンパク質ペアのうち、9 つは、ヒトで神経発生異常の原因遺伝子/タンパク質として報告され、先天性 ZIKV 感染症と重複する表現型を示すものであった (図 3B, ピンクのハイライト)。加えて、8 つの RNA-タンパク質ペアについて、発生中の脳で重要な機能を持つことがマウスで報告されていた (図 3B, 紫のハイライト)。これらには先天性 ZIKV 感染症の病態においては新規に報告される遺伝子/タンパク質が含まれていた。

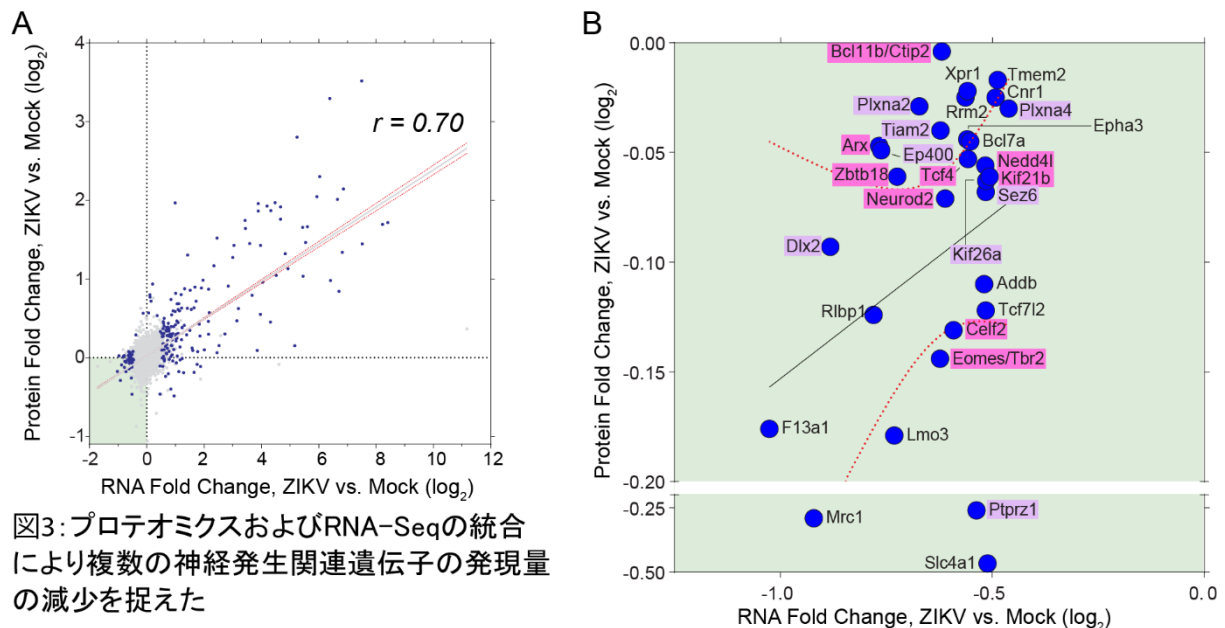


図3: プロテオミクスおよびRNA-Seqの統合により複数の神経発生関連遺伝子の発現量の減少を捉えた

(A) RNAとタンパク質の発現量は相関を示した。

(B) ジカウイルス感染によりRNAとタンパク質レベルで共通して発現量が減少したペアには、ヒトで神経発生異常の原因遺伝子として報告されたもの(ピンク)や、マウスで神経発生における機能が報告されたもの(紫)が含まれていた。

3. 考察

正常免疫をもつ先天性 ZIKV 感染症モデルマウスの胎仔脳で行ったプロテオミクスと RNA-Seq の定量解析の結果、先天性 ZIKV 感染症による小頭症発生の病態生理として以下が考えられた ; ZIKV 感染胎仔脳では JAK/STAT 経路の活性化を介して (1) 抗原提示プログラムが活性化し、ZIKV に感染した神経系前駆細胞のマクロファージによる貪食が誘導されたとともに、(2) 神経系前駆細胞の増殖を抑制する IFN 誘導性タンパク質の翻訳が促進された。両メカニズムが並行して生じた結果、神経系前駆細胞とそれらが産生する神経細胞の数が減少し、小さな脳が形成されと考えられた。この病態を反映して、本研究で認められたように複数の神経発生関連遺伝子/タンパク質の発現量が減少したと考えられた。

このように、先天性感染症モデルと systems biology による包括的アプローチを組み合わせることで、免疫応答により生じる神経発生異常のメカニズムについて新たな知見を得ることができた。

4. 成果の発表状況

本研究の成果を学術誌に投稿中であり、17th Annual Conference of US Human Proteome Organization にてポスター発表を行った。また、派遣先研究室で共著者として携わった研究成果を投稿準備中である。