

令和 元年 6 月 25 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 平成 29 年

受付番号 828

氏 名 佐々木 裕

(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： ジョンズホプキンス大学 （国名：米）
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。
先天性サイトメガロウイルス感染症による脳構造・機能異常の病態解明と治療戦略
3. 派遣期間：平成 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 年 3 月 31 日
4. 受入機関名及び部局名
Department of Psychiatry, Johns Hopkins University School of Medicine/Akira Sawa
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、英語で記入も可)**
(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。

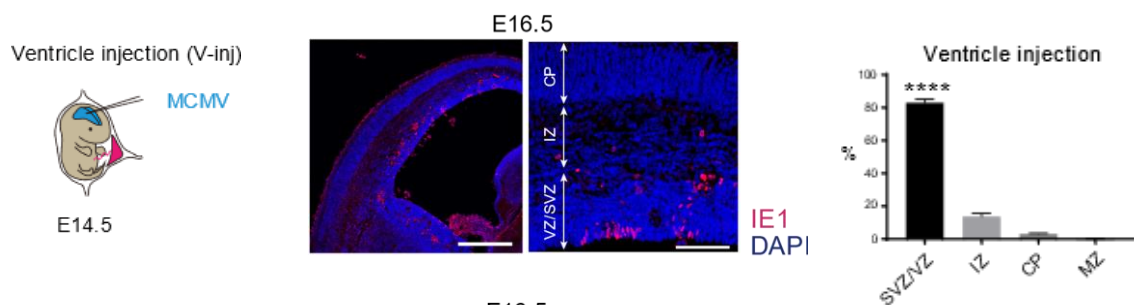
I. 派遣先における研究目的（申請書より転記）

- 目的 1.** サイトメガロウイルス（CMV）ゲノムから転写翻訳される IE1 の宿主細胞内での発現を起点とした神経幹細胞の増殖障害が、小頭症及び精神発達遅滞の病態生理に関与することを、マウス CMV 経胎盤感染モデルを用い、脳組織及び行動レベルの解析を行うことで明らかにする。
- 目的 2.** IE1 の発現を抑制することで、先天性 CMV 感染症への治療介入が可能であるか検証する。

II. 研究実施状況

はじめに CMV の頭蓋内感染モデルと経胎盤感染モデルの 2 種類のマウスモデルを用い、これらがヒトの先天性 CMV 感染の胎児の脳における感染様式を反映するか組織学的に解析した。マウス胎生 14.5 日にマウス CMV (MCMV) を胎仔の脳室内（頭蓋内感染モデル）、または胎盤（経胎盤感染モデル）に投与し（図 1）、脳内における感染の分布を調べた。CMV は細胞に感染すると直ちにウイルスゲノムから IE1 が転写・翻訳される。したがって、IE1 陽性細胞は急性の CMV 感染の指標となる。MCMV 投与 2 日後（胎生 16.5 日）における脳内の IE1 陽性細胞の分布を解析したところ、その分布は両モデルで同様の傾向を示した（図 1）。これまでにヒトの病理所見、培養細胞による感染実験より、CMV は大脳発生期における大脳皮質の神経前駆細胞（NPCs; neural progenitor cells）に選択的に感染することが示されている。2 つのマウスモデルを用いた本研究でも同様に、大脳皮質の NPCs が位置する脳室帯（VZ; ventricular zone）、脳室下帯（SVZ; subventricular zone）の細胞に選択的に MCMV が感染することが示された（図 1）。

a



b

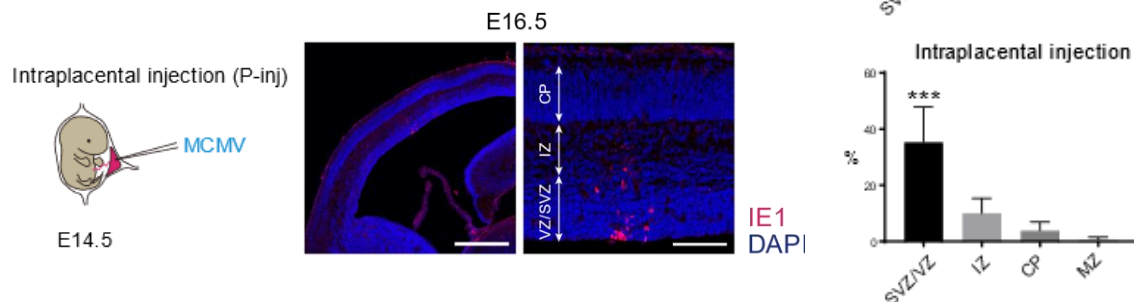
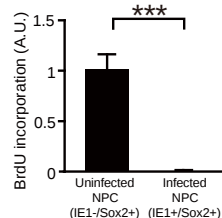
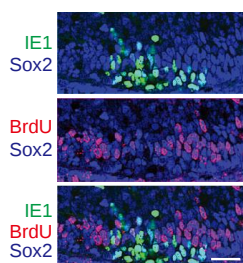


図1. a. 頭蓋内感染モデル。感染2日後（胎生16.5日）のマウス胎生期の脳におけるMCMV感染細胞（赤、IE1）の分布。グラフは大脳皮質における脳室下帯（SVZ）、脳室帯（VZ）、皮質板（CP）、辺縁帯（MZ）における感染細胞の分布の割合を示している。b. 経胎盤感染モデル。感染2日後（胎生16.5日）のマウス胎生期の脳におけるMCMV感染細胞（赤、IE1）の分布。グラフは大脳皮質における脳室下帯（SVZ）、脳室帯（VZ）、皮質板（CP）、辺縁帯（MZ）における感染細胞の分布の割合を示している。*** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$.

次に、CMV感染が発生期大脳皮質のNPCsの増殖能に障害をきたすか、ゲノムDNAに取り込まれるチミジンの類似体である5-ブロモデオキシウリジン（BrdU）をパルス投与し、分裂細胞であるNPCsを標識することによりその増殖能を調べた。胎生14.5日にMCMVを投与し、胎仔脳を取り出す2時間前（胎生16.5日）にBrdUをパルス投与した。脳切片を作製し抗BrdU抗体と抗IE1抗体を用い免疫染色を行い、感染細胞におけるBrdUの取り込みを解析した。MCMVに感染したNPCs（神経幹細胞マーカーSox2とIE1の二重陽性細胞；IE1⁺/Sox2⁺）では著明なBrdU取り込み低下を認めた（図2a）。これは細胞周期S期（DNA合成期）におけるデオキシヌクレオチドの取り込み低下を示し、CMV感染によるNPCsの細胞増殖の障害を示唆する。さらにCMVから産生されるIE1自体が単独で細胞増殖の障害を引き起こすか調べるため、胎仔脳への遺伝子導入法である子宮内胎仔脳電気穿孔法（*in utero electroporation*法）を用い、マウス発生期の脳（脳室帯）にIE1発現プラスミドを導入しIE1を強制発現させた。BrdUパルス標識により、同様にNPCsにおいてBrdUの取り込み低下を認めた。さらに、IE1の変異体を導入したところ、BrdU取り込み障害は認めなかった（図2b）。したがって、IE1が単独でNPCsの増殖障害を引き起こすことがわかった。

a



b

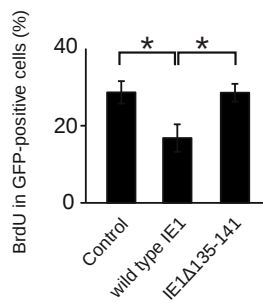


図2. a. 写真はBrdU（赤）によりパルス標識された神経前駆細胞（青）を示している。感染細胞（IE1⁺/Sox2⁺）ではBrdUの取り込みが著明に低下している。b. 胎生14.5日に*in utero electroporation*法で野生型IE1（wild type IE1）またはIE1の変異体（IE1Δ135-141）を発生期大脳皮質に強制発現させた。野生型IE1強制発現により神経前駆細胞のBrdUの取り込み低下を認めた。* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

先天性CMV感染症は知的障害（intellectual disability）や認知機能障害を引き起こすことが知られている。したがって、胎生期におけるCMV感染、特にウイルスタンパクのIE1が直接脳機能の障害に関与するかどうか、経胎盤感染モデルマウスを用いて行動解析を行った。胎生期にMCMVに感染したマウス（週齢1か月）に対し、自発的な活動性を評価するオープンフィールドテストと記憶・学習を評価する新奇物体認識テスト（NORT; novel object recognition test）を行った。オープンフ

ィールドテストによる自発活動量は3群間に有意な差は認めず、少なくともこれは感染による運動機能の障害がないことが考えられた(図3a)。NORTでは、MCMVに感染したマウス群ではコントロール群に比べ有意に物体認識に関する記憶が低下していた(図3b)。しかし、IE1遺伝子を欠損した変異型MCMV(MCMV Δ IE1)に感染したマウスでは、この記憶障害が軽減された(図3b)。この認知機能障害は同様に週齢3か月においても認めた(図3cとd)これはIE1自体が生後の認知機能障害に影響を与えていることを示唆する。

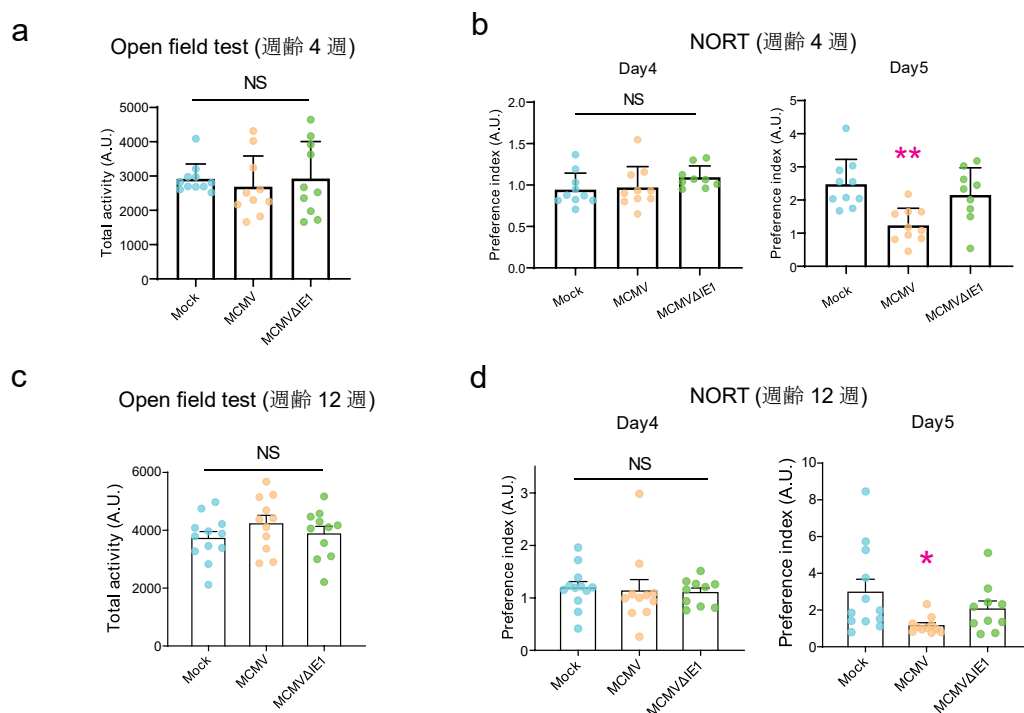


図3. a, c. 週齢4週及び12週におけるオープンフィールドテストによる自発活動性 (total activity)。b, d. 新奇物体認識テストのDay4 (トレーニング) では、全ての群において同様に2つの異なる物体を等しい割合で探索した。24時間後 (Day5) に片方の物体を新奇物体に取り換えたところ、MCMV感染マウスでは新規物体に対する探索行動の増加を認めなかった。一方、コントロール群 (Mock) とIE1遺伝子を持たないMCMV (MCMV Δ IE1) に感染したマウス群では新奇物体に対する探索行動の増加を認めた。One-way ANOVA, * p < 0.05, ** p < 0.01。

これらより、CMVが産生するIE1がNPCsの増殖障害を引き起こし(分子・細胞レベル)、胎生期の胎児の脳発達に影響を与えることにより(組織レベル)、脳の奇形及び知的障害を引き起こす(行動レベル)可能性が示唆された。したがって、IE1の産生を抑制することでこれらの障害を未然に防ぐことが出来る可能性がある。CMVは標的細胞に感染すると自身のウイルスゲノムを標的細胞に挿入する。細胞内に入ったウイルスゲノムから直ちにIE1が転写・翻訳される。したがって、宿主細胞内に存在するIE1遺伝子(CMVゲノム上に存在する)を効率よく抑制出来れば、NPCsの増殖障害をレスキュー出来る可能性がある。

ZFN、TALENに続く第三世代のゲノム編集技術であるCRISPR/Cas9システムは、その有効性、簡便さから、現在ヒトやマウスといった哺乳類だけでなく、多くの細胞腫や生物種において利用されている。そこでCRISPR/Cas9システムを用いて、CMV感染細胞内のIE1遺伝子をノックアウトすることで、NPCsの増殖障害がレスキューされるか培養細胞を用いた*in vitro*、及びマウスモデルを用いた*in vivo*で検討した。MCMV IE1遺伝子のエクソン4を標的としたCRISPR/Cas9ベクターを4種(Target#1~Target#4)作製しマウスの海馬由来のHT22細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション24時間後にMCMVを感染させ、翌日に細胞を回収した。ミスマッチ切断アッセイ(T7E1 assay; T7 Endonuclease I assay)を行い、IE1遺伝子上の変異の有無を調べた。更に、CRISPRによるIE1タンパクの抑制効果を免疫細胞化学的解析に調べた。T7E1アッセイにより、全てのターゲットにおいてIE1遺伝子上に変異が入っていることが確認できた(図4a)。さらに、IE1タンパクの発現量の減少も全てのターゲットにおいて認めた(図4b)。これらの結果より、CRISPR/Cas9システムにより感染細胞内に存在するMCMV IE1遺伝子に変異を起こし、そのタンパク産生を抑制することがわかった。

T7 endonuclease I assay

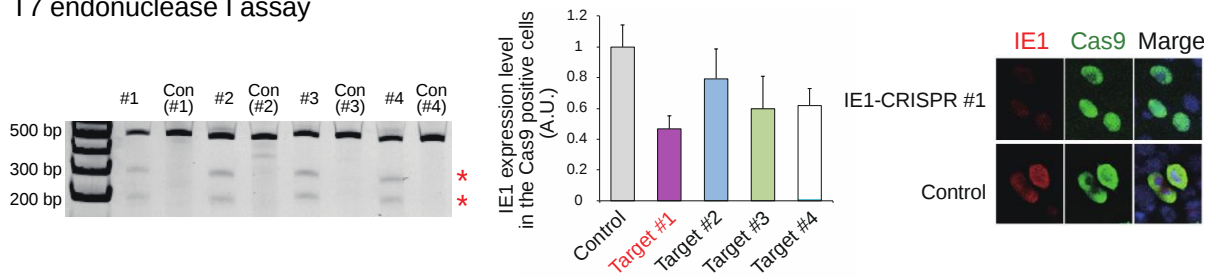


図4. a. T7E1アッセイで IE1 を標的とした4種類 (#1-#4) の CRISPR/Cas9 発現ベクターの変異導入効果を調べた。200bp と 300bp に位置するバンド (星印) は IE1 遺伝子が切断されていることを示し、これは IE1 に CRISPR による変異が入っていることを示す。b. グラフは CRISPR/Cas9 発現ベクターを導入した MCMV 感染細胞 (HT22 細胞) における IE1 タンパクの発現レベルを示している。IE1 を標的とした CRISPR/Cas9 (Target #1) が導入された感染細胞ではコントロール CRISPR が導入された感染細胞と比較して IE1 タンパクの発現が減少している (右の写真)。

次に、IE1 を標的とした CRISPR/Cas9 (IE1-CRISPR) が CMV 感染モデルマウスにおいて (*in vivo*) 効果を認めるか検討した。マウス胎生 14.5 日に胎仔の側脳室内に MCMV と IE1-CRISPR 発現ベクターを同時に注入し、*in utero* electroporation 法により IE1-CRISPR 発現ベクターを胎仔大脳皮質に導入した。感染及び遺伝子導入から 2 日後 (胎生 16.5 日) に胎仔の脳を取り出し免疫組織化学的解析を行った。IE1-CRISPR は VZ と SVZ 領域に効率よく発現していた (青)。IE1-CRISPR が発現した細胞では、コントロールベクター (scramble gRNA-CRISPR) が導入された細胞に比べ、有意に IE1 タンパク量が減少していた (図5)。これらより、MCMV IE1 を標的とした CRISPR/Cas9 システムは *in vivo* においても有効であることが確認された。

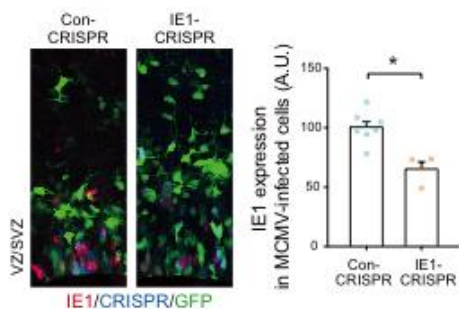


図5. 胎生 14.5 日に IE1-CRISPR 発現ベクターと MCMV を胎仔側脳室に投与し、パルス電流により CRISPR 発現ベクターを胎仔の VZ に位置する細胞に導入した。左の写真は胎生 16.5 日の大脳皮質の免疫染色像。IE1-CRISPR が VZ/SVZ に発現している (青)。GFP (緑) は electroporation された細胞を示している。グラフは IE1-CRISPR が導入された MCMV 感染細胞における IE1 タンパクの発現量を示している。IE1-CRISPR を導入した MCMV 感染細胞では有意に IE1 タンパクの発現が減少している。* $p < 0.05$ 。

III. 目標の達成度

以上より、MCMV ゲノムから転写・翻訳される IE1 が神経前駆細胞の増殖障害を引き起こすことがマウスモデルを用いた *in vivo* 解析で示された。更に、IE1 を欠損する MCMV に感染したマウスでは学習・記憶行動障害が軽減されることから、IE1 自体が先天性 CMV 感染により引き起こされる知的障害の病態生理に関与していることが考えられた (目的1)。現在、感染脳を用い、脳病理と行動障害との関連を解析中である (目的1)。更に、IE1 を標的にした CRISPR/Cas9 が *in vitro* 及び *in vivo* において IE1 タンパクの発現を抑えるのに有効であることを示した。更に、CRISPR/Cas9 によりウイルスゲノム上の IE1 をノックアウトすることにより CMV に感染した神経前駆細胞の分裂障害を改善させることがわかった。従って、これは CMV IE1 の発現を抑制することで、先天性 CMV 感染症への治療介入が可能であることを示唆しており (目的2)、現在、CRISPR による IE1 産生の抑制が行動障害に対しレスキュー効果を認めるか解析中である。従って、派遣期間に当初の目的1と2を達成した。

4. 成果の発表関係学会への参加状況等

これらの成果を北米神経科学会 (SfN; Society for Neuroscience) の年会である Neuroscience 2017 (ワシントン DC) で口頭発表を行った。更に、本演題は学会の Hot Topic に選出され、Hot Topics book プリント版がメディアに配布された。