

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：82609

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2012～2016

課題番号：24115006

研究課題名(和文) ウイルスの標的組織決定における攻防

研究課題名(英文) Competition between the host and virus in the target tissues

研究代表者

小池 智 (KOIKE, Satoshi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・参事研究員

研究者番号：30195630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 45,600,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルスはそれぞれの標的組織に好んで感染するが、標的組織はウイルス受容体などの感染を促進する因子群と自然免疫系などのウイルスを排除しようとする因子群とウイルスがいかに折り合うかという攻防によって決定される。本研究では、インターフェロンラムダがポリオウイルスの消化管における感染防御における重要であることを明らかにした。また、Scavenger receptor B2 (SCARB2)やヘパラン硫酸プロテオグリカン(HS-PG)はEV71受容体として知られているが、SCARB2はEV71の種特異性を決定していることを示した。一方HS-PGは個体内でのウイルス病原性発現を負に制御していることを示した。

研究成果の概要(英文)：Viruses infect preferentially in their target tissues. The target tissues are determined by competition between the viruses and the host factors. Host factors that support virus replication such as viral receptors and those that inhibit virus replication such as interferon (IFN) system are considered to be most important factors. Using poliovirus receptor transgenic mice and IFN-lambda receptor knockout mice, we have shown that IFN-lambda plays an important role in protection of poliovirus infection in the alimentary tract. Scavenger receptor B2 (SCARB2) and heparan sulfate-proteoglycan (HS-PG) are known as receptors for enterovirus 71 (EV71). We have shown that SCARB2 determines the host range specificity of EV71 by producing SCARB2 transgenic mice. On the other hand, HS-PG reduced the viral replication and pathogenicity in SCARB2tg mice.

研究分野：ウイルス学

キーワード：感染症 ウイルス受容体 自然免疫 感染症モデル動物

1. 研究開始当初の背景

ポリオウイルス(PV)やエンテロウイルス71 (EV71) は消化管粘膜で増殖し糞口感染により個体間伝播するが、殆どの場合には不顕性感染である。しかし低い頻度で、消化管で増殖した後にウイルス血症を起こし他の組織へと伝播する。最悪の場合、中枢神経系に到達し、激しい病変を生ずる。つまりこれらのウイルスは全身感染を起こしながらも神経系を標的組織とするウイルスである。このような神経親和性のメカニズムは明らかではないが、ウイルス受容体のようなウイルス感染を正に制御する因子とインターフェロン (IFN) 応答のような感染を負に制御する因子とのせめぎあいでウイルスに曝された組織が標的となるか否かや病原性の強弱が決定されていると考えられる。このような背景の中でこれらの因子による感染コンピテンシーという概念において、宿主の標的組織の決定機構について調べる必要があると考えた。

2. 研究の目的

PV と EV71 を研究対象として取り上げ、それぞれのウイルスの受容体である poliovirus receptor (PVR) や Scavenger receptor B2 (SCARB2) の発現あるいは IFN 応答などによってどのようにウイルス組織特異性や病原性の強さなどが、制御されているかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

PV や EV71 は本来ヒトを宿主とするウイルスであるため、ウイルス受容体や IFN 応答を変化させた個体レベル実験は不可能である。そこで感染動物モデルとして PVR を発現する PVR-tg マウス、SCARB2 を発現する SCARB2-tg マウスを用い、さらに IFN 系のノックアウトマウスを用いて、これらを人工的にコントロールすることが可能となる。このようなモデル系を用いて、ウイルス感受性、標的組織の決定、病原性の強弱について研究を行った。

4. 研究成果

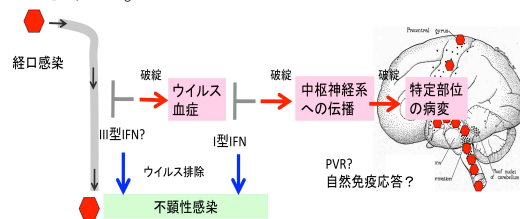
(1) PV の経口感染における IFN-λ の役割

IFN-λ は粘膜上皮で IFN-λ receptor を発現し、IFN-α/β とは別に特に粘膜感染においてウイルス感染防御に寄与していることが明らかになりつつある。PVR-tg マウスに IFN-α/β receptor 1 (AR1) 並びに IFN-λ receptor 1 (LR1) KO マウスを交配し、PVR-tg の背景で WT, AR1 KO, LR1 KO, DKO の変異を持つマウスを作製した。これらのマウスに PV

を胃内に投与し消化管からの感染を調べた。WT, LR1 KO マウスは感染効率が低かったが、AR1 KO マウスでは感染効率が上昇し、DKO マウスではさらに効率が上昇した。WT, AR1, LR1 KO では糞便中や小腸でウイルスタイトルは低かったが、DKO マウスにおいてはウイルス力価が増大した。さらに、パイエル板にウイルス抗原が検出された。

ウイルス抗原が検出された細胞はマクロファージマーカーである iba1 陽性細胞であり、この細胞が腸管の感染部位として重要であると考えられる。この細胞は IFN-stimulated gene (ISG) の一つである Mx を高レベルで発現していた。AR1, LR1 マウスにおいて Mx の発現レベルはわずかに低下し、DKO マウスにおいては非常に低くなっていた。これらのことから PVR-tg マウスモデルの小腸における感染においてパイエル板のマクロファージでは、IFN-α/β と IFN-λ の両方が感染防御に重要な役割を果たしており、消化管でのバリアとなっていることがあきらかになった。

一方 PVR-tg マウスは経鼻感染経路によって感染させた場合は LR1 KO 単独によっても感染効率は上昇した。WT マウスにおいてはウイルス抗原の検出頻度は低いながら LR1 KO マウスにおいては鼻呼吸部の単純上皮細胞や円柱上皮細胞において高頻度で検出された。このことから呼吸部の上皮細胞において IFN-λ が単独でバリアとして働いていると考えられた。

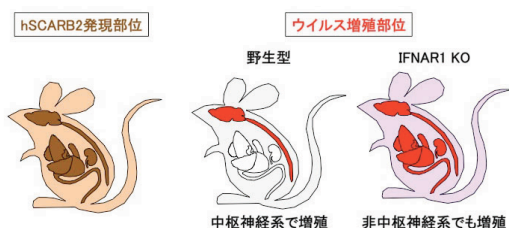


(2) SCARB2-tg マウスの解析

我々はそれまでに EV71 の感染受容体としてヒト SCARB2 を同定した。SCARB2 はウイルスとの結合、細胞内侵入、脱殻の開始反応を行うことができる受容体である。この遺伝子をマウスに導入したところ SCARB2-tg マウスはウイルス感受性を獲得し、感染したマウスの中枢神経系でウイルスの増殖が認められた。ウイルス抗原は脳幹、脊髄、中脳、小脳核などの神経細胞で認められ、EV71 感染により死亡したヒトと類似のトロピズムが認められた。これにより、SCARB2 は個体レベルにおいても感染の種特異性を制御していることが判明した。

SCARB2 は神経細胞で発現レベルが高いが、それ以外にも肝臓、肺、脾臓、腎臓、小腸などに高レベルの発現が見られる。しかし、ウイルスの増殖は神経細胞に限定される。ウイルス受容体によってウイルスゲノムの細胞質への放出までが可能であるのに感染が成立しない理由として、IFN 応答の影響を調べ

た。AR1 KO した SCARB2-tg マウスにウイルスを感染させるとウイルスの増殖は上記 SCARB2 発現臓器で増大した。これにより、ウイルスの神経系以外での増殖の阻害に I 型 IFN 応答が重要な働きをしていることが明らかになった。



(3) attachment receptor の EV71 増殖と病原性に関する役割の解析

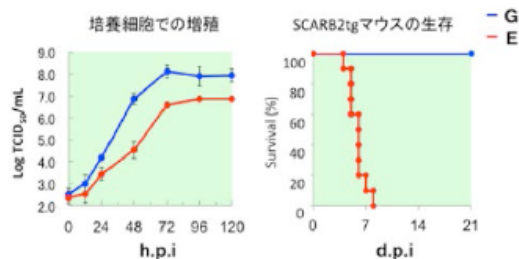
SCARB2tg マウスはヒトと類似のトロピズムを示し、さらにウイルス株によって毒力が異なることを再現できた。したがってこのモデルにより、ウイルスの毒力の制御についても研究することが可能である。我々が SCARB2 を感染受容体として同定した時に、他のグループから heparan sulfate proteoglycan (HS-PG), P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1), Annexin II, vimentin, nucleorin など多数の分子が EV71 と結合する分子として同定された。これらの分子は SCARB2 と異なり、ウイルスとの結合には関わらないことから attachment receptor と呼ばれている。Attachment receptor は細胞への吸着能力を上昇させるため、感染効率を上昇させると考えられる。EV71 でヒトから分離される株の大多数は HS-PG とは結合できないが、RD 細胞などの培養細胞中で培養すると結合可能に変異した株が速やかに生じる。

EV71 粒子において 5 回対称軸付近にはプラス電荷をもつアミノ酸が集中している。そのため株によってはマイナス電荷をもつ HS-PG や PSGL-1 と結合できる株が存在する。カプシドタンパク VP1 の 145 番目のアミノ酸が Glu (E) である場合にはこの電荷を打ち消すので、粒子全体としてはマイナス電荷を多くもつ HS-PG には結合しなくなる。他方 Gly (G) や Gln (Q) の場合には HS-PG と結合する。VP1-145E のウイルスと VP1-145G のウイルスの RD 細胞での増殖効率は VP1-145G のウイルスの方が有利であったが、SCARB2tg マウスにおける毒力を測定すると、VP1-145E のウイルスの方が圧倒的に病原性が高かった。

この理由について解析を行った。VP1-145G ウイルスは SCARB2tg マウスもしくは nontg マウスに静脈内接種を行うと、速やかに血中のタイターが減少する。これは HS-PG に結合するためであると考えられた。しかし、HS-PG はウイルスの増殖を許容されていない SCARB2 発現のない細胞や細胞外マトリ

クスにも多く発現されているため、個体内での attachment receptor の利用は反って標的細胞への到達を困難にしていると考えられた。

ウイルスは絶えず変異を蓄積し、自らの増殖コンピテンシーを上昇するように変異し続けているが、動物個体内と培養細胞内では異なった選択圧が働いているため、単に細胞への吸着を上昇させる attachment receptor への順化は必ずしもウイルスにとって有利ではないことが判明した。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

1. 小池智: エンテロウイルス 71 研究の進展 *医学のあゆみ* 258:1149-1154, 2016 (査読無)
2. 小池智: ポリオウイルスの神経指向性のメカニズム *Annual Review 2015神経* (中外医学社) 121-126, 2015 (査読無)
3. 小池智: ポリオウイルスの神経指向性のメカニズム *NEUROINFECTION*, 19(1):7-12, 2014 (査読無)
4. Yamayoshi S, Fujii K, Koike S Receptors for enterovirus 71 *Emerg. Microbes Infect.* 3: e53 2014. doi : 10.1038/em.2014.49 (査読有)
5. Koike S: A pH-dependent molecular switch for virion uncoating. *Protein Cell*, 5(9): 653-654, 2014. doi : 10.1007/s13238-014-0094-4 (査読無)
6. Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Sato Y, Nakajima N, Koike S, Iwasaki T, Sata T, Yamashita T, Minagawa H, Taguchi F, Hasegawa H, Shimizu H, Nagata N Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infectious. *Neuropathology* 35:107-121, 2014. doi : 10.1111/nep.12171 (査読有)
7. Fujii K, Nagata N, Sato Y, Ong KC, Wong

- KT, Yamayoshi S, Shimanuki M, Shitara, H, Taya C, Koike S, Transgenic mouse model for the study of enterovirus 71 neuropathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 110: 14753-14758, 2013. doi : 10.1073/pnas.1217563110 (査読有)
8. Ng CS, Jogi M, Onomoto K, Koike S, Iwasaki T, Yoneyama M, Kato H, Fujita T Encephalomyocarditis virus disrupts stress granules, the critical platform for triggering antiviral innate immune responses *J. Virol.* 87:9511-9522, 2013. doi : 10.1128/JVI.03248-12 (査読有)
 9. Yamayoshi S, Ohka S, Fujii K, Koike S Functional Comparison of SCARB2 and PSGL1 as receptors for enterovirus 71. *J. Virol.* 87:3335-3347, 2013. doi : 10.1128/JVI02070-12 (査読有)
 10. 小池智:ポリオウイルス感染とウイルスセンサー *臨床とウイルス*, 41: 222-228, 2013 (査読無)
 11. Yamayoshi S, Iizuka S, Yamashita T, Minagawa H, Mizuta K, Okamoto M, Nishimura H, Sanjoh S, Katsushima N, Itagaki T, Nagai Y, Fujii K, Koike S : Human SCARB2-dependent Infection by Cocksackievirus A7, A14, A16 and Enterovirus 71. *J. Virol.* 86:5686-5696, 2012. doi : 10.1128/JVI00020-12 (査読有)
 12. Yamayoshi S, Fujii K, Koike S : Scavenger receptor B2 as a receptor for hand, foot and mouth disease and severe neurological diseases. *Frontiers in Virology*, Vol 3. Article 32, 2012. doi : 10.3389/fmicb.2012.00032. (査読有)
 13. 小池智 : エンテロウイルス 71 の受容体としての Scavenger receptor B2 *The Lipid*, 23: 384-389, 2012 (査読無)
- [学会発表] (計 27 件)
1. Fujii K, Sudaka Y, Kataoka C, Suzuki T, Iwata-Yoshikawa N, Kotani O, Amin Y, Shimizu H, Nagata N, Koike S. The VP1 amino acid residue 145 of EV71 is a virulence determinant in a cynomolgous monkey model. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 札幌コンベンションセンター(2016.10.22 札幌市、北海道)
 2. Takashino A, Sudaka Y, Imura A, Fujii K, Kobayashi K, Nishimura H, Mizuta K, Koike S. Variation in virulence of clinical isolates of enterovirus 71. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 札幌コンベンションセンター(2016.10.22 札幌市、北海道)
 3. Sudaka Y, Imura A, Takashino A, Fujii K, Koike S. Changes in EV71 virulence by substitution of amino acid 145 of capsid protein VP1 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 札幌コンベンションセンター (2016.10.22 札幌市、北海道)
 4. Imura A, Sudaka Y, Takashino A. Fujii K, Kobayashi K, Koike S. Application of SCARB2tg mice to an efficacy test of EV71 vaccine. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 札幌コンベンションセンター(2016.10.22 札幌市、北海道)
 5. Fujii K, Sudaka Y, Imura A, Takashino A, Kataoka C, Suzuki T, Iwata-Yoshikawa N, Kotani O, Ami Y, Shimizu H, Nagata N, Koike S. The VP1 amino acid residue 145 of EV71 is a virulence determinant in SCARB2-dependent infection. *The XVIII th Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses (EUROPIC 2016)* (2016.9.8 Les Diablerets, Switzerland)
 6. Koike S. Neurovirulence of enterovirus 71 assessed by transgenic mouse model expressing human scavenger receptor B2. *Hand, Foot and Mouth Disease International Conference 2016 (HFMDIC2016)* (2016.7.25. Biopolis, Singapore)
 7. Fujii K and Koike S. Analysis of viral RNA sensors for control of EV71 infection. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会 福岡国際会議場 (2015.11.22 福岡市、福岡県)
 8. Ohka S, Matsuura E, Ogasawara K, Hanasaka T, Ishida K, Fujii K, Chong P, Hanaki K and Koike S. Analysis of uncoating mechanism for Enterovirus 71. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会 福岡国際会議場 (2015.11.22 福岡市、福岡県)
 9. Koike S. Development of a new animal model for enterovirus 71 infection. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会 福岡国際会議場 (2015.11.22 福岡市、福岡県)

10. Sudaka S, Imura A, Takashino A, Fujii K, Koike S. Glu at VP1 145 of EV 71 is a virulence determinant in SCARB2 transgenic mice. **第 63 回日本ウイルス学会学術集会 福岡国際会議場** (2015.11.22 福岡市, 福岡県)
11. Takashino A, Mizuta K, Koike S. Human chromosome 16 confers Coxsackievirus A2 susceptibility to mouse cells. **第 63 回日本ウイルス学会学術集会 福岡国際会議場** (2015.11.22 福岡市, 福岡県)
12. Fujii K and Koike S The role of Type I Interferon system for control of EV71 Infection. ***The 14th Awaji International Forum of Infection and Immunity*** 淡路夢舞台国際会議場 (2015.9.11 淡路市、兵庫県)
13. Koike S. Establishment of a new animal model for Enterovirus 71 infection. ***Scientific Workshop to Explore e-ASISA Research Collaboration Opportunities Focused on Emerging Infectious Disease and Cancer Priorities in South East Asia and the Pacific Rim.*** (2015.8.13 Yangon, Myanmar)
14. 藤井健、小池智 EV71 の非神経組織での増殖は I 型インターフェロンにより抑制されている **第 62 回日本ウイルス学会学術集会 パシフィコ横浜** (2014.11.10 横浜市、神奈川県)
15. 小池智、藤井健、Tanel Mahlakoiiv, Peter Staeheli, 永田典代 Role of type III interferon in intranasal infection of poliovirus in PVR transgenic mice. **第 62 回日本ウイルス学会学術集会 パシフィコ横浜** (2014.11.10 横浜市、神奈川県)
16. 大岡静衣、松浦絵里、小笠原勝利、石田欣二、藤井健、萩原恭二、花木賢一、Pele Choi-Sing Chong, 小池智 エンテロウイルス 71 の感染初期過程解析 **第 62 回日本ウイルス学会学術集会 パシフィコ横浜** (2014.11.10 横浜市、神奈川県)
17. 小池智:エンテロウイルス 71 受容体による種特異的、組織特異的感染の制御機構 **第 87 回日本生化学会大会 国立京都国際会館** (2014.10.16 京都市、京都府)
18. Koike S : Enterovirus 71 –an emerging enterovirus–. ***The XVIII th Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses (EUROPIC 2014)*** (2014.3.13 Blankenberge, Belgium)
19. Ohka S, Tan SH, Fujii K, Kaneda S, Nakamura H, Fujii T, Ong KC, Wong KT, Koike S: hSCARB2-dependent neural pathway for EV71 transmission. ***The XVIII th Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses (EUROPIC 2014)*** (2014.3.13 Blankenberge, Belgium)
20. 小池智 エンテロウイルス 71 受容体の解析 **第 61 回日本ウイルス学会学術集会 神戸国際会議場** (2013.11.10 神戸市、兵庫県)
21. 小池智 エンテロウイルス 71 受容体の解析 **第 18 回日本神経感染症学会学術集会 シーガイヤコンベンションセンター** (2013.10.11. 宮崎市、宮崎県)
22. Ohka S, Fujii K, Kaneda S, Nakamura H, Fujii T, Koike S : Analysis of Enterovirus infection in motor neuron using microfluidic culture platform. ***The XIIth Awaji International Forum on Infection and Immunity*** 淡路夢舞台国際会議場 (2013.9.12 淡路市、兵庫県)
23. Fujii K, Koike S : A SCARB2-transgenic mouse model for the study of enterovirus 71 pathogenesis. ***The XIIth Awaji International Forum on Infection and Immunity*** 淡路夢舞台国際会議場 (2013.9.11 淡路市、兵庫県)
24. Koike S: Scavenger receptor B2-transgenic mouse model for EV71 infection. ***Singapore International Conference on Dengue and Emerging Infection*** (2012.11.21 Singapore)
25. 山吉誠也、大岡静衣、藤井健、小池智 2 つのエンテロウイルス 71 受容体 SCARB2 と PSGL1 の機能比較 **第 60 回日本ウイルス学会学術集会 グランキューブ大阪** (2012.11.14 大阪市、大阪府)
26. 藤井健、永田典代、山吉誠也、島貫碧、設楽浩志、多屋長治、小池智 EV71 感受性マウスモデルの作出と解析 **第 60 回日本ウイルス学会学術集会 グランキューブ大阪** (2012.11.14 大阪市、大阪府)
27. Koike S, Yamayoshi S, Fujii K: Scavenger receptor B2 is a receptor for Enterovirus 71. ***The XIth Awaji International Forum on***

Infection and Immunity 淡路夢舞台国際会議場 (2012.9.11 淡路市、兵庫県)

[図書] (計 2 件)

1. Koike S, Nagata N. *Poliovirus Methods and Protocol* Chapter 7 Transgenic Mouse Model of poliomyelitis pp129-144 Humana Press 2016
2. ウイルス—ミクロの賢い寄生体— 第2章 世界中ウイルスだらけ (pp25-39), 第9章 ウイルスの過去、現在、未来 (pp191-210) Drothy H Crawford 著 永田恭介監訳 丸善出版 2014

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：強毒性エンテロウイルス 71 の安定的生産およびその応用
発明者：小池智、小林郷介、巢鷹佑衣、猪村亜弓
権利者：公益財団法人東京都医学総合研究所
種類：特許
番号：特願 2017-072562
出願年月日：2017 年 3 月 3 1 日
国内外の別： 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
公益財団法人東京都医学総合研究所・ウイルス感染プロジェクトホームページ
<http://www.igakuken.or.jp/project/detail/neurovirology.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池智 (KOIKE, Satoshi)
公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・参事研究員
研究者番号：30195630

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

藤井健 (FUJII, Ken)
公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主席研究員
研究者番号：10580201

(4) 研究協力者

小林郷介 (KOBAYASHI, Kyosuke)
公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主任研究員

永田典代 (NAGATA, Noriyo)
国立感染症研究所・感染病理部・室長

STAEHELI, Peter
University of Freiburg, University Medical Center Freiburg, Institute of Virology, Department of Medical Virology and Hygiene, (Germany)
Professor

Wong, Kum Thong,
Malaya University, Department of Pathology, (Malaysia)
Professor