

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08512

研究課題名(和文) 手足口病ウイルスを標的とする細胞侵入阻害剤の分子認識機構の解明

研究課題名(英文) Studies on the molecular mechanism of cell-entry inhibitors for hand-foot-and-mouth disease virus.

研究代表者

西村 順裕 (Nishimura, Yorihiro)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・主任研究官

研究者番号：00392316

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：手足口病の病原体のひとつであるエンテロウイルス71型(EV71)は、稀に髄膜炎・脳炎・脳症を起こす。しかし、治療法は確立されていない。治療法開発への基礎研究として、EV71感染を阻害する化合物であるNF449に着目し、NF449がどのようにして感染を阻害しているのかを分子レベルで解明した。NF449はEV71ウイルス粒子の表面と相互作用し、ウイルスと細胞表面受容体との結合を阻害することによって感染性を低下させることを明らかにした。今後、NF449の分子構造を改変することにより、より強力な感染阻害薬を開発可能と期待される。

研究成果の概要(英文)：Enterovirus 71 (EV71) is one of the pathogens of hand, foot, and mouth disease and various neurological symptoms including fatal encephalitis in young children. There are no specific therapies available. In this study, I focused on the anti-EV71 compound, NF449. I clarified how NF449 inhibits EV71 replication in vitro. I found that NF449 interacts with the EV71 capsid and prevents virus attachment to the receptor molecules on the cell surface. This work provides information that may facilitate development of improved antiviral compounds that block the attachment of EV71 to cellular receptors.

研究分野：ウイルス学

キーワード：手足口病 エンテロウイルス71 受容体 PSGL-1 ヘパラン硫酸 感染阻害剤

1. 研究開始当初の背景

手足口病は四肢末端・口腔粘膜の水疱性発疹を主症状とし、幼児に流行する。主要な病原体はエンテロウイルス 71 (EV71)、コクサッキーウイルス A16 型 (ともにピコルナウイルス科・エンテロウイルス属、エンベロープなし) である。一般に症状は軽いが、EV71 感染では髄膜炎・脳炎・脳症を起こし死に至ることがある。EV71 感染による手足口病は近年東南アジア、中国で大流行を繰り返しており、年に数百名が死亡することもある。国内でも EV71 の流行・重症例が報告されているが、EV71 の抗ウイルス薬は未だ開発されていない。

EV71 の感染、複製を阻害する化合物はいくつか報告されている。有田らは化合物ライブラリーを「横紋筋腫 Rhabdomyosarcoma (RD) 細胞への EV71 感染の阻害能」を指標にスクリーニングし、EV71 感染を特異的に阻害する化合物 NF449 を同定した (Arita et al., J. Gen. Virol. 2008 図 1)。NF449 はスラミン誘導体であり、8 個の硫酸基をもちマイナス電荷に富む分子である。NF449 に耐性をもつ変異ウイルスはキャプシド蛋白質に変異をもつことから、NF449 はキャプシドを標的とした感染阻害剤と予想されたが、その分子認識機構の詳細は不明であった。

我々が同定した EV71 受容体 P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) は Jurkat 細胞などリンパ球系細胞がもつ受容体である (Nishimura et al., Nat. Med. 2009)。PSGL-1 のアミノ末端領域にあるチロシンの硫酸化が EV71 との相互作用に必須であることから (Nishimura et al., PLoS Pathog. 2010)、これらの相互作用にはマイナス電荷とプラス電荷による電気的な引力が重要と考えられている。一方、Scavenger receptor class B, member 2 (SCARB2; Yamayoshi et al., Nat. Med. 2009)、ヘパリン硫酸 (Tan et al., J. Virol. 2013) は RD 細胞の受容体と考えられている。

2. 研究の目的

抗ウイルス薬は、(a) 細胞外でウイルス粒子に作用するものと、(b) 細胞内でウイルス複製過程に作用するものに大別される。本研究では、上記背景と我々の EV71 受容体に関する研究成果を踏まえ、(a) のウイルスと受容体の結合を阻害する化合物、つまり EV71 と受容体の結合を阻害する可能性のある化合物 NF449 に焦点を絞り、その結合様式を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PSGL-1 結合株として、EV71-1095/Shiga 株を用いた。PSGL-1 非結合株として、EV71-02363 株を用いた。EV71 を RD 細胞に感染させ、細胞内で複製した EV71 をフローサイトメトリーで検出した。

(2) EV71 と細胞、可溶性受容体蛋白質あるい

はヘパリンとの結合性の解析には ^{35}S でラベルしたウイルスを用いた。可溶性 PSGL-1-Fc 蛋白質、可溶性 SCARB2-Fc 蛋白質は R&D Systems 社より購入した。ヘパリンアガロースビーズは Sigma 社より購入し、ネガティブコントロールとしてマンナンアガロースビーズを用いた。

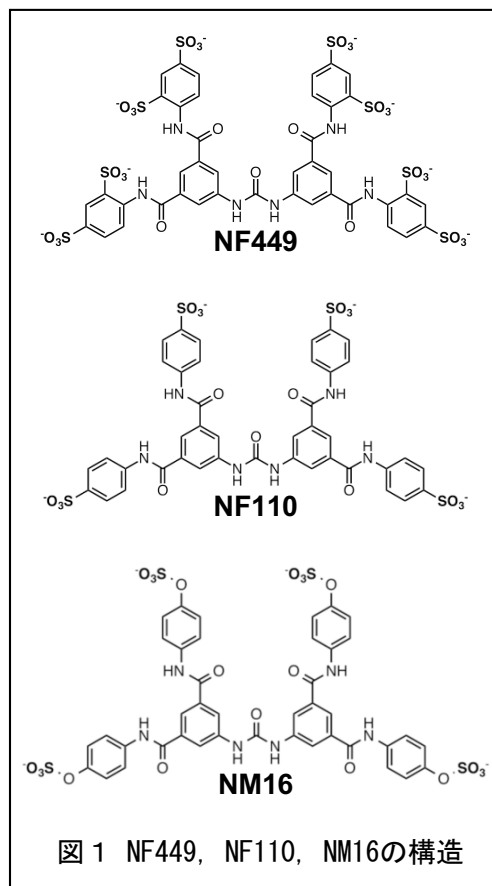
(3) スラミン、NF449、NF110 等は Tocris 社より購入した。

4. 研究成果

(1) EV71-1095/Shiga の RD 細胞への感染は、NF449 で濃度依存的に阻害された。EV71-1095/Shiga の RD 細胞への結合も NF449 で濃度依存的に阻害された。NF449 はコクサッキーウイルス B3 と RD 細胞との結合を阻害しなかったことから、NF449 は EV71 に特異的な阻害剤と考えられた。

(2) NF449 と類似した構造をもつ化合物が阻害効果をもつかどうかを検討した。スラミン、NF023、NF110、NF157、NF279、NF340 等を用いて、EV71-1095/Shiga と RD 細胞との結合阻害効果を解析したところ、NF110 のみが NF449 と同等以上の阻害効果を示した。次に NF110 を用いて RD 細胞への感染阻害能を検討したところ、予想通り感染性も強力に阻害した。

(3) より強力な阻害剤を検索するために、NF110 をベースとして構造を改変した化合物 15 種類を合成し、阻害効果を検討した。NF110



の構造をわずかに変えるだけで阻害効果が大きく変化し、その中でも NM16 と名付けた化合物は NF110 よりも低濃度で EV71-1095/Shiga と RD 細胞との結合を阻害した。

(4) NF449, NF110, NM16 を用いて、EV71-1095/Shiga の Jurkat 細胞への感染性の阻害を検討した。NF110 が最も低濃度で EV71-1095/Shiga 感染を阻害した。次に EV71-1095/Shiga と Jurkat 細胞との結合阻害を検討した。この場合、NF449, NF110, NM16 とも、同程度の阻害効果を示した。

(4) EV71 は PSGL-1 結合性に基づき、PSGL-1 結合株、非結合株に分類される。上記の実験は PSGL-1 結合株を用いて行ってきた。次に PSGL-1 非結合株 (EV71-02363) を用い、NF449, NF110, NM16 の阻害効果を検討した。RD 細胞への感染性の阻害効果、結合性の阻害効果とも、NF449 が最も高かった。NF110 も NM16 も阻害効果を示したことから、これらの EV71 阻害効果は、PSGL-1 非結合株にも有効であると考えられた。

(5) EV71 と可溶性 EV71 受容体との相互作用を NF449, NF110 が阻害するかどうかを検討した。EV71 と PSGL-1 との相互作用、および、EV71 とヘパリンとの相互作用は、NF449, NF110 によって濃度依存的に阻害された。一方、EV71 と SCARB2 との相互作用は阻害されなかった。したがって、NF449, NF110 は EV71 キャプシド上の PSGL-1 あるいはヘパリンの結合部位に相互作用し、受容体との結合を阻害すると考えられた。EV71 上の SCARB2 相互作用部位は、PSGL-1, ヘパリン硫酸の相互作用部位と異なると考えられており、これを裏付ける結果となった。

(6) キャプシドに対するモノクローナル抗体と EV71 との結合を NF449 が阻害するかどうかを検討した。EV71 の 5 回転軸近辺に結合することが明らかとなっているモノクローナル抗体 MA28-7 と EV71 との結合は、NF449 で濃度依存的に阻害された。しかし、キャプシド蛋白質 VP2 に対するモノクローナル抗体 10F0 と EV71 との結合は全く阻害されなかった。したがって、NF449 は EV71 の 5 回転軸近辺に特異的に相互作用することが示唆された。

(総括)

NF449 をはじめとするスラミン誘導体化合物の EV71 感染阻害メカニズムは、EV71 上の受容体結合領域に特異的に相互作用し、受容体である PSGL-1, ヘパリン硫酸との相互作用を阻害することとと考えられた。

本研究成果をもとに、NF449, NF110, NM16 をリード化合物としたより強力な抗 EV71 化合物のデザイン、開発が可能になると期待される。

<引用文献>

- ① Arita M, Wakita T, Shimizu H. Characterization of pharmacologically active compounds that inhibit poliovirus and enterovirus 71 infectivity. *J Gen Virol.* 2008 89(Pt 10):2518-30. doi: 10.1099/vir.0.2008/002915-0.
- ② Nishimura Y, Shimojima M, Tano Y, Miyamura T, Wakita T, Shimizu H. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. *Nat Med.* 2009 15(7):794-7. doi: 10.1038/nm.1961.
- ③ Yamayoshi S, Yamashita Y, Li J, Hanagata N, Minowa T, Takemura T, Koike S. Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. *Nat Med.* 2009 15(7):798-801. doi: 10.1038/nm.1992.
- ④ Tan CW, Poh CL, Sam IC, Chan YF. Enterovirus 71 uses cell surface heparan sulfate glycosaminoglycan as an attachment receptor. *J Virol.* 2013 87(1):611-20. doi: 10.1128/JVI.02226-12.
- ⑤ Nishimura Y, Wakita T, Shimizu H. Tyrosine sulfation of the amino terminus of PSGL-1 is critical for enterovirus 71 infection. *PLoS Pathog.* 2010 6(11):e1001174. doi: 10.1371/journal.ppat.1001174.

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 3 件)

- ① Nishimura Y, McLaughlin NP, Pan J, Goldstein S, Hafenstein S, Shimizu H, Winkler JD, Bergelson JM. The Suramin Derivative NF449 Interacts with the 5-fold Vertex of the Enterovirus A71 Capsid to Prevent Virus Attachment to PSGL-1 and Heparan Sulfate. *PLoS Pathog.* 2015 11(10):e1005184. doi: 10.1371/journal.ppat.1005184. 査読有
- ② Kataoka C, Suzuki T, Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Nagata N, Ami Y, Wakita T, Nishimura Y, Shimizu H. The Role of VP1 Amino Acid Residue 145 of Enterovirus 71 in Viral Fitness and Pathogenesis in a Cynomolgus Monkey Model. *PLoS Pathog.* 2015 11(7):e1005033. doi:

10.1371/journal.ppat.1005033 査読有

- ③ Zhang Y, Yan D, Zhu S, Nishimura Y, Ye X, Wang D, Jorba J, Zhu H, An H, Shimizu H, Kew O, Xu W. An Insight into Recombination with Enterovirus Species C and Nucleotide G-480 Reversion from the Viewpoint of Neurovirulence of Vaccine-Derived Polioviruses. *Sci Rep.* 2015 5:17291. doi: 10.1038/srep17291. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 西村順裕. エンテロウイルスと受容体についての最新の理解. *医学のあゆみ* 260: 509-512 (2017)
- ② 西村順裕. エンテロウイルス 71 型の受容体に関する最新の知見. 第 14 回 ウイルス学キャンプ in 湯河原. 2017
- ③ 西村順裕. エンテロウイルス 71 と受容体 PSGL-1 の結合とその制御. 東京大学医科学研究所共同研究拠点事業 平成 28 年度若手研究者シンポジウム「若手研究者が切り拓く次世代ウイルス学」. 2017.
- ④ Yorihiro Nishimura, Noel McLaughlin, Jieyan Pan, Sara Goldstein, Susan Hafenstein, Hiroyuki Shimizu, Jeffrey D. Winkler, Jeffrey M. Bergelson. NF449 interacts with the 5-fold vertex of the EV71 capsid to prevent virus attachment to PSGL-1 and heparan sulfate. *The 63rd Annual Meeting of the Japanese Society for Virology.* 2015.
- ⑤ Yorihiro Nishimura. The suramin derivative NF449 interacts with the 5-fold vertex of the enterovirus 71 capsid to prevent virus attachment to PSGL-1 and heparan sulfate. *10th Asia-Pacific Congress of Medical Virology.* 2015.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<https://www.niid.go.jp/niid/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 順裕 (NISHIMURA, Yorihiro)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・主任
研究官

研究者番号 : 00392316

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし