

令和元年6月14日現在

機関番号：84407

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21709

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞を用いたパレコウイルス筋炎の発症機序の解明と新規筋炎ウイルスの探索

研究課題名(英文) The study of the mechanism of HPeV-3-associated myositis

研究代表者

山元 誠司 (Yamamoto, Seiji)

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・微生物部・研究員

研究者番号：20649008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトパレコウイルス(HPeV)は、その感染によりたびたび筋炎を惹起することが報告されている。HPeVのなかでもHPeV-3が流行性筋痛症患者より検出されている一方で、HPeV-1は心筋炎の患者から稀に検出されることから、両者において標的筋細胞種の指向性もしくは筋細胞種により感染による傷害性が異なることが想定された。そこで本研究ではヒトiPS細胞より分化させた筋細胞を用いて、HPeV-1とHPeV-3の異なる遺伝子型のHPeVの感染細胞種特異性および病原性の違いを解析し、HPeV-1が心筋細胞でより傷害性を有することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ほとんどの場合に軽い風邪や下痢などの症状で済むウイルス感染症でも、個人の遺伝的背景や免疫状態によっては症状が重篤化することがあります。本研究では、前述のように、稀に心臓の筋肉の炎症(心筋炎)を引き起こすパレコウイルス1型(HPeV-1)、骨格筋の炎症を伴う流行性筋痛症を引き起こすHPeV-3について、両者の筋炎誘発部位の違いはどのようなウイルスの性質の差異によってもたらされているのかを、ヒトiPS細胞より分化させた筋細胞を用いて調べ、HPeV-1がより速く心筋細胞を傷害する性質を有することが明らかになりました。本研究の知見は、パレコウイルス心筋炎の発症メカニズムの解明の一助となるものです。

研究成果の概要(英文)：Human parechovirus (HPeV) infections sometimes cause myositis. Among 17 genotypes of HPeV, it has been reported that HPeV-3 was detected from patients with epidemic myalgia whereas HPeV-1 was detected from patients with cardio myositis. I hypothesized that there would be differences between HPeV-1 and -3 in cell tropism or virus-induced cell injury. To test the hypothesis, I utilized myocytes differentiated from human iPS cells and perform infection experiments. We found that HPeV-1 damaged cardiomyocytes faster than HPeV-3 did.

研究分野：ウイルス

キーワード：パレコウイルス 筋炎 筋痛症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトパレコウイルス (HPeV) は、ピコルナウイルス科パレコウイルス属に分類される + 鎖の一本鎖 RNA ウイルスである。現在までに HPeV は 17 の遺伝子型が報告されているが、日本では HPeV-1 と HPeV-3 の検出が大部分を占め、ヒトは生後数年以内にこれらに初感染すると考えられる。近年、HPeV-3 感染に伴う成人の流行性筋痛症 (筋炎) が山形県より報告され、その後 HPeV-3 感染による重症筋炎が成人と小児の両方で起こり得ることが報告された。一般的な流行性筋痛症では、主に成人がコクサッキーウイルス B などに感染することにより、胸部・腹部・背部といった胴体部分の筋肉に増悪する激しい痛みを伴うが、HPeV-3 筋炎は腓腹筋 (ふくらはぎ) などの遠位筋に痛みを伴うことが多い。HPeV のなかでも HPeV-3 が流行性筋痛症患者より検出されている一方で、HPeV-1 は心筋炎の患者から稀に検出されることから筋組織に対して感染能を有する可能性が十分にある。HPeV-1 は HPeV-3 よりも感染性胃腸炎患者からの検出率が有意に高いことから、両者において標的筋細胞種の指向性もしくは筋細胞種により感染による傷害性が異なることが想定された。

### 2. 研究の目的

本研究では、ヒト iPS 細胞の分化により得られる心筋細胞および骨格筋細胞を用いた HPeV 感染実験系を確立し、異なる遺伝子型の HPeV の感染細胞種特異性および病原性の違いを解析することで、筋炎発症のメカニズムを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

ドキシサイクリン誘導系により骨格筋細胞へ分化誘導可能なヒト iPS 細胞株は、京都大学 iPS 細胞研究所の櫻井英俊先生より供与された。HPeV-3 株は、山形県衛生研究所の水田克己先生より供与された。HPeV-1 株およびデングウイルス 1 型 (DENV-1) 株は、当研究所でウイルス分離されたものを用いた。

### 4. 研究成果

ヒト iPS 細胞においてドキシサイクリン分化誘導に伴う内在性遺伝子の mRNA および蛋白質レベルでの発現確認をリアルタイム PCR および免疫染色法によりそれぞれ行った。その結果、薬剤誘導に伴って骨格筋細胞のマーカー遺伝子である MyoD、Myogenin、そして CK-M 遺伝子の発現が増強していることが確認された。これらのマーカーが発現している段階の細胞において HPeV 感染によるインターフェロン応答の有無を検討したところ、感染後 12 時間でインターフェロン が誘導されたことから、分化した骨格筋細胞においてもウイルス感染に対して自然免疫応答が惹起されることが明らかとなった。さらに、免疫染色法により HPeV 感染細胞の可視化を試みたところ、ウイルスの複製過程で生じる dsRNA を標的とする抗 dsRNA 抗体により、分化誘導した細胞内における HPeV 複製が確認された。

ドキシサイクリン分化誘導前のヒト iPS 細胞ならびに分化誘導後の細胞におけるウイルスの増殖性を、ウイルス遺伝子を検出するリアルタイム RT-PCR 法にて解析したところ、HPeV-1 (A 株および B 株) および HPeV-3 (C 株) とともにいずれの細胞においても効率よく増殖し、大きな差異は認められなかった。ヒトへの感染に伴ってウイルス血症を引き起こし、筋肉痛などの症状を惹起することのある DENV-1 もいずれの細胞においても効率よく複製することがわかった。

次に、HPeV-1 と HPeV-3 で、ヒト iPS 細胞より分化した心筋細胞への感染に差異があるかを確認した。心筋細胞の場合は自己拍動が観察されるため分化誘導の確認が容易である。また、ウイルス感染に伴う細胞傷害性の程度は自己拍動の停止を指標とすることで、細胞傷害が培養細胞全体に広がったかどうかを明確に評価することが可能である。心筋細胞の分化誘導実験では、誘導後 9 日目より自己拍動胚様体が観察され始め、誘導後 15 日目には培養プレートの各ウェル全体に活発に拍動する胚様体が広がっていた。そこで、誘導後 17 日目に HPeV-1 (A 株または B 株) あるいは HPeV-3 (C 株) を添加し、1 時間感染させたのちに培地を交換し、そこから経日的に細胞の拍動を観察した。HPeV-1 A 株に感染させた心筋細胞は、感染後 1 日目 (1 dpi) にてそのほとんどが拍動を停止し、HPeV-1 B 株に感染させた心筋細胞は 5 dpi までにそのほとんどが拍動を停止した。一方、HPeV-3 C 株に感染させた心筋細胞のほとんどが拍動を停止するには 7 dpi を要した。異なるヒト iPS 細胞株を用いた実験でも同様の結果が得られた。これらの結果は、HPeV-1 と HPeV-3 は心筋細胞に感染することができるものの、心筋細胞における感染拡大あるいは傷害性において差異があることを示している。細胞傷害を引き起こすのに要する日数が短いことで、個体においては宿主の免疫機能が追い付かず、感染組織におけるダメージが大きくなると考えられるため、このことが HPeV-1 心筋炎の起こりやすさにつながっているのかもしれない。

### 5. 主な発表論文等

( 研究代表者には下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 16 件 )

Iritani N, Yamamoto SP, Abe N, Kubo H, Oka T, Kaida A.  
Epidemics of GI.2 sapovirus in gastroenteritis outbreaks during 2012-2013 in Osaka City, Japan.

Journal of Medical Virology, 88, 1187-1193 (2016), 査読有  
10.1002/jmv.24451

入谷展弘、上林大起、改田厚、阿部仁一郎、中村寛海、山元誠司、久保英幸、小笠原準、著者計 15 名

集団胃腸炎事例からのノロウイルス GII.P16-GII.4 Sydney\_2012 の検出 大阪市病原微生物検出情報, 37, 136-138 (2016), 査読無

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/norovirus-m/norovirus-iasrd/6617-437d03.html>

山元誠司、上林大起、改田厚、久保英幸、入谷展弘、小笠原準、著者計 13 名  
G2 型の A 群ロタウイルスによる感染性胃腸炎集団事例, 2016 年 大阪市病原微生物検出情報, 37, 139-140 (2016), 査読無

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/rotavir-m/rotavir-m-iasrd/6619-437d05.html>

小林彩香、金井瑞恵、島田智恵、奥野英雄、松井珠乃、多屋馨子、大石和徳、上山賀也子、井戸美恵子、福田直子、宮本妙子、川井奈々、貞方菜月、大西聖子、今川和子、松浦玲子、倉田貴子、山元誠司、著者計 26 名

関西国際空港内事業所での麻疹集団感染事例について

病原微生物検出情報, 38, 48-49 (2017), 査読無

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/allarticles/surveillance/2405-iasr/related-articles/related-articles-445/7131-445r01.html>

倉田貴子、山元誠司、弓指孝博、久米田裕子、本村和嗣、著者計 19 名

関西国際空港の麻疹事例の検査結果から得られた知見

病原微生物検出情報, 38, 49-51 (2017), 査読無

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/allarticles/surveillance/2405-iasr/related-articles/related-articles-445/7132-445r02.html>

Kaida A, Iritani N, Yamamoto SP, Kanbayashi D, Hirai Y, Togawa M, Amo K, Kohdera U, Nishigaki T, Shiomi M, Asai S, Kageyama T, Kubo H.

Distinct genetic clades of enterovirus D68 detected in 2010, 2013, and 2015 in Osaka City, Japan.

PLoS One, 13;12(9):e0184335 (2017), 査読有

10.1371/journal.pone.0184335

Kanbayashi D, Kaida A, Yamamoto SP, Hirai Y, Kubo H, Fujimori R, Hakui N, Hirokawa H, Iritani N.

Impact of Coxsackievirus A6 emergence on hand, foot, and mouth disease epidemic in Osaka City, Japan.

Journal of Medical Virology, 89, 2116-2121 (2017), 査読有

10.1002/jmv.24905

上林大起、改田厚、平井有紀、山元誠司、著者計 12 名

大阪市における手足口病の流行状況 ( 2017 年 )

病原微生物検出情報, 38, 196-197 (2017), 査読無

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/allarticles/surveillance/2412-iasr/related-articles/related-articles-452/7603-452r03.html>

久保英幸、改田厚、上林大起、平井有紀、入谷展弘、山元誠司、小笠原準

2016/17 シーズンの季節性インフルエンザウイルス分離状況 - 大阪市

大阪市立環科研報告, 79, 11-16 (2017), 査読無

[https://www.city.osaka.lg.jp/kenko/cmsfiles/contents/0000428/428619/r2016\\_11-16.pdf](https://www.city.osaka.lg.jp/kenko/cmsfiles/contents/0000428/428619/r2016_11-16.pdf)

Li R, Narita R, Nishimura H, Marumoto S, Yamamoto SP, Ouda R, Yatagai M, Fujita T, Watanabe T.

Antiviral Activity of Phenolic Derivatives in Pyroligneous Acid from Hardwood, Softwood, and Bamboo.

ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 6, 119-126 (2018), 査読有

10.1021/acssuschemeng.7b01265

Kaida A, Iritani N, Kanbayashi D, Yamamoto SP, 著者計 11 名

Ten-year surveillance of measles virus from 2007-2016 in Osaka City, Japan

Jpn J Infect Dis, 71, 152-154 (2018), 査読有

10.7883/yoken.JJID.2017.322

山元誠司、江川和孝、馬場孝、平井有紀、改田厚、久保英幸、阿部仁一郎、小笠原準、著者計 14 名

ヒトパレコウイルス 3 型が原因と考えられた感染性胃腸炎集団事例, 2018 年 大阪市

病原微生物検出情報, 39, 203-204 (2018), 査読無  
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/id/981-disease-based/a/entero/idsc/iasr-in/8436-465d02.html>  
平井有紀、改田 厚、山元誠司、著者計 14 名  
流行性角結膜炎患者からのアデノウイルス 54 型の検出, 2016 年-大阪市  
病原微生物検出情報, 39, 125-126 (2018), 査読無  
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/ekc-m/ekc-iasrd/8178-461d03.html>  
Oka T, Iritani N, Yamamoto SP, Mori K, Ogawa T, Tatsumi C, Shibata S, Harada S, Wu FT.  
Broadly reactive real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for the detection of human sapovirus genotypes  
Journal of Medical Virology, 91, 370-7 (2019), 査読有  
10.1002/jmv.25334  
Yamamoto SP, Kasamatsu Y, Kanbayashi D, Kaida A, Shirano M, Kubo H, Goto T, Iritani N.  
Dengue Virus in Traveler Returning to Japan from the Democratic Republic of the Congo, 2015  
Japanese Journal of Infectious Diseases, (2019) *in press*, 査読有  
Okada K, Morita R, Egawa K, Hirai Y, Kaida A, Shirano M, Kubo H, Goto T, Yamamoto SP.  
Dengue virus type 1 infection in a traveler returning to Japan from Tanzania, 2019  
Emerging Infectious Diseases, (2019) *in press*, 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

Kaida A, Iritani N, Yamamoto SP, Kanbayashi D, Hirai Y, Kohdera U, Togawa M, Amo K, Shiomi M, Nishigaki T, Kageyama T, Kubo H.  
Single genetic clades of Enterovirus D68 strains in 2010, 2013, and 2015 in Osaka City, Japan  
The 19th annual ESCV meeting、2016 年 9 月 14 日、Lisbon, Portugal  
上林大起、山元誠司、倉田貴子、加瀬哲男、駒野淳、弓指孝博、久保英幸、改田厚、平井有紀、入谷展弘、西尾孝之、小笠原準  
風疹市中流行株に対する監視の重要性 ～風疹の排除にむけて～  
平成 28 年度地研近畿支部ウイルス部会研究会、2016 年 9 月 30 日、和歌山市役所  
山元誠司、改田 厚、上林大起、久保英幸、入谷展弘  
2015/16 シーズンに大阪市内で流行したロタウイルス A (G2P[4]株) の遺伝子解析  
第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年 10 月 23 日、札幌コンベンションセンター  
上林大起、改田 厚、山元誠司、久保英幸、入谷展弘  
手足口病流行へのコクサッキーウイルス A6 の関与  
第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年 10 月 24 日、札幌コンベンションセンター  
倉田貴子、山元誠司、本村和嗣、西村公志、久米田裕子、弓指孝博  
関西国際空港内事業所における麻しん集団発生事例の検査から得られた知見  
第 58 回日本臨床ウイルス学会学術集会、2017 年 5 月 27 日、長崎大学  
入谷展弘、上林大起、改田厚、阿部仁一郎、山元誠司、久保英幸、野田衛  
2016/17 シーズンに大阪府で認められたノロウイルス GII.2 流行  
第 65 回日本ウイルス学会学術集会、2017 年 10 月 25 日、大阪国際会議場  
中村寛海、山元誠司、朝倉 宏、梅田 薫、山本香織、小笠原 準  
生菌由来カンピロバクター DNA のふきとり材料からの定量的検出  
第 39 回日本食品微生物学会学術集会、2018 年 9 月 27 日、大阪市立大学  
平井有紀、改田 厚、山元誠司、江川和孝、久保英幸、入谷展弘、小笠原 準  
2016～2018 年の大阪府における流行性角結膜炎患者からのアデノウイルスの検出  
平成 30 年度地研近畿支部ウイルス部会研究会、2018 年 10 月 5 日、京都府庁  
中村寛海、山元誠司、朝倉 宏、梅田 薫、山本香織、小笠原準  
調理環境から採取したふきとり材料からのカンピロバクター遺伝子の検出  
第 11 回カンピロバクター研究会、2018 年 12 月 1 日、徳島大学  
倉田貴子、山元誠司、西村公志、弓指孝博、本村和嗣  
関西国際空港内事業所における  
麻しん集団発生事例のウイルス学的解析  
第 22 回日本ワクチン学会学術集会、2018 年 12 月 8 日、神戸国際会議場

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。