

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390116

研究課題名(和文) エンテロウイルス71の神経病原性の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular basis of enterovirus 71 neuropathogenicity

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・副参事研究員

研究者番号：30195630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円

研究成果の概要(和文)：これまでエンテロウイルス71(EV71)の毒力を評価することは困難だった。我々はEV71受容体であるScavenger receptor B2を発現するトランスジェニックマウスモデルを作製した。マウスはEV71感受性を獲得し、神経細胞での増殖やヒトの重症化例と類似の病態を示した。マウスに種々のウイルス株を接種すると異なった毒力の強さを示したことから、毒力測定に適したモデルであることが示唆された。そこで我々はVP1 145番がGとEのアミノ酸置換の影響を調べた。EのウイルスはGのウイルスと比較して毒力が強かったことからこれはEV71の毒力を決定する重要なアミノ酸の一つであることが判明した。

研究成果の概要(英文)：The host range of enterovirus 71 (EV71) is restricted to primates with some exceptions. Therefore it was difficult to evaluate the neurovirulence level of EV71 strains. We have established a transgenic mouse model that expressed a cellular receptor for EV71, human Scavenger receptor B2 (SCARB2). The transgenic mice became susceptible to EV71. They showed efficient EV71 replication in neurons in the CNS and neurological signs similar to those observed in human severe cases infected with EV71. We inoculated several EV71 strains and compared the virulence of these strains. The inoculated virus exhibited different virulence levels, suggesting that the tg mice are useful model. We then evaluated the effect of a single amino acid substitution Gly to Glu at position 145 of the VP1 capsid protein. The virus with Glu at this position significantly increased the virulence compared to that with Gly. The result suggested that this amino acid is an important virulence determinant in EV71.

研究分野：ウイルス学

キーワード：エンテロウイルス71 神経病原性 マウス感染モデル

1. 研究開始当初の背景

エンテロウイルス 71 (EV71) はピコルナウイルス科エンテロウイルス属に分類される。このウイルスはコクサッキーウイルス A16 (CVA16)、CVA10 などと共に手足口病の原因ウイルスであることが知られている。手足口病は口腔粘膜および手や足などに現れる水疱性の発疹を主症状とし、幼児を中心に夏季に流行が見られる。手足口病自体は基本的に予後の良好な疾患であるが、EV71 感染による場合に限り髄膜炎等の中枢神経症状、稀に急性脳炎、急性弛緩性マヒなどの重篤な中枢神経系合併症が見られる。特に近年アジアを中心とする手足口病の流行が相次いで報告され、1997 年マレーシア、1998 年台湾において急速な経過で死亡する例がそれぞれ 30 例、78 例報告され、その後も流行を繰り返している。2008 年、2009 年、2010 年はさらに中国本土でも大規模な EV71 による手足口病の大流行があり、それぞれ 126、353、537 の死亡例が報告されている。これはポリオウイルス根絶後 EV71 が次の脅威となるエンテロウイルスであることを示している。

EV71 の重症化で最も大きなウイルス学的問題は EV71 の毒性を決定する変異が同定できていないことである。手足口病は世界中で流行があるにも関わらず特定の地域で重症例が多数報告されることは、変異により強毒化が起こっている可能性が考えられる。近縁のポリオウイルスに関してはウイルスの毒力に関与する塩基もしくははアミノ酸配列が決定されているので、EV71 に関しても同様のルールが適用されると予想されたが、中枢神経症状を示した患者からの分離株と手足口病患者から分離株の比較において、ポリオウイルスの代表的な毒力決定基である internal ribosome entry site 内の stem-loop V の塩基を調べても病態との間に明確な相関性は見られない。また中枢神経合併症を起こしやすい EV71 とほとんど起こすことがない CVA16 とを比較しても病原性の強弱を支配する原理は見いだせない。従ってこのウイルスが中枢神経系に病原性をもたらす機構はポリオウイルスで得られた分子遺伝学的知見のみでは説明しきれず、新たな原理を明らかにする必要がある。

ウイルスゲノム上の病原性決定基が正確に同定できない理由は、ヒトにおいて同じ株に感染しても急性脳炎等の発症に至る確率は低く、強毒性のウイルス株に感染しても必ずしも重症化しないために神経病原性とウイルス株の塩基配列の因果関係が判明しにくいことが挙げられる。現在使用可能な動物実験モデルとして、サックリングマウスモデルとサルモデルが存在する。サックリングマウスモデルは、すべての EV71 株が感染する訳でなく、感染したとしてもウイルスの増殖部位は筋肉が主であ

るために、ヒトと類似の病原性を示す訳ではない。単に手軽であるが故に一部の研究者によって使用されている。サルを用いた研究は少数のウイルス株を用いて連携研究者である清水、永田が行っているが、まだ十分であるとは言いがたい。大掛りな設備や経費を必要とするが、遺伝学的に均一でないサルを少数使用しても、安定で信頼のできるデータの収集は困難である。研究代表者小池はこれまでポリオウイルス受容体 (PVR, CD155) を同定し、PVR を発現するトランスジェニックマウスがポリオウイルスの神経毒力を測定しうる動物モデルであることを示してきたが、この方法は EV71 に対しても同様に有効な手段であると考えられる。

マウスモデルの作成には宿主域を決定しているウイルス受容体の同定が必須であるが、我々は EV71 と CVA16 の共通の受容体として Scavenger Receptor B2 (SCARB2) を同定し、さらにもう一つの侵入に関わる未同定の分子の存在を見いだした (Yamayoshi et al 2009 Nat. Med.)。連携研究者の清水らはこれと独立に P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1) を介する侵入経路が存在することを発見した (Nishimura et al 2009 Nat. Med.)。これらの知見を元に我々はウイルス受容体を発現するマウスモデルを作製し、これを用いて EV71 の病原性発現に関わるウイルス側、宿主側の因子の同定をまさに開始することを計画した。

2. 研究の目的

近年アジアを中心に流行し大きな問題となっているエンテロウイルス 71 (EV71) の神経病原性発現機構の分子基盤を明らかにする。EV71 受容体である Scavenger receptor B2 (SCARB2) を発現するマウスを作成して、EV71 の神経毒力を測定する動物モデルを確立し、そのモデルを用いてウイルスの病原性の強弱を決定する分子機構を明らかにする。さらにウイルスの伝播動態を調べ、脅威となるウイルスの出現機構などについて明らかにすることを目標とする。

3. 研究の方法

(1) SCARB2 マウスの作製と神経毒力検定系モデルの確立

現在までの結果で EV71 の個体への感染、特に神経細胞への感染に最も重要な受容体は SCARB2 であると考えられる。ヒト SCARB2 遺伝子全長を含む BAC クローンをトランスジーンとしたトランスジェニックマウスの作製を行うことを計画する。マウスは EV71 感受性を示し、神経病変を示すことが期待される。ウイルス学的並びに病理学的な解析を行い、マウスモデルがヒトと同様な病態を示すか否かを調べる。

最もよい結果の得られたマウス系統を選

択し、種々のルートからウイルスを接種し、LD₅₀ 値によって毒力の違いが判定できれば最も望ましい。もし、LD₅₀ 値による判定が困難な場合は病理学的検定プロトコルを定め、そのスコアにより毒力を判定可能にする。連携研究者清水、永田がすでにいくつかのウイルス株についてサルを用いて実験を行っているので、サルモデルとマウスモデルの比較が可能である。

(2) 分離株の毒力測定、毒力決定基の同定

様々な臨床分離株を用いてマウスモデルを用いてウイルス株間の毒力の違いを判定する。ウイルス株は国内外の株を用いて実験を行うが、特に重症例由来株と通常の手足口病のみの患者から得られた株を比較する。いくつかの株から得られた情報を総合し、ウイルスの毒力に変化を与えている塩基置換などを明らかにする。上記実験結果から得られた候補となる塩基置換を逆遺伝学的手法で導入した変異体ウイルスを作成し、実際に関与している変異を同定する。

別の観点からの研究として、EV71 は高頻度で中枢神経合併症を引き起こして重症化するのに対し、CVA16 では殆どそのような重症化例が報告されていないことに着目する。これらのウイルスは塩基配列の上でも非常に近縁であり、かつ同一の受容体 SCARB2 を利用して感染することが判明しているため、2つのウイルスの病原性の違いは異なる受容体を用いるためではなく、ウイルス側にその原因があると考えられる。したがってこの2つのウイルスの違いを解明することにより、EV71 の神経病原性が解明される可能性がある。

(3) 神経毒性発現のメカニズムの解明

上記2の結果で得られる結果によってこの項目で行う実験は異なってくるが、これまで行った実験では、ウイルス-受容体の結合、脱殻の効率などに焦点をあててメカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

(1) SCARB2 マウスの作製と神経毒力検定系モデルの確立

①hSCARB2 Tg マウスの作製

トランスジーンとしてプロモーターなどの発現調節部位と構造遺伝子などヒト SCARB2 遺伝子全領域をカバーすると考えられる約 150-200Kb の長さを持つ Bacterial artificial chromosome clone RP11-54D17 及び RP11-628A4 を購入した。この BAC clone を C57Black/6 マウスの受精卵前核にマイクロインジェクションを行い、トランスジェニックマウスの作製を行った。

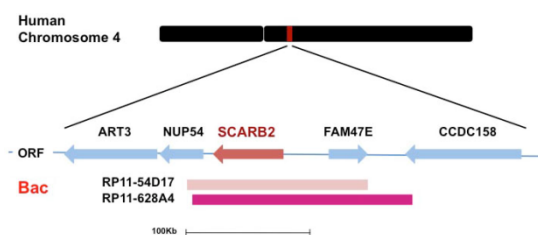


図1 SCARB2 遺伝子と BAC クローン。hSCARB2 遺伝子はヒト第4番染色体長腕に位置しており、約 55 kb の長さを持っている。

②hSCARB2 遺伝子の tg マウスでの発現

ヒト SCARB2 遺伝子はマウス個体のすべての組織で発現していることを Western Blotting で確認した。さらに免疫組織化学によって発現を確認したところ、すべての細胞で均一に発現しているのではなく、特定の細胞で高いレベルの発現が観察された。中枢神経系においては神経細胞に高いレベルで発現し、グリア、血管内皮などでは発現が確認できなかった(図2) 非神経系組織では肝細胞、肺細胞、尿細管上皮細胞、脾臓胚中心、小腸上皮細胞で高いレベルの発現が観察された。ヒトとマウスにおける hSCARB2 の発現部位やその程度は非常によく一致しており、BAC のヒト SCARB2 遺伝子の発現制御機構はマウスにおいても同様に作動していた。

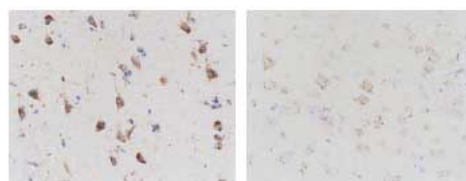


図2 ヒト(左)と SCARB2 tg マウス(右)の脳幹部における hSCARB2 の発現

③tg マウスのウイルス感受性

Tg マウスに EV71 を脳内接種、静脈内接種、腹腔内接種などの経路で感染させると運動機能障害、弛緩性マヒ等の神経症状が観察された(図3)。3週令以上の non tg マウスにおいては麻痺等の症状は全く観察されなかった。したがって、ウイルス感受性は導入された hSCARB2 によって獲得された形質である。サックリングマウスのウイルス感受性は2週間を過ぎると概ね観察されなくなるが、tg マウスのウイルス感受性は14週令以上のマウスにおいても観察され、おそらく終生感受性を持ち続けると考えられた。



図3 EV71 の接種後後肢の麻痺を示した SCARB2 tg マウス

ウイルス接種後経時的に組織を採取し、ウイルス力価を測定したところ、ウイルスの増殖が明確に認められたのは中枢神経系のみで、その他の組織、或いは発症前の中枢神経系ではウイルスは認められなかった。さらに免疫組織化学により麻痺等の症状を発症したマウスでウイルス抗原を検出すると、抗原は脊髄、延髄、橋、小脳核、視床の神経細胞で見られた(図4)

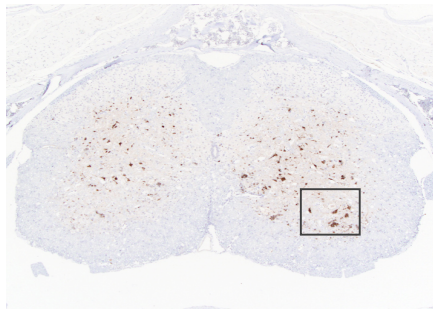


図4 麻痺を示した SCARB2 tg マウスの脊髄 抗 EV71 抗体による染色

tg マウスのウイルス感受性はサックリングマウスに対して病原性を示さない SK-EV006 株や C7 株においても観察され、おそらくすべての EV71 株に対して感受性と持つと考えられ、サックリングマウスモデルを持つ一部の株しか感染できないという欠点を克服していた

これらのことから hSCARB2 tg マウスモデルは、週令に依らず感受性を維持し続け、すべての株に対して感受性を示し、ヒトと類似の中枢神経病原性を示すモデルである。他のグループから報告されている PSGL-1 tg マウスモデルは特にウイルス感受性が獲得できなかったことと併せて、SCARB2 がウイルス感受性を与える最も重要な受容体であり、このマウスのみで解析は十分であると考えられた。マウス Scarb2 遺伝子の exon4 をヒトの配列を入れ替えたマウスも作製したが、スプライシング異常が起こり、感受性を獲得しなかった。また exon4 以降をスプライシング済みの配列で置き換えたマウスも作製したが、解析した tg マウスに対して圧倒的に優位ではなかったため、以後の解析はこの tg マウスで行うこととした。

(2) 分離株の毒力測定、毒力決定基の同定

次にこのマウスモデルを用いてウイルスの毒力が測定できるかどうかを調べた。これまで分離されている 13 株を脳内接種し、症状を観察した。症状は死亡、重度の麻痺、軽度の運動障害などに分類し、観察期間中のスコアを積分することにより、重篤度を算出した。

図5に示すように Isehara 株、Nagoya 株はより毒力が強く、02464 株、209-VN 株等は

毒力が弱い結果を示した。その他の株はこの中間的な値を示した。

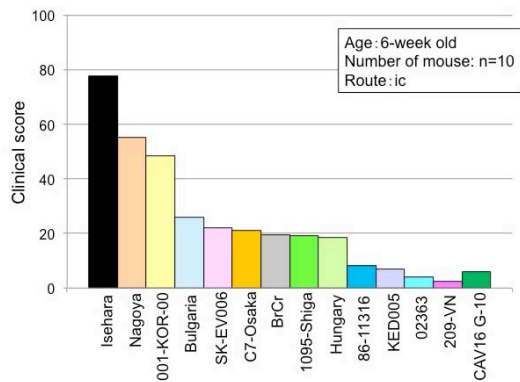


図5 さまざまな EV71 株は異なった毒力を示す。

さらに CVA16 G-10 株を接種してその毒力を測定したところ、EV71 株と比較すると比較的毒力は低い部類に属していた。

これらの事実から hSCARB2 tg マウスは EV71 の毒力を測定することのできるモデル動物として有用である可能性が示された。

今後は EV71、CVA16 ともにより多くの株について接種を行い、強毒性、弱毒性をもたらす遺伝的背景について研究を進めていくことができると思われる。

(3) 神経毒性発現のメカニズムの解明

これまで EV71 のカプシドタンパク質 VP1 の 145 番目のアミノ酸の変異により、サックリングマウスに対する感染性が大きく変化することが知られていた。この部分が Glu である場合には、サックリングマウスに感染し、Gly である場合には感染しない。また、細胞レベルでも Gly であると PSGL-1 に結合が可能であり、Glu では結合しないことが知られていた。この部位はウイルス粒子表面で 5 回対称軸に近い部分に位置することから、ウイルス受容体の結合や脱殻などに関係すると考えられていた。従ってこれは病原性の決定に関与しているのか、単にマウスの未知の分子に対して結合する機能を持つため種間のアダプテーションを示しているのか不明であった。

Isehara 株、Nagoya 株の VP1 145 はもともと Glu であり tg マウスでも強毒性を示し、C7 株、SK-EV006 株はもともと Gly であり tg マウスで弱毒性をしめしたことから、我々はこの変異が病原性に直接関与する可能性を考えた。そこでこれらのウイルスの感染性 cDNA 上で Glu と Gly のアミノ酸を持つ変異体を作製した。図6に Isehara 株の VP1 145G および VP1 145E 株を 106TCID₅₀ 静脈内接種した場合のマウスの生存率の変化を示した。145 Glu の株では全頭が死亡し、145 Gly の株では全頭が生存した。これによりこのアミノ酸変異は tg マウスにおいても毒力を決定していると考えられた。

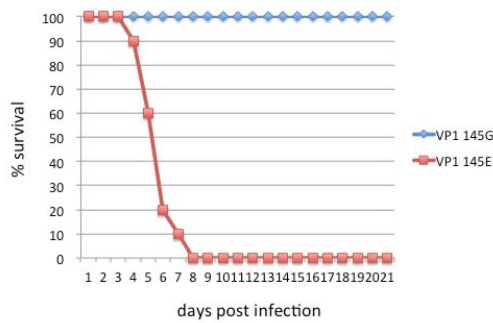


図6 VP1 145 変異体接種後のマウスの生存率

この結果は Nagoya 株、C7 株、EV-SK006 株でも同様であった。現在この病原性の違いが生じる理由について調べている。また、この毒力の違いがサルにおいても観察できるかどうかを検討中である。

さらにこのウイルスの毒力が変化する理由として、ウイルス受容体との親和性の変化、脱殻反応の起こり易さの変化、ウイルス粒子の安定性の変化などを想定し、ウイルス学的、生化学的な解析を行っている。

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 8 件)

- ① 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. (2014) Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infections. *Neuropathology* 35: 107-121 査読有 DOI: 10.1111/neurop.12171
- ② Yamayoshi S, Fujii K, Koike S. (2014) Receptors for enterovirus 71. *Emerg. Microbes Infect.* 3: e53 査読有 DOI: 10.1038/emi.2014.49
- ③ Fujii K, Nagata N, Sato Y, Ong KC, Wong KT, Yamayoshi S, Shimanuki M, Shitara H, Taya C, Koike S. (2013) Transgenic mouse model for the study of enterovirus 71 pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110: 14753-14758 査読有 DOI:10.1073/pnas.1217563110
- ④ Yamayoshi S, Ohka S, Fujii K, Koike S. (2013) Functional Comparison of SCARB2 and PSGL1 as Receptors for Enterovirus 71. *J.Virol.* 87: 3335-3347 査読有 DOI:

10.1128/JVI02070-12

- ⑤ Yamayoshi S, Iizuka S, Yamashita T, Mizuta K, Okamoto M, Nishimura H, Sanjoh S, Matsushima N, Itagaki Y, Fujii K, Koike S. (2012) Human SCARB2-dependent Infection by Coxsackievirus A7, A14, A16 and Enterovirus 71. *J.Virol.* 86: 5886-5696 査読有 DOI: 10.1128/JVI00020-12
 - ⑥ Yamayoshi S, Fujii K, Koike S (2012) Scavenger receptor B2 as a receptor for hand, foot, and mouth disease and severe neurological diseases. *Frontiers in Virology* 3: article32, 1-6 査読有 DOI: 10.3389/fmicb.2012.00032
 - ⑦ McWilliam Leitch EC, Cabrerizo M, Cardosa J, Harvala H, Ivanova OE, Koike S, Kroes AC, Lukashev A, Perera D, Roivainen M, Susi P, Trallero G, Evans DJ, Simmonds P (2012) The association of recombination events in the founding and emergence of subgenogroup evolutionary lineages of human enterovirus 71. *J. Virol.* 86: 2676-2685. 査読有 DOI: 10.1128/JVI.06065-11
 - ⑧ Yamayoshi S & Koike S (2011) Identification of the Human SCARB2 Region That Is Important for Enterovirus 71 Binding and Infection. *J.Virol.* 85: 4937-4936. 査読有 DOI: 10.1128/JVI.02358-10
- [学会発表] (計 13 件)
- ① 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制御されている 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014/11/10-12 パシフィコ横浜、横浜市
 - ② 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 感染初期過程解析 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014/11/10-12 パシフィコ横浜、横浜市
 - ③ 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 2014/10/15-18 国立京都国際会館、京都市 (招待講演)
 - ④ Koike S. Enterovirus 71 –an emerging enterovirus–. The XVIIIth Meeting of the European

- Study Group on the Molecular Biology of Picornavirus. 2014/3/9-14 Blankenberge, Belgium (招待講演)
- ⑤ 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シンポジウム 2013/11/10-12 神戸国際会議場、神戸市 (招待講演)
- ⑥ Fujii K, Koike S. SCARB2-transgenic mouse model for the study of enterovirus 71 pathogenesis. The XIIth Awaji International Forum on Infection and Immunity. 2013/9/10-13 Awaji, Hyogo
- ⑦ Koike S. Scavenger receptor B2-transgenic mouse model for EV71 infection. International Conference on Dengue and Emerging Infection. 2012/11/21-23 Grand Copthorne Waterfront, Singapore (招待講演)
- ⑧ 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 2012/11/13-15. 大阪国際会議場、大阪市
- ⑨ 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 2012/11/13-15. 大阪国際会議場、大阪市
- ⑩ Koike S, Yamayoshi S, Fujii K. Scavenger receptor B2 is a receptor for Enterovirus 71. The XIth Awaji International Forum on Infection and Immunity 2012/9/11-14. Awaji, Hyogo (招待講演)
- ⑪ Fujii K, Nagata N, Yamayoshi S, Shimanuki M, Shitara H, Taya C, Koike S. Establishment of a transgenic mouse model for EV71 infection. The XVIIth Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses 2012/6/3-7. Saint-Raphael, France
- ⑫ Yamayoshi S, Fujii K, Koike S. Functional analyses of Scavenger receptor B2 as a receptor for Enterovirus 71. The XVIIth Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses 2012/6/3-7. Saint-Raphael, France
- ⑬ Yamayoshi S, Iizuka S, Yamashita T, Minagawa H, Sanjoh K, Kasushima N, Itagaki T, Mizuta K, Nagai Y, Okamoto M, Nishimura H, Fujii K, & Koike S. Human SCARB2-dependent infection of clinical isolates of coxsackievirus

A14, A16 and Enterovirus 71. The XVth International Congress of Virology. 2011/9/16. 札幌コンベンションセンター、札幌市

〔図書〕(計 1 件)
ウイルス-ミクロの賢い寄生体- 丸善出版
Dorothy H. Crawford 著 永田恭介監訳
2014 全240ページ

〔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公式サイト
<http://www.igakuken.or.jp/>
公益財団法人東京都医学総合研究所公式サイト内 ウイルス感染プロジェクトホームページ
http://www.igakuken.or.jp/research/project/res_prj17.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・副参事研究員
研究者番号：30195630
- (2) 研究分担者
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・主任研究員
研究者番号：10580201
- 山吉 誠也 (YAMAYOSHI, Seiya)
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・研究員
研究者番号：50529534
(平成23年度研究分担者)
- (3) 連携研究者
永田 典代 (NAGATA, Noriyo)
国立感染症研究所・感染病理部・室長
研究者番号：30270648
- 清水 博之 (SHIMIZU, Hiroyuki)
国立感染症研究所・ウイルス第二部・室長
研究者番号：90270644