

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790518

研究課題名（和文） エンテロウイルス 71 感染マウスモデルの構築

研究課題名（英文） Establishment of mouse model for EV71 infection

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：EV71は手足口病の原因ウイルスであり、稀に神経疾患を伴う。しかし適した動物モデルが確立されていないため神経病原性発症機構は明らかにされていない。そこでEV71神経病原性発症機構解明のためEV71の受容体であるヒトSCARB2を発現し、EV71に感受性を持つマウスの作出を目的とした。本研究期間にヒトSCARB2の発現分布がヒトと類似のトランスジェニックマウス（hSCARB2-Tgマウス）の作製し、EV71感染により神経症状を示し、ウイルスの主な増殖部は脳および脊髄であることを明らかにした。従って、hSCARB2-Tgマウスはヒトの症例と類似したEV71感染モデルであると考えられる。

研究成果の概要（英文）：EV71 typically causes mild hand-foot-and-mouth disease in children, but it can also cause severe neurological disease. However, there is little information available concerning EV71 neuropathogenesis. Thus, the development of an appropriate small animal model would greatly contribute to the study of this disease. Previously, we identified the human scavenger receptor class B, member 2 (hSCARB2) as a cellular receptor for EV71. In the current study, we generated a transgenic (Tg) mouse expressing hSCARB2 with an expression profile in similar to that in humans. Tg mice infected with EV71 exhibited ataxia, paralysis and death. The most severely affected cells were neurons in the spinal cord, brainstem, cerebellum, hypothalamus, thalamus and cerebrum. The pathological features in these Tg mice were generally similar to those of EV71 encephalomyelitis in humans. These results suggest that this Tg mouse could represent a useful animal model for the study of EV71.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：病原性、エンテロウイルス 71、神経病原性、マウスモデル

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、A 群ヒトエンテロウイルスに分類される、手足口病の原因ウ

イルスである。一般的に手足口病は重篤化することはないが稀に EV71 感染では神経疾患を伴う死亡例が報告されている。しかし EV71 の宿主域は狭く成体マウスでは神経病原性

は観察されないため、適した動物モデルが確立されていない。従って、神経病原性発症機構は明らかにされていない。

2. 研究の目的

EV71 神経病原性発症機構解明のため EV71 の受容体であるヒト SCARB2 を発現し、EV71 に感受性を持つマウスの作出を目的とした。

3. 研究の方法

ヒト SCARB2 をマウス培養細胞に発現させるとほぼ全ての EV71 株に対する感受性が極めて高くなる。従って、トランスジェニックとノックイン技術を用いて人工的にヒト SCARB2 をマウスの遺伝子に導入し、ヒト SCARB2 をマウスで発現させれば、ヒトでの感染様式と病態を模した EV71 感受性マウスを作製できると考えられる。

(1) ヒト SCARB2 発現トランスジェニックマウス

ヒト SCARB2 遺伝子全領域を含む Bacterial Artificial Chromosome (Bac) クローンを入手し、C57BL/6 マウス卵細胞にマイクロインジェクションにより SCARB2 発現トランスジェニック (hSCARB2-Tg) マウスを作製した。ウエスタンブロット法や免疫組織化学により hSCARB2-Tg マウスのヒト SCARB2 タンパク質発現分布を解析した。EV71 を異なる経路で接種し、神経病原性発現の有無を観察した。更に神経病原性発現マウスの組織中のウイルス力価測定および組織染色によりウイルス増殖部位を特定した。異なる EV71 株を接種し、神経症状の有無を観察した。また hSCARB2-Tg マウスの週齢による EV71 に対する感受性を試験した。更に hSCARB2-Tg マウス系統間のヒト SCARB2 発現量と EV71 に対する感受性を比較した。

(2) ヒト SCARB2 ノックインマウス

マウス SCARB2 エクソン 4 領域をヒト型に組換えターゲットベクターの作製し、マウス ES 細胞への導入後、キメラマウスを作出する。キメラマウスと cre 組換え酵素を発現するマウスとの交配により、knock-in allele を持つマウスを作製した。このマウス臓器もしくは初代培養細胞から RNA を抽出し、狙い通りの転写並びにスプライシングが起こっているかを調べた。さらにマウス個体に EV71 を感染させ、感受性を獲得したかどうか調べた。

4. 研究成果

(1) ヒト SCARB2 発現トランスジェニックマウス

入手した Bac クローンを C57BL/6 マウス卵細胞へマイクロインジェクションし、生まれた

99 匹の仔マウスのジェノミック PCR を行ったところ 6 系統 (Tg-10、Tg-16、Tg-22、Tg-24、Tg-49、Tg-75) 得た。ヒト SCARB2 発現部位をウエスタンブロット法と免疫組織化学により確認したところ全身の臓器で発現を確認した。特に中枢神経系においては神経細胞が最も強く染色され、発現レベルが高いことが推測された。次に EV71/Isehara/Japan/99 株を接種したところ 4 系統 (Tg-10、Tg-16、Tg-22、Tg-49) で四肢の弛緩性麻痺や運動失調などの神経症状を示した (図 1)。Tg-10 マウスを用いて接種経路による感受性比較を行ったところ、脳内、静脈内、腹腔内および胃内接種により神経症状を発現した (表 1)。静脈内接種により神経症状を発現したマウスでは脳および脊髄で高いウイルス力価を示した (図 2)。組織染色により脳および脊髄の神経細胞にウイルス抗原を検出した。更に EV71 ウイルス株間での病原性の違いを比較するため、3 週齢の Tg-10 マウスに BrCr/USA/70、SK-EV006/Malaysia/97、C7/Japan/97、EV71/Isehara/Japan/99 株を 1×10^6 TCID₅₀ 脳内接種し、病態を観察したところ、試験した全てのウイルス株の感染により、神経症状を発現した。またコクサッキーウイルス A16 (CVA16) G-10 株を 1×10^6 TCID₅₀ 脳内接種したところ神経症状を発現した。マウス週齢における EV71 に対する感受性を比較するため、6、10、14 週齢の Tg-10 マウスに EV71/Isehara/Japan/99 株を 1×10^6 TCID₅₀ 脳内接種すると、四肢の弛緩性麻痺や運動失調などの神経症状を示した。次に、hSCARB2-Tg マウス系統間の感受性を比較するため、Tg-10、16、22、49 系統のトランスジェニックマウスに EV71/Isehara/Japan/99 株を 1×10^4 および 1×10^5 TCID₅₀ 静脈内接種した結果、Tg-16 系統が最も感受性が高く、他の 3 系統は同程度であった。定量 RT-PCR をおこなったところ Tg-16 系統で最もヒト SCARB2 発現量が高かった。hSCARB2-Tg マウスの性状解析から、hSCARB2-Tg マウスにおける病態と EV71 標的部位はヒトの症例と類似していることからよい EV71 感染動物モデルであると考えられる。ただし、感受性が弱いモデルとしてはまだ充分ではない。最も強い感受性を示す Tg-16 系統はホモ化することが出来ないため、系統維持には不利である。マウス系統間の比較からヒト SCARB2 発現量に依存して EV71 に対する感受性が高まることが示唆されている。従って、神経病原性解析により有用なマウスモデルを樹立するためには、よりヒト SCARB2 発現量が高く、感受性が強く、かつホモ化可能で系統維持が有利である系統が必要である。



図 1. EV71/Isehara/Japan/99 株を脳内接種により左後肢に麻痺を示した hSCARB2-Tg マウス

接種経路	mouse	Viral inoculation dose (Log ₁₀ TCID ₅₀ /animal)							
		1	2	3	4	5	6	7	8
脳内	non-Tg	-	-	-	-	-	0/18*	-	-
	Tg	0/18	2/18	13/18	11/18	17/18	18/18	-	-
静脈内	non-Tg	-	-	-	-	-	0/18	-	-
	Tg	0/18	7/18	4/18	4/18	4/18	16/18	-	-
腹腔内	non-Tg	-	-	-	-	-	0/18	-	-
	Tg	-	0/18	2/18	2/18	5/18	7/18	-	-
胃内	non-Tg	-	-	-	-	-	-	-	0/10
	Tg	-	-	-	-	-	1/20	1/20	0/10

表 1. 接種経路による神経症状発現率の比較
EV71/Isehara/Japan/99 株を 3 週齢の Tg マウスに接種し、3 週間病態観察を行った。*神経症状発現マウス匹数/全接種マウス匹数

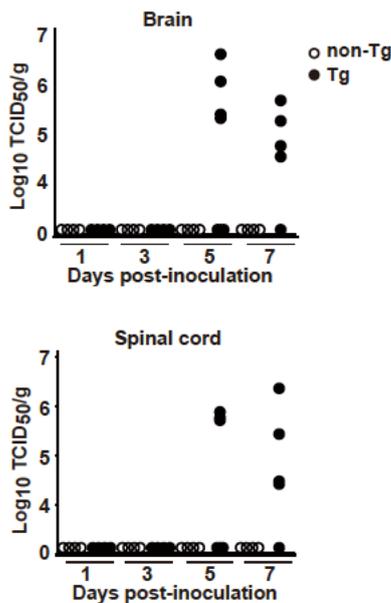


図 2. ウイルスの主な増殖部位。
EV71/Isehara/Japan/99 株静脈接種後、臓器を採取し、ウイルス力価を測定した。神経症状を示した Tg マウスの脳および脊髄で高いウイルス力価を検出した。その他の臓器では検出限界以下であった。

(2) ヒト SCARB2 ノックインマウス

ヒト SCARB2 エクソン 4 を置換するためのターゲティングベクターを作製、C57BL/6 マウス ES 細胞への導入し、生まれた仔マウスを調べたところ優良キメラマウス 6 匹を得た。しかしながら予想外にノックインマウスではエクソン 4 を飛ばしてスプライシングが

起こる mRNA が殆どであり、目的の mRNA は殆どできていないことが判明した。個体にウイルスを感染させた場合も hSCARB2-Tg マウスで観察されたような神経症状は観察されなかった。本来はスプライシング異常の原因を追求して新たなマウスを作製することが正当な手段である。現在、このエクソン 3-4 間のスプライシング問題を回避するため、エクソン 3 にヒト SCARB2 エクソン 4-12 が直接繋がったキメラマウス SCARB2 を発現するノックインマウスの作製に取り掛かっている。

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)

[学会発表] (計 7 件)

(1) Ken Fujii Transgenic mouse model for EV71 infection The 2nd Meeting on RNA and Biofunctions-ASIA Study “RNA Biofunctions and Viruses” 2013 年 1 月 9 日～2013 年 1 月 11 日 Fukuoka

(2) 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 年 11 月 13 日～2012 年 11 月 15 日 大阪

(3) Ken Fujii, Noriyo Nagata, Seiya Yamayoshi, Midori Shimanuki, Hiroshi Shitara, Choji Taya and Satoshi Koike Development of a transgenic mouse model for EV71 infection. The 34th NAITO CONFERENCE ON Infection, Immunity and their Control for Health: Mucosal Barrier, Pathogen and Vaccine. 2012 年 10 月 16 日～2012 年 10 月 19 日 Hokkaido

(4) Ken Fujii, Noriyo Nagata, Kum Thong Wong, Kien Chai Ong, Seiya Yamayoshi, Midori Shimanuki, Hiroshi Shitara, Choji Taya and Satoshi Koike. Generation of novel mouse model for study of EV71 neuropathogenesis. The 16th Annual Meeting of Japanese Society for Neurovirology 2012 年 8 月 30 日～2012 年 8 月 31 日 Tokyo

(5) Ken Fujii, Noriyo Nagata, Seiya Yamayoshi, Midori Shimanuki, Hiroshi Shitara, Choji Taya and Satoshi Koike. Establishment of a transgenic mouse model for EV71 infection. The 17th Meeting of European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses. 2012 年 6 月 3 日～2012 年 6 月 7 日 Saint Raphael, France

(6) 藤井健、山吉誠也、小池智、エンテロ

ウイルス 71 感染モデルマウスの作出、感染症
若手フォーラム、2012年2月2日～2012年2
月4日 長崎

(7) 藤井健、山吉誠也、設楽浩志、多屋長
治、小池智、EV71 感染受容体ヒト SCARB2
発現マウス作出の試み、第15回日本神経ウイ
ルス研究会、2011年5月19日-2011年5月20
日 金沢

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし