

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460583

研究課題名(和文) 運動神経細胞におけるエンテロウイルス感染複製機構のイメージング解析

研究課題名(英文) Imaging analysis of Enterovirus-infected motoneurons

研究代表者

大岡 静衣 (OHKA, Seii)

公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・主席研究員

研究者番号：80313097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：エンテロウイルス71 (EV71) が *in vivo* および *in vitro* で運動神経細胞を逆行性輸送される系が存在することを示した。培養細胞ではEV71感染20分～30分後に脱殻が進行していた。脱殻の時期にEV71はmannose-6-phosphate receptor (M6PR) およびRab9、lysosome-associated membrane glycoprotein 2 (LAMP2) 陽性小胞に存在した。さらに、M6PRがEV71感染初期過程に重要であることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Enterovirus 71 (EV71) was retrogradely transported in axon of motoneuron *in vivo* and *in vitro*. In cultured cells, EV71 was uncoated from 20 to 30 minutes after the infection. The uncoating was observed at vesicles with mannose-6-phosphate receptor (M6PR), Rab9 and lysosome-associated membrane glycoprotein 2 (LAMP2). Furthermore, knockdown experiments showed that M6PR was important for early stage of EV71 infection.

研究分野：ウイルス学

キーワード：エンテロウイルス71 脱殻機構 感染初期過程

### 1. 研究開始当初の背景

ポリオウイルス (PV) は小児まひ、エンテロウイルス 71 (EV71) は手足口病の原因ウイルスで、いずれも運動神経細胞 (MN) 向性である。エンテロウイルスは、エンベロープを持たず、 capsid にゲノムが包まれたプラス鎖 1 本鎖の RNA ウイルスである。経口で侵入し、血中に入りウイルス血症を引き起こした後、血液脳関門を透過して中枢神経系内へ侵入し、MN 選択的に感染し脱落させ、麻痺を生じさせるのが主な感染経路と考えられている。ヒトにおいて両ウイルスはよく似た運動神経症状を示す。より研究が進んでいる PV では、骨格筋へ投射している MN を経由して、骨格筋から直接中枢神経系へウイルスが侵入する神経経路がヒトで存在することが知られている。EV71 にも神経経路の存在が予想される結果が得られたとの報告が Wong KT 教授らにより、2012 年 8 月に行われた国際会議 (Symposium “Current Progress in Enterovirus 71 Research in The Asia-Pacific Region”) であった。

PV の受容体はヒト PV 受容体 (hPVR/CD155) である。一般にマウスは PV 非感受性であるけれども、hPVR を発現させた hPVR-トランスジェニック (Tg) マウスは PV 感受性を獲得したことから、PVR が PV の種特異性を決定していることが明らかになっている。この hPVR-Tg マウスにおいても PV の神経経路が存在している。この神経経路において、PV がシナプスから hPVR によってエンドサイトーシスされ、hPVR 含有小胞に内包されて逆行性軸索輸送されることを代表者らは明らかにした (Ohka S, et al., *Virology*, 1998; Ohka S, et al., *J. Virol.*, 2004)。したがって、MN では、エンドサイトーシスによりウイルス粒子が細胞内部へ取り込まれた後、エンドソームとして細胞体へ輸送され、細胞体でウイルス粒子の構造変化が起こり、ウイルスゲノムが粒子から放出され脱殻すると考えられる。また、軸索内部で PV は hPVR と共存しているため脱殻が進行してもおかしくない状況下にもかかわらず、感染性を維持したまま細胞体へ到達していることも示した (Ohka S, et al., *Virology*, 1998)。

非極性細胞であるヒト子宮頸がん細胞由来 HeLa 細胞における PV 脱殻については、細胞表面に存在する hPVR に PV 粒子が結合してエンドサイトーシスされた後、速やかにウイルス粒子の構造変化が起こり、粒子内部にあるウイルスゲノムが細胞質内へ放出され、細胞質内でウイルス複製が開始されると考えられている。一方、極性細胞である神経細胞においては、脱殻に至る過程について代表者らが明らかにした以上のことは解明されていない。

このように、先行している PV についてですら、最終ターゲットとして重要な MN での PV 感染過程が、依然として未解明のままである。EV71 については、神経経路の存在や MN

内での挙動が未だ解明されてはならず、現在非極性細胞で感染初期過程の解析を行っている段階である。代表者は EV71 が EV71 受容体である Scavenger receptor B2 (SCARB2) 発現細胞で効率よくエンドサイトーシスされることを、また、山吉らは SCARB2 が酸性下で EV71 の構造変化を効率よく引き起こすことも発見した。SCARB2 発現 Tg マウスが樹立され、神経病原性も確認されたことから、この Tg マウスを用い、MN での EV71 感染伝播・複製機構を解析できる。MN における両ウイルスの取り込みから脱殻・複製に至る過程を解明することは、両ウイルスの MN 内複製機構を理解するために非常に重要なだけではなく、最終ターゲットでの複製に至るウイルスの伝播機構解明にも繋がる。

従来の細胞培養系における感染実験では、細胞体側とシナプス側を分離培養できなかったため、両方にウイルスを感染させるしかなかった。より *in vivo* を反映した結果を得るためには、*in vivo* で見られるシナプス側からのみの感染を初代 MN 系で再現することが必須である。代表者らは、Polydimethylsiloxane (PDMS) デバイスを用い、初代 MN を細胞体側とシナプス側に分離して培養する系の確立に既に成功した。代表者らは、この系において、細胞体側からの PV 感染による細胞変性効果発現効率の方がシナプス側よりも高く、細胞体側とシナプス側では PV 感受性あるいは感染様式が異なっている可能性を示した。したがって、従来の細胞培養系感染実験では、主に細胞体からの感染現象を観察してきた可能性が高い。実際の生体内では、シナプス側からの感染が主であると考えられることから、これまでの観察結果は実態を反映していない可能性が高く、今後は分離培養下での感染実験が必須であると考えられる。

### 2. 研究の目的

PV、EV71 の最終ターゲットである運動神経細胞でのウイルス感染複製機構の解明は、非常に重要である。PV は、骨格筋へ投射している運動神経シナプスから取り込まれ逆行性軸索輸送され直接中枢神経系へ侵入することから、代表者らは運動神経における PV 感染モデルを確立し *in vivo* の研究を行ってきた。また、*in vivo* での感染伝播時同様に、運動神経初代細胞シナプス側からのみウイルスを感染させる培養系を、分離培養デバイスを利用し確立した。そこで、これらの系を用い、どのように PV、EV71 が軸索輸送され脱殻の場へ到達し、脱殻・複製するのか、を明らかにし、運動神経細胞での PV、EV71 感染・複製機構を解明する。

### 3. 研究の方法

PV 粒子 capsid とゲノムの蛍光標識方法を確立・最適化し、PV の capsid とゲノムを初代運動神経細胞内でリアルタイム観

察した。分離培養チャンバーを用いた初代運動神経細胞への軸索末端側からのみ、または細胞体側からのみの PV・EV71 感染を行い、逆行性輸送が特異的に行われているかを、ウイルス力価測定・免疫細胞染色により検討した。EV71 受容体 SCARB2 発現・非発現マウスの in vivo 坐骨神経経路での EV71 取り込み・軸索輸送機構を解析した。また、SCARB2 高発現ヒト胎児横紋筋肉腫 (RD) 細胞における、EV71 感染初期過程を、光感受性 EV71 感染、in situ 免疫細胞染色、免疫細胞染色、透過電子顕微鏡観察、免疫電子顕微鏡観察により検討した。また、EV71 感染初期過程に関連が予想される分子のノックダウン(KD) RD 細胞での EV71 感染効率を検討した。

#### 4. 研究成果

PV のキャプシドとゲノムを両方標識したウイルスの作製に成功し、蛍光顕微鏡下、初代運動神経細胞の軸索内で逆行性輸送を観察した。PV のキャプシドとゲノムは両方が同一小胞内で逆行性輸送されており、ゲノムのみが輸送されている小胞は観察出来なかったことから、PV の神経経路では粒子として逆行性輸送されたものが細胞体に到達し複製に寄与すると考えられる。

EV71 受容体発現マウスに EV71 を下腿背側に筋注後、投与後 3 日目に半数以上の脊髄内からウイルスが検出された。さらに、坐骨神経切断後に EV71 を下腿背側に筋注したところ、投与 3 日目に脊髄内からウイルスが検出されるマウスはいなかった。したがって、坐骨神経経路で脊髄内へウイルスが到達し複製を開始する経路がある可能性が示された。分離培養チャンバーで培養した SCARB2 発現運動神経初代細胞に EV71 を軸索末端側から感染させたところ、経時的に細胞体で複製したウイルスが検出されるようになったのに対し、細胞体から感染させたところ、軸索末端側にはウイルスが検出されるようにならなかったことから、EV71 は軸索内を逆行性輸送されていることを明らかにした。

培養細胞において EV71 の脱殻機構を解析した。光感受性 EV71 の作製系を確立し、作製した光感受性 EV71 を用いて、感染後いつ脱殻が行われるかを検討した。その結果、感染 10 分後には脱殻しておらず、感染 20 分後には脱殻が進行しており、感染 40 分後には脱殻完了していた。In situ 免疫細胞染色の結果からは、感染 10 分後には脱殻しておらず、感染 20 分後からわずかに脱殻が始まり、感染 30 分後にはかなり脱殻が進行していた。脱殻の時期にどの細胞内小器官に局在しているかを免疫細胞染色で検討したところ、感染 20~30 分後には late endosome マーカーである mannose-6-phosphate receptor (M6PR) および Rab9、lysosome-associated membrane glycoprotein 2 (LAMP2) と共局在し、感染 40 分後には Rab9、LAMP2 と共局在していた。以上の結果から、脱殻の時期には

late endosome か、late endosome からオートファゴソーム系に入った amphisome に存在することが判明した。透過電子顕微鏡観察でも、感染 20 分後には late endosome 中に、感染 30 分後には autophagosome 隔離膜内部に EV71 様粒子が確認できた。EV71 感染初期に関与すると考えられるオートファジー経路の阻害剤 3-メチルアデニン(3-MA)存在下、EV71 の細胞内局在を検討したところ、感染 40 分後でも LAMP2 とは共局在せず、EV71 は late endosome に留まることがわかった。

EV71 感染初期過程に関連が予想される RAB5、RAB7、RAB9、Cation-dependent Mannose-6-phosphate Receptor(M6PR)、Insulin-like Growth Factor 2 Receptor(IGF2R)、Clathrin の siRNA を用いたノックダウン(KD)細胞における EV71 感染効率を検討した。その結果、M6PR と IGF2R の KD 細胞での EV71 感染効率が有意に減少し、これらの分子が EV71 感染初期過程に重要であることが示唆された。M6PR と IGF2R の KD 細胞で EV71 感染効率が有意に減少したのは、M6PR と IGF2R は細胞内で EV71 の脱殻を促進し abortive infection を抑制するが、M6PR や IGF2R の存在量が低下すると、EV71 の脱殻が抑制され abortive infection が促進されるためである可能性が考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yamaoka S, Ito N, Ohka S, Kaneda S, Nakamura H, Agari T, Masatani T, Nakagawa K, Okada K, Okadera K, Mitake H, Fujii T, Sugiyama M. (2013) Involvement of Rabies Virus Phosphoprotein Gene in Neuroinvasiveness. J Virol. 査読有、87:12327-12338.

doi: 10.1128/JVI.02132-13

〔学会発表〕(計 8 件)

Sei OHKA, Eri MATSUURA, Katsutoshi OGASAWARA, Tomohito HANASAKA, Kinji ISHIDA, Ken FUJII, Chong Pele Choi-Sing, Ken-ichi HANAKI, Satoshi KOIKE Analysis of uncoating mechanism for Enterovirus 71 第 63 回日本ウイルス学会学術集会 2015 年 11 月 22 日~24 日 福岡国際会議場 福岡県福岡市

大岡静衣、松浦絵里、小笠原勝利、石田欣二、藤井健、萩原恭二、花木賢二、Chong Pele Choi-Sing、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 2014 年 11 月 10 日~12 日 パシフィコ横浜 神奈川県横浜市

大岡静衣 エンテロウイルス 71 の感染初期過程解析 第 11 回ウイルス学キャンプ in 湯河原 2014 年 9 月 19 日 ニューウェルシ

テイ湯河原 静岡県 熱海市

Seii OHKA, Soon Hao TAN, Ken FUJII, Shohei KANEDA, Hiroko NAKAMURA, Teruo FUJII, Kien Chai ONG, Kum Thong WONG, Satoshi KOIKE hSCARB2-dependent neural pathway for EV71 transmission. EuroPic2014 2014年3月9日~13日 ブランケンベルヘ ベルギー

大岡静衣、藤井健、金田祥平、中村寛子、藤井輝夫、小池智 運動神経初代培養細胞の軸索終末側からのみの感染を可能にするマイクロ流体デバイスを用いたエンテロウイルス感染機構解析 第61回日本ウイルス学会学術集会 2013年11月10日~12日 神戸国際会議場 兵庫県 神戸市

Seii OHKA, Ken FUJII, Shohei KANEDA, Hiroko NAKAMURA, Teruo FUJII, Satoshi KOIKE Analysis of Enterovirus infection in motor neuron using microfluidic culture platform. 第12回あわじしま感染症・免疫フォーラム 2013年9月10日~13日 淡路夢舞台国際会議場 兵庫県 淡路市

大岡静衣 マイクロ流体デバイスを用いたエンテロウイルスの運動神経細胞感染機構解析 第2回若手国内シンポジウム・第6回ナノバイオ若手ネットワークシンポジウム 2013年6月14日 富山県民会館 富山県 富山市

大岡静衣 マイクロ流体デバイスを用いた運動神経細胞分離培養系でのエンテロウイルス感染機構解析 第10回ウイルス学キャンプ in湯河原 2013年5月31日 ニューウェルシティ湯河原 静岡県 熱海市

〔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  
なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

大岡 静衣 (OHKA, Seii)  
公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・主席研究員  
研究者番号：80313097

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

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

藤井 輝夫 (FUJII, Teruo)  
東京大学・生産技術研究所・教授  
研究者番号：30251474

遠山 稿二郎 (TOHYAMA, Koujiro)  
岩手医科大学・歯学部生理学講座・研究員  
研究者番号：10129033

花木 賢一 (HANAKI, Ken-ichi)  
国立感染症研究所・実験動物研究施設・室長  
研究者番号：40376421

金田 祥平 (KANEDA, Syohei)  
東京大学・生産技術研究所・助教  
研究者番号：10542467

### (4)研究協力者

なし