

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860350

研究課題名(和文) エンテロウイルス71神経指向性機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of Enterovirus 71 neurotropism by using EV71 infection model mouse

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：エンテロウイルス71(EV71)は手足口病の原因ウイルスの1つである。EV71感染の手足口病の場合は神経合併症による死亡例が報告されているがその神経病原性および神経指向性のメカニズムは解明されていない。我々はEV71感受性マウスモデルを用いて、自然免疫機構に着目し、個体におけるEV71神経指向性機構の解明を目的として解析を行ったところ、I型IFNが非中枢神経系でのEV71増殖を抑制していることを明らかにした。また非中枢神経系ではTLR7、中枢神経系ではTLR3を中心とし、それぞれの病原体認識受容体が協調してEV71感染防御に関与している可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Enterovirus 71 (EV71) is one of causative agents of hand-foot-mouth disease (HFMD). In EV71 associated HFMD, severe or fatal neurological complications were reported. However, pathogenesis of EV71 is remains unknown. Recently, we generated human SCARB2 transgenic (hSCARB2-Tg) mice model. Here, to understand tropism of EV71, we focused on host innate immune systems. Type I IFN receptor knockout (AR1KO) hSCARB2-Tg mice are highly susceptible to EV71 infection. Viral titers in non-CNS of hSCARB2-Tg-AR1KO mice are higher than that of hSCARB2-Tg wild type mice, suggesting that type I IFN is important for control of EV71 infection in non-CNS. Furthermore, we analyzed features in RNA sensor knockout hSCARB2-Tg mice (MDA5KO, TLR3KO and TLR7KO). The hSCARB2-Tg-TLR7KO mice are slightly susceptible to EV71. EV71 seems to be able to replicate more effectively in the CNS of TLR3 deficient mice. Based on these data, we speculate that both TLR3 and TLR7 may affect EV71 infection in hSCARB2-Tg mice.

研究分野：ウイルス学

キーワード：エンテロウイルス 神経病原性 神経指向性 自然免疫

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の 1 つである。近年、アジア-太平洋地域で手足口病の大流行が起こり、特に EV71 感染では神経症状を伴う死亡例が報告されている。しかし、その神経病原性発現機構については不明である。我々は EV71 感染受容体である hSCARB2 を発現したマウス (hSCARB2-Tg マウス) を作製した。hSCARB2-Tg マウスを用いた解析により EV71 が選択的に神経細胞に感染することで神経症状を発現することが明らかになった。しかし、非神経組織でも受容体である受容体である hSCARB2 は発現しているにも関わらず、なぜ神経指向性を示すのかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究は hSCARB2-Tg マウスを用いて個体内における EV71 神経指向性機構の解明を目的とした。標的組織決定においてはウイルス増殖に必要な宿主因子とウイルス感染防御に関わる宿主因子を考慮する必要がある。本研究では自然免疫機構の 1 つである I 型インターフェロン (IFN) システムとの関わりに着目し以下の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) EV71 感染における I 型 IFN 産生の解析
個体内での I 型 IFN 応答を調べるため、hSCARB2-Tg(WT) マウスに EV71/Isehara (Isehara) 株を 1×10^6 TCID₅₀ 静脈内接種し、接種後 6、12、24 時間後の血中 IFN- α 産生量を ELISA により定量した。

(2) I 型 IFN の EV71 感染における効果

I 型 IFN の病態への関与を解析するため WT マウスと I 型 IFN 受容体欠損 hSCARB2-Tg (AR1KO) マウスに Isehara 株を 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 TCID₅₀ 静脈内接種し、病態比較を行った。更に I 型 IFN のウイルス増殖に対する影響を調べるため、WT と AR1KO に Isehara 株を 1×10^6 TCID₅₀ 静脈内接種し、病態発現時の各臓器中のウイルス力価をマイクロプレート法で算出した。

(3) EV71 認識センサーの同定および解析

EV71 感染を認識するセンサーを特定するため、ウイルス認識センサーである MDA5、TLR3、TLR7 を欠損したマウス (MDA5KO、TLR3KO、TLR7KO) を作製し、Isehara 株を 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 TCID₅₀ 静脈内接種し、病態比較を行った。またウイルス増殖に対する影響を調べるため、WT と上記センサー欠損マウスに Isehara 株を 1×10^6 TCID₅₀ 静脈内接種し、病態発現時の各臓器中のウイルス力価をマイクロプレート法で算出した。

(4) EV71 感染における中枢サイトカイン産生比較

EV71 感染時の中枢でのサイトカイン産生量を比較するため、上記 WT と上記センサー欠損マウスに Isehara 株を 1×10^6 TCID₅₀ 静脈内接種し、病態を発現した個体の脳と脊髄中の IFN- α 、IL12p40、IL6 を ELISA により定量した。

4. 研究成果

(1) I 型 IFN の EV71 感染における効果

WT マウスにおいて IFN α は接種 6 時間後には産生されており、12、24 時間後と減少していた (図 1)。

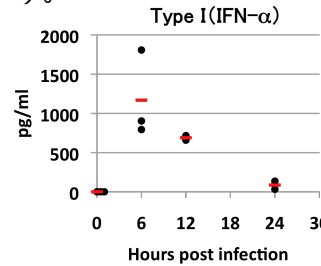


図 1: EV71 感染 hSCARB2-Tg-WT マウスの血中 I 型 IFN 産生

(2) I 型 IFN の EV71 感染における効果

1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 接種の生存率は WT ではそれぞれ 100%、80%、50% であり、AR1KO では 40%、20%、0% であった (図 2)。

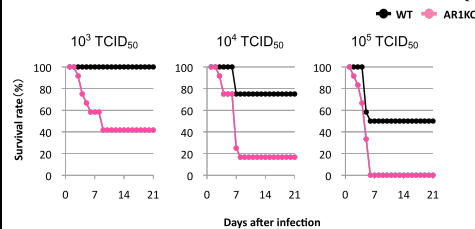


図 2: hSCARB2-Tg-WT マウスと hSCARB2-Tg(AR1KO) マウスの感受性比較

脳と脊髄においては WT、AR1KO ともに 10^5 - 10^6 TCID₅₀/g のウイルス力価であった。非神経系においては WT で検出限界以下であったのに対して AR1KO では EV71 増殖がみられ、特に肝臓、脾臓では 10^8 TCID₅₀/g 以上のウイルス力価を検出した。(図 3)。

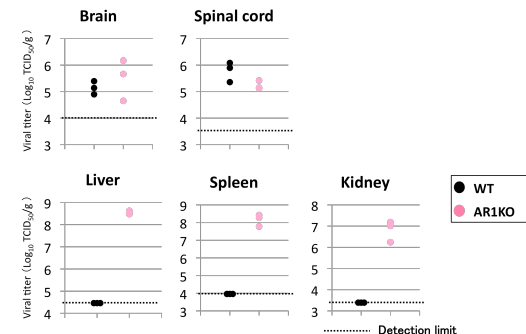


図 3: hSCARB2-Tg-WT マウスと hSCARB2-Tg(AR1KO) マウスでのウイルス増殖比較

以上のことから hSCARB2-Tg マウスでは EV71 感染により I 型 IFN が産生され、また I 型 IFN 受容体欠損マウスの非神経組織で EV71 増殖が認められることから I 型 IFN は EV71 標的組織決定に重要であると結論された。

(3) EV71 認識センサーの同定および解析

1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 接種の生存率は WT ではそれぞれ 80%、80%、30%、MDA5KO では 100%、90%、40%、TLR3KO では 90%、75%、20%、TLR7KO では 100%、20%、20%であり、TLR7KO マウスは僅かに感受性が高くなっていた。(図 4)。しかし、各センサー欠損マウスでのウイルス力価は非神経系においては WT と同様検出限界以下であった。一方、中枢神経系においては WT と比較して TLR3KO マウスにおいて 10 倍高い値を示した(図 5)。

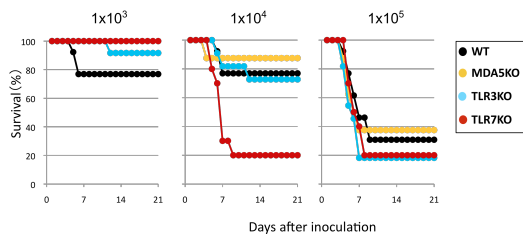


図 4：各センサー欠損マウスの感受性比較

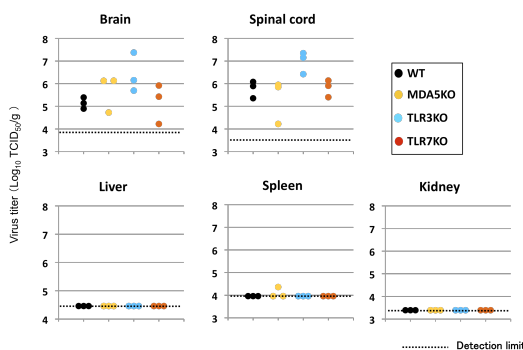


図 5：各センサー欠損マウスのウイルス増殖比較

(4) EV71 感染における中枢サイトカイン産生比較

神経症状発現時における WT マウス脊髄中の平均サイトカイン産生量は IFN- α :61pg/ml、IL12p40:1400pg/ml、410pg/ml であった。それに対し、MDA5 欠損マウスでは IFN- α 産生量が低い値を示した。TLR3 欠損マウスはどのサイトカイン産生量も低く、特に IL12p40 は検出限界以下であった。TLR7 欠損マウスにおいては IFN- α と IL6 産生量は WT と同等であり、IL12p40 は低い値を示した(図 6)。この結果から TLR3 は hSCARB2-Tg マウスの中枢神経系での EV71 感染認識に重要であることが示唆された。

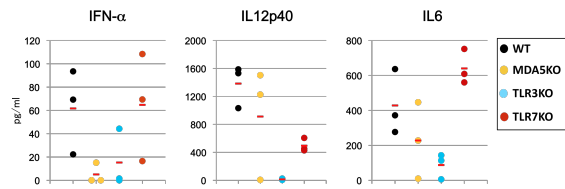


図 6：脊髄中のサイトカイン産生比較

以上の結果から hSCARB2-Tg マウスにおいて特定の病原体認識センサーのみが EV71 感染を感知し標的組織決定に関わっているのではなく、特に TLR3 と TLR7 経路を中心とし、それぞれの病原体認識受容体が協調して EV71 感染防御に関与し、EV71 標的組織決定に寄与している可能性が考えられる。この仮説を検証するため、現在、センサーの多重欠損マウスを作製し、解析を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

(1) Yamayoshi S, Fujii K, Koike S. 2014. Receptors for enterovirus 71. *Emerg. Microbes. Infect.* 3:e53. DOI: 10.1038/emi.2014.49. (査読有り)

(2) 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 neuropathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:14753-14758. DOI: 10.1073/pnas.1217563110. (査読有り)

(3) 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. DOI: 10.1128/JVI.02070-12. (査読有り)

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) Fujii K and Koike S. Analysis of viral RNA sensors for control of EV71 infection 第 63 回日本ウイルス学会学術集会 2015 年

11月22日 福岡国際会議場（福岡県福岡市）
[ポスター]

なし

(3)連携研究者
なし

(2) Fujii K and Koike S. The role of Type I Interferon system for control of EV71 Infection 第14回あわじしま感染症・免疫フォーラム 2015年9月11日 淡路夢舞台国際会議場（兵庫県淡路市）[口演]

(3) 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抑制されている 第62回日本ウイルス学会学術集会 2014年11月10日 パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）[口演]

(4) 藤井健、永田典代、小池智 hSCARB2-Tgマウスを用いたEV71標的組織決定機構の解析 第61回日本ウイルス学会学術集会 2013年11月11日 神戸国際会議場（兵庫県神戸市）[ポスター]

(5) Fujii K and Koike S. A SCARB2-transgenic mouse model for the study of enterovirus 71 pathogenesis. 第12回あわじしま感染症・免疫フォーラム 2013年9月11日 淡路夢舞台国際会議場（兵庫県淡路市）[口演]

〔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：
<http://www.igakuken.or.jp/neurovirology>

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