

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860832

研究課題名(和文) エンテロウイルス71の感染メカニズムの解明 -PSGL-1受容体を通して-

研究課題名(英文) The mechanism of infection of enterovirus71: through the receptor PSGL-1.

研究代表者

片岡 周子 (Kataoka, Chikako)

国立感染症研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：10646623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではEV71受容体であるPSGL-1に結合するPSGL-1 binding型(PB)と非結合型(non-PB)のEV71を用いて、感染モデル動物であるカニクイザルによる感染実験を行った。その結果、体内でPBはカプシドタンパクの145番目のGがEに変異したnon-PB変異体となりPSGL-1非依存的に中枢神経系まで到達し、non-PBは効率良く増殖し、中枢神経系におけるウイルス増殖と病原性発現に関与することが示唆された。カプシドタンパクの145番目のアミノ酸は非ヒト霊長類モデルにおいてウイルスの複製と病原性に関わる決定因子であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：We identified PSGL-1 as an EV71 receptor before. In this study, we investigated viral replication, genetic stability, and the pathogenicity of PSGL-1-binding (PB with VP1-145G) and PSGL-1-nonbinding (non-PB with VP1-145E) strains of EV71 in a cynomolgus monkey model. Mild neurological symptoms, transient lymphocytopenia, and inflammatory cytokine responses were found predominantly in the non-PB-inoculated monkeys. After inoculation with EV71, almost all EV71 detected in clinical samples, central nervous system (CNS), and non-CNS tissues of both inoculated groups, possessed VP1-145E, suggesting a strong in vivo selection of VP1-145E variants and CNS spread presumably in a PSGL-1-independent manner. Thus, VP1-145E variants are mainly responsible for the development of viremia and neuropathogenesis in a non-human primate model, further suggesting the in vivo involvement of amino acid polymorphism at VP1-145 in cell-specific viral replication and pathogenesis in EV71-infected individuals.

研究分野：ウイルス学

キーワード：エンテロウイルス 感染動物モデル 選択圧

1. 研究開始当初の背景

(1) エンテロウイルス 71 (EV71)は手足口病の主な原因ウイルスである。EV71 に感染しても一般的には不顕性感染もしくは軽度な症状で治まることが多いが、時として、無菌性髄膜炎や急性脳炎、神経原性肺水腫など重篤な中枢神経合併症を引き起こし死に至るケースもある。しかしながら EV71 による重篤な中枢神経疾患発症を規定する要因と発症機構については、今のところ、ほとんど分かっておらず、ワクチンや抗ウイルス薬もないのが現状である。1990 年代後半以降から東アジア地域において乳幼児の急性死症例の流行が報告されているが、その多くは EV71 脳炎によるものと考えられている。

(2) 我々は EV71 の受容体として PSGL-1 を同定し (Nishimura Y. *et al.* Nat Med. 15(7):794-7 2009) EV71 には PSGL-1 に結合する PB 型と結合しない non-PB 型が genogroup に関係なく存在することが分かっている。ウイルスの PSGL-1 への結合性はカプシドタンパク VP1 の 145 番目のアミノ酸によって規定されていることを明らかにしているが、EV71 の感染や細胞内での増幅や複製にどのように PSGL-1 が関わっているのかはまだ分かっていない。

2. 研究の目的

現在までに申請者らは *in vitro* における PSGL-1 依存的 EV71 感染機構を解析してきたが、*in vivo* における EV71 の感染及び病原性発現における PSGL-1 受容体の関与は未だ不明である。ヒトに近い感染動物モデルであるカニクイザルを用いた PB と non-PB 型ウイルスの感染実験を通して、EV71 の PSGL-1 依存的な感染の役割だけでなく、*in vivo* での感染・病原性発現における EV71 の増殖機構、さらには EV71 が中枢神経合併症を引き起こすメカニズムを解明する事を目的とした。

3. 研究の方法

EV71-02363 株感染性クローン (non-PB 型; 02363-KE) および VP1 アミノ酸 (VP1-98 および VP1-145) に変異を導入した感染性クローン (PB 型; 02363-EG) を作製し、ヒト横紋筋肉腫由来細胞である RD 細胞にてクローン由来ウイルスストックを調整した。PB あるいは non-PB ウイルスをそれぞれ 4 頭ずつのカニクイザルに静脈内接種し ($10^{6.3}$ CCID₅₀/monkey) 中枢神経症状を含む臨床症状の発現を観察した。感染後 0・3・7・10 日目には臨床検体 (末梢血、直腸拭い液、咽頭拭い液、髄液) を採取した。重篤な神経症状は認められず、いずれも感染 10 日目に解剖し、心臓・肝臓・脾臓などの主要臓器や脳・脊髄などの中枢神経系組織を採取した。採取したサンプル中のウイルス検出には、RD 細胞を用いたウイルス分離や、エンテロウイルスを高感度に検出する事ができる

consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primer (CODEHOP) RT-PCR や VP1 全領域を増幅する RT-PCR を行った。

4. 研究成果

(1) 全てのサルにおいて、重篤な神経症状や手足口病のような症状は観察されなかった。02363-KE 接種群のみ振戦や握力の低下などの軽度の神経症状を示したが、一方の 02363-EG 接種群では明らかな神経症状を示さなかった。

(2) 両感染群の末梢血中の CD3+CD4+細胞、CD3+CD8+細胞、B 細胞、NK 細胞数を測定したところ、02363-KE 接種群では感染後 3 日目に全ての細胞数が減少し、その後回復がみられた。一方、02363-EG 接種群では細胞数の変動はみられなかった。

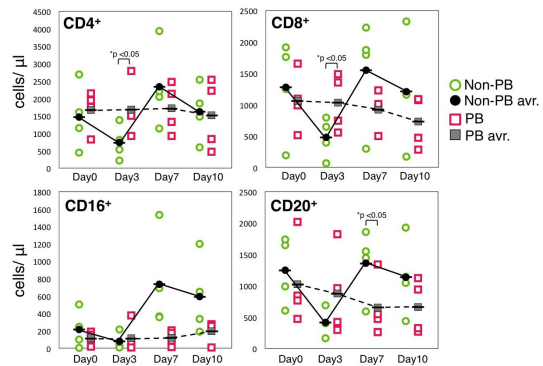


図1 感染後3・7・10日目における末梢血中のリンパ球数

(3) 両感染群の血清中の中和抗体価を測定したところ、どちらの群でも EV71 に対する抗体の中和能が感染後 7 日目から増加しており、どちらの群も EV71 感染が成立していたことが確認された。さらに感染 10 日目の血清を用いて、02363-KE 接種群サルの血清の 02363-EG ウイルスに対する交叉中和能、及び 02363-EG 接種群サルの血清の 02363-KE ウイルスに対する交叉中和能も測定し、どちらの接種群のサル血清も交叉中和能を持つ事が明らかになった。

(4) EV71 感染による脳炎や肺水腫など重症患者で高値であることが報告されているサイトカイン (TNF α , IL-6, IFN- γ) と EV71 感染において予後不良の患者で高値であることが報告されているサイトカイン (IL-1 β , G-CSF, IL-1RA) について、両感染群サルの血清中の濃度の解析したところ、IL-1 β は両群において感染 3 日目以降、上昇がみられた。その他のサイトカインについては、02363-KE 接種群の値は感染後 3 日目や 7 日目には感染前より高い傾向がみられたが、02363-EG 接種群では感染前と比較してほぼ変化が見られなかった。

(5) 感染 0、3、7、10 日後に採取した臨床検体と感染 10 日目の剖検採材中のウイルスの検出をおこなった。検出法としては CODEHOP-PCR で VP1 の一部の領域を増幅、または RT-PCR にてウイルスの VP1 全領域を増幅した後、シーケンス解析を行った。その結果、02363-KE 接種群では、感染初期の臨床検体から高頻度にウイルスが検出され、そのアミノ酸配列は VP1-98K が E に変異したものが多く検出されたが VP1-145 は E のまま変異しておらず、そのフェノタイプは non-PB のままであった。一方、02363-EG 接種群では、感染初期の臨床検体からはウイルスが検出されなかったが、感染後期の血清や PBMC ではウイルスが検出された。検出されたウイルスのほとんどが VP1-98E のままであったが、VP1-145G から E に変異しておりフェノタイプも PB から non-PB に変異していた。しかし、02363-EG を接種したサル 4 頭のうち 2 頭の感染後 10 日目の PBMC からは変異を有していない PB 型のウイルスが検出された。さらに 02363-EG 接種群の中樞神経系組織からは 02363-KE 接種群と比較して高頻度にウイルスが検出・分離されたが、そのアミノ酸配列は全て VP1-145E を持つ non-PB 型に変異している事が分かった。

(6) 中樞神経組織の病理学的解析では、02363-KE 接種群全頭と 02363-EG 接種群のうち中樞神経組織から高頻度にウイルスが検出されたサルにおいて神経細胞の変性・壊死と炎症所見が観察された。しかし、その組織病変の程度に明らかな差は見られなかった。

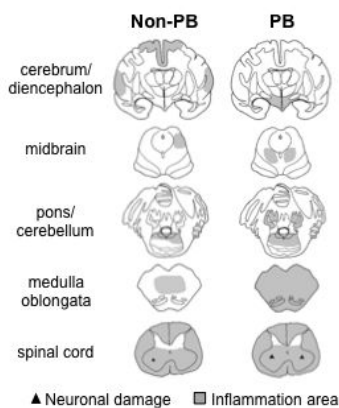


図2 non-PBとPB接種サルの中樞神経組織における病変の分布

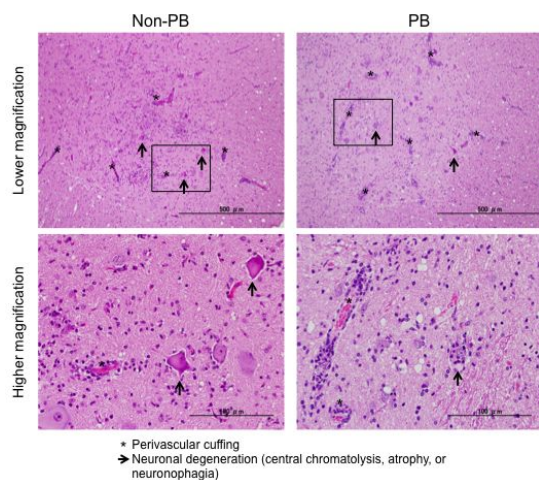


図3 non-PBとPBサルの脊髄のH&E染色

(7) 以上の結果より、EV71 感染動物モデルであるカニクイザルにおいて、non-PB が効率良く増殖し、中枢神経系におけるウイルス増殖と病原性発現に関与することが示唆された。PB は感染後早い段階で 145 番目の G が E に変異した non-PB 変異体となり PSGL-1 非依存的に CNS まで到達したと考えられる。145 番目のアミノ酸の変異/選択のメカニズムは未解明であるが、非ヒト霊長類モデルにおいてウイルスの複製と病原性に関わる決定因子であることが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

(1) Yorihiro Nishimura, Hyunwook Lee, Susan Hafenstein, Chikako Kataoka, Takaji Wakita, Jeffrey M. Bergelson, Hiroyuki Shimizu. Enterovirus 71 binding to PSGL-1 on leukocytes: VP1-145 acts as a molecular switch to control receptor interaction. PLOS Pathogens, 2013; 9 (7): e1003511.

〔学会発表〕(計3件)

(1) 片岡周子、西村順裕、小谷 治、鈴木忠樹、岩田奈織子、網 康至、永田典代、清水博之：エンテロウイルス 71 のカニクイザルにおける病原性の免疫学的解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014.11.10-12、横浜

(2) Chikako Kataoka, Yorihiro Nishimura, Tadaki Suzuki, Osamu Kotani, Naoko Iwata, Noriyo Nagata, Yasushi Ami, Hiroyuki Shimizu: VP1-145 of enterovirus 71 is one of the determinants for pathogenicity in a cynomolgus monkey model. 18th International Picornavirus Meeting, 9-14 March 2014, Blankenberge, Belgium.

(3) 片岡周子、西村順裕、鈴木忠樹、小谷 治、岩田奈織子、永田典代、網 康至、清水博之：エンテロウイルス 71 のカニクイザルにおける病原性の解析。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013.11.10-12、神戸

6 . 研究組織

(1)研究代表者

片岡 周子 (KATAOKA, Chikako)

国立感染症研究所ウイルス第二部第二室
研究員

研究者番号：

(4)研究協力者

清水 博之 (SHIMIZU, Hiroyuki)

西村 順裕 (NISHIMURA, Yorihiro)

脇田 隆字 (WAKITA, Takaji)

網 康至 (AMI, Yasushi)

永田 典代 (NAGATA, Noriyo)

鈴木 忠樹 (SUZUKI, Tadaki)

岩田(吉川)奈織子 (IWATA-YOSHIKAWA, Naoko)

小谷 治 (KOTANI, Osamu)