

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460561

研究課題名(和文) Saffold ウイルス感染は自己免疫疾患(特に 1型糖尿病)のトリガーとなるか？

研究課題名(英文) Will Saffold virus infection be a trigger of autoimmune disease (especially type 1 diabetes)?

研究代表者

姫田 敏樹 (HIMEDA, Toshiki)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80340008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：1型糖尿病および膵炎を対象とした解析結果は、SAFVの膵臓に対する病原性を強く示唆するものであるが、研究期間内に十分な症例数に拡大することができず因果関係を証明するには至らなかった。SAFV感染受容体の同定についても継続中である。一方、本研究において想定していなかった新たな知見が得られた。SAFV VP1の不安定性に関わる責任領域はPEST配列であることが明らかとなった。さらに、他の構造蛋白の共存によりVP1の安定性は向上し、カプシド形成に伴いPEST領域がマスクされVP1の分解が抑制されることが示唆された。加えて、IRES依存的な発現において、未知のウイルス蛋白が産生されることが見出された。

研究成果の概要(英文)：The epidemiological study on type 1 diabetes mellitus and acute pancreatitis strongly suggests the pathogenicity of SAFV to pancreas. However, we could not establish the relationship between the diseases and SAFV infection since the number of cases was not enough. The study of the receptor for SAFV infection is also ongoing. On the other hand, unexpected findings were obtained in this study. We found that the PEST sequence in SAFV VP1 is a responsible element for its instability. The degradation of SAFV VP1 was suppressed with the co-expression of other capsid proteins, suggesting that the PEST sequence is masked and VP1 is stabilized during capsid formation. In addition, unknown viral protein was found, presumably translated from a non-AUG codon in an IRES dependent manner.

研究分野：ウイルス学

キーワード：Saffoldウイルス 糖尿病 膵炎 ウイルス蛋白 感染受容体

1. 研究開始当初の背景

ピコルナウイルス科カルジオウイルス属のウイルスは、これまで“げっ歯類に感染するウイルス”として知られていたが、2007年、ヒトを自然宿主とするカルジオウイルスとして Saffold ウイルス (SAFV) が原因不明の発熱患者の便から初めて分離され注目を集めた。その後 SAFV は、主に上気道炎の咽頭ぬぐい液や胃腸炎の便からしばしば検出され、また、SAFV に対する抗体の保有率調査からヒトは幼少期に SAFV に初感染していることが強く示唆された。しかし一部では、無菌性髄膜炎および死亡例を含む脳炎の髄液、さらには、急性膵炎の便からも SAFV が検出されている。これらのことから、SAFV においても、ピコルナウイルス科エンテロウイルス属のウイルス【エンテロウイルス (主に胃腸炎や手足口病の原因となるが、まれに重篤な脳炎を起こす。2010年には、中国で876名の死者を出すアウトブレイクが起こっている。) や、コクサッキーウイルス (主に手足口病やヘルパンギーナの原因となるが、まれに重篤な脳炎を起こす。型糖尿病の発症要因のひとつとも考えられている。) など】と同様、脳や膵臓に重篤な病原性を発揮する可能性が危惧される。SAFV は、多発性硬化症のモデル作製に用いられるマウスカルジオウイルス (タイラーウイルス、TMEV) と遺伝子レベルで高い相同性を保持しており、TMEV 様ヒトカルジオウイルスとして報告された。TMEV はマウスマクロファージに持続感染し、その一部がオリゴデンドロサイトに広がり、この溶解感染により漏出する細胞成分が自己免疫を誘発し脱髄を起こす原因になっていると考えられている (epitope spreading)。SAFV もまた、持続感染能を有するウイルスであることを報告者らは *in vitro* で証明した (引用文献1)。

以上のことから、マウスカルジオウイルスと同様に、SAFV 感染は自己免疫疾患のトリガーとなっている可能性が考えられる。しかし、SAFV の詳細な病原性については、疫学的観点からも、ウイルス学的観点からも依然不明である。

2. 研究の目的

(1) SAFV 感染受容体の同定と病型別の発現差異解析

報告者はこれまでに、HeLa 細胞の SAFV 感受性を変化させる培養方法を見出し、SAFV 高感受性 HeLa 細胞、および、SAFV 低感受性 HeLa 細胞を作出した。さらに、ウイルス結合解析により、SAFV 高感受性 HeLa 細胞と SAFV 低感受性 HeLa 細胞の間に、ウイルスと結合する細胞表面因子 (感染受容体の可能性が考えられる) の発現に顕著な差が生じていることを明らかにした (引用文献1)。本研究では、この細胞表面因子を検索し、感染受容体を同定することを目的とする。また、同定された因子について、1 型糖尿病、2 型糖尿病、およ

び、非糖尿病の患者の末梢血単核球または LONZA 社の提供する初代培養細胞を用いて発現差異を解析し、SAFV 感染受容体の発現差異が、1 型糖尿病発症の危険因子となっているか否かを検討する。

(2) 剖検例を用いた SAFV 感染の検出

報告者らはこれまでに、1 型糖尿病剖検例二例のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 切片を用いて、免疫組織染色を行ったところ、膵臓における浸潤した組織球およびランゲルハンス氏島の細胞に SAFV 抗原の陽性像が認められることを見出した。この結果より、一部のヒトでは、SAFV の初感染時に何らかの宿主側要因でウイルスが単核球に持続感染した後、膵臓に組織球として浸潤し、そこから産生される少量のウイルスがランゲルハンス氏島の細胞に感染し破壊することで、epitope spreading の原因となっている可能性が考えられる。そこで、2 型糖尿病、非糖尿病の剖検例を加えた上で、解析する症例の絶対数を増やし、この検出結果を詳細に検証する。

(3) 1 型糖尿病患者における SAFV 感染の調査と持続感染の解析

報告者らの提唱する「単核球への SAFV 持続感染が 1 型糖尿病の発症要因となる」という仮説の真偽を確かめるために、1 型糖尿病、2 型糖尿病、および、非糖尿病の患者の末梢血単核球における SAFV 感染を疫学的観点から調査解析する。さらに、SAFV 感染が認められた患者に対し、継続的に追跡調査を行い、SAFV 持続感染が *in vivo* でも起こり得るか否かを証明する。

3. 研究の方法

(1) SAFV 感染受容体の同定

HeLa 細胞 (HeLa, RCB0007) を FCS 添加 MEM または CS 添加 MEM にて、それぞれ 2 週間以上培養し、異なる SAFV 感受性を誘導する。SAFV 感受性の誘導が確認できたら、それぞれの細胞から total RNA を抽出・精製し、DNA マイクロアレイ Human Gene 1.0 ST array (Affimetryx) にて、遺伝子発現の変化を比較解析する。得られた結果を用いて、FCS 添加 MEM で培養した SAFV 高感受性 HeLa 細胞で発現の増加している細胞膜タンパクをスクリーニングし、SAFV 感染受容体としての候補因子をリスト化する。得られた候補因子リストについて、各々の cDNA を発現ベクターにサブクローニングし、SAFV 非感受性細胞である BHK-21 細胞にそれぞれを発現させることで、SAFV 感受性を獲得するか否かを検証し、SAFV 感染受容体を同定する。

SAFV 高感受性 HeLa 細胞から cDNA ライブラリーを作製し、SAFV 非感受性 BHK-21 細胞に導入する。この細胞集団に GFP を発現する組換え SAFV (SAFV-GFP) を感染させ、SAFV 感

受性を獲得した細胞を GFP の蛍光を目印として単離する。単離した細胞をシングルセル RT-PCR 法に供することで、導入されている cDNA を同定する。同定した cDNA について各々個別に BHK-21 細胞に改めて導入し、SAFV 感受性を獲得するか否かを検証する。

(2) 剖検例を用いた SAFV 感染の検出

研究期間全体をとおして、糖尿病剖検例の膵臓 FFPE 切片が入手出来次第、抗 SAFV 抗血清を用いた免疫組織化学染色により SAFV 抗原を検出し、疫学的な解析を進める。

(3) 1 型糖尿病患者における SAFV 感染の調査と持続感染の解析

1 型糖尿病、2 型糖尿病、および、非糖尿病患者の末梢血単核球におけるウイルス感染を RT-PCR 法により調査する。SAFV 陽性となった検体について、適宜、ウイルスの分離培養、ウイルス遺伝子の全シーケンス決定、SAFV に対する抗体価の測定、継時的検体採取によるウイルス持続感染の調査等を試みる。

4. 研究成果

(1) SAFV 感染受容体の同定

DNA マイクロアレイ解析の結果、SAFV 高感受性 HeLa 細胞で 3 倍以上高発現している膜タンパクとして 57 の分子が挙げられた。これらの分子について、各 cDNA を各々サブクローニングし、ランダムにグループ分けして SAFV 非感受性細胞に共発現させたとこ、7 つの遺伝子の組み合わせ【Ras association domain family member 5, IL-27 receptor alpha, receptor activator of NF-kB, desmocollin 2, platelet/endothelial cell adhesion molecule, odd Oz/ten-m homolog 3, chondroitin sulfate proteoglycan 4】で発現させた細胞の一部において、SAFV-GFP の感染が確認された。しかし、感受性の獲得は必ずしも再現されるものではなく、適切な分子比の制御が不十分である可能性や、安定した感染に必要な分子が含まれていない可能性が考えられ、最終的な同定には至らなかった。なお、各々個別の発現系では、SAFV の感染は認められなかった。

SAFV-GFP 接種後、GFP 陽性を示した 50 個の細胞について、各々を単離し導入されている cDNA を決定した。その結果、beta-2-microglobulin をはじめとする 20 種の候補遺伝子が同定された。そこで、これらの分子を各々個別に SAFV 非感受性 BHK-21 細胞に発現させ、SAFV 感受性を獲得するか否か調べたが、いずれも感受性を獲得するものは得られなかった。この結果を学会発表した際、cDNA の発現系では、発現に用いるプロモーター等の影響で十分な発現を確保できない可能性を指摘され、ゲノムそのものを導入する方法を改善案として情報提供いただいた。そこで、エンテロウイルス 71 の受容体 (SCARB2)

同定に用いられた手法に倣い、SAFV 高感受性 HeLa 細胞の genomic DNA を Noe 耐性遺伝子と共に SAFV 非感受性 BHK 細胞に導入して安定発現させた後、限界希釈法にて分離培養したものに SAFV を接種することで細胞変性効果の出現を指標に、感受性を獲得したクローンをスクリーニングした。その結果、290,000 クローンのうち 2 つのクローンにおいて細胞変性効果様の変化が認められた。この細胞に導入されている遺伝子を同定するためにレプリカより拡大培養を行ったが、その培養過程において目的遺伝子の脱落が起こり、同定には至らなかった。

これらの結果より、SAFV の感染受容体 (少なくとも本研究で得られた感受性を变化させる因子) は、1 分子からなるものではなく複合体として機能するものである可能性が示唆された。特に の結果で得られた beta-2-microglobulin は、一部のコクサッキーウイルスやエコーウイルスにおいて co-receptor として利用されており、SAFV の感染受容体も同様に複数の分子からなる複合体である可能性は十分に考えられる。感染受容体が複数の分子による複合体からなると仮定した場合、非感受性細胞に感受性を獲得させる方法での探索は条件設定が容易ではない。そこで、マウスノロウイルスの感染受容体同定に利用された CRIPR knockout Pooled library を用いて感受性細胞の感受性を消失させることから感染受容体を同定する方法を検討することが、SAFV の感染受容体同定にも有用であると考えられた。研究方法の見直しを含めた本研究の更なる継続が、本研究課題に残された課題である。

(2) 剖検例を用いた SAFV 感染の検出

本研究期間内に得られた結果のうち、抗 SAFV 抗血清による免疫染色の結果が染色性陽性となったものは、1 型糖尿病では 2 例中 2 例、2 型糖尿病では 18 例中 0 例、非糖尿病では 2 例中 0 例であった。陽性となった検体からのウイルス遺伝子 RNA の検出も試みたが、-tubulin さえも検出できない状態で検出不可能であった。免疫染色の結果は、SAFV 感染が 1 型糖尿病発症において特異的に関与する可能性を強く示している。しかし、研究期間内に新たに入手できた検体は 2 型糖尿病と非糖尿病の剖検例のみであり、解析できた症例数が依然少数にとどまっており、結論を出すにはまだ十分であるとは言えない。

(3) 1 型糖尿病患者における SAFV 感染の調査と持続感染の解析

糖尿病患者の末梢血単核球 (45 例) を対象として行った RT-PCR では、5 例から SAFV ゲノム (5' UTR) が検出された。これら 5 例の病型の内訳は、1 型 2 例、2 型 1 例、型不明 2 例であり、1 型糖尿病に特異的な傾向はみられなかった。ただし、本結果は季節性 (流行

性)の一過性感染を否定できない条件であるため、最終的な結論を得るためには、引き続き解析が必要である。一方、手足口病様症状を呈した後に急性膵炎を発症した患者の便および血液の解析からは、SAFV ゲノムが検出され、著しい抗体価の上昇が認められ報告した(発表論文 1)。この結果は、SAFV 感染が急性膵炎に関わる可能性を示しており、SAFV の膵臓病原性を示唆する症例として重要であると考えられた。しかし、本症例においてもウイルスは分離されなかった。

SAFV は一般的に分離培養が困難であると言われている。そこで、より効率的な分離培養法を確立するために、ウイルス蛋白の性状を解析する目的で、発現系による解析を行ったところ、SAFV の構造蛋白である VP1 は細胞内で極めて不安定であることが見出された。このことが培養細胞におけるウイルス分離を困難にしている可能性が考えられた。また、アミノ酸配列のコンピューター解析から、VP1 には、140-165 残基にタンパク質の不安定性に関与するとされる PEST 配列(Pro, Glu, Ser, Thr に富む配列)が含まれていることが示された。そこで、PEST 配列欠損変異体の発現解析、および、発現後も安定である TMEV の VP1 に PEST 配列を導入した発現解析を行ったところ、VP1 の不安定性に関わる責任領域のひとつが PEST 配列であることが明らかとなった。さらに、他のウイルス構造蛋白または非構造蛋白の共存が SAFV-VP1 の安定性に及ぼす影響を調べるために行った IRES 依存的な共発現系の解析から、他の構造蛋白の共存下では VP1 の安定性がわずかに上昇し、カプシド形成に伴い PEST 領域がマスクされ VP1 の分解が抑制される可能性が示された。また、プロテアソーム阻害剤 MG132 の添加によっても VP1 の分解は抑制された。これらのことから、ウイルス分離培養時に VP1 蛋白の分解を抑制することができれば、ウイルスの分離効率が向上すると考えられる。ウイルス蛋白の成熟に関わるプロテアーゼを阻害しない安価なタンパク質分解阻害薬の探索・同定は今後の課題である。

加えて、この IRES 依存的な共発現系の実験過程において、想定していなかった未知の蛋白の存在が見出された。SAFV のウイルス蛋白は、1042nt の開始コドンからポリ蛋白として合成され(N 末端には Leader 蛋白がコードされている)その後、開裂を受けて各タンパクとして成熟されると考えられている。しかし報告者は、上述の発現系解析(C 末 FLAG tag 標識を利用)により、ポリ蛋白の開始コドンより上流からも翻訳が起こり、その途中に現れる終止コドンが読み飛ばされ、サイズの大きい未知の蛋白(Large-Leader, LL)が合成されることを見出した。TMEV では、ポリ蛋白とは異なったフレームから合成される L*蛋白が神経病原性に深く関わっているが、SAFV では異フレームからの蛋白合成は見つ

かっておらず TMEV-L*の代わりとなる因子が不明であった。したがって、今回見つかった LL がその役割を担っている可能性が疑われた。そこで、LL の開始コドンを同定するために、1042AUG より上流にある AUG に変異を導入し解析したところ、いずれの変異体においても LL の翻訳が消失することはなく、LL 翻訳開始点は非 AUG コドン由来である可能性が示されたが、その詳細は依然不明である。

VP1 の不安定性および新規ウイルス蛋白 LL に関する知見は、研究開始当初には予想していなかった想定外の新たな発見となったが、特に LL の発現機序を詳細に解析することは、IRES 依存的翻訳における新規の発現制御機序を明らかにし、SAFV を含むピコルナウイルスの病原性解析を大きく前進させるものと期待される。

<引用文献>

1. Himeda T, Hosomi T, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y. Saffold virus type 3 (SAFV-3) persists in HeLa cells. PLoS One 8:e53194 (2013)

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 5 件)

1. Ito H, Miyagaki S, Sakaue S, Matsui F, Katsumi Y, Otabe O, Torii J, Itagaki T, Himeda T, Okuwa T, Ohara Y. Saffold cardiovirus infection in a 2-year-old boy with acute pancreatitis. (査読有) Jpn J Infect Dis. 70:105-107 (2017) DOI: 10.7883/yoken.JJID.2015.488

2. Okuwa T, Sasaki Y, Matsuzaki Y, Himeda T, Yoshino N, Hongo S, Hara Y, Muraki Y. The epitope sequence of S16, a monoclonal antibody against influenza C virus hemagglutinin-esterase fusion glycoprotein. (査読有) Future Virol. 12:93-101 (2017) DOI: 10.2217/fvl-2016-0105

3. 姫田敏樹、大原義朗: ウイルス感染と脱髄(査読無)感染・炎症・免疫 45: 305-311 (2015)

4. 姫田敏樹: Saffold virus の病原性解明 ~ ウイルス学および疫学的解析 ~ (査読無) Neuroinfection (2015) 20: 77-80 (2015)

5. Shimizu A, Himeda T, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y: Role(s) of Leader protein of Saffold virus. (査読有) Clinic. Exp. Neuroimmunol. 5: 362-366 (2014) DOI: 10.1111/cen3.12109

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 姫田敏樹、大桑孝子、樋口雅也. Saffold ウイルス Leader 蛋白の機能解析. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 2016 年 10 月 23 ~ 25 日 (札幌コンベンションセンター、北海道・札幌市)

2. 武田和也、姫田敏樹、大原義朗、中村晃. タイラーマウス脳脊髄炎ウイルスは形質細胞様樹状細胞を刺激しない. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 2016 年 10 月 23 ~ 25 日 (札幌コンベンションセンター、北海道・札幌市)

3. 大桑孝子、姫田敏樹. Saffold ウイルス VP1 蛋白質の不安定性に関する解析. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会 2015 年 11 月 22 ~ 24 日 (福岡国際会議場、福岡県・福岡市)

4. 姫田敏樹、大桑孝子. サフォードウイルス VP1 蛋白質の分解に関わるアミノ酸領域の探索. 第 52 回日本細菌学会中部支部会 2015 年 10 月 23 ~ 24 日 (名古屋市立大学、愛知県・名古屋市)

5. 姫田敏樹、大桑孝子、村木靖、大原義朗. 1 型糖尿病における抗 Saffold ウイルス抗体染色性. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014 年 11 月 10 ~ 12 日 (パシフィコ横浜、神奈川県・横浜市)

6. 姫田敏樹. Saffold virus の病原性解明 ~ ウイルス学のおよび疫学的解析 ~. 第 19 回日本神経感染症学会総会学術集会・第 26 回日本神経免疫学会学術集会 合同学術集会 2014 年 9 月 4 ~ 6 日 (金沢歌劇座、石川県・金沢市)

7. 姫田敏樹、齋藤峰輝、大桑孝子、村木靖、谷浦直子、大原義朗. タイラーウイルス非構成蛋白の機能解析から示唆される細胞死制御機構. 第 18 回日本神経ウイルス研究会 2014 年 6 月 20 ~ 21 日 (アクトシティ浜松、静岡県・浜松市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

姫田敏樹 (HIMEDA, Toshiki)
金沢医科大学. 医学部・准教授
研究者番号: 80340008

(2) 研究分担者

大桑孝子 (OKUWA, Takako)
金沢医科大学. 医学部・助教
研究者番号: 20460347