

機関番号：82609

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590482

研究課題名 (和文) エンテロウイルス 71 受容体の研究

研究課題名 (英文) Studies on enterovirus 71 receptor

研究代表者

小池 智 (KOIKE SATOSHI)

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・副参事研究員

研究者番号：30195630

研究成果の概要 (和文)：

エンテロウイルス 71 (EV71)はコクサッキーウイルス A16 と共に手足口病の主要な原因ウイルスである。EV71 による手足口病は稀に重篤な神経合併症を生ずる。我々はスカベンジャーレセプターB2 (SCARB2)が EV71 の受容体の一つであることを明らかにした。SCARB2 は試験した全ての EV71 臨床分離株の受容体として機能した。さらに同じく手足口病を引き起こす CVA16, CVA14 も SCARB2 依存的な感染をする。また我々はウイルス結合や感染成立に必須の 64 アミノ酸からなる SCARB2 の領域を同定した。

研究成果の概要 (英文)：

Enterovirus 71 (EV71) is a major causative agent of hand-foot-mouth disease (HFMD) together with Coxsackievirus A16. HFMD caused by EV71 is sometimes involved with severe neurological diseases. We have identified Scavenger receptor B2 (SCARB2) as a cellular receptor for enterovirus 71. SCARB2 serves as receptor for all clinical isolates of EV71 tested. In addition, clinical isolates of CVA16 and CVA14, both of which cause HFMD, are also able to infect in a SCARB2-dependent pathway. We also identified that the 64 amino acid region in the human SCARB2 is essential for binding to EV71 and establishment of infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：エンテロウイルス 71、ウイルス受容体、手足口病、脳炎、新興・再興感染症

## 1. 研究開始当初の背景

EV71 はピコルナウイルス科エンテロウイルス属に属するウイルスでコクサッキーウイルス A16 などと共に手足口病の主要な原因となるウイルスである。EV71 による手足口病は稀に重篤な脳炎やポリオ様マヒを合併することが知られている。近年アジア諸国で重篤な神経合併症を伴う EV71 の流行が報告されており、疫学的に重要なウイルスである。ウイルスとしてはポリオウイルスと近縁であるが、なぜ EV71 は強い神経病原性を有するのかは明確ではなかった。特に感染細胞の特異性を決定するウイルス受容体に関する報告はなく、その解明が必要であった。

## 2. 研究の目的

EV71 受容体を同定し、EV71 の感染初期過程を明らかにする。またウイルス受容体の同定によって EV71 感染細胞の特異性を明らかにし、EV71 の神経向性の分子基盤を明らかにする。EV71 を発現するマウスモデルを作製する基礎とする。

## 3. 研究の方法

### (1) EV71 受容体の同定

#### ①EV71 感受性形質転換細胞株の樹立

L929 は EV71 にほとんど感受性を持たない。しかし、ウイルス RNA を細胞内にトランスフェクションすると 1 サイクル限りのウイルス粒子の産生は起こる。したがってこの細胞はウイルスの侵入や脱殻などのウイルス感染の初期過程が起こらないが、その後の複製過程には問題がないことがわかった。この細胞にヒト RD-A 細胞の染色体 DNA をトランスフェクションし、ウイルス感受性となった形質転換細胞株 Ltr051 と Ltr246 細胞を樹立した。

#### ②形質転換細胞株内に存在するヒト由来 DNA の同定

Ltr051 細胞、Ltr246 細胞に存在するヒト由来 DNA を同定するために形質転換細胞 Ltr051 細胞と L929 細胞から RNA を調整し、Whole Human Genome Microarray kit 4x44K (Agilent) を用いて Ltr051 細胞に発現があり、L929 細胞に発現のない遺伝子の同定を試みた。複数の遺伝子候補が見いだされたが、それらの候補遺伝子が実際に Ltr051 細胞 DNA に導入されているか PCR 法で調べ、1 つの遺伝子が導入されている事を確認した。

#### ③SCARB2 が EV71 受容体であることの確認

ヒト SCARB2 全長 cDNA をマウス L929 細胞で発現させ、細胞がウイルス感受性を獲得するか否か確認した。また EV71 粒子と SCARB2 が直接結合することをプルダウンアッセイによって確認した。

#### (2) SCARB2 の EV71 受容体としての役割の解析

##### ①ウイルス受容体の特異性

L929 細胞に恒常的に SCARB2 を発現する細胞 L-SCARB2 を樹立し、EV71 以外の A 群エンテロウイルスの臨床分離株を用いて、これらのウイルスが SCARB2 を利用して感染するか否かを検討した。

##### ②SCARB2 のヒト組織での発現分布

抗ヒト SCARB2 抗体を用いたウエスタンブロットティングにより、SCARB2 のヒト体内での発現分布を検討した。

##### (3) SCARB2 の機能ドメインの検索

①ヒト SCARB2 とマウスの SCARB2 のキメラ分子を作製してマウス L929 細胞で発現させ、ウイルスとの結合やウイルス感染に重要な役割を果たす機能ドメインを解析した。

## 4. 研究成果

### (1) EV71 受容体の同定

#### ①EV71 感受性形質転換細胞株の樹立

マウス L929 細胞にヒト RD-A 細胞の染色体 DNA をトランスフェクションし、約 70,000 の形質転換細胞株のプールに GFP を発現する EV71 を感染させ、ウイルス感受性を示した細胞株をスクリーニングした。その結果 2 つの細胞株 Ltr051 と Ltr246 細胞を樹立した(図 1)。

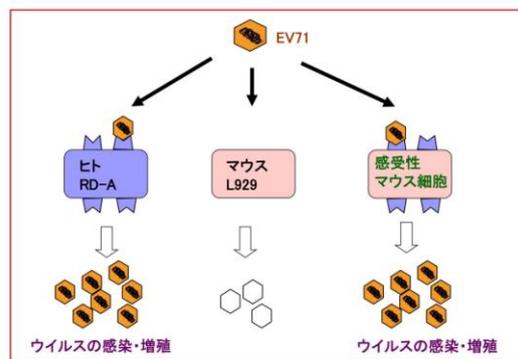


図 1 ウイルス感受性形質転換細胞株の樹立

#### ②形質転換細胞株内に存在するヒト由来 DNA の同定

当初 Ltr051 細胞と Ltr246 細胞は同一の遺伝子によって形質転換されたと考えていたので、両者に共通して存在するヒト由来 DNA を探したが、共通に存在している遺伝子はなかったため、両者は別々の遺伝子によってウイルス感受性を獲得したと推論した。そこでウイルス受容体は膜タンパク質であると予測されたので、Ltr051 細胞に存在すると予測

された遺伝子のうち、SOSUI プログラムによって膜タンパク質を選別した。上位からその遺伝子特異的な PCR プライマーを設計して Ltr051 細胞 DNA に対して PCR を行い、遺伝子が存在しているか否かを確認した。Ltr246 細胞についても同様の操作を行った。その結果 Ltr051 細胞については SCARB2 が、Ltr246 細胞については CCL2、BCDIN3 がそれぞれ存在していることが明らかになった。

### ③SCARB2 が EV71 受容体であることの確認

ヒト SCARB2、CCL2、BCDIN3 全長 cDNA をマウス L929 細胞で発現させ、細胞がウイルス感受性を獲得するか否かを確認した。その結果 SCARB2 を発現している細胞は EV71 に関して感受性を示し、RD 細胞と同等のウイルス増殖性が観察された (図 2)。CCL2、BCDIN3 発現細胞ではウイルス感受性は確認されなかった。

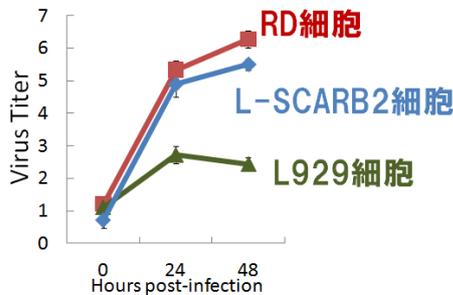


図 2 SCARB2 発現細胞でのウイルス増殖

さら感染は抗 SCARB2 抗体により阻害された (図 3)。

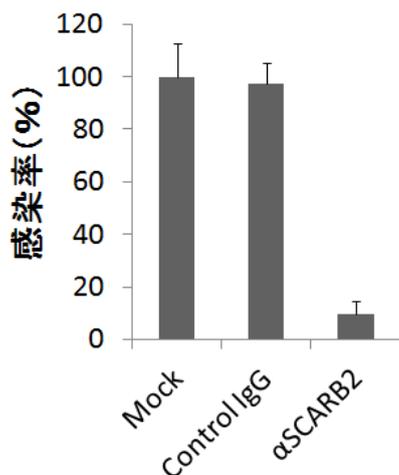


図 3 抗 SCARB2 抗体による EV71 感染の阻害

IgG-Fc 部分と SCARB2 の細胞外ドメインを融合したタンパクと EV71 粒子のプルダウンアッセイによって、ウイルスと SCARB2 が直接結合することが確認された (図 4)。



図 4 SCARB2-Fc タンパクによるウイルス粒子のプルダウン

これらの事により Ltr051 細胞に EV71 感受性を与えた人由来の DNA は SCARB2 遺伝子であることが判明した。この遺伝子単独で L 細胞にウイルス感受性を付与し、なおかつ SCARB2 は EV71 と直接結合する。

Ltr246 細胞を感受性にした遺伝子はいまだ判明していない。

L-SCARB2 細胞に様々な EV71 臨床分離株を感染させ、ウイルス感染が成立するか否かを検討した。142 株をテストし全ての株が感染し、この受容体は EV71 であれば株に依らず感染を成立させることが明らかになった。

### (2) SCARB2 の EV71 受容体としての役割の解析

#### ①ウイルス受容体の特異性

L-SCARB2 に EV71 以外の A 群 エンテロウイルスを感染させた (表 1)

ウイルス	CPE 陽性数/サンプル数
CVA2	0/10
CVA3	0/5
CVA4	0/11
CVA5	0/2
CVA6	0/7
CVA8	0/3
CVA10	0/10
CVA12	0/9
CVA14	16/17
CVA16	27/27

表 1 L-SCARB2 細胞の CVA 分離株に対する感受性試験

CVA14、CVA16 は SCARB2 を介して感染することができることが判明した。これらのウイルスは系統樹上でも EV71 の近くに位置し、手足口病を引き起こすことが知られている。したがって SCARB2 は EV71 だけの受容体ではなく、これらの手足口病を起こすウイルスの共通の受容体であると考えられる。

②SCARB2 のヒト組織での発現分布

抗ヒト SCARB2 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、SCARB2 のヒト体内での発現分布を検討した結果、SCARB2 はどの組織においても発現が見られた。このことから SCARB2 の発現分布が単独でウイルスの標的組織を決定しているとは考えられず、SCARB2 発現はウイルス感染の必要条件となっていると考えられる。

神経組織での発現を調べると全ての神経細胞に SCARB2 の発現は見られたことから、神経細胞への感染も SCARB2 を介していることが示唆された。

(3) SCARB2 の機能ドメインの検索

①ヒト SCARB2 とマウスの SCARB2 のキメラ分子を作製してマウス L929 細胞で発現させ、ウイルスとの結合やウイルス感染に重要な役割を果たす機能ドメインを解析した。SCARB2 遺伝子は 12 個のエクソンにコードされているので、エクソン単位でヒトとマウスを入れ替えた多くのキメラを作製したが、図 5 に示したようにエクソン 4 の部分をヒトからマウス、あるいはマウスからヒトへと置換するとウイルス感受性が変化した。従ってこの部分のアミノ酸がウイルス感染成立に重要であることが判明した。

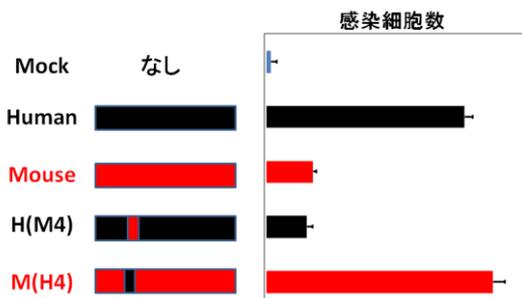


図 5 ヒト-マウスキメラ SCARB2 のウイルス感受性

またこれらのキメラを発現する細胞表面に結合するウイルスを検出する方法でキメラ受容体がウイルスと結合するか否か検討したところ、エクソン 4 部分をヒト配列にした受容体はウイルスと結合することが示された。

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 2 件)

- ① Yamayoshi S & Koike S: Identification of the Human SCARB2 Region That Is Important for Enterovirus 71 Binding and Infection. *Journal of Virology* 85: 4937-4946 (2011) 査読有
- ② Yamayoshi S, Yamashita Y, Li J, Hanagata N, Minowa T, Takemura T & Koike S: Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. *Nature Medicine* 15: 789-801 (2009) 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① 山吉誠也、小池智: エンテロウイルス 71 感染受容体とその機能第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010.11.9 徳島市
- ② Koike S: Scavenger receptor B2: a cellular receptor for enterovirus 71. The 2<sup>nd</sup> International Symposium on Vaccine from Research to Product Launch 2010.10.8 Miaoli, Taiwan (招待講演)
- ③ Yamayoshi S & Koike S: Identification of importantn region of human SCARB2 for an Enterovirus 71 infection XVIth Meeting of European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses 2010.9.12 St Andrews, Scotland
- ④ Yamayoshi S & Koike S: Important region of human SCARB2 for an efficient Enterovirus 71 infection, The 10<sup>th</sup> Awaji International Forum of Infection and Immunity 2010.9.8 Awaji, Hyogo
- ⑤ Koike S: Scavenger receptor B2 is a functional cellular receptor for enterovirus 71. JST Workshop Taiwan -Japan "Host-Pathogen Interaction" 2009.11.16 Kyoto
- ⑥ 山吉誠也、小池智: マウス SCARB2 のエンテロウイルス 71 感染受容体としての機能第 57 回日本ウイルス学会学術集会 2009.10.26 東京都
- ⑦ Yamayoshi S, & Koike S: Species specificity of enterovirus 71 is determined by quality and quantity of viral receptor. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity 2009.9.10 Awaji
- ⑧ 山吉誠也、山下康子、花方信孝、箕輪貴司、竹村太郎、清水博之、小池智: エンテロウイルス 71 の感染性決定分子の同定 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008.10.28 岡山市

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ヒトエンテロウイルス 71 受容体を用いた  
ウイルス感染実験系

発明者: 小池智、山吉誠也

権利者: 小池智、山吉誠也

種類: 特願

番号: 2009-120748

出願年月日: 2009 年 5 月 19 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小池 智 (KOIKE SATOSHI)

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床

医学総合研究所・副参事研究員

研究者番号: 30195630

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

山吉 誠也 (YAMAYOSHI SEIYA)

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床

医学総合研究所・研究員

研究者番号: 50529534

安部優子 (ABE YUKO)

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床

医学総合研究所・非常勤研究員

研究者番号: 80398156