

令和元年6月11日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04738

研究課題名(和文) ヒトノロウイルス感受性細胞の樹立とレセプター探索

研究課題名(英文) Study of human norovirus receptor for developing of susceptible cell line

研究代表者

片山 和彦 (KATAYAMA, KAZUHIKO)

北里大学・感染制御科学府・教授

研究者番号：60342903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトに感染するノロウイルス(HNV)のレセプターを同定するため、株化培養細胞(RAW264.7)で培養増殖させることが可能なネズミノロウイルス(MNV)を用いてMNVのレセプターを同定した。RAW264.7細胞のCRISPR/Cas9システムを用いてランダムノックアウトし、ゲノムノックアウトによってMNV非感受性となった細胞のノックアウトされた遺伝子を調べることで、MNVレセプターCD3001f, CD3001dを同定した。ヒト腸管オルガノイドを2D培養し、十分に分化誘導を行うことで、HNVを高効率に培養増殖可能な系を構築した。MNVレセプターのヒトホモログは、HNVレセプターでは無かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MNVのレセプター分子CD3001fとCD3001dを発見した。CD3001fとCD3001dのヒトホモログはHNVのレセプターとして機能しなかった。HNVは組織血液型抗原、MNVはシアル酸など、糖鎖がレセプターだと考えられていた。しかし、本研究でMNVレセプターが膜タンパク質であることが明らかになったことで、HNVレセプターが膜タンパク質である可能性が急浮上することになった。さらに、ヒト腸管上皮の構造を試験管内で再現可能なオルガノイドの平板培養技術の開発に成功したことにより、HNVの感染感受性細胞を再現性良く作出することが可能となり、HNVレセプター探索に新たな道を開いた。

研究成果の概要(英文)：Human norovirus (HNV) is the leading cause of acute gastroenteritis worldwide. Since the discovery of HNV, an efficient and reproducible norovirus replication system has not been established in cultured cells. Those results imply that the identification of a functional cell-surface receptor for norovirus might be the key to establishing a norovirus culture system. Using a genome-wide CRISPR/Cas9 guide RNA library, we identified murine CD3001f and CD3001d as functional receptors for murine norovirus (MNV). The treatment of susceptible cells with polyclonal antibody against CD3001f significantly reduced the production of viral progeny. Furthermore, CD3001d, which has an amino acid sequence in the N-terminal region of its extracellular domain that is highly homologous to that of CD3001f, also functions as a receptor for MNV.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ノロウイルス レセプター CRISPR/Cas9 ホモログ

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトノロウイルス(HNV)感染症は、全世界で数千万人規模の感染者が報告されており、公衆衛生上大きな問題となっており、国際的規模で感染制御対策が必要なウイルスとして認識されている。しかし、HNVにおいては、あらゆる株化細胞を用いて、40年にわたり試みられたHNVの感染増殖系の確立の試みは失敗しており、2014年現在、失敗の歴史が過去2度にわたり国際誌に報告された(J of Gen Virol.2004, Virology 2010)。このような背景から、HNVにおいては、培養細胞による感染増殖系、小動物モデルが無いことが、予防衛生にかかるワクチンや抗ウイルス薬、治療薬開発、消毒薬開発の障害となっている。

バキュロウイルス発現システムで、HNVの構造タンパク質を発現させて得られるウイルス様中空粒子(VLP)は、HNVの抗原性、感受性細胞の探索、レセプターの研究に用いられてきた。HNVに近縁なカリシウイルスであるウサギ出血熱ウイルス(RHDV)のレセプターが組織血液型抗原(HBGA)であることから、HNV-VLPとHBGAの結合を解析され、HBGAがVLPに特異的に結合することが明らかにされた。以降、HBGAは2002年にレセプター候補と考えられてきた。一方、感染性HNVは、HBGA強制発現細胞に感染せず、HBGAは感染に関わるレセプターとして機能していないことを示唆した[Guix et al, J Virol, 2007]。さらに、ヒト腸管バイオプシサンプルを用いた研究で、ヒト腸管では、HBGA非依存的なVLPの結合と細胞への取り込みが観察されることを証明した[Murakami et al, PLoS ONE, 2013]。以上から、HNVの細胞への結合から侵入、脱殻、ゲノムRNAの放出に至る感染初期ステップは、未だ未知の分子(真のレセプター)によって引き起こされていることが示唆された。

## 2. 研究の目的

MNVは株化培養細胞RAW264.7細胞で増殖可能であるため、RAW264.7細胞に発現しているMNVの真のレセプター分子の同定を試みることを最初の目的とした。MNVレセプター分子の同定に成功すれば、その分子のヒトホモログを起点に、HNVの真のレセプター分子を検索する。レセプター分子を導入したMNV、HNV感染感受性株化培養細胞を作出して細胞の感染感受性変化を調べ、最終的にレセプター分子導入MNV、HNV感染感受性トランスジェニック動物を作出することにより、感染モデル小動物の作出を実現する。

## 3. 研究の方法

### ・MNV株、培養細胞、CRISPR/Cas9ゲノムワイド遺伝子ノックアウトスクリーニング

MNVには、MNV-S7株、MNV-1株を用いた。RAW264.7細胞はATCCより購入し、プロバイダープロトコールに従って培養維持して、以下の感染実験、レセプター分子の同定に供し、CRISPR/Cas9によるランダムノックアウトを実施した。MNV感染後に生存した細胞に含まれるgRNAをMiSeqによって解析し、レセプター候補分子の遺伝子を同定した。MNVレセプター分子のヒトホモログのクローニングとノックアウト、定常発現細胞の構築は、CRISPR/Cas9システム、レンチウイルス遺伝子導入システムを用いた。

### ・HNV感受性細胞の検索と樹立

HNVは、ヒト小腸に感染することが免疫組織学的研究から明らかにされている。ヒト十二指腸、ヒト小腸(空腸、回腸)のバイオプシサンプルより、ヒト腸管オルガノイドを樹立して、HNVの増殖培養を試みた。ヒト腸管オルガノイドは研究協力者の佐藤俊朗博士(慶應義塾大学医学部)より技術供与、分与を受けた。スフェロイド状に増殖したオルガノイドは、トリプシン処理後にマトリジェルでコートした96ウェルプレートに播種し、モノレイヤーとした。その後、腸管上皮細胞への分化誘導を行い、HNV増殖培養に用いた。

#### ・HNV 陽性便検体

HNV 陽性便検体は、PBS に 10% となるように懸濁し、遠心操作で得た上清を 0.22  $\mu$ M のフィルターで濾過した後にイノキュラムとして用いた。

#### ・HNV 感染実験

フィルター濾過後の便懸濁液上清は、モノレイヤーかつ分化誘導されたオルガノイドに添加後 3 時間静置することで感染させた。3 時間後、3 回洗浄後 100  $\mu$ L の培地を加え、6~7 日間培養した。0 日、3 日、6 日もしくは 7 日目に同じウェルから 15  $\mu$ L の上清を回収して、遠心操作によって細胞や細胞断片をペレットとして除き、上清 10  $\mu$ L を凍結保存した後、RNA 抽出に供した。HNV-RNA titer は、定法に従ってリアルタイム RT-PCR によって求めた。

#### 4. 研究成果

我々は、CRISPR/Cas9 ゲノムワイドノックアウトシステム遺伝子をランダムにノックアウトした RAW264.7 細胞を作出し、そこに MNV を感染させて感受生細胞を細胞死に導いた。MNV 感染後に生き残った RAW264.7 細胞を増殖培養し、それらに含まれている gRNA の配列を次世代シーケンサー (Illumina MiSeq) で網羅的にシーケンスしたところ、最もリード数の多い遺伝子として Cluster of Differentiation 300lf; CD300lf が検出された。次に CD300lf 遺伝子のみを CRISPR/Cas9 でノックアウトした RAW264.7 細胞を作出し、MNV 感染感受性を調べると、CD300lf ノックアウト RAW264.7 細胞は MNV に対する感受性を失った。更に、通常の RAW264.7 細胞表面の CD300lf を抗マウス CD300lf 抗体でブロックすると、MNV 感受性は有意に低下した。抗ヒト CD300lf 抗体でブロックを試みたが、MNV 感受性に変化は生じなかった。これらのデータは、細胞表面に発現している CD300lf 分子が MNV の感受性に直接関与するレセプターであることを示唆していた。CD300lf がレセプターであることを確認するために、ヒト由来細胞 HEK293T、ハムスター由来 CHO、ネコ由来 CRFK、マウス由来であるが MNV 非感受性の NIH3T3 にそれぞれ CD300lf 遺伝子を導入して定常的に発現させ、MNV 感受性の変化を調べた。全ての細胞で MNV の感染と増殖が確認され、CD300lf 分子依存的感受性変化をが観察され、CD300lf がレセプターであることが確認された。

CD300lf と lf 以外の CD300 分子とのアミノ酸配列の相同性を調べると、CD300lf と CD300ld の N-terminal 側の配列の相同性が 90% 以上であることが判明した。しかし、CD300ld は CD300lf と異なり、細胞質側ドメインを持たないため、レセプターとして機能しない可能性がある。そこで、CD300lf と同様に CD300ld についても非感受生細胞である HEK293T に導入し、MNV 感受性の変化を調べた。すると、細胞質ドメインを持たない CD300ld もレセプターとして機能することが明らかになった。また、*in vitro* の実験系において、MNV は細胞への感染に際し、シアル酸を必要としていないことも示唆された。

ヒト腸管オルガノイドをスフェロイド状に 3 次元:3D 培養増殖させ、それに HNV 感染患者の 10% 便懸濁液を感染させても、HN の感染増殖は認められなかった。WENRAS 添加増殖培地でスフェロイドを増殖させ、トリプシン処理後、マトリジェルでコートした 96 ウェルプレートに播種することでモノレイヤー化 (2 次元:2D 培養) させ、ENRA 添加培地で分化誘導を行った後に HNV 感染患者の 10% 便懸濁液を感染させると、HN の対数関数的増殖が観察された。培養上清中の HNV-RNA タイターは、6-7 日後には培養開始時の 10 万倍に上昇することが明らかになった (2016-08-24 出願、2017-08-21 PCT 出願)。

ヒト腸管オルガノイドにおいて CD300lf, ld のヒトホモログの発現が認められたことから、これらの遺伝子のノックアウト、HN 非感受性株化培養細胞への遺伝子導入、発現、ノックアウトを実施したが、ヒト CD300lf, ld 依存的な感染感受性変化は認められなかった。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. Chapellier B, Tange S, Tasaki H, Yoshida K, Zhou Y, Sakon N, Katayama K, Nakanishi A. Examination of a plasmid-based reverse genetics system for human astrovirus. *Microbiol Immunol*. 2015 Aug 14. doi: 10.1111/1348-0421.12317.
2. Kobayashi M, Yoshizumi S, Kogawa S, Takahashi T, Ueki Y, Shinohara M, Mizukoshi F, Tsukagoshi H, Sasaki Y, Suzuki R, Shimizu H, Iwakiri A, Okabe N, Shirabe K, Shinomiya H, Kozawa K, Kusunoki H, Ryo A, Kuroda M, Katayama K, Kimura H. Molecular Evolution of the Capsid Gene in Norovirus Genogroup I. *Sci Rep*. 2015 Sep 4;5:13806. doi: 10.1038/srep13806.
3. Sato J, Miki M, Kubota H, Hitomi J, Tokuda H, Takai-Todaka R and Katayama K. Effects of disinfectants against norovirus virus-like particles predict norovirus inactivation. *Microbiol Immunol* 60, 609-616, 2016.
4. Matsushima Y, Shimizu T, Ishikawa M, Komane A, Okabe N, Ryo A, Kimura H, Katayama K, Shimizu H. Complete Genome Sequence of a Recombinant GII.P16-GII.4 Norovirus Detected in Kawasaki City, Japan, in 2016. *Genome Announc*. 2016 Oct 6;4(5). pii: e01099-16. doi: 10.1128/genomeA.01099-16.
5. Haga K, Fujimoto A, Takai-Todaka R, Miki M, Doan Y. H, Murakami K, Yokoyama M, Murata M, Nakanishi A, and Katayama K. Functional receptor molecules CD300lf and CD300ld enable murine norovirus to internalize into host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 11;113(41):E6248-E6255., 2016.
6. Kobayashi M, Matsushima Y, Motoya T, Sakon N, Shigemoto N, Okamoto-Nakagawa R, Nishimura K, Yamashita Y, Kuroda M, Saruki N, Ryo A, Saraya T, Morita Y, Shirabe K, Ishikawa M, Takahashi T, Shinomiya H, Okabe N, Nawasawa K, Suzuki Y, Katayama K, Kimura H. Molecular evolution of the capsid gene in human norovirus genogroup II. *Sci Rep*. 2016 Jul 7;6:29400. doi: 10.1038/srep29400.
7. Kitamoto T, Takai-Todaka R, Kato A, Kanamori K, Takagi H, Yoshida K, Katayama K, Nakanishi A. Viral population changes during murine norovirus propagation in RAW 264.7 cells. *Front Microbiol*. 2017 Jun 15;8:1091. doi: 10.3389/fmicb.2017.01091. eCollection 2017.
8. Rachmadi AT, Kitajima M, Watanabe K, Yaegashi S, Serrana J, Nakamura A, Nakagomi T, Nakagomi O, Katayama K, Okabe S, Sano D. Free-Chlorine Disinfection as a Selection Pressure on Norovirus. *Appl Environ Microbiol*. 2018 Jun 18;84(13). pii: e00244-18. doi:10.1128/AEM.00244-18. Print 2018 Jul 1.
9. 片山和彦 院内・施設内感染症に関わる胃腸炎ウイルス vol.2 66-72 感染制御と予防衛生 2018
10. 片山和彦 ノロウイルス総説 vol.3 4-11 感染制御と予防衛生 2019
11. 片山和彦 ノロウイルスレセプター 臨床とウイルス 日本臨床ウイルス学会 vol. 47, 38-45, 2019年

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 戸高玲子、村上耕介、朴英斌、吉田和央、中西章、片山和彦 Development of norovirus

- replication efficiency monitoring system based on reverse genetic system. 日本分子生物学会 2015年12月1日～4日、兵庫(神戸ポートアイランド)
2. 朴英斌、戸高玲子、芳賀慧、下池貴志、福士秀悦、染谷雄一、佐藤裕徳、河合文啓、朴三用、片山和彦 Functional analysis of human norovirus RNA dependent RNA polymerase. 第64回日本ウイルス学会学術集会 2015年11月22日～24日、福岡
  3. Fujimoto A, Haga K, Sugimoto S, Sato T, Doan H.Y. Miki M, Takai-Todaka R, Katayama K. Cultivation of human norovirus using human duodenal enteroids. 第65回日本ウイルス学会学術集会 2016年10月23日～25日、北海道(札幌)
  4. Haga K, Fujimoto A, Doan H.Y, Takai-Todaka R, Miki M, Murakami K, Yokoyama M, Murata K, Nakanishi A, Katayama K. Identification of the functional receptor for murine norovirus. 第65回日本ウイルス学会学術集会 2016年10月23日～25日、北海道(札幌)
  5. Fujimoto A, Haga K, Sugimoto S, Sato T, Doan H.Y. Miki M, Takai-Todaka R, Katayama K. Cultivation of human norovirus using human duodenal organoids. The 6<sup>th</sup> International Calicivirus Conference, 2016,10,09~13. Savannah, GA, USA. (国際学会)
  6. Haga K, Fujimoto A, Doan H.Y, Takai-Todaka R, Miki M, Murakami K, Yokoyama M, Murata K, Nakanishi A, Katayama K. Identification of the functional receptor for murine norovirus. The 6<sup>th</sup> International Calicivirus Conference, 2016,10,09~13. Savannah, GA, USA. (国際学会)
  7. Katayama K. Norovirus Special workshop 5<sup>th</sup> international Society for Food and Environmental Virology 2016,9,13~16, 群馬(草津)(招待講演)(国際学会)
  8. 片山和彦 ノロウイルス研究の最前線 日本獣医師学会(招待講演) 2017年2月24日~26日、金沢
  9. Katayama K. Identification of the functional receptor for murine norovirus. The 2017 Japan-NIH Joint Symposium. 2017.2.15~17. 宮城(仙台)(招待講演)(国際学会)
  10. Katayama K, Takai-TO高 R, Song C, Miki M, Fujimoto A, Yokoyama M. Iwasaki K, Murata K. Study of norovirus virion structure and new antigen delivery system. US-Japan Cooperative Medical Sciences Program (USJCMSP) 20<sup>th</sup> International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. 2018,1,8~11. Shenzhen, China. (招待講演)(国際学会)
  11. Fujimoto A, Takai-Todaka R, Sugimoto S, Matano M, Sato T, Katayama K. Towards development of a human norovirus culture system. US-Japan Cooperative Medical Sciences Program (USJCMSP) 20<sup>th</sup> International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. 2018,1,8~11. Shenzhen, China. (国際学会)
  12. Katayama K, Takai-Todaka R, Song C, Miki M, Fujimoto A, Miyasaki N, Iwasaki K, Murata K. Study of norovirus infection mechanism. 第66回日本ウイルス学会学術集会 2018年10月28~30日 京都
  13. Rachmadi A.T, Kitajima M, Watanabe K, Yaegashi S, Serrana J, Nakamura A, Nakagomi T, Nakagomi O, Katayama K, Sano D. Selective pressure of free chlorine on murine norovirus. 第66回日本ウイルス学会学術集会 2018年10月28~30日 京都
  14. Murakami K, Tange V.R, Karandikar U, Ramani S, Ettayebi K, Zeng XL, Crawford S.E,

Katayama K, Atmar R.L, Estes M.K. Possible alternative mechanism of bile-requiring GII.3 human norovirus replication in human intestinal enteroids. 第66回日本ウイルス学会学術集会 2018年10月28~30日 京都

15. Song C, Todaka R, Haga K, Fujimoto A, Yokoyama M, Miyazaki N, Iwasaki K, Katayama K, Murata K. Capsid structure of murine norovirus revealed by cryo-electron microscopy. 生物物理学会 2018年9月15日~17日 岡山

〔図書〕(計 2件)

1. 片山和彦 ノロウイルスワクチン ワクチン 日本ワクチン学会編 朝倉書店 総ページ数376, 2018年
2. 片山和彦 ノロウイルス ウイルス検査法 日本臨床ウイルス学会 春恒社 総ページ数382, 2018年

〔産業財産権〕

出願状況(計 2件)

・名称: ノロウイルスが増殖可能な遺伝子組換え培養細胞、及び、その用途

発明者: 片山和彦、戸高玲子、芳賀慧、藤本陽、中西章、三木元博、関根盛、大塚浩史、三森重孝

権利者: 国立感染症研究所[45%]、国立長寿医療研究センター[45%]、デンカ株式会社[10%]

番号: 特願 2016-19315

出願年: 2016-02-03 出願、2017-02-01 PCT 出願

国内外の別: 国内及び、PCTにて、米国、EP、カナダ、中国、韓国、ブラジル、インド)

・名称: ヒト下痢症ウイルスの感染・増殖培養用2Dオルガノイド及びその使用

発明者: 佐藤俊朗(慶應義塾大学教授)、片山和彦(慶應義塾大学研究員)

権利者: 学校法人慶應義塾[100%]

番号: 特願 2016-163711

出願年: 2016-08-24 出願、2017-08-21 PCT 出願

国内外の別: 国内及び、PCTにて、米国、EP、カナダ、中国、韓国、ブラジル、インド

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)研究分担者

研究分担者氏名: 中西 章(ナカニシ アキラ)

ローマ字氏名: Nakanishi Akira

所属研究機関名: 近畿大学

部局名: 生物理工学部遺伝子工学科応用ゲノム工学研究室

職名: 教授

研究者番号(8桁): 60397049

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。