

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08514

研究課題名(和文) hSCARB2-Tgマウスを用いたEV71神経毒力因子の解析

研究課題名(英文) Identification of EV71 virulence determinants using mouse model

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・主席研究員

研究者番号：10580201

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：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。このウイルスは神経病原性を示すがその神経毒力決定機構は不明である。EV71分離株の中には温度順化株が存在し、神経毒力に変化を及ぼすと考え、温度馴化変異株に焦点を当てウイルス因子を同定することとした。

本研究を遂行中にEV71粒子を構成するVP1の145番目のアミノ酸が毒力に影響することが明らかになった。そこで計画を変更し温度感受性よりも影響を及ぼす可能性のあるVP1-145アミノ酸の毒力への関与を霊長類モデルで比較し、VP1-145アミノ酸が強い毒力を示すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Enterovirus 71 (EV71) is a causative agent of hand, foot, and mouth disease and sometimes causes severe or fatal neurological complications. The amino acid at VP1-145 determines virological characteristics of EV71. Viruses with glutamic acid (E) at VP1-145 (VP1-145E) are virulent in neonatal mice and transgenic mice expressing human scavenger receptor B2, whereas those with glutamine (Q) or glycine (G) are not. However, the contribution of this variation to pathogenesis in humans is not fully understood. We compared the virulence of VP1-145E and VP1-145G viruses of Isehara and C7/Osaka backgrounds in cynomolgus monkeys. VP1-145E, but not VP1-145G, viruses induced neurological symptoms. VP1-145E viruses were frequently detected in the tissues of infected monkeys. VP1-145G viruses were detected less frequently and disappeared quickly. Instead, mutants that had a G to E mutation at VP1-145 emerged, suggesting that VP1-145E viruses have a replication advantage in the monkeys.

研究分野：ウイルス学

キーワード：エンテロウイルス71 神経病原性

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。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、その神経毒力決定機構は不明である。EV71は宿主域が狭く、成熟マウスでは病態を示さない。従って適したマウスモデルが確立されていなかったため毒力決定機構の解析は進んでいない。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感染様式がヒトの場合と類似しており、試験した全てのウイルス株で神経症状を示す。そこで本研究はhSCARB2-Tgマウスを用いてEV71が持つ神経毒力決定に関わる因子の同定を目的とし実験を行う。

ポリオウイルスでは弱毒株を高温継代すると神経毒力が強くなることが報告されている。一方、EV71は温度抵抗性と温度感受性の株が混在している (Hagiwara et al. 1983 JGV, Wong et al. Virology)。プロトタイプであるBrCr株は高温(39.5℃)と低温(36℃)の両方の環境下でも増殖可能な温度抵抗性株 (BrCr-Tr) と高温では増殖できない温度感受性株 (BrCr-Ts) が存在し、BrCr-Tr株はBrCr-Ts株よりもカニクイザルで強い神経毒力を示す (Hagiwara et al. 1983 Acta Neuropathol)。BrCr-Tr株とBrCr-Ts株の遺伝子配列を比較すると7塩基の違いが見られ、IRES領域がその温度感受性とカニクイザルにおける神経毒力に關与していることが示唆されている (Arita et al. 2005 JGV)。従って、温度馴化による変異はウイルス増殖能を含め神経毒力に変化を及ぼす可能性が高い。またhSCARB2-Tgマウスの脳で継代すると神経毒力が強くなる可能性が高い。

本研究を遂行中にEV71粒子を構成するVP1の145番目のアミノ酸がグリシン (G) である株とグルタミン酸 (E) の株が存在し、Eを持つ株の方が毒力が強くなることが明らかになった。ヒトにおいてもVP1-145アミノ酸による毒力の違いがあるかは不明である。

2. 研究の目的

本研究は1つのウイルス株を基準とし、その株の変異体を作成、ウイルス学的性質とhSCARB2-Tgマウスでの毒力を比較することで神経毒力に關与するウイルス因子の同定を目的としていた。そこで当初は温度馴化変異株とマウス馴化株を作製し、SCARB2-Tgマウスを用いて親株との神経毒力を比較することで神経毒力に關与するウイルス因子を同定することを予定していたが、計画を変更し温度感受性よりも影響を及ぼす可能性のあるVP1-145アミノ酸の毒力への関与をヒトに近い霊長類モデルで比較した。

3. 研究の方法

(1) カニクイザルを用いた病原性比較

8頭のサルを2群に分け、Isehara-G接種群 (#5212、5213、5214、5215)、Isehara-E接種群 (#5216、5217、5218、5219) とした。更に6頭のサルを2つの群に分け、C7-G接種群 (サル#5254、#5255、#5256)、他の群はC7-E接種群 (サル#5257、#5258、#5220) とした。麻酔下 (10mg/kg ケタミン、筋肉内注射) でウイルス接種および検体採取を行った。ウイルス接種の前 (接種前) に、手足口病症状を観察し、全血、咽頭拭い液および直腸拭い液を採取した。10⁶ TCID₅₀ のウイルスを含有する1mlのEV71ウイルス溶液を右脛骨静脈に静脈内接種した。接種後、10日間毎日サルを観察し、神経症状を評価した。接種後1,4,7、および10日後、麻酔下では、手足口病症状を観察された。また同時にウイルス学的および免疫学的分析のために、全血、咽頭拭い液および直腸拭い液を収集した。接種後10日目に深麻酔下でサルを安楽死させ、組織病理学的およびウイルス学的分析のために中枢神経系、主要器官およびリンパ節を収集した。収集した組織の10% [wt / vol] ホモジネートを、MagNA Lyzer (Roche, Basel, CH) を含む5% FBS含有DMEM中で調製した後、4℃で10,000xgで5分間遠心分離して組織破片を除去した。上清をRD-SCARB2細胞におけるウイルス単離およびウイルスRNA検出のためのRNA抽出に使用した。

(2) 病理学的解析

組織病理学および免疫組織化学のために脳および脊髄サンプルをPBS中の10%ホルマリン中に固定し、パラフィンに包埋した。パラフィン包埋切片をヘマトキシリンおよびエオシン (HE) で染色した。EV71抗原の免疫組織化学的検出は、標識ストレプトアビジン-ビオチン法 (Dako Denmark A / S, Glostrup, Denmark) を用いてパラフィン包埋切片上で行った。抗原露出のために、切片を、10mMクエン酸緩衝液 (pH6.0) を含むオートクレーブ中、121℃で10分間加熱した。一次抗体として、EV71-1095 / Shiga (亜群C2) の変性ウイルス粒子に対して産生されたポリクローナル抗体を用いた。ペルオキシダーゼ活性は3,3'-ジアミノジジンジン (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) で検出し、切片をヘマトキシリンで対比染色した。

(3) ウイルス増殖比較

ウイルス単離のために、臨床試料調製物または組織ホモジネートを接種したRD-SCARB2細胞を細胞変性効果 (CPE) について1週間観察し、次いで第1回継代の凍結融解後にCPE陰性試料について盲検継代を行った。第1および第2回培養中にCPEが観察されなかった場合、ウイルス単離の結果は陰性とした。

ウイルスRNAの検出と配列解析のためにRNA抽出を行なった。RNA抽出の前に、拭い液検体を2,000rpmで3分間遠心分離し、上清をRNA抽出に使用した。ウイルスゲノムRNA

を、HighPure ウイルス RNA 精製キット (Roche, Penzberg, DE) を用いて、臨床検体または 10% 組織解剖検体から抽出した。PrimeScript II One-Step RT-PCR Kit (Takara, Japan) を用いて逆転写 PCR (RT-PCR) を行った。Nested PCR は Takara Taq Hot Start バージョン (Takara, Japan) を用いて行った。PCR 産物は、PCR 精製キット (Qiagen, Germany) を用いて精製し VP1 の全長配列を決定・比較分析した。

(4) サイトカイン産生比較

COS7 細胞における IFN- γ の産生を調べるために、 10^6 COS7 細胞に 10^5 TCID₅₀ (Vero 細胞を用いて測定) で VP1-145 変異体を感染させた。感染後 48 時間後、培養上清を回収し、-80 °C で保存した。培養上清またはサル血清中の IFN- γ 濃度を、Cynomolgus / Rhesus IFN Alpha ELISA キット (PBL, Piscataway, NJ) を用いて分析した。血清サイトカイン濃度を、Luminex 200 (Luminex, Austin, TX) で Cytokine Monkey Magnetic 29-Plex Panels (Life Technologies, Carlsbad, CA) を用いて分析した。

(5) 中和抗体価測定

血清サンプルを 5% FBS/DMEM で段階希釈した。EV71 液を 500 プラーク形成単位/100 μ l の濃度に希釈した。100 μ l の希釈した血清を 96 ウェルプレート中の 100 μ l の EV71 溶液と混合し、37 °C で 2 時間インキュベートした。インキュベーション後、200 μ l の血清 - ウイルス混合物を 10^6 個の RD-A 細胞を含む 6-ウェルプレートに移し、37 °C で 1 時間インキュベートした。インキュベーション後、血清 - ウイルス混合物を除去し、RD-A 細胞に 5% FBS および 1.2% メチルセルロースを含有する MEM を追加した。中和抗体価は、プラーク数を元の数の 20% 未満に減少させた最も高い血清希釈として決定した。

4. 研究成果

(1) カニクイザルにおける病原性

Isehara, C7 / Osaka および SK-EV006 株に基づく VP1-145 で G または E を有する組換えウイルスを作製し、hSCARB2 tg マウスモデルにおけるこれらのウイルスの病原性を決定した。VP1-145E は、すべてのウイルス株において VP1-145G よりも強い毒力を示した。非ヒト霊長類モデルにおいて、VP1-145E が VP1-145G より毒性が高いかどうかを確認するために、Isehara および C7 / Osaka の VP1-145 突然変異体をカニクイザルに接種した。それぞれ 4 頭のサルに、Isehara-G または Isehara-E の 10^6 TCID₅₀ を静脈内接種した。それぞれ 3 頭のサルに 10^6 TCID₅₀ の C7-G または C7-E を静脈内接種した。接種後、サルの臨床症状を 10 日間観察した。観察期間中、いずれの群のサルも非常に重篤な神経症状は示していないため観察期間 10 日の間で安楽死させた個体はいない。Isehara-E (#5217 および #5218) を接種した 2 頭のサルは、C7-E (#5257 および #5220) を接種した 2 頭のサ

ルと同様に、接種後 5~6 日目で神経症状である企図振戦を示した。C7-E (#5258) を接種した 1 頭のサルは、8 日目で振戦を示した。Isehara-G または C7-G を接種したサルのいずれも明らかな神経症状を示さなかった。いずれの群においても手足口病症状と肺水腫は観察されなかった。したがって、これらの結果は、VP1-145E ウイルスが VP1-145G ウイルスよりも頻繁に神経学的症状を誘発することを示した。

(2) 病理学的解析

サルを 10 日目に安楽死させ、中枢神経組織を組織病理学的に検査した。Isehara-E 接種群では、神経症状を呈した 2 頭のサル (#5217 および #5218) の脊髄および大脳灰白質を含む中枢神経組織の多くの領域で広範な炎症が見られた。脊髄の前角に軽度の神経変性があった。サル #5217 の脊髄の前角でウイルス抗原が検出された。2 つのサル (#5216 および #5219) の中枢神経組織に病理学的変化は認められず、神経学的症状はなかった。Isehara-G 接種群では、いずれのサルも中枢神経病変を有していなかった。同様に、C7-E 接種群では、振戦のある 2 頭のサル (#5257 および #5220) の中枢神経組織に炎症が見られた。C7-E を接種したサル #5258 は接種後 8 日目で軽度の神経学的症状を示したが、中枢神経組織では炎症およびニューロン変性は見られなかった。C7-G を接種したサルには明らかな中枢神経病変はなかった。結論として、接種後 10 日目における中枢神経組織の組織病理学的分析により、Isehara-E および C7-E は炎症およびニューロン損傷を誘導したが、Isehara-G および C7-G は誘導しなかったことが明らかになった。

(3) ウイルス増殖比較

静脈内接種後のウイルスの広がりを調べるために、臨床検体 (咽頭拭い液、直腸拭い液、および血清) を 0 (接種前)、1, 4, 7 および 10 日目に収集した。10 日目で剖検検体を得た。臨床検体および検体検体のウイルス力価は低いため、RD-SCARB2 細胞を使用してウイルス分離を行った。この細胞は、RD-A 細胞よりも EV71 感染に対して約 100 倍感受性が高い。ほとんどすべての細胞変性効果 (CPE) は、2 回目の盲検継代で認められた。RT-PCR により、臨床検体および剖検検体からウイルス RNA を直接検出した。RT-PCR の感度は、RD-SCARB2 細胞を用いたウイルス単離の感度よりも高い。ウイルス分離で陽性である全ての試料においてウイルス RNA が検出されている。

ウイルスおよびウイルス RNA は、1 日目および/または 4 日目の咽頭拭い液が陽性であった。Isehara-E、C7-E、および C7-G を接種したサルにおいて、ウイルスおよび/またはウイルス RNA は直腸拭い液において 1 日目で陽性であった。Isehara-E、C7-E、または C7-G を接種したサルにおいて、Isehara-G を接種したサルの咽頭または直腸拭い液では、

ウイルスおよび/またはウイルス RNA は検出されなかった。一過性ウイルス血症は1および/または4日目で検出された。すべてのウイルスに感染したサルでは、Isehara-E および C7-E を接種したサルより、様々な剖検検体でウイルスおよび/またはウイルス RNA を検出する頻度が、Isehara-G および C7-G を接種したサルよりも頻りに検出された。特に、VP1-145E 接種サルの中で、神経症状および組織病理学的変化(#5217、#5218、#5257 および #5220)を有するサルは、中枢神経組織においてウイルス RNA 陽性であった。これらの神経症状、組織病理学的変化、およびウイルス分離の結果から、VP1-145E ウイルスが、VP1-145G ウイルスよりも毒性が高いことを示唆している。

ウイルスの遺伝的安定性を解明するために、我々はウイルス RNA が検出されたすべての検体の VP1 配列を決定した。我々は、回収されたウイルス配列にいくつかの変異を見出した。興味深いことに、Isehara-G を接種したサルの 11 個の試料すべてにおいて VP1-145 に G から E 突然変異が見出された。この突然変異に加えて、サル #5212 の橋では、VP1-77 Glu が Gly に、VP1-150 Leu が Ser に、そして VP1-243 Ser が Pro に変異していた。Isehara-E を接種したサルから回収したすべての検体において、VP1-145 は変化しなかった。#5218 および #5219 から回収された試料では、VP1-19 Ala から Ser への変異が見出された。

C7-G を接種したサンプルでは、咽頭拭い液、直腸拭い液、および血清検体を接種後1日目で検出したウイルス RNA には変異は認められなかった。しかし、直腸拭い液中のウイルス RNA および #5255 の血清は接種後 4~7 日目で VP1-145 において G が E へ置換していた。C7-E 接種されたサルから回収されたすべての検体の VP1-145 は変化していなかった。サル #5257 および #5258 において VP1-233 Phe が Leu に部分置換していた。

重要なことに、VP1-145 は VP1-145E 接種群で変化しなかったが、VP1-145G ウイルス接種サルにおいて接種後1日目に VP1-145E 変異体が出現した。これらの結果は、VP1-145E がカニクイザルにおける VP1-145G よりも安定であり、VP1-145 での G から E への突然変異に対する強い選択圧が生体内で生じたことを示した。

(4) サイトカイン産生比較

I 型インターフェロン (IFN) および前炎症性サイトカインを含む先天性免疫応答は、ウイルス感染に対する宿主防御において重要な役割を果たす。サルの自然免疫応答を比較する前に、培養したサル細胞における I 型 IFN 産生を確認した。サル腎臓由来の COS7 細胞に VP1-145 変異体を感染させ、培養上清中の IFN- γ の量を ELISA によって測定した。この条件では、ウイルスを感染させていない COS7 細胞の上清中に IFN- γ は検出されな

った。VP1-145G および VP1-145E 感染細胞の培養上清中には同量の IFN- γ が、検出された。これは、VP1-145G および VP1-145E の両方が、サル細胞において IFN 誘導活性を有することを示唆する。我々は、VP1-145G および VP1-145E ウイルスを接種した後、ELISA を用いて血清 IFN- γ レベルおよびサイトカインを測定した。接種後 4 または 7 日目に血清 IFN- γ レベルの有意な増加が観察された。Isehara-E または C7-E を接種した全てのサルにおいても同様であった。対照的に、Isehara-G または C7-G を接種したサルでは血清中 IFN- γ の産生は、検出限界以下であった。これらの結果は、VP1-145E 接種群では自然免疫反応が4日目から惹起されたことを示し、VP1-145G 接種群では検出されなかったことから VP1-145E ウイルスによる感染が VP1-145G ウイルスによる感染よりも広範に進行すると示唆された。

我々はまた、マルチサイトカインアッセイ系を用いて、EV71 感染中の IFN- γ 、TNF- α 、G-CSF および IL-6 の血清レベルを比較した。Isehara-E 接種群のサル #5217 および C7-E 接種群の #5257 および #5220 のサルでは、IFN- γ 、TNF- α 、および G-CSF の血清レベルの有意な増加が接種後 7-10 日目に観察された。これらのサルでは、いずれも振戦および病理学的変化を示した。対照的に、Isehara-G または C7-G ウイルスを接種したサルでは、サイトカインの血清レベルの上昇は観察されなかった。

以上のことから、VP1-145E および VP1-145G ウイルスによる感染後の自然免疫応答の反応は異なっていた。VP1-145E ウイルスは VP1-145G ウイルスよりもより多くの組織で検出され、より広範囲に広がっていることが示唆される。強いサイトカイン産生誘導は、VP1-145E ウイルスによる感染拡大に反応して誘導されていると考えられる。

(5) 中和抗体価測定

中和抗体はエンテロウイルス感染を排除するのに重要な役割を果たす。VP1-145G および VP1-145E が中和抗体を誘導する能力が、静脈内感染後に異なるかどうかを調べた。中和抗体価を、プラーク数減少が 80% を超える最高希釈値と定義した。Isehara-G および Isehara-E を接種したサルでは、Isehara-G に対する中和抗体が 4 日目から出現した。(1:4-16)。力価は接種後 10 日目も増加した。(1:16-256)。Isehara-E を攻撃ウイルスとして使用した場合も中和抗体価は上昇していたが、攻撃ウイルスとして Isehara-G を使用した場合に比べて力価はるかに低かった。同様の結果が C7 ウイルス接種群で得られた。VP1-145G および VP1-145E ウイルスはいずれも、同等の中和抗体価を誘導した。これらの結果は、VP1-145G および VP1-145E ウイルスの両方も、十分に中和抗体を誘発し、その誘導レベルは同等であることを示唆した。しかし、VP1-145E ウイルスに対する中

和抗体力価は、VP1-145G ウイルスに対する中和抗体価より低かった。したがって、Isehara-EおよびC7-Eは中和抗体に対してより耐性があると示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

Ken Fujii, Yui Sudaka, Chikako Kataoka, Tadaki Suzuki, Naoko, Iwata-Yoshikawa, Osamu Kotani, Yasushi Ami, Hiroyuki Shimizu, Noriyo Nagata and Satoshi Koike. The VP1 amino acid residue 145 of EV71 is a virulence determinant in a cynomolgus monkey model 第64回日本ウイルス学会学術集会 2016年

Ken Fujii, Yui Sudaka, Ayumi Imura, Ayako Takashino, Chikako Kataoka, Tadaki Suzuki, Naoko Iwata-Yoshikawa, Osamu Kotani, Yasushi Ami, Hiroyuki Shimizu, Noriyo Nagata and Satoshi Koike. The VP1 amino acid residue 145 of EV71 is a virulence determinant in SCARB2-dependent infection. The 19th Meeting of European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses (国際学会) 2016年

〔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〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/neurovirology/index.html>

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・主席研究員

研究者番号：10580201