

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02667

研究課題名(和文) エンテロウイルス71感染の重症化に関するウイルス側因子の解明

研究課題名(英文) Studies on viral factors that contribute to severe infection of enterovirus 71

研究代表者

小池 智 (KOIKE, Satoshi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・疾患制御研究分野・分野長

研究者番号：30195630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：エンテロウイルス71(EV71)は手足口病の原因ウイルスであるが、時に中枢神経合併症を起こすことが知られている。その理由として伝播の過程で強毒変異を起こしていることが考えられる。我々は臨床分離株とEV71感受性Scavenger receptor B2-トランスジェニックマウスを用いて、病原性の解析を行った。ウイルスは流行ごとに異なった病原性の程度を示し、変異の導入による病原性の変動が示唆された。強毒株と弱毒株の組換え体ウイルスを作製して、5'-UTRの変異が病原性の変化に重要な役割を担っていることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルスは生態系の中で塩基置換や相同組換えを繰り返し、重篤な感染症の原因ウイルスとして変化(進化)していきと考えられ、EV71もそのモデルの一つと考えられる。その過程の解明はウイルス学の概念上重要で一般化して考える意義が十分にある。さらに、その解明は新興・再興感染症出現のメカニズムを解明することにつながり、社会にいち早く注意喚起情報を発出することができ、社会的な貢献も大きい。

研究成果の概要(英文)：EV71, a causative agent of hand, foot and mouth disease, sometimes causes central nervous system complications. The reason for this is that it undergoes a virulent mutation during transmission. We analyzed the pathogenicity of the viruses using clinical isolates and EV71-susceptible Scavenger receptor B2 transgenic mice. The viruses showed different degrees of virulence in different epidemics, suggesting the fluctuation of the virulence by introduced mutations. We generated recombinant viruses of both virulent and avirulent strains and found that mutations in the 5'-UTR played an important role in determining the virulence.

研究分野：ウイルス学

キーワード：エンテロウイルス71 病原性 神経病原性

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

エンテロウイルス 71(EV71)やコクサッキーウイルス A16(CVA16)などピコルナウイルス科エンテロウイルス属 species A(EV-A)に属する一群のウイルスは手足口病の主な原因ウイルスである。手足口病は予後の良好な疾患であるが、EV71 感染の場合には、髄膜炎等の中枢神経症状、稀に急性脳炎、急性弛緩性マヒなどの重篤な中枢神経系合併症が見られることがある。EV71 は点塩基置換や近縁の EV-A 間の相同組換えにより、ダイナミックな変異を繰り返しながら、新たな genogroup, subgenogroup 或いは clade の出現や消失を繰り返していることが知られている。従って EV71 変異によって神経病原性の高い EV71 の一群が出現した場合に重症例を多く伴う流行が起こっている可能性が考えられた(図1)。

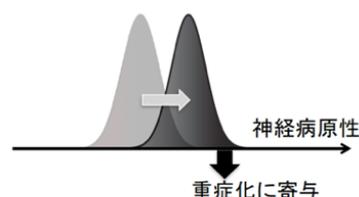


図1 ウイルス病原性と重症化の仮説

EV71は塩基配列や病原性が少しずつ異なるばらつきを持った集団として伝播している。病原性の低いウイルスが伝播している場合は手足口病の流行となるが(灰色)、病原性のより高いウイルスが生じた場合に重症化が多く見られる(黒)と予想される。

これらの状況を踏まえ、①点塩基置換や EV-A 間の相同組換えによって生ずる変異で重症化に関連する変異があるのか? ②これらの変異の出現は重症化が多発する地域や時期と関連があるか?などを明らかにする必要があった。しかしながら、適切な動物モデルがなかったことから正確な解析が困難であった。そこで、我々は種特異性を決定しているウイルス受容体、ヒト Scavenger receptor B2(SCARB2)を同定し(1)、これを発現するトランスジェニック(tg)マウスを作製した(2)。SCARB2tg マウスによってウイルスの病原性の程度を定量的に評価することがはじめて可能となった。そこでウイルスの時間的、地理的に伝播していく際の毒力の変異の有無、毒力の変化を決定している塩基置換などの同定を行う準備が整った。

2. 研究の目的

EV71 の伝播に伴い強毒化或いは弱毒化する時間的、地理的なウイルスの動態を解明すること、毒力を規定するウイルス側遺伝情報の解明を本研究の目的とする。これまでに研究分担者等が長年にわたって分離してきたウイルス株等と SCARB2tg マウスを利用することによって EV71 病原性に関わるウイルス側要因の詳細な解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) ウイルスサンプル

手足口病などと診断された患者検体から仙台ウイルスセンター、山形県衛生研究所で分離された EV71 株並びにベトナムハノイ国立小児病院で分離された EV71 株を用いた。国内で分離された株の患者は手足口病、ヘルパンギーナ、上気道炎などと診断された患者である。ハノイ国立小児病院で分離された患者はベトナムの診断基準によって分類され、手足口病(グレード1)の患者とミオクローヌスなど中枢神経症状が観察された患者(グレード2以上)が存在する。最終

的に国内分離株として subgenogroup B5 並びに C4 に属する株をそれぞれ 11、21 株、ベトナム株として 19、8 株を実験に用いた。

(2) 塩基配列の解析

次世代シーケンサーMiSeq によりウイルスゲノム RNA の配列を決定した。配列のデータから分子系統樹を作成するなどして、genogroup, subgenogroup, clade などの群に分類しウイルス株の時間的あるいは地理的な流行の動態を調べた。

(3) 病原性の解析

1 ウイルス株について SCARB2 tg マウス 10 頭を用い、 5×10^5 TCID₅₀ のウイルスを腹腔内接種し、2 週間麻痺などの神経症状と体重変化を観察し、死亡率によってこのウイルスの毒力の指標とした。病原性を決定する実験においては、はじめの実験で毒力が高いものと低いものを代表として選抜し、それぞれの株の cDNA を用いて組換え体を作製し、その病原性を実測することにより、毒力に変異を与えるゲノム領域の同定などについて解析を行った。

4. 研究成果

(1) 株の選抜方法とウイルス調製方法の改良

臨床分離株を RD 細胞で培養するとカプシドタンパク質 VP 1 の 145 番の Glu(E)が Gly(G)もしくは Gln(Q)に変異し弱毒化してしまう。VP1-145G/Q 変異株は attachment receptor であるへパラン硫酸

(HS) に結合可能なため培養細胞においてはほとんどの E 株と比較して数百倍感染効率が高くなる。ところが動物の体内では HS に吸着された変異株は感染成立することができず体内伝播ができずに弱毒化する(3, 4)。そこで我々は G, Q への変異が起きない培養方法として HS 生合成経路の EXT1 破壊と SCARB2 の強制発現を行なった。RD-ΔEXT1+hSCARB2 細胞株は VP1-145E 株の変異は最小限に抑制することができ、病原性を変化させることがなく実験に供することができる。変異株含有率の高い株はウイルス遺伝子をクローニングし感染性 cDNA 由来の混入のほとんどないウイルス株を使うことにしてデータの揺らぎを防ぐことができた。

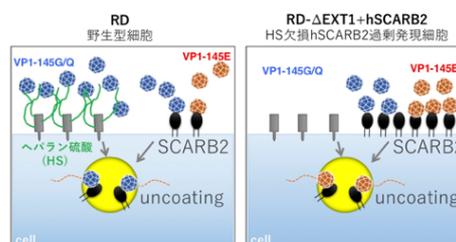


図2 RD細胞ではVP1-145G/Qに変異したEV71がHSを介して効率よく感染するため感染効率が高くなる。これに対してRD-ΔEXT1+hSCARB2細胞では、この経路が使えないのでVP1-145G/Qが選択的に増殖することはない。

(2) ベトナム株の解析

ベトナムハノイにおいて 2015-2016 に流行したウイルス株を調べた(5)。127 株のうち 117 株(92.1%)は subgenogroup B5 に属し、10 株 (7.9%)は subgenogroup C4 に属した。このことはこの時期にハノイでは異なっ

た2種類の subgenogroup に属するウイルスが同時に流行していたことになる。これらのウイルスに感染した患者の臨床症状を比較すると C4 株に感染した患者の重症度が有意に高かった(表1)。subgenogroup B5 の属する 19 株と C4 に属する 8 株を SCARB2 tg マウスを用いてこれらの株の病原性を詳細に解析した。B5 群では死亡率は 0-75%であったが、C4 群では 60-100%で

	グレード1	グレード2以上
B5 (n=117)	85(72.6%)	32(24.4%)
C4 (n=10)	2(20%)	8(80%)

表1 ベトナム株のsubgenogroupと臨床症状の関係

あり、C4 株の病原性は B5 株と比較して有意に高いと結論された (図 3A)。また C4 に属する 10 株のうち 2 株については 3D 遺伝子の部分が CVA8 との組換え体ウイルスであると結論された。つまり、この年のハノイの流行株は 2 種類の subgenogroup に属するものが存在し、そのうち C4 株群がヒトにおいても SCARB2 tg マウスにおいても高い病原性を示した。また、C4 株で見つかった CVA8 との相同組換えによる組換え体ウイルスは大きな表現系の違いを示さなかった。異なった病原性の高さを持った 2 つのウイルス群が流行し、ヒトに対して程度の異なる毒力を示していたことは、我々の仮説であるウイルスの変異と重症例を伴う流行との関係を支持する結果である。

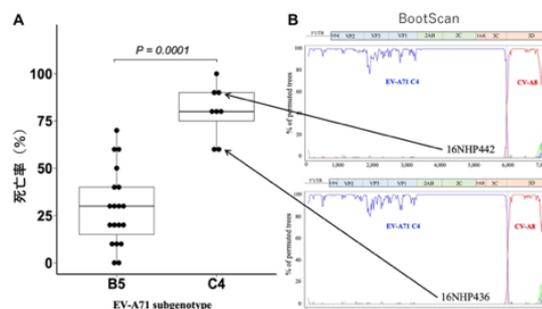


図3 (A)SCARB2tgマウスにおけるB5, C4株の死亡率。C4株の方が強い病原性を示した。(B) 矢印で示した2株はBootScan解析によりCVA8とrecombinationしたことが判明した。

(3) 国内株の解析

国内株は過去 20 年に渡り仙台ウイルスセンター並びに山形県衛生研究所で分離、保管されてきた EV71 株を用いて行なった。この間の主な流行株は subgenogroup B5 もしくは C4 に属する株 32 株を実験に用いた。情報量を増やすためには上に述べたベトナム株 27 株のデータと比較検討する方が望ましいと考えられたので両者を合わせて解析した。

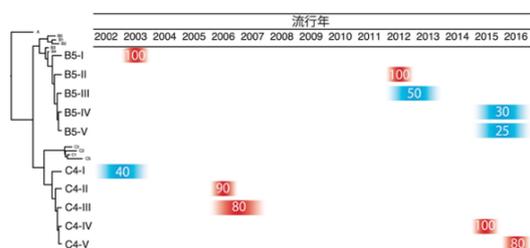


図4 国内分離株のクレードごとの流行年と病原性。左側は分子系統樹で臨床分離株は10のクレードに分類される。右側はそれぞれのクレードが流行した年とhSCARB2-tgマウスにおける各クレードの平均死亡率 (%) を示している。平均死亡率が60%以上のクレードは赤で、60%未満のクレードは青で示している。

NGS で得られた塩基配列を元に分子系統樹を作成すると、これらのウイルス群は 10 のクレードに分けられることが判明した (図 4)。EV71 の流行はほぼ 4、5 年周期であるが、一つのクレードは 1 回の流行に対応していた。また、流行年には 2 つのクレードが同時に検出された。ウイルスの伝播によって新たなクレードが次々の出現しているウイルスの動態が明確となった。

国内の EV71 株が分離された患者の臨床症状で重症例はなかったが、マウスの毒力試験では強毒株から弱毒株までが存在した。興味深いことに同一クレードに属する株の間では病原性は同程度だが、異なったクレード間では違いがあり、クレード毎に固有の病原性があることが判明した (図 4)。この実験結果からも、ウイルスの伝播に伴い時間的、地理的に離れた集団においてウイルスの毒力の変動していることを示している。

(4) キメラ解析

同一の subgenogroup に属しているが異なったクレードに属するウイルス株の間のホモロジーは高い (97.5-99.6%、平均 98.7%) のでごく少数の変異によって毒力が大きく変動する可能性があると考えられた。両者間で組換え体ウイルスを逆遺伝学的手法で作製し、その毒力を比較することができれば初期の予定通り毒力の決定に関与するウイルスゲノム上の変異を同定するこ

とができる。重要な変異を探すために C4 株の強毒の代表と弱毒の代表を選抜した。N772-Sendai-06 株はクレード C4-II に属し、死亡率は 90%と強毒性を示した。一方 100-Yamagata-03 はクレード C4-I に属し、死亡率は 0%で弱毒性を示した。初めに作製した両者の間のキメラウイルスはウイルスゲノムの前半部分と後半部分で組み換えたもので、前半部分が強毒株由来であると強毒性であった。さらに前半部分を 5'-UTR とカプシドタンパク質がコードされている P1 領域に分けて組換え体を作製したところ、5'-UTR が強毒株由来である場合に組換え体は強毒性を示し、5'-UTR が最も毒力に大きな影響を与えていることがわかった。ここは internal ribosome entry site (IRES) の領域である。この領域をさらに 3 分割し、どの領域にマップされるかを調べ、ステム・ループ III と IV の領域が重要であることがわかった (図 5)。

(5) 考察

この実験方法により過去に流行した、或いは現在流行しているウイルス株が強毒性をもつものか否か実験的に調べることができるシステムが確立できた。これによって過去の大規模な流行時の株を遡って調べることが可能であり、現在の流行株に関する危険情報をより早く伝達することが可能となった。

今回取り上げた subgenogroup C4 に属する強毒株・弱毒株の比較結果からは 5'-UTR に毒力に強い影響を与える変異がマップされた。この結果がどの流行でも共通の箇所に強毒性をもたらす変異であると結論することができるか否かは現段階では不明である。さらなる検討が必要とされる。もし共通の強毒マーカーが存在するのであれば、それを同定し危険情報を予測することも可能である。

IRES の変異であればウイルスタンパクの合成効率の調節により毒力はコントロールされている可能性がある。これはポリオウイルスの毒力変化のメカニズムとの共通性が示唆される。しかし、毒力を決定する塩基の位置は異なっているため、弱毒化のメカニズムについては更なる解析が必要である。

<引用文献>

1. S. Yamayoshi *et al.*, *Nature medicine* **15**, 798-801 (2009).
2. K. Fujii *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 14753-14758 (2013).
3. K. Kobayashi *et al.*, *J Virol* **92**, e00681-00618 (2018).
4. K. Fujii *et al.*, *J Virol* **92** (2018).
5. S. T. Chu *et al.*, *Sci Rep* **10**, 159 (2020).

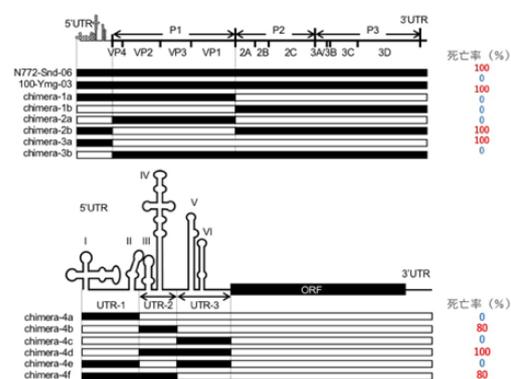


図5 EV71強毒株と弱毒株のキメラウイルスの病原性解析。黒は強毒株、白は弱毒株由来の配列を示す。野生型および各キメラウイルスをhSCARB2-tgマウスに感染させ死亡率を調べた。5'-UTRでステム・ループIII, IVの領域が強毒性に関連があることがわかる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Imura Ayumi, Sudaka Yui, Takashino Ayako, Tamura Kanami, Kobayashi Kyousuke, Nagata Noriyo, Nishimura Hidekazu, Mizuta Katsumi, Koike Satoshi	4. 巻 94
2. 論文標題 Development of an Enterovirus 71 Vaccine Efficacy Test Using Human Scavenger Receptor B2 Transgenic Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01921-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 小池 智	4. 巻 48
2. 論文標題 エンテロウイルス71の病原性に関する基礎研究	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床とウイルス	6. 最初と最後の頁 330-335
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chu ST, Kobayashi K, Bi X, Ishizaki A, Tran TT, Phung TTB, Pham CTT, Nguyen LV, Ta TA, Khu DTK, Agoh M, Pham AN, Koike S, Ichimura H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Newly emerged enterovirus-A71 C4 sublineage may be more virulent than B5 in the 2015-2016 hand-foot-and-mouth disease outbreak in northern Vietnam.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-56703-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 kobayashi K, Mizuta K, Koike S	4. 巻 16
2. 論文標題 Heparan sulfate attachment receptor is a major selection factor for attenuated enterovirus 71 mutants during cell culture adaptation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS Pathogness	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.ppat.1008428	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi K, Koike S	4. 巻 27
2. 論文標題 Cellular receptors for enterovirus A71	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Blomed Sci	6. 最初と最後の頁 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12929-020-0615-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kyoussuke Kobayashi, Yui Sudaka, Ayako Takashino, Ayumi Imura, Ken Fujii, Satoshi Koike	4. 巻 92
2. 論文標題 Amino Acid Variation at VP1-145 of Enterovirus 71 Determines Attachment Receptor Usage and Neurovirulence in Human Scavenger Receptor B2 Transgenic Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.00681-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ken Fujii, Yui Sudaka, Ayako Takashino, Kyoussuke Kobayashi, Chikako Kataoka, Tadaki Suzuki, Naoko Iwata-Yoshikawa, Osamu Kotani, Yasushi Ami, Hiroyuki Shimizu, Noriyo Nagata, Katsumi Mizuta, Yoko Matsuzaki, Satoshi Koike	4. 巻 92
2. 論文標題 VP1 Amino Acid Residue 145 of Enterovirus 71 Is a Key Residue for Its Receptor Attachment and Resistance to Neutralizing Antibody during Cynomolgus Monkey Infection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.00682-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件(うち招待講演 1件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Subash CD, Larwal L, Springer Z, Vang, Tamura K, Takashino A, Kobayashi K, Koike S, Adachi S, Fukuda S, Thomson, Rao R, Dean H
2. 発表標題 An inactivated EV71 vaccine candidate provides cross-protection against heterogenous subgenotypes in human SCARB2 transgenic mice
3. 学会等名 American Society for Virology 39th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Koike S, Imura A, Sudaka Y, Takashino A, Kobayashi K, Fujii K, Nishimura H, Mizuta K
2. 発表標題 Establishment of EV71 vaccine efficacy test using human scavenger receptor B2 transgenic mice
3. 学会等名 The 20th Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses (EUROPIC 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kotani O, Yokoyama M, Kobayashi K, Nagata N, Shimizu H, Koike S, Sato H.
2. 発表標題 Cis-allosteric regulation of the interaction surfaces of enterovirus A71 capsid protein by the VP1 single amino acid residue at position 145
3. 学会等名 The 66th Annual Meeting of The Japanese Society for Virology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小池智
2. 発表標題 エンテロウイルス71の病原性に関する基礎研究
3. 学会等名 第61回日本臨床ウイルス学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kobayashi K, Chu ST, Mizuta K, Nishimura H, Ichimura H, Koike S
2. 発表標題 Virulence analysis of enterovirus 71 isolated from Hand-foot-mouth disease patients in Japan and Vietnam for identification of virulence determinant
3. 学会等名 the 67th annual meeting of the Japanese society for virology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kobayashi K, Sudaka Y, Takashino A, Imura A, Fujii K, Koike S
2. 発表標題 Use of attachment receptor, heparan sulfate proteoglycan, negatively affects neurovirulence of VP1-145 variants of enterovirus 71
3. 学会等名 The 20 th Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kobayashi K, Son Thanh Chu, Takashino A, Aoki Y, Matoba Y, Mizuta K, Nishimura H, Ichimura H, Koike S
2. 発表標題 Tissue culture adaptation of enterovirus 71 selects mutant viruses that bind to HS and are attenuated in vivo
3. 学会等名 The 66th Annual Meeting of The Japanese Society for Virology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Son Thanh Chu, Bi X, Ishizaki A, Masanobu Ago M, yousuke Kobayashi K, Koike, S Ichimura H
2. 発表標題 Epidemiological and Virological Characterization of the Enterovirus Causing Hand Foot and Mouth Disease in Northern Vietnam, 2015-2011
3. 学会等名 The 66th Annual Meeting of The Japanese Society for Virology
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

公益財団法人 東京都医学総合研究所 ウイルス感染プロジェクト http://www.igakuken.or.jp/project/detail/neurovirology.html 公益財団法人 東京都医学総合研究所 ウイルス感染プロジェクト (一般向け) http://www.igakuken.or.jp/project/to-tomin/to-pro04.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	市村 宏 (ICHIMURA Hiroshi) (10264756)	金沢大学・医学系・教授 (13301)	
研究分担者	小林 郷介 (KOBAYASHI Kyousuke) (80644989)	公益財団法人東京都医学総合研究所・疾患制御研究分野・主席研究員 (82609)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	水田 克己 (MIZUTA Katsumi)	山形県衛生研究所・所長	
連携研究者	西村 秀一 (NISHIMURA Hidekazu) (50172698)	独立行政法人仙台国立病院機構(仙台医療センター臨床研究部)・ウイルス研究室・室長 (81301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ベトナム	ハノイ国立小児病院			