

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07153

研究課題名(和文)オルガノイドへのヒトノロウイルス侵入メカニズムと胆汁の役割の解明

研究課題名(英文) Research on the function of bile in human norovirus entry into human intestinal organoids.

研究代表者

村上 耕介 (Murakami, Kosuke)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・主任研究官

研究者番号：60586973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトノロウイルス(HuNoV)は長らく培養系が未確立であったため、感染メカニズムに不明な点が多い。本研究では、ヒト小腸オルガノイドを用いたHuNoV培養系を駆使し、感染時に胆汁を必要とする遺伝子群II遺伝子型3(GII.3)のHuNoVの感染メカニズムを調べた。その結果、胆汁酸とセラミドがHuNoV細胞侵入に重要な役割を担うことを示した。また、胆汁酸による1)エンドサイトーシス促進、2)エンドソーム酸性化誘導、3)腸内腔側細胞膜のセラミドレベル増加、といった複数の細胞ダイナミクスの変化を利用してHuNoVが細胞に侵入することも明らかにした。この研究成果は、米国科学アカデミー紀要に掲載された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HuNoVは大規模な食中毒事例を引き起こすことから、社会的に重要な病原体である。しかし、長らく培養系が確立されていなかったため、HuNoVの感染メカニズムに関する知見は代替ウイルスの研究による“間接的”なものであった。その中、本研究ではH10と感染性HuNoVを用いることで、HuNoVの感染メカニズムに関する“直接的な”知見を得た。この研究成果はHuNoVに対する抗ウイルス剤を開発する上で重要なシーズと成り得る。

研究成果の概要(英文)：Human norovirus (HuNoV) is the leading cause of gastroenteritis, however, our understanding of mechanism of HuNoV infection, especially virus entry into cells, is still limited due to the past lack of a robust in vitro cultivation system. In this study, we aimed to unveil the mechanism of HuNoV entry into cells by utilizing stem cell-derived human intestinal organoids (HIOs) and genogroup II genotype 3 (GII.3) HuNoV, which can replicate in HIOs only in the presence of bile. Our research showed that bile acids and ceramide have important roles during GII.3 replication; bile acids enhance 1) endosomal uptake, 2) endosomal acidification, and 3) ceramide levels on the apical membrane. Furthermore, we found that GII.3 exploits these bile acid-mediated cellular dynamic changes to achieve successful infection. These findings were published in PNAS in 2020.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ノロウイルス オルガノイド 胆汁 感染メカニズム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 一般的な背景・申請者以外の研究者によって行われてきた研究

ヒトに感染するノロウイルス (human norovirus: HuNoV) は、冬季に起こる急性胃腸炎および非細菌性集団食中毒の原因ウイルスである。日本だけでなく世界中で公衆衛生上の重要なウイルスとして認識されている。しかし、発見から45年以上にわたって培養増殖系が未確立であったため、感染メカニズムに不明な点が多く、感染防御対策のためにも感染メカニズムの解明が求められている。

ウイルス様中空粒子 (virus-like particle: VLP) は、HuNoV 外殻タンパク質 VP1 のみから構成される中空粒子で、感染性 HuNoV と同様の抗原性および構造を有する。HuNoV の細胞への感染メカニズムの研究は VLP を用いて進められ、様々な *in vitro* 実験の結果、HuNoV の細胞結合への組織血液型抗原 (histo-blood group antigen: HBGA) の関与が示唆された。また、リバースジェネティクスシステム (reverse genetics system: RGS) を始めとするレプリコンシステムの開発により、細胞内におけるウイルス複製過程以降についても理解が進んでいる。

(2) 申請者がこの研究に関してこれまで行ってきたこと

申請者は、HuNoV の細胞結合時における HBGA の機能を詳細に解析するため、ヒト腸管由来株化細胞 Caco-2 への VLP の結合様式を共焦点レーザー顕微鏡で可視化した。その結果、HBGA 非依存的な VLP-細胞結合が起きることを示した。また小腸生検を用いた検証から、生体内でも同様の現象が起きることを示唆した。一方で予想外の結果として、小腸生検において VLP が腸管上皮細胞のみでなくゴブレット細胞にも高効率で取り込まれることも報告した [PLoS One, 2013]。

ここで申請者は HuNoV の細胞侵入メカニズムに興味を持ち、感染性 HuNoV を用いた解析を目指して、米国ベイラー医科大学 Mary K. Estes 教授との共同研究において、ヒト小腸幹細胞の培養から得られるオルガノイド (HIO) への HuNoV 感染の研究を開始した。その結果、世界初の安定的 HuNoV 培養系を確立し、また胆汁が HuNoV 感染に関与することを発見した [Science, 2016]。

2. 研究の目的

HuNoV の細胞侵入メカニズムの解明を目指し、HIO への感染時に胆汁を必要とする遺伝子群 (genogroup) II 遺伝子型 (genotype) 3 (GII.3) の HuNoV を対象として、HuNoV の細胞侵入メカニズム経路、および感染時における胆汁の機能の特定を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 胆汁成分の同定

GII.3 の HIO への感染に関与する胆汁成分の同定を行なった。胆汁主成分である胆汁酸を候補分子とし、13 種類の各種胆汁酸を GII.3 感染時に培地に添加したところ、検討した胆汁酸の大半でウイルス増殖が認められた。さらにウイルス増殖量が胆汁酸の疎水度と有意に相関することを見出した。

(2) GII.3 感染に関与する胆汁酸受容体の同定

胆汁酸受容体であるファルネソイド X 受容体 (FXR) および G タンパク質結合受容体 (TGR5) の関与を、各受容体に特異的なアゴニストやアンタゴニストを用いて評価したところ、GII.3 はこれらの受容体に非依存的事であることが示された。一方で、スフィンゴシン-1-リン酸受容体 (S1PR2)

の阻害剤が GII.3 の感染を抑制したことから、S1PR2 が GII.3 感染に関与することを見出した。

(3) GII.3 感染時における胆汁酸の機能

i) GII.3 がエンドサイトーシスで細胞に侵入すると仮定し、エンドサイトーシスに伴い蛍光を呈する FM1-43FX で細胞を染色したところ、胆汁酸存在下においてエンドサイトーシスが促進された。さらに S1PR2 阻害剤によりエンドサイトーシスが抑制されたことから、胆汁酸により促進される S1PR2 介在エンドサイトーシスを利用して GII.3 は細胞に侵入していることが示された。一方で GII.3 感染は、エンドサイトーシスへの関与が示されている EGF 受容体には非依存的であった。ii) HuNoV と同じカリシウイルス科に属するブタサポウイルスにおいて、ウイルス増殖へのエンドソーム酸性化の関与が報告されたことから、HuNoV でも同様のメカニズムが保存されているかどうかを解析した。エンドソームの酸性化に伴い蛍光シグナルが増強される LysoTracker で H10 を染色したところ、胆汁酸の添加によりエンドソーム酸性化が誘導された。またプロトンポンプ阻害剤によりエンドソーム酸性化および GII.3 増殖が抑制された。さらにリソソームに局在する酸性スフィンゴミエリナーゼ (ASM) に対する阻害剤を用いた解析から、ASM も GII.3 の細胞侵入に関与することが示された。これらの結果から、GII.3 は胆汁酸により誘導されるエンドソーム酸性化および ASM 活性を利用して細胞に侵入することが示された。iii) ASM はスフィンゴミエリンからセラミドを合成する酵素であることから、胆汁酸存在下におけるセラミドを共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、腸内腔側細胞膜に多量のセラミドが検出された。また、H10 内のリソソーム局在タンパク質 LAMP1 を観察したところ、胆汁酸存在下ではシグナル強度が低下した。さらに、リソソームのエキソサイトーシス阻害剤が GII.3 増殖を抑制することが示された。これらの結果から、リソソームのエキソサイトーシスにより分泌された ASM が腸内腔側細胞膜においてセラミドを合成し、それに伴ってラフトの形成、ウイルス受容体のクラスタリングが生じるものと予想された。

4. 研究成果

本研究から、胆汁酸が H10 における 1) エンドソーム促進、2) エンドソーム酸性化誘導、3) 腸内腔側細胞膜のセラミドレベル増加といった複数の細胞ダイナミクスを変化させること、さらに GII.3 がこれらの変化を巧みに利用して細胞に侵入していくことを示した (図 1)。本研究成果を米国科学アカデミー紀要で報告した (Murakami et. al., PNAS, 2020, 117(3):1700-1710.)。今後は、他の遺伝子型の HuNoV についても解析を進め、HuNoV 全般の感染メカニズムの解明を目指す。

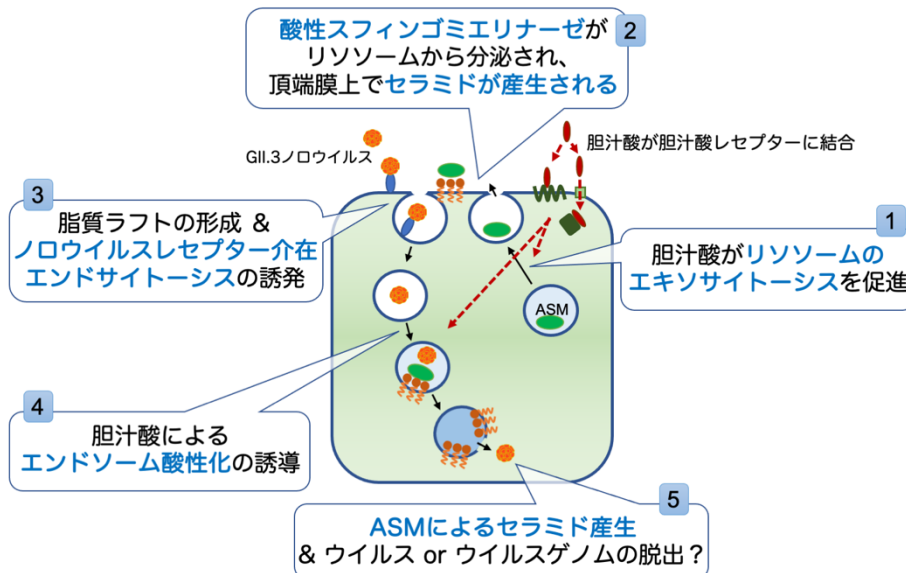


図 1 胆汁酸を利用する GII.3 の H10 への感染メカニズム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Murakami Kosuke, Tenge Victoria R., Karandikar Umesh C., Lin Shih-Ching, Ramani Sasirekha, Ettayebi Khalil, Crawford Sue E., Zeng Xi-Lei, Neill Frederick H., Ayyar B. Vijayalakshmi, Katayama Kazuhiko, Graham David Y., Bieberich Erhard, Atmar Robert L., Estes Mary K.	4. 巻 117
2. 論文標題 Bile acids and ceramide overcome the entry restriction for GII.3 human norovirus replication in human intestinal enteroids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 1700 ~ 1710
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1910138117	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 該当する

1. 著者名 Estes Mary K., Ettayebi Khalil, Tenge Victoria R., Murakami Kosuke, Karandikar Umesh, Lin Shih-Ching, Ayyar B. Vijayalakshmi, Cortes-Penfield Nicolas W., Haga Kei, Neill Frederick H., Opekun Antone R., Broughman James R., Zeng Xi-Lei, Blutt Sarah E., Crawford Sue E., Ramani Sasirekha, Graham David Y., Atmar Robert L.	4. 巻 11
2. 論文標題 Human Norovirus Cultivation in Nontransformed Stem Cell-Derived Human Intestinal Enteroid Cultures: Success and Challenges	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 638 ~ 638
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v11070638	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 Tenge Victoria R., Murakami Kosuke, Salmen Wilhelm, Lin Shih-Ching, Crawford Sue E., Neill Frederick H., Prasad B. V. Venkataram, Atmar Robert L., Estes Mary K.	4. 巻 13
2. 論文標題 Bile Goes Viral	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 998 ~ 998
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v13060998	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

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Murakami K, Tenge VR, Karandikar U, Lin SC, Ramani S, Ettayebi K, Crawford SE, Zeng XL, Neill FH, Ayyar BV, Atmar RL and Estes MK.
2. 発表標題 GII.3 human norovirus hijacks bile acid-driven cellular dynamic changes to entry human intestinal enteroids.
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 Lewis MA, Cortes-Penfield NW, Tenge VR, Murakami K, Ettayebi K, Ayyar BV, Neill FH, Ramani S, Estes MK, Atmar RL.
2. 発表標題 Evaluating Antiviral Agents for Human Noroviruses Using a Human Intestinal Enteroid Model.
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 Murakami K, Tenge VR, Karandikar U, Lin SC, Ramani S, Ettayebi K, Crawford SE, Zeng XL, Neill FH, Ayyar BV, Atmar RL and Estes MK.
2. 発表標題 GII.3 human norovirus hijacks bile acid-driven cellular dynamic changes to entry human intestinal enteroids.
3. 学会等名 Virtual ASV Calicivirus & Astrovirus Workshop Presentation. (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村上耕介、片山和彦
2. 発表標題 胆汁酸により誘発される細胞内ダイナミクス変化を用いてGII.3ヒトノロウイルスは小腸オルガノイドに侵入する
3. 学会等名 第61回日本臨床ウイルス学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Murakami K., Tenge VR., Karandikar U., Lin SC., Ramani S., Ayyar BV., Atmar RL., Estes KM.
2. 発表標題 Bile acids and ceramide are critical to allow GII.3 human norovirus entry into human intestinal enteroids
3. 学会等名 7th International Calicivirus Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上 耕介、片山 和彦
2. 発表標題 小腸オルガノイドにおける胆汁要求性ヒトノロウイルスGII.3の複製機序の解析
3. 学会等名 第60回日本臨床ウイルス学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kosuke Murakami, Victoria R. Tenge, Umesh Karandikar, Sasirekha Ramani, Khalil Ettayebi, Sue E. Crawford, Xi-Lei Zeng, Frederick H. Neill, Robert L. Atmar and Mary K. Estes
2. 発表標題 Evaluation of the bile-driven replication of GII.3 human norovirus in human intestinal enteroids
3. 学会等名 American Society for Virology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kosuke Murakami, Victoria R. Tenge, Umesh Karandikar, Sasirekha Ramani, Khalil Ettayebi, Xi-Lei Zeng, Sue E. Crawford, Kazuhiko Katayama, Robert L. Atmar, Mary K. Estes
2. 発表標題 胆汁要求性GII.3ヒトノロウイルスのヒト小腸エンテロイドにおける複製メカニズムの解析
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 山崎 毅 (分担執筆: 村上耕介)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 82
3. 書名 アグリバイオ 2020年5月号	

1. 著者名 佐藤 俊朗、武部 貴則、永樂 元次	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 372
3. 書名 実験医学別冊 決定版 オルガノイド実験スタンダード	

〔産業財産権〕

〔その他〕

AMED 成果情報 ノロウイルスの細胞への侵入が胆汁酸により助長されることを発見 https://www.amed.go.jp/news/seika/kenkyu/20200128.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
---------------------------	-----------------------	----

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		
米国	Baylor College of Medicine		