

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07601

研究課題名(和文) エンテロウイルス71の組織特異性に関わる宿主因子の探索

研究課題名(英文) Exploration of host factors involved in the tissue specificity of enterovirus 71

研究代表者

小林 郷介 (KOBAYASHI, Kyousuke)

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

研究者番号：80644989

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)：エンテロウイルス71(EV71)は、時に中枢神経に感染して重症化するが、重症化機序は未解明である。研究代表者のこれまでの研究から、アタッチメント受容体がEV71の組織指向性に強く影響することが示唆されていた。本研究はEV71のアタッチメント受容体を同定することを目的とする。神経芽細胞腫SH-SY5Yを用いたゲノムワイドCRISPR-Cas9 KOライブラリーによって、複数の候補遺伝子を見出した。その中から2つの有力な候補に絞り込んだ。これらを細胞に過剰発現させることによりウイルス感受性が増大し、ノックアウトによって感受性が失われた。今後、組織特異性との関連が明らかになることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エンテロウイルス71(EV71)の感染機序の解明は、新たな治療法開発の具体的な指針を示すだけでなく、ウイルスの組織特異性に対する理解を一段と深める重要な一歩である。特定された受容体は、中枢神経系への感染経路を明らかにし、EV71感染の重症化を防ぐ手立てを提供する可能性がある。これにより、中枢神経系への感染を阻止または遅延させる新たな治療法の開発が可能となり、感染症の早期対応策を強化する道が開かれる。さらに、この研究はウイルスの組織特異性についての新たな知見を提供し、他のウイルス感染症の研究にも応用可能なプラットフォームを提供することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Enterovirus 71 (EV71) infects the intestinal tract and sometimes the central nervous system, causing severe disease, but the mechanism of severe disease remains unclear. Previous studies by the applicant have suggested that attachment receptors strongly influence the tissue-directedness of EV71. This study aims to identify the attachment receptors of EV71. A genome-wide CRISPR-Cas9 KO library using the neuroblastoma SH-SY5Y revealed several candidate genes. From these, we narrowed them down to two leading candidates. Overexpression of these in cells increased viral susceptibility, while knockout resulted in loss of susceptibility. It is expected that the relationship with tissue specificity will be clarified in the future.

研究分野：ウイルス学

キーワード：エンテロウイルス71 受容体 組織指向性

1. 研究開始当初の背景

エンテロウイルス 71 (EV71) は比較的軽度な手足口病を引き起こす一方、まれに脊髄や延髄の神経細胞に感染して、中枢神経合併症を引き起こし重症化することが知られている。特にアジア地域では過去に数度の大流行が発生し多くの死者が出ているため、重症化機序の解析が世界中で行われているが、解明には到っていない。

EV71 の受容体として “ Scavenger receptor B2 (SCARB2) ” が同定されている。SCARB2 はリソソームタンパク質であるため、細胞表面の発現量が少なく、ウイルスが細胞にアタッチメントする過程は別の受容体が必要と考えられる。これまでにいくつかのアタッチメント受容体が報告されている。最も研究が進んでいるのが、ヘパラン硫酸 (HS) だ。しかし、HS は培養細胞馴化変異株に対するアタッチメント受容体であることが明らかになっている。ヒトに感染する株のアタッチメント受容体は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ゲノムワイド CRISPR-Cas9 KO ライブラリーを用いて EV71 の非神経および神経細胞での感染・増殖に必要な宿主因子を網羅的に探索・比較することで、EV71 の組織特異性・細胞特異性に関連する感染様式の分子基盤を明らかにすることである。

3. 研究の方法

1) 神経細胞、非神経細胞におけるEV71強毒株の増殖性の比較

ヒト神経芽細胞に由来する神経細胞様の細胞株 SH-SY5Y やヒト横紋筋肉腫細胞由来の RD-A など数種類の細胞株の EV71 に対する感受性の違いを調べる。ウイルスゲノムのコピー数あたりのウイルスタイター (TCID₅₀/copy) を感受性の指標とする。

2) ゲノムワイドCRISPR-Cas9 KOライブラリーによる宿主因子の探索

1) の結果から EV71 強毒株が効率よく結合・感染・増殖可能な神経系細胞株および RD-A 細胞を用いて、KO ライブラリー (GeCKO version 2) によるスクリーニングを行う。レンチウイルスベクターを用いて各々の細胞に KO ライブラリーを導入した後、EV71 を KO ライブラリー導入細胞に感染させる。通常の細胞はウイルス感染によって死滅するはずなので、生存細胞はウイルス感染に重要な宿主因子が KO されていると考えられるため、これを増殖させ、ゲノム DNA を回収する。ゲノムにインテグレートされた sgRNA 配列を PCR によって増幅し、illumina 社 MiSeq、NextSeq、HiSeq などシーケンス解析を行う。取得した配列データから sgRNA 配列のカウントデータを抽出し、RNA seq の発現変動遺伝子の解析に用いられるソフト (edgeR や DESeq2 などの R パッケージ) を用いて、以下の方法で統計的に有意に濃縮された sgRNA を抽出する。

各細胞株において、ウイルスによる選択を行った細胞と行わなかった細胞の 2 群間で sgRNA カウントデータを比較。

EV71 で選択を行った群において、神経系細胞と RD-A 細胞で sgRNA カウントデータを比較。

の解析から SCARB2 や SETD3 など EV71 の増殖に必須な既知の宿主因子がヒット

していることを確認し、結果の妥当性を検証する。 の解析から神経系細胞特異的に要求される宿主因子がヒットする。一方で、全ての細胞で要求される SCARB2 や SETD3 はヒットしないと考えられる。 の解析で得られた遺伝子リストを元に、EV71 が標的細胞特異的に利用する宿主因子の候補を推定する。

3) 同定された宿主因子の機能解析

有望な候補遺伝子に関して、過剰発現細胞や KO 細胞を SH-SY5Y や RD-A 細胞各々で作製し、EV71 の感受性を評価する。

4. 研究成果

- 1) 複数の細胞株に対して、培養細胞順化株と非順化株の感染効率を測定した。EV71 の培養に多用されるヒト横紋筋肉腫由来 RD-A 細胞では、培養細胞順化株が非順化株よりも高い感染効率を示した。一方、ヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y では、非順化株の方が、順化株よりも高い感染効率を示した。この結果から、SH-SY5Y をスクリーニングに用いることが妥当と考えられた。しかし、SH-SY5Y には問題点がある。EV71 に対する感受性が低いのだ。そこで、SCARB2 を過剰発現させたところ感受性が大きく上昇した。この場合、もう一つ別の懸念が生じる。この細胞で KO スクリーニングを行うと、SCARB2 の gRNA ばかりがヒットして、アタッチメント受容体に対する gRNA が埋もれてしまう可能性が高い。これを解決するために、SCARB2 cDNA 内の gRNA 認識配列を除去した MH4-msg1 を、レトロウイルスベクターで導入した。その結果、SH-SY5Y の EV71 感受性が約 10^5 倍上昇した。この条件でも非順化株は順化株よりも高い感受性を示していた。

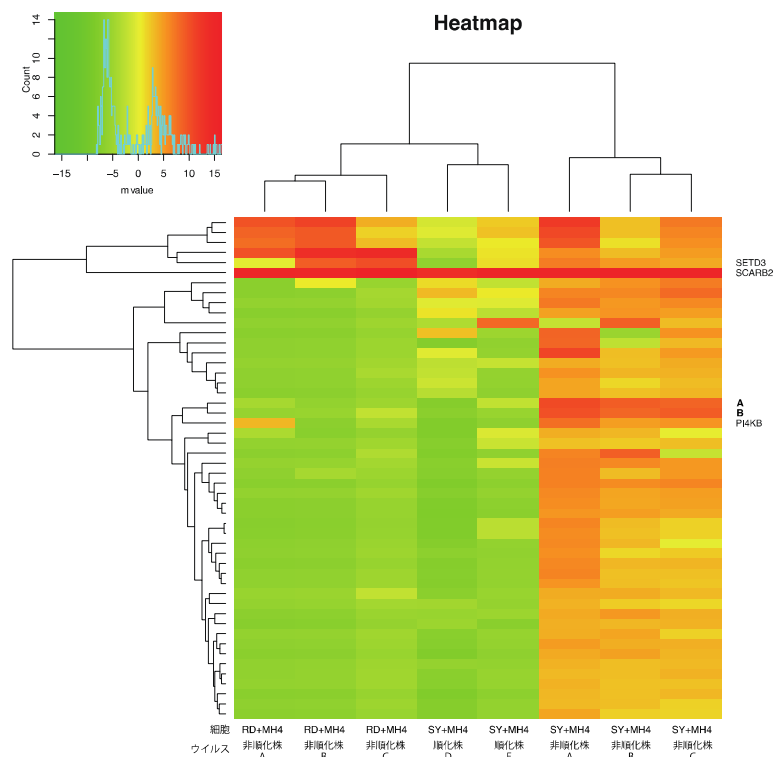


図 1 ノックアウトスクリーニングの結果

- 2) MH4-msg1 を導入した SH-SY5Y 細胞 (SY+MH4) と RD 細胞 (RD+MH4) に対して、非順化株を 3 株、順化株を 2 株用いて KO スクリーニングを行った (図 1)。いずれの条件でも SCARB2、SETD3、PI4KB など既知の宿主因子が高いヒットとして認められた。このことから、スクリーニングが正しく行われたと推測できる。SY+MH4 において非順化株で強くヒットした遺伝子が 44 個認められた。これらは、SY+MH4 における馴化株のスクリーニングや、RD+MH4 細胞における非馴化株でのスクリーニングではヒットしなかった。

- 3) これらの中から特に選択が強く認められた 2 個の遺伝子 (遺伝子 A、遺伝子 B) について、個別の gRNA を作製して SH-SY5Y 細胞に導入し、薬剤選択後 EV71 非順化株を感染させた。その結果、遺伝子 A と B に対する gRNA を導入した細胞では細胞の生存が確認されたが、gRNA を導入していないコントロール細胞はウイルス感染により死滅した。候補遺伝子が KO されたことにより、ウイルスの感染に抵抗性を獲得したと推測される。これらの候補遺伝子について詳細に研究することで、EV71 の感染様式や組織指向性が明らかになると期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kobayashi Kyousuke, Koike Satoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Adaptation and Virulence of Enterovirus-A71	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 1661-1661
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/v13081661	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 Kyousuke, Nishimura Hidekazu, Mizuta Katsumi, Nishizawa Tomoha, Chu Son T., Ichimura Hiroshi, Koike Satoshi	4. 巻 95
2. 論文標題 Virulence of Enterovirus A71 Fluctuates Depending on the Phylogenetic Clade Formed in the Epidemic Year and Epidemic Region	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01515-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01515-21	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 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 e01921-19
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 Chu Son T., Kobayashi Kyousuke, Bi Xiuqiong, Ishizaki Azumi, Tran Tu T., Phung Thuy T. B., Pham Chung T. T., Nguyen Lam V., Ta Tuan A., Khu Dung T. K., Agoh Masanobu, Pham An N., Koike Satoshi, Ichimura Hiroshi	4. 巻 10
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 159
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 Kyousuke, Mizuta Katsumi, Koike Satoshi	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 Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1008428
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 Kyousuke, Koike Satoshi	4. 巻 27
2. 論文標題 Cellular receptors for enterovirus A71	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Science	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 Tamura Kanami, Kohnoe Mai, Takashino Ayako, Kobayashi Kyousuke, Koike Satoshi, Karwal Lovkesh, Fukuda Shigeru, Vang Fue, Das Subash C., Dean Hansi J.	4. 巻 40
2. 論文標題 TAK-021, an inactivated Enterovirus 71 vaccine candidate, provides cross-protection against heterologous sub-genogroups in human scavenger receptor B2 transgenic mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 3330-3337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vaccine.2022.04.064	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 Miwatashi Wakako, Ishida Minori, Takashino Ayako, Kobayashi Kyousuke, Yamaguchi Midori, Shitara Hiroshi, Koike Satoshi	4. 巻 96
2. 論文標題 Mouse Scarb2 Modulates EV-A71 Pathogenicity in Neonatal Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e0056122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jvi.00561-22	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小林郷介、西澤朋葉、小池智
2. 発表標題 Identification of two nucleotides on IRES that control the neurovirulence of EV71
3. 学会等名 The 19th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林郷介、西澤朋葉、小池智
2. 発表標題 Analysis of two nucleotides on the internal ribosome entry site regulating the EV-A71 neurovirulence
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 郷介、Chu SonThanh、水田 克己、西村 秀一、市村 宏、小池 智
2. 発表標題 Virulence analysis of enterovirus71 isolated from hand-foot-and-mouth disease patients in Japan and Vietnam for identification of virulence determinant.
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Kobayashi、N. Nomura、A. Ohkubo、T. Nishizawa、S. Koike
2. 発表標題 Two nucleotide mutations in IRES stem-loop IV define neuron-specific EV-A71 proliferation
3. 学会等名 The 20th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ https://www.igakuken.or.jp/neurovirology/ Research Map https://researchmap.jp/kkoba
--

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
---------	---------