

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08294

研究課題名(和文) ヒトパレコウイルス3型の受容体同定と感染重症化機序の解明

研究課題名(英文) Studies on isolation and identification of human parechovirus 3 receptor gene and elucidation of the mechanism of severe disease

研究代表者

渡邊 香奈子 (Watanabe, Kanako)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：80626094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト由来PeV-A3高感受性細胞(HuTu-80)とヒト遺伝子をターゲットとするCRISPR/Cas9ライブラリーを用いてゲノムワイドなランダムノックアウトスクリーニングを実施し、ヒトパレコウイルスに共通する受容体として、MYADMを同定した。MYADMは8回膜貫通型タンパク質で、4つの細胞外領域がある。ヒトとマウスのMYADMの第4細胞外領域のみを置換したキメラ蛋白質を作製し、ヒトMYADMの第4細胞外領域がPeV-A3の感染に必須であることを示した。さらに、PeV-A3のVPO蛋白質がMYADMの第4細胞外領域に結合することにより、細胞に感染することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトパレコウイルス3型(PeV-A3)が新生児や早期乳児に感染すると、敗血症や髄膜脳炎などの重症感染症を発症することがある。PeV-A3感染症の重症化の分子機構は不明であり、その解明のためには動物モデルが必要不可欠である。本研究では世界に先駆けてPeV-A3のウイルス受容体を同定した。ウイルス受容体を発現する動物を作製し、PeV-A3が感染する動物モデルを樹立することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：We identified the human myeloid-associated differentiation marker (MYADM) as an essential host factor for the entry of human parechovirus (PeV-A) using a genome-wide knockout strategy with PeV-A3-susceptible human cells (HuTu-80) and a lentivirus CRISPR/Cas9 library targeting human genes. MYADM is an 8 transmembrane protein with four extracellular domains. We constructed two chimeric constructs between human MYADM and mouse MYADM, and showed that the fourth extracellular domain of human MYADM is essential for PeV-A3 infection. Furthermore, we showed that this domain determined PeV-A3 infection, by mediating the binding of human MYADM to the VPO protein of PeV-A3.

研究分野：ウイルス学 感染症

キーワード：ウイルス受容体 ヒトパレコウイルス3型 PeV-A 蛍光タンパク質組換えヒトパレコウイルス3型 CRISPR/Cas9

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトパレコウイルス (human parechovirus, PeV-A) は、ピコルナウイルス科パレコウイルス属に分類される一本鎖 (+ 鎖) RNA をゲノムにもつウイルスである。現時点で、19 種類の遺伝子型 (PeV-A1 ~ A19) が同定されているが、そのうち 6 種類 (PeV-A1 ~ A6) がウイルスとして分離され、それ以外は核酸による検出である。PeV-A3 を含む PeV-A の多くの遺伝子型は、主に乳幼児に感染し、胃腸炎、上・下気道感染症、発疹などの概して軽度の感染症を引き起こす。ところが、PeV-A3 は、他の遺伝子型とは異なり、新生児や早期乳児に敗血症や髄膜脳炎などの重篤な感染症を引き起こすことがあり、神経学的後遺症や死亡例も報告されている。しかしながら、PeV-A3 感染症が他の PeV-A 感染症よりも重症化する分子メカニズムは不明である。また、PeV-A3 に対する特異的な治療薬や予防のためのワクチンは開発されていない。したがって、重症 PeV-A3 感染症に対する治療薬の開発は喫緊の課題である。

(2) ウイルスは、細胞表面のウイルス受容体に特異的に結合し、細胞に侵入する。ウイルス受容体はウイルス感染の成立に欠くことのできないものであり、ウイルス受容体の組織特異的発現および細胞特異的な発現量はウイルス感染症の病因の分子メカニズムを解明するための有用なツールである。ポリオウイルスとエンテロウイルス A71 (EV-A71) は、PeV-A と同じく、ピコルナウイルス科に属し、それぞれ急性灰白髄炎 (ポリオ) および脳炎を引き起こす。これらのウイルスにおいては、それぞれのウイルス受容体が同定され、ウイルス受容体を発現するトランスジェニックマウスが作製された。これらのウイルス感染動物モデルを用いて、ポリオウイルスによるポリオおよび EV-A71 脳炎の分子機序の解明が著しく進展した。重症 PeV-A3 感染症の分子機序の解明には、PeV-A3 感染動物モデルの開発が必要不可欠である。

### 2. 研究の目的

PeV-A3 のウイルス受容体を同定する。PeV-A3 受容体が発現するマウスを作製し、PeV-A3 が感染するモデルマウスを開発する。このマウスを用いたウイルス感染実験を実施し、PeV-A3 感染症の重症化の分子機序を明らかにする。

### 3. 研究の方法

PeV-A3 感染に関与する細胞遺伝子を同定するため、CRISPR/Cas9 を用いてゲノムワイドなノックアウトスクリーニングを行う。PeV-A3 高感受性細胞にヒトゲノムノックアウトライブラリーを組み込んだレンチウイルスを感染させ、さらに、PeV-A3 を感染させた。合計 3 回の PeV-A3 感染後、生残細胞を回収する。生残細胞中のノックアウト遺伝子に対応する gRNA を、次世代シーケンズ解析で定量し、PeV-A3 受容体の候補遺伝子を同定する。

### 4. 研究成果

(1) ヒト由来 8 株、サル、ハムスター、マウス由来各 1 株の合計 11 種類の培養細胞株について、PeV-A3 を感染後、経時的に培養上清を採取し、ウイルス力価 (TCID<sub>50</sub>) を測定した。各種培養細胞株の PeV-A3 感受性は、ヒト細胞株では、HuTu-80 細胞、HeLa 細胞、C33A 細胞、SW620 細胞、SH-SY5Y 細胞、293T 細胞の 7 株が PeV-A3 に感受性を示し、中でもヒト十二指腸由来の HuTu-80 細胞が最も感受性が高かった。一方、Saos2 細胞と Jurkat 細胞は PeV-A3 に対して非感受性であった。サル由来の LLC-MK2 細胞は HuTu-80 細胞と同等の高い PeV-A3 感受性を示したが、ハムスター由来の BHK-21 細胞とマウス由来の NIH/3T3 細胞は PeV-A3 に感受性を示さなかった。これらの結果は、PeV-A3 はヒトおよびサルの細胞には感染するが、げっ歯類 (ハムスター、マウス) の細胞には感染しないこと、また PeV-A3 がヒトの様々な組織由来の細胞株に感染することを示した。

(2) CRISPR/Cas9 を用いたゲノムワイドなノックアウトスクリーニング法このスクリーニングを成功させるためには、PeV-A3 感染によって完全に死滅する PeV-A3 高感受性細胞を使用することが有効である。そこで、スクリーニングに HuTu-80 細胞を使用した。次世代シーケンズ解析の定量で最もノックアウトされた遺伝子は、MYADM (myeloid-associated differentiation marker, 骨髄関連分化マーカー) であった。

(3) PeV-A3 感受性の高い HuTu-80 細胞と感受性の低い 293T 細胞で MYADM 遺伝子をノックアウトし、ノックアウト細胞の PeV-A3 感染を検討した。MYADM をノックアウトした HuTu-80 細胞と 293T 細胞には PeV-A3 は感染せず、感染性ウイルスの産生は観察されなかった。一方、PeV-A3 は BHK-21 細胞には感染しないが、ヒト MYADM 遺伝子を導入した BHK-21 細胞 (BHK-MYADM, BHK-NF-MYADM, BHK-CF-MYADM) に、PeV-A3 は感染性を示し、感染性ウイルスの産生が観察されことから、MYADM が PeV-A3 の感染および増殖に必須であることが示された。

次に、PeV-A3 蛋白質が MYADM に結合するかどうかを検討した。N 末端または C 末端に FLAG タグを付加したヒト MYADM 蛋白質 (NF-MYADM, CF-MYADM) を発現する BHK 細胞と PeV-A3 を 4 日 1 時間反応させた。細胞を洗浄した後、これらの細胞から細胞抽出液を調整し、FLAG 抗体を用い

て MYADM 蛋白質を免疫沈降した。MYADM (NF-MYADM または CF-MYADM) 蛋白質と PeV-A3 の VP0 蛋白質との結合が検出された。この MYADM と VP0 との結合は、細胞とウイルスを 4 で 1 時間反応させた後、37 で 15 分または 30 分間反応させると増強されたことから、PeV-A3 の VP0 タンパク質が細胞表面で MYADM と結合することが示された。一方、興味深いことに、VP0 蛋白質は、ヒト MYADM 発現の有無に関わらず、BHK 細胞膜表面の未知の分子と結合することを示した。

(4) MYADM は 8 回膜貫通型タンパク質で、4 つの細胞外領域がある。MYADM の 4 番目の細胞外領域 (第 4 細胞外領域) が最も長いことから、この第 4 細胞外領域が VP0 と結合するという仮説を立てた。まず、マウス MYADM 遺伝子を BHK-21 細胞で発現させた細胞 (MF-MYADM) に PeV-A3 が感染しないことを確認した。ヒト MYADM とマウス MYADM のアミノ酸配列を比較したところ、マウス MYADM には、ヒト MYADM とは異なる 10 個のアミノ酸置換と 1 つの挿入配列があることが明らかになった。そこで、ヒト MYADM、マウス MYADM あるいは第 4 細胞外領域のみを置換したキメラ MYADM (NF-MYADM, MF-MYADM, F-HMH, F-MHM) を発現する BHK 細胞を用いて、PeV-A3 の感染性を調べた。PeV-A3 はヒト MYADM の第 4 細胞外領域を持つ細胞 (BHK-NF-MYADM と BHK-F-MHM) に感染したが、マウス MYADM の第 4 細胞外領域を持つ細胞 (BHK-MF-MYADM と BHK-F-HMH) には感染しなかったことから、ヒト MYADM の第 4 細胞外領域が PeV-A3 の感染に必須であることが示された。

ヒト MYADM とマウス MYADM のキメラ MYADM 遺伝子を発現した BHK 細胞 (BHK-NF-MYADM, BHK-MF-MYADM, BHK-F-HMH, BHK-F-MHM) を用いて、前述の PeV-A3 との結合実験を行った。ヒト MYADM の第 4 細胞外領域を発現している細胞では、PeV-A3 の VP0 と MYADM との結合が検出された。一方、マウス MYADM の第 4 細胞外領域を発現している細胞では、VP0 と MYADM との結合は検出されなかったことから、PeV-A3 の VP0 タンパク質がヒト MYADM の第 4 細胞外領域に結合し、この結合が PeV-A3 の感染に必須であることが示された。

(5) PeV-A3 以外の 5 種類の PeV-A の感染における MYADM の関与を検討した。PeV-A 3 と同様に、PeV-A1, A2, A4, A5, A6 は BHK (BHK-CONT) 細胞には感染しなかったが、ヒト MYADM を発現する BHK (BHK-MYADM) 細胞には感染し、感染性ウイルスを産生した。また、これらの 5 種類の PeV-A は HuTu-80 細胞に感染したが、MYADM ノックアウト細胞には感染しなかった。これら結果は、MYADM が PeV-A3 に加えて 5 種類の PeV-A (PeV-A1, A2, A4, A5, A6) の感染に必須であった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Aizawa Yuta, Kasamatsu Takuhiro, Nagasawa Koo, Watanabe Kanako, Saitoh Akihiko	4. 巻 227
2. 論文標題 Molecular Evolution and Epidemiology of Parechovirus-A3 in Japan, 1997?2019	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 288 ~ 294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/infdis/jiac213	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 Watanabe Kanako, Oka Tomoichiro, Takagi Hiroataka, Anisimov Sergei, Yamashita Shun-ichi, Katsuragi Yoshinori, Takahashi Masahiko, Higuchi Masaya, Kanki Tomotake, Saitoh Akihiko, Fujii Masahiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Myeloid-associated differentiation marker is an essential host factor for human parechovirus PeV-A3 entry	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-37399-8	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 Suzuki Yuko, Aizawa Yuta, Izumita Ryohei, Habuka Rie, Watanabe Kanako, Saitoh Akihiko	4. 巻 135
2. 論文標題 PCR detection rates for serum and cerebrospinal fluid from neonates and young infants infected with human parechovirus 3 and enteroviruses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Virology	6. 最初と最後の頁 104736 ~ 104736
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcv.2021.104736	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 Ikuse Tatsuki, Aizawa Yuta, Takihara Hayato, Okuda Shujiro, Watanabe Kanako, Saitoh Akihiko	4. 巻 59
2. 論文標題 Development of Novel PCR Assays for Improved Detection of Enterovirus D68	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JCM.01151-21	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 Ikuse Tatsuki, Aizawa Yuta, Yamanaka Takayuki, Habuka Rie, Watanabe Kanako, Otsuka Taketo, Saitoh Akihiko	4. 巻 40
2. 論文標題 Outbreak of Enterovirus D68 Among Children in Japan? Worldwide Circulation of Enterovirus D68 Clade B3 in 2018	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatric Infectious Disease Journal	6. 最初と最後の頁 6~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/INF.0000000000002889	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 Izumita Ryohei, Aizawa Yuta, Watanabe Kanako, Saitoh Akihiko	4. 巻 38
2. 論文標題 Persistence of High Neutralizing Antibody Titers After Neonatal and Early Infantile Infection with Parechovirus-A3	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Pediatric Infectious Disease Journal	6. 最初と最後の頁 e159~e161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/INF.0000000000002245	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9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 渡邊香奈子 岡智一郎 高木弘隆 セルゲイアニシモフ 高橋雅彦 大桑孝子 樋口雅也 藤井雅寛
2. 発表標題 ヒトパレコウィルスの受容体遺伝子の同定
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 幾瀬樹、相澤悠太 山中崇之 渡邊香奈子 齋藤昭彦
2. 発表標題 小児の気管支喘息様発作とエンテロウイルスD68 -2018年の新潟県の流行から-
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 羽深理恵 相澤悠太 鈴木優子 渡邊香奈子 齋藤昭彦
2. 発表標題 新生児・早期乳児におけるパレコウイルスA3とエンテロウイルス感染症の臨床像の違い
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 相澤悠太 宇田和宏 伊藤健太 庄司健介 大竹正悟 笠井正志 鈴木優子 渡邊香奈子 齋藤昭彦
2. 発表標題 国内の小児入院施設における新生児、早期乳児のパレコウイルスA3感染症の前胞子的疫学調査 -第1報
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 鈴木優子 相澤悠太 渡邊香奈子 齋藤昭彦
2. 発表標題 パレコウイルスA3に対するアンチセンス・ペプチド治療薬の効果の検討
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 鈴木優子、相澤 悠太、渡邊香奈子、齋藤昭彦
2. 発表標題 新生児・早期乳児におけるパレコウイルスA3とエンテロウイルス感染症：血清と髄液のPCR陽性率の比較
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 Aizawa Yuta, Izumita Ryohei, Yamanaka Takayuki, Habuka Rie, Ikuse Tatsuki, Watanabe Kanako, Otsuka Taketo, Saitoh Akihiko
2. 発表標題 Changing Epidemiological Profile of Infantile Parechovirus-A3 Infection in Japan
3. 学会等名 IDWeek 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Izumita Ryohei, Kon kazuki, Aizawa Yuta, Watanabe Kanako, Saitoh Akihiko
2. 発表標題 Human Breast Milk Inhibits the Replication of Parechovirus-A
3. 学会等名 IDWeek 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ikuse Tatsuki, Aizawa Yuta, Yamanaka Takayuki, Habuka Rie, Watanabe Kanako, Otsuka Taketo, Saitoh Akihiko
2. 発表標題 Outbreak of Enterovirus D68 among children in Japan and simultaneous circulation of clade B3 in Europe
3. 学会等名 IDWeek 2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="https://www.niigata-u.ac.jp/news/2023/382493/">https://www.niigata-u.ac.jp/news/2023/382493/</a>
---

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	齋藤 昭彦  (Saitoh Akihiko)  (30531389)	新潟大学・医歯学系・教授    (13101)	
研究分担者	樋口 雅也  (Higuchi Masaya)  (50334678)	金沢医科大学・医学部・教授    (33303)	

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