

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22532

研究課題名（和文）ヒトノロウイルスの感染モデルマウスの樹立を目指した宿主側タンパク質受容体の同定

研究課題名（英文）Human norovirus

研究代表者

佐藤 慎太郎（Sato, Shintaro）

大阪大学・微生物病研究所・特任准教授（常勤）

研究者番号：80447333

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：CRISPR/Cas9システムを用いたヒトノロウイルス受容体のスクリーニングを行うために、細胞変性効果を認めるヒトノロウイルスロットの検索を行ったが、ウイルス濃度を100倍に上げたものでも細胞変性効果は認められなかった。ヒトノロウイルスの感染、増殖に関わる遺伝子の絞り込みを行い、5つの遺伝子を決定した。それぞれについて、ヒトノロウイルスの増殖を示さない上皮細胞にレンチウイルスベクターを用いて強制発現させた。現在これらの細胞のヒトノロウイルス増殖能を検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトノロウイルスの*in vitro*増殖が可能になってからすでに5年近く経過したが、その増殖系を用いたヒトノロウイルスの性状解析などは未だに進んでおらず、申請者らも挑戦しているが、細胞変性効果を示す実験系も確立されていない。今後も地道に解析を継続することで、ヒトノロウイルスに対するワクチン、治療薬の開発に繋がるものと思われる。

研究成果の概要（英文）：In order to screen for human norovirus receptors using the CRISPR/Cas9 system, we searched for human norovirus lots that have a cytopathic effect, however, no cytopathic effect was observed even when the virus concentration was increased 100 times. Five genes that may be involved in human norovirus infection and proliferation were determined. Each was forcibly expressed using a lentiviral vector in epithelial cells showing no propagation of human norovirus. We are currently investigating the ability of these cells to proliferate human norovirus.

研究分野：粘膜免疫学

キーワード：ヒトノロウイルス 受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトノロウイルス (HuNoV) は感染性胃腸炎の約 7 割を占める感染症ウイルスであるが、その感染様式や宿主内での増殖メカニズムなどはほとんど明らかにされておらずワクチンも存在しない。これは、HuNoV の挙動を *in vivo* で解析できる感染モデル動物が存在しないことに加えて、HuNoV の *in vitro* での感染・増殖系が確立されていないことが大きな障壁となっているためである。その一方で、HuNoV のカプシドタンパク質である VP1 を組み替え体として産生させると、自己凝集を起こしてウイルス様粒子 (Virus-like particle; VLP) を形成することが知られており、これをヒトに経口もしくは経鼻投与すると、抗原特異的血清 IgG および IgA 抗体が誘導されることが報告されている (Cortes-Penfield, N.W. et al. Clin. Ther. 39:1537, 2017)。しかしこの画期的な発見もまた、上記の実験系が確立されていないために、これらの抗体がウイルスの感染、増殖を防御しうる中和活性を有しているかどうかは不明のままである。

近年、腸管上皮幹細胞マーカーである Lgr5 の発見を機に、これまでは不可能であった腸管上皮細胞の初代培養が、マトリゲルなどの細胞外基質と幹細胞ニッチ形成に必要なサイトカイン類の添加による 3 次元培養により可能となっている。2016 年に米国ベイラー医科大学の Mary Estes らのグループにより、ヒト小腸組織由来の単層化したヒト腸管上皮細胞に胆汁を添加するだけで HuNoV の感染、増殖が認められることが報告された (Ettayebi, K. et al., Science 353:1387, 2016)。彼女らの報告では、HuNoV のうち少なくとも GI.1、GII.3、GII.4、GII.17 の遺伝子型が吸収上皮細胞にのみ感染、侵入し、そこで数十倍から数百倍程度の増殖が起きているとしている。

申請者が最近樹立に成功したヒト iPS 細胞株由来の腸管上皮細胞においても、HuNoV の GII.3、GII.4、GII.6、GII.17 型が増殖することを確認しているが、我々の樹立した細胞を用いた場合は、組成の不明な胆汁の添加を必要とすることなく、検討したすべての HuNoV が十分に増殖できている (Sato S (Corresponding), et al., Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol. 7:686, 2019)。しかし、「ウイルスを得る」目的としては、組織由来、多能性幹細胞由来にかかわらず、ヒト腸管上皮細胞を用いて HuNoV の増殖を行うことは、コストの面からも増殖効率の面からも未だ現実的なものではない。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が最近樹立に成功したヒト iPS 細胞由来の腸管上皮細胞を用いて、HuNoV の侵入に関与する宿主側のタンパク質レセプターの同定を目的とし、さらにその分子を発現する一般的な細胞株やトランスジェニックマウスを作出することで、HuNoV に対するワクチン開発に資する、改良型 *in vitro* HuNoV 増殖系の確立、および、HuNoV 感染モデルマウスの作製を目指す。

3. 研究の方法

HEK293 細胞を用いた HuNoV のリバーシジェネティクス法はすでに報告があるため、ウイルスゲノムが細胞内に入ることができればウイルスの複製、増殖が起こるものと考えられている (Katayama, K. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 111:E4043, 2014)。したがって本研究計画の最終目的は、HuNoV の宿主側タンパク質レセプターを同定することでほぼ達成されると考えられることから、以下のストラテジーによりこのレセプターの同定を目指す。

申請者はすでに、同じヒト iPS 細胞株由来で、HuNoV が増殖できる細胞ロットと出来ない細胞ロットを樹立している (申請者未発表データ)。これらの細胞間で遺伝子発現パターンを比較し、HuNoV が感染し、増殖する細胞ロットで高発現している膜タンパク質をピックアップし、候補分子とする。すべての候補分子はリアルタイム PCR や免疫染色などにより実際の発現の有無を確認する。

実験に用いる HuNoV のなかで細胞変性効果 (cytopathogenic effect; CPE) を認め、かつ申請者が樹立したヒト iPS 細胞株由来腸管上皮細胞で継代することができたウイルス株を用いて、その腸管上皮細胞を一過性に大量培養 (1 回あたり 5×10^7 程度) した後、Cas9/sgRNA ライブラリーを導入する。HuNoV を感染させても CPE を認めずに生き残った細胞集団では、ウイルスの感染や増殖に必須と考えられる分子に対する sgRNA が導入されていると考えられるので、次世代シーケンサーをもちいて当該遺伝子を同定する。

4. 研究成果

同じヒト iPS 細胞株由来で、HuNoV (GII.4) が増殖できる細胞ロットと出来ない細胞ロットを用いて、GII.4 を認識する膜タンパク質の同定を試みたが、候補となる分子が得られなかった。一方で、申請者が樹立したヒト iPS 細胞株由来腸管上皮細胞では GII.2 型の HuNoV の増殖は認められなかったが、ヒト組織由来の腸管上皮細胞では、複数の GII.2 サンプルの増殖を認めることが明らかになった (申請者論文投稿準備中)。この結果は、iPS 細胞由来の腸管上皮細胞は、ウイルスが複製、増殖できる機構は備えているものの、GII.2 型 HuNoV の感染が成立してい

ないことを意味しており、少なくとも GII.2 型 HuNoV は iPS 細胞由来の腸管上皮細胞で増殖が認められている他の遺伝子型 HuNoV とは異なるタンパク質レセプターを感染に利用していることと、iPS 細胞由来の腸管上皮細胞では GII.2 を認識するタンパク質レセプターを欠失している可能性を強く示唆するものである。そこで、これらの細胞間で遺伝子発現パターンを比較し、組織由来の細胞でのみ高発現している膜タンパク質をピックアップし、候補分子とした。それぞれについて、ヒトノロウイルスの増殖を示さない上皮細胞にレンチウイルスベクターを用いて強制発現させた。現在これらの細胞のヒトノロウイルス増殖能を検討している。

感染時に用いるウイルス量を上げた場合に CPE が認められるかどうかを検討するため、細胞で 1 度増やしたウイルス液を大量に調整し、限外濾過膜を使用して 100 倍に濃縮したウイルスを調整した。このウイルスを用いて同様に感染実験を行ったが、感染後 72 時間においても CPE を認めなかった。

上記に加えて、感染、増殖能を保ったまま増殖可能な腸管上皮細胞株樹立を目指し、ヒト iPS 細胞由来の腸管上皮細胞に SV40 Large T 抗原の導入を行った。安価な一般培養細胞用の培地で培養することは出来なかったが、分化誘導・維持培地で 10 回以上継代可能な株化に成功した。現在この細胞株のヒトノロウイルス増殖能を検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sasou Ai, Yuki Yoshikazu, Kurokawa Shiho, Sato Shintaro, Goda Yuki, Uchida Masao, Matsumoto Naomi, Sagara Hiroshi, Watanabe Yuji, Kuroda Masaharu, Sakon Naomi, Sugiura Kotomi, Nakahashi-Ouchida Rika, Ushijima Hiroshi, Fujihashi Kohtarō, Kiyono Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Development of Antibody-Fragment-Producing Rice for Neutralization of Human Norovirus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	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) 10.3389/fpls.2021.639953	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 Sato Shintaro, Matsumoto Naomi, Hisaie Kota, Uematsu Satoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Alcohol abrogates human norovirus infectivity in a pH-dependent manner	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/s41598-020-72609-z	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 Fujimoto Kosuke, Kimura Yasumasa, Shimohigoshi Masaki, Satoh Takeshi, Sato Shintaro, et al.	4. 巻 28
2. 論文標題 Metagenome Data on Intestinal Phage-Bacteria Associations Aids the Development of Phage Therapy against Pathobionts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Host & Microbe	6. 最初と最後の頁 380 ~ 389.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chom.2020.06.005	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 Yuki Yoshikazu, Kurokawa Shiho, Sato Shintaro, Sasou Ai, Matsumoto Naomi, Suzuki Akio, Sakon Naomi, Goda Yuki, Takeyama Natsumi, Miyoshi Tatsuya, Marcotte Harold, Tanaka Tomoyuki, Hammarstrom Lennart, Kiyono Hiroshi	4. 巻 222
2. 論文標題 A Heterodimeric Antibody Fragment for Passive Immunotherapy Against Norovirus Infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 470 ~ 478
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/infdis/jiaa115	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 Yuki Yoshikazu, Kurokawa Shiho, Sato Shintaro, Sasou Ai, Matsumoto Naomi, Suzuki Akio, Sakon Naomi, Goda Yuki, Takeyama Natsumi, Miyoshi Tatsuya, Marcotte Harold, Tanaka Tomoyuki, Hammarstrom Lennart, Kiyono Hiroshi	4. 巻 -
2. 論文標題 A heterodimeric antibody fragment for passive immunotherapy against norovirus infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Infectious Diseases	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) 10.1093/infdis/jiaa115	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 Kimura Shunsuke, Nakamura Yutaka, Kobayashi Nobuhide, Shiroguchi Katsuyuki, Kawakami Eiryō, Mutoh Mami, Takahashi-Iwanaga Hiromi, Yamada Takahiro, Hisamoto Meri, Nakamura Midori, Udagawa Nobuyuki, Sato Shintaro, Kaisho Tsuneyasu, Iwanaga Toshihiko, Hase Koji	4. 巻 11
2. 論文標題 Osteoprotegerin-dependent M cell self-regulation balances gut infection and immunity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	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/s41467-019-13883-y	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 Takahashi Ichiro, Hosomi Koji, Nagatake Takahiro, Tobou Hirokazu, Yamamoto Daiki, Hayashi Ikue, Kurashima Yosuke, Sato Shintaro, Shibata Naoko, Goto Yoshiyuki, Maruyama Fumito, Nakagawa Ichiro, Kuwae Asaomi, Abe Akio, Kunisawa Jun, Kiyono Hiroshi	4. 巻 32
2. 論文標題 Persistent colonization of non-lymphoid tissue-resident macrophages by Stenotrophomonas maltophilia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 133 ~ 141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz071	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 Joo Sunyi, Suwanto Aldina, Sato Ayuko, Nakahashi-Ouchida Rika, Mori Hiromi, Uchida Yohei, Sato Shintaro, Kurashima Yosuke, Yuki Yoshikazu, Fujihashi Kohtarō, Kawaguchi Yasushi, Kiyono Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 A role for the CCR5-CCL5 interaction in the preferential migration of HSV-2-specific effector cells to the vaginal mucosa upon nasal immunization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mucosal Immunology	6. 最初と最後の頁 1391 ~ 1403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41385-019-0203-z	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 Nagai M, Noguchi R, Takahashi D, Morikawa T, Koshida K, Komiyama S, Ishihara N, Yamada T, Kawamura YI, Muroi K, Hattori K, Kobayashi N, Fujimura Y, Hirota M, Matsumoto R, Aoki R, Tamura-Nakano M, Sugiyama M, Katakai T, Sato S, Takubo K, Dohi T, Hase K.	4. 巻 178
2. 論文標題 Fasting-Refeeding Impacts Immune Cell Dynamics and Mucosal Immune Responses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 1072 ~ 1087.e14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2019.07.047	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 Kimura Shunsuke, Kobayashi Nobuhide, Nakamura Yutaka, Kanaya Takashi, Takahashi Daisuke, Fujiki Ryoji, Mutoh Mami, Obata Yuuki, Iwanaga Toshihiko, Nakagawa Tomoo, Kato Naoya, Sato Shintaro, Kaisho Tsuneyasu, Ohno Hiroshi, Hase Koji	4. 巻 216
2. 論文標題 Sox8 is essential for M cell maturation to accelerate IgA response at the early stage after weaning in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 831 ~ 846
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20181604	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Shintaro Sato
2. 発表標題 Human norovirus propagation in human induced pluripotent stem cell-derived intestinal epithelial cells
3. 学会等名 Keystone Symposia - Tissue Organoids as Models of Host Physiology and Pathophysiology of Disease (J1) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shintaro Sato
2. 発表標題 Human norovirus propagation in human induced pluripotent stem cell-derived intestinal epithelial cells
3. 学会等名 19th International Congress of Mucosal Immunology (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Shintaro Sato and David W. Pascual	4. 発行年 2020年
2. 出版社 ACADEMIC PRESS, INC.	5. 総ページ数 915
3. 書名 Mucosal Vaccines, 2nd ed. - Innovation for Preventing Infections Diseases	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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