

令和 5 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：2020～2022

課題番号：20K08320

研究課題名(和文) サポウイルスのリソース確保および消化器感染増殖メカニズム解明のための研究

研究課題名(英文) Research to secure resources for sapoviruses and to elucidate the mechanism of growth of gastrointestinal infections

研究代表者

岡 智一郎 (OKA, Tomoichiro)

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：50356242

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)：ヒト十二指腸由来細胞(HuTu80)を用いたヒトサポウイルス(HuSaV)の効率的な増殖系を初めて確立することに成功した。合計で15遺伝子型株のウイルスストックを得た。多様な遺伝子型株の増殖及び大量培養、それらを抗原とした特異抗血清作製により、本研究課題の目的として掲げたHuSaV研究を進展させるためのバイオリソースの確保を達成した。さらに複数のHuSaV株とHuTu80を用いたCRISPR/Cas9によるゲノムワイドノックアウトスクリーニングを実施しHuSaV感染を規定する細胞側候補因子を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトサポウイルスはノロウイルス同様、下痢嘔吐原因ウイルスのひとつで、あらゆる年齢層で感染・発症し、再感染や食中毒を含む集団感染事例も報告されている。そのため、その感染制御のためには、ウイルスを用いた研究が必須である。しかし、1970年代にヒトサポウイルスが発見されてから40年以上培養細胞や動物での増殖成功例はなかった。本研究で初めてヒトサポウイルスの増殖系が確立でき、ウイルス陽性糞便に依存しない分離株を用いた研究が初めて可能になった。

研究成果の概要(英文)：We have succeeded in establishing for the first time an efficient growth system for sapoviruses in human feces using human duodenum-derived cells (HuTu80). In total, virus stocks of 15 genotype strains were obtained. The propagation of diverse genotype strains and their large scale preparation, as well as the preparation of specific antisera, have achieved the objective of this research project to secure bioresources to advance human sapovirus research. We have also conducted genome-wide knockout screening using multiple sapovirus strains and HuTu80 cells with CRISPR/Cas9 to identify candidate cellular factors that may serve as receptors involved in sapovirus infection.

研究分野：感染症

キーワード：サポウイルス ヒト十二指腸由来細胞株 HuTu80 ウイルスストック virion 特異抗血清 ウイルス感受性規定因子 パレコウイルス

1. 研究開始当初の背景

ヒトサポウイルスはノロウイルス同様、下痢嘔吐を引き起こす原因ウイルスのひとつである。全年齢層に感染・発症し、再感染や食中毒を含む集団感染事例も報告されている。経口感染後、腸管組織で速やかに増殖すると考えられており、糞便中には大量のウイルス($\sim 10^{11}$ RNA コピー/g 糞便)が排泄される。しかし、1970年代の発見以降、このウイルスの培養や実験動物を用いた増殖系は存在せず、不活性化条件検討や感染・増殖のメカニズムはわからないままであった。核酸検出系の普及に伴い、その検出報告が増加し、多種多様な株は構造タンパク質領域の配列に基づき現時点で18の遺伝子型に分類されている。我々は培養細胞を用いたヒトサポウイルスの増殖条件を世界で初めて見出すことに成功した(2019年 第7回国際カリシウイルス学会@オーストラリアにて発表)。

2. 研究の目的

本研究では消化器官生理条件を考慮しながら、さらなるサポウイルス感染・増殖効率向上条件を探るとともに、持続的な研究リソースとしてのウイルスストック確保を第1の目的とした。また、増殖したウイルスを用いて、その性状・組成解析を行うとともに、加熱、紫外線処理といった物理化学的不活性化処理への抵抗性を評価し、さらにヒトサポウイルスの細胞への感染・増殖メカニズム解明のため、ウイルス感染性を規定する細胞性因子の検索も行った。

3. 研究の方法

ヒト体内での感染・増殖部位の生理的整合性をふまえ、主にヒト腸管由来細胞と抱合型胆汁酸を組み合わせることで、ヒトサポウイルスのさらなる効率的な増殖条件を検討した。

サポウイルスの増殖評価はまず多様な遺伝子型株を同一条件で検出できる核酸定量系で行い、さらに使用する遺伝子型株のサポウイルス構造タンパク質 VP1 で形成されたウイルス様中空粒子に対して作成した特異抗血清を用いるサンドイッチ ELISA でも評価した。更に細胞内でのウイルスタンパク質の発現を、構造タンパク質、非構造タンパク質に対する自作抗体で、ウイルスゲノム複製を double strand RNA 検出用市販抗体を用いた免疫細胞染色で確認した。さらに電子顕微鏡観察でウイルス粒子の存在も確認した。またウイルスの継代を行いウイルスストックも調製した。安定的な感染結果が得られる最小感染濃度に加え、加熱、紫外線不活化に対する抵抗性も評価した。精製ウイルスをウサギ、モルモットに免疫し、抗血清を調製し、一部の遺伝子型株について抗原抗原性も評価した。

HuTu80 細胞での効率的な増殖ができた株のフルゲノム配列を合成し、in vitro で合成した capped RNA を HuTu80 細胞へのトランスフェクトにより、感染性ウイルスの産出を検証した。さらに超遠心精製したヒトサポウイルス粒子の SDS-PAGE 及び LC-MS/MS 解析を行った。

サポウイルスの感染・増殖に必須な細胞宿主因子を検索するため、CRISPR/Cas9 によるゲノムワイドノックアウトスクリーニングを実施した。HuTu80 細胞で効率的に増

殖するパレコウイルスについても感染受容体になりうる細胞因子の候補を検索した。

4 . 研究成果

ヒト十二指腸由来細胞(HuTu80)を用いてヒト糞便中のサポウイルスを効率的に増殖させることができる条件を見出し、論文発表を行った (2020 PNAS)。ヒト糞便中のサポウイルスは生理的な感染・増殖部位と考えられるヒト十二指腸由来細胞で、そこに高濃度で存在する抱合型胆汁酸を培地中に添加することで効率的なウイルス増殖とウイルス継代が可能であった。最初に増殖に成功し論文発表した GI.1, GI.2, GII.3 に加え、研究期間中に GI.3, -4, -5, -6, -7, GII.1, -2, -4, -,5, -8, GV.1, -2 についても糞便からウイルス増殖、ウイルス継代、高濃度ウイルスストック (培養上清中に $\sim 10^9\sim 11$ ウイルスゲノムコピー/mL)の調製することができた。これにより、現在報告されている 18 のうち 15 遺伝子型株の増殖・ウイルスストックが得られ、糞便に依存しないウイルスリソース確保という本研究課題の第 1 目的を達成した。

またヒトサポウイルスが 60 30 分でも一定の抵抗性を有し、遺伝子型株によって抵抗性が異なることも明らかにした。紫外線処理では糞便乳剤では $5.4\text{J}/\text{cm}^2$ でも不活化されなかったのに対し、ウイルスを含む培養上清では $1.8\text{J}/\text{cm}^2$ で不活化され、両者で大きく不活化抵抗性が異なることも明らかになった (2020 PNAS)。

ヒトサポウイルスの 10 遺伝子型株について $\sim 400\text{mL}$ スケールでの培養も実施し、精製ウイルスを免疫抗原とした特異抗血清の調製も実施した。

ヒトサポウイルスのリバースジェネティクスによる産出についても検討し、in vitro で合成した capped full length RNA を HuTu80 細胞にトランスフェクトし、胆汁酸添加培地で培養することで感染性ウイルスを作出できることを確認した (2022 Viruses)。さらにヒトサポウイルスの virion 構成タンパク質組成解析も行った (2022 Viruses)。

4 つのヒトサポウイルス遺伝子型株と HuTu80 細胞を用いた CRISPR/Cas9 レンチウイルスによるゲノムワイドノックアウトスクリーニングを実施し、ヒトサポウイルスの感染・増殖に必須と考えられる宿主細胞因子の候補を見出した。

この研究の過程で HuTu80 細胞でサポウイルスだけでなくパレコウイルス (1-6 型すべて) も効率的に増殖し、ウイルス分離できることを見出し、論文発表した (2022 Jpn J Infect Dis)。さらにパレコウイルス 1-6 型に共通する感染・エンターに必須な宿主タンパク質を見出すことにも成功し、論文発表した (2023 Nature Communications)。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

Polymerase chain reaction primer sets for the detection of genetically diverse human sapoviruses.

Oka T, Yamamoto SP, Iritani N, Sato S, Tatsumi C, Mita T, Yahiro S, Shibata S, Wu FT, Takagi H.

Arch Virol. 2020, 165(10):2335-2340.

Human sapovirus propagation in human cell lines supplemented with bile acids. **Takagi H, Oka T**, Shimoike T, Saito H, Kobayashi T, Takahashi T, Tatsumi C, Kataoka M, Wang Q, Saif LJ, Noda M. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020, 117(50):32078-32085.

汎用培養細胞によるヒトサポウイルスの培養法について

高木弘隆, 岡智一郎. 食品衛生学雑誌 2021 62 J53-55.

A Human Intestinal Cell Line Suitable for the Propagation of Human Parechovirus Type 1 to 6 with a Clear Cytopathic Effect.

Takagi H, Oka T, Ami Y, Suzaki Y, Saito H.

Jpn J Infect Dis. 2022 May 24;75(3):318-321. doi: 10.7883/yoken.JJID.2021.534.

Atomic Structure of the Human **Sapovirus** Capsid Reveals a Unique Capsid Protein Conformation in Caliciviruses.

Miyazaki N, Song C, **Oka T**, Miki M, Murakami K, Iwasaki K, Katayama K, Murata K.

J Virol. 2022 May 11;96(9):e0029822. doi: 10.1128/jvi.00298-22.

Characterization of a Human Sapovirus Genotype G11.3 Strain Generated by a Reverse Genetics System: VP2 Is a Minor Structural Protein of the Virion. Li T-C, Kataoka M, Doan YH, Saito H, **Takagi H**, Muramatsu M, **Oka T**.

Viruses. 2022 Jul 27;14(8):1649. doi: 10.3390/v14081649.

Distribution of Human Sapovirus Strain

Genotypes over the last four Decades in Japan: a Global Perspective. Doan YH, Yamashita Y, Shinomiya H, Motoya T, Sakon N, Suzuki R, Shimizu H, Shigemoto N, Harada S, Yahiro S, Tomioka K, Sakagami A, Ueki Y, Komagome R, Saka K, Okamoto-Nakagawa R, Shirabe K, Mizukoshi F, Arita Y, Haga K, Katayama K, Kimura H, Muramatsu M, **Oka T**. Jpn J Infect Dis. 2023 Mar 31. doi: 10.7883/yoken.JJID.2022.704. Online ahead of print.

Myeloid-associated differentiation marker is an essential host factor for human parechovirus PeV-A3 entry.

Watanabe K, **Oka T**, **Takagi H**, Anisimov S, Yamashita SI, Katsuragi Y, Takahashi M, Higuchi M, Kanki T, Saitoh A, Fujii M.

Nat Commun. 2023 Mar 31;14(1):1817. doi: 10.1038/s41467-023-37399-8.

〔学会発表〕(計 5 件)

渡邊香奈子, **岡智一郎**, **高木弘隆**, Anisimov Sergei, 高橋雅彦, 大桑孝子, 樋口雅也, 藤井雅寛. ヒトパレコウイルスの受容体遺伝子の同定. 日本ウイルス学会 第 68 回学術集会 2021

腸管系ウイルス培養における新知見-ヒトの生理からウイルス増殖を考える-**高木弘隆**, **岡智一郎**. ウイルス性下痢症研究会 第 32 回学術集会 2021 年 11 月

非胃腸炎症例の咽頭拭い液からの下痢症ウイルス検出. **岡智一郎**, **高木弘隆**, 斎藤博之. 第 63 回日本臨床ウイルス学会 2022.6.

汎用細胞増殖系を活用した下痢症ウイルスの浄水処理性の評価. 白崎伸隆, 胡秋晗, 白川大樹, **高木弘隆**, **岡智一郎**, 松下拓,

松井佳彦. ウイルス性下痢症研究会
第 33 回学術集会, 2022.11.

ヒトサポウイルス研究加速のための遺伝子
型網羅的リソース確立に向けた取り組み.

岡智一郎、李天成、米満研三、網康至、須崎
百合子、中村(桶本)優子、片岡紀代、団海
燕、三田哲朗、小林孝行、斎藤博之、八尋俊
輔、佐藤重紀、柴田伸一郎、塚田竜介、高木
弘隆. 第 69 回日本ウイルス学会, 2022.11.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

ヒトサポウイルスの細胞培養増殖系の確立
[https://www.niid.go.jp/niid/ja/basic-
science/virology/9995-virology-2020-
13.html](https://www.niid.go.jp/niid/ja/basic-science/virology/9995-virology-2020-13.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者 岡 智一郎

(Oka Tomoichiro)

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：50356242

(2)研究分担者 高木 弘隆

(Takagi Hirotaka)

国立感染症研究所・

安全実験管理部・主任研究官

研究者番号：00332362

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7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 2. Takagi T, Oka T, Ami Y, Suzaki Y, Saito H.	4. 巻 -
2. 論文標題 A human intestinal cell line suitable for the propagation of Type 1-6 human parechovirus with a clear cytopathic effect.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Jpn J Infect Dis.	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） なし	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 高木弘隆, 岡智一郎.	4. 巻 62
2. 論文標題 汎用培養細胞によるヒトサポウイルスの培養法について	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 食品衛生学雑誌	6. 最初と最後の頁 J53-55
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 Takagi Hiroataka, Oka Tomoichiro, Shimoike Takashi, Saito Hiroyuki, Kobayashi Takayuki, Takahashi Tomoko, Tatsumi Chika, Kataoka Michiyo, Wang Qihong, Saif Linda J., Noda Mamoru	4. 巻 117
2. 論文標題 Human sapovirus propagation in human cell lines supplemented with bile acids	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 32078 ~ 32085
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2007310117	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 Oka Tomoichiro, Yamamoto Seiji P., Iritani Nobuhiro, Sato Shigenori, Tatsumi Chika, Mita Tetsuo, Yahiro Shunsuke, Shibata Shinichiro, Wu Fang-Tzy, Takagi Hiroataka	4. 巻 165
2. 論文標題 Polymerase chain reaction primer sets for the detection of genetically diverse human sapoviruses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 2335 ~ 2340
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00705-020-04746-9	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 該当する

1. 著者名 Miyazaki N, Song C, Oka T, Miki M, Murakami K, Iwasaki K, Katayama K, Murata K.	4. 巻 96
2. 論文標題 Atomic Structure of the Human Sapovirus Capsid Reveals a Unique Capsid Protein Conformation in Caliciviruses.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Virol.	6. 最初と最後の頁 e0029822
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jvi.00298-22.	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 -

1. 著者名 Li T-C, Kataoka M, Doan YH, Saito H, Takagi H, Muramatsu M, Oka T.	4. 巻 14
2. 論文標題 Characterization of a Human Sapovirus Genotype G11.3 Strain Generated by a Reverse Genetics System: VP2 Is a Minor Structural Protein of the Virion.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Viruses.	6. 最初と最後の頁 1649
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v14081649.	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 Doan YH, Yamashita Y, Shinomiya H, Motoya T, Sakon N, Suzuki R, Shimizu H, Shigemoto N, Harada S, Yahiro S, Tomioka K, Sakagami A, Ueki Y, Komagome R, Saka K, Okamoto-Nakagawa R, Shirabe K, Mizukoshi F, Arita Y, Haga K, Katayama K, Kimura H, Muramatsu M, Oka T.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Distribution of Human Sapovirus Strain Genotypes over the last four Decades in Japan: a Global Perspective.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Jpn J Infect Dis.	6. 最初と最後の頁 x
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7883/yoken.JJID.2022.704.	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 K, Oka T, Takagi H, Anisimov S, Yamashita SI, Katsuragi Y, Takahashi M, Higuchi M, Kanki T, Saitoh A, Fujii M.	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 Nat Commun.14	6. 最初と最後の頁 1817
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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高木弘隆, 岡智一郎.
2. 発表標題 腸管系ウイルス培養における新知見-ヒトの生理からウイルス増殖を考える-
3. 学会等名 ウイルス性下痢症研究会 第32回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 2. 渡邊香奈子, 岡智一郎, 高木弘隆, Anisimov Sergei, 高橋雅彦, 大桑孝子, 樋口雅也, 藤井雅寛.
2. 発表標題 ヒトパレコウイルスの受容体遺伝子の同定.
3. 学会等名 日本ウイルス学会 第68回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡智一郎, 高木弘隆, 斎藤博之.
2. 発表標題 非胃腸炎症例の咽頭拭い液からの下痢症ウイルス検出.
3. 学会等名 第63回日本臨床ウイルス学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白崎伸隆, 胡秋陰, 白川大樹, 高木弘隆, 岡智一郎, 松下拓, 松井佳彦
2. 発表標題 汎用細胞増殖系を活用した下痢症ウイルスの浄水処理性の評価.
3. 学会等名 ウイルス性下痢症研究会 第33回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡智一郎、李天成、米満研三、網康至、須崎百合子、中村（桶本）優子、片岡紀代、団海燕、三田哲朗、小林孝行、斎藤博之、八尋俊輔、佐藤重紀、柴田伸一郎、塚田竜介、高木弘隆。
2. 発表標題 ヒトサボウイルス研究加速のための遺伝子型網羅的リソース確立に向けた取り組み。
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ヒトサボウイルスの細胞培養増殖系の確立 https://www.niid.go.jp/niid/ja/basic-science/virology/9995-virology-2020-13.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	高木 弘隆 (TAKAGI Hirotaka) (00332362)	国立感染症研究所・安全実験管理部・主任研究官 (82603)	

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