

機関番号：82603

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790452

研究課題名 (和文) 手足口病ウイルスの白血球侵入機構に関する研究

研究課題名 (英文) Studies on the leukocyte-entry mechanism of the hand-foot-and-mouth disease virus

研究代表者

西村 順裕 (NISHIMURA YORIHITO)

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：00392316

研究成果の概要 (和文)：

エンテロウイルス 71 (EV71) は、主に乳幼児にみられる一般的な発熱性疾患である手足口病の主要な原因となる病原体である。本研究では、白血球に発現するシアロムチン膜蛋白質であり、炎症の初期段階できわめて重要な役割を果たす P セレクチン糖蛋白質リガンド 1 (PSGL-1) を、EV71 の機能的受容体として同定した。

PSGL-1 のアミノ末端領域は、EV71 と特異的に結合した。非感受性マウス L929 細胞に PSGL-1 を発現させると、EV71 が侵入・増殖し、細胞変性効果を示すようになった。EV71 分離株 8 株のうち 5 株は可溶性 PSGL-1 に結合し、PSGL-1 は Jurkat T 細胞への感染のための主要な受容体として機能していた。他の 3 株の EV71 分離株は PSGL-1 を使用せず、白血球における分離株特異的 EV71 増殖機構の存在が示唆された。非白血球細胞では EV71 が PSGL-1 非依存的に増殖し、EV71 に対する別の受容体が存在することが示唆された。

PSGL-1 と EV71 の相互作用の分子基盤を解明するため、PSGL-1 変異体を作製し、EV71 との結合に重要な翻訳後修飾を同定した。PSGL-1 アミノ末端領域のチロシン硫酸化部位に変異を導入すると、PSGL-1 と EV71 の結合は阻害された。さらに、硫酸化阻害剤である sodium chlorate は PSGL-1 と EV71 の相互作用を阻害し、Jurkat 細胞における EV71 増殖を阻害した。これらの実験から、PSGL-1 アミノ末端領域のチロシン硫酸化が、白血球細胞における EV71 の複製を促進することが示された。

EV71 受容体としての PSGL-1 の同定は、手足口病および EV71 が関連する他の疾患での細胞指向性や病態形成における PSGL-1 陽性白血球の役割に新たな光を当ててものである。

研究成果の概要 (英文)：

Enterovirus 71 (EV71) is a major causative agent of hand, foot, and mouth disease (HFMD), a common febrile disease occurring mainly in young children. In this study, I identified human P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1), a sialomucin membrane protein expressed on leukocytes that plays a critical role in early stages of inflammation, as a functional receptor for EV71. The N terminal region of PSGL-1 bound specifically to EV71. The stable PSGL-1 expression conferred EV71 entry, replication, and development of cytopathic effect to nonsusceptible mouse L929 cells. Five out of eight EV71 strains bound to soluble PSGL-1 and utilized intact PSGL-1 as the primary receptor for infection of Jurkat T cells. Three other EV71 strains did not utilize PSGL-1, suggesting the presence of strain-specific replication of EV71 in leukocytes. EV71 replicated in nonleukocyte cell lines in a PSGL-1-independent manner, indicating the presence of alternative receptor (s) for EV71.

To elucidate the molecular basis of the PSGL-1-EV71 interaction, we generated a series of PSGL-1 mutants and identified the post-translational modifications that are critical for binding of PSGL-1 to EV71. Site-directed mutagenesis at one or more potential tyrosine sulfation sites in the N-terminal region of PSGL-1 significantly impaired PSGL-1 binding to EV71. Furthermore, an inhibitor of sulfation, sodium chlorate, blocked the PSGL-1-EV71 interaction and inhibited PSGL-1-mediated viral replication of EV71 in Jurkat T cells in a dose-dependent manner. Thus, the results presented in this study reveal that tyrosine sulfation, but not O-glycosylation, in

the N-terminal region of PSGL-1 may facilitate virus entry and replication of EV71 in leukocytes.

Thus, the identification of PSGL-1 as a receptor for EV71 sheds new light on a role for PSGL-1-positive leukocytes in cell tropism and pathogenesis during the course of HFMD and a variety of other EV71-mediated diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	0	1,700,000
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：手足口病・エンテロウイルス71・受容体・レセプター・PSGL-1・白血球

1. 研究開始当初の背景

エンテロウイルス71 (EV71) はピコルナウイルス科エンテロウイルス属、A群ヒトエンテロウイルスに分類され、コクサッキーウイルスA16 (CVA16) とともに手足口病の主要な病原ウイルスである。手足口病の症状は一般に軽く、通常数日で回復する。しかし、EV71は時として無菌性髄膜炎、急性弛緩性麻痺などの様々な神経疾患を引き起こす。EV71による手足口病の大規模な流行は、1997年のマレーシア、1998年の台湾以降、アジア太平洋地域で多発しており、公衆衛生上の大きな問題となっている。特に2008年には、安徽省を中心とした中国各地で大規模な手足口病流行が発生し、120名以上の死亡例が報告された。幸いにも我が国では手足口病重症例の大規模な流行は認められていない。しかし、死亡例を含む手足口病重症例が散発的に報告されている。

特異的ウイルス受容体の同定は、ウイルス感染による病原性発現機構の分子基盤の解明や予防治療法の開発研究にとって重要である。たとえば、EV71と同様にエンテロウイルス属に分類されるポリオウイルスでは、特異的受容体であるヒトポリオウイルスレセプター (hPVR, CD155) 同定の後、hPVR発現トランスジェニックマウスモデルが樹立された。このマウスにより、神経病原性発現機序やワクチン株の病原性解析等の研究が大きく前進した。またhPVR発現マウスL929細胞 (L20B細胞) は、ポリオウイルスの分離同定に非常に有用な細胞であり、WHOによるポリオ根絶計画にも大きく寄与している。しかしながら、EV71やCVA16を含むA群ヒトエ

ンテロウイルスの受容体は同定されておらず、ウイルス感染・病原性発現を規定する宿主因子の分子基盤の研究は進んでいない。また、ポリオウイルス分離同定におけるL20B細胞に相当する、EV71が特異的に増殖する細胞株も存在しない。

2. 研究の目的

従来、臨床検体 (手足口病患者の便・咽頭拭い液など) からのEV71分離には、Vero細胞 (アフリカミドリザル腎由来)、RD細胞 (ヒト横紋筋腫由来) が使用されてきた。したがっておそらく世界中のEV71研究者は、これらの細胞上のEV71受容体の同定を試み、失敗に終わっている。研究代表者は、これらの細胞からのEV71受容体同定が困難な理由は、受容体発現量が低いためと考えた。つまり、全く異なる組織由来の細胞では、EV71受容体発現量が高い場合もあり、同定が容易になることもありうると推測した。研究代表者は、EV71がヒト末梢血細胞で増殖するという報告に着目し、ヒト白血球系細胞からEV71受容体を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞

ヒトリンパ球由来Jurkat細胞、U937細胞、MOLT-4細胞 (PSGL-1陽性)、ヒト腎由来293T細胞 (PSGL-1陰性) を用いた。またウイルスの力価測定にはヒト横紋筋腫由来RD細胞を用いた。

(2) EV71結合分子の同定

レトロウイルスライブラリーと浮遊系マウス細胞とを組み合わせた発現クローニン

グ法を用いた。Jurkat T 細胞よりレトロウイルス cDNA ライブラリーを作製し、浮遊系細胞であるマウスミエローマ細胞に感染させた。感染細胞を回収し、EV71 1095 株

(EV71-1095) 粒子を固相化したプレートに添加した。結合していない細胞を洗浄除去し、付着細胞を 37°C で 1 週間培養した。プレート上に形成された細胞のゲノムを回収し、ライブラリー由来遺伝子を PCR で増幅した。

(3) フローサイトメトリーによる EV71-PSGL-1 結合の検出

293T 細胞に一過性に PSGL-1 分子を発現させた。この細胞と EV71 を氷上で 30 分反応させ、細胞に結合した EV71 を蛍光標識抗 EV71 抗体で染色した。

(4) 免疫沈降による EV71-PSGL-1 結合の検出

可溶性 PSGL-1-Fc キメラ蛋白質と EV71 を反応させ、Protein G ビーズで免疫沈降させた。共沈した EV71 VP1 蛋白質をウエスタンブロッティングで検出した。

(5) L-PSGL-1.1 細胞の樹立

マウス L929 細胞にヒト PSGL-1 発現プラスミドをトランスフェクションし、プラストシジン存在下で培養後、ヒト PSGL-1 発現の高いクローンを選択した。

(6) ウイルス感染実験

細胞 (4×10^4) を $1 \text{ CCID}_{50}/\text{cell}$ のウイルスで 1 h 感染させ、洗浄後、34°C で培養した。Sodium chlorate による硫酸化阻害実験においては、10~30 mM の sodium chlorate 存在下で培養した Jurkat 細胞を用いた。マウス L929 細胞にヒト PSGL-1 発現プラスミドをトランスフェクションし、プラストシジン存在下で培養後、ヒト PSGL-1 発現の高いクローンを選択した。

4. 研究成果

(1) EV71 結合分子の同定

EV71 結合プレートによるパンニングの結果、EV71 結合コロニーとして 4 クロウンを得た。これらの細胞ゲノムからは、ヒト PSGL-1 遺伝子が検出された。

(2) PSGL-1 の EV71 結合領域の同定

PSGL-1 と EV71 の特異的結合にするために、フローサイトメトリーによる EV71 結合アッセイを行った。アッセイには、PSGL-1 をほとんど発現していないヒト 293T 細胞を用いた。293T 細胞にヒト PSGL-1 を一過性に発現させたところ、細胞表面に EV71-1095 粒子が結合した。一方、シアロムチン蛋白質であるヒト CD34 分子、ヒト CD43 分子、あるいはマウス PSGL-1 を発現させた場合には、EV71-1095 は結合しなかった。また、EV71-1095 と PSGL-1 との結合は、抗 PSGL-1 抗体により濃度依存的に阻害された。さらに、マウス PSGL-1 のアミノ末端領域を、ヒト PSGL-1 の相当領域

に組換えキメラ PSGL-1 を発現させた場合にも、EV71-1095 は結合した。以上の結果より、EV71-1095 は、ヒト PSGL-1 のアミノ末端領域に特異的に結合することが明らかとなった。

(3) ヒト PSGL-1 発現マウス L929 細胞における EV71 増殖

ヒト PSGL-1 分子により、EV71 の細胞侵入・ウイルス増殖が誘導されるかを解析するために、EV71 非感受性であるマウス L929 細胞にヒト PSGL-1 を発現させ (L-PSGL-1.1 細胞)、EV71 感受性を評価した。L-PSGL-1.1 細胞に EV71-1095 を感染させた場合、細胞変性効果 (CPE) と細胞内での EV71 抗原が検出された (感染後 4 日目)。さらに、CPE と EV71 抗原の発現は、L-PSGL-1.1 細胞細胞を抗 PSGL-1 抗体で前処理することにより阻害された。したがって、PSGL-1 は EV71 と結合するのみならず、EV71 の侵入および増殖にもかかわる機能的受容体であることが明らかとなった。

(4) 細胞株における PSGL-1 発現と EV71 増殖

各種細胞株を用い、PSGL-1 発現と EV71 増殖との関連を解析した。ヒト白血球由来細胞である Jurkat T 細胞、U937 細胞、MOLT-4 細胞において、PSGL-1 は高発現していた。これらの細胞での EV71 増殖が PSGL-1 依存的かどうかを解析するため、細胞と抗 PSGL-1 抗体とを反応後 EV71-1095 を感染させ、EV71 増殖を評価した。Jurkat T 細胞と U937 細胞では、抗 PSGL-1 抗体処理により EV71 増殖が阻害された。MOLT-4 細胞では顕著な EV71 増殖は認められなかったが、抗 PSGL-1 抗体処理により、感染細胞から回収されるウイルス力価が低下した。

一方、非白血球系細胞表面には、PSGL-1 はほとんど発現していなかった。RD 細胞 (多くの EV71 株が効率よく増殖し、顕著な CPE をおこす) は臨床検体からの EV71 分離に頻用されるにもかかわらず、EV71 増殖は抗 PSGL-1 抗体によって阻害されなかった。以上の結果から、非白血球系細胞では PSGL-1 非依存的に EV71 が増殖することが明らかとなった。

(5) PSGL-1 結合性による、EV71 の分類

EV71-1095 を含む代表的な分離株 8 株を用い、PSGL-1 結合および PSGL-1 依存的ウイルス増殖を検討した。まず、PSGL-1 結合性を解析するために、可溶性 PSGL-1-Fc キメラ蛋白質を用いた免疫沈降を行った。EV71-1095 を含む 5 株は共沈したが、02363 株、BrCr 株、Nagoya 株は共沈しなかった。したがって、EV71 分離株は、PSGL-1 結合株 (EV71-PB) および PSGL-1 非結合株 (EV71-non-PB) に分類できることが明らかとなった。

次に、Jurkat T 細胞における PSGL-1 依存的 EV71 増殖を検討した。EV71-PB 株 5 株は PSGL-1 依存的に増殖した。一方、EV71-non-PB 株のうち 2 株、02363 株と Nagoya 株は増殖し

たものの、その増殖は抗 PSGL-1 抗体で阻害されなかった。つまり、PSGL-1 非依存的に Jurkat T細胞で増殖した。また、EV71-non-PB である BrCr 株は、Jurkat T細胞において増殖しなかった。

(6) PSGL-1 T57 の O型糖鎖は、EV71 結合に不要

PSGL-1 を発現させた 293T 細胞 (293T/PSGL-1 細胞) を用い、可溶性 Pセレクトリン-FcあるいはEV71との結合をフローサイトメトリーで解析した。T57 をアラニンに置換したPSGL-1変異体には、Pセレクトリン-Fcは結合しなかったが、EV71-PBは結合した。PSGL-1 とともに FUT7 を発現させた場合、Pセレクトリン-Fc 結合細胞数は約 3 倍に増加したが、EV71-PB 結合細胞数は不変であった。PSGL-1 発現細胞をシアリダーゼで処理した場合、Pセレクトリン-Fc 結合細胞数は低下したが、EV71-PB 結合細胞数は不変であった。したがって、PSGL-1 T57 の O型糖鎖は、EV71-PB 結合に不要と考えられた。

(7) 硫酸化阻害剤による、PSGL-1 と EV71 の結合阻害

Sodium chlorate 存在下で培養した 293T/PSGL-1 細胞に対する EV71-PB 結合を、フローサイトメトリーで解析した。sodium chlorate は細胞表面での PSGL-1 発現には影響しなかった。しかし、sodium chlorate は細胞表面での硫酸化チロシン発現を低下させ、さらに EV71 結合も阻害した。したがって、硫酸化チロシンが EV71-PB 結合に重要であることが明らかとなった。

(8) PSGL-1 アミノ末端領域のチロシンが EV71-PB 結合に重要

PSGL-1 のチロシン (Y46, Y48, Y51) をフェニルアラニンに置換した変異体を 293T 細胞に発現させ、EV71 との結合を検討した。これらの PSGL-1 変異体ではチロシンの硫酸化が阻害されるとともに、EV71-PB 結合も低下した。したがって、これらのチロシンの硫酸化が EV71-PB 結合に必須であることが示唆された。

(9) 硫酸化阻害剤による EV71-PB 増殖阻害

PSGL-1 の硫酸化が EV71 の PSGL-1 依存的増殖に関与するかどうかを検討した。Jurkat 細胞を sodium chlorate 存在下で培養したところ、細胞表面の PSGL-1 発現は不変であった。しかし、Jurkat 細胞における EV71-PB の増殖は sodium chlorate 依存的に阻害された。また、CVA16 の増殖も阻害された。一方、EV71-nonPB の増殖は阻害されなかった。以上の結果より、Jurkat 細胞における EV71-PB と CVA16 の増殖には、硫酸化を受ける分子が関与することを明らかにした。

以上のように、EV71 が白血球に侵入する際

の受容体として PSGL-1 を同定した。この研究成果は学術雑誌 Nature Medicine に掲載され、さらに掲載誌巻頭のレビュー“News and Views”にも取り上げられた。

今後、PSGL-1 以外の EV71 受容体の同定、手足口病および EV71 が関連する他の疾患での細胞指向性や病態形成における PSGL-1 陽性白血球の役割の解明が期待される。

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)

1. Miyamura K., Nishimura Y., Abo M., Wakita T., Shimizu H. Adaptive mutations in the genomes of enterovirus 71 strains following infection of mouse cells expressing human P-selectin glycoprotein ligand-1. *J. Gen. Virol.* 92: 287-91, 2011 査読あり

2. Nishimura Y., Wakita T., Shimizu H. Tyrosine sulfation of the amino terminus of PSGL-1 is critical for enterovirus 71 infection. *PLoS Pathog.* 6: e1001174, 2010 査読あり

3. Nishimura Y., Shimojima M., Tano Y., Miyamura T., Wakita T., Shimizu H. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. *Nat. Med.* 15: 794-7, 2009 査読あり

4. 西村順裕、清水博之 エンテロウイルス 71 受容体としての P-selectin glycoprotein ligand-1 の同定. *ウイルス* 59: 195-204, 2009 査読なし

[学会発表] (計 9 件)

1. 西村順裕、脇田隆宇、清水博之: コクサッキーA16 型ウイルスの白血球系細胞株における増殖の解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月 8 日 徳島

2. Nishimura Y., Wakita T., Shimizu H: Tyrosine sulfation of the amino terminus of PSGL-1 is critical for enterovirus 71 infection. 16th Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses. 2010 年 9 月 12 日 St. Andrews, UK

3. 西村順裕、宮村達男、脇田隆宇、清水博之: エンテロウイルス 71 と PSGL-1 受容体との結合には PSGL-1 アミノ末端領域のチロシン硫酸化が重要である. 第 57 回日本ウイル

ス学会学術集会 2009 年 10 月 25 日 東京

4. 宮村紘平、西村順裕、安保雅博、脇田隆
字、清水博之：ヒト PSGL-1 発現マウス L929
細胞におけるエンテロウイルス 71 増殖とウ
イルス遺伝子変異の解析. 第 57 回日本ウイ
ルス学会学術集会 2009 年 10 月 26 日 東京

5. Nishimura Y., Shimojima M., Tano Y.,
Miyamura T., Wakita T., Shimizu H. Human
P-selectin glycoprotein ligand-1 is a
functional receptor for enterovirus 71
Gordon research conference (Viruses &
Cells) 2009 年 6 月 9 日 Lucca, Italy

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 順裕 (NISHIMURA YORIHRO)
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：00392316

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：