

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790449

研究課題名(和文) Saffoldウイルスの病原性解明を目指した感染受容体の探索研究

研究課題名(英文) The study on the pathogenicity of Saffold virus by means of the identification of the receptor for infection

研究代表者

姫田 敏樹 (HIMEDA, Toshiki)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80340008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒトから検出・分離されるが、未だ疾患との関係が明らかではないSaffoldウイルス(SAFV)の病原性を解明する目的で、感染に関わる受容体の同定を試みた。その結果、94遺伝子が感染受容体の候補として選出されたが、最終的な同定には至らなかった。しかし、受容体候補分子の選出過程で、SAFV感染受容体の発現は、細胞の培養条件に依存して変化することが明らかとなった。今後、本研究により見出されたこの特徴を最大限利用し、感染受容体の同定に結び付けたい。

研究成果の概要(英文)：The aim of the study is to identify the receptor for Saffold virus (SAFV) which is a novel human cardiovirus with unknown pathogenicity. Although 94 genes were selected as a candidate of the receptor for SAFV infection, the expression of those genes in the non-susceptible cells was unable to induce the infection of SAFV, suggesting that those genes may not be the receptor for SAFV infection. However, through the selection process, the virus binding assay demonstrated that the expression of the receptor for SAFV infection was changeable depending on the cell culture conditions. This phenomenon will be helpful to identify the receptor for SAFV infection.

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：感染受容体 Saffold virus

1. 研究開始当初の背景

ピコルナウイルス科カルジオウイルス属のウイルスは、げっ歯類にのみ感染すると考えられていたが、2007年にヒトに感染するカルジオウイルスとして初めて Saffold ウィルス (SAFV) が同定された。その後、腸管症状を呈した患者の便からの検出が相次いで報告され、さらに、日本では呼吸器症状や手足口病様症状を呈した疾患の咽頭ぬぐい液からの検出が報告されている。それに加えて申請者は、無菌性髄膜炎患者の髄液からの SAFV の分離を報告した。これらのことから SAFV は、同科エンテロウイルス属に属するコクサッキーウイルスやエンテロウイルス同様、稀に中枢神経症状を引き起こす病原体である可能性が示唆される。また、タイラーウイルス (TMEV) や脳心筋炎ウイルス (EMCV) を含むマウスカルジオウイルスが、脳炎や髄膜炎を起こすことから、SAFV と中枢神経疾患、さらには I 型糖尿病との関連も疑われる。しかし、SAFV 感染と疾患との因果関係は明らかではない。

感染受容体の同定は、トランスジェニックマウスの作出による新たな動物モデルの作出に不可欠な要素であり、動物モデルの樹立は、種々の組換えウイルスを用いた感染実験を可能にし、ウイルス学的なアプローチによる、より詳細な病原性解析を可能にする。また、感染受容体の組織特異的発現パターンを解析することからは、ウイルスの組織親和性が明らかになり、その病原性解明に重要な情報をもたらすことが期待される。しかし、SAFV 感染受容体に関する情報も未だ皆無である。

2. 研究の目的

SAFV はマウス細胞株に感染しないことから、実験動物を用いた病原性解析には、ポリオウイルスやエンテロウイルス等でも前例のある感染受容体のトランスジェニックマウスを用いた研究が不可欠である。しかし、現在のところ SAFV の感染受容体は全く不明である。そこで本研究では、SAFV 感染受容体を同定し、SAFV の病原性解明を加速させることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究開始までに申請者は、ウイルスが細胞に吸着した後、侵入・脱殻の過程を経てウイルスゲノムからのタンパク合成が始まると、細胞内で GFP を発現するキメラウイルスを作出し、さらに、SAFV 感受性ヒト由来細胞株と SAFV 非感受性ハムスター由来細胞株を同定した。この非感受性細胞は、ウイルスゲノムのトランスフェクトにより新たなウイルス粒子を産生することから、ウイルスの複製過程以降には影響がなく、それ以前、細胞への吸着および侵入の過程に感受性細胞との違いを持つ細胞であり、感染受容体の探索に有用であると考えられた。そこで、これ

らのキメラウイルスおよび細胞株を用いて以下の要領で SAFV の感染受容体を探索した。

(1) SAFV 感受性細胞 (HeLa 細胞) から cDNA ライブラリーを作製し、発現ベクターを用いて非感受性細胞 (BHK-21 細胞) に導入することで、SAFV 感染受容体を発現する細胞を含む細胞ライブラリーを作製した。この細胞ライブラリーに GFP を発現する SAFV を感染させて GFP の蛍光を観察し、SAFV 感染受容体を発現している細胞を選択した。ここで単離した 1 個の細胞から、Cell Direct cDNA 合成キット (Invitrogen) により 1st strand cDNA を合成し、cDNA ライブラリー作製時の末端配列を利用して PCR を行うことで、感染細胞に導入され、かつ、発現している cDNA をクローニングした。この様にして単離された SAFV 感染受容体 cDNA 候補群について、各々の cDNA を改めて発現ベクターにサブクローニングし、非感受性細胞にそれぞれを発現させることで、非感受性細胞であった細胞が SAFV 感受性を獲得するか否かを検証し、SAFV 感染受容体の同定を試みた。

(2) 上記(1)に代わる新たな方法として、HeLa 細胞の SAFV に対する感受性を変化させる培養方法を探索した。これらの細胞間における遺伝子発現の違いを、DNA マイクロアレイにより解析し、発現量に 2 倍以上の違いが見られ、かつ、膜タンパクと考えられる分子群を選択した。この方法で得られた遺伝子群について、各々を SAFV 非感受性細胞 (BHK-21) に導入して受容体遺伝子の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) SAFV 感受性 HeLa 細胞から作製した cDNA ライブラリーを、SAFV 非感受性 BHK-21 細胞に導入し、SAFV 感受性を獲得したと考えられる GFP 陽性細胞を数百個単離し、導入された感染受容体の候補分子として、beta-2 microglobulin をはじめとする 36 種の遺伝子を特定した。しかし、サブクローニングして行った個別の遺伝子の発現系による解析では、SAFV 感染を再現出来なかった。また、各候補因子に対する抗体を用いた感染のブロッキングアッセイにおいても、受容体であることは確認できなかった。1 細胞あたりに複数の遺伝子が導入されるため、この方法では、目的の遺伝子をクローニングできなかったことが原因のひとつとして考えられた。そこで、その欠点を補うために、網羅的解析を導入し、新たな解析を開始した。

(2) 上記に代わる新たな方法として HeLa 細胞の SAFV に対する感受性を変化させる培養方法を探索し、培養時に用いる血清 (FCS or CS) の違いにより、SAFV 感受性が可逆的に著しく変化することを見出した。さらに、SAFV 高感受性 HeLa 細胞と SAFV 低感受性

HeLa 細胞の間では SAFV の細胞表面への結合量に顕著な違いがみられることを明らかにした (Himeda et al. PLoS ONE 8(1):e53194) (下図)。

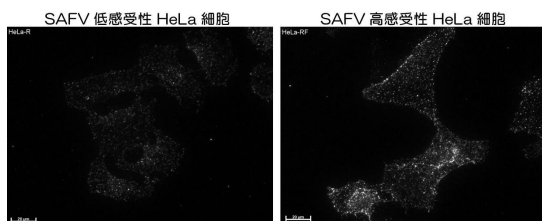


図. SAFV 吸着分子の差異
SAFV 吸着後、抗 SAFV 抗体で検出した。

この事実は、両細胞間における SAFV 感染受容体の発現に明らかな相違があることを示している。そこで、両細胞間における遺伝子発現の違いを、DNA マイクロアレイにより解析し、発現量に 2 倍以上の違いが見られ、かつ、膜タンパクと考えられる分子群 (58 遺伝子) を同定した。現在、これらの遺伝子を SAFV 非感受性細胞 (BHK-21) に導入して受容体遺伝子の同定を試みているが、まだ同定には至っていない。

また、ポリオウイルスおよびエンテロウイルスの感染受容体同定に成功している小池智先生 (東京都医学総合研究所) から、cDNA からのアプローチでは、プロモーターの違いによる発現の不確実さや、完全長 cDNA 作製の困難さなどが問題となりやすいとの助言を頂き、現在、genomic DNA からのスクリーニングを並行して実施しているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Shimizu A, Himeda T, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y. Role(s) of Leader protein of Saffold virus. *J. Clinic. Exp. Neuroimmunol.* Article first published online (2014) 査読有 DOI: 10.1111/cen3.12109
2. Himeda T, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y. Possibility of neuropathogenesis of Saffold virus suggested from the in vitro virus persistence. *J. Clinic. Exp. Neuroimmunol.* 4:163 - 164 (2013) 査読有 DOI: 10.1111/cen3.12033
3. Himeda T, Hosomi T, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y. Saffold virus type 3 (SAFV-3) persists in HeLa cells. *PLoS One.* 8(1):e53194 (2013) 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0053194
4. 大原義朗, 姫田敏樹. 新しいピコルナウイルス感染症 - ヒトカルジオウイルスを中心に -. *小児感染免疫* 25: 446-451 (2013) 査読有

<http://www.jspid.jp/journal/full/02504/025040446.pdf>

5. Himeda T, Ohara Y. Saffold virus, a novel human cardiovirus with unknown pathogenicity. *J. Virol.* 86: 1292-1296 (2012) 査読有 DOI: 10.1128/JVI.06087-11

〔学会発表〕(計 24 件)

1. 姫田敏樹, 大桑孝子, 村木靖, 大原義朗 Saffold ウイルス (SAFV) Leader 蛋白の IFN 産生抑制能の解析 第 25 回日本神経免疫学会 2013 年 11 月 27 日 ~ 29 日 (海峡メッセ、下関市)
2. 姫田敏樹 カルジオウイルスの神経病原性 ~ Theiler ウイルスとの比較から考える Saffold ウイルスの病原性 ~ 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (シンポジウム) 2013 年 11 月 10 日 ~ 12 日 (神戸国際会議場、神戸市)
3. 姫田敏樹, 大桑孝子, 村木靖, 大原義朗 Saffold ウイルスの in vitro における持続感染機序の解明 第 50 回細菌学会中部支部会 2013 年 10 月 18 日 ~ 19 日 (ホテル竹島、蒲郡市)
4. 大原義朗, 姫田敏樹, 大桑孝子, 村木靖, 西山修平, 高橋利幸, 藤盛寿一, 三須建郎, 中島一郎, 藤原一男, 糸山泰人, 青木正志, 石崎義人, 原寿郎, 中村龍文 Saffold ウイルスの持続感染と神経病原性の可能性 第 18 回日本神経感染症学会 2013 年 10 月 11 日 ~ 12 日 (シーガイアコンベンションセンター、宮崎市)
5. 姫田敏樹, 大桑孝子, 村木靖, 大原義朗 小児下痢症から分離される "Saffold virus" の病原性解析 ~ 持続感染機序の解明と Saffold virus 陽性となった剖検例の考察 ~ 平成 25 年度 北陸腸内細菌研究会 2013 年 7 月 13 日 (福井県国際交流会館、福井市)
6. 姫田敏樹, 大桑孝子, 村木靖, 大原義朗 In vitro における Saffold ウイルスの持続感染 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 2012 年 11 月 13 日 ~ 15 日 (大阪国際会議場、大阪府)
7. 姫田敏樹, 大桑孝子, 村木靖, 大原義朗 ヒトカルジオウイルスの in vitro における持続感染 第 49 回細菌学会中部支部会 2012 年 11 月 9 日 ~ 10 日 (金沢大学十全講堂、金沢市)
8. 大原義朗, 姫田敏樹, 大桑孝子, 村木靖, 西山修平, 高橋利幸, 藤盛寿一, 三須建郎, 中島一郎, 藤原一男, 糸山泰人, 青木正志,

石崎義人、原寿郎、中村龍文 Saffold virus
感染と神経疾患の関係 第 17 回日本神経
感染症学会 2012 年 10 月 19 日～20 日
(ホテルルビノ京都堀川、京都府)

9. 姫田敏樹、大桑孝子、村木靖、大原義朗 カ
ルジオウイルスの持続感染と IFN 応答
第 24 回日本神経免疫学会 2012 年 9 月 20
日～21 日 (軽井沢プリンスホテルウエ
スト、軽井沢)
10. Himeda T, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y.
Persistent infection of SAFV-3 in vitro. 第 16
回日本神経ウイルス研究会 2012 年 8 月
30 日～31 日 (国立感染症研究所、東京)
11. Himeda T, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y.
Reverse genetics of Saffold virus. The 17th in
a series of biennial meetings of the European
Study Group on Molecular Biology of
Picornaviruses (Europic2012). 2012 年 6 月
3 日～7 日 (Saint-Raphaël, France)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kanazawa-med.ac.jp/~microbio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

姫田 敏樹 (HIMEDA, Toshiki)
金沢医科大学 医学部・准教授
研究者番号：80340008