

厚生労働省科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
「エンテロウイルス感染症制御のための診断・予防治療に関する国際連携研究」
分担研究報告書

ヒト白血球/ヒト化マウスを用いたエンテロウイルス71感染モデルの作製に関する研究

分担研究者 小柳 義夫 京都大学ウイルス研究所 教授

共同研究者 佐藤 佳 京都大学ウイルス研究所 助教

研究要旨

腸管ウイルスである病原性エンテロウイルス71(EV71)の複数の分離株の細胞表面受容体は、ヒト白血球に高発現する分子PSGL-1であると2009年に報告された。EV71は消化管内で増殖するウイルスとして知られるが、この結果より生体内での効率的なウイルス増殖の際には白血球が主な複製の場となっている可能性が考えられる。そこで本研究では、EV71の生体内における細胞指向性を明らかにすることを目的として、ヒト白血球初代培養系およびヒト化マウス実験系を用いたEV71感染実験を行った。その結果、EV71は試みたヒト白血球を使った実験では効率的な複製が得られないことがわかった。このことから、EV71はヒト白血球への感染を獲得していない、または、きわめて微弱である可能性、あるいは、ヒト白血球において強力な抗EV71応答が惹起されている可能性が考えられた。

A. 研究目的

エンテロウイルス71 (Enterovirus 71, 以下EV71と略)はピコルナウイルス科に属する一本鎖RNAウイルスであり、手足口病やヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎・脳炎の原因ウイルスである。EV71は主として糞口感染し、腸管をはじめとする消化管内で増殖する。しかしながら、生体内において、EV71がどのような細胞指向性を有し、どの細胞で感染増殖するのか、そして、それらがどのように病原性発現に関与するのか、不明な点が多い。

2009年西村らにより、(i) 複数のEV71分離株はP-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1)分子を細胞表面受容体として感染、増殖する(PSGL-1依存的EV71:PB株と略)ことと、(ii) PSGL-1はヒト白血球で高発現していることが報告された(Nishimura et al, Nat Med, 2009)。

興味深いことに、麻疹ウイルス(MV)は、主として呼吸器系を介して感染し、病原性を発現するウイルスであるが、Signaling lymphocyte activation molecule/CD150 (SLAM/CD150)という白血球に高発現する表面受容体分子を介し

て白血球に感染することで、生体内での効率的な複製を行っていることが知られている。そこで、EV71もMVと同様、ヒト白血球をウイルスのamplifierとして用いている可能性が疑われる。PSGL-1分子を介したEV71の感染はヒト細胞に特異的であり、マウスなど他種のPSGL-1分子は受容体として使用できない(Nishimura et al, Nat Med, 2009)。そこで、ヒト白血球細胞培養系、および、ヒト白血球を有するマウスである"ヒト化マウス(NOG-hCD34マウス)"を用いた実験系を確立し、EV71のヒト白血球における増殖機構の解明を目的として、以下の実験を行った。

B. 研究方法(倫理面への配慮)

1) ヒト末梢血単核球(PBMCs)、ヒト臍帯血単核球(CBMCs)培養

ヒト末梢血、および、ヒト臍帯血を、Ficoll液を用いた密度勾配遠心により分離し、buffy coatを回収することでPBMCsを得た。また、PBMCsあるいはCBMCs中のT細胞を活性化さ

せるために、phytohemagglutinin (PHA)あるいは抗CD3/抗CD28抗体ビーズを適宜添加し、10%胎仔ウシ血清 (FCS)含 RPMI1640にて2-3日間培養した。

2) その他の細胞培養

ヒト横紋筋肉腫由来のRD細胞は、10%FCS含 DMEMにて培養した。

3) EV71感染実験

EV71 1095株 (PB株), SK-EV006株 (PB株), Nagoya株 (non-PB株), 02363株 (non-PB株)のウイルス液は、RD細胞に感染させ、感染後1週間の細胞培養上清を回収することにより得た。作製したEV71は、RD細胞を用いた限外希釈法によりタイトレーションを行い、cell culture infective dose 50% (CCID50)として算出した。

EV71感染実験は、ウイルス液を感染標的細胞に暴露し、CO2インキュベーターで37°C1時間恒温放置することにより行った。感染後の細胞は10%FCS含 RPMI1640で2度洗浄し、CO2インキュベーターで培養し、細胞培養上清を適宜回収し、細胞培養上清中の感染性EV71量を、上述の方法により定量した。

4) Flow cytometry

ヒトPSGL-1分子の細胞質膜上の発現レベルを解析するために、抗ヒトPSGL-1抗体と、抗CD3抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗CD19抗体、抗CD14抗体、抗CD303抗体を適宜組み合わせ、FACSCalibur (BD biosciences)を用いて解析を行った。

5) ヒト化マウス

生後2日以内の胎仔NOGマウス (実験動物中央研究所より分与) に放射線を0.1 Gy照射後、ヒト臍帯血より分取したヒトCD34陽性造血幹細胞を肝臓へ移入した (Virology 394:64-72, 2009)。8-10週間specific pathogen-free (SPF)環境下で飼育し、ヒト白血球を生体内に有するヒト化マウスを得た。

6) (倫理面への配慮)

動物実験の施行にあたり本学実験動物委員会から動物愛護上の配慮ならびに感染実験の

適切な施行を行うように指導を受けた。すべての実験は本委員会より承認されている。また、臍帯血採取にあたり供血妊婦より同意 (インフォームド・コンセント) を得るとともに本学倫理委員会より承認を得ている。

C. 研究結果

1) ヒト白血球細胞質膜上におけるPSGL-1発現

ヒト白血球表面のPSGL-1発現をflow cytometry法により解析した結果、主としてヒトCD3陽性CD4陽性ならびにCD3陽性CD8陽性T細胞の両画分において比較的高レベルのPSGL-1発現が確認された (図a)。一方、ヒトCD19陽性B細胞画分においては、PSGL-1の発現は比較的低レベルであった (図a)。

2) ヒト白血球初代培養系におけるEV71増殖

i) PHA刺激有無のPBMCsに、EV71 SK-EV006株 (PB株)をmultiplicity of infection (MOI)10で接種し、細胞培養上清中の感染性EV71量を経時的に測定した。その結果、PHA刺激の有無によらず有意な1095株の感染は確認されなかった (図b)。

ii) 抗CD3/抗CD28抗体ビーズ添加を行った、あるいは、添加しなかったCBMCsに、EV71 1095株 (PB株)、および、Nagoya株 (non-PB株)をMOI20で接種し、細胞培養上清中の感染性EV71量を経時的に測定した。その結果、抗CD3/抗CD28抗体刺激の有無によらず、1095株の増殖は確認されなかった。一方、感染後3日目において、抗CD3/抗CD28抗体刺激の有無によらず、微量ながらNagoya株の増殖が確認された (図c)。

iii) 分離直後のCBMCsに、EV71 1095株 (PB株), SK-EV006株 (PB株), Nagoya株 (non-PB株), 02363株 (non-PB株)をそれぞれMOI10で接種し、10%FCSのみで維持培養した細胞の培養上清中の感染性EV71量を経時的に測定した。その結果、1095株, SK-EV006株, 02363株の有意な感染は確認されなかった (図d)。一方、感染後1-2

日目において、微量ながらNagoya株の増殖が確認された (図d右上)。

3) ヒト化マウスへのEV71接種実験

ヒトCD34陽性細胞を移植後8-10週齢のヒト化マウスに、EV71 SK-EV006株 (PB株), Nagoya株 (non-PB株)をそれぞれ 1×10^7 CCID50/mouseで尾静脈接種した。その後、半年以上SPF環境で飼育したが、顕著な病変は確認されなかった (結果示さず)。

D. 考察

ヒト白血球では高レベルのPSGL-1が発現していたが、EV71 PB株の増殖はほとんど確認できなかった。ヒト白血球でEV71 PB株がほとんど増殖しない点について以下に考察を行う。

i) インターフェロン (IFN)応答の可能性

EV71接種により、ヒト白血球において抗EV71応答が惹起されている可能性が疑われる。その抗ウイルス物質として、I型IFNが想定される。実際、EV71と同じピコルナウイルス科に分類されるポリオウイルス (PV) の感染では、type I IFNにより排除されることが報告されている (Yoshikawa et al, *J Virol*, 2006)。そのセンサー分子として、RIG-I-like receptorファミリーのひとつであるMDA5の関与が示唆されている。実際、脳心筋炎ウイルス (EMCV)をはじめとしたピコルナウイルスは、MDA5を介して認識され、I型IFN応答が誘導されることが知られている。また、PVもMDA5により認識されることが報告されている (Barral et al, *J Virol*, 2007)。EV71もこのMDA5依存的経路で認識され、排除されていることが強く示唆されるが、これについての報告/証明はいまだなされていない。

(ii) ヒト白血球PSGL-1分子の硫酸化修飾

最近、PSGL-1分子を介したEV71 PB株の感染の際には、PSGL-1が硫酸化修飾されていることが必須であると報告された (Nishimura et al, *PLoS Pathog*, 2010)。本研究結果より、ヒトの生体内の白血球、特にヒトT細胞が高レベルのPSGL-1を発現していることが明らかとなった

が、その硫酸化修飾レベルについては不明である (なお、ヒトT細胞株のひとつであるMolt-4細胞では、PSGL-1が発現しているにも関わらず増幅しない (Nishimura et al, *Nat Med*, 2009)。EV71のヒト白血球における増殖能の検討には、ヒト白血球に発現するPSGL-1分子の硫酸化レベルを測定することが必要と考える。

E. 結論

ヒト白血球では高レベルのPSGL-1が発現していたが、EV71 PB株の増殖はほとんど確認できなかった。また、EV71接種ヒト化マウスは、病変を示さなかった。以上の結果から、ヒト白血球および生体内においては、EV71はヒト白血球感染性を獲得していない可能性、あるいは、ヒト白血球において強力な抗EV71応答が惹起されている可能性が疑われた。

F. 健康危険情報

EV71 感染実験、ウイルスの保管は全て京都大学ウイルス研究所で定める感染微生物取り扱い安全管理委員会、動物委員会、組換えDNA委員会の規定に基づき、すべてP3実験施設で行われた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sato K, Nie C, Misawa N, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y. Dynamics of memory and naive CD8+ T lymphocytes in humanized NOD/SCID/IL-2R γ null mice infected with CCR5-tropic HIV-1. *Vaccine*, 28S2:B32-37, 2010
- 2) Sato K, Izumi T, Misawa N, Kobayashi T, Yamashita Y, Ohmichi M, Ito M, Takaori-Kondo A, Koyanagi Y. Remarkable lethal G-to-A mutations in vif-proficient HIV-1 provirus by individual APOBEC3 proteins in humanized mice. *J. Virol.* 84:9546-9556,

2010

- 3) 佐藤 佳、小柳義夫 HIV-1 のウイルス-宿主相互作用と新規治療薬の開発 実験医学 28, 2961-2968, 2010

2. 学会発表

- 1) Sato K, and Koyanagi Y. A novel HIV-1 infection model using humanized mice, 1st international young investigator symposium, Kumamoto, Japan, 2010
- 2) Sato K, Izumi T, Misawa N, Ito M, Takaori-Kondo A, Koyanagi Y. Evidence for HIV-1 G-to-A hypermutation in vivo by APOBEC3 proteins. Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2010
- 3) Sato K. A novel animal model for active EBV infection in humanized mice, The 16th East Asia Joint Conference on Biomedical Research, Taipei, Taiwan, 2010
- 4) Sato K, Misawa N, Nie C, Satou Y, Matsuoka M, Ito M, Koyanagi Y. Investigation of HIV-1 pathogenesis in humanized mice. 14th International Congress of Immunology, Kobe, 2010
- 5) Iwami S, Sato K, Misawa N, Kobayashi T, Rob J. de Boer, and Koyanagi Y. DNA labeling system by peripheral blood of humanized mouse, the 2nd synthetic immunology workshop, Kyoto, Japan, 2010.
- 6) Sato K, Izumi T, Misawa N, Kobayashi T, Ito M, Takaori-Kondo A, and Koyanagi Y. G-to-A mutations in HIV-1 provirus by APOBEC3 proteins contribute to abrogation of virus replication in humanized mice, 第10回あわじしま感染症・免疫フォーラム, 淡路島, 2010
- 7) 佐藤佳, 岩見真吾, 三沢尚子, 伊藤守, 小柳義夫. ヒト化マウス末梢血による DNA ラベリング系の確立 -動物実験-, 第20回日本数理生物学会大会, 札幌, 2010.
- 8) 岩見真吾, 佐藤佳, Rob J. de Boer, 小柳義夫. ヒト化マウス末梢血による DNA ラベリング系の確立 -数理モデル-, 第20回日本数理生物学会大会, 札幌, 2010

- 9) 佐藤佳, 三沢尚子, Chuanyi Nie, 佐藤賢文, 松岡雅雄, 高橋玲, 伊藤守, 高田賢蔵, 小柳義夫. ヒト化マウスを用いた EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症モデルマウスの確立, 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島, 2010

- 10) Sato K, Koyanagi Y, Remarkable and lethal G-to-A mutations in wild-type HIV-1 provirus by individual APOBEC3 proteins in infected humanized mice model. 第 24 回日本エイズ学会学術集会、東京、2010

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

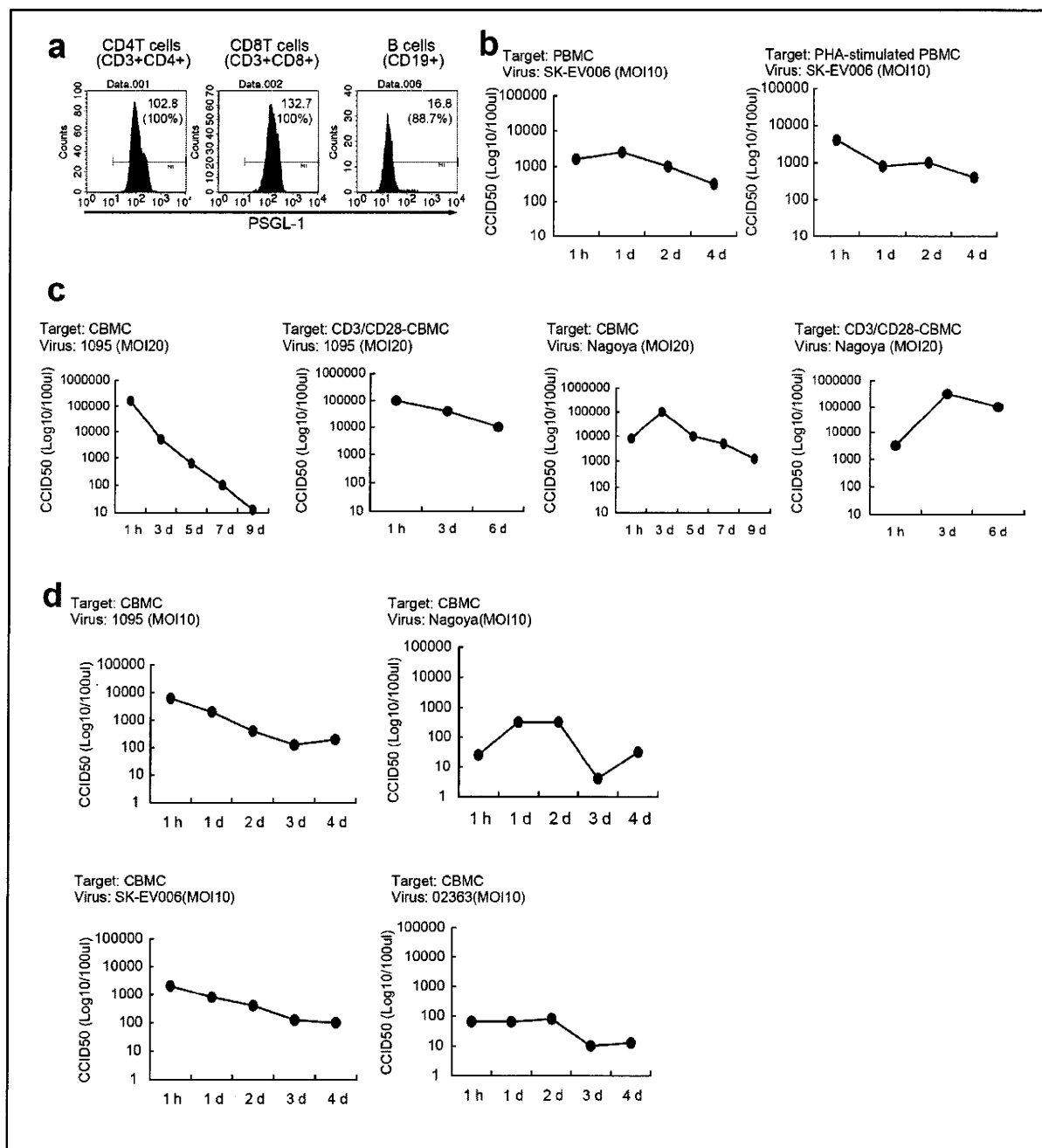


図. ヒト白血球表面上におけるPSGL-1の発現とEV71の感染増殖

(a) Flow cytometryによるヒト白血球表面上におけるPSGL-1の発現解析. (b) PHA刺激/非刺激PBMCへのEV71の感染性. (c) CD3/CD28活性化ならびに非活性化CBMCへのEV71の感染性. (d) 単離直後のCBMCへのEV71の感染性.

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

研究報告書

エンテロウイルス 71 と PSGL-1 受容体との結合における
PSGL-1 チロシン硫酸化の解析

研究分担者 西村順裕 国立感染症研究所 主任研究官

エンテロウイルス 71 (EV71) は、小児の発熱性疾患である手足口病の主要な原因ウイルスである。一般に手足口病の症状は軽く、予後も良好である。しかしながら、EV71 は時として重篤な中枢神経疾患を起こす。EV71 感染の分子機構には不明な部分が多く、EV71 が細胞に感染する際に使用する受容体も長年にわたり未知であった。近年我々は EV71 受容体として、P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) を同定した。PSGL-1 は白血球表面に発現するシアロムチンファミリー蛋白質であり、初期炎症反応に重要な分子である。

EV71 はヒト PSGL-1 のアミノ末端領域に結合する。この領域には、PSGL-1 と本来のリガンドとの結合に重要な翻訳後修飾（チロシン硫酸化と O 型糖鎖付加）が起こる。これらの翻訳後修飾と EV71 との相互作用を詳細に解析し、チロシン硫酸化が EV71 との結合に必須であることを明らかにした。PSGL-1 のチロシン硫酸化に依存する EV71 感染機構の解析は、手足口病や中枢神経疾患等、EV71 感染症の病原性発現の分子的基盤の解明に役立つことが期待される。

A. 研究目的

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る。遺伝学的に近縁な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。その後中国では毎年 EV71 が大流行し、数百人の死亡例が報告されている。また 2010 年には国内においても EV71 による手足口病が流行した。幸いにも我が国で

は重症例の大規模な発生は認められていないが、散発的には報告されている。

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的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 と同じエンテロウイルス属に分類されるポリオウイルスでは、受容体の同定後、ヒトポリオウイルスレセプター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。またヒトポリオウイルスレセプター発現マウス L929 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。EV71 や CVA16 を含む A 群ヒトエンテロウイルスの受容体は長年未知であったが、2009 年に 2 種類の全く異なる受容体が同定された。一つは我々が Jurkat 細胞から同定した P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1)、もう一つは小池らが RD 細胞から同定した Scavenger receptor class B, member 2 (SCARB2) である。これらの分子はそれぞれ全く異なるファミリーに属すにもかかわらず、ともに EV71 の受容体として機能する。

PSGL-1 はシアロムチンファミリー

膜蛋白質であり、主に骨髄系・リンパ球系細胞および血小板に発現する。

PSGL-1 のアミノ末端領域は細胞外に位置し、セレクチンやケモカインと相互作用する。この相互作用は、炎症初期過程における白血球の遊走・接着・浸潤に重要である。PSGL-1 と P セレクチンの相互作用には、PSGL-1 のチロシン (Y46、Y48、Y51) の硫酸化に加え、トレオニン (T57) の O 型糖鎖付加が重要である。一方、PSGL-1 とケモカイン CCL27 の相互作用には、チロシンの硫酸化のみが必須である。

EV71 分離株には PSGL-1 結合性 EV71 (PSGL-1-binding EV71; EV71-PB) と PSGL-1 非結合性 EV71 (PSGL-1-nonbinding EV71; EV71-nonPB) がある。本研究では、EV71-PB と PSGL-1 との相互作用における、PSGL-1 翻訳後修飾の役割を詳細に解析した。EV71-PB 結合にはチロシン硫酸化が必須であり、O 型糖鎖付加は不要であることを明らかにした。

B. 研究方法

1. 細胞

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

2. ウイルス

EV71-PB 株 (SK-EV006, C7/Osaka, KED005, 1095, 75-Yamagata) および EV71-nonPB 株 (Nagoya, 02363) を用いた。また、CVA16 のプロトタイプ株である G-10 株を用いた。

3. 抗体

抗 EV71 抗体 MA105、抗 PSGL-1 抗体 KPL1 および PL2、抗硫酸化チロシン抗体 Sulfo-1C-A2、抗シアリルルイス x 抗体 CSLEX1 を用いた。

4. 発現プラスミド

ヒト PSGL-1 発現プラスミドを基に、アミノ末端領域にアミノ酸変異を導入した発現プラスミドを作製した。また、シアリルルイス x 合成に関与する酵素 FUT7 の発現プラスミドを作製した。

5. 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。

6. シアリダーゼ処理

細胞 (2.5×10^6) を 50 mU/ml, 500 μ l のシアリダーゼで 1 h、37°C 処理し、フローサイトメトリー解析に用いた。

7. ウイルス感染実験

Jurkat 細胞 (4×10^4) を 1 CCID₅₀/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。

C. 結果

1. 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 セレクチン-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 セレクチン-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 セレクチン-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 セレクチン-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。

2. 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。

3. 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。

4. 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。

D. 考察

PSGL-1 はチロシン硫酸化を受けられる分子として、最も詳細に研究されている分子である。特に PSGL-1 の硫酸化チロシン・O 型糖鎖とセレクチンの相互作用については、結晶構造解析を含め詳細に解析されている。P セレクチンとの相互作用には Y48 と Y51 の硫酸化チロシンと T57 の O 型糖鎖が鍵である。L セレクチンとの結合には、Y46 と Y48 の硫酸化チロシンとシアリルルイス x をもつ T57 の O 型糖鎖が重要である。E セレクチンとの結合には硫酸化チロシンは関与せず、シアリルルイス x をもつ T57 の O 型糖鎖のみが相互作用する。本研究では、PSGL-1 と EV71-PB との結合には特に Y48 と Y51 の硫酸化チロシンが重要であることを明らかにした。T57 の O 型糖鎖やシアリルルイス x は EV71-PB との結合に不要であった。以上のように、EV71 と P セレクチンは、PSGL-1 結合において異なる様式をとることを解明した。

腸管由来 DLD-1 細胞においては、シアル化グリカンが EV71 の受容体として機能するという報告がある。本研究において、PSGL-1 T57 のシアリルルイス x は EV71 結合に関与しないことが明らかとなったが、シアル化を受けた受容体の関与は細胞によって異なるのかもしれない。

PSGL-1 のリガンドの一つに、皮膚

に関連したケモカインである CCL27 が知られている。PSGL-1 は、P セレクチンを介し炎症を起こした皮膚への白血球の移動に関与するのみならず、CCL27 と相互作用し、皮膚にホーミングする T 細胞を制御する。一方、EV71 や CVA16 による手足口病では、手足の皮膚・口の粘膜に特徴的な発疹が生じる。この発疹発症のメカニズムは明らかになっていないが、EV71-PB と PSGL-1 陽性細胞（皮膚にホーミングする T 細胞や、皮膚ランゲルハンス細胞）との相互作用が関与しているのかもしれない。また、PSGL-1 のアミノ末端チロシンの硫酸化レベルにより、EV71 の感染性が制御されている可能性もある。

硫酸化チロシンがウイルス受容体において重要な役割をなす例は、現在までにヒト免疫不全ウイルスとケモカインレセプターCCR5 においてのみ報告されている。CCR5 のアミノ末端領域にも硫酸化を受けるチロシンがあり、この硫酸化がヒト免疫不全ウイルス感染に重要である。PSGL-1 は、硫酸化チロシンの重要性が明らかとなった、第二番目のウイルス受容体である。

近年、EV71 は中国・アジアにて猛威をふるっているが、ワクチンや抗ウイルス薬は開発されていない。本研究成果は、EV71 と PSGL-1 の相互作用

をターゲットとした新規抗ウイルス薬の開発へ役立つと思われる。PSGL-1 のチロシン硫酸化がウイルス増殖に必須であることが明らかとなったので、チロシン硫酸化阻害薬を抗ウイルス薬として利用できる可能性もある。

E. 結論

EV71-PB と PSGL-1 の結合には、PSGL-1 アミノ末端領域の硫酸化チロシンが重要であり、O 型糖鎖は不要であることを明らかにした。PSGL-1 のチロシン硫酸化に依存する EV71 感染機構の解析は、手足口病や中枢神経疾患等、EV71 感染症の病原性発現の分子の基盤の解明に役立つことが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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
2. 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

2. 学会発表

1) 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. St. Andrews, UK、2010
年 9 月

2) 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. 徳島市、 2010
年 11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Human enterovirus A 臨床分離株を用いた L-SCARB2 細胞感染実験

研究協力者	飯塚 節子	島根県保健環境科学研究所
研究分担者	小池 智	東京都臨床医学総合研究所

研究要旨

エンテロウイルス 71 (EV71) 特異的受容体発現細胞 (L-SCARB2 細胞) の Human enterovirusA (HEV-A) に対する感受性を調べる目的で、EV71、コクサッキーウイルス A12 (CVA12)、CVA14 の臨床分離株を細胞に接種したところ、EV71 および CVA14 はすべての株で細胞変性効果 (CPE) が認められ感染が成立したが、CVA12 は感染しなかった。さらに、EV71 は株によって感染効率が悪い株が存在した。

A. 研究目的

東アジア地域では 1990 年代後半から多数の小児急性死亡例を伴う EV71 による手足口病の大規模な流行が発生し、公衆衛生上の脅威となっている。日本では重症 EV71 感染症の大規模な流行は認められていないが、EV71 流行時には散発的な重症例、死亡例が報告されており、重症エンテロウイルス感染症の大規模流行のリスクが常に存在し、迅速かつ正確な検査が望まれている。

小池らは EV71 受容体の一つである scavenger receptorB2 (SCARB2) 遺伝子の導入によって EV71 感受性を獲得したマウス L929 細胞 (L-SCARB2 細胞) を樹立し、いくつかの EV71 分離株で感染が成立するこ

とを明らかにした (小池智, ウイルス 59 : 189-194, 2009)。本研究では L-SCARB2 細胞の感受性を明らかにすることを目的に、EV71 臨床分離株および EV71 と同じ HEV-A に属するウイルスの臨床分離株で感染が成立するかどうかを検討した。

B. 研究方法

1. 材料

島根県感染症発生動向調査事業の一環として、病原体定点においてウイルス感染症を疑い、採取された発症初期の検体から Vero 細胞あるいは哺乳マウスを用いて分離し、-20℃保存していた EV71 32 株、CVA12 8 株、CVA14 14 株を使用した。分離株の分離年、分離場所、患者の病態等は表 1 のとおりである。

2. 方法

L-SCARB2 細胞、遺伝子導入前の親株である L929 細胞、SCARB2 遺伝子の由来元である RD 細胞をそれぞれ 24well マルチプレートにまき、37°C、5%CO₂ の条件下で 3 日間培養した。細胞にウイルス原液を 10 倍希釈したウイルス液 50 μl/well 接種し、CPE の出現を 1 週間観察した。CPE の程度は以下の基準で判定した。+++ : well 全体に CPE がみられ、ほぼすべての細胞が剥がれている状態、++ : well 全体に CPE がみられるが、貼りついている細胞が多数みられる状態、+ : well の一部分で CPE が観察されるが、全体には広がっていない状態、- : 未接種の細胞と同様な状態+++とならなかった場合はウイルス原液を 25 μl/well 接種し、CPE の出現を 1 週間観察した。

EV71 分離株については各年の株 1、2 株を 10 倍段階希釈した液 50 μl を L-SCARB2 細胞と RD 細胞に接種、CPE の出現を 1 週間観察した。

なお、実験に用いた L-SCARB2 細胞、L929 細胞、RD 細胞は分担研究者の小池より分与された。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. EV71(表 2)

すべての分離株が L-SCARB2 細胞と RD 細胞に感染し CPE が出現したが、L929 細胞では CPE は認められなかった。

CPE の程度を RD 細胞と比較すると、

L-SCARB2 細胞での CPE が弱い株が認められ、分離年によっていた。

分離株の希釈液を接種した実験では L-SCARB2 細胞での CPE が弱い株は CPE の出現に RD 細胞より 100~1000 倍力価の高いウイルス液が必要であった(表 3)。

2. CVA12 (表 4)

すべての株が RD 細胞には感染したが、L-SCARB2 細胞と L929 細胞には感染しなかった。

3. CVA14(表 5)

すべての分離株が L-SCARB2 細胞と RD 細胞に感染し CPE が出現したが、L929 細胞では CPE は認められなかった。

D. 考察

2000 年以降に臨床検体から分離した EV71 32 株すべてが L-SCARB2 細胞で CPE を示し感染した。分離株によって CPE に強弱が観察されたが、分離した患者の病態ではなく、分離年と相関が認められた。CPE が弱い株は L-SCARB2 細胞での感染の成立に RD 細胞に比べより高い力価のウイルスが必要であり、感染効率が悪いことが示唆された。

CVA14 の L-SCARB2 細胞での感受性については標準株では L929 細胞にも感染することが明らかになっているが(小池智, ウイルス 59 : 189-194, 2009)、臨床分離株は標準株と異なり、株由来患者の病態によらずすべての株が L-SCARB2 細胞には感染するが L929 細胞には感染しないことが明らかとなった。

今後は EV71 臨床分離株間の感染効率の違いが何によるのか明らかにしたい。また、L-SCARB2 細胞を用いて臨床検体か

らの EV71、CVA14 の分離・同定を試みる
予定である。

E. 結論

L-SCARB2 細胞は EV71 および CVA14 の臨
床分離株に感受性であることが明らかと
なった。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

表1. 感染実験株一覧

Strain	Place (city)	Year	Month	Clinical diagnosis or outcome
EV71 1945-Shimane-00	Izumo city	2000	August	HFMD
EV71 1958-Shimane-00	Matsue city	2000	August	HFMD
EV71 2193-Shimane-00	Hamada city	2000	August	HFMD
EV71 2326-Shimane-00	Matsue city	2000	September	Meningitis
EV71 2906-Shimane-00	Izumo city	2000	December	HFMD
EV71 110-Shimane-01	Izumo city	2001	January	HFMD
EV71 111-Shimane-01	Izumo city	2001	January	HFMD
EV71 1365-Shimane-03	Matsue city	2003	June	HFMD
EV71 1440-Shimane-03	Hamada city	2003	June	HFMD
EV71 1573-Shimane-03	Matsue city	2003	July	HFMD
EV71 1647-Shimane-03	Matsue city	2003	August	Meningitis
EV71 1902-Shimane-03	Izumo city	2003	September	HFMD
EV71 1970-Shimane-03	Hamada city	2003	September	HFMD
EV71 773-Shimane-06	Hamada city	2006	October	HFMD
EV71 774-Shimane-06	Hamada city	2006	October	HFMD
EV71 778-Shimane-06	Izumo city	2006	October	Gastroenteritis
EV71 817-Shimane-06	Izumo city	2006	November	Meningitis
EV71 842-Shimane-06	Izumo city	2006	November	HFMD
EV71 858-Shimane-06	Izumo city	2006	November	HFMD
EV71 523-Shimane-07	Izumo city	2007	July	HFMD
EV71 567-Shimane-07	Izumo city	2007	July	HFMD
EV71 569-Shimane-07	Izumo city	2007	July	HFMD
EV71 692-Shimane-09	Izumo city	2009	July	HFMD
EV71 720-Shimane-09	Matsue city	2009	August	HFMD
EV71 788-Shimane-09	Hamada city	2009	September	HFMD
EV71 35-Shimane-10	Matsue city	2010	January	HFMD
EV71 129-Shimane-10	Hamada city	2010	March	HFMD
EV71 260-Shimane-10	Matsue city	2010	May	HFMD
EV71 324-Shimane-10	Hamada city	2010	June	HFMD
EV71 333-Shimane-10	Matsue city	2010	July	HFMD
EV71 393-Shimane-10	Matsue city	2010	August	Meningitis
EV71 418-Shimane-10	Izumo city	2010	August	Myocarditis
CVA12 1917-Shimane-02	Matsue city	2002	September	Herpangina
CVA12 1918-Shimane-02	Matsue city	2002	September	Pharyngitis
CVA12 1141-Shimane-03	Matsue city	2003	May	Herpangina
CVA12 1198-Shimane-03	Matsue city	2003	May	Pharyngitis
CVA12 1315-Shimane-03	Matsue city	2003	June	Herpangina
CVA12 1317-Shimane-03	Matsue city	2003	June	Pharyngitis
CVA12 1443-Shimane-03	Hamada city	2003	June	Herpangina
CVA12 912-Shimane-05	Hamada city	2005	October	Pharyngitis
CVA14 1060-shimane-85	Matsue city	1985	July	HFMD
CVA14 1061-shimane-85	Matsue city	1985	July	HFMD
CVA14 1634-shimane-85	Matsue city	1985	November	HFMD
CVA14 2394-shimane-91	Matsue city	1991	August	HFMD
CVA14 2525-shimane-91	Hamada city	1991	August	Pharyngitis
CVA14 2839-shimane-91	Hamada city	1991	September	Pharyngitis
CVA14 2854-shimane-91	Hamada city	1991	September	Pharyngitis
CVA14 1458-shimane-03	Izumo city	2003	July	Exanthema
CVA14 1484-shimane-03	Matsue city	2003	July	HFMD
CVA14 1592-shimane-03	Izumo city	2003	July	HFMD
CVA14 1599-shimane-03	Izumo city	2003	July	Herpangina
CVA14 1639-shimane-03	Izumo city	2003	July	HFMD
CVA14 1769-shimane-03	Matsue city	2003	August	Meningitis
CVA14 1982-shimane-03	Matsue city	2003	September	Pharyngitis

表2. EV71感染実験

Strain	Clinical diagnosis or outcome	X10希釈液を50 μ l添加			原液を25 μ l添加		
		RDA	L-SCARB2	L929	RDA	L-SCARB2	L929
1945-Shimane-00	HFMD	+++	+	-	+++	+++	-
1958-Shimane-00	HFMD	+++	+	-	+++	+++	-
2193-Shimane-00	HFMD	+++	+	-	+++	+++	-
2328-Shimane-00	Meningitis	+++	++	-	+++	+++	-
2906-Shimane-00	HFMD	+++	++	-	+++	+++	-
110-Shimane-01	HFMD	+++	+++	-	NT		
111-Shimane-01	HFMD	+++	+++	-	NT		
1365-Shimane-03	HFMD	+++	+	-	+++	+++	-
1440-Shimane-03	HFMD	+++	++	-	+++	+++	-
1573-Shimane-03	HFMD	+++	+	-	+++	+++	-
1647-Shimane-03	Meningitis	+++	++	-	+++	+++	-
1902-Shimane-03	HFMD	+++	+	-	+++	++	-
1970-Shimane-03	HFMD	+++	+	-	+++	+++	-
773-Shimane-06	HFMD	+++	+++	-	NT		
774-Shimane-06	HFMD	+++	+++	-	NT		
778-Shimane-06	Gastroenteritis	+++	+++	-	NT		
817-Shimane-06	Meningitis	+++	+++	-	NT		
842-Shimane-06	HFMD	+++	+++	-	NT		
858-Shimane-06	HFMD	+++	+++	-	NT		
523-Shimane-07	HFMD	+++	+++	-	NT		
567-Shimane-07	HFMD	+++	+++	-	NT		
569-Shimane-07	HFMD	+++	+	-	+++	+++	-
692-Shimane-09	HFMD	+++	++	-	+++	+++	-
720-Shimane-09	HFMD	+++	+	-	+++	+++	-
788-Shimane-09	HFMD	+++	+	-	+++	+++	-
35-Shimane-10	HFMD	+++	++	-	+++	+++	-
129-Shimane-10	HFMD	+++	+	-	+++	+++	-
260-Shimane-10	HFMD	+++	+	-	+++	+++	-
324-Shimane-10	HFMD	+++	+	-	+++	+++	-
333-Shimane-10	HFMD	+++	+	-	+++	+++	-
393-Shimane-10	Meningitis	+++	+++	-	NT		
418-Shimane-10	Myocarditis	+++	+	-	+++	+++	-

表3. 細胞毎のCPEが出現した最高希釈

strain	RDA	L-SCARB2
1958-Shimane-00	10 ⁴	10 ¹
110-Shimane-01	10 ⁶	10 ⁶
1902-Shimane-03	10 ³	10 ¹
773-Shimane-06	10 ⁵	10 ⁵
523-Shimane-07	10 ⁶	10 ³
569-Shimane-07	10 ⁶	10 ⁴
720-Shimane-09	10 ⁵	10 ²
324-Shimane-10	10 ⁶	10 ³

表4. CVA12感染実験

Strain	Clinical diagnosis or outcome	原液を25 μ l添加		
		RDA	L-SCARB2	L929
1917-Shimane-02	Herpangina	+++	-	-
1918-Shimane-02	Pharyngitis	+++	-	-
1141-Shimane-03	Herpangina	+++	-	-
1198-Shimane-03	Pharyngitis	+++	-	-
1315-Shimane-03	Herpangina	+++	-	-
1317-Shimane-03	Pharyngitis	+++	-	-
1443-Shimane-03	Herpangina	+++	-	-
912-Shimane-05	Pharyngitis	+++	-	-

表5. CVA14感染実験

Strain	Clinical diagnosis or outcome	X10希釈液を50 μ l添加			原液を25 μ l添加		
		RDA	L-SCARB2	L929	RDA	L-SCARB2	L929
1060-shimane-85	HFMD	+++	++	-	+++	+++	-
1061-shimane-85	HFMD	+++	+++	-	NT		
1634-shimane-85	HFMD	+++	+++	-	NT		
2394-shimane-91	HFMD	+++	+++	-	NT		
2525-shimane-91	Pharyngitis	+++	+++	-	NT		
2839-shimane-91	Pharyngitis	+++	++	-	+++	+++	-
2854-shimane-91	Pharyngitis	+++	+++	-	NT		
1458-shimane-03	Exanthema	+++	+++	-	NT		
1484-shimane-03	HFMD	+++	++	-	+++	+++	-
1592-shimane-03	HFMD	+++	++	-	+++	+++	-
1599-shimane-03	Herpangina	+++	++	-	+++	+++	-
1639-shimane-03	HFMD	+++	+++	-	NT		
1769-shimane-03	Meningitis	+++	+	-	+++	+++	-
1982-shimane-03	Pharyngitis	+++	++	-	+++	+++	-

平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
「エンテロウイルス感染症制御のための診断・予防治療に関する国際連携研究」
分担研究報告書

エンテロウイルス 71 株分離細胞系
ならびにエンテロウイルス 71 感染モデルマウスの開発

研究分担者

小池智 (財) 東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・副参事研究員

研究協力者

山吉誠也、藤井健(東京都臨床研)

水田克巳(山形県衛生研究所)、

西村秀一(仙台医療センター・仙台ウイルスセンター)、

山下照夫、皆川洋子(愛知県衛生研究所)、

飯塚節子(島根県保健環境科学研究所)

研究要旨

手足口病の原因ウイルスであるエンテロウイルス 71 (EV71) は、近年、アジア太平洋地域で大規模な流行が起こっており、稀に中枢神経合併症による死亡例が報告されている。我々は重要エンテロウイルス感染症の制御に必要な以下の 2 つの項目について研究を行った。

1. 我々は EV71 の受容体である Scavenger receptor B2 (SCARB2) を発現する L929 細胞(L-SCARB2 細胞)を作製し、この細胞が EV71, コクサッキーウイルス (CV) A14, CVA16 に対して感受性であることを明らかにした。L-SCARB2 細胞はこれらのウイルスの特異的な分離に有効である可能性を示した。

2. EV71 神経病原性試験やワクチン検定法は確立されていないことが大きな問題であるが、神経病原性を検定可能で操作性の容易なモデル動物はまだ樹立されていない。我々は SCARB2 の発見と培養系での知見を基に SCARB2 を発現する EV71 感受性マウスモデルの確立を開始した。

1. EV71 株分離細胞系の開発

A. 研究目的

EV71 を特異的かつ効率よく分離する細胞系の確立はサーベイランスを行う上で有用であると考えられる。現在ポリオウイルスの分離にポリオウイルス受容体である CD155 を発現する L 細胞が使用されており、有効な手段となっている。我々は Scavenger receptor B2 (SCARB2) が EV71 の受容体であることを見だし、これを発現する L929 細胞 (L-SCARB 細胞) を作製した。ポリオウイルス分離と同様に EV71 のサーベイランスにおいて、L-SCARB2 細胞が EV71 の分離・同定に有用であるかを検討するために、まず既に分離・同定されている EV71 やそれに近縁な A 群コクサッキーウイルスの感染に対して L-SCARB2 細胞が感受性を示すかを確認し、感染の選択性並びに感受性の高さが他の細胞を用いた場合より優れているかを検討することにした。

B. 研究方法

(1) EV71 臨床分離株に対する L-SCARB2 細胞の感受性確認試験

仙台医療センター (26 株)、山形県衛生研究所 (67 株)、愛知県衛生研究所 (37 株) および島根県保健環境科学研究所 (32 株) において分離・同定された EV71 計 162 株を実験に用いた。仙台医療センターならびに山形県衛生研究所で分離された株については東京都臨床医学総合研究所において実験を行い、愛知県衛生研究所お

よび島根県保健環境科学研究所で分離された株についてはそれぞれの研究所で実験を行った。この報告書においてはこれらの実験結果を総合的にまとめた結果を報告する。

L-SCARB2 細胞並びに RD 細胞、L929 細胞にそれぞれのウイルス株を接種し、細胞変性効果 (CPE) の出現を一週間観察した。それぞれのウイルス株が RD 細胞において感染が成立して明瞭な CPE を誘導し、L929 細胞では CPE を誘導しないことを確認すると同時に、L-SCARB2 細胞で CPE が出現した場合を感受性陽性と判定した。一部の CVA 株は L929 細胞にも感染して CPE を示す場合が知られているので、L929 細胞で CPE が観察された場合には判定不能とすることにした。

(2) A 群コクサッキーウイルスに対する L-SCARB2 細胞の感受性確認試験

山形県衛生研究所において分離・同定された CVA2 (5 株)、CVA3 (5 株)、CVA4 (5 株)、CVA6 (5 株)、CVA10 (5 株)、CVA14 (2 株) および CVA16 (14 株)、愛知県衛生研究所において分離・同定された CVA2 (5 株)、CVA4 (6 株)、CVA5 (2 株)、CVA6 (2 株)、CVA8 (3 株)、CVA10 (5 株)、CVA12 (1 株)、CVA14 (1 株) および CVA16 (13 株) および島根県保健環境科学研究所において分離・同定された CVA12 (8 株)、CVA14 (14 株) をそれぞれ L-SCARB2 細胞等に接種し、CPE の出現を一週間観察し、(1) と同様に判定を行った。

C. 研究結果

(1) EV71 臨床分離株に対する L-SCARB2 細胞の感受性確認試験

供試した全ての EV71 の臨床分離株は、L-SCARB2 細胞において CPE を引き起こした (表 2)。ウイルス株によって CPE の出現が早い株と遅い株が存在していた。

(2) A 群コクサッキーウイルスに対する L-SCARB2 細胞の感受性確認試験

CVA2 (10 株)、CVA3 (5 株)、CVA4 (11 株)、CVA5 (2 株)、CVA6 (7 株)、CVA8 (3 株)、CVA10 (10 株) および CVA12 (1 株) は、RD 細胞において CPE を示したが L-SCARB2 細胞および L929 細胞においては CPE を示さなかった (表 1)。

CVA14 (17 株) は、16 株は L-SCARB2 細胞において CPE を示したが、1 株は CPE を示さなかった (表 2)。

CVA16 (27 株) は、供試した全ての株が L-SCARB2 細胞において CPE を示した (表 2)。

D. 考察

L-SCARB2 細胞はすべての EV71 の臨床分離株の感染において CPE を示したことから、臨床検体から分離されたウイルスを型別・同定する際に、L-SCARB2 細胞を用いれば型別・同定の補助となり得る可能性を示すことが出来た。

我々は、CVA16 の標準株である G10 株が L-SCARB2 細胞において増殖することを既に報告している。今回の CVA16 の臨床分離株 27 株を用いた試験により、CVA16 の

L-SCARB2 細胞における感染成立が、標準株である G10 株特有の現象では無く一般的に L-SCARB2 細胞は CVA16 に対して感受性であることが示された。このことは、L-SCARB2 細胞を用いれば、CVA16 を選択的に分離出来ることを示唆している。

CVA14 および CVA10 の標準株は、L-SCARB2 細胞の親株である L929 細胞で CPE を示して増殖するため、これらが L-SCARB2 細胞で選択的に分離できるかどうかは確認できていなかった。今回の臨床分離株を用いた試験により、CVA14 は L-SCARB2 細胞で選択的に分離可能であること、また CVA10 は分離出来ないことが明らかとなった。

E. 結論

SCARB2 は EV71 のみならず、CVA16 や CVA14 に対する受容体としても機能することが判明した。他のウイルスに対して L-SCARB2 細胞は感受性を示さなかったことから L-SCARB2 細胞を用いることによって、EV71、CVA16 および CVA14 の 3 種類のウイルスを選択的に分離できる可能性が示された。今後は、EV71 や CVA16 の感染が疑われる手足口病患者由来の臨床検体を直接 L-SCARB2 細胞に接種することにより、迅速に EV71 や CVA16 の分離・同定が行えることを示していきたい。また一部の EV71 株は L-SCARB2 での増殖が悪いため、この細胞を使用した場合一部の EV71 株を分離し損ねる場合も考えられるので、このような場合にどう対処するか検討す