

201123034A-B

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

コクサッキーA16型ウイルス特異的受容体の同定と機能解析

平成23年度 総括研究報告書

平成22年度～平成23年度 総合研究報告書

研究代表者 西村 順裕

平成24（2012）年 3月

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

コクサッキーA16型ウイルス特異的受容体の同定と機能解析

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 西村 順裕

平成24（2012）年 3月

目 次

I. 総括研究報告

コクサッキーA16型ウイルス特異的受容体の同定と機能解析 ---- 1
西村 順裕

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 7

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 8

I . 総括研究報告

総括研究報告書

コクサッキーA16 型ウイルス特異的受容体の同定と機能解析

研究代表者 西村 順裕 国立感染症研究所 主任研究官

研究要旨

コクサッキーA16 型ウイルス（CVA16）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のひとつである。一般に手足口病の症状は軽く、予後も良好である。一方、エンテロウイルス 71（EV71）感染による手足口病では、まれではあるが重篤な中枢神経疾患を呈することがある。CVA16 および EV71 感染の分子機構や病原性の違いには不明な部分が多い。たとえば、ウイルス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 CVA16 および EV71 に共通の受容体として、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る。

本研究では、PSGL-1 陽性の Jurkat 細胞における CVA16 増殖様式を解析した。CVA16 の増殖は、抗 PSGL-1 抗体で阻害されなかったが、硫酸化阻害剤で阻害された。したがって、Jurkat 細胞における CVA16 受容体は、PSGL-1 以外の硫酸化を受ける分子であることが示唆された。次に、Jurkat 細胞で増殖した CVA16 と、横紋筋種由来の RD 細胞で増殖した CVA16 とで、キャプシドアミノ酸を比較した。わずか二つのキャプシドアミノ酸により、Jurkat 細胞における増殖メカニズムに違いが生じることが明らかとなった。本研究成果は、CVA16 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

コクサッキーA16 型ウイルス (CVA16) 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属している。CVA16 と遺伝学的に近縁なエンテロウイルス 71

(EV71) とともに、手足口病の主要な病原ウイルスとして知られている。手足口病の症状は一般に軽く経過し、通常数日で回復する。特に CVA16 感染による手足口病では、手、足、口の発疹が主な症状で、重症化することはない。一方 EV71 感染では、手足口病のみならず、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伴うことが知られている。

EV71 による手足口病の大規模な流行は、近年アジア太平洋地域で多発している。1997 年のマレーシア、1998 年の台湾での大流行が報告されて以来、各国で相次いでおり、公衆衛生上の深刻な問題となっている。特に中国においては、2008 年に安徽省を発端とした各地での手足口病流行が発生した。120 名以上の死亡例が報告され、社会は震撼した。その後も中国では 2009 年、2010 年に EV71 が大流行し、どちらの年にも数百人の死亡例が報告されている。

日本国内においては、例年 CVA16 あるいは EV71 のどちらかが主流の手足口病が発生している。近年では CVA16 の流行が続いていたが、2010 年には EV71 による手足口病が流行した。また、2011 年には CVA6 による手足口病も流行している。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。しかしながら、散発的

には報告されている。

ウイルスが細胞に感染する際に使用する特異的受容体を同定できれば、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へと展開できる。最も有名な例は、CVA16 と同じピコルナウイルス科、エンテロウイルス属に分類されるポリオウイルスであろう。ポリオウイルス受容体は 1989 年に同定された。これが大きな布石となり、ポリオウイルスの分子生物学的研究および病理学的研究が飛躍的に進展した。例えば、ヒトポリオウイルスレセプター発現マウス L929 細胞の樹立である。この細胞は、ポリオウイルスのみが感染し、細胞死を起こす。簡便かつ特異的なポリオウイルス分離同定を実現し、1990 年代以降、WHO によるポリオ根絶計画にも大きく寄与している。さらにヒトポリオウイルス受容体を発現する、トランスジェニックマウスモデルも開発された。このマウスは、ポリオウイルスの神経毒性を反映した症状を呈することから、ポリオウイルスによる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に非常に有用なモデルとなっている。

ポリオウイルス以外のエンテロウイルスについては、ICAM-1、CAR、インテグリンなどの膜蛋白質が受容体として同定されて来た。しかし、

CVA16やEV71を含むA群ヒトエンテロウイルスの受容体は長年謎に包まれており、同定が切望されていた。2009年、2種類の全く異なる受容体が相次いで報告された。我々がJurkat細胞から同定したP-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1)、山吉らが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異なるファミリーに属し、構造も全く異とする分子であるが、両分子とも、CVA16およびEV71に共通な受容体として機能する。

我々の同定したPSGL-1はシアロムチンファミリーに属す、I型膜蛋白質である。主に骨髄系・リンパ球系細胞および血小板に発現している。PSGL-1は炎症初期過程における白血球の遊走・接着・浸潤に重要な機能を果たす。この機能発現には、細胞外に位置するアミノ末端領域とはセレクチンやケモカインとの相互作用が重要である。この相互作用は、PSGL-1アミノ末端領域の複雑な翻訳後修飾により制御されている。例えば、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へのシアル酸を含む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り、O型糖鎖付加は不要であ

る。このように、PSGL-1が細胞外からのシグナルを受信し、生理機能を発現するためには、細胞表面での発現のみならず、アミノ末端領域の翻訳後修飾が重要なのである。

CVA16はPSGL-1を受容体とし、PSGL-1特異的にヒトPSGL-1発現マウスL929細胞へ感染することを明らかにしてきた。しかしながら、PSGL-1陽性のJurkat細胞においては、PSGL-1以外の分子が主要なCVA16受容体として機能していると考えられた。つまり、PSGL-1以外かつSCARB2以外の受容体(この受容体をCVA16Rと本研究では呼ぶ)を使用して感染することを示唆する研究結果を得てきた。

本研究ではCVA16Rの同定を目指した。また、受容体の違いからCVA16とEV71の病原性の違いを考察することを目的とした。平成22年度はCVA16Rの分子生物学的性状の解析を行い、CVA16Rは硫酸化を受ける分子であることを突き止めた。さらに、様々な白血球系細胞株を用いた感染実験を行い、CVA16の細胞指向性を解明した。本年度は、CVA16の受容体特異性を決定するキャプシドアミノ酸の同定を行った。さらにその研究成果をEV71研究にフィードバックすることに成功した。つまり、CVA16の受容体特異性に関与するアミノ酸に相当するEV71のアミノ酸は、EV71の受

容体特異性を規定することを解明した。

B. 研究方法

1. 細胞

PSGL-1 陽性白血球細胞株として Jurkat 細胞を用いた。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

CVA16 のプロトタイプ株である G-10 株を用いた。PSGL-1 に結合する EV71 株 (EV71-PB) である 1095 株を用いた。PSGL-1 に結合しない EV71 株 (EV71-non-PB) として 02363 株を用いた。

3. キャプシド領域塩基配列の決定

RT-PCR により、キャプシドをコードする領域を増幅した。塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定した。

4. 感染性クローンの作製

EV71-1095 および EV71-02363 を基に作製した。ゲノム全長を RT-PCR により増幅し、pBR322 由来プラスミドにクローニングした。アミノ酸変異は PCR による site-directed mutagenesis により導入した。In vitro transcription により RNA を合成し、RD 細胞にトランスフェクションした。24 時間後に組換えウイルスを含む培養液を回収した。高タイターウイルスを得るために、も

う一度 RD 細胞に感染させた。強い細胞変性効果が出現した時点でウイルス液を回収し、実験に用いた。

5. 免疫沈降法による EV71-PSGL-1 結合の検出

Protein G ビーズと PSGL-1-Fc を反応後、洗浄し、EV71 を加えた、1 時間後洗浄し、共沈した EV71 をウエスタンブロットティングで検出した。

(倫理面への配慮)

本研究は、特定の研究対象者や動物実験を含まないため、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. 異なる細胞指向性を示す CVA16 のキャプシド領域の解析

CVA16 の Jurkat 細胞での増殖は、硫酸化阻害剤の影響を受けない。つまり、PSGL-1 以外の受容体を介してのウイルス感染が主要であると考えられる。そこで、RD 細胞で増殖させた CVA16 を Jurkat 細胞で一度増殖させ、Jurkat 細胞での増殖前後におけるキャプシドアミノ酸変異を解析した。その結果、Jurkat 細胞で一度増殖した CVA16 では、VP1-97 と VP1-145 に変異を起していることが明らかとなった。つまり、これら二つのアミノ酸で、CVA16 の受容体特異性が規定されていることが示唆された。

2. VP1-97 と VP1-145 に相当する、EV71 アミノ酸の機能予測

EV71 分離株間において、VP1-97 は高く保存されているが、近接する VP1-98 に高い多様性がある。また、EV71 の VP1-145 も高い多様性がある。EV71 における VP1-98 および VP1-145 はポジティブセレクションを受けることが報告されていることから、この二つのアミノ酸は EV71 感染および増殖に重要な役割をなすことが推測された。そこで、EV71 の VP1-98 および-145 が、受容体特異性に関与するものと推測した。

EV71-PB 株と non-PB 株とで VP1-98 および-145 のアミノ酸を比較した。EV71-PB 株では VP1-98E/145G、non-PB 株では VP1-98K/145E をもつ頻度が高いことから、これら 2 つのアミノ酸の組合せが PSGL-1 結合性に関与するものと推測した。

3. VP1-98 および VP1-145 と EV71 受容体特異性の解析

cDNA 由来ウイルスの PSGL-1 結合性を、PSGL-1-Fc との共沈により検討した。PB 型アミノ酸(VP1-98E/145G) をもつ、EV71-1095 分離株、cDNA 由来 EV71-1095 株および EV71-02363EG 株は、PSGL-1-Fc と共沈した。つまり、VP1-98E/145G が PSGL-1 結合に重要であることが明らかとなった。

Non-PB 型アミノ酸(VP1-98K/145E)

をもつ、EV71-02363 分離株、cDNA 由来 EV71-02363 株および EV71-1095KE 株は、PSGL-1-Fc と共沈しなかった。つまり、VP1-98K/145E をもつ EV71 は PSGL-1 に結合しないことが示された。

以上のように、VP1-98 および-145 は、EV71 における受容体特異性を規定することを明らかにした。

D. 考察

本研究では、CVA16 の受容体同定を目指した。また、CVA16 の研究成果を EV71 研究にフィードバックし、EV71 病原性解明に役立てることを目的とした。研究代表者は CVA16 の未知受容体が硫酸化を受ける分子であることを明らかにした。また、CVA16 の受容体特異性は VP1 のアミノ酸わずか二つで規定されていることを明らかにした。さらに、この CVA16 における成果を EV71 研究にフィードバックすることができた。つまり、CVA16 の受容体特異性に関与するアミノ酸に相当する EV71 キャプシドアミノ酸は、EV71 の受容体特異性にも関与していることを突き止めた。

平成 22 年度は、CVA16R の同定を行い、硫酸化を受ける分子であることを突き止めた。硫酸化を受ける細胞表面分子には様々な種類がある。たとえば、グリコサミノグリカンである。硫

酸化の種類により、コンドロイチン硫酸グリカン、ヘパラン硫酸プロテオグリカンなど様々に分類されている。このようなグリコサミノグリカンがコア蛋白質とよばれる細胞膜蛋白質に共有結合し特異的機能を果たしている。本研究では CVA16R は硫酸化を受ける分子であることを明らかにしたが、今後さらに詳細な機能解明が望まれる。

CVA16 と EV71 は遺伝学的に非常に近縁なウイルスであり、ともに PSGL-1 を受容体として使用できる。しかし、いずれも異なる第二の受容体を使用することが明らかとなった。また、その受容体特異性を規定するのは、ウイルスキャプシド VP1 にあるアミノ酸二つであることを明らかにした。CVA16 感染と EV71 感染に共通してみられる手足口病の症状は、PSGL-1 により説明できる可能性がある。一方、CVA16 と EV71 による病原性が関与していることも考えられる。CVA16 の受容体特異性の解明をきっかけとして、今後両ウイルスの病原性の違いの解明への展開が期待される。推測される。

E. 結論

CVA16 の Jurkat 細胞への感染には、PSGL-1 に加え、硫酸化を受ける分子が関与することを明らかにした。さらに、CVA16 の受容体特異性を決定する、

ウイルスキャプシドアミノ酸を同定した。受容体特異性に着目した CAV16 感染機構の解析は、手足口病のみならず、EV71 細胞指向性の解明に繋がった。本研究の成果は、今後さらにエンテロウイルスによる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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nishimura Y, Shimizu H: Cellular receptors for human enterovirus species A. *Frontiers in Virology*, in press.

2. 学会発表

1) Nishimura Y, Wakita T, Shimizu H: Analysis of amino acid determinants of enterovirus 71 responsible for the PSGL-1-binding phenotype. IUMS 2011 Sapporo. 札幌市、2011 年 9 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

Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nishimura Y, Shimizu H	Cellular receptors for human enterovirus species A.	Frontiers in Virology			In press

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷

1 **Mini review**

2

3 **Cellular receptors for human enterovirus species A**

4

5 Yorihiro Nishimura* and Hiroyuki Shimizu

6

7 Department of Virology II

8 National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

9

10 ***Correspondance:**

11 Dr. Yorihiro Nishimura

12 Department of Virology II

13 National Institute of Infectious Diseases

14 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama-shi,

15 Tokyo 208-0011, Japan

16 ynishi@nih.go.jp

17

18 **Running title:**

19 HEV-A receptors

20

21 **Headings and sub-headings:**

22 **1. Introduction**

23 **2. PSGL-1**

24 **3. SCARB2**

25 **4. Annexin II**

26 **5. Sialic acid**

27 **6. DC-SIGN**

28 **7. Conclusion**

29 **8. Acknowledgements**

30

31 **Conflict of interest statement**

32 The authors declared that no competing interests exist.

33 **Abstract**

34 Human enterovirus species A (HEV-A) is one of the four species of HEV in the genus
35 *Enterovirus* in the family *Picornaviridae*. Among HEV-A, coxsackievirus A16 (CVA16)
36 and enterovirus 71 (EV71) are the major causative agents of hand, foot, and mouth
37 disease (HFMD). Some other types of HEV-A are commonly associated with
38 herpangina. Although HFMD and herpangina due to HEV-A are common febrile
39 diseases among infants and children, EV71 can cause various neurological diseases,
40 such as aseptic meningitis and fatal encephalitis.

41

42 Recently, two human transmembrane proteins, P-selectin glycoprotein ligand-1
43 (PSGL-1) and scavenger receptor class B, member 2 (SCARB2), were identified as
44 functional receptors for EV71 and CVA16. In *in vitro* infection experiments using the
45 prototype HEV-A strains, PSGL-1 and SCARB2 could be responsible for the specific
46 receptors for EV71 and CVA16. However, the involvement of both receptors in the *in*
47 *vitro* and *in vivo* infections of clinical isolates of HEV-A has not been clarified yet. To
48 elucidate a diverse array of the clinical outcome of HEV-A-associated diseases, the
49 identification and characterization of HEV-A receptors may provide useful information
50 in understanding the HEV-A pathogenesis at a molecular level.

51

52 **Keywords:**

53 Human enterovirus species A, enterovirus 71, receptor, PSGL-1, SCARB2

54

55 **1. Introduction**

56 The genus *Enterovirus* within family *Picornaviridae*, nonenveloped viruses with a
57 single-stranded RNA genome of positive polarity, is comprised of more than 100
58 serotypes (Pallansch and Roos, 2007). Human enteroviruses (HEVs) are presently
59 classified into four species, HEV species A, B, C, and D (HEV-A, B, C, and D). At
60 present, coxsackievirus A2 (CVA2), CVA3, CVA4, CVA5, CVA6, CVA7, CVA8,
61 CVA10, CVA12, CVA14, CVA16, enterovirus 71 (EV71), EV76, EV89, EV90, EV91,
62 and EV92 have been classified as HEV-A (Oberste et al., 2004, 2005, 2008). In addition,
63 four types of simian enteroviruses are classified as HEV-A (Oberste et al., 2007).

64 Although most enterovirus infections are asymptomatic, particular clinical
65 manifestations are associated with specific types of enteroviruses (Pallansch and Roos,
66 2007). CVA2, CVA4, CVA5, CVA6, and CVA10 are commonly associated with
67 herpangina. EV71 and CVA16 are major causative agents of hand, foot, and mouth
68 disease (HFMD), a common febrile disease occurring mainly in young children,
69 characterized by skin rash involving palms and soles, and ulcers on oral mucosa.
70 Recently, HFMD outbreaks mainly due to CVA6 have been reported (Fujimoto et al., in
71 press). Clinical manifestations of HFMD caused by EV71, CVA6, and CVA16 are
72 usually mild and self-limited. However, EV71 infection causes a diverse range of
73 neurological diseases, such as aseptic meningitis, acute flaccid paralysis, brainstem
74 encephalitis, neurogenic pulmonary edema, and may result in long-term neurological
75 sequelae, mainly in infants and young children (Alexander et al., 1994;McMinn,
76 2002;Modlin, 2007).

77

78 Recently, two human transmembrane proteins, P-selectin glycoprotein ligand-1
79 (PSGL-1) (Nishimura et al., 2009) and scavenger receptor class B, member 2
80 (SCARB2) (Yamayoshi et al., 2009), were identified as functional receptors for EV71
81 and CVA16 (Patel and Bergelson, 2009). In addition, annexin II (Yang et al., 2011),

82 sialic acid (Yang et al., 2009), and dendritic cell(DC)-specific ICAM3-grabbing
83 nonintegrin (DC-SIGN) (Lin et al., 2009b) were found to be cellular factors involved in
84 the early stages of EV71 infection. This review summarizes our current understanding
85 of the EV71/CVA16 receptors and their role in HEV-A infection.

86

87 **2. PSGL-1**

88 Patients with severe EV71-associated encephalitis and neurological pulmonary edema
89 showed a significant depletion of T cells and high levels of proinflammatory cytokines
90 (Lin et al., 2003;Wang et al., 2003), suggesting the possible involvement of
91 lymphocytes in EV71 infection and the immunopathogenesis. Therefore, we generated a
92 cDNA library from Jurkat T cells and used it for expression cloning to identify a
93 receptor on lymphocytes that specifically binds to EV71. Finally we identified PSGL-1
94 as a functional EV71 receptor on Jurkat T cells (Nishimura et al., 2009).

95

96 PSGL-1 is a sialomucin leukocyte membrane protein expressed as a homodimer of
97 disulfide-linked subunits and it can bind to three different selectins (P, E, and L) (Sako
98 et al., 1993;Laszik et al., 1996;Somers et al., 2000). The tissue distribution of PSGL-1 is
99 restricted to myeloid, lymphoid, and dendritic lineages, and platelets. PSGL-1 is also
100 expressed on DCs of lymph nodes and macrophages in the intestinal mucosa (Laszik et
101 al., 1996), which could be the primary sites of EV71 replication. PSGL-1 plays critical
102 roles in the tethering and rolling of leukocytes for the recruitment of cells from blood
103 vessels to the sites of acute inflammation upon stimulation by infection.

104

105 We found that some representative EV71 strains bind to PSGL-1 but other strains did
106 not (Nishimura et al., 2009). According to their PSGL-1 binding capability, we
107 classified the EV71 isolates as PSGL-1-binding strains (EV71-PB) and
108 PSGL-1-non-binding strains (EV71-non-PB). The replication of EV71-PB in Jurkat T

109 cells was inhibited by anti-PSGL-1 monoclonal antibody (KPL1), indicating that
110 EV71-PB replicated in Jurkat cells in a PSGL-1-dependent manner. On the other hand,
111 EV71 replicated in nonleukocyte cells (such as RD cells) expressing little or no PSGL-1,
112 and the replication was not affected by KPL1. Therefore we conclude that EV71 does
113 not use PSGL-1 as the major cellular receptor on RD cells and other receptor(s),
114 including SCARB2 or annexin II, may be responsible for EV71 infection in
115 nonleukocyte cells expressing little or no PSGL-1.

116

117 Post-translational modifications of the N-terminal region of PSGL-1 contribute the
118 efficient binding to selectins and chemokines (Pouyani and Seed, 1995;Sako et al.,
119 1995;Wilkins et al., 1995;Liu et al., 1998;Hirata et al., 2004). In this region, there are a
120 potential *O*-glycosylation residue (T57) and three potential tyrosine sulfation sites (Y46,
121 Y48, and Y51). We demonstrated that tyrosine sulfation, not *O*-glycosylation, of the
122 N-terminal region of PSGL-1 facilitates its binding to EV71-PB and viral replication in
123 Jurkat T cells (Nishimura et al., 2010).

124

125 CVA16 is genetically and antigenically related to EV71 and is a major causative agent
126 of HFMD as well as EV71 (Oberste et al., 2004). The inoculation of L-PSGL-1.1 cells,
127 mouse L929 cells stably expressing human PSGL-1, with the prototype CVA16-G-10
128 strain induced faint cytopathic effects (CPE). The replication of CVA16-G-10 was
129 partially inhibited by KPL1 in L-PSGL-1.1 cells. This result indicated that the prototype
130 CVA16 strain may use human PSGL-1 and another unidentified receptor(s) to infect
131 L-PSGL-1.1 cells. CVA16-G-10 replication in Jurkat cells was not apparently inhibited
132 by KPL1 (Nishimura et al., 2009), but significantly inhibited by a sulfation inhibitor,
133 sodium chlorate (Nishimura et al., 2010). Therefore some sulfated molecules other than
134 PSGL-1 might be involved in the replication of CVA16 in Jurkat cells. CVA16-G-10
135 would use unidentified receptor(s) to infect Jurkat T cells (Nishimura et al., 2009;Patel

136 and Bergelson, 2009).

137

138 To investigate the PSGL-1-dependent replication phenotype of HEV-A, we tested the
139 replication of 10 prototype HEV-A strains in L-PSGL-1.1 cells in the presence or
140 absence of the anti-PSGL-1 mAb, KPL1 (Figure 1A). On day 6 post-inoculation, there
141 was no significant replication of CVA4, CVA5, CVA6, or CVA8 in L-bsd cells
142 (blasticidin-resistant control L929 cells) or L-PSGL-1.1 cells. Although higher viral
143 titers were found for CVA2 and CVA7 in L-PSGL-1.1 cells compared with those in
144 L-bsd cells, replication was not affected by KPL1. These results suggest that CVA2 and
145 CVA7 may infect to L-PSGL-1.1 cells in an alternative pathway via PSGL-1 or
146 glycosylated PSGL-1, without the interaction between EV71-PB and the N-terminal
147 region of PSGL-1 recognized by KPL1. We could not demonstrate any
148 PSGL-1-dependent replication of the CVA3, CVA10, CVA12, and CVA14 strains in
149 L-PSGL-1.1 cells, because they replicated even in PSGL-1 negative L-bsd cells as
150 previously reported for certain HEV-A field isolates (Nadkarni and Deshpande, 2003;
151 Yamayoshi et al., 2009).

152

153 CVA7 and CVA14 infection induced CPE in L-PSGL-1.1 cells, but not in L-bsd cells
154 (Table 1). On the other hand, CVA7 and CVA14 induced CPE in L-Empty cells
155 (puromycin-resistant control L929 cells) (Table 1) (Yamayoshi et al., 2009). The
156 difference in the CPE induction by some HEV-A strains might be due to the
157 maintenance or cultivation conditions of the mouse L929-derived cells regardless of the
158 receptor expression of PSGL-1 or SCARB2. Some strains of HEV-A are able to infect
159 mouse L929 cells regardless of expression of PSGL-1 or SCARB2 (Nadkarni and
160 Deshpande, 2003; Yamayoshi et al., 2009). It is therefore impossible to determine
161 receptor usage of HEV-A by simply investigating the susceptibility of L929 cells
162 expressing the putative cellular receptor. Receptor usage of HEV-A should be