

第13回ウイルス学キャンプin湯河原

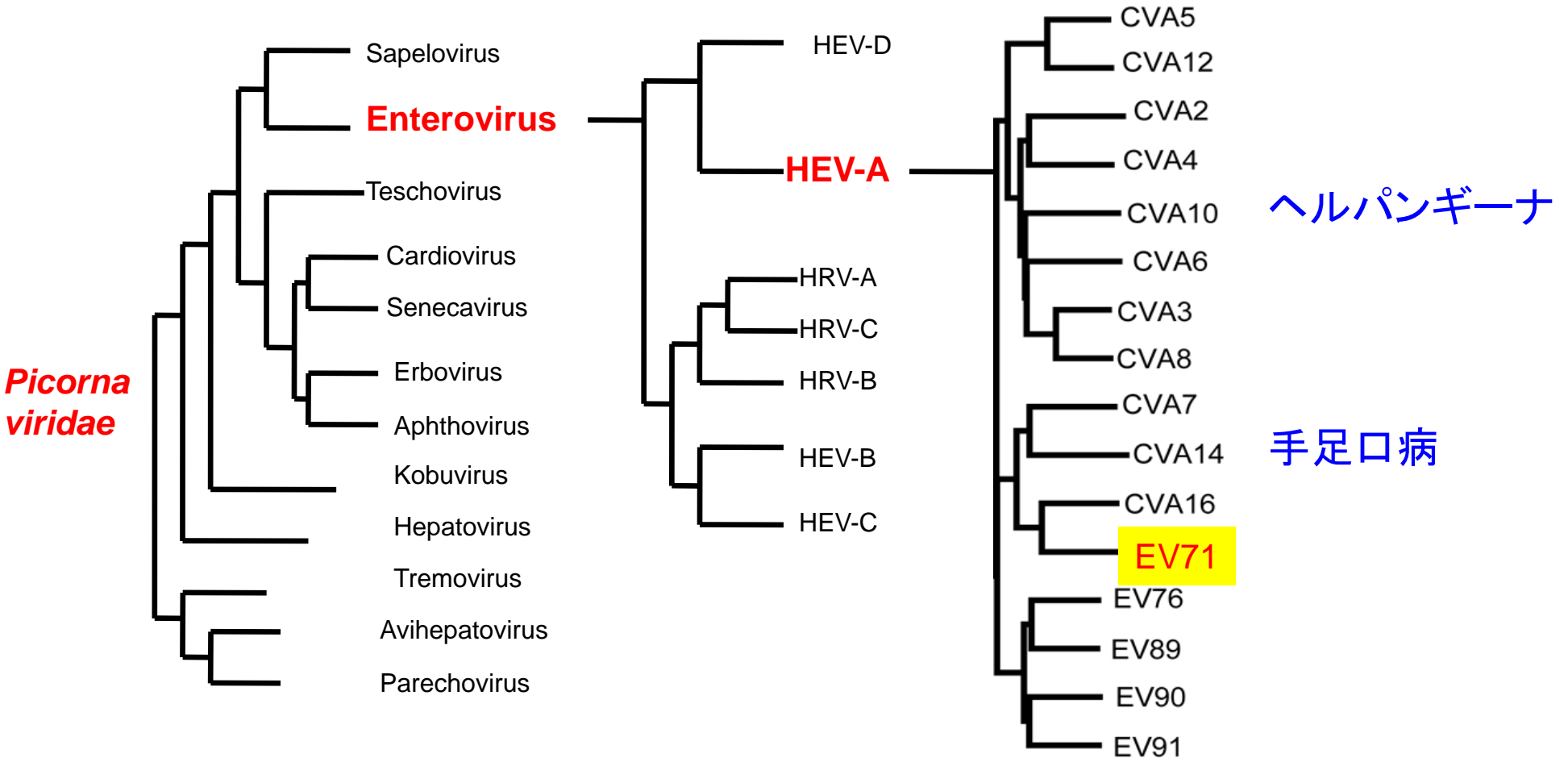
エンテロウイルス71の病原性解析



公益財団法人東京都医学総合研究所
ウイルス感染プロジェクト
藤井 健

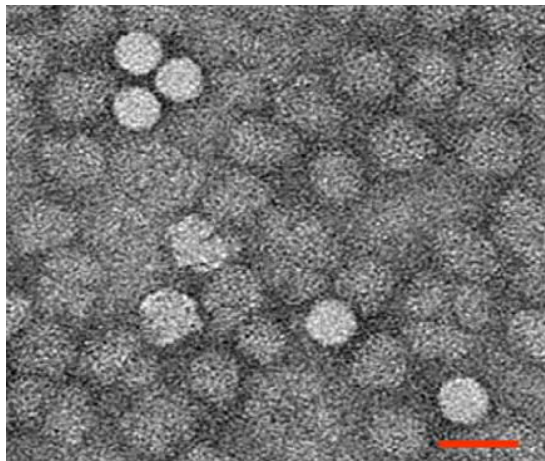
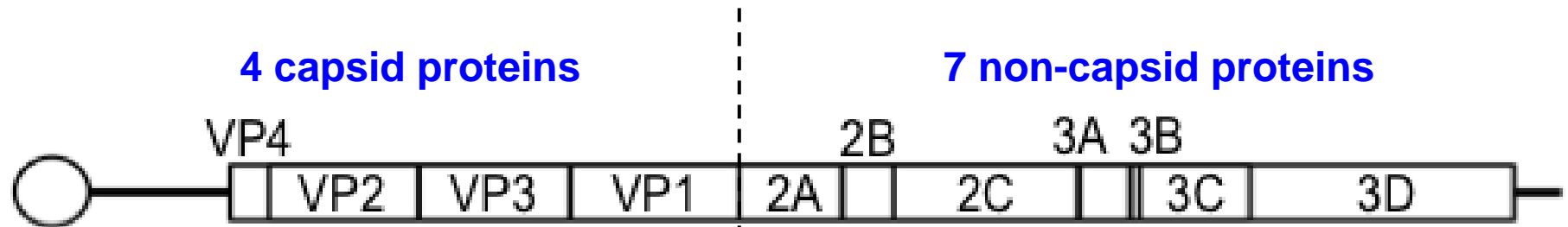
エンテロウイルス71(EV71)

1. 1969年アメリカ合衆国カリフォルニア州で分離
2. ピコルナウイルス科エンテロウイルス属エンテロウイルスA群
3. 1本鎖プラス鎖RNAゲノム(約7.4Kb)、粒子直径20-30nm
4. 手足口病、神経合併症

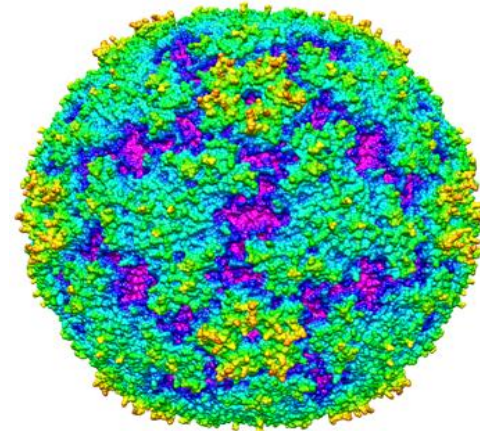


エンテロウイルス71(EV71)

1. 1969 年アメリカ合衆国カルフォルニア州で分離
2. ピコルナウイルス科エンテロウイルス属エンテロウイルスA群
3. 1本鎖プラス鎖RNAゲノム (約7.4Kb)、粒子直径20-30nm
4. 手足口病、神経合併症



Liu et al. PLoS One. 2011 6:e20005

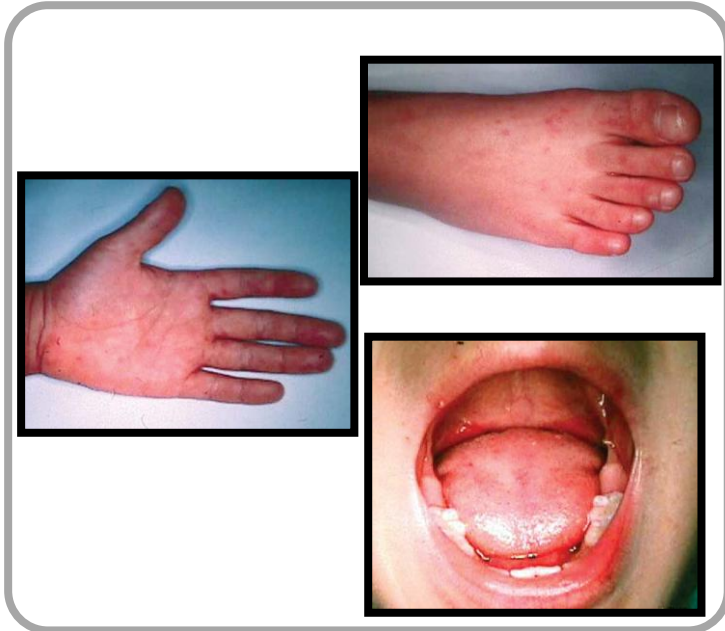


Wang et al. Nat Struct Mol Biol. 2012 19:424-430.
Plevka, et al . Science 2012 336:1274

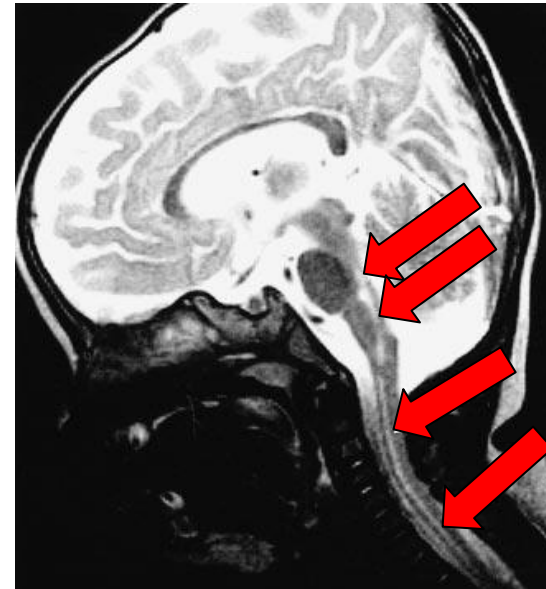
エンテロウイルス71(EV71)

1. 1969年アメリカ合衆国カルフォルニア州で分離
2. ピコルナウイルス科エンテロウイルス属エンテロウイルスA群
3. 1本鎖プラス鎖RNAゲノム(約7.4Kb)、粒子直径20-30nm
4. 手足口病、神経合併症

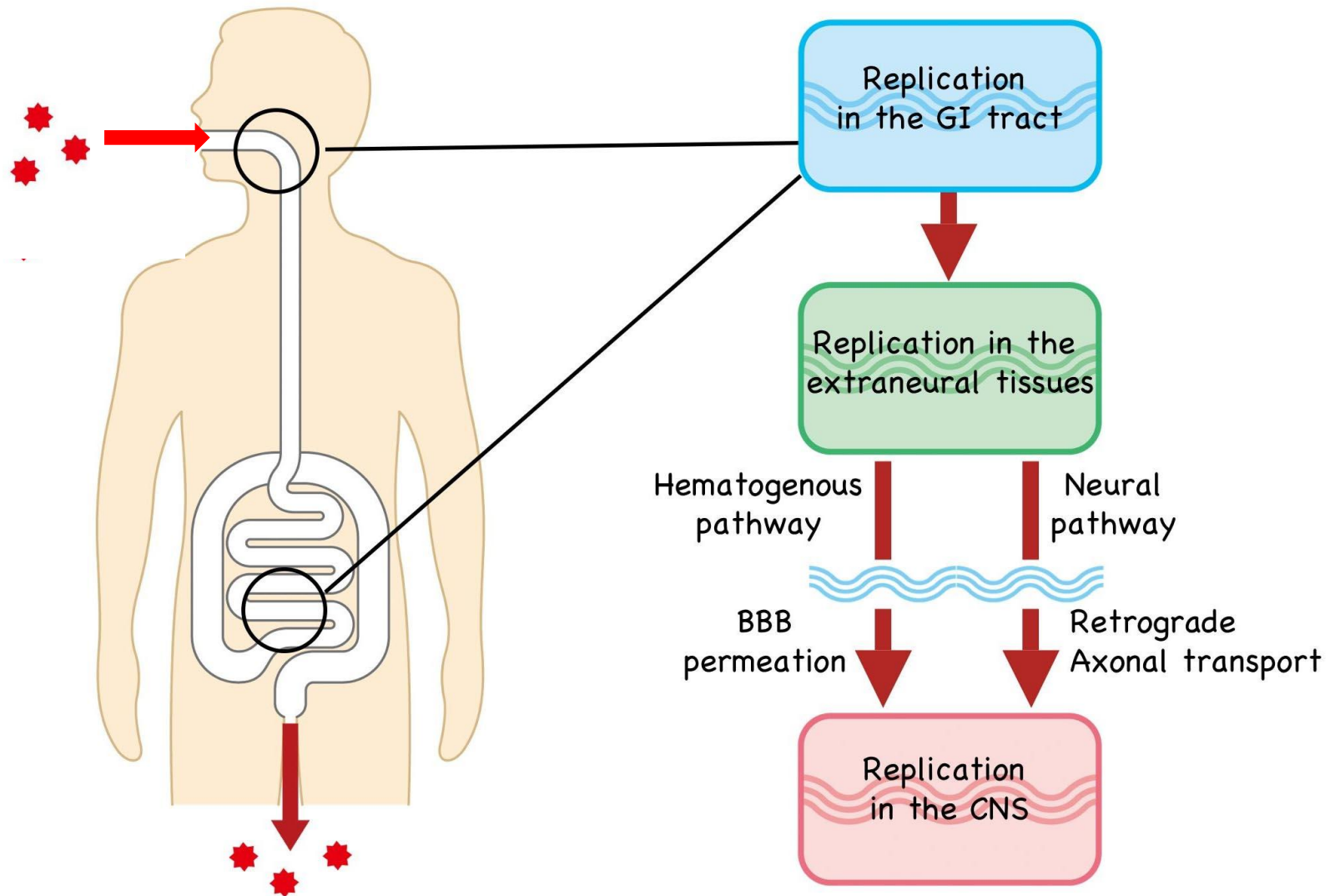
手足口病



弛緩性麻痺
脳幹脳炎
神経原性肺水腫

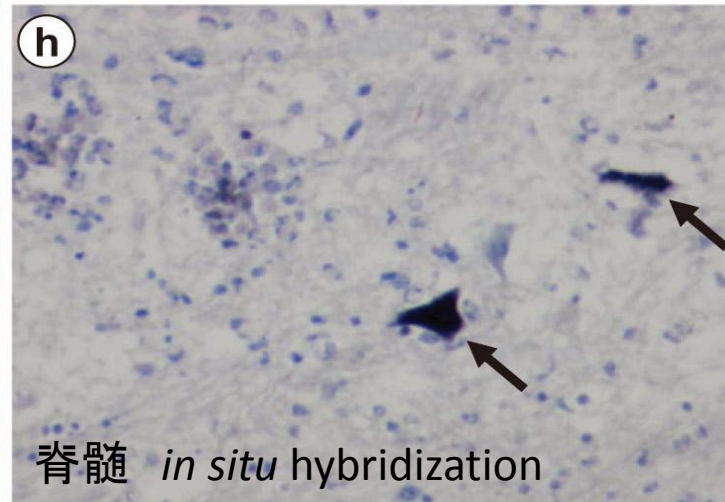
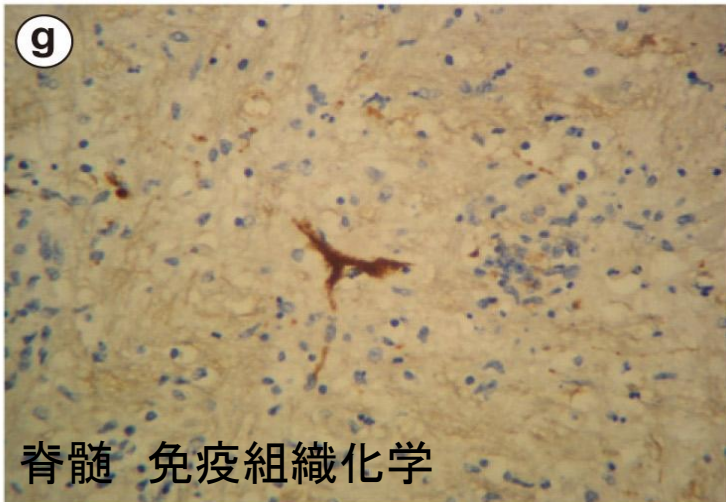
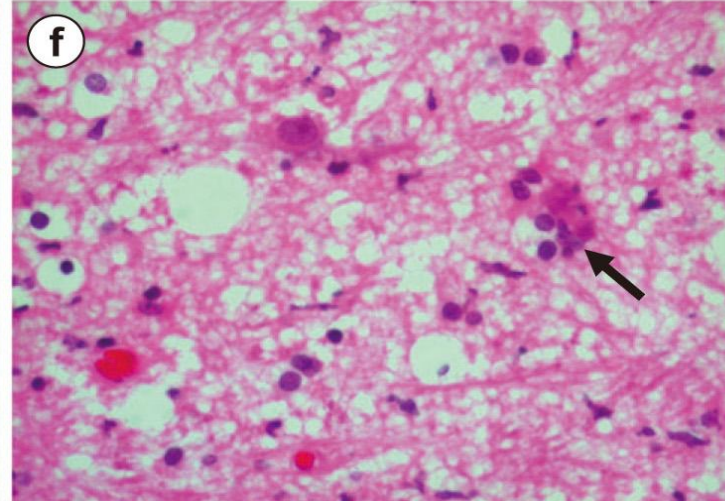
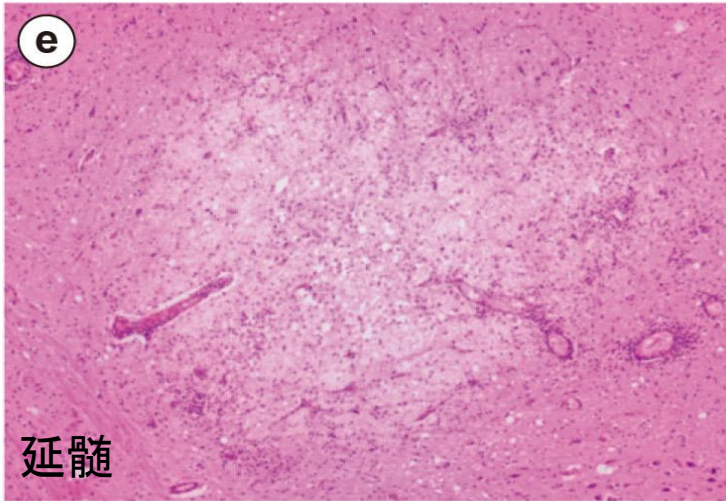


EV71感染経路



病変の局在とウイルス増殖

Enterovirus 71 encephalomyelitis



EV71関連手足口病の流行と死亡者数

発生年	国名	死亡者数
1975	Bulgaria	44
1978	Hungary	47
1997	Malaysia	34
1998	Republic of China	78
2008~2011	China	1890
2011	Vietnam	166
2012	Cambodia	63

EV71関連手足口病の流行と死亡者数

発生年	国名	死亡者数
1975	Bulgaria	44
1978	Hungary	47
1997	Malaysia	34
1998	Republic of China	78
2008～2011	China	1890
2011	Vietnam	166
2012	Cambodia	63

ポリオウイルス根絶後、警戒を要するエンテロウイルス

疑問

1. なぜ近年流行しているのか
強毒になっているのか
強毒化因子はなにか？
2. なぜ神経病原性を示すのか？
なぜ神経細胞で増殖し易いのか？

動物モデルが必要

EV71感染動物モデル

カニクイザル



病態

弛緩性マヒ

増殖部位

神経細胞

取り扱い

難しい

新生仔マウス



筋組織損傷

感受性: 生後1週間

ウイルス株依存的

筋肉

容易

EV71感染動物モデル

カニクイザル



新生仔マウス



病態

弛緩性マヒ

筋組織損傷

感受性: 生後1週間

ウイルス株依存的

増殖部位

神経細胞

筋肉

取り扱い

難しい

簡単

類似の病態を示す小動物モデルが必要

トピック

1. EV71感染モデルマウスの構築
2. 標的組織決定機構の解析

トピック1

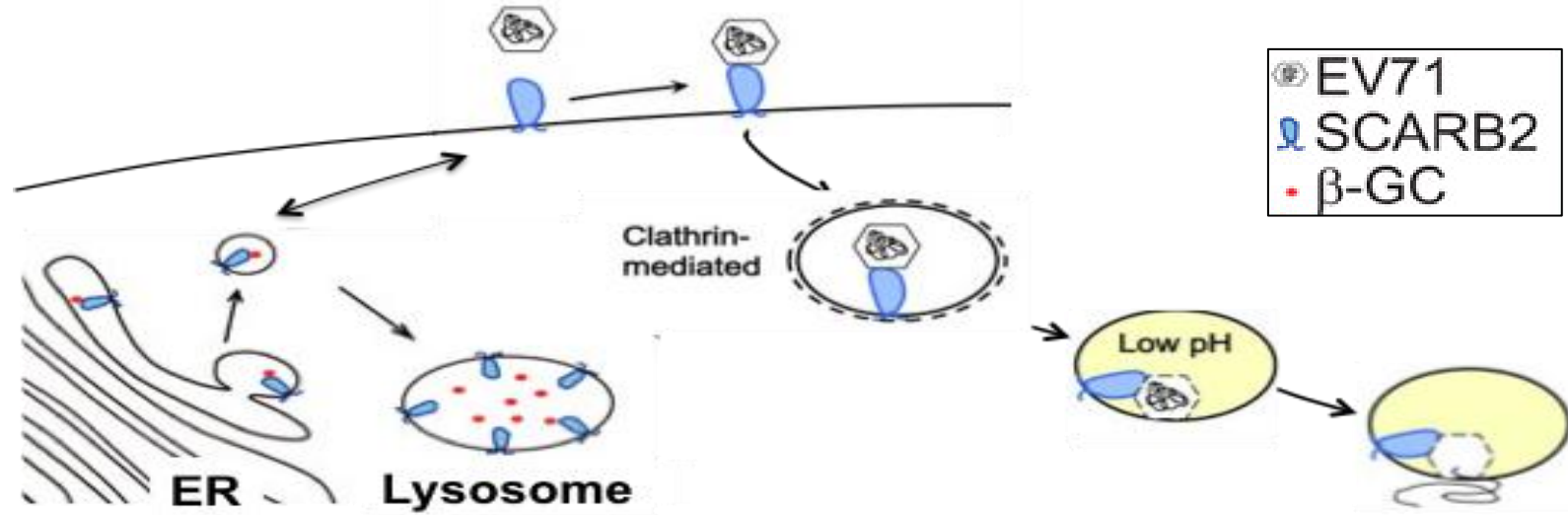
EV71感染モデルマウスの構築

- a. hSCARB2-Tgマウスの作製
- b. 毒力相関性の解析

EV71 感染受容体

SCARB2: scavenger receptor class B, member 2

Yamayoshi et al. Emerg Microbes Infect. (2014)

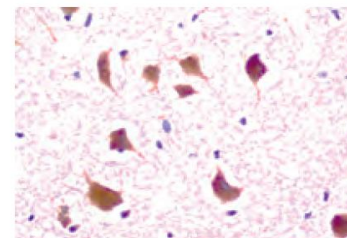
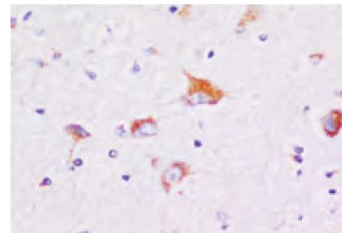
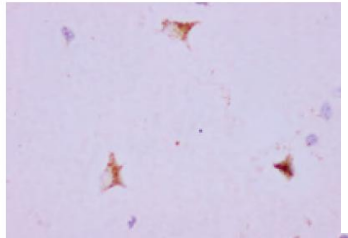
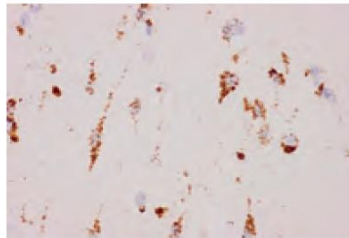


大腦皮質

視床

中腦

視床下部



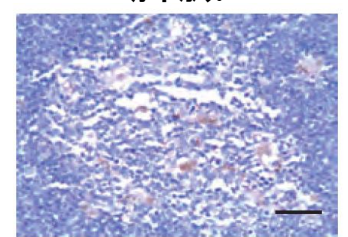
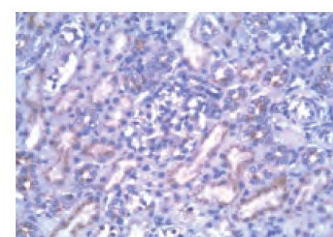
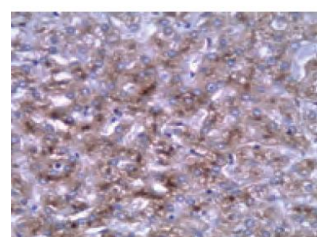
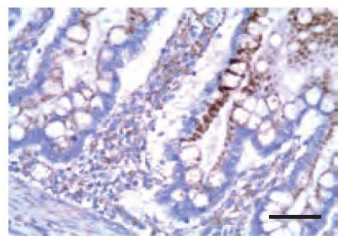
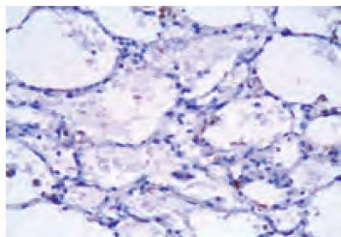
肺

小腸

肝臟

腎臟

脾臟

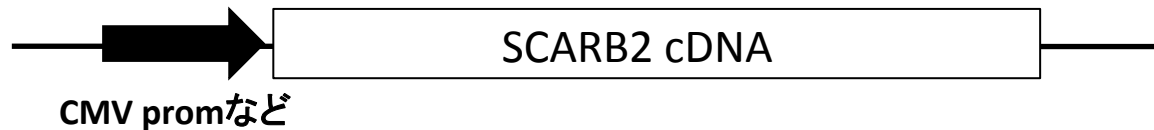


IHC; anti-hSCARB2 antibody

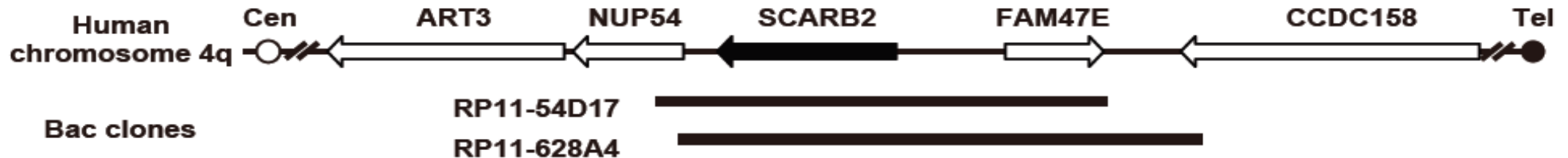
Fujii et al. PNAS (2013)

hSCARB2-Tgマウス作製方法

1. cDNAを用いる(発現量高い)

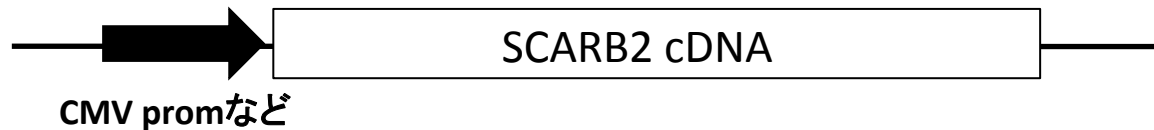


2. BACクローンを用いる(発現量は本来のプロモーターに依存)

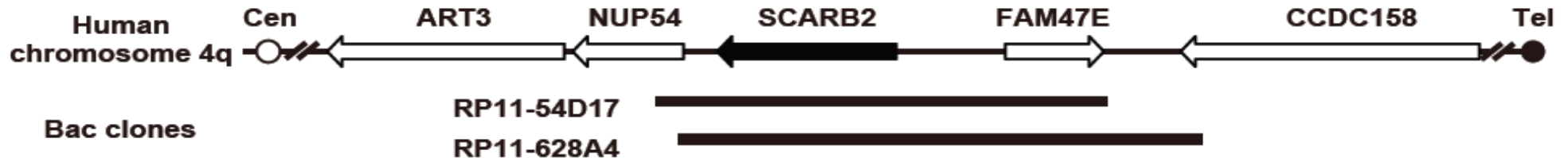


hSCARB2-Tgマウス作製方法

1. cDNAを用いる(発現量高い)



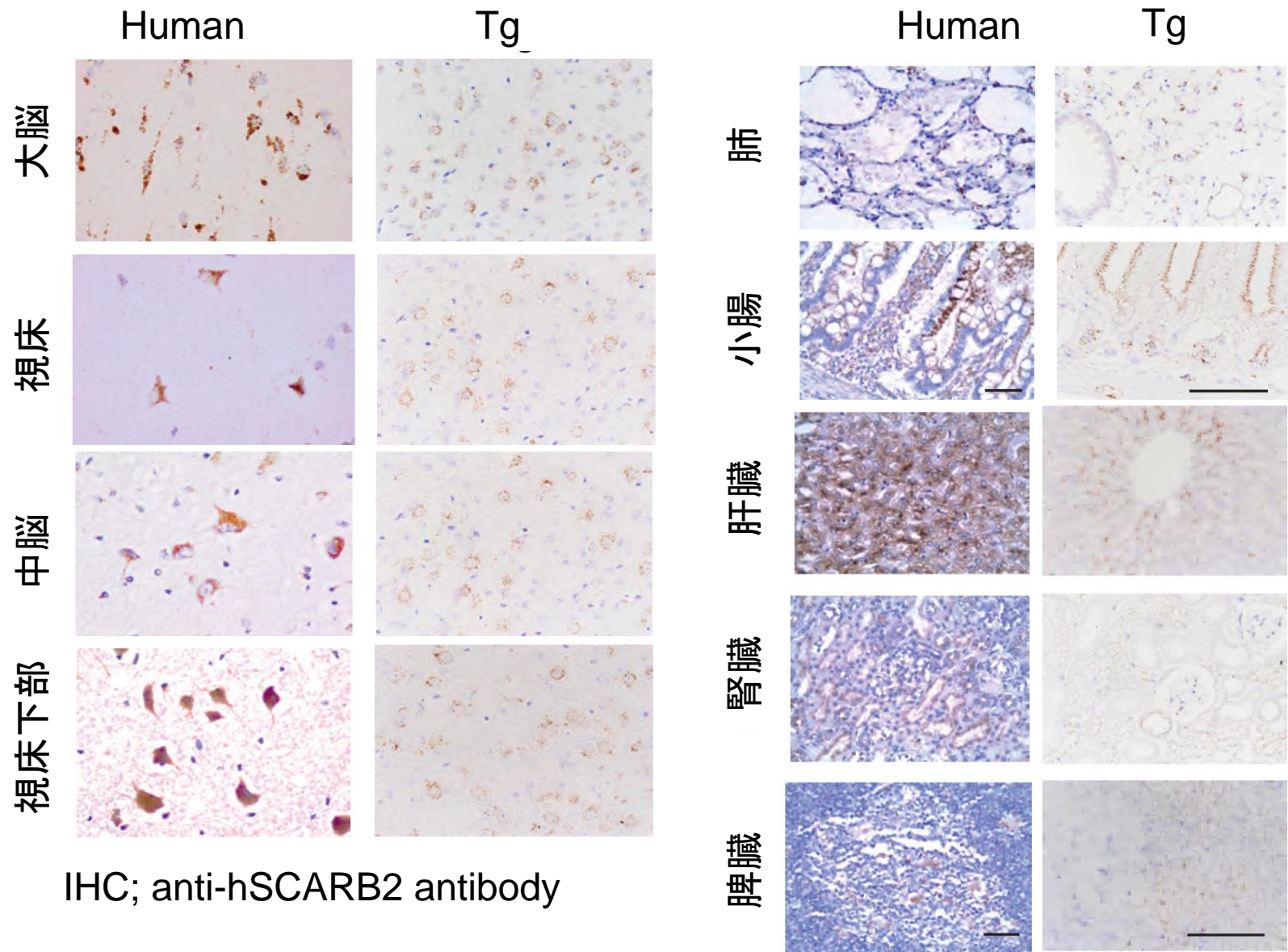
2. BACクローンを用いる(発現量は本来のプロモーターに依存)



モデルとして重要な事

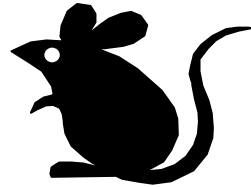
1. 病態が類似しているか
2. 標的部位は同じか

hSCARB2-TgマウスでのhSCARB2発現分布



hSCARB2-Tg は神経症状を示す

EV71
 1×10^6 TCID₅₀
Intracerebral



病態観察

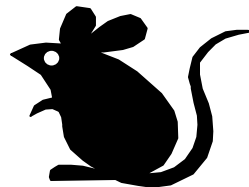
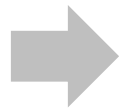
ウイルス株	発症率
Isehara	18/18
SK-EV006	3/10
BrCr	4/10
C7	5/10

神経症状発症マウス/ 接種マウス



EV71は中枢神経系で増殖する

Isehara
 1×10^6 TCID₅₀
静脈内接種



臓器回収

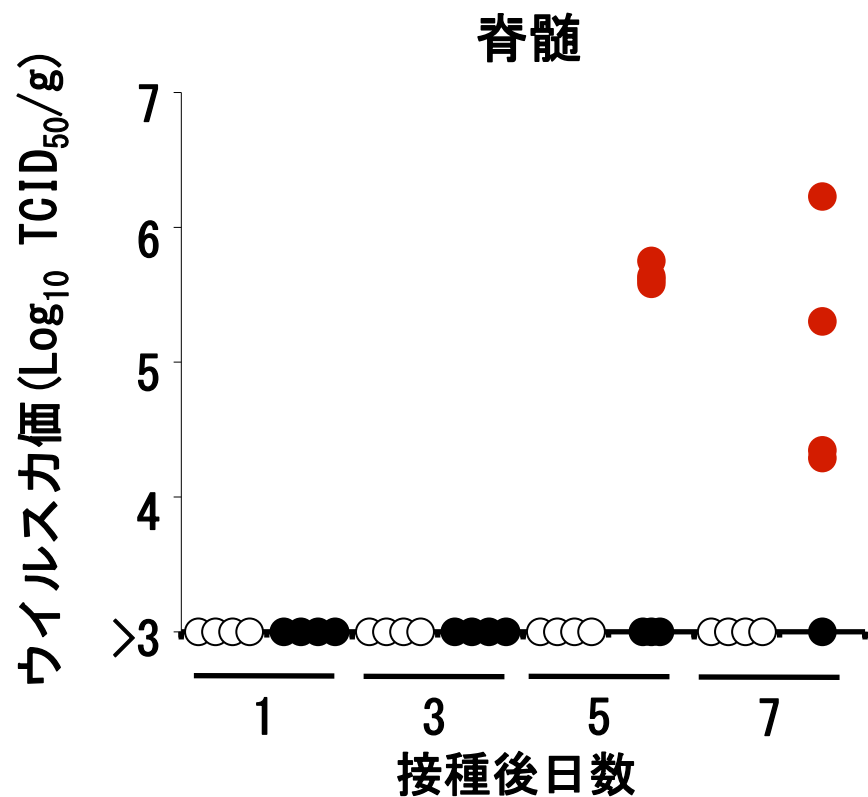
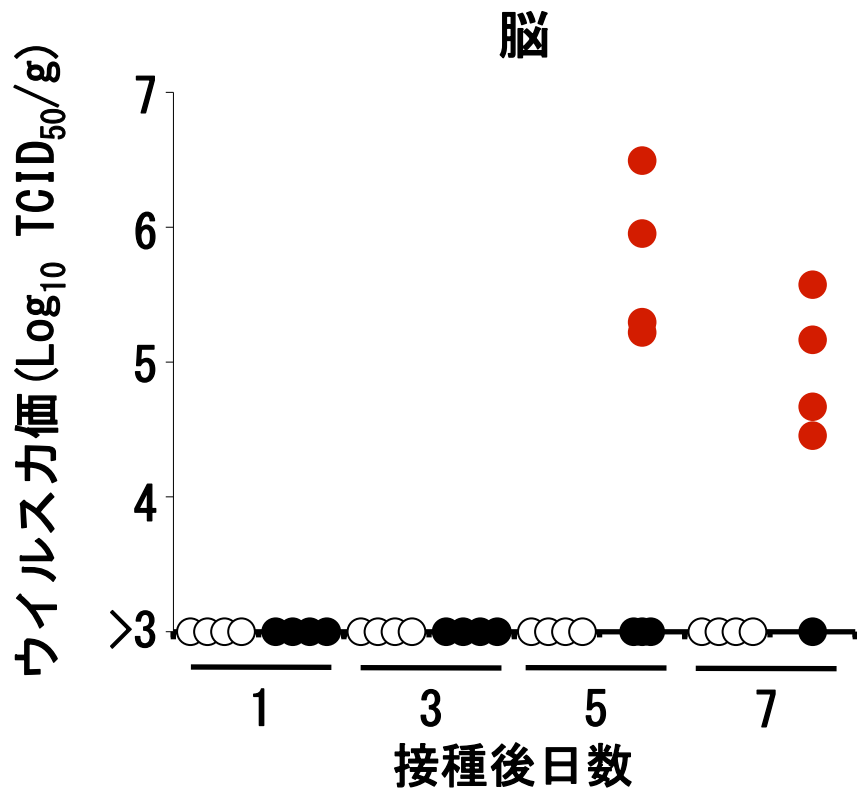


ウイルスカ価測定

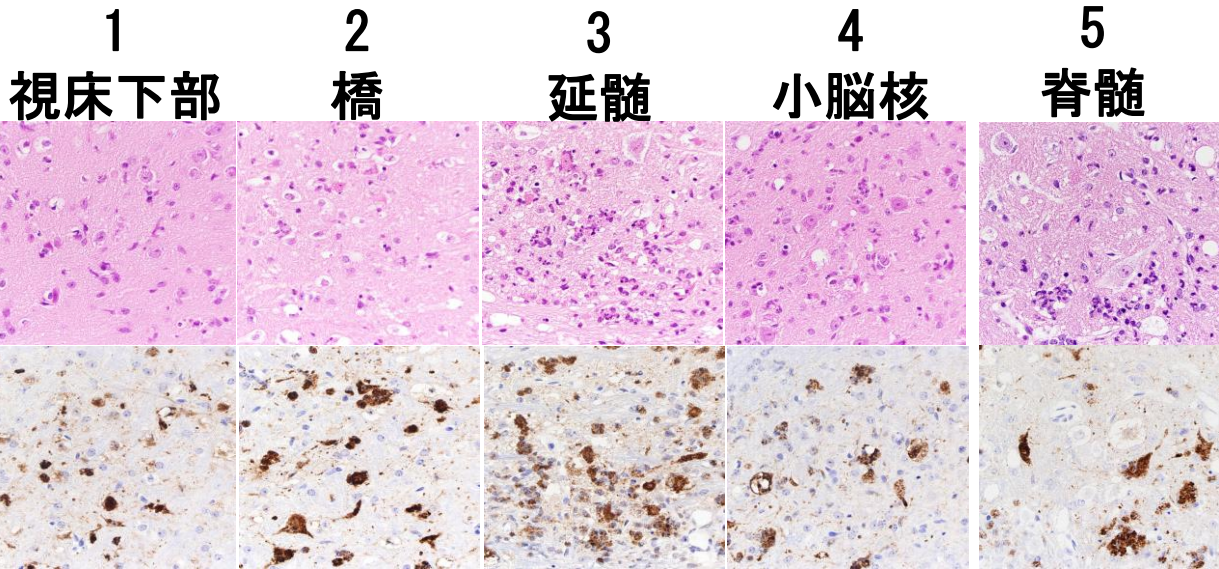
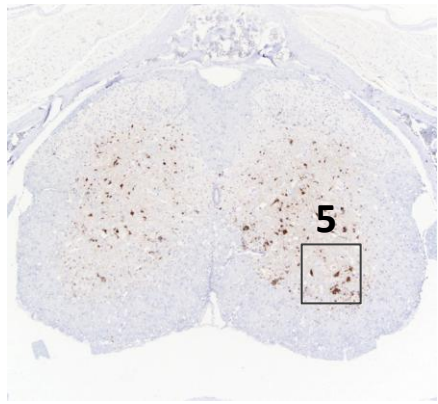
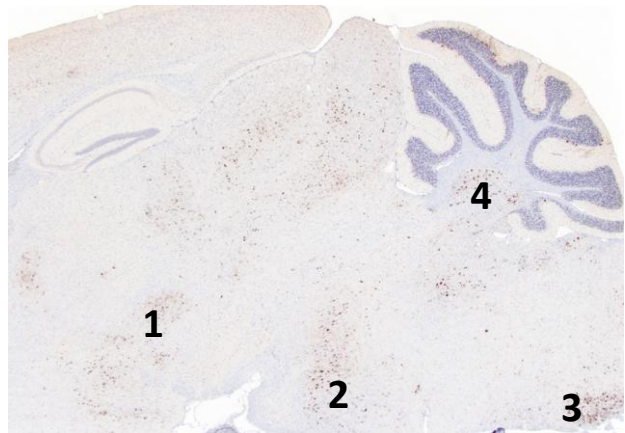
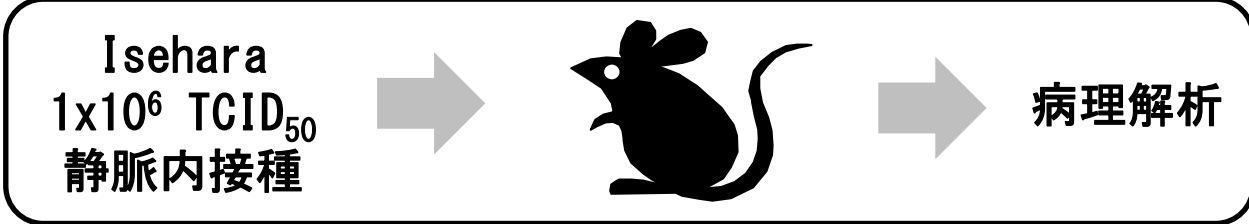
○ Non Tg

● Tg

● 神経症状を示したTg



EV71の標的は中枢神経の神経細胞である



HE

ウイルス
抗原

結論

hSCARB2-Tgマウスは神経病原性解析に適したモデルである

カニクイザル



病態

弛緩性マヒ

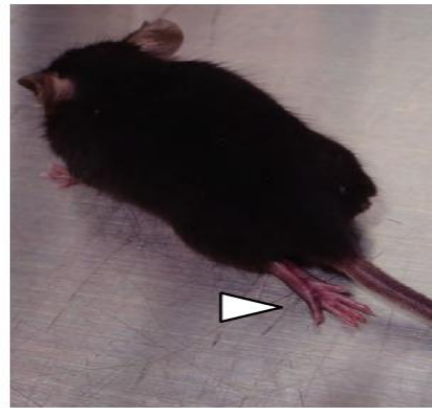
増殖部位

神経細胞

取り扱い

難しい

hSCARB2-Tg



弛緩性マヒ

神経細胞

容易

新生仔マウス



筋組織損傷

筋肉

容易

ところで.....

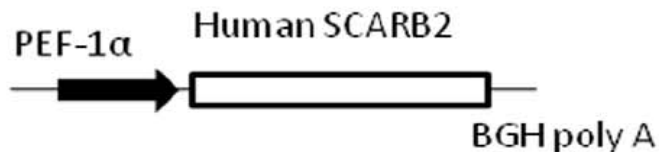
他グループのSCARB2-Tgマウス

PLOS ONE

February 2013 | Volume 8 | Issue 2 | e57591

Human SCARB2 Transgenic Mice as an Infectious Animal Model for Enterovirus 71

Yi-Wen Lin^{1,2}, Shu-Ling Yu¹, Hsiao-Yun Shao¹, Hsiang-Yin Lin¹, Chia-Chyi Liu¹, Kuang-Nan Hsiao¹, Ebenezer Chitra^{1a}, Yueh-Liang Tsou¹, Hsuen-Wen Chang¹, Charles Sia^{1,3}, Pele Chong^{1,3*}, Yen-Hung Chow^{1*}



E59-infected
Tg, N=16



N-2838-infected
Tg, N=9



ユビキタスプロモーターを使用

皮膚に発疹

中枢でも増えるけど主に筋肉

生後1週間で感受性消失

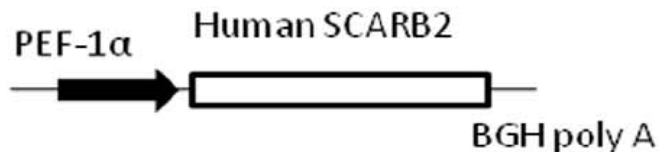
他グループのSCARB2-Tgマウス

PLOS ONE

February 2013 | Volume 8 | Issue 2 | e57591

Human SCARB2 Transgenic Mice as an Infectious Animal Model for Enterovirus 71

Yi-Wen Lin^{1,2}, Shu-Ling Yu¹, Hsiao-Yun Shao¹, Hsiang-Yin Lin¹, Chia-Chyi Liu¹, Kuang-Nan Hsiao¹, Ebenezer Chitra^{1a}, Yueh-Liang Tsou¹, Hsuen-Wen Chang¹, Charles Sia^{1,3}, Pele Chong^{1,3*}, Yen-Hung Chow^{1*}



E59-infected
Tg, N=16



N-2838-infected
Tg, N=9



ユビキタスプロモーターを使用

皮膚に発疹

中枢でも増えるけど主に筋肉

生後1週間で感受性消失

Non Tg 新生仔マウスと同じ

hSCARB2-Tgマウスは

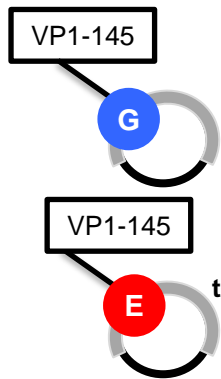
ウイルス本来の毒力を反映しているか？

hSCARB2-Tgマウスは
ウイルス本来の毒力を反映しているか？

弱毒型と強毒型のウイルスが必要

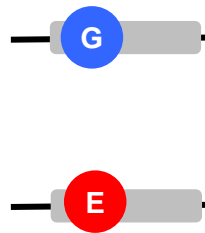
VP1-145アミノ酸変異体の毒力解析

感染性クローン



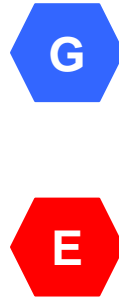
In vitro transcription

ウイルス RNAs



Transfection

組換えウイルス

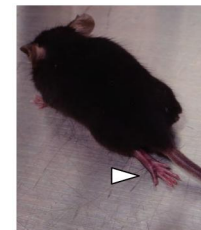


In vitro 解析

SCARB2 結合性
プラークサイズ
ウイルス増殖

In vivo 解析

病態比較
ウイルス増殖

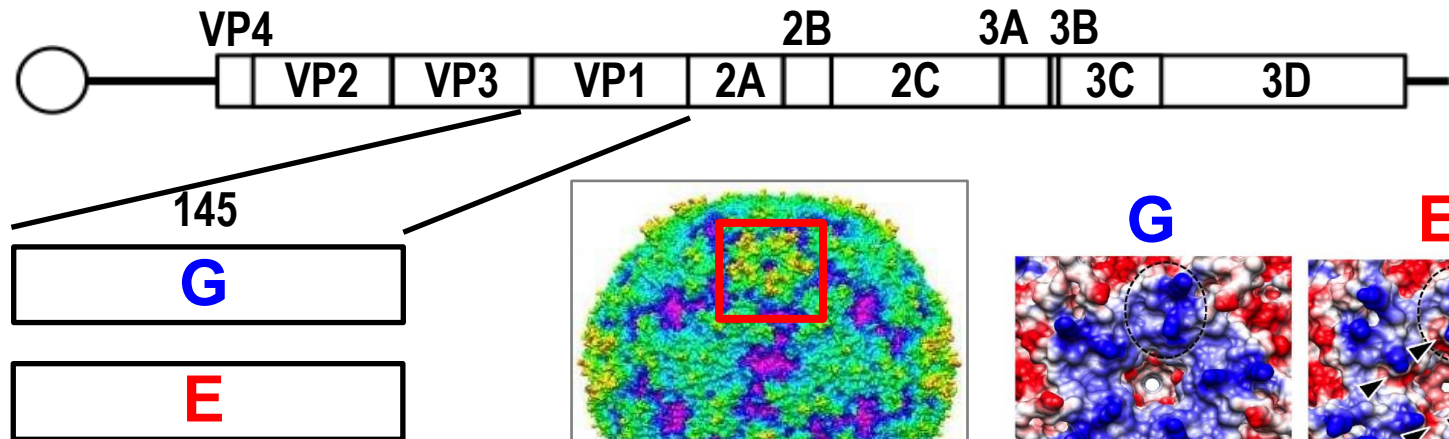


VP1-145アミノ酸によるウイルス粒子の性質変化

1. 近傍の粒子表面電荷の変化
2. 新生仔マウスへの感染性
VP1-145Eは感染性が増す。

➡ マウス馴化もしくは
毒力変化の可能性

EV71遺伝子構造

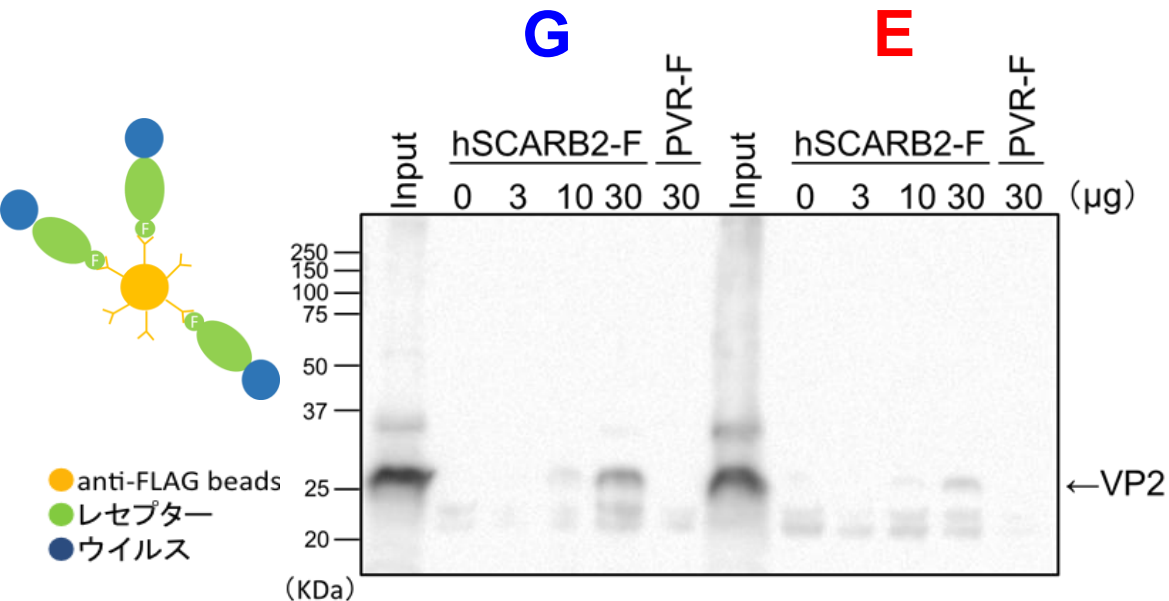


EV71粒子構造

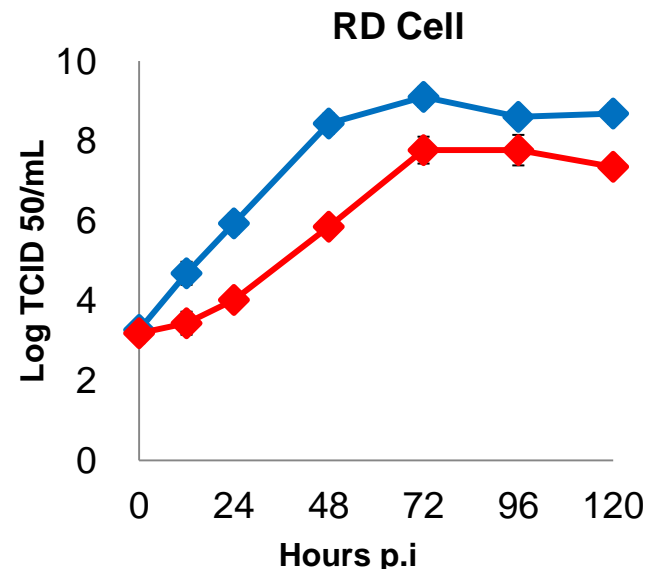
Nishimura et al. PLoS Patho (2013)

In vitro性状比較

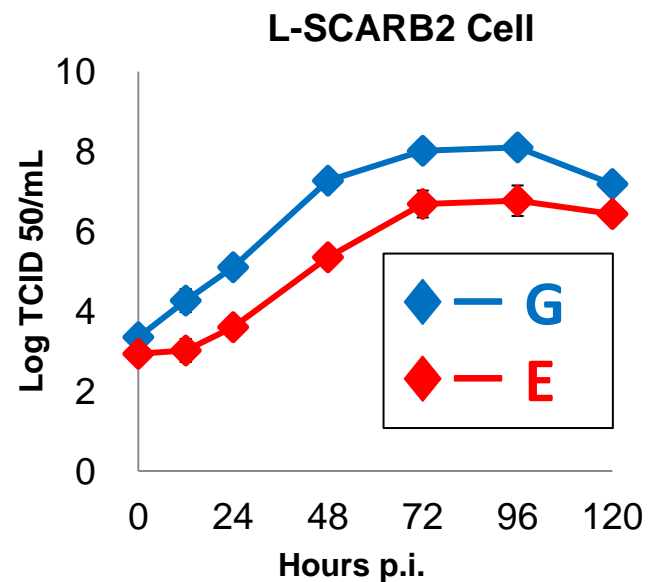
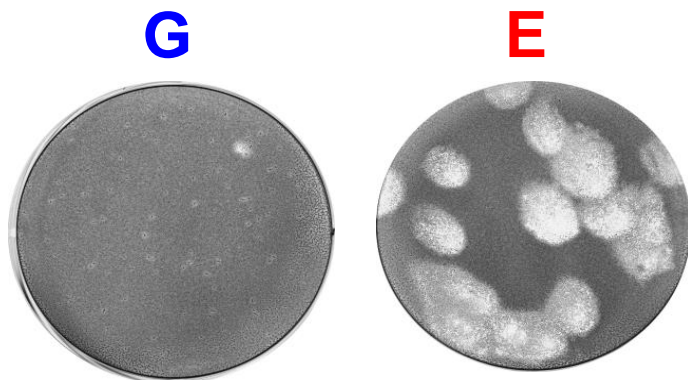
SCARB2 結合能 (G=E)



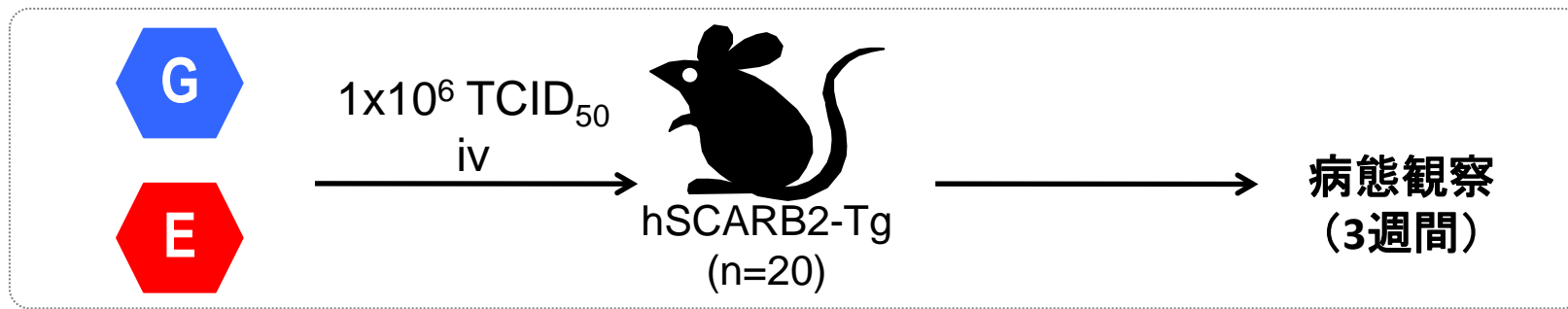
ウイルス増殖 (G≥E)



プラークサイズ (G>E)



hSCARB2-TgではEウイルスはGウイルスより強毒である



体重変化

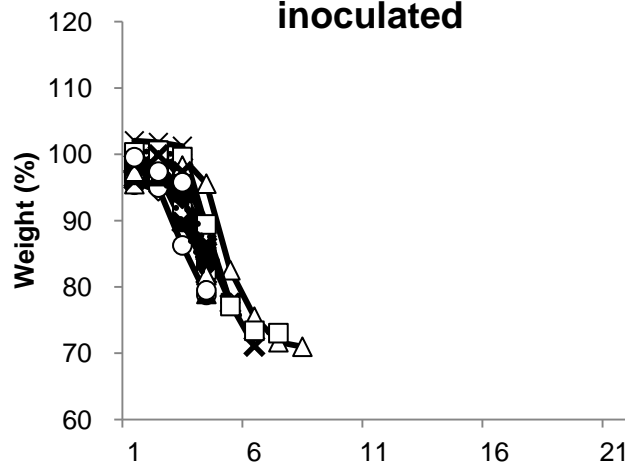
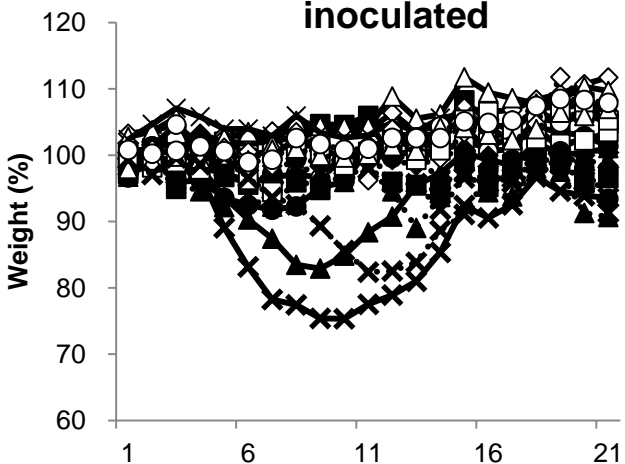
生存率

G

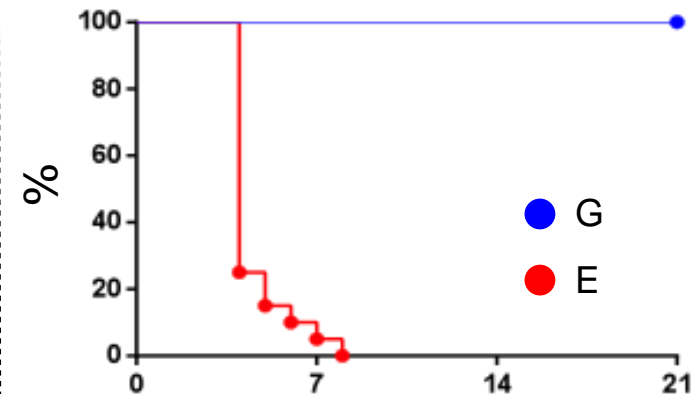
inoculated

E

inoculated

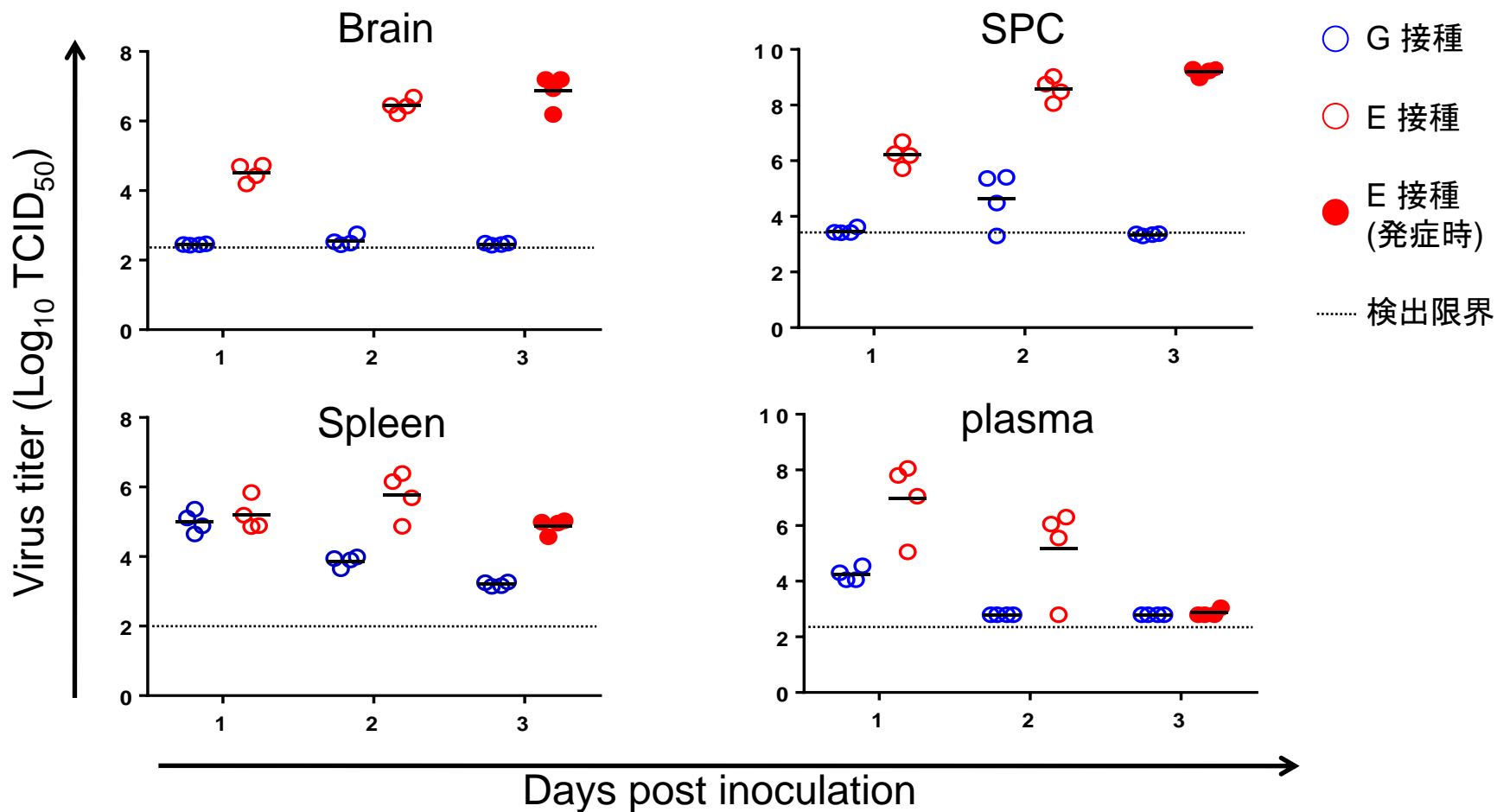
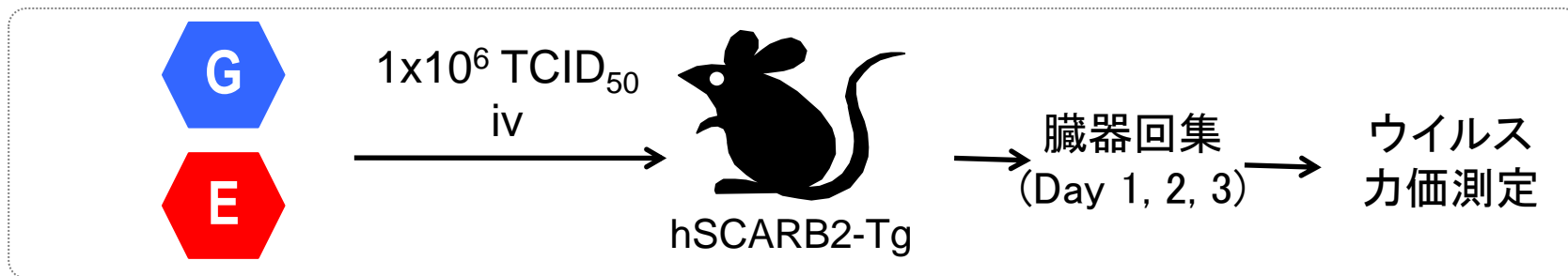


Days post inoculation



Days post inoculation

hSCARB2-TgではEウイルスはGウイルスよりよく増殖する



VP1-145組換えウイルスを用いた毒力相関性の解析

hSCARB2-Tgマウスが本来の毒力を反映するか

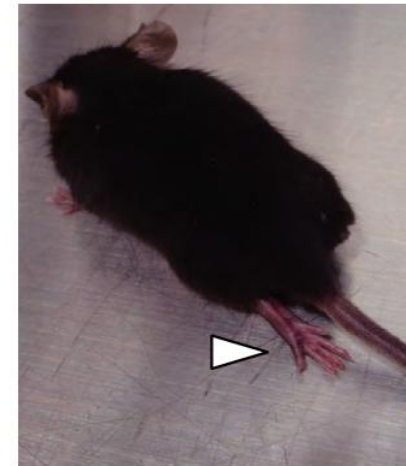
カニクイザル



?



hSCARB2-Tg

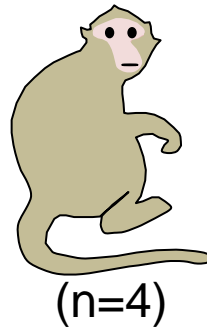


G < E

カニクイザルにおいてEウイルスはGウイルスより強毒である



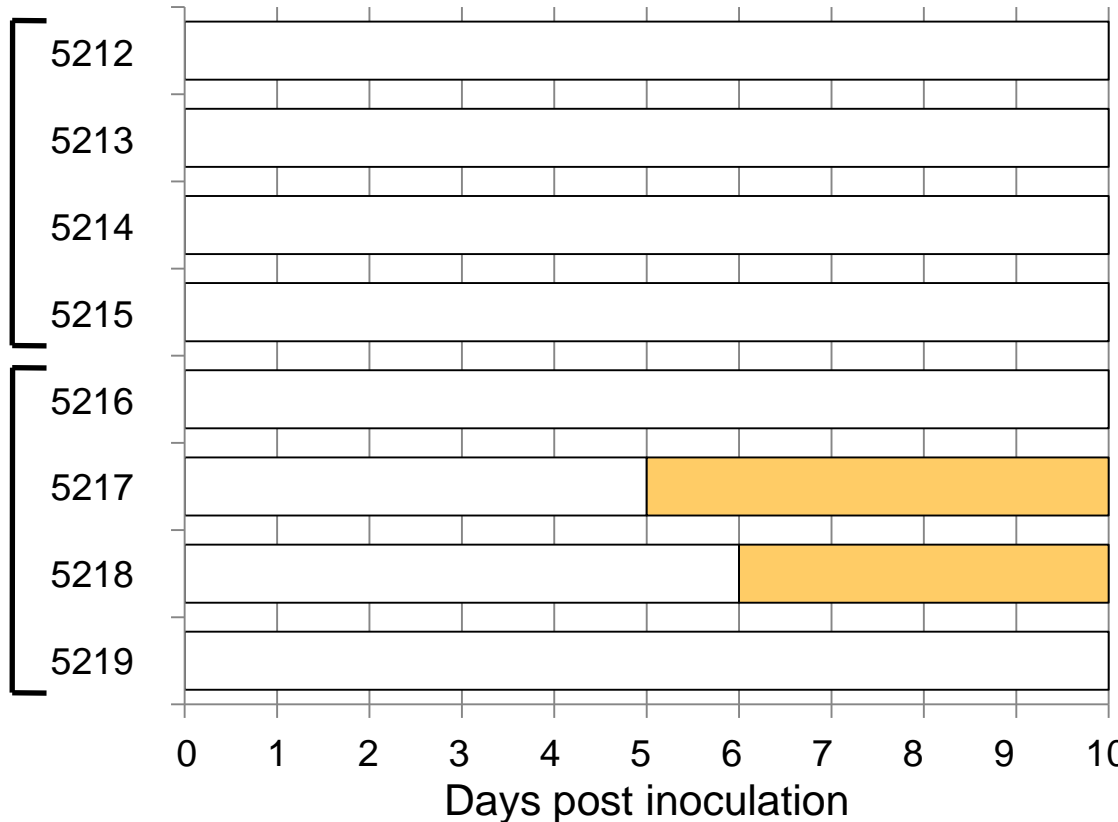
1×10^6 TCID₅₀
iv



病態観察 (10日間)
ウイルス検出



G



□ 神経症状無し
■ 神経症状(振戦)

E

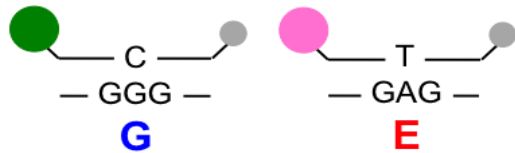
カニクイザルにおいてEウイルスはGウイルスよりよく増殖する

臨床・組織サンプル

逆転写

ウイルスゲノムPCR

SNPタイピング



検出効率の比較

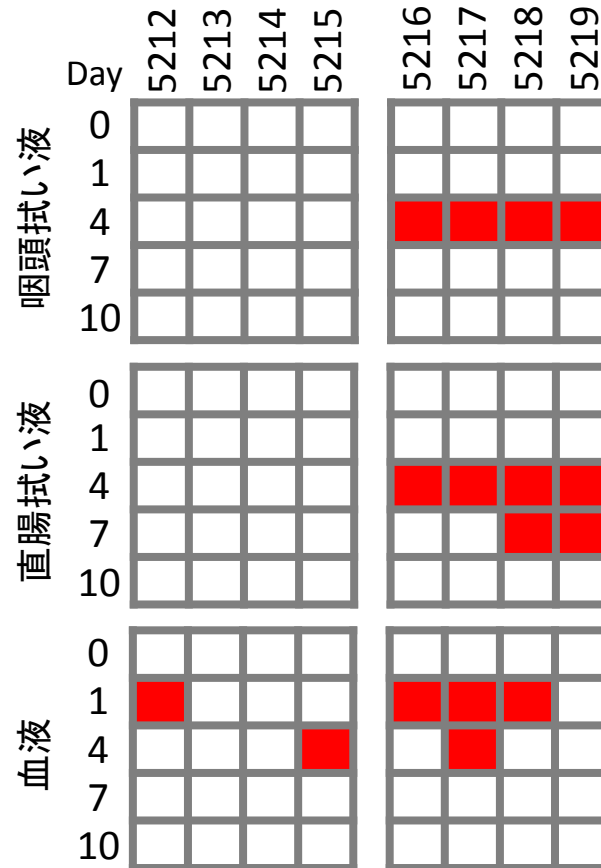
臨床サンプル

G

接種群

E

接種群



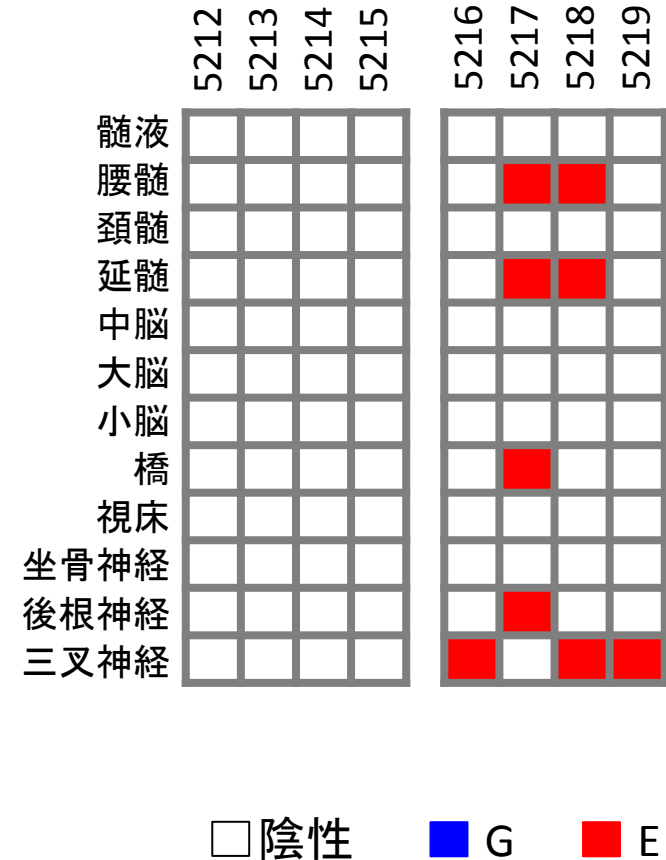
組織サンプル

G

接種群

E

接種群



腰髄膨大部の組織像

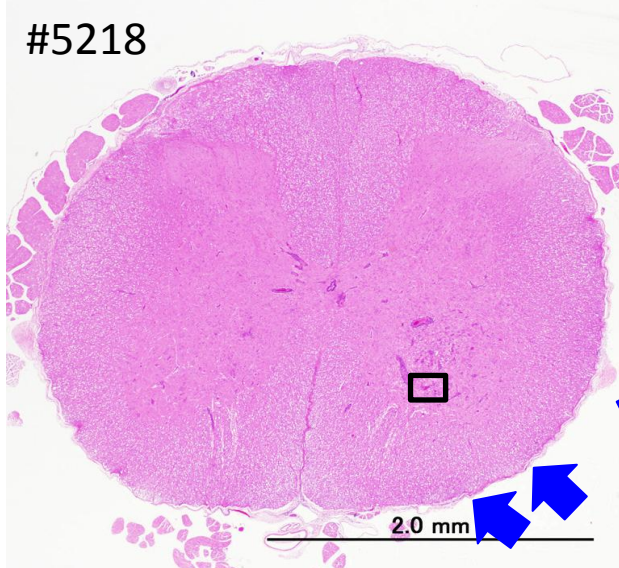
G接種

#5215

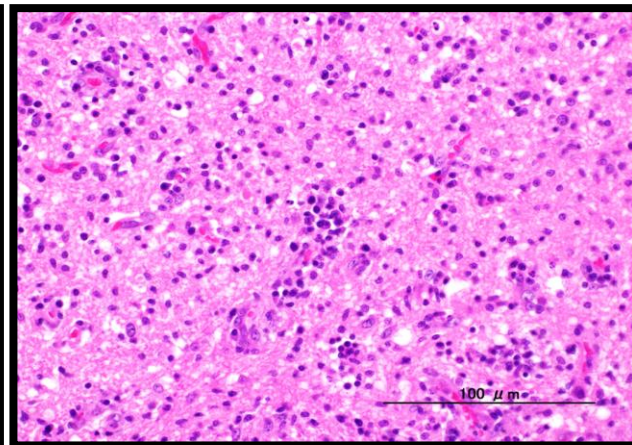
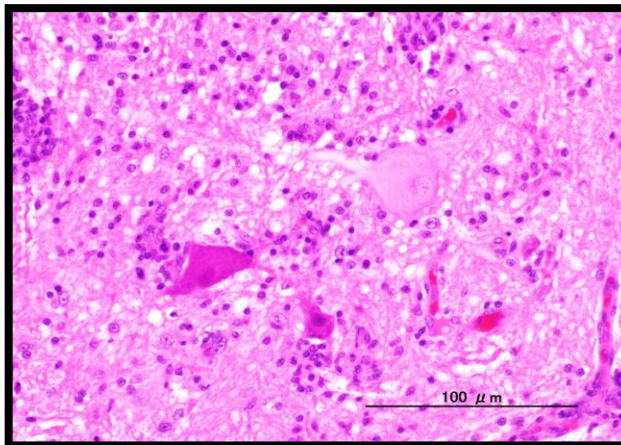
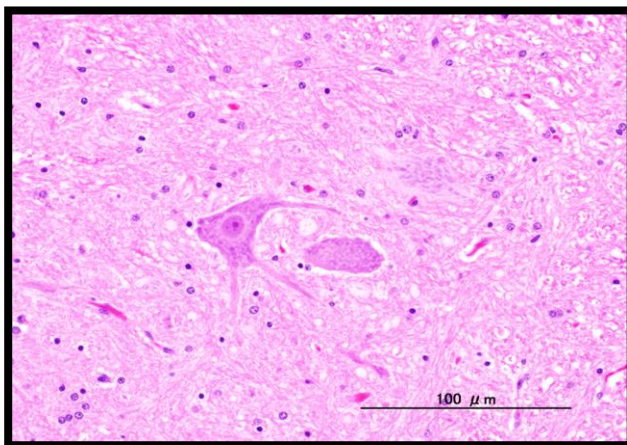
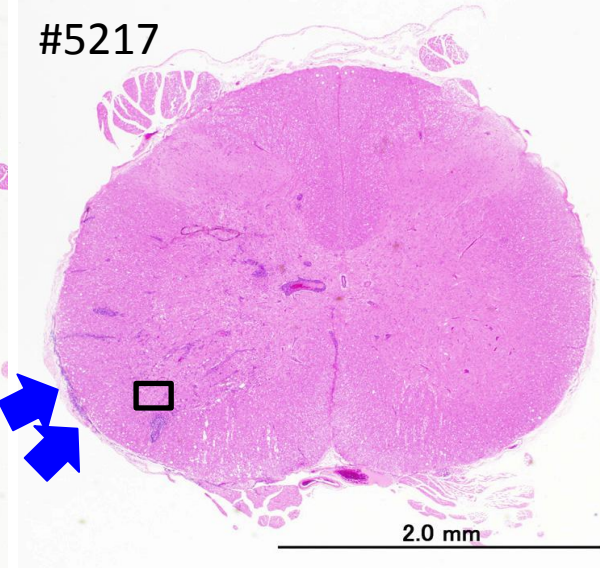


E接種

#5218



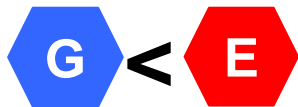
#5217



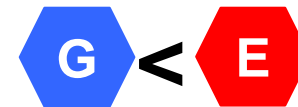
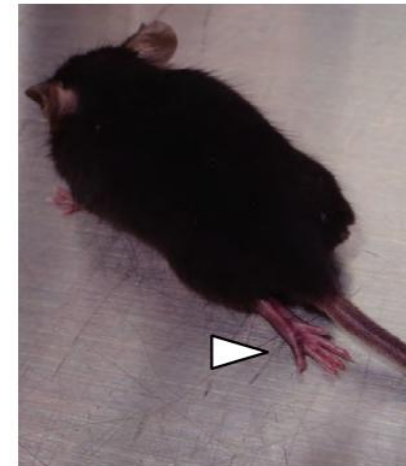
結論

hSCARB2-Tgマウスモデルは本来の毒力を反映する

カニクイザル



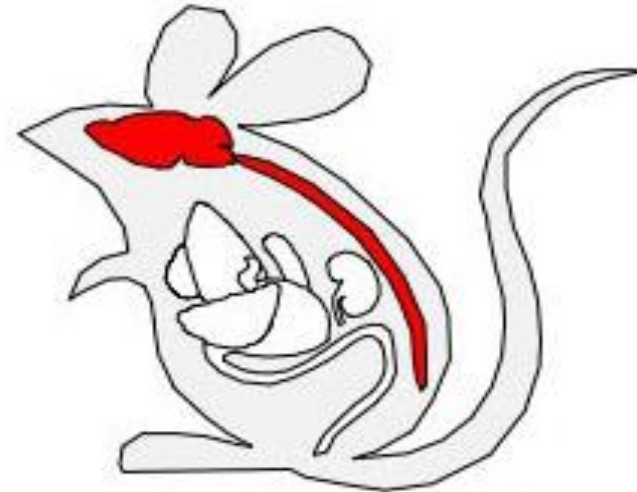
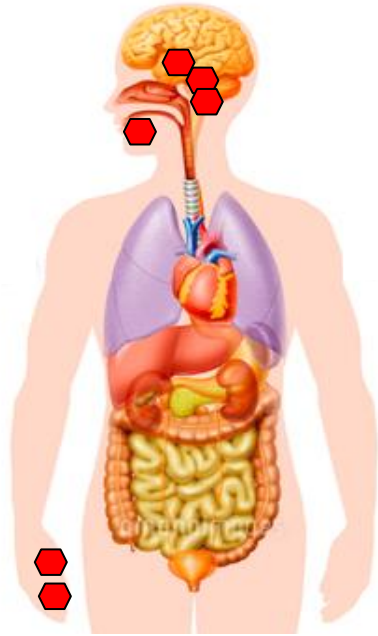
hSCARB2-Tg



トピック2

標的組織決定機構の解析

EV71標的組織決定機構



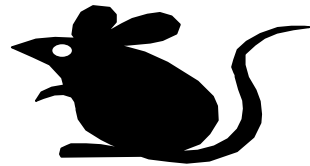
ウイルス受容体は全身で発現

**なぜ神経系でよく増えるのか
なぜ非神経系で増えにくいのか**

標的組織決定に関わる因子

	中枢	非中枢
増殖に必要な因子	高	低
インターフェロン	低	高

EV71感染により型IFNが産生される



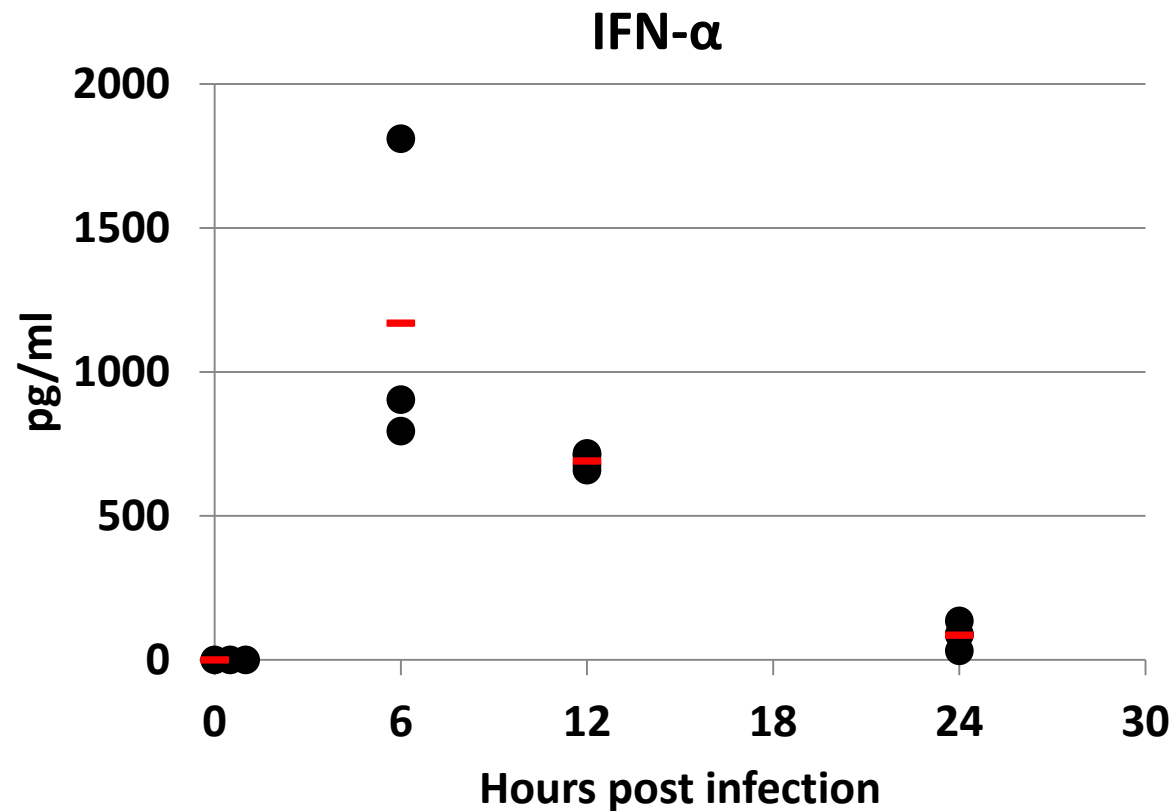
1×10^6 TCID₅₀
静脈内



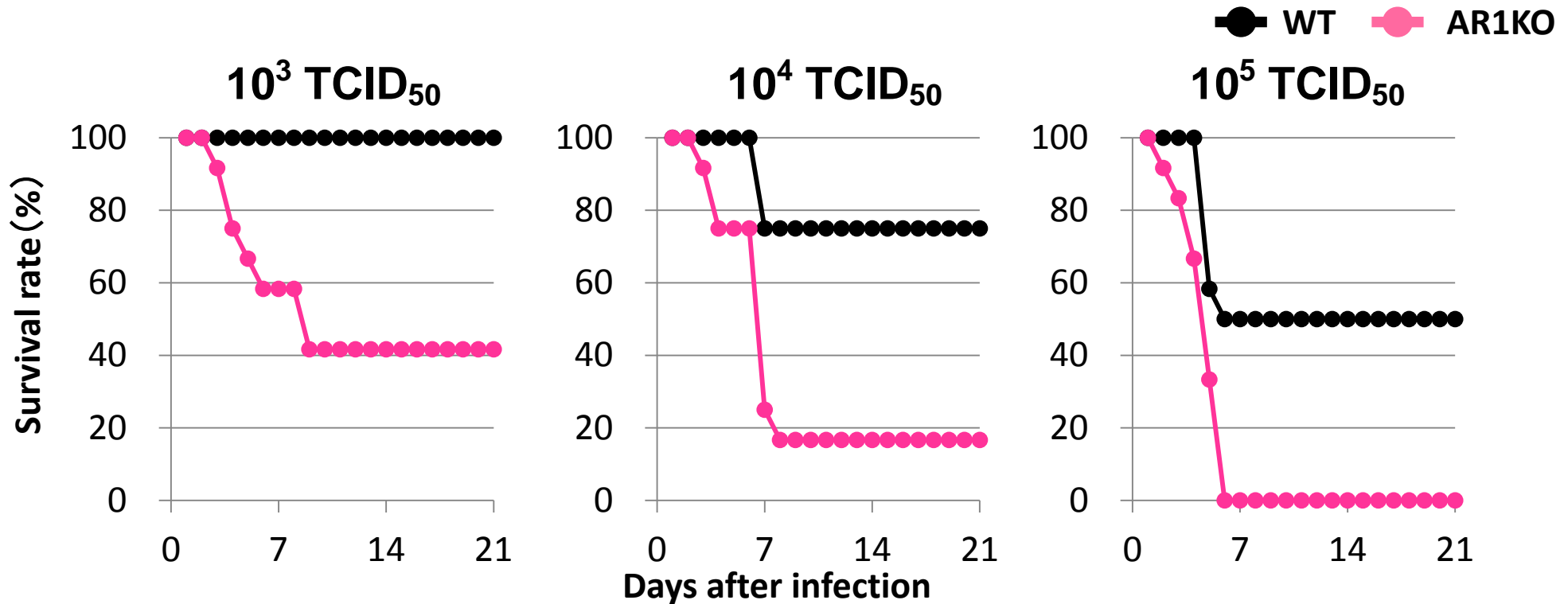
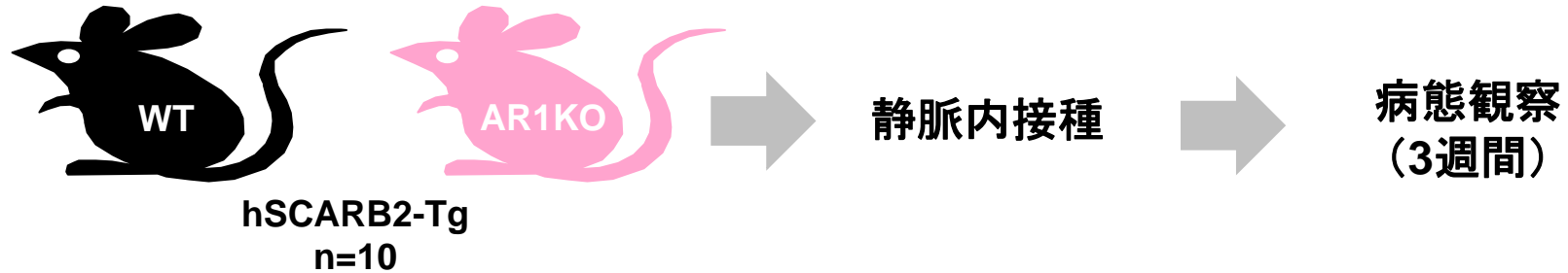
採血
(0, 6, 12, 24h)



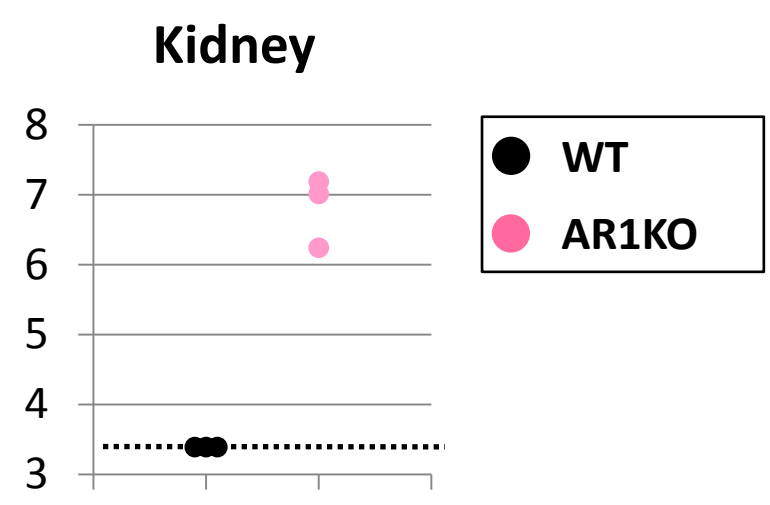
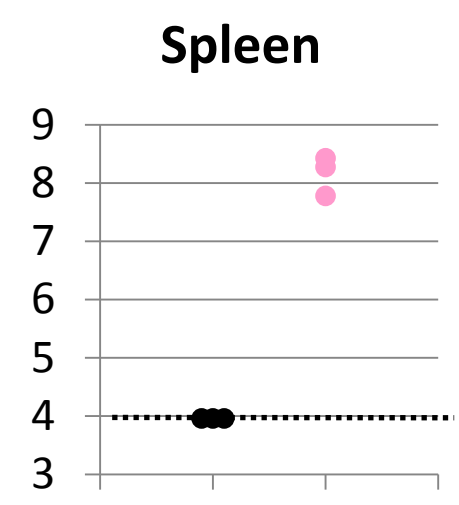
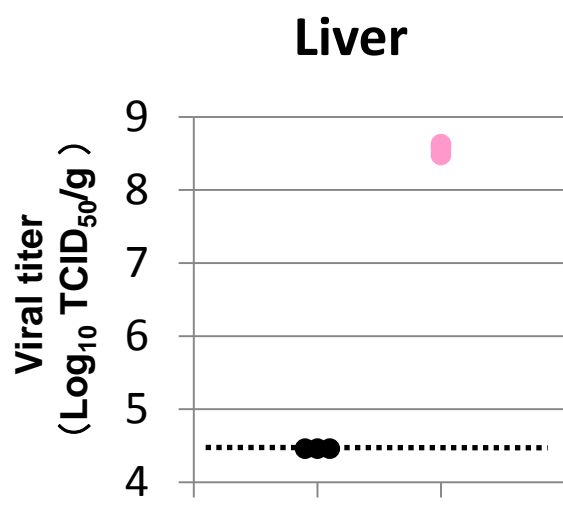
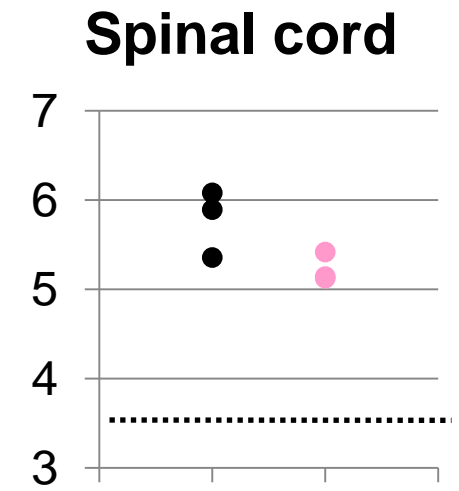
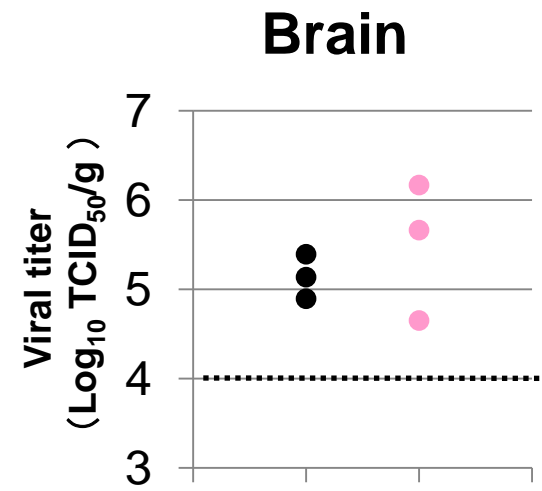
IFN- α 測定
(ELISA)



I型IFNはEV71感染制御に重要である



I型IFNは非神経組織のEV71増殖を抑制する



● WT
● AR1KO

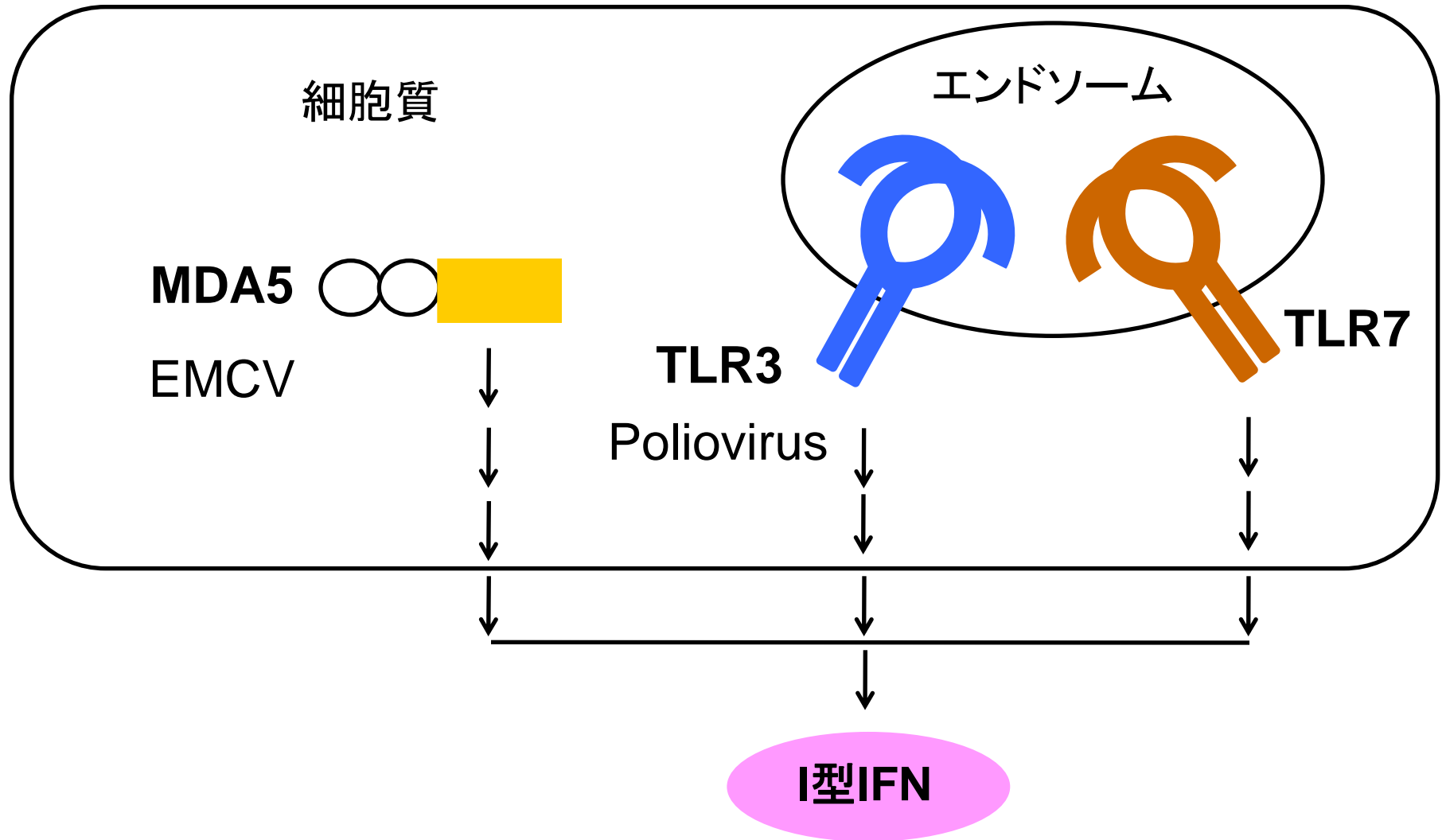
..... 検出限界

結論

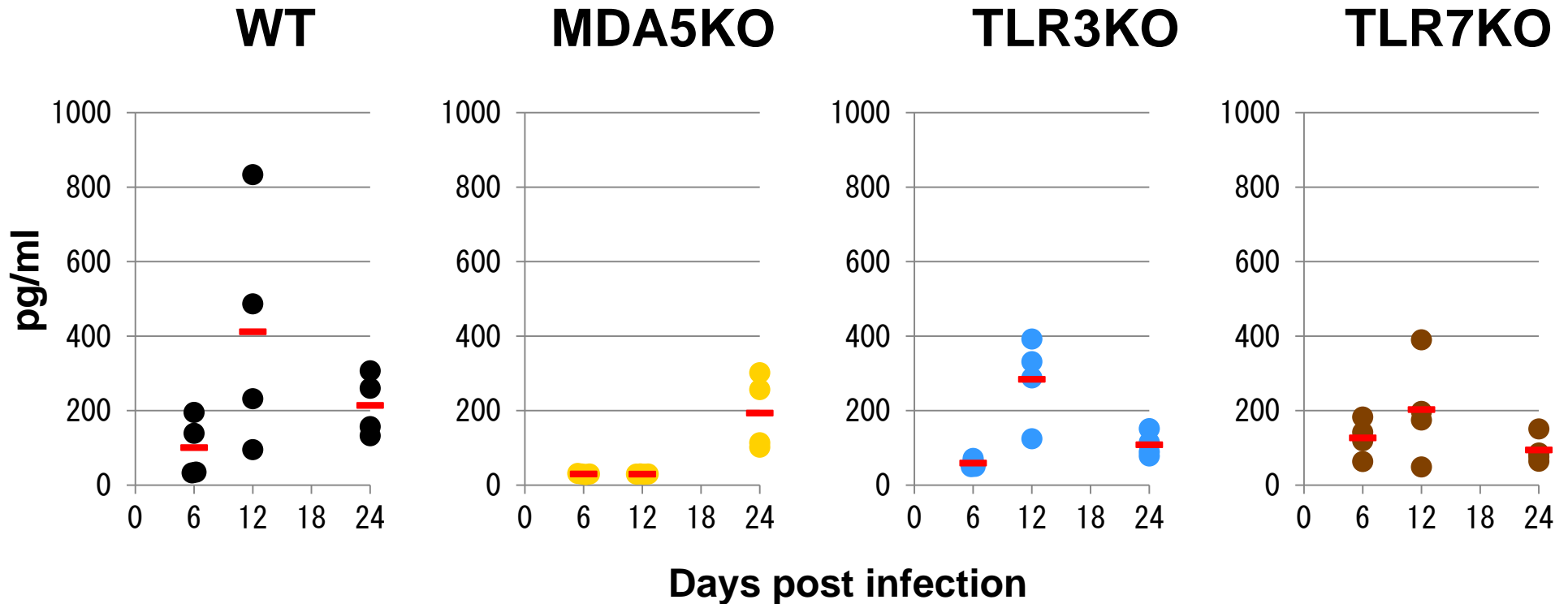
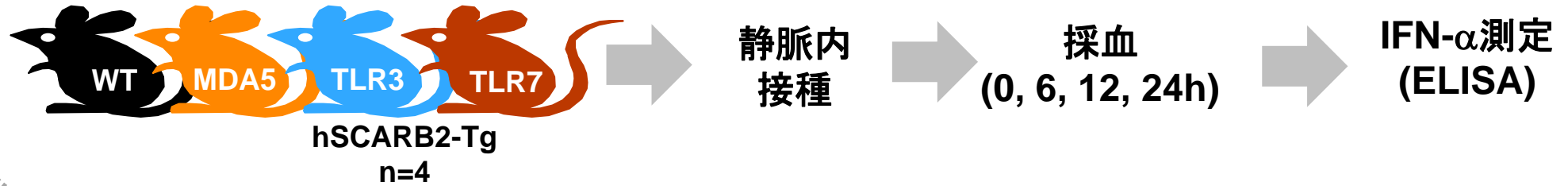
IFNはEV71の非神経系での増殖を抑制している

EV71認識機構は何か？

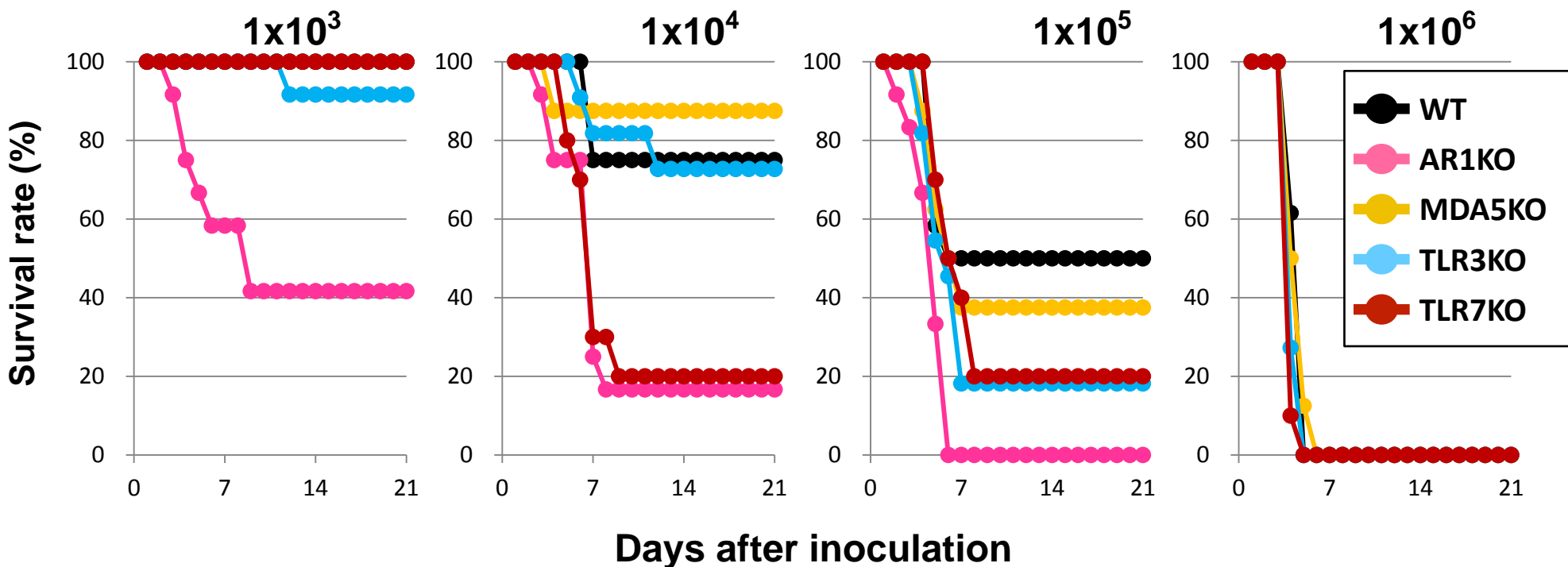
RNAウイルスを認識するセンサー分子



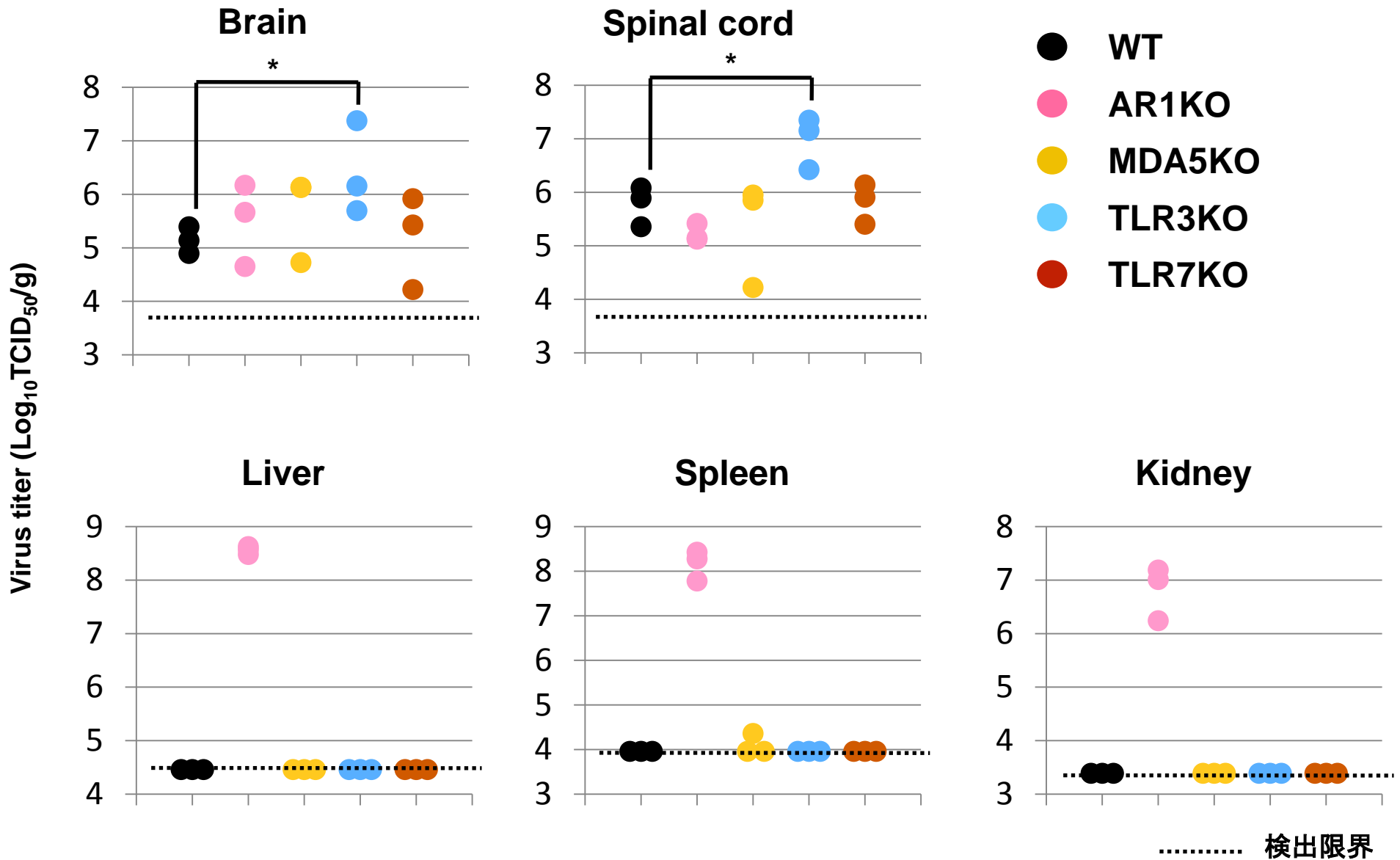
MDA5は早期のI型IFN産生に重要である



TLR7KOはEV71感染の感受性が高くなる

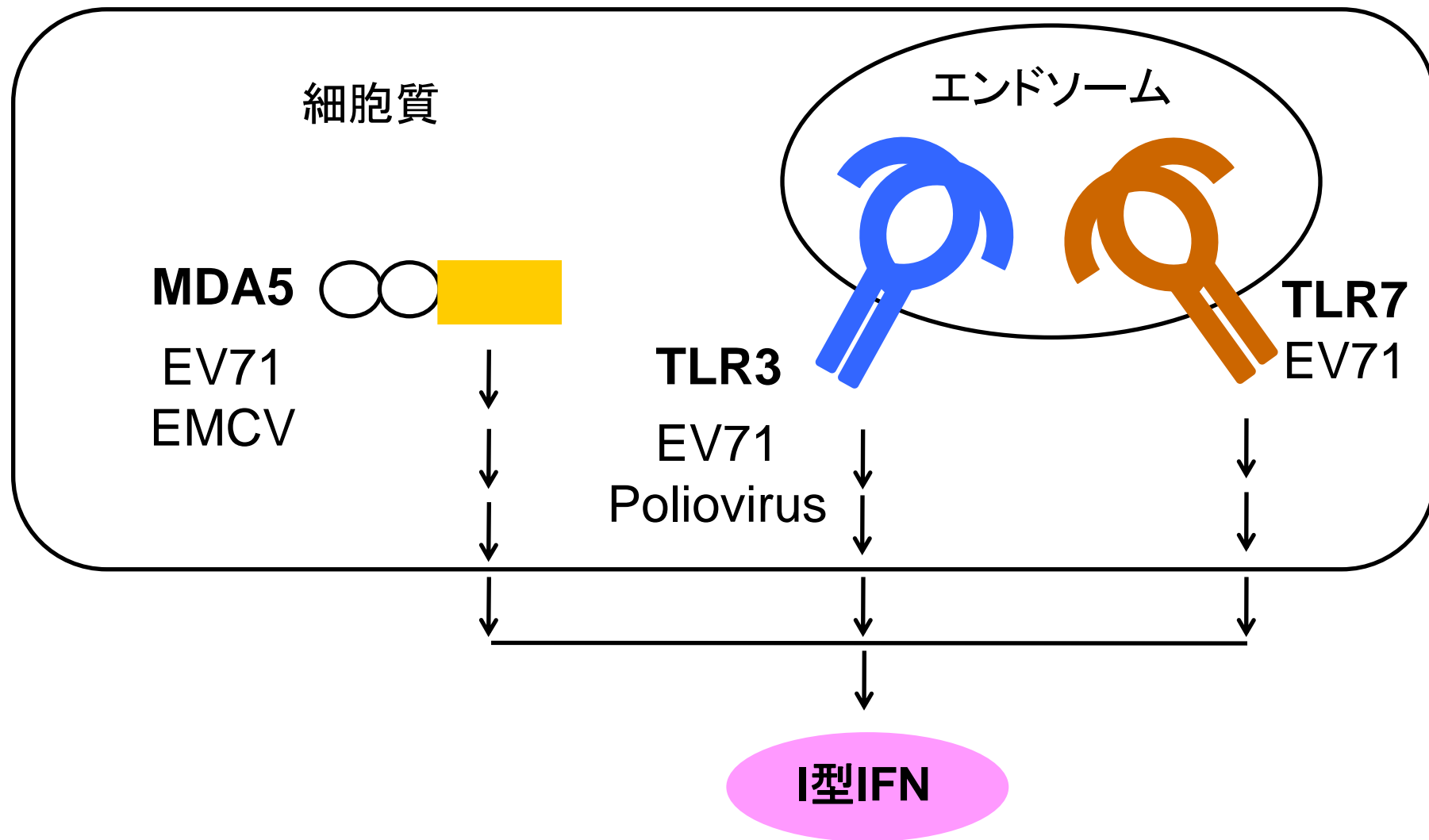


TLR3KOでは中枢神経系でのEV71増殖が高くなる



結論

各RNAセンサーがEV71感染認識に関わっている



今後

- **毒力決定因子の同定**
ウイルス粒子構造変化
- **標的組織決定機構**
自然免疫機構との関連

謝辞

都医学研

ウイルス感染PT

小池智
大久保絢子
市ノ川由莉
雨森秀介
巢鷹祐衣
猪村亜弓
中山渚

国立感染研

ウイルス第2部

清水博之
片岡周子

感染病理部

永田典代
鈴木忠樹
岩田奈織子
小谷治

動物管理室

網康至
須崎百合子