

トピックス

1. ヒトパレコウイルス受容体 MYADM の同定

渡 邊 香奈子¹⁾, 藤 井 雅 寛²⁾

1) 新潟大学大学院保健学研究科
2) 新潟大学大学院医歯学総合研究科

はじめに

ヒトパレコウイルス (human parechovirus, PeV-A) は、ピコナウイルス科パレコウイルス属に分類される一本鎖 (+鎖) RNA をゲノムにもつウイルスである。現時点で、19 種類の遺伝子型 (PeV-A1 ~ A19) が同定されているが、そのうち 6 種類 (PeV-A1 ~ A6) がウイルスとして分離され、それ以外は核酸によって検出された (https://www.picornaviridae.com/paavivirinae/parechovirus/parechovirus_a/parechovirus_a_seqs.htm)。

臨床検体から検出される頻度が高いのは PeV-A1 と PeV-A3 である (図 1)。PeV-A1 は毎年検出されるが、大きな流行は観察されていない。PeV-A1 は夏から秋にかけて最も多く検出されるが、年間を通して検出され、多い年は年間 100 例前後である。一方、PeV-A3 は 2014 年までは 2 ~ 3 年ごとに流行を繰り返し、6 ~ 8 月に集中して検出され、流行年には年間 300 例前後が検出されていたが、2016 年以降は 4 年連続で PeV-A3 が検出され、5 月と 9 月に検出が増加しており、PeV-A3 感染の流行が変化した可能性が示唆される。

PeV-A3 を含む PeV-A の多くの遺伝子型は、主に乳幼児に感染し、胃腸炎、上・下気道感染症、発疹などの概して軽度の感染症を引き起こす。ところが、PeV-A3 は、他の遺伝子型とは異なり、新生児や早期乳児に敗血症や髄膜炎などの重篤な感染症を引き起こすことがあり¹⁾、神経学的後遺症や死亡例も報告されている¹⁾。しかしながら、

PeV-A3 感染症が他の PeV-A 感染症よりも重症化する分子メカニズムは不明である。

ウイルス受容体は細胞や組織におけるウイルスの感染特異性に関与し、ウイルスの病原性に重要な役割を果たしている。我々は、PeV-A3 感染症に特異的な重症化機構を解明するため、PeV-A3 受容体の同定を試み、MYADM (myeloid-associated differentiation marker, 骨髄関連分化マーカー) をヒトパレコウイルスの受容体と同定した²⁾。

各種培養細胞株の PeV-A3 感受性

ヒト由来 8 株、サル、ハムスター、マウス由来各 1 株の合計 11 種類の培養細胞株について、PeV-A3 感受性を検討した。ヒト細胞株では、HuTu-80 細胞、HeLa 細胞、C33A 細胞、SW620 細胞、SH-SY5Y 細胞、293T 細胞の 7 株が PeV-A3 に感受性を示し、中でもヒト十二指腸由来の HuTu-80 細胞が最も感受性が高かった。一方、Saos2 細胞と Jurkat 細胞は PeV-A3 に対して非感受性であった (図 2)。

サル由来の LLC-MK2 細胞は HuTu-80 細胞と同等の高い PeV-A3 感受性を示したが、ハムスター由来の BHK-21 細胞とマウス由来の NIH/3T3 細胞は PeV-A3 に感受性を示さなかった。これらの結果は、PeV-A3 はヒトおよびサルの細胞には感染するが、げっ歯類 (ハムスター、マウス) の細胞には感染しないこと、また PeV-A3 がヒトの様々な組織由来の細胞株に感染することを示している。

PeV-A3 受容体分子の単離

PeV-A3 感染に関与する細胞遺伝子を同定するため、CRISPR/Cas9 を用いてゲノムワイドなノックアウトスクリーニングを行った。このスクリーニングを成功させるためには、PeV-A3 感染によって完全に死滅する PeV-A3 高感受性細胞を使用することが有効である。そこで、スクリーニングに HuTu-80 細胞を使用した。

HuTu-80 細胞にヒトゲノムノックアウトライブラリーを組み込んだレンチウイルスを感染させ、さらに、

連絡先

〒951-8518
新潟県新潟市中央区旭町通 2 番町 746 番地
新潟大学 大学院保健学研究科
TEL/FAX: 025-227-0953
E-mail: kwatanabe@clg.niigata-u.ac.jp

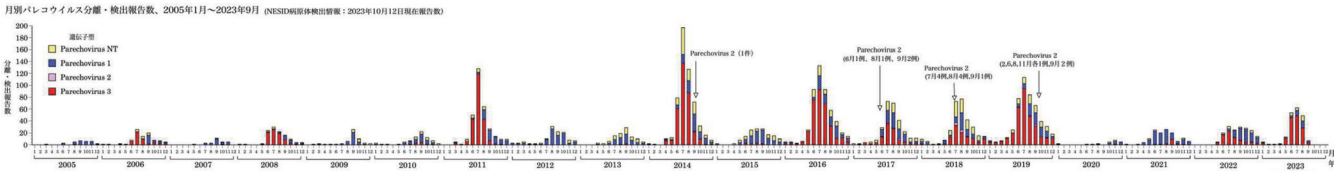


図1 日本における PeV-A の分離・検出報告数 (2023 年 10 月 12 日現在)
IASR Topics グラフ (パレコウイルス) より転載.
https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/rapid/topics/parecho/160817/parecho1_231012.gif

	由来	細胞	PeV-A3の産生
ヒト	十二指腸腺癌	HuTu-80	++ +
	子宮頸癌	HeLa	++
	子宮頸癌	C33A	+
	大腸腺癌	SW620	+
	神経芽細胞種	SH-SY5Y	+
	胚性腎	293T	+
	急性T細胞白血病	Jurkat	-
	骨肉腫	Saos2	-
サル	腎臓	LLC-MK2	+++
ハムスター	腎臓	BHK-21	-
マウス	胎児	NIH/3T3	-

図2 各種培養細胞株の PeV-A3 の感受性
+/- は PeV-A3 の産生の有無を示す. + の数が多いほど PeV-A3 産生量が多いことを示す.

PeV-A3 を感染させた. 合計 3 回の PeV-A3 感染後, 生残細胞を回収した (図 3). 生残細胞中のノックアウト遺伝子に対応する gRNA を, 次世代シーケンス解析で定量したところ, 最もノックアウトされた遺伝子は MYADM であった. そこで, PeV-A3 感染における MYADM の役割を解析した.

PeV-A3 はヒト MYADM を発現する細胞に感染し, 増殖する

PeV-A3 感受性の高い HuTu-80 細胞と感受性の低い 293T 細胞で MYADM 遺伝子をノックアウトし, ノックアウト細胞の PeV-A3 感染を検討した. MYADM をノックアウトした HuTu-80 細胞と 293T 細胞には PeV-A3 は感染せず, 感染性ウイルスの産生は観察されなかった (図 4a). 一方, PeV-A3 は BHK-21 細胞には感染しないが,

ヒト MYADM 遺伝子を導入した BHK-21 細胞 (BHK-MYADM, BHK-NF-MYADM, BHK-CF-MYADM) に, PeV-A3 は感染性を示し, 感染性ウイルスの産生が観察された (図 4b). これらの結果は, MYADM が PeV-A3 の感染および増殖に必須であることを示している.

次に, PeV-A3 蛋白質が MYADM に結合するかどうかを検討した. N 末端または C 末端に FLAG タグを付加したヒト MYADM 蛋白質 (NF-MYADM, CF-MYADM) を発現する BHK 細胞と PeV-A3 を 4℃ で 1 時間反応させた. 細胞を洗浄した後, これらの細胞から細胞抽出液を調整し, FLAG 抗体を用いて MYADM 蛋白質を免疫沈降した. MYADM (NF-MYADM または CF-MYADM) 蛋白質と PeV-A3 の VP0 蛋白質との結合が検出された (図 4b). この MYADM と VP0 との結合は, 細胞とウイルスを 4℃ で 1 時間反応させた後, 37℃ で 15 分または 30 分間反応させ

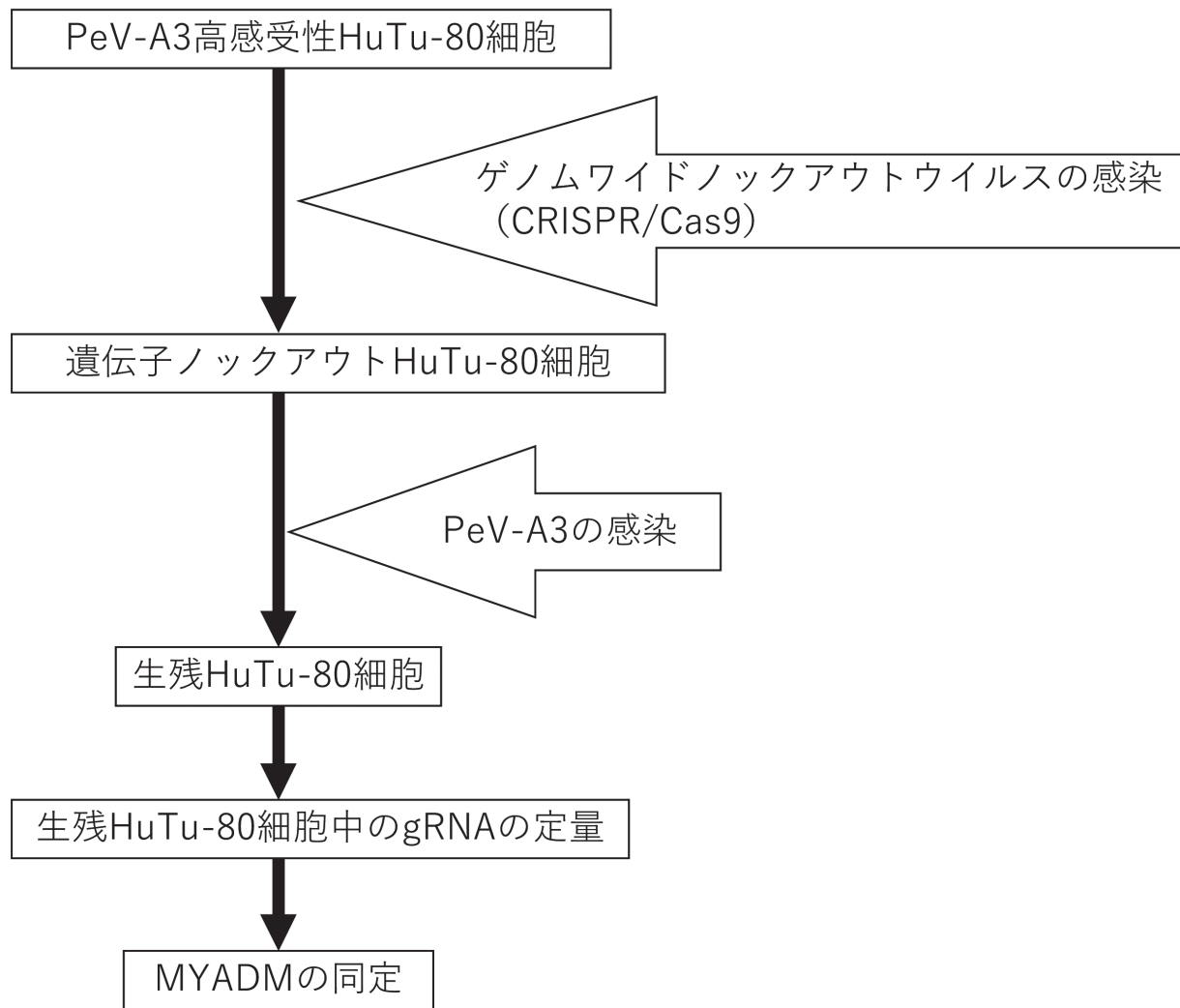


図3 PeV-A3 受容体分子同定の流れ

ると増強された。これらの結果は、PeV-A3のVP0タンパク質が細胞表面でMYADMに結合することを示している。

一方、興味深いことに、VP0蛋白質は、ヒトMYADM発現の有無に関わらず、BHK細胞膜表面の未知の分子と結合することが示された²⁾。これらの結果は、PeV-A3のVP0蛋白質がBHK細胞表面の未知の分子と結合し、この結合がPeV-A3の感染に関与している可能性を示唆している。

MYADMの4番目の細胞外領域はPeV-A3の感染に必須である

MYADMは8回膜貫通型タンパク質で、4つの細胞外領域を持つ(図5a)。MYADMの4番目の細胞外領域(第4細胞外領域)が最も長いことから、この第4細胞外領域がVP0と結合するという仮説を立てた。まず、マウス

MYADM遺伝子をBHK-21細胞で発現させた細胞(MF-MYADM)にPeV-A3が感染しないことを確認した(図6)。ヒトMYADMとマウスMYADMのアミノ酸配列を比較したところ、マウスMYADMには、ヒトMYADMとは異なる10個のアミノ酸置換と1つの挿入配列があることが明らかになった(図5b)。そこで、ヒトMYADM、マウスMYADMあるいは第4細胞外領域のみを置換したキメラMYADM(NF-MYADM, MF-MYADM, F-HMH, F-MHM)を発現するBHK細胞を用いて(図5c)、PeV-A3の感染性を調べた。PeV-A3はヒトMYADMの第4細胞外領域を持つ細胞(BHK-NF-MYADMとBHK-F-MHM)に感染したが、マウスMYADMの第4細胞外領域を持つ細胞(BHK-MF-MYADMとBHK-F-HMH)には感染しなかった(図6)。これらの結果は、ヒトMYADMの第4細胞外領域がPeV-A3の感染に必須であることを示している。

a	細胞	PeV-A3の産生
	HuTu-80	+
	HuTu-80-MYADM-KO1.12	—
	HuTu-80-MYADM-KO2.24	—
	HuTu-80-MYADM-KO3.3	—
	293T	+
	293T-MYADM-KO1.33	—
	293T-MYADM-KO2.19	—
	293T-MYADM-KO3.14	—

b	細胞	PeV-A3の産生	PeV-A3 VP0タンパク質との結合
	BHK-CONT	—	—
	BHK-MYADM	+	ND
	BHK-NF-MYADM	+	+
	BHK-CF-MYADM	+	+

図4 PeV-A3はヒトMYADMを発現する細胞に感染し、増殖する

a PeV-A3はヒトMYADMをノックアウトしたヒト細胞には感染しない。+/-はPeV-A3の産生の有無を示す。
 b PeV-A3はヒトMYADMを強制発現したハムスターBHK細胞に感染し、これらの細胞でMYADMはVP0タンパク質に結合する。+/-はPeV-A3の産生の有無、またはウイルスタンパク質とMYADMとの結合の有無を示す。

次に、ヒトMYADMとマウスMYADMのキメラMYADM遺伝子を発現したBHK細胞を用いて、前述のPeV-A3との結合実験を行った。ヒトMYADMの第4細胞外領域を発現している細胞では、PeV-A3のVP0とMYADMとの結合が検出された。一方、マウスMYADMの第4細胞外領域を発現している細胞では、VP0とMYADMとの結合は検出されなかった（図6）。これらの結果は、PeV-A3のVP0タンパク質がヒトMYADMの第4細胞外領域に結合し、この結合がPeV-A3の感染に必須であることを示している。

MYADMはPeV-A1～A6の感染に必須である

最後に、PeV-A3以外の5種類のPeV-Aの感染におけるMYADMの関与を検討した。PeV-A3と同様に、PeV-A1, A2, A4, A5, A6はBHK（BHK-CONT）細胞には感染しなかったが、ヒトMYADMを発現するBHK（BHK-MYADM）細胞には感染し、感染性ウイルスを産生した。また、これらの5種類のPeV-AはHuTu-80細胞に感染し

たが、MYADMノックアウト細胞には感染しなかった。これらの結果は、MYADMがPeV-A3に加えて5種類のPeV-A（PeV-A1, A2, A4, A5, A6）の感染に必須であり、おそらくMYADMはすべてのPeV-A感染に必須であることを示唆している。

PeV-Aの感染モデル

インテグリン $\alpha v \beta 1$, $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 6$ がPeV-A1の受容体であることが報告されている³⁵⁾。 $\alpha v \beta 1$, $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 6$ を含む8つのインテグリンはいずれも、RGD配列を持つ蛋白質と結合する⁶⁾。PeV-A1のVP1タンパク質のC末端近傍にはRGD配列があり、VP1はこのRGD配列を介して、インテグリンと結合すると考えられる。これらのPeV-A1の論文では、インテグリンに対する抗体やRGD配列を含むペプチド（RRRGDL, CRRRGDL）が、PeV-A1のインテグリンへの結合や細胞への感染を阻害することが示された。これらの結果と、PeV-A3のMYADMへの結合が感染に必須であるという結果からは、少なくとも1つ

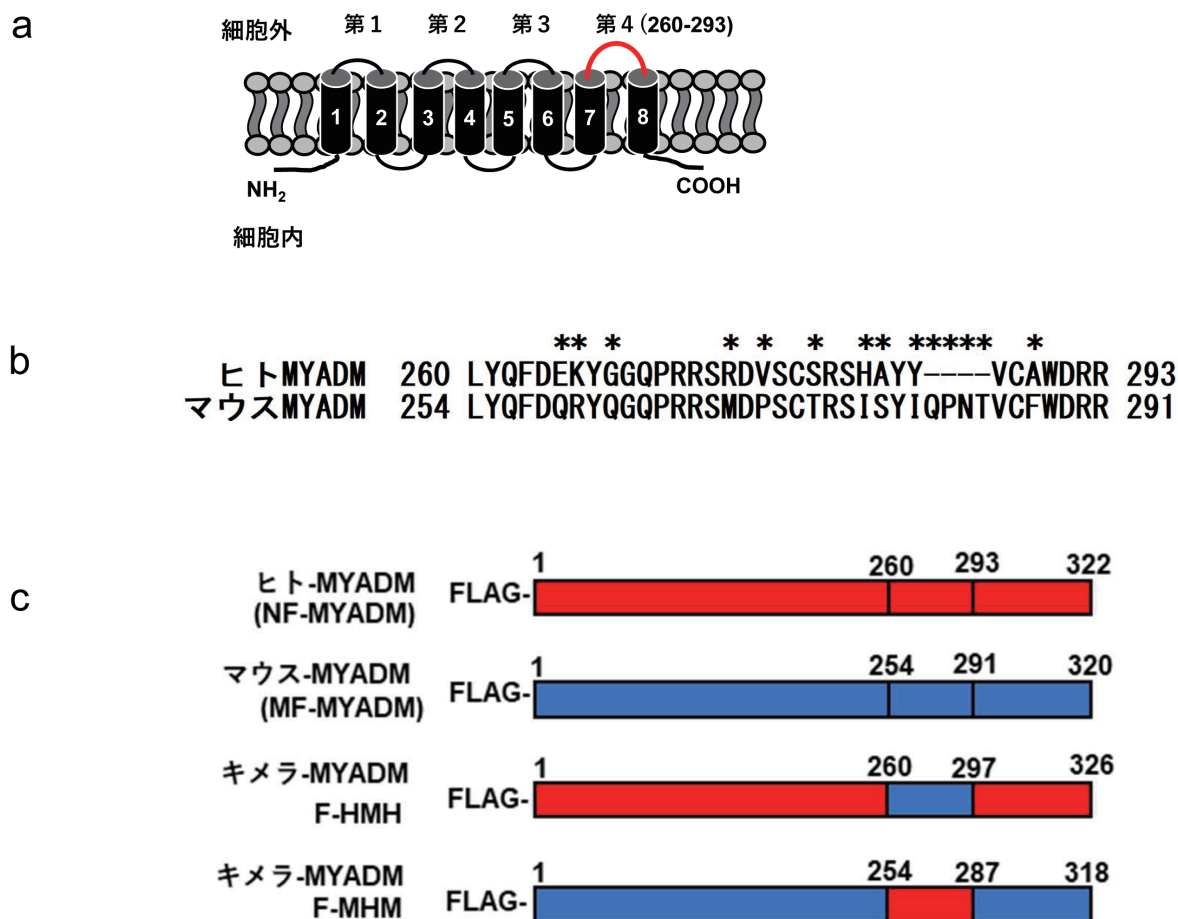


図5 MYADMの4番目の細胞外領域はPeV-A3の感染に必須である

a ヒトMYADMの構造. b ヒトとマウスMYADMの第4細胞外領域のアミノ酸の比較. アステリスク (*) はヒトMYADMとマウスMYADMのアミノ酸配列の違いを示す. c MYADMキメラ蛋白質の構造図. (参考文献2より抜粋・改変)

の仮説が示唆される. PeV-A1はMYADMとインテグリン ($\alpha v \beta 1, \alpha v \beta 3, \alpha v \beta 6$) の両方に結合し, インテグリンへのPeV-A1の結合がMYADMへのPeV-A1の結合を増強し, ウイルスが細胞内へ侵入して感染するという仮説である.

PeV-A1と同様に, PeV-A2, A4, A5, A6のVP1にはRGD配列があるが, PeV-A3のVP1にはRGD配列はない. PeV-A3のVP0蛋白質は, MYADM発現の有無に関わらず, BHK細胞表面の未知の分子に結合する²⁾. この未知の分子は, MYADMへのPeV-A3の結合を増強する分子である可能性がある. 今後, PeV-A3感染の詳細なメカニズムの解明が期待される.

動物モデルは, PeV-A3感染の重症化メカニズムの解明に大きな役割を果たすと期待されている. C57BL/6新生児マウスにPeV-A3を頭蓋内に接種すると, 体重減少, 後肢麻痺, 死亡が認められ, PeV-A3VP0抗体による免疫染色から, マウス脳の海馬と大脳皮質にPeV-A3が感染していることが示された⁷⁾. 一方, 我々の結果では, PeV-A3はマウスMYADMには結合せず, マウスの細胞には感染しなかったことから (図2, 図6), PeV-A3はMYADMを介した感染とは異なる感染機構を持つ可能性が示唆される. PeV-A3感染症の重症化に, MYADMを介した感染メカニズムとMYADMを介さない感染メカニズムがどのように関与しているかが明らかになることが期待される.

PeV-A3感染症の動物モデル

ヒトにおけるPeV-A3の病原性を反映したPeV-A3感染

おわりに

今回の研究で著者らは, MYADMがPeV-A1から

コンストラクト	細胞	PeV-A3の産生	VP0タンパク質との結合
	BHK-CONT	—	—
ヒトMYADM FLAG- 	BHK-NF-MYADM	+	+
マウスMYADM FLAG- 	BHK-MF-MYADM	—	—
FLAG- 	BHK-F-HMH	—	—
FLAG- 	BHK-F-MHM	+	+

図6 PeV-A3 はヒト MYADM の第4細胞外領域に結合し、細胞に感染して増殖する
+/- は PeV-A3 の産生の有無または VP0 タンパク質との結合の有無を示す。(参考文献2より抜粋・改変)

PeV-A6 の感染に必須のタンパク質であることを証明した。ヒト MYADM を発現するマウスは、PeV-A3 感染症の動物モデルになる可能性が高い。この動物モデルにより、PeV-A3 感染が重症化を引き起こすメカニズムの解明が期待される。

利益相反の開示

本稿に関して、開示すべき利益相反関係にある企業等はありません。

参考文献

1) Tachikawa J, Aizawa Y, Saitoh A.: Severe Disease in Children with Parechovirus-A Infection. *Curr Clin Microbiol Rep* 10:75–84, 2023.
2) Watanabe K, Oka T, Takagi H, Anisimov S, Yamashita S, Katsuragi Y, Takahashi M, Higuchi M, Kanki T, Saitoh A, Fujii M.: Myeloid-associated dif-

ferentiation marker is an essential host factor for human parechovirus PeV-A3 entry. *Nat Commun* 14:1817, 2023.
3) Triantafilou, K, Triantafilou M, Takada Y, Fernandez N.: Human parechovirus 1 utilizes integrins alphavbeta3 and alphavbeta1 as receptors. *J Virol* 74:5856–5862, 2000.
4) Seitsonen J, Susi P, Heikkilä O, Sinkovits RS, Laurinmäki P, Hyypiä T, Butcher SJ.: Interaction of alphaVbeta3 and alphaVbeta6 integrins with human parechovirus 1. *J Virol* 84:8509–8519, 2010.
5) Merilahti P, Tauriainen S, Susi P.: Human parechovirus 1 infection occurs via $\alpha V \beta 1$ integrin. *PLoS ONE* 11:e0154769, 2016.
6) Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW.: Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* 275:21785–21788, 2000.
7) Jan MW, Su HL, Chang TH, Tsai KJ.: Characterization of Pathogenesis and Inflammatory Responses to Experimental Parechovirus Encephalitis. *Front Immunol* 12:753683, 2021.