

2. エンテロウイルス 71 受容体としての P-selectin glycoprotein ligand-1 の同定

西村 順裕, 清水 博之

国立感染症研究所 ウイルス第二部

エンテロウイルス 71 (EV71) は、一般的な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。手足口病の症状は一般に軽く予後も良好であるが、EV71 は時として重篤な中枢神経疾患の大規模な流行を引き起こす。我々は、ヒト T 細胞 cDNA ライブラリーを用いて EV71 結合分子の発現クローニングを行い、EV71 が P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1; CD162) に結合することを見いだした。PSGL-1 は、おもに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、セレクチンやケモカインとの結合により初期炎症反応で重要な機能を果たす。EV71 はヒト PSGL-1 のアミノ末端領域に結合し、ヒト PSGL-1 発現マウス細胞が EV71 感受性を獲得したことから、EV71 の機能的受容体であることが示された。EV71 分離株には PSGL-1 結合株・非結合株が存在し、非白血球系細胞では EV71 は PSGL-1 非依存的に感染増殖することが明らかとなった。PSGL-1 依存的 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。

EV71 は、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り、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¹⁾。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、脳幹脳炎、神経原性肺水腫などの様々な中枢神経疾患を引き起こすことが知られている。1997 年のマレーシア、1998 年の台湾での流行以降、小児の急性死症例をともなう EV71 による手足口病の大規模な流行が、アジア太平洋地域で多発しており、大きな公衆衛生上の問題となっている²⁻⁷⁾。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

告されている。我が国では、手足口病重症例の大規模な流行は認められていないが、死亡例を含む手足口病重症例が散発的に報告されている⁸⁾。

特異的ウイルス受容体の同定は、感受性細胞・組織へのウイルス結合侵入の初期過程のみならず、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な役割を果たしてきた。EV71 と同様、エンテロウイルス属に分類され、重篤な中枢神経疾患を引き起こすポリオウイルスについては、特異的受容体であるヒトポリオウイルスレセプター (hPVR, CD155) が同定され^{9,10)}、その後の hPVR 発現トランスジェニックマウスモデルの樹立は¹¹⁾、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大きく貢献した。しかし、手足口病の原因となる EV71 や CVA16 を含む A 群ヒトエンテロウイルスの受容体は同定されておらず、ウイルス感染・病原性発現を規定する宿主因子の分子的基盤の研究は進んでいない。また、EV71 の自然宿主はヒトだけであり、サル以外の感染モデルが限られていることから、ヒトにおける病原性を反映した小動物モデルの樹立が望まれている。

連絡先

〒 208-0011

東京都武蔵村山市学園 4-7-1

国立感染症研究所 ウイルス第二部

TEL : 042-561-0771

FAX : 042-561-4729

E-mail : ynishi@nih.go.jp (西村順裕)

hshimizu@nih.go.jp (清水博之)

Jurkat T 細胞における EV71 結合分子の同定

EV71 受容体の同定には、レトロウイルスライブラリー

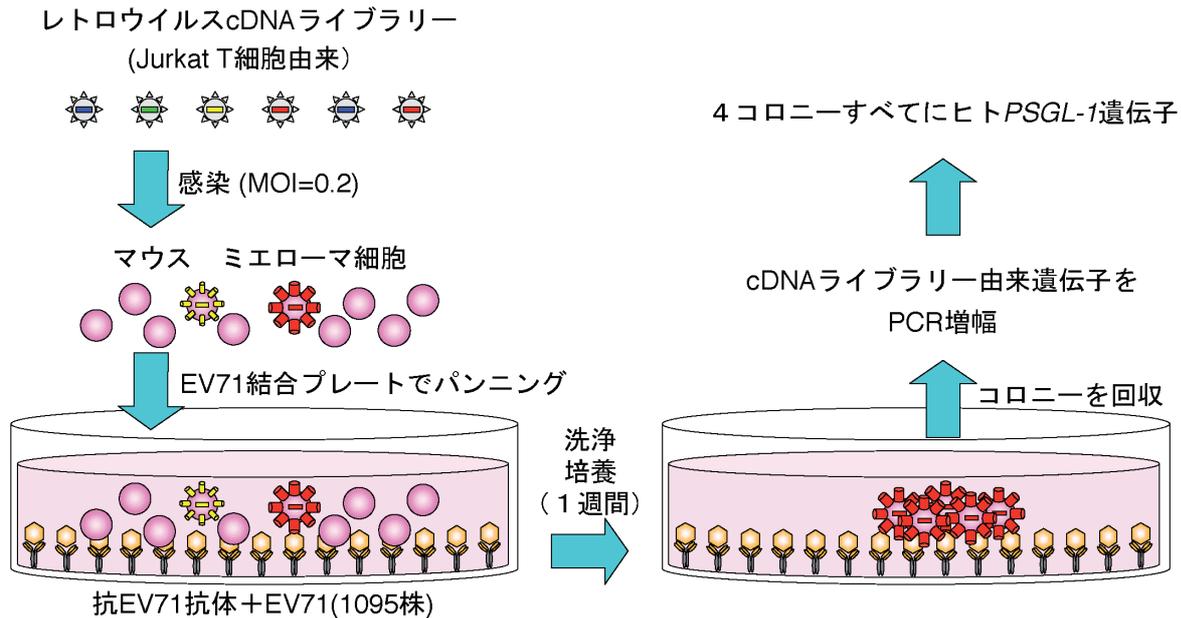


図1 パニング法を用いた、EV71受容体の発現クローニング
EV71結合プレート作製には、EV71-1095株を使用した

と浮遊系マウス細胞とを組み合わせた発現クローニング法を用いた¹²⁾。これまでに、このパニング法により、ネコ免疫不全ウイルス¹³⁾、ネコカリシウイルス¹⁴⁾、エボラウイルス¹⁵⁾の受容体が同定されており、特異性が高く強力なクローニング方法である。図1にパニング法の概略を示す。EV71感受性Jurkat T細胞よりレトロウイルスcDNAライブラリーを作製し、浮遊系細胞であるマウスミエローマ細胞に感染させた。感染細胞を回収し、EV71 1095株(EV71-1095)粒子を固相化したプレートに添加した。90分後、結合していない細胞を洗淨除去し、付着細胞を37℃でさらに培養した。1週間後、プレート上には4つの独立した細胞コロニーが形成された。これらの細胞ゲノムには、いずれにもヒトPSGL-1遺伝子が組み込まれていた。PSGL-1は主に骨髄系・リンパ球系細胞および血小板に発現しているシアロムチンファミリー膜蛋白質である¹⁶⁻¹⁸⁾(図2A)。細胞外に位置するPSGL-1のアミノ末端領域は、リガンドであるセレクトインやケモカインと相互作用する。感染炎症等により血管内皮細胞表面への発現が誘導されるセレクトインと、白血球表面に恒常的に発現するPSGL-1との相互作用が、炎症初期過程における局所への白血球の遊走・接着・浸潤に重要であることが、PSGL-1-リガンド相互作用の立体構造解析も含め詳細に研究されている¹⁶⁻¹⁸⁾。

EV71はPSGL-1のアミノ末端領域に特異的に結合する

細胞表面でのPSGL-1発現がEV71結合に関与すること

を確認するために、PSGL-1とEV71-1095の結合をフローサイトメトリーで解析した(図2B)。PSGL-1をほとんど発現していないヒト293T細胞表面に、ヒトPSGL-1を一過性に発現させたところ、細胞表面にEV71-1095粒子が結合した。これに対し、シアロムチン蛋白質であるヒトCD34、ヒトCD43、あるいはマウスPSGL-1を発現させた場合には、EV71-1095の結合は検出できなかった¹⁹⁾。また、EV71-1095とPSGL-1との結合は、PSGL-1のアミノ末端領域を認識する抗PSGL-1抗体(KPL1、図2A)により濃度依存的に阻害された(図2C)。さらに、ヒトPSGL-1のアミノ末端領域をマウスPSGL-1のアミノ末端領域と組み換えたキメラPSGL-1を発現させた場合にも、EV71は結合した¹⁹⁾。したがって、EV71-1095は、ヒトPSGL-1のアミノ末端領域に特異的に結合することが示された。また、マウスPSGL-1は、ヒトPSGL-1とのアミノ末端構造の違いによりEV71受容体として機能しないことが示唆された。

ヒトPSGL-1発現マウスL929細胞におけるEV71増殖

次に、PSGL-1発現により、EV71結合後の細胞侵入・ウイルス増殖過程が誘導されるかを検討するため、EV71非感受性マウスL929細胞にヒトPSGL-1を発現し、EV71感受性の変化を検討した。我々は、まず、プラストジシン存在下でヒトPSGL-1を安定的に発現するL929細胞(L-PSGL-1.1細胞)を樹立した(図3A)。EV71-1095を感染させたL-PSGL-1.1細胞は、感染後4日目で細胞変性効果

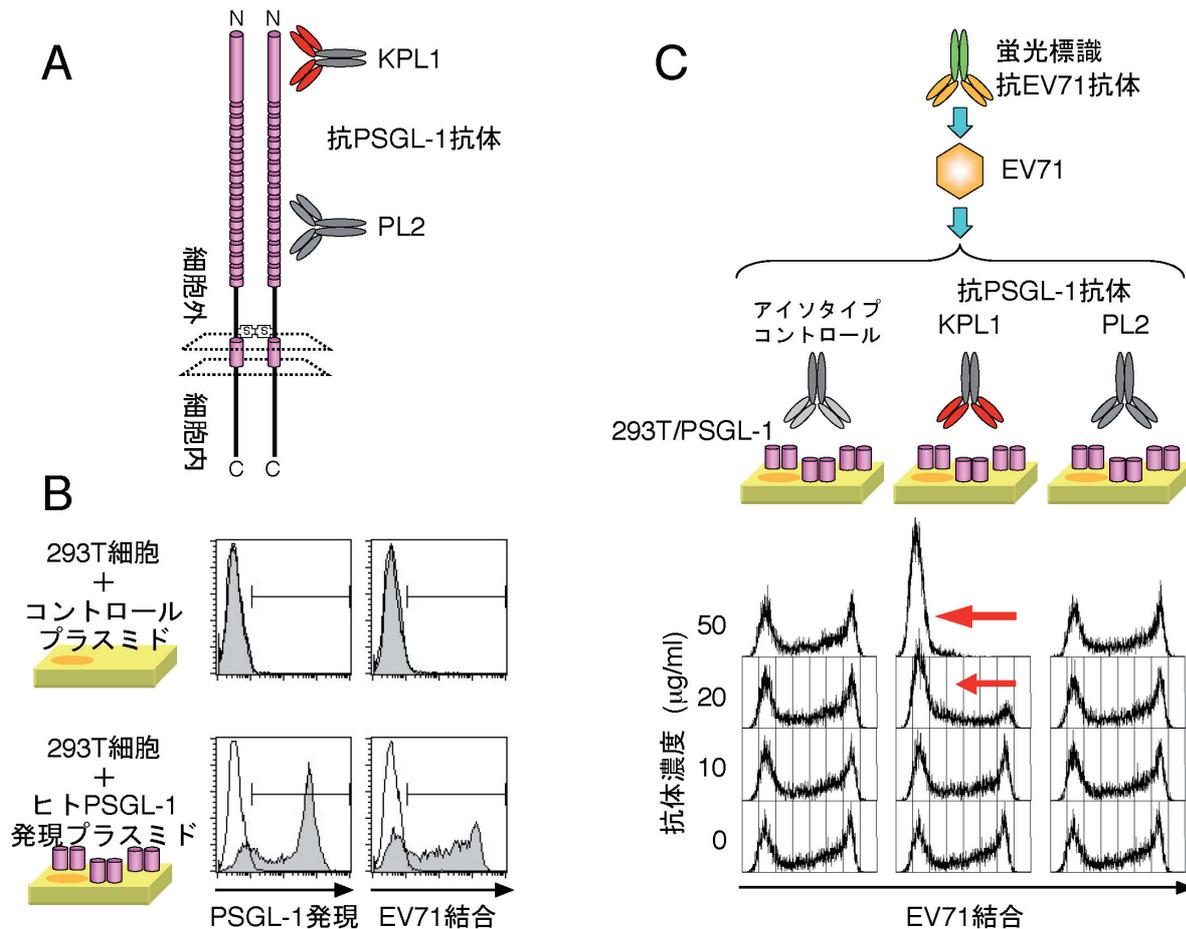


図2 EV71 はヒト PSGL-1 に特異的に結合する

A PSGL-1 の模式図. 抗 PSGL-1 モノクローナル抗体の認識部位を示す.

B 293T 細胞に一過性にヒト PSGL-1 を発現させ、PSGL-1 発現および EV71-1095 との結合を、フローサイトメトリーで検出した.

C PSGL-1 発現 293T 細胞と EV71-1095 との結合は、抗 PSGL-1 抗体 (KPL1) により、特異的に阻害される. 一過性にヒト PSGL-1 を発現させた 293T 細胞 (293T/PSGL-1) と抗 PSGL-1 抗体とを、氷上で 30 分反応させた. その後の EV71-1095 の結合を、フローサイトメトリーで検出した.

(文献 19 を改変)

(CPE) を示し、細胞内に EV71 抗原が検出された (図 3A). EV71-1095 感染による CPE と EV71 抗原の発現は、細胞を抗 PSGL-1 抗体 (KPL1) で前処理することにより阻害された (図 3A). 陰性対照である L-bsd 細胞では、EV71 感染による CPE および EV71 抗原は検出されなかった (図 3A). PSGL-1 依存的 EV71 増殖は、L-PSGL-1.1 細胞におけるウイルス増殖試験でも確認された (図 3B). また、EV71 を可溶性 PSGL-1-Fc キメラ蛋白質で処理すると、EV71 増殖が阻害された (図 3B). 以上のように、PSGL-1 は EV71 との結合だけでなく、EV71 の侵入増殖にもかかわる機能的受容体であることが示された.

種々の細胞株における PSGL-1 発現と EV71 増殖

次に、各種細胞株における PSGL-1 発現と EV71 増殖との関連を解析した. 細胞表面における PSGL-1 発現をフローサイトメトリーで解析したところ、ヒト白血球由来細胞である Jurkat T 細胞, U937 細胞, MOLT-4 細胞で高い発現がみられた (図 4A). PSGL-1 依存的増殖を解析するため、抗 PSGL-1 抗体と細胞を反応させた後、EV71-1095 を感染させた. PSGL-1 発現量の高い Jurkat T 細胞, U937 細胞では、抗 PSGL-1 抗体処理により EV71 増殖が効果的に阻害された (図 4B). MOLT-4 細胞では顕著なウイルス増殖は認められなかったが、抗 PSGL-1 抗体処理により、

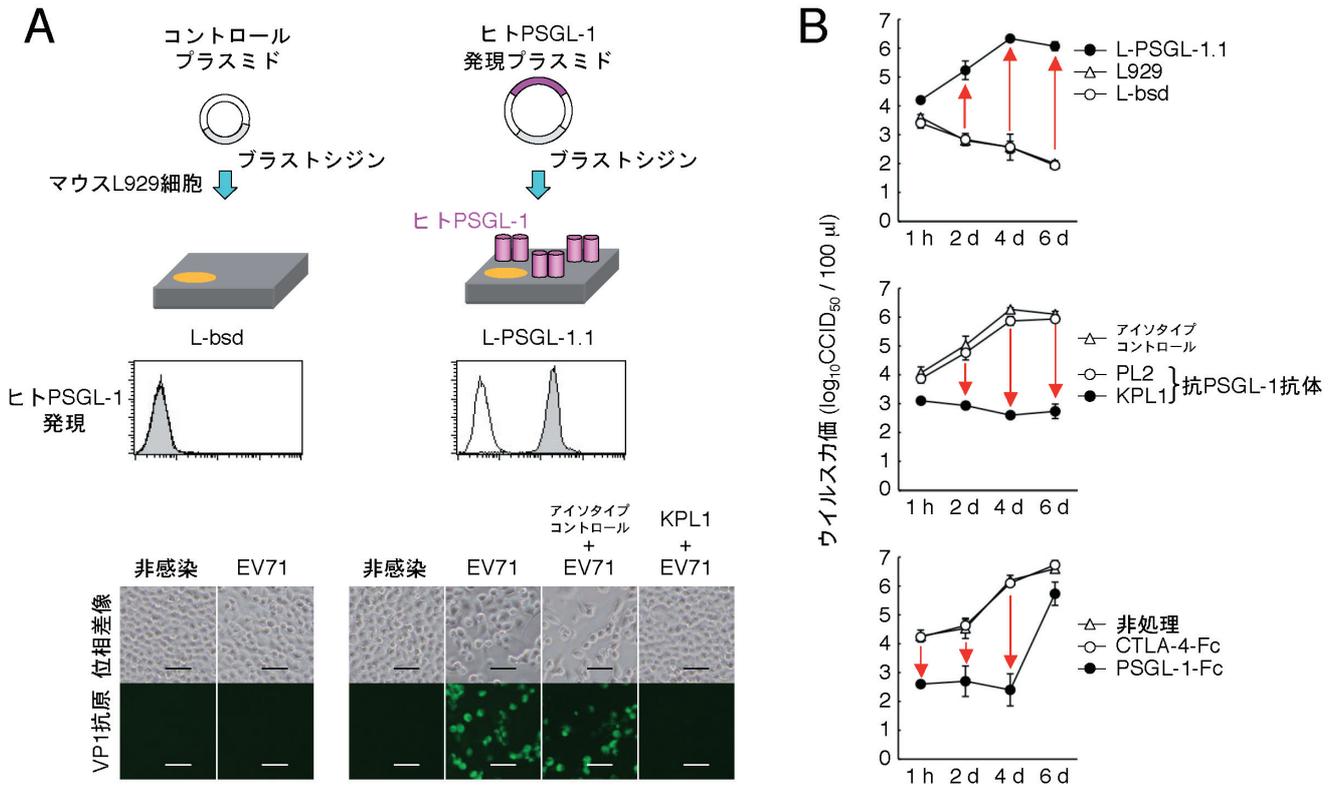


図3 EV71非感受性マウスL929細胞にヒトPSGL-1を発現させると、EV71感受性を獲得する

A L929細胞にヒトPSGL-1発現プラスミドを導入し、ブラストシジンで選択後、ヒトPSGL-1発現量の高いクローンL-PSGL-1.1細胞を樹立した。また、陰性コントロールとしてL-bsd細胞を作製した。L-PSGL-1.1細胞にEV71-1095株を感染させたところ、4日後にCPEおよびEV71抗原を呈した。

B L-PSGL-1.1細胞でのPSGL-1依存的EV71複製。感染直後および2, 4, 6日後のウイルス力価を測定した。L-PSGL-1.1細胞を抗PSGL-1抗体(KPL1)で処理すると、EV71増殖が阻害された。また、可溶性PSGL-1-FcとEV71を反応後、L-PSGL-1.1細胞に感染させると、ウイルス複製が低下した。

(文献19を改変)

感染細胞から回収されるウイルス力価が有意に低下した(図4B)。一方、臨床検体からのEV71分離に頻用されるRD細胞(多くのEV71株が効率よく増殖し顕著なCPEをおこす)を含む非白血球系細胞表面には、PSGL-1はほとんど発現していなかった(図4A)。非白血球系細胞におけるEV71増殖は、抗PSGL-1抗体によって阻害されなかったことから(図4B)、EV71は、非白血球系細胞ではPSGL-1非依存的に増殖することが明らかとなった。

PSGL-1結合EV71株と非結合EV71株の存在

EV71の伝播様態を解析するため、また、強い神経病原性を有する特定の遺伝子型のEV71が伝播している可能性を検討するため、EV71分離株の分子系統学的解析が進められてきた^{7,20-23}。カプシドVP1領域の塩基配列をもとにした分子系統解析により、プロトタイプであるBrCr株(genogroup A)を除く、すべての分離株が、2種類の遺伝

子型であるgenogroup Bおよびgenogroup Cに大きく分かかれ、さらにB1~B5およびC1~C5に細分類される(図5A)。1095株を含む代表的な8株を用いて、PSGL-1結合およびPSGL-1依存的ウイルス増殖を比較した。可溶性PSGL-1-Fcキメラ蛋白質を用いた免疫沈降によりPSGL-1結合性を解析したところ、1095株を含む5株はPSGL-1-Fcと共沈したが、02363株、BrCr株、Nagoya株は共沈しなかった(図5B)。EV71分離株には、PSGL-1結合株(EV71-PB)およびPSGL-1非結合株(EV71-non-PB)が存在することが明らかとなった。次に、Jurkat T細胞におけるPSGL-1依存的ウイルス増殖を、抗PSGL-1抗体存在下・非存在下におけるウイルス増殖により比較した。PSGL-1結合株5株はJurkat T細胞でPSGL-1依存的に増殖した(図5C)。PSGL-1非結合株のうち2株、02363株とNagoya株は、Jurkat T細胞における増殖が認められたが、その増殖は抗PSGL-1抗体で阻害されなかった(図5C)。つまり、

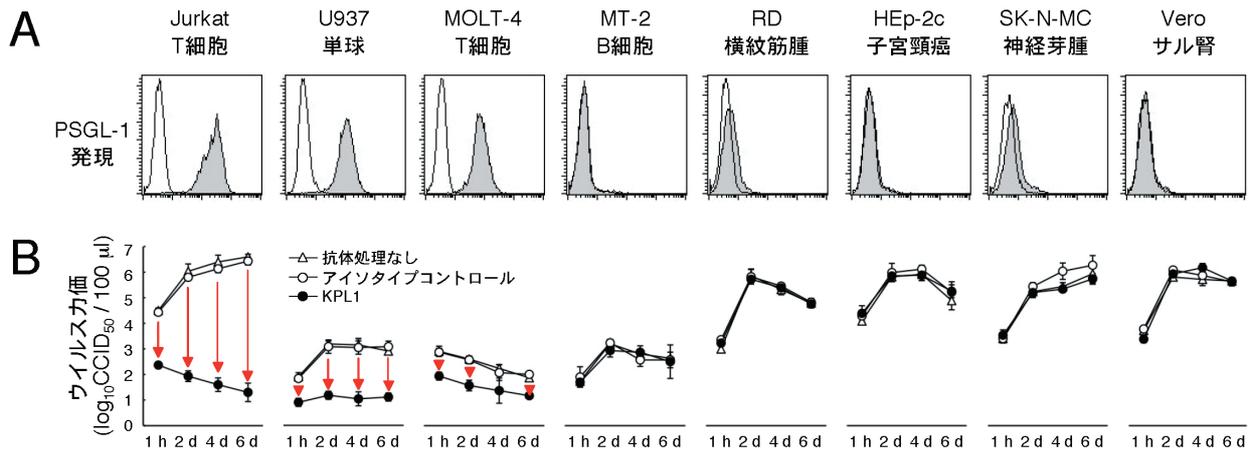


図 4 各種細胞株における PSGL-1 発現と EV71 増殖

A 細胞表面の PSGL-1 発現をフローサイトメトリーで検出した。

B EV71-1095 株の複製. PSGL-1 依存的増殖の解析のため, 細胞を抗 PSGL-1 抗体(KPL1)で処理後, EV71-1095 を感染させた. (文献 19 を改変)

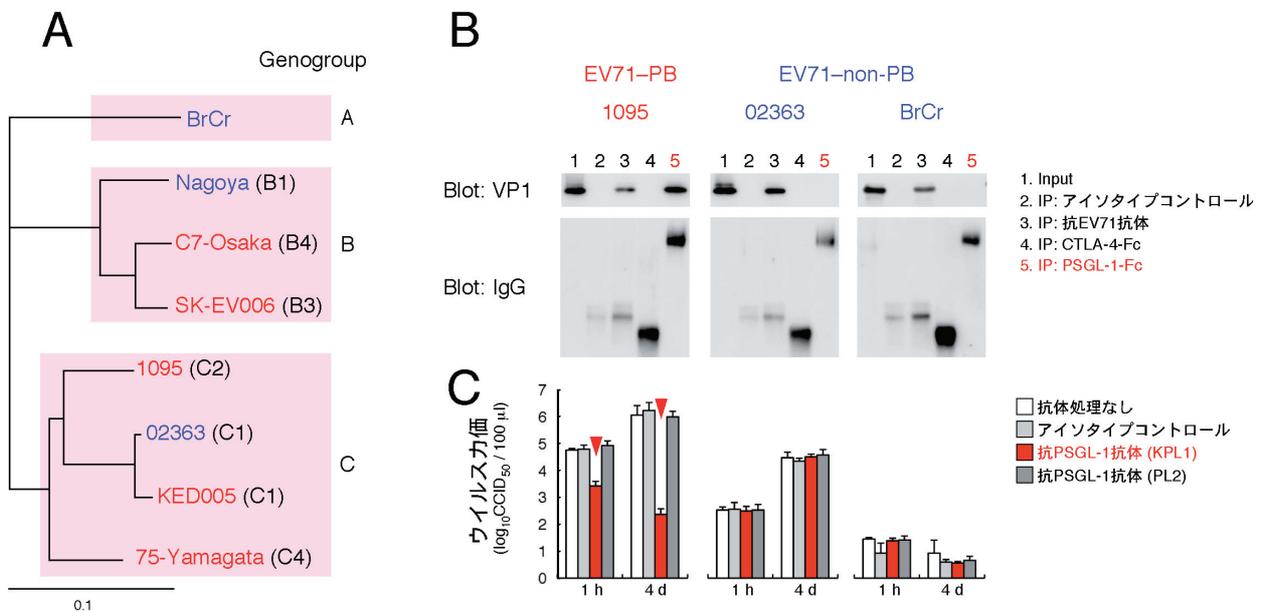


図 5 PSGL-1 結合性による EV71 分離株の分類

A EV71 の遺伝子型. EV71 は A, B, C の 3 つの genogroup に分けられる. genogroup A に分類される株は, BrCr 株 1 株のみである. genogroup B および C は, さらに subgenogroup (B1~5, C1~5) に細分される. 赤: EV71-PB, 青: EV71-non-PB.

B EV71 株と PSGL-1 の結合. EV71 と PSGL-1-Fc との共沈を, 抗 EV71 VP1 抗体を用いたウエスタンブロッティングで検出した. 可溶性蛋白質の陰性コントロールとして, CTLA-4-Fc を用いた.

C EV71 分離株の Jurkat T 細胞での増殖. PSGL-1 依存的増殖の解析のため, Jurkat T 細胞を抗 PSGL-1 抗体で処理後, 各 EV71 分離株を感染させた. EV71-PB である EV71-1095 の増殖は, 抗 PSGL-1 抗体 (KPL1) で阻害された (赤矢頭). しかし, EV71-non-PB である EV71-02363 の増殖は, 抗 PSGL-1 抗体で阻害されなかった. EV71-BrCr は Jurkat T 細胞で増殖しなかった.

(文献 19 を改変)

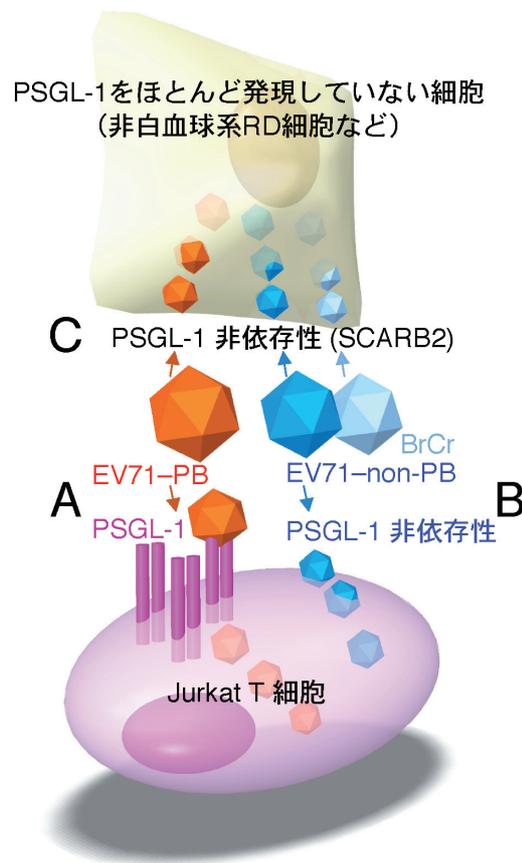


図6 複数の受容体を介したEV71感染機構

A EV71-PBは、PSGL-1を受容体としてJurkat T細胞に感染する。

B EV71-non-PB (BrCr株以外)は、PSGL-1以外の受容体によりJurkat T細胞に感染する。BrCr株はJurkat T細胞で増殖しない。

C すべてのEV71株は、SCARB2を受容体としてPSGL-1をほとんど発現していない非白血球系細胞に感染する。
(文献19を改変)

PSGL-1非依存的にJurkat T細胞に感染した。PSGL-1非結合BrCr株は、Jurkat T細胞において顕著な増殖が認められなかった(図5B)。同じsubgenogroup C1に属するPSGL-1結合株・非結合株(KED005株と02363株)のカプシドアミノ酸配列862残基を比較したところ、4アミノ酸残基のみが異なっていた¹⁹⁾。in vitroあるいはin vivoでの感染伝播過程におけるEV71の適応変異により、PSGL-1結合性が比較的容易に変化する可能性が示唆される。

CVA16におけるPSGL-1依存性・非依存性増殖

EV71と遺伝学的に近縁で手足口病の原因ウイルスであるCVA16についてPSGL-1依存的感染の有無を検討した。CVA16プロトタイプG10株により誘導されるL-PSGL-1.1細胞におけるCPEは、抗PSGL-1抗体により部分的に阻害されたが、Jurkat T細胞におけるCVA16増殖は、抗PSGL-1抗体で阻害されなかった¹⁹⁾。CVA16のL-PSGL-1.1

細胞への感染においてはPSGL-1依存的感染が認められたが、Jurkat T細胞へはPSGL-1非依存的に感染することが示唆された。

まとめ

以上の結果より、我々は、Jurkat T細胞等PSGL-1発現白血球細胞では、PSGL-1がPSGL-1結合EV71株の主要な宿主受容体として機能することを明らかにした。同時に、RD細胞等の非白血球系細胞では、EV71はPSGL-1非依存的に増殖することから、他の感染機構が存在する可能性を示した。山吉らは、RD細胞に由来するゲノムDNAをマウスL929細胞に発現させることにより、PSGL-1とは異なるEV71受容体として、human scavenger receptor class B, member 2 (SCARB2)を同定した²⁴⁾。SCARB2は、RD細胞等非白血球細胞におけるEV71感染を規定する機能的受容体であると考えられ、構造的にも機能的にもまったく

異なる2種類の宿主受容体, PSGL-1とSCARB2を介するEV71感染機構の存在が明らかになった。SCARB2は、白血球等に局限して発現するPSGL-1と異なり、ユビキタスに多くの細胞・組織で発現することが報告されているが、Jurkat T細胞表面には顕著な発現は認められなかった(未発表データ)。すなわち、Jurkat T細胞等、ある種の細胞・組織では、PSGL-1依存性増殖がPSGL-1結合性EV71株の主要な感染経路であると考えられる。PSGL-1非結合EV71株やCVA16については、PSGL-1およびSCARB2以外の受容体を介した感染経路の存在も否定できない²⁵⁾。

今後の展望

EV71とCVA16は、同じA群エンテロウイルスに属する手足口病の主要な原因ウイルスであるが、EV71による手足口病流行時に中枢神経疾患発症の頻度が高くなる^{8,26)}。事実、近年のアジア太平洋地域での手足口病流行時において、急性脳炎等の重症例から高頻度にEV71が検出されている²⁷⁾。PSGL-1およびSCARB2は、EV71のみならずCVA16の受容体としても機能したことから、中枢神経疾患と宿主受容体との関連はいまのところ明らかではない。PSGL-1は中枢神経細胞に発現していないが¹⁶⁾、EV71脳炎患者の中枢神経組織にはCD68陽性マクロファージ/ミクログリアを中心とした炎症性細胞の浸潤が認められる^{28,29)}。EV71感染による中枢神経疾患発症に、PSGL-1発現炎症細胞さらにはPSGL-1依存性EV71感染が関与する可能性については、今後の検討が必要である²⁵⁾。

多くのウイルスにおいて、異なる複数の宿主受容体の機能と局在、それに伴う異なる受容体を認識するウイルスvariantの変異・適応が、ウイルス感染増殖、病原性発現において重要な役割を果たすことが明らかにされている。EV71と同じエンテロウイルス属であるB群コクサッキーウイルス(CVB)ではdecay-accelerating factor (DAF)^{30,31)}およびcoxsackievirus and adenovirus receptor (CAR)³²⁾の2種類の宿主受容体が同定されている。極性を有するCaco-2細胞への感染において、CVBはまず、細胞表面apical側のDAFに結合するが、ウイルス粒子構造は変化せず、細胞表面にDAF-CVB複合体が形成される³³⁾。DAF-CVB相互作用により誘導されるAblキナーゼシグナルを介したアクチン再編成によりDAF-CVB複合体はタイトジャンクションへ移動し、タイトジャンクションに局在するCARとのウイルス粒子構造変化を伴う相互作用によりゲノムRNAが細胞内に侵入する³³⁾。PSGL-1を介したシグナルは、インテグリンの局在等白血球機能に関与することが報告されている³⁴⁾。PSGL-1とEV71との相互作用は、白血球細胞機能に影響を及ぼすのか? PSGL-1-リガンド相互作用にとって重要なPSGL-1のアミノ末端領域の翻訳後修飾はEV71との結合にも必要なのか? PSGL-1発現細胞へのEV71結合およびそれに続くウイルス感染は、PSGL-

1-リガンド結合を介した炎症細胞間相互作用にどのような影響を与えるのか? PSGL-1依存性EV71感染は、重症EV71脳炎患者で認められるリンパ球減少やサイトカイン異常^{35,36)}においてなんらかの役割を果たしているのか? PSGL-1結合株・非結合株の存在は、EV71の分子進化および病原性発現にとってどのような意味を持つのか? 等々、EV71受容体としてPSGL-1が同定されたことにより、あらたな視点に基づいたEV71感染の分子機構に関する研究の進展が期待できる。もちろん、SCARB2を介したEV71感染経路を含め、EV71が複数の受容体を使用することの生物学的意義の解明が今後きわめて重要となる。

参考文献

- 1) Oberste MS, Peñaranda S, Maher K, and Pallansch MA: Complete genome sequences of all members of the species *Human enterovirus A*. J Gen Virol 85:1597-1607, 2004.
- 2) Bible JM, Pantelidis P, Chan PKS, and Tong CYW: Genetic evolution of enterovirus 71: epidemiological and pathological implications. Rev Med Virol 17:371-379, 2007.
- 3) Chan LG, Parashar UD, Lye MS, Ong FGL, Zaki SR, Alexander JP, Ho KK, Han LL, Pallansch MA, Suleiman AB, Jegathesan M, and Anderson LJ: Deaths of children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in Sarawak, Malaysia: clinical and pathological characteristics of the disease. Clin Infect Dis 31:678-683, 2000.
- 4) Ho M, Chen ER, Hsu KH, Twu SJ, Chen KT, Tsai SF, Wang JR, and Shih SR: An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. N Engl J Med 341:929-935, 1999.
- 5) McMinn PC: An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance. FEMS Microbiol Rev 26:91-107, 2002.
- 6) WHO: Outbreak news. Enterovirus, China. Wkly Epidemiol Rec 83:169-170, 2008.
- 7) 清水博之: 東アジアにおけるエンテロウイルス71型感染症の流行. 病原微生物検出情報 30:9-10, 2009.
- 8) Suzuki Y, Taya K, Nakashima K, Ohyama T, Kobayashi JM, Ohkusa Y, and Okabe N: Study on Risk Factors for Severe Hand-foot-and-mouth Disease. Pediatr Int, 2009.
- 9) Koike S, Horie H, Ise I, Okitsu A, Yoshida M, Iizuka N, Takeuchi K, Takegami T, and Nomoto A: The poliovirus receptor protein is produced both as membrane-bound and secreted forms. EMBO J 9:3217-3224, 1990.
- 10) Mendelsohn CL, Wimmer E, and Racaniello VR: Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. Cell 56:855-865, 1989.
- 11) Koike S, Taya C, Kurata T, Abe S, Ise I, Yonekawa H, and Nomoto A: Transgenic mice susceptible to poliovirus. Proc Natl Acad Sci USA 88:951-955, 1991.
- 12) Shimojima M, Miyazawa T, Sakurai Y, Nishimura Y,

- Tohya Y, Matsuura Y, and Akashi H: Usage of myeloma and panning in retrovirus-mediated expression cloning. *Anal Biochem* 315:138-140, 2003.
- 13) Shimojima M, Miyazawa T, Ikeda Y, McMonagle EL, Haining H, Akashi H, Takeuchi Y, Hosie MJ, and Willett BJ: Use of CD134 as a primary receptor by the feline immunodeficiency virus. *Science* 303:1192-1195, 2004.
 - 14) Makino A, Shimojima M, Miyazawa T, Kato K, Tohya Y, and Akashi H: Junctional adhesion molecule 1 is a functional receptor for feline calicivirus. *J Virol* 80:4482-4490, 2006.
 - 15) Shimojima M, Takada A, Ebihara H, Neumann G, Fujioka K, Irimura T, Jones S, Feldmann H, and Kawaoka Y: Tyro3 family-mediated cell entry of Ebola and Marburg viruses. *J Virol* 80:10109-10116, 2006.
 - 16) Laszik Z, Jansen PJ, Cummings RD, Tedder TF, McEver RP, and Moore KL: P-selectin glycoprotein ligand-1 is broadly expressed in cells of myeloid, lymphoid, and dendritic lineage and in some non-hematopoietic cells. *Blood* 88:3010-3021, 1996.
 - 17) Sako D, Chang XJ, Barone KM, Vachino G, White HM, Shaw G, Veldman GM, Bean KM, Ahern TJ, Furie B, and et al.: Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell* 75:1179-1186, 1993.
 - 18) Somers WS, Tang J, Shaw GD, and Camphausen RT: Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe^x and PSGL-1. *Cell* 103:467-479, 2000.
 - 19) Nishimura Y, Shimojima M, Tano Y, Miyamura T, Wakita T, and Shimizu H: Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. *Nat Med* 15:794-797, 2009.
 - 20) Brown BA, Kilpatrick DR, Oberste MS, and Pallansch MA: Serotype-specific identification of enterovirus 71 by PCR. *J Clin Virol* 16:107-112, 2000.
 - 21) McMinn P, Lindsay K, Perera D, Chan HM, Chan KP, and Cardosa MJ: Phylogenetic analysis of enterovirus 71 strains isolated during linked epidemics in Malaysia, Singapore, and Western Australia. *J Virol* 75:7732-7738, 2001.
 - 22) Mizuta K, Abiko C, Murata T, Matsuzaki Y, Itagaki T, Sanjoh K, Sakamoto M, Hongo S, Murayama S, and Hayasaka K: Frequent importation of enterovirus 71 from surrounding countries into the local community of Yamagata, Japan, between 1998 and 2003. *J Clin Microbiol* 43:6171-6175, 2005.
 - 23) Shimizu H, Utama A, Onnimala N, Li C, Li-Bi Z, Yu-Jie M, Pongsuwanna Y, and Miyamura T: Molecular epidemiology of enterovirus 71 infection in the Western Pacific Region. *Pediatr Int* 46:231-235, 2004.
 - 24) Yamayoshi S, Yamashita Y, Li J, Hanagata N, Minowa T, Takemura T, and Koike S: Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. *Nat Med* 15:798-801, 2009.
 - 25) Patel KP and Bergelson JM: Receptors identified for hand, foot and mouth virus. *Nat Med* 15:728-729, 2009.
 - 26) Chang LY, Lin TY, Huang YC, Tsao KC, Shih SR, Kuo ML, Ning HC, Chung PW, and Kang CM: Comparison of enterovirus 71 and coxsackie-virus A16 clinical illnesses during the Taiwan enterovirus epidemic, 1998. *Pediatr Infect Dis J* 18:1092-1096, 1999.
 - 27) Yang F, Ren L, Xiong Z, Li J, Xiao Y, Zhao R, He Y, Bu G, Zhou S, Wang J, and Qi J: Enterovirus 71 outbreak in the People's Republic of China in 2008. *J Clin Microbiol* 47:2351-2352, 2009.
 - 28) Wong KT, Munisamy B, Ong KC, Kojima H, Noriyo N, Chua KB, Ong BB, and Nagashima K: The distribution of inflammation and virus in human enterovirus 71 encephalomyelitis suggests possible viral spread by neural pathways. *J Neuropathol Exp Neurol* 67:162-169, 2008.
 - 29) Yang Y, Wang H, Gong E, Du J, Zhao X, McNutt MA, Wang S, Zhong Y, Gao Z, and Zheng J: Neuropathology in 2 cases of fatal enterovirus type 71 infection from a recent epidemic in the People's Republic of China: a histopathologic, immunohistochemical, and reverse transcription polymerase chain reaction study. *Hum Pathol* 40:1288-1295, 2009.
 - 30) Bergelson JM, Mohanty JG, Crowell RL, St John NF, Lublin DM, and Finberg RW: Coxsackievirus B3 adapted to growth in RD cells binds to decay-accelerating factor (CD55). *J Virol* 69:1903-1906, 1995.
 - 31) Shafren DR, Bates RC, Agrez MV, Herd RL, Burns GF, and Barry RD: Coxsackieviruses B1, B3, and B5 use decay accelerating factor as a receptor for cell attachment. *J Virol* 69:3873-3877, 1995.
 - 32) Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, and Finberg RW: Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275:1320-1323, 1997.
 - 33) Coyne CB and Bergelson JM: Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell* 124:119-131, 2006.
 - 34) Atarashi K, Hirata T, Matsumoto M, Kanemitsu N, and Miyasaka M: Rolling of Th1 cells via P-selectin glycoprotein ligand-1 stimulates LFA-1-mediated cell binding to ICAM-1. *J Immunol* 174:1424-1432, 2005.
 - 35) Lin TY, Hsia SH, Huang YC, Wu CT, and Chang LY: Proinflammatory cytokine reactions in enterovirus 71 infections of the central nervous system. *Clin Infect Dis* 36:269-274, 2003.
 - 36) Wang SM, Lei HY, Huang KJ, Wu JM, Wang JR, Yu CK, Su IJ, and Liu CC: Pathogenesis of enterovirus 71 brainstem encephalitis in pediatric patients: roles of cytokines and cellular immune activation in patients with pulmonary edema. *J Infect Dis* 188:564-570, 2003.

Identification of P-selectin glycoprotein ligand-1 as one of the cellular receptors for enterovirus 71

Yorihiro NISHIMURA and Hiroyuki SHIMIZU

Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases,
4-7-1 Gakuen, Musashimurayama-shi, Tokyo 208-0011, JAPAN

E-mail:

Yorihiro Nishimura: ynishi@nih.go.jp

Hiroyuki Shimizu: hshimizu@nih.go.jp

Enterovirus 71 (EV71) is a major causative agent of hand, foot and mouth disease (HFMD), a common febrile disease in young children. Although clinical manifestations of HFMD are usually mild and self-limiting, EV71 can cause large outbreaks of HFMD including severe neurological complications. We identified human P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1; CD162) as a functional receptor for EV71 using an expression cloning method with a human T cell cDNA library by panning. PSGL-1 is a sialomucin membrane protein, expressed on leukocytes, that has a major role in early stages of inflammation by interacting with selections and chemokines. EV71 specifically binds to the N terminal region of PSGL-1 and the expression of human PSGL-1 allowed EV71 replication in nonsusceptible mouse cells, suggesting that PSGL-1 is a functional EV71 receptor. We found the presence of strain-specific EV71 replication in leukocytes. In addition, EV71 replicates in nonleukocyte cell lines in a PSGL-1-independent manner. Thus, further elucidation of the PSGL-1-dependent EV71 replication may provide valuable insights into the molecular basis of EV71 infection including HFMD and various neurological diseases.

