

とは異なっている。我々は、HTLV-I 陽性の患者で PML を発生した症例や[3]、HTLV-I の合併に伴い高度の脱髄病巣が見られた症例を経験した[4]。しかも後者の症例では生前脳生検にて JCV 調節領域の解析が行われ、JCV 遺伝子には大きな変異が見られない事が判っており[5]、HTLV-I の関与が問題とされていた。そこで本研究では、HTLV-I の特異的転写因子である Tax が JCV の転写活性に影響を与えているという可能性を検討するために Dual luciferase assay を用いた解析を行った。

〔方 法〕

JCV archetype および PML type の両方のウイルスの初期蛋白転写領域(early protein transcription signal)、後期蛋白転写領域(late protein transcription signal)をホタル(fire fly) luciferase 活性を持った vector に subcloning し、それぞれの vector を HTLV-I Tax の発現 vector とともに、ヒト腎臓由来の 293 細胞に transfection した。Transfection の効率は発光酵素 luciferase を用いた発光強度の差として測定した。

1) Vector construction

a) Reporter vector

pGL3-basic vector (fire fly) luciferase vector に JCV CY(archetype)と JCV Mad1(PML type)の初期蛋白転写領域と後期蛋白転写領域をそれぞれ subcloning した(図 1A)。陰性 control として subcloning を行っていない pGL3-basic vector そのものを用いた。

b) Enhancer vector

pCMV-FLAG vector に HTLV-I の Tax 蛋白の coding region を subcloning した。陽性 control として、Mad 1 の転写活性を促進することが知られている HIV-1 由来 tat 蛋白の coding region [6]を pCMV-FLAG vector に subcloning したものを用いた(図 1B)。

c) Internal control vector

Transfection の効率を補正するための internal control として pRL-SV40 vector (ウミシイタケ Renilla) luciferase vector を用いた。陽性 control には Tax によって転写活性が促進することが知られている HTLV-I の LTR [7, 8]を pGL3-basic vector に subcloning したものを用いた。以上の reporter vector (JCV)、enhancer vector (Tax)、internal control vector を 50:50:1、の割合で 293 細胞に transfection した。

2) Transfection

Effectene (QIAGEN: non-liposomal lipid)を用いて行った。

a) 293 細胞を transfection 前日に 60 mm dish あたり 5.0×10^5 で蒔いて、翌日まで DMEM+10% FBS で培養。

b) $1 \mu\text{g}$ の DNA を buffer EC で希釈して $150 \mu\text{l}$ に溶解し、 $8 \mu\text{l}$ の enhancer を加えて voltex。

c) 室温で 5 分間放置した後、 $25 \mu\text{l}$ の effectene を加えて voltex。

d) 293 細胞の media を新しい 4 ml の media に交換する。

e) 1 ml の growth media を transfection complex に加え、pipetting で混ぜた後、60 mm dish に 1 滴ずつ加える。その後ゆっくりと dish を揺らして、液を一様にする。

f) transfection reagent を加えた細胞は 48 時間 37°C 、5% CO_2 で incubate して、luciferase assay を行う。

3) Dual Luciferase Assay

Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)は、fire fly luciferase の発光値で表される転写活性値を、内部対照である renilla luciferase の発光値で補正する測定方法で、これによって dish 間の細胞の状態や transfection 効率に起因する結果 (比活性) のばらつきを最小限に抑えることができる。

a) 60 mm dish から培地を除く。

b) PBS(-)で 3 回洗う。

- c) 1 x passive lysis buffer (PLB)を 400 μ l ずつ加える。
- d) シリコンラバーで細胞を剥離する。
- e) 細胞抽出液をマイクロチューブに移し、凍結融解を行って細胞を完全に破壊する。
- f) 測定用チューブに Luciferase Assay Reagent II(LAR II)を 100 μ l ずつ 分注。
- g) 細胞抽出液 20 μ l を LAR II に加え、2 ~ 3 回 pipetting で混和する。
- h) 測定用チューブをルミノメーター(TD-20/20; Turner Designs Luminometer)に set して fire fly luciferase 活性を測定する。
- i) 1 x Stop & Glo Reagent を 100 μ l 加えて vortex で混和する。
- j) 測定用チューブをルミノメーターに set して renilla luciferase 活性を測定する。

4) Luciferase Assay 比活性の算出

- a) 各 fire fly luciferase assay 活性値を、renilla luciferase 活性値で除す。
- b) 得られた比活性値を計算し、グラフで図示化する。

〔結 果〕(図 2)

1) HTLV-I Tax 蛋白発現下では、Mad 1 初期蛋白転写領域と後期蛋白転写領域に転写活性の上昇が認められ、その値は陰性 control の 1,300-1,500 倍であった。また CY 後期蛋白転写領域でもその転写活性は約 900 倍に上昇した。

2) HIV-1 tat 蛋白発現下では従来の報告どおり、Mad 1 の後期蛋白転写領域転写活性の上昇が認められたが、本実験では初期蛋白転写領域も同様に活性化された。また CY 後期蛋白転写領域転写活性においては約 500 倍の活性の上昇が認められた。

〔考 察〕

AIDS の流行により PML 症例が急増し、AIDS 患者の 3-5%と高頻度に見られることが報告され、さらに AIDS に見られる PML の白質病変が高度であることも知られ、この背景因子が検討された [9, 10]。その結果、HIV-1 tat は JCV 後期転写を活性化することが認められた [11, 12]。HIV-1 tat は HIV-1 LTR にある "transactivation responsive element: TAR" を認識して自らの転写を活性化することが知られているが、同様の TAR 配列が JCV 後期転写 RNA にも存在していることから、JCV の活性化は TAR を介したものと考えられた [13]。その後の deletion mutation analysis により後期 RNA 翻訳開始部位の上流の GA/GC-rich region (GGAGGCGGAGGC) が tat による活性化に重要な部位として同定された [6]。最近、GA/GC-rich region が転写と DNA 複製を制御する核タンパク Pur alpha の結合部位であることが判明し、tat と Pur alpha とが相乗的に JCV の転写を活性化していることが示されてきている [14]。しかし、活性化されるのは JCV 後期転写であり、初期転写に関する知見が無く、また従来の研究は PML type の JCV と HIV-1 との作用を検討したもののみで、archetype との関係は未知である点など、今後に残された問題と思われる。

今回、我々は HTLV-I を対象として検討した結果、JCV-PML type の初期蛋白転写領域と後期蛋白転写領域の両方が HTLV-I Tax により活性化されることを示した。対象として用いた HIV-1 tat も初期蛋白と後期蛋白との両方が活性化しており、従来の所見に加えるべき新しい知見と思われる。今回初めて用いた CY type JCV では後期蛋白のみの転写が上昇しており、GA/GC-rich region の存在が影響している可能性が考えられた。初期蛋白の場合には GA/GC-rich region の配列は GGAGGCCCGAGGC と 1ヶ所が G から C に変わっており、そのために活性が上昇しなかったことも考えられるが、Mad 1 初期蛋白転写は活性化されていることから、GA/GC-rich region 以外にも転写効率に影響する部位があるものと推測された。

HTLV-I Tax は ATF/CREB 蛋白と HTLV-I LTR の 21-bp repeats に結合する coactivators CBP/p300 と協調して自らのウイルス遺伝子を活性化するばかりでなく、JCV と同じパポウイルス科ポリオーマウ

イルス属の SV40 の初期蛋白転写領域を HTLV-I Tax が NF-kappa B を介して活性化することが報告されている [15, 16]。HTLV-I は NF-kappa B を介して IL-2 や IL-2R などの細胞性遺伝子を活性化しているばかりでなく、その他多数の growth factors や receptors を活性化していることが知られている [17, 18]。しかしながら HTLV-I Tax が JCV を活性化したという報告は未だ無い。JCV 調節領域には HTLV-I Tax にて活性化される NF-kappa B、AP-1 結合部位があり [19]、どのような機序で JCV を活性化させるかは今後の課題と思われる。

今回、HTLV-I Tax が JCV の初期転写と後期転写を著明に亢進させることを明らかにしたが、このことは HTLV-1 陽性の患者での PML 病変が高度であることを説明する一つの理由と考えられた。今後 Tax binding site と考えられる NF-kappa B site 等を削除した deletion mutant を用いて Tax の結合部位の同定を行い、転写活性の分子レベルでの解析を進めることが重要と考えられた。

〔文 献〕

- 1) Weber, T., Major, E.O.: Progressive multifocal leukoencephalopathy: molecular biology, pathogenesis and clinical impact. *Intervirology* 40: 98-111, 1997
- 2) Monaco, M.C., Jensen, P.N., Hou, J., Durham, L.C., Major, E.O.: Detection of JC virus DNA in human tonsil tissue: evidence for site of initial viral infection. *J Virol* 72: 9918-9923, 1998
- 3) Ochi, H., Yamada, T., Hara, H., Yoshimura, T., Iwaki, T., Nagashima, K., Yogo, Y., Kobayashi, T.: A case of progressive multifocal leukoencephalopathy with methionine uptake demonstrated by PET. *Rinsho Shinkeigaku* 36: 858-863, 1996
- 4) 中野俊也、湧谷陽介、三浦弘資、余郷嘉明、前迫直久、林 裕子、清水保孝、長嶋和郎、大浜栄作: 高度な壊死性変化を示した進行性多巣性白質脳症 (PML) の 1 剖検例. *Neuropathology* 18 Suppl: 181, 1998
- 5) Wakutani, Y., Shimizu, Y., Miura, H., Nakashima, K., Nakano, T., Ohama, E., Sugimoto, C., Yogo, Y., Kobayashi, Y., Nagashima, K.: A case of brain-biopsy proven progressive multifocal leukoencephalopathy: Pathologic findings and analysis of JC virus regulatory region. *Neuropathology* 18: 347-351, 1998;
- 6) Chowdhury, M., Kundu, M., Khalili, K.: GA/GC-rich sequence confers Tat responsiveness to human neurotropic virus promoter, JCvL, in cells derived from central nervous system. *Oncogene* 4: 887-892, 1993
- 7) Sodroski, J.G., Rosen, C.A., Haseltine, W.A.: Trans-acting transcriptional activation of the long terminal repeat of human T lymphotropic viruses in infected cells. *Science* 225: 381-385, 1984
- 8) Fujisawa, J., Seiki, M., Kiyokawa, T., Yoshida, M.: Functional activation of the long terminal repeat of human T-cell leukemia virus type I by a trans-acting factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 2277-2281, 1985
- 9) Stoner, G.L., Ryschkewitsch, C.F., Walker, D.L., Webster, H.D.: JC papovavirus large tumor (T)-antigen expression in brain tissue of acquired immune deficiency syndrome (AIDS) and non-AIDS patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2271-2275, 1986
- 10) Budka, H., Costanzi, G., Cristina, S., Lechi, A., Parravicini, C., Trabattoni, R., Vago, L. : Brain pathology induced by infection with the human immunodeficiency virus (HIV). A histological, immunocytochemical, and electron microscopical study of 100 autopsy cases. *Acta Neuropathol* 75: 185-198, 1987
- 11) Tada, H., Rappaport, J., Lashgari, M., Amini, S., Wong-Staal, F., Khalili, K.: Trans-activation of the JC virus late promoter by the tat protein of type 1 human immunodeficiency virus in glial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3479-3483, 1990
- 12) Chowdhury, M., Taylor, J.P., Tada, H., Rappaport, J., Wong-Staal, F., Amini, S., Khalili, K.: Regulation of the human neurotropic virus promoter by JCV-T antigen and HIV-1 tat protein. *Oncogene* 5: 1737-1742, 1990
- 13) Chowdhury, M., Taylor, J.P., Chang, C.F., Rappaport, J., Khalili, K.: Evidence that a sequence similar to

TAR is important for induction of the JC virus late promoter by human immunodeficiency virus type 1 Tat. J Virol 66: 7355-7361, 1992

- 14) Krachmarov, C.P., Chepenik, L.G., Barr-Vagell, S., Khalili, K., Johnson, E.M.: Activation of the JC virus Tat-responsive transcriptional control element by association of the Tat protein of human immunodeficiency virus 1 with cellular protein Pur alpha. Proc Natl Acad Sci USA 93: 14112-14117, 1996 (Published erratum appears in Proc Natl Acad Sci USA. 94: 9571, 1997)
- 15) Saito, S., Nakamura, M., Ohtani, K., Ichijo, M., Sugumura, K., Hinuma, Y.: *Trans*-activation of the simian virus 40 enhancer by a pX product of human T-cell leukemia virus type I. J Virol 62: 644-648, 1988
- 16) Nakamura, M., Niki, M., Nagata, K., Ohtani K., Saito, S., Hinuma, Y., Sugumura, K.: Cell line-dependent response of the enhancer element of simian virus 40 to transactivator p40^{tax} encoded by human T-cell leukemia virus type I. J Biol Chem 264: 20189-20192, 1989
- 17) Bex, F., Gaynor, R.B.: Regulation of gene expression by HTLV-I Tax protein. Methods. 16: 83-94, 1998
- 18) Kitze, B., Brady, J.N.: Human T cell lymphotropic retroviruses: association with diseases of the nervous system. Intervirology 40: 132-142, 1997
- 19) Raj GV, Khalili K. Transcriptional regulation: lessons from the human neurotropic polyomavirus, JCV. Virology 1995; 213: 283-291.

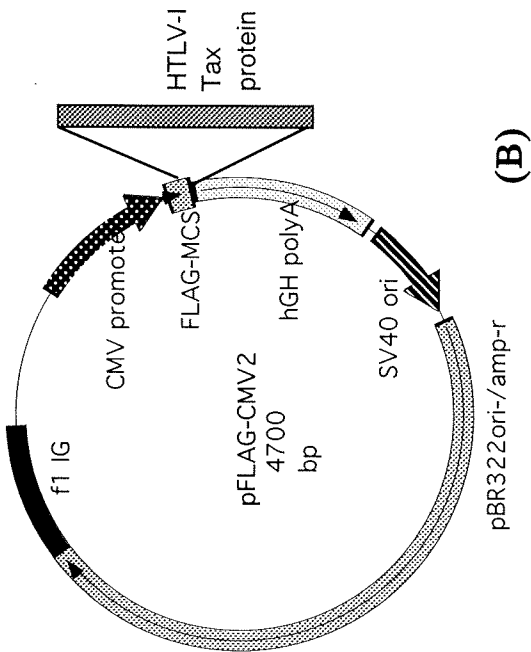
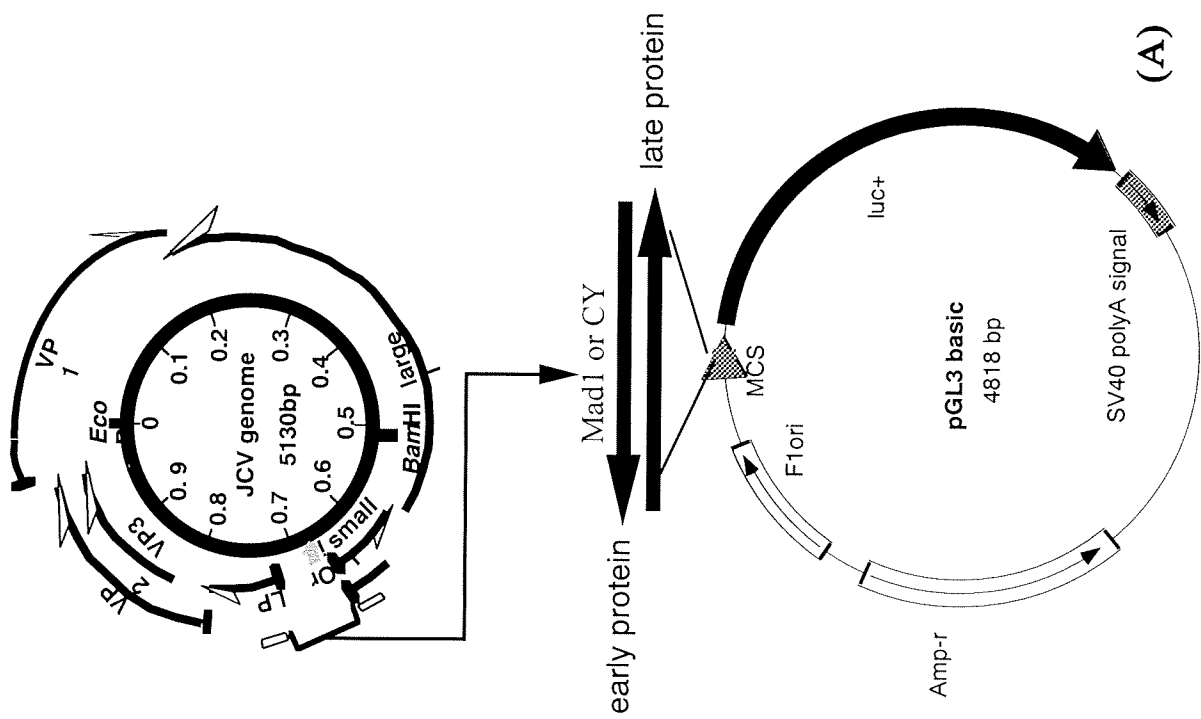


図1 Luciferase assay 用 vector のconstruction

A) ホタルルシフェラーゼ発光ベクター pGL3 basic のルシフェラーゼ遺伝子上流に、JCV MadIとCYの調節領域遺伝子を、それぞれ初期蛋白転写方向と後期蛋白転写方向でサブクローニングした。

B) HTLV-I Tax 遺伝子は mammalian 発現ベクター pFlag-CMV2 のCMVプロモーター下流にサブクローニングした。

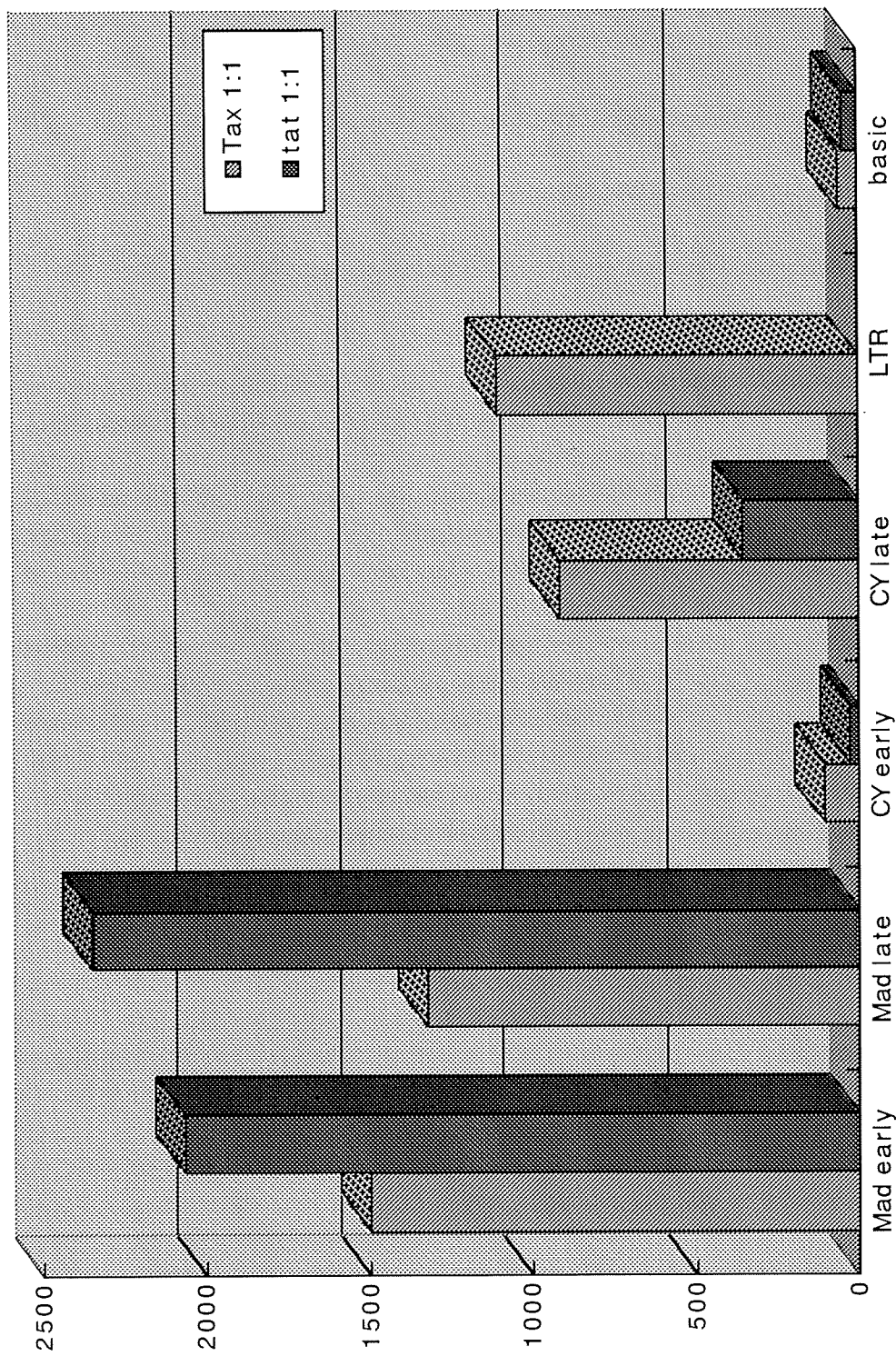


図2 Dual luciferase assayの結果 (縦軸は比活性)

Tax で活性化されるボジティブコントロールに HTLV-1 の LTR を pGL3 にサブクローニングしたものを、ネガティブコントロールには何も insertion されていない pGL3 basic vector を用いた。HTLV-1 Tax 発現下では、Mad1 初期蛋白転写領域と後期蛋白転写領域で陰性コントロールの 1300 ~ 1500 倍の転写活性の上昇が認められた。CY 初期蛋白転写領域では転写活性は上昇しなかったが、後期蛋白転写領域では陰性コントロールの約900倍の活性上昇が見られた。また HIV-1 tat 発現下では Mad1 の初期および後期蛋白領域と CY の後期蛋白転写領域において転写活性の上昇が認められた。

J Cウイルス粒子形成とDNA免疫

班員：保井孝太郎（東京都神経科学総合研究所・微生物学・免疫学）
研究協力者：向川 純（東京都神経科学総合研究所・微生物学・免疫学）
宮本 道子（東京都神経科学総合研究所・微生物学・免疫学）
趙 子江（東京都神経科学総合研究所・微生物学・免疫学）

Pseudo particle formation of JC virus and DNA immunization

Kotaro YASUI, Jun MUKAIGAWA, Michiko MIYAMOTO, Zijiang ZHAO

Department of Microbiology and Immunology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience

ABSTRACT

To analyze virological characteristics and host immune response of JC virus, we developed a production system of pseudo JC virus particle which had JC virus virion proteins and appropriate reporter genes. When the construct DNA which had VP1, 2 and 3 protein genes of JC virus under a SRa promoter was transfected in Cos 7 or 293T cells, JC virus like-particles were observed in the nucleus. The JC virus like-particles were isolated and purified by sucrose-CsCl gradient centrifugation. The purified JC virus like-particle was composed of JC virion proteins and SRa plasmid DNA. When pJCV231/SRa and pLacZ/SRa constructs were co-transfected in Cos 7 cells, LacZ DNA was also detected in the purified JC virus like-particles.

After naked DNA immunization method was developed, new approaches to vaccination has been actively developed using plasmid DNA expressing antigens of a variety of infectious agents. To develop a drug for PML treatment, we examined application of DNA immunization method. We focused in this experiment on development of more simple and constantly successful DNA immunization method. The plasmid DNA expressing VP1 of JC virus could induce immune response against JC virus VP1 effectively and constantly in mice and rabbit using our DNA immunization method. This method is very simple and applicable to many different kinds of antigens for constant and effective induction of specific immune responses in many different kinds of animals.

【はじめに】

J Cウイルスは、中長期的に脱髄が進行性に起こる疾患である進行性多巣性白質脳症（PML）の病因ウイルスであると考えられている。日本人の70%を越える成人にJ Cウイルスの感染が認められ、1) その多くが持続感染状態にあり断続的にJ Cウイルスを排出している可能性が報告されているが、持続感染機構等は不明のままである。またPML類似脳疾患にJ Cウイルスの増殖が関与している可能性が予測されているが、確証は得られていない。さらにAIDS患者には、数%とHIV非感染者と比較してきわめて高率にPMLが発症することが報告されている。したがってJ Cウイルスは容易に脳内に侵入し、増殖することが予想される。PML患者脳内でのJ Cウイルスは、もっぱらオリゴデンドログリア細胞で増殖し、神経細胞では増殖しないと考えられている。我々は、J Cウイルスの遺伝子発現調節領域が、J Cウイルスの宿主域を決める要因の一部になっていることを明らかにした。2) しかし、オリゴデンドログリア細胞と神経細胞でのJ Cウイルスの増殖性の違いを、その遺伝子発現調節領域の活性によって説明出来ていない。

J Cウイルスの有効なin vitro増殖系は、ヒト脳初代培養細胞（PHFG）に限られている。またJ Cウイルスをin vitroで培養すると、その遺伝子発現調節領域の構造が容易に変異することも明らかになってい

る。2、3) これらの点が、J Cウイルスのウイルス学的研究を遅らせ、持続感染とPML発症機構の解明を困難にしている。

そこでJ Cウイルスに対する宿主の免疫状態の解析と持続感染機構の解明、特異な宿主域を規定する因子の同定、PML発症機構の解明などを可能にするため、組み換えDNA技術を用いて、レポーター遺伝子と種々な遺伝子発現調節領域を内部に持ち、J Cウイルスの外郭蛋白で出来たpseudo J Cウイルス粒子の形成を試みた。

一方、PMLの治療法については現在殆ど検討されていない状態である。PML患者は比較的長い経過をとり、細胞性免疫が低下しているものが多いと考えられている。遺伝子工学的技術の発展により、現在では蛋白よりもDNAを操作する方が容易である。そこで治療的ワクチンの可能性をはかる目的で、より有効なDNA免疫法の開発を試みた。

【材料と方法】

1, 発現ベクターの構築

J Cウイルス遺伝子は、我々がクローニングしたTokyo-1株を用いた。3) J Cウイルス構造蛋白は、後期遺伝子領域にコードされている。そこでJ CウイルスTokyo-1株後期蛋白をコードしている遺伝子領域を、強力なプロモータSRaを持つ発現ベクターに組み込みpJC231/SRaを構築した。4) また同様に、レポーター遺伝子としてLacZを持つ発現ベクター、pLacZ/SRaを構築した。一方DNA免疫法に用いる目的で、CAGプロモータ下でVP1蛋白を発現する、発現プラスミドpJCVP1/CAGを構築した。

2, 発現蛋白およびJ Cウイルス粒子の検出

発現体DNAをCos 7および293T細胞にトランスフェクションし、発現蛋白を抗J Cウイルスウサギ抗体または、抗 β -galactosidase抗体を用いた免疫染色によって検出した。

J Cウイルス様粒子の形成は、電子顕微鏡を用いた形態学的観察と、ウイルス粒子を分離精製することによって確認された。pJC231/SRaをCos 7および293T細胞にトランスフェクションし、2日間培養後細胞を固定して、透過電子顕微鏡により核内J Cウイルス様粒子の形成を観察した。

一方生化学的方法による粒子の確認は、pJC231/SRaおよびpLacZ/SRaをCos 7細胞にトランスフェクション後2日間培養し、細胞を破壊してsucrose-CsCl gradient遠心法を用いてJ Cウイルス粒子を精製する方法によった。25%と33%CsClのinterface画分に遠心沈降される粒子を集め、DNaseI処理後抗J Cウイルス抗体で免疫沈降し、VP1またはLacZ遺伝子のプライマーを用いたPCR法により、粒子内に遺伝子DNAが入っていることを確認した。

3, DNA免疫法

pJCVP1/CAG DNAを0.01%金コロイドと混合し、マウス皮下またはウサギ耳静脈内に投与した。抗体産成の確認は、pJC231/SRaをトランスフェクションしたCos 7細胞が発現するVP1蛋白を、間接蛍光抗体法により検出することにより行った。

【結果と考察】

1, J Cウイルス構造蛋白の発現

これまでの我々の研究によりJ Cウイルスの粒子形成には、以下の条件が必要であることが明らかになっている。a, ヒトポリオマーウイルスのDNA replication originを持つプラスミドが存在すること。

b, T抗原の発現があること。c, J CウイルスVP1蛋白のみならずVP2,VP3蛋白が発現していること。さらに哺乳動物細胞内で発現できるプロモータを持ったバキュロウイルス発現系を用いた研究により、VP1, VP2,VP3蛋白の発現のみでは粒子形成は起こらないこと、バキュロウイルスは、肝臓細胞には良く感染するが、Cos 7細胞などそれ以外の細胞では感染効率が低いことが明らかになった。そこで、Cos 7細胞や293T細胞などのT抗原を発現している細胞に、効率よく発現体DNAをトランスフェクション出来る条件を検索し、50%を越えるトランスフェクション効率条件を設定することが出来た。またpJC231/SRaと

pLacZ/SRa等異なる発現体DNAをco-transfectionした場合、発現している細胞の殆どが両者の発現体のコード蛋白を共に発現していた。

2, JCVウイルス様粒子の形態学的確認

pJC231/SRaをトランスフェクションしたCos 7細胞および293T細胞内に、JCVウイルス様粒子が形成されているかどうかを、電子顕微鏡により観察した。その結果図1に示すように、核内に多数のJCVウイルス様粒子が形成されていることが確認できた。粒子形成効率はサル腎臓細胞由来であるCos 7細胞の方が、ヒト腎臓細胞由来の293T細胞よりよかった。この違いの原因は不明であるが、発現体DNAのreplication originとそれぞれの細胞で発現しているT抗原が、サルのウイルスであるSV₄₀由来であることによるものである可能性も考えられ今後検討する必要がある。

3, JCVウイルス様粒子の生化学的確認

pJC231/SRaとpLacZ/SRa発現体DNAをCos 7細胞にトランスフェクションし2日間培養後、細胞を破碎しsucrose-CsCl gradient 遠心法を用いて、JCVウイルス様粒子を精製した。JCVウイルス粒子は、この方法で精製した場合、25%と33%のCsCl gradientの中間に遠心沈降される。そこでこの画分を採取しDNaseI処理後、VP1およびLacZ遺伝子のプライマーを用いPCR法を行うことにより、この画分にVP1 DNAおよびLacZ DNAが沈降してきているかどうかを調査した。その結果、pJCVP231/SRa発現体DNAをトランスフェクションした場合、VP1 遺伝子を含むDNAが、この画分に遠心沈降されてくることが確認された。また一方pLacZ/SRa発現体DNAを単独でトランスフェクションした場合、DNaseI処理後この画分にはLacZ遺伝子を含むDNAは検出されなかった。さらにこの画分を抗JCVウイルス抗体で免疫沈降させ、沈降画分をPCR法により調査して遺伝子DNAが含まれているかどうかを調査した。その結果図2に示すように、抗JCVウイルス抗体により沈降される画分にVP1遺伝子を含むDNAが検出された。この結果はプラスミドDNAが、JCVウイルス構造蛋白で包まれたJCVウイルス様粒子内に存在していることを示すものである。さらにpJC231/SRaとpLacZ/SRa DNAをco-transfectionした場合、LacZ遺伝子を持つDNAも抗JCVウイルス抗体で沈降される粒子中に検出された。これらの結果から、目的の遺伝子をその内部に持った偽JCVウイルス粒子を形成することが可能になったといえる。これらの偽JCVウイルス粒子の感染性については、現在調査中である。

4, DNA免疫法の開発

蛋白そのものと比較して、DNAを操作してデザインすることは容易である。これまで発現体DNAを直接動物体内に投与して、免疫反応を誘導しようとする試みがなされてきており、一応の効果的結果が報告されている。しかし常に安定した一定の結果が得られる訳ではなく、またその応用範囲も限られている。一方PMLの治療法の開発は、いまだ手が付けられていない状態である。そこで、簡便で常に一定の結果が得られ、多くの抗原とヒトを含む動物に応用範囲が広いDNA免疫法の開発を試みた。

まずモデル実験として、日本脳炎ウイルス構造タンパク遺伝子を用いて検討した。その結果、日本脳炎ウイルス構造蛋白発現体DNAと10nmの金コロイドを混合し、マウス静脈内に投与すると、中和抗体を含む高い抗体産成が誘導された。投与ルートを検討した結果、静脈内投与、皮下投与、腹腔内投与共に有効であり、投与DNA量も、0.5ugでも効果的に抗体産成が誘導された。また、細胞性免疫反応も誘導されていることが確認された。このDNA免疫法は、マウスのみならずウサギ、ニワトリでも有効であることも明らかとなった。この結果をもとに、JCVウイルス構造蛋白に対する免疫反応の誘導を試みた。強力なプロモータ活性を持つCAGプロモーターを用い、JCVウイルス構造蛋白VP1遺伝子を組み込んだpJCVP1/CAG発現体を構築した。この発現体DNAを金コロイドと混合し、マウスおよびウサギ静脈内に投与した。抗体産成の検出は、pJCVP231/SRa発現体をトランスフェクションしたCos 7細胞を用いて、間接蛍光抗体法により行った。その結果図3に示すように、抗JCVウイルスVP1抗体が効率よく誘導されてくることが確認された。PMLの治療としてどのような免疫反応が有効であるかについては、現在不明である。しかしPML患者には細胞性免疫の低下がみられることから、PML発症予防に細胞性免疫が関与している可能性が大きい。JCVウイルスに対する免疫応答を誘導することは、PMLの治療法の一つとして有効であると考えられ

る。DNA免疫法は、抗体産成のみならず細胞性免疫の誘導にも効果的であり、このDNA免疫法によるPML治療法の開発の可能性を示すことが出来た。またこの方法は、SSPEやプリオン病など他の疾患にも応用可能であると考えられる。

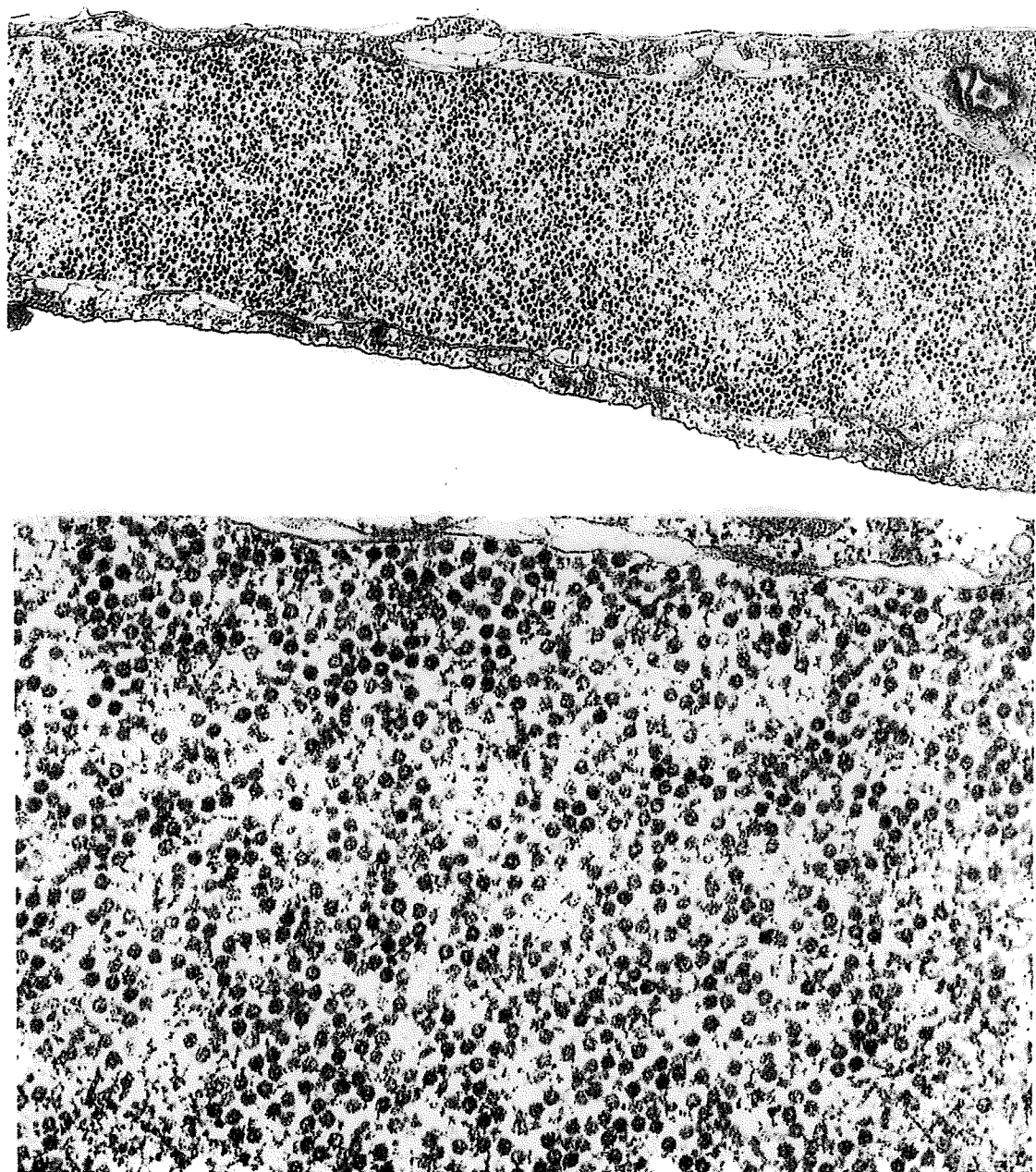
【結論】

- 1, JCウイルス構造蛋白発現体をT抗原発現細胞内に導入することにより、目的のレポーター遺伝子を内部に持ちJCウイルスピリオン蛋白で包まれた、偽JCウイルス粒子を形成出来ることを確認できた。
- 2, JCウイルス構造蛋白発現体DNAを用いて、JCウイルス蛋白に対する免疫反応を誘導できる、簡便で効果的なDNA免疫法を開発した。この方法は、PML治療法の開発に道を開くものとなりうる。

【文献】

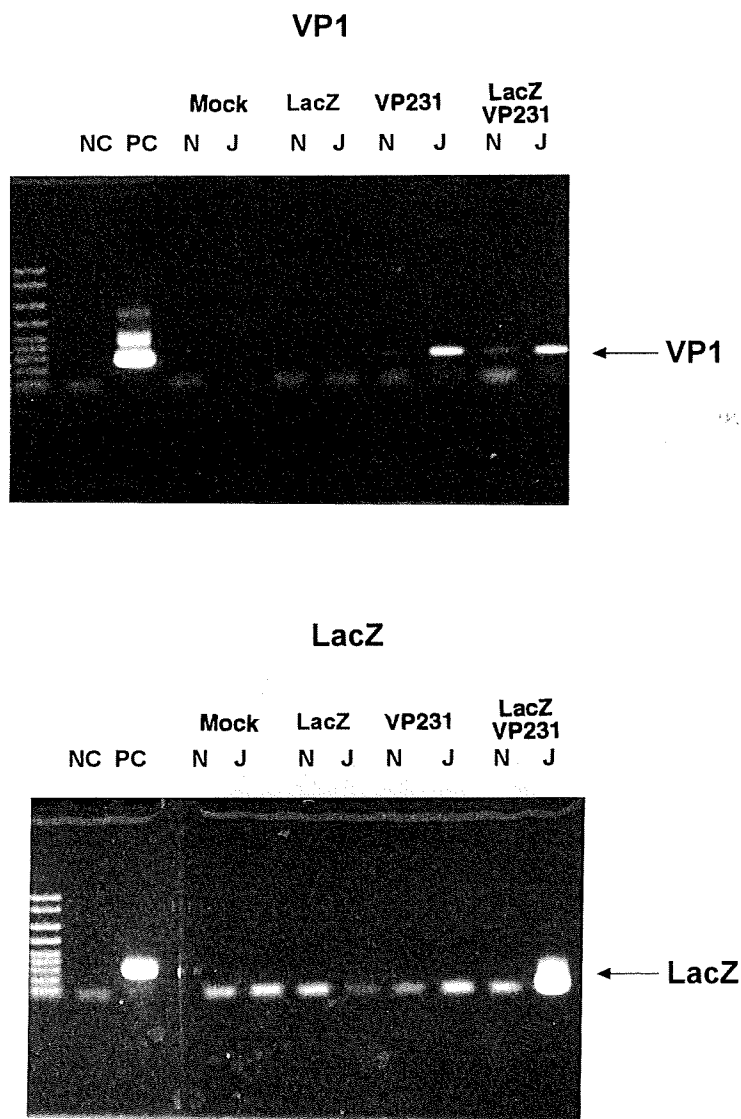
- 1) 益子仁、中村健、篠崎正彦、荒木和子、藤井良知、保井孝太郎、荻原博：JCウイルスの血清疫学的研究-1 東京地方における年齢別抗体保有状況ならびに地域抗体保有状況について。帝京医学雑誌。5：299。(1982)
- 2) Shinohara, T., Matsuda, M., Yasui, K., Yoshiike, K., : Host range bias of the JC virus mutant enhancer with DNA rearrangement. *Virology*. 170: 261-263 (1989)
- 3) Matsuda, M., Jona, M., Yasui, K., Nagashima, K.,: Genetic characterization of JC virus Tokyo 1 strain, a variant oncogenic in rodents. *Virus Res*. 7: 159-168 (1987)
- 4) Shishido, Y., Nukuzuma, S., Mukaigawa, J., Morikawa, S., Yasui, K., Nagashima, K.,: Assembly of JC virus like particle in Cos 7 cells. *J. Med. Virol.* 51: 265-272 (1997)

図1 pJCVP231/SRa発現体DNAを導入したCos 7細胞核内に形成されたJCウイルス様粒子の電子顕微鏡による観察



下図は高拡大したもの

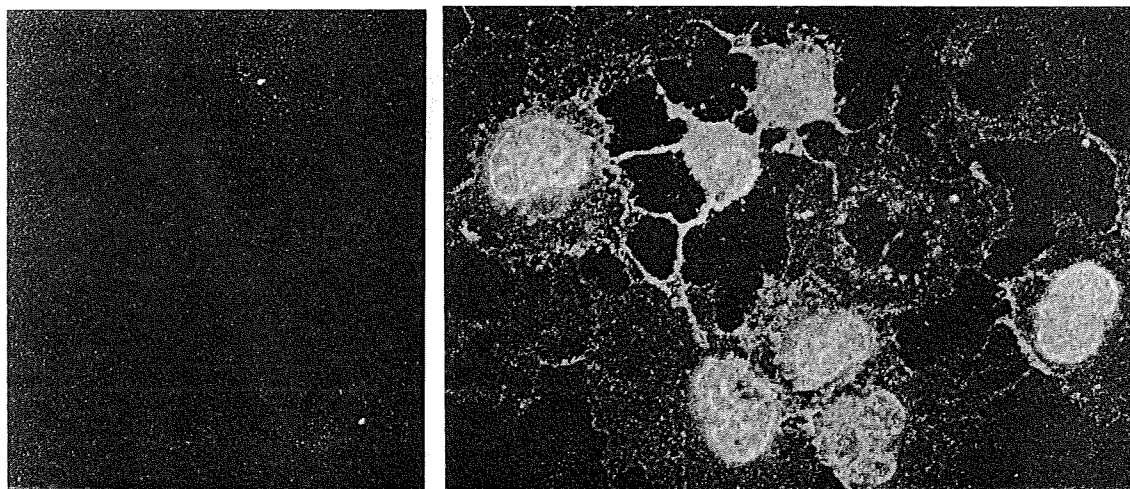
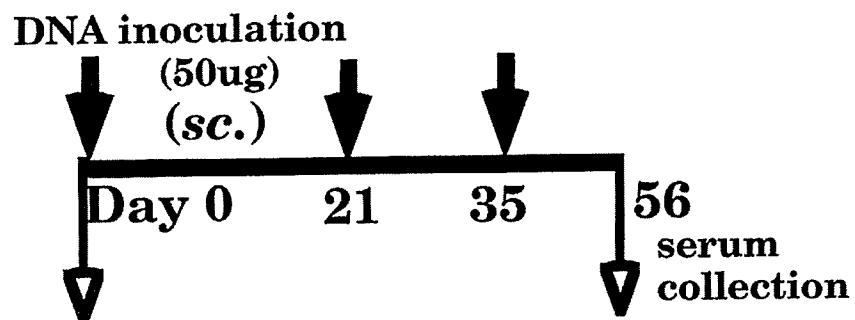
図2, J Cウイルス様粒子中にはレポーター遺伝子を含むプラスミドDNAが含まれている



sucrose-CsCl gradient 遠心により精製した J Cウイルス様粒子を、DNaseI処理した後抗 J Cウイルス抗体で免疫沈降し、沈降してきた J Cウイルス様粒子中に VP1 遺伝子を含む DNA または、LacZ 遺伝子を含む DNA が存在することを、VP1 または LacZ 遺伝子に特異的なプライマーを用いた PCR 法により検出した。

N : 正常ウサギ血清. J : 抗 J Cウイルスウサギ抗体. VP231 : pJC231/SRa 発現体トランスフェクション細胞からの精製粒子. LacZ : pLacZ/SRa 発現体トランスフェクション細胞. Mock : 偽トランスフェクション細胞.

図 3, pJCV P1/CAG発現体DNAを投与したBalb/cマウスの抗VP1抗体産成



JCV VP231 in Cos7 cells

抗プリオン単クローン抗体の作製と性状解析

班 員：檜垣 惠（聖マ医大・難治研）
研究協力者：小平 浩代（聖マ医大・難治研）
：峰 りさ（聖マ医大・難治研）
：水島 裕（聖マ医大・難治研）

Production and characterization of monoclonal antibodies against anti-human prion protein

Megumu HIGAKI, Hiroyo KODAIRA, Risa MINE, Yutaka MIZUSHIMA

Institute of Medical Science, St. Marianna Medical University

ABSTRACT

We develop specific and sensitive monoclonal antibodies (MAbs) against recombinant prion protein (PrP) or synthetic peptides derived from human PrP in order to detect PrP from clinical samples of affected patients and normal distribution.

Here we have employed GST-PrP recombinant protein and also synthesized three peptides whose sequences correspond to amino acid (1) 145-154, (2) 179-189, and (3) 201-217 of human PrP. Six week-old female Balb/c mice were immunized with either DST-PrP or these peptides mixture conjugated with KLH together with Freund's complete adjuvant. Three weeks later mice were immunized with the same antigen mixed with Freund's incomplete adjuvant. Spleen cells were prepared three days after intravenous booster. To obtain monoclonal antibodies, spleen cells were fused with PAI myeloma cell lines by PEG method and HAT selection was performed. Then antibody production was examined by ELISA using Mal-PrP. We could obtain 5 hybridomas producing MAbs by peptides mixture and 6 hybridomas by GST-PrP. These MAbs reacted with recombinant Mal-PrP by Western blotting and three MAbs stained Kuru spots of CJD patients immunohistochemically. Furthermore these MAbs reacted with myelocytic cell lines and also with FDC cells in RA synovium. We are going to examine the distribution of PrP protein and reveal the function of this protein.

【はじめに】

現在、ヒトへの感染が疑われる伝染性海綿状脳脊髄症の早期診断が早急に必要とされている。本疾患における異常プリオンの検出は生検組織を用いた免疫組織染色などにより行なわれるが、現状では感度、複雑さ、時間に制限がある。今回われわれは本疾患の迅速診断に有用な特異性の高いマウス抗ヒトプリオン単クローン抗体の開発を試みる。さらにこれらの抗体を用いて生体内でのプリオン蛋白の分布および機能解析を行う。

【方法】

以下の2種類の抗原を免疫原として用いた。(1) プリオン組換蛋白である GST-PrP は東北大学北本先生より分与された。(2) クローニングされたヒトプリオン蛋白 cDNA から決定されたアミノ酸配列を参考に親水性、フレキシビリティ、二次構造より抗原性部位を推定した。さらに Korth らの報告を参考にアミノ酸残基 145-154 (10 mer), 179-189 (11 mer), 201-217 (17 mer) にあたる合成ペプチドを作製し、スルフォ MBS 法によりキャリアタンパクの KLH と結合した。GST-PrP または3種類の

合成ペプチド混合物をフロイント完全アジュバントと混合して、Balb/c マウスにプライミング免疫する。3 週後に不完全アジュバントと混合した上記抗原をブースター免疫し、1 週後に採血して抗体価の上昇をペプチドもしくは融合タンパク (Mal-PrP) を抗原とした ELISA にて確認した。抗体価の上昇が認められたマウスにはさらに上記抗原を静注して3 日後に脾臓細胞を採取し、PAI ミエローマ細胞と PEG 法にて細胞融合させ HAT 選択を行った。さらに陽性クローンは融合タンパク (Mal-PrP) を抗原とした ELISA にて選択した。抗体の大量生産の為にプリスタン処理した Balb/c マウスの腹腔にハイブリドーマ細胞を投与して腹水を得た。

【結果と考察】

GST-PrP を抗原とした 6 種類のハイブリドーマ細胞 (図 1)、およびペプチドを抗原とした 5 種類のハイブリドーマ細胞が得られた。前者の陽性クローンに関してはアイソタイプを決定すると共にウエスタンブロットにより Mal-PrP との反応性を確認した。そのうち 3 クローンは CJD 患者脳組織を用いた免疫染色でクールー班が陽性であった。また、フローサイトメーターを用いた種々の細胞株との反応性の検討では U937 および THP-1 細胞株と反応した。一方、これら抗体の中には慢性関節リウマチリンパ組織の濾胞樹状細胞と反応すると共に血管内皮細胞と反応するものが得られた。今後 PrP の生体内での分布を検討すると共にその機能解析にこれらの抗体を用いる。さらに抗ペプチド抗体に関しても解析を進める。

【文献】

- 1) Korth C, Stierli, Streit P, Moser M, Schaller O, Fischer R et al.: Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature*.390:74-77, 1997
- 2) Hill AF, Zeidler M, Ironside J, Collinge J.: Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet* 349: 99-100, 1997
- 3) Keuken LJM, Schreuder BEC, Melen RH, Mooij-Harkes G, Vromans MEW, Langeveld JPM.: Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *J Clin Microbiol* 34: 1229-1231, 1996
- 4) Williamson RA, Peretz D, Smorodinsky N et al.: Circumventing tolerance to generate autologous monoclonal antibodies to the prion protein. *Proc Natl. Acad. Sci.* 93: 7279-7282, 1996
- 5) Kascsak RJ, Tonna-Demasi M, Fersko R, Rubenstein R, Carp RI, Powers JM.: The role of antibodies to PrP in the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies. In Brown F (ed) *Transmissible Spongiform Encephalopathies- impact on animal and human health.* Dev Biol Stand Basel, Karger, 1993, vol. 80, pp141-151

Fig.1 Characterization of α GST-PrP mAbs

Antibody	Isotype	ELISA(U)	Western blot	Immunohistochemistry (Brain/RA synovium)
K1-1E	IgG ₁ , κ	10.0	+	+ / (++)
K1-2D	IgG ₁ , λ	1.7	+	/ +
K1-5D	IgG ₁ , κ	0.1	+	/ +
K1-5G	IgG ₃ , κ	0.3	+	/ +
K1-6H	IgG _{2b} , κ	0.9	++	+ / ++
K1-8F	IgG ₁ , κ	1.2	++	+ / ++

ヒトプリオン蛋白に対するモノクローナル抗体

班 員：田中 智之（和歌山医大・微生物学教室）
研究協力者：北元 憲利（姫路工業大学・環境人間学科）
班 員：北本 哲之（東北大学・医・病態神経学）

Production of Monoclonal Antibody to Human Prion Protein

Tomoyuki TANAKA¹⁾, Noritoshi KITAMOTO²⁾ and Tetsuyuki KITAMOTO³⁾

- 1) Department of Microbiology, Wakayama Medical College
- 2) Humanity for Environment Policy and Technology, Himeji Institute of Technology
- 3) Department of Neurological Science, Tohoku University School of Medicine

ABSTRACT

Human prion protein (PrP)-specific monoclonal antibody (MAB190) was obtained from MBP-PrP immunized mouse. MAB190 reacted with not only prion plaque but synaps of cerebellum by immunohistological staining with pretreatment of hydrolytic autoclaving method. By the Western blotting analysis, MAB190 reacted with 27kD, 25kD and 22.5kD prion protein. Further analysis such as epitope mapping are undergoing.

【はじめに】

大腸菌によって発現されたヒト型プリオン蛋白 (Hu-PrP) から、それを特異的に認識するモノクローナル抗体 (MAb) の作製を試みた。今回、これまで報告した ELISA assay とは異なり、免疫組織染色を用いたアッセイ系で陽性クローンを得ることができた。

【材料と方法】

MBP-PrP を免疫源として、型のごとく Balb/c マウスに腹腔内、筋肉内あるいは皮下に Freund's complete adjuvant (FCA) と共に免疫した。PrP を Booster 免疫後、3～4 日目に脾細胞と PAI あるいは P3 (P3-X63-Ag8U1) mouse myeloma cell で Fusion を行った。Hybridoma cell のスクリーニングは、これまで報告した Sandwich ELISA 法と北本ら¹⁾ の Hydrolytic autoclaving を用いた前処理後の免疫組織染色法を行った。Sandwich ELISA 法では MBP-PrP から Factor Xa を使って Hu-PrP と MBP 分画を作成し、MBP 分画を negative control とした。

【結 果】

免疫組織染色の結果、MAB190 に陽性所見が認められた。これらは小脳切片の Prion plaque に特異的に染色されるのみならず Synaps にも陽性を示した (図 1)。一方、MAB190 のウェスタンブロットでは 27kD、25kD および 22.5kD products との反応が認められた (図 2)。一方、Sandwich ELISA 法では MAB190 は陰性であった。そこで、これまでの MAb 作製の過程で Sandwich ELISA 法で陽性であったすべてのクローンの上清および腹腔内移植後に得られた腹水を用いて免疫組織染色を試みたが、すべて陰性か、いくつかは小脳神経繊維あるいは Purkinje 細胞に対する非特異的反応であった。さらにこれらの検体をウェスタンブロットで解析したところ MBP に相当する部位での反応が見られた。

【考 察】

ヒトプリオン蛋白に対する MAb 陽性クローンが得られた。免疫源は MBP-HuPrP であり、Hu-PrP が正確に大腸菌プラスミッドに挿入・発現されていることが確認された。しかし、免疫組織染色法を用いた場合でのみ陽性で、従来 of Sandwich ELISA 法では検出できなかった。Sandwich ELISA 法で検出されたクローンの多くは MBP に反応するものであった。Sandwich ELISA 法は多数検体の測定や迅速性などに利点があり、今後この方法の改良が強く求められる。得られた MAb190 の性状、epitope mapping、他の MAb²⁾ との比較については現在検討中である。

〔文 献〕

- 1) Kitamoto T, Shin RW, Doh-ura K, Tomokane N, Miyazono M, Muramoto T and Tateishi J: Abnormal isoform of prion proteins accumulates in the synaptic structures of the central nervous system in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Am J Path.* 140: 1285-1294, 1992
- 2) Korth C, Stierli B, Streit P, Moser M, Schaller O, Fischer R, Schultz-Schaeffer W, Kretzschma H, Raeber A, Braun U, Ehrensperger F, Hornemann S, Glockshuber R, Riek R, Bi11eter M, Wuthrich K and Oesch B.: Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature.* 390:74-77, 1997

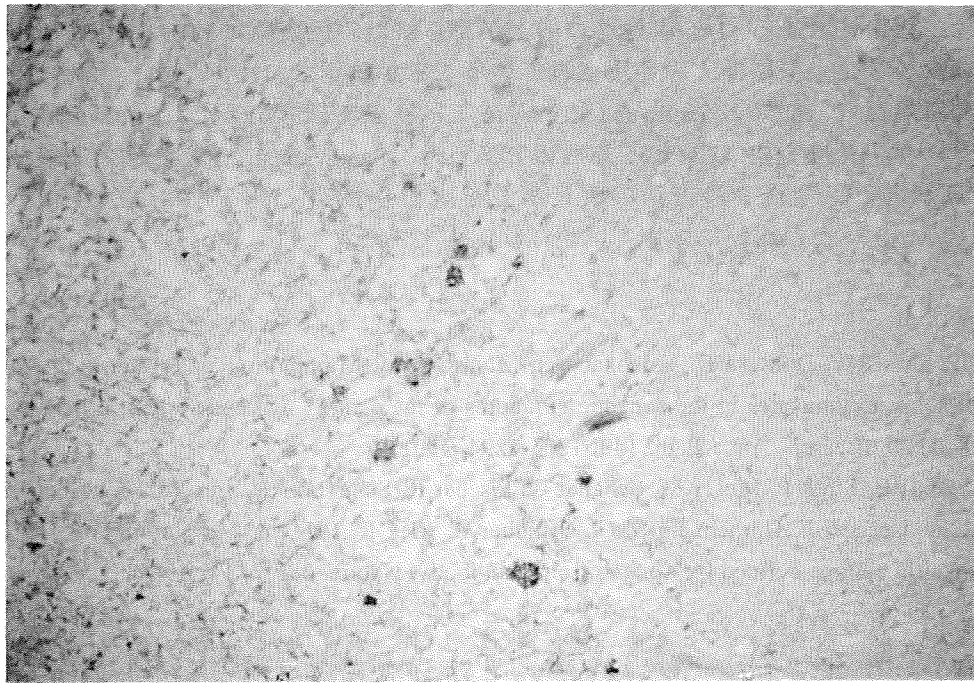


図1 MAb190によるHydrolytic autoclaving前処理を用いた免疫組織染色.
Prion plaqueのみならずSynapsも染色されている.

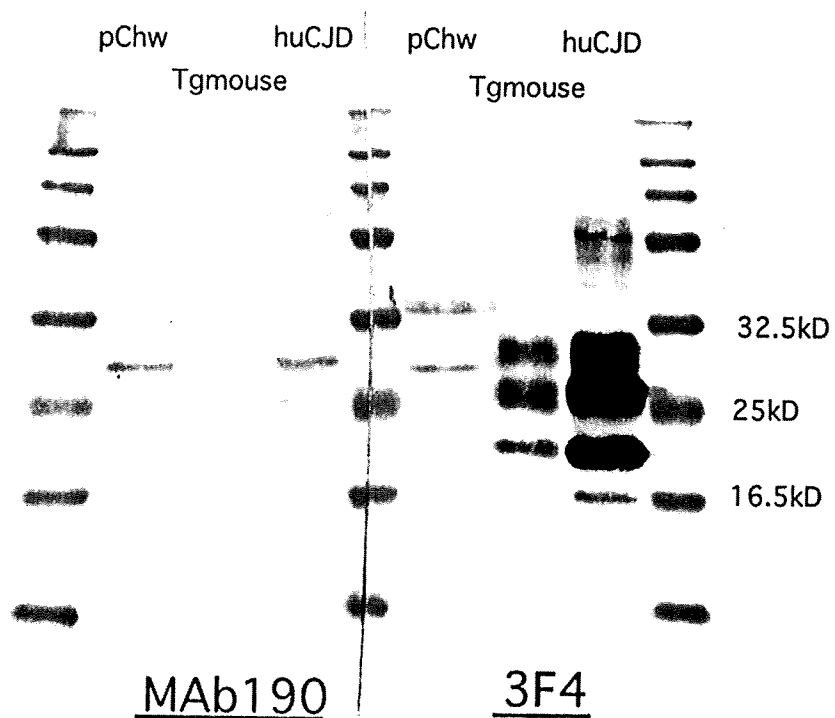


図2 MAb190のWestern blotting.
1: pChw (Knockin mouse), PK(-); 2: Transgenic mouse (発症), PK(+);
3: human CJD, PK(+).

PrP 認識ファージ発現ニワトリモノクローナル抗体の構築

班 員：松田治男（広大・生物生産・免疫生物）

班 員：北本哲之（東北大・医・病態神経）

Construction of the Phage Display Chicken Monoclonal Antibodies against Prion Protein

Haruo MATSUDA, Naoto NAKAMURA, Yuri AOKI, Hiroyuki HORIUCHI, Shuichi FURUSAWA
and Tetsuyuki KITAMOTO¹

Department of Immunobiology, Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University and

¹Department of Neurological Science, Tohoku University School of Medicine

ABSTRACT

Phage display and soluble chicken monoclonal antibodies (mAbs) were constructed from a chicken hybridoma (HUC2-13) which has been generated by cell fusion with a MuH1 fusion partner line and spleen cells from chicken immunized with human prion protein peptide H25 (25 to 49 residues). VH and VL genes from a HUC2-13 hybridoma line were ligated with a linker sequence. Finally, two single chain Fragment of V-region (scFv) expressed on cp3 protein of M13 phage were selected and named as HUC2p3 and HUC2p5. The specificity of these antibodies was demonstrated by ELISA using H25 peptide-coated plate without panning steps. These two antibodies were also obtained as soluble type recombinant scFv antibodies by using non-suppressor cells. These recombinant chicken mAbs, phage display and soluble mAbs were useful for detection of PrP antigens, H25 peptide and PrPc from mouse and sheep brains, in ELISA and Western blotting.

〔はじめに〕

伝染性海綿状脳症の病原体と認識されているプリオン蛋白 (PrP) は、哺乳動物間に高度に保存されているタンパク分子であり、そのアミノ酸レベルでの哺乳動物間ホモロジーは 95% 以上である。そのため、これまでに種々の抗 PrP 抗体が哺乳動物を用いて作成されているが、その認識エピトープには限界があった。一方、ニワトリ PrP と哺乳動物 PrP との間のホモロジーは 40% 以下であり、哺乳動物 PrP を認識する抗体の作成にニワトリが有用であることを強く示唆された。実際に、最近 PrP 特異的ニワトリ抗血清の作成 (1) や著者らによる PrP 特異的ニワトリモノクローナル抗体作成の成功 (2) が報告されている。一方、PrP ノックアウトマウスを免疫動物として PrP 特異抗体の作成が複数報告されてはいるが (3,4,5)、ニワトリを免疫動物として用いればノックアウト動物を利用することなく PrP 特異的モノクローナル抗体を比較的容易に作出可能である。

昨年、私達はヒトを含む哺乳動物の PrP の N 末端を認識するニワトリモノクローナル抗体 HUC2-13 および主としてウシとヒツジの PrP を認識するニワトリモノクローナル抗体 HUC3 の作成に成功した。これらのニワトリモノクローナル抗体はハイブリドーマの培養上清を抗体として利用してきたが、培養上清中の抗体濃度はマウスの系より低いことから、より広範な活用のためにはニワトリモノクローナル抗体の大量生産系の構築が必要である。そこで、本研究ではニワトリモノクローナル抗体 HUC2-13 について、追加的特異性試験を行うとともにファージ発現抗体並びに可溶化抗体の作出を試みた。