

PML will be progressively increased here in Japan, mainly due to the increase of AIDS patients. Until now there were few reports showing available treatment for PML except with the highly active antiretroviral therapy in AIDS-related PML. Therefore, clinicians who are to take care of a PML patient may be puzzled how to manage their patient and what treatment to provide. Based on these reasons, the PML subcommittee has decided to make guidelines for the management of PML during the year of 2005, particularly for the diagnosis of atypical PML and the management of PML in non-AIDS patients.

{はじめに}

昨年度、当 PML 分科会は PML の診断基準を作成し、それを用いてわが国の PML の一次実態調査を行った。その結果、わが国にも症状の著明な改善が認められた患者が少数ではあるが存在することが確認された。わが国では HIV 感染者が増加傾向にあり、今後 PML 患者は増加していくと予測される。しかしながら、現時点では一部の施設を除けば PML は非常に稀な疾患であるため、患者が入院した場合どのような診療計画を立てたらよいのか、最善の治療は何なのか直ちに見当がつかないのが現状と思われる。実際、PML の治療に関しては、エイズに合併した PML では Standard Treatment が提唱されているが、エイズ以外の疾患に合併した PML では明確な治療ガイドラインは提唱されていない。

かかる理由から、最新の PML の診断法および治療法を網羅した診療ガイドラインを本研究班が作成する必要があると判断した。

{目的・方法}

PML は極めて稀な神経疾患であるので、実用的な診療ガイドラインを作成することを目的にする。内容は、2005 年度までに学術雑誌に掲載された Up-date の PML の診断および治療を記述した論文を検索し、グレードを付して診断法・治療法を推奨する。

A: 行うよう強く勧められる

B: 行うよう勧められる

C1: 行うことを考慮してもよいが、十分な科学的根拠がない

C2: 科学的根拠がないので、勧められない

D: 行わないよう勧められる

非エイズ患者の PML は極めてまれであるので、多施設治験結果だけでなく、1 施設における少数例の治験結果に関する有効性が認められた論文はできるだけガイドラインの記載対象にする。さらに、昨年度施行された PML 全国実態調査を解析し、症状の停止および改善が認められた症例について解析し、文献と併せて予後関連因子の解明に努める。また、PML には非定型な神経症状、画像所見および脳脊髄液所見を呈する症例が少なからずあり、このような非定型例における診断法についてもガイドラインの対象にする。2005 年度末までの完成を目標にする。

{考察・結論}

HAART 療法はエイズ関連 PML の早期死亡率を減少させたが、患者の多くは重篤な神経症状を残存した状態で延命しており、さらなる治療法の開発が求められている。また、

HAART 療法を受けたエイズ患者にも PML の発症が少なからず起きており、このような症例では PCR による脳脊髄液の JC ウイルスゲノム検出が陰性のことが多く、さらに MRI 上の脱

髄病巣がGd造影効果陽性であり、PMLの診断が困難なことが欧米では問題になっている。本研究班の診療ガイドラインでは、非定型PMLの診断方法についても最新の知見を紹介する必要があると判断している。治療においても、欧米では種々の抗ウイルス薬および免疫賦活薬による治験がすでに多数行われており、ガイドラインでは1施設の少数例の治験であっても効果が認められた治療についてはガイドラインの対象にすることになっている。

{ 参考文献 }

- 1) Koralnik IJ: New insights into progressive multifocal leukoencephalopathy. *Curr Opin Neurol* 17:365-370, 2004.

{ 研究発表 }

1. 論文発表

- 1) 黒田康夫、江里口誠：神経系感染症の診断と治療。医学と薬学 52:342-348, 2004.
- 2) Sueoka E, Yukitake M, Iwanaga K, Sueoka N, Aihara T, Kuroda Y: Autoantibodies against heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1 in CSF of MS patients. *Ann Neurol* 56:778-786, 2004.

HIV-関連PMLの発症と末梢血CD4(+)Tリンパ球数ならびに血漿HIV負荷量との関係

研究協力者：岸田修二（東京都立駒込病院・神経内科）

〔研究要旨〕 神経内科専門医を対象にしたわが国でのPML（進行性多巣性白質脳症）の疫学調査から、HIV（ヒト免疫不全症ウイルス）関連PMLの患者数が漸増していることが明らかになった。今回エイズ治療拠点病院を対象にしたPMLの発症状況と、発症時のCD4(+)Tリンパ球数、血漿HIV負荷量との関連を検討した。2002年～2003年の2年間におけるエイズ患者数987名中PML発症者は17名であった。発症時のCD4(+)Tリンパ球数は多剤併用抗レトロウイルス療法(HAART)未治療者では平均 $48/\mu\text{L}$ (4～154)と低値であった。HIV負荷量は平均 16×10^4 コピー/mlであった。HAARTを受けている患者でも発症がみられ、CD4(+)Tリンパ球数 $256/\mu\text{L}$ (22～579)と高値であり、HIV負荷量は平均 $6000/\text{ml}$ であった。HAART療法導入前1997年度および後2002年度、2004年度の疫学調査からHIV感染によるPMLの発症者数は増加傾向を認めた。結論：HIV関連PMLの多くは細胞性免疫不全の進行した状態で発症するが、HAARTにより免疫が回復し、血漿HIVが抑制された状態でも発症する。HIV関連PMLはHAARTにより延命するが、神経学的改善を来すかどうかは不明で、重篤な機能障害を来す以前に進行を停止し、改善を来すようなPMLの制御に関連する免疫状態の解明と直接的治療法の開発が必要である。

HIV-related progressive multifocal leukoencephalopathy: Relation between disease onset and CD4 cell count or plasma HIV load.

Shuji Kishida

Department of Neurology, Tokyo Metropolitan Komagome Hospital.

ABSTRACT

There was an increased trend of incidence of human immunodeficiency virus(HIV)-related progressive multifocal leukoencephalopathy(PML) coincident with acquired immunodeficiency syndrome(AIDS) epidemic despite the introduction of highly active antiretroviral therapy(HAART) in Japan. Most patients with PML were previously naive to antiretrovirals with high plasma viral load and low CD4 cell count, but some cases of PML developed in context of HAART-induced immune reconstitution. Although potent antiretroviral therapies significantly prolong survival of patients affected by HIV-related PML, not all HIV-infected patients with PML receive significant benefit from HAART. Further insight into the pathogenesis and mechanism of specific immunity and new therapeutic approaches are required for a more effective control of this disease.

〔はじめに〕 進行性多巣性白質脳症 (PML) は JC ウイルス (JCV) によって引き起こされる中枢神経脱髄疾患であり、後天性免疫不全症候群 (AIDS) 患者にとっては重篤な機能障害から致死的となりうる重要な合併症である。神経専門医を対象に昨年行ったわが国での PML の疫学調査では本症の基礎疾患として AIDS が 40% に認められた¹⁾。基礎疾患としてヒト免疫不全症ウイルス (HIV) 感染症が 85% を占めるという欧米の最近の報告²⁾ に比べると低いものの、わが国で HIV/AIDS 罹患患者が漸増してきていることを反映し、AIDS 関連 PML が漸増傾向にあった。

そこで、HIV 感染と PML の発症の関係をさらに明らかとするために、HIV 治療を専門に行っている AIDS 治療拠点病院での PML 発症状況とその際の免疫状態を、末梢血 CD4(+) リンパ球数と血漿 HIV 負荷量、高活性抗レトロウイルス使用状況を指標に調査した。

〔目的〕 わが国での PML の疫学調査から、HIV 感染者数が漸増している本邦の状況に一致して、HIV 関連 PML の患者数が増加していることが明らかになった。そこで HIV 感染と PML 発症との免疫学的関連を検討した。

材料と方法：AIDS 治療拠点病院 368 施設を対象にアンケート方式で HIV 関連 PML の発症状況と発症時の末梢血 CD4(+)T リンパ球数および血漿 HIV 負荷量を調査し、また高活性レトロウイルス療法導入による本症の影響に関して過去の疫学調査と比較を行った。

(倫理面への配慮)

本報告は個人情報を含まないもので、倫理面での問題はない。

〔結果〕2002 年～2003 年の 2 年間における AIDS 患者数 987 名中 PML 発症者は 17 名であった。HAART 療法導入前 1997 年度および導入後 2002 年度、2004 年度の疫学調査から AIDS 患者全体に占める本症の割合はそれぞれ 1.6%、1.4%、1.7% とほとんど変化がみられないが、AIDS 患者数の増加とともに PML の発症者数は増加傾向を認めた (図 1、表 1)。

発症時の末梢血 CD4(+)T リンパ球数は抗レトロウイルス療法未治療者では平均 $48/\mu\text{L}$ (4~154) と低値であった。血漿 HIV 負荷量は平均 16×10^4 コピー/ml であった。抗レトロウイルス療法を受けている患者でも発症がみられ、CD4(+)T リンパ球数 $256/\mu\text{L}$ (22~579) と高値であり、HIV 負荷量は平均 6000/ml であった (表 2)。

〔考察〕神経専門医を対象とした PML 罹患患者の疫学調査から、わが国の PML 罹患患者は HIV 感染患者の漸増に一致して増加傾向にあることが前回の調査で明らかとなったが、今回のエイズ治療拠点病院を対象にした調査でも、PML 罹患患者は HIV 感染に対する有効な治療法の開発にもかかわらず増加傾向にあることが示された。諸外国でも HIV 感染に伴う神経合併症の疫学調査では、PML 罹患患者の発症頻度に関する高活性レトロウイルス療法の影響は他の日和見感染に比べ影響が少ないとの報告が多い^{3,4)}。

末梢血 CD4(+) リンパ球数と血漿 HIV 負荷量を指標とした HIV 感染に伴う免疫状態と PML の発症との関係をみてみると、殆どの PML は HIV の血漿中負荷量が多く、CD4(+)T 細胞の絶対値が低い患者に主に生じており、PML が JCV 特異 CD4(+)T 細胞数が重要な閾値以下になったときに発症することを示唆している⁵⁾。また JCV は HIV との相互作用により活性化されると考えられており、HIV 感染により免疫状態が悪化し、HIV 負荷量が多いときに PML が発症し易いことは当然である。しかし今回の検討でもみられたように PML は診断時に既に HAART 治療を受け、その結果 HIV 負荷量低値や CD4(+)T リンパ球が増加している状態でも発症しうることも報告されている⁴⁾。この場合 HAART による免疫再構築疾患として発症している可能性があるし、血漿内でのウイルス制御ができたとしても、中枢神経内での HIV 複製の制御がないことや JCV に対する特異免疫が回復していないことが PML を発症させている可能性が考慮される。HAART 療法時代でも他の日和見感染性中枢神経疾患に比べ PML の減少が少ない一つの理由となるであろう。

一方 HIV 関連 PML の予後は HAART により HIV を抑制することにより延命効果をもたらすし、また発症時の CD4(+)T リンパ球の高値は PML の延命と関係がある⁴⁾。しかし延命はかならずしも神経学的改善を意味しているわけではなく、また HAART 療法下では PML の診断時に髄液中の JCV-DNA が陰性の患者が多いために、PML の診断が困難になる可能性が指摘されている⁶⁾。重篤な神経症状に至る前に進行を停止させ、改善を来 PML の制御に関わる免疫機構の解明と直接的な治療法の開発は必須のことである。

(結論)

わが国の HIV 関連 PML の発症頻度は HAART 導入の影響を受けず、患者数は増加傾向にある。多くは HIV 感染未治療の高度免疫不全状態で発症しているが、HAART を受け、末梢血 CD4(+)T リンパ球数が増加し、血漿 HIV 負荷量が抑制された状態でも発症している。HAART 療法下での延命と神経学的改善とは別であり、今後 PML を制御する免疫機構の解明と PML に対する特異療法の開発が必要である。

(参考文献)

- 1) 岸田修二、黒田康夫、余郷嘉明、他：進行性多巣性白質脳症の診断基準に基づいた全国疫学調査結果。厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業、プリオン病及び遅発性ウイルス感染に関する調査研究。平成 15 年度研究報告書 227-232, 2004

- 2) Manji H, Miller RF: Progressive multifocal leukoencephalopathy: progress in the AIDS era. J Neurol Neurosurg Psychiatry 69:569-571, 2000.
- 3) d'Arminio Monforte A, Cinque P, Mocroft A, et al: Changing incidence of central nervous system diseases in the EuroSIDA cohort. Ann Neurol. 55:320-328, 2004.
- 4) Antinori A, Cingolani A, Lorenzini P, et al: Clinical epidemiology and survival of progressive multifocal leukoencephalopathy in the era of highly active antiretroviral therapy: Data from the Italian registry Investigative Neuro AIDS (IRINA). J Neurovirol 9(suppl. 1):47-53, 2003.
- 5) Gasnault J, Taoufik Y, Goujard C, et al: Prolonged survival without neurological improvement in patients with AIDS-related progressive multifocal leukoencephalopathy on potent combined antiretroviral therapy. J Neurovirol. 5:421-429, 1999.
- 6) De Luca A, Giancola ML, Ammassari A et al: The effect of potent antiretroviral therapy and JC virus load in cerebrospinal fluid on clinical outcome of patients with AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. J Infect Dis 182: 1077-1083, 2000.

[研究発表]

1. 論文発表

新井憲俊、岸田修二、頼高朝子、大田恵子：AIDSに合併した進行性多巣性白質脳症8例の検討. 臨床神経 45(2)：掲載予定、2005

2. 学会発表

岸田修二、黒田康夫、余郷嘉明、保井孝太郎、長嶋和郎、水澤英洋：進行性多巣性白質脳症の診断基準に基づいた全国疫学調査. 第9回日本神経感染症学会 2004.10

[知的所有権の取得状況]

該当なし

図1. わが国でのAIDS関連PMLの発症状況

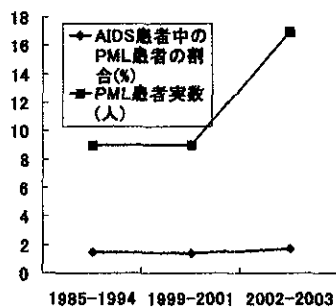


表1. PMLの発症者数の比較

報告年	1997年	2002年	2004年
観察年数	10年	3年	2年
全AIDS患者数	576	635	987
PML患者数	9	9	17

ART(-)		ART(+)	
CD4(+) /μL	HIV-RNA ×10 ⁴ コピー/ml	CD4 /μL	HIV-RNA コピー/ml
67	210	579	250
154	53	189	12000
54	18	22	<400
18	4.3	Av 258	Av 6125
141	2.5		
48	260		
20	290		
56	94		
1.7			
40	74		
20			
12	20		
4	21		
41	89.5		
Av 48	Av 161.8		

表2.

ART:Anti-Retroviral Therapy
Av:Average

PML の発症に関与する JC ウイルスの遺伝学的な変化

研究協力者：余郷 嘉明（東京大学・大学院医・泌尿器科）

研究協力者：鄭 懷穎（東京大学・大学院医・泌尿器科）

研究協力者：北村 唯一（東京大学・大学院医・泌尿器科）

研究協力者：長嶋 和郎（北海道大学・大学院医・分子細胞病理学）

研究協力者：野田 和幸（順天堂大学・医・脳神経内科）

研究協力者：冠木 智之（埼玉県立小児医療センター・感染免疫アレルギー科）

〔研究要旨〕

JC ウイルス (JCV) は広くヒト集団に蔓延しており、子供に無症候性感染し、その後、腎やリンパ組織に潜伏または持続感染する。一般に、免疫低下によって再活性化された JCV が進行性多巣性白質脳症 (PML) を惹起すると考えられている。JCV 調節領域は PML 患者の脳や髄液から検出される PML 型 JCV と健常人の腎やリンパ組織から検出される原型 JCV とに分けられる。前者は後者から、塩基配列の再編成によって患者体内で作られる。しかし、調節領域の再編成が PML の発症にどう関わるかという点に関しては、未だ明確な解答は得られていない。本研究は、ウイルス蛋白をコードする領域を解析し、PML の発症に関して有用な情報を得ることを目的とする。そのため、3 名の PML 患者の脳組織から全長 JCV DNA クロームを多数樹立し、それらの全長塩基配列を解析した。全てのクロームにおいてユニークな再編成型の調節領域が検出された。同時に、多くのクロームにおいて、ウイルス蛋白をコードしている領域 (コード領域) に 1-2 個の塩基置換が認められた。全ての塩基置換 (計 12 個) はアミノ酸置換を伴うことがわかった。これらのうち 7 個のアミノ酸置換は主要キャプシド蛋白 (VP1) の表面でループを形成すると考えられている領域 (VP1 ループ) に存在した。最後に、今までに報告された PML 型 JCV の VP1 配列をゲノム型毎に、原型 JCV 株のコンセンサス配列と比較した。その結果、16 PML 型 JCV 株のうち、13 株の VP1 ループにアミノ酸置換が認められた。しかし、原型 JCV の VP1 ループにはほとんどアミノ酸置換が認められなかった。以上により、PML 型 JCV の VP1 ループにアミノ酸置換が頻繁に起きることが示唆された。

Genetic Changes of JC Virus Possibly Involved in the Development of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy

Yoshiaki YOGO, Huai-Ying ZHENG, Tadaichi KITAMURA, Kazuo NAGASHIMMA, Kazuyuki NODA,
Tomoyuki KABUKI

Department of Urology, Faculty of Medicine, University of Tokyo; Laboratory of Molecular & Cellular Pathology,
Hokkaido University Graduate School of Medicine; Department of Neurology, Juntendo University School of
Medicine; Division of Infectious Diseases, Immunology and Allergy, Saitama Children's Medical Center

ABSTRACT

JC virus (JCV) causes progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) in patients with decreased immune competence. It is generally thought that upon immunosuppression, latent JCV is reactivated to induce a productive infection of oligodendrocytes in the brain. To gain new insights into the genetic changes of JCV possibly associated with the pathogenesis of PML, we established and sequenced multiple complete JCV DNA clones from the brain in three PML cases. While unique rearranged control regions occurred in all clones, a low level of nucleotide variations in the coding region was also found. We identified in each case a parental coding sequence from which variant coding sequences with nucleotide substitutions would have been generated. A comparison between the parental and variant

coding sequences revealed that all 12 detected nucleotide substitutions accompanied amino acid substitutions. Interestingly, seven of these amino acid changes were located in the surface loops (BC, DE and HI) of the major capsid protein (VP1). Finally, 16 reported VP1 sequences from PML-type isolates were compared with their genotypic prototypes generated as consensus sequences of representative archetypal isolates belonging to the same genotypes. We found that 13 VP1 proteins underwent amino acid changes in DE or HI loop. In contrast, the VP1 proteins from archetypal isolates rarely underwent mutations in the VP1 loops. The present findings suggest that the JCV variants in the brain of PML patients frequently undergo amino acid substitutions in the VP1 loops.

[はじめに]

進行性多巣性白質脳症 (PML) は中枢神経系での脱髄疾患であり、免疫が低下する疾患を有する患者や免疫抑制剤が投与される患者で主に起きる。PML の病因ウイルスである JC ウイルス (JCV) は広くヒト集団に蔓延しており、子供に無症候性感染し、その後、腎やリンパ組織に潜伏または持続感染する。一般に、免疫低下によって再活性化された JCV が進行性多巣性白質脳症 (PML) を惹起すると考えられている。健常人や非 PML 患者の尿、腎、扁桃から検出される JCV DNA は原型調節領域 (archetypal regulatory region) と命名された一定の調節領域を持つ。一方、PML 患者の脳病変部から検出される JCV DNA は多様に変化した調節領域 (PML 型調節領域) を持つ。それぞれの PML 型調節領域は原型調節領域から塩基配列の再編成 (欠失と重複または欠失のみ) によって患者の体内で作られる。しかし、JCV 調節領域の再編成が PML の発症とどうかかわるかは未だ解明されていない。本研究では、視点を変えて、ウイルス蛋白をコードする領域を解析し、PML の発症に関して有用な情報を得ること試みた。

[目 的]

PML の発症には宿主側要因とウイルス側要因が関与すると考えられる。本研究は、ウイルス遺伝子 (蛋白をコードする領域) の塩基配列を解析し、PML の発症に関して有用な情報を得ることを目的とする。

[材料と方法]

症例 1 : 患者は 33 歳の男性。エイズのため North Shore 大学病院に入院。1988 年 5 月に知的障害が出現し、その後神経症状は増悪し、1 ヶ月後に死亡した。剖検脳組織の病理所見と in situ hybridization によって PML と診断された。症例 2 : 59 歳の女性。3 年前に混合性結合組織病と診断され、prednisolone と azathioprine が投与された。2000 年 12 月、記憶障害、失語症、右方麻痺のため順天堂大学病院に入院。臨床経過と MRI 画像、それに髄液からの JCV DNA の検出によって PML と診断された。2001 年 3 月に死亡。症例 3 : 20 歳の男性。幼少より慢性皮膚粘膜カンジタ症と診断された。2001 年 8 月末、右上肢の運動障害と言語障害が出現したため、埼玉小児医療センターに入院。当初、多発性硬化症が疑われたが、2001 年 10 月、髄液から JCV DNA が検出され、PML と診断された。2003 年 1 月に死亡。

DNA 解析 : 剖検脳組織から抽出した DNA から全長 JCV DNA を既報の方法によりクローニングした。蛍光式 DNA シークエンサーを用いてシークエンシングを行った。調節領域と蛋白コード領域に分けて、JCV DNA の塩基配列を解析した。

分子系統解析 : 報告された塩基配列と本研究で決定した塩基配列をアラインメントした後、近隣結合法による分子系統樹を作成した (CLUSTAL W を使用)。塩基配列のアミノ酸配列への翻訳には GENETX-MAC VER 11.10 を使用した。

(倫理面への配慮)

本研究ではウイルス DNA の塩基配列のみを解析したので、倫理的には問題はないと考えられた。

[結 果]

1. 調節領域の構造

症例 1、2、3 からそれぞれ 12、14、14 の全長 JCV DNA クローンを得た。これら全てのクローンの全長

塩基配列を決定した。得られた塩基配列を調節領域とコード領域に分けて解析した。

症例 1-3 で検出された調節領域を図 1 に模式的に示した。(i) 症例 1 では 2 種の調節領域 (1A、1B) が検出された。1A では nt 206-nt 217 の欠失と 29 塩基対の挿入があった (この欠失と挿入は JCV DNA の初期領域との組み換えによって生じたことが示唆された)。一方、1B では、nt 42-180 の重複と nt 112-164 の欠失があった。したがって、1A と 1B は全く異なる機構によって形成されたと推定された。(ii) 症例 2 では 3 種の調節領域 (2A、2B、2C) が検出された。2A と 2B には、nt 141-176 の欠失、nt 37-98 の重複、nt 207 の断点が共通して存在した。しかし、2B にはユニークな欠失 (nt 99-252) もあった。したがって、2B はこの欠失によって 2A から作られたと考えられた。一方、2C は明瞭に 2A/2B から区別された。例えば、2C で見られた欠失や重複の末端は 2A/2B で検出された欠失や重複の末端と一致しなかった。したがって、2C は 1A/1B とは全く異なる機構によって作られたと推定された。(iii) 症例 3 では 3 種の調節領域 (3A、3B、3C) が検出された。これらの調節領域は 3 つの共通構造-nt 118 の断点、nt 61-68 の重複、nt 89-174 の欠失-が観察された。共通構造に加えて、3A には 3 塩基対 (nt 258-260) の重複、3C には nt 37-58 の欠失があった。3C は 3B とほとんど同じ構造であったが、特有の欠失 (nt 183-218) もあった。以上から、原型調節領域から 3A が最初に作られ、次いで、3A から 3B が作られ、最後に、3B から 3C が作られたと考えられた。

2. 蛋白コード領域の塩基配列 (coding sequence)

各症例で 3 または 5 個の coding sequence が検出された。(i) 症例 1 では 3 個の coding sequence (1-1-1-3) が検出された (表 1)。分子系統解析により、1-1 が親配列であることがわかった。1-2 には 2 個の塩基置換 (VP1 遺伝子内に 1 個、T 抗原遺伝子内 1 個) が検出された。1-3 には 1 個の塩基置換が VP1 遺伝子内に検出された。以上の塩基置換は全てアミノ酸の変化を伴っていた。(ii) 症例 2 では 3 個の coding sequence (2-1-2-3) が検出された。分子系統解析によって、2-1 が親配列であることがわかった。2-2 には 1 個の塩基置換が、VP1 遺伝子内に検出された。2-3 には 1 個の塩基置換が、T 抗原遺伝子内に検出された。以上の塩基置換は全てアミノ酸の変化を伴っていた。(iii) 症例 3 では 5 個の coding sequence (3-1-3-5) が検出された。分子系統解析によって、3-1 が親配列であることがわかった。3-2 から 3-5 には合計 7 個の塩基置換が検出された。内訳は、VP1 遺伝子内に 4 個、VP2 内に 3 個の塩基置換が検出された。その他、T 抗原遺伝子内に 1 箇所の短い重複が観察された。以上の塩基置換は全てアミノ酸の変化を伴っていた。

3. 症例 1-3 において検出された VP1 アミノ酸配列多型

3 症例から検出された塩基置換 (アミノ酸置換) の数は、全部で 12 個あり、これらの全てがアミノ酸置換を伴っていた。遺伝子別に見ると、VP1 遺伝子での変異が一番多く検出された。そこで、VP1 の変異に注目して、さらに解析を進めた。VP1 で検出された 7 個のアミノ酸置換は、全てループ領域にあった。2 個が BC ループに、2 個が DE ループに、3 個が HI loop にあった (表 2)。以下では、VP1 ループ内で検出されたアミノ酸置換を「VP1 ループ変異」と呼ぶ。VP1 ループ変異を有するクローンの比率は、症例 1 と 2 では 25% (3/12)、14% (2/14) と低く、症例 3 では 86% (12/14) と高かった。

4. 以前報告された PML 型 JCV における VP1 ループ変異

PML 患者の脳または髄液から分離された JCV 株 (PML 型 JCV 株) のうち、VP1 遺伝子の塩基配列が決定された株は全部で 16 株存在する。これらの PML 型 JCV が VP1 ループ変異を持っているかどうかを調べた。一般に、ウイルスの塩基配列 (またはアミノ酸配列) から変異を検出するためには、変異を起こす前の親株の配列が必要である。しかし、本当の親株は手に入らないので、各 PML 型株が属しているゲノム型のコンセンサス配列を親配列とみなし、これと各 PML 型株の VP1 配列を比較した。全部で VP1 アミノ酸置換が 13 株 (81%) で検出された (表 3)。これらのアミノ酸置換は全て表面ループに集中した。5 個が BC ループに存在し、8 個が HI ループにあった。2 カ所 (アミノ酸番号 55 と 269) でアミノ酸置換が頻繁に起きたことが示された。また、同じゲノム型に属する原型株を多数比較した結果、原型株には VP1 ループ変異は起きていないことが判明した。

[考 察]

我々は3 PML 症例の剖検脳組織からクローニングされた多数の全長 JCV DNA をシーケンシングした。得られた JCV DNA クローンは全て再編成型の調節領域を持っていたので、PML 型であることが確認された。各症例において、1 または 2 個の塩基置換によって区別される複数の coding sequence が検出された。全長 JCV DNA のクローニングは、正確な DNA 合成を行う宿主を用いてが行われたことから、検出された塩基置換がクローニングの過程で起きた可能性は否定される。各症例で検出された coding sequence のうちどれが親配列であるかが決定され、さらに、親配列と変異配列との比較から VP1 ループ変異が発見された。そして、以前報告された 16 株の PML 型 JCV に VP1 ループ変異が存在するかどうかを調べた結果、13 株 (81%) において VP1 ループ変異が検出された。一方、原型 JCV 株から VP1 ループ変異は検出されなかった。以上から、PML 型 JCV の VP1 ループにアミノ酸置換が頻繁に起きることが示された。

VP1 ループ変異を持つクローンの頻度は PML 症例により異なった。すなわち、症例 1、2、3 において調べたクローンのうち、それぞれ 25%、14%、86% が VP1 ループ変異を持っていた。症例 1 と 2 では患者は神経症状が現れてから半年以内に死亡し、症例 3 では発症後 2 年以上生存した。このことは、中枢神経系でのウイルス増殖の期間が長くなると VP1 ループ変異を持っているクローンの比率が高まることを示唆している。

VP1 ループ変異は PML 型 JCV に特異的に起きることから、PML の発症と何らかの関連があることが示唆される。VP1 ループの機能としては、細胞レセプターとの結合や抗 JCV 抗体との反応などが想定されている。したがって、VP1 ループ変異株は (1) 細胞レセプターとの結合性が亢進している可能性や、(2) 既存の抗 JCV 抗体と反応しなくなった、いわゆる escape mutant である可能性が考えられた。今後、VP1 ループ変異と PML の病態進行との関係を明らかにすることが必要である。

[結 論]

VP1 ループ変異が PML 型 JCV で高率に起きていることが示された。発見された PML に関連したアミノ酸配列多型は PML の新しいマーカーとして有用である。この変異の生物学的な意義は今後解明されなければならない。

[参考文献]

- 1) Agostini HT, Ryschkewitsch CF, Stoner GL: Complete genome of a JC virus genotype Type 6 from the brain of an African American with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Hum Virol* 1:267-272, 1998
- 2) Chang D, Liou ZM, Ou WC, Wang KZ, Wang M, Fung CY, Tsai RT: Production of the antigen and the antibody of the JC virus major capsid protein VP1. *J Virol Methods* 59:177-187, 1996
- 3) Frisque RJ, Bream GL, Cannella MT: Human polyomavirus JC virus genome. *J Virol* 51:458-469, 1984
- 4) Hall WW, Farmer PM, Takahashi H, Tanaka S, Furuta Y, Nagashima K: Pathological features of virus infections of the central nervous system (CNS) in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Acta Pathol Jpn* 41:172-181, 1991
- 5) Iida T, Kitamura T, Guo J, Taguchi F, Aso Y, Nagashima K, Yogo Y: Origin of polyomavirus variants associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:5062-5065, 1993
- 6) Kato A, Sugimoto C, Zheng HY, Kitamura T, Yogo Y: Lack of disease-specific amino acid changes in the viral proteins of JC virus isolates from the brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Arch Virol* 145:2173-2182, 2000
- 7) Liddington RC, Yan Y, Moulai J, Sahli R, Benjamin TL, Harrison SC: Structure of simian virus 40 at 3.8-A resolution. *Nature* 354:278-284, 1991
- 8) Loeber G, Dörries K: DNA rearrangements in organ-specific variants of polyomavirus JC strain GS. *J Virol* 62:1730-1735, 1988
- 9) Venter M, Smit SB, Leman P, Swanepoel R: Phylogenetic evidence of widespread distribution of genotype 3 JC virus in Africa and identification of a type 7 isolate in an African AIDS patient. *J Gen Virol* 85:2215-2219, 2004

- 10) Walker DL: Progressive multifocal leukoencephalopathy. In Handbook of Clinical Neurology Demyelinating Diseases, vol. 3 (47), pp. 503-524. Edited by P. J. Vinken, G. W. Bruyn, H. L. Klawans & J. C. Koetsier. Netherlands: Elsevier, 1985
- 11) Yogo Y, Sugimoto C, Zheng HY, Ikegaya H, Takasaka T, Kitamura T: JC virus genotyping offers a new paradigm in the study of human populations. *Rev Med Virol* 14:179-191, 2004
- 12) Yogo Y, Sugimoto C: The archetype concept and regulatory region rearrangement. In: K. Khalili, G.L. Stoner (Eds.) *Human Polyomaviruses: Molecular and Clinical Perspectives*, John Wiley & Sons, New York, pp. 127-148, 2001

[研究発表]

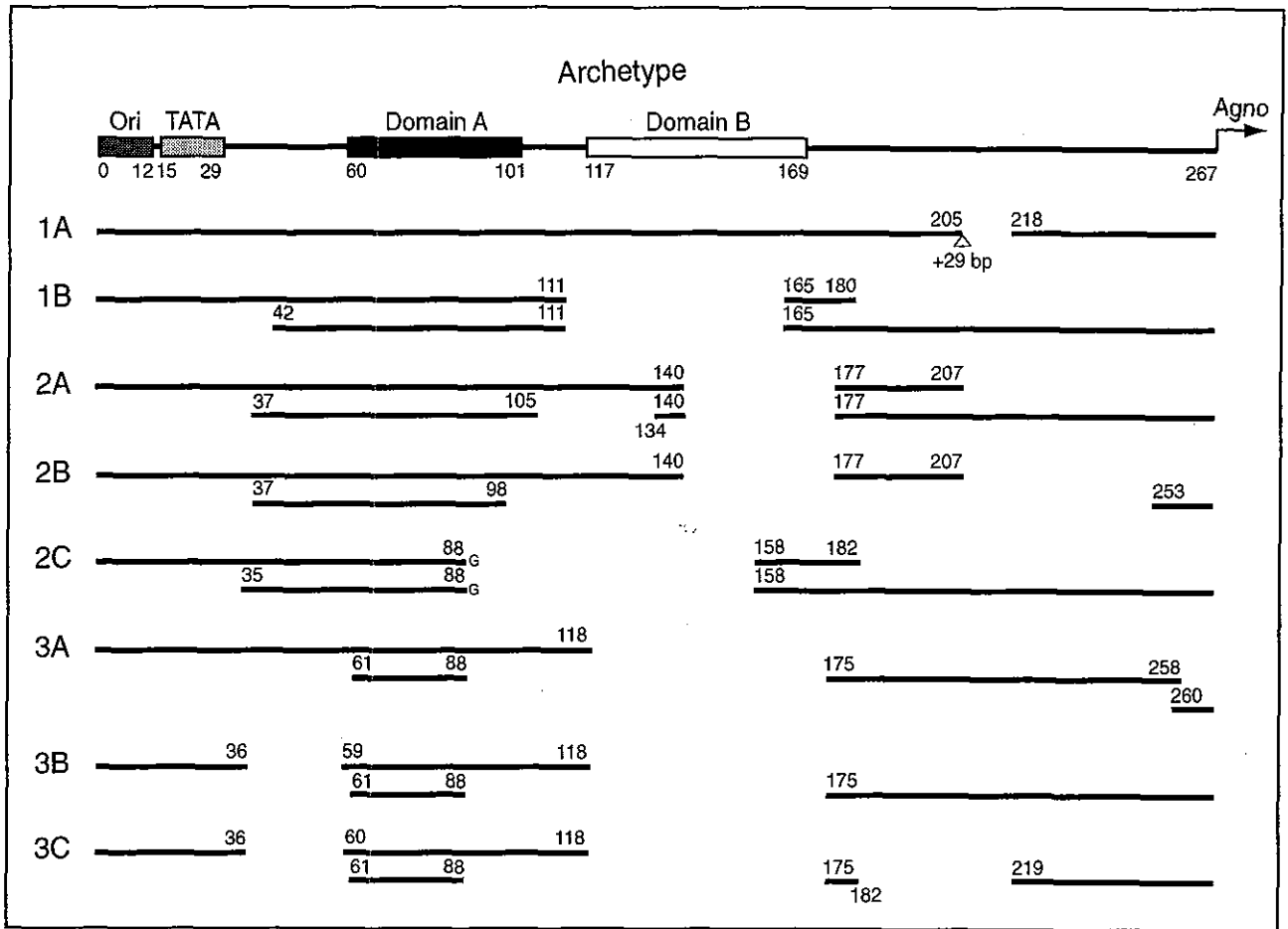
1. 論文発表

- 1) Zheng HY, Kitamura T, Takasaka T, Chen Q, Yogo Y: Unambiguous identification of JC virus strains transmitted from parents to children. *Arch Virol* 149:261-273, 2004
- 2) Zheng HY, Yasuda Y, Kato S, Kitamura T, Yogo Y: Stability of JC virus-coding sequences in a case of progressive multifocal leukoencephalopathy where the viral control region was rearranged markedly. *Arch Pathol Lab Med* 128:275-278, 2004
- 3) Ikegaya H, Iwase H, Yogo Y: Detection of identical JC virus sequences in both human kidneys. *Arch Virol* 149:1215-1220, 2004
- 4) Yogo Y, Sugimoto C, Zheng HY, Ikegaya H, Takasaka T, Kitamura T: JC virus genotyping offers a new paradigm in the study of human populations. *Rev Med Virol* 14:179-191, 2004
- 5) Kato A, Kitamura T, Takasaka T, Zheng HY, Tominaga T, Yogo Y: Detection of archetypal JC virus DNAs in tonsillar tissue from patients with tonsillitis and tonsillar hypertrophy. *J Neurovirol* 10:244-249, 2004
- 6) Takasaka T, Goya N, Tokumoto T, Tanabe K, Toma H, Ogawa Y, Hokama S, Momose A, Funyu T, Fujioka T, Omori S, Akiyama H, Chen Q, Zheng HY, Ohta N, Kitamura T, Yogo Y: Subtypes of BK virus prevalent in Japan and variation in their transcriptional control region. *J Gen Virol* 85:2821-2827, 2004
- 7) 内堀歩, 小林康弘, 千葉厚郎, 土屋一洋, 鄭懷穎, 余郷嘉明, 作田学: 後天性免疫不全症候群にともなう進行性多巣性白質脳症病巣の拡散強調画像を主とした MRI による神経放射線学的検討. *臨床神経*, 44:531-536, 2004
- 8) Ikegaya H, Iwase H, Zheng HY, Nakajima M, Sakurada K, Takatori T, Fukayama M, Kitamura T, Yogo Y: JC virus genotyping using formalin-fixed, paraffin-embedded renal tissues. *J Virol Methods*, in press

2. 学会発表

- 1) 鄭懷穎, 余郷嘉明, 北村唯一, 野田和幸, 金澤章, 森秀生, 長嶋和郎: 進行性多巣性白質脳症患者の剖検脳組織から得られた全長 JC ウイルス DNA の塩基配列の解析. 第 9 回日本神経感染症学会、2004、弘前
- 2) 鄭懷穎, 高坂友和, 北村唯一, 長嶋和郎, 余郷嘉明: JC ウイルスゲノムのコード領域と調節領域の総合的な解析: PML の発症機構の解明を目指して. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会、2004、横浜
- 3) 高坂友和, 池谷博, 石田貴文, 鄭懷穎, 北村唯一, 余郷嘉明: インドネシア東南端のスンバ島で検出された JC ウイルスゲノム型. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会、2004、横浜
- 4) 池谷博, 鄭懷穎, 高坂友和, 北村唯一, 余郷嘉明: 北海道出身者の解剖体から検出された新規な東北アジア系 JC ウイルスゲノム型 (MX). 第 52 回日本ウイルス学会学術集会、2004、横浜
- 5) Yogo Y: Genetic changes of JC virus possibly involved in the development of progressive multifocal leukoencephalopathy. Sixth Ilosong International Symposium on Aging and Viral Neuropathy. December 5, 2004. Anyang, South Korea

図1. 症例1-3で検出されたJCV調節領域の構造



最上部に原型調節領域を示す。Oriは DNA複製の開始点、TATAは TATA配列、Agnoはagnogeneを表す。Domain Aは多くのPML型調節領域で重複し、Domain Bは欠失している領域である。原型調節領域の下に、剖検脳組織から検出された調節領域を示す。図の表し方：原型調節領域と同じ配列なら、左から右へ線を引く。欠失に出会ったら、空白にする。重複に遭遇したら、一段下の、重複が開始する位置へ戻り、再び右へ線を引く。数字は原型調節領域のヌクレオチド番号を示す。1A, 1B：症例1で検出された調節領域；2A, 2B, 2C：症例2で検出された調節領域；3A, 3B, 3C：症例3で検出された調節領域。

表1. 各症例で検出された coding sequence におけるヌクレオチド (アミノ酸) 変化

症例 1			症例 2		
Coding sequence	nt 2274 (VP1)	nt 3329 (LT)	Coding sequence	nt 1650 (VP1)	nt 4778 (ST/LT)
1-1	C (S)	C (K)	2-1	C (S)	C (S)
1-2	T (F)	G (N)	2-2	T (L)	C (S)
1-3	T (F)	C (K)	2-3	C (S)	G (T)
親配列	C (S)	C (K)	親配列	C (S)	C (S)

症例 3					
Coding sequence	nt 599 (VP2)	nt 840 (VP2)	nt 1647 (VP1)	nt 1836 (VP1)	nt 2274 (VP1)
3-1	C (S)	G (W)	A (K)	C (S)	C (S)
3-2	C (S)	G (W)	A (K)	C (S)	A (Y)
3-3	C (S)	C (C)	T (M)	C (S)	C (S)
3-4	T (L)	G (W)	A (K)	G (C)	C (S)
3-5*	T (L)	G (W)	A (K)	G (C)	C (S)
親配列	C (S)	G (W)	A (K)	C (S)	C (S)

LT, large T 抗原; ST, small T 抗原。

*他の変化, LT遺伝子内の6塩基対配列 (nt 2744-2749)の重複。

表2. 症例1-3におけるVP1アミノ酸配列多型

Coding sequence	アミノ酸残基			
	BCループ*		DEループ	HIループ
	60†	61	123	269
親配列	K	S	S	S
1-1	K	S	S	S
1-2	K	S	S	F
1-3	K	S	S	F
2-1	K	S	S	S
2-2	K	L	S	S
2-3	K	S	S	S
3-1	K	S	S	S
3-2	K	S	S	Y
3-3	M	S	S	S
3-4	K	S	C	S
3-5	K	S	C	S

*ループはJCV VP1の表面に存在すると考えられる構造で、結晶構造が解明されたSV40とのアミノ酸配列の相同性を基に推定された (Chang *et al.*, 1996)。

†VP1アミノ酸番号。

表 3. 報告された PML 型 JCV から検出された VP1 ループ変異

ゲノム型	株名*	由来	アミノ酸残基						文献‡
			BCループ†			HIループ			
			55§	60	66	265	267	269	
コンセンサス			L	K	D	N	S	S	
Af1	#601	脳	F	K	D	N	S	S	1
Af2-a	SA84-00	CSF	L	K	D	N	F	S	2
Af2-a	SA296-02	CSF	F	K	D	N	S	S	2
Af2-b	SA28-03	CSF	L	N	D	N	S	S	2
EU-a1	Her-1	脳	L	K	D	N	S	L	3
EU-a1	Mad-1	脳	L	K	D	N	S	S	4
EU-a1	Mad-11	脳	L	K	H	N	S	S	3
B1-b1	SA27-03	CSF	L	K	D	N	S	C	2
B1-c	Mad-8	脳	L	K	D	N	S	F	3
B1-c	GS/B	脳	F	K	D	N	S	S	5
CY-a	Tky-2a	脳	L	K	D	N	S	Y	6
MY-a	Aic-1a	脳	L	K	D	N	S	S	7
MY-b	Tokyo-1	脳	L	K	D	N	S	S	3
MY-b	Tky-1	脳	L	K	D	N	S	F	6
MY-b	Sap-1	脳	L	K	D	N	S	F	3
SC-f	SA21-01	CSF	L	K	D	T	S	S	2

*全ての株はユニークな再編成型の調節領域を持つ。

†SV40 VP1 との相同性に基づいて推定された JCV VP1 の表面ループ (Chang *et al.*, 1996)。

§VP1 アミノ酸番号。

‡1, Agostini *et al.*, 1998; 2, Venter *et al.*, 2004; 3, Iida *et al.*, 1993; 4, Frisque *et al.*, 1984; 5, Loeber *et al.*, 1988; 6, Kato *et al.*, 2000; 7, Zheng *et al.*, 2003.

進行性多巣性白質脳症における promyelocytic leukemia (PML) 蛋白の発現

～JC ウイルスは PML 核体を足場に粒子形成する。～

班 員 : 宍戸 - 原 由紀子 (杏林大学・医・病理)

研究要旨

進行性多巣性白質脳症 (PML) では、JC ウイルス (JCV) が感染 oligodendroglia の核内封入体として認められる。JCV 粒子外殻 (カプシド) を担う major カプシド蛋白 VP1 と minor カプシド蛋白 VP2、VP3 は、細胞質で合成された後、協調して核に移行し、核内構造を足場に粒子形成する。これまでの研究から、細胞質から核への移行には VP2/VP3 共通の C 末端 34 残基が、核内構造への集積には Cluster2 配列 (KRRSRSSRS) が機能することが明らかになった。しかし、ウイルス複製を支持する宿主細胞の核内構造は、未だ明らかにされていない。

PML 核体は、真核細胞に広く見られる核内構造で、promyelocytic leukemia (PML) 蛋白がその主要構成蛋白として知られている。進行性多巣性白質脳症の腫大した oligodendroglia の核内で、PML 蛋白は約 2.5 μ m までのドット状の染色パターンを核膜近傍に示した。また二重染色の結果、ウイルスカプシド蛋白が PML 陽性の核体構造に集積することも明らかになった。さらに、PML 核体におけるウイルスカプシド蛋白の動態を明らかにするため、JCV カプシド蛋白を強制発現した COS-7 細胞を共焦点顕微鏡と電子顕微鏡で解析すると、PML 核体に集積したカプシド蛋白は、これを足場に効率よく粒子形成することが明らかになった。またヒト脳組織においても、JCV が核膜近傍にクラスターを形成して集積する像が確認された。これらの結果は、PML 核体がウイルス粒子形成の足場となることを示している。PML 核体の oligodendroglia 変性における役割を解明することが、今後の課題と考えられた。

Pathogenic roles of the PML nuclear bodies in progressive multifocal leukoencephalopathy:

How does polyomavirus JC develop intranuclear inclusions?

Yukiko SHISHIDO-HARA

Department of Pathology, Kyorin University School of Medicine

ABSTRACT

Progressive multifocal leukoencephalopathy is a fatal demyelinating disorder due to JC virus (JCV) infection. The viral inclusions have been identified in markedly enlarged nuclei of infected oligodendrocytes. We report here, the pathogenesis of this disease is closely associated with a distinct subnuclear structure, the PML nuclear bodies (PML-NBs). Brain tissues of five autopsied cases were histologically examined. Affected oligodendrocytes showed distinct dot-shaped structures along inner nuclear periphery. These dots were positive with PML, identifying as the PML-NBs. The viral capsid proteins were accumulated to the PML-NBs in cells of the early stage for viral infection. COS-7 cells expressing the viral capsid proteins were also examined by electron microscopy. Assembly of virus-like structures was detected with clusters of VP1

accumulated to the PML-NBs. Consistently, in oligodendrocytes of affected human brains, clusters of JCV virions were seen along inner nuclear periphery. These observations indicate that the PML-NBs provide scaffolds for production of progenies. Therefore, the PML-NBs play important roles for establishment of viral infection.

[[はじめに]]

進行性多巣性白質脳症は JCV 感染による脱髄疾患である。脱髄巣辺縁では、腫大した oligodendrocyte 核内に、球状または管状の形態をしたウイルスが封入体として認められる。JCV 粒子外郭 (カプシド) は、major カプシド蛋白 VP1 と minor カプシド蛋白 VP2 および VP3 から構成されるが、感染細胞核内においてこれらの蛋白がどんな機序で assembly し、核内ウイルス封入体を形成するか、未だ明らかにされていない。PML 核体は、真核細胞の分裂間期に見られる核内構造で、promyelocytic leukemia (PML)蛋白がその主要構成蛋白として知られている。そこで我々は、JCV 感染における PML 核体の機能を解析した。

目 的

本研究は、進行性白質脳症 (PML) の核内ウイルス封入体形成機序を解明し、これに引き続く細胞変性と脱髄の機序を理解することを目的とする。

材料と方法

- 1) 剖検脳の病理学的検索：進行性多巣性白質脳症 5 症例の脳組織は、ホルマリン固定後パラフィンに包埋し、薄切切片を HE 染色、KB 染色で解析した。また、抗 PML 抗体または抗 JCV カプシド蛋白抗体を用いた免疫染色、蛍光抗体法でも解析を行った。さらに、ヒト脳組織をグルタルアルデヒドで前固定、オスミウムで後固定し、エポキシ樹脂に包埋後、超薄切切片を電子染色して、電子顕微鏡で解析した。
- 2) 真核細胞発現系と免疫細胞化学：JCV Tokyo-1 株のゲノムフラグメントを pcDL-SRα296 に組み込み、発現ベクター AVP231-SRαを作成した。これを COS-7 細胞に導入し、トランスフェクション 72 時間後、2%パラフォルムアルデヒド固定し、蛍光抗体法で解析した。また、4%パラフォルムアルデヒドで固定し、エタノール脱水して LR white に包埋し、post-embedding 法にて抗 JCV カプシド蛋白抗体を用いた免疫電顕を行った。

(倫理面への配慮)

JCV に関する遺伝子組み換え実験は、倫理委員会の承認のもと P2 実験室で行った。

結 果

(1) 進行性多巣性白質脳症の病理学的解析。

進行性多巣性白質脳症の脱髄巣の辺縁部では、多数の腫大した核を有する oligodendroglia が見られた。HE 染色にて、これらの細胞には核内全体に両染色性の封入体をもつものと、淡明な核の辺縁にドット状の核内構造を示すものが認められた。JCV カプシド蛋白を免疫染色すると、その核内分布に多様性が見られた。脱髄巣の辺縁には、核腫大はあるもののカプシド蛋白陰性の細胞が多数存在し、これらの細胞の核内辺縁にはヘマトキシリンに染まるドット状の構造が認められた。また、カプシド蛋白がドット状の核内構造に集積する像も見られた。さらに、腫大した核内全体にカプシド蛋白の発現を示す細胞も見られ、こうした細胞は脱髄巣辺縁よりも、やや中心に多く見られる傾向があった。これらのデータは、各細胞がウイルス感染過程の異なった段階にあることを示すと考えられる。また、大きな脱髄巣の中心部では、泡沫細胞の集簇やしばしば壊死巣も見られ、腫大核をもつ oligodendroglia の数は減少した。

感染 oligodendroglia に見られるドット状の核内構造を同定するため、PML 蛋白の免疫染色をおこなった。腫

大した核をもつ oligodendroglia には、核辺縁に約 2.5 μ m までのドット状の PML 蛋白の染色性を示すものが多数存在した。また 2 重染色により、初期病変部では JCV カプシド蛋白が PML 核体に蛋白に集積していることが明らかになった。

(2) ウイルス蛋白発現 COS-7 細胞を用いた解析。

JCV カプシド蛋白をコードする発現ベクター AVP231-SR α を COS-7 細胞に導入し、細胞核内におけるカプシド蛋白の分布を共焦点顕微鏡で解析した。約 98% の陽性細胞で核に限局したカプシド蛋白の発現が認められ、核内でドット状の集積を示す細胞も存在した。二重染色により、ウイルス蛋白の集積の場が PML 核体であることが確認された。また、核内におけるウイルス粒子の形成を解析するために、AVP231-SR α 導入 COS-7 細胞を免疫電顕で観察した。JCV カプシド蛋白の発現を示す金コロイド粒子は核膜近傍でクラスターを形成し、これと一致して球状および管状のウイルス様の粒子形成が認められた。これより、JCV カプシド蛋白は PML 核体に集積し、これを足場に効率よくウイルス粒子を形成することが明らかになった。

【考 察】

PML 核体はポリグルタミン病等の神経変性疾患とも関連しており、PML 核体でおこる ubiquitin-proteasome 系による蛋白分解が細胞変性を誘導するとも示唆されている。進行性多巣性白質脳症における oligodendroglia の変性に PML 核体がどう関与するかを解明することが、今後の課題と考えられる。

【結 論】

JC ウイルスは、感染 oligodendroglia の PML 核体を足場に複製する。

【謝 辞】

本研究は、(財) 東京都神経科学総合研究所神経病理研究部門、内原俊記副参事研究員との共同研究である。

【参考文献】

- 1) Shishido-Hara Y., Ichinose S., Higuchi K., Hara Y., and Yasui. K.: Major and minor capsid proteins of human polyomavirus JC cooperatively accumulate to nuclear domain 10 for assembly into virions. *J. Virol.* 78:9890-903, 2004
- 2) Shishido-Hara Y. and Nagashima K. Synthesis and Assembly of Polyomavirus Virions. In Khalili, K. and Stoner, G. L. eds, *The Human Polyomaviruses: Molecular and Clinical Perspectives* John Wiley & Sons Inc. New York 2001
- 3) Shishido-Hara Y., Hara Y., Larson T., Yasui K., Nagashima K., Stoner G. L.: Analysis of Capsid Formation of Human Polyomavirus JCV (Tokyo-1 strain) by a Eukaryotic Expression System: Splicing of Late RNAs, Translation and Nuclear Transport of Major Capsid Protein VP1, and Capsid Assembly *J. Virology* 74: 1840-185, 2000
- 4) Shishido Y., Nukuzuma S., Mukaiyama J., Morikawa S., Yasui K., Nagashima K.: Assembly of JC virus-like particles in COS7 cells *J Medl Virology* 51: 265-272, 1997
- 5) 穴戸由紀子: 遺伝子組み換えによる JC virus 偽ウイルス粒子の作成 *北海道医学雑誌* 71:573-583, 1996

【研究発表】

1. 論文発表

- 1) Shishido-Hara Y., Ichinose S., Higuchi K., Hara Y., and Yasui. K.: Major and minor capsid proteins of human polyomavirus JC cooperatively accumulate to nuclear domain 10 for assembly into virions. *J. Virol.* 78:9890-903, 2004

2. 学会発表

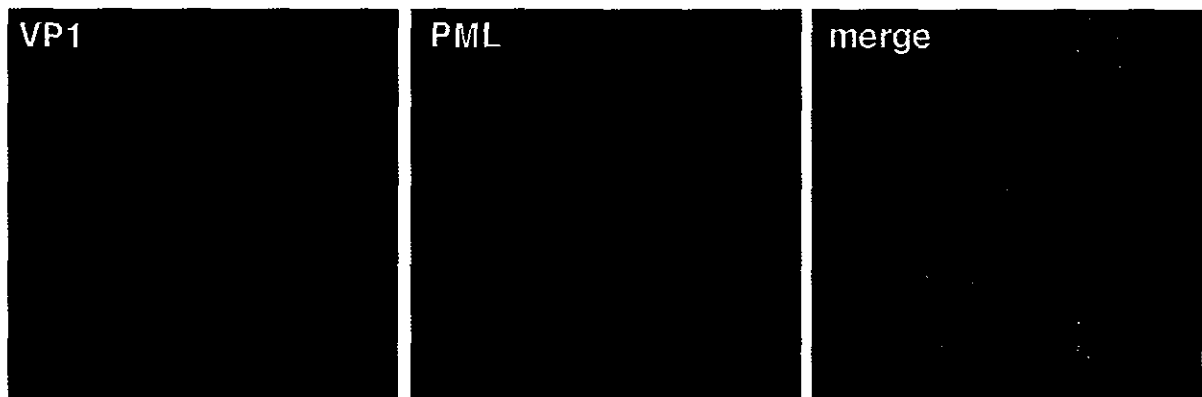
1) 宍戸原 由紀子、保井 孝太郎

JC ポリオーマウイルスは、PML 核体で粒子形成する。第 52 回日本ウイルス学会 ワークショップ 7: ウイルス感染から粒子形成まで 平成 16 年 (2004 年) 11 月 横浜

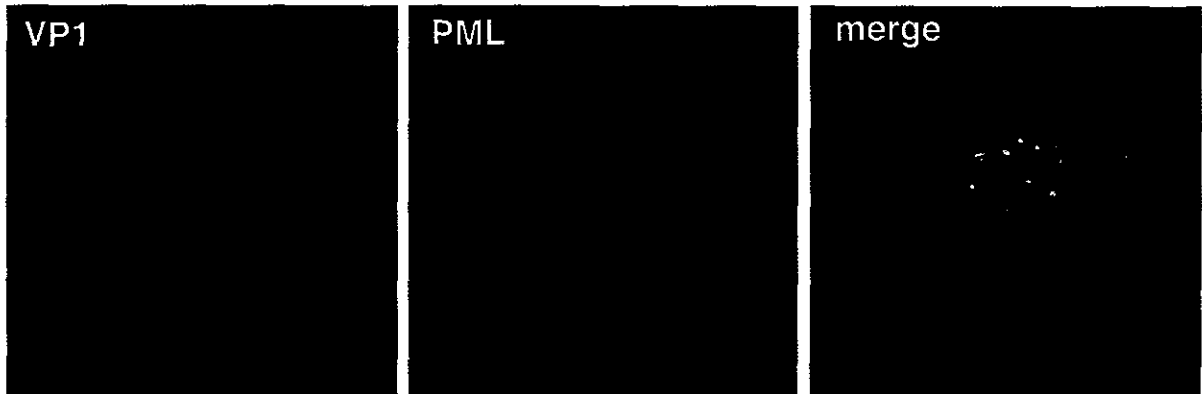
2) 宍戸原 由紀子、保井 孝太郎

進行性多巣性白質脳症 (PML) の核内ウイルス封入体形成メカニズム第 2 報: ウイルス粒子形成は、DNA 複製と連動しているか? 第 45 回日本神経病理学会 平成 16 年 (2004 年) 5 月 前橋

進行性多巣性白質脳症: ヒト脳組織



JCV カプシド蛋白発現 COS-7 細胞



(図 1) 進行性多巣性白質脳症の脳組織と、JCV カプシド蛋白発現 COS-7 細胞において、JCV カプシド蛋白が PML 核体に集積することが明らかになった。

上段: 進行性多巣性白質脳症のヒト脳組織 下段: JCV カプシド蛋白発現 COS-7 細胞

JC virus 感染における細胞特異性を規定する因子の解析

班 員：長嶋 和郎 (北海道大学・医・分子細胞病理)
研究協力者：仙葉 慎吾 (北海道大学・医・分子細胞病理)
：澤 洋文 (北海道大学・医・分子細胞病理)

〔研究要旨〕

JC ウイルス (JCV) は、ヒトの脱髄性疾患である進行性多巣性白質脳症 (PML) の原因ウイルスである。JCV が感染する宿主領域は狭く、特に PML の発症にはヒト中枢神経系のグリア細胞に限られている。JCV 遺伝子の発現は宿主細胞の様々な DNA 結合蛋白質が JCV の転写調節領域 (TCR) に結合することにより調節されており、これが宿主特異性を決定する大きな要因と考えられている。そこで、本研究では JCV の TCR に特異的に結合するタンパク質複合体 (TCR-BP) を単離、同定することを目的とした。JCV 感受性の神経芽細胞腫由来 IMR-32 細胞、および JCV 非感受性の HeLa、A549、SW480、HepG2 各細胞から調製した核タンパク質と、TCR 領域を 40bp 前後に断片化した合成オリゴヌクレオチドをプローブとして用いたゲルシフトアッセイの結果、この結合蛋白質は TCR の特定の配列に結合することが明らかとなった。IMR-32 細胞から調製した核タンパク質から TCR-BP を精製したところ、この蛋白質は分子量 70 kDa と 40 kDa のサブユニットからなるヘテロダイマーであることが明らかとなった。部分アミノ酸配列分析の結果、両サブユニットともそれぞれ、cleavage stimulation factor (CstF) の 77 kDa、50 kDa サブユニットであることが判明した。しかし CstF は種々の細胞に普遍的に発現していることから、IMR-32 と HeLa 細胞を用いて subtracted cDNA library を作製し、CstF 77 kDa サブユニットを bait とした Yeast two hybrid assay を施行した結果、CstF に結合している蛋白を同定し fCI.35 と仮称した。この蛋白質は JCV 感受性神経芽細胞種由来の cell line (IMR-32 細胞) で過剰発現しており、このことから、CstF/fCI.35 の蛋白質複合体が TCR に結合し、JC ウイルス遺伝子の転写、複製を活性化しているものと推察された。

Identification of factors associated with cell specificity in JCV infection

Kazuo NAGASHIMA, Shingo SEMBA, Hirofumi SAWA

Laboratory of Molecular & Cellular Pathology, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo, Japan

ABSTRACT

It has recently been accepted that transcriptional factors are associated with JCV activation and neurotropism. We have examined nuclear factors by using a Mad-4 variant of JCV adapted to grow in the IMR-32 cells. The regulatory region of the variant JCV which consists of 290 bp was divided into 9 fragments, and the fragments were labeled and incubated with nuclear lysates from both IMR-32 and non-permissive cells, and subjected to electrophoretic mobility shift assay (EMSA) assays. The specificity of shifted bands exclusively observed in IMR-32 lysates was confirmed by a competitive assay with a cold probe. By applying several columns and UV cross-linking assays, two molecules of 75 kDa and 45 kDa were identified and verified as forming a heterodimer. By a micro-sequencing analysis, both molecules were identical to those known as 'cleavage stimulation factors (CstF)'. As CstF was widely expressed in the variety of cells, we tried to isolate a CstF binding protein using a yeast two hybrid assay with the subtracted cDNA library which was

made by subtraction of the HeLa cDNAs from the IMR-32 cDNAs. Finally, we have isolated the molecule, designated as fCI.35 which was highly expressed in the IMR-32 cells. We are currently investigate the detailed function of the protein in JCV replication and transcription.

〔はじめに〕

進行性多巣性白質脳症(Progressive multifocal leukoencephalopathy, PML) は致死性中枢神経系脱髄疾患であり, human polyomavirus である JC virus (JCV) はその原因ウイルスである(1)。近年免疫抑制療法の普及や acquired immune deficiency syndrome (AIDS) の流行に伴って PML が益々問題になって来ている(2)。JCV は polyomavirus family に属する二重鎖環状 DNA ウイルスである。その構造は直径 42 から 45nm の 72 個の五量体のカプソマーから成る。JCV ゲノムは 5,130 塩基から成り、三つの領域に分けられる(3)。調節領域は早期と後期蛋白転写領域の間にあり、複製の開始起点及び転写調節領域を含む。早期蛋白転写領域は 1 種類の mRNA から large T 抗原と small t 抗原等が翻訳されるが、後期蛋白転写領域からは VP1、VP2、VP3 のほかに agnoprotein も翻訳される。VP1 は JCV の主な外殻蛋白であり、ウイルス粒子の表面を覆っている。大腸菌や昆虫細胞でウイルス蛋白を発現させた場合、JCV VP1 は単独で virus-like-particle (VLP) を形成し、JCV と同様の機能も持っていることから JCV 研究によく用いられてきている。JCV 感染はウイルスが細胞表面の sialic acid を有する receptor との結合することから始まり、clathrin 依存性に細胞内に侵入し(4,5)、microtubules や microfilaments あるいは intermediate filaments 等を利用して細胞核に輸送される(6)。JCV は核内において mRNA の転写や DNA 複製を行いウイルス粒子の増殖を行っている。今までの研究で、JCV の組織および種特異性は細胞膜因子ではなく、核内因子によって制御されている事が示唆されてきた(5,7,8)。しかしそのメカニズムは未だ不明である。

〔目的〕

JCV 遺伝子の発現は宿主細胞の様々な DNA 結合蛋白質で調節されており、これが宿主特異性を決定する大きな要因と考えられている。そこで、本研究では JCV の転写調節領域 (TCR) に特異的に結合する蛋白質を単離し、JCV の種・組織特異性を制御している因子を同定する事を目的とした。

〔材料と方法〕

1) 細胞株 :

培養細胞株として、核に入った後の JCV 増殖を許容するヒト神経芽細胞腫由来 IMR-32 細胞と JCV 増殖ができない非許容細胞としてヒト子宮頸部類上皮癌由来 HeLa, ヒト肺腺癌由来 A549, ヒト大腸腺癌由来 SW480, ヒト肝臓癌由来 HepG2 細胞を用いた。細胞株は 10% FBS および抗生物質を含んだ DMEM 培地で培養を行った。

2) Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) :

我々はこれまでに TCR 配列が最小である JCV を JCV 持続感染細胞である JCI 細胞から単離し、その配列を決定した(TCRs)。この TCRs (約 290 bp) を互いに重なるように長さ 40 bp の 9 個のユニットに細分し、一本鎖 DNA を合成して、RI 標識した後 annealing を行い二重鎖 DNA probe とした。前述した種々の培養細胞からの核抽出液と JCV DNA との結合を検索するために EMSA を行った。許容細胞である IMR-32 細胞に認められ、非許容細胞 (HeLa, A549, SW480, HepG2 細胞) では認められない分子、即ち IMR-32 細胞の核抽出液に特異的に結合している分子を確認した(図 1)。最終的に Probe の特異性の確認を以下の方法で行った。IMR-32 細胞の核抽出液を各一本鎖 DNA probe (sense, antisense) と混和し、その際に、RI label を行っていない一本鎖 DNA を competitor として種々の濃度で混和し、反応させて EMSA を行った。得られた Band の強さを LAS image analyzer で数値化して比較した。

3) UV cross-linking :

EMSA で認められた band の分子量を推定するために、UV crosslinking 法を行った。DNA probe と核抽出物を poly (dI·dC) と混和し、その後 UV lamp (254 nm) のもとで 4°C で 30 分 incubate した。Sample は SDS-PAGE 後、autoradiography で band を確認する。

4) 蛋白質の精製：種々のカラムを用いた分画法を用いて精製した。

a) Hitrap Q (volume 5 ml)、溶出条件：20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 -1.0 M NaCl, 50 ml linear gradient。

b) EconoPak CHT-II (hydroxyapatite, volume 1ml)、溶出条件：50-400 mM Kpi (pH 7.2), 10 ml linear gradient。

c) Mono S PC 1.6/5、溶出条件：20 mM MES-NaOH (pH 6.0), 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1-0.5M NaCl, 1 ml linear gradient。

d) Superose 6 PC3.2/30、溶出条件：20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mM EDTA, 1mM DTT, 0.15 M NaCl, 0.04 ml/min, 0.05 ml/fraction で分画。この際に standard protein の分子量と比較して転写結合因子複合体の分子量を推定した。

e) 最終的に精製した蛋白を SDS-PAGE で泳動して、Coomasie Brilliant Blue (CBB) で gel を染色して目的の位置の band を切り出し、トリプシンを用いたゲル内消化を行い得られたペプチド断片の配列を protein sequensor によって決定した。

f) 得られたアミノ酸配列をもとに Blast を用いた database 検索を行い精製した蛋白質の同定を行った。

4) Subtracted cDNA library の作成

PCR-Select cDNA Subtraction Kit を用いて、IMR-32 細胞の mRNA から HeLa 細胞の mRNA を subtract することによって IMR-32 細胞特異的に発現している mRNA からなる cDNA library を作製した。

IMR-32 細胞特異的に発現している cDNA を酵母の持つギャップリペア反応を用いて prey となる

pACT2 ベクターに組み込んだ。Subtraction の効率を ³²P でラベルした IMR-32 細胞の subtracted cDNAs プローブとしたコロニーハイブリダイゼーションで検定し、その結果、IMR-32、HeLa 細胞の total cDNA を用いた場合では多くのポジティブコロニーが得られたのに対し、subtracted cDNA を用いた場合には IMR-32 細胞のみにポジティブコロニーが含まれていることが判明した。従って、作成した library 中には、IMR-32 細胞のみに特異的に発現している cDNA が多く含まれていることが明らかになった。

5) Yeast two hybrid assay

4) で単離した cleavage stimulation factors (CstF) は全ての細胞での発現が一様だったので、IMR-32 細胞特異的に発現している因子を単離するために CstF の 77 kDa の subunit を bait として、IMR-32 細胞から調整した subtracted cDNA library をスクリーニングした。約 6.6 x 10⁶ 個のクローンをスクリーニングした結果、結合蛋白質の候補の一つとして fCI.35 が得られた。抗 fCI.35 抗体を用いた WB の結果、全長の fCI.35 は JCV 感受性細胞である IMR-32 細胞に高発現していることが判明した。

6) ChIP assay

JCV 感染細胞内での JCV TCR と CstF の結合を確認するために、クロマチンイムノプレシピテーションアッセイ (ChIP Assay) を施行した。当研究室で樹立した JCV 持続感染細胞 (JCI 細胞) をホルムアルデヒドで固定した後、ライセートを調整し、CstF の 75 k Da subunit に対する抗体を用いて免疫沈降し、沈降物中の JCV genome を PCR で、CstF の 75 k Da subunit を immunoblotting でそれぞれ検出した。陰性対照として normal Rabbit IgG を用いた。

(倫理面の配慮)

本研究では、JCV の感染機構の解析を目的とした。本実験で用いられた JCV は P2 で扱うべきウイルスであり、本研究は当研究室の P2 指定実験室にて安全性に留意して行なわれた。また本実験で用いた大腸菌の系については人体に対する安全性は認められており、北海道大学の組換え DNA 申請に