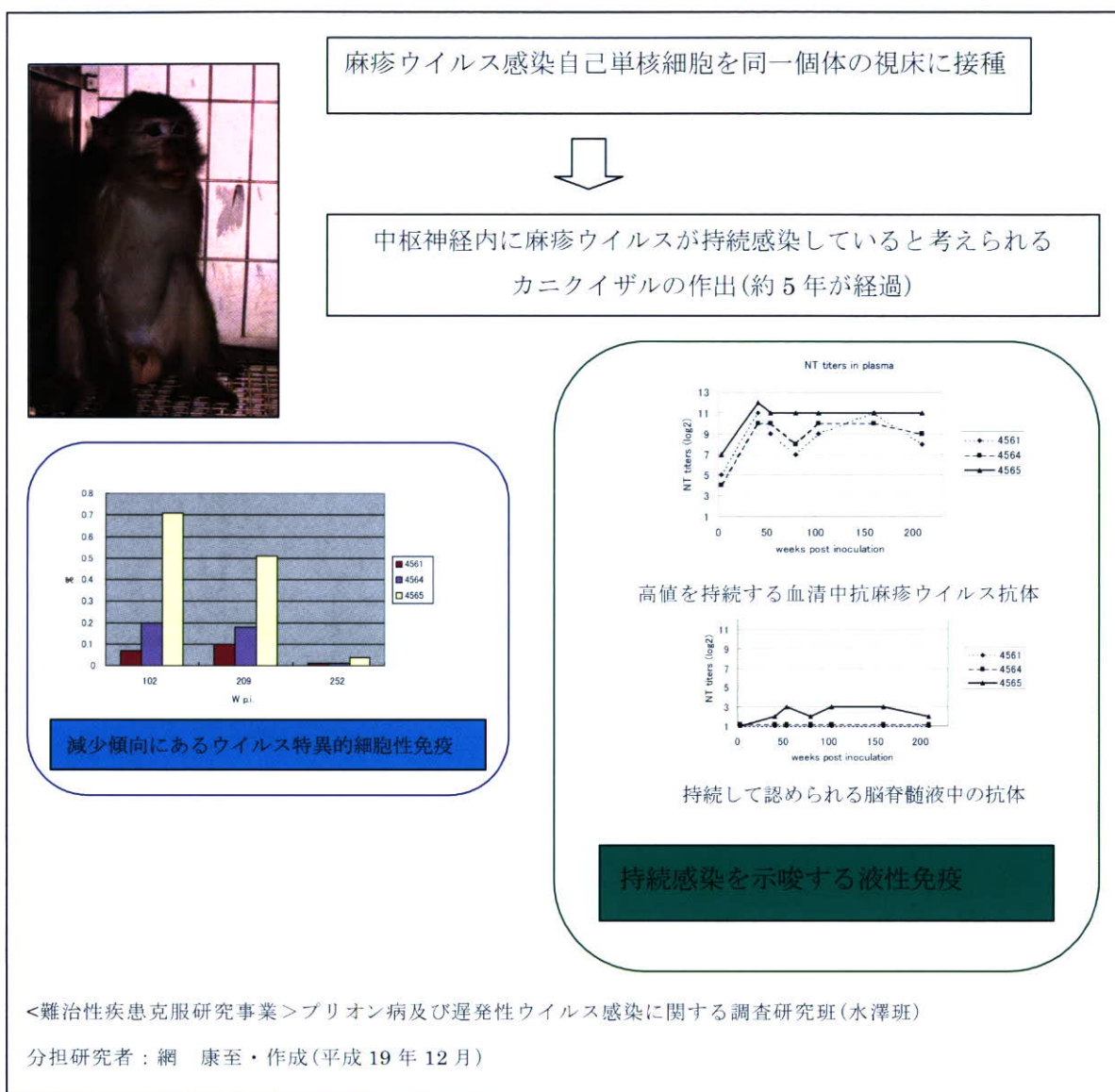


- Comp Immunol Microbiol Infect Dis  
2008 ; 31 : 25-35.
2. Kobune F, Ami Y, Katayama M, Takahashi M, Tuul R, Korukluoglu G, Kiyohara T, Miura R, Sato H, Yoneda M, Kai C. A novel monolayer cell line derived from human umbilical cord blood cells shows high sensitivity to measles virus. J Gen Virol 2007 ; 88 : 1565-1567.
3. Takeuchi K, Takeda M, Miyajima N, Ami Y, Nagata N, Suzaki Y, Shahnewaz J, Kadota S, Nagata K. Stringent requirement for the C protein of wild-type measles virus for growth both in vitro and in macaques. J Virol 2005 ; 79 : 7838-7844.
7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)
1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし

## カニクイザルを用いた SSPE モデル動物の開発



麻疹ウイルスの脳内における持続感染が SSPE 発症要因のひとつであると考えられている。持続感染の作出と麻疹ウイルスの脳内侵入経路を明らかにする目的で、感染自己単核細胞を同一個体の視床に接種したカニクイザル2頭のうちの1頭は、約5年間、持続的に脳脊髄液中にウイルス中和抗体を検出し、持続的な血清中の高い中和抗体価の維持し、中枢神経内における麻疹ウイルスの持続感染の可能性を示唆する。脳脊髄液中では、IgG index の上昇、oligoclonal IgG は認められないものの IgG 量の増加傾向が認められた。麻疹ウイルス特異的的刺激に対する CD8(+)細胞における  $\gamma$  IFN 産生細胞率を指標とする細胞性免疫は、低下傾向にあり SSPE 発症要因との関連についてはさらに観察を続けることが重要と考えられる。

分担研究者：柳 雄介 九州大学大学院医学研究院(ウイルス学分野)

### 1. 研究目的

麻疹後に数万人に約 1 人の割合で発生する SSPE の発症機構を明らかにすることにより、その発症の予防および治療に資する。特に、ニューロンの麻疹ウイルス感染機構について明らかにする。

### 2. 研究方法

麻疹ウイルス受容体である SLAM を発現するマウスを樹立する。様々なルート(経鼻、腹腔内、脳内)から、野生型麻疹ウイルスを感染させ、長期に渡ってマウスを観察し、持続感染の有無を調べる。持続感染が成立すれば、その間にどのような変異がウイルスに生じているかを調べる。また、ウイルスがどのような細胞に感染し、伝播するかを検討する。さらに、麻疹ウイルスと細胞受容体の相互作用を明らかにするために、麻疹ウイルスの受容体結合蛋白質である H 蛋白質の結晶構造を解明する。

(倫理面の配慮)

動物実験については、必要な許可(遺伝子組換え実験に関する大臣確認および学内の動物委員会)を受けている。

### 3. 研究結果及び考察

麻疹ウイルスは免疫系の細胞に発現しているヒト SLAM(CD150)を受容体として細胞に感染する。麻疹ウイルス感染の小動物モデルを開発するために、ヒト型 SLAM を発現している遺伝子改変マウス(SLAM ノックインマウス)を作製した。SLAM ノックインマウスは期待された通り、免疫系の細胞にヒト型 SLAM を発現していた。また、免疫機能に明らかな異常を認めなかった。in vitro の実験

で野生型マウスの脾臓細胞に麻疹ウイルスは全く感染しなかったが、SLAM ノックインマウス由来の脾臓細胞には感染し、ウイルス増殖を認めた。しかし、in vivo では、腹腔内、経鼻、静脈内のいずれの経路からの接種でも感染が成立しなかった。そこで、ウイルス抵抗性に重要な役割をしているインターフェロン系に欠陥のある 1 型インターフェロン受容体欠損マウスと交配し、麻疹ウイルスを感染させた。その結果、全身のリンパ組織で麻疹ウイルスの感染、増殖を認めた。また、感染マウスから得られた脾臓細胞はマイトジェン刺激に対する反応が低下し、ヒトで見られる免疫抑制を再現できた。さらに、in vitro、in vivo いずれの実験でも、病原性のある麻疹ウイルス野生株は SLAM ノックインマウスの免疫細胞でよく増殖したが、弱毒ワクチン株はほとんど増殖しなかった。すなわち、ウイルスの毒力の違いをマウスモデルで再現することができた。

そこで、次にこの SLAM ノックインマウスを用いて、中枢神経系で麻疹ウイルス感染が成立するか検討した。新生仔および成熟マウスに麻疹ウイルス野生株を脳内接種後 1 ヶ月観察したが、神経症状は認められず、脳からウイルスも回収できなかった。SSPE における主要なウイルス感染細胞であるニューロンには SLAM の発現は認められていない。これまでに報告されているマウスの脳感染モデルは、麻疹ウイルス野生株ではなく、齧歯類の脳に馴化したウイルス株(未知の分子を受容体としてニューロンに感染していると考えられる)が主に用いられている。また、別の受容体発現マウスモデルである CD46 トランスジェニックマウスの場合は、ニューロンに

CD46 が発現しており、CD46 を受容体として使うワクチン株が実験に使われている。ヒトの SSPE では、受容体として SLAM を使う麻疹ウイルス野生株が、SLAM を発現していないニューロンに何らかのメカニズムで持続感染を起こしていると考えられる。

一方、麻疹ウイルス H 蛋白質の構造解析の結果、その受容体結合ドメインは、6 つの羽根を持つプロペラ状の構造をしていることが分かった。これは、既に構造が解明されている他のパラミクソウイルス(シアル酸を受容体とする)の受容体結合蛋白質やインフルエンザウイルスのニューラミニダーゼ(やはりシアル酸と結合する)と同じ基本骨格である。しかし、その表面構造は立方体状であり、上記の他のウイルス蛋白質が示す球状構造とは異なっていた。

H 蛋白質上の SLAM 結合部位は単量体上では分子の側面に位置し、受容体との結合には不都合であるように見える。しかし、H 蛋白質は二量体構造をとり、それぞれの単量体が互いに水平面方向に大きく傾くことによって受容体結合部位がウイルス粒子の頂点にくるような配向をとる。この SLAM 結合部位の構造を基にした抗ウイルス薬の開発が今後期待される。

#### 4. 評価

##### 1) 達成度について

受容体発現マウスの作製には成功したが、麻疹ウイルス持続感染の再現には至っておらず、さらに実験系の改良が必要である。また、麻疹ウイルス受容体結合蛋白質の結晶構造解析に成功し、受容体との相互作用に関して重要な知見が得られた。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

SSPE の発症機構の解明には小動物モデルが不可欠であり、受容体発現マウスはその樹

立へ向けた第一歩となった。麻疹ウイルス受容体結合蛋白質の結晶構造の解明は抗ウイルス薬の開発につながる重要な成果である。これらの研究の学術的・国際的評価は高く、いずれも一流の国際学術誌に発表された。

##### 3) 今後の展望

動物モデルについてはさらに改良が必要である。それに加え、ニューロンへの麻疹ウイルス侵入・伝播に関してこれまでに分かっている受容体とは異なる未知の分子を介したメカニズムを検討する必要がある。

##### 4) 研究内容の効率性について

SSPE の病因解明や治療につながる知見が得られ、効率性が高い研究だと考えられる。

#### 5. 結論

麻疹ウイルスの受容体を発現するマウスを作製することにより、麻疹ウイルスの免疫細胞へのトロピズムや免疫抑制能を再現する動物モデルを樹立することに成功した。しかし、現時点では、本マウスと麻疹ウイルス野生株を用いて中枢神経系の持続感染を再現することはできていない。今後さらに実験系の改良が必要である。一方、麻疹ウイルスの受容体結合蛋白質の構造解析に関しては、結晶構造の解明に成功し、受容体結合領域の詳細な構造が明らかになった。今後、抗ウイルス薬の開発などにつながることを期待できる。

#### 6. 研究発表

##### 1) 国内

口頭発表：3 件

原著論文による発表：0 件

それ以外(レビュー等)の発表：3 件

そのうち主なもの

##### 論文発表

1. 柳 雄介、竹田 誠、大野真治. 麻疹ウイ

ルスの細胞侵入と受容体. 蛋白質 核酸 酵素. 2007 : 52 ; 1088 -1094.

#### 学会発表

1. Ohno S, Ono N, Seki F, Takeda M, Yanagi Y. Analysis of measles virus infection using human SLAM knockin mice. The 6th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Hyogo, Japan. Sept 4-6, 2006.
2. 大野真治, 小野伸之, 関文緒, 竹田 誠, 柳 雄介. ヒト SLAM ノックインマウスの麻疹ウイルス感染の解析. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会. 名古屋, 2006.11.
3. 橋口隆生, 竹田 誠, 柳 雄介. X 線結晶構造解析による麻疹ウイルス H タンパク質のレセプター認識の構造基盤. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌, 2007.10.22.

#### 2) 海外

口頭発表 : 0 件

原著論文による発表 : 3 件

それ以外(レビュー等)の発表 : 1 件

そのうち主なもの

#### 論文発表

1. Yanagi Y, Takeda M, Ohno S. Measles virus : cellular receptors, tropism and pathogenesis. J Gen Virol 2006 ; 87 : 2767-2779.
2. Ohno S, Ono N, Seki F, Takeda M, Kura S, Tsuzuki T, Yanagi Y. Measles virus

infection of SLAM(CD150) knockin mice reproduces tropism and immunosuppression in human infection. J Virol. 2007 : 81(4) ; 1650-1659.

3. Takeda M, Tahara M, Hashiguchi T, Sato TA, Jinnouchi F, Ueki S, Ohno S, Yanagi Y. A human lung carcinoma cell line supports efficient measles virus growth and syncytium formation via a SLAM- and CD46-independent mechanism. J Virol. 2007 : 81(21) ; 12091-12096.
4. Hashiguchi T, Kajikawa M, Maita N, Takeda M, Kuroki K, Sasaki K, Kohda D, Yanagi Y, Maenaka K. Crystal structure of measles virus hemagglutinin provides insight into effective vaccines. Proc Natl Acad Sci USA. 2007(in press)

#### 学会発表

特になし

#### 7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

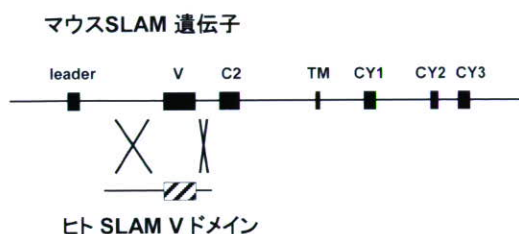
3. その他

特になし

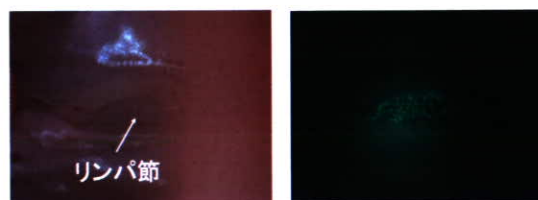
# 麻疹ウイルスの感染モデルと受容体認識の構造基盤

分担研究者：柳 雄介 九州大学大学院医学研究院ウイルス学

## ヒト SLAM ノックインマウスの作製

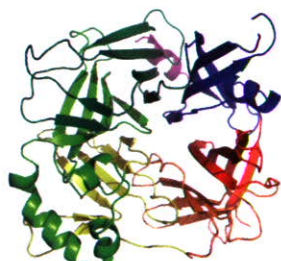


## SLAMノックイン, I型インターフェロン受容体欠損マウスでの麻疹ウイルスの増殖

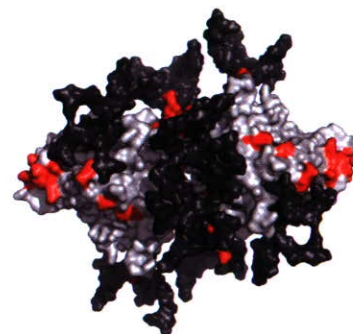


## 受容体発現マウスモデルを用いた麻疹ウイルス感染の解析

### 麻疹ウイルス受容体結合蛋白質の結晶構造解析



6つの羽根を持つベータ・プロペラ構造



受容体結合領域と抗体のエピトープ  
(黒：糖鎖、赤：エピトープ)

われわれは、麻疹ウイルスの受容体が免疫系細胞に発現している SLAM (CD150) であることを明らかにした。SLAM は免疫グロブリン・スーパーファミリーに属する分子であり、その V ドメインが受容体機能に重要である。麻疹ウイルス感染の小動物モデルを開発するために、マウス SLAM 遺伝子をヒトの遺伝子で置き換えた SLAM ノックインマウスを作製した。SLAM ノックインマウスを 1 型インターフェロン受容体欠損マウスと交配し、麻疹ウイルスを感染させたところ、全身のリンパ組織で麻疹ウイルスの感染、増殖を認めた。この SLAM ノックインマウスは、中枢神経系でのウイルス感染および SSPE の発症機構の解明に有力なモデルになることが期待される。

麻疹ウイルスの受容体認識の構造基盤を明らかにするために、受容体結合蛋白質 (H 蛋白質) の結晶構造解析を行った。その結果、H 蛋白質の受容体結合ドメインは、6 つの羽根を持つプロペラ状の構造をしていることが分かった。H 蛋白質は二量体構造をとり、その大部分は糖鎖に覆われている。しかし、糖鎖に覆われていない領域があり、その部分で受容体 SLAM と結合していることが分かった。また、中和活性を持つ抗 H 蛋白質抗体のエピトープも同じ領域にマップされる。今後、SLAM 結合部位の構造を基にした抗ウイルス薬の開発が期待される。

主任研究者：水澤英洋 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脳神経病態学  
(神経内科学)分野

分担研究者：澤 洋文 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター  
分子病態・診断部門

## 1. 研究目的

背景：human polyomavirus である JC virus (JCV) は致死性中枢神経系脱髄疾患である進行性多巣性白質脳症 (Progressive multifocal leukoencephalopathy, PML) を惹起する。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。JCV は Polyomavirus family に属する二重鎖環状 DNA ウイルスである。

本調査研究では、①臨床的に診断が困難である JCV 感染症の診断を補助するために nested PCR 法を用いて髄液検体の JCV 遺伝子の検索を行うこと、②治療法が確立されていない JCV 感染症の治療法開発のための基盤として、JCV による宿主細胞の機能障害機構の解明を行うことを目的とした。

## 2. 研究方法

### ①の方法：

髄液からの DNA 抽出はスマイテスト EX-R&D (ゲノムサイエンス研究所) を使用し、メーカーのプロトコールに従って行った。JCV の遺伝子の検出については、髄液から抽出した DNA を用いて nested PCR 法を行った。予想される増幅断片のサイズは原型の場合は 396 bp であるが、再編成型の場合、断片サイズは異なる。陽性のバンドが出た場合は、遺伝子配列をシーケンシングにより確認を行った。これらの方法は余郷博士 (東京大学 医科学研究所) の protocol に従って行った。

### ②の方法：

#### 1) 細胞生物学的手法

免疫組織学

バイオイメージング

#### 2) 分子生物学的手法

タンパク質-タンパク質の相互作用

Yeast two-hybrid assay

免疫沈降法

微小管共沈法

ウイルス粒子を用いた overlay assay

Immunoblotting 法

DNA-タンパク質の相互作用

Electrophoretic mobility shift assay

を用いて行った。

### (倫理面への配慮)

本実験で用いられた JCV は微生物のレベル 2 に属しており、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実験系については、北海道大学の組換え DNA 申請において承認を得ている。[承認番号 17(12)]。また JCV の遺伝子検索は臨床医療機関から依頼を受けて行ったものであり、厚生労働省が定めた個人情報保護のためのガイドラインに沿って行った。

## 3. 研究結果及び考察

### 目的①の結果

1) 平成 18 年 4 月から平成 19 年 3 月までに、全国の医療機関から依頼を受けた 56 例の髄液検体および 1 例の尿検体について JCV の遺伝子の検索を行った。

- 2) 今回用いた nested PCR 法による JCV 遺伝子の検出感度は 1 反応あたり 25 copy であった。
- 3) 13 検体(12 症例)の髄液から JCV の遺伝子を検出した。44 検体からは JCV の遺伝子は検出されなかった。
- 4) 尿検体(1 例)から JCV の遺伝子を検出した。

#### 目的①の考察

平成 18 年度の検索においては、髄液検体からの陽性率は約 23%であった。現在臨床的に診断が困難である JCV 感染症において、髄液中の JCV 遺伝子を検索することは診断の補助となり、医療の向上において成果をあげた。

本検索は nested PCR 法を利用しており、検出感度は 1 反応あたり 25 copy であったが、real-time PCR 法を行った場合には検出感度が変化することが予想された。

#### 目的②の結果

1. JCV のタンパク質である agnoprotein は宿主因子である heterochromatin protein 1 alpha (HP1 $\alpha$ )、lamin B receptor (LBR)、AP-3 delta と結合しその生理作用を阻害することにより、JCV 粒子の核内から核外への輸送を促進し、また細胞内小胞輸送を阻害することにより、ウイルス粒子の細胞内から細胞外への輸送を促進した。
2. JCV 調節領域に結合する宿主因子として Cleavage stimulation factor (CstF)、DDX1 を単離した。DDX1 は JCV 感染の組織特異性に関与していることが示された。
3. 実験から得られた基礎的結果に基づいて、cdk inhibitor である Roscovitine が JCV の感染を抑制することを見出した。

これらの結果については既に英文雑誌に報告し (EMBO Rep, 2005, J Biol Chem, 2005, Microbiol Immunol, 2007, Microbiol Immunol, 2007, Virology, in press)、一部は投稿準備中である。

#### 目的②の考察

これまで機能が不明であった JCV のタンパク質である agnoprotein が JCV 粒子の核内一核外また細胞質一細胞外の輸送を制御していることを明らかにした。また JCV の組織特異感受性が宿主タンパク質である DDX1 により一部は制御されていることが明らかになった。

#### 4. 評価

##### 1) 達成度について

本研究で目的としていた①臨床的に診断が困難である JCV 感染症の診断を補助するために nested PCR 法を用いて髄液検体の JCV 遺伝子の検索を行うこと、②治療法が確立されていない JCV 感染症の治療法開発のための基盤として、JCV による宿主細胞の機能障害機構の解明を行うことに関して計画を達成した。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

現在 JCV 感染により惹起される進行性多巣性白質脳症は治療法が確立されていない。その原因は JCV 感染による病態が十分に解明されていないことである。

本計画において、JCV 粒子の宿主細胞内での動態に関する新知見が得られたこと、JCV 感染の組織特異性に関与する因子が単離されたこと、また JCV 感染を抑制する薬剤が新たに見出されたことは学術的に重要である。これらの仕事は国際的にも注目されており EMBO Rep に報告した agnoprotein が粒子の核外輸送を制御していることを報告した論文は 2005 年に Nat Rev Microbiol に Research highlight として紹介され、注目を集めた (図 1)。

さらに JCV 感染を抑制する薬剤を新たに見出したことは治療法の確立されていない JCV 感染症において、新たな治療戦略の基盤



を作ったことで、重要な社会的な意義を有している。

### 3) 今後の展望

現在分担研究者は JCV 感染に対する基礎的研究を精力的に行っており、研究を継続することにより得られる基盤に基づいて、JCV 感染により惹起される進行性多巣性白質脳症の治療法が確立されることが予測される。

### 4) 研究内容の効率性について

本研究で得られた結果は、海外雑誌に報告を行い、国際的にも評価された。これらの点から判断すると本研究は効率的に実施されたと考える。

## 5. 結論

- 1) JCV 感染症の診断を補助し、医療の向上に寄与した。
- 2) 基礎的研究により JCV 感染機構の新知見を得た。得られた基礎的知見に基づく治療法の可能性を見出した。

## 6. 研究発表(2005-2007年)

### 1) 国内

口頭発表：17件

原著論文による発表：1件(印刷中)

それ以外(レビュー等)の発表：3件(印刷中を含む)

そのうち主なもの

#### 論文発表

- 1) 澤 洋文, 鈴木忠樹, 大場靖子, 寸田祐嗣, 長嶋和郎: JC ウイルスの最近の基礎的知見. BRAIN and NERVE 59: 101-108, 2007
- 2) 鈴木忠樹, 長嶋和郎, 澤 洋文: 進行性多巣性白質脳症(PML): 原因ウイルスと発病機構. 日本臨床 65: 1495-1500, 2007

#### 学会発表

- 1) 澤 洋文, 長嶋和郎: 中枢神経系のウイル

ス感染症の神経病理. 第94回日本病理学会総会(ワークショップ), 2005年, 4月14-16日, 横浜

- 2) 澤 洋文: ウイルス感染症の分子病理学的研究. 第143回日本獣医病理学会シンポジウム, 2007年, 4月3-5日, つくば

### 2) 海外

口頭発表：8件

原著論文による発表：8件(印刷中を含む)

それ以外(レビュー等)の発表：2件

そのうち主なもの

#### 論文発表

- 1) Okada Y, Suzuki T, Sunden Y, Orba Y, Kose S, Imamoto N, Takahashi H, Tanaka S, Hall WW, Nagashima K, Sawa H\* : Dissociation of heterochromatin protein 1 from lamin B receptor induced by human polyomavirus agnoprotein : role in nuclear egress of viral particles. EMBO Rep 6 : 452-457, 2005(\* corresponding author)
- 2) Suzuki T, Okada Y, Semba S, Orba Y, Yamanouchi S, Endo S, Tanaka S, Fujita T, Kuroda S, Nagashima K, Sawa H\* : Identification of FEZ1 as a protein that interacts with JC virus agnoprotein and microtubules : role of agnoprotein-induced dissociation of FEZ1 from microtubules in viral propagation. J Biol Chem 280, 24948-24956, 2005(\* corresponding author)
- 3) Sunden Y, Suzuki T, Orba Y, Umemura T, Asamoto M, Nagashima K, Tanaka S, Sawa H\*. Characterization and application of polyclonal antibodies that specifically recognize JC virus large T antigen. Acta Neuropathol 111: 379-387, 2006(\* corresponding author)

- 4) Orba Y, Sunden Y, Suzuki T, Nagashima K, Kimura T, Tanaka S, Sawa H\* : Pharmacological cdk inhibitor R-Roscovitine suppresses JC virus proliferation. *Virology* (in press) (\* corresponding author)

学会発表

- 1) Sawa H, Suzuki T, Okada Y, Orba Y, Sunden Y, Semba S, Nagashima K : Agnoprotein plays a role in intracellular trafficking of JC virus. 3rd International Conference Polyomaviruses and Human Diseases : Basic and Clinical Perspectives, Sep. 11-14, 2005, Providence, RI, U.S.A., (invited speaker)
- 2) Sawa H, Sunden Y, Semba S, Suzuki T, Okada Y, Orba Y, Kimura T,

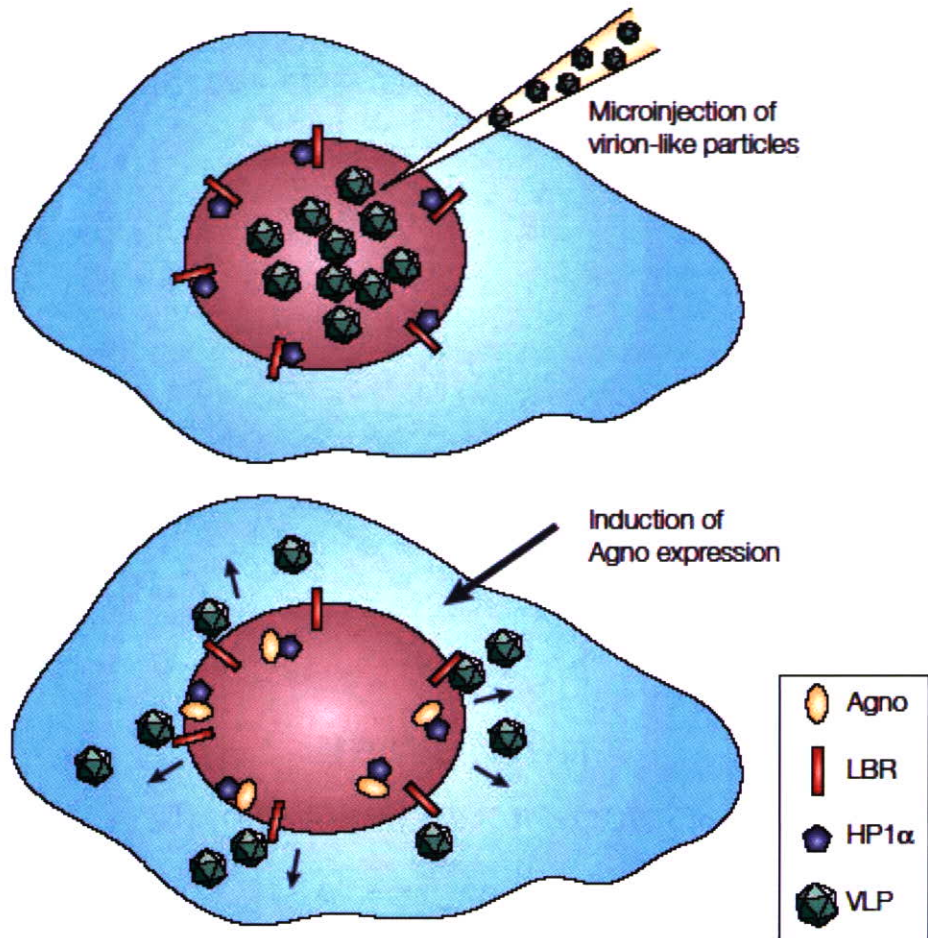
Nagashima K : Cellular factor DEAD box protein 1 (DDX1) regulates JCV proliferation. IV International Conference on Polyomaviruses and Human Disease, : Basic and Clinical Perspectives, Sept 30-Oct 3, 2007, Barcelona, Spain (invited speaker)

7. 知的所有権の出願・取得状況

出願中の特許 3 件

- 1) JC ウイルス agno を対象とした PML の治療 (特願 2001-356836 号)
- 2) JC ウイルスの粒子形成阻害剤 (特願 2004-165083 号)
- 3) JC ウイルスの VP-1 に対する siRNA、およびそれを含有してなる医薬組成物 (特願 2006-513677 号)

# Agno finds a way out

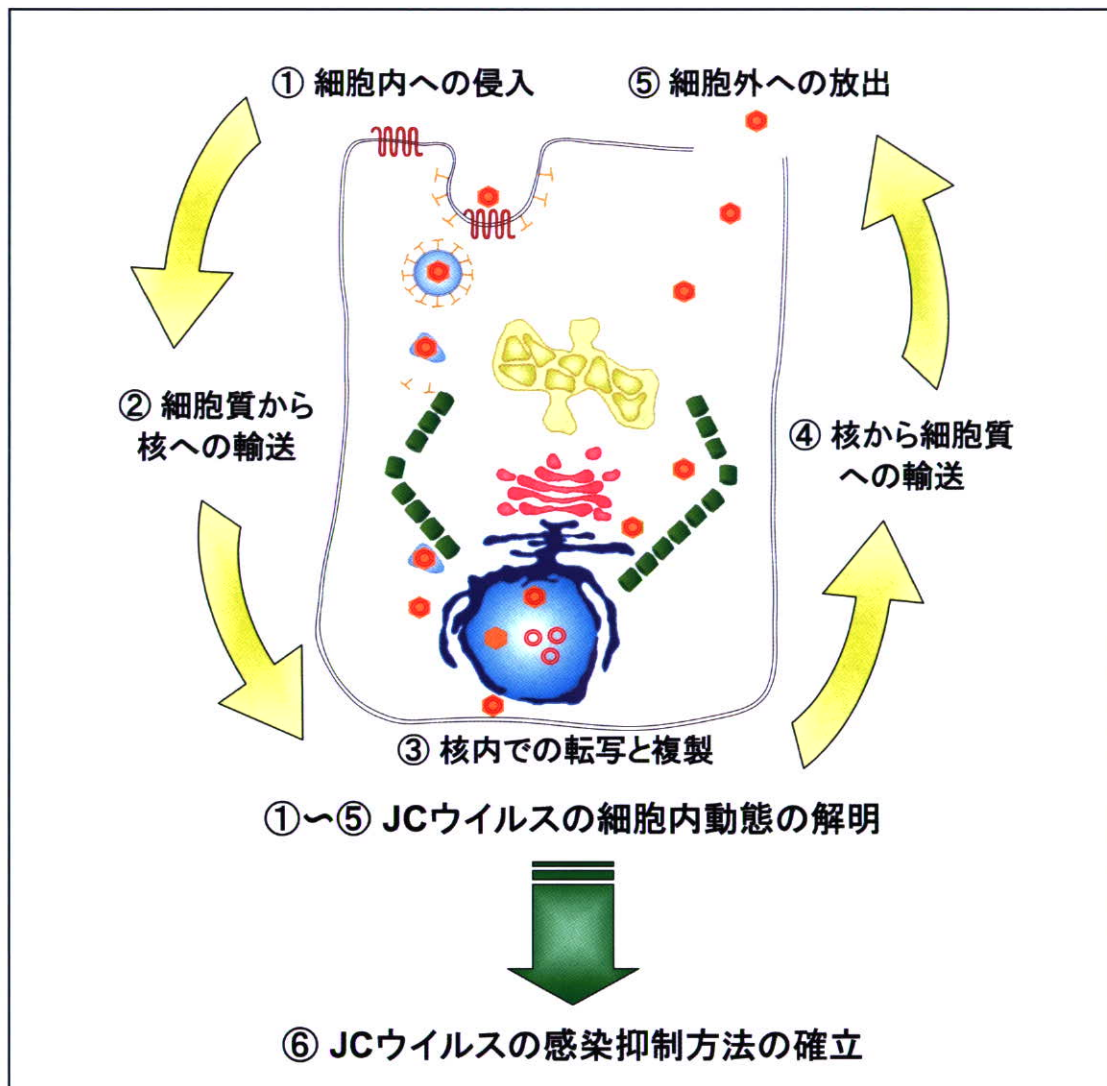


Schematic showing the nuclear export of microinjected virion-like particles (VLPs) after induction of Agno expression. Figure courtesy of H. Sawa, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

図 1 Nat Rev Microbiol 3 : 205-6, 2005 で紹介された図

## JC ウイルスの細胞内動態の解明と感染抑制法の確立

分担研究者：澤 洋文 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター



これまで JC ウイルスの宿主細胞における感染サイクルには不明な点が多かった。分担研究者は JC ウイルスが細胞に感染し増殖する際の細胞内動態を解析し、以下の事を見出した。さらに、これらの発見に基づいて JC ウイルスの感染抑制方法を確立した。

- ① JC ウイルスの細胞内への侵入は糖鎖が必要であり、また細胞内での輸送はクラスリンを介して行っていることを明らかにした。
- ② JC ウイルス様粒子 (Virus-like particle) を用いて、ウイルス粒子は importin と結合して核内に輸送されることを見出した。
- ③ JC ウイルスの転写を制御する宿主因子として、DDX1 を単離した。
- ④ JC ウイルスの agnoprotein がウイルス粒子の核内から核外への輸送を制御していることを明らかにした。
- ⑤ Agnoprotein は細胞膜の機能を変化させてウイルス粒子の細胞外への放出を制御していることを見出した。
- ⑥ In vitro で JC ウイルスの感染を抑制する薬剤を見出した。

## 進行性多巣性白質脳症の病態と治療法の解明

分担研究者：岸田修二 東京都立駒込病院脳神経内科

### 1. 研究目的

- ① 進行性多巣性白質脳症(以下 PML)に対し 2003 年統一した診断基準を作成し、それを基にわが国における 1999 年～2003 年の実態調査を神経内科専門医を対象に行った。その結果、definite 例 20 例、probable 例 18 例、possible 例 14 例の計 52 例が認められた。本症はヒトにのみ発症する疾患であるために、発病や病状進行のメカニズム、有効な治療法の解明には個々の症例の解析が必要であり、その臨床像と予後、治療歴などを明らかにするため第二次調査を行う。
- ② 第二次疫学調査を行った結果、基礎疾患として非 HIV 関連では 86%の患者が進行性経過の後死亡しているのに比べ、HIV 関連では 36%の死亡率であり、HIV 関連 PML は抗レトロウイルス療法により延命効果が示され、非 HIV 関連 PML より生命予後が良かった。しかし本症の転帰は治療評価を行う上で、生命予後、薬剤反応性の有無で判定されるのではなく、臨床症状、髄液 JC ウイルスの動態、MRI 所見などを含め総合的な活動性を評価すべきであるとの立場から活動性評価基準を作成し、個々の症例に関し、試用された治療法の有効性を検討する。
- ③ HIV 関連に関しては延命、病状の停止、改善効果を認める治療方法は HAART による免疫回復であることが前回までの調査と文献報告から明らかであるが、この治療法はすべての患者に有効ではない。更に HAART 開始後臨床経過が悪化する免疫

再構築症候群を発症することがあり、その臨床経過や対応に関して不明な点が多い。HAART 有効例と無効例の違い、PML の免疫再構築症候群の臨床像を解析する。一方 HIV 関連に比べ極めて予後不良な非 HIV 関連 PML に関しても症例を通して治療法を考察する。

### 2. 研究方法

- ① わが国の神経内科専門医 3,920 名を対象に、以下の事項につき第二次疫学医調査を、郵送による質問形式で調査した。1999 年～2004 年に発症した症例の転機、基礎疾患、経過、発症様式、初発症状、経過中に出現した症状、画像検査所見、髄液検査所見、脳生検所見、HIV 感染の場合、発症時の CD4(+)リンパ球数、抗ウイルス療法の有無、治療とその効果などについてそれぞれを解析する。
- ② 活動性評価基準を以下の様に定義する。
  1. 治療開始前状態の評価定義：活動性：病歴から推察し、臨床症状の増悪あるいは経過観察中に MRI 所見の増悪をみるもの、髄液 JCV の検出などを認めるもの(但し髄液 JCV は必ずしも検出されない事もある)。停止：病歴から推察し、臨床症状の変化および経過観察中に MRI 所見の変化をみないもの(髄液中の JCV 検出を認めないもの)。
  2. 治療開始後状態の評価定義：活動性：3 ヶ月の定期観察中、臨床症状の増悪あるいは MRI 所見の増悪を認めたもの(MRI での萎縮性変化は増悪ととらない)。停止：3 ヶ月

の定期観察中、臨床症状の変化および MRI 所見の変化をみないもの(髄液中の JCV 検出を認めないもの)。

改善：3 ヶ月の定期観察中、臨床症状と MRI 所見の改善をみたもの。以上の定義を用いて追跡を行い治療効果判定を行う。

- ③ 免疫再構築症候群を発症した自験 PML5 症例を中心とし、平成 19 年度コンサルテーションに応じた HIV 関連 PML 症例 3 例と非 HIV 関連 PML2 例の計 10 例から現時点での PML の診断、治療、予後を考察する。

(倫理面への配慮)

本報告は個人情報を含まない進行性多巣性白質脳症の臨床情報の収集であり、倫理面での問題はないと判断した。

### 3. 研究結果及び考察

- 1) 第二次疫学調査回答は definite 13 例、probable 15 例、possible 4 例であった。
- ①基礎疾患として非 HIV が 21 名(66%)、HIV が 11 名(34%)であった。②年齢は平均 53 歳であった。③調査期間内での発病からの生存日数は 1 ヶ月から 75 ヶ月におよび、非 HIV 患者では 18 名、HIV 患者では 4 名死亡し、多くは 1 年以内に死亡していた。④死因は PML が 36%、その他が 41%であった。⑤経過では 84%の患者で進行性経過をとり、16%で停止～改善を見た。⑥初発は 84%で大脳半球、16%で小脳であった。⑦初発症状は運動麻痺、認知機能障害、失語症、視力障害が代表的であり、経過中に言語・嚥下障害、脳神経麻痺、無動無言状態が多く症例で加わっていた。⑧画像検査では初診時の病変は単一病巣が 20 例、多発例が 8 例あった。小脳発症は 5 例のみでその他は大脳に初発していた。⑨髄液検査では細胞数は殆どの例で増加はなく、蛋白は軽度上昇するものが 1/3 例にみられた。⑩definite 例の 8 例は

脳生検によるものであり、5 例は剖検診断によるものであった。⑪HIV 症例では発症時の CD4 リンパ球数は平均  $66.3/\mu\text{L}$  と低値であった。⑫治療面では、HIV 関連 PML では HAART が有効であったが、その他に関しては全く有効例を見なかった。

- 2) エントリー時にはすべて活動性の症例で、HIV-PML 7 例、SLE に合併した PML 1 例、計 8 例が解析出来た。HIV 関連 PML では 2 例、無治療では 3 ヶ月、HAART 無効例は 5 ヶ月でそれぞれ死亡した。SLE 例では PML に特異的治療なく 10 ヶ月活動性のまま生存していた。HIV 関連では HAART により 41 ヶ月の現在停止状態を維持、4 ヶ月で停止後 9 ヶ月維持、3 ヶ月で改善後 69 ヶ月維持、3 ヶ月で停止後 23 ヶ月維持、1 例は HAART 開始 1 ヶ月後から免疫再構築反応を生じ 2 ヶ月現在活動性の症例がみられた。IFN- $\alpha$  の試用例が 1 例あるが無効、cidofovir に関しても効果なし、risperidone は 3 例試用中、1 例無効、2 例は不明との報告である。HIV-PML では HAART による停止・改善が 4/5 例、無効 1/5 例あり、HIV 関連 PML に対して HAART は活動性評価の点からも有効な治療法であると思われる。
- 3) 自験例とコンサルテーション例の HIV 関連、非 HIV 関連 PML の詳細な検討結果から、①診断補助診断として MRI は最も鋭敏であるが、臨床症状や髄液 JCV 陽性所見を伴わない場合には現在の診断基準では診断確定までに病巣が不可逆的に拡大する可能性があり、HIV 関連では HAART 開始後も HAART のみでは病巣と症状の急速な進行がみられる。②HIV-PML に HAART 開始後自験例では全例 IRIS を発症した。③IRIS 発症時必ずしも末梢血 CD4 の顕著な増加はなく、また髄液所見、髄液 IL-6 値は必ずしも炎症を反映しなかったが、CD4/CD8 比の 1 ヶ月目

の上昇と IRIS 発症時期は相関した。IRIS の重症度とこれら所見とは関係無かった。④IRIS-PML、PML-IRIS とともに自験例では全例 8 ヶ月以上生存しており、HAART 導入以前の自験例平均寿命 5 ヶ月に比べ明らかに生命予後は良好である。⑤他施設での HIV-PML3 例では HAART 施行で 1 例のみ有効であり、無効例も存在する。⑥長期生存予測因子として、発症後 2 ヶ月以内に HAART 開始例、免疫再構築として発症例、HAART 開始後 MRI で造影剤増強効果をみる例は延命効果を認める傾向があった。⑦acyclovir、ara-A、cidofovir、risperidone など抗ウイルス剤が HIV-関連、移植関連 PML に試用されたが、効果は証明されなかった。⑧髄液 JCV 量の推移は PML の予後と関連する。⑨免疫再構築症候群により腫瘍効果が著明な例にはステロイドパルスを試みるべきである。

PML は HIV 感染患者の増加に伴って増加してきている疾患であり、HAART が HIV 感染治療に導入された以後も他の日和見感染症と異なり免疫再構築症候群として発症するため減少傾向になく、また他の免疫抑制状態を伴う治療法・病態に合併する疾患として全体に増加傾向にある。

PML のほとんどは HIV 関連、非 HIV 関連ともに症状に違いはなく亜急性進行性に経過し、致死的経過をとり、治療により進行が停止したとしても極めて重篤な機能障害を残す予後不良疾患である。HIV 関連 PML では HAART が全例に有効ではなく、また HAART 導入後急速に症状と病巣の拡大がみられることは治療としての免疫改善方法(使用抗レトロウイルス剤の選択方法)の検討のほか、非 HIV 関連 PML は HIV 関連に比べ更に生命予後不良でありその治療法の解明は重要であり、いずれも進行を阻止する新たな療法の開

発が急務である。MRI は鋭敏な検査法であるが非特异的であるし、髄液 JCV の検出は特異性が高いが、早期診断には必ずしも有用でないなど本症を早期に診断するための診断方法の改良も必要である。

#### 4. 評価

##### 1) 達成度について

PML の第二次疫学調査により、HIV 関連および非 HIV 関連 PML 双方の臨床症状の解析と転帰を解析できた。更に PML の治療法の転帰を評価するための基準を作成し、この定義に沿って治療法の有効性をみたところ、HIV 関連では HAART 療法が有効であることが判明した。HAART 療法の有効性は免疫再構築によるものであるが、必ずしもすべての例に有効性があるわけではなく、また高度な後遺症をのこすこと、また非 HIV 関連にいたっては現在進行を阻止する有効な手段はなく、HIV 関連以上に予後不良であることが判明した。今後も早期特異的診断がなく生命・機能的予後不良の本疾患に対し診断法の改良と治療法の開発が必要である。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

HIV 関連、非 HIV 関連とも臨床症状に差が無いこと、免疫を早期に改善させることが現在最も有効な治療手段であることが判明したことは、HIV 感染者が増加傾向にあり、また骨髄移植ほか免疫不全を来す薬剤の頻度が増加するにつれ本症罹患患者の増加が見込まれる現時点での治療指針に貢献すると思われる。

##### 3) 今後の展望について

ヒトでのみ発症する疾患であるため、一例一例の症例検討が必要であり、その解析から、本症の問題点が明らかになる。近年わが国でも増加傾向にあり、解析数が増えるにつれ有効な診断・治療手段が生じるものと思われる。

#### 4) 研究内容の効率性に関して

動物実験が出来ず、発症症例研究を主体とする研究であるため、症例の蓄積とその解析から結論が導かれるが、難治性疾患の解明には重要な研究である。

### 5. 結論

PML の診断に MRI や髄液 JCV 検出は有用な方法であるが、予後不良の本疾患の早期診断には限界がある。HIV 感染者では HAART 療法がある程度有効な治療手段であり、延命が望まれるが、HAART 後免疫再構築症候群を発症し、急速に悪化する例があるなど問題点があり、さらに非 HIV 関連の予後は極めて不良である。

現段階では HIV 感染や細胞性免疫不全のある患者では本症の発症危険性を絶えず持ち、早期発見・診断に努め進行を阻止する可能性のある治療の早期開始が必要である。動物モデルの開発は極めて有益ではあるが、現時点ではヒト症例から情報を得、そこで病態の解明・診断方法の改良・有効な治療法を探すしか方法が無く、そのためには症例の登録システム作りを行うべきと考える。

### 6. 研究発表

#### 1) 国内

口頭発表：4 件

原著論文による発表：0 件

それ以外(レビュー等の発表：3 件

そのうち主なもの

#### 論文発表

1. 岸田修二. 進行性多巣性白質脳症. 概念と疫学. 日本臨床 65(8) : 1487-1494、2007

2. 岸田修二. PML の疫学と臨床. Brain and Nerve 2007 ; 59(2) : 125-137.

#### 学会発表

1. 村松 崇, 関谷紀貴, 相野田祐介, 舟木万季, 柳澤如樹, 菅沼明彦, 今村顕史, 味澤篤, 岸田修二. 当院で経験した HIV 感染症に合併した進行性多巣性白質脳症 5 症例の臨床的検討. 第 21 回日本エイズ学会総会. 広島.2007.11.30.
2. 岸田修二. わが国における PML の疫学と臨床第 10 回日本神経感染症学会シンポジウム. 東京.2005.10.20.

#### 2) 海外

口頭発表：0 件

原著論文による発表：1 件

1. Zheng HY, Ikegaya H, Takasaka T, Matsushima-Ohno T, Sakurai M, Kanazawa I, Kishida S, Nagashima K, Kitamura T, Yogo Y. Characterization of the VP1 loop mutations widespread among JC polyomavirus isolates associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. Biochem Biophys Res Commun 2005 5 ; 333(3) : 996-1002.

#### 7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

1. 特許取得

特なし

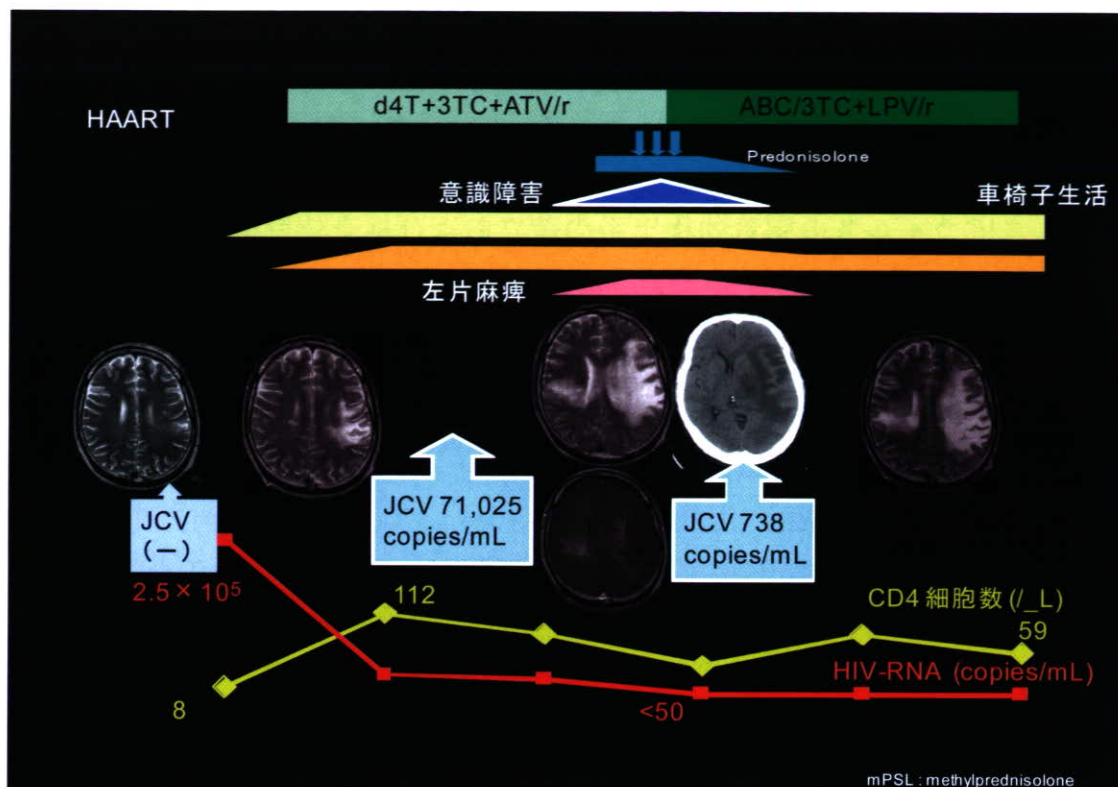
2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし





### 進行性多巣性白質脳症（以下 PML）の病態と治療法の解明

#### 診断・治療・予後に関して

**診断：**脳 MRI は検出感度が高いが非特異的である。造影効果の併用は他の疾患の鑑別と PML 治療後の免疫再構築の診断、予後推定にも有用である。

髄液 JCV は発症早期には検出できないことがあるが、定量は病勢を反映し推移するため経過を追うことは治療効果判定に有用である。

**治療：**今回詳細に調査した HIV 関連 PML では HAART 併用した 11 例中 8 例に延命効果を確認した。現在最も有用な治療法と考える。免疫再構築症候群を併発した場合、重症例ではステロイドパルス療法を試みるべきである。非 HIV 関連 PML に関しても免疫回復が必要と考えられる。

Risperidone が HAART と併用 5 例、非 HIV 関連に 2 例用いられたが現在有益であるとの証拠は無く、Cidofovir、Ara-A、Ara-C、IFN- $\alpha$  に関しても今回の調査では明らかな有効性は証明されなかった。

**予後：**HIV 関連 PML は HAART で免疫再構築を起こすことが症状の進行停止・改善をもたらすが、HAART 開始後急速に悪化を示す傾向がある。

脳 MRI 造影効果が治療で認められる場合、髄液 JCV が減量する場合には延命する傾向が高い。しかし、機能的予後は極めて不良であり、生存者 8 名中 3 名 (38%) にしか自立生活ができていない。

非 HIV 関連 PML は 86% が平均 10 ヶ月以内に死亡しており HIV 関連 PML の 36% に比べ生命予後は不良である。

上記した内容を示す代表例を図に示す。

## 進行性多巣性白質脳症 (PML) の診断・治療を目的とした JCウイルスの定量的検出系の確立および検査体制の整備

分担研究者：倉根一郎 国立感染症研究所ウイルス第一部

### 1. 研究目的

進行性多巣性白質脳症 (Progressive Multifocal Leukoencephalopathy: PML) は、免疫不全患者等の脳においてJCウイルス (JCV) が増殖することで引き起こされる致死的な脱髄疾患である。PMLの診断では、特異性と侵襲性の点から髄液を用いたJCV-DNAのPCR検査が優先される。また、米国ではリアルタイムPCRを用いた髄液検査が導入され始めており、迅速性や定量性において優れた実用性を発揮している。本研究は、リアルタイムPCRを基盤としたJCV検出系を確立し、国内の医療機関におけるPML診断を支援するための検査体制を整備することを目的とする。

### 2. 研究方法

JCVを標的とした約50種類のプライマーセットを合成し、特異性と検出感度を比較した。プライマー候補から2種類を選定し、増幅断片に対する蛍光プローブを用いたTaqMan-リアルタイムPCR系を確立した。また、PMLおよび非PML症例の髄液を用いて検査系の信頼性を確認した。さらに、DNA汚染による偽陽性を排除するため、陽性対照DNAのみを検出するPCR系を確立するとともに、検査室全体を紫外線照射するための装置を配備した。また、検体輸送においては、医療関係者の利便性ならびに万が一の破損や紛失等を考慮し、国連規格の包装容器および冷凍輸送用オーバーパックを医療機関とのシャトル輸送に用いることとした。

(倫理面の配慮)

PMLおよび非PML症例の髄液を用いた検査系のバリデーションは、国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会において承認された上で実施した(平成18年6月21日 受付番号97)。

### 3. 研究結果及び考察

#### 1) PCR検出系の最適化

プライマー候補の中から選定した2種類のプライマーセット(T遺伝子およびVP1遺伝子領域)は高い特異性および感度を有した。また、プライマー/プローブと既報告(374種)の分子クローンとの塩基配列の相同性は約100%であり、ミスプライミングによる検出感度および定量性のエラーを回避できることが分かった。

#### 2) 定性的検査系(第一段階検査)の確立

JCVの遺伝子配列(2種類)および陽性対照のDNA配列(1種類; DNA汚染の可能性を排除するため)を標的としたリアルタイムPCR系を確立した。これら3種類のPCR系は、Nested-PCRと同程度の感度(数コピー/反応)を有した。また、3種類のPCRは同一のプログラムによって約40分間で検出が完了するため、第一段階の定性的検査における高い迅速性と特異性が示された。

#### 3) 定量的検査系(第二段階検査)の確立

第一段階の定性的検査において陽性を示した髄液検体を対象として、含有されるJCV-DNA量を測定するためのリアルタイム

PCR系を確立した。本検出系を用いた定量的検査では、広範囲(10E9から数コピー)のJCV-DNAの測定が可能であることが分かった。また、髄液中のJCV量は、PMLにおける症状の進行およびHAARTの導入等において変動することが示された。

#### 4. 評価

##### 1) 達成度について

本研究では、リアルタイムPCRを基盤としたJCV DNAの定性的および定量的検出系を確立した。また、医療機関におけるPML診断を支援するため、検体輸送を含めたJCVの髄液検査体制を整備した。以上の成果から本研究の目的が達成されたと判断する。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

###### (1) 学術的および国際的意義

近年、髄液中のJCV量はPMLの進行と相関することが明らかとなり、診断や治療における有用な指標として注目されている。事実、米国を含む国外の医療関連機関ではJCV検査においてリアルタイムPCR検出系がすでに導入されている。本研究において確立した定量的検査系は海外における系と同一の基本構成を有するため、国内外においてデータベースの共有が可能となる。その学術的および国際的意義は大きい。

###### (2) 社会的意義

本研究では、JCVの検出系の確立だけでなく医療現場における利便性、および検体輸送時の安全性、検査における汚染対策等を考慮した検査体制を整備した。医師に必要な作業は国連規格のシャトル輸送用容器に依頼書と髄液を入れることのみであり、容器の準備や煩雑な梱包を必要としない。また、リアルタイムPCR検査によって迅速に結果を得ることができる。本検査体制は国内の医療機関への支援する上で、またPMLの発生状況を把握

する上で社会的意義を有する。

##### 3) 今後の展望

本研究によって整備した検査体制を基盤として、医療機関におけるPMLの診断および治療法の評価を支援する。また、検査を通じて国内におけるPMLの発生状況を把握することが可能となるだけでなく、PML医療に必要なデータベース(髄液中のJCVの有無やコピー数、基礎疾患の種類、症状の推移、投薬のスケジュール等)を構築し、臨床に還元する。

##### 4) 研究内容の効率性について

効率的な研究の遂行によって研究目的(国内のJCV検査体制の整備)が達成されたため、平成19年5月より医療機関からのJCV検査依頼を受け付けているによる。また、JCV検査に関するインターネット上のホームページ(HP)を開設し、神経内科を含む様々な診療科の医師が直接依頼できる環境を整えた。平成19年11月までの7ヶ月間において56件(HP経由は20件)の依頼を受け検査を実施した。うち9検体からJCV-DNAを検出し、陽性と判断した。

#### 5. 結論

リアルタイムPCRを基盤として髄液を用いたJCV DNAの検査系を確立した。また、国内の医療機関におけるPML医療を支援するための検査体制を整備した。

#### 6. 研究発表

##### 1) 国内

口頭発表：0件

原著論文による発表：0件

それ以外(レビュー等の発表)：0件

##### 論文発表

特になし

##### 学会発表

特になし

2) 海外

論文発表

特になし

学会発表

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし該当なし

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

1. 特許取得

特になし