

年を除き株が変化した時に麻疹が大流行した。1990年の沖縄県ではD5株が新たに流入し、麻疹が大流行した。1990～91年は約20の都道府県で麻疹が大流行したが、4例以上のSSPE患児が麻疹に罹患したのは沖縄県と福岡県のみであった。また麻疹が大流行した年でも、1990年の麻疹では10例がSSPEを発症したにもかかわらず、1993年は1例のみであった。新たな麻疹株の流行がSSPE発症の危険因子になる可能性があるが、それ以外の危険因子の関与がなければ沖縄県の多発を説明する事ができない。さらに危険因子の調査が必要である。

E. 結 論

麻疹の流行以外にSSPE発症の危険因子が存在すると考えた。

[参考文献]

- 1) 中村好一, ほか. 臨床調査個人票からみた亜急性硬化性全脳炎の疫学像. 脳と発達 35 : 316-320, 2003
- 2) 平安京美, ほか. 沖縄県における亜急性硬化性全脳炎の発生状況. 脳と発達 36 :

21-25, 2004

- 3) Nakayama T, et al. Molecular epidemiology of measles virus in Japan. *Pediatr Int* 46 : 214-223, 2004

G. 研究発表(2010/4/1～2011/3/31 発表)

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

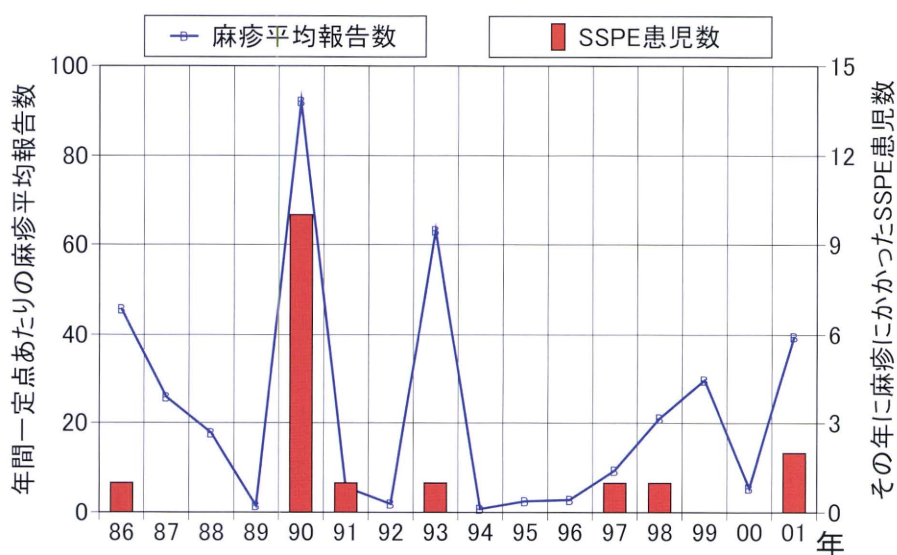


図1 沖縄県での麻疹流行とその年に麻疹に罹患したSSPE患児数

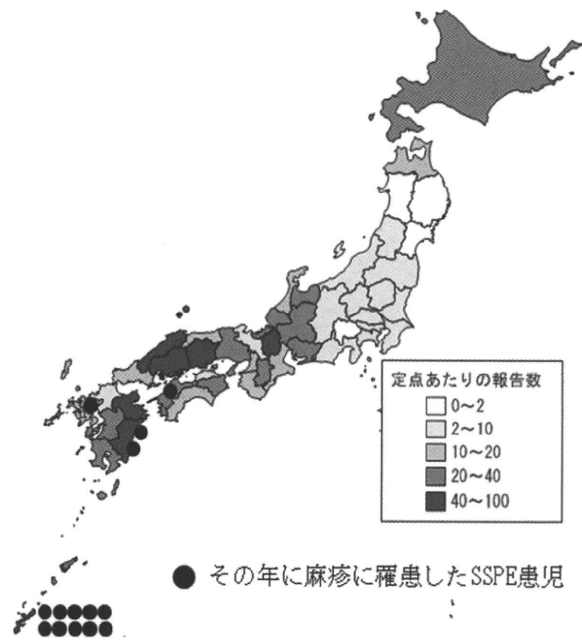


図2 1990年の麻疹流行とその年に麻疹に罹患したSSPE患児数

JC ウイルスはヒトに脳腫瘍を発生させるのか？

研究協力者：宍戸-原 由紀子 杏林大学医学部病理学教室

研究要旨

進行性多巣脳症はヒトポリオーマウイルス JC (JC ウイルス)感染で起きる脱髄疾患である。JC ウイルスは環状二本鎖の DNA ゲノムをもち、DNA 腫瘍ウイルスの代表、simian virus 40 (SV40) と約 70% のホモロジーを有している。JC ウイルスを実験動物に接種すると、高率に小脳髄芽腫などの腫瘍を発生させた。1990 年代から 2000 年代、神経膠腫、膠芽腫、髄芽腫、上衣腫などのヒト脳組織の他、大腸癌や肺癌からも、JC ウイルスが相次いで検出された。しかし、WHO (2007) は、乏突起膠腫、乏突起膠星細胞腫、髄芽腫や悪性リンパ腫(PCNSL)の項目でポリオーマウイルス感染の関与に触れてはいるが、真偽はわからないと明記している。1950 年代から 1960 年代、SV40 に汚染されたポリオウイルスワクチンが接種されたことは世界的に有名で、幼児期にワクチン接種された世代が現在がん年齢域に達していることから、結論には慎重を要すると考える。

A. 研究目的

JC ウイルスの潜伏・持続感染の場所と、脳腫瘍との関係を検索する。

B. 研究方法

ヒト脳組織において、JC ウイルス蛋白と、ウイルス感染の標的となる細胞核内構造 PML ボディの主要因子、PML 蛋白の発現を免疫組織化学的に検討する。

(倫理面への配慮)

組織提供者に不利益はきたさず、倫理面に問題はない。

C. 研究結果

脳腫瘍 21 例全例で、PML 蛋白の発現は低下し、3 例で JC ウイルスのカプシド蛋白が検出された。

D. 考 察

JC ウイルスは、腎に潜伏・持続感染し、

免疫不全状態で骨髄やリンパ球などで遺伝子変異をきたして、脳に移行して脱髄脳症をきたすと考えられている。一方、正常脳組織からも JC ウイルスが検出され、脳も JC ウイルスの持続・潜伏感染の場所ではないかと議論されてきた。

一方、JC ウイルスは高率に実験動物に脳腫瘍の発症を誘導する。既に、ヒト脳腫瘍組織からも JC ウイルスを検出したとの報告は多数あるが、JC ウイルスは脳腫瘍発症を誘導するか否かの結論はまだ得られていない。ヒト脳腫瘍組織における JC ウイルスの検出が、何れもウイルスゲノム DNA や腫瘍抗原(T 抗原)を検索したものであった。そこで今回、JC ウイルスの溶解感染が低レベルでの脳腫瘍組織で起きている可能性も考え、ウイルス粒子の構成成分であるカプシド蛋白の発現を調べて見た。結果、21 例中 3 例の症例で腫瘍細胞の核に VP1 蛋白の陽性所見が得られた。

進行性多巣性白質脳症は、最も効率のよい

溶解感染が脳の oligodendroglia で起きた病態である。脱髄脳症を起こさなくとも、低レベルで JC ウイルスがヒト脳組織に存在する可能性が考えられる。

E. 結 論

本研究の結果は、JC ウイルスが進行性多巣性白質脳症をきたしていないヒト脳組織にも存在している可能性を示唆している。脳腫瘍組織にも JC ウイルスが低レベルで溶解感染している可能性があるが、この結論は JC ウイルスが脳腫瘍発症を誘導する可能性を否定するものではない。

JC ウイルスには、promoter-enhancer 活性の低い archetype (青)と、活性の上昇した neurotropic type (赤)が存在する。かつて、人口に蔓延しているのは病原性の低い archetype で、これが免疫不全状態の宿主で遺伝子変異をおこして neurotropic typen になり、脱髄脳症をおこすと考えられた (archetype 仮説)。その後、AIDS 患者や健康人の組織からウイルスの検索が行われたが、正常脳組織からも neurotropic type が検出され議論となった。正常脳組織にも、JC ウイルスが潜伏・持続感染している可能性があるが、結論はまだ見ていない。

[参考文献]

- 1) White, et al. JC virus DNA is present in many human brain samples from patients without progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Virol* 66 : 5726-5734, 1992
- 2) Elsner, et al. Evidence of human polyomavirus BK and JC infection in normal brain tissue. *Virology* 191 : 72-80, 1992
- 3) Perez-Liz, et al. Detection of JC virus DNA fragment but not proteins in normal brain tissue. *Ann Neurol* 64 :

379-387, 2008

- 4) Delbue, et al. Presence and expression of JCV early gene large T antigen in the brains of immunocompromised and immunocompetent individuals. *J Med Virol* 80 : 2147-2152, 2008

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (2010/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Shishido-Hara, Y. Progressive multifocal leukoencephalopathy and promyelocytic leukemia nuclear bodies : a review of clinical, neuropathological, and virological aspects of JC virus-induced a demyelinating disease. *Acta Neuropathol* 120(3) : 403-17, 2010

2. 学会発表

- 1) 宍戸-原 由紀子. 進行性多巣性白質脳症の核内ウイルス封入体. 第 99 回に本病理学会総会 ワークショップ「神経疾患と封入体」, 東京, 2010.4

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

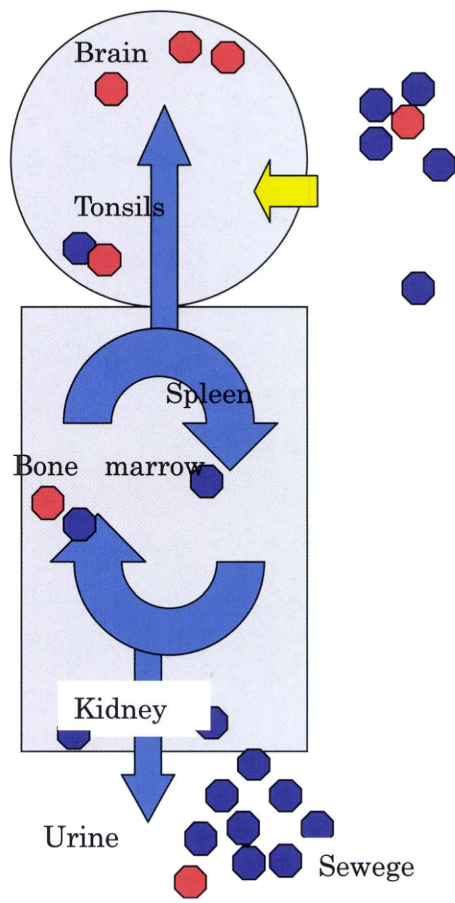


図1 ヒト組織からのJCウイルスの検出

JC ウイルス関連蛋白のメチル化遺伝子結合蛋白 MeCP2 による転写制御の解析

研究協力者：長嶋 和郎 札幌東徳州会病院・病理部
研究協力者：高橋 健太 北海道大学大学院医学研究科腫瘍病理学分野
研究協力者：王 磊 北海道大学大学院医学研究科腫瘍病理学分野
研究協力者：木村 太一 北海道大学大学院医学研究科腫瘍病理学分野
研究協力者：工藤 伸一 北海道立研究所・疫学部ウイルス科
研究協力者：奴久妻聡一 神戸市環境保健研究所微生物部
研究協力者：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
研究協力者：田中 伸哉 北海道大学大学院医学研究科腫瘍病理学分野

研究要旨

進行性多巣性白質脳症 (progressive multifocal leukoencephalopathy : PML) の原因ウイルスである JC ウイルス (JCV) は、持続感染している JCV の調節領域に再編成が生じ、脳への感染性が成立すると考えられている。一方 methyl CpG binding protein 2 (MeCP2) は DNA メチル化遺伝子プロモーター領域の転写を制御する分子で、神経細胞の機能や個体の発生に必須である。近年、MeCP2 遺伝子異常が、女兒の発達異常や異常行動を呈する疾患として知られる Rett 症候群の原因であることが報告された。PML 脳では種々の遺伝子がメチル化状態であることが想定され、これに基づいて免疫染色を行ったところ、PML 脳における JCV 感染細胞に高頻度で MeCP2 が過剰発現していることが判明した。次に JCV T-antigen と MeCP2 の発現亢進の関与について検討した結果、二つの蛋白に直接結合は見られなかった。そこで本年度の研究では MeCP2 による JCV 関連蛋白の転写制御について解析を行った。その結果、JC 関連 early および late 蛋白のプロモーターはいずれも MeCP2 の発現により活性が亢進することが判明した。この所見から JCV の活性化に MeCP2 の発現が関与していることが示唆された。

A. 研究目的

JCV は PML の原因ウイルスであるが、ヒト脳への親和性や脳での増殖機構に未だ不明な点が多い。我々は、JCV 感染細胞ではメチル化関連遺伝子 MeCP2 が高発現していることを示した。今回、この発現機序を解明するため MeCP2 蛋白による JCV のプロモータの活性化の状況を検討した。

MeCP2、luciferase を指標とした JCV 関連蛋白プロモーター領域および JCV 初期蛋白である JCT 抗原それぞれの遺伝子発現ベクター pEGFP-MeCP2、pGL3-Mad1-Early/Late および pCXN2-Flag-JCT を transfection させた。続いて luciferase reporter 法にて pGL3-Mad1-Early/Late の luciferase 活性を測定した。

B. 研究方法

MeCP2 による JCV 関連蛋白の転写制御解析：ヒト神経芽細胞腫細胞株 IMR-32 に

(倫理面への配慮)

本実験で使用している JCV は P2 対応のウイルスであり、本研究は北海道大学大学院医

学研究科腫瘍病理学分野の P2 指定実験室にて安全性に留意して行われた。

C. 研究結果

IMR-32 細胞株においては、JC 関連 early および late 蛋白のプロモーターいずれも活性を認めた。JCT 抗原存在下では early および late 蛋白のプロモーター活性は増強されるが、MeCP2 の発現により活性は亢進した (図 1)。

D. 考察

JCV 感染細胞においては MeCP2 が過剰発現しているが、今回の実験で JCT 抗原存在下では MeCP2 の発現により JC early および late 蛋白いずれもプロモーター活性の亢進が認められ、MeCP2 の発現が JCV の持続感染に直接関与する可能性が考えられた。今回の実験では JC 関連蛋白による MeCP2 の発現制御については未解析であり、また MeCP2 が細胞内で代謝されずに蓄積する可能性も考えられる。今後は JC 関連蛋白による MeCP2 の転写制御について、種々の細胞株も用いて検討を進める予定である。

E. 結論

JCV 感染と MeCP2 の関連に関して JCV の promoter assay を行ったところ、JCT 抗原存在下では MeCP2 は JCV の early および late 蛋白の両方のプロモーターを活性化することが判明した。この結果、MeCP2 は JCV の感染と増殖に重要な働きを示していることが示唆された。

[参考文献]

- 1) Shirai S, Takahashi K, Kohsaka S, Tsukamoto T, Isogai H, Kudo S, Sawa H, Nagashima K, Tanaka S. High expression of MeCP2 in JC virus-infected cells of progressive multifocal leukoencephalopathy brains. *Neuropathology*, 2010.5.19, Epub ahead

of print.

- 2) 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
- 3) Kudo S. Methyl-CpG-binding protein MeCP2 represses Sp1-activated transcription of the human leukosialin gene when the promoter is methylated. *Mol Cell Biol* 18 : 5492-5499, 1998

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (2010/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Shirai S, Takahashi K, Kohsaka S, Tsukamoto T, Isogai H, Kudo S, Sawa H, Nagashima K, Tanaka S. High expression of MeCP2 in JC virus-infected cells of progressive multifocal leukoencephalopathy brains. *Neuropathology*. 2010.5.19, Epub ahead of print.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

同一のメフロキン投与スケジュールで治療した進行性多巣性白質脳症(PML)の検討 (2010年における西日本症例を中心に)

研究協力者：雪竹 基弘 佐賀大学医学部附属病院神経内科
研究協力者：米持 康寛 熊本大学神経内科
研究協力者：本田 省二 熊本大学神経内科
研究協力者：内野 誠 熊本大学神経内科
研究協力者：宮本 亮介 徳島大学病院神経内科
研究協力者：松井 尚子 徳島大学病院神経内科
研究協力者：梶 龍兒 徳島大学病院神経内科
研究協力者：上野 弘貴 広島大学大学院脳神経内科学(内科学第三)
研究協力者：松本 昌泰 広島大学大学院脳神経内科学(内科学第三)
研究分担者：岸田 修二 東京都立駒込病院脳神経内科

研究要旨

2010年、同一のメフロキン投与スケジュールで治療を行った PML 症例を中心に検討し、その有用性を示した。

生物学的製剤に関連した PML への対応やメフロキン投与を組み込んだ PML 診療ガイドラインの改訂に取り組んでいる。

A. 研究目的

Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) は稀な疾患ではあるものの、HIV 感染者の増加、適応拡大に伴う免疫抑制剤などの汎用が行われている事や、近年の Rituximab、Natalizumab Alemtuzumab や Efalizumab といった生物学的製剤投与との関連など日常診療においても留意すべき疾患となってきた。特に生物学的製剤との関連は Monoclonal antibody-associated PML 等の名称で論じられ始めている。

また、治療においてはマラリアの予防および治療に用いられるメフロキン(Mefloquine)に抗 JC ウイルス作用があることが In vitro の JC ウイルス感染の実験系において 2009 年に発表され¹⁾、2010 年に使用経験の論文報告も出た^{2,3)}。

本研究では、PML の現在の診断・治療を把握し、より効率の良い治療法の検討/新規治療法への可能性を模索するため、この 1 年間に発表された PML の診療に関する症例報告・論文をレビューした。本年はメフロキン治療に関して同一の投与スケジュールに従い治療した PML を検討し、その有効性、問題点などを論じた。

B. 研究方法

メフロキン投与スケジュール(図 研究分担者:岸田修二先生より提供)に従って治療した 3 症例を比較検討し、メフロキンの効果検討とともに今後の問題点などを抽出した。

(倫理面への配慮)

症例は匿名化され、個人を特定できない状

態で臨床情報を提出していただいた。

C. 研究結果

症例 1(熊本症例)。38 歳男性。非 HIV-PML(サルコイドーシス)。複視や構音障害などで発症。頭部 MRI でテント上およびテント下病変。髄液 PCR にて JC ウイルス検出。メフロキン投与後、一時全身痙攣・無呼吸まで進んだ状態が随意運動出現まで改善。

症例 2(徳島症例)。52 歳男性。非 HIV-PML(多発性骨髄腫)。喚語困難や左右失認などを認めた。頭部 MRI で多巣性のテント上病変。髄液 PCR にて JC ウイルス検出。ミルタザピン、シタラビンおよびメフロキンで治療。画像進行の停止、臨床症状の改善。

症例 3(広島症例)。55 歳男性。HIV-PML。半側空間無視や観念失行などを呈した。頭部 MRI で右後頭葉病変。髄液 PCR にて JC ウイルスを検出。HAART に加えメフロキンで治療。臨床症状の改善(無動無言→発語出現、左完全麻痺→不全麻痺)。

D. 考察

メフロキンの抗 JC ウイルス作用は 2009 年以降、PML 治療における大きなニュースである。PML の平均生存期間は HIV-PML で中央生存期間 1.8 年、非 HIV-PML で 3 ヶ月とされており⁴⁾、PML 治療におけるメフロキンへの期待は大きい。特に非 HIV-PML では上記のごとく予後不良例が多く、また原疾患治療の中断が原疾患死を引き起こすこともあり、PML に対するメフロキン治療は選択肢として重要と考えられる。

今回提示した 3 症例ともメフロキンの効果はあったと判断されている。また、複数回の髄液 PCR での JC ウイルス量が追えており、臨床的意義も大きい。メフロキンは JC ウイルスが細胞内で増殖するのを阻害することされている。非 HIV-PML では原因薬剤中止は原疾患増悪を招く可能性があり、メフロキン

は有用な治療薬であると考ええる。また、HAART により予後の改善がみられている HIV-PML においてもウイルス増殖を抑えることは免疫再構築症候群を軽減させることで治療効果の上乗せになる可能性がある。

問題点としてはメフロキン投与までの期間短縮、メフロキン投与スケジュールなどの情報や検査態勢などを神経内科医に周知していく体制などがあげられる。また、メフロキン不応例の解析なども今後の課題である。

E. 結論

2010 年、同一のメフロキン投与スケジュールで治療を行った PML 症例を中心に検討し、その有用性を示した。

メフロキンの抗 JC ウイルス作用は今後の PML 診療における新しい方向性を示す知見であり、メフロキン投与を組み込んだ PML 診療ガイドラインの改訂に取り組んでいる。

[参考文献]

- 1) Brickelmaier M, Lugovskoy A, Kartikeyan R, Reviriego-Mendoza MM, Allaire N, et al. Identification and characterization of mefloquine efficacy against JC virus in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 53 : 1840-1849, 2009
- 2) Kishida S, Tanaka K. Mefloquine treatment in a patient suffering from progressive multifocal leukoencephalopathy after umbilical cord blood transplant. *Intern Med* 49 : 2509-2513, 2010
- 3) Schröder A, Lee DH, Hellwig K, Lukas C, Linker RA, Gold R. Successful management of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy and immune reconstitution syndrome in a patient with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 67 : 1391-1394, 2010
- 4) Tan CS, Koralknik IJ. Progressive

multifocal leukoencephalopathy and other disorders caused by JC virus : clinical features and pathogenesis. Lancet Neurol 9 : 425-437, 2010

Gerstmann-Sträussler-Scheinker 症候群(GSS)の3症例の検討. 第191回日本神経学会九州地方会, 佐賀, 2010.9.11

F. 健康危険情報

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

G. 研究発表(2010/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

なし

2. 実用新案登録

なし

2. 学会発表

3. その他

なし

1) 岡 孝之, 雪竹基弘ら, 当院で経験した

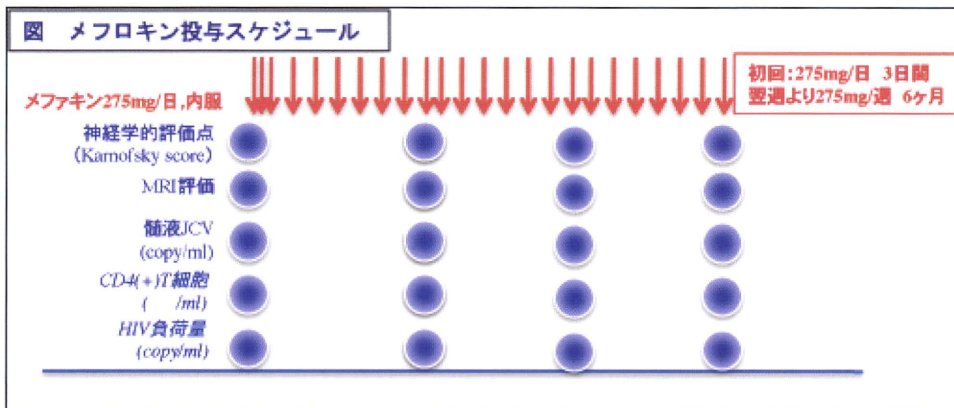


表. メフロキン投与スケジュールで治療したPML3例

	38歳男性 (熊本症例)	52歳男性 (徳島症例)	55歳男性 (広島症例)
基礎疾患	サルコイドーシス (ステロイド内服なし)	多発性骨髄腫 (ステロイド2.5ミリ内服)	AIDS(HIV-PML)
治療前の状態	舌根沈下.無呼吸 強直性けいれん.	喚語困難. 左右失認など.	無言無動 左完全片麻痺
治療後の状態	随意運動出現. 発語出現	外来での経過観察 見当識・記憶力の改善	発語出現 左不全片麻痺
頭部MRI	病変拡大,のちに縮小	病巣拡大の停止	病巣拡大の停止~やや縮小
効果判定	改善	改善	改善
診断から治療まで	約3週間	約2ヶ月	約3ヶ月 (HAART優先)

HIV-1 Tat の PML 型 JCV 増殖促進機構の解明と宿主細胞に及ぼす影響

研究協力者：奴久妻聡一 神戸市環境保健研究所微生物部
研究協力者：亀岡 正典 大阪大学微生物病研究所日本・タイ感染症共同研究センター
研究協力者：杉浦 重樹 奈良県立医科大学組換えDNA実験施設
研究協力者：中道 一生 国立感染症研究所ウイルス第一部第三室
研究協力者：奴久妻智代子 神戸市環境保健研究所微生物部
研究協力者：三好 勇夫 高知大学医学部内科
研究協力者：竹上 勉 金沢医科大学総合医学研究所分子腫瘍学研究部門

研究要旨

進行性多巣性白質脳症 (PML) はエイズの流行に伴い増加しており、その発生率は他の免疫低下を引き起こす疾患よりも高いことがわかっている。本研究では Tat を発現する COS-tat 細胞を用いて、PML 型 JC ウイルス (PML 型 JCV) の増殖促進することを明らかにした。さらに、Tat の宿主細胞の増殖への影響を MTT 法により調べたところ、COS-tat 細胞 3 クローンが親細胞である COS-7 細胞より細胞増殖が低下しており、Tat の発現が高いクローンほどその傾向が顕著であった。さらに、JCV の複製を促進する細胞因子である Purine-Rich Element Binding Protein α (Pura) の発現を定量したところ、Pura の発現を促進する Tat には至適濃度がある可能性が考えられた。これらのことから、JCV の増殖は Tat、Pura および SV40 T 抗原の複雑な相互作用で促進されていることが示唆された。

A. 研究目的

ヒトの中樞神経の脱髄疾患である進行性多巣性白質脳症 (PML) は免疫不全等の基礎疾患の上に発症するが、亜急性に症状が進行し 1 年以内に死に至る致死的な疾患で有効な治療薬がない。近年、エイズ流行に伴い PML 患者数は増加しているが、その原因のひとつとして HIV-1 の調節タンパクである Tat がグリア細胞で JCV の後期プロモーターを活性化することが報告されている。一方、我々は腎臓で持続感染している非病原性の Archetype JCV の増殖が HIV-1 Tat で促進されることを明らかにしたが、PML を引き起こすのは病原性の PML 型 JCV である。本研究では Tat の PML 型 JCV の増殖促進と

宿主細胞に及ぼす影響を調べた。

B. 研究方法

1) HIV-1 Tat の PML 型 JCV 増殖促進の解析
HIV-1 Tat が PML 型 JCV を増殖促進するかどうか調べるために、Tat 高発現細胞 3 クローン (COS-tat7、15、22 細胞) に PML 型 JCV (Mad-1/ CR-JCI) をトランスフェクションし、30、43 および 50 日後にヒト O 型赤血球を用いた HA 価の測定、JC-VP1 (TaqMan probe)、JC-VP-F/R (primers) を用いた real-time PCR にて JCV DNA を定量 および抗 JCV/BKV モノクローナル抗体 (CLA 375) を用いた免疫染色を行った。さらに、COS-tat 細胞で増殖した JCV の調節領

域に再編成が生じているか調べるためにシーケンスを行った。

2) HIV-1 Tatの宿主細胞に及ぼす影響

HIV-1 Tat は宿主細胞の遺伝子発現に影響を及ぼすことから PML 型 JCV 増殖促進実験で用いた COS-tat 細胞 3 クローンと親細胞である COS-7 細胞の増殖を Cell Proliferation Kit I (MTT 法) で比較した。

また、Tat の発現と JCV の複製を促進する細胞因子である Purine-Rich Element Binding Protein α (Pura) の発現との相関を調べるために、Tat の発現量が異なるクローンを樹立した。Tat 発現細胞は HIV-1 Tat の発現ベクターである pcDNA-tat86 を COS-7 細胞にトランスフェクション後、Zeocin 耐性クローンを選択した。Tat の発現は real-time RT-PCR にて定量した。Pura の発現は Pura-probe (TaqMan probe)、Pura-F,R (primers) を用いた real-time PCR にて定量した。

(倫理面への配慮)

本研究は臨床検体や実験動物を使用していないことから倫理面の問題がないと判断した。また、本実験で使用している JCV は P2 対応のウイルスであり、本研究は神戸市環境保健研究所の P2 指定実験室にて安全性に留意して行われた。

C. 研究結果

1) HIV-1 TatのPML型JCV増殖促進

HIV-1 Tat を高発現する 3 クローン (COS-tat7、15、22) における PML 型 JCV の増殖促進を HA 価測定と real-time PCR で調べたところ、30 日後で COS-tat22 細胞が一番高値だったが、培養が長期間に及ぶ 43、50 日後では逆に低下し、50 日後には親細胞である COS-7 細胞と同程度になった。一方、COS-tat7 細胞は 43 日後で、COS-tat15 細胞は 50 日後で最高値を示した。また、抗

JCV/BKV モノクローナル抗体で免疫染色したところ、HA 陽性の COS-tat 細胞の腫大した核内にウイルス抗原が検出された。COS-7 細胞、COS-tat 細胞で増殖したウイルスの調節領域も元の構造と同一であった。

2) HIV-1 Tatの宿主細胞に及ぼす影響

MTT 法による測定では COS-tat 細胞 3 クローンが親細胞である COS-7 細胞に比べて、有意に細胞増殖が低下していた。また、COS-tat 細胞 3 クローンの中では COS-tat22 細胞が一番増殖が低下しており、Tat の発現が高いクローンほど細胞増殖が低下していることが明らかになった。

一方、Tat と Pura の発現との相関を調べるために、樹立した COS-tat 細胞から real-time RT-PCR により Tat の発現量が異なるクローン 3 クローン (COS-tat33、42、45) を選択した。Pura の遺伝子発現については、Tat が中程度発現する COS-tat42 細胞 (約 7,000 コピー) では親細胞である COS-7 細胞に比べて Pura の発現は約 2 倍促進されたが、高発現する COS-tat33 (約 35,000 コピー) になると逆に抑制され、COS-7 細胞と同程度であった。このことから Pura の発現を促進する Tat には至適濃度がある可能性が考えられた。

D. 考 察

JCV は PML の原因ウイルスであり、近年のエイズ流行に伴い PML の患者数が増加している。エイズ患者で他の免疫低下を引き起こす疾患より PML の発症頻度が高い原因としては、HIV-1 の調節タンパクである Tat がグリア細胞で JCV の後期プロモーターを活性化することが過去に報告されている。PML の発症において、JCV の調節領域が先祖型から PML 型に遺伝子再編成することが明らかになっており、PML 型 JCV がヒトの脳組織のオリゴデンドロサイトを感染破壊することで脱髄を引き起こす。一方、我々は腎臓で持

続感染している非病原性の Archetype JCV の増殖が HIV-1 Tat で促進されることを明らかにしたが、PML を引き起こすのは病原性の PML 型 JCV である。本研究からエイズ患者での PML が他の免疫低下を引き起こす疾患よりも発生率が高いのはエイズウイルスの Tat が PML 型 JCV の増殖を促進することが一つの原因でことをウイルス増殖レベルで初めて明らかにした。さらに、Tat の宿主細胞の増殖への影響を MTT 法により調べたところ、COS-tat 細胞 3 クローンが親細胞である COS-7 細胞より細胞増殖が低下しており、Tat の発現が高いクローンほどその傾向が顕著であった。また、JCV の複製を促進する細胞因子である Pura の発現を定量したところ、Pura の発現を促進する Tat には至適濃度がある可能性が考えられた。これらのことから、Tat の発現が高い COS-tat 細胞ほど細胞増殖が低下する原因の一つとして、Tat の発現が高まることで Pura の発現に影響を及ぼすためと考えられた。また、COS-tat 細胞を用いた PML 型 JCV の増殖実験において、培養が長期間に及ぶとウイルス増殖が Tat 発現量に必ずしも依存しなくなるのは、Tat、Pura および SV40 T 抗原の複雑な相互作用によると考えられた。

E. 結 論

本研究では PML 型 JCV の増殖促進することを明らかにした。また、Tat の発現が高いクローンほど細胞増殖が低下していた。さらに、細胞因子である Pura の発現を定量したところ、Pura の発現を促進する Tat には至適濃度がある可能性が考えられた。JCV の増殖は Tat、Pura および SV40 T 抗原の複雑な相互作用で促進されていることが示唆された。

[参考文献]

- 1) 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

- 2) Chang CF, Gallia GL, Muralidharan V, Chen NN, Zoltick P, Johnson E, Khalili K. Evidence that replication of human neurotropic JC virus DNA in glial cells is regulated by sequence-specific single-stranded DNA-binding protein Pura. J Virol 70 : 4150-4156, 1996

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表(2010/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Nukuzuma S, Nakamichi K, Kameoka M, Sugiura S, Nukuzuma C, Miyoshi I, Takegami T. Efficient propagation of progress multifocal leukoencephalopathy-type JC virus in COS-7-derived cell lines stably expressing Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. Microbiol Immunol 54 : 758-762, 2010

2. 学会発表

- 1) 奴久妻聡一, 中道一生, 亀岡正典, 杉浦重樹, 奴久妻智代子, 三好勇夫, 竹上 勉 : HIV-1 PML 型 JCV の増殖を促進する. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 2010.11.8

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

プリオン病における MRI-autopsy images と剖検対比の試み ープリオン病における剖検の重要性、推進のためにー

- 研究分担者：高尾 昌樹 地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター神経病理学研究
(高齢者ブレインバンク)
財団法人脳血管研究所美原記念病院神経内科
インディアナ大学医学部神経病理学
- 研究協力者：Bernardino Ghetti インディアナ大学医学部神経病理学
- 研究協力者：美原 盤 財団法人脳血管研究所美原記念病院神経内科
- 研究協力者：吉田 洋二 財団法人脳血管研究所美原記念病院神経難病・認知症部門
- 研究協力者：初田 裕幸 地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター神経病理学研究
(高齢者ブレインバンク)
- 研究協力者：舟辺さやか 地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター神経病理学研究
(高齢者ブレインバンク)
- 研究協力者：杉山美紀子 地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター神経病理学研究
(高齢者ブレインバンク)
- 研究協力者：伊東 慎治 地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター神経病理学研究
(高齢者ブレインバンク)
- 研究分担者：村山 繁雄 地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター神経病理学研究
(高齢者ブレインバンク)

研究要旨

プリオン病症例は入院受け入れや剖検が拒否されることがあるが、現在の確定診断方法が剖検を必要としていることも含め、臨床・研究面さらに公衆衛生学的見地からも剖検自体の重要性はゆるぎない。プリオン病の研究をすすめ、さらにブレインバンクとして貢献をするために地域病院で行ってきたプリオン病に対する対策を紹介し、特に剖検時に施行している剖検前 3T MRI による Autopsy images と病理所見の対比を紹介する。

当院では入院中に定期的に MRI を施行し、さらに剖検前(死亡後)に Autopsy images の応用として全例 3T-MRI を施行してきた(死亡後 1 時間以内、剖検は 3 時間以内)。この画像を用いて、CJD の診断に重要な拡散強調画像(DWI)で高信号を呈する皮質病変が病理学的にどのような変化を来しているのかを検討した。Ai 画像(T1, T2, FLAIR, DWI)と完全に対比させた病理標本を作製し、通常染色に加え、免疫染色として特に PrP(3F4), GFAP, CD68 を施行した。半定量的に神経細胞脱落、グリオシス、海綿状変性、PrP(3F4)陽性沈着、CD68 陽性細胞浸潤のレベルを 0=なし, 1=軽度, 2=中等度, 3=重度結果として、拡散強調画像で正常の部位(側頭葉)と比較検討した。DWI 高信号部位では ADC は正常部位に比し低下していることを確認した。組織学的には、グリオシス、PrP 沈着、CD68 陽性細胞浸潤に関しては両者での有意差はなかったが、DWI 高

信号部位での神経細胞脱落が平均スコア 2.33(正常部位 2.98, $P<0.05$)、海綿状変性が 1.33(正常部位 2.58, $P<0.05$)といずれも軽度の変化にとどまった。従来の報告では DWI で高信号を生じる原因は、強い海綿状変性やグリオシスとされている。本結果は既報告を追従するものではなかったが、一般に臨床経過とともに DWI 高信号病変が消失することもふまえ、今後症例数を増やすことで、プリオン病にみられる MRI 変化を解明し診断の糸口になる可能性があると考えられた。

A. 研究目的

弧発性クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)に代表されるプリオン病症例は、難治性疾患であること、感染性に対する誤解や認識不足から、日常臨床の場においては、剖検拒否だけでなく、入院受け入れの拒否もされることが多い。しかし、現在の医学における確定診断方法が剖検を前提としていること、さらに将来的な臨床・研究面さらには、本邦における公衆衛生的見地からも症例の正確な実態把握と、それに必要な剖検自体の重要性は揺るぎないものと考えられる。

美原記念病院では、群馬県でも数少ないプリオン病の長期受け入れ、および剖検体制を確立してきた。今回日本神経科学ブレインバンクネットワークに属するブレインバンクとして貢献をするために地域病院で行ってきたプリオン病に対する対策の一貫として、剖検時に施行している 3T MRI による Autopsy images(Ai)と病理所見の対比を報告する。

CJD における、MRI 拡散強調画像(DWI)の大脳皮質や基底核高信号病変は、診断にとって重要である。DWI 高信号(ADC 低下)を反映する要因として、水分子によるブラウン運動の制限があるが、CJD における原因は特定されていない。過去の報告でも、MRI 撮像と剖検までの間に数週間以上の時間があるため、その期間における病理変化を、画像所見と対応することが困難である。

本研究の目的は、死亡後剖検時に行う頭部 MRI(AIs-MRI)(通常死後 30 分以内)において、DWI で高信号を呈する部分と病理所見を比較検討し、CJD における DWI 高信号病変

の背景にある、病理学的変化を検討した。

B. 研究方法

当院でブレインバンクシ、及び Ai を施行するようになった 2007 年以降、7 例の臨床診断 CJD の剖検があった(1 例は CJD ではなかった)。MRI(GE Medical Systems Signa EXCITE 3.0T)は、日常臨床と同様の機器、撮像シーケンスで施行した(表)。

	Pulse Sequence	TR	TE	Slice thickness	Matrix	NEX	
DWI	EPI	6000	79.6	5mm	128x256	1	b=1500
T1	FSE	2570	16	5mm	288x224	2	
T2	FSE	4800	92	5mm	512x256	1	
FLAIR	FSE	11002	140 (T12400)	5mm	288x224	1	
T2*	FSE	500	10	5mm	320x192	1	

DWI 画像で高信号を呈した部位に対応した標本をサンプリングし、組織学的に検討した。免疫染色には Discovery®XT system (Ventana)を使用。組織学的評価は半定量的スコアを設定し、神経細胞脱落、グリオシス(GFAP)、海綿状変性、マクローファージ(CD68 陽性細胞)、PrP^{Sc}(3F4 陽性)に関し 20 倍対物レンズ 3 視野で、0(なし)、1(軽度)、2(中等度)、3(高度)と評価した。DWI で高信号を呈さない側頭葉と比較した。本研究は、美原記念病院倫理委員会で承認された。

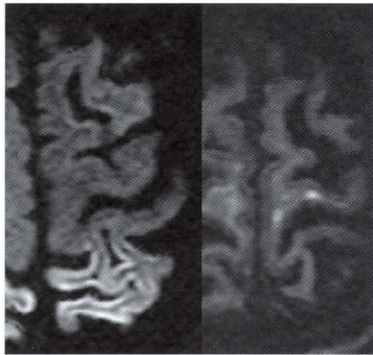
C. 研究結果

MRI-AIs を施行した 6 例中 4 例が DWI 皮質高信号を呈した。以下に臨床背景を示す。

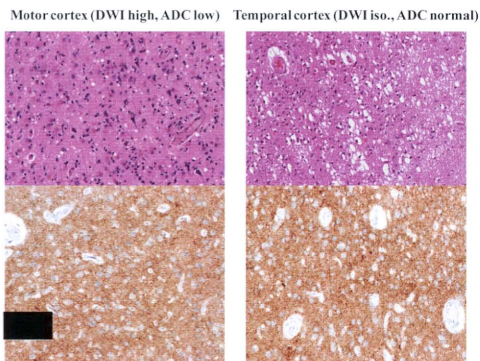
AiDWI 皮質高信号部位の ADC は、高信号を呈さなかった部位(側頭葉)に比し低下していた。MRI 画像の 1 例を以下に示す。発症後

12ヶ月(左)のMRIでは、広範な皮質高信号を認め、Ai-MRIでは高信号病変が限られる。

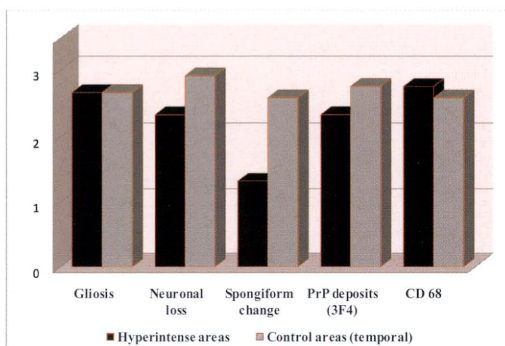
	Sex	AAO	AOD	Duration (months)	PRNP codon 129	PrP ^{sc} type	HI - DWI - AIs
Case 1	F	74	76	30	MM	1+2	Motor (sensory)
Case 2	F	80	81	8	MM	1	Motor
Case 3	F	65	68	42	MM	1	Cingulate
Case 4	F	63	65	34	MM	1	Cingulate



組織学的所見の例を以下に示した。DWIで高信号を呈していた部位では、皮質の神経細胞脱落、空胞変化が軽いことがわかる。



4例をまとめると、グリオシス、PrP沈着、CD68細胞浸潤に関して有意差はなかったが、DWI高信号部位での神経細胞脱落が平均2.33(正常部位2.98)、海綿状変性1.33(正常部位2.58)と有意に軽かった($p < 0.05$)。



E. 結論

従来、強いグリオシスや海綿状変性、あるいは高度のPrP沈着がDWI高信号の原因とされてきたが、今回は逆の結果を得た。CJDにおける皮質初期病変であろうPrPのconformational changeやPrP^{sc}沈着、脳実質小空胞やその液体成分などが、DWI高信号を呈する病理学的背景になる可能性が推察されるが、今後分子レベルでの検討を要する。また症例数が少なく、今後の蓄積を要する。AiにおけるDWIの評価に関して常に議論があり、実際Ai画像が生前と同様であるとは言えない。しかし死亡直前にMRIを施行し検討することは困難で、それを補う方法として提唱した。死亡後数時間のMRIはDWIの評価が可能であるとする報告もあり、本研究では死後すぐにMRIを撮像していることから研究の一助として有用であると考慮された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(2010/4/1~2011/3/31発表)

1. 論文発表

- 1) Takao M, et al. Correlations between autopsy images of 3-tesla-MRI (MRI-Ais) and neuropathologic findings. Brain Pathol 20 Suppl 1 : 97, 2010
- 2) Takao M, et al. Pathologic basis of hyperintensities of diffusion-weighted imaging in Creutzfeldt-Jakob disease using autopsy images of MRI. J Neuropathol Exp Neurol 69 : 542-543, 2010
- 3) 高尾昌樹. Movement disordersの神経病理学:overview. 日本運動障害研究会機関誌 20 : 53-64, 2010

2. 学会発表

- 1) Takao M, et al. Correlations between

- autopsy images of 3-tesla-MRI (MRI-Ais) and neuropathologic findings. XVIth International Congress of Neuropathology, Salzburg, Austria, 2010.9
- 2) Takao M, et al. Pathologic basis of hyperintensities of diffusion-weighted imaging in Creutzfeldt-Jakob disease using autopsy images of MRI. 86th Annual Meeting, The American Association of Neuropathologists, USA, 2010.6
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

耐熱性プロテアーゼによるプリオン分解

研究協力者：古賀 雄一 大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻

研究要旨

本研究では、スクレイピー(Chandler 株、Obihiro 株)感染マウス脳ホモジネート(MBH)に対し、超好熱菌由来セリンプロテアーゼ Tk-サチライシンを作用させたところ、Proteinase K で分解されないプリオン蛋白質(PrPres)を Western-blot 法の検出限界以下にまで分解出来ることを見出した。さらに、本酵素は洗浄剤成分となる各種界面活性剤の存在下で極めて安定に活性を保持することも確認されている。

A. 研究目的

プロテアーゼ耐性を有する異常プリオン蛋白質が本酵素によって分解可能であることを実証することを目的とする。

B. 研究方法

スクレイピー(obihiro 株と chandler 株)を感染させたマウス脳ホモジネート(MBH)を用いて、本酵素による異常プリオン蛋白質分解試験を行った。SAF83 をもちいたウエスタンブロット法により、残留プリオン蛋白質を確認した。

C. 研究結果

マウスの脳ホモジネートを酵素とともにインキュベートしたのち、ウエスタンブロットティングを行い、分解残留物を検出した(図 1)。

さらに、同様の実験を、酵素濃度、SDS 濃度、酵素処理時間を変えて行った。

D. 考察

PrP^{Sc} の酵素分解については、1% SDS の添加により分解活性が高まる。また、時間を 60 分まで伸ばすことで SDS がない場合でも完全分解に至ることが確認できた。酵素濃度は SDS があれば 0.002mg/ml でも大丈夫だが、

0.2mg/ml 程度であればより確実に分解できる。確実に思われる分解条件：0.002mg/ml 以上, 1% SDS, 100°C, 60 min となる。

E. 結論

本酵素により異常プリオン蛋白質が分解可能であることが確かめられた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表(2010/4/1～2011/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Foophow T, Tanaka S, Angkawidjaja C, Koga Y, Takano K, Kanaya S. Crystal structure of a subtilisin homologue, Tk-SP, from *Thermococcus kodakaraensis* : requirement of a C-terminal beta-jelly roll domain for hyperstability., *J Mol Biol* 400 : 865-877, 2010
- 2) Tanaka SI, Koga Y, Takano K, Kanaya S. Inhibition of chymotrypsin- and subtilisin-like serine proteases with Tk-serpin from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*., *Biochim Biophys Acta* 1814 : 299-307, 2011

2. 学会発表

- 1) Koga Y¹, Tanaka S², Sakudo A³, Ikuta K¹, Takano K^{1,4}, Kanaya S¹. (¹Osaka University, ²Amano Enzyme Inc. ³University of the Ryukyus, ⁴JST). Degradation of abnormal prion protein by a new protease from a hyperthermophile. Prion 2010, Salzburg, Austria, 2010.9.8-11
- 2) 古賀雄一¹, 田中俊一², 作道章一³, 高野和文^{1,4}, 金谷茂則¹(¹阪大院・工・生命先端, ²天野エンザイム, ³琉大・医, ⁴JST). 超好熱菌由来プロテアーゼによる異常プリ

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

PCT 出願 PCT/JP2009/064629
(各国移行段階)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

1. Prion alone at 65°C
2. 1 + ProK
3. Prion + Tk-sub at 65°C
4. 3 + ProK
- 1'. Prion alone at 100°C
- 2'. 1' + ProK
- 3'. Prion + Tk-sub at 100°C
- 4'. 3' + ProK

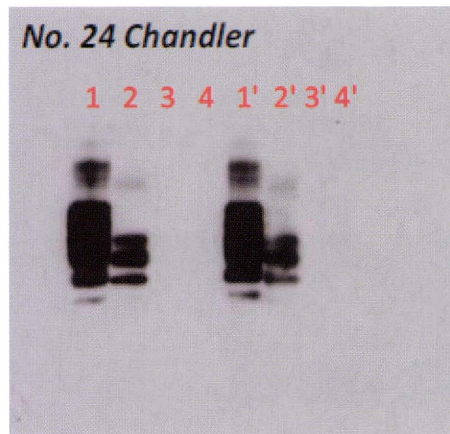


図1 プリオン分解試験

- 1 全プリオン蛋白質
 - 2 プロテイナーゼ K(PK) 耐性プリオン 65°C
 - 3 Tk-サチライシンによる分解、65°C
 - 4 Tk-サチライシンと PK による分解 65°C
- 1'~4'は1~4を100°Cで実施。



研究成果の刊行に関する一覧表