

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 type になり、神経組織で特異的に溶解感染を起こして脱髄脳症を発症させる考えられていた (archetype 仮説)。しかしその後、AIDS 患者や健常人組織を検索した結果、正常組織からも neurotropic type が検出され議論となった。これまでの研究から、JC ウイルス受容体は全身に広く分布し、神経系特異的な感染を決定する因子ではないことが明らかになっている。JC ウイルスの乏突起膠細胞での特異的感染は、複数の核内因子によって決定されると見解の一致に至った。こうした JC ウイルス増殖を促進する核内因子が、PML ボディの component である可能性がある。

- 2) **Slow virus infection** ; 既に述べたように、JC ウイルスは正常脳組織からも検出されている。JC ウイルスが、正常脳組織で潜伏・持続感染している可能性があるが、見解の一致にはまだ至っていない。乏突起膠細胞の核内には、JC ウイルス複製を促進する因子があり、これらが PML ボディの構成成分である可能性がある。しかしながら、PML ボディの component はダイナミックに変化していることから、常に効率のよい溶解感染が起きると細胞内環境が用意されているとは限らない。即ち、脳組織でも JC ウイルスが潜伏・持続感染することが可能である。
- 3) **Oncogenicity** ; JC ウイルスは高率に実験動物に脳腫瘍の発症を誘導した。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 ウイルスの検出は、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ところ、21 例の脳腫瘍 (神経膠腫) 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。従って、脳腫瘍組織でも低レベルで JC ウイルスが溶解感染している可能性がある。しかしながら、この結果は決して JC ウイルスのヒト腫瘍発生の可能性を否定するものではない。

E. 結 論

JC ウイルスは、ドット状の核内ドメイン、PML ボディを標的に感染する。ウイルス感染の標的が解明されたことにより、今後の研究の発展が期待される。

[参考文献]

- 1) Shishido Y, Nukuzuma S, Mukaigawa J, Morikawa S, Yasui K, Nagashima K. Assembly of JC virus-like particles in COS7 cells. *J of Med Virol* 51 : 265-272, 1997
- 2) * Shishido-Hara Y, Ichinose S, Higuchi K, Hara Y, Yasui K. Major and Minor Capsid Proteins of Human Polyomavirus JC Cooperatively Accumulate to Nuclear Domain 10 for Assembly into Virions. *J Virol* 78 : 9890-9903, 2004
- 3) * Shishido-Hara Y, Hara Y, Larson T, Yasui K, Nagashima K, Stoner GL. 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 Virol* 74 : 1840-185, 2000

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(2008/4/1～2011/3/31 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 demyelinating disease. *Acta Neuropathol* 120(6) : 403-417, 2010

*Kurt Jellinger(2010)賞受賞論文:この論文に対し、Acta Neuropathol 誌より賞が授与された。(日本人の受賞は二人目。)

2) * Shishido-Hara Y, Higuch K, Ohara S, Duyckaerts C, Hauw J-J, Uchihara T. Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies Provide a Scaffold for Human Polyomavirus JC Rplcation and Are Disrupted after Development of Viral Inclusions in Progressive Multifocal Leukoencephalopathy *J Neuropathol & Exp Neurol* 67 : 299-8, 2008

3) 宍戸-原 由紀子. 進行性多巣性白質脳症(PML) -臨床医のための神経病理-. *Clinical Neuroscience 月刊 臨床神経科学* 27(3) : 250-251, 2009

4) 宍戸-原 由紀子. 進行性多巣性白質脳症(PML)の核内ウイルス封入体形成と細胞変性における PML ボディの役割. -JC ウイルスの分子生物学から、進行性多巣性白質脳症の人体病理学まで-. 病理と

臨床 26(9) : 999-1006, 2008

5) 宍戸-原 由紀子, 内原俊記. What you can see in a single picture? 進行性多巣性脳症(PML)と PML ボディ 癌化か? 変性か? - ウイルス感染による PML ボディの機能破綻をもたらす細胞の運命 -. *Brain Medical* 20(3) : 207-209, 2008

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 -JC ウイルス感染の標的 PML ボディ-. 第99回日本病理学会総会 ワークショップ「神経疾患と封入体」, 東京, 2010

2) 宍戸-原 由紀子, 内原俊記, 市野瀬志津子. 進行性多巣性白質脳症の核内ドット-ウイルス複製を支持する PML ボディ- 第40回日本臨床分子形態学会シンポジウム5 神経系の分子形態科学 -基礎と臨床-. 福岡, 2008.10

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

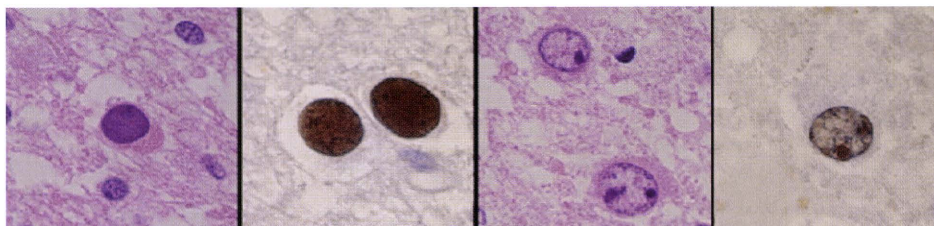
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



進行性多巣性白質脳症の核内ウイルス封入体:

左より full inclusions (HE 染色、JC ウイルス免疫染色)、dot-shaped inclusions (HE 染色、JC ウイルス免疫染色)。Shishido-Hara, *Acta Neuropathol*. 2010 より。

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、女児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。

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 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。

(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、図 2)。

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* 31 : 38-41, 2011

- 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. 研究発表(2008/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Orba Y, Sunden Y, Suzuki T, Nagashima K, Kimura, Tanaka S, Sawa H. Pharmacological cdk inhibitor R-Roscovitine suppresses JC virus proliferation. *Virology* 370 : 173-183, 2008
- 2) Matoba T, Orba Y, Suzuki T, Makino Y, Shichinohe H, Kuroda S, Ochiya T, Itoh H, Tanaka S, Nagashima K, Sawa H. An siRNA against JC virus(JCV) agnoprotein inhibits JCV infection in JCV-producing cells inoculated in nude mice. *Neuropathology* 28 : 286-294, 2008
- 3) Oshima K, Tsuchiya K, Niizato K, Akiyama H, Arai T, Nagashima K. Clinicopathological study of early progressive multifocal leukoencephalopathy incidentally found in a schizophrenia patient. *Neuropathology*

29 : 684-688, 2009

- 4) 長嶋和郎, 福原敏行. 免疫再構築症候群. *Clinical Neuroscience* 27 : 850-851, 2009
- 5) 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* 31 : 38-41, 2011

2. 学会発表

- 1) 長嶋和郎. 進行性多巣性白質脳症 PML 研究の進展とその成果. 第 42 回日本神経病理学会北海道地方会 : 特別講演, 札幌, 2009.11.14

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

- 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 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)
- 3) 注意欠陥多動性障害の評価方法(特願 2008-171035)
- 4) Clspn 遺伝子発現を指標とする精神疾患の評価方法(特願 2008-171036)

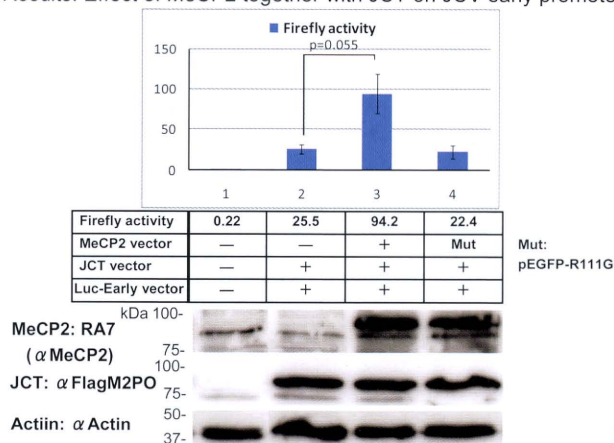
2. 実用新案登録

なし

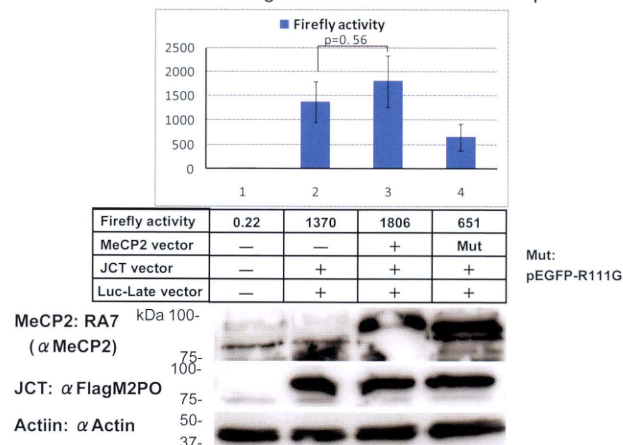
3. その他

なし

Results: Effect of MeCP2 together with JCT on JCV early promoter



Results: Effect of MeCP2 together with JCT on JCV late promoter



進行性多巣性白質脳症(PML)診療, 1年間の進歩 (平成20-22年度総合報告)

研究協力者: 雪竹 基弘 佐賀大学医学部附属病院神経内科

研究要旨

平成20-22年のPMLの診断・治療に関する論文を中心に検索を行いPML診療に関する最新の知見を収集。平成21年以降は新規治療薬の候補となり得るメフロキンに関して症例報告なども収集しその有用性を示した。また、生物学的性愛に関連したPMLも注目されている。

現在、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ている。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、2010年に使用経験の論文報告も出た。

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、平成20年度から3年間、各1年の間に発表されたPMLの診療に関する論文等をレビューし、「PML診断および治療ガイドライン」を刷新していくことを目的としている。

B. 研究方法

主にPubMedを利用して、各年度に報告されたPMLの診断および治療に関する論文等を検索した。また、21年度以降はメフロキンを使用したPML症例の報告も行った。

(倫理面への配慮)

症例に関しては匿名化され、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

平成20年度

1. 基礎医学的研究

IFN β -a と5HT2Aセロトニン受容体抗体のJCV感染に対する作用機序の違い(図1)など2報告の紹介。

2. 臨床

テント下病変2例、Dapsone内服でのPML発生、RituximabでのPML3例報告および非HIV-PML多数例でのCidofovirの評価(有意差無し)の2報告(図2:うち1報告)。

平成21年度

1. PMLと生物学的製剤(図3)

- Rituximab、Natalizumab、Alemtuzumab

および Efalizumab での PML 発症。

- ・ 単剤で PML の原因となる可能性。
- ・ PML の発生率は Rituximab で 1/4000 (SLE)、 Natalizumab で 1/1000、 Efalizumab では 1/400 (3 年以上治療の患者)。
- ・ 死亡率はそれぞれ 89%(51/57)、 23%(3/13)、 66.6%(2/3)。

2. メフロキンと PML。

In vitro の JC ウイルス感染の実験系において、2000 種類の薬剤等のなかから数種類の薬剤に著明な抗 JC ウイルス作用があることが認められ、その中で中枢神経への良好な移行を示すのはメフロキンのみであった。メフロキンの抗 JCV 作用は JCV が細胞内で増殖するのを阻害することされている。

PML 治療にメフロキンを使用した症例として 3 例の学会報告を紹介。いずれも非 HIV-PML。概して効果が期待される報告であった(表 1)。

平成 22 年度

- ・ 同一のメフロキン投与スケジュールで治療した PML の検討。

メフロキン投与スケジュール(図 4。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。

症例は非 HIV-PML 2 名、HIV-PML 1 名。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。

E. 結 論

平成 20-22 年においてはメフロキンの抗 JC ウイルス作用は PML 治療における画期的な話題であり、今後の PML 診療における新しい方向性を示している。また、生物学的製剤に関連した PML は今後の使用量は増加し

ていくと考えられる。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。

[参考文献]

- 1) O'Hara BA, Atwood WJ. Interferon beta1-a and selective anti-5HT(2a) receptor antagonists inhibit infection of human glial cells by JC virus. *Virus Res* 132 : 97-103, 2008
- 2) De Luca A, Ammassari A, Pezzotti P, Cinque P, Gasnault J, Berenguer J, et al. Cidofovir in addition to antiretroviral treatment is not effective for AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy : a multicohort analysis. *AIDS* 22 : 1759-1767, 2008
- 3) Piccinni C, Sacripanti C, Poluzzi E, Motola D, Magro L, et al. Stronger association of drug-induced progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) with biological immunomodulating agents. *Eur J Clin Pharmacol* 66 : 199-206, 2010
- 4) Carson KR, Focosi D, Major EO, Petrini M, Richey EA, West DP, Bennett CL. Monoclonal antibody-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in patients treated with rituximab, natalizumab, and efalizumab : a Review from the Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) Project. *Lancet Oncol* 10 : 816-824, 2009
- 5) 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

- 6) 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
- 7) 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
- 8) Tan CS, Koranik IJ. Progressive multifocal leukoencephalopathy and other disorders caused by JC virus : clinical features and pathogenesis. Lancet Neurol 9 : 425-437, 2010

哉, 大内尉義 編, 老年医学の基礎と臨床 II. ワールドプランニング, 東京, 151-156, 2009

- 2) 黒田康夫. III 進行性多巣性白質脳症 (PML) 1. 疫学: 日本と世界の現状. プリオン病と遅発性ウイルス感染症. プリオン病および遅発性ウイルス感染症に関する調査班 編, 金原出版, 東京, 290-294, 2010

2. 学会発表

- 1) 岡 孝之ら. 当院で経験した 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

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

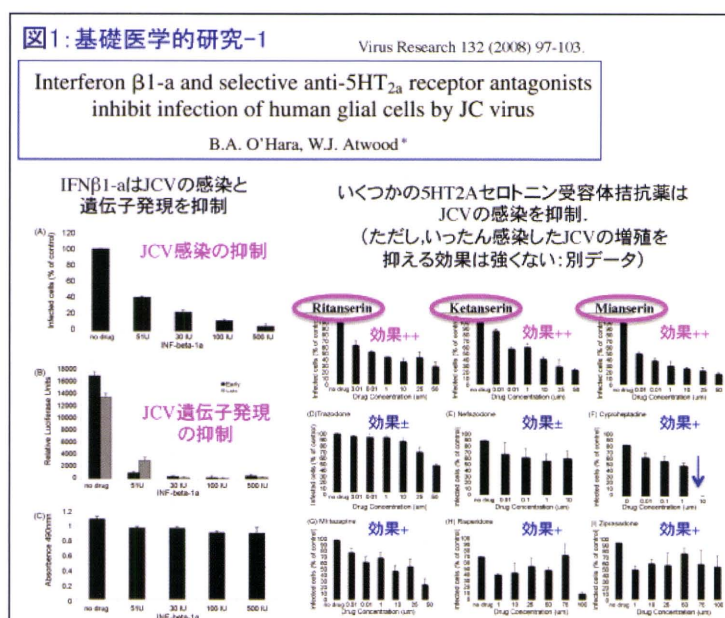
F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (2008/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) 雪竹基弘. 脳膿瘍, 髄膜炎, 脳炎. 浦上克



Cidofovir in addition to antiretroviral treatment is not effective for AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy: a multicohort analysis

Andrea De Luca, Andiana Ammassari, Patrizio Pezzotti, Paola Cinque, Jacques Gasmault, Juan Berenguer, Simona Di Giambenedetto, Antonella Cingolani, Yassine Taoufik, Pilar Miralles, Christina M Marra, Andrea Antinori, for Gesida 9/99, IRINA, IRINA, ACTG 363 study groups

対象: 基礎疾患がAIDSのPML患者, 370名.
Combination antiretroviral therapy (cART)にCidofovirを加えた群とcARTのみの群に, 生存率や後遺障害の程度に統計学上の差は認めなかった。

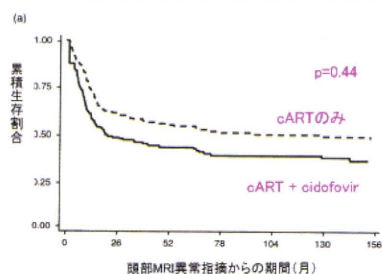
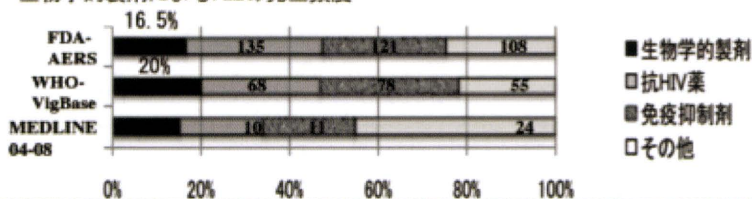


図3.PMLと生物学的製剤の関連

生物学的製剤によるPMLの発生頻度



生物学的製剤によるPMLの特徴

(単剤・多剤投与による検討)

Therapeutic group	FDA-AERS		WHO-VigiBase	
	単剤使用	多剤使用	単剤使用	多剤使用
(A)生物学的製剤	44	28	30	20
(B)抗HIV薬	25	110	11	57
(C)免疫抑制剤	29	92	17	61
(D)その他	25	83	12	43
カイ二乗検定(全体)	47.19, P<0.0001		32.72, P<0.0001	
カイ二乗検定:A vs (B+C+D)	44.17, P<0.0001		30.03, P<0.0001	

各生物学的製剤におけるPML

	Rituximab	Natalitumab	Efalitumab
Target	Anti-CD20	Binds to the α4-integrin	Anti-CD11
主な標的細胞	B細胞	T細胞	T細胞
PML発生数(死亡率)	57例(89%)	13例(10例は単剤投与)(23%)	3例(66.6%)
発生率	1/4000(SLE): 適応外使用	1/1000	1/400 (3年以上Efalitumabによる治療を受けた場合のもの)
	リンパ腫や関節リウマチでの率は示されていない。		

表1. PML治療にメフロキンを使用した症例(本邦例)

	43歳男性 (田中こずえら)	67歳男性 (川本未知ら)	60歳男性 (平山幹生ら)
基礎疾患	急性骨髄性白血病	全身性エリテマトーデス	基礎疾患なし
治療前の状態	ほぼ寝たきり 経口摂取困難	寝たきり 経口摂取困難	パーキンソン症候群
治療後の状態	反応性の改善 経口摂取可能	会話がスムーズ 見当識・記憶力の改善	軽度神経症状改善
頭部MRI等	画像異常の改善	病巣拡大の停止	—
効果の判断	改善	改善	—

図4. メフロキン投与スケジュール

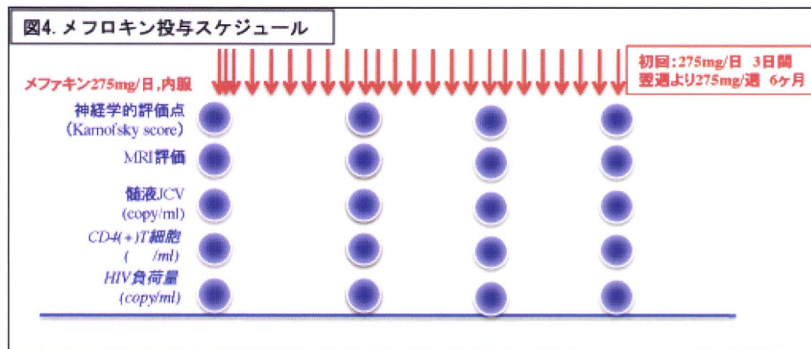


表2. メフロキン投与スケジュールで治療したPML3例

	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 JCV 増殖促進機構の解明と抗 JCV 薬スクリーニング系の確立

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、HIV-1 の Tat タンパクが先祖型 JC ウイルス(Archetype JCV)と 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、長期培養では Tat、Pur α および SV40 T 抗原の複雑な相互作用で JCV 増殖が促進されていることが示唆された。一方、5HT_{2A} レセプター阻害剤の JCV の増殖抑制効果を JCV 持続感染細胞で検討したところ、抑制効果がみられ抗 JCV 薬のスクリーニング系としての有用性を明らかになった。

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)が他の免疫不全疾患よりも高頻度に発生する原因を解明するために、Archetype JCV と PML 型 JCV の HIV-1 Tat による増殖促進について調べた。一方、PML が致命的疾患であることから抗 JCV 薬を探索するために、JCV 持続感染細胞(JCI細胞)を用いたスクリーニング系の有用性について検討した。

B. 研究方法

1) HIV-1 Tat の JCV 増殖促進の解析

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 Tat 高発現細胞(COS-tat細胞)を樹立した。

次に、COS-tat細胞に Archetype JCV DNA(CY) および PML 型 JCV(Mad-1/CR-JCI)をトランスフェクションし、30日後(Mad-1/CR-JCI)、32日後(CY)にヒトO型赤血球を用いたHA価の測定、real-time PCRにてJCV DNAを定量および免疫染色を行った。さらに、PML型JCVは43および50日後のHA価測定とreal-time PCRによるJCV DNAの定量も行った。

一方、COS-tat細胞のSV40 T抗原のmRNAをreal-time RT-PCRで定量するとともに、宿主細胞に及ぼす影響はCOS-tat細胞の増殖をMTT法で、Tatと結合してJCVの複製を促進するPurine-Rich Element Binding Protein α (Pur α)の発現はTatが中程度および高発現のCOS-tat細胞をあらたに作製し、real-time RT-PCRで定量した。

2) JCI細胞を用いた抗JCV薬スクリーニング系の検討

JCV 増殖抑制実験は ketanserin、ritanserin を 0 (対照 : DMSO 添加), 10, 100 μ M の濃度で継代毎に培養液に添加し、19, 23, 28, 36 日後に細胞を回収して HA 価を常法に従って測定した。JCV 抗原検出は 36 日後の JCI 細胞を免疫染色し、陽性率を算出した。JCV DNA の定量は 21 日後の JCI 細胞より DNA を抽出し、real-time PCR にて JCV DNA を定量した。

(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 JCV 増殖促進

Tat を高発現する 3 クローン (COS-tat7、15、22) の Archetype JCV と PML 型 JCV の増殖促進を HA 価測定と real-time PCR で調べたところ、Archetype JCV は 32 日後には明らかな増殖促進がみられ、HA 価と JCV DNA 量は COS-tat-22 細胞が一番高値を示した。PML 型 JCV は 30 日後で Archetype と同様に COS-tat-22 細胞が一番高値だったが (図 1)、培養が長期間に及ぶ 43、50 日後では COS-tat15 細胞が最高値を示した。また、免疫染色で 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。

さらに、COS-7 細胞、COS-tat 細胞で SV40 T 抗原の発現に有意差はなかった。宿主細胞に及ぼす影響は MTT 法による測定では 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、Pur α 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 Pur α 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。

2) 抗 JCV 薬スクリーニング系の確立

10 μ M の濃度で処理した JCI 細胞の HA 価は 36 日後には ketanserin 処理群が対照の 1/4 で、ritanserin 処理群が 1/16 の HA 価を示した (表 1)。36 日後の JCI 細胞を免疫染色し陽性率を算出したところ、対照を 100% とした時、ketanserin 処理群は 57.9%、ritanserin 処理群では 19.0% まで陽性率が低下した。21 日後の JCV の DNA 量は対照を 100% とした時、ketanserin 処理群が 55.0%、ritanserin 処理群では 51.9% まで低下した。

D. 考察

エイズ患者で PML の発症頻度が高いのは Tat が Archetype JCV と PML 型 JCV の増殖を促進することが一つの原因である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、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、Pur α および SV40 T 抗原の複雑な相互作用によるものと思われた。

一方、JCV 増殖抑制実験で 5HT_{2A} レセプター阻害剤明らかな抑制効果がみられたことから、JCI 細胞を用いた培養系は抗 JCV 薬を探索するためのスクリーニング系として有用であると考えられた。

E. 結論

HIV-1 Tat が Archetype JCV と PML 型 JCV の増殖を促進していることを明らかにした。さらに、JCI 細胞を用いた抗 JCV 薬スクリーニング系を確立した。

[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 Pur α . J Virol 70 : 4150-4156, 1996
- 3) Fonseca-Elphick G, Querbes W, Jordan JA, Gee GV, Eash S, Manley K, Dugan A, Stanifer M, Bhatnagar A, Kroeze WK, Roth BI, Atwood WJ. The human polyomavirus, JCV, uses serotonin receptors to infect cells. Science 306 : 1380-1383, 2004

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表(2008/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Nukuzuma S, Nakamichi K, Nukuzuma C, Takegami T. Inhibitory effect of serotonin antagonists on JC virus propagation in a carrier culture of human neuroblastoma cells. Microbiol Immunol 53 : 496-501, 2009
- 2) Nukuzuma S, Kameoka M, Sugiura S, Nakamichi K, Nukuzuma C, Miyoshi I, Takegami T. Archetype JC virus efficiently propagates in kidney-derived cells stably expressing HIV-1 Tat.

Microbiol Immunol 53 : 621-628, 2009

- 3) 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, 奴久妻智代子. JCI細胞を用いた抗JCV薬のスクリーニング系の確立. 第50回日本臨床ウイルス学会, 高知, 2009.6.14
- 2) 奴久妻聡一, 亀岡正典, 杉浦重樹, 中道一生, 奴久妻智代子, 三好勇夫, 竹上 勉. HIV-1 TatによるArchetype JCウイルスの増殖促進. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.10.27
- 3) 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

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

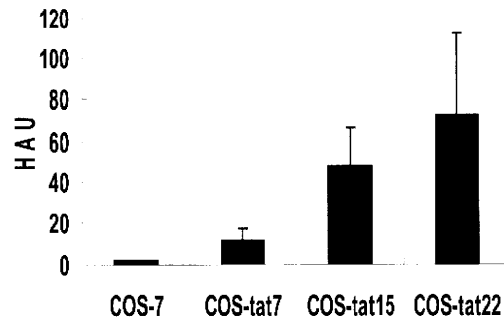


図 1 HIV-1 Tat による PML 型 JCV の増殖促進(30 日後)

表 1. JCI 細胞を用いた 5HT_{2A} レセプター阻害剤の JCV 増殖抑制効果

Drug	Expt .No.	HA titers on indicated days after treatment			
		19	23	28	36
DMSO	1	256	256	512	1,024
	2	64	256	512	1,024
Ketanserin*	1	32	128	128	128
	2	64	256	256	256
Ritanserin*	1	64	64	64	64
	2	32	64	64	64

* concentration of 10 μ M

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Naomi Hachiya, Yuko Komata, Sana Harguem, Kana Nishijima, Kiyotoshi Kaneko	Possible involvement of calpain-like activity in normal processing cellular prion protein.	Neuroscience Letters	In press		2011
Sakudo A, Onodera T	Tissue- and cell type-specific modification of prion protein (PrP)-like protein Doppel, which affects PrP endoproteolysis.	Biochem Biophys Res Commun	404	523-527	2011
Sakudo A, Ano Y, Onodera T, Nitta K, Shintani H, Ikuta K, Tanaka Y	Fundamentals of prions and their inactivation.	Int J Mol Med	In press		2011
Yokoyama T, Okada H, Murayama Y, Masujin K, Iwamaru Y, Mohri S	Examination of the Offspring of a Japanese Cow Affected with L-Type Bovine Spongiform Encephalopathy.	J Vet Med Sci	73(1)	121-123	2011
Atarashi R, Satoh K, Sano K, Fuse T, Yamaguchi N, Ishibashi D, Matsubara T, Nakagaki T, Yamanaka H, Shirabe S, Yamada M, Mizusawa H, Kitamoto T, Klug G, McGlade A, Collins SJ, Nishida N	Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion.	Nature Medicine	In press		2011
Hamanaka T, Sakasegawa Y, Omoto A, Kimura T, Ando T, Doh-ura K	Anti-prion activity of protein-bound polysaccharide K in prion-infected cells and animals.	Biochem Biophys Res Commun	in press		2011
Hashiguchi T, Ose T, Kubota M, Maita N, Kamishikiryo J, Maenaka K, Yanagi Y	Structure of the measles virus hemagglutinin bound to its cellular receptor SLAM.	Nature Structural andMolecular Biology	10.1038/nsmb.1969		2011
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	31(1)	38-41	2011
Katayose M, Hosoya M, Sato M, et al	The effectiveness of trivalent inactivated influenza vaccine in children over six consecutive influenza seasons.	Vaccine	in press		2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ano Y, Sakudo A, Uraki R, Sato Y, Kono J, Sugura K, Yokoyama T, Itohara S, Nakayama H, Yukawa M, Onodera T	Enhanced enteric invasion of scrapie agents into the villous columnar epithelium via maternal immunoglobulin.	Int J Mol Med	26	845-851	2010
Uraki R, Sakudo A, Ando S, Kitani H, Onodera T	Enhancement of phagocytotic activity by prion protein in PrP-deficient macrophage cells.	Int J Mol Med	26	527-532	2010
Sakudo A, Xue G, Kawashita N, Ano Y, Takagi T, Shintani H, Tanaka Y, Onodera T, Ikuta K	Structure of the prion protein and its gene: an analysis using bioinformatics and computer simulation.	Curr Protein Pept Sci	11	166-179	2010
Kobayashi A, Sakuma N, Matsuura Y, Mohri S, Aguzzi A, Kitamoto T	Experimental verification of a traceback phenomenon in prion infection.	J Virol	84(7)	3230-3238	2010
Hizume M, Kobayashi A, Mizusawa H, Kitamoto T	Amino acid conditions near the GPI anchor attachment site of prion protein for the conversion and the GPI anchoring.	Biochemical and Biophysical Research Communications	391	1681-1686	2010
Yokoyama T, Masujin K, Schmerr MJ, Shu Y, Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Murayama Y, Mohri S	Intraspecies prion transmission results in selection of sheep scrapie strains.	PLoS ONE	5(11)	e15450	2010
Shimizu Y, Kaku-Ushiki Y, Iwamaru Y, Muramoto T, Kitamoto T, Yokoyama T, Mohri S, Tagawa Y	A novel anti-prion protein monoclonal antibody and its single-chain fragment variable derivative with ability to inhibit abnormal prion protein accumulation in cultured cells.	Microbiol Immunol	54(2)	112-121	2010
Ushiki-Kaku Y, Endo R, Iwamaru Y, Shimizu Y, Imamura M, Masujin K, Yamamoto T, Hattori S, Itohara S, Irie S, Yokoyama T	Tracing conformational transition of abnormal prion proteins during interspecies transmission by using novel antibodies.	J Biol Chem	285(16)	11931-11936	2010
Hasegawa K, Mohri S, Yokoyama T	Fragment molecular orbital calculations reveal that the E200K mutation markedly alters local structural stability in the human prion protein.	Prion	4(1)	38-44	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
An SS, Lim KT, Oh HJ, Lee BS, Zukic E, Ju YR, Yokoyama T, Kim SY, Welker E	Differentiating blood samples from scrapie infected and non-infected hamsters by detecting disease-associated prion proteins using Multimer Detection System.	Biochem Biophys Res Commun	392(4)	505-509	2010
Gomi H, Yokoyama T, Itohara S	Role of GFAP in morphological retention and distribution of reactive astrocytes induced by scrapie encephalopathy in mice.	Brain Res	1312	156-167	2010
Yumiko Ohhashi, Kazuki Ito, Brandon Toyama, Jonathan Weissman, Motomasa Tanaka	Differences in prion strain conformations result from non-native interactions in a nucleus.	Nature Chem Biol	6	225-230	2010
Takeshi Ishikawa, Kazuo Kuwata	Interaction Analysis of the Native Structure of Prion Protein with Quantum Chemical Calculations.	J Chem Theory Comput	6	538-547	2010
Satoshi Endo, Toshiyuki Matsunaga, Kazuo Kuwata, Hai-Tao Zhao, Ossama El-Kabbani, Yukio Kitade, Akira Hara	Chromene-3-carboxamide derivatives discovered from virtual screening as potent inhibitors of the tumour maker, AKR1B10.	Bioorg Med Chem	18	2485-2490	2010
Takeshi Ishikawa, Kazuo Kuwata	Acceleration of monomer self-consistent charge process in fragment molecular orbital method.	Chem-Bio Inform J	10	24-31	2010
N. Yamamoto, K. Kuwata	Redox behaviors of the neurotoxic portion in human prion protein, HuPrP (106-126)	Chemical Physics Letters	498	184-187	2010
Takeshi Ishikawa, Norifumi Yamamoto, Kazuo Kuwata	Partial energy gradient based on the fragment molecular orbital method application to geometry optimization.	Chemical Physics Letters	500	149-154	2010
Wiham JM, Orru CD, Bessen RA, Atarashi R, Sano K, Race B, Meade-White KD, Taubner LM, Timmes A, Caughey B	Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays.	PLoS Pathogens	2 : 6 (12)	e1001217	2010
Kim JI, Cali I, Surewicz K, Kong Q, Raymond GJ, Atarashi R, Race B, Qing L, Gambetti P, Caughey B, Surewicz WK	Mammalian prions generated from bacterially expressed prion protein in the absence of any mammalian cofactors.	J Biol Chem	285(19)	14083-14087	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sakata H, Horiuchi M, Takahashi I, Kinjo M	Confomational Analysis of Soluble Oligomers of GFP Tagged Prion Protein by Fluorescence Fluctuation Spectroscopy. <i>Curr. Pharm. Biotechnol.</i>	<i>Curr. Pharm. Biotechnol.</i>	11	87-95	2010
Sato Y, Shimonohara N, Hanaki KI, Goto M, Yamakawa Y, Horiuchi M, Takahashi H, Sata T, Nakajima N	ImmunoAT method: an initial assessment for the detection of abnormal isoforms of prion protein in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues.	<i>J Virol. Methods</i>	165	261-267	2010
Watanabe Y, Hiraoka W, Igarashi M, Ito K, Shimoyama Y, Horiuchi M, Yamamori T, Yasui H, Kuwabara M, Inagaki F, Inanami O	A novel copper(II) coordination at His186 in full-length murine prion protein.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	94	522-528	2010
Sassa Y, Yamasaki T, Horiuchi M, Inoshima Y, Ishiguro N	The effects of lysosomal and proteasomal inhibitors on abnormal forms of prion protein degradation in murine macrophages.	<i>Microbiol Immunol</i>	54	763-768	2010
Teruya K, Nishizawa K, Doh-ura K	Semisynthesis of a protein with cholesterol at the C-terminal, targeted to the cell membrane of live cells.	<i>Protein J</i>	29(7)	493-500	2010
Kimura T, Ishikawa K, Sakasegawa Y, Teruya K, Sata T, Schätzl H, Doh-ura K	GABAA receptor subunit beta1 is involved in the formation of protease-resistant prion protein in prion-infected neuroblastoma cells.	<i>FEBS Lett</i>	584(6)	1193-1198	2010
Okamura N, Shiga Y, Furumoto S, Tashiro M, Tsuboi Y, Furukawa K, Yanai K, Iwata R, Arai H, Kudo Y, Itoyama Y, Doh-ura K	In vivo detection of prion amyloid plaques using [(11)C]BF-227 PET. <i>Eur J Nucl Med Mol Imaging.</i>	<i>Eur J Nucl Med Mol Imaging</i>	37(5)	934-941	2010
Terada T, Tsuboi Y, Obi T, Doh-ura K, Murayama S, Kitamoto T, Yamada T, Mizoguchi K	Less protease-resistant PrP in a patient with sporadic CJD treated with intraventricular pentosan polysulphate.	<i>Acta Neurol Scand</i>	121(2)	127-130	2010
Fujita K, Harada M, Yuasa T, Sasaki M, Izumi Y, Kaji R	Temporal evolution of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease monitored by 3-Tesla MR spectroscopy.	<i>J Neurol</i>	in press		

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Iwasaki Y, Mori K, Ito M, Nagaoka M, Ieda T, Kitamoto T, Yoshida M, Hashizume Y	An autopsied case of V180I Creutzfeldt-Jakob disease presenting with panencephalopathic-type pathology and a characteristic prion protein type.	Neuropathology	in press		2010
Kobayashi A, Mizukoshi K, Iwasaki Y, Miyata H, Yoshida Y, Kitamoto T	Co-occurrence of types 1 and 2 PrP ^{res} in sCJD-MM1.	Am J Pathol	in press		2010
Saito Y, Iwasaki Y, Aiba I, Kitamoto T, Yoshida M, Hashizume Y	An autopsy case of MM2-cortical + thalamic-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease.	Neuropathology	in press		2010
Iwasaki Y, Mimuro M, Yoshida M, Kitamoto T, Hashizume Y	Survival to akinetic mutism state in Japanese cases of MM1-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease is similar to Caucasians.	Eur J Neurol	in press		2010
Tsukui K, Iwasaki Y, Nagaoka M, Tadokoro K	Detection of RNA in the plasma of patients with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease, Gerstmann-Straüssler syndrome and other non-transmissible spongiform encephalopathy brain disorders.	Microbiology Insight	3	27-36	2010
Nozaki I, Hamaguchi T, Sanjo N, Noguchi-Shinohara M, Sakai K, Nakamura Y, Sato T, Kitamoto T, Mizusawa H, Moriwaka F, Shiga Y, Kuroiwa Y, Nishizawa M, Kuzuhara S, Inuzuka T, Takeda M, Kuroda S, Abe K, Murai H, Murayama S, Tateishi J, Takumi I, Shirabe S, Harada M, Sadakane A, Yamada M	Prospective 10-year surveillance of human prion diseases in Japan.	Brain	133	3043-3057	2010
Go H, Hashimoto K, Hosoya M, et al	An extremely low body weight infant born to a mother with measles.	J Perinatol	30	146-148	2010
Hasegawa S, Ichiyama T, Hashimoto K, Suzuki Y, Hirano R, Fukano R, Furukawa S	Functional expression of cysteinyl leukotriene receptors on human platelets.	Platelets	21 (4)	253-259	2010