厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（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症に関する調査研究班　分担研究報告書

JC ウイルス T 抗原 C 末端領域の機能解析

研究分担者：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：大場靖子　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

研究要旨　進行性多巣性白質脳症の原因ウイルスである JC ウイルス（JCV）の Large T 抗原（TAg）に特異的な C 末端領域の機能を明らかにするため、C 末端領域の変異体を作成し TAg の機能を解析した。その結果、JCV の TAg の C 末端領域は同族のポリオーマウイルスである SV40 の TAg と異なり、p53 のタンパク質修飾を顕著に抑制することが判明した。また、この領域は JCV ゲノム複製を促進することが明らかとなった。

A. 研究目的

致死性の中枢神経系脱髄疾患である進行性多巣性白質脳症はポリオーマウイルスに属する JC ウイルス（JCV）によって惹起される。

我々はこれまでに JCV を対象とした基礎的研究を推進し、進行性多巣性白質脳症の病態を解明することを目的とし、得られた知見を報告してきた[1)-5)]。JCV の Large T 抗原（TAg）はウイルスの複製、転写調節を行う早期タンパク質である。また、p53 や pRb などの癌抑制遺伝子タンパク質と結合し、細胞増殖を誘導する。これらの機能に関与する TAg の責任領域は明らかとなっている。JCV TAg は同族のポリオーマウイルスである SV40 の TAg と 72%と比較的高いアミノ酸の相同性を有している。しかしながら、TAg の C 末端側の約 60 アミノ酸をコードする領域は、SV40 の TAg およびその他のポリオーマウイルスの TAg と比較して相同性が低く、その機能は不明である。本研究では、JCV TAg の C 末端領域の機能を明らかにすることを目的とした基礎研究を実施した。本分担研究は進行性多巣性白質脳症の発症機序の解明を最終目的とし、現在治療法の確立していない進行性多巣性白質脳症の対策に資することを目指す。

B. 研究方法

JCV TAg の C 末端領域の機能を解析するため、C 末端 60 aa を欠損した JCV TAg（JTdC）、C 末端 81 aa を欠損した SV40 TAg（STdC）、それぞれの C 末端領域を置換したキメラタンパク質（J-ST, S-JT）等の変異体を発現するベクターを作成し、IMR-32 細胞に導入、発現させた。TAg の既知の機能への影響を確認するため、p53 との結合能を免疫沈降法にて検討した。また、TAg のウイルスゲノム複製能を、定量 PCR を用いた Dpn I replication assay を新たに確立し検討した。ウイルスプロモーターの転写活性化能については、ZsGreen レポーターベクターに早期および後期プロモーターを導入したものを作成し、蛍光発現量をイメージアナライザーで解析した。

（倫理面への配慮）

本実験で用いられた JCV は P2 で扱うべきウイルスであり、本研究は当施設の P2 指定実験室にて安全性に留意して行なわれた。また、本研究の内容は、北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター病原性微生物等安全管理委員会[実験番号 10(8)]、北海道大学遺伝子組換え実験等安全委員会 [承認番号 20(22)]および文部科学大臣から[承認番号 24 受学文科振第 1727 号]承認を得ている。本研究では臨床検体は使用しておらず、動物実験は実施していない。

C. 研究結果

TAg各変異体とp53の結合能を解析した結果、野生型JCV TAg（JTwt）およびSV40 TAg（STwt）と同等の結合能があることを確認した。次に、各TAg発現細胞のp53のリン酸化およびアセチ

ル化状態を確認した結果、JTdC、J-ST、STwt、STdCではJTwt、S-JTに比べてp53のリン酸化、アセチル化が亢進していた(図1)。TAgに結合しているp53においても同様の修飾状態の変化が見られた。この結果から、JCV TAgのC末端領域がp53のリン酸化、アセチル化修飾を抑制すると考えられた。また、様々な部位のp53リン酸化抗体を用いた結果、JCV TAg C末端によるリン酸化の抑制は上流のリン酸化酵素に依存しないことが判明した。

さらにこれらの変異体がJCVゲノム複製効率およびJCVプロモーター転写活性に及ぼす影響を検討した。JCVゲノム複製効率を定量した結果では、JTwtに対してJTdC、J-STではゲノム複製量が減少し、STwt、STdCに対してS-JTでは有意にゲノム複製量が増加した(図2)。JCVの早期および後期プロモーター活性を測定した結果では、各TAg変異体はJCwt、STwtと比較し、JCVプロモーター転写活性化に明らかな差は認められなかった。これらの結果から、JCV TAgはSV40 TAgと異なり、C末端領域がJCVゲノム複製に促進的に働くことが示された。

D. 考察

JCV TAgでは、p53のタンパク質修飾が上流酵素に非依存的に阻害されていたことから、立体構造上C末端領域がp53の修飾に影響している可能性が示唆された。p53のリン酸化およびアセチル化状態と、ゲノム複製量に逆相関が見られたことから、JCV TAg C末端領域は、p53の過剰な修飾を抑制し、ゲノム複製効率を上げている可能性が示唆された。今後は、p53が関連する宿主細胞内機構への影響についても検討する。また、得られた基礎的知見を基にして、進行性多巣性白質脳症に対する抗ウイルス薬開発への応用について検討を行う予定である。

E. 結論

JCV TAgのC末端領域は、①自身に結合するp53の修飾を抑制すること、②ウイルスゲノム複製に促進的に働くことが明らかになった。

[参考文献]

1) Orba Y, Suzuki T, Makino Y, Kubota K, Tanaka S, Kimura T, Sawa H. Large T antigen promotes JC virus replication in G2-arrested cells by inducing ATM- and ATR-mediated G2 checkpoint signaling. *J Biol Chem* 285:1544-1554, 2010.

2) Suzuki T, Orba Y, Okada Y, Sunden Y, Kimura T, Tanaka S, Nagashima K, Hall WW, Sawa H. The human polyoma JC virus agnoprotein acts as a viroporin. *PLoS Pathogens* 6:e1000801, 2010.

3) Suzuki T, Yamanouchi S, Sunden Y, Orba Y, Kimura T, Sawa H. Natalizumab has no direct biological effect on JC virus infectivity in permissive human neural cell lines. *J Med Virol* 82:1229-1235, 2010.

4) 澤　洋文. 第3回信州NeuroCPC特別講演：進行性多巣性白質脳症(PML)の原因ウイルスであるJCウイルスの細胞内動態. *信州医誌* 59:202-207, 2011.

5) 鈴木忠樹、大場靖子、澤　洋文. III 進行性多巣性白質脳症(PML)、3. ウイルス検索と発症機序. 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症に関する調査研究班」・編 プリオン病と遅発性ウイルス感染症, 金原出版, 東京, pp303-309, 2010.

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Dang X, Wüthrich C, Gordon J, Sawa H, Koralnik IJ. JC virus encephalopathy is associated with a novel agnoprotein-deletion JCV variant. *PLoS One* 7:e35793, 2012.

2) Suzuki T, Semba S, Sunden Y, Orba Y, Kobayashi S, Nagashima K, Kimura T, Hasegawa H, Sawa H. Role of JC virus agnoprotein in virion formation. *Microbiol Immunol* 56:636-646, 2012.

3) Takahashi K, Orba Y, Kimura T, Wang L, Kohsaka S, Tsuda M, Tanino M, Nishihara H, Nagashima K, Sawa H, Tanaka S. The relathionship between methyl CpG binding protein 2 and JC viral proteins. *Jpn J Infect Dis*, in press.

2. 学会発表

1) 高橋健太, 木村太一, 王　磊, 高阪真路, 工藤伸一, 奴久妻聡一, 谷野美智枝, 西原広史, 澤　洋文, 長嶋和郎, 田中伸哉. メチル化遺伝子結合蛋白 MeCP2 の JC ウイルス関連蛋白による転写制御の解析, 第 53 回日本神経病理学会総会学術研究会, 新潟, 6.28-30, 2012.

2) 鈴木忠樹, 片野晴隆, 佐藤由子, 澤　洋文, 佐田徹太郎, 長谷川秀樹. 進行性多巣性白質脳症における JC ウイルス後期蛋白質発現動態の面積組織学的検討。第 101 回日本病理学会総会, 東京, 4.26-28, 2012.

3) 鈴木忠樹, 片野晴隆, 大場靖子, 小林進太郎, 佐藤由子, 佐田徹太郎, 澤　洋文, 長谷川秀樹. JC ウイルス後期蛋白質に対する特異抗体を用いた進行性多巣性白質脳症の免疫組織化学的診断法の比較検討, 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 11.13-15, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

1) 発明の名称：Treatment of PML targeting JC virus agno (JC ウイルス agno を対象とした PML の治療)
出願国：カナダ
出願人：Japan Science and Technology Agency (独立行政法人科学技術振興機構)
発明者：Kazuo Nagashima (長嶋和郎), Hirofumi Sawa (澤　洋文), Yuki Okada (岡田由紀)
出願番号(出願日)：2467930 (2002/6/5)
公報番号(公報日)：2467930 (2003/5/30)
特許許可通知発行日：2012/10/5

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図 1

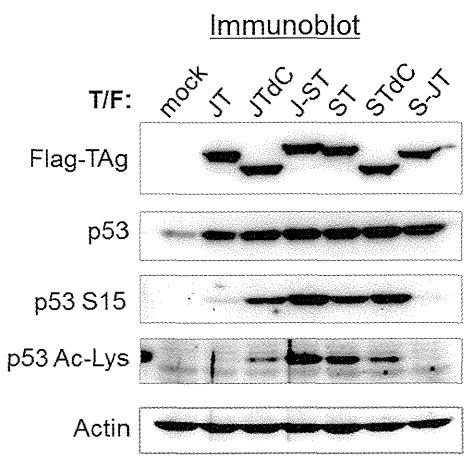
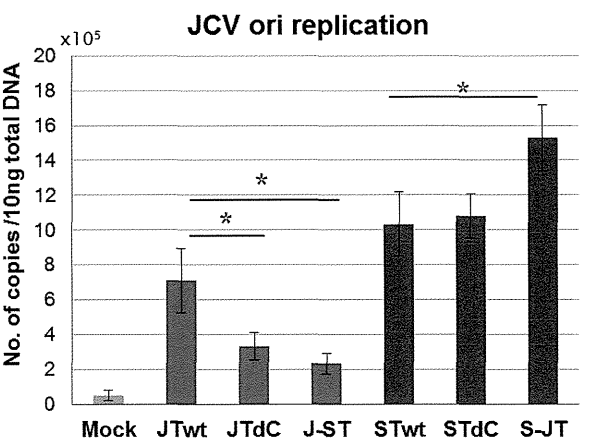


図 2



厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（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症に関する調査研究班　分担研究報告書

進行性多巣性白質脳症：グリア細胞の腫大核における細胞周期関連蛋白の発現と PML-NBs の形態変化

研究分担者：宍戸-原　由紀子　　杏林大学医学部病理学教室

研究要旨　進行性多巣性白質脳症は JC ウイルスが中枢神経系の乏突起膠細胞に感染し、髄鞘崩壊を誘導して発症する。病理組織学的に、感染した乏突起膠細胞の腫大核には、核全体を占める JC ウイルス封入体(full inclusion)が認められ、病理診断の指標とされてきた。さらに近年我々は、感染初期にはドット状の封入体(dot-shaped inclusions)も存在することを発見した。この封入体は、JC ウイルスがドット状の核内ドメイン、PML-NBs に集積するために形成される。グリア細胞核での細胞周期関連蛋白の発現を調べてみると、グリア細胞の核面積増大に伴い核内環境は S から G2 期様に変化し、PML-NBs も腫大化する。腫大化する PML-NBs を足場にウイルス粒子の複製が進行することが明らかになった。

A. 研究目的

JC ウイルスは、宿主細胞のドット状の核内ドメイン、promyelocytic leukemia nuclear bodies (PML-NBs)で複製し、感染初期に dot-shaped inclusions を形成する。その後、ウイルスが細胞核全体へ広がり full inclusion を形成する過程で、PML-NBs は崩壊する。PML-NBs の機能破綻は、感染細胞の細胞周期を破綻させ、細胞腫瘍化または変性へ導くと考えられるが、JC ウイルス感染における PML-NBs の病理学的意義は明らかではない。そこで、本研究ではウイルス封入体形成過程における PML-NBs の形態変化を観察した。

B. 研究方法

進行性多巣性白質脳症のヒト脳組織において、細胞周期関連蛋白の発現を免疫組織化学的に検討し、画像解析ソフトを用いて、陽性細胞の核面積と、PML-NBs を有する細胞の核面積を測定した。また、PML-NBs の直径も測定した。

（倫理面への配慮）

個人情報や遺伝子情報は使用しない。

C. 研究結果

乏突起膠細胞の核腫大は脱髄・変性の進行に伴い顕著化し、細胞周期関連蛋白の発現は核面積に応じて変化していることがわかった。分裂細胞 S 期に発現する PCNA は、JC ウイルス感染細胞の比較的小型核(核面積約 30 mm^2)に陽性となり、S 期～G2 期に発現が増加する cyclin A は大型核(核面積約 70 mm^2)に陽性となった。JC ウイルス VP1 蛋白陽性細胞は、PCNA・cyclin A と一致した二峰性の核面積ピークを示した。また、PML-NBs は、小型核(核面積約 30 mm^2)では直径約 0.2 mm の顆粒状で、大型核(核面積約 70 mm^2)では直径約 1.0 mm 以上の二次元でリング状、三次元で球状の構造を示していた。超解像顕微鏡(SIM)で観察すると、JC ウイルス VP1 蛋白は、大型 PML-NBs の外側に集積しており、電子顕微鏡でも、これに相当する JC ウイルス粒子のリング状配列が確認された。

D. 考察

上記結果から、JC ウイルスに感染した乏突起膠細胞は、DNA ウイルス複製に有利な S 期類似の核内環境を提供し、その後 G2 類似の状態で活発にウイルス増殖を支持すると考えられる。PML-NBs も、細胞核内環境の変化に応じて腫大化し、ウイルス増殖の足場を提供後、崩壊・消失すると考えられた。

E. 結論

JC ウイルスに感染したグリア細胞は、核腫大

に伴い核内環境をSからG2類似に変化させる。PML-NBs もこれに伴い腫大化し、ウイルス複製の足場を提供する。

[参考文献]

1) Shishido-Hara, Y. Progressive multifocal leukoencephalopathy and promyelocytic leukemia nuclear bodies: a review of clinical, neuropathological, and virological aspects of JC virus-induced demuelinating disease. *Acta Neuropathol* 120:403-417, 2010.

2) Shishido-Hara Y, Ichinose S, Uchihara T. JC virus intranuclear inclusions associated with PML-NBs: analysis by electron microscopy and structured illumination microscopy. *Am J Pathol* 180:1095-1106, 2012.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

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-NBs の病理学的な意義–. 第 58 回日本病理学会秋期特別総会, 名古屋, 11.23, 2012.

2) 宍戸-原 由紀子, 市野瀬志津子, 矢澤卓也, 菅間 博, 内原俊記. 進行性多巣性白質脳症の核内ウイルス封入体：PML-NBs でのウイルス複製と agnogene の機能. 第 53 回日本神経病理学会総会学術研究会, 新潟, 6.28-30, 2012.

3) 宍戸-原 由紀子, 市野瀬志津子, 矢澤卓也, 菅間 博, 内原俊記. 進行性多巣性白質脳症の JC ウイルス封入体：免疫電子顕微鏡法と超解像顕微鏡法による解析. 第 101 回日本病理学会総会, 東京, 4.26-28, 2012.

4) 山岸夢希, 山口夏希, 藤田雄吾, 藤井 肇, 宍戸-原 由紀子, 井野辺恵, 小林啓一, 土屋一洋, 永根基雄, 塩川芳昭, 藤岡保範, 菅間 博. 大脳膠腫症を伴う悪性神経膠腫から発生した多発性膠肉腫の一剖検例. 第 101 回日本病理学会総会, 東京, 4.26-28, 2012.

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

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（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症に関する調査研究班　分担研究報告書

メチル化 CpG 結合タンパク質 MeCP2 と JC ウイルスタンパク質の相関に関する検討

研究分担者：長嶋和郎　北海道大学大学院医学研究科腫瘍病理学分野
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
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：大場靖子　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：王　　磊　北海道大学大学院医学研究科探索病理学分野
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
研究分担者：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
北海道大学大学院医学研究科探索病理学分野

研究要旨　進行性多巣性白質脳症（PML）は、JC ウイルス（JCV）により惹起される致死的疾患であるが、効果的な治療法は未だ確立されていない。Methyl CpG binding protein 2（MeCP2）は DNA プロモーター領域の転写を制御する分子である。PML 脳では、JCV T 抗原（T antigen, TAg）が発現している乏突起膠細胞において、MeCP2 発現細胞が多数認められることが免疫染色にて判明し、MeCP2 の発現が JCV の感染に関与する可能性が考えられた。本研究では *in vitro* の系で JCV TAg による MeCP2 のプロモーター活性を詳細に検討すると共に、JCV TAg による MeCP2 発現の影響を検討した。JCV TAg により MeCP2 プロモーター活性は上昇するにも関わらず、mRNA およびタンパク質発現の亢進は認めず、プロモーター活性と mRNA およびタンパク質発現に乖離が認められた。乖離の原因として、マイクロ RNA による転写後修飾や、エピジェネティックな制御機構が関与する可能性が考えられた。

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 DNA の CpG 結合タンパク質である MeCP2 が発現していることを明らかにした[1]。今回、この発現機序を解明するため JCV TAg と MeCP2 の発現の相関について、分子生物学的手法を用いて検討した。

B. 研究方法

(1) JCV TAg による MeCP2 プロモーター活性への影響について検討した。まずヒト胎児腎細胞株（293T 細胞）より、MeCP2 プロモーター領域を PCR 法にてクローニングし、luciferase をマーカーとして転写活性を測定することを目的に、pGL3-basic プラスミドにサブクローニングした（pGL3-MeCP2-promoter）[2]。続いてプロモーター領域を 5'末端側より段階的に切断したベクター、および 3'末端側より切断したベクターも作製した。JCV 感受性のあるヒト神経芽細胞腫細胞株 I（MR-32）に JCV TAg 発現ベクター[3]と作製した pGL3-MeCP2-promoter ベクターをトランスフェクションし、luciferase 活性を測定した。

(2) JCV TAg が MeCP2 の mRNA 発現に与える影響について、7 種のヒト神経系および 6 種のヒト非神経系細胞株を使用し、JCV TAg 発現ベクターをトランスフェクションし、リアルタイム RT-PCR 法にて MeCP2 mRNA の発現を検討した。

(3) JCV TAg が MeCP2 タンパク質の発現に与え

る影響について、9 種のヒト神経系および 6 種のヒト非神経系細胞株を使用し、JCV TAg 発現ベクターをトランスフェクションし、イムノブロット法にて MeCP2 タンパク質の発現を検討した。

(4) MeCP2 タンパク質の過剰発現が、JCV 早期および後期遺伝子転写調節領域の活性に与える影響について検討した。IMR-32 細胞に、JCV 早期あるいは後期遺伝子転写調節領域を組み込んだ pGL3-basic ベクターである pGL3-Mad1-Early/Late[4]、および MeCP2[5]、JCV TAg それぞれの発現ベクターをトランスフェクションし、luciferase 活性を測定した。MeCP2 の対照として、DNA 結合能を欠く変異型 MeCP2 である MeCP2-R111G を発現するベクターを使用した[6]。

(5) MeCP2 タンパク質の過剰発現が、JCV タンパク質の発現に与える影響について、IMR-32 細胞に JCV ゲノムと MeCP2 野生型および R111G 変異型発現ベクターをトランスフェクションし、イムノブロット法にて JCV タンパク質の発現を検討した。

（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および北海道大学人獣共通感染症リサーチセンターの P2 指定実験室にて安全性に留意して行われた。また本研究では臨床検体を使用しておらず、動物実験も実施していない。

C.研究結果

本研究において以下の新知見が得られた。

(1) IMR-32 細胞において、MeCP2 プロモーター活性は、JCV TAg 発現により著明に亢進する。JCV TAg による MeCP2 プロモーター活性の亢進には、MeCP2 exon 1 開始塩基より 307-257 塩基上流と、178 塩基上流から exon1 開始 9 塩基までの配列が重要である（図 1）。

(2) ヒト神経系 7 種および非神経系 6 種の細胞株において、JCV TAg は MeCP2 mRNA の発現に影響を与えない（図 2A、2B）。

(3) ヒト神経系 9 種および非神経系 6 種の細胞株において、JCV TAg は MeCP2 タンパク質の発現に影響を与えない（図 3）。

(4) JCV TAg 共発現下において、MeCP2 タンパク質の過剰発現により、JCV 早期および後期遺伝子転写調節領域の活性は亢進しない（図 4）。

(5) MeCP2 タンパク質の過剰発現は、JCV タンパク質（TAg、Vp1、agnoprotein）の発現に影響を与えない（図 5）。

D.考察

PML 脳では JCV TAg 発現細胞で MeCP2 陽性細胞を多数認めるが、*in vitro* の系においては JCV TAg により MeCP2 プロモーター活性は上昇するにも関わらず、mRNA およびタンパク質発現の亢進は認めず、プロモーター活性と mRNA およびタンパク質発現に乖離が認められた。乖離の原因として、マイクロ RNA による転写後修飾や、エピジェネティックな制御機構が関与する可能性が考えられた。また今回の実験系でクローニングした MeCP2 のプロモーター領域外の塩基配列が JCV TAg によるプロモーター活性に影響する可能性や、マイクロ RNA が mRNA の分解に関与する可能性も否定できない。

E.結論

PML 脳では JCV TAg 発現細胞で MeCP2 陽性細胞を多数認めるが、*in vitro* の系においては JCV TAg による、MeCP2 プロモーター活性と mRNA およびタンパク質発現への影響に乖離が認められた。乖離の原因として、マイクロ RNA による転写後修飾や、エピジェネティックな制御機構が関与する可能性が考えられた。

[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) Liu J, Francke U. Identification of cis-regulatory elements for MeCP2 expression. *Hum Mol Genet* 15:1769-1782, 2006.

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.
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* 370:173-183, 2008.
5) Kudo S, Nomura Y, Segawa M, Fujita N, Nakao M, Dragich J, Schanen C, Tamura M. Functional analyses of MeCP2 mutations associated with Rett syndrome using transient expression systems. *Brain Dev* 23:S165-173, 2001.
6) Kudo S, Nomura Y, Segawa M, Fujita N, Nakao M, Schanen C, Tamura M. Heterogeneity in residual function of MeCP2 carrying missense mutations in the methyl CpG binding domain. *J Med Genet* 40:487-493, 2003.

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

1) Takahashi K, Orba Y, Kimura T, Wang L, Kohsaka S, Tsuda M, Tanino M, Nishihara H, Nagashima K, Sawa H, Tanaka S. The relationship between methyl CpG binding protein 2 and JC viral proteins. *Jpn J Infect Dis*, in press.

2. 学会発表

1) 高橋健太, 木村太一, 王　磊, 高阪真路, 工藤伸一, 奴久妻聡一, 谷野美智枝, 西原広史, 澤　洋文, 長嶋和朗, 田中伸哉. メチル化遺伝子結合蛋白 MeCP2 の JC ウイルス関連蛋白による転写制御の解析. 第 53 回日本神経病理学会, 新潟, 6.28-30, 2012.

H.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

1) 発明の名称：Treatment of PML targeting JC virus agno（JC ウイルス agno を対象とした PML の治療）
出願国：カナダ
出願人：Japan Science and Technology Agency（独立行政法人科学技術振興機構）
発明者：Kazuo Nagashima（長嶋和郎），Hirofumi Sawa（澤　洋文），Yuki Okada（岡田由紀）
出願番号（出願日）：2467930（2002/6/5）
公報番号（公報日）：2467930（2003/5/30）
特許許可通知発行日：2012/10/5

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1: JCV TAgによりMeCP2のプロモーター活性は亢進する

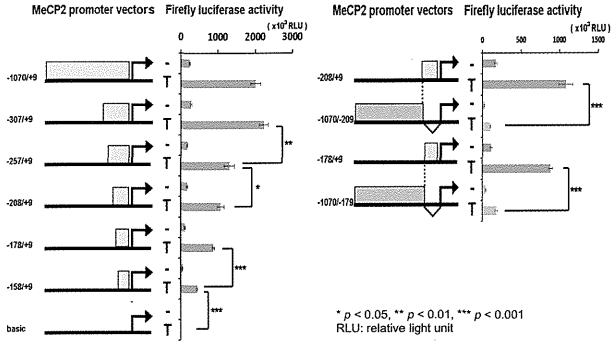


図2A: 各種ヒト細胞株においてJCV TAgは MeCP2A mRNAの発現に影響を与えない

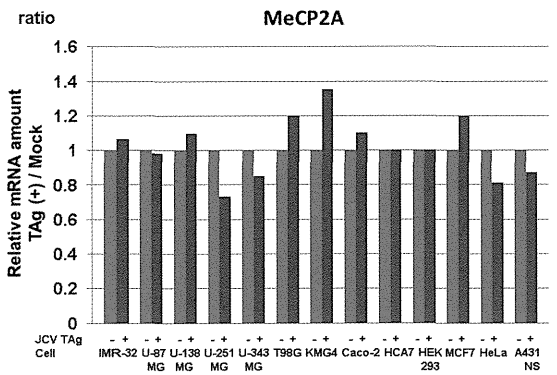


図2B: 各種ヒト細胞株においてJCV TAgは MeCP2B mRNAの発現に影響を与えない

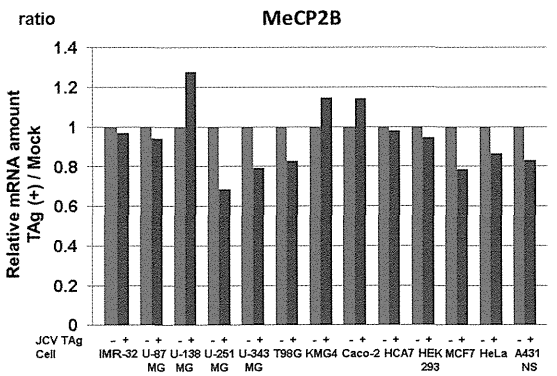


図3: JCV TAgはMeCP2タンパク質の発現に影響を与えない

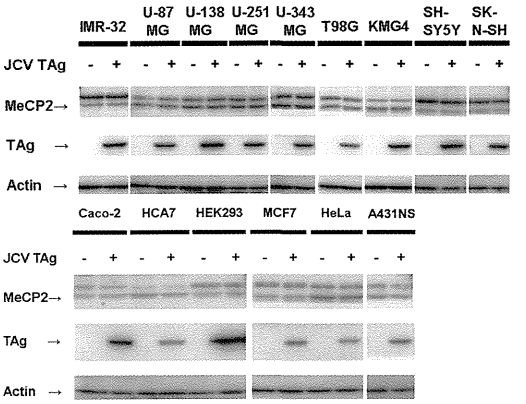


図4: JCV TAg共発現下において, MeCP2過剰発現により JCV遺伝子転写調節領域の活性は亢進しない

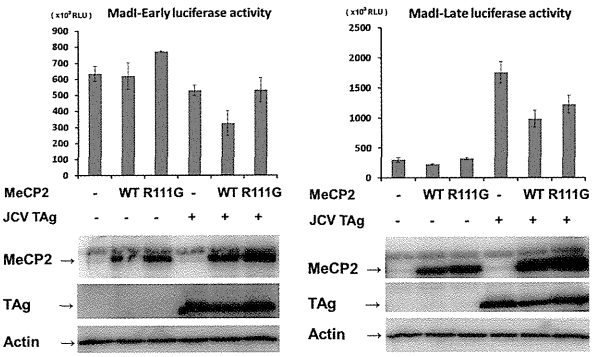
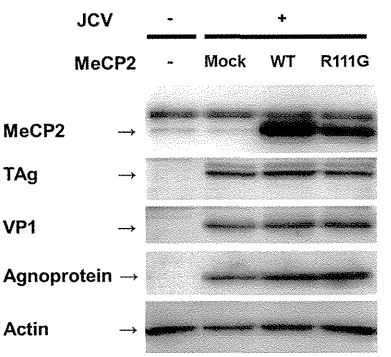


図5: MeCP2タンパク質の過剰発現は JCVタンパク質の発現に影響を与えない



厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（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症に関する調査研究班　分担研究報告書

PARP-1阻害剤のin vitroにおけるJCウイルス増殖抑制効果について

研究分担者：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　神戸大学大学院保健学研究科
研究協力者：杉浦重樹　奈良県立医科大学組換DNA実験施設
研究協力者：奴久妻智代子　東京ソアラクリニック
研究協力者：田崎隆史　金沢医科大学総合医学研究所生命科学領域
研究協力者：竹上　勉　金沢医科大学総合医学研究所生命科学領域

研究要旨　進行性多巣性白質脳症(PML)は JC ウイルス(JCV)が髄鞘形成細胞であるオリゴデンドロサイトを感染破壊し、亜急性に症状が進行する致死的な脱髄疾患で、1年以内に死に至る症例が多い。従来は免疫異常の基礎疾患の上に発症し、極めて稀な疾患であったが、近年エイズの流行に伴い患者数が増加している。しかし、治療に関しては、HIV-PML は臨床的には HAART 療法で死亡率が低下している。一方、非 HIV-PML は現在のところ有効な治療薬がない。本研究では細胞内酵素 Poly(ADP-ribose) polymerase 1(PARP-1)阻害剤である 3-aminobenzamide3-(AB)の JCV 増殖抑制効果を神経芽細胞腫由来の IMR-32 細胞と JCV 持続感染細胞である JCI 細胞を用いて検討したところ、DNA replication assay と JCI 細胞を用いた長期間培養の結果から、3-AB により JCV の複製が抑制されることでウイルス産生が低下することは明らかになった。さらに、PARP-1 阻害剤添加による PARP-1 活性と細胞増殖への影響を調べたところ、IMR-32 細胞内の PARP-1 活性が低下し、二次的に JCV の複製が抑制された可能性が示唆された。

A. 研究目的

進行性多巣性白質脳症(PML)は免疫異常の基礎疾患の上に、JC ウイルス(JCV)が髄鞘形成細胞であるオリゴデンドロサイトを感染破壊することで発症する極めて稀な疾患であったが、近年エイズの流行に伴い患者数が増加している。PML は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が多い。しかし、治療に関しては、HIV-PML は臨床的には HAART 療法で死亡率が低下している。一方、非 HIV-PML は現在のところ有効な治療薬がない。過去の報告において、JCV をターゲットにした治療薬の探索が試みられているが、十分な効果が見られないのが現状である。近年、細胞内酵素である Poly(ADP-ribose) polymerase 1(PARP-1)阻害剤の 3-AB が JCV と同じ仲間である SV40 のウイルス増殖を抑制すること、PARP-1 に対する RNAi が HIV-1 の複製を抑制すること、さらに HSV-1 の複製には PARP family である Trankyrase 1 が必須であることが報告されている。そこで、本研究では PARP-1 阻害剤である 3-aminobenzamide(3-AB)の JCV 増殖抑制効果を神経芽細胞腫由来の IMR-32 細胞と JCV 持続感染細胞である JCI 細胞を用いて検討すると同時に、PARP-1 阻害剤添加による PARP-1 活性と細胞増殖への影響を調べた。

B. 研究方法

1) 3-AB添加による細胞増殖への影響

3-ABの細胞毒性は極めて少ないと報告されているが、20 mMの濃度の3-ABをIMR-32細胞に添加し、5日後のIMR-32細胞の増殖をCell Proliferation Kit I(MTT法)で無添加群と比較した。

2) 3-ABのJCV増殖抑制の解析

IMR-32細胞にM1-IMRb DNA(IMR-32細胞で最も良く増殖するJCV)を1μgトランスフェクトし、3-ABを20 mMで添加した群(3-AB添加群)と添加しない群(DMSO群)から48、72時間後に低分子DNAを抽出し、*Bam* HIと*Dpn* I消化により複製したDNAのみをDNA replication assayにより検出し、複製DNAのバンドをNIH Image Jを用いて数値化

した。

一方、JCV持続産生細胞であるJCI細胞に3-ABを20mMの濃度で長期間添加培養し、12日後と18日後にウイルス量を赤血球凝集反応で測定した。さらに、HAサンプルからDNAを抽出し、JC-VP1(TaqMan probe)、JC-VP-F,R(primers)を用いたreal-time PCRにてJCV DNAを定量した。

3) 3-AB添加によるPARP-1への影響

3-ABがJCVと同じ仲間であるSV40の感染細胞からの放出を促進することでウイルス増殖を抑制することが報告されている。JCV複製抑制機構を解明するために、20 mMの3-ABをIMR-32細胞に添加し、72時間後のPARP-1活性を測定した。

4) 統計学的解析

データの統計学的解析はStudent's t-testで行った。

（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) 3-AB添加による細胞増殖への影響

3-ABは20 mMではIMR-32細胞に対する細胞毒性は見られなかった。

2) 3-ABのJCV増殖抑制の解析

DNA replication assayにより3-AB添加群はDMSO群に比べて、48時間後は61.0%、72時間後では59.0%のJCVのDNA複製抑制率を示した。特に、72時間後ではDMSO群に比して、有意な複製抑制($p<0.05$)を示した(図1)。

また、JCI細胞を用いた3-AB添加長期間培養では3-AB添加群がDMSO群に比して、12日後に60.0%、18日後に79.1%のHA価の抑制が見られた。さらに、HAサンプル中のJCV DNAを定量したところ、3-AB添加群がDMSO群より12日後で81.5%、18日後では75.0%の抑制率を示し、共に有意差が見られた($p<0.01$)。

3) 3-AB添加によるPARP-1への影響

3-AB添加によるIMR-32細胞のPARP-1活性は3-AB添加群がDMSO群に比べて35.8%抑制した。

D. 考察

近年、先進国でエイズが増えているのは日本だけで、それに伴ってPMLも増加している。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。しかし、エイズ感染に関連して発症したHIV-PMLについてはHAART療法が有効であることが臨床的に明らかになっている。一方、非HIV-PMLは現在のところ有効な治療薬がない。従来の治療薬はJCVをターゲットにしたものが大半で、治療効果が不十分である上に生体に重篤な副作用を示す欠点がある。近年、細胞内酵素であるPARP-1阻害剤の3-ABがJCVと同じ仲間であるSV40のウイルス増殖を抑制すること、PARP-1に対するRNAiがHIV-1の複製を抑制すること、さらにHSV-1の複製にはPARP familyであるTrankyrase 1が必須であることが報告されていることから、本研究ではPARP-1阻害剤である3-ABのJCV増殖抑制効果を神経芽細胞腫由来のIMR-32細胞とJCV持続感染細胞であるJCI細胞を用いて検討すると同時に、PARP-1阻害剤添加によるPARP-1活性と細胞増殖への影響を調べた。

その結果、DNA replication assayとJCI細胞を用いた長期間培養実験において、3-ABによりJCVの複製が抑制されることでウイルス産生が低下することは明らかである。しかし、Gordon-Shaagらは3-ABがSV40の複製や外郭タンパクの産生を抑制するのではなく、感染細胞にnecrosisを誘導しウイルス放出を促進するPARP-1の活性を低下させることでウイルス増殖を抑制すると報告している。一方、KameokaらはPARP-1に対するRNAiがHIV-1の複製を抑制すること、さらにLiらはHSV-1の複製にはPARP familyであるTrankyrase 1が必須であることが報告している。本研究は3-ABの添加によりIMR-32細胞内のPARP-1活性が低下し、二次的にJCVの複製が抑制された可能性が示唆された。これらのことにより、3-ABの細胞毒性は極めて少ないことを考えれば、PARP-1をターゲットにした抗JCV薬の開発の新しいアプローチになると考えられる。

E. 結論

本研究では3-ABの短期添加によるDNA replication assayとJCI細胞への長期間添加実験を

行ったが、3-AB により JCV の複製および増殖が抑制されることは明らかである。さらに、3-AB を添加することで IMR-32 細胞内の PARP-1 活性が低下したことから、二次的に JCV の複製が抑制された可能性が示唆された。一方、細胞増殖は低下していなかったことから、3-AB の細胞毒性は極めて少ないと考えられ、PARP-1 をターゲットにした抗 JCV 薬として有用であると思われる。

[参考文献]

1) Gordon-Shaag A, Yosef Y, El-Latif MA, Oppenheim A. The abundant nuclear enzyme PARP participates in the life cycle of Simian virus 40 and is stimulated by minor capsid protein VP3. *J Virol* 77:4273-4282, 2003.

2) Kameoka M, Nukuzuma S, Itaya A, Tanaka Y, Ota K, Ikuta K, Yoshihara K. RNA interference directed against poly(ADP-ribose) polymerase 1 efficienctly suppresses human immunodeficiency virus type 1 replication in human cells. *J Virol* 78:8931-8934, 2004.

3) Li Z, Yamauchi Y, Kamakura M, Murayama T, Goshima F, Kimura H, Nishiyama Y. Herpes simplex virus requires poly(ADP-ribose) polymerase activity for efficient replication and inducesextracellular signal-related kinase-dependent phosphorylation and ICP0-dependent nuclear localization of tankyrase 1. *J Virol* 86:492-503, 2012.

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Beppu M, Kawamoto M, Nukuzuma S, Kohara N. Mefloquine improved progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient with systemic lupus erythematosus. *Intern Med* 51:1245-1247, 2012.

2) Nukuzuma S, Kameoka M, Sugiura S, Nakamichi K, Nukuzuma C, Takegami T. Suppressive effect of PARP-1 inhibitor on JC virus replication in vitro. *J Med Virol* 85:132-137, 2013.

2. 学会発表

1) 奴久妻聡一, 亀岡正典, 杉浦重樹, 中道一生, 奴久妻智代子, 竹上　勉. HIV-1 Tatによる神経芽細胞腫でのJCウイルスの増殖促進. 第60回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 11.13-15, 2012.

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

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（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症に関する調査研究班　分担研究報告書

JC ウイルス T 抗原 C 末端領域の機能解析

研究分担者：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：大場靖子　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

研究要旨　進行性多巣性白質脳症の原因ウイルスである JC ウイルス（JCV）の Large T 抗原（TAg）に特異的な C 末端領域の機能を明らかにするため、C 末端領域の変異体を作成し TAg の機能を解析した。その結果、JCV の TAg の C 末端領域は同族のポリオーマウイルスである SV40 の TAg と異なり、p53 のタンパク質修飾を顕著に抑制することが判明した。また、この領域は JCV ゲノム複製を促進することが明らかとなった。

A. 研究目的

致死性の中枢神経系脱髄疾患である進行性多巣性白質脳症はポリオーマウイルスに属する JC ウイルス（JCV）によって惹起される。

我々はこれまでに JCV を対象とした基礎的研究を推進し、進行性多巣性白質脳症の病態を解明することを目的とし、得られた知見を報告してきた[1)-5)]。JCV の Large T 抗原（TAg）はウイルスの複製、転写調節を行う早期タンパク質である。また、p53 や pRb などの癌抑制遺伝子タンパク質と結合し、細胞増殖を誘導する。これらの機能に関与する TAg の責任領域は明らかとなっている。JCV TAg は同族のポリオーマウイルスである SV40 の TAg と 72%と比較的高いアミノ酸の相同性を有している。しかしながら、TAg の C 末端側の約 60 アミノ酸をコードする領域は、SV40 の TAg およびその他のポリオーマウイルスの TAg と比較して相同性が低く、その機能は不明である。本研究では、JCV TAg の C 末端領域の機能を明らかにすることを目的とした基礎研究を実施した。本分担研究は進行性多巣性白質脳症の発症機序の解明を最終目的とし、現在治療法の確立していない進行性多巣性白質脳症の対策に資することを目指す。

B. 研究方法

JCV TAg の C 末端領域の機能を解析するため、C 末端 60 aa を欠損した JCV TAg（JTdC）、C 末端 81 aa を欠損した SV40 TAg（STdC）、それぞれの C 末端領域を置換したキメラタンパク質（J-ST, S-JT）等の変異体を発現するベクターを作成し、IMR-32 細胞に導入、発現させた。TAg の既知の機能への影響を確認するため、p53 との結合能を免疫沈降法にて検討した。また、TAg のウイルスゲノム複製能を、定量 PCR を用いた Dpn I replication assay を新たに確立し検討した。ウイルスプロモーターの転写活性化能については、ZsGreen レポーターベクターに早期および後期プロモーターを導入したものを作成し、蛍光発現量をイメージアナライザーで解析した。

（倫理面への配慮）

本実験で用いられた JCV は P2 で扱うべきウイルスであり、本研究は当施設の P2 指定実験室にて安全性に留意して行なわれた。また、本研究の内容は、北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター病原性微生物等安全管理委員会[実験番号 10(8)]、北海道大学遺伝子組換え実験等安全委員会 [承認番号 20(22)]および文部科学大臣から[承認番号 24 受学文科振第 1727 号]承認を得ている。本研究では臨床検体は使用しておらず、動物実験は実施していない。

C. 研究結果

TAg各変異体とp53の結合能を解析した結果、野生型JCV TAg（JTwt）およびSV40 TAg（STwt）と同等の結合能があることを確認した。次に、各TAg発現細胞のp53のリン酸化およびアセチ

ル化状態を確認した結果、JTdC、J-ST、STwt、STdCではJTwt、S-JTに比べてp53のリン酸化、アセチル化が亢進していた(図1)。TAgに結合しているp53においても同様の修飾状態の変化が見られた。この結果から、JCV TAgのC末端領域がp53のリン酸化、アセチル化修飾を抑制すると考えられた。また、様々な部位のp53リン酸化抗体を用いた結果、JCV TAg C末端によるリン酸化の抑制は上流のリン酸化酵素に依存しないことが判明した。

さらにこれらの変異体がJCVゲノム複製効率およびJCVプロモーター転写活性に及ぼす影響を検討した。JCVゲノム複製効率を定量した結果では、JTwtに対してJTdC、J-STではゲノム複製量が減少し、STwt、STdCに対してS-JTでは有意にゲノム複製量が増加した(図2)。JCVの早期および後期プロモーター活性を測定した結果では、各TAg変異体はJCwt、STwtと比較し、JCVプロモーター転写活性化に明らかな差は認められなかった。これらの結果から、JCV TAgはSV40 TAgと異なり、C末端領域がJCVゲノム複製に促進的に働くことが示された。

D. 考察

JCV TAgでは、p53のタンパク質修飾が上流酵素に非依存的に阻害されていたことから、立体構造上C末端領域がp53の修飾に影響している可能性が示唆された。p53のリン酸化およびアセチル化状態と、ゲノム複製量に逆相関が見られたことから、JCV TAg C末端領域は、p53の過剰な修飾を抑制し、ゲノム複製効率を上げている可能性が示唆された。今後は、p53が関連する宿主細胞内機構への影響についても検討する。また、得られた基礎的知見を基にして、進行性多巣性白質脳症に対する抗ウイルス薬開発への応用について検討を行う予定である。

E. 結論

JCV TAgのC末端領域は、①自身に結合するp53の修飾を抑制すること、②ウイルスゲノム複製に促進的に働くことが明らかになった。

[参考文献]

1) Orba Y, Suzuki T, Makino Y, Kubota K, Tanaka S, Kimura T, Sawa H. Large T antigen promotes JC virus replication in G2-arrested cells by inducing ATM- and ATR-mediated G2 checkpoint signaling. *J Biol Chem* 285:1544-1554, 2010.

2) Suzuki T, Orba Y, Okada Y, Sunden Y, Kimura T, Tanaka S, Nagashima K, Hall WW, Sawa H. The human polyoma JC virus agnoprotein acts as a viroporin. *PLoS Pathogens* 6:e1000801, 2010.

3) Suzuki T, Yamanouchi S, Sunden Y, Orba Y, Kimura T, Sawa H. Natalizumab has no direct biological effect on JC virus infectivity in permissive human neural cell lines. *J Med Virol* 82:1229-1235, 2010.

4) 澤　洋文. 第3回信州NeuroCPC特別講演：進行性多巣性白質脳症(PML)の原因ウイルスであるJCウイルスの細胞内動態. *信州医誌* 59:202-207, 2011.

5) 鈴木忠樹、大場靖子、澤　洋文. III 進行性多巣性白質脳症(PML)、3. ウイルス検索と発症機序. 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症に関する調査研究班」・編 プリオン病と遅発性ウイルス感染症, 金原出版, 東京, pp303-309, 2010.

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Dang X, Wüthrich C, Gordon J, Sawa H, Koralnik IJ. JC virus encephalopathy is associated with a novel agnoprotein-deletion JCV variant. *PLoS One* 7:e35793, 2012.

2) Suzuki T, Semba S, Sunden Y, Orba Y, Kobayashi S, Nagashima K, Kimura T, Hasegawa H, Sawa H. Role of JC virus agnoprotein in virion formation. *Microbiol Immunol* 56:636-646, 2012.

3) Takahashi K, Orba Y, Kimura T, Wang L, Kohsaka S, Tsuda M, Tanino M, Nishihara H, Nagashima K, Sawa H, Tanaka S. The relathionship between methyl CpG binding protein 2 and JC viral proteins. *Jpn J Infect Dis*, in press.

2. 学会発表

1) 高橋健太, 木村太一, 王　磊, 高阪真路, 工藤伸一, 奴久妻聡一, 谷野美智枝, 西原広史, 澤　洋文, 長嶋和郎, 田中伸哉. メチル化遺伝子結合蛋白 MeCP2 の JC ウイルス関連蛋白による転写制御の解析, 第 53 回日本神経病理学会総会学術研究会, 新潟, 6.28-30, 2012.

2) 鈴木忠樹, 片野晴隆, 佐藤由子, 澤　洋文, 佐田徹太郎, 長谷川秀樹. 進行性多巣性白質脳症における JC ウイルス後期蛋白質発現動態の面積組織学的検討。第 101 回日本病理学会総会, 東京, 4.26-28, 2012.

3) 鈴木忠樹, 片野晴隆, 大場靖子, 小林進太郎, 佐藤由子, 佐田徹太郎, 澤　洋文, 長谷川秀樹. JC ウイルス後期蛋白質に対する特異抗体を用いた進行性多巣性白質脳症の免疫組織化学的診断法の比較検討, 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 11.13-15, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

1) 発明の名称：Treatment of PML targeting JC virus agno（JC ウイルス agno を対象とした PML の治療）
出願国：カナダ
出願人：Japan Science and Technology Agency（独立行政法人科学技術振興機構）
発明者：Kazuo Nagashima（長嶋和郎）, Hirofumi Sawa（澤　洋文）, Yuki Okada（岡田由紀）
出願番号（出願日）：2467930（2002/6/5）
公報番号（公報日）：2467930（2003/5/30）
特許許可通知発行日：2012/10/5

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図 1

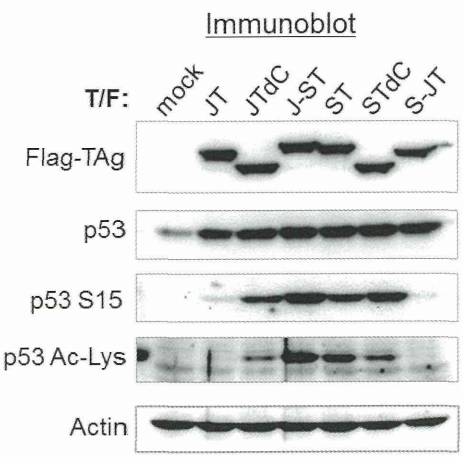
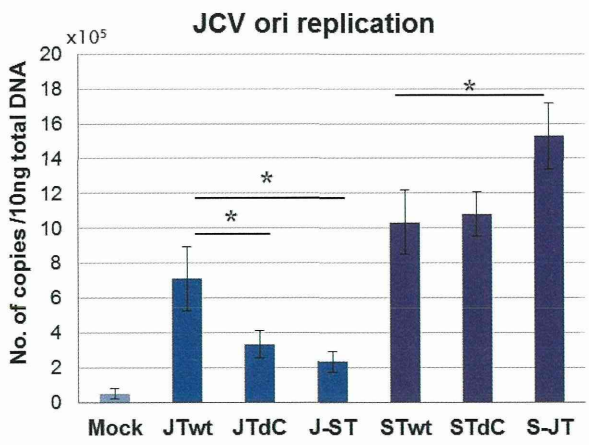


図 2



厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（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症に関する調査研究班　分担研究報告書

進行性多巣性白質脳症：グリア細胞の腫大核における細胞周期関連蛋白の発現と PML-NBs の形態変化

研究分担者：宍戸-原　由紀子　　杏林大学医学部病理学教室

研究要旨　進行性多巣性白質脳症は JC ウイルスが中枢神経系の乏突起膠細胞に感染し、髄鞘崩壊を誘導して発症する。病理組織学的に、感染した乏突起膠細胞の腫大核には、核全体を占める JC ウイルス封入体（full inclusion）が認められ、病理診断の指標とされてきた。さらに近年我々は、感染初期にはドット状の封入体（dot-shaped inclusions）も存在することを発見した。この封入体は、JC ウイルスがドット状の核内ドメイン、PML-NBs に集積するために形成される。グリア細胞核での細胞周期関連蛋白の発現を調べてみると、グリア細胞の核面積増大に伴い核内環境は S から G2 期様に変化し、PML-NBs も腫大化する。腫大化する PML-NBs を足場にウイルス粒子の複製が進行することが明らかになった。

A. 研究目的

JC ウイルスは、宿主細胞のドット状の核内ドメイン、promyelocytic leukemia nuclear bodies（PML-NBs）で複製し、感染初期に dot-shaped inclusions を形成する。その後、ウイルスが細胞核全体へ広がり full inclusion を形成する過程で、PML-NBs は崩壊する。PML-NBs の機能破綻は、感染細胞の細胞周期を破綻させ、細胞腫瘍化または変性へ導くと考えられるが、JC ウイルス感染における PML-NBs の病理学的意義は明らかではない。そこで、本研究ではウイルス封入体形成過程における PML-NBs の形態変化を観察した。

B. 研究方法

進行性多巣性白質脳症のヒト脳組織において、細胞周期関連蛋白の発現を免疫組織化学的に検討し、画像解析ソフトを用いて、陽性細胞の核面積と、PML-NBs を有する細胞の核面積を測定した。また、PML-NBs の直径も測定した。

（倫理面への配慮）

個人情報や遺伝子情報は使用しない。

C. 研究結果

乏突起膠細胞の核腫大は脱髄・変性の進行に伴い顕著化し、細胞周期関連蛋白の発現は核面積に応じて変化していることがわかった。分裂細胞 S 期に発現する PCNA は、JC ウイルス感染細胞の比較的小型核（核面積約 30 mm^2）に陽性となり、S 期～G2 期に発現が増加する cyclin A は大型核（核面積約 70 mm^2）に陽性となった。JC ウイルス VP1 蛋白陽性細胞は、PCNA・cyclin A と一致した二峰性の核面積ピークを示した。また、PML-NBs は、小型核（核面積約 30 mm^2）では直径約 0.2 mm の顆粒状で、大型核（核面積約 70 mm^2）では直径約 1.0 mm 以上の二次元でリング状、三次元で球状の構造を示していた。超解像顕微鏡（SIM）で観察すると、JC ウイルス VP1 蛋白は、大型 PML-NBs の外側に集積しており、電子顕微鏡でも、これに相当する JC ウイルス粒子のリング状配列が確認された。

D. 考察

上記結果から、JC ウイルスに感染した乏突起膠細胞は、DNA ウイルス複製に有利な S 期類似の核内環境を提供し、その後 G2 類似の状態で活発にウイルス増殖を支持すると考えられる。PML-NBs も、細胞核内環境の変化に応じて腫大化し、ウイルス増殖の足場を提供後、崩壊・消失すると考えられた。

E. 結論

JC ウイルスに感染したグリア細胞は、核腫大

に伴い核内環境をSからG2類似に変化させる。PML-NBsもこれに伴い腫大化し、ウイルス複製の足場を提供する。

[参考文献]

1) Shishido-Hara, Y. Progressive multifocal leukoencephalopathy and promyelocytic leukemia nuclear bodies: a review of clinical, neuropathological, and virological aspects of JC virus-induced demuelinating disease. *Acta Neuropathol* 120:403-417, 2010.

2) Shishido-Hara Y, Ichinose S, Uchihara T. JC virus intranuclear inclusions associated with PML-NBs: analysis by electron microscopy and structured illumination microscopy. *Am J Pathol* 180:1095-1106, 2012.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

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-NBs の病理学的な意義–. 第 58 回日本病理学会秋期特別総会, 名古屋, 11.23, 2012.

2) 宍戸-原 由紀子, 市野瀬志津子, 矢澤卓也, 菅間 博, 内原俊記. 進行性多巣性白質脳症の核内ウイルス封入体：PML-NBs でのウイルス複製と agnogene の機能. 第 53 回日本神経病理学会総会学術研究会, 新潟, 6.28-30, 2012.

3) 宍戸-原 由紀子, 市野瀬志津子, 矢澤卓也, 菅間 博, 内原俊記. 進行性多巣性白質脳症の JC ウイルス封入体：免疫電子顕微鏡法と超解像顕微鏡法による解析. 第 101 回日本病理学会総会, 東京, 4.26-28, 2012.

4) 山岸夢希, 山口夏希, 藤田雄吾, 藤井 肇, 宍戸-原 由紀子, 井野辺恵, 小林啓一, 土屋一洋, 永根基雄, 塩川芳昭, 藤岡保範, 菅間 博. 大脳膠腫症を伴う悪性神経膠腫から発生した多発性膠肉腫の一剖検例. 第 101 回日本病理学会総会, 東京, 4.26-28, 2012.

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

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（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症に関する調査研究班　分担研究報告書

メチル化 CpG 結合タンパク質 MeCP2 と JC ウイルスタンパク質の相関に関する検討

研究分担者：長嶋和郎　北海道大学大学院医学研究科腫瘍病理学分野
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
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：大場靖子　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：王　　磊　北海道大学大学院医学研究科探索病理学分野
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
研究分担者：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
北海道大学大学院医学研究科探索病理学分野

研究要旨　進行性多巣性白質脳症（PML）は、JC ウイルス（JCV）により惹起される致死的疾患であるが、効果的な治療法は未だ確立されていない。Methyl CpG binding protein 2（MeCP2）は DNA プロモーター領域の転写を制御する分子である。PML 脳では、JCV T 抗原（T antigen, TAg）が発現している乏突起膠細胞において、MeCP2 発現細胞が多数認められることが免疫染色にて判明し、MeCP2 の発現が JCV の感染に関与する可能性が考えられた。本研究では *in vitro* の系で JCV TAg による MeCP2 のプロモーター活性を詳細に検討すると共に、JCV TAg による MeCP2 発現の影響を検討した。JCV TAg により MeCP2 プロモーター活性は上昇するにも関わらず、mRNA およびタンパク質発現の亢進は認めず、プロモーター活性と mRNA およびタンパク質発現に乖離が認められた。乖離の原因として、マイクロ RNA による転写後修飾や、エピジェネティックな制御機構が関与する可能性が考えられた。

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 DNA の CpG 結合タンパク質である MeCP2 が発現していることを明らかにした[1]。今回、この発現機序を解明するため JCV TAg と MeCP2 の発現の相関について、分子生物学的手法を用いて検討した。

B. 研究方法

(1) JCV TAg による MeCP2 プロモーター活性への影響について検討した。まずヒト胎児腎細胞株（293T 細胞）より、MeCP2 プロモーター領域を PCR 法にてクローニングし、luciferase をマーカーとして転写活性を測定することを目的に、pGL3-basic プラスミドにサブクローニングした（pGL3-MeCP2-promoter）[2]。続いてプロモーター領域を 5'末端側より段階的に切断したベクター、および 3'末端側より切断したベクターも作製した。JCV 感受性のあるヒト神経芽細胞腫細胞株 I（MR-32）に JCV TAg 発現ベクター[3]と作製した pGL3-MeCP2-promoter ベクターをトランスフェクションし、luciferase 活性を測定した。

(2) JCV TAg が MeCP2 の mRNA 発現に与える影響について、7 種のヒト神経系および 6 種のヒト非神経系細胞株を使用し、JCV TAg 発現ベクターをトランスフェクションし、リアルタイム RT-PCR 法にて MeCP2 mRNA の発現を検討した。

(3) JCV TAg が MeCP2 タンパク質の発現に与え

る影響について、9 種のヒト神経系および 6 種のヒト非神経系細胞株を使用し、JCV TAg 発現ベクターをトランスフェクションし、イムノブロット法にて MeCP2 タンパク質の発現を検討した。

(4) MeCP2 タンパク質の過剰発現が、JCV 早期および後期遺伝子転写調節領域の活性に与える影響について検討した。IMR-32 細胞に、JCV 早期あるいは後期遺伝子転写調節領域を組み込んだ pGL3-basic ベクターである pGL3-Mad1-Early/Late[4]、および MeCP2[5]、JCV TAg それぞれの発現ベクターをトランスフェクションし、luciferase 活性を測定した。MeCP2 の対照として、DNA 結合能を欠く変異型 MeCP2 である MeCP2-R111G を発現するベクターを使用した[6]。

(5) MeCP2 タンパク質の過剰発現が、JCV タンパク質の発現に与える影響について、IMR-32 細胞に JCV ゲノムと MeCP2 野生型および R111G 変異型発現ベクターをトランスフェクションし、イムノブロット法にて JCV タンパク質の発現を検討した。

（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および北海道大学人獣共通感染症リサーチセンターの P2 指定実験室にて安全性に留意して行われた。また本研究では臨床検体を使用しておらず、動物実験も実施していない。

C.研究結果

本研究において以下の新知見が得られた。

(1) IMR-32 細胞において、MeCP2 プロモーター活性は、JCV TAg 発現により著明に亢進する。JCV TAg による MeCP2 プロモーター活性の亢進には、MeCP2 exon 1 開始塩基より 307-257 塩基上流と、178 塩基上流から exon1 開始 9 塩基までの配列が重要である（図 1）。

(2) ヒト神経系 7 種および非神経系 6 種の細胞株において、JCV TAg は MeCP2 mRNA の発現に影響を与えない（図 2A、2B）。

(3) ヒト神経系 9 種および非神経系 6 種の細胞株において、JCV TAg は MeCP2 タンパク質の発現に影響を与えない（図 3）。

(4) JCV TAg 共発現下において、MeCP2 タンパク質の過剰発現により、JCV 早期および後期遺伝子転写調節領域の活性は亢進しない（図 4）。

(5) MeCP2 タンパク質の過剰発現は、JCV タンパク質（TAg、Vp1、agnoprotein）の発現に影響を与えない（図 5）。

D.考察

PML 脳では JCV TAg 発現細胞で MeCP2 陽性細胞を多数認めるが、*in vitro* の系においては JCV TAg により MeCP2 プロモーター活性は上昇するにも関わらず、mRNA およびタンパク質発現の亢進は認めず、プロモーター活性と mRNA およびタンパク質発現に乖離が認められた。乖離の原因として、マイクロ RNA による転写後修飾や、エピジェネティックな制御機構が関与する可能性が考えられた。また今回の実験系でクローニングした MeCP2 のプロモーター領域外の塩基配列が JCV TAg によるプロモーター活性に影響する可能性や、マイクロ RNA が mRNA の分解に関与する可能性も否定できない。

E.結論

PML 脳では JCV TAg 発現細胞で MeCP2 陽性細胞を多数認めるが、*in vitro* の系においては JCV TAg による、MeCP2 プロモーター活性と mRNA およびタンパク質発現への影響に乖離が認められた。乖離の原因として、マイクロ RNA による転写後修飾や、エピジェネティックな制御機構が関与する可能性が考えられた。

[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) Liu J, Francke U. Identification of cis-regulatory elements for MeCP2 expression. *Hum Mol Genet* 15:1769-1782, 2006.

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.
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* 370:173-183, 2008.
5) Kudo S, Nomura Y, Segawa M, Fujita N, Nakao M, Dragich J, Schanen C, Tamura M. Functional analyses of MeCP2 mutations associated with Rett syndrome using transient expression systems. *Brain Dev* 23:S165-173, 2001.
6) Kudo S, Nomura Y, Segawa M, Fujita N, Nakao M, Schanen C, Tamura M. Heterogeneity in residual function of MeCP2 carrying missense mutations in the methyl CpG binding domain. *J Med Genet* 40:487-493, 2003.

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

1) Takahashi K, Orba Y, Kimura T, Wang L, Kohsaka S, Tsuda M, Tanino M, Nishihara H, Nagashima K, Sawa H, Tanaka S. The relationship between methyl CpG binding protein 2 and JC viral proteins. *Jpn J Infect Dis*, in press.

2. 学会発表

1) 高橋健太, 木村太一, 王　磊, 高阪真路, 工藤伸一, 奴久妻聡一, 谷野美智枝, 西原広史, 澤　洋文, 長嶋和朗, 田中伸哉. メチル化遺伝子結合蛋白 MeCP2 の JC ウイルス関連蛋白による転写制御の解析. 第 53 回日本神経病理学会, 新潟, 6.28-30, 2012.

H.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

1) 発明の名称：Treatment of PML targeting JC virus agno（JC ウイルス agno を対象とした PML の治療）
出願国：カナダ
出願人：Japan Science and Technology Agency（独立行政法人科学技術振興機構）
発明者：Kazuo Nagashima（長嶋和郎）, Hirofumi Sawa（澤　洋文）, Yuki Okada（岡田由紀）
出願番号（出願日）：2467930（2002/6/5）
公報番号（公報日）：2467930（2003/5/30）
特許許可通知発行日：2012/10/5

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし