

York, June 19-20, 2013.

2) 宍戸-原由紀子. 基礎と臨床の架け橋の病理学を目指して. 第 102 回日本病理学会総会, 札幌, 6.26-28, 2013.

3) 頼元雅慧, 此田奈央, 宍戸-原由紀子, 永根基雄, 矢澤卓也, 菅間 博. JC ウイルスはヒト脳腫瘍を発生させるのか? 脳腫瘍組織におけるウイルス再活性化の可能性. 第 102 回日本病理学会総会, 札幌, 6.26-28, 2013.

4) 宍戸-原由紀子, 内原俊記. 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. 第 54 回日本神経病理学会, 東京, 4.24-26, 2013.

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

進行性多巣性白質脳症（PML）診療、1年間の進歩 - Natalizumab-Associated PML 発症の予見因子や MRI 画像の特徴など -

研究分担者：雪竹基弘 佐賀大学医学部内科（神経内科）

研究要旨 2012年11月から2013年10月までに報告されたPMLの診断・治療に関する論文を中心に検索した。多発性硬化症(MS)とNatalizumab治療では、PML発症前における抗JCウイルス抗体価の変化や頭部MRIにおいて他のPMLとは異なった画像特徴の報告などPML発症を早期に検出する可能性の検討が深まっている。メフロキンのPML治療は本年も散見される。海外におけるHIV-PMLに対する評価は否定的である報告が出たが、非HIV-PMLに対する評価はまだ確定されていない。2013年、本邦でもPML診断基準を改訂したが、American Academy of Neurology(AAN)においても診断基準が提唱された。

A. 研究目的

PMLは稀な疾患だが、HIV感染者の増加や免疫抑制剤などの汎用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MS治療における副作用として関心が急速に高まっている。治療においてはメフロキン使用例の報告が今年も散見されるが、画期的な治療法は確立していない。

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の診療に関する論文をレビューした。本年は其中でMSにおけるNatalizumab-Associated PML発症の予見因子の検討やMRI画像の特徴などを中心に報告する。

B. 研究方法

2012年11月から2013年10月に報告されたPMLに関する論文を、主にPubMedで検索した。

(倫理面への配慮)

文献検索とそのレビューが主体であり、引用論文はすべて執筆者、雑誌名などを提示しており倫理面の問題はないと考える。

C. 研究結果

MSにおけるNatalizumab-Associated PMLでは抗JCウイルス抗体陽性などがリスクファク

ターにあげられているが、PML発症時に抗体価がNatalizumab投与前より上昇していたり、発症前から抗体上昇がみられることが報告された(図1)¹⁾。これらは、経過において抗体価の上昇がPML発症を予見する因子である可能性を示唆する。

また、Natalizumab-Associated PMLの頭部MRIは通常のPMLとは異なる所見を呈する場合があることが報告された。

画像特徴としては

- 3 cm以上：15/18(83%)
- 皮質下病変：18/18(100%)
- T2/FLAIR高信号：18/18(100%)
- T1低信号：17/18(94%)
- DWI高信号：15/15(100%)
- 病変の辺縁は灰白質方向に鋭く、白質方向では不鮮明：18/18(100%)
- Gd増強効果：7/17(41%)

があげられているが、皮質下病変とGd増強効果(通常のPMLでは10-15%程度)が強調されている(図2)²⁾。

海外のHIV-PML29例によるメフロキンの評価では、髄液JCV DNAコピー数はメフロキン投与で変化がなく、臨床スコアも両群で差異を認めなかったため、有効ではないとの判断となっている。ただし、メフロキン非投与群は16週において経過観察可能な症例がなくなっている(図3)³⁾。その他、メフロキン投与の症例報

告は今年も散見されており、本邦に多い非 HIV-PML に関する評価が待たれる。

AAN の PML 診断基準⁴⁾は本邦と異なり、「病理、免疫染色または電顕および髄液 JCV DNA での診断基準」と「臨床、画像および髄液 JCV DNA での診断基準」が提唱されている。病理所見では以下を trias としている。

1. demyelination
2. bizarre astrocytes
3. enlarged oligodendroglial nuclei

どちらの診断基準も髄液 JCV DNA を重視した形になっている。なお后者は病理所見がなくても definite と診断できる(図 4)。

D. 考察

Natalizumab による PML はその特徴・治療指針、発症予見のデータなど対応が進んできている。メフロキンの評価は海外の HIV-PML を中心とした治験ではウイルス量の低下は認められなかったが、非 HIV-PML への効果など検討課題がある。AAN の PML 診断基準と本邦の「進行性多巣性白質脳症(PML)の診断基準 2013」を比較すると、AAN のものは病理所見がなくても definite と診断できる点が特徴である。

E. 結論

1. Natalizumab による MS 患者の PML はその特徴・発症予見の検討など解析が進んできている。
2. メフロキンの非 HIV-PML に対する効果に関してははまだ定まっていないと考える。
3. AAN から PML 診断基準が提唱された。

[参考文献]

- 1) Warnke C, Ramanujam R, Plavina T, et al. Changes to anti-JCV antibody levels in a Swedish national MS cohort. *J neurol neurosurg psychiatry* 84:1199-1205, 2013.
- 2) Yousry TA, Pelletier D, Cadavid D, et al. Magnetic resonance imaging pattern in natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann neurol* 72:779-787, 2012.
- 3) Clifford DB, Nath A, Cinque P, et al. A study of mefloquine treatment for progressive multifocal

leukoencephalopathy: results and exploration of predictors of PML outcomes. *J neurovirol* 9:351-358, 2013.

4) Berger JR, Aksamit AJ, Clifford DB, et al. PML diagnostic criteria: consensus statement from the AAN neuroinfectious diseases section. *Neurology* 80:1430-1438, 2013.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 森本 彩, 上野弘貴, 藤井裕樹, 中村 毅, 中道一生, 西條政幸, 雪竹基弘, 松本昌泰. 診断に磁化率強調画像が有用で、メフロキン投与にて改善をみとめなかった悪性リンパ腫合併進行性多巣性白質脳症の 1 例. *臨床神経* 53:843-847, 2013.
- 2) 田口 明, 雪竹基弘. プリオン病(クロイツフェルト・ヤコブ病)の 2 例. *Neuro Imaging Conference* 17:72-74, 2013.
- 3) 雪竹基弘. 抗ウイルス薬. 水澤英洋, 鈴木則宏, 梶 龍兒, 吉良潤一, 神田 隆, 斎藤延人・編 今日の神経疾患治療指針 第 2 版, 医学書院, 東京, pp174-177, 2013.

2. 学会発表

- 1) 小川始至夏, 江里口誠, 岡 孝之, 小杉雅史, 佐藤克也, 雪竹基弘, 原 英夫. 非痙攣性てんかん重積で発症し QUIC 法が陽性であり孤発性 Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD) が疑われた一例. 第 18 回日本神経感染症学会総会学術集会, 宮崎, 10.11-12, 2013.

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. MSにおけるNatalizumab-Associated PMLの発症予見因子（血清抗JCV抗体）

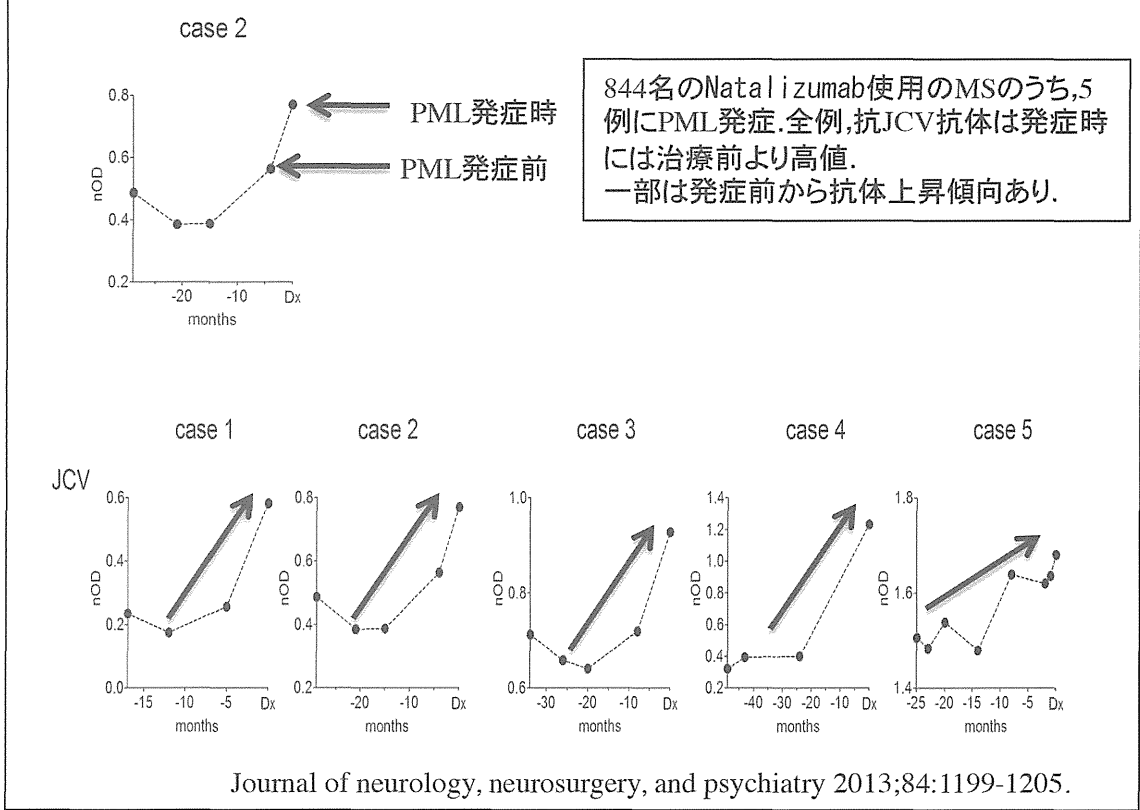
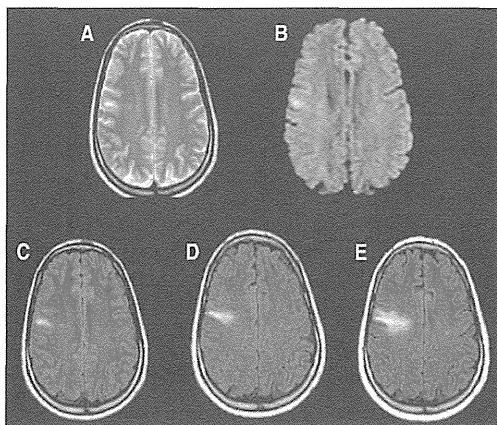


図2. 22例のNAT-associated PML（原疾患はMS）のMRI解析.

Early PML→IRIS



Annals of neurology 2012;72:79-787.

画像特徴として特に

1. Gd増強効果 (41%)
2. 皮質下病変 が強調されている.

その他,

- 3 cm以上 : 15/18
- T2/FLAIR高信号 : 18/18
- T1低信号 : 17/18
- DWI高信号 : 15/15
- 病変の辺縁は灰白質方向に鋭く, 白質方向では不鮮明 : 18/18

図3. HIV-PMLに対するメフロキンの評価

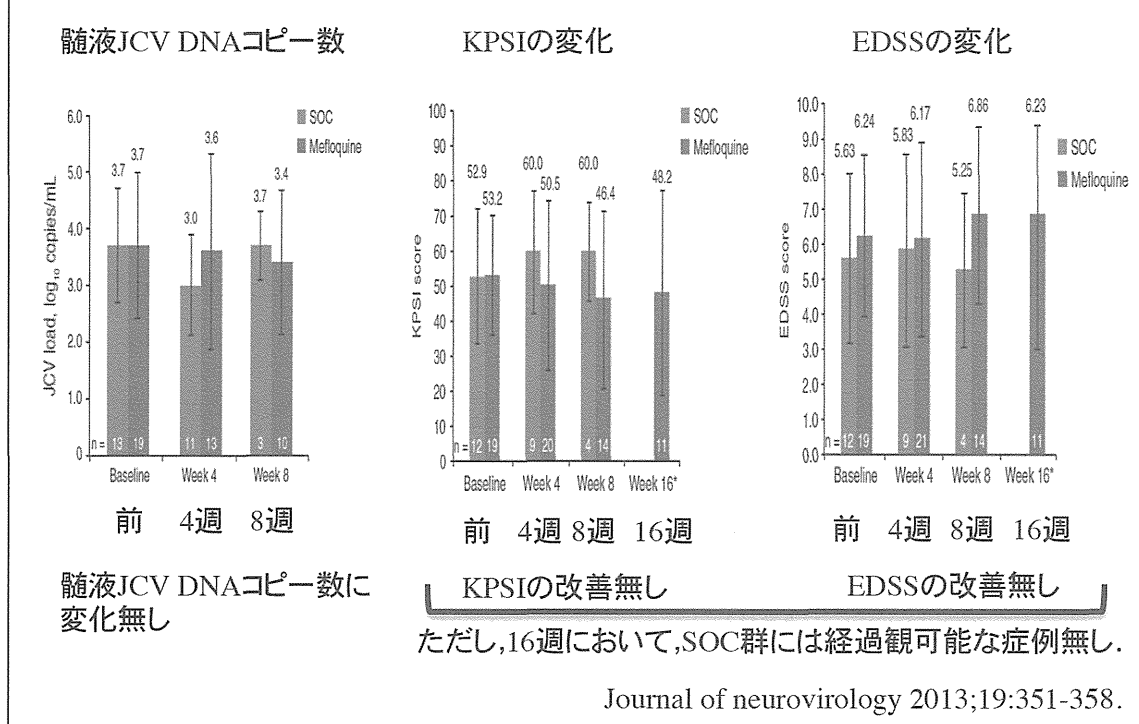


図4. PML診断基準2013とAANのPML診断基準の比較

AAMの臨床、画像および髄液JCV DNAでの診断基準

Table 2 Establishing the diagnosis with clinical, radiographic, and laboratory data^a

Certainty of PML diagnosis	臨 床			画 像		髄 液	
	Compatible clinical features	Compatible imaging findings	Compatible imaging findings	Compatible imaging findings	CSF PCR for JC virus	CSF PCR for JC virus	CSF PCR for JC virus
Definite	+	+	+	+	+	+	+
Probable	+	-	+	+	+	+	+
Possible	+	+	-	-	-	-	-/ND
Not PML	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: ND = not done or equivocal result; PML = progressive multifocal leukoencephalopathy.

^a+ = Positive; - = negative.

Neurology 2013;80:1430-1438.

進行性多巣性白質脳症(PML)の診断基準2013

表6 進行性多巣性白質脳症(PML)の診断基準

厚生労働科学研究補助金 難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患克服研究事業) プリオン病及び連発性ウイルス感染症に関する調査研究班, 2013

- Definite PML: 下記基準項目の5を満たす。
Probable PML: 下記基準項目の1, 2, 3および4を満たす。
Possible PML: 下記基準項目の1, 2および3を満たす。
- 成人発症の急性進行性の脳症(1)
 - 脳MRIで、白質に脳浮腫を伴わない大小不同、融合性の病変が散在(2)
 - 白質病変をきたす他疾患を臨床的に除外できる(3)
 - 脳脊髄液からPCRでJCV DNAが検出(4)
 - 剖検または生検で脳に特徴的病理所見(5)とJCV感染(6)を証明

PCR: polymerase chain reaction

本邦の「進行性多巣性白質脳症(PML)の診断基準2013」ではPMLの病理所見がある場合にDefinite.

AANの診断基準は病理所見がなくてもDefiniteの診断可能.

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 ウイルスのコードする agnoprotein の viroporin 活性発現メカニズムの解明

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
 研究協力者：鈴木忠樹 国立感染症研究所感染病理

研究要旨 JC ウイルスは、免疫不全状態等で致死性の脱髄疾患である進行性多巣性白質脳症を惹起する。我々はこれまでに、JC ウイルスの agnoprotein はウイルス粒子の放出を促進するウイルスタンパク質である viroporin として機能することを報告している (PLoS Pathogens, 2010)。本研究では JC ウイルスの agnoprotein に結合する宿主タンパク質として adaptor protein complex 3 の δ サブユニット (AP3D) を同定し、agnoprotein が AP3D と結合することにより viroporin として機能することを明らかにした。さらに、agnoprotein と AP3D の結合を阻害することにより JC ウイルス感染を抑制した。

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)-8)。JC ウイルスの後期タンパク質である agnoprotein はウイルス粒子の放出を促進するウイルスタンパク質である viroporin として機能している。本研究では、agnoprotein の宿主タンパク質との相互作用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を解明することを目的とし、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

本研究は、宿主細胞内において viroporin として機能する JC ウイルスの後期タンパク質である agnoprotein の宿主因子との相互作用を明らかにするために、yeast 2-hybrid system を用いて agnoprotein に結合する宿主因子を探索した。

さらに、agnoprotein 結合因子として同定した adaptor protein complex 3 の δ サブユニット (AP3D) との相互作用について、分子生物学的

手法を用いて種々の agnoprotein 及び AP3D の変異体を作成し詳細に検討した。また、生化学的及び免疫学的手法を用いて、viroporin としての機能に重要な役割を果たす責任部位を同定すると共に、agnoprotein と AP3D の相互作用が宿主細胞やウイルス感染に及ぼす影響について細胞生物学的手法を用いて詳細に解析した。

(倫理面への配慮)

本実験で用いられた JC ウイルスは 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実施した。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において [実験番号 011(10)] 承認されている。本研究で実施した遺伝子組換え実験は、北海道大学遺伝子組換え実験等安全委員会、及び文部科学大臣から承認を得ている [承認番号 24(35)、24 受文科振第 2471 号]。

C. 研究結果

- 1) JC ウイルスの後期タンパク質である agnoprotein に結合する宿主因子として AP3D を同定した。
- 2) agnoprotein は AP3D と結合し、細胞内小胞輸送系を阻害した。
- 3) AP3D のフラグメントである Y27C タンパク

質は、agnoprotein と AP3D の相互作用を阻害し、ウイルス粒子の細胞外放出を抑制した(図 1)。4) agnoprotein は AP3D の機能を阻害することにより、細胞表面上に発現し viroporin としての機能を獲得していた(図 2)。

D. 考察

本研究により、JC ウイルスの agnoprotein が viroporin として機能するには、細胞膜上に pore を形成することだけでなく、特定の宿主因子である AP3D と直接相互作用することが必要不可欠であることが明らかになった。さらに、agnoprotein と宿主因子 AP3D との特異的相互作用は JC ウイルス感染症治療薬の新たな標的となる可能性が示された。

本研究で示された viroporin と特定の宿主因子との相互作用によるウイルス粒子放出制御機構は、viroporin を有する他のウイルスにも存在することが予想されるので、今後、様々なウイルスで viroporin を標的とした新規の抗ウイルス薬の開発が期待される。

E. 結論

agnoprotein の viroporin 機能は、宿主因子との特異的な相互作用により制御されている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) 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.

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

6) 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.

7) Takahashi K, Orba Y, Kimura T, Wang L, Kohsaka S, Tsuda M, Tanino M, Nishihara H, Nagasima K, Sawa H, Tanaka S. The relationship between methyl CpG binding protein 2 and JC viral proteins. *Jpn J Infect Dis* 66:126-132, 2013.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kobayashi S, Suzuki T, Igarashi M, Orba Y, Ohtake N, Nagakawa K, Niikura K, Kimura T, Kasamatsu H, Sawa H. Cysteine residues in the major capsid protein, Vp1, of the JC Virus are important for protein stability and oligomer formation. *PLoS One* 8:e76668, 2013.
- 2) Suzuki T, Orba Y, Makino Y, Okada Y, Sunden Y, Hasegawa H, Hall WW, Sawa H. Viroporin activity of the JC polyomavirus is regulated by interactions with the adaptor protein complex 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:18668-18673, 2013.

2. 学会発表

- 1) Sawa H. Investigation of the role of JC virus VP1 cysteine residues. The 5th International Conference on Polyomaviruses and Human Diseases: Basic and Clinical Perspectives, Stresa, May 7-12, 2013.
- 2) Sawa H. Investigation of the mechanism of

virion formation and its application in neurovirology research. The 12th International Symposium on Neuro Virology and 2013 Conference on HIV in the Nervous System, Washington D.C., October 29-November 2, 2013.

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

図1 JC ウイルスの外郭タンパク質 VP1、agnoprotein (Agno)および、AP3D フラグメント Y27C、internal control である actin の immunoblotting の図。

SUP は JC ウイルス感染細胞の上清、WCL は細胞の lysates を示している。

JC ウイルス agnoprotein の結合タンパク質である AP3D のフラグメント Y27C タンパク質は JC ウイルスの細胞外放出を抑制している。

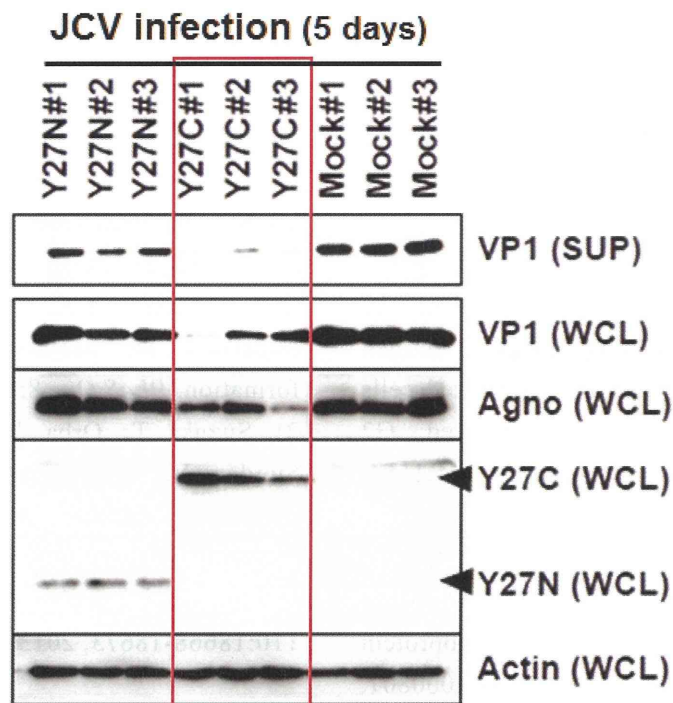
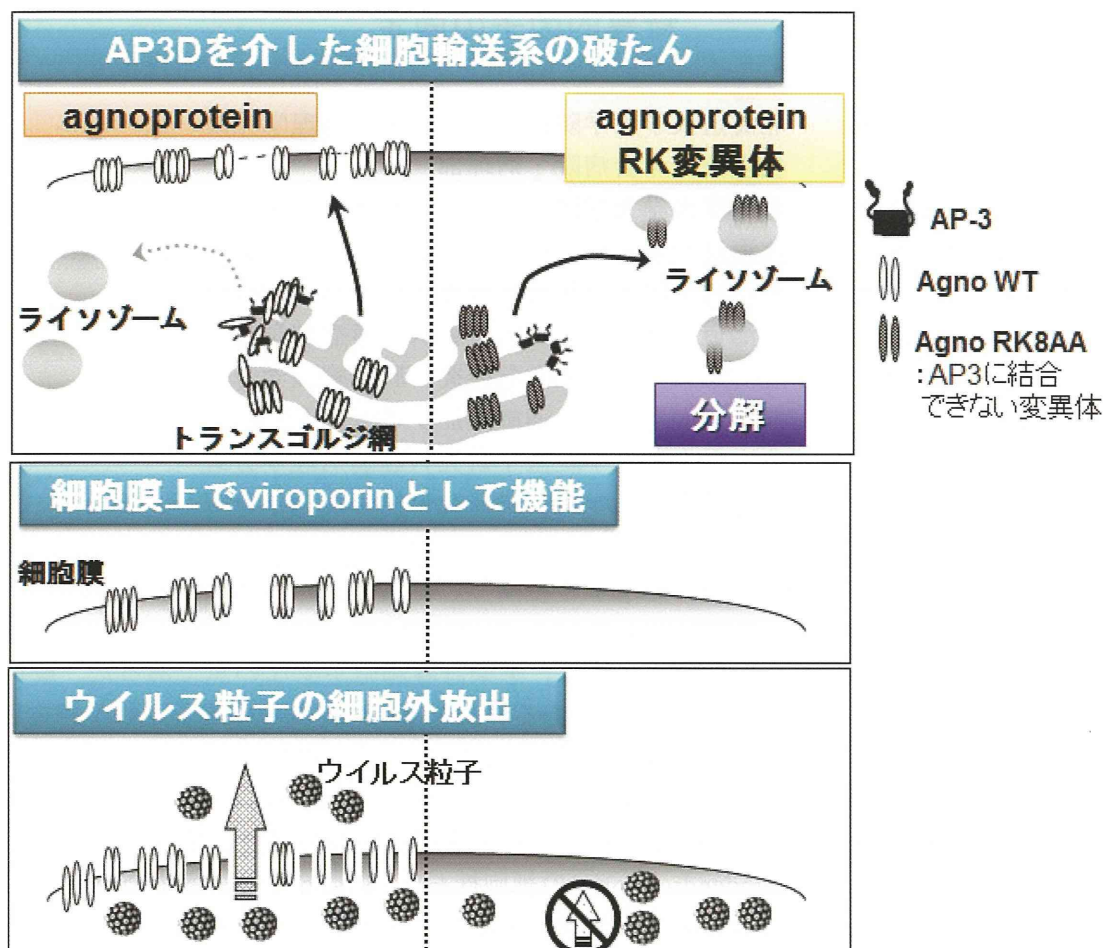


図2 JCウイルス agnoprotein と AP3D の相互作用と viroporin 機能発現機構の模式図。

JCウイルス agnoprotein は AP3D の機能を阻害することにより、細胞表面上に発現し viroporin としての機能を獲得している。



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

OligodendrogliaにおけるJC virus 感染許容細胞の検索および 特異的因子の同定

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：加藤容崇	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：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：西原広史	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 PMLはJC virusがoligodendrogliaに感染し、髄鞘保持機能を破壊する為に生ずる脱髄性疾患であるが、oligodendrogliaに感染する為の特異的因子の同定に関しては長い間の研究目的の一つであった。研究が困難であった理由の一つは、感染許容細胞が少ない点であった。最初に報告された細胞株はhuman neuroblastoma由来細胞であるIMR32細胞で、この細胞を用いて核内因子DDX1が同定された。しかし、DDX1はoligodendrogliaに必ずしも多く発現されるという特異的因子ではなく、他のfactorの存在が示唆されている。他にもJCV感染許容細胞はhuman fetal glial cellにて報告されているが、oligodendroglia系細胞においてJCV増幅を伴う維持型持続感染は未だ報告されていない。そこで、今回我々はoligodendrogliaの細胞株およびastrocytoma系の細胞株を用いてJCV感染実験を行った。Oligodendrogliaの細胞株であるU87細胞株にのみ持続感染が認められ、同じOligodendroglia系の細胞株であるA172およびastrocytoma系であるKMG4、U251細胞株には感染しなかった。今後U87細胞株を用いてOligodendroglia特異的JCV増殖因子の検索を行う予定である。

A. 研究目的

JCVはPMLの原因ウイルスでありoligodendrogliaに感染し、髄鞘保持機能を破壊する為に生ずる脱髄性疾患であるが、oligodendrogliaに感染する為の特異的因子の同定に関しては長い間の研究目的の一つであった。研究が困難であった理由の一つは、感染許容細胞が少ない点であった。今回我々は新たな許容細胞を検索し、別の側面からoligodendroglia特異性を検討することとした。

一方、KMG4、U251はastrocytomaの細胞株と考えられ、これら4種類の細胞株を用いてJC virus感染実験を行った。細胞株は感染前日に6cm dishに 1×10^6 個播種し24時間後細胞が接着していることを確認した後、1 dishあたり800 HAUとなるようにJC virusをinoculateし、37°C、5% CO₂にて48時間培養する。Inoculateして、4日、7日、14日、21日、28日後に抗VP1抗体を用いた細胞免疫染色を行い評価した。JC virusはJCI細胞から既報通りの方法により抽出されHA価の測定を行ったものを用いた。

B. 研究方法

U87とA172は1p19qのdeletionが報告されておりoligodendrogliaの細胞株と考えられる。

（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) U87 細胞株に維持型持続感染が認められた (図 1)。
- 2) A172、KMG4、U251 細胞株には感染が認められなかった (図 2)。

D. 考察

U87 細胞株に維持型持続感染が成立したことは、新たな JC virus 感染における許容細胞の可能性があり、oligodendroglia の JV virus 感染における特異的因子を検索する上で重要な知見である。Oligodendroglioma 細胞株でも A172 細胞株で感染が認められなかったことから、同じ Oligodendroglia であっても JCV 増殖における特異的核内因子の存在が異なる可能性があり、特異的因子同定につながる重要な所見である。

E. 結論

JCV 新規感染許容細胞の検索では U87 細胞株にて維持型持続感染が認められた。

[参考文献]

- 1) Law ME, Templeton KL, Kitange G, Smith J, Misra A, Feuerstein BG, Jenkins RB. Molecular cytogenetic analysis of chromosomes 1 and 19 in glioma cell lines. *Cancer Genet and Cytogenet* 160:1-14, 2005.

- 2) Sunden Y, Semba S, Suzuki T, Okada Y, Orba Y, Nagashima K, Umemura T, Sawa H. DDX1 promotes proliferation of the JC virus through transactivation of its promoter. *Microbiol Immunol* 51:339-347, 2007.

- 3) 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 Pathog* 6:e1000801, 2010.

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. Relationship between methyl CpG binding protein 2 and JC viral proteins. *Jpn J Infect Dis* 66:126-132, 2013.

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

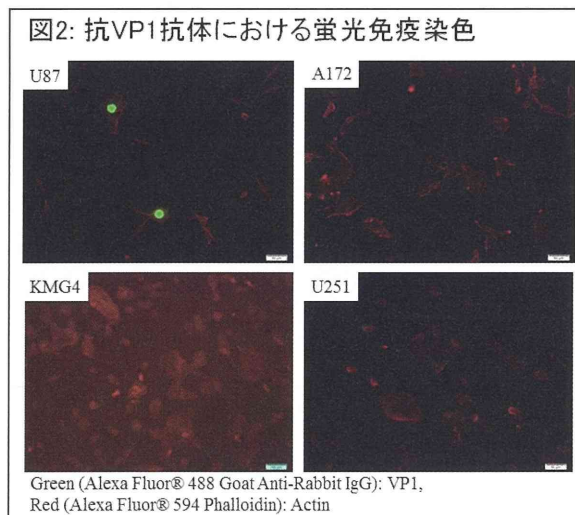
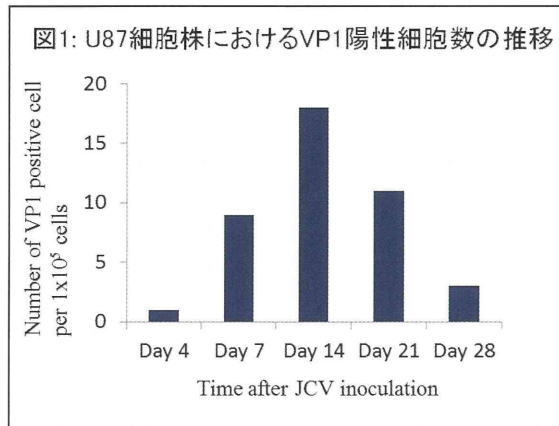
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



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

TNF- α による JCVDNA 複製の促進

研究分担者：奴久妻聡一	神戸市環境保健研究所感染症部
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え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 エイズ患者で進行性多巣性白質脳症 (PML) が増加しているのは、JC ウイルス (JCV) の増殖を促進する因子が存在するためだと考えられる。我々は過去に神経芽細胞腫である IMR-32 細胞を用いて、Tat タンパクが JCV の増殖を促進することを明らかにした。しかし、Tat タンパク以外の因子も JCV の増殖を促進する可能性があることから、本研究では IMR-32 細胞を用いて検討したところ、Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) が JCV の複製を促進することを明らかにした。さらに、JCV 複製促進機構を解明するために、TNF- α 添加による JCV Large T と VP1 の発現量を real-time RT-PCR により定量したところ、Large T のみに有意な発現の増加がみられた。また、核内転写調節因子である NF- κ B の活性化に伴う p65 の核移行量と細胞増殖への影響を調べたところ、p65 の核移行量は増加していたのに対して、細胞増殖には影響がなかった。これらのことから、TNF- α は IMR-32 細胞内の NF- κ B の活性化によって Large T の発現を高め、DNA 複製の促進に関与している可能性が示唆された。

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 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に感染し、直接細胞を破壊することで脱髄を引き起こすものである。また、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で有効な治療薬がない。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 PML 患者数は増加している。エイズ関連の PML (HIV-PML) が増加しているのは、JCV の増殖を促進する因子が存在するためだと考えられるが、我々は過去に神経芽細胞腫である IMR-32 細胞を用いて、Tat タンパクが JCV の増殖を促進することを明らかにした。一方、ヒトのオリゴデンドロサイト由来の細胞株を用いて、Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) が JCV の前期および後期プロモーターを活性化することが報告されていることから、HIV-が感染したマクロファージ系

の細胞より産生された TNF- α が JCV の複製を促進する可能性が示唆された。

本研究では IMR-32 細胞を用いて、TNF- α の JCV 複製促進について検討した。さらに、JCV 複製促進機構を解明するために、TNF- α 添加による JCV Large T と VP1 の発現量を real-time RT-PCR により定量し、核内転写調節因子である NF- κ B の活性化に伴う p65 の核移行量と細胞増殖への影響も調べた。

B. 研究方法

1) JCV Large T と VP1 の発現解析

IMR-32細胞にM1-IMRb DNA (IMR-32細胞で最も良く増殖するJCV)を1 μ gトランスフェクトし、TNF- α を25ng/mlで添加した群 (TNF- α 群) と添加しない群 (コントロール群) から48時間後に細胞からRNAを抽出し、JCV Large TとVP1の発現量をreal-time RT-PCRにより定量した。

2) JCV DNA複製の解析

Large TとVP1の発現促進の解析と同一条件でIMR-32細胞にM1-IMRb DNAをトランスフェクトし、TNF- α を25ng/mlで添加し48時間後にTNF- α 群とコントロール群の細胞から低分子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。

3) JCVの増殖の解析

IMR-32細胞にM1-IMRb DNAをトランスフェクトし、TNF- α を25ng/mlで添加し継代培養21日後の細胞より凍結融解操作にてウイルスを回収した後、DNase処理とreal-time PCRを組み合わせたDNase protection assayによりウイルス粒子由来のDNAを定量した。

4) NF- κ Bと細胞増殖への影響

TNF- α がJCVの前期および後期プロモーターを活性化することが促進することが過去に報告されている。JCV複製促進機構を解明するために、TNF- α を25ng/mlでIMR-32細胞に添加し、3日後のNF- κ Bの活性化に伴うp65の核移行量をNF- κ B/p65 ActivELISA Kitにて定量した。

また、TNF- α の細胞毒性を調べるために、同じ濃度のTNF- α を添加し、3日後のIMR-32細胞の増殖をCell Proliferation Kit I(MTT法)でコントロール群と比較した。

5) 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) TNF- α のJCV Large TとVP1の発現促進

JCV Large TとVP1の発現量をreal-time

RT-PCRにより定量したところ、VP1の発現量はTNF- α 群がコントロール群に比べて2倍の上昇であったのに対して、Large Tの発現量は6.2倍となり有意な増加がみられた($p < 0.05$)。

2) TNF- α のJCV DNA複製の促進

IMR-32細胞にM1-IMRb DNAをトランスフェクトし、TNF- α を25ng/mlで添加した細胞から低分子DNAを抽出しDNA replication assayを行ったところ、48時間後でTNF- α 群がコントロール群に比べてDNA複製量は2倍多く、有意差がみられた($p < 0.05$) (図1)。

3) TNF- α のJCVの増殖促進

DNase処理とreal-time PCRを組み合わせたDNase protection assayによりウイルス粒子由来のDNAを定量したところ、TNF- α 群がコントロール群に比べて1.5倍増加していたが、有意差はみられなかった。

4) NF- κ Bの活性化と細胞増殖への影響

IMR-32細胞においてTNF- α の添加により、p65の核移行量が2.3倍増加し有意差がみられ($p < 0.01$)、NF- κ Bが活性化していた。また、MTT法でTNF- α の細胞増殖への影響を調べたところ、細胞増殖には影響がなかった。

D. 考察

近年、エイズ感染に関連して発症したPML、いわゆる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。しかしながら、先進国でエイズ患者が増えているのは日本だけであるという現状を考えればHIV-PMLがエイズの日和見感染症として重要な神経疾患であることには変わりはない。

ところで、HIV-PMLが増加しているのは、JCVの増殖を促進する因子が存在するためだと考えられるが、我々は以前に神経芽細胞腫であるIMR-32細胞を用いて検討したところ、TatタンパクがJCVの増殖を促進することを明らかにした。しかし、Tatタンパク以外の因子もJCVの増殖を促進する可能性があることから、本研究ではIMR-32細胞を用いて、TNF- α がJCVの複製を促進することを明らかにした。実際、過去の報告において、ヒトのオリゴデンドロサイトー

マ由来の細胞株を用いて、TNF- α がJCVの前期および後期プロモーターを活性化することが報告されていることから、我々が得られた知見と合わせるとHIV-1が感染したマクロファージ系の細胞より産生されたTNF- α がJCVの複製を促進する可能性が示唆された。

さらに、JCV複製促進機構を解明するために、TNF- α 添加によるJCV Large TとVP1の発現量をreal-time RT-PCRにより定量したところ、Large T のみに有意な発現の増加がみられた。また、核内転写調節因子であるNF- κ Bの活性化に伴うp65の核移行量と細胞増殖への影響を調べたところ、p65の核移行量は増加していたのに対して、細胞増殖には影響がなかった。これらのことから、TNF- α はIMR-32細胞内のNF- κ Bの活性化によってLarge Tの発現を高め、DNA複製の促進に関与している可能性が示唆された。これらの知見からTNF- α がエイズにおけるPML発症の要因のひとつであると考えられた。

E. 結論

本研究では、TNF- α 添加によるreal-time RT-PCRによるJCV Large TとVP1の発現解析、DNA replication assayおよびDNase protection assayによりJCVDNAを定量したところ、TNF- α 添加によりLarge Tの発現が高まり、JCVの複製および増殖が促進されることは明らかである。さらに、NF- κ Bの活性化に伴うp65の核移行量が増加していたことから、TNF- α はIMR-32細胞内のNF- κ Bの活性化によってLarge Tの発現を高め、DNA複製の促進に関与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nukuzuma S, Nakamichi K, Kameoka M, Sugiura S, Nukuzuma C, Tasaki T, Takegami T. TNF- α stimulates efficient JC virus replication in neuroblastoma cells. *J Med Virol*, in press.

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, 田崎隆史, 竹上 勉. PARP-1 阻害剤の in vitro における JC ウイルス増殖抑制効果. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 11.10-12, 2013.

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

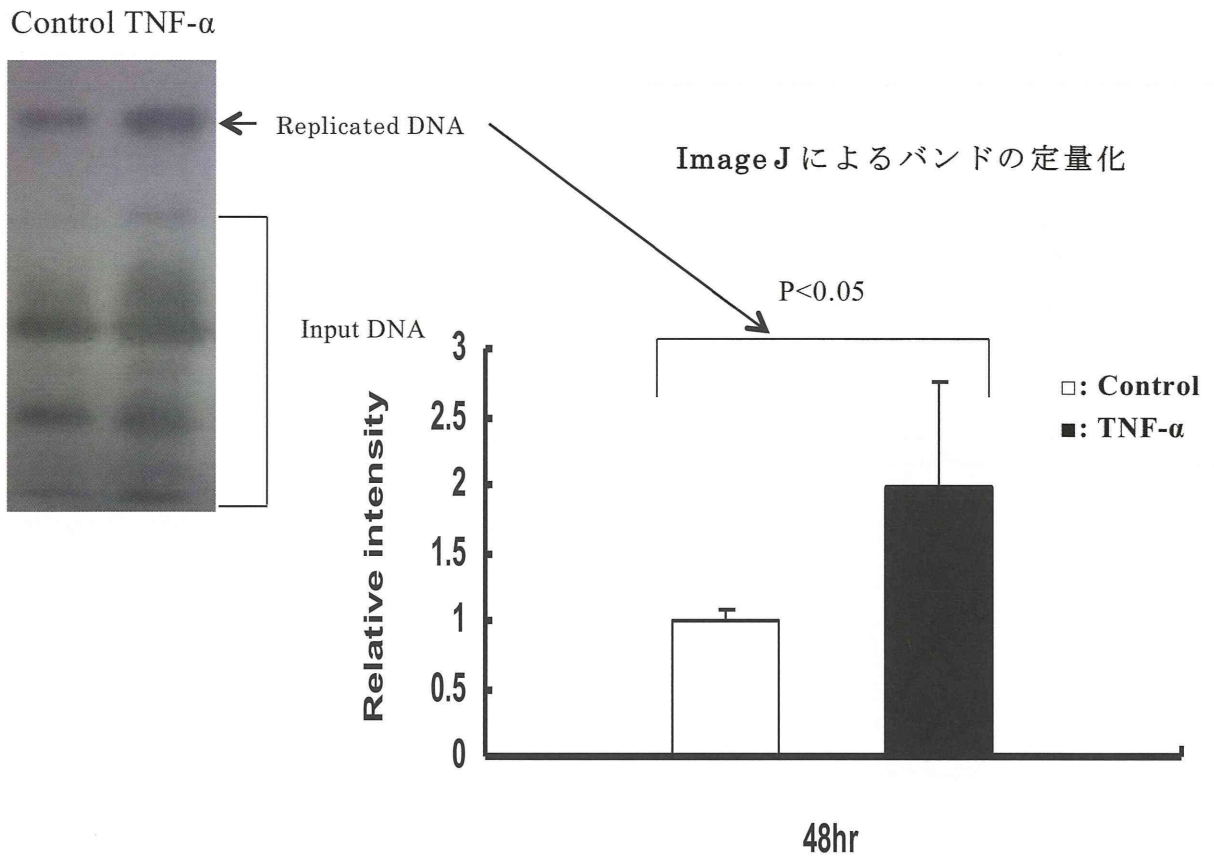


図 1. IMR-32 細胞における TNF- α の JCV DNA 複製促進 (DNA replication assay)

[Ⅲ] 研究成果

神経血管減圧術(Jannetta手術)を受けた硬膜移植後 Creutzfeldt-Jakob病の検討

研究分担者: 金沢大学大学院脳老化・神経病態学(神経内科学) 山田正仁

Clinical manifestations of non-plaque-type cases

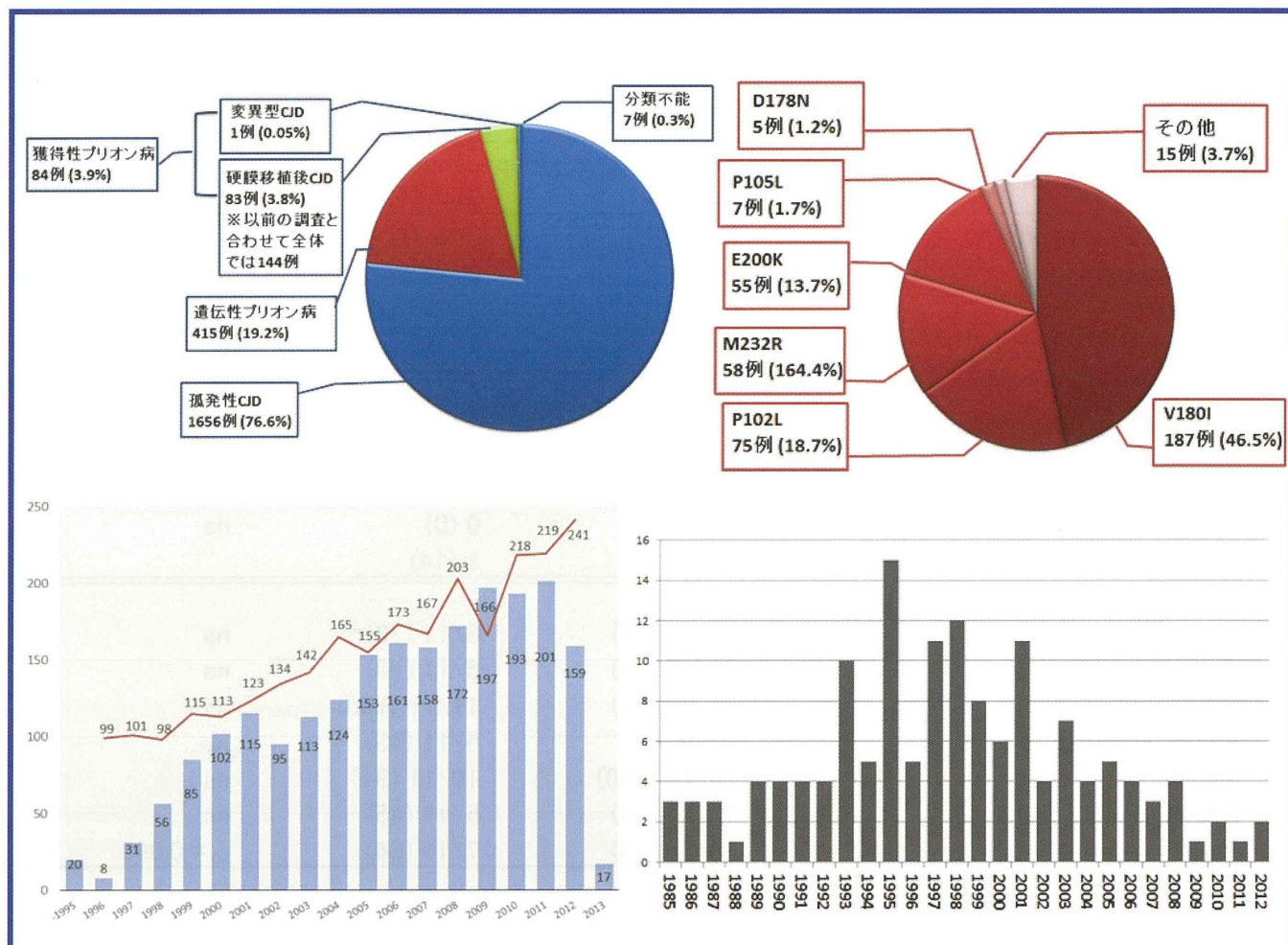
	Supratentorial group (n = 20)	Jannetta group (n = 11)	p value
Initial manifestations (%)	(n = 16)	(n = 7)	
Unsteady gait	4 (25)	2 (29)	ns
Dementia	6 (38)	2 (29)	ns
Vertigo	0 (0)	2 (29)	p = 0.083
Behavioral abnormality	4 (25)	1 (14)	ns
Ataxia	3 (19)	1 (14)	ns
Diplopia	0 (0)	2 (29)	p = 0.083
Sensory disturbance	1 (6)	0 (0)	ns
Extrapyramidal signs	1 (6)	0 (0)	ns
Others	3 (19)	1 (14)	
Manifestations during clinical course (%)			
Cerebellar signs	10/20 (50)	8/11 (73)	ns
Psychiatric feature	11/17 (65)	8/11 (73)	ns
Dementia	19/20 (95)	11/11 (100)	ns
Visual disturbance	8/19 (42)	5/11 (45)	ns
Myoclonus	20/20 (100)	10/11 (91)	ns
Extrapyramidal signs	12/20 (60)	5/11 (45)	ns
Pyramidal signs	18/20 (90)	7/11 (64)	p = 0.098

解 説

1. 2012年6月までにJannetta手術を受けた硬膜移植後CJDは26例であった。
2. Jannetta手術例の移植時年齢、発症時年齢、移植から発症までの期間の平均はそれぞれ50歳、61歳、11年であった。
3. 非プラーク型のみ解析では、Jannetta手術例では TENT 上に移植された群と比較して vertigo や複視で発症する症例が多い傾向がみられた。

わが国におけるプリオン病のサーベイランス (2013年9月まで)

研究分担者: 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科) 水澤英洋

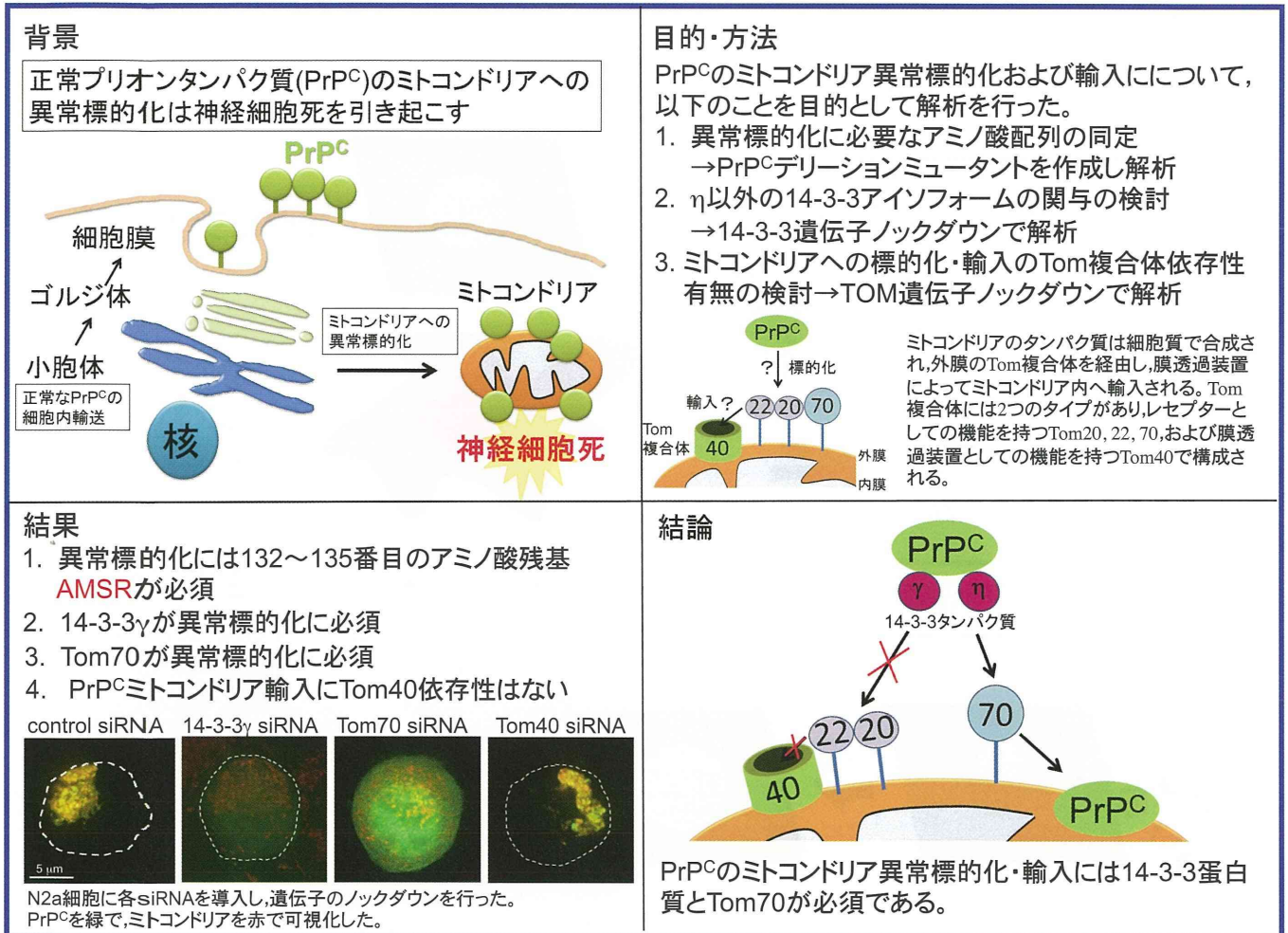


解説

1. サーベイランス委員会は1999年4月から2013年9月までに2162例のプリオン病を同定した。病型、および変異遺伝子ごとの頻度を図示した。プリオン病患者数は近年増加しているようにも見え、今後も注意深いサーベイランス調査が必要である。
2. 病型別の割合は孤発性CJDが1,656例(76.6%)、遺伝性プリオン病が415例(19.2%)、硬膜移植後CJDが83例(3.8%)であった。
3. 新たな変異型CJDの発症はなかった。硬膜移植例は2012年9月から2例増えて146例となった。獲得性プリオン病の新規発症例は減少傾向にある。
4. 遺伝性プリオン病の遺伝子変異ごとの頻度はV180I、P102L、M232Rの順であり、本邦に特有とも言えるV180Iが最多であった。

正常プリオンタンパク質依存性神経細胞死機構の解析

研究分担者: 東京医科大学医学部神経生理学講座 八谷如美



解 説

1. PrP^Cのミトコンドリアへの異常標的化には、132~135番目のアミノ酸残基が必須であった。
2. 14-3-3γはPrP^Cのミトコンドリア異常標的化に必須であった。
3. Tom70はPrP^Cのミトコンドリア異常標的化に必須であった。
4. PrP^Cのミトコンドリア輸入にTom40依存性はなかった。