

20142/032A-B

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

HIV 陽性者における進行性多巣性白質脳症に対する  
高精度検査技術の開発および診断への応用

(H24-エイズ-若手-002)

平成26年度 総括研究報告書

平成24年度～平成26年度 総合研究報告書

研究代表者 中道 一生

(国立感染症研究所)

平成27(2015)年5月

## 目次

### I. 平成26年度 総括研究報告書

#### 1) 総括研究報告 \*

HIV陽性者における進行性多巣性白質脳症に対する高精度検査技術の開発および診断への応用	5
---	---

2) 研究成果の刊行に関する一覧表	13
-------------------	----

3) 研究成果の刊行物・別刷	17
----------------	----

### II. 平成24年度～平成26年度 総合研究報告書

#### 1) 総合研究報告 \*

HIV陽性者における進行性多巣性白質脳症に対する高精度検査技術の開発および診断への応用	19
---	----

2) 研究成果の刊行に関する一覧表	29
-------------------	----

3) 研究成果の刊行物・別刷	33
----------------	----

※ 若手育成型課題において単独で研究を実施したため分担研究報告は該当しない。

## Ⅱ. 平成24年度～平成26年度 総合研究報告書

### 1) 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

総合研究報告書

HIV陽性者における進行性多巣性白質脳症に対する高精度検査技術の開発  
および診断への応用

研究代表者 中道 一生

国立感染症研究所ウイルス第一部 主任研究官

### 研究要旨

進行性多巣性白質脳症(Progressive Multifocal Leukoencephalopathy, PML)は、JCウイルス(JCV)に起因する脱髄疾患であり、HIV陽性者を中心とした免疫不全患者等において発生する。PMLの診断では、脳脊髄液を用いたJCVゲノムDNAのリアルタイムPCR検査が主流となっている。この検査手法は極めて鋭敏であるが、病原性のない持続感染型JCVの混入、もしくは検体間の汚染によって偽陽性を生じる危険性を有している。PMLが疑われる患者では基礎疾患の治療において化学療法や免疫抑制療法を受けていることが多く、偽陽性はPMLの診断のみならず基礎疾患の治療方針にまで悪影響を及ぼしかねない。PMLを引き起こすタイプのJCVは、ウイルスゲノムの調節領域に多様な変異を有している。そこで、脳脊髄液中に存在するJCVの変異パターンを迅速に識別することで、変異ウイルスの有無およびJCVのPCR検査における偽陽性の可能性を解析するための検査技術の開発を着想した。本研究は、「高解像度融解曲線分析(High-Resolution Melting analysis, HRM)法を用いて、JCVのゲノムDNAに生じるランダムな変異を迅速に識別するための検査系を確立し、PMLの高精度診断技術へと応用すること」を目的とする。平成24年度(研究開始年度)では、JCVゲノムの調節を標的としたHRM検出系を確立した。平成25年度では、PML患者および非PML患者の脳脊髄液を用いた臨床面でのバリデーションを実施し、本検査系をPMLの診断技術として実用化することに成功した。平成26年度(最終年度)では、HRMによるJCVの変異スキャンニングがPML患者のフォローアップにおける検体の識別、もしくは脳組織検査や基礎的研究における変異解析において高い汎用性を有することを示した。以上の結果から、本研究において開発されたHRM検査系は、PMLの診断や治療だけでなくフォローアップ検査や脳組織検査、さらにはPMLの病態機序に関する基礎的研究においても有用であることを示した。

#### 研究分担者

該当なし。(若手育成型の研究課題であり、研究代表者が単独で実施した)

### A. 研究目的

進行性多巣性白質脳症(Progressive Multifocal Leukoencephalopathy, PML)は、ポリオーマウイルス科のJCウイルス(JCV)に起因する脱髄疾患であり、患者の約30～50%をHIV陽性者が占める。JCVは多くの成人に持続感染しており、免疫抑制に伴って変異型ウイルスが出現し、大脳白質等を破壊する。治療がなされない場合、ほぼ全てのPML患者が発症から1年以内に死に至る。AIDS患者の場合にはHIV陽性であることが判明する以前の段階でPMLを発症するケースも珍しくない。

PMLの診断では脳脊髄液を用いたJCVゲノムDNAのPCR検査が有効である。また、近年では高感度な定量的リアルタイムPCRを用いた検査系が数多く開発され、それらはPMLの診断における一般的な検査手法として活用されている。しかし、この手法は健常人においても持続感染している病原性のないアーキタイプJCVの混入、もしくは陽性検体から陰性検体への汚染によって偽陽性を生じるリスクを有している。研究代表者らは、より確実なPMLの診断や治療を目的として偽陽性の有無を迅速に調べるための検査系が必要であると考えた。

PMLを引き起こすタイプのJCVは、ウイルスゲノムの調節領域に多様な変異を有している。そこで、脳脊髄液中に存在するJCVの変異パターンを迅速に識別することで、変異ウイルスの有無およびJCVのPCR検査における偽陽性の可能性を解析するための検査技術の開発を着想した。本研究は、「高解像度融解曲線分析(High-Resolution Melting analysis, HRM)法を用

いて、JCVのゲノムDNAに生じるランダムな変異を迅速に識別するための検査系を確立し、PMLの高精度診断技術へと応用すること」を目的とする。

平成24年度(研究開始年度)では、JCVゲノムの変異領域を標的としたHRM検査系を確立した。平成25年度では、PML患者および非PML患者の脳脊髄液を用いた本検査系の臨床面でのバリデーションを実施し、PMLの診断技術としての実用化に成功した。平成26年度(最終年度)では、PMLの治療や脳組織検査、病態解明への基礎的研究におけるHRM検査系の有用性を解析した。

### B. 研究方法

#### 1) HRM検査系の確立

健常人に持続感染しているJCVのゲノム配列は安定しており、宿主の終生を通じて大きな変異は認められない。一方、PMLを引き起こすJCVではゲノムの転写調節領域(以下、調節領域)において患者個人レベルの多様な変異が生じる。本検査系は、リアルタイムPCR法によって調節領域を増幅した後、そのDNA断片の配列の相違(解離温度の差異)をHRMによって測定することを原理としている。JCVの調節領域のDNA配列を対象とした*in silico*解析によって20種類のプライマーDNAを設計した。リアルタイムPCR-HRM解析にはRoche社製の試薬およびリアルタイムPCR機器を用いた。標準DNAとしてJCVの実験室株(持続感染型CY株、PML型Mad-1株)のゲノムDNAを用いた。上記のプライマーおよび標準DNA等を用いて、リアルタイムPCR-HRMの反応条件(温度、時間、サイクル数、プライマーの組合せや配列の微調整等)を至適化した。次に、健常人の尿およびPML患者の脳脊髄液に由来するJCVのDNAクローン(約100種類)を対象としてリアルタイムPCR-HRMを実施することで、①持続感染型およびPML型の

ゲノムを判別しうるか否か、および②様々なPML型JCVにおける患者個人レベルの変異パターンを識別しうるか否かを解析した。

## 2) 臨床検体を用いたHRM検査系のバリデーション

PML患者の脳脊髄液中には微量のJCV粒子しか放出されていないことが珍しくない。低コピー数のJCV-DNAを検出するため、リアルタイムPCR-HRMにおいて標的としている調節領域の外縁に、1対のDNAプライマーセットを設計した。これらのプライマーおよびコンベンショナルPCRキット(Toyobo社製)を用いて、鋳型となるDNAの標的配列を前増幅した。このPCR産物をリアルタイムPCR-HRMの鋳型として用いた。標準DNA(持続感染型およびPML型のJCVゲノム)の希釈系列を用いて、リアルタイムPCR-HRM検出系の検出限界を解析した。次に、PML疑い患者の脳脊髄液DNA(陽性75検体、陰性453検体)を対象としてリアルタイムPCR-HRMを行い、①PML患者の脳脊髄液中に存在するJCVにおける変異の有無を判別しうるか否か、②JCV陽性の脳脊髄液を患者個人レベルで識別しうるか否か、③JCV陰性の脳脊髄液を検査に用いた場合に非特異的増幅による偽陽性が生じるか否かを解析した。

## 3) PMLの治療もしくは基礎研究におけるHRMスキニングの有用性の評価

PML患者26名を対象として、治療中のフォローアップ検査において本検査が適用しうるか否かを解析した。PML診断時および1~3ヶ月後に採取された脳脊髄液(26組、計52検体)からDNAを抽出し、JCVゲノムの調節領域をリアルタイムPCRによって増幅した。PCRに引き続き同一のチューブ内においてHRMを実施した後、調節領域の解離温度を比較することで、「PMLの治療の際のフォローアップ検査においても

JCVの変異パターンを患者個人レベルで照合しうるか否か」を解析した。

国立感染症研究所感染病理部との共同研究として、リアルタイムPCR-HRM検査が脳組織を用いたPMLの検査において応用できるか否かを解析した。HIV陽性者を含む12名のPML患者の脳組織DNA(複数部位を含む18検体、うち生検10検体)を用いて「各検体をHRMによって識別しうるか否か」を解析した。また、調節領域をプラスミドに接続した後、これらが大腸菌に導入することで変異型JCV-DNAのライブラリー(合計約1,700クローン)を作製した。それぞれの大腸菌の一部を熱処理した後、各配列の変異パターンをHRMによって比較することで、「本検出系がJCV-DNAクロンのハイスループットスクリーニングに応用できるか否か」を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認を受けた後、適切な配慮のもとに実施された。

## C. 研究結果

### 1) HRM検出系の確立

JCVゲノムの調節領域を標的とした20種類のプライマーおよび標準DNAを用いてリアルタイムPCR-HRMを行い、プライマーの組み合わせにおける増幅効率やHRMの波形パターン等を比較した。これらのプライマーセットのうち、3セットのプライマーを用いたリアルタイムPCR-HRMにおいて、JCVゲノムの調節領域の特異的かつ安定的な増幅が認められた。また、これらの検出系を用いることで持続感染型およびPML型のJCVゲノムを容易に判別しうる事が分かった。次に、100種類のJCVのDNAパネルを用いて、これら3系統のリアルタイムPCR-HRM検出系の感度および変異パターンの

波形を解析したところ、1系統のリアルタイムPCR-HRM検出系を用いることで、調節領域の変異の有無や配列の相違を識別することが可能であった。

## 2) 臨床検体を用いたHRM検査系のバリデーション

一般的に、JCVの調節領域はPCRによる増幅効率が低いいため、上記1)の検出系のみによって脳脊髄液中の低コピー数のJCV-DNAを検出することは困難であった。そのため、標的配列の外縁にプライマーセットを設計し、サンプル中のJCVをPCRによって前増幅する手法(Nested PCR-HRM)を考案した。本法を用いることで、検出系の感度が向上し、20コピー/反応の標的配列を検出することが可能であった。約530検体(うち75検体がJCV陽性)を用いた解析の結果、本検出系の感度および精度は、通常のJCV-DNAのクローニングやシーケンシングで用いられるNested PCRと同程度であった。75検体のJCV陽性検体を対象としたHRM解析を行ったところ、本検査系を用いることで各々の検体に含まれるJCVの変異パターンを患者個人レベルで識別しうることが分かった。

## 3) PMLの治療もしくは基礎研究におけるHRMスキニングの有用性の評価

PMLと診断された患者、フォローアップにおいて脳脊髄液中のJCVコピー数を定期的に測定することが多い。診断時に提出された検体およびフォローアップにおいて採取された検体において、HRMによる解離温度のパターンが異なるか否かを解析した。26名の患者から採取された脳脊髄液検体におけるJCVの変異パターンをHRMによって比較したところ、各々の検体中のJCVを患者個人レベルで識別することが可能であった。また、各患者の診断時およびフォローアップ時の検体中のJCVは極めて

類似した変異パターンを示しており、診断から治療までの長期に亘ってJCV陽性検体を照合しうることが分かった。加えて、PML患者の脳組織から増幅したJCVの調節領域をプラスミドにクローニングし、約1,700クローンの変異DNAライブラリーを作製した。その際、プラスミドを導入した大腸菌から核酸を抽出することなく、菌体をそのままリアルタイムPCR-HRMの鋳型として用いることで、JCV-DNAクローンのハイスループットスクリーニングが可能となった。

## D.考察

PML型のJCVは、ゲノムの転写調節領域にランダムな変異を生じるというユニークな性質を有している。この点に着目し、ルーチンのPCR検査において陽性を示した場合の確認検査として、転写調節領域の配列を解析するという手法が古くから用いられている。しかし、PML患者の脳脊髄液には、複数のJCV変異体が含まれており、ダイレクトシーケンシングによる塩基配列の決定が困難となるケースが多い。そのため、PCR検査において偽陽性が疑われた場合には、ウイルスゲノムの転写調節領域をプラスミドにクローニングした後、多数のDNAクローンの塩基配列を決定し、複雑に変異した配列のパターンをin silicoにて解析する必要がある。これらの解析には、煩雑かつ長期間の作業、および大きな経済的コストを要するためルーチン検査としての実施は困難である。

そこで、本研究では、平成24年度においてPML型JCVのゲノムにおける変異パターンを高速でスキャンするためのリアルタイムPCR-HRM検出系を確立した。平成25年度では、多数の臨床検体を用いた検査系のバリデーションを実施し、PMLの高精度診断技術としての実用化に成功した。本検査系を用いることで、ゲノムクローニングや次世代シーケンシング

等を行うことなく迅速かつ低コストにJCVの変異パターンを測定し、陽性検体を患者個人レベルで判別することが可能となった。

最終年度となる平成26年度では、HRM検出系の応用性を評価した。PMLに対する根本的な治療法は確立されていないが、抗レトロウイルス療法や免疫抑制の解除、もしくはメフロキンの投与等による治療への試みがなされている。その際、フォローアップ時のウイルス学的な評価として、治療前後における脳脊髄液中のJCVコピー数を比較することが一般的である。本検査系をルーチン検査時の確認検査として用いた場合、数ヶ月後に採取された検体と初回検査時の検体との照合が可能である。また、本検査系は、JCV陽性である可能性が高いフォローアップ検体から他の検体へのキャリアオーバーによる偽陽性を確実に監視し、PCR検査の信頼性の向上に貢献する。また、本検査の基盤となっているHRM技術は、PMLの病態解明に向けた基礎研究において有用な研究ツールとなることが期待される。

## E. 結論

PMLを引き起こすJCVのゲノムには患者個人レベルの多様な変異が生じる。検体中のJCVの変異パターンをHRMによって迅速にスキャンすることで、陽性検体を患者個人レベルで識別するための検査技術を開発した。また、HRMによるJCVの変異スキャンは、PMLの診断だけでなく、フォローアップ検査や脳組織検査、さらにはPMLの病態機序に関する基礎的研究においても有用なツールとなりうることを示した。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nakamichi K, Mizusawa H, Yamada M, Kishida S, Miura Y, Shimokawa T, Takasaki T, Lim CK, Kurane I, Saijo M. Characteristics of progressive multifocal leukoencephalopathy clarified through internet-assisted laboratory surveillance in Japan. *BMC Neurol.*12:121(online), 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(1):132-137, 2013.
- 3) Nakamichi K, Kishida S, Tanaka K, Suganuma A, Sano Y, Sano H, Kanda T, Maeda N, Kira JI, Itoh A, Kato N, Tomimoto H, Kurane I, Lim CK, Mizusawa H, Saijo M. Sequential changes in the non-coding control region sequences of JC polyomaviruses from the cerebrospinal fluid of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Arch. Virol.* 158(3): 639-650, 2013.
- 4) Kobayashi Z, Akaza M, Numasawa Y, Ishihara S, Tomimitsu H, Nakamichi K, Saijo M, Morio T, Sanjo N, Shintani S, Mizusawa H. Failure of mefloquine therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy: report of two Japanese patients without human immunodeficiency virus infection. *J. Neurol. Sci.* 324(1-2):190-194, 2013.
- 5) Mikita K, Maeda T, Fujikura Y, Kozaki Y, Hara Y, Kanoh S, Kishida S, Saijo M, Nakamichi K, Kawana A. Does anti-JCV therapy improve the prognosis of AIDS-related PML? *Clin. Neurol. Neurosurg.* 115(9):1853-1854, 2013.
- 6) Nakamichi K, Inoue N, Shimokawa T, Kurane I, Lim CK, Saijo M. Detection of human herpesviruses in the cerebrospinal fluid from patients diagnosed with or suspected of having progressive multifocal leukoencephalopathy. *BMC Neurol.* 13:200



- (online), 2013.
- 7) Nukuzuma S, Nakamichi K, Kameoka M, Sugiura S, Nukuzuma C, Tasaki T, Takegami T. TNF- $\alpha$  stimulates replication of JC virus efficiently in neuroblastoma cells. *J. Med. Virol.* 86(12): 2026-2032, 2014.
  - 8) Nakamichi K, Tajima S, Lim CK, Saijo M. High-resolution melting analysis for mutation scanning in the non-coding control region of JC polyomavirus from patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Arch. Virol.* 159(7): 1687-1696, 2014.
  - 9) Ohara H, Kataoka H, Nakamichi K, Saijo M, Ueno S. Favorable outcome after withdrawal of immunosuppressant therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy after renal transplantation: case report and literature review. *J. Neurol. Sci.* 341(1-2): 144-146, 2014.
  - 10) Nakamichi K, Lim CK, Saijo M. Stability of JC virus DNA in cerebrospinal fluid specimens preserved with guanidine lysis buffer for quantitative PCR testing. *Jpn. J. Infect. Dis.* 67(4): 307-310, 2014.
  - 11) Shirai S, Yabe I, Kano T, Shimizu Y, Sasamori T, Sato K, Hirotsu M, Nonaka T, Takahashi I, Matsushima M, Minami N, Nakamichi K, Saijo M, Hatanaka KC, Shiga T, Tanaka S, Sasaki H. Usefulness of  $^{11}\text{C}$ -methionine-positron emission tomography for the diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Neurol.* 261: 2314-2318, 2014.
- ## 2. 学会発表
- 1) 中道一生、井上直樹、倉根一郎、林昌宏、西條政幸. 進行性多巣性白質脳症が疑われた患者の脳脊髄液におけるヘルペスウイルスの出現プロファイルの解析. 第17回日本神経感染症学会学術集会、2012年10月19日、京都.
  - 2) 田中淳、小杉雅史、薬師寺祐介、雪竹基弘、中道一生、西條政幸、原英夫. HAART療法及びmefloquine投与が有効であった後天性免疫不全症候群(AIDS)患者における進行性多巣性白質脳症(HIV-PML)の一例. 第17回日本神経感染症学会学術集会、2012年10月19日、京都.
  - 3) 田中こずえ、中道一生、大橋一輝、津田浩昌、西條政幸、岸田修二. 造血幹細胞移植後に発症した進行性多巣性白質脳症2症例に対するメフロキンの使用経験. 第17回日本神経感染症学会学術集会、2012年10月19日、京都.
  - 4) 中道一生、林昌宏、西條政幸. 進行性多巣性白質脳症患者の脳脊髄液中に検出されたJCポリオーマウイルスの経時的なゲノム変異パターンの解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月15日、大阪.
  - 5) 山口(木下)一美、中道一生、伊藤(高山)睦代、垣内五月、林昌宏、倉根一郎、西條政幸. LAMP法を用いたPML患者の脳脊髄液中のJCウイルスの検出および定量試験. 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月14日、大阪.
  - 6) 中道一生、田島茂、林昌宏、西條政幸. 高解像度融解曲線分析による変異型JCウイルスゲノムのスキニング技術の確立および進行性多巣性白質脳症の検査への応用. 第18回日本神経感染症学会学術集会、2013年10月11日、宮崎。(学会賞を受賞)
  - 7) 小原啓弥、形岡博史、中道一生、西條政幸、上野聡. 免疫抑制剤の中止により良好な転帰をたどったHIV陰性腎移植後PMLの臨床学的検討. 第18回日本神経感染症学会学術集会、2013年10月11日、宮崎.
  - 8) 石川晴美、高橋恵子、齋藤磨理、江橋桃子、塩原恵慈、南正之、塩田宏嗣、大石實、亀井聡、武井正美、中道一生、高橋健太、鈴木忠樹、片野晴隆、長谷川秀樹. 抗AQP4抗体陽性を示したヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染を基礎疾患とする進行性多巣性白質脳症(PML)の1例. 第18回日本神経感染症学会学術集会、2013年10月11日、宮崎.

- 9) 白井慎一、廣谷真、加納崇裕、南尚哉、中道一生、西條政幸、畑中佳奈子、志賀哲、矢部一郎、佐々木秀直. 非HIV-PML2症例における<sup>18</sup>F-FDG-PETおよび<sup>11</sup>C-MET-PET所見. 第18回日本神経感染症学会学術集会、2013年10月11日、宮崎.
- 10) 古川迪子、三條伸夫、工藤俊介、中道一生、鈴木忠樹、吉岡光太郎、齊藤和幸、石橋賢士、石原正一郎、石橋哲、大久保卓哉、森尾友宏、江石義信、西條政幸、横田隆徳、水澤英洋. BKウイルス感染による後根神経節炎が疑われた原発性無ガンマグロブリン血症の30歳男性. 第18回日本神経感染症学会学術集会、2013年10月11日、宮崎.
- 11) 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について. 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日、兵庫.
- 12) 中道一生、田島茂、林昌宏、西條政幸. JCウイルスゲノムの転写調節領域に生じるランダムな変異をスキャンするための高解像度融解曲線分析法の確立. 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日、兵庫.
- 13) 中道一生、林昌宏、西條政幸. JCウイルスゲノムの新しい検出-PMLへの臨床応用. 第55回日本神経学会学術大会、2014年5月21日、福岡. (招待講演)
- 14) 三浦義治、岸田修二、中道一生、西條政幸、山田正仁、水澤英洋. 本邦における進行性多巣性白質脳症発症者の近年の傾向について—厚労省PML研究班報告. 第55回日本神経学会学術大会、2014年5月23日、福岡.
- 15) 小原啓弥、形岡博史、中道一生、西條政幸、上野聡. 免疫抑制剤の中止により良好な転帰をたどったHIV陰性腎移植後PMLの臨床学的検討. 第55回日本神経学会学術大会、2014年5月23日、福岡.
- 16) 喜納里子、三條伸夫、能勢裕里江、石橋哲、小林大輔、宍戸-原由起子、長嶋和郎、中道一生、西條政幸、森尾友宏、前原健寿、江石義信、水澤英洋. 治療反応性進行性多巣性白質脳症(PML)の臨床的・病理学的特徴—新たな病型の提案—. 第55回日本神経学会学術大会、2014年5月23日、福岡.
- 17) 中道一生. PMLの非典型例と最近の動向. 第19回日本神経感染症学会総会学術集会、2014年9月4日、金沢. (招待講演)
- 18) 吉田健二、佐々木格、瀬川茉莉、村上丈伸、吉原章王、星明彦、杉浦嘉泰、宇川義一、守谷新、中村耕一郎、中道一生、西條政幸. Mirtazapineとmefloquine治療が有効であった全身性サルコイドーシスに発症した進行性多巣性白質脳症の1例. 第19回日本神経感染症学会総会学術集会、2014年9月4日、金沢.
- 19) 三浦義治、岸田修二、中道一生、西條政幸、雪竹基弘、水澤英洋、山田正仁. 近年の日本国内発症進行性多巣性白質脳症患者の特徴について. 第19回日本神経感染症学会総会学術集会、2014年9月5日、金沢.
- 20) 三條伸夫、喜納里子、能勢祐里江、石橋哲、宍戸-原由紀子、中道一生、西條政幸、前原健寿、江石義信、水澤英洋. メフロキン治療が有効な進行性多巣性白質脳症における脳の病理学的特徴. 第19回日本神経感染症学会総会学術集会、2014年9月5日、金沢.
- 21) 山本詞子、石井一弘、本間晋介、岡田克典、中道一生、西條政幸、玉岡晃. 肺移植術後に発症した進行性多巣性白質脳症の60歳女性例. 第19回日本神経感染症学会総会学術集会、2014年9月5日、金沢.
- 22) 中道一生、林昌宏、西條政幸. 日本における進行性多巣性白質脳症の実験室サーベイランスおよびその発生動向の解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月12日、横浜.
- 23) 奴久妻聡一、亀岡正典、中道一生、杉浦重樹、奴久妻智代子、田崎隆史、竹上勉. ヒト神経芽細胞腫でのTNF- $\alpha$ によるJCウイルスDNA複製の促進. 第62回日本ウイルス

学会学術集会、2014年11月12日、横浜.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

## 2) 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

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
Nakamichi K, Mizusawa H, Yamada M, Kishida S, Miura Y, Shimokawa T, Takasaki T, Lim CK, Kurane I, Saijo M.	Characteristics of progressive multifocal leukoencephalopathy clarified through internet- assisted laboratory surveillance in Japan.	BMC Neurol.	12 (オンラインジャーナルのため号番号なし)	121 (オンラインジャーナルのためページ範囲なし)	2012
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(1)	132-137	2013
Nakamichi K, Kishida S, Tanaka K, Suganuma A, Sano Y, Sano H, Kanda T, Maeda N, Kira JI, Itoh A, Kato N, Tomimoto H, Kurane I, Lim CK, Mizusawa H, Saijo M.	Sequential changes in the non-coding control region sequences of JC polyomaviruses from the cerebrospinal fluid of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy.	Arch. Virol.	158(3)	639-650	2013
Kobayashi Z, Akaza M, Numasawa Y, Ishihara S, Tomimitsu H, Nakamichi K, Saijo M, Morio T, Sanjo N, Shintani S, Mizusawa H.	Failure of mefloquine therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy: report of two Japanese patients without human immunodeficiency virus infection.	J. Neurol. Sci.	324(1-2)	190-194	2013

Mikita K, Maeda T, Fujikura Y, Kozaki Y, Hara Y, Kanoh S, Kishida S, Saijo M, <u>Nakamichi K</u> , Kawana A.	Does anti-JCV therapy improve the prognosis of AIDS-related PML?	Clin. Neurol. Neurosurg.	115(9)	1853-1854	2013
<u>Nakamichi K</u> , Inoue N, Shimokawa T, Kurane I, Lim CK, Saijo M.	Detection of human herpesviruses in the cerebrospinal fluid from patients diagnosed with or suspected of having progressive multifocal leukoencephalopathy.	BMC Neurol.	13 (オンラインジャーナルのため番号なし)	200 (オンラインジャーナルのためページ範囲なし)	2013
Nukuzuma S, <u>Nakamichi K</u> , Kameoka M, Sugiura S, Nukuzuma C, Tasaki T, Takegami T.	TNF- $\alpha$ stimulates replication of JC virus efficiently in neuroblastoma cells.	J. Med. Virol.	86(12)	2026-2032	2014
<u>Nakamichi K</u> , Tajima S, Lim CK, Saijo M.	High-resolution melting analysis for mutation scanning in the non-coding control region of JC polyomavirus from patients with progressive multifocal leukoencephalopathy.	Arch. Virol.	159(7)	1687-1696	2014
Ohara H, Kataoka H, <u>Nakamichi K</u> , Saijo M, Ueno S.	Favorable outcome after withdrawal of immunosuppressant therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy after renal transplantation: case report and literature review.	J. Neurol. Sci.	341(1-2)	144-146	2014
<u>Nakamichi K</u> , Lim CK, Saijo M.	Stability of JC virus DNA in cerebrospinal fluid specimens preserved with guanidine lysis buffer for quantitative PCR testing.	Jpn. J. Infect. Dis.	67(4)	307-310	2014
Shirai S, Yabe I, Kano T, Shimizu Y, Sasamori T, Sato K, Hirotani M, Nonaka T, Takahashi I, Matsushima M, Minami N, <u>Nakamichi K</u> , Saijo M, Hatanaka KC, Shiga T, Tanaka S, Sasaki H.	Usefulness of $^{11}\text{C}$ -methionine-positron emission tomography for the diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy.	J. Neurol.	261(12)	2314-2318	2014

### 3) 研究成果の刊行物・別刷

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Characteristics of progressive multifocal leukoencephalopathy clarified through internet-assisted laboratory surveillance in Japan

Kazuo Nakamichi<sup>1</sup>, Hidehiro Mizusawa<sup>2</sup>, Masahito Yamada<sup>3</sup>, Shuji Kishida<sup>4</sup>, Yoshiharu Miura<sup>4</sup>, Toshio Shimokawa<sup>5</sup>, Tomohiko Takasaki<sup>1</sup>, Chang-Kweng Lim<sup>1</sup>, Ichiro Kurane<sup>1</sup> and Masayuki Saijo<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML), a rare but fatal demyelinating disease caused by JC virus (JCV), occurs mainly in immunocompromised patients. As PML develops in individuals with various underlying disorders sporadically and infrequently, a nationwide survey of PML is difficult. This study was conducted to elucidate the characteristics of PML in Japan through an internet-assisted laboratory surveillance program.

**Methods:** A diagnostic support system for PML was established using a real-time PCR assay of JCV DNA in cerebrospinal fluid (CSF), and requests for testing were received from clinicians via specialized websites. Medical histories of patients were collected through standardized questionnaires, and a database of CSF JCV loads and clinical information was created and analyzed.

**Results:** For 4 years from April 2007 to March 2011, CSF specimens from 419 patients were tested. Forty-eight individuals were found positive for JCV DNA in their CSF and were diagnosed with PML. PML primarily occurred not only in HIV-positive patients (33.3%) but also in patients with hematologic disorders after receiving stem cell transplantation, chemotherapy, and/or immunosuppressive treatment (39.6%). The frequencies of PML cases among the subjects in these two categories were 20.3% and 23.5%, respectively. Although no significant features were observed with respect to CSF JCV loads in PML patients with an HIV infection or hematologic disorder, males were predominant in both groups (100% and 89.5%, respectively). The proportion of PML cases with autoimmune disorders (6.3%) or solid-organ transplants (2.1%) was smaller than those with HIV infection or hematologic disorders, probably due to the limited availability of therapeutic monoclonal antibodies and transplantation from brain dead donors.

**Conclusions:** The results suggest that the internet-assisted laboratory surveillance program might be a useful strategy for collecting precise real-time information on PML on a national level. The current database provides important background information for the diagnosis and treatment of patients with risk factors for PML.

**Keywords:** Cerebrospinal fluid, Surveillance, Japan, JC virus, Progressive multifocal leukoencephalopathy

\* Correspondence: [msaijo@nih.go.jp](mailto:msaijo@nih.go.jp)

<sup>1</sup>Department of Virology 1, National Institute of Infectious Diseases, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

Full list of author information is available at the end of the article



## Background

Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) is a rare but fatal demyelinating disease caused by JC virus (JCV), a small DNA virus belonging to the family *Polyomaviridae*, genus *Polyomavirus* [1-3]. JCV establishes a persistent and asymptomatic infection in a large number of individuals, with the serologically positive rate for JCV among the adult human population being 50–90%. However, in some severely immunocompromised patients, JCV reactivates and causes a lytic infection in the oligodendrocytes, leading to PML [1-4]. PML develops in human immunodeficiency virus (HIV)-positive patients as well as in those with immunodeficiency due to hematological malignancies, chemotherapy, transplantation, lymphocyte depletion or autoimmune disorders, such as systemic lupus erythematosus (SLE), treated with immunosuppressive agents [1-4]. In addition, PML has recently been diagnosed in patients receiving immunomodulatory therapies with monoclonal antibodies, such as natalizumab, rituximab, and efalizumab [2,5].

To conduct a nationwide survey of PML, the collection and analysis of large amounts of clinical data are necessary. However, as PML develops in patients with various underlying disorders sporadically and infrequently, a comprehensive surveillance of PML is difficult. Recent epidemiological data on PML were mainly obtained from retrospective cohort studies of HIV-infected persons [6-15] or reported cases of serious adverse events following treatment with monoclonal antibodies [16-23]. Although the results of these investigations are important for a better understanding of PML in association with HIV infection or monoclonal antibody therapies, it is difficult to comprehensively monitor PML patients with diverse underlying diseases. Several other recent studies demonstrated the incidence of PML using national databases in the USA, such as the National Multiple Cause of Death Data system, the Nationwide Inpatient Sample, the US health insurance claims database, and the US Renal Data System [24-27]. While these database screening strategies are considered to be beneficial for the surveillance of PML, the amount of information available for each case is limited.

The detection of JCV DNA in cerebrospinal fluid (CSF) by PCR is a reliable and less-invasive marker for the diagnosis of PML [1]. In Japan, the ongoing CSF testing for JCV DNA has been supported by the Laboratory of Neurovirology, Department of Virology 1, National Institute of Infectious Diseases (NIID), Tokyo, Japan, since April 2007. Through this practice, datasets of clinical information are being obtained not only from PML patients but also from individuals suspected of having PML via their physicians. The current study has been undertaken to assess the occurrence and characteristics of PML patients in Japan over the past 4 years.

## Methods

### Clinical information on patients from whom CSF specimens were collected

This study was performed under informed consent from patients or their family members and with the approval of the Ethical Committee for Biomedical Science in the NIID. CSF testing for JCV DNA was requested from the patients' physicians for the diagnosis or management of PML primarily via two specialized web sites (available in Japanese language only), [<http://www0.nih.go.jp/vir1/NVL/Virus1/NVL3%20HP/index11.html>] and [<http://prion.umin.jp/pml/virus.html>]. This diagnostic support system was funded by the Japanese government (Research Committee of Prion Disease and Slow Virus Infection, the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan) and performed free of charge to patients. CSF specimens were collected by lumbar puncture from patients suspected of having PML on the basis of neurological symptoms and/or magnetic resonance imaging (MRI) patterns, and were transferred to the NIID. Patient information including age, sex, underlying disease, and past medical history was collected anonymously through standardized questionnaires.

### Real-time PCR testing for JCV DNA

Total DNAs were extracted from CSF specimens using a QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) and subjected to real-time PCR assay as described previously [28]. The pBR322-based plasmid pJC1-4->pJCV containing the complete genome sequence of JCV Mad-1 strain [29] was supplied by the Health Science Research Resources Bank (Osaka, Japan) and was used as the standard DNA for real-time PCR. For clinical testing of JCV DNA in CSF specimens, three different real-time PCR assays were developed to detect either the JCV T or viral protein 1 (VP1) genes and to monitor the contamination of each clinical sample with standard DNA. The primers and TaqMan probe targeting the JCV large T gene were described in an earlier report [28]. A pair of primers (5'- AAT GCA ACA GTG CAA TCT CA -3' and 5'- GGC CCA ACA CCA AAT TCA TC -3') and a TaqMan probe (5'- TTG GGT TCC TGA TCC CAC CAG -3') were designed to detect a highly conserved region within the JCV VP1 gene. The sequences of these primers and probes were 100% identical to the corresponding region of over 360 JCV isolates of various origins in GenBank (data not shown). To control the contamination of samples with standard DNA, another set of primers (5'- CAC AGC TTG ACT GAG GAA -3' and 5'- GAT GTC GGC GAT ATA GGC -3') and probe (5'- ATC CTC TAC GCC GGA CGC AT -3') were also designed to detect the boundary sequence of the JCV genome and pBR322 within pJC1-4->pJCV [see Additional file 1]. This primer/probe set detects standard

DNA but not the JCV genome. All TaqMan probes were 5' labeled with 6-carboxyfluorescein and 3' labeled with Black Hole Quencher-1. These three PCRs were carried out independently for each sample under the conditions described previously [28] except that the annealing temperature was 58°C instead of 60°C. The copy numbers of the viral genome in JCV DNA-positive samples were determined as reported earlier [28]. In each PCR, target DNAs were detected in a range from  $1 \times 10^9$  to 4 copies per reaction [see Additional file 2] and no amplification signals were detected, even in the presence of high concentrations (over  $10^7$  copies) of other polyomaviruses, including BK virus and simian virus 40 (data not shown).

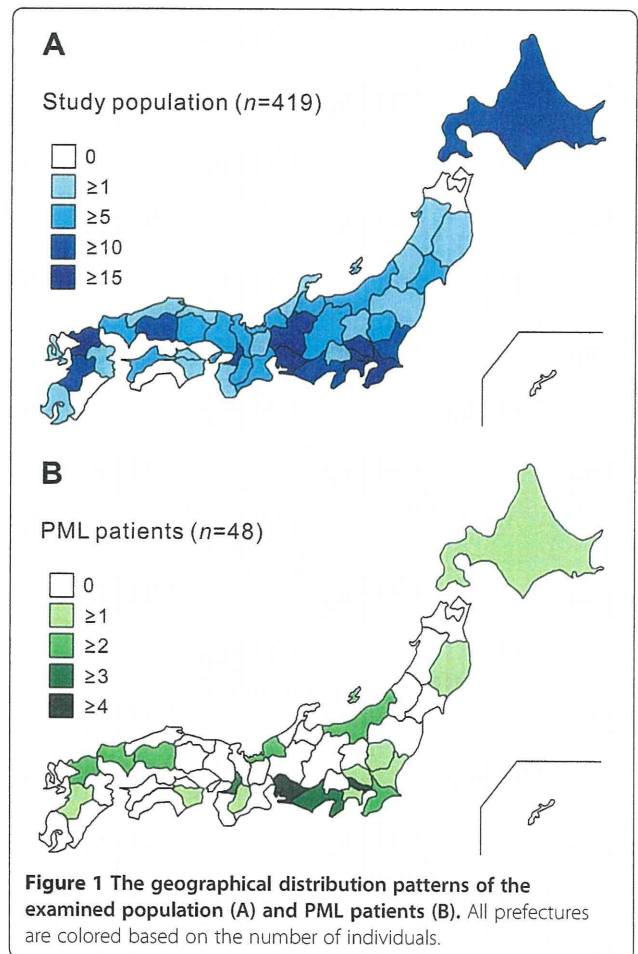
### Statistical analysis

The proportions of JCV-positive or combination anti-retroviral therapy (cART)-treated patients in each group were statistically compared by means of a two-tailed Fisher's exact test. For multiple testing, the resulting *P*-value was corrected using the Benjamini-Hochberg method [30]. The numbers of clusters of differentiation 4 (CD4)-positive T cells in JCV-positive and -negative patient groups were compared using a Mann-Whitney U test. The amounts of CSF JCV DNA in different patient groups were compared using a Steel-Dwass nonparametric multiple comparison method. All *P*-values less than 0.05 were judged to be statistically significant.

### Results

#### Detection of JCV DNA in CSF specimens from patients

From April 2007 to the end of March 2011, 504 CSF specimens from 419 patients were submitted to the NIID for testing by hospitals in 43 of Japan's 47 prefectures (91.5%), with many requests received from the Tokyo metropolitan area and other regions with large populations (Figure 1A). Forty-eight individuals showed a positive reaction for JCV DNA in the real-time PCR targeting the T and VP1 genes and were subsequently diagnosed with PML (Figure 1B). The distribution pattern of PML patients resembled that of the total population. The PCR testing results and underlying diseases of the subjects are summarized in Table 1. Of 48 patients positive for CSF JCV DNA, 16 (33.3%) had HIV infection. The total number of HIV-positive subjects was 79 (20.3%). The proportion of cART-received patients found to be positive and negative for CSF JCV DNA at the initial testing was 31.3% ( $n = 14$ ) and 50.8% ( $n = 57$ ), respectively. The median peripheral blood CD4 counts in the two groups were 37.0 cells /  $\mu$ L ( $n = 13$ ; range, 8–232 cells /  $\mu$ L) and 43.5 cells /  $\mu$ L ( $n = 60$ ; range, 1–400 cells /  $\mu$ L), respectively. For both parameters, no statistical differences were observed between the JCV-positive and -negative patient groups. Nineteen



**Figure 1** The geographical distribution patterns of the examined population (A) and PML patients (B). All prefectures are colored based on the number of individuals.

of the JCV-positive patients (39.6%) had hematologic disorders, and the frequency of PML cases in this category was approximately 24%. Of 50 subjects with autoimmune disorders, 3 with SLE were positive for CSF JCV. Among patients with other underlying diseases, 9 JCV-positive cases were observed, and high positive ratios were found among those with lung disease (66.7%) and sarcoidosis (100%). Among these 4 categories of underlying disorders, the proportion of JCV-positive patients with hematologic disorders, but not that of patients with HIV infection, was significantly higher than that of patients with autoimmune disorders ( $P = 0.009$ ). The underlying illness of the remaining 1 JCV-positive patient could not be determined. These results indicate that PML occurs primarily in patients not only with HIV infection but also with hematologic disorders.

#### Characteristics of PML patients with hematologic disorders or other underlying diseases

Having shown that PML is frequently seen in patients with hematologic disorders in Japan, the characteristics of these patients were compared to those of

**Table 1 Underlying diseases of patients positive and negative for JCV DNA on the basis of CSF specimens**

Underlying disease		No. (%) of JCV-positive patients		No. (%) of JCV-negative patients	
Category	Subcategory				
HIV infection / AIDS		16	(20.3)	63	(79.7)
Hematologic disorders		19	(23.5)	62	(76.5)
	Acute myeloid leukemia	2	(16.7)	10	(83.3)
	Acute lymphocytic leukemia	1	(14.3)	6	(85.7)
	Chronic myeloid leukemia	0	(0)	2	(100)
	Chronic lymphocytic leukemia	1	(50.0)	1	(50.0)
	Adult T-cell leukemia	1	(50.0)	1	(50.0)
	Hodgkin's lymphoma	1	(50.0)	1	(50.0)
	Non-Hodgkin's lymphoma	6	(22.2)	21	(77.8)
	Aplastic anemia	2	(50.0)	2	(50.0)
	Primary immunodeficiency syndrome	2	(25.0)	6	(75.0)
	Multiple myeloma	2	(66.7)	1	(33.3)
	Primary macroglobulinemia	1	(100)	0	(0)
	Myelodysplastic syndrome	0	(0)	6	(100)
	Other	0	(0)	5	(100)
Autoimmune disorders		3	(6.0)	47	(94.0)
	Multiple sclerosis	0	(0)	11	(100)
	Rheumatoid arthritis	0	(0)	7	(100)
	Systemic lupus erythematosus	3	(20.0)	12	(80.0)
	Other	0	(0)	17	(100)
Other diseases		9	(10.0)	81	(90.0)
	Cerebrovascular disorders	0	(0)	7	(100)
	Solid-organ cancer	0	(0)	13 <sup>a</sup>	(100)
	Lung diseases	2	(66.7)	1	(33.3)
	HCV-related liver disease	3	(37.5)	5	(62.5)
	Renal diseases	0	(0)	11 <sup>b</sup>	(100)
	Sarcoidosis	3	(100)	0	(0)
	Other	1 <sup>c</sup>	(2.2)	44 <sup>d</sup>	(97.8)
None/Unknown		1	(0.8)	118	(99.2)
Total		48	(11.5)	371	(88.5)

HCV, hepatitis C virus.

<sup>a</sup> Two patients underwent liver transplantation.

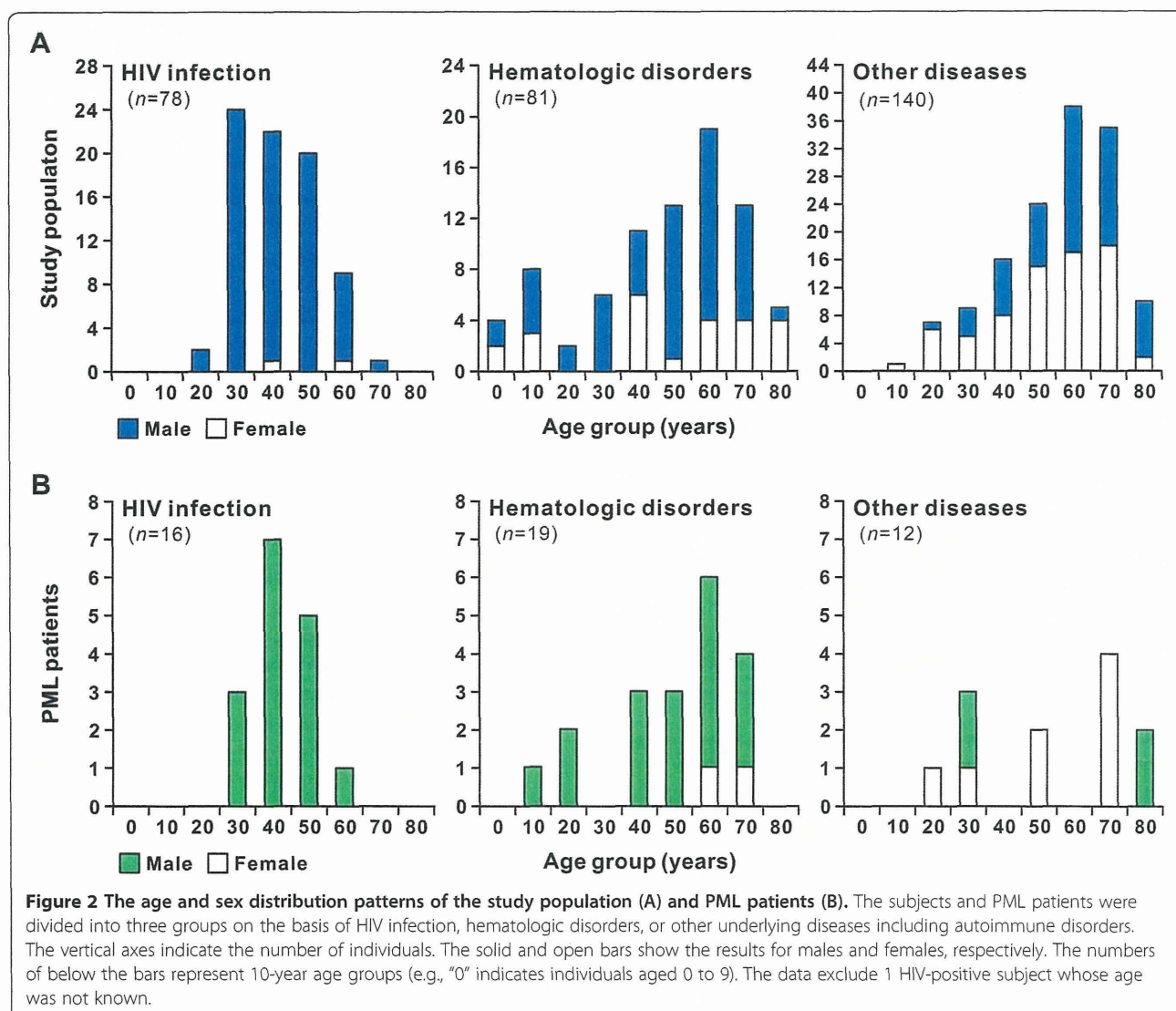
<sup>b</sup> Six patients underwent renal transplantation.

<sup>c</sup> The patient receiving the liver transplant had common variable immunodeficiency.

<sup>d</sup> One patient received heart and kidney transplants.

patients with HIV infection or other non-HIV-related diseases. The age and sex distributions of study population and PML patients are shown in Figure 2. The majority of subjects and PML patients with HIV infection were male in their thirties to sixties, and subjects and PML patients with hematologic disorders or other underlying diseases were found at various ages. PML patients with hematologic disorders were mainly males, while non-HIV-related PML occurred in both sexes (Figure 2B). These data suggest that there is a predominance of males

among PML patients; not only among those with HIV infection but also those with hematologic disorders. The median viral loads in CSF specimens from patients with HIV infection, hematologic disorders, and other diseases were  $2.6 \times 10^4$ ,  $8.0 \times 10^4$ , and  $6.4 \times 10^3$  copies per mL, respectively (Figure 3). No statistical differences in the CSF JCV levels were found between the groups. These results indicate that PML cases with hematologic disorders exhibit no significant differences with respect to CSF JCV loads.



### Medical history of PML patients with hematologic disorders

The final set of analyses was conducted to assess the clinical background of PML patients with hematologic disorders. The practice of hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in patients found to be positive or negative for JCV DNA on the basis of CSF specimens is shown in Table 2. Eight of 19 JCV-positive patients with hematologic disorders (42.1%) received HSCT for the treatment of acute myeloid leukemia (AML), acute lymphoblastic leukemia (ALL), Hodgkin's lymphoma (HL), non-Hodgkin's lymphoma (NHL), aplastic anemia (AA), or multiple myeloma (MM). Among the CSF JCV-negative cases, 19 of 49 individuals (38.8%) received HSCT. There was no statistically significant difference in the proportion of HSCT-treated individuals between the JCV-positive and -negative patients. The characteristics

of 8 PML patients receiving HSCT are summarized in Table 3. In these 8 cases, JCV DNA was detected in the CSF specimens at a median of 471.5 days after transplantation (range, 279–833 days). These results indicate that in cases of PML with hematologic disorders, a high proportion of patients had a history of HSCT, and that PML occurred 1–2 years after the various types of transplantation. However, 11 of 19 PML patients with hematologic disorders (57.9%) had no record of HSCT. Thus, potential risk factors for PML were examined in these patients. Table 4 shows the characteristics of PML patients without HSCT. Nine of 11 patients (81.8%) were over 60 years old, and 8 of 11 patients had received combination chemotherapy, cyclophosphamide or rituximab. The remaining 3 individuals had no history of treatment with chemotherapeutic or immunosuppressive agents, but 2 had primary immunodeficiency syndrome