

厚生労働科学研究委託事業 難治性疾患等克服研究事業
 （難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業））

プリオン病及び遅発性ウイルス感染症の分子病態解明・治療法開発に関する研究班 委託業務成果報告（業務項目）

遺伝性プリオン病患者登録・評価・介入ユニット(trial unit)の構築

研究分担者：水澤英洋	国立精神・神経医療研究センター病院
研究協力者：塚本 忠	国立精神・神経医療研究センター病院
研究協力者：三條伸夫	東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科学)
研究協力者：森若文雄	北祐会神経内科病院神経内科学
研究協力者：青木正志	東北大学大学院医学系研究科神経内科学
研究協力者：西澤正豊	新潟大学脳研究所神経内科学分野
研究協力者：田中章景	横浜市立大学大学院医学研究科神経内科
研究協力者：犬塚 貴	岐阜大学大学院医学研究科神経内科・老年学分野
研究協力者：武田雅俊	大阪大学大学院医学研究科精神医学教室
研究協力者：阿部康二	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科脳神経内科学
研究協力者：村井弘之	九州大学大学院医学系研究科神経内科
研究協力者：佐藤克也	長崎大学医歯薬学総合研究科感染分子
研究協力者：北本哲之	東北大学大学院医学系研究科病態神経学分野
研究協力者：中村好一	自治医科大学地域医療学センター公衆衛生学部門
研究協力者：村山繁雄	東京都健康長寿医療センター研究所老年病理学研究チーム
研究協力者：黒岩義之	帝京大学溝口病院神経内科・脳卒中センター
研究協力者：原田雅史	徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部放射線科学分野
研究協力者：齊藤延人	東京大学大学院医学系研究科脳神経外科学
研究協力者：太組一朗	日本医科大学武蔵小杉病院脳神経外科
研究協力者：金谷泰宏	国立保健医療科学院健康危機管理部
研究協力者：田村智英子	木場公園クリニック
研究代表者：山田正仁	金沢大学大学院脳老化・神経病態学(神経内科学)
研究協力者：桑田一夫	岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科

研究要旨 わが国のプリオン病は、平成11年4月1日から平成26年9月26日までの合計2394例の解析から、孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病(sCJD)が1836例であり、全体の77%を占めている。これらの大部分は急速進行性の認知症を呈し、約4カ月で無動性無言に至り、約16カ月で死に至るといふ、極めて急激な経過をとる。したがって、発症後に薬物効果を判定するのは容易ではなく、アルツハイマー病の治験結果を見るにつけても、発症超早期あるいは発症前の治療開始が必要と考えられる。そのためにはまず遺伝性プリオン病について、発症前に診断を確定しバイオマーカー、臨床所見の前向き調査を行い、発症前治療介入試験を可能とするための基礎データを得る必要があると思われる。

A. 研究目的

現在、オールジャパン体制での臨床研究のための Japanese Consortium of Prion Disease (JACOP)にて、全プリオン病を対象として患者登録と自然歴研究が進んでいる。この全プリオ

ン病自然歴研究の家で、遺伝性プリオン病については、保因者・未発症者に遺伝子診断を行い、発症前～超早期のバイオマーカー変化を明らかにして、治験などの介入試験へと発展させることが望ましい。本研究はその可能性について、

米国において進行中の、遺伝性アルツハイマー患者のコホート研究に次いで治験薬による介入を行う DIAN-TU, API trial, A4 trial, およびわが国の DIAN-J を参考に検討を行う。

B. 研究方法

神経変性疾患としての治験が先行しているアルツハイマー病の介入試験の文献検索を行い、コホート研究の具体的方法・バイオマーカーの選択理由、神経心理的検査結果・バイオマーカー(髄液・血液生化学の他に画像検査を含む)の経時的変化、神経学的所見の変化などの重要性を検討する。

具体的には API (Alzheimer Prevention Initiative), A4 (anti-amyloid treatment in asymptomatic Alzheimer's disease), DIAN (Dominantly Inherited Alzheimer Network) のコホート研究および介入試験のこれまでの結果を、遺伝性プリオン病の特徴と比較しつつ検討した。

(倫理面への配慮)

現時点では、発症前診断を開始していないため、発症前診断への倫理的配慮の必要性はない。アルツハイマー病の介入試験が(前世界的に)大規模に行なわれており、プリオン病の難治性・症状の悲惨さを考慮すると問題はないと思われる。

C. 研究結果

DIAN, A4, APIいずれも presenilin (PSEN) 1、PSEN2 もしくは amyloid precursor protein (APP) に変異を持つ未発症症例もしくは、家族に遺伝性変異があるもの本人が遺伝子変異をもつかどうか不明のままの症例を登録し、ApoE4 の遺伝子数を調べ、定期的に画像検査 (アミロイド PET, MRI, fMRI, FDG-PET, SPECT)、髄液検査 (アミロイドβ、タウ)、各種血液生化学、心理検査バッテリー、臨床症状の経過を調べることで、発症年齢は変異遺伝子とその変異の種類により様々であること、ApoE 遺伝子型と発症年齢の相関が強くない事、親の発症年齢と本人の発症年齢が有意に相関する事、発症年齢と罹病期間に相関がある事が明らかである。

遺伝性プリオン病の研究にあたっては臨床

コア、バイオマーカーコア、遺伝学コア、統計コア、病理学コアなどを作り、経時的変化を明らかにしつつ、発症年齢を想定してその数年前もしくは超早期に介入を行なう事が必要と考えられた。

D. 考察

プリオン病研究は、他の変性疾患との関連性もあり、今後急速に進展することが予想され、治療候補薬についても現在の P092 に加えて新しいものができる可能性は高い。また、すでに全プリオン病対象の自然歴研究 (JACOP) が始まっており、多くのバイオマーカーが実用化されていることから、治験薬による介入試験は十分に実行可能であると思われる。

E. 結論

プリオン病サーベイランス事業、JACOP 研究の進捗と同期して、遺伝性プリオン病の未発症・超早期症例の登録を行ない、治療薬候補による介入試験に備える必要性がある。

[参考文献]

- 1) Mills SM, et al. Preclinical trials in autosomal dominant AD: implementation of the DIAN-TU trial. *Rev Neurol* 169:737-743, 2013.
- 2) Sperling RA, et al. The A4 study: stopping AD before symptoms begin? *Sci Transl Med* 6(228):228fs13, 2014;
- 3) Reiman EM, et al. Alzheimer's Prevention Initiative: a plan to accelerate the evaluation of presymptomatic treatments. *J Alzheimers Dis* 26(Suppl 3):321-329, 2011.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakamura Y, Ae R, Takumi I, Sanjo N, Kitamoto T, Yamada M, Mizusawa H. Descriptive epidemiology of prion disease in Japan: 1999-2012. *J Epidemiol* 25:8-14, 2015.
- 2) 能勢裕里江, 水澤英洋. プリオン病. *日本医師会雑誌* 143 特別号(2):415-417, 2014.

3) 三條伸夫, 水澤英洋. VII. プリオン病 プリオン病. 辻 省次, 水澤英洋・編 アクチュアル脳・神経疾患の臨床 神経感染症を極める, 中山書店, 東京, pp278-285, 2014.

4) 三條伸夫, 水澤英洋. 付録 2 感染症関連ガイドラインと使用法の注意 プリオン病, 辻 省次, 水澤英洋・編 アクチュアル脳・神経疾患の臨床 神経感染症を極める, 中山書店, 東京, pp325-334, 2014.

2. 学会発表

1) Furukawa F, Sanjo N, Kobayashi A, Shiraishi A, Ishikawa K, Yamada M, Kitamoto T, Eishi Y, Mizusawa H. Involvement of the dorsal root ganglion in GSS with P105L mutation. Asian Pacific Prion Symposium 2014, Jeju, July 6-7, 2014.

2) Sanjo N, Higuma M, Hizume M, Furukawa F, Nakamura Y, Kitamoto T, Hamaguchi T, Moriwaka F, Aoki M, Tanaka F, Nishizawa M, Takeda M, Inuzuka T, Abe K, Sato K, Murai H, Murayama S, Satoh K, Harada M, Uyama N, Fujita K, Saito N, Takumi I, Tsukamoto T, Yamada M, Mizusawa H. Human prion disease in Japan: a prospective surveillance from 1999. Asian Pacific Prion Symposium 2014, Jeju, July 6-7, 2014.

3) Sakai K, Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Takumi I, Sanjo N, Nakamura Y, Kitamoto T, Saito N, Mizusawa H, Yamada M. Graft-related disease progression in dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease: a cross-sectional study. Asian Pacific Prion Symposium 2014 Jeju, July 6-7, 2014.

4) Hamaguchi T, Sakai K, Nozaki I, Noguchi-Shinohara M, Sanjo N, Nakamura Y, Kitamoto T, Murayama S, Satoh K, Harada M, Mizusawa H, Yamada M. Clinical features of MM2 type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Asian Pacific Prion Symposium 2014, Jeju, July 6-7, 2014.

5) 古川迪子, 三條伸夫, 日熊麻耶, 小林篤史, 北本哲之, 中村好一, 村山繁雄, 辻 省次, 山田正仁, 水澤英洋. プリオン蛋白遺伝子コドン 105 変異 (P105L) による Gerstmann-Sträussler-Scheinker 症候群の臨床像 -GSS(P102L)との比較解析-. 第 19 回日本神経感染症学会総会学術集会, 金沢, 9.4-6. 2014.

6) 浜口 毅, 坂井健二, 野崎一朗, 篠原もえ子, 三條伸夫, 中村好一, 北本哲之, 村山繁雄, 佐藤克也, 原田雅史, 水澤英洋, 山田正仁. MM2 型弧発性 Creutzfeldt-jakob 病の臨床的特徴について. 第 19 回日本神経感染症学会総会学術集会, 金沢, 9.4-6. 2014.

7) Mizusawa H. Prion disease in Japan. 69th Annual Congress of the Chilean Neurology, Psychiatry and Neurosurgery Association, Puerto Varas, October 9-11. 2014

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

厚生労働科学研究委託事業 難治性疾患等克服研究事業

（難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業））

プリオン病及び遅発性ウイルス感染症の分子病態解明・治療法開発に関する研究班 委託業務成果報告（業務項目）

亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) ウイルスの神経病原性規定因子の解明

研究分担者：堀田 博 神戸大学大学院医学研究科微生物学分野

研究協力者：伊藤正恵 長浜バイオ大学バイオサイエンス学部

研究要旨 亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) は、麻疹ウイルス (MV) 感染後 5～10 年を経て、約 10 万人に 1 人の割合で発症する致死的中枢神経疾患であり、長期間の潜伏期に生じた麻疹ウイルス変異株 (SSPE ウイルス) によって引き起こされる。我々はこれまでに、SSPE ウイルス Kobe-1 株の神経細胞への感染とマウスにおける神経病原性の発現には M、F 及び H タンパク質の変異が必要であることを明らかにしてきた。本研究では、細胞融合能を担う F タンパク質の個々のアミノ酸変異が F タンパク質の性状に及ぼす影響を解析するとともに、神経細胞への感染に必要な変異の同定を試みた。その結果、SSPE-Kobe-1 株の F タンパク質の安定性は著しく低下しており、そのため、膜融合に必要な立体構造変化を促進して、細胞融合活性を上昇させている可能性が考えられた。F タンパク質の個々のアミノ酸残基については、Y398H 変異は F タンパク質の細胞内発現量及びフリプロテアーゼ感受性を亢進させ、細胞融合活性を増強させた。G301W 変異は F タンパク質の安定性を低下させ、細胞融合活性を増強させた。一方、G401E 変異は F タンパク質の細胞内発現量及びフリプロテアーゼによる開裂感受性を低下させ、細胞融合活性を著しく低下させた。次いで、それぞれのアミノ酸変異を持つ組換えウイルスを作製して解析した。その結果、F タンパク質の Y398H 変異を MV 野生株に復帰させた組換えウイルス (H398Y) は感染能を全く欠失し、感染性ウイルスが回収できなかった。また、G301W 変異を復帰させたウイルス (W301G) は Vero/SLAM 細胞での細胞融合能が強く抑制され、神経細胞由来の SH-SY5Y 細胞では増殖できなかった。一方、G401E 変異を復帰させたウイルス (E401G) は細胞融合能が亢進し、SH-SY5Y 細胞で著明な感染拡大を示した。以上の結果から、SSPE-Kobe-1 株 F タンパク質の 398 位のアミノ酸は、立体構造上フリプロテアーゼによる開裂部位近傍に位置するため、その開裂に影響しており、SSPE-Kobe-1 株の感染拡大には Y398H 変異が決定的に重要であることが明らかとなった。また、G301W 変異も SSPE-Kobe-1 株 F タンパク質の細胞融合活性を増強させ、神経細胞への感染に大きく寄与していることがわかった。一方、G401E 変異はウイルス感染能を抑制し、持続感染の成立に関与する可能性が考えられた。今後、Y398H 変異及び G301W 変異等について、神経病原性との関連をマウス感染実験系で検証する予定である。

A. 研究目的

亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) は、麻疹罹患後 5～10 年を経て約 10 万人に 1 人の割合で発症する致死的中枢神経疾患であり、長期間の潜伏期に生じた麻疹ウイルス (MV) の変異株 (SSPE ウイルス) によって引き起こされる^{1,2)}。昨年の本研究班の分担研究において、我々が独自に分離した SSPE ウイルス (SSPE-Kobe-1 株)³⁾ の神経細胞への感染とマウスにおける神経病原性の発現には、M、F 及び H タンパク質の変

異が必要であることを明らかにした⁴⁾。他の研究者によっても、MV が神経病原性を獲得するために、細胞融合能を担う F タンパク質の変異が重要であることが報告されている^{5,6)}。本研究では、細胞融合能と神経病原性発現に関連する F タンパク質について、SSPE-Kobe-1 株に見られる個々のアミノ酸変異が F タンパク質の性状に及ぼす影響を解析するとともに、この変異を有する組換え MV の融合能や神経細胞への感染に必要な変異について検討した。

B. 研究方法

1) 変異 F タンパク質の細胞融合活性、フリンプロテアーゼによる開裂の程度及び構造安定性に関する解析

SSPE-Kobe-1 株に特有のアミノ酸変異³⁾を個々に有する変異 F タンパク質発現プラスミドを作製した。これらのプラスミドを用いて、変異 F タンパク質を H タンパク質と共に Vero/SLAM 細胞に発現させ、[融合細胞の数] x [融合細胞当たりの平均核数] を指標にして、変異 F タンパク質の細胞融合活性を測定した。

また、上記細胞の細胞膜画分を回収後 lysis buffer で溶解し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により展開し、PVDF メンブレンフィルターに転写後、抗 F タンパク質抗体を用いた免疫ブロット法により、未開裂の F₀ タンパク質及び開裂された F₁ タンパク質を検出した。

F タンパク質の構造安定性については、上記の発現細胞を 30°C、37°C 及び 40°C で培養して、それぞれの温度下における細胞融合活性を測定した。30°C において野生型 F タンパク質より強い細胞融合活性を示す変異 F タンパク質は、構造的に不安定であると推論した。

2) 遺伝子組換え MV の作製

MV 野生株 (Ich-B 株) の全長ゲノムの cDNA と EGFP cDNA をコードするプラスミド (p(+))MV323 及び p(+))MV323-EGFP ; 九州大学・柳雄介教授より分与^{7,8)} の F 遺伝子領域に、SSPE-Kobe-1 株に特有のアミノ酸変異³⁾を個々に導入した変異株を作製した。同様に、SSPE-Kobe-1 株の M、F、H 遺伝子を持ち、SSPE-Kobe-1 株と同程度の神経病原性を有する遺伝子組換え MV (rMV/EGFP_{sspe}MFH) をコードするプラスミドも作製した。これらのプラスミドを用いて、既報の方法の変法⁹⁾により、遺伝子組換え MV を作製した。作製した変異ウイルスは Vero/SLAM 細胞により継代した。

3) 遺伝子組換え MV の神経細胞への感染性及び細胞融合活性の解析

作製した変異 MV を Vero/SLAM 細胞において増殖させ、ヒト神経芽細胞腫由来培養細胞 (SH-SY5Y 細胞) に感染させた。感染 2 日後に細胞を固定し、蛍光抗体法により、単一細胞レベルでの感染の成立及び多核巨細胞形成を指標にして、細胞融合能を調べた。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え MV の作製及び使用は、文部科学大臣の確認、神戸大学及び長浜バイオ大学の遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得て、神戸大学大学院医学研究科微生物学研究室あるいは長浜バイオ大学バイオサイエンス学部遺伝子生命科学研究室において、遺伝子組換え実験に関する法令・規則に準拠して行った。

感染動物実験は、神戸大学動物実験委員会及び感染動物実験小委員会の承認を得て、大学院医学研究科附属動物実験施設感染動物実験室において、遺伝子組換え実験及びバイオセーフティーに関する法令・規則ならびに指針等に準拠して行った。

C. 研究結果

(1) F タンパク質の個々のアミノ酸変異が細胞融合活性やフリンプロテアーゼによる開裂の程度、構造安定性に及ぼす影響

変異 F タンパク質を H タンパク質と共に Vero/SLAM 細胞に発現させ、30°C、37°C 及び 40°C における変異 F タンパク質の細胞融合活性を測定し、以下の結果を得た。

1) SSPE-Kobe-1 株の F タンパク質は安定性を大きく低下させており、そのため、膜融合に必要な立体構造変化を促進して、細胞融合活性を上昇させていると考えられた。

2) Y398H 変異は、F タンパク質の細胞内発現量及びフリンプロテアーゼ感受性を亢進させ、細胞融合活性を増強させた。

3) G301W 変異は、F タンパク質の構造安定性を低下させ、細胞融合活性を増強させた。

4) 一方、G401E 変異は、F タンパク質の細胞内発現量及びフリンプロテアーゼによる開裂感受性を低下させ、細胞融合活性を著しく低下させた。

(2) 組換えウイルスを用いた F 蛋白質の個々のアミノ酸変異の意義の検証

F タンパク質の個々のアミノ酸変異を野生型 (MV-IchB と同じ残基) に戻した組換えウイルス (rMV/EGFP_{sspe}MFH 由来) を作製し、それらの細胞融合活性及びヒト神経芽細胞腫由来培養細胞 (SH-SY5Y 細胞) における増殖能について解析し、以下の結果を得た。

1) rMV/EGFPsspeMFHの細胞融合活性は、SSPE-Kobe-1株と同程度に強かった。

2) rMV/EGFPsspeMFHのFタンパク質のY398H変異のみをMV-IchB株と同じアミノ酸残基に復帰させた組換えウイルス(H398Y)は、Vero/SLAM細胞で全く増殖できず、感染性ウイルスが回収できなかつた。

3) rMV/EGFPsspeMFHのG301W変異のみをMV-IchB株と同じ残基に復帰させた組換えウイルス(W301G)は、Vero/SLAM細胞での細胞融合能は強く抑制され、SH-SY5Y細胞では増殖できなかつた。

4) 一方、rMV/EGFPsspeMFHのG401E変異のみをMV-IchB株と同じ残基に復帰させた組換えウイルス(E401G)は、細胞融合能が亢進し、SH-SY5Y細胞で著明な感染拡大が観察された。

D. 考察

SSPE ウイルスのFタンパク質は強い細胞融合活性を有し、Hタンパク質と共同で、標的細胞への感染成立や隣接細胞への感染伝播に重要な役割を果たしている。

本研究により、rMV/EGFPsspeMFHのFタンパク質のY398H変異は、Fタンパク質の細胞内発現量及びフリプロテアーゼ感受性を亢進させることによって、強い細胞融合能及びそれを介した標的細胞へのSSPEウイルスの感染成立・感染拡大能をもたらしていることが明らかになった。

また、G301W変異も、Fタンパク質の構造安定性を低下させることによって、強い細胞融合能及びそれを介した標的細胞へのウイルス感染成立・感染拡大能をもたらしていることがわかった。301位のアミノ酸は、隣接するサブユニットの融合ペプチド上のT127残基に近接しており、G301W変異により融合ペプチドのF蛋白質表面への露出が促進される可能性が考えられた。

一方、G401E変異は、Fタンパク質のフリプロテアーゼ感受性を減少させることによって、細胞融合能の著しい低下及びそれを介したウイルス感染拡大能の減弱をもたらすことがわかった。このウイルス感染拡大能の減弱は、宿主の免疫監視機構からの回避を可能にし、麻疹罹患後の持続感染成立に関与している可能

性が考えられる。

今後、上記のFタンパク質のY398H変異、G301W変異及びG401E変異と神経病原性との関連について、マウス感染実験系を用いて検証する予定である。

E. 結論

SSPE-Kobe-1株の細胞融合能は、Fタンパク質のY398H変異及びG301W変異によりもたらされている可能性が示唆された。一方、Fタンパク質のG401E変異は、ウイルス感染拡大能の低下や免疫監視機構からの回避を通して、持続感染の成立に寄与している可能性が示唆された。

[参考文献]

- 1) 堀田 博, 姜 大鵬, 長野基子. プリオン病と遅発性ウイルス感染症：原因ウイルスと発症機構. *日本臨床* 65:1475-1480, 2007.
- 2) Yanagi Y, Takeda M, Ohno S. Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *J Gen Virol* 87:2767-2779, 2006.
- 3) Hotta H, Nihei K, Abe Y, Kato S, Jiang D-P, Nagano-Fujii M, Sada K. Full-length sequence analysis of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus, a mutant of measles virus, isolated from brain tissues of a patient shortly after onset of SSPE. *Microbiol Immunol* 50:525-534, 2006.
- 4) 堀田 博, 姜 大鵬, 伊藤正恵. SSPE ウイルスの神経病原性はF, HおよびM遺伝子の変異によって規定される. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等克服研究事業 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総括・分担研究報告書 pp110-113, 2014.
- 5) Ayata M, Takeuchi K, Takeda M, Ohgimoto S, Kato S, Sharma LB, Tanaka M, Kuwamura M, Ishida H, Ogura H. The F gene of the Osaka-2 strain of measles virus derived from a case of subacute sclerosing panencephalitis is a major determinant of neurovirulence. *J Virol* 84:11189-11199, 2010.
- 6) Watanabe S, Shirogane Y, Suzuki SO, Ikegame S, Koga R, Yanagi Y. Mutant fusion proteins with enhanced fusion activity promote measles virus spread in human neuronal cells and

brains of suckling hamsters. *J Virol* 87:2648-2659, 2013.

7) Hashimoto K, Ono N, Tatsuo H, Minagawa H, Takeda M, Takeuchi K, Yanagi Y. SLAM (CD150)-independent measles virus entry as revealed by recombinant virus expressing green fluorescent protein. *J Virol* 76:6743-6749, 2002.

8) Takeda M, Ohno S, Seki F, Hashimoto K, Miyajima N, Takeuchi K, Yanagi Y. Efficient rescue of measles virus from cloned cDNA using SLAM-expressing Chinese hamster ovary cells. *Virus Res* 108:161-165, 2005.

9) Jiang D-P, Ide Y-H, Nagano-Fujii M, Shoji I, Hotta H. Single-point mutations of the M protein of a measles virus variant obtained from a patient with subacute sclerosing panencephalitis critically affect solubility and subcellular localization of the M protein and cell-free virus production. *Microbes Infect* 11:467-475, 2009.

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Wahyuni TS, Widyawaruyanti A, Lusida MI, Fuad A, Soetjipto, Fuchino H, Kawahara N, Hayashi Y, Aoki C, Hotta H. Inhibition of hepatitis C virus replication by chalepin and pseudane IX isolated from *Ruta angustifolia* leaves. *Fitoterapia* 99:276-283, 2014.

2) Adianti M, Aoki C, Komoto M, Deng L, Shoji I, Wahyuni T S, Lusida MI, Soetjipto, Fuchino H, Kawahara N, Hotta H. Anti-hepatitis C virus compounds obtained from *Glycyrrhiza uralensis* and other *Glycyrrhiza* species. *Microbiol Immunol* 58:180-187, 2014.

3) Ratnoglik S L, Aoki C, Sudarmono P,

Komoto M, Deng L, Shoji I, Fuchino H, Kawahara N, Hotta H. Antiviral activity of extracts from *Morinda citrifolia* leaves and chlorophyll catabolites pheophorbide a and pyropheophorbide a, against hepatitis C virus. *Microbiol Immunol* 58:188-194, 2014.

2. 学会発表

1) 佐藤友人, 樋口 遥, 姜 大鵬, 西川大智, 正垣博子, 脇本浩史, 北川善紀, 後藤 敏, 堀田 博, 伊藤正恵. SSPE ウイルス Kobe-1 株 F 蛋白の細胞融合に関わる変異の解析. 第 62 回 日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11.10-12, 2014.

2) Wahyuni T S, Widyawaruyanti A, Lusida M I, Fuad A, Soetjipto, Fuchino H, Kawahara N, Hayashi Y, Aoki C, Hotta H. Chalepin and pseudane IX isolated from *Ruta angustifolia* leaves inhibit hepatitis C virus replication. The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity in Nara, Nara, September 23-26, 2014.

3) Wahyuni T S, Widyawaruyanti A, Lusida M I, Fuad A, Soetjipto, Fuchino H, Kawahara N, Hayashi Y, Aoki C, Hotta H. Inhibition of hepatitis C virus replication by Chalepin and Pseudane IX isolated from *Ruta angustifolia* leaves. 日本薬学会第 135 年会, 神戸, 3.25-28, 2015.

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

厚生労働科学研究委託事業 難治性疾患等克服研究事業
 （難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業））

プリオン病及び遅発性ウイルス感染症の分子病態解明・治療法開発に関する研究班 委託業務成果報告（業務項目）

麻疹ウイルスの神経系持続感染機構の解明とそれに基づく治療法開発

研究分担者：柳 雄介 九州大学大学院医学研究院ウイルス学分野
 研究協力者：渡辺俊平 九州大学大学院医学研究院ウイルス学分野
 研究協力者：佐藤裕真 九州大学大学院医学研究院ウイルス学分野
 研究協力者：大野真治 九州大学大学院医学研究院ウイルス学分野

研究要旨 麻疹ウイルスが神経細胞に感染し伝播するには、細胞外領域の変異により F 蛋白質が不安定化すること、その結果、膜融合能が亢進することが重要であることを培養細胞および動物モデルを用いた実験で明らかにした。実際、SSPE 患者由来のウイルス株の F 蛋白質にはそのような変異が認められる。現在、そのような変異 F 蛋白質を活性化できる神経細胞上の受容体分子の同定を、発現クローニングおよび抗体作製により進めている。神経細胞受容体の同定により、麻疹ウイルスの神経細胞感染機構の理解が深まるだけでなく、ウイルスの細胞侵入を標的にした治療法の開発が期待できる。

A. 研究目的

麻疹ウイルスのエンベロープ上には受容体と結合する機能をもつ H 蛋白質と、膜融合活性をもつ F 蛋白質が存在する。麻疹ウイルスの免疫細胞、上皮細胞への感染は、それぞれ受容体分子が同定され、細胞特異的な感染機構が理解されている。一方、麻疹ウイルスは中枢神経系に感染して亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) を起こす。しかし、既知の受容体 (SLAM, nectin 4) を発現していない神経細胞にどのようにして麻疹ウイルスが感染するか分かっていない。本研究は、麻疹ウイルスの神経細胞感染機構を解明することにより、SSPE の治療法を開発することを目的とする。

B. 研究方法

野生型あるいは融合能が亢進した F 蛋白質を発現する組換え麻疹ウイルスをヒト SLAM 発現遺伝子改変マウスに脳内および腹腔内接種し、感染の広がりを観察した。神経細胞受容体の同定のためには、膜融合能が亢進した F 蛋白質を H 蛋白質とともに発現させても膜融合を起こさないような細胞株をスクリーニングした。その細胞を recipient とし、レトロウイルスベクターに組み込んだ神経細胞の cDNA ライブ

ラリーを導入した。それに GFP を発現する組換え麻疹ウイルスを感染させ、非感受性細胞に感受性を付与できる cDNA のスクリーニングを行った。また、神経細胞でマウスを免疫してモノクローナル抗体を産生し、ウイルスの神経細胞感染を阻害するものをスクリーニングした。

（倫理面への配慮）

組換え麻疹ウイルスの使用に関しては大臣確認を受けている。

C. 研究結果

SLAM 発現遺伝子改変マウスに脳内接種すると、野生型 F 蛋白質を持つ組換え麻疹ウイルスは全く脳内で広がらなかったが、変異 F 蛋白質を持つウイルスは脳内で広がった。これは乳のみハムスターを用いた実験結果と一致した。一方、腹腔内接種した場合は、変異ウイルスは、野生型ウイルスに比べて SLAM 陽性細胞が多数存在する脾臓での増殖は著しく低下した。以上より、F 蛋白質の変異により膜融合能が亢進することは、神経性でのウイルス感染・伝播には有利であるが、細胞障害性が強くなるために脾臓などの末梢臓器では逆に不利になると考えられる。

神経細胞に発現している受容体同定のために、神経芽腫細胞株 IMR-32 の cDNA ライブラリーを作製して、非感受性細胞に導入後 GFP 発現麻疹ウイルスを感染させる発現クローニングを現在進めている。並行して、IMR-32 の細胞表面分子に対するモノクローナル抗体を作製し、それらのウイルス感染阻止能を調べるスクリーニングも進めている。

D. 考察

神経細胞受容体の同定により、麻疹ウイルスの神経細胞感染機構の理解が深まるだけでなく、ウイルスの細胞侵入を標的にした治療法の開発が期待できる。

E. 結論

麻疹ウイルスが、神経細胞に感染伝播するには、F 蛋白質の変異による膜融合能の亢進が必要である。そのような変異 F 蛋白質を活性化できる神経細胞受容体の同定は、SSPE の病態解明と治療法開発に不可欠である。

[参考文献]

- 1) Rima BK, Duprex WP. Morbilliviruses and human disease. *J Pathol* 208:199-214, 2006.
- 2) Watanabe S, Shirogane Y, Suzuki SO, Ikegame S, Koga R, Yanagi Y. Mutant fusion proteins with enhanced fusion activity promote measles virus spread in both human neuronal cells and brains of suckling hamsters. *J Virol* 87:2648-2659, 2013.
- 3) Griffin DE. Measles virus. In: Knipe DM et al. eds., *Fields Virology* 6th edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp1042-1069, 2013.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watanabe S, Ohno S, Shirogane Y, Suzuki SO, Koga R, Yanagi Y. Measles virus mutants possessing the fusion protein with enhanced fusion activity spread effectively in neuronal cells, but not in other cells, without causing strong cytopathology. *J Virol*, in press.

2. 学会発表

- 1) 柳 雄介. 麻疹ウイルス研究、これまでとこれから. 第 55 回臨床ウイルス学会, 札幌, 6.14-15, 2014.
- 2) 柳 雄介. Virus entry - receptor attachment and membrane fusion. 第 13 回あわじしま感染症・免疫フォーラム in 奈良, 奈良, 9.23-26, 2014.

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

厚生労働科学研究委託事業 難治性疾患等克服研究事業
 （難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業））

プリオン病及び遅発性ウイルス感染症の分子病態解明・治療法開発に関する研究班 委託業務成果報告（業務項目）

亜急性硬化性全脳炎患者に対するリバビリン脳室内持続輸注療法時の リバビリン投与量と髄液中リバビリン濃度の検討

研究分担者：細矢光亮	福島県立医科大学・医学部・小児科学講座
研究分担者：水澤英洋	独立行政法人・国立精神・神経医療研究センター病院
研究協力者：坪井義夫	福岡大学・医学部・神経内科学教室
研究協力者：橋本浩一	福島県立医科大学・医学部・小児科学講座
研究協力者：宮崎恭平	福島県立医科大学・医学部・小児科学講座
研究協力者：菅野修人	福島県立医科大学・医学部・小児科学講座
研究協力者：阿部優作	福島県立医科大学・医学部・小児科学講座

研究要旨 亜急性硬化性全脳炎(SSPE)は麻疹ウイルス変異株の持続感染による遅発性ウイルス感染症である。国内外ともに有効な治療法はなく、治療法の確立が切望されている。抗ウイルス効果のあるリバビリン(Rib)による治療が試みられているが、安全かつ効果的に実施するため投与方法の標準化が必要である。今回、皮下埋込み型持続輸注ポンプを用いた Rib 脳室内持続輸注療法を試み、髄液中 Rib 濃度を検討した。新規 SSPE 患者 3 例を対象とし、皮下埋込み型持続輸注ポンプ埋込み術を施行し、Rib + IFN α の持続輸注療法を開始した。投与サイクルは 10 日間薬剤投与+10~20 日間休薬を 1 サイクルとして、髄液中 Rib 目標濃度を 50~200 μ g/mL に設定し治療した。Rib 投与中の髄液中濃度を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。3 症例とも、髄液中 Rib 濃度は投与量に応じて高まり、概ね治療域濃度で維持することができた。治療中、重篤な副反応は認められず、薬剤濃度を調節することにより、髄液中 Rib 有効濃度の維持が可能であった。髄液中濃度の安定化後は Rib 治療中であっても自宅で過ごすことが可能で、患者・家族の QOL の改善につながった。皮下埋込み型持続輸注ポンプを用いた Rib 脳室内持続輸注療法により、髄液中 Rib 目標濃度を持続的に維持することができた。安全かつ効果的に実施するため、さらなる症例の集積および検討が必要である。

A. 研究目的

亜急性硬化性全脳炎(SSPE)は麻疹ウイルス変異株の持続感染による遅発性ウイルス感染症である。国内外ともに有効な治療法はなく、治療法の確立が切望されている。抗ウイルス効果のあるリバビリン(Rib)による治療が試みられているが、安全かつ効果的に実施するため投与方法の標準化が必要である。以前報告した Ommaya reservoir を用いた Rib 脳室内単回投与療法では、髄液中 Rib 有効濃度の維持が困難な症例があった[1]。また、Ommaya reservoir への頻回の穿刺により、細菌性髄膜炎を合併することが報告されている[2]。今回、皮下埋込み型持続輸注ポンプを用いた Rib 脳室内持続輸注療法

を試みた。これまで実施した 3 例において、その投与量と髄液中 Rib 濃度を検討した。

B. 研究方法

【対象】

福島県立医科大学付属病院に入院した SSPE 患者 3 症例。

【方法】

皮下埋込み型持続輸注ポンプ(archimedes®, codman 社, [容量・輸注速度：40mL・2mL/day と 60mL・4mL/day の 2 種類あり。])埋込み術を施行し、Rib + IFN α の持続輸注療法を開始した。投与サイクルは 10 日間薬剤投与の後 10~20 日間休薬を 1 サイクルとして、髄液中 Rib 目

標濃度を 50~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に設定し治療した。Rib 投与中の髄液中濃度を高速液体クロマトグラフィー (ELITE LaChrom®, HITACHI 社) を用いて測定した。

（倫理面への配慮）

本治療は福島県立医科大学倫理委員会の承認を受け、家族に対するインフォームドコンセントのもとに実施された。

C. 研究結果

【髄液中 Rib 濃度 (図)】

症例 1 (19 歳男性) では、始め Rib 投与量 1.5mg/kg/day で治療開始し、髄液中 Rib 濃度は 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 前後であった。そのため、投与量を最大量 3mg/kg/day に増量したところ、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 前後で維持することができた。症例 2 (13 歳女性) では 2mg/kg/day で治療を開始し、60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の髄液中濃度が得られた。目標髄液中濃度を 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に設定し、投与量を 4mg/kg/day に増量することによって、目標濃度まで上昇させることができた。症例 3 (14 歳男性) は 1mg/kg/day では 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 前後であったため、2mg/kg/day に増量したところ、倍の 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で維持することができた。3 症例とも、髄液中 Rib 濃度は投与量に応じて高まり、概ね治療域濃度で維持することができた。

【単回投与方法と持続輸注療法の比較(表)】

Ommaya reservoir を用いた単回投与療法と比較して、持続輸注療法では髄液中 Rib 濃度を一定に保つことができた。治療中のリザーバーへの穿刺回数は単回投与では 10~30 回/月だったのに対し、持続輸注療法では 2 回/月の穿刺で治療することが可能であった。持続輸注療法では外来での治療も可能であった。両者とも Rib の経静脈投与で見られるような溶血性貧血は認められなかった。持続輸注療法のうち 1 例で前胸部リザーバー埋め込み部のるい瘦に伴う皮膚の被薄化による局所感染を認め、抗生剤治療を要した。2 例目以降は埋め込み部を皮下組織の厚い腹部にすることで感染を認めずに経過している。

D. 考察

これまでの Ommaya reservoir を用いた Rib 単

回投与方法では Rib 投与の度に 10 回~30 回/月の穿刺が必要であったが、今回試みた持続輸注ポンプを用いた治療では、1 クールに 2 回 (髄液濃度安定化後は 1 回) の穿刺で治療が可能だった。治療中、重篤な副反応は認められず、薬剤濃度を調節することにより、髄液中 Rib 有効濃度の維持が可能であった。

臨床的には、実施症例において病状進行の停止、および改善には至らなかったが、病状の進行は緩徐となった。治療中は麻疹特異的 IgG 抗体価の上昇が抑えられるが治療中止後は急激に上昇する症例がみられた。投与量と髄液中濃度が安定化するまでは入院での治療となるが、安定化後は Rib 治療中であっても自宅で過ごすことが可能で、患者・家族の QOL の改善につながった。症例ごとに Rib 投与量と濃度に違いがみられたが、それは個々の髄腔内体積や脳脊髄液の代謝の違いなどが関係していると推察された。また、Rib 濃度の安定化後も体重変化などによると思われるリバビリン濃度の変動がみられ、投与量の微調整が必要であり、継続的に Rib 髄液中濃度の測定が必要である。

症例 1 でのリザーバー埋め込み部の感染については、2 例目から埋め込み部を皮下脂肪の比較的厚い腹部に変更し、症例 2 と 3 では埋め込み部の感染は生じていない。3 例とも細菌性髄膜炎などの中枢神経感染症の合併は認めていない。

E. 結論

皮下埋め込み型持続輸注ポンプを用いた Rib 脳室内持続輸注療法により、髄液中 Rib 目標濃度を持続的に維持することができた。より安全かつ効果的に実施するため、さらなる症例の集積および検討が必要である。

[参考文献]

- 1) Hosoya M, Mori S, Tomoda A, Mori K, Sawaishi Y, Kimura H, Shigeta S, Suzuki H. Pharmacokinetics and effects of ribavirin following intraventricular administration for treatment of subacute sclerosing panencephalitis. *Antimicrob Agents Chemother* 48:4631-4635, 2004.
- 2) Lishner M, Perrin RG, Feld R, Messner HA, Tuffnell PG, Elhakim T, Matlow A, Curtis JE,

Complications associated with Ommaya reservoir in patients with cancer. *Arch Intern Med* 150:173-176, 1990.

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) 宮崎恭平, 橋本浩一, 佐藤晶論, 細矢光亮. リバビリン代謝物, 1,2,4 triazole-3-carboxamide の麻疹ウイルスに対する抗ウイルス作用. 第55回日本臨床ウイルス学会, 札幌, 6.14-15, 2014.

- 2) 菅野修人, 宮崎恭平, 佐藤晶論, 橋本浩一, 細矢光亮. 亜急性硬化性全脳炎患者に対するリバビリン脳室内持続輸注療法時のリバビリン投与量と髄液中リバビリン濃度の検討. 第19回日本神経感染症学会総会学術集会, 金沢, 9.4-6, 2014.

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:リバビリン脳室内持続輸注療法中の髄液中リバビリン濃度

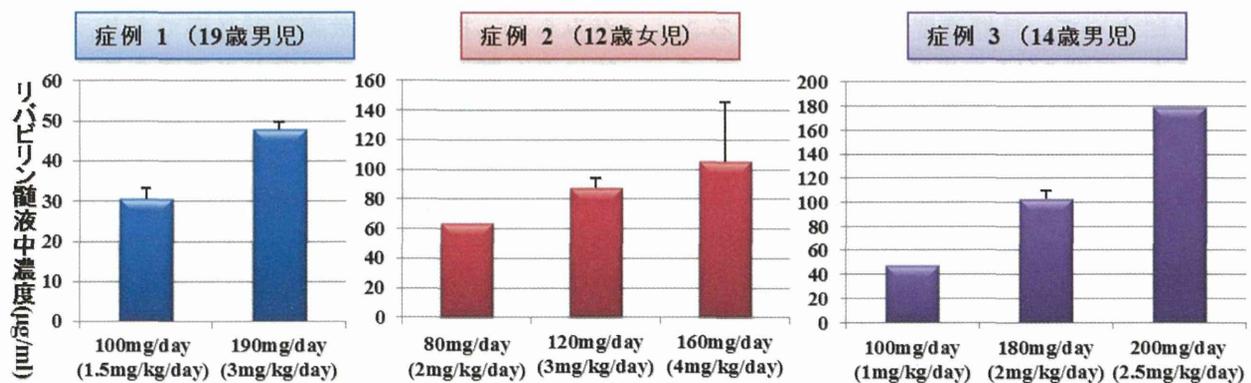


表:単回投与と持続投与の比較

	単回投与 Ommaya reservoir	持続投与 持続輸注ポンプ
Rib濃度	変動	一定
穿刺回数	10~30回/月	2回/月
感染リスク	高い	低い ※
貧血	なし	なし
外来治療	不可	可

※持続投与3例中、1例目で全胸部皮下リザーバー埋め込み部の局所感染を認め、抗生剤治療を要した。
2例目からは埋め込み部を腹部に変更した。

厚生労働科学研究委託事業 難治性疾患等克服研究事業
 （難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業））

プリオン病及び遅発性ウイルス感染症の分子病態解明・治療法開発に関する研究班 委託業務成果報告（業務項目）

JC ウイルス（VP1, agnoprotein）に対するモノクローナル抗体の作成

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の原因ウイルスである JC ウイルスは、カプシドと呼ばれる正二十面体の球状殻にゲノム DNA を容れている。JC ウイルスのカプシドは、VP1, VP2, VP3 の 3 種のカプシドタンパクからなる。カプシド表面は、主要構成タンパクである VP1 の 5 量体 72 個（合計 360 分子）からなり、特に VP1 BC, DE, HI ループからなる表面構造は、ウイルス抗原構造や受容体結合部位の形成を担っている。VP2 および VP3 は internal protein と呼ばれ、ウイルス粒子の内側で、ゲノム DNA をアンカリングする。また、Agnoprotein は、ウイルス粒子形成の制御を含む多機能性の制御蛋白である。今回我々は、VP1 および agnoprotein に対するモノクローナル抗体を作成した。既に作製したポリクローナル抗体と合わせて、JC ウイルスが誘導する脱髄脳症の発症機序の解明や、脱髄脳症の病理診断への応用が期待できる。

A. 研究目的

進行性多巣性白質脳症の原因ウイルスである JC ウイルスの特異抗体を作成し、分子病態の解明や病理診断へ応用する。

B. 研究方法

JC ウイルス Tokyo-1 株は、病理解剖で得られた患者脳組織から分離された、日本最初の JC ウイルス株である。既に我々は、JC ウイルス Tokyo-1 株の全塩基配列（5128 bp）を決定し、JC ウイルス Mad-1 株、BK ウイルス、simian virus 40 との比較から、後期領域にコードされた 3 種のカプシド蛋白のアミノ酸配列を決定している【agnoprotein (71 amino acids, nt 275 to 490), VP2 (344 amino acids, nt 524 to 1558), VP3 (225 amino acids, nt 881 to 1558), and VP1 (354 amino acids, nt 1467 to 2531)】。結晶構造解析から、JC ウイルス VP1 の BC, HI ループ構造に相当する領域を選択し、抗原性の高いペプチドを合成して、モノクローナル抗体を作成した。また、agnoprotein C 末端配列に対するモノクローナル抗体も同様に作成した。

（倫理面への配慮）

本年度の研究では、ヒト遺伝子の解析は行っていない。またヒト組織は、抗体スクリーニン

グの目的で使用し、個人情報扱っていない。

C. 研究結果

JC ウイルス VP1 の BC, HI ループ構造に相当する合成ペプチドに対するモノクローナル抗体は、ヒト脳組織を用いた免疫染色でスクリーニングし、JC ウイルス遺伝子を導入した COS-7 細胞および、JC ウイルス蛋白を持続的に発現する JCI 細胞を用いてウエスタンブロットで分子量を確認した。Agnoprotein C 末端配列に対するモノクローナル抗体は、免疫染色で JC ウイルス感染細胞の細胞質におけるシグナルを確認できたが、ウエスタンブロットでは確認することができなかった。また、VP2/VP3 に対するモノクローナル抗体も作成を試みたが、期待する結果を得ることができなかった。既に使用しているポリクローナル抗体（VP1, VP2/VP3, agnoprotein）と合わせて、今後、脱髄脳症の発症機序解明の研究や、病理診断に応用する予定である。

D. 考察

ウイルス結晶構造解析からも予測されるように、VP1 蛋白のループ構造がウイルス抗原性を担っていると考えられ、これに対するモノクローナル抗体も比較的力価の高いものが作成

できた。一方、VP2/VP3 や agnoprotein は抗原性が低く、発現量も少ないため、特異抗体の作成は VP1 に比較して困難であった。

近年、JC ウイルス VP1 変異が、赤血球凝集能や受容体との特異性と関係するとの報告があり、そのループ構造に対するペプチド・モノクローナル抗体の作成は、今後の JC ウイルス感染症の病態解明に有用と考える。また、agnoprotein の C 末端配列は JC ウイルス特異的で、BK ウイルスや SV40 とは交叉がない。これまでに使用してきたラビットポリクローナル抗体と合わせて、今後、脱髄脳症発症の病態解明や病理診断に応用していきたいと考えている。

E. 結論

JC ウイルス VP1, agnoprotein に対するモノクローナル抗体を作成した。

[参考文献]

- 1) Neu U et al. Structure-function analysis of the human JC polyomavirus establishes the LSTc pentasaccharide as a functional receptor motif. *Cell Host Microbe* 8:309-319, 2010.
- 2) Shishido-Hara Y et al. Analysis of capsid formation of human polyomavirus JC (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* 74:1840-1853, 2000.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shishido-Hara Y, Yazawa T, Nagane M, Higuchi K, Abe-Suzuki S, Kurata M, Kitagawa M, Kamma H, Uchihara T. JC virus inclusions in progressive multifocal leukoencephalopathy: scaffolding promyelocytic leukemia nuclear bodies grow with cell cycle transition through an S-to-G2-Like state in enlarging oligodendrocyte nuclei. *J Neuropathol Exp Neurol* 73:442-53, 2014.

- 2) 宍戸-原由紀子. 進行性多巣性白質脳症 -JC ウイルス封入体を有する乏突起膠細胞腫大核の特徴-. *臨床神経科学* 32:1332-1333, 2014.

- 3) Shishido-Hara, Y. Progressive multifocal leukoencephalopathy. In: Aminoff MJ, Daroff RB eds. *Encyclopedia of the Neurological Sciences*, 2nd edition, Oxford: Academic Press, New York, pp982-986, 2014.

- 4) Shishido-Hara Y. Progressive multifocal leukoencephalopathy: dot-shaped inclusions and the virus-host interactions. *Neuropathology*, in press.

2. 学会発表

- 1) 宍戸-原由紀子. 進行性多巣性白質脳症. 第 55 回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, 6.5-6, 2014.

- 2) 宍戸-原由紀子, 矢沢卓也, 菅間 博, 内原俊記. 進行性多巣性白質脳症: JC ウイルス感染による乏突起膠細胞変性のメカニズム. 第 19 回日本神経感染症学会総会学術集会, 金沢, 9.4-6, 2014.

- 3) 宍戸-原由紀子. 基礎と臨床の架け橋としての病理学を目指して～JC ウイルスから学んだこと～. 第 9 回大学院医学研究セミナー (第 13 回腫瘍病理セミナー), 内灘, 7.8, 2014.

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

厚生労働科学研究委託事業 難治性疾患等克服研究事業
 （難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業））

プリオン病及び遅発性ウイルス感染症の分子病態解明・治療法開発に関する研究班 委託業務成果報告（業務項目）

進行性多巣性白質脳症(PML)における JC ウイルスタンパク質の発現様式の免疫組織学的検討

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：鈴木忠樹 国立感染症研究所 感染病理
 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(PML)は稀な疾患であり、その病態は未だ不明な部分が多い。現在、PMLの免疫組織学的診断にはJCウイルス(JCV)のコードする後期タンパク質であるVP1、及び早期タンパク質T抗原(LT)に対する特異抗体が用いられている。

本研究では、PMLの免疫組織学的診断に適した抗体を評価することを目的として、JCVの後期タンパク質であるagnoprotein(Agno)、VP2/3、及びVP1に対する特異抗体を用いて、PML症例の病変部における各タンパク質の発現様式を詳細に解析し、病態解明につながる知見を得ると共に、PML症例の脳組織切片におけるJCVタンパク質の発現様式を免疫組織化学的に解析する。更にPML検体切片からDNAを抽出し、リアルタイムPCR法を用いてJCVゲノムを定量し、ウイルスゲノム量とタンパク質発現様式の関連について検討することを試みた。

その結果、PML脳組織切片では、病変中心部、辺縁部において、Agno、VP2/3、及びVP1各抗体で異なる染色結果が得られた。AgnoとVP1は細胞外の間質に強い陽性所見を認めた。VP2/3は明瞭に核に陽性所見を認め、JCVゲノム量と、VP2/3の免疫染色陽性所見は相関性が高かった。一方AgnoはJCVゲノム量との相関は低かったが、低ゲノム量の検体においても免疫染色陽性所見が認められた。

以上の結果から、病変領域において各抗体の染色像は異なっており、PMLの免疫組織学的検索において、異なったウイルスタンパク質に対する抗体を用いることが有用である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)は脳のオリゴデンドロサイトにJCウイルス(JCV)が溶解感染し、その結果、脱髄が起きて発症する疾患である。

国立感染症研究所ウイルス1部の中道らの報告によると¹⁾、本邦では1年間に20人前後の発症、罹患率は人口100万人に1人程度と稀な疾患であるが、JCVの成人における感染率70%以上と非常に高い。PMLは、JCVの初感染に伴い発症するわけではなく、宿主の免疫不全状態に伴い腎臓に持続感染しているJCVが再活性化することにより起こる。免疫不全状態ではない健常人においても持続感染が成立していることから、PML発症に関わらず血清中のJCV抗体は陽性となり、JCVの血清学的検査はPML

の診断において有用ではない。更に、PMLの発症とウイルス血症の間にも明らかな相関がないことが報告されており²⁾、PML診断において最も重要な検査は、髄液や脳組織内にJCVが存在することを証明する事である。特に免疫組織化学的に、脳組織でJCV抗原陽性細胞を検出する事は直接的に脳内でJCVが増殖している事を示しており、最も確度の高い検査法と考えられている。

現在、JCVの免疫組織化学にはJCV粒子外殻タンパク質であるVP1に対する特異抗体、もしくは近縁ウイルスであるSV40の早期タンパク質であるT抗原(LT)に対する抗体が用いられているが、脱髄が進んだ病変等では典型的な染色パターンを示さない症例が散見され、確定診断に苦慮する事がある。

本研究は、PMLの免疫組織学的診断に適した抗体を評価するために、JCVの後期タンパク質である agnoprotein (Agno)、VP2/3、及び VP1 に対する特異抗体を用いて、PML症例の病変部における各タンパク質の発現様式を詳細に解析し、病態解明につながる知見を得ると共に、PML症例の脳組織切片における JCV タンパク質の発現様式を免疫組織化学的に解析すること、更に PML 検体切片から DNA を抽出し、リアルタイム PCR 法を用いて JCV ゲノムを定量し、ウイルスゲノム量とタンパク質発現様式の関連について検討することを目的とした。

B. 研究方法

1) 材料

国立感染症研究所感染病理部に対応表を有さない連結可能匿名化検体として保存されている PML と確定診断がされている症例のホルマリン固定パラフィン包埋脳組織検体を用いた。これらの検体は病理検査のために採取された剖検および生検検体であり、当初の病理検査に使用した余剰分である。

2) 病理学および免疫組織学的検索

国立感染症研究所感染病理部に保管されているホルマリン固定パラフィン包埋脳組織検体は、脱パラフィン後、一部はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を実施した。また、ウイルス抗原を検出するために、一次抗体として抗 VP1 抗体、抗 VP2 抗体、抗 agnoprotein (Agno) 抗体 (いずれも北海道大学 澤洋文博士より供与されたウサギポリクローナル抗体)^{3), 4)} および SV40 LT 抗体 (マウスモノクローナル抗体 Abcam 社) を用いて免疫組織化学染色を実施した。脱パラフィンした切片を抗原賦活化剤 (pH9.0) (ニチレイ) 中で 121°C 20 分オートクレーブ処理によって抗原賦活化した。その後、過酸化水素水・メタノールによる内因性ペルオキシダーゼの阻害を室温 30 分で処理し、1 次抗体 (4000 倍希釈) を加え 4°C で一晩インキュベートした。その後、ENVISION+ (DAKO) を用いてプロトコル通り免疫染色を実施した。

3) 定量的 PCR

パラフィン切片からキアゲン社 QIAamp

DNAFFPE Tissue Kit を用いて DNA を抽出し、DNA 溶液を 50µl 得た。DNA 溶液 1µl を用いて、下記の条件により JCV の定量的 PCR を行った。同時に内在性のコントロールとして beta-actin の検出を行った。QuantiTect Probe PCR kit (Qiagen) 20µl total volume [10 µl 2 x Pre mix, 0.8 µl each primer (10 µM working, 400 nmol final conc.), 0.4 µl probe (10 µM working, 200 nmol final conc.), 6 µl DDW, 1 µl template DNA] PCR condition: 95 °C, 15 min -> 40 x (94 °C, 15 s -> 60 °C, 60 s) Primer and probes: Forward primer (5'-3'): ATGTTTGCCAGTGATGATGAAAA, Reverse primer (5'-3'): GGAAAGTCTTTAGGGTCTTCTACCT, Probe (5'-3'): AGGATCCCAACACTCTACCCACCTAAAAGA, Label of probe (5'-3'): FAM-TAMRA, Target gene: early gene (GenBank J02226, nt 4251-4339, amplicon=89 bp)。

(倫理面への配慮)

保存試料の利用については、国立感染症研究所医学研究倫理委員会による審査を経て承認されている (「進行性多巣性白質脳症の病理組織学的解析」受付番号 516)。

C. 研究結果

1) JCV の後期タンパク質 (VP1, VP2, Agno) に対する抗体と早期タンパク質 (LT) に対する抗体を用いて、PML 脳組織での免疫染色を実施し以下の結果が得られた。

同一症例においても、PML 病変の中心部、及び辺縁部において、また使用した各 JCV タンパク質の抗体によって、異なる染色結果が得られた。

2) 免疫染色の結果をスコアにより定量化することを試みた。

3) 切片から抽出した DNA を用いて実施した Real-time PCR 法により検索した JCV のゲノム量と各抗体を用いた免疫染色のスコアの結果の相関を調べた結果、抗 VP2/3 抗体を用いた免疫染色の結果が JCV のゲノム量と相関することが判明した (図1)。

更に、各抗体を用いた免疫染色のスコアの合計と JCV のゲノム量の相関を調べた結果、VP2/3

抗体とAgno抗体の合計したスコアが、JCVのゲノム量と最も高い相関を示すことが判明した(図2)。

D. 考察

上記の得られた結果から下記の事実が示唆された

- 1) 病変領域によって、各抗体の染色像に差異があること。
 - 2) PMLの免疫染色においては、抗VP2/3抗体を含む複数の抗体を用いて免疫組織化学解析を行うことが望ましい。
- VP2/3抗体とAgno抗体を組み合わせることで、病理組織上でウイルス量を推定できると考えられ、今後、病理像とウイルス増殖との関係性が詳細に明らかになることが期待される。

E. 結論

本研究の結果から、病変領域において各抗体の染色像は異なっており、PMLの免疫組織学的検索において、異なったウイルスタンパク質に対する抗体を用いることが有用である可能性が示唆された。

[参考文献]

- 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, 2012.
- 2) Berger JR, Houff SA, Gurwell J, Vega N, Miller CS, Danaher RJ. JC virus antibody and viremia as predictors of progressive multifocal leukoencephalopathy in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. *Clin Infect Dis* 53:711-715, 2011.
- 3) Okada Y, Sawa H, Endo S, Orba Y, Umemura T, Nishihara H, Stan AC, Tanaka S, Takahashi H, Nagashima K. Expression of JC virus agnoprotein in progressive multifocal leukoencephalopathy brain. *Acta Neuropathol* 104:130-136, 2002

- 4) 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) 澤 洋文, 小林進太郎, 鈴木忠樹, 大場靖子. ポリオーマウイルスの疫学研究と基礎研究. *ウイルス* 64:25-34, 2014

2. 学会発表

- 1) 澤 洋文, 小林進太郎, 鈴木忠樹, 大場靖子. JCウイルス感染抑制の標的となる細胞内機構の解明. *SSPE・PMLシンポジウム 2014*, 金沢, 9.6, 2014.
- 2) 大場靖子, 鈴木忠樹, 澤 洋文. JCウイルス後期遺伝子RNAの新たな転写後調節機構. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 11.10-12, 2014.
- 3) 大場靖子, 鈴木忠樹, 澤 洋文. JCウイルス後期遺伝子のRNAプロセッシング. 第37回日本分子生物学会年会, 横浜, 11.25-27, 2014.

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

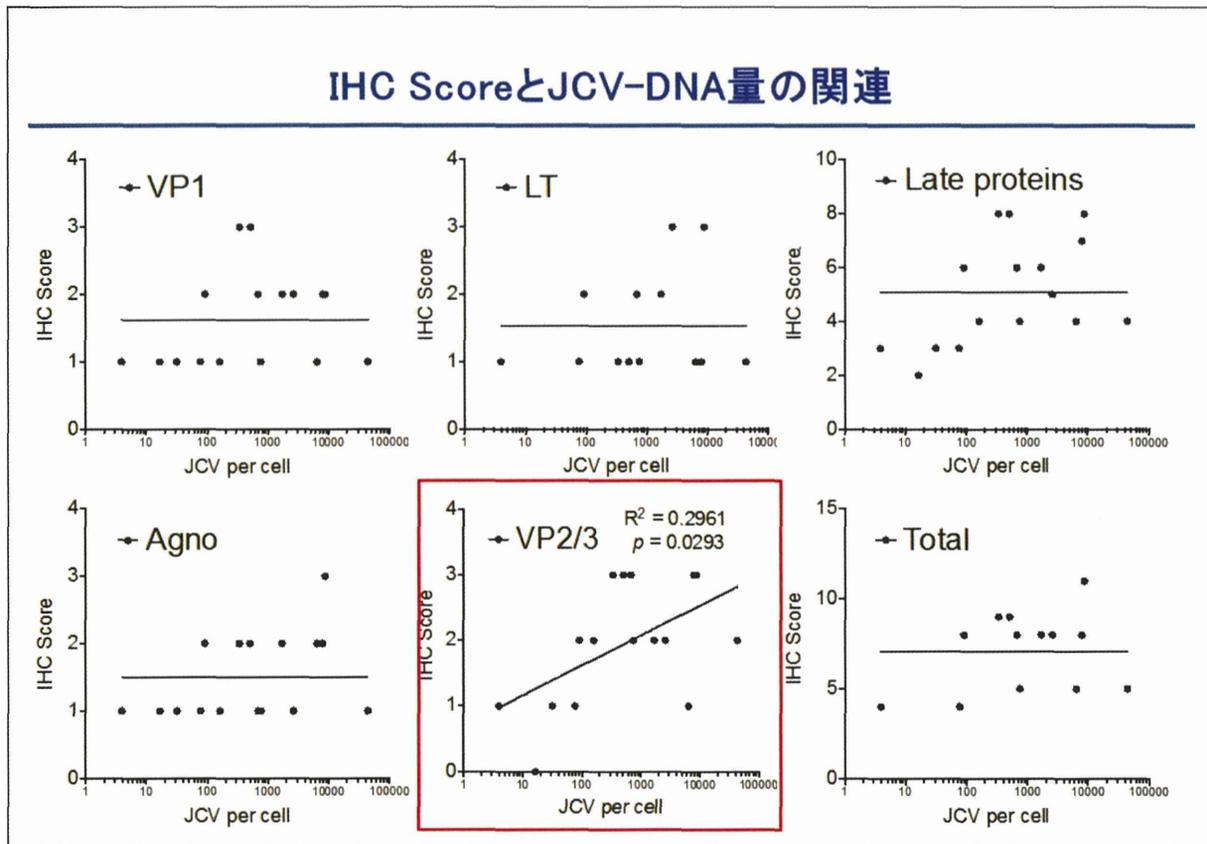


図 1：VP2/3 の免疫染色のスコアは Real-time PCR 法により検索した JCV のゲノム量と正の相関を示した。

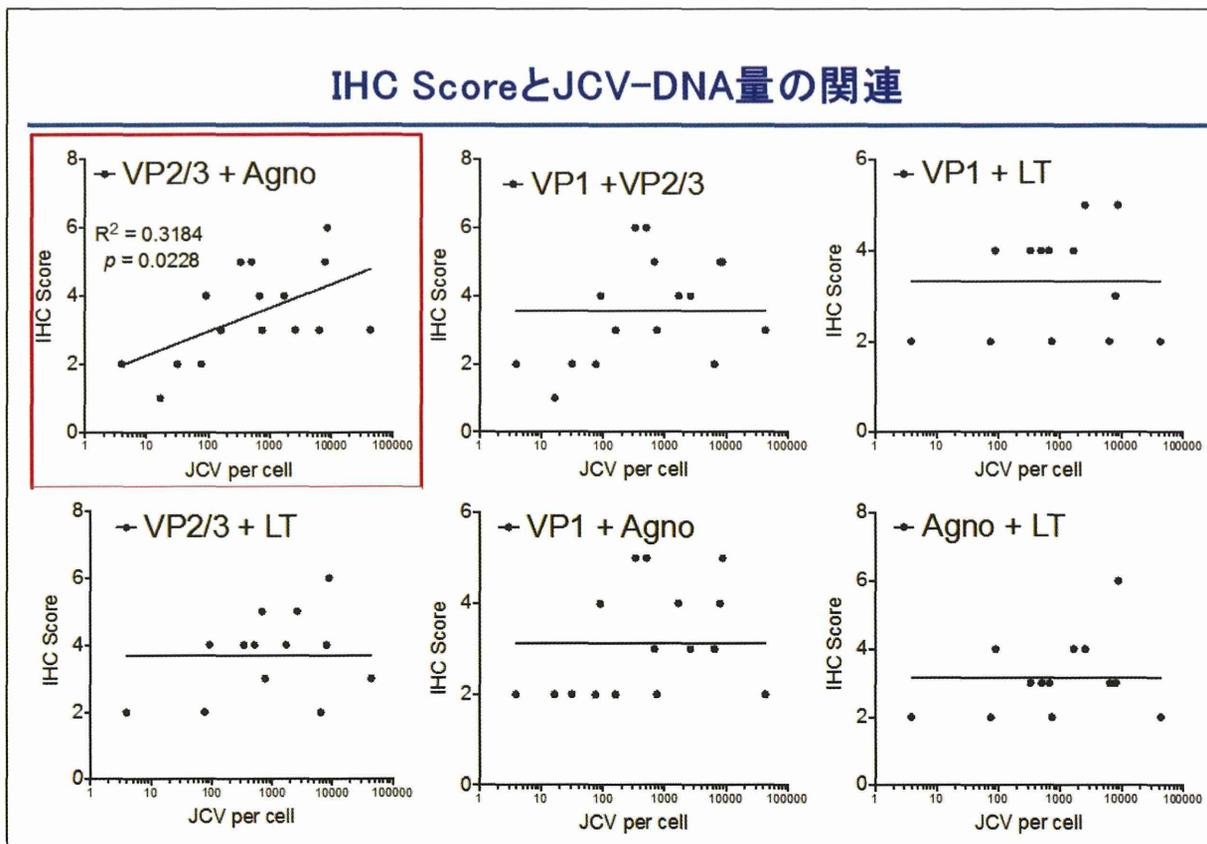


図 2：VP2/3 と Agno の免疫染色のスコアの合計は、VP2/3 単独のスコアよりも、Real-time PCR 法により検索した JCV のゲノム量と高い正の相関を示した。

厚生労働科学研究委託事業 難治性疾患等克服研究事業
 （難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業））

プリオン病及び遅発性ウイルス感染症の分子病態解明・治療法開発に関する研究班 委託業務成果報告（業務項目）

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oligodendrogloma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。Oligodendrogloma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Oligodendrogloma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。U87細胞株へのJCウイルス感染細胞数はJCウイルス接種後2週間で最大になり、1か月後には消失した。原因として感染細胞数が少ないため持続感染の維持が困難であったと考えられた。そこでJCウイルス接種により培養上清中に浮遊細胞集塊が増え、これを収集し培養すると陽性細胞数が約5倍に増加した。今後、浮遊細胞集塊を収集することにより感染細胞数を増加させ維持型持続感染細胞の樹立を行い、これを用いて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

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はIMR32細胞で、human neuroblastoma由来細胞で、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。これまでの検討で我々は、新たな許容細胞としてoligodendroglia系の細胞株であるU87細胞株にJC virus感染が成立しうることを見出した。そこで今回我々はoligodendroglia特異性の原因となる特異的因子の検索を行うこととした。

B. 研究方法

U87 と A172 は 1p19q の deletion が報告されており oligodendroglioma の細胞株と考えられる。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 抗体を用いた細胞蛍光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。また、JC ウイルス接種後あるいは浮遊細胞集塊採取後の JC ウイルス感染細胞数の確認は図 1、2 のように行った。

（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) U87 細胞株に維持型持続感染が認められた（図 3, 4）。
- 2) A172、KMG4、U251 細胞株には感染が認められなかった（図 3）。
- 3) U87 細胞株へ JC ウイルスを接種するとウイルス陽性細胞を多く含む浮遊細胞集塊が増加する（図 5）。
- 4) 浮遊細胞集塊を収集することにより JC ウイルス感染細胞数は約 5 倍程度増加する（図 6）。

D. 考察

本検討にて U87 細胞株に持続的な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樹立という観点では重要な知見である。しかしながら本検討では長期の感染維持が

不可能であった。Oligodendroglia の JV virus 感染における特異的因子を検索する上で感染維持が不可欠であり、感染細胞数を増加させることが今後の課題と考えられた。浮遊球状細胞集塊を収集し培養することを繰り返すことで感染細胞数が濃縮され増加する可能性がある。今後、浮遊球状細胞集塊の収集、継代により陽性細胞を増加させ、抗 JCV 抗体を用いてウイルス感染阻害の可否を検討し、またウイルス株の調節領域について既存の JC virus 感染細胞株である JCI 細胞との比較を行う予定である。

D. 考察

本検討にて U87 細胞株に持続的な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樹立という観点では重要な知見である。しかしながら本検討では長期の感染維持が不可能であった。Oligodendroglia の JV virus 感染における特異的因子を検索する上で感染維持が不可欠であり、感染細胞数を増加させることが今後の課題と考えられた。浮遊球状細胞集塊を収集し培養することを繰り返すことで感染細胞数が濃縮され増加する可能性がある。今後、浮遊球状細胞集塊の収集、継代により陽性細胞を増加させ、抗 JCV 抗体を用いてウイルス感染阻害の可否を検討し、またウイルス株の調節領域について既存の JC virus 感染細胞株である JCI 細胞との比較を行う予定である。

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、浮遊細胞集塊を収集し培養することにより感染細胞数が増加した。

【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 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*