

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

なし

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

図1. グリオーマ細胞株へのJCウイルス接種の流れ

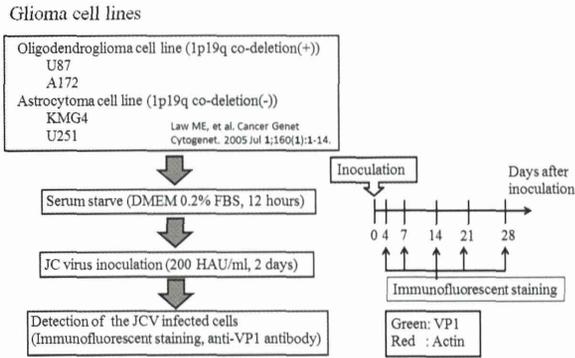


図2. 浮遊細胞集塊収集および培養

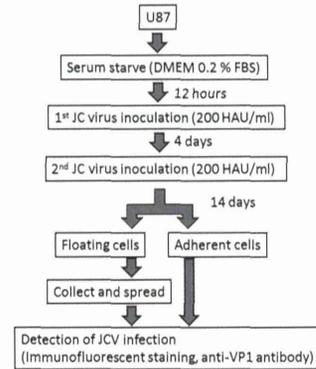


図3. 抗VP1抗体における蛍光免疫染色

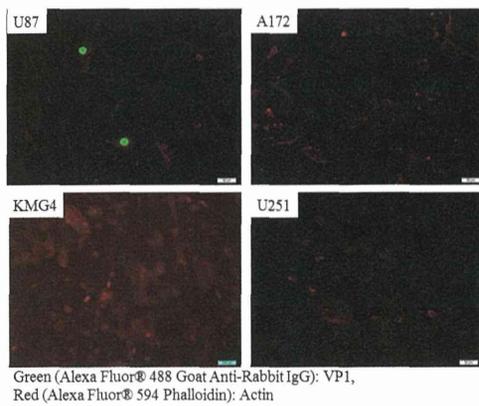


図4. U87細胞株におけるVP1陽性細胞数の推移

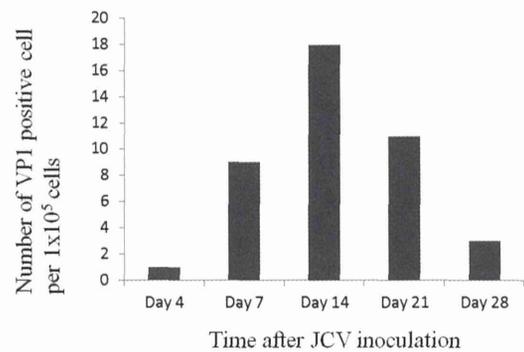


図5. 浮遊細胞集塊におけるVP1陽性像

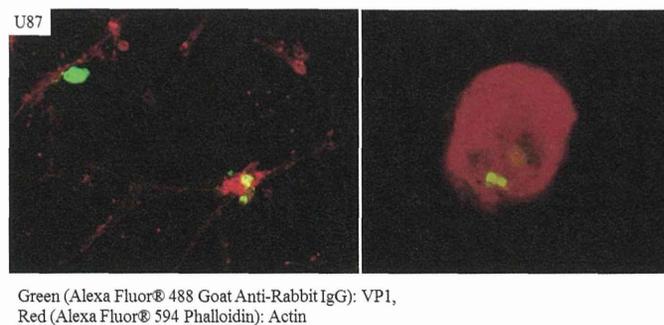
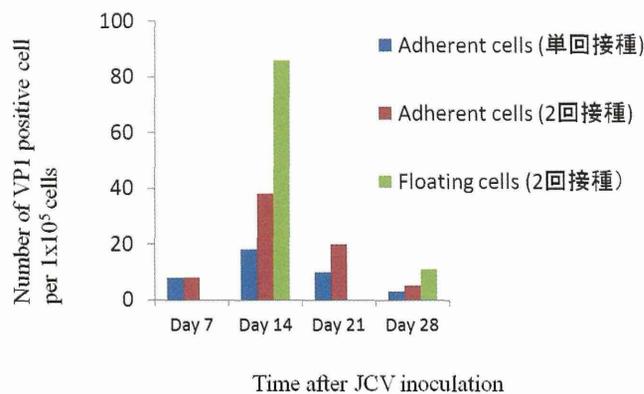


図6. U87細胞株におけるVP1陽性細胞数の推移



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の診断のための JC ウイルス検出 LAMP 法の開発

研究分担者：西條政幸	国立感染症研究所ウイルス第一部
研究協力者：林 昌宏	国立感染症研究所ウイルス第一部第三室
研究協力者：山口-木下一美	国立感染症研究所ウイルス第一部第三室
研究協力者：中道一生	国立感染症研究所ウイルス第一部
研究協力者：伊藤-高山睦代	国立感染症研究所ウイルス第一部
研究協力者：飯塚愛恵	国立感染症研究所ウイルス第一部第三室
研究協力者：王 麗欽	国立感染症研究所ウイルス第一部第三室
研究協力者：倉根一郎	国立感染症研究所副所長

研究要旨 進行性多巣性白質脳症 (Progressive Multifocal Leukoencephalopathy: PML) は、多くの場合免疫不全状態の患者の脳組織で JC ウイルス (JCV) が増殖することによっておこる致死的な中枢神経脱髄疾患である。脳脊髄液 (CSF) 中の JCV の検出および定量は、PML の診断および治療の重要な指標である。Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法を応用して、迅速・簡便で、かつ高い感度と特異度を有する JCV 遺伝子検査法を開発し、その有用性を検討した。JCV 検査のため全国の医療機関から国立感染症研究所ウイルス第一部に送付された CSF 検体のうち、153 検体を用いた。LAMP 法に用いたプライマーセットはアジア・アフリカ・ヨーロッパなどに分布する JCV の 12 サブタイプのゲノムシークエンスのアライメントより T 遺伝子領域を増幅するように設計された。CSF から精製された JCV DNA をテンプレートとして、63°C、60 分反応させた。増幅された JCV ゲノムは、反応液の濁度を測定することにより、陽性対照 DNA を用いた標準曲線を作成して、定量的に検出 (qLAMP 法) した。qLAMP 法により得られた結果を TaqMan プローブを用いた qPCR 法による結果と比較検討した結果、臨床検体では 1 反応あたり 20 DNA コピー/reaction の JCV ゲノムを 100% 検出した。qLAMP 法の感度および特異度は、qPCR 法と比較して、それぞれ 78%、97% であった。陽性的中率および陰性的中率は、それぞれ 93%、90% であった。qLAMP 法で決定された JCV ゲノム量は qPCR 法によるそれと高い相関 ($r=0.882$ 、 $P<0.0001$) を示した。qLAMP 法による JCV の検出・定量は、PML の診断や治療方針の指標に有用であり、治療薬のモニタリング等の臨床応用に期待できると考えられる。

A. 研究目的

進行性多巣性白質脳症 (Progressive Multifocal Leukoencephalopathy: PML) は高度の免疫不全等を有する患者において、JC ウイルス (JCV) 増殖によって発症する致死的な脱髄性疾患である。JCV はポリオーマウイルス科ポリオーマウイルス属に分類される約 5 kbp の環状二本鎖 DNA ウイルスで、ヒトを宿主とする。ウイルス粒子の直径は約 40 nm であり、エンベロープはない。JCV のヒトにおける感染機序の詳細は不明であるが、多くのヒトは幼小児期に JCV に感

染し、腎臓および骨髄等において JCV が持続感染することが知られている。また JCV は世界中のほとんどのヒト集団に広く蔓延しており、成人の約 70% が抗 JCV 抗体を有している。

通常 JCV 感染は無症候性であり、健常人において病原性を示すことはない。しかしながら免疫不全等を有する患者においては、脳内で JCV が増殖し、PML を引き起こすことがある。JCV の標的細胞は髄鞘を形成している稀突起膠細胞 (オリゴデンドロサイト) であり、JCV が増殖することによって標的細胞が破壊されるため

重度の脳機能障害を生じる。PMLの予後は極めて悪く、ほとんどの患者は3～6ヶ月以内に死亡する。根本的な治療法は確立されていない。数種類の治療薬候補が見つかったが、効果が確認されている薬剤はない。

近年、HIV感染者の増加および臓器・造血幹細胞移植療法の実施件数の増加により、PML患者数は増加傾向にある。また、主に自己免疫疾患を有する患者において、 $\alpha 4\beta 1$ インテグリンに対するヒトモノクローナル抗体製剤であるnatalizumabの投与が原因のPMLが報告されている。

PMLの診断には脳MRI所見や神経症状、脳生検試料の病理学的検査、脳脊髄液や脳組織を用いたウイルスDNAのPCR検査を実施する。特に実験室診断では、特異性および侵襲性の点から脳脊髄液を用いたPCR検査が優先される。

これまでに私たちはJCVの実験室診断法としてCSFを用いたTaqMan法による定量PCR(qPCR)法を用いた遺伝子検出法による診断法を確立した。しかしながら既存のqPCR法では特別な機器を要するため臨床現場での実施が難しい。そこで我々は特異性が高く迅速・簡易な遺伝子増幅法であるLoop-mediated isothermal amplification(LAMP)法によるJCVの診断系を確立した。LAMP法は鎖置換型DNAポリメラーゼを使用して等温で反応が進行するため特別な機器を必要とせず、恒温槽さえあれば実施可能である。さらに濁度測定装置を用いれば、増幅産物の定量(qLAMP法)も可能である。

B. 研究方法

検体：JCV検査のため全国の医療機関から国立感染症研究所ウイルス第1部に送付されたPML疑い患者132名より得られた脳脊髄液(CSF)153検体を用いた。

プライマー設計：LAMP法に用いるプライマーセットをアジア・アフリカ・ヨーロッパなどに分布するJCVの12サブタイプの16株のJCV MY株、Tokyo-1株、CB-2株、SA-3株、SL-2株、CY株、#223株、Taiwan-3株、IN-6株、CW-2株、ET-3株、AT-2株、G2株、Mad-1株、#402株、GH-1株の塩基配列を用いて、JCV VP1、Large-T、small-t遺伝子をターゲットとしたアラ

イメントを行い、プライマーを17セット設計した。

qLAMP法：LAMP法については試薬製造者(栄研化学)のプロトコールに従った。LAMP法は63°C、60分間反応し、リアルタイム濁度測定装置(LA-320C)(栄研化学)を用いて濁度が0.1以上のものを陽性とした。またJCV Mad-1株のゲノムが挿入されたpJCVプラスミドを用いて標準曲線を作成し、CSF中のJCVゲノムの定量を行った。qPCRはこれまでに我々の確立した方法を用いた。LAMP法による増幅産物は制限酵素*SspI*で37°C1時間反応し、電気泳動法によって確認した。

C. 研究結果

JCV検出用LAMP法プライマーの設計：日本、アジア、アメリカ、アフリカ、ヨーロッパなど世界中に分布する12サブタイプから16株の塩基配列を用いて、JCV VP1、Large-T、small-t遺伝子をターゲットとしたアライメントを行い、プライマーを17セット設計した(data not shown)。設計した各プライマーセットのpJCVに対する反応性を検討した結果、Large T遺伝子をターゲットにしたプライマーの反応性が最も高かった(data not shown)。プライマーの配列はMY株と相同配列を示し、増幅領域に*SspI*の制限酵素サイトが存在した。

JCV検出用LAMP法プライマーの特異性の検討：JCV、BKウイルス(BKV)、シミアンウイルス40(SV40)、マウスポリオーマウイルス(MPyV)の遺伝子をコードしている各プラスミドpJCV、pBKV、pSV40、pMPyV、各 10^7 DNAコピーに対する、LAMP法プライマーの反応性を検討した。その結果JCVゲノムに対してはラダー状の特異的増幅が認められたが、BKV、SV40、MPyV遺伝子に対してはゲノムの増幅は認められなかった(図1A)。またJCVに対する特異的増幅産物は、目視によっても確認され、さらに増幅産物を増幅ゲノムの領域内にある制限酵素*SspI*で処理すると、推定される特定のサイズ(238、198、158、167、130、127、68 bp)に集束した(図1B)。このことより設計したLAMP法プライマーは、JCVを特異的に検出することが示された。

JCV検出用LAMP法プライマーの検出感度と

定量性の検討：次に設計したプライマーの検出感度について pJCV を用いて検討した。pJCV を 10^6 DNA コピー/reaction から 5 倍階段希釈し、LAMP 法の検討を行った。その結果 10^2 DNA コピー/reaction の pJCV を検出することが出来た（図 2）。陰性コントロールでは特異的反応は認められなかった。次に 5 倍階段希釈した pJCV を用いて、濁度が 0.1 に達した陽性反応時間と、初期鑄型量を検討したところ両者には直線性が認められた。このことより、検体の陽性反応時間と標準曲線から、LAMP 法による検体の JCV ゲノムの定量 (qLAMP 法) が可能であることが示された。

臨床検体を用いた LAMP 法の検討：JCV 検査のため全国の医療機関から送られてきた PML 疑い患者 132 名より得られた脳脊髄液 (CSF) 153 検体を用いて qLAMP 法の検討を行った。また qLAMP 法と各検体における TaqMan システムを用いた qPCR 法の結果の比較検討を行った。その結果 qLAMP 法では qPCR での陽性 50 検体中、39 検体で陽性を示した。また qPCR 陰性 103 検体中 3 検体で qLAMP 法陽性を示した。この qPCR 陰性の 3 例については、電気泳動で増幅反応の特異性を確認した。このことより qLAMP 法は qPCR 法と比較すると感度 78% (39/50)、特異度 97% (100/103)、陽性的中率 93% (39/39+3)、陰性的中率は 90% (100/11+100) であった。

臨床検体中の JCV ゲノム量と qLAMP 法の陽性率の検討：qPCR によって算出された CSF 中の JCV ゲノム量と qLAMP 法の陽性率について比較検討した。CSF 中 3,000 DNA コピー/mL 以上の 29 検体は、qLAMP 法で 100% 陽性を示した。これは 20 DNA コピー/reaction に相当した。1,000~3,000 DNA コピー/mL では 64%、300~1,000 DNA コピー/mL では 43% の検体が qLAMP 法で陽性を示した。100~300 DNA コピー/mL の検体は検出されなかった。qPCR の検出限界以下である 100 DNA コピー/mL 以下では、3% の検体が qLAMP 法で陽性を示した（表）。次に qPCR 法、qLAMP 法ともに陽性を示した 39 検体中、qLAMP 法により 3×10^3 DNA コピー/mL 以上と定量された 33 検体について、その相関性を検討したその結果 qPCR 法による JCV ゲノム数と qLAMP 法による CSF 中の JCV ゲノム

数の相関性は、相関係数 $r=0.882$ であり、強い相関を示した（図 3）。ところで骨髄移植を受けたホジキンリンパ腫患者 1 例における JCV ゲノムの定量結果はそれぞれ qLAMP 6.5×10^5 /ml、qPCR 5.0×10^2 /ml であった。また HIV 患者 1 例における JCV ゲノムの定量結果はそれぞれ qLAMP 5.0×10^1 /ml、qPCR 7.0×10^2 /ml であった。したがって qLAMP 法および qPCR 法それぞれにおいて、検体由来の何らかの阻害因子が存在した可能性が示唆された。

同一患者における qLAMP 法を用いた JCV ゲノム量の推移の検討：同一患者から複数回検体を得たケースについて qLAMP 法を用いた JCV ゲノムの推移の検討を行った。その結果白血病などの血液疾患や、自己免疫疾患などの基礎疾患をもつ多くの患者で JCV ゲノム量の経時的な増加が認められた（図 4A）。HIV 患者においては HAART 法の治療による免疫能の回復とともに JCV ゲノム量の減少が認められた（図 4B）。急性骨髄性白血病に対する臍帯血移植治療による免疫抑制状態から、PML を発症した例では *in vitro* で JCV の抑制効果が知られている抗マラリア薬であるメフロキンによる治療が行われたが、メフロキン治療により JCV ゲノム量の低下が観察され、さらに再びゲノム量の増加が認められた（図 4C）。qLAMP 法により得られたこれらの CSF 中における JCV ゲノムの経時的推移は qPCR の結果に一致した。

D. 考察

私たちは JCV の 12 のサブタイプの中から 16 株を抽出し、その相同性領域の検討を行い、17 セットのプライマーを設計した。その結果 JCV Large-T 遺伝子を標的とするプライマーセットが JCV に対する特異性が高く、さらに定量性を有することを見出した。その検出感度は 2.0×10^1 DNA コピー/reaction であり、qPCR の感度 2.0×10^0 DNA コピー/reaction の約 1/10 であることが示された。また qLAMP 法と qPCR 法を比較した感度は 78% であった。さらに qLAMP 法と qPCR 法による定量結果には強い相関関係が認められた。しかしながら、骨髄移植を受けたホジキンリンパ腫患者 1 例における JCV ゲノムの定量結果あるいは HIV 患者 1 例における JCV ゲノムの定量結果には相違が認められた。

これは患者検体中の何らかの阻害物質が関与している可能性が示唆されたため、今後疾患特異的な阻害反応の検討を行う必要性が示された。さらに同一患者から複数回検体を得られたケースについてその経時的な JCV ゲノム量の動態を検討した結果 qLAMP 法および qPCR 法の結果において同様の結果が得られたことから、qLAMP 法は qPCR 法の補完的な方法としても適用可能であることが示唆された。

JCV を定量することが出来る簡便で特異性の高い qLAMP 法を開発した。qLAMP 法による CSF 中の JCV ゲノムの検出・定量は、PML の診断や治療方針の指標に有用であり、治療薬のモニタリング等の臨床応用が可能であることが考えられた。

E. 結論

我々は CSF 中の JCV ゲノムを迅速・簡便に検出・定量する qLAMP 法を開発した。CSF 中の JCV ゲノムの検出・定量は、PML の診断や治療方針の指標に有用であり、qLAMP 法の応用は PML の診断や治療薬のモニタリング等の臨床応用が期待される。さらにその qPCR 法との併用による診断能力の向上も期待される。

F. 健康危険情報

PML は国指定難病 130 種類の対象疾患である。今後、HIV の感染者の増加や生物由来製剤の導入、臓器移植例の増加に伴いさらなる PML 患者の増加が予測されている。しかしながら PML に対する特異的で有効な治療法はない。したがって PML の治療は基礎疾患に伴う免疫能低下を回復/正常化することが主であり、その予後が非常に悪いため、早期診断が重要である。よって CSF における JCV の迅速診断系の整備および改良は今後も重要な課題である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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* 67:307-310, 2014.
- 2) 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* 159:1687-1696, 2014.

- 3) Shirai S, Yabe I, Kano T, Shimizu Y, Sasamori T, Sato K, Hirofumi M, Nonaka T, Takahashi I, Matsushima M, Minami N, Nakamichi K, Saijo M, Hatanaka KC, Shiga T, Tanaka S, Sasaki H. Usefulness of ¹¹C-methionine-positron emission tomography for the diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurol* 261:2314-2318, 2014.

- 4) 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* 341:144-146, 2014.

2. 学会発表

- 1) 西條政幸. 日本における重症熱性血小板減少症候群とダニ媒介性脳炎の流行. 第19回日本神経感染症学会総会学術集会, 金沢, 9.4-6, 2014.
- 2) 三浦義治, 岸田修二, 中道一生, 西條政幸, 榎丈基弘, 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, 金沢, 9.4-6, 2014.
- 3) 三條伸夫, 喜納里子, 能勢裕里江, 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, 金沢, 9.4-6, 2014.
- 4) 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, 金沢, 9.4-6, 2014.
- 5) 西條政幸, 伊藤(高山)睦代, 森本金次郎, 垣内五月, 山口幸恵, 堀谷まどか, 林 昌宏. リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス感染症に対する非増殖型組換え狂犬病ワクチンの開発. 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) 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，横浜，11.10-12, 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

表. CSF検体中のウイルスゲノム量とLAMP法の陽性率の検討

結果	リアルタイムPCR法		LAMP法	
	ウイルスゲノム量 [copies/mL CSF]	検体数 (n = 153)	陽性数 (n)	陽性率 (%)
陽性	>3000	29	29	100
	1000 - 3000	11	7	64
	300 - 1000	7	3	43
	100 - 300	3	0	0
陰性	<100	103	3	3

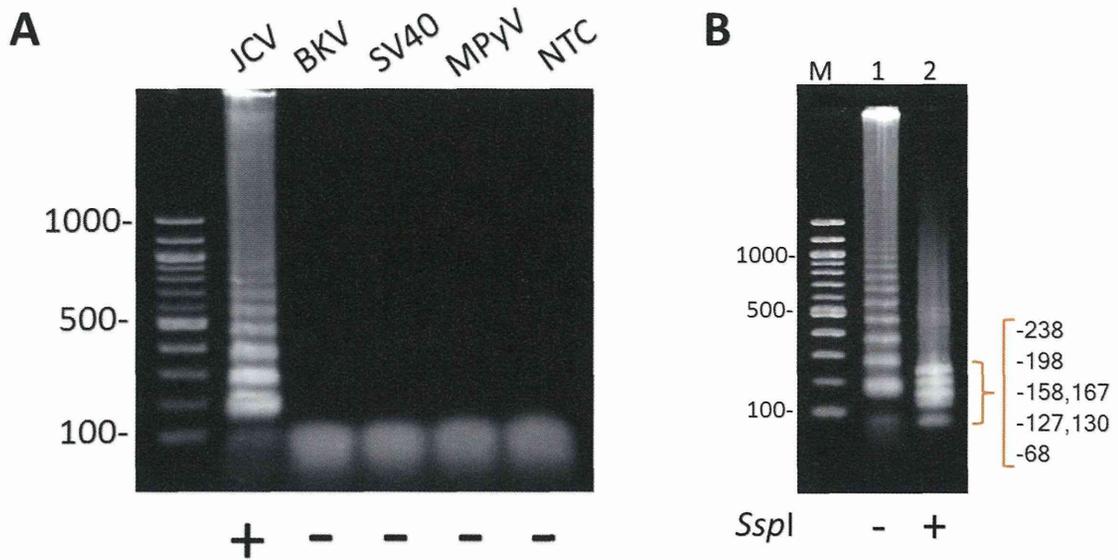


図 1 . JCV LAMP 法の特異性の検討：pJCV、pBKV、pSV40、pMPyV プラスミド各 10^7 コピー用いて 63°C 、60 分間 LAMP 法による反応を行った。その結果、pJCV の増幅は確認されたが、pBKV、pSV40、pMPyV の増幅は確認されなかった (A)。また *SspI* で処理することにより推定されたサイズ (238、198、158、167、130、127、68 bp) のバンドが確認された (B)。

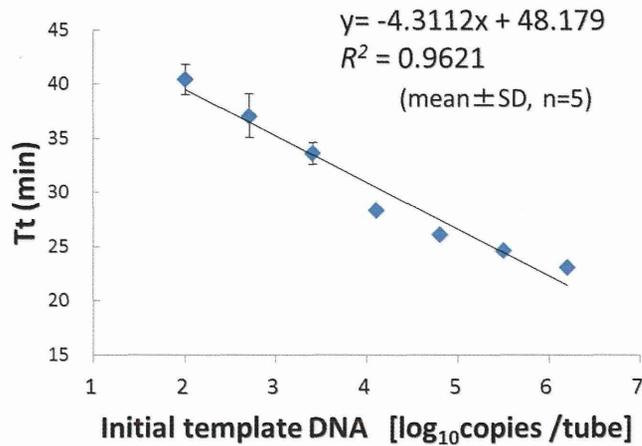


図 2 . JCV 検出用 LAMP 用プライマーの定量的 LAMP 法 (qLAMP) への応用：JCV DNA 挿入プラスミド pJCV (10^6 DNA copies) を 5 倍階段希釈し、LAMP 用プライマーを用いて、その定量性を検討したところ 20 コピーDNA/reaction の検出感度を示し、さらに DNA の検出においては定量性が認められた。

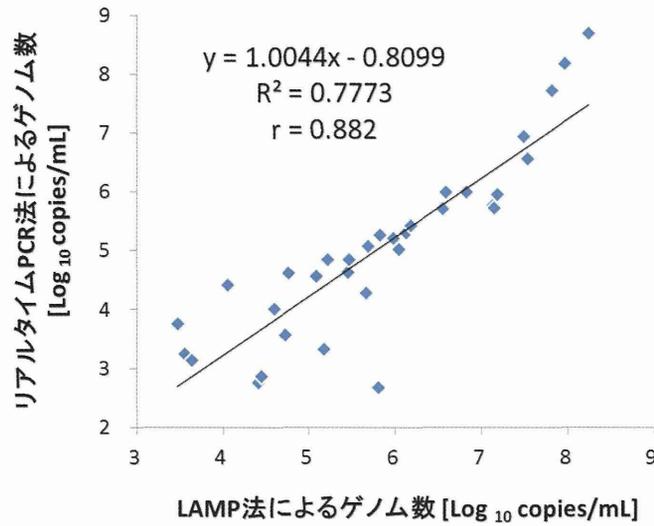


図3. 臨床検体中のウイルスゲノム量と qLAMP 法の相関性の検討：qPCR 法、qLAMP 法ともに陽性を示した 39 検体中、qLAMP 法により 3×10^3 DNA コピー/mL 以上検出された 33 検体について、qLAMP 法と qPCR 法の DNA コピー数の相関性を検討した。その結果、相関係数が $r=0.822$ となり強い相関を示した。

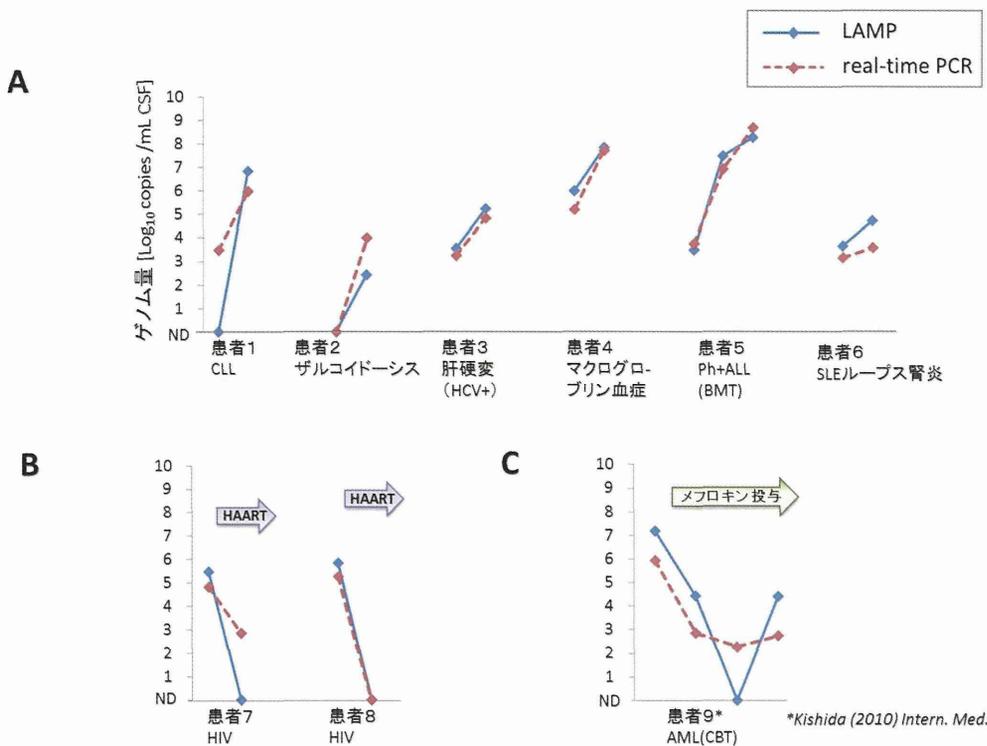


図4. 同一患者における qLAMP 法を用いた JCV ゲノム量の推移の検討：同一患者から複数回検体が得られた患者 CSF を用いて qLAMP 法による経時的な JCV DNA コピー数の変化を定量した。実線が qLAMP 法、破線が qPCR 法による定量結果をそれぞれ示す。白血病などの血液疾患や、自己免疫疾患などの基礎疾患をもつ多くの PML 患者において JCV ゲノム量の増加が観察された (A)。HAART 療法がおこなわれた HIV 患者のケースでは JCV ゲノム量が HAART 療法により検出限界以下となった (B)。急性骨髄性白血病を患い、臍帯血移植治療による免疫抑制状態から PML を発症した患者にメプロキンによる治療が行われたケースでは当初ウイルスゲノム量の低下が観察されたが、再びゲノム量の増加が認められた (C)。いずれのケースにおいても qLAMP 法と qPCR 法において同様の結果が得られた。

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）

種々のヒト由来細胞におけるJCウイルス増殖の解析

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：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：亀岡正典	神戸大学大学院保健学研究科
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) の原因である JC ウイルス (JCV) の感受性細胞が極めて少なく、培養系での PML 病態解明の障害となっている。過去の報告で、SV40 の T 抗原を発現する COS-7 細胞、293T 細胞および SVG 細胞を用いて JCV を増殖させているが、T 抗原をターゲットとした治療薬のスクリーニングには不適である。本研究では、SV40 の T 抗原を発現しておらず、かつ培養が容易な種々のヒト由来細胞を用いて、real-time RT-PCR により JCV large T の発現量を定量し、JCV 複製を DNA replication assay で、ウイルス増殖は HA および *Dpn* I 処理と real-time PCR を組み合わせたアッセイで調べたところ、アストロサイトと 293 細胞で IMR-32 馴化株に large T の発現、複製および増殖がみられた。この 2 つの細胞は SV40 の T 抗原を発現していないことから、T 抗原をターゲットとした治療薬のスクリーニングに有用であると考えられた。

A. 研究目的

JC ウイルス (JCV) が原因である進行性多巣性白質脳症 (PML) は中枢神経の脱髄疾患であり、組織学的には脱髄巣内で神経細胞がよく保たれているのに対して、オリゴデンドロサイトと髄鞘の消失が顕著にみられる。脱髄巣周辺のオリゴデンドロサイトを電子顕微鏡で観察すると、ウイルスで充満した核内封入体が見られたことから、JCV のオリゴデンドロサイトへの感染は明らかである。一方、培養系では JCV を初代ヒト胎児グリア (PHFG) 細胞に接種すると感染が成立し、ウイルスの増殖が認められる。しかし、JCV の感受性細胞が極めて少なく、さらに PHFG 細胞は倫理上の問題から入手が困難であることから、培養系での PML 病態解明の障害となっている。これらの問題点を克服するために、SV40 の T 抗原を発現する COS-7 細胞、293T 細胞および SVG 細胞が樹立された。SV40 の T 抗原は JCV の複製を促進することから、これらの細胞株は JCV を増殖させるには有用であるが、T 抗原をターゲットとした治療薬のスクリーニングには不適である。

一方、SV40 の T 抗原を発現していないヒト神経芽細胞腫由来の IMR-32 細胞で JCV が増殖可能になったが、IMR-32 細胞は基質への接着が弱く、培養が困難であるという問題点が指摘された。

本研究では、SV40 の T 抗原を発現しておらず、かつ培養が容易な種々のヒト由来細胞を用いて、JCV 複製を DNA replication assay で解析した。また、ウイルス DNA の複製には T 抗原の発現が必須であることから、real-time RT-PCR により JCV large T の発現量を定量し、ウイルス増殖は HA および *Dpn* I 処理と real-time PCR を組み合わせたアッセイで調べた。また、HA 価の高いサンプルについては、PCR によりウイルスの断片および全長を増幅し、JCV 遺伝子を解析した。

B. 研究方法

1) JCV クローンと細胞

JCV クローンは Mad-1 (PML 病変組織分離株)、M1-IMRa と M1-IMRb (ヒト神経芽細胞腫由来の

IMR-32細胞馴化株)およびCY(尿中に排泄されるArchetype株)の4株のDNAを、細胞はヒト由来のアストロサイト、近位尿細管上皮細胞、脳血管内皮細胞および293 GTP-AC free細胞(293細胞)を用いた。

2) JCV large Tの発現の定量

4種類の細胞に各々のJCV DNA 1 μ gをリポフェクトアミン法でトランスフェクトした細胞からRNAを抽出し、JCV large Tの発現量をreal-time RT-PCRにより定量した。

3) 複製したJCV DNAの検出

各々のJCV DNAをトランスフェクトした細胞から低分子DNAを抽出し、*Bam* HIと*Dpn* I処理により複製したDNAのみをDNA replication assayにより検出した。

4) 増殖したJCVの定量

細胞にJCV DNAをトランスフェクトし、継代培養した細胞より凍結融解操作にてウイルスを回収した後、ヒトO型赤血液を用いた赤血球反応(HA)および*Dpn* I処理とreal-time PCRを組み合わせたアッセイによりウイルス量を定量した。

5) PCRによるJCVの遺伝子解析

HA価の高いサンプルについては、抽出したDNAを鋳型として、PCR法によりJCVの調節領域、T抗原とVP1の一部およびV-T intergenic regionを増幅し、ダイレクトシーケンスにて塩基配列を決定した。一方、*Bam*HIと*Eco*RI部位の各々にプライマーをデザインしたLong PCR法により、JCVの全ゲノムを増幅し、断片長を比較した。

6) 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) JCV large Tの発現

各々のJCV DNAをトランスフェクトしたアストロサイトと293細胞で、48時間後のJCV large Tの発現量をreal-time RT-PCRにより定量したところ、両方の細胞においてMad-1とCYの発現量は少なかったのに対して、IMR-32馴化株の発現量が多かった。さらに、293細胞では25日後でもIMR-32馴化株の発現量が多かった。(図1)。

2) JCV DNA複製

4種類の細胞に各々のJCV DNAをトランスフェクトし、72時間後に細胞から低分子DNAを抽出しDNA replication assayを行ったところ、293細胞でのみIMR-32馴化株であるM1-IMRaとM1-IMRbに細胞内で複製したウイルスDNAの明瞭なバンドが検出された(図2)。

3) JCVの増殖の解析

293細胞で増殖したJCVを*Dpn* I処理とreal-time PCRを組み合わせたアッセイにより定量したところ、Mad-1とCYは検出限界以下であったが、IMR-32馴化株で検出できた。また、M1-IMRbがM1-IMRaに比べて1.2倍増加していたが、有意差はみられなかった(図3)。一方、M1-IMRbをトランスフェクトしたアストロサイトでは58日後に最高値の32HAを示したが、他の3株は66日経過してもHAは検出されなかった。

4) PCRによるJCVの遺伝子解析

アストロサイトで32のHA価を示したサンプルから抽出したDNAを鋳型として、PCR法により4つの遺伝子領域を増幅し塩基配列を決定したところ、遺伝子の変異は見られなかった。一方、JCV全ゲノムの増幅は*Bam*HI部位のプライマーを用いたLong PCR法では増幅しなかったが、*Eco*RI部位のプライマーは増幅された。しかし、増幅された断片長はコントロールのM1-IMRbよりも短かったことから、*Bam*HI部位を含む領域において一部変異が存在する可能性が示唆された。

D. 考察

ヒトの中枢神経系の疾患であるPMLは、原因ウイルスであるJCVが髄鞘形成細胞であるオリゴデンドロサイトに特異的に感染し破壊することで生じる脱髄疾患である。この脱髄発生機序の解明には、JCVの細胞内での増殖

機構の解析が必要である。このように、JCVのウイルス学的研究には培養細胞で増殖させる系の確立が必要である。過去に、JCVの感受性が様々な細胞で検討されたが、JCVが増殖可能な細胞は限られ、PHFG細胞の初代細胞においてのみ、効率よく増殖することが判明した。しかし、PHFG細胞は倫理上の問題で入手が困難であることから、SV40のT抗原を発現するCOS-7細胞、293T細胞およびSVG細胞が樹立された。これらの細胞を用いたJCVの増殖が可能になったが、SV40のT抗原はJCVの複製を促進することから、T抗原をターゲットとした治療薬のスクリーニングには不適である。一方、SV40のT抗原を発現していない細胞株でJCVが増殖可能なのはIMR-32細胞であるが、培養がむずかしいという欠点がある

本研究では、種々のヒト由来細胞にJCV DNAをトランスフェクトして、JCVのlarge Tの発現量をreal-time RT-PCRにより定量したところ、IMR-32馴化株をトランスフェクトしたアストロサイトと293細胞でlarge Tに有意な発現の増加がみられた。さらに、ウイルスDNAの複製およびウイルス増殖を調べたところ、アストロサイトと293細胞でIMR-32馴化株の複製、増殖がみられた。これらの結果から、アストロサイトと293細胞ではIMR-32馴化株が複製できることが明らかになり、T抗原をターゲットとした治療薬のスクリーニングに有用であると考えられた。

E. 結論

本研究では、アストロサイトと293細胞でIMR-32馴化株にlarge Tの発現、複製および増殖がみられた。この2つの細胞はSV40のT抗原を発現していないことから、T抗原をターゲットとした治療薬のスクリーニングに有用であると考えられた。

[参考文献]

1) Major EO, Vacante DA. Human fetal astrocytes in culture support the growth of the neurotropic human polyomavirus, JCV. *J Neuropathol Exp Neurol* 48:425-436, 1989.

2) 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* 86:2026-2032, 2014.

3) Yogo Y, Hara K, Guo J, Taguchi F, Nagashima K, Akatani K, Ikegami N. DNA-sequence rearrangement required for the adaptation of JC polyomavirus to growth in a human neuroblastoma cell line (IMR-32). *Virology* 197:793-795, 1993.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nukuzuma S, Sugiura S, Nakamichi K, Kameoka M, Nukuzuma C, Tasaki T, Takegami T. Replication of IMR-32-adapted JC virus clones in human embryonic kidney cells. *Microbiol Immunol*, in press.

2. 学会発表

1) 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- α 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, 横浜, 11.10-12, 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

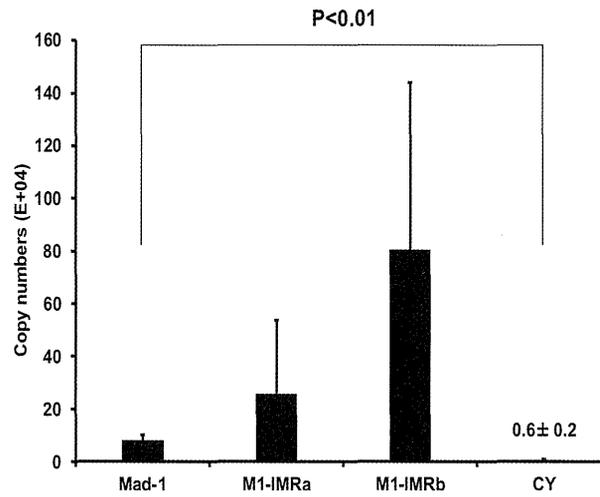


図 1. 293細胞における種々のJCVのlarge T抗原の発現

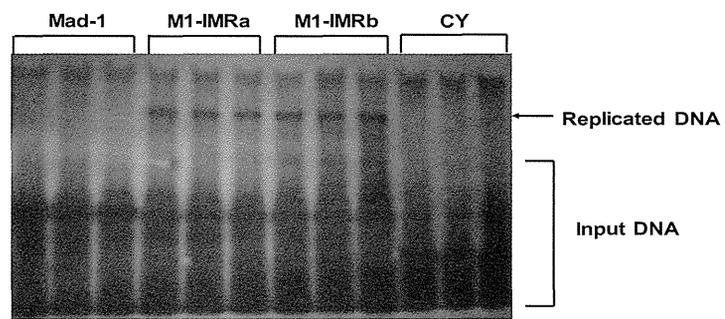


図 2. 293細胞における種々のJCV DNA複製

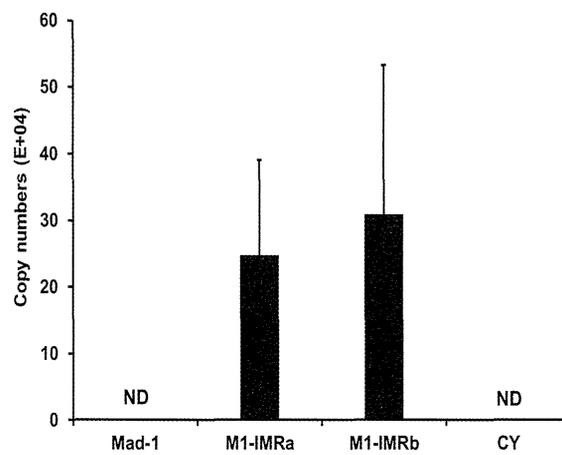


図 3. 293細胞における種々のJCVの増殖

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）

本邦発症進行性多巣性白質脳症に対する塩酸メフロキン投与の多数例での検討

研究協力者：三浦義治 がん・感染症センター都立駒込病院脳神経内科
 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）

研究要旨 本邦発症の進行性多巣性白質脳症（PML）患者に関してメフロキン投与例を中心に retrospective に解析した。17例の塩酸メフロキン投与症例のうち7例で臨床症状の改善があり、8例で改善なく、2例で投与中止となった。症状の改善を認めた7例の基礎疾患は膠原病3例、HIV2例、血液疾患2例であった。本邦発症PMLの基礎疾患は非HIVが多く、その病態も複雑であると考えられるが、一部症例では塩酸メフロキン投与にて改善を示しており、今後の症例の蓄積と詳細な解析が重要であると思われた。

A. 研究目的

本研究の目的は、これまで in vitro の実験系でJCウイルスの増殖を抑制することで知られている塩酸メフロキンのPML患者に対する有用性を検討し、新規治療薬として確立することである。

B. 研究方法

2010年6月以降国立感染症研究所にて髄液JCV-PCR検査陽性であったPML症例および駒込病院内厚生労働科研PML班PML情報センターに寄せられた情報のうち、下記のプロトコール（図1）に従って塩酸メフロキンを投与したPML症例に関する情報を収集し、集計した。

（倫理面への配慮）

同意承諾書を作成して診療担当医へ送付し、患者様とそのご家族に説明頂いて同意を得たのち、担当医が同意書へ記入して提出いただいた。患者および家族の情報は性別と年齢を記載頂き、カルテ番号や生年月日などの情報は含まず、倫理面への配慮がなされている。

C. 研究結果

17例の症例情報が蓄積され、塩酸メフロキン投与6か月後の結果では、7例で臨床症状の改善があり、うち2例では合併症で死亡。8例では臨

床症状の改善なく、うち7例で死亡であった。また2例で投与中止となった（図2）。有効例7例での基礎疾患はHIV2例、血液疾患2例、膠原病3例であったのに対し（図3）、無効例8例ではHIV3例、血液疾患2例、膠原病2例であった。

D. 考察

これまでPML患者に対する塩酸メフロキンの有効性に関してはさまざまな報告があり、欧米ではHIV-PMLに関しては有効性が乏しいと考えられている。本邦発症のPML症例では非HIV-PMLが多いことが特徴であり、その基礎疾患や免疫学的状態、発症誘発薬剤なども多岐にわたっている。今回の集計でも本邦発症PMLの一部症例では塩酸メフロキン投与にて症状の改善、転帰の改善を認めた症例があり、今後も症例の蓄積とその特徴を解析することは重要であると考えられる。

E. 結論

本邦発症PMLの一部症例に対して塩酸メフロキンは有効であると考えられ、今後の症例の蓄積と詳細な解析が重要である。

【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) 三浦義治, 岸田修二. 進行性多巣性白質脳症に伴う dementia. *神経内科* 80:73-76, 2014.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 三浦義治. 進行性多巣性白質脳症. 水澤英洋・編, 神経関連感染症, 最新医学社, 大阪, pp182-191, 2014.

2) 三浦義治. 進行性多巣性白質脳症. 味澤 篤・編, 長期療養時代のHIV感染症/AIDSマニュアル, 日本医事新報社, 東京, pp209-214, 2014.

3) 三浦義治. 進行性多巣性白質脳症. 永井良三, 鈴木則宏, 荒木信夫, 神田 隆, 吉良潤一, 塩川芳昭, 西野一三, 水澤秀洋・編, 神経内科研修ノート, 診断と治療社, 東京, pp360-363, 2015.

2. 学会発表

1) 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 The features of recent PML patients in Japan. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 5.21-24, 2014.

2) 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, 金沢, 9.4-6, 2014.

3) 三浦義治. PMLのサーベイランス体制構築と臨床試験. SSPE・PMLシンポジウム2014, 金沢, 9.6, 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

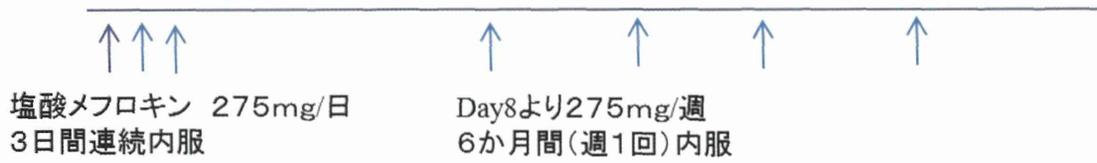


図1 塩酸メフロキン投与プロトコール

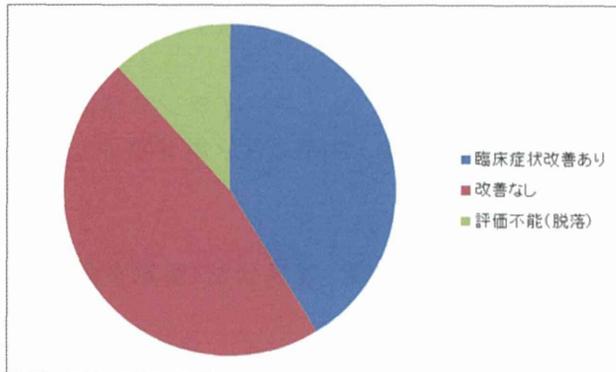


図2 塩酸メフロキン投与結果（6か月後）

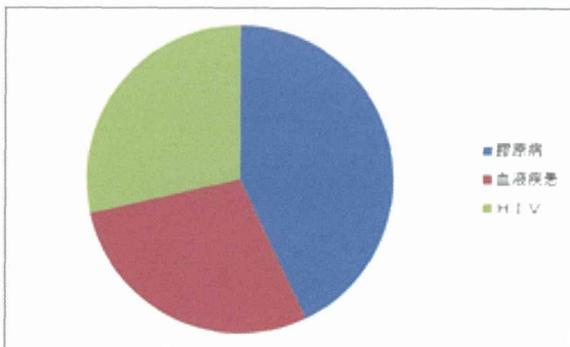
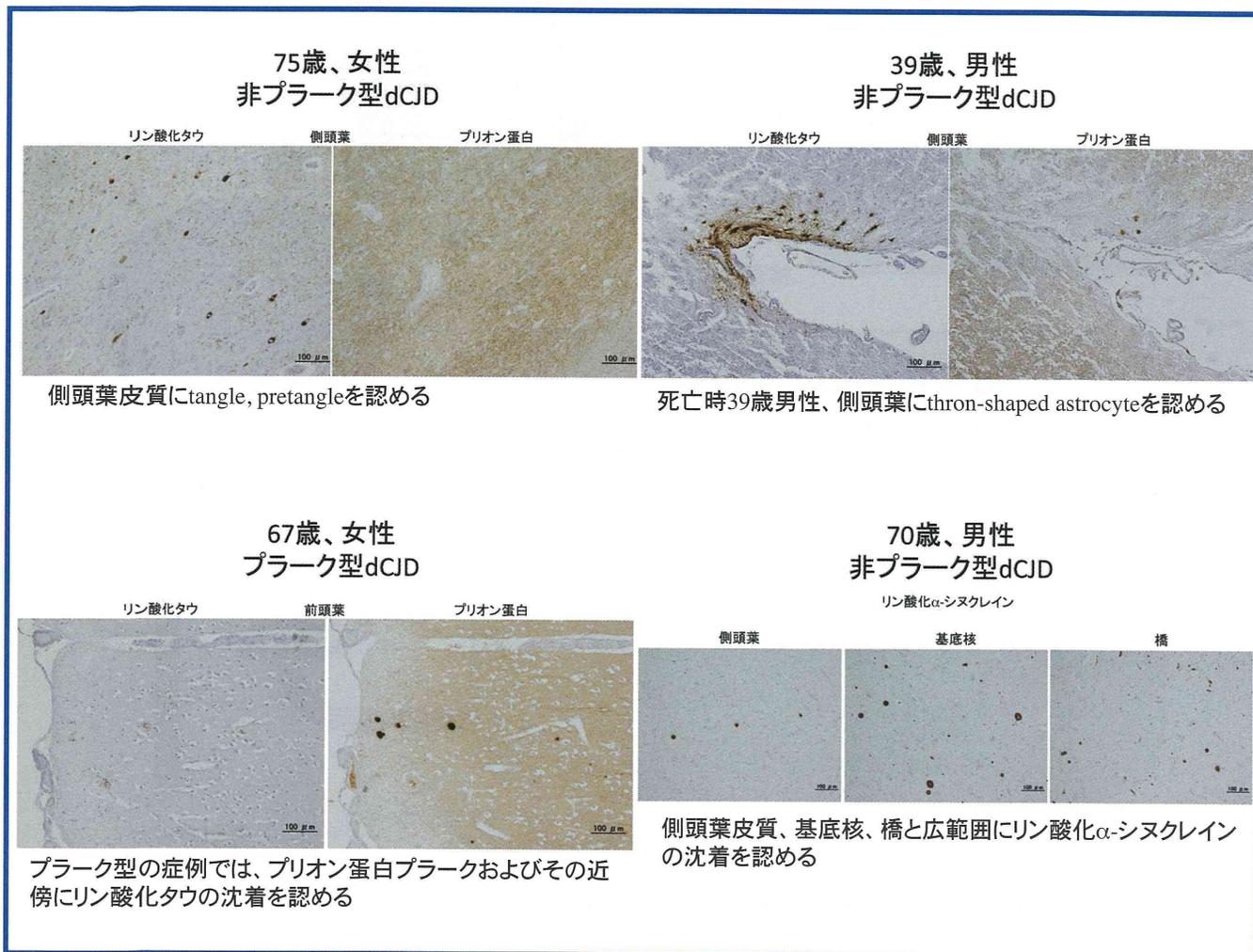


図3 塩酸メフロキン有効例での基礎疾患

[Ⅲ] 研究成果

硬膜移植後Creutzfeldt-Jakob病剖検脳における リン酸化タウ、リン酸化 α -シヌクレイン、リン酸化TDP-43の沈着について

研究代表者: 金沢大学医薬保健研究域医学系脳老化・神経病態学(神経内科学) 山田正仁

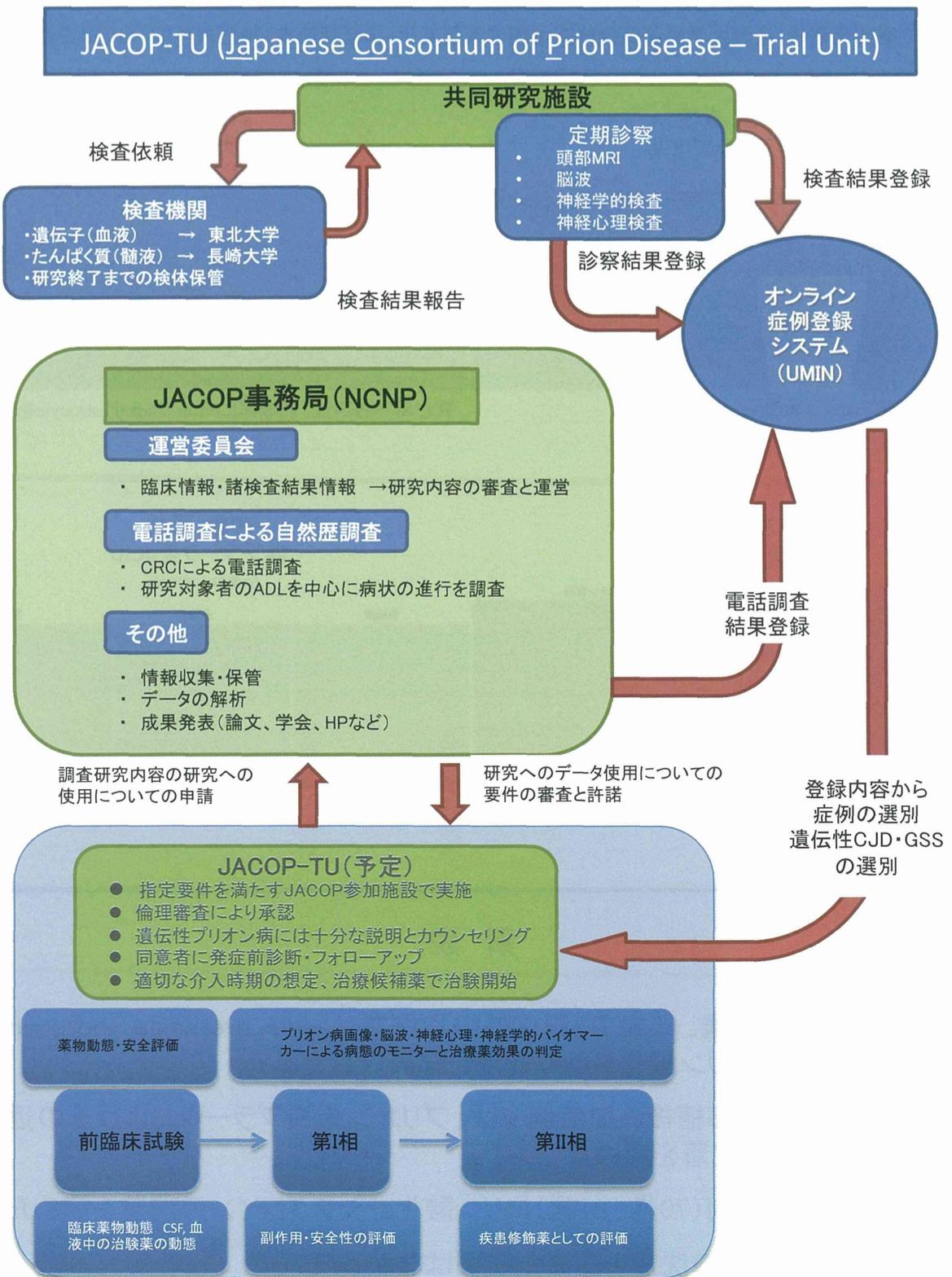


解 説

1. 死亡時35歳、41歳、55歳の3例以外の13例で、tangle, pretangle, thorn-shaped astrocyteなどのリン酸化タウの沈着を認めた。
2. プラーク型硬膜移植後CJD症例では、プリオン蛋白プラークおよびその近傍にリン酸化タウの沈着を認めた。
3. 比較的高齢の2例(70歳、81歳)にリン酸化 α -シヌクレインの沈着を認めた。
4. リン酸化TDP-43の沈着を認めた症例はなかった。

平成26年度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 研究成果

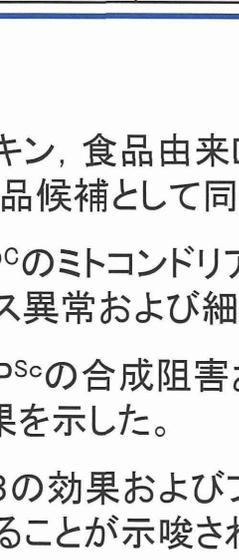
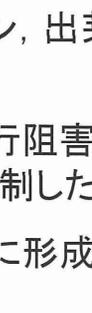
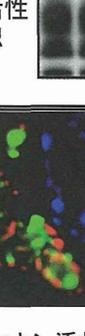
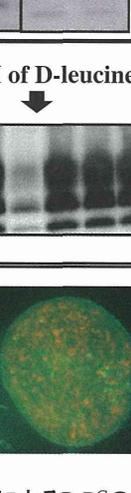
研究分担者：国立精神・神経研究医療センター病院 水澤英洋



プリオン病における神経変性阻害効果を持つ医薬品の探索

研究分担者: 東京医科大学医学部医学科病態生理学講座 八谷如美

研究成果

	研究目的	研究結果	成果の位置づけ
プリオン形成阻害と破壊 	Unfoldin Unfoldin添加により,既に形成されたプリオンアミロイドが破壊され,分解系での排出活性が生じるかの検討(ScN2a細胞)	 プリオンアミロイド破壊活性の確認 (-) (+) (++) プロテアソーム系との連動 	医薬品候補から医薬品へ  Unfoldinとプロテアソームによる排除 <chem>CC(C)C(N)C(=O)O</chem> D-ロイシンによるアミロイド破壊と防御  フシコキンによる防御
	D-ロイシン D-ロイシン添加により,既に形成されたプリオンアミロイドが破壊されるかの検討(ScN2a細胞)	1 mM of D-leucine ↓ プリオンアミロイド破壊活性の確認 	
	フシコキン フシコキンにより,PrP ^C ミトコンドリア移行の阻害から,ミトコンドリアダイナミクスの破綻による神経細胞死の防御および遅延効果を検討(ScN2a細胞)	 フシコキン添加によるPrP ^C のミトコンドリア移行の阻害と続いて起こる細胞死の抑制	

解説

1. 植物由来フシコキン, 食品由来D-ロイシン, 出芽酵母由来Unfoldinをプリオン病に対する医薬品候補として同定した。
2. フシコキンはPrP^Cのミトコンドリアへの移行阻害から, 結果として起こるミトコンドリアダイナミクス異常および細胞死を抑制した。
3. D-ロイシンはPrP^{Sc}の合成阻害および既に形成されたプロテアーゼ抵抗性PrP^{Sc}の排除効果を示した。
4. Unfoldinは上記3の効果およびプロテアソーム系との連動で効率よいクリアランス活性を呈することが示唆された。