

学位論文題名

リアルタイム RT-PCR 法を用いた

JC ウイルスの動態解析

学位論文内容の要旨

中枢神経疾患である進行性多巣性白質脳症 (Progressive multifocal leukoencephalopathy: PML) は、原因ウイルスである JC ウイルス (JCV) が髄鞘形成細胞であるオリゴデンドロサイトに感染し、それを障害することで生じる脱髄疾患である。通常 PML は免疫不全状態を契機に発症し、近年 AIDS の流行や臓器移植治療の普及に伴って、欧米諸国をはじめ世界的に増加傾向にある。JCV は神経系細胞で特異的に増殖して、細胞障害を惹起する 5,130 bp の 2 本鎖環状 DNA ウイルスである。JCV は調節領域を基点に、反時計回り方向に small t (st)、large T (LT) の 2 種類の初期蛋白、時計回り方向に agnoprotein (Agno)、VP1、VP2/3 の 3 種類の後期蛋白の遺伝子を有している。JCV は経口感染によってヒトに感染し、主に尿路系に不顕性感染すると考えられている。PML では、尿路系に潜伏していた非病原型 JCV が何らかの原因によって病原型 JCV に再編成され、その結果脳のグリア細胞において増殖が可能になると考えられている。

JCV は宿主域が狭く、遅発性ウイルス感染症と呼ばれるように、その増殖が非常に遅いことが知られているが、この理由は不明である。本研究では JCV の許容細胞株であるヒト神経芽細胞腫由来の IMR-32 細胞 (IMR) を用いて JCV 感染後の蛋白の動態を調べ、本ウイルスの生活環における特異性を明らかにすることを試みた。蛋白の免疫染色は、感度は高いが定量性に欠けること、異なる蛋白の発現を抗体を用いて定量・比較することは困難であることから、本研究では各蛋白を code している mRNA の絶対量をリアルタイム RT-PCR 法を用いて比較・検討した。一方後期蛋白の一つである Agno 蛋白は未だ機能が不明である。Agno を欠損した JCV DNA を IMR に導入した際に、野生型に比較して VP1 および LT の mRNA の発現が著明に抑制されたこと、PML 脳で Agno の発現が高率に認められるという事実から、Agno は他の JCV 蛋白の転写を制御している可能性が示唆されている。それを検証するために非許容細胞であるヒト胎児腎臓由来の HEK293 細胞 (293) に Agno を強制発現させ、JCV 各蛋白の mRNA および蛋白発現の解析を試み、ウイルス蛋白の相互作用に関する考察を行った。その結果として以下の事実を明らかにした。

JCV 許容細胞である IMR において感染後の JCV 各蛋白の mRNA の発現時期は、初期蛋白 st、LT は 36 時間、後期蛋白である Agno は 48 時間、VP1、VP2/3 では 72 時間であることが判明した。mRNA の発現時期については、初期蛋白に引き続いて後期蛋白が発現していた。JCV と同属の SV40 や polyomavirus A2 では初期蛋白の mRNA の発現時期は感染後数時間から 10 数時間と報告されている。本研究では感度の優れた定量的リアルタイム RT-PCR 法を用いているにもかかわらず、初期蛋白の発現は感染後 36 時間以降にしか認められなかった。今回

の結果により、JCV による感染の成立が他のポリオーマウイルスに比較して緩徐であることが示唆された。また後期蛋白である VP1、VP2/3 は感染後 72 時間で発現しているにもかかわらず、Agno は感染後 48 時間で発現していた。この発現の解離は JCV の増殖が他のポリオーマウイルスに比べて緩徐であることに関係しているかもしれない。後期蛋白である Agno に関する発現様式はこれまで不明であったが、同じ後期蛋白である VP1 や VP2/3 に比べて mRNA の発現時期が早く、発現量も多いことが判明した。JCV の Agno は後期蛋白転写領域の最上流に位置し、調節領域の直後に位置している。後期蛋白は転写後、VP1、VP2/3 領域でスプライシングされて数種類の mRNA ができることが知られている。Agno の領域はスプライシングされないことが報告されていることから、Agno と VP1、2/3 の mRNA の発現量の差に関連している可能性が考えられた。また Agno の mRNA の発現が早く、発現量が多いという事実は、Agno が JCV 感染において未知の重要な機能を有している可能性を示唆している。

我々は 293 に Agno を強制発現させた 293 細胞 (293A) を用いて JCV 感染後の各蛋白の発現への Agno の影響を検索した。その結果 Agno は、非許容細胞である 293 において、各 JCV 蛋白の mRNA の発現を促進した。さらに免疫染色法で蛋白の発現を検索した結果、JCV 感染後 2-3 週で、少数のウイルス蛋白産生細胞を認めた。しかしながら陽性細胞数が少なかったことから immunoblot 法では検出は困難であった。Agno による JCV 各蛋白の発現促進効果は強力ではなく、SV40 の LT を発現する 293 細胞 (293T) と比較すると、JCV 蛋白の mRNA の発現時期は 293T より 1 週間以上遅く、また発現量は 293T の 1/5 程度であった。発現量は 293T に比して微量であったが、今回用いたリアルタイム RT-PCR 法によってはじめて検出できたものと考えられた。また許容細胞である IMR に Agno を発現することも試みたが成功せず、今後の課題と考えられる。さらに Agno の JCV 各蛋白に対する転写への影響を dual luciferase assay により検討したところ、Agno は初期転写調節領域に対して影響は認めなかったが、後期転写調節領域に対する転写活性を増加させる傾向が認められた ($p=0.08$)。293 と比較した結果から、293A では VP1、VP2/3 の mRNA の発現量は 293 の 100 倍、st は 60 倍、LT は 20 倍程度に上昇しており、後期蛋白の mRNA の増加の程度は初期蛋白に比べて顕著であったことと合致していた。以上の事実から Agno は非許容細胞において、許容細胞が特異的に有している JCV 転写活性化細胞因子の機能を部分的に補助している可能性が推察された。Agno の機能に関してはこれまでに SV40 にて注目され、多くの知見が報告されてきている。SV40 の Agno 欠損ウイルスは野生型に比べてウイルスの増殖が著明に抑制される。また Agno がウイルスの転写や複製に関与するという報告、さらに SV40 Agno は後期蛋白の翻訳やプロセッシングへの関与、VP1 の核移行の促進、DNA への結合に関与するという報告がみられている。このように Agno は多機能蛋白であることが予想され、今回我々が明らかにした機能はその一部であると考えられる。今後 Agno の機能を明らかにすることが JCV の感染機構の解明に大きく寄与するものと思われる。さらに Agno を抑制することで現在治療法のない PML の治療が可能になることが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 皆 川 知 紀

学 位 論 文 題 名

リアルタイム RT-PCR 法を用いた JC ウイルスの動態解析

進行性多巣性白質脳症 (PML) の原因である JC ウイルス (JCV) は神経系細胞で特異的に増殖して、細胞障害を惹起する 5,130 bp の 2 本鎖環状 DNA ウイルスである。JCV は small t (st)、large T (LT) の 2 種類の初期蛋白、agnoprotein (Agno)、VP1、VP2/3 の 3 種類の後期蛋白の遺伝子を有している。PML は遅発性ウイルス感染症の代表的な疾患であり、JCV の増殖は非常に遅いことが知られているが、この理由は不明である。本研究では JCV の許容細胞株であるヒト神経芽細胞腫由来の IMR-32 細胞 (IMR) に JCV を感染させて、リアルタイム RT-PCR 法にて JCV mRNA の動態を調べ、本ウイルスの生活環における特異性を明らかにすることを試みた。その結果、IMR 感染後の JCV 各蛋白の mRNA の発現時期は、初期蛋白 st、LT は 36 時間、後期蛋白である Agno は 48 時間、VP1、VP2/3 では 72 時間であることが判明した。この結果は、JCV による感染の成立は他のポリオーマウイルスに比較して緩徐であることに合致しており、JCV の増殖の遅さは転写レベルで調節されている可能性が示唆された。また Agno の発現様式はこれまで不明であったが、同じ後期蛋白である VP1 や VP2/3 に比べて mRNA の発現時期が早く、発現量も多いことが判明した。一方 Agno は機能未知の蛋白である。Agno を欠損した JCV DNA を IMR に導入した際に、野生型に比較して VP1 および LT の mRNA の発現が著明に抑制されたことから、Agno は他の JCV 蛋白の転写を制御している可能性が示唆されている。それを検証するために非許容細胞であるヒト胎児腎臓由来の HEK293 細胞 (293) に Agno を強制発現させた細胞株を樹立し、JCV 各蛋白の mRNA および蛋白発現の解析を試み、ウイルス蛋白の相互作用に関する考察を行った。その結果 Agno は、293 において、各 JCV 蛋白の mRNA の発現を後期蛋白優位に促進した。さらに免疫染色法で蛋白の発現を検索した結果、JCV 感染後 2-3 週で、少数のウイルス蛋白産生細胞を認めた。Agno の JCV 各蛋白に対する転写への影響を dual luciferase assay により検討したところ、Agno は初期転写調節領域に対して影響は認めなかったが、後期転写調節領域に対する転写活性を増加させる傾向が認められた。これは後期蛋白の mRNA の増加の程度が初期蛋白に比べて顕著であったことと合致していた。293 において Agno は、後期蛋白の転

写促進作用などにより JCV mRNA 及び JCV 蛋白の発現を促進すると考えられた。

口頭発表に当り、副査の吉木教授からは、1) 尿路系での JCV の潜伏感染細胞、2) PML の発症機序、3) Agno 欠損による初期蛋白の発現抑制の有無、4) Agno による初期蛋白発現促進の機序、5) Agno の立体構造解析による治療薬の開発の可能性、6) 現在の PML の治療法、について質問があった。これらに対して申請者は、1) 腎尿細管・集合管上皮細胞、2) 免疫能低下による JCV の活性化、3) 初期蛋白 LT の mRNA の発現は著明に低下する、4) Agno により JCV DNA の複製が数十倍に亢進する (未発表データ)、5) 検討中であるが Agno の精製は困難である、6) Ara-C や HAART が使われているが効果は乏しい、と回答した。同じく副査の皆川教授からは、1) Agno の意味、2) JCV に対する宿主細胞の反応について質問があり、1) unknown の意味、2) PML では液性免疫は保たれているが細胞性免疫は低下している、と回答した。さらに同教授からは、蛋白レベルでの検討についての指摘があった。主査の長嶋教授からは、他のポリオーマウイルスの Agno の機能に関しての質問があり、これに対しては、SV40 の Agno は転写・複製・翻訳への関与、DNA への結合、ウイルス粒子の細胞内輸送の促進などの報告があると回答した。またフロアの小山名誉教授からは、1) 免疫不全状態で PML が発症するメカニズム、2) JCV の細胞特異性は何によって規定されているのかについて質問があり、1) 免疫不全状態では JCV の増殖が抑制されないために JCV の調節領域の再編成が起こりやすく強毒株が出現しやすい可能性、2) 受容体はユビキタスなので、JCV の細胞選択性を決めるのは細胞に特異的に存在する転写因子が考えられると回答した。

この論文は、JC ウイルスの動態と機能未知の agnoprotein の機能の一部を明らかにした点で高く評価され、今後 JC ウイルス研究に重要な基礎資料を確立したものである。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程に於ける研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。