

学 位 論 文 題 名

JC virus 感染症のモデル動物の作成と
その治療法に関する検討

学位論文内容の要旨

緒 言

JC ウイルス(JCV)はポリオーマウイルス科に属する2本鎖環状 DNA ウイルスで、ゲノムは 5,130 塩基対からなり、6 個の蛋白をコードしている。JCV は主として免疫不全患者の中枢神経系に進行性多巣性白質脳症(progressive multifocal leukoencephalopathy; PML)を惹起する。PML の治療法として、DNA 合成阻害剤 Ara-C や抗ウイルス薬 cidofovir 等が臨床的に検討されてきたが、未だ確固たる有効性は示されていない。臨床的に効果が得られなかった Ara-C に関しては、培養細胞では有効と報告されてきているが、以前の報告では SV40 で不活化したヒト胎仔神経系細胞に高濃度の Ara-C を投与しており、至適濃度での有効性の検討が必要と思われた。そこで我々はヒト神経芽細胞種由来細胞株 IMR-32 を用いて樹立した JCV 持続感染細胞 JCI を用いて Ara-C の JCV 感染に対する抑制効果を検討することとした。

次に、PML に対する治療法が未だ確立されていない原因として、JCV はヒト以外には感染が成立せず、JCV 感染モデルが存在しないという事が考えられる。そこで我々はマウスの脳に JCV 感染細胞を接種することにより *in vivo* の JCV 感染を模倣するモデルを作成することを試みた。さらに最近 small interfering RNAs (siRNAs) を用いた RNA interference (RNAi) が種々の内因性、およびウイルス、細菌の遺伝子を抑制するために用いられており、我々を含めたグループが *in vitro* の実験で JCV の遺伝子に対する siRNA を用いて JCV の感染抑制に成功している。そこで今回作成した JCV 感染モデルを利用して、*in vitro* で効果の認められた siRNA を用いて PML の治療法の検討をすることを試みた。

材料と方法

1. 培養細胞実験: 6-well dish に JCI を蒔き、翌日から 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の各濃度で Ara-C を含んだ培養液で培養を行なった。Ara-C 投与 3 日後に、1枚を細胞数計算に、もう1枚は Western blotting に用いた。
2. *in vivo* モデルの作製: 実験には、BALB/c マウスと、BALB/c 由来のヌードマウスを用いた。頭部の皮膚を切開し、十字縫合から右へ 1 mm の部位に電気ドリルで小さい穴を開け、マイクロシリンジをこの穴から 3 mm 刺入し、10 μl の細胞混濁液 (8,000 個/ml) を 1 $\mu\text{l}/\text{分}$ の割合で注入した。細胞は SVG-A と JCI を用いた。
3. *in vivo* siRNA 実験: 用いた siRNA は以前我々が報告した JCV の agnoprotein に対する siRNA (Ag122) を用いた。siRNA は *in vivo* では速やかに分解されてしまうので、コラーゲン分子の両端に存在する主要抗原部位であるテロペプチドというアミノ酸配列を除去したバイオマテリアルであるアテロコラーゲンを用いて、*in vivo* での siRNA の効果を持続させた。

JCI 細胞をヌードマウスに移植して 4 日後に、アテロコラーゲンと混和した siRNA を同部位に注入した。その 6 日後に脳を採取し、標本を作製した。HE 標本で移植細胞が 200 個以上存

在する切片を選択し、移植細胞数を数えた。さらにその連続切片を抗 T 抗原(Ab-2)抗体を用いて免疫染色を行い、JCV 感染細胞数を計数し、各動物につき移植細胞の JCV 感染率を求めた。陰性対照群には siRNA の代わりに等量の PBS をアテロコラーゲンに加えたものを用いた。

結果

1. 培養細胞実験:生細胞と死細胞をそれぞれ計数したところ、Ara-C の濃度が 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までは総細胞数は変化せず、死細胞の割合は Ara-C 濃度依存性に増加した。Ara-C の濃度が 0.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上では総細胞数の減少が認められ、Ara-C により細胞の増殖が抑制されていることが示された。一方、Western blotting を行った結果、生細胞中の JCV の T 抗原の発現量は Ara-C の濃度によらず一定であった。以上の結果から、Ara-C は以前の報告とは異なり、JCV の増殖には影響を及ぼさなかった。
2. *in vivo* モデルの作製:マウスの脳内では SVG-A 細胞は移植後 14 日で生存は認められなかった。次に JCV を感染させた SVG-A 細胞をマウス脳に移植したところ、移植後 5 日の早期で CD68 陽性細胞に貪食されている事が示唆された。そこで、マウスの免疫による移植細胞拒絶を抑制するために、Cyclosporin A を投与したマウス、およびヌードマウスに JCV 感染 SVG-A 細胞および JCI 細胞を移植し、種々の組み合わせ条件を検討した結果、ヌードマウスに JCI 細胞を移植する実験系において、移植後 2 週間にわたって安定して生着細胞を確認できた。
3. *in vivo* siRNA 実験: 陰性対照群の JCV 感染率の平均は 10.1%であり、*in vitro* での JCI 細胞の JCV 感染率と変化は認められなかった。一方 siRNA 投与群の平均は 7.2%であり、siRNA の投与により細胞の JCV 感染率が減少する傾向が認められた。

考案

今回、最初に既報の培養細胞での Ara-C の効果について追試実験を行なったが、有効とされていた濃度では細胞障害が生じ、生細胞でのウイルス抑制効果は無いことが判明した。

JCV はヒト以外の動物では増殖しないので、純粋な動物実験は組めなかったが、ヒト神経系細胞をマウス脳に移植し、移植細胞でのウイルス感染率を判定するという実験系を作製した。

SVG-A 細胞に JCV を感染させた細胞をマウス脳内に移植した際には、長期生存が得られなかったが、この組み合わせでは *in vitro* の条件でも、約 2 週間で lytic infection の状態となり死滅する事から、拒絶反応よりむしろ JCV 感染による SVG-A 細胞自体の傷害が生じ、細胞が生存できなかったことが予測された。免疫抑制と移植細胞の組み合わせ検討の結果、JCI 細胞を BALB/c 由来のヌードマウスに移植すると、少なくとも移植後 14 日間 JCI 細胞はマウス脳内で生着している事が明らかになり、本研究の目的である JCV に対する種々の薬剤投与の効果判定について充分有用である事が判明した。

In vivo 実験系では *in vitro* での成果を考慮し、薬剤効果を試すよりも siRNA を用いた実験を優先させた。今回の実験ではまだ動物数も少なく、有意差は出せなかったが、予備実験の段階では有効と思われ、今後さらに実験を進めていく指標が得られた。今回我々が採用したアテロコラーゲンを用いて脳内に siRNA を投与した研究はこれまでに認められず、今後他の疾患に関しても応用が期待される。

結語

1. *In vitro* で Ara-C の細胞毒性は強く、JCV に対する抑制効果は認められなかった。
2. JCV 感染を模倣するモデルとして、ヒト神経系細胞をマウス脳内に移植するモデルの作成を試みた。
3. ヌードマウスの脳内に JCI 細胞を移植し、少なくとも移植後 14 日間生存することを確認した。
4. JCV に対する siRNA を用いた場合、マウス脳内に移植した JCI 細胞の感染性は低下する傾向にあることを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 佐々木 秀 直

副 査 教 授 岩 崎 喜 信

学 位 論 文 題 名

JC virus 感染症のモデル動物の作成と その治療法に関する検討

JC virus (JCV) は主として免疫不全患者の中枢神経系に進行性多巣性白質脳症 (progressive multifocal leukoencephalopathy; PML) を惹起する。PML の治療法として、DNA 合成阻害剤 Ara-C や抗ウイルス薬 cidofovir 等が臨床的に検討されてきたが、未だ確固たる有効性は示されていない。そこで、過去に *in vitro* で効果のあった薬剤等を今回再検討することを試みた。

次に、PML に対する治療法が未だ確立されていない原因として、JCV はヒト以外には感染が成立せず、JCV 感染モデルが存在しないという事が考えられる。そこで、マウスの脳に JCV 感染細胞を接種することにより *in vivo* での JCV 感染を模倣するモデルを作成することを試みた。さらに最近 small interfering RNAs (siRNAs) を用いた RNA interference (RNAi) が種々の内因性、およびウイルス、細菌の遺伝子を抑制するために用いられており、当教室が *in vitro* の実験で JCV に対する siRNA を用いての JCV の感染抑制に成功している。そこで今回作成した JCV 感染モデルを利用して、*in vitro* で効果の認められた siRNA を用いて PML の治療法の検討をすることを試みた。

まず、培養細胞の JCI を用いて Ara-C の有効性について検討した。0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 $\mu\text{g/ml}$ の各濃度の Ara-C を含んだ培養液で培養を行った。Ara-C 投与 3 日後に、細胞数の計算と western blotting で評価を行った。細胞数は生細胞と死細胞をそれぞれ計数したところ、Ara-C の濃度が 0.5 $\mu\text{g/ml}$ までは総細胞数は変化せず、死細胞の割合は Ara-C 濃度依存性に増加した。Ara-C の濃度が 0.75 $\mu\text{g/ml}$ 以上では総細胞数の減少が認められ、Ara-C により細胞の増殖が抑制されていることが示された。一方 western blotting を行った結果では生細胞中の JCV の T 抗原の発現量は Ara-C の濃度によらず一定であった。以上の結果から、Ara-C は以前の Major らの報告とは異なり、JCV の増殖には影響を及ぼさなかった。

JCV 感染モデルの作成では、BALB/c マウスと BALB/c 由来のヌードマウスを用いた。頭蓋の十字縫合から右へ 1mm の部位に電気ドリルで小さい穴を開け、マイクロシリンジを垂

直に刺入して細胞液を注入した。JCV を感染させた SVG-A 細胞をマウス脳に移植したところ、移植後早期の 5 日目に細胞は死滅し、CD68 陽性細胞に貪食されていることが示された。JCV を感染させていない SVG-A 細胞では 7 日目までの生存が確認できており、JCV 感染による SVG-A 細胞自体の傷害が生じ、細胞が生存できなかったことが予想された。Cyclosporin A を投与したマウス、およびヌードマウスに移植しても長期の生着は得られなかった。JCI 細胞を用いて同様の実験を行ったところ、ヌードマウスに移植した場合で移植後 2 週間にわたって安定して生着細胞を確認でき、これをモデルとして以後の実験に用いることとした。

siRNA は以前に当教室から報告した JCV の agnoprotein に対する siRNA(Ag122)を用いた。siRNA は in vivo では速やかに分解されてしまうので、アテロコラーゲンを用いて in vivo での siRNA の効果を持続させた。アテロコラーゲンはコラーゲン分子の両端に存在する主要抗原部位であるテロペプチドというアミノ酸配列を除去したバイオマテリアルである。JCI 細胞をヌードマウスに移植して 4 日後に、アテロコラーゲンと混和した siRNA を同部位に注入し、その 6 日後に脳を採取し、標本を作製した。この結果、陰性対照群の JCV 感染率の平均は 10.1%であり、in vitro での JCI 細胞の JCV 感染率と変化は認められなかった。一方 siRNA 投与群の平均は 7.2%であり、siRNA の投与により細胞の JCV 感染率が減少する傾向が認められた。

口頭発表に当たり、副査の佐々木秀直教授より、移植細胞 JCI の生着期間、アテロコラーゲンの導入効率等に関する質問があった。また副査の岩崎教授より、JCI 細胞移植後の観察期間を 2 週間までにした理由、siRNA や薬剤の投与方法等に関する質問があった。主査の長嶋教授より、siRNA や薬剤の投与方法についての質問が再びあった他、siRNA を用いての実験の陰性対照について等の質問があった。これらの質問に対して申請者は概ね適切な回答を行った。

この論文はヒト以外の動物には感染しない JCV の感染モデル動物を作成し、薬剤等のスクリーニングに有効であることを示した点で優れていると判断され、今後 PML の治療を研究する上で貴重な材料を与えたものと考えられた。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。