

令和元年6月20日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06759

研究課題名(和文) 進行性多巣性白質脳症：JCウイルス感染グリア細胞のPML-NBs構成蛋白の変動

研究課題名(英文) Progressive multifocal leukoencephalopathy: Dynamics of PML-NBs of JC virus-infected glial cells

研究代表者

原由紀子(Hara, Yukiko)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40313267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：進行性多巣性白質脳症(PML)は、JCV感染による脱髄脳症である。JCVは感染細胞核内のPML-NBsで複製するが、詳細な機序は不明である。今回、agnoproteinの存在下(agn(+))、非存在下(agno(-))でvirus-like particle(VLP)を作製し、次の結果を得た。JCVはagn(+)で、カプシド蛋白の発現量を制御し、PML-NBsで効率よく粒子形成する。カプシド蛋白の過剰発現は、PML-NBs以外の核内領域で不整なVLP形成をもたらす。Agn(+)では多数の転写因子の発現上昇がみられ、JCV複製に重要な転写因子のPML-NBs局在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PML-NBsは広く真核細胞の核内にみられる構造であるが、その機能は多彩である。ウイルス感染においてはウイルス遺伝子の転写や、ウイルス粒子形成の場として研究されているが、JCV感染でPML-NBsの解析を積極的に行っている研究は、世界的に少数である。希少研究である上に、培養細胞と人体組織を関連させたtranslational researchが行われているという点で、本研究は学術的意義が高い。また、近年、免疫抑制剤などの使用に伴うJCV再活性化、PML発症が問題となっている。JCV溶解感染のメカニズムを明らかにすれば、将来的には薬剤関連PMLの対策にも貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) is a demyelinating disorder caused due to JCV infection. Previous studies demonstrated that JCV capsid proteins accumulate to the promyelocytic leukemia nuclear bodies (PML-NBs), where they are assembled into virions. To clarify functions of PML-NBs, we expressed JCV capsid proteins, VP1 and VP2/VP3 in the presence or absence of agnoprotein, and assembly of virus-like particles (VLPs) was examined. The results indicated that (1) JCV efficiently produces VLPs, in the presence of agnoprotein, with regulated expression levels of capsid proteins. (2) Overexpression of the capsid proteins, in the absence of agnoprotein, results in ectopic assembly of irregular VLPs. (3) Moreover, mRNA expression levels of transcription factors increased in presence of agnoprotein. Thus, it may be indicated that the levels of transcription factors, which are important for JCV reproduction would be increased, when capsid assembly occurs at PML-NBs.

研究分野：神経病理学

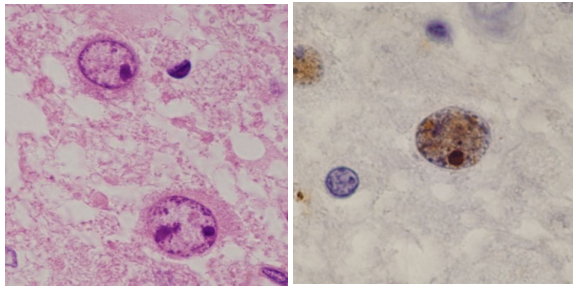
キーワード：進行性多巣性白質脳症 JC virus PML-NBs 脱髄 細胞周期 転写因子 細胞変性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

進行性多巣性白質脳症 (progressive multifocal leukoencephalopathy: PML)は、JCvirus (JCV)感染による脱髄脳症である。JCV は多くのヒトに潜伏・持続感染し、免疫能の低下した宿主において、再活性化する。神経系の乏突起膠細胞において、JCV の溶解感染は脱髄病変を形成する。

近年我々は、JCV がグリア細胞において promyelocytic nuclear bodies (PML-NBs)と呼ばれるドット状の核内構造で複製し、核内にドット状のウイルス封入体を形成することを明らかにした (図1)。グリア細胞は JCV 感染に伴い、細胞周期を S から G2 に移行し、この過程で PML-NBs が腫大化する。これを足場に JCV が増殖する。JCV には、後期領域に agnoprotein と呼ばれる調節蛋白をコードしており、そのコード領域や遺伝子産物は PML-NBs でのウイルス



粒子形成を制御することが示唆されていたが、その詳細な機能は明らかではなかった。また、PML-NBs は多数の核内蛋白の集積の場であり、細胞活動の状態に応じて局在する核内蛋白が変動すると推測されたが、その詳細も明らかではなかった。

(図1) JCV が PML-NBs で複製するために形成されるドット状の封入体。

2. 研究の目的

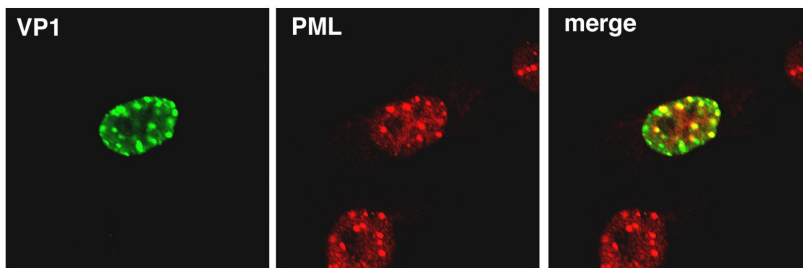
進行性多巣性白質脳症において、JCV が誘導する細胞変性と脱髄のメカニズムを明らかにすることを目的に、感染細胞における PML-NBs の機能を明らかにする。具体的には、JCV が PML-NBs で複製する意義を明らかにし、感染細胞で変動する PML-NBs の構成蛋白を検討する。

3. 研究の方法

既に我々は、培養細胞にて JCV カプシド蛋白を強制発現し、ウイルス様粒子 (virus-like particles: VLP) を形成するシステムを樹立している。Agnoprotein の蛋白コード領域を full length で有している発現ベクター (agn(+)) と、ATG 翻訳開始コドンを含む 5' 領域 148-bp を欠失した発現ベクター (agn(-)) をそれぞれ COS-7 細胞にトランスフェクションし、JCV カプシド蛋白の局在や、VLP 形成のメカニズムを共焦点顕微鏡や、電子顕微鏡で解析した。また、各々の発現ベクターをトランスフェクションした培養細胞から mRNA を抽出し、マイクロアレイにて発現の上昇している遺伝子を比較検討した。

4. 研究成果

JCV カプシド蛋白を agnoprotein の下流で発現すると (agn(+))、カプシド蛋白 VP1 の発現量は抑制されていたものの、PML-NBs に限局して集積が見られることが明らかになった。共焦点顕微鏡による解析で、VP1 は、PML-NBs の主要構成蛋白である PML 蛋白と、局在を一致させていた (図2)。培養細胞核内で、agn(+)) では、VP1 蛋白が核膜直下の PML-NBs 様の構造に集積し、核マトリックス様の構造に沿って、その分布を広げていることが明らかになった。



免疫電顕による解析でも、VP1 蛋白をラベルする金コロイドが、核膜直下に集積し、d 金コロイド集積部位と一致して、VLP 形成が確認された。

(図2) agnoprotein 発現下で、JCV カプシド蛋白は、PML-NBs に限局して集積している。

一方で、agnoprotein の 5' 側、148-bp を欠失すると (agn(-))、VP1 蛋白の発現量は上昇したものの、PML-NBs 以外の核内領域にも、VP1 がびまん性に分布し、金コロイドの密度の高い領域では、VLP 形成が認められた。

VLPの超微形態を、agn(+)とagn(-)で比較した。Agn(+)では、均一な形態を示す球状VLPが多数みられるのに対し、agn(-)ではVLP形態に多様性が見られ、歪んだ形態を示すVLPが目立った。また、マイクロアレイの結果、agno(+)では、多数の転写因子のmRNA発現の上昇が認められた。

以上の結果より、JCVはagnoproteinの下流でカプシド蛋白を発現し、PML-NBsで効率よくウイルス粒子を複製すると考えられる。Agnoproteinまたはagnoproteinコード領域は、JCVカプシド蛋白の発現量を制御し、PML-NBsでの効率よりウイルス複製を促進すると考えられる。Agn(+)では多数の転写因子の発現上昇がみられたことから、JCV複製に重要な転写因子がPML-NBsに局在している可能性が示唆されるが、今後の研究で詳細な検討が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

Ishii J., Shishido-Hara Y, Kawamoto M, Fujiwara S, Imai Y, Nakamichi K, Kohara N
A Punctate Magnetic Resonance Imaging Pattern in a Patient with Systemic Lupus Erythematosus is an Early Sign of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy: A Clinicopathological Study
Intern Med. [査読有] 2018 15:57(18): 2727-2734 doi: 10.2169/internalmedicine.0696-17.

赤川優美、上野 晃弘、池田淳司、石井亘、宍戸-原由紀子、関島良樹
メフロキン、ミルタザピン、リスベリドンにより 長期的に良好な経過をとった宿主免疫応答の示唆される 進行性多巣性白質脳症の2症例
臨床神経 [査読有] 2018 58:324-331 doi: 10.5692/clinicalneurology.001166.

Nishiyama S, Misu T, Shishido-Hara Y, Nakamichi K, Saijo M, Takai Y, Takei K, Yamamoto N, Kuroda H, Saito R, Watanabe M, Tominaga T, Nakashima I, Fujihara K and Aoki M.
Fingolimod-associated PML with mild IRIS in MS.
Neurol Neuroimmunology Neuroinflamm. [査読有] 2017 10;5(1):e415 doi: 10.1212/NXI.0000000000000415.

宍戸-原 由紀子

進行性多巣性白質脳症の分子病理と病態
Neuroinfection[査読無] 2017 22(1): 10-15,

Sanjo N, Kina S, Shishido-Hara Y, Nose Y, Ishibashi S, Fukuda T, Maehara T, Eishi Y, Mizusawa H, Yokota T.
Progressive Multifocal Leukoencephalopathy with Balanced CD4/CD8 T-Cell Infiltration and Good Response to Mefloquine Treatment.
Intern Med [査読有]. 2016;55(12):1631-5. doi: 10.2169/internalmedicine.55.6051.

宍戸-原 由紀子

進行性多巣性白質脳症の病理 JC ウイルス増殖と、宿主免疫応答のバランスを考える。
「神経内科」[査読有] 2016 84(3):306-311

宍戸-原 由紀子、内原俊記、三條伸夫

炎症反応を伴った進行性多巣性白質脳症 ~免疫不全の原因の多様性と、病理所見~
Brain Nerve [査読有]. 2016 68(4):479-88. doi: 10.11477/mf.1416200422.

Shishido-Hara Y

Progressive Multifocal Leukoencephalopathy -Dot-shaped inclusions and virus-host interactions.
Neuropathology[査読有]. 2015: 35(5) 487 -96 doi: 10.1111/neup.12203.

内原俊記、宍戸-原 由紀子

ヒト大脳白質の成り立ちと病態 [What matters more in the white matter: thinking inside of the brain]. Brain Nerve[査読有]. 2015 ;67(4):371-87. doi: 10.11477/mf.1416200153.

〔学会発表〕(計 14 件)

宍戸-原由紀子、松林純、中道一生、西條政幸、中村直哉、相澤仁志、秋元治朗、長尾俊孝、
画像・病理・遺伝子解析で悪性リンパ腫が疑われた、高度炎症細胞浸潤を伴った進行性多巣性白
質脳症の 1 例

第 46 回日本臨床神経病理談話会 2018 年 11 月 17-18 日、京都

宍戸-原由紀子、小野大介、水谷真之、森容子、市野瀬慶子、渡邊睦房、谷澤徹、横田隆徳、
内原俊記、藤ヶ崎浩人

進行性多巣性白質脳症：経時的 MRI 画像と神経病理の比較からみた PML 病変の伸展様式

第 23 回日本神経感染症学会総会・学術大会 2018 年 10 月 19-20 日 東京

三條伸夫、**宍戸-原由紀子**、能勢裕里江、宮本翔平、齋藤鉄也、福田哲也、山本くらら、小林
大輔、横田隆徳

髄液 JC ウイルス陽性の高齢者では中枢神経細胞への JC ウイルス感染が起こっている

第 23 回日本神経感染症学会総会・学術大会 2018 年 10 月 19-20 日 東京

Yukiko Shishido-Hara

Progressive multifocal leukoencephalo -pathy, Virology and Neuropathology

The 19th International Congress of Neuropathology (ICN2018) 2018 年 9 月 25 日 東京

宍戸-原 由紀子

JC ウイルスの基礎および PML の神経病理

第 30 回日本神経免疫学会学術集会 イブニングセミナー 多発性硬化症(MS)治療における PML
マネジメント 2018 年 9 月 20 日 郡山

Nishigori R, Warabi Y, **Shishido-Hara Y**, Nakamichi K, Komori T, Isozaki E
Progressive multifocal leukoencephalopathy under the control of a regulated infectious
immune response in a patient with rheumatoid arthritis Sendai Conference 2018, July 14
2018, Sendai

宍戸-原由紀子、松林純、中道一生、西條政幸、中村直哉、相澤仁志、秋元治朗、長尾俊孝、
画像・病理・遺伝子解析で悪性リンパ腫が疑われた、高度炎症細胞浸潤を伴った進行性多巣性白
質脳症の 1 例

第 22 回日本神経感染症学会総会・学術大会 2017 年 10 月 13-14 日、小倉

小野大介、**宍戸-原由紀子**、水谷真之、森容子、市野瀬慶子、渡邊睦房、谷澤徹、横田隆徳、
内原俊記、藤ヶ崎浩人

灰白質病変で発症し、悪性リンパ腫との鑑別に苦慮した進行性多巣性白質脳症の 1 剖検例

第 58 回日本神経病理学会総会学術研究会 2017 年 6 月 1 日-3 日、東京

西山修平、三須建郎、**原由紀子**、中道一生、高井良樹、黒田宙、中島一郎、藤原一男、青木
正志

初期の病理像を呈した Fingolomod 関連進行性多巣性白質脳症の 1 例

第 58 回日本神経病理学会総会学術研究会 2017 年 6 月 1 日-3 日、東京

宍戸-原 由紀子

シンポジウム 9 中枢神経 ナタリツマブ PML

進行性多巣性白質脳症の病理：宿主免疫レベルと病理所見の多様性

第 36 回日本画像医学会 2017 年 2 月 25 日 26 日 東京

宍戸-原由紀子

シンポジウム1 進行性多巣性白質脳症の診断・治療の新展開： 進行性多巣性白質脳症の分子
病態と病理

第21回日本神経感染症学会総会・学術大会 2016年10月21日-22日、金沢

Yukiko Shishido-Hara

JC viral inclusions in progressive multifocal leukoencephalopathy: Scaffolding

promyelocytic leukemia nuclear bodies (PML-NBs) grow with cell cycle transition through S-to-G2-like state in the enlarging nuclei of oligodendrocytes
2nd International Conference on PML, August 25-26, 2015, Mölndal, Sweden

Sanjo N, Kina S, Shishido-Hara Y, Nose Y, Ishibashi S, Fukuda T, Maehara K, Eishi Y, Mizusawa H, Yokota T.

A Case of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy with Balanced CD4/CD8 T-Cell Infiltration and Good Response to Mefloquine Treatment

2nd International Conference on PML, August 25-26, 2015, Mölndal, Sweden

土橋裕一、中江啓晴、大久保正、多田美紀子、土井 宏、日比谷孝志、宍戸-原由紀子、田中章景

脳生検で診断しえた非 HIV 進行性多巣性白質脳症の 62 歳男性例
第 213 回日本神経学会関東・甲信越地方会 2015 年 6 月 6 日, 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名： 菅間 博
ローマ字氏名： KAMMA, Hiroshi
所属研究機関名： 杏林大学
部局名： 医学部
職名： 教授
研究者番号 (8 桁)： 10195191

研究分担者氏名： 矢澤 卓也
ローマ字氏名： YAZAWA, Takuya
所属研究機関名： 獨協医科大学
部局名： 医学部
職名： 教授
研究者番号 (8 桁)： 50251054

研究分担者氏名： 千葉 知宏
ローマ字氏名： CHIBA, Tomohiro
所属研究機関名： 杏林大学
部局名： 医学部
職名： 講師
研究者番号 (8 桁)： 60398617

研究分担者氏名： 佐藤 華子
ローマ字氏名： SATO, Hanako
所属研究機関名： 獨協医科大学
部局名： 医学部
職名： 講師
研究者番号 (8 桁)： 60438132

研究分担者氏名： 石井 順
ローマ字氏名： ISHII, Jun
所属研究機関名： 獨協医科大学
部局名： 医学部
職名： 助教
研究者番号(8桁): 80749599

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。