

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860270

研究課題名(和文) 次世代シーケンサーが明らかにしたJCウイルスゲノム変異とPMLの病態

研究課題名(英文) Deep-sequence identification and role in virus replication of a JC virus quasi-species in patients with progressive multifocal leukoencephalopathy

研究代表者

高橋 健太 (Takahashi, Kenta)

国立感染症研究所・感染病理部・研究官

研究者番号：80711689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：病理組織学的に進行性多巣性白質脳症(PML)と確定された6症例の脳組織よりDNAを抽出し、次世代シーケンサーにてJCウイルス(JCV)ゲノムの変異を解析したところ、全例に共通して早期タンパク質のT抗原に共通した変異(V392G)を有する株が野生株と共存して3-19%に認められた。In vitroの実験系で変異株は野生株と比較し、ウイルスタンパク質発現及びウイルス増殖能が著しく低下した。変異株が検出されたいずれの症例のPML病変部でも、免疫組織化学ではT抗原の発現が認められた。JCVは、ウイルス増殖に抑制的な作用を有する変異株と共存した状態でPML病変部で増殖していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：JC virus is a DNA virus causing progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). We identified a JC virus quasi-species with an amino acid substitution in the large T antigen in patients with PML by next-generation sequencing. In vitro studies showed that the mutation strongly repressed the expression of viral proteins and reduced the viral replication. However, immunohistochemistry revealed that the expression of viral proteins was sustained in vivo. Thus, JC virus replicates in PML lesions in the presence of a mutant virus which is able to suppress virus replication.

研究分野：病理学

キーワード：進行性多巣性白質脳症 JCウイルス T抗原 次世代シーケンサー quasi-species

## 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、ヒトに特異的に感染する JC ウイルス (JCV) により、主に免疫抑制状態にある患者に発症する致死性の脱髄疾患である。近年は多発性硬化症やクローン病の治療薬として使用されるナタリズマブなどの抗体医薬による PML の発症が報告され、抗体医薬使用に伴う PML への関心が急速に高まっているが、PML に対する効果的な治療法は未だになく、その確立が強く求められている。

ウイルスは自然界においてモノクローンで存在するわけではなく、通常は疑似種 (quasi-species) という遺伝的に多様性を持った集団として存在し、これが病態を形成する重要な要因となることもある。JCV は多くの健常人に不顕性感染しているが、これらの JCV 株と PML 検体から検出される JCV 株を比較すると、ゲノムの調節領域に再構成が認められることが知られている。しかし、実際の PML 脳組織由来の JCV に特異的なコーディング領域の変異や quasi-species の詳細な解析はこれまでにされていない。

次世代シーケンサーを使用しゲノムを解析すると、既存のシーケンサーでは解析できなかったマイナーな集団も発見することが可能となる。PML 脳組織由来の JCV ゲノムについて次世代シーケンサーを用いて解析することで、PML の病態解明への新たな知見が得られることが考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、実際の PML 症例の脳組織検体より DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて JCV ゲノムの変異について解析する。続いて、解析によって明らかとなった変異型 JCV を作製し、培養細胞を用いた *in vitro* の実験系で、変異株が病態にもたらす影響について、分子生物学的手法にて検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 国立感染症研究所感染病理部に解析依頼があり、病理組織学的検索で PML と確定された 6 症例の脳組織より DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて JCV ゲノムの変異を解析する。

(2) 次に、解析にて明らかとなった変異株のウイルスゲノムおよび変異型タンパク質発現ベクターを作成する。続いて、これらウイルスゲノムあるいはウイルスタンパク質発現ベクターを、ヒト神経芽細胞腫細胞株 IMR-32 およびヒト胎児腎細胞株 HEK293 にトランスフェクションさせ、*in vitro* の実験系において分子生物学的手法を用いて、ウイルスタンパク質の発現および培養上清中におけるウイルスコピー数を検索し、変異株がウイルス増殖に与える影響につき検討する。

また、野生株と変異株を種々の割合で混合して培養細胞にトランスフェクションさせる系も作製し、同様にウイルス増殖に与える影響につき検討する。

(3) さらに、検索した全 6 症例で、PML 脳組織病変部における T 抗原の発現を免疫組織化学にて検索する。

## 4. 研究成果

(1) 検索した PML 全 6 症例のいずれにおいても、JCV 早期タンパク質の T 抗原に共通した変異 (V392G) を有する株が、野生株に混在する quasi-species として 3-19% に認められた。この T 抗原 V392 は、ヒトに感染する他のポリオーマウイルスにおいても高率に保たれていた。

(2) 培養細胞を用いた *in vitro* の実験系において、JCV の野生株と比較し、変異株では早期タンパク質および後期タンパク質いずれも発現が強く抑制され、培養上清中のウイ

ルス増殖能も著しく低下した。変異型タンパク質発現ベクターを用いた実験系においても、野生型と比較してT抗原の発現は著しく低下した。

続いて野生株と変異株を種々の割合で混合させた実験系においては、50%まで変異株の割合を大きくしても、ウイルスタンパク質発現およびウイルス増殖能は保たれており、少なくとも変異株が50%まで混在しても全体のウイルス増殖には影響しないことが明らかとなった。

(3) 変異株が検出されたいずれの症例のPML脳病変部においても、免疫組織化学ではT抗原の発現が認められた。

これらの結果より、JCVは、ウイルス増殖に抑制的な作用を有する変異株と共存した状態で、PML病変部で増殖していることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Kenta Takahashi, Tsuyoshi Sekizuka, Hitomi Fukumoto, Kazuo Nakamichi, Tadaki Suzuki, Yuko Sato, Hideki Hasegawa, Makoto Kuroda, Harutaka Katano.

Deep-sequence identification and role in virus replication of a JC virus quasispecies in patients with progressive multifocal leukoencephalopathy.

Journal of Virology. 査読有, 2016 Dec 16;91(1). pii: e01335-16. Print 2017 Jan 1.

〔学会発表〕(計2件)

高橋 健太、関塚 剛史、福本 瞳、中道 一

生、鈴木 忠樹、佐藤 由子、長谷川 秀樹、黒田 誠、片野 晴隆

次世代シーケンサーが明らかにしたJCウイルスのゲノム変異とPMLの病態、第58回日本神経病理学会総会学術研究会、2017、6/1-3、東京、学術総合センター (一橋講堂)

Kenta Takahashi, Tsuyoshi Sekizuka, Hitomi Fukumoto, Kazuo Nakamichi, Tadaki Suzuki, Yuko Sato, Hideki Hasegawa, Makoto Kuroda, Harutaka Katano.

Deep-sequence identification and role in virus replication of a JCV quasispecies in PML patients.

第106回日本病理学会総会、2017、4/27-29、東京、京王プラザホテル

〔図書〕(計0件)  
該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称: 該当なし  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称: 該当なし  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
該当なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 健太 (TAKAHASHI, Kenta)

国立感染症研究所・感染病理部・研究官  
研究者番号：80711689