

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500421

研究課題名(和文) JCウイルス感染が誘導するPML-NBsの変化と、細胞腫瘍化の解明

研究課題名(英文) Dynamics of PML-NBs and potential oncogenicity in JC virus-infected cells

研究代表者

原 由紀子 (Shishido-Hara, Yukiko)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：40313267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：進行性多巣性白質脳症は、JCウイルス感染による脱髄脳症である。乏突起膠細胞の腫大核には、核全体を占めるウイルス封入体(full inclusion)が認められる。さらに我々は、JCウイルスがPML-NBsに集積してドット状の封入体(dot-shaped inclusions)も形成することも報告している。本研究で、感染細胞の核はSからG2期様への細胞周期移行に伴い腫大し、PML-NBsも腫大化することを明らかにした。JCウイルスは、腫大化するPML-NBsを足場に複製し、その後核全体を占める封入体を形成する。PML-NBsの機能破綻が、乏突起膠細胞の細胞変性を誘導する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Progressive multifocal leukoencephalopathy is a fatal demyelinating disorder caused by JC virus infection. Histopathologically, infected oligodendroglia-like cells display two distinctive inclusion patterns: full inclusions in which progeny virions occupy throughout the enlarged nucleus and dot-shaped inclusions in which virions are clustered at subnuclear domains called promyelocytic leukemia nuclear bodies (PML-NBs). In this study, we clarified that nuclei of infected oligodendrocytes enlarge with cell cycle transition from S to G2-like state. PML-NBs also enlarge during this process, and the virus re-produce progenies. Eventually, PML-NBs are dispersed by propagating viruses. Therefore PML-NBs serve a scaffolding role for viral progeny production however it remains unclear why the virus-infected oligodendrocytes undergo cell death but not mitosis, after cell cycle transition from S to G2.

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ウイルス 細胞周期 PML-NBs DNA複製 細胞変性 細胞腫瘍化

1. 研究開始当初の背景

進行性多巣性白質脳症は、JC ウイルス感染による脱髄疾患である。JC ウイルスは人口の約 70% に持続・潜伏感染し、免疫能の低下した宿主において再活性化して、重篤な脱髄脳症を発症させる。かつて、JC ウイルスは腎に潜伏し、調節領域の遺伝子変異により転写活性が上昇した変異ウイルスのみが脳に移行して脱髄脳症を発症させると考えられていた。しかし、骨髄、扁桃の他、正常脳組織からも遺伝子変異をきたした JC ウイルスが検出され、現在では正常脳組織にも JC ウイルスが持続・潜伏感染しているとも考えられている。

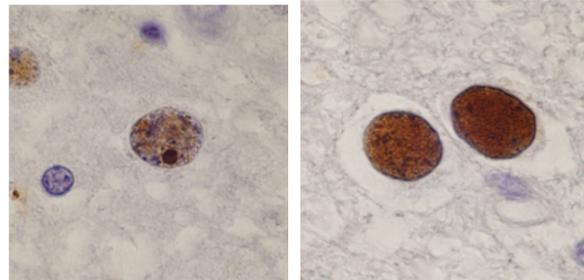
病理組織学的に、本疾患では乏突起膠細胞の腫大核にウイルス封入体が形成され、その検出が病理診断の指標となる。しかし、JC ウイルスがどの様なメカニズムで、乏突起膠細胞の核内に封入体を形成し、感染細胞の変性と脱髄を誘導するのかは明らかでない。また、JC ウイルスを実験動物に接種すると、脳腫瘍の発生が誘導された。ヒト脳腫瘍組織からも、JC ウイルスは頻りに検出されているが、JC ウイルスのヒトに対する腫瘍原性の有無も結論に至っていない。

2. 研究の目的

JC ウイルスの核内封入体は、典型的には、乏突起膠細胞の腫大核全体を占める構造物として知られていた(full inclusion) (図 1 右)。近年我々は、JC ウイルスが乏突起膠細胞のドット状の核内ドメイン、promyeocytic leukemia nuclear bodies (PML-NBs) を標的に感染することを明らかにし、感染初期にはドット状の封入体を形成することを見出した(dot-shaped inclusions) (図 1 左)。PML-NBs は、真核細胞に広く認められる核内構造で、DNA 複製や転写、細胞周期制御や腫瘍抑制、クロマチン制御など様々な核機能に関与することが知られている。JC ウイルスは PML-NBs を足場に子ウイルスを産生して、まずドット状の封入体を形成し、その後、細胞核全体へウイルスが分布することにより full inclusion を形成すると考えられる。

PML-NBs は、細胞変性・細胞腫瘍化の双方に関与する核内構造であるが、JC ウイルスに感染した宿主細胞がどの様なメカニズムで細胞変性・腫瘍化の運命をたどるのかは明らかになっていない。また、どのようなメカニズムで核内ウイルス封入体が形成されるの

かも不明である。そこで、本研究では、JC ウイルス封入体の形成過程を詳細に解析し、PML-NBs の形態変化や機能変化から細胞死、のメカニズムを解明する糸口を得ることを目的とした。



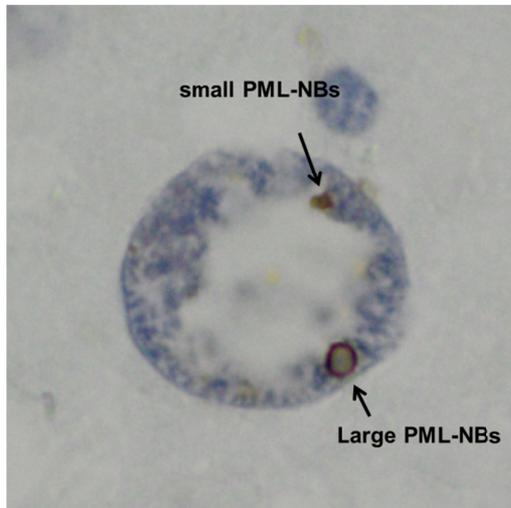
(図1)JCウイルス染細胞に見られるドット状封入体(dot-shaped inclusion: 左)と、核全体を占める封入体(full inclusion: 右)。

3. 研究の方法

ウイルス感染細胞では、細胞周期が活性化している。そこで、核内ウイルス封入体形成過程における細胞周期関連蛋白の発現と、PML-NBs の形態変化を、乏突起膠細胞の腫大化核の核面積と関連して解析した。病理解剖で得られた進行性多巣性白質脳症の脳組織片は、通常の方法で組織切片を作成した。細胞周期関連蛋白として、S 期のマーカーである PCNA, S ~ G2 期マーカーである cyclin A の発現を検討した。また、画像解析ソフトを用いて、陽性細胞の核面積と、PML-NBs を有する細胞の核面積を測定した。さらに、JC ウイルスカプシド蛋白と PML-NBs の主要構成成分である PML 蛋白の蛍光二重染色を行い、共焦点顕微鏡や超解像顕微鏡(Nicon N-SIM, Leica GSD)で解析した。電子顕微鏡による解析も行った。

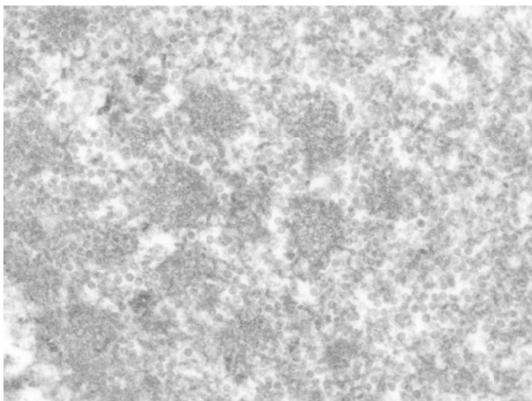
4. 研究成果

進行性多巣性白質脳症の脳組織では、乏突起膠細胞の核は脱髄・変性の進行に伴い腫大する。PCNA, cyclin A 陽性細胞の核面積を測定すると、これら細胞周期関連蛋白の発現は核面積に応じて変化していることが明らかになった。分裂細胞の S 期に高発現する PCNA は、JC ウイルス感染細胞の比較的小型核(核面積 約 30 sq. mm) に陽性となり、S 期 ~ G2 期に発現が増加する cyclin A は大型核(核面積 約 70 sq. mm) に陽性となった。JC ウイルス VP1 蛋白陽性細胞は、PCNA・cyclin A と一致した二峰性の核面積ピークを示した。



(図2) 進行性多巣性白質脳症の乏突起膠細胞の腫大核に認められたPML-NBs (PML蛋白に対する免疫染色)。Shishido-Hara et al, JNEN 73(5) 442-453, 2014より引用。

また、PMLNBsは、小型核(核面積約30 sq mm)では直径約0.2 mmの顆粒状で、大型核(核面積約70 sq mm)では直径約1.0 mm以上の二次元でリング状、三次元で球状の構造を示していることも明らかになった(図2)。超解像顕微鏡(N-SIM, GSD)で観察すると、JCウイルスカプシド蛋白は、大型PML-NBsの外側に集積しており、電子顕微鏡でも、これに相当するJCウイルス粒子のリング状配列が確認された(図3)。



(図3) 電子顕微鏡で確認されたJCウイルスの集簇。PML-NBsで複製した子ウイルスが集積している。Shishido-Hara et al, JNEN 73(5) 442-453, 2014より引用。

これらの結果より、以下のことが明らかになった。進行性多巣性白質脳症の乏突起膠細胞では、JCウイルス感染を契機にまず細胞周期が活性化する。S期からG2期様に細胞周期が移行する過程で、細胞核は腫大化し、

PML-NBsも発達する。ウイルス蛋白はこの過程でPML-NBsに集積し子ウイルスを産生すると考えられた。培養細胞を用いた実験系では、JCウイルスは*pml*遺伝子を欠失した細胞でも複製することが報告されている。即ち、PML-NBsはJCウイルス複製に必須ではない。むしろ、ウイルス感染によるPML-NBsの崩壊、機能破綻から細胞周期の制御が乱れ、細胞変性が導かれると推測された。しかし、JCウイルス感染細胞において、何故、SからG2へ細胞周期の移行後、分裂期に入らず、細胞変性が導かれるのか、今後の課題と考えられた。

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10件)

Ishii J, Sato H, *Yazawa T, Shishido-Hara Y, Hiramatsu C, Nakatani Y, Kamma H. Class III/IV POU transcription factors expressed in small cell lung cancer cells are involved in proneural/ neuroendocrine differentiation. *Pathol Int.* 査読有 64(9), 2014, 415-22.

DOI:

Endo T, *Yazawa T, Shishido-Hara Y, Fujiwara M, Shimoyamada H, Ishii J, Sato H, Tachibana K, Takei H, Kondo H, Goya T, Endo S, Kamma H. Expression of developing neural transcription factors in lung carcinoid tumors. *Pathol Int.* 査読有; 64(8), 2014, 365-74.

DOI:

Shishido-Hara Y, Yazawa T, Nagane M, Higuchi K, Abe-Suzuki S, Kurata M, Kitagawa M, Kamma H, Uchiyama T. JC virus inclusions in progressive multifocal leukoencephalopathy: scaffolding promyelocytic leukemia nuclear bodies grow with cell cycle transition through an S-to-G2-like state in enlarging oligodendrocyte nuclei. *J Neuropathol Exp Neurol.* 査読有, 73(5), 2014, 442-453.

DOI:

穴戸原 由紀子 進行性多巣性白質脳症-JCウイルス封入体を有する乏突起膠細胞腫大核の特徴-、*Clinical Neuroscience 月刊臨床神経科学*, 査読無, 32(12), 2014, 1332-1333.

菅岡 博, 住石 歩, 千葉 知宏, 穴戸原 由紀子, 甲状腺腫瘍の遺伝子診断と細胞診、*日本内分泌・甲状腺外科学会雑誌*, 査読有, 31(2), 2014, 125-129.

穴戸原 由紀子 *New York Academy of Science -Progressive Multifocal*

Leukoencephalopathy に参加して、病理と臨床、査読無、32(2)、2014、209.

Tazaki E, **Shishido-Hara Y**, Mizutani N, Nomura S, Isaka H, Ito H, Imi K, Imoto S, **Kamma H**. Histopathological and clonal study of combined lobular and ductal carcinoma of the breast. Pathol Int. 査読有 63(6), 2013, 297-304

DOI:

Ishii J, Sato H, Sakaeda M, **Shishido-Hara Y**, Hiramatsu C, **Kamma H**, Shimoyamada H, Fujiwara M, Endo T, Aoki I, ***Yazawa T**. POU domain transcription factor BRN2 is crucial for expression of ASCL1, NDI and neuroendocrine marker molecules and cell growth in small cell lung cancer. Pathol Int. 査読有 63(3), 2013, 158-168.

DOI:

Sakaeda M, Sato H, Ishii J, Miyata C, **Kamma H**, **Shishido-Hara Y**, Shimoyamada H, Fujiwara M, Endo T, Tanaka R, Kondo H, Goya T, Aoki I, **Yazawa T**. Neural lineage-specific homeoprotein BRN2 is directly involved in TTF1 expression in small-cell lung cancer. Lab Invest. 査読有 93(4), 2013, 408-421.

DOI:

Kashiwagi K, Ishii J, Sakaeda M, Arimasu Y, Shimoyamada H, Sato H, Miyata C, **Kamma H**, Aoki I, ***Yazawa T**. Differences of molecular expression mechanisms among neural cell adhesion molecule 1, synaptophysin, and chromogranin A in lung cancer cells. Pathol Int 査読有 62, 2012, 232-45.

DOI:

Shishido-Hara Y, Ichinose S, Uchihara T. JC virus intranuclear inclusions associated with PML-NBs: analysis by electron microscopy and structured illumination microscopy. Am J Pathol. 査読有 180(3), 2012, 1095-1106.

DOI:

[学会発表](計 14 件)

石井順、**矢澤卓也**、佐藤華子、**穴戸-原由紀子**、平松千恵、下山田博明、藤原正親、**菅間博**、肺野神経内分泌系悪性腫瘍と / 型 POU 遺伝子、第 103 回日本病理学会総会 平成 26 年 4 月 24 日 -26 日、広島

阿部泰明、小林啓一、**原由紀子**、千葉知宏、横谷重臣、野口明男、**菅間博**、塩川芳明、永根基雄、退形成性上衣腫に膠芽腫成分を伴った頭頂葉悪性神経膠腫の一例、第 32 回日本脳腫瘍病理学

会 平成 26 年 5 月 23 日・24 日、徳島 **穴戸-原由紀子**、進行性多巣性白質脳症 Progressive Multifocal Leukoencephalopathy 第 55 回日本神経病理学会総会学術研究会 2014 年 6 月 5 日-7 日、東京

穴戸-原由紀子、河合拓也、畑中良、土屋一洋、塩川芳昭、永根基雄、**菅間博**、A case of choroid plexus arteriovenous malformation accompanying with choroid plexus microcysts in a newborn infant、第 55 回日本神経病理学会総会学術研究会、2014 年 6 月 5 日-7 日、東京

穴戸-原由紀子、**矢澤卓也**、**菅間博**、内原俊記、進行性多巣性白質脳症：JC ウイルス感染による乏突起膠細胞変性のメカニズム、第 19 回日本神経感染症学会総会学術集会、平成 26 年 9 月 4 日-6 日、金沢

Shishido-Hara Y, Uchihara T, Yazawa T, Kamma T, JC virus intranuclear inclusions associated with promyelocytic leukemia nuclear bodies, The New York Academy of Science、平成 25 年(2013 年)6 月 19 日-20 日、New York

穴戸-原由紀子、基礎と臨床の架け橋となる病理学を目指して、第 102 回日本病理学会総会、平成 25(2013)年 6 月 26 日-28 日、札幌

頼元 雅慧、此田 奈央、**穴戸-原由紀子**、永根 基雄、**矢澤卓也**、**菅間博**、JC ウイルスはヒト脳腫瘍を発生させるのか？ 脳腫瘍組織におけるウイルス再活性化の可能性、第 102 回日本病理学会総会、平成 25(2013)年 6 月 26 日-28 日、札幌

穴戸-原由紀子、**矢澤卓也**、**菅間博**、内原俊記、進行性多巣性白質脳症：グリア細胞の腫大核における細胞周期関連蛋白の発現と PML-NBs の形態変化、第 54 回日本神経病理学会 平成 25 年(2013 年)4 月 24 日-26 日、東京

穴戸-原由紀子、内原俊記、**矢澤卓也**、**菅間博**、JC ウイルスは、グリア細胞核内の PML-NBs で粒子形成する。超解像顕微鏡と電子顕微鏡による観察、第 30 回染色体ワークショップ・第 11 回核ダイナミクス研究会合同会議、平成 24 年(2012 年)12 月 19 日-21 日、淡路島 **穴戸-原由紀子**、進行性多巣性白質脳症の核内ウイルス封入体-JC ウイルス感染の標的 PML-NBs の病理学的な意義-第 58 回日本病理学会秋期特別総会 A 演説(学術研究賞受賞講演)、平成 24 年(2012 年)11 月 23 日 名古屋

矢澤卓也、菅間博、内原俊記、進行性多巣性白質脳症の核内ウイルス封入体：PML-NBs でのウイルス複製と agnogene の機能、第 53 回日本神経病理学会総会 学術研究会、平成 24 年 6 月 28 日-30 日 新潟

矢澤卓也、菅間博、内原俊記、進行性多巣性白質脳症の JC ウイルス封入体：免疫電子顕微鏡法と超解像顕微鏡法による解析、第 101 回日本病理学会総会 平成 24 年 4 月 26 日-28 日、東京 山岸夢希、山口夏希、藤田雄吾、藤井肇、矢澤卓也、菅間博**、井野辺恵、小林啓一、土屋一洋、永根基雄、塩川芳昭、藤岡保範、**菅間博**、大脳膠腫症を伴う悪性神経膠腫から発生した多発性膠肉腫の一剖検例、第 101 回日本病理学会総会 平成 24 年 4 月 26-28 日 東京**

〔図書〕(計 1 件)

Shishido-Hara Y., Oxford: Academic Press.
Progressive Multifocal Leukoencephalopathy
In: Aminoff M.J. and Daroff R.B. (eds.)
Encyclopedia of the Neurological Sciences,
2nd edition, vol. 3, 2014, 982-986. 2014

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕なし

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 由紀子 (HARA, Yukiko)

杏林大学・講師

研究者番号：40313267

(2) 研究分担者

菅間 博 (Kamma, Hiroshi)

杏林大学・教授

研究者番号：10195191

矢澤 拓也 (YAZAWA, Takuya)

千葉大学・医学(系)研究科・准教授

研究者番号：50251054