

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K15174

研究課題名(和文) JCウイルスマイクロRNAに着眼した新しい感染症の病理診断とPMLの治療法開発

研究課題名(英文) Pathological diagnosis targeting JC polyomavirus-encoded microRNAs in progressive multifocal leukoencephalopathy tissues and its repressive role in virus replication

研究代表者

高橋 健太 (Takahashi, Kenta)

国立感染症研究所・感染病理部・主任研究官

研究者番号：80711689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：進行性多巣性白質脳症はJCウイルスにより、主に免疫抑制状態の患者で発症する脱髄疾患である。マイクロRNAはゲノムにコードされる20塩基ほどの短いRNAで、他の遺伝子の発現を調節する。本研究ではウイルス由来マイクロRNAを検出するin situ hybridizationの技術を確立し、進行性多巣性白質脳症の組織標本上でウイルス由来マイクロRNAが感染細胞の核に発現することを世界で初めて示した。培養細胞を用いた実験系では、ウイルス由来マイクロRNAがウイルス自身の増殖を抑制することを明らかにした。ウイルス由来マイクロRNAを標的とした、感染症の新しい病理診断や新規治療法の開発が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではウイルス由来のマイクロRNAに着眼し、JCウイルス感染症である進行性多巣性白質脳症の実際の病理組織標本上で、ウイルス由来マイクロRNAの感染細胞における局在を世界で初めて明瞭に示した。また培養細胞を用いた実験系では、ウイルス由来マイクロRNAがウイルス自身の増殖に抑制的に作用していることを明らかにした。

ウイルス由来マイクロRNAを標的とした、感染症の新しい病理組織診断法や新規治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)： JC polyomavirus (JCV) is a causative agent of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). MicroRNAs (miRNAs) are short fragments of RNA with 20-22 mer length. Almost all animals encode miRNAs in their genomes and many DNA viruses also encode their own miRNAs. Viral miRNAs bind to host mRNAs and affect their translation.

In this study, high expression and nuclear localization of polyomavirus-encoded miRNAs were demonstrated in tissues from PML cases by in situ hybridization. The sensitivity of in situ hybridization for viral miRNA was comparable to that of immunohistochemistry. Therefore, in situ hybridization targeting viral miRNA may be a useful diagnostic tool for PML. Additionally, the deletion of viral miRNA coding region in JCV DNA resulted in high expression of viral proteins in JCV DNA-transfected cells, implying an autoregulation mechanism in virus replication as well as the possibility that viral miRNA may be a new therapeutic tool for PML.

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 マイクロRNA In situ hybridization

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で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やフィンゴリドなどの薬剤による発症も報告され、抗体医薬や免疫抑制剤などの薬剤使用時の副作用として PML への関心が急速に高まっているが、効果的な治療法は確立されていない。

マイクロ RNA (miRNA) は約 20 塩基よりなる小型の RNA で転写後修飾などの生物学的活性を有し、JCV では T 抗原 (TAg) 領域内にコードされている。

申請者は *in situ* hybridization (ISH) にて、PML 脳組織標本上で JCV がコードするマイクロ RNA (miRNA) が発現することを世界に先がけて発見したことから、本研究では JCV miRNA に着目し、以下の観点から感染症の新しい診断法の確立と PML の病態解明、治療法の開発を目指して研究を行った。

2. 研究の目的

本研究では JCV がコードする miRNA に着目し、(1) ウイルス miRNA を標的とした世界初の病理組織診断を開発するとともに、(2) JCV miRNA による JCV の病原性と PML 発症機序への影響、JCV miRNA を標的とした PML の新規治療法について検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) JCV miRNA を標的とした PML の新規病理組織診断の開発:

PML 脳組織検体中の JCV miRNA を標的として分子生物学的手法を用いて解析、定量的に評価し、PML の組織診断におけるウイルス由来 miRNA 検索の有用性について検討を行った。ISH による組織標本上の JCV miRNA 検索では、既存の免疫組織化学による組織標本におけるウイルスタンパク質の検出系と比較検討を行った。成熟 miRNA は約 20 塩基よりなり通常の定量的 RT-PCR では検出不可能であるが、JCV miRNA の定量においては stem-loop real time RT-PCR による検出系で検索を行った。

(2) JCV miRNA がウイルス増殖と PML の病態に与える影響の解析:

JCV 感受性ヒト神経芽細胞腫細胞株 IMR-32 を使用した実験を行った。JCV miRNA をコードする領域に変異を有する JCV ゲノムを作成、IMR-32 にゲノムトランスフェクションし、*in vitro* の実験系で分子生物学的手法により JCV miRNA がウイルス増殖と PML の病態発生機序に与える影響を解析した。作製した変異型を野生型と比較し、ウイルスタンパク質産生に与える影響を検討した。

4. 研究成果

(1) ウイルス由来の miRNA を検出する ISH の技術を確立し、病理学的に診断確定された PML の実際の病理組織標本上で、JCV に由来する miRNA がウイルス感染細胞の核に発現することを明瞭に示し、免疫組織化学との比較では同等の感度を有した。病理組織標本上でウイルス由来 miRNA の局在を明瞭に示した報告は世界初である。続いて JCV 由来 miRNA について、組織における発現を定量する stem-loop real time RT-PCR の検出系を用いて解析し、PML の脳組織では対照の脳組織と比較してウイルス由来 miRNA の発現量が有意に高く、ウイルス由来 miRNA の発現量の測定が診断に有用となることを明らかにした。また次世代シーケンサーによる解析を行ったところ、実際の PML 脳組織では JCV miRNA は未成熟な状態のものも多く含まれることが明らかとなった。

(2) 培養細胞を用いた実験系では、miRNA をコードする TAg の領域が変異した JCV を産生させる実験を行い、miRNA を欠損させた変異株ではウイルスタンパク質の発現が著明に増加することを明らかにした。これは JCV 由来の miRNA がウイルス自身のタンパク質の発現を抑制させる働きを持つことを示し、ウイルスは自らの miRNA を介して自身の増殖制御機構を有することが明らかになった。

本研究では、実際のウイルス感染症の病理組織標本上でウイルス由来 miRNA の局在を世界で初めて明瞭に示し、PML の組織検体からウイルス由来 miRNA を定量することも可能となった。小型の RNA である miRNA は通常の病理組織標本の作製過程におけるホルマリン固定の影響を受けにくいことが考えられることから、ウイルス由来 miRNA を標的とした検索は、既存の手法では解

析困難であった過去の組織検体に対してもウイルス感染症の病理学的解析法として有用であり、画期的な診断技術となる可能性がある。さらに、培養細胞を用いた実験系ではウイルス由来 miRNA がウイルス自身の増殖抑制機構を有することも明らかとなったことで、将来的にウイルス由来 miRNA を標的とした、ウイルス感染症における新規の治療法の開発が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kenta Takahashi, Yuko Sato, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda, Tadaki Suzuki, Hideki Hasegawa, Harutaka Katano	4. 巻 16
2. 論文標題 High expression of JC polyomavirus-encoded microRNAs in progressive multifocal leukoencephalopathy tissues and its repressive role in virus replication	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1008523
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.ppat.1008523	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kenta Takahashi, Yuko Sato, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda, Tadaki Suzuki, Hideki Hasegawa, Harutaka Katano
2. 発表標題 JC polyomavirus-encoded microRNAs in progressive multifocal leukoencephalopathy tissues
3. 学会等名 第62回 日本神経病理学会総会学術研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 健太, 佐藤 由子, 関塚 剛史, 黒田 誠, 鈴木 忠樹, 長谷川 秀樹, 片野 晴隆
2. 発表標題 進行性多巣性白質脳症組織におけるJCポリオマウイルスが産生するマイクロRNAの解析
3. 学会等名 第110回 日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 健太
2. 発表標題 中枢神経感染症の病理
3. 学会等名 第24回日本神経感染症学会総会・学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------