

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月21日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790446

研究課題名（和文） ヒト脳においてJCウイルスの増殖を促進する宿主遺伝子の同定とその応用

研究課題名（英文） Identification and application of human brain genes that facilitate JC virus replication.

研究代表者 中道 一生 (NAKAMICHI KAZUO)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任研究官

研究者番号：50348190

研究成果の概要（和文）：JCウイルス(JCV)はヒトにおいて致死的な脱髄疾患である進行性多巣性白質脳症(PML)を引き起こす。JCVに対する創薬等では培養細胞におけるJCVの増殖効率の低さが技術的な課題となっている。本研究では、ヒト脳のcDNAライブラリーを用いたスクリーニングによってJCVの増殖を促進する宿主遺伝子を同定し、人為的に高感受性細胞を樹立するために必要な実験系等を構築した。

研究成果の概要（英文）：JC virus is the causative agent of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML), a fatal demyelinating disease in humans. Replicative efficacy of JCV in cultured cells is limited, which hampers in vitro studies including drug discovery. In this study, experimental systems were developed for the identification of human brain genes that facilitates JCV replication and for the establishment of JCV-permissive cell lines.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	0	1,200,000
2011年度	900,000	0	900,000
2012年度	900,000	0	900,000
年度			
年度			
総計	3,000,000		3,000,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：ウイルス、脳、神経、脳神経疾患

## 1. 研究開始当初の背景

JCウイルス(JCV)はポリオーマウイルス科に属する環状二本鎖DNAウイルスである。JCVはほとんどの成人の腎やリンパ組織等において無症候性に持続感染しており、通常は病

原性を引き起こすことはない。しかし、エイズ等の免疫不全症、もしくは免疫抑制療法等を受けた患者ではJCVが脳(髄鞘を形成するオリゴデンドロサイト)において増殖し、致死性の脱髄疾患である進行性多巣性白質脳

症(PML)を引き起こすことがある。PMLに対する根本的な治療法は確立されておらず、治療薬候補物質の有効性も完全には証明されていない。加えて、JCVの宿主域はヒトに限定されており、実験動物モデルを用いた解析が困難である。そのため、JCVの感染メカニズム等に関する基礎的な研究、および抗ウイルス薬等の開発研究では、培養細胞を用いた解析が中心となっている。しかしながら、JCVはヒト胎児脳の初代培養細胞、もしくは限られた種類の株化細胞においてのみ低効率の増殖を示し、その増殖速度も極めて遅い。そのため、十分量のウイルスストックの調製および細胞レベルでの感染実験等における技術的な課題となっている。多数の細胞株を対象としたJCVの高許容性細胞の探索は国内外を問わず古くから行われてきたが、その特定には至っていない。PMLにおけるJCVの爆発的な増殖を考慮した場合、ヒトの脳内にはJCVの増殖に関与する宿主遺伝子が発現されているが株化細胞ではその遺伝子が発現していない、もしくは発現が抑制されている可能性がある。そこで、ヒトの脳においてJCVの増殖に関与する遺伝子を同定した後、株化細胞に人為的に導入し、JCVに対する高感受性細胞を作出することを着想した。

## 2. 研究の目的

JCVに対する高許容性細胞を作出するために、ヒト脳由来のcDNAライブラリーを用いたスクリーニング系を確立し、JCVの増殖を促進する宿主遺伝子を同定することを目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 参照用JCVおよびPML患者の臨床検体

JCVのゲノム定量のための標準DNAとして、JCRB遺伝子バンク(現:独立行政法人医薬基盤研究所)より分与を受けたプラスミドDNAを用いた。ウイルス定量系の確立のためのJCV粒子として、JCVを持続的に産生するIMR-32由来細胞(JCI細胞)の細胞抽出液を用いた。PML患者の脳脊髄液は、診断や治療を目的としたJCV検査を目的として所属機関に提出されたものであり、施設内の倫理委員会において研究における承認がなされている。

### (2) ダイレクト-リアルタイムPCRによるJCV-DNAの定量系

JCVを含有するサンプルに対して、グアニジンおよび塩基性ポリエチレングリコール溶液を添加した後、熱処理をすることで蛋白質の可溶化を行った。得られたサンプルをテ

ンプレートとして、JCVのT遺伝子を標的としたリアルタイムPCRを行い、サンプルからDNAを抽出することなく、JCV-DNAを定量するための条件を至適化した。

### (3) スクリーニングのためのヒト脳cDNAの調製

ヒト成人脳(大脳白質および小脳等)もしくはヒト胎児脳のcDNAを哺乳類細胞発現用カセットに挿入したプラスミドを調製した。これらのライブラリーを大腸菌に導入した後、約500枚のLBプレート上に分割して展開した。各プレートの大腸菌を37°Cにて一晚培養した後、プラスミドDNAを抽出することで、スクリーニングに必要なポピュレーションを得た。

### (4) PML患者の検体からのJCV-DNAの増幅および分子クローンの作出

PMLの診断を目的としたJCVのPCR検査において陽性を示した脳脊髄液のDNAサンプル(約40検体)を対象として、PCRによってJCV-DNAを増幅し、プラスミドベクターに接続した。これらのプラスミドを大腸菌に導入した後、コロニーを選別した。各々の大腸菌コロニーを培養した後、プラスミドDNAを抽出し、約200種類のJCV-DNAのクローンを得た。ユニバーサルプライマー等を用いたシーケンシングによって、プラスミドに挿入されたJCV-DNAの塩基配列を決定した。それぞれのJCV-DNAはゲノムの一部にPML特有の変異を有していたため、当該領域の塩基配列の変異パターンを、遺伝子解析ソフトウェアを用いたin silico解析によって特定した。

### (5) リアルタイムPCR法を用いたJCV粒子の定量系

培養細胞において明瞭なプラークを形成させることが困難なJCVの力価をリアルタイムPCRによって定量するためのアッセイ系を開発するため、JCVのウイルス粒子を含むサンプルに多量のJCV-DNAをスパイクした。このサンプルに対して遺伝子改変によって酵素活性を増強させたDNA分解酵素(DNase)を添加し、上記(2)の方法によってDNaseを不活化した後、DNA抽出を行わずにJCV-DNAを定量した。酵素濃度や反応時間等を至適化することで、ウイルス粒子外に存在しているJCV-DNAを完全消化し、ウイルス粒子内において保護されているJCV-DNAを定量するための条件を決定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 研究の主な成果と位置づけ

ウイルスの増殖に関与する宿主遺伝子のスクリーニングでは、それらをノックダウンする手法、もしくは非許容細胞に強制発現させる手法が考えられる。JCVの場合には、その増殖を高度に許容する細胞株が見つからないことから後者を選択し、ヒト脳に由来するcDNAライブラリーを用いたスクリーニングを考案した。PML患者からcDNAライブラリーを構築するための脳組織を採取することが困難であったため、PML以外の患者の脳に由来するcDNAライブラリー、および実際のスクリーニングに必要となるポピュレーションを調製した。これらの遺伝子は哺乳類細胞において発現させるためのカセットに接続されている。そのため、コンストラクトを細胞内に導入させた後、遺伝子を発現させることでJCVの増殖性を測定することが可能である。また、これらの材料は、JCVだけでなく様々な神経ウイルスを対象とした宿主遺伝子のスクリーニングにおいて有用である。

次に、宿主遺伝子とJCVの増殖機序を研究するにはJCVの実験室株だけでなく、実際のPML患者に由来するJCVが必要であると考えた。そのため、PML患者の脳脊髄液から約500種類のJCV-DNAクローンを作製した。塩基配列の決定および*in silico*による変異パターンの解析により、各検体において患者特有のゲノム変異が生じていることが分かった。また、病態が増悪する際には脳脊髄液中のJCV変異体のポピュレーションが変化すること、ならびに症状の進行が停止する際にはこのような変化が生じないことを明らかにした。これらの分子クローンはJCVの増殖に関与する宿主遺伝子のスクリーニングだけでなく、実験室株をモデルとして得られた知見を実際の臨床株で検証する上でも有用なツールとなる。

JCVは培養細胞での増殖能が低く、プラークアッセイによるウイルス力価の定量が困難である。また、ゲノムサイズが小さいために蛍光等のマーカー遺伝子を有する組み換えウイルスの作出が技術的に難しい。そのため、増殖機序の解析や抗ウイルス薬候補の探索では、免疫染色や赤血球凝集反応といった煩雑な手技が必要となる場合が多い。また、近年ではリアルタイムPCRを用いたJCVゲノムの定量が用いられているが、各サンプルからDNAを抽出する作業がハイスループット化の障壁となっている。そのため、本研究では、

薬剤によってサンプルを短時間で溶解し、DNAを抽出することなくリアルタイムPCRによってJCV-DNAを定量するためのアッセイ系を確立した。加えて、培養細胞を用いたJCVの感染実験では、接種用のウイルスストックを作製するだけでも長期の培養期間を要し、その過程でウイルスゲノムが大きく変化する。そのため、JCVのゲノムDNAを細胞に導入することで増殖性を解析するという手法がとられることが多い。しかし、この方法では、細胞内に導入したウイルスDNA、および産生されたウイルス粒子内のウイルスDNAとを明確に区別して定量することが難しい。本研究では、DNAをモノヌクレオチドまで分解する強力なDNaseを用いてサンプルを処理し、ウイルス粒子内のJCV-DNAのみを定量するための実験系を確立した。これら一連の定量系は、JCVの増殖に関与する宿主遺伝子のスクリーニングの他、ウイルスの増殖機序を解析するための幅広い研究において高い汎用性を有する。

##### (2) 今後の展望

現在、上記の研究ツールおよび各種の実験系を用いてJCVの増殖に関与するヒト脳cDNAの探索を行っている。この遺伝子を同定し株化細胞に恒常的に発現させることができれば、ウイルス増殖機序の解明および抗ウイルス薬候補物質の開発において大きく貢献することが期待できる。

#### 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3件)

著者名、論文標題、雑誌名(大学の研究紀要等を含む。)、査読の有無、巻、発行年(西暦)及びページを記入

- ① Nakamichi K, Kishida S, Tanaka K, Suganuma A, Sano Y, Sano H, Kanda T, Maeda N, Kira JI, Itoh A, Kato N, Tomimoto H, Kurane I, Lim CK, Mizusawa H, Saijo M. Sequential changes in the non-coding control region sequences of JC polyomaviruses from the cerebrospinal fluid of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. Archives of

Virology (査読有) 2013, 158:639-650.  
doi: 10.1007/s00705-012-1532-3.

- ② Nakamichi K, Mizusawa H, Yamada M, Kishida S, Miura Y, Shimokawa T, Takasaki T, Lim CK, Kurane I, Saijo M. Characteristics of progressive multifocal leukoencephalopathy clarified through internet-assisted laboratory surveillance in Japan. BMC Neurology (査読有) 2012, 12:121. doi: 10.1186/1471-2377-12-121

- ③ Nakamichi K, Kurane I, Saijo M. Evaluation of a quantitative real-time PCR assay for the detection of JC polyomavirus DNA in cerebrospinal fluid without nucleic acid extraction. Japanese Journal of Infectious Diseases (査読有) 2011, 64:211-216.

[学会発表] (計3件)

- ① 中道一生、林昌宏、西條政幸、進行性多巣性白質脳症患者の脳脊髄液中に検出されたJCポリオーマウイルスの経時的なゲノム変異パターンの解析、第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月15日、大阪国際会議場 (大阪府)
- ② 中道一生、林昌宏、倉根一郎、西條政幸、進行性多巣性白質脳症患者の脳脊髄液中に出現するJCポリオーマウイルスゲノムの転写調節領域における変異パターンの解析、第16回日本神経感染症学会学術集会、2011年11月4日、学術総合センター (東京都)
- ③ 中道一生、伊藤 (高山) 睦代、倉根一郎、西條政幸、進行性多巣性白質脳症が疑われた血液疾患患者の脳脊髄液におけるJCポリオーマウイルスゲノムDNAの検出、第58回日本ウイルス学会学術集会、平成22年11月8日、徳島県郷土文化会館 (徳島県)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中道 一生 (KAZUO NAKAMICHI)  
国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任  
研究官

研究者番号 : 50348190

### (2) 研究分担者

無 ( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

無 ( )