

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26461286

研究課題名（和文）メフロキン投与中の進行性多巣性白質脳症患者におけるJCウイルスの変異機序の解析

研究課題名（英文）Analysis of mutational mechanism of JC virus in patients with progressive multifocal leukoencephalopathy during mefloquine administration

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：進行性多巣性白質脳症(PML)はJCウイルス(JCV)に起因する致死的な脱髄疾患であり、患者の脳や脳脊髄液からは変異したJCVが検出される。また、PMLに対してメフロキンによる治療が検討されている。本研究では、PML患者の脳脊髄液におけるJCVの変異機序を網羅的に解析した。また、メフロキンの投与を受けたPML患者の脳脊髄液からJCVのDNAをクローニングし、ウイルス変異と病勢との関連性を調べた。

研究成果の概要（英文）：Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) is a fatal demyelinating disease caused by JC polyomavirus (JCV) infection. JCV isolates from PML patients have variable mutations in the viral genome. In this study, we have comprehensively analyzed the mutational patterns of JCV isolates obtained from the cerebrospinal fluid of PML patients. We have also examined the relationship between JCV mutation and disease progression.

研究分野：神経感染症学

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

(1) 進行性多巣性白質脳症 (Progressive Multifocal Leukoencephalopathy : PML) は JC ウイルス (JCV) に起因する致死的な脱髄疾患である。JCV は多くの健常人において無症候性に持続感染している。一方、エイズ等の免疫不全患者、もしくは免疫抑制療法を受けた患者等においては、希に JCV のゲノム DNA のプロモーター領域 (調節領域) 等に多様な変異が生じ、大脳白質等のオリゴデンドログリアにおいて JCV が活発に増殖することで、PML を引き起こす。

(2) PML に対する根本的な治療法は確立されていないため、その治療においては免疫抑制の解除に重点が置かれる。しかし、近年では、抗マラリア薬であるメフロキンが培養細胞レベルで JCV の増殖を抑制することが報告されている。また、日本を中心として PML 患者にメフロキンが投与され、病態の進行停止や症状の改善等が報告されている。一方、PML に対してメフロキンが無効であった症例も散見される。これらの相違を生み出す背景には、患者の個人差や基礎疾患の種類、PML の進行段階、ウイルス自体の特性等の因子が関係する可能性があるが、その特定には至っていない。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究は、「ウイルス学・疫学・統計学分野の学際的なアプローチによって、PML 患者の脳脊髄液における JCV の変異パターンを網羅的に解析し、治療効果との相関性を明らかにする」ことを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) PML 疑い患者の情報および脳脊髄液検体  
研究代表者は、日本国内で発生する PML のサーベイランスを目的として、平成 19 年度より医療機関における脳脊髄液中の JCV を標的とした PCR 検査を支援している。また、本検査を介して主治医より患者情報の提供を受け、PML 疑い患者のデータベースを構築し、臨床および疫学的な研究を実施している。本サーベイランスにおいて集積された患者情報および脳脊髄液検体を研究に用いた。また、これらのリソースの使用については、国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会において研究内容等の審査がなされ、その承認を受けた後で本研究を実施した。

(2) PML 患者の検体からの JCV クローンの作出  
代表研究者が構築した PML 疑い患者のデータベースの一部 (約 1,200 名分) を対象として、PML と診断された後にメフロキンが投与された患者群、および比較対照群のデータを抽出した。PML 患者 (約 50 名分) の脳脊髄液 DNA を鋳型として、JCV ゲノムの調節領域を PCR 法によって増幅した後、プラスミドにクローニ

ングした。プラスミドを有する大腸菌を対象として高解像度融解曲線分析法によるスクリーニングを実施し、JCV の変異パターンに基づいて JCV の DNA クローンを選別した。その後、ユニバーサルプライマーを用いて各クローンの塩基配列を決定した。

### (3) JCV の調節領域における変異配列の解析

本研究および先行研究において配列が決定されている JCV の調節領域を対象として、配列情報のアライメントによるデータのクリーナップを実施した。その後、ハイスペックコンピューターを用いて、JCV の調節領域上に存在する配列のパターンを解析するためのプロトコルを確立した。また、調節領域の配列パターンとメタデータ (患者の疾患、検体の種類等) を照合した。

### (4) PML 患者に由来する JCV の変異パターンおよび病勢との関連性の解析

PML の診断後にメフロキン等の治療によるフォローアップがなされた 33 症例の患者の脳脊髄液を対象として、上記 (2) の手法を用いて JCV-DNA のクローンライブラリーを作出した。また、上記 (3) の手法を用いて各クローンの変異パターンを解析した。さらに、各クローンが得られた PML 患者の臨床情報 (頭部 MRI 所見、神経学的所見、脳脊髄液 JCV のコピー数等) を後方視的に解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 研究の主な成果

本研究において、多数の PML 患者の脳脊髄液に由来する JCV-DNA クローンのライブラリーを構築した。また、得られたクローンの変異パターンをハイスペックコンピューターによって解析することで、変異の規則性を解析した。JCV の調節領域においては多様な変異が生じることが知られているが、変異が頻発する領域を推定することが可能となった。これらの結果は、JCV の病原性発現機序を解明する上で有用な知見となりうる。また、PML の診断後にメフロキン等の治療を受けた患者の情報を後方視的に解析したところ、病態の進行が進行した患者群、および病態が増悪し続けた患者群が認められた。各患者群の脳脊髄液からクローニングされた JCV の調節領域は多様な変異を有しており、現段階においては病態と関連した特徴的なパターンは認められていない。そのため、メフロキン投与後の PML 患者の予後については、調節領域の変異といったウイルス側の因子よりも、患者側の背景に依存する可能性が示唆された。

### (2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

PML は希な疾患であるため、患者におけるウイルスの性状および臨床経過との関連性を解析することは困難である場合が多い。本研究においては、10 年以上にわたる国内の

PML サーベイランスによって集積したリソース(患者情報および脳脊髄液検体)を用いて研究を推進した。また、現段階においてはメフロキン投与後の病態の推移に関わる JCV の変異は確認されていないことから、同製剤を用いた PML の治療法の検討においては、ウイルス側よりも患者側の因子を解析することの意義が示唆された。本研究において得られた研究成果は国内外の PML に関する医療において重要な基盤的知見となりうる。

### (3) 今後の展望など

PML は 100 万人あたり 0.1~1 人程度の頻度で発生する希な疾患であるが、近年では多発性硬化症に対する治療薬の投与中に PML を発症するケースが多々報告されており、PML のリスクの高まりが懸念されている。また、脳脊髄液中の JCV を標的とした PCR 検査は PML の診断において有用であるが、DNA 汚染等による偽陽性は患者の診断や治療、QOL に悪影響を及ぼす危険性がある。多数の JCV の臨床分離株を対象とした解析の結果、変異型 JCV の調節領域は PML 患者個人レベルで配列が異なることを明らかにした。本研究で確立された JCV の変異解析プロトコルは、PML 疑い患者が JCV 陽性を呈した際のウイルスのタイピングにおいて応用が可能であり、PML の診断の精度を高める上で有用なツールとなりうる。

### 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9件)

Yokokawa K, Hisahara S, Matsuura Y, Ikeda K, Tsuda E, Saitoh M, Nakamichi K, Saijo M, Kamihara Y, Sato T, Kawamata J, Shimohama S. Progressive multifocal leukoencephalopathy after autologous peripheral blood stem cell transplantation in a patient with multiple myeloma treated with combination therapy. *Journal of the Neurological Sciences* (査読有) 2016, 368:304-306. doi: 10.1016/j.jns.2016.07.045.

Aotsuka Y, Uzawa A, Nishimura K, Kojima K, Yamaguchi M, Makino T, Nakamichi K, Saijo M, Kuwabara S. Progressive multifocal leukoencephalopathy localized in the cerebellum and brainstem associated with idiopathic CD4(+) T lymphocytopenia. *Internal Medicine* (査読有) 2016,55:1645-1647. doi: 10.2169/internalmedicine.55.6649.

Nukuzuma S, Nakamichi K, Kameoka M, Sugiura S, Nukuzuma C, Tasaki T, Takegami T. Suppressing effect of topoisomerase inhibitors on JC polyomavirus propagation in human neuroblastoma cells. *Microbiology and Immunology* (査読有) 2016,60:253-260. doi: 10.1111/1348-0421.12372.

Yoshida T, Kawamoto M, Togo M, Kohara N, Ito T, Nakamichi K, Saijo M, Mizuno T. Progressive multifocal leukoencephalopathy developing after liver transplantation showing marked neurological symptom improvement and arrest of further deterioration of imaging findings: A case report. *Journal of the Neurological Sciences* (査読有) 2015,359:1-3. doi: 10.1016/j.jns.2015.10.028.

Nukuzuma S, Sugiura S, Nakamichi K, Kameoka M, Nukuzuma C, Tasaki T, Takegami T. Replication of IMR-32-adapted JC virus clones in human embryonic kidney cells. *Microbiology and Immunology* (査読有) 2015,59:238-242. doi: 10.1111/1348-0421.12243.

Sano Y, Nakano Y, Omoto M, Takao M, Ikeda E, Oga A, Nakamichi K, Saijo M, Maoka T, Sano H, Kawai M, Kanda T. Rituximab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy derived from non-Hodgkin lymphoma: neuropathological findings and results of mefloquine treatment. *Internal Medicine* (査読有) 2015,54:965-970. doi: 10.2169/internalmedicine.54.2308.

Nakamichi K, Tajima S, Lim CK, Saijo M. High-resolution melting analysis for mutation scanning in the non-coding control region of JC polyomavirus from patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Archives of Virology* (査読有) 2014,159:1687-1696. doi: 10.1007/s00705-014-1988-4.

Nakamichi K, Lim CK, Saijo M. Stability of JC virus DNA in cerebrospinal fluid specimens preserved with guanidine lysis buffer for quantitative PCR testing. *Japanese Journal of Infectious Diseases* (査読有) 2014,67:307-310.

Nukuzuma S, Nakamichi K, Kameoka M, Sugiura S, Nukuzuma C, Tasaki T, Takegami T. TNF- stimulates replication of JC virus efficiently in neuroblastoma cells. Journal of Medical Virology (査読有) 2014, 86:2026-2032. doi: 10.1002/jmv.23886.

[学会発表](計27件)

中道一生, 西條政幸. JCウイルス感染の実態と検出法. 第21回日本神経感染症学会総会・学術大会, 2016年10月21日, 金沢東急ホテル(石川県・金沢市)

三浦義治, 岸田修二, 中道一生, 西條政幸, 高橋健太, 鈴木忠樹, 三條伸夫, 阿江竜介, 澤洋文, 奴久妻聡一, 穴戸-原由紀子, 雪竹基弘, 浜口毅, 水澤英洋, 山田正仁. PMLの診断と治療. 第21回日本神経感染症学会総会・学術大会, 2016年10月21日, 金沢東急ホテル(石川県・金沢市)

伊崎祥子, 田中覚, 田島考士, 中道一生, 西條政幸, 高橋健太, 長谷川秀樹, 野村恭一. 特発性CD4+リンパ球減少症の関連が示唆され, メフロキンが有効であった小脳・脳幹型進行性多巣性白質脳症の1剖検例. 第21回日本神経感染症学会総会・学術大会, 2016年10月21日, 金沢東急ホテル(石川県・金沢市)

石井淳子, 川本未知, 藤原悟, 船津堯之, 今井幸弘, 奴久妻聡一, 高橋健太, 中道一生, 幸原伸夫. 全身性エリテマトーデス加療中に頭部MRIで散在性点状T2高信号病変を呈し進行が見られていない進行性多巣性白質脳症の一例. 第21回日本神経感染症学会総会・学術大会, 2016年10月22日, 金沢東急ホテル(石川県・金沢市)

福田晃史郎, 石橋賢士, 松村謙, 金政祐典, 中道一生, 西條政幸, 三浦義治. 血管免疫芽球性T細胞リンパ腫治療後に両側視力障害にて発症し, PET検査が有用であった進行性多巣性白質脳症の63歳男性例. 第21回日本神経感染症学会総会・学術大会, 2016年10月22日, 金沢東急ホテル(石川県・金沢市)

古川貴大, 松井尚子, 山崎博輝, 和泉唯信, 中道一生, 西條政幸, 梶龍兒. 非HIV関連進行性多巣性白質脳症の3例. 第21回日

本神経感染症学会総会・学術大会, 2016年10月22日, 金沢東急ホテル(石川県・金沢市)

三浦義治, 中道一生, 西條政幸, 岸田修二, 高橋健太, 鈴木忠樹, 三條伸夫, 阿江竜介, 澤洋文, 奴久妻聡一, 原由紀子, 雪竹基弘, 浜口毅, 水澤英洋, 山田正仁. 本邦発症進行性多巣性白質脳症患者に対する塩酸メフロキン治療の多数例における有効性の解析. 第21回日本神経感染症学会総会・学術大会, 2016年10月22日, 金沢東急ホテル(石川県・金沢市)

中道一生, 林昌宏, 西條政幸. 限外濾過デバイスを用いた脳脊髄液中JCウイルスの高感度PCR検査系の確立および臨床検査における有用性の評価. 第21回日本神経感染症学会総会・学術大会, 2016年10月22日, 金沢東急ホテル(石川県・金沢市)

中道一生, 林昌宏, 西條政幸. JCポリオーマウイルスの調節領域における転写因子結合配列のin silico解析. 第64回日本ウイルス学会学術集会, 2016年10月24日, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

奴久妻聡一, 中道一生, 亀岡正典, 杉浦重樹, 奴久妻智代子, 田崎隆史, 竹上勉. ヒト神経芽細胞腫でのトポイソメラーゼI阻害剤のJCポリオーマウイルス増殖抑制効果. 第64回日本ウイルス学会学術集会. 2016年10月24日, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

池田淳司, 松嶋聡, 小平農, 石井亘, 関島良樹, 高橋健太, 長谷川秀樹, 中道一生, 西條政幸, 池田修一. 髄液JCV-PCR陰性で脳生検で確定診断した進行性多巣性白質脳症2症例の検討. 第56回日本神経学会学術集会, 2015年5月22日, 新潟コンベンションセンター(新潟県・新潟市)

三浦義治, 岸田修二, 中道一生, 西條政幸, 三條伸夫, 雪竹基弘, 浜口毅, 水澤英洋, 山田正仁. 本邦発症の進行性多巣性白質脳症に関する疫学調査と塩酸メフロキンの効果に関する検討. 第56回日本神経学会学術集会, 2015年5月22日, 新潟コンベンションセンター(新潟県・新潟市)

池田淳司, 松嶋聡, 小平農, 石井亘, 関島良樹, 浅沼恵, 後藤哲哉, 高橋健太,

中道一生,池田 修一. 脳生検で診断し早期治療により良好な経過をとった全身性エリテマトーデス合併進行性多巣性白質脳症の一例. 第20回日本神経感染症学会総会・学術大会,2015年10月22日,ホテルメルパルク長野(長野県・長野市)

吉田誠克,川本未知,十河正弥,幸原伸夫,伊藤孝司,中道一生,西條政幸,水野敏樹. メフロキン投与により神経症状の改善と画像所見の進行停止がみられた,肝移植後発症の進行性多巣性白質脳症の1例. 第20回日本神経感染症学会総会・学術大会,2015年10月22日,ホテルメルパルク長野(長野県・長野市)

三浦義治,中道一生,岸田修二,西條政幸,高橋健太,鈴木忠樹,三條伸夫,阿江竜介,澤洋文,奴久妻聡一,原由紀子,雪竹基弘,濱口毅,水澤英洋,山田正仁. 本邦発症の進行性多巣性白質脳症サーベイランスの現状と課題 - 厚労科研PML研究班PMLサーベイランス報告 -. 第20回日本神経感染症学会総会・学術大会,2015年10月23日,ホテルメルパルク長野(長野県・長野市)

木下一美,中道一生,伊藤睦代,塩田愛恵,林昌宏,倉根一郎,西條政幸. LAMP法を用いたPML患者の脳脊髄液中のJCウイルス診断. 第20回日本神経感染症学会総会・学術大会,2015年10月23日,ホテルメルパルク長野(長野県・長野市)

中道一生,林昌宏,西條政幸. コンピューターシミュレーションによるJCウイルスゲノムの変異様式の解析. 第20回日本神経感染症学会総会・学術大会,2015年10月23日,ホテルメルパルク長野(長野県・長野市)

中道一生,林昌宏,西條政幸. JCウイルスゲノムの新しい検出-PMLへの臨床応用. 第55回日本神経学会学術大会,2014年5月21日,福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

三浦義治,岸田修二,中道一生,西條政幸,山田正仁,水澤英洋. 第55回日本神経学会学術大会,2014年5月23日,福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

小原啓弥,形岡博史,中道一生,西條政幸,上野聡. 免疫抑制剤の中止により良好な転帰をたどったHIV陰性腎移植後PMLの臨床学的検討. 第55回日本神経学会学術大

会,2014年5月23日,福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

⑳ 喜納里子,三條伸夫,能勢裕里江,石橋哲,小林大輔,宍戸-原由起子,長嶋和郎,中道一生,西條政幸,森尾友宏,前原健寿,江石義信,水澤英洋. 治療反応性進行性多巣性白質脳症(PML)の臨床的・病理学的特徴 - 新たな病型の提案 - 第55回日本神経学会学術大会,2014年5月23日,福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

㉑ 中道一生. PMLの非典型例と最近の動向. 第19回日本神経感染症学会総会学術集会,2014年9月4日,金沢歌劇座(石川県・金沢市)

㉒ 吉田健二,佐々木格,瀬川茉莉,村上丈伸,吉原章王,星明彦,杉浦嘉泰,宇川義一,守谷新,中村耕一郎,中道一生,西條政幸. Mirtazapineとmefloquine治療が有効であった全身性サルコイドーシスに発症した進行性多巣性白質脳症の1例. 第19回日本神経感染症学会総会学術集会,2014年9月4日,金沢歌劇座(石川県・金沢市)

㉓ 三浦義治,岸田修二,中道一生,西條政幸,雪竹基弘,水澤英洋,山田正仁. 近年の日本国内発症進行性多巣性白質脳症患者の特徴について. 第19回日本神経感染症学会総会学術集会,2014年9月5日,金沢歌劇座(石川県・金沢市)

㉔ 三條伸夫,喜納里子,能勢祐里江,石橋哲,宍戸-原由紀子,中道一生,西條政幸,前原健寿,江石義信,水澤英洋. メフロキン治療が有効な進行性多巣性白質脳症における脳の病理学的特徴. 第19回日本神経感染症学会総会学術集会,2014年9月5日,金沢歌劇座(石川県・金沢市)

㉕ 山本詞子,石井一弘,本間晋介,岡田克典,中道一生,西條政幸,玉岡晃. 肺移植術後に発症した進行性多巣性白質脳症の60歳女性例. 第19回日本神経感染症学会総会学術集会,2014年9月5日,金沢歌劇座(石川県・金沢市)

㉖ 奴久妻聡一,亀岡正典,中道一生,杉浦重樹,奴久妻智代子,田崎隆史,竹上勉. ヒト神経芽細胞腫でのTNF- $\alpha$ によるJCウイルスDNA複製の促進. 第62回日本ウイルス学会学術集会,2014年11月12日,パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

㉗ 中道一生,林昌宏,西條政幸. 日本における進行性多巣性白質脳症の実験室サーベイランスおよびその発生動向の解析. 第

62回日本ウイルス学会学術集会,2014年11月12日,パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

6. 研究組織

(1)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

(2)連携研究者

下川 敏雄 (SHIMOKAWA, Toshio)  
和歌山県立医科大学・臨床研究センター・准教授  
研究者番号 : 00402090