

学 位 論 文 題 名

ヒトポリオーマウイルス属 JC ウイルスの
細胞親和性に関する解析

学位論文内容の要旨

【目的】 ヒト大脳の脱髄疾患PML（進行性多巣性白質脳症）の原因であるヒトポリオーマウイルス属JCウイルス(JCV)は宿主域が狭く、生体内では中枢神経のオリゴデンドログリアにおいてのみウイルスが増殖できる。従来、JCVの増殖にはヒト胎児脳初代培養細胞しか用いられておらず、他にいくつかの許容細胞が報告されているが、いずれも継代維持に限界があることや、十分なウイルス量が得られないこと、ウイルス増殖の指標になるCPE(cytopathic effect)が出現しにくいことなどが原因で、このウイルスの増殖機構や細胞親和性因子の解明にとって大きな障害となっていた。最近、JCVのprototype Mad-1株がヒト神経芽腫細胞株であるIMR-32細胞に感受性があることが報告され、そしてIMR-32細胞への適応によるJCVの調節領域の変異も微細なことが示された。さらに我々はこの変異したJCVをIMR-32細胞に接種、長期間維持した結果、JCVを持続感染した状態で産生し続ける細胞株(JCI細胞)を樹立し、JCVの細胞感染性を解析する基礎を確立することができた。そこで本研究ではこの持続感染系を利用してJCVを精製し、このウイルスに対する許容細胞としてIMR-32細胞を選び、非許容細胞である他の培養細胞と比較検討することにより、JCVの細胞親和性に関する要因を明らかにしようと試みた。

【材料と方法】 1) ウイルスと細胞：JCI細胞を凍結融解後20% sucroseに重層し38,000 rpm, 1hr遠心しJCVウイルス液(JCI)とした。使用した細胞のうちヒト神経芽細胞腫由来IMR-32、ヒト類上皮細胞癌由来A431は10% FBS添加DMEMで継代維持し、SV40にて形質転換させたサル腎細胞COS-7は10% FBS添加MEMを使用した。

2) 赤血球凝集反応 (hemagglutination: HA)：96穴マイクロプレートに0.2% BSA加PBSを50 μ lずつ分注し、2倍段階希釈のウイルス液を混和させ、そこに0.5%ヒトO型赤血球を加え4 $^{\circ}$ Cで3時間反応させた。HA価は赤血球を完全に凝集させた最大希釈の逆数とした。

3) 吸着による感染：4 HA unitsのウイルスをIMR-32細胞、A431細胞、COS-7細胞に一晩吸着処理後、2%血清添加培地で維持し、ウイルス増殖の有無を3週間後のHA価で検討した。

4) マイクロインジェクション：8192HA unitsのウイルスを自動インジェクションシステ

ム(AIS:Zeiss)を用いて、注入圧80~100hpa、維持圧40~60hpa、注入時間0.2secの条件で細胞質へ注入し、間接蛍光抗体法により抗原を検出した。

5) トランスフェクション：pUC-19のEco RI siteにクローニングされたJC-IMR株を制限酵素で切断後電気泳動し、5.1kbのバンドを抽出し、ウイルスDNAとした。これを磷酸カルシウム法にて細胞内に導入し、間接蛍光抗体法にてウイルス抗原を検出した。

6) 蛍光抗体法：実験した細胞は4% paraformaldehydeで固定後0.2% Triton Xで3分間処理し、間接蛍光抗体法にて検索した。抗体にはSV40 large T 抗体とJCV Vp-1認識マウス血清とを使用した。

7) CAT assay：JC-IMR株の調節領域を含む353 bpのDNA断片(4981~279)をNco Iで切り出しKlenow酵素処理後pSV00CAT (Nippon Gene)に挿入しCAT 遺伝子構築(CAT gene)を得た。挿入された調節領域の方向によって初期と後期の転写活性をそれぞれ反映するJ001とJ002を得た。磷酸カルシウム法ではCAT gene 10μg、RSV-β gal 5μg、Carrier DNA 5μgを導入し、48時間後に細胞上清を回収しCAT assayを行なった。

[結果] 吸着によるウイルスの感染性を調べたところIMR-32細胞では3週間後頃より細胞の凝集と剥離が著明となりCPE様変化が出現した。このときHA>64unitsでウイルスの増殖が認められた。しかし、A431細胞とCOS-7細胞ではHAは測定限界以下でありウイルスは増殖しなかった。この結果よりIMR-32細胞が許容細胞でありA431細胞とCOS-7細胞とが非許容細胞であることが示された。

マイクロインジェクションによる実験の結果、A431細胞ではT抗原、V抗原ともに発現しなかった。IMR-32細胞では2日目後以降にウイルス粒子複製によると思われるV抗原が観察された。この細胞内でのJCVDNAの転写、複製を確認するために、更にJCVDNAのトランスフェクションを行ったところ、3日後に5~8%の細胞がTおよびV抗原陽性であった。この結果ウイルスDNAが細胞内で転写、複製されたことが確認された。非許容細胞であるCOS-7にマイクロインジェクションしたところ5日目にウイルス粒子複製によると思われるV抗原が陽性となった。

ウイルス親和性に関与する核内の要因を明らかにするために、JCVの調節領域の細胞内活性をCATアッセイによって測定した。その結果、IMR-32とCOS-7細胞においてのみ初期転写活性と後期転写活性の両方の活性上昇が認められた。A431細胞では全く活性がみられなかった。これらの結果は次の表のようにまとめられた。

	INF	MIC	CAT	TRANS
IMR - 32	+	+	+	+
COS - 7	-	+	+	*
A431	-	-	-	-

INF: Infection, MIC: Microinjection, CAT: CAT assay, Trans: Transfection
* not examined.

[考案] JCVは宿主域が非常に狭く、感受性細胞が限られている。宿主特異性を規定しているものにウイルス遺伝子、ウイルスと宿主細胞との複雑な相互作用が考えられている。ウイルス-宿主相関を規定する因子としてはウイルスレセプター、核内転写因子が挙げられるが、JCVでの詳細については不明である。今回のウイルスの感染実験ではIMR-32細胞では良好な増殖が認められたが、A431細胞やCOS-7細胞では感染は認められなかった。しかしマイクロインジェクションによる新たなウイルス粒子の増殖は、IMR-32細胞のみならずCOS-7細胞でも確認されたが、A431細胞ではウイルス粒子は増殖しなかった。この結果はJCVDNAのトランスフェクションによっても確かめられた。マイクロインジェクションにより細胞膜を通過させて注入したウイルス粒子がIMR-32細胞とCOS-7細胞において増殖可能であったことは、JCVの細胞親和性を決定する因子には種特異的な膜レセプターが関与することが示唆された。しかし膜を通過させたにもかかわらずA431細胞で増殖が見られなかったことは、核内因子により規定されていることが想定された。そこで核内転写因子の関与を調べるために行ったCAT assayでは、ウイルス増殖が認められたIMR-32細胞とCOS-7細胞においてのみJCVの調節領域が活性化されており、A431細胞では活性が見られず、核内因子がJCVの調節領域に結合し活性化された結果JCVがこれらの細胞内で増殖可能となったことを反映していると考えられた。

従来、IMR-32細胞以外の神経芽細胞腫由来の細胞においてJCVが増殖する可能性は以前から示唆されていたが、サル由来のCOS-7細胞に関する実験で細胞膜を通過したJCVが増殖可能であるという報告は初めてであり、JCVDNAのトランスフェクションや増殖したウイルス粒子の解析を含めて更に検討が必要であると思われた。しかし、今回の実験でJCVにレセプターが存在することが示され、さらに特異的核内転写因子を解析する基礎的成果が得られた訳で、今後これらの遺伝子をクローニングしていくことが重要と考えられた。

[結語] 新しく確立したJC virus 持続感染株化細胞より分離したJC virus (JCI)を用いてJC virusの細胞親和性に関する実験を行ない次の結果が得られた：

1. JCIを用いて感染実験を行なったところヒト神経芽細胞腫IMR-32にて増殖するが、ヒト類上皮癌細胞A431やSV40にて形質転換されたサル腎細胞COS-7では増殖しなかった。
2. JCIをマイクロインジェクション法にて細胞膜を越えて直接注入するとIMR-32細胞のみならずCOS-7細胞でもウイルス増殖が見られた。しかしA431細胞は陰性であった。
3. JC virus調節領域を組み込んだ構築遺伝子を用いてCAT assayを行なったところIMR-32細胞とCOS-7細胞では活性が見られたが、A431細胞では活性が見られなかった。

以上の結果より、JC virusの細胞親和性には細胞膜の種特異的レセプター分子と核内の組織特異的転写因子との両方が関与していることが明かとなった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 皆 川 知 紀

副 査 教 授 葛 巻 暹

学 位 論 文 題 名

ヒトポリオーマ属 JC ウイルス (JCV) の 細胞親和性に関する解析

要 約 ヒト大脳の脱髄疾患PML(進行性多巣性白質脳症)の原因であるJCVは宿主域が狭く、病変を起こすのは中枢神経のオリゴデンドログリアに感染した時に限られる。従来ウイルスの分離には胎児脳初代培養細胞のみが用いられてきたが、これはウイルスが十分に増殖可能な宿主が他になかったためである。最近我々はJCV Mad-1株をヒト神経芽細胞腫由来のIMR-32細胞に接種継代した結果、JCVを持続感染した状態で産生し続けるJCI細胞を樹立し、感染機構を解析することが可能となった。そこで、この系から精製したJCVを用いて許容細胞IMR-32と他の培養細胞とを比較することにより、JCVの感染を規定する因子に関する検討を行った。

材料と方法 ウイルスはJCI細胞より分離精製し、力価はHA(赤血球凝集反応)により測定した。細胞は、IMR-32の他にA431(human epidermoid carcinoma)、COS-7(SV40 large T transformed African green monkey kidney)を使用した。

1、感染：細胞 10^5 個あたり4HAのJCVを37度で1晩吸着させ3週間維持後、細胞上清のHAを測定し増殖の有無を判定した。

2、Microinjection：自動インジェクションシステム(Zeiss)を用いてガラス針を細胞質へ穿刺し、8192HAのウイルス液を一細胞あたり約0.5 μ l注入した。

3、Transfection：JCI細胞から抽出しクロニングしたJCVDNAを用いた。30mmシャーレで細胞が50%コンフルエントの時JCVDNA1 μ gをCarrier DNAとともにリソ酸カルシウム法により導入した。

4、蛍光抗体法：JCVのVp-1蛋白を認識するマウス血清とJCV large T と交差反応するSV40 large T に対するモノクローナル抗体を用いた。二次抗体にFITC標識抗マウスIgGを使用し間接法で観察した。

5、CAT assay：JCVの調節領域(353bp)をpSV00CATに挿入し、初期転写活性と後期転写活性をみる二種類の構築物を作製した。細胞約 10^5 個

あたり各構築物10 μ gをRSV- β galとともにリン酸カルシウム法により導入し48hr後に酵素活性を測定した。

結果 IMR-32はJCVに感染性を示し、MicroinjectionでもJCVの増殖が見られた。COS-7では感染性を示さなかった。しかし、Microinjectionにより細胞膜を越えてウイルス粒子を導入すれば、感染成立が可能なことが明らかとなり、細胞膜にウイルス感染に対するバリアーが存在することが示された。A431では感染でも接種でもウイルス増殖はみられず、CATassayの結果より核内因子の欠如が原因として考えられた。

考察と結論 IMR-32においてJCVが増殖可能なことが確認できたが、COS-7とA431では感染は成立しなかった。Microinjectionによって細胞膜を越えて注入するとCOS-7でも増殖したことより、JCVの細胞親和性には細胞膜の種特異的receptor分子が関与することが示唆された。しかしA431ではMicroinjectionによってもウイルス増殖が認められなかった。CATassayでは、IMR-32とCOS-7では活性がみられたがA431ではみられなかったことより、感染成立には核内因子が重要であることが示された。

口頭発表にあたり、葛巻教授より生体内におけるJCVの局在分布と、抗体の交差反応性について、皆川教授より感染実験におけるウイルス力価の条件について、西教授より核内転写因子について、細川教授、阿部教授よりMicroinjectionにおける粒子侵入についての質問がなされたが、申請者は概ね適切な回答をなした。また、副査の葛巻、皆川両教授には個別に審査を受け合格と判定された。

以上本研究は、新たに樹立したJCV持続感染系からJCV粒子を分離精製し、感染、Microinjection、Transfection、CATassayの手法を用いて、JCVの感染成立を規定する因子を検討したもので、JCVの細胞親和性の解明に寄与するものであり、よって博士（医学）の学位授与の十分値するものと判定された。