

学 位 論 文 題 名

JC ウイルスを産生する持続感染細胞系の樹立と解析

学位論文内容の要旨

I. 緒 言

ヒトの中枢神経の疾患である進行性多巣性白質脳症(PML)は、原因ウイルスであるJCウイルス(JCV)が髄鞘形成細胞であるオリゴデンドロサイトに特異的に感染し、破壊することで引き起こす脱髄性脳症である。JCVのウイルス学的研究にはウイルスをin vitroで増やす系が欠かせない。しかし、JCVが増殖可能な細胞は限られ、十分量のウイルスを短期間に得られる細胞株は見い出されていない。我々はこれらの問題を克服するために、JCVを産生する持続感染細胞系を樹立し、ウイルス遺伝学的解析を行った。

II. 材料と方法

1. 持続感染細胞(JCI細胞)の樹立と性状

IMR-32細胞(ヒト神経芽細胞腫由来)10⁷個あたり、4HA unitsのJCV(IMR-32細胞で3代継代)を感染させ、2%FBS含有DMEMで4日間培養後、1:4の継代比率にて10%FBS含有DMEMで盲継代した。なお、ウイルス産生は赤血球凝集反応(HA)で測定し、JCVの同定は抗JCVマウス血清を用いた免疫染色および透過型電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察により行った。また、ヒト血清中の抗JCV抗体価は樹立細胞系(JC+IMR:JCI細胞)産生JCVを用いて赤血球凝集抑制反応(HAI)で測定した。さらに、confluentのJCI細胞を血清濃度を2%におとした培地で維持することで多量のJCVの産生を行った。

2. JCI細胞由来JCV DNAのクローニングと解析

17代継代したJCI細胞からウイルスDNAを抽出し、*Eco*RIまたは*Bam*HIで消化後、pUC19に連結した。この連結反応液を用いて、high-voltage electroporationにて*Escherichia coli* DH5を形質転換した。これらのクローンからJCV DNAをもつクローンを[α -³²P] dCTPにてラベルしたJCV DNAをプローブとして、colony hybridizationにて選択した。制限酵素解析として、ウイルスDNA全長の解析は*Eco*RIまたは*Bam*HIで、調節領域の解析は*Bam*HIと*Sst*Iで消化した。消化したDNAは全長の解析には0.7%アガロースゲルで、調節領域の解析には5%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した。塩基配列は調節領域を含む断片を単離し、chain termination法にて決定した。

3. キメラJCV DNAのウイルス増殖誘導能

JCI由来の調節領域(Control region:CR)のウイルス増殖誘導能を調べるために、調節領域はJCIのCRで他の領域はMad-1に由来するキメラJCV DNA (Mad-1/CR-JCI)を作成した。トランスフェクションはIMR-32細胞 6×10^5 個にリン酸カルシウム法によりJCV DNA $1.5 \mu\text{g}$ をsalmon sperm DNA $2.5 \mu\text{g}$ とともに導入した。トランスフェクション後、confluentになった細胞を継代し、33日後の細胞を回収しウイルスの産生量をHA試験にて測定した。

III. 結果と考察

JCV Mad-1株をIMR-32細胞で3代継代して得たウイルスをIMR-32細胞に感染させ、confluentになった細胞を1:4の継代比率にて10%FBS含有DMEMで17代継代をすることによりJCV持続感染細胞(JCI細胞)を樹立した。JCI細胞は免疫染色により維持型持続感染であることが明らかになり、この細胞から産生されたJCVはHA反応を示し、JCVを用いてヒト血清抗体価をHAIで測定することが可能となった。

持続感染が維持される機構を解明するために、JCI細胞からJCV DNAをクローン化し解析した。クローン化したJCV DNAの全長はさまざまな分子の集団で多様に変化していた。それに対して、JCI由来の調節領域(CR-JCI)はMad-1およびIMR-32細胞で3代継代されたJCVから以前にクローン化されたJCV DNA(M1-IMRa,b,c)の3種と異なっていたが、今回調べたクローン間では一致していた。塩基配列より、CR-JCIはMad-1に存在する2つのTATA配列のうち複製開始点から遠い方のTATA配列が欠失しており、さらにM1-IMRaの199番目から226番目の28塩基対が欠失して生じたことが判明した。

ウイルス増殖誘導能を調べるために、リン酸カルシウム共沈法によりMad-1/CR-JCIを、対照としてM1-IMRaとM1-IMRbをIMR-32細胞にトランスフェクションし、ウイルスの産生量をHA試験にて測定したところ、Mad-1/CR-JCIはM1-IMRaやM1-IMRbに比べて低かった。Mad-1/CR-JCIをトランスフェクションした細胞からJCV DNAをクローニングし解析したところ、トランスフェクションに用いたDNAの構造に変化はなかった。これらのことから、JCI細胞の持続感染の維持の主な要因は調節領域の適度な機能低下であることが示唆された。さらに、JCI細胞を用いたウイルス産生は低血清下で細胞を培養することによって、多量のウイルスを比較的短期間に供給できることからJCVのウイルス学的解析を発展させるものと思われた。

IV. 結 語

ヒト神経芽細胞腫由来であるIMR-32細胞に同細胞で3代継代したJCV Mad-1株を感染させ17代継代したところ、多量のウイルスを比較的短期間に産生するJCV持続感染細胞(JCI細胞)が樹立できた。この細胞から産生されたJCVはHA反応を示し、このウイルスを用いてヒト血清抗体価をHAIで測定することが可能となった。JCI細胞は免疫染色により維持型持続感染であ

った。JCI細胞から回収したJCV DNAは全長がさまざまな分子の集団であったが、調節領域の構造は一定(CR-JCI)であり、塩基配列よりCR-JCIはM1-IMRaの199番目から226番目の28bpが欠失して生じたことが示唆された。Mad-1/CR-JCIはM1-IMRaやM1-IMRbに比べて、IMR-32細胞でのウイルスの産生量が低かったので調節領域の構造が持続感染系の維持には重要であることが明らかになった。このJCI細胞は多量のウイルスを短期間に供給できることからJCVのウイルス学的解析をさらに発展させるものと思われた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 細 川 眞澄男

副 査 教 授 皆 川 知 紀

学 位 論 文 題 名

JC ウイルスを産生する持続感染細胞系の樹立と解析

目的：ヒトの中枢神経の脱髄疾患である進行性多巣性白質脳症(PML)は、原因ウイルスであるJCウイルス(JCV)が髄鞘形成細胞であるオリゴデンドロサイトに特異的に感染し、破壊することで脱髄を引き起こす。JCVのウイルス学的研究にはウイルスをin vitroで増殖させる系が必要であるが、JCVは宿主域が狭いため、十分量のウイルスを短期間に得られる細胞株は見い出されていない。我々はこれらの問題を克服するために、JCVを産生する持続感染細胞系を樹立し、その系の生物学的特性を明らかにするとともに、持続感染系が維持される機構についてウイルス遺伝学的解析を行った。

材料と方法：ヒト神経芽細胞腫由来であるIMR-32細胞に同細胞で3代継代したJCVを感染させ、10%FBS含有DMEMで盲継代した。ウイルスの産生は赤血球凝集反応(HA)で測定し、JCVの同定は抗JCVマウス血清を用いた免疫染色および透過型電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察により行った。また、ヒト血清中の抗JCV抗体価は樹立細胞系(JCI細胞)産生JCVを用いて赤血球凝集抑制反応(HAI)で測定した。さらに、confluentになったJCI細胞を血清濃度を2%に低くした培地で維持することで多量のJCVの産生を行った。

17代継代したJCI細胞からウイルスDNAを抽出し、*Eco*RIまたは*Bam*HIで消化後、pUC19にて多数クローニングし、colony hybridizationにて選択した。制限酵素を用いて、JCI細胞由来のクローンの全長と調節領域を含む断片の泳動パターンを解析した。塩基配列は調節領域を含む断片を単離し、chain termination法にて決定した。

JCI細胞由来の調節領域(Control region:CR)のウイルス増殖誘導能を調べるために、調節領域はJCIのCRから成り、他の領域はプロトタイプMad-1に由来するキメラ JCV DNA(Mad-1/CR-JCI)を作成した。トランスフェクションはリン酸カルシウム共沈法により、Mad-1/CR-JCIをIMR-32細胞に導入し、その対照として持続前のウイルス株であるM1-IMRaとM1-IMRbを導入した。トランスフェクション後、confluentになった細胞を継代し、33日後の細

胞を回収しウイルスの産生量をHA試験にて測定した。

結果と考察：IMR-32細胞に同細胞で3代継代したJCV Mad-1株を感染させ17代継代したところ、多量のウイルスを比較的短期間に産生するJCV持続感染細胞(JCI細胞)が樹立できた。この細胞から産生されたJCVはHA反応を示し、このウイルスを用いてヒト血清抗体価をHAIで測定することが可能となった。JCI細胞は免疫染色により維持型持続感染の様式を示した。JCI細胞からクローニングしたJCV DNAは全長がさまざまな分子の集団で多様に変化していたが、調節領域の構造はクローン間で均一(CR-JCI)であり、持続化以前のウイルス株由来のクローン(M1-IMRa,b,c)のいずれとも異なっていた。塩基配列より、CR-JCIはMad-1に存在する2番目のTATA配列が欠失しており、さらにM1-IMRaの199番目から226番目の28塩基対が欠失して生じたことが明らかになった。ウイルス増殖誘導能はMad-1/CR-JCIがM1-IMRaやM1-IMRbに比べて低かった。Mad-1/CR-JCIをトランスフェクションした細胞からJCV DNAをクローニングし制限酵素解析したところ、トランスフェクションに用いたDNAの構造を維持しており、同DNAの調節領域の塩基配列の構造も変化していなかった。これらのことから、JCI細胞の持続感染の維持に関する主な要因は調節領域の適度な機能低下であることが示唆された。さらに、JCI細胞を用いたウイルス産生は低血清下で細胞を培養することによって、多量のウイルスを比較的短期間に得ることができることからJCVのウイルス増殖機構の解析およびELISAの系の確立に有用であると考えられた。

口頭発表にあたり、細川教授よりJCVの非感染IMR-32細胞への感受性について、皆川教授より持続感染系の特性、調節領域の再編成およびウイルスの定量方法について、柿沼教授より調節領域とウイルスDNA複製との関係について、阿部教授より免疫染色での感染細胞の核の腫大について等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、副査の細川、皆川両教授には個別の審査を受け合格と判定された。

以上、本研究は培養細胞で増殖させることが困難であったJCVを多量にしかも短期間に供給できる持続感染細胞を樹立し、さらに、調節領域の構造が持続感染の維持に重要であることを明らかにしたことでJCVの病態機構の解明に寄与するものであり、よって博士(医学)の学位授与に値するものと判定された。