

学位論文題名

JC virus 外郭蛋白遺伝子とベクター SR α (VP231-SR α)
によって形成される人工的偽ウイルス粒子の解析

学位論文内容の要旨

I. 研究目的

JC virus (JCV) はヒト脳脱髄疾患である進行性多巣性白質脳症の原因ウイルスであるが、培養細胞で増殖させる事が困難であった。最近、JCVの外郭蛋白遺伝子VP231をSR α のプロモーターの下にCOS7細胞に発現させる事によって、人工的な偽ウイルス粒子、JC pseudotype virus (JCPV) を形成する事が明らかにされた。しかし、JCPVが空の粒子であるのか、感染性はあるのかといった点に関してはまだ明らかにされておらず、本研究においてはそのDNAの有無、感染性の有無に関して検討を行った。

II. 研究方法

1. 細胞とDNA

培養細胞はCOS7細胞を用いた。VP231-SR α はJCVの後期タンパクのうち、5'-truncated agnogene、VP1及びVP2/3をtransfer vectorのpcDL-SR α 296に組み込んだDNAであり、COS7細胞にトランスフェクションする事によって、72時間後にJCPVの発現を示す。

2. トランスフェクション

COS7細胞はトランスフェクション前日に単層培養を行い、lipofectamine法によるVP231-SR α のトランスフェクションを行った。

3. JCPVの精製

トランスフェクション後のCOS7細胞を凍結融解を繰り返して破壊、その後neuraminidase処理を行った後1,500rpm、10分の遠心を行い、上清のJCPV液を回収後、更にショ糖PBS溶液の上に重層し、超遠心を行って、沈渣を回収し精製JCPVとした。

4. 赤血球凝集反応 (hemagglutination:HA)

JCVはHA試験にて定量を行った。JCPV液を0.2%BSA含有PBS (pH7.15)にて96穴V字型マイクロプレート中で段階希釈を行い、37°C 1時間静置した。0.5%O型赤血球PBS溶液を各穴に添加し3時間後に赤血球凝集反応を判定した。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。

5. JCPV液の透過型電子顕微鏡を用いた観察

銅製シートメッシュ上にホルムパール薄膜を張り、精製JCPV溶液を滴下して膜に吸着させた上でネガティブ染色を行ない、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

6. JCPVのDNA精製

トランスフェクションした細胞及び精製JCPV液からのDNA抽出はHirt法を用いて行った。

7. サザンブロッティングによるJCPV DNAの検出

陽性controlとしてVP231-SR α DNAおよび原始調節領域の構造を有するJCV CY DNAを用いた。JCPV DNA、VP231-SR α DNAはPstI、KpnIによる、CY DNAはEcoRIによる制限酵素処理を行っ

た後、agarose gelにて電気泳動を行った。アルカリ変性を行った後、ニトロセルロース膜にキャピラリー法によりトランスファーした。プローブはdigoxigenin標識したJCV DNA全長を用い、一昼夜ハイブリダイゼーションを行った後にLuminigen PDD を用いて発光反応を行わせ、Kodak X-OMAT ARフィルムに露光しバンドの検出を行った。

8. COS7細胞への感染実験

COS7の培養シャーレの培養液中に精製JCPV液を接種し、翌日に培地交換、4日後に細胞を回収した。細胞はPBSによる洗浄を繰り返し、残存ウイルスを除去し、Hirt法によるDNA抽出を行なった。プライマー対としてVP1領域のうち675bpを増幅するVPV-3、VPV-4を用い、94℃30秒、55℃1分、72℃1分を1サイクルとして35サイクルの増幅反応を行った。陽性コントロールとしてVP231SR α 、陰性コントロールとしてJCV調節領域を増幅するプライマー対を用いた。PCR産物はagarose gelにて電気泳動し、紫外線トランスイルミネーター下でバンドを確認し、写真撮影した。

9. In situ PCRによるJCPV感染COS7細胞中のVP1遺伝子検索

COS7細胞をchamber slide上に培養し、JCPVを添加、4日後にPBSで細胞を洗浄し、10% formaldehyde含有PBS溶液にて一昼夜固定した。陰性コントロールとして未感染COS7細胞を用いた。固定後標本はProteinase K処理、Klenow処理を行ない、VPV-3、VPV-4をプライマー対として95℃1分、その後93℃1分、60℃2分、72℃3分を1サイクルとして25サイクル増幅反応を行い、さらに72℃7分の合成反応を加えた。PCR後の標本はDIG DNA Labeling Kit を用いてPCR産物の検出を行ない、さらにケルンエヒテロートにて核染色を行い封入し、顕微鏡にて観察した。

III. 結果

1. JCPVによるのHA価の上昇

transfectionは計3回行い、それぞれ64、128、256とHA価の上昇を示す事が確認された。

2. JCPVにおけるDNAの検索

陽性コントロールのVP231-SR α と同様の約1.2kbpの位置に陽性シグナルを認め、JCPVはVP231-SR α 由来のDNAをその中に有していると考えられた。尚、EcoRIで切断したJCV CY DNAは5.1kbpの部位に強い陽性像を示した。

3. JCPVのCOS7細胞への感染能

感染細胞より抽出したDNAよりPCR法を用いてJCVのVP1領域の検出を試み、その結果675bpのPCR産物が得られた。陰性コントロールとした調節領域のPCRではJCVは検出されなかった。in situ PCRの結果、6.4%の細胞の核内に陽性結果が得られ、JCPVが核内に移行している事を確認した。陰性コントロールの非感染COS7細胞は陽性所見は認められなかった。

4. JCPVの電子顕微鏡を用いた形態の観察

径約40nmのJCVと同一の形態を示すJCPV粒子を確認した。

IV. 考察

人工的な偽ウイルスの作成は培養細胞での増殖が困難なウイルスや実験室での機能解析には不可欠な手段である。遺伝子導入への応用としてはVP231-SR α に導入目的とするDNAを組み込んだコンストラクトを作成し、COS7細胞にトランスフェクションし、形成された粒子を用いて遺伝子導入を行う事が期待できる。ヒト由来の何等かの細胞への特異的な感染性が証明されれば特異臓器への遺伝子導入を行う事によって、臨床応用が可能かもしれない。特にJCVがヒト乏突起膠細胞に特異的に感染する事実を考えれば、JCPVも神経系細胞に特異的な感染を起こす可能性もあり、将来的に脱髄疾患やleukodystrophy等の神経疾患に対する遺伝子治療への応用が期待される。

V. 結語

今回の実験で、JCPVがHAの上昇を示す事が明らかとなり、またその中にDNAを有している事、さらに、COS7細胞に接種する事によって核内移行を示す事が確認された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 柿 沼 光 明

副 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 高 田 賢 藏

学位論文題名

JC virus 外郭蛋白遺伝子とベクター SR α (VP231-SR α) によって形成される人工的偽ウイルス粒子の解析

目的：JCウイルスは培養細胞上で増殖する事が困難であり、これまでJCウイルスの研究の障害となっていた。構造蛋白をコードする遺伝子のVP2/3、及びVP1の領域のDNAをpcDL-SR α 296に組み込み、COS7細胞にトランスフェクションすることによって人工的偽ウイルス粒子JC pseudotype virus(JCPV)が72時間後に形成される事が最近見出された。しかし、JCPVはDNAをもっているのか、細胞に感染する能力があるのか等についてはまだ明らかにされておらず、今回その点につき解析をした。

材料と方法：培養細胞は、COS7細胞を用い、10%FBSを添加したMEM培地を用いて培養を行った。

VP231-SR α のトランスフェクションはリポフェクトアミン法を用いた。トランスフェクション72時間後に細胞を回収し、凍結融解法でJCPVを回収した。

JCPVの定量は、JCウイルスと同様HA価の測定によって行った。段階希釈したJCPV液を赤血球溶液と混和し、完全に凝集をおこした最大希釈の逆数をHA価とした。次に、JCPVのDNAの有無を明らかにするために、サザンブロットィングを用いてDNAの検出を行った。回収されたJCPVは精製を行った後、Hirt法を用いてDNAを抽出した。KpnI, PstIによる制限酵素処理後、ジゴキシゲニン標識したJCウイルスDNA全長のプローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。

次に、JCPVの感染能を検討するために、回収されたJCPVをCOS7細胞に接種した。4HA価のJCPVを培養液中に添加し、4日後に細胞を回収、十分な洗浄を行って培養液中に残存しているVP231-SR α を除去し、凍結融解、精製、Hirt法によるDNA抽出を行った後にPCR法にてJCPV DNAを検出した。さらに、チャンバーシャーレ上に培養したCOS7細胞にも同様に接種を行い、in situ PCR法を行った。プライマー対はPCR, in situ PCRともにVP1領域のうち675bpを増幅するVPV3, VPV4を用いた。

結果：トランスフェクション実験は計3回行ない、それぞれHA価の上昇がみられ、最も効率の良好であった3回目の実験では、256倍のHA価上昇を示した。

サザンブロッティングの結果、*KpnI PstI*で制限酵素処理を行ったJCPVと、同じく*KpnI PstI*で制限酵素処理を行った陽性コントロールのVP231-SR α は、ともに約2.4kbpのVP231に相当する位置に陽性バンドを認め、JCPVがVP231-SR α 由来のDNAを持っている事が明らかとなった。

COS7細胞にJCPVを接種し、4日後に回収された細胞からVP1領域DNAをPCR法を用いて検出した結果、JCPV感染COS7細胞に、675bpのPCR産物が認められ、COS7細胞に感染能がある事が示唆された。

JCPV感染COS7細胞の*in situ* PCRの結果、200個の細胞のカウントで6.4%の細胞の核内に限局して陽性シグナルが認められ、培養液中のJCPVがCOS7に感染し、核内に移行している事が示された。

回収したJCPVのnegative染色後の電子顕微鏡像では径約約40nmのJCVとほぼ同様の形態を有したJCPV粒子が確認された。

考察：JCPVは、DNAをもち、感染能を有する偽ウイルス粒子であり、JCウイルスと同様、HA価の上昇、即ち赤血球凝集能を持つ事が明らかとなった。この事よりJCウイルスの抗体測定系への応用が可能である。また、JCウイルスの粒子形成過程に対する研究に有用と考えられる。さらに将来の展望として、VP231-SR α に何等かの遺伝子をさらに付加し、他の細胞に感染させる事により遺伝子導入のピークルとして利用できる可能性が考えられた。

以上、本研究は遺伝子組み換え技術を用いて人工的に作成されたJC pseudotype virusが、外郭のみならずDNAを有しており、COS7細胞への感染性も備えている事を明らかにしたもので、培養細胞上で増殖する事が困難なJCウイルスの研究に大きく寄与したものである。よって博士（医学）の学位授与に充分値するものと思われる。