

## 学 位 論 文 題 名

## Archetypeの調節領域を持つJCウイルスの細胞親和性とその解析

## 学位論文内容の要旨

## 目的

JCウイルス (以下JCVと略す) は、ヒト中枢神経の脱髄性疾患である進行性多巣性白質脳症 (progressive multifocal leukoencephalopathy: PML) の原因ウイルスである。従来、PML患者の脳組織から分離されたJCV (PML type) に関する研究が行われてきたが、JCVが増殖可能な細胞がヒト胎児脳細胞の初代培養細胞にほぼ限られていた。しかし最近、JCV Mad-1株 (PML type) がヒト神経芽細胞腫由来のIMR-32細胞で増殖したことが報告され、JCVの解析およびPMLの発症機序の解明を発展させるものとなっている。一方、JCVは幅広くヒトに無症候性に感染しており、しばしば尿中に排泄されていることが報告され、健常人の尿中からJCVがクローニングされた。この腎型JCVはarchetypeと呼ばれ腎親和性を示す。JCV archetypeの調節領域は脳親和性を示すPML typeの調節領域とは構造が異なることが明らかにされており、archetypeの塩基配列から欠失と重複という変化を経てPML typeの塩基配列が構築されると推測されている。しかし、腎型JCVに関しては未だ詳細な解析は行われておらず、脳型JCVほど研究も進められていない。そこで我々は、腎型JCV (archetype) の細胞親和性の解析を試みた。

## 材料と方法

1) ウイルスと細胞:DNAは、腎型 (archetype) のJCV株であるCY、PML型のJCV株であるMad-1およびCYの調節領域とMad-1のキメラであるJCV Chimera DNAを用いた。細胞は、サル腎細胞であるCOS-7細胞とヒト神経芽細胞腫由来のIMR-32細胞を用いた。COS-7細胞は10%FBS添加MEM、IMR-32細胞は10%FBS添加DMEMで培養した。

2) トランスフェクション:それぞれpUC-19のEcoRI siteでクローニングされた3型のJCV DNAをEcoRIで消化後、Lipofectamine法によりトランスフェクションを行った。

3) 赤血球凝集反応 (Hemagglutination:HA):感染細胞を凍結融解により破壊、遠心後その上清をウイルス液とした。

4) サザンブロット:感染細胞から抽出したウイルスDNAはEcoRI単独、またEcoRIとBamHIの両方で消化した。プローブは、JCV CY DNAをランダムプライム法によりジゴキシゲニン標識し、シグナルの検出はHNPP-EUと反応後、Epi-Light UV撮像セットEU-1100 (アイシン・コスモス) を用いて行った。

5) 免疫染色:64日目の感染細胞をカバーガラスに培養し、4日後に冷アセトンにて固定後、抗JCVウサギVP1抗体を用いて行った。

6) シークエンス:JCV調節領域の増幅は、プライマーJRR-5 (BamHI siteを含む) とJRR-6 (PstI siteを含む) を用い、94℃ 30秒、55℃ 1分、72℃ 1分を1サイクルとして35サイクルをGene Amp System 240 (Perkin Elmer) を用いて行った。

形質転換させた大腸菌からのプラスミドDNA抽出は、Wizard™ Plus Minipreps DNA Purification system (Promega, Madison, USA) キットを用い、insertの入っているクローンを選択し、日立蛍光式パーソナルDNAシーケンサーSQ-5500 (HITACHI) にて塩基配列を決定した。

## 結果

1) トランスフェクション後64日目のHA価の測定を行ったところ、COS-7細胞にお

いては、JCV CYとJCV Chimera は128 HA units、JCV Mad-1は64 HA unitsであり、CYの調節領域を持つものは腎細胞であるCOS-7細胞にて良く増殖した。これとは逆に、IMR-32細胞においてはJCV CYおよびJCV Chimeraは検出限界以下 (<4 HA units) で、JCV Mad-1は256 HA unitsであった。

2) 抗JCVウサギVP 1抗体を用いた免疫染色を行った結果、COS-7細胞においては、JCV CY、JCV Chimera、JCV Mad-1のすべてで核内に陽性であった。

3) サザンブロットハイブリダイゼーション法によるJCV DNAの解析を行った結果、*EcoRI*単独で消化した場合は一ヶ所で切断され約5.1 kbpの位置に、さらに*EcoRI*と*BamHI*で消化した場合は半分の約2.5kbpの位置に陽性シグナルを認めた。

4) シークエンスを行った結果、COS-7に感染したCYおよびCY-Mad-1のJCV DNAの調節領域はトランスフェクションに用いたJCV CY DNAのものと完全に一致した。

5) IMR-32にて増殖したMad-1は2番目のTATA boxを含む欠失が見られたが、COS-7にて増殖したMad-1は複製開始点 (Ori) から109塩基のところにGGTCという4塩基の挿入を認めた。

## 考察

HAの測定の結果より、CYおよびChimeraをCOS-7に感染させた場合では128 HA units、Mad-1をCOS-7に感染させた場合では64 HA unitsであり、HA価に2倍の差があることはPML typeはarchetypeに比べ腎細胞への親和性が少ないためであろうと推測された。また、3型のいずれもがCOS-7細胞で増殖したことからは、COS-7細胞ではSV40 T抗原が発現しているため調節領域の違いよりもSV40 T抗原の影響が大きいものと考えられた。一方、神経芽細胞腫由来のIMR-32細胞においては、CYおよびChimeraでは検出限界以下 (<4 HA units) でありウイルスの増殖は起こらなかったと考えられるが、Mad-1-IMR32においては256 HA unitsでウイルスの増殖を認めたことから、JCVがIMR-32細胞において増殖するためには、少なくともPML typeの調節領域を持っている必要があると考えられ、調節領域の違いによる細胞親和性への影響が示唆された。免疫染色の結果からは、JCVはCOS-7細胞の核内にて増殖していることが明らかとなった。さらに感染細胞から抽出されたDNAを*EcoRI*単独、*EcoRI*と*BamHI*の両方で消化した後、サザンブロットハイブリダイゼーション法によりその解析を行ったところ、*EcoRI*単独で消化した場合は一ヶ所のみで切断され5.1 kbpの位置に陽性シグナルが見られ、*EcoRI*と*BamHI*で消した場合は2.5kbpの位置に陽性シグナルを認めたことから、このDNAがJCVのものでありCOS-7細胞内に存在しているウイルスDNAは構造上の大きな変化のないJCV DNAであると考えられた。さらにこのJCVの調節領域の塩基配列を解析した結果、CYおよびChimera由来のJCVの調節領域はトランスフェクションに用いたJCV DNAのそれと完全に一致した。一般にJCVの調節領域はin vitroにおいても非常に変異を起こしやすい領域であることが知られているが、本実験においては、欠失や重複などの塩基配列の再編成は認められず、長期間にわたる持続感染により変化のないウイルスを得ることが可能であると考えられた。しかしCOS-7で増殖したMad-1株に新たな塩基変異がみられたことは、Mad-1株が腎由来細胞に適応したための変化と推測された。

## 結語

JC virusの組織親和性に関して、archetype (腎親和性) とPML type (脳親和性) のウイルス株の調節領域の差によるウイルス増殖性を、主にCOS-7細胞 (腎由来細胞) とIMR-32細胞 (脳由来細胞) とを用いて解析し、次の結果が得られた。

1) IMR-32細胞においてPML typeのMad-1のみが増殖したことから、この細胞では調節領域がPML typeであることが重要であると示された。COS-7細胞においてarchetypeのCYとCY-Mad-1のChimeraが著名に増殖したことはarchetypeの調節領域がCOS-7細胞の親和性に関与していることが示された。しかしCOS-7細胞でJCV Mad-1が増殖したのは、この細胞では調節領域の違いよりもSV40 T抗原の影響が大きいものと思われた。

2) HA価の上昇を示したCY-COS-7、Chimera-COS-7およびMad-1-COS-7細胞のすべてで、感染細胞の腫大した核内にVP 1抗原を確認し、JCVが細胞核内に増殖していることが明らかにされた。

3) COS-7細胞から抽出されたDNAをそれぞれサザンブロットハイブリダイゼーション法により解析を行ったところ、構造上大きな変化のないJCV DNAであると考えられた。

4) COS-7細胞から抽出された3型あるJCV DNAの調節領域の塩基配列を解析したところ、CYおよびChimeraではトランスフェクションに用いたJCV DNAのものと完全に一致し、欠失や重複などは認められなかった。Mad-1では複製開始点 (Ori) から109塩基のところにGGTCという4塩基の挿入を認めた。

5) Archetype のJCVが COS-7細胞においてウイルスを生ずることを証明した。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 生 田 和 良

副 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 高 田 賢 蔵

## 学 位 論 文 題 名

### Archetypeの調節領域を持つJCウイルスの細胞親和性とその解析

JCウイルス（以下JCVと略す）は、ヒト中枢神経の脱髄性疾患である進行性多巣性白質脳症（progressive multifocal leukoencephalopathy:PML）の原因ウイルスであり、従来、PML患者の脳組織から分離されたJCV（PML type）に関する研究が行われてきた。また最近、JCVは幅広くヒトに無症候性に感染しており、しばしば尿中に排泄されていることが報告され、健常人の尿中から腎型のJCV（archetype）がクローニングされた。しかし、腎型JCVに関しては未だ詳細な解析は行われていない。そこで、腎型JCV（archetype）の細胞親和性の解析を試みた。

ウイルスDNAは、腎型（archetype）のJCVであるCY株、PML型のJCVであるMad-1株およびCYの調節領域とMad-1のキメラ株を用い、サル腎細胞でSV40 T抗原を発現してるCOS-7細胞とヒト神経芽細胞腫由来のIMR-32細胞にLipofectamine法によるトランスフェクションを行った。ウイルスの増殖は赤血球凝集反応（Hemagglutination:HA）により測定し、感染細胞より得られたウイルスDNAをEcoRI単独、EcoRIとBamHIの両方で消化して、HNPPを用いたサザンブロットによりシグナルの検出を行い、さらにJCV調節領域のシーケンスを行った。また、64日目の感染細胞を用い抗JCVウサギVP1抗体による免疫染色を行った。その結果、COS-7細胞においてCYとChimeraは128 HA units、Mad-1は64 HA unitsで、IMR-32細胞においてはMad-1のみ256 HA unitsで、CYおよびChimeraは検出限界以下（<4 HA units）であった。サザンブロットの結果、EcoRI単独で消化した場合は約5.1 kbp、EcoRIとBamHIで消化した場合は約2.5kbpの位置に陽性シグナルを認め、シーケンスの結果、COS-7にて増殖したCYおよびChimeraは欠失や重複など変化は認められなかったが、Mad-1は複製開始点から109塩基のところにGGTCという4塩基の挿入を認めた。また、免疫染色の結果、COS-7細胞核内にVP1陽性であった。以上のことから、JCVがIMR-32細胞において増殖するためには、調節領域がPML typeであることが重要と思われ、COS-7細胞において3型が増殖したのは、調節領域の違いよりもSV40 T抗原の影響が大きいものと思われた。サザンブロットの結果から、抽出されたJCVは構造上大きな変化のないJCV DNAであると考えられ、さらにCOS-7細胞から抽出され

たJCV DNAの調節領域のシーケンスの結果、CYおよびChimeraでは欠失や重複などは認められなかったことから、長期間にわたる持続感染により変化のないウイルスを得ることが可能であると考えられ、さらにArchetypeのJCVがCOS-7細胞においてウイルスを生ずることを証明した。

学位申請者長谷川 靖の学位論文公開発表は、平成9年1月29日午後4時20分より医学部臨床大講堂において行われた。

主査生田 和良教授から紹介があった後、申請者はスライドを用いながら約10分に渡って学位論文内容の発表を行った。その後、吉木 敬教授よりトランスフェクションと感染実験の違いについて、PML typeとArchetypeの住み分けについて、Archetypeの病原性について、高田 賢蔵教授よりトランスフェクション効率について、細胞変性効果について、感染細胞のselectionについてなどの質問があった。次いで主査の生田和良教授より、tropismの問題について、核内因子の関与について、脳移行のメカニズムについて、質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は概ね適切な回答を行った。質疑応答の時間は約15分であった。なお、出席者はおよそ10名であった。

以上、本研究は将来的にarchetypal JCVの腎での持続感染機構やPML発症に至るまでの機序の解明を発展させるものと考えられた。

よって、審査員一同は申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。