

学 位 論 文 題 名

JC ウイルス初期転写領域の腫瘍原性の解析
及びヒト髄芽腫との関連に関する検討

学位論文内容の要旨

[目的と背景]

JC virus (JCV) はヒト脳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 virus である. JCV は同属の polyomavirus である simian virus 40 (SV40), BK virus (BKV)と同様に実験的に新生仔 hamster 脳に腫瘍原性がある事が示されており, 脳腫瘍との関連性が示唆されているが, 未だその詳細な機構については解明されていない. Polyomavirus の transform 能の解析では, 現在までに SV40 での研究が詳細に行われてきている. JCV は SV40 と DNA 全体で 69 %の homology を有し, かつ腫瘍化に関連する Large T (LT) 遺伝子では 72 %の homology を持つ. 現在までの報告では, JCV の LT 抗原 (蛋白) の transform 誘導能は SV40 の LT 抗原の transform 誘導能より著しく低いという結果が発表されている. しかし通常 LT と small t (st)とは同じ frame から翻訳されるため, LT 単独の機能は不明であった. そこで著者らは, JCV の LT のみを発現する plasmid を構築し, NIH3T3 細胞を用いて stable transformant を作製し, 腫瘍原性の有無を解析し, その強度を SV40, BKV と比較検討した. また最近, JCV がヒト medulloblastoma の発生に関連しているという報告があり, 再び JCV とヒト脳腫瘍との関連性が注目を集めてきている. そこで, ヒト medulloblastoma の手術材料を用いて JCV の LT 遺伝子とその蛋白の有無を検討した.

[対象と方法]

1. Mouse 線維芽細胞である NIH3T3 細胞に JCV, SV40, BKV の LT 遺伝子のみを単独で発現させる plasmids,すなわち JCLT, SV40LT, BKLT を構築し, それらを PCXN2-Flag vector に組み込み LT の transform 能を colony formation assay, 細胞増殖能の検討に用いた.
2. LT と st を判別する為に, JC virus small t (JCst) に対する抗体の作製を試みた. JCst は 172 個の amino acid 残基からなり, 688 個の JCLT と N 末端の 81 残基が同じ frame から翻訳され, その後 splicing により異なった蛋白として作られる. そこで JCLT と交差しない C 末端の 16 残基を抗原として抗体を作製した.
3. ヒト脳腫瘍と JCLT の関連性を調べる為にヒト小脳に発生した medulloblastoma の手術材料を用いて JCV 遺伝子の有無を PCR, genomic Southern blotting, *in situ* hybridization (ISH) 法, および免疫染色法にて検討を行った.

[結 果]

- 1) Transform 能の解析: NIH3T3 を用いて JCLT, SV40LT および BKLT を stable に発現する clone をそれぞれ 3 clone ずつ樹立した. Colony formation assay の結果, JCLT を組み込んだ NIH3T3 細胞は SV40LT, BKLT を組み込んだ NIH3T3 細胞よりはやや低いものの, これらとほぼ同等の transform 能を誘導する事が判明した. さらに細胞増殖能と transform 能が比例していた.
- 2) JCst 抗体の検討: JCLT と交差しない JCst の C 末端の 16 残基を抗原として抗体を作製し, 抗体の感度と特異性を JCV 持続感染細胞(JCI)および JCV transformed hamster cell line (Med-1)を用いて調べたところ, 感染細胞及び腫瘍化細胞のいずれにおいても予想される分子量の位置に st が発現していることが判明した. 非感染細胞の IMR-32 は陰性であり, 抗体が特異的であると思われた. またヒト PML 脳においては JCV 感染 oligodendroglia の核内に陽性となった.
- 3) ヒト medulloblastoma と JCV genome との関連: ヒト小脳に発生した 8 例の medulloblastoma (6 例の凍結手術材料と 3 例の paraffin-embedded tissue) を用いて JCV 感染の有無を PCR, genomic Southern blotting, ISH, 免疫染色にて検討を行った. その結果 8 例のヒトの medulloblastoma ではいずれの方法においても JCV genome は検出されなかった.

[考 察]

現在までの Rat 2 細胞を用いた実験では JCLT の transform 能がないと報告されているが, 今回 JCst を欠いた JCLT で NIH3T3 細胞に高い腫瘍原性を示した. このことは, 我々の実験で使用した PCXN2-Flag vector の promoter が JCV の野生型 promoter より非常に強力な機能を持つ事と, mouse の培養細胞に対して高い活性を持つ特徴を有する為と考えられた.

JCst の抗体が作られ, これを用いた解析で, JCV によって transform した細胞と JCV に感染した細胞の両方に JCst が発現していることが明らかとなった.

ヒトの medulloblastoma の検索で, いずれの方法でも陰性であった. 我々は凍結保存材料から DNA を抽出して検討しており, 報告された論文に比してより正確な結果が得られたものと考えられた. 1 症例の VP 領域にて増幅される band が出現したが, PCR による非特異的増幅産物であった.

[結 語]

1. JCV, SV40, BKV の LT のみを発現する NIH3T3 細胞株を樹立し, colony formation assay を行った結果, SV40 や BKV と同様に JCLT も rodent cell を transform させることが判明した. またいずれの transformant でも細胞増殖能の増加が見られた. その活性は SV40LT>BKLT>JCLT の順であった.
2. JCst に対する抗体を作製し, JCst が JCV 感染細胞および腫瘍化細胞で発現していることを明らかにした.
3. ヒト medulloblastoma 8 例について PCR 法, genomic Southern blotting, ISH 法, および免疫染色法で検討したが, いずれの方法においても JCV genome の存在は認められなかった.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 守 内 哲 也

学 位 論 文 題 名

JC ウイルス初期転写領域の腫瘍原性の解析 及びヒト髄芽腫との関連に関する検討

JC virus (JCV) はヒト脳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 virus である。JCV は同属の polyomavirus である SV40, BKV と同様、実験的に新生仔ハムスター脳に腫瘍原性がある事が示されており、脳腫瘍との関連性が示唆されているが、未だその詳細な機構については解明されていない。最近、JCV がヒト髄芽腫の発生に関連しているという報告があり、再び JCV とヒト脳腫瘍との関連性が注目を集めてきている。一方、トランスフォーム能の解析では、現在までに SV40 での研究が詳細に行われてきている。JCV は SV40 と DNA 組成で 69% の相同性を有し、かつ腫瘍化に関連する大型 T 抗原遺伝子では 72% の相同性があり、JCV の腫瘍化機構の解析が興味の対象となってきた。現在までの報告では、JCV の大型 T 抗原蛋白のトランスフォーム誘導能は SV40 の大型 T 抗原蛋白のトランスフォーム誘導能より著しく低いという結果が発表されている。しかし通常大型 T 抗原と小型 t 抗原とは同じフレームから翻訳されるため、大型 T 抗原単独の機能は不明であった。そこで著者らは、JCV の大型 T 抗原のみを発現するプラスミドを構築し、NIH3T3 細胞を用いてクローン化細胞を作製し、腫瘍原性の有無を解析し、その強度を SV40, BKV と比較検討した。又、注目されているヒト髄芽腫との関連に関しては、ヒト手術材料を用いて JCV の大型 T 抗原遺伝子とその蛋白の有無を解析した。その結果、以下の 4 点が明らかとなった：

- 1) Transform 能の解析: NIH3T3 を用いて JCLT, SV40LT および BKLT を stable に発現する clone をそれぞれ 3 clone ずつ樹立した。Colony formation assay の結果、JCLT を組み込んだ NIH3T3 細胞は SV40LT, BKLT を組み込んだ NIH3T3 細胞よりはやや低いものの、これらとほぼ同等の transform 能を誘導する事が判明した。さらに細胞増殖能と transform 能が比例していた。
- 2) JCst 抗体の検討: JCLT と交差しない JCst の C 末端の 16 残基を抗原として抗体を作製し、抗体の感度と特異性を JCV 持続感染細胞(JCI)および JCV transformed hamster cell line

(Med-1)を用いて調べたところ、感染細胞及び腫瘍化細胞のいずれにおいても予想される分子量の位置に st が発現していることが判明した。非感染細胞の IMR-32 は陰性であり、抗体が特異的であると思われた。またヒト PML 脳においては JCV 感染 oligodendroglia の核内に陽性となった。

3) ヒト medulloblastoma と JCV genome との関連： ヒト小脳に発生した 8 例の medulloblastoma (6 例の凍結手術材料と 3 例の paraffin-embedded tissue) を用いて JCV 感染の有無を PCR, genomic Southern blotting, ISH, 免疫染色にて検討を行った。その結果 8 例のヒトの medulloblastoma ではいずれの方法においても JCV genome は検出されなかった。

口頭発表にあたり、副査の吉木教授から、1) NIH3T3 細胞以外で JCV によるトランスフォーム能の報告について、2) 大型 T 抗原と小型 t 抗原の局在について、3) 小型 t 抗原遺伝子の機能について、4) 1999 年発表の Proc Natl Acad Sci U S A の報告との差異に関しての質問があった。続いて副査の守内教授から、1) PCR assay の結果について、2) この論文のまとめ方について。更に主査の長嶋から、1) JCLT が NIH3T3 細胞強トランスフォーム能を示した点、2) small t 抗体で medulloblastoma を検討したかについての質問を行った。これらの質問に対して発表者は豊富な知識と文献例を引用し、ほぼ妥当な解答をした。

この論文は、JCV の大型 T 抗原が単独で NIH3T3 細胞のトランスフォーム誘導能を有することを明らかにした。さらに、JCV はヒト髄芽腫には直接関係していないことを示した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。