

学位論文題名

Establishment of an immunoscreening system using recombinant VP1 for isolation of a monoclonal antibody that blocks JC virus infection.

(組み換え VP1タンパクを用いたイムノスクリーニングシステムの確立と JC ウイルス感染阻害抗体の単離)

学位論文内容の要旨

緒言

JC virus (JCV)は、*Polyomavirus*科に属する二本鎖環状 DNA ウイルスである。成人では 70% 以上が血清の JCV 抗体が陽性であり、多くの人々が不顕性感染をしていると考えられているが、悪性腫瘍、AIDS 等に罹患し免疫不全状態になると中枢神経系(CNS)に脱髄病変を生じる進行性多巣性白質脳症(PML)を惹起する。PML に対する有効な治療法は未だ確立されていない。

JCV のゲノムは様々な臓器から検出されるが、PML の病変は CNS のグリア細胞に局限している。本研究では、神経組織を標的とする JCV 感染を制御するために、神経系細胞を用いて JCV 感染に対する感染阻害抗体を単離することを目的とした。

材料と方法

JCV 許容細胞である、ヒト神経芽細胞腫由来 IMR-32 細胞の細胞膜分画を BALB/c マウスに免疫し、モノクローナル抗体を作製した。これらのモノクローナル抗体の中から、JCV 吸着阻害活性を指標としたイムノスクリーニング法により JCV 感染阻害抗体の単離を行った。実際のスクリーニングでは、大量に精製することが困難な JCV に代わり、JCV の主な外殻蛋白である VP1 を大腸菌で発現・精製したウイルス様粒子(virus-like particle: VLP)を用いてスクリーニングを行い、ウイルス感染阻害活性を有するモノクローナル抗体の単離を試みた。

結果

IMR-32 細胞の細胞膜分画をマウスに免疫し、細胞膜分子を認識する抗体を産生するハイブリドーマを約 600 クローン作製した。これらのハイブリドーマについてイムノスクリーニングを行い、プレート上への VLP の結合を阻害する抗体 (24D2) を分離した。

24D2 は VLP、JCV のイムノプレートへの吸着を抗体濃度依存性に阻害した。さらに、VLP が native な JCV と同様に細胞へ吸着、侵入し、核内へ移行する活性を持つことが報告されていることから、24D2 が VLP の細胞への吸着、侵入を阻害することが可能かどうか、蛍光色素で標識した FITC-VLP を用いて検討した所、24D2 抗体存在下では FITC-VLP の細胞への吸着、侵入ともに顕著な阻害効果が認められた。

次に、24D2 抗体の JCV 感染に対する阻害活性について検討した。

JCV の許容細胞である IMR-32 細胞は、JCV に感染させると数日でウイルス由来タンパクである T 抗原、agnoprotein を発現、ウエスタンブロットで検出することができる。IMR-32 細胞における JCV 感染は、24D2 抗体存在下でウイルス由来タンパクの発現が顕著に抑制され、この阻害効果は 24D2 抗体濃度依存性に認められた。以上の結果より、分離した 24D2 抗体は JCV 感染に対して顕著な阻害活性を有することが明らかとなり、この抗体によって認識される膜分子が、JCV 感染に重要な役割を担っている可能性が示唆されたため、24D2 によって認識される膜分子について検討を行った。抗原として用いた IMR-32 細胞の膜画分について 24D2 を用いてイムノブロッティングを行ったところ、約 60kDa 分子を認識し、IMR-32 細胞を用いた免疫染色では、この分子の細胞膜上への分布が認められた。

JCV による感染では、中枢神経系において主に神経膠細胞が標的となる。このため、24D2 によって認識される分子のヒト脳組織における分布を検討した。

24D2 の免疫陽性反応は、オリゴデンドロサイトのマーカーとして報告されている CA2、アストロサイトのマーカーである GFAP と共局在を示したが、神経細胞のマーカーであるシナプトフィジン陽性細胞には認められなかった。以上の結果から、24D2 によって認識される分子は主に神経膠細胞において発現している分子であることが示された。

考察

今回 IMR-32 細胞の膜分画を抗原として作製したモノクローナル抗体 24D2 は、JCV 感染に対し、顕著な抑制効果を有することが明らかとなり、この抗体によって認識される約 60kDa の分子が IMR-32 細胞への JCV 感染において重要な機能を担っている可能性が示唆された。現在 λ phage library を用いて約 60kDa の分子の同定を行っている。今回確立したイムノスクリーニングシステムによる感染阻害抗体の探索は、ウイルス感染制御法の開発にも生かしていくことができるかと期待される。

結語

- 1) IMR-32 細胞の膜分画を plate に抗原として固定し、モノクローナル抗体と incubate した後に JCV 外殻蛋白 VP1 を大腸菌で発現・精製したウイルス様粒子(VLP)の膜分画への結合を抗 VP1 抗体を用いて検出するという、JCV の吸着阻害活性を指標としたイムノスクリーニング法を確立した。
- 2) イムノスクリーニング法によって単離したモノクローナル抗体 (24D2) は、VLP、JCV の plate への吸着を濃度依存性に阻害した。
- 3) 生細胞を用いたウイルス感染実験において、24D2 は JCV の感染を顕著に阻害した。
- 4) immunoblotting 法により 24D2 は細胞膜画分において、約 60kDa の分子を認識することを明らかにした。またこの抗体を用いて免疫組織学的検索を行い、JCV 感染許容細胞の細胞膜、ヒト脳において主に神経膠細胞で免疫陽性反応が認められた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 瀬 谷 司
副 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 志 田 久 寿

学 位 論 文 題 名

Establishment of an immunoscreening system using recombinant VP1 for isolation of a monoclonal antibody that blocks JC virus infection.

(組み換え VP1タンパクを用いたイムノスクリーニングシステムの確立と
JC ウイルス感染阻害抗体の単離)

JC virus (JCV) は、*Polyomavirus* 科に属する二本鎖環状 DNA ウイルスである。JCV による感染は、一般に多くのヒトが無症候性感染の形をとるが、免疫不全状態では中枢神経系 (CNS) に脱髄病変を生じる進行性多巣性白質脳症 (PML) を生じる。有効な治療法は未だ確立されておらず、予後不良の脱髄性疾患である。JCV のゲノムは様々な臓器から検出されるが、病変は CNS のグリア細胞に局限する。本研究では、神経組織を標的とした JCV 感染を制御するために、神経系細胞を用いて JCV 感染に対する感染阻害抗体を単離する事を目的とした。JCV 感染許容細胞である、ヒト神経芽細胞腫由来 IMR-32 細胞の細胞膜分画を BALB/c マウスに免疫し、モノクローナル抗体を作製し JCV 吸着阻害活性を指標としたイムノスクリーニングを行い、JCV 感染阻害抗体の単離を行った。

IMR-32 細胞の膜分画をプレートに抗原として固定し、モノクローナル抗体を反応させた後、JCV 外殻タンパク VP1 で発現・精製したウイルス様粒子 (virus-like particle: VLP) の膜分画への結合を抗 VP1 抗体を用いて検索する JCV の吸着阻害活性を指標としたイムノスクリーニング系を確立した。イムノスクリーニングによって得られたモノクローナル抗体 (24D2) は、VLP、JCV のプレートへの吸着を抗体濃度依存性に阻害した。生細胞を用いたウイルス感染実験において、24D2 は JCV の感染を顕著に阻害した。イムノブロットング法により 24D2 は細胞膜分画において、約 60kDa の分子を認識する事を明らかにした。またこの抗体を用いた免疫組織学的検索では、JCV 感染許容細胞の細胞膜、ヒト PML 脳において主に神経膠細胞で免疫陽性反応が認められる事を確認した。

今回 IMR-32 細胞の膜分画を抗原として作製したモノクローナル抗体 24D2 は、JCV 感染に対し、顕著な抑制効果を有することが明らかとなり、この抗体によって認識される約 60kDa の分子が IMR-32 細胞への JCV 感染において重要な機能を担って可能性が示唆された。今回確立したイムノスクリーニングシステムによる感染阻害抗体の探索は、ウイルス感染制御法の開発にも生かしていくことができると期待される。以上の学位論文の発表

内容に対し、志田久寿教授から JCV が細胞内に侵入する機構、取得抗体の認識する分子の細胞内分布について、取得抗体のアイソタイプが IgM であったことに対する改良点についての質問があった。次いで瀬谷司教授から現在報告されている JCV の受容体との関連性、ウイルス存在下、非存在下におけるこの分子の細胞内動態についての質問があった。また、長嶋和郎教授から JCV 非感受性細胞における分布、JCV 持続感染臓器と考えられている腎臓における分布についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は過去の実験データや参考文献を引用し、志田教授の質問に対しては、JCV は最初シアル酸に吸着し、その後なんらかの分子によってクラスリン依存性エンドサイトーシスによって細胞内へ侵入し核内へ移行すること、詳細な検討は未だ行っていないが、取得抗体によって認識される分子の細胞内分布は細胞膜部分と、細胞質内に一部陽性であることから、膜から細胞内へ移行している分子と推測されること、アイソタイプが IgM であったことに対しては、今回の免疫回数は 5 回であり、免疫効果を充分確認した上でハイブリドーマの作製を行っているが、最終免疫後にさらに免疫効果について検討を行うとより良い結果を得られた可能性があるとして解答した。また、瀬谷教授の質問に対しては、昨年報告された JCV 受容体の一つとして考えられるセロトニン受容体については、実際に抗体を購入してウェスタンブロットによって検討したが、IMR-32 細胞における分子量が 24D2 抗体によって検出される分子とは異なる点から両者は異なる分子と考えられること、細胞内動態については、ウイルスを感染させない状態については観察していないが、ウイルスを感染させた状態でタイムコースを追うと、細胞質内で共局在を示す所見が得られていることを解答とした。長嶋教授の質問に対しては、様々な JCV 非感受性細胞においても、ウェスタンブロットで 24D2 抗体の陽性反応を検出することができた事、しかしながら、細胞株によっては分子量の異なる位置に検出された点、また、腎臓における詳細な検討は今後行っていく旨を解答とした。

この論文は、JCV 感染阻害抗体を単離した点で高く評価され、今後の JCV 感染機構のさらなる解明が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、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。