

学 位 論 文 題 名

Pharmacological cdk inhibitor *R*-Roscovitine
suppresses JC virus proliferation

(cdk 阻害剤 *R*-Roscovitine による JCV 増殖抑制効果の検討)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】JC ウイルス (JCV) は *Polyomavirus* 属に分類され、主に免疫不全状態において活性化し、進行性多巣性白質脳症 (progressive multifocal leukoencephalopathy, PML) を惹起するウイルスである。PML は後天性免疫不全症候群 (AIDS) の流行に伴い、近年増加しているが、有効な治療法は未だ確立していない。JCV は 2 本鎖環状の DNA ゲノムを持ち、宿主細胞のタンパク質を利用して、核内でウイルスの複製、転写を行う。JCV の複製開始において、宿主細胞の cyclin dependent kinase (cdk) が JCV の早期タンパク質である Large T 抗原 (TAg) をリン酸化することが重要である。近年、Pharmacological cdk inhibitor である *R*-Roscovitine が、宿主細胞内の cdk を利用しているウイルスに対して、抗ウイルス作用を有することが報告されている。*R*-Roscovitine は cdk1, 2, 7, 9 の特異的阻害剤であり、抗がん剤として現在治験の第二相試験が行われている。本研究では、JCV 感染細胞を用いて *R*-Roscovitine の JCV に対する増殖抑制効果について検討を行った。

【方法と結果】

- ① JCV 感染による宿主細胞の cytopathic effects (CPE) に対する Roscovitine (Rosco) の抑制効果を検討した。JCV 感染許容細胞であるヒト神経芽細胞腫由来 IMR-32 細胞に JCV 感染後 8 日目から Rosco (10 μ M) または、対照として DMSO を培地中に加え、細胞増殖並びに細胞死を検討した。その結果、DMSO 処理を行った細胞では JCV 感染後 20 日前後から CPE が観察され、30 日までに細胞はほぼ死滅したが、Rosco 処理した細胞は増殖を続け CPE は認められなかった。
- ② 次に IMR-32 細胞由来の JCV 持続感染細胞である JCI 細胞を用いて、Rosco のウイルス感染価に対する影響を Hemagglutination assay (HA) により検討した。その結果、Rosco 処理後 12 日で、JCI 細胞のウイルス感染価は、対照群の約 10% に低下した。
- ③ Rosco 処理を行った JCI 細胞の、JCV のタンパク質の発現を、immunoblotting により解析した。その結果、Rosco の濃度依存的ならびに処理日数依存的に早期タンパク質 (TAg)、および後期タンパク質 (VP1, Agnoprotein) の発現は減少した。また、Rosco で 10 日間処理した JCI 細胞では対照群に比べて、TAg 陽性細胞数が顕著に減少していることを flow cytometry にて確認した。さらに、Rosco 処理後の JCI 細胞におけるウイルスタンパク質の mRNA 量を quantitative RT-PCR にて測定した。JCV タンパク質の mRNA は、Rosco 処理時間に伴い減少していた。
- ④ Rosco による JCV タンパク質発現抑制の機構を検討するため、Rosco の JCV 早期、後期方向の転写活性に対する影響を検討した。JCV 転写調節領域を早期方向、後期方向にそ

れぞれ含むレポータープラスミドを IMR-32 細胞に導入し Luciferase assay, Transcription assay を行った。その結果、Rosco 存在下では、JCV 転写活性は早期方向では対照に比べて変化を認めなかったが、後期方向の転写活性は 50%程度に低下した。

⑤ Rosco の JCV ゲノムの複製に対する影響を調べるため、IMR-32 細胞に JCV *ori* 領域を含むプラスミドならびに TAg 発現プラスミドを同時に導入し、Rosco または DMSO 存在下で *DpnI* replication assay を行い、複製した DNA を Southern blotting にて検出した。その結果、JCV ゲノムの複製は Rosco 処理により、対照に比べて 50%程度に減少した。

⑥ Rosco による JCV ゲノムの複製阻害と、TAg のリン酸化の阻害について検討した。Rosco または DMSO 処理した JCI 細胞の lysate を用いて、抗 TAg 抗体による immunoprecipitation を行い、cdk 認識配列である threonine-proline (TP)のリン酸化を認識する抗体を用いて immunoblotting を行い、リン酸化 TAg を検出した。その結果、Rosco 処理細胞では TAg 上の cdk 認識配列のリン酸化が顕著に低下していた。

【考察】 *R*-Roscovitine は宿主細胞の増殖に影響を与えない濃度で、JCV の増殖を抑制し、感染によって引き起こされる細胞死を阻止した。JCV 増殖抑制機序の一つとして、cdk による TAg のリン酸化が阻害されたことによる、JCV ゲノムの複製阻害が考えられた。また、JCV の後期転写活性は、宿主細胞内因子を介して cdk によって制御されている可能性が示唆された。

宿主側のタンパク質を治療標的とした薬剤の場合、生体内での副作用が問題となる場合が多い。しかし Roscovitine は、これまでの動物実験や治験の結果で重大な副作用は報告されていない。また、*R*-Roscovitine は、ラットを用いた動物実験で血液脳関門を通過することが報告されている。今後、抗ウイルス薬としての治験が進み、生体内での安全性が確認できれば、PML の治療薬としての有用性が期待出来ると考えられた。

【結語】 *R*-Roscovitine は *in vitro* において JCV の複製および後期転写活性を低下させ、その増殖を抑制した。本研究により、*R*-Roscovitine は JCV に対する抗ウイルス薬の候補として PML の治療に有用である可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 笠 原 正 典

副 査 教 授 畠 山 鎮 次

副 査 教 授 有 川 二 郎

学 位 論 文 題 名

Pharmacological cdk inhibitor *R*-Roscovitine suppresses JC virus proliferation

(cdk 阻害剤 *R*-Roscovitine による JCV 増殖抑制効果の検討)

この学位論文は、進行性多巣性白質脳症 (progressive multifocal leukoencephalopathy, PML)の原因ウイルスである JC ウイルス(JCV) に対する抗ウイルス薬の開発を目的とし、*in vitro* において、cdk 阻害剤の一つである *R*-Roscovitine による JCV の増殖抑制効果を検討した論文である。この研究の結果、Roscovitine は、宿主細胞の増殖に影響を与えない濃度でウイルスの増殖を抑制し、感染による CPE を阻止することを明らかにした。Roscovitine はウイルスの早期、後期ウイルスタンパク質の発現、およびウイルス mRNA の発現を抑制し、これらのウイルス遺伝子発現抑制機序として、JCV の後期転写活性、およびウイルス DNA 複製が Roscovitine により抑制されることを明らかにした。また、Roscovitine による T 抗原のリン酸化の低下が、ウイルス複製阻害機序の一つである可能性を示した。これらの結果から、Roscovitine が JCV に対する抗ウイルス薬として有用である可能性が示唆された。

公開發表での質疑応答では、はじめに副査である畠山教授から次の質問がなされた。今回用いた Roscovitine の濃度はどのように決定したかについて、また、用いた薬剤濃度では細胞周期に影響を与えていないことから、細胞周期に関わらない cdk 等の関与の可能性や、各細胞周期で止めた場合の抗ウイルス効果についての質問がなされた。これらの質問に対し、Roscovitine の濃度は、抗癌剤として用いられている濃度よりも低い濃度で、宿主細胞の増殖が停止しない範囲で検討したこと、細胞周期に関わらない cdk として cdk5 が関与している可能性があり、cdk5 がオリゴデンドロサイトにおいても活性があることを回答した。最後の質問には、細胞周期を揃えた状態での検討は行っていないが、JCV 感染細胞が G2 期に集積することから、G2 期においても Roscovitine の効果が得られるのではないかと推測を回答した。次いで主査の笠原教授からは、PML の動物モデルの有無について、細胞毒性が見られずにウイルス増殖が抑えられた点について、免疫不全状態において PML が発症する機序についての質問がなされた。これらの質問に対し、JCV は種特異性が強く動物モデルが存在しないこと、ウイルスの増殖のみを阻害できる薬剤の至適濃度がある可能性については、cdk5 が関係している可能性以外に、通常細胞には無いウイルス複製の場に

ある基質よりも、cdk が本来働くべき宿主細胞内の基質の方が特異性が高いのではないかという推測を回答した。PML 発症の機序については、これまでの報告を基に、脳内で増殖する JCV は再構成された増殖型のウイルスであり、このようなウイルスがどのような機序で再活性化しているかについてはまだ不明であることを回答した。これに対し笠原教授からは、脳へのウイルスの侵入をブロックできる薬剤があれば有用である可能性についてコメントがあった。また、後日個別に行われた副査の有川教授からの質問では、笠原教授の質問と同様に、動物モデルについて、PML 発症機序についての質問がなされた他、Roscovitine が HIV-1 や HSV など多くの他のウイルスでも抗ウイルス効果があることから、今後抗ウイルス薬として臨床応用される可能性について質問がなされた。この質問に対し、現在抗ウイルス薬としても治験に入る準備を進めているという報告があることを回答した。

この論文は、*in vitro* において R-Roscovitine が JCV の増殖抑制効果を持つことを明確に示し、この薬剤が JCV に対する抗ウイルス薬として有用である可能性を示した点で高く評価され、今後の PML 治療薬の開発につながることを期待される。

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。