

学 位 論 文 題 名

メチル化CpG結合タンパク質MeCP2とJCウイルスタンパク質の 相関に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 JC ウイルス (JCV) は simian virus 40, BK ウイルス等が含まれるポリオマウイルスに属する。進行性多巣性白質脳症 (progressive multifocal leukoencephalopathy, PML) は、後天性免疫不全症候群や造血器系腫瘍などに罹患し、免疫抑制状態にある患者に発症する致死性の疾患であるが、効果的な治療法は未だ確立されていない。PML脳組織の病理組織学的特徴は、多巣性の脱髄病変と、病変部での腫大した核を有する乏突起膠細胞、奇怪な核を有する巨大な星細胞の出現である。

JCV は、5130 塩基対の 2 重鎖環状 DNA から成るゲノムとカプシドより構成される。JCV のゲノムは転写調節領域、Large T 抗原 (T antigen, TAg) と small t 抗原をコードする早期遺伝子、および VP1, VP2, VP3 と agnoprotein をコードする後期遺伝子を含む。TAg はウイルス DNA の複製やウイルスタンパク質の転写を制御し、また宿主細胞の増殖および細胞周期に影響を与えることが知られている。

メチル化 CpG 結合タンパク質 MeCP2 (Methyl CpG binding protein 2, MeCP2) は X 染色体にコードされる核タンパク質で、遺伝子の CpG 配列に結合して転写活性を制御する機能を有し、クロマチンの構造や RNA スプライシングに関与することも報告されている。MeCP2 は神経の発達やシナプス形成に重要な作用を有し、発現量は厳密に制御されており、MeCP2 の変異は X 連鎖性の神経発達障害である Rett 症候群の原因である。MeCP2 は 2 つのアイソフォーム、すなわち MeCP2A と MeCP2B を有するが、MeCP2A は神経系細胞において細胞死をもたらすことが報告されている。

PML 脳病変部の免疫染色において、TAg を発現する細胞で核の MeCP2 陽性像が多数認められるが、その意義や機序は不明である。今回の研究では、培養細胞を用いた *in vitro* の系にて、MeCP2 の発現と JCV TAg の関連性について検討した。

【材料と方法】 今回の実験では、10 種のヒト神経系細胞株 (IMR-32, U-87 MG, U-138 MG, U-251 MG, U-343 MG, T98G, KMG4, SH-SY5Y, SK-N-SH, SVG-A) および 6 種のヒト非神経系細胞株 (Caco-2, HCA-7, HEK 293, MCF7, HeLa, A431NS) を使用した。最初に JCV TAg による MeCP2 プロモーター活性への影響について、JCV 感受性のある IMR-32 細胞を用いて、ルシフェラーゼアッセイにて検討した。次に JCV TAg が MeCP2 の mRNA 発現に与える影響について、13 種の細胞株を用いてリアルタイム PCR にて検討した。続い

て JCV TAg が MeCP2 タンパク質の発現に与える影響について、16 種の細胞株を用いてイムノブロット法にて検討した。さらに、MeCP2 タンパク質の過剰発現が、JCV 早期および後期遺伝子転写調節領域の活性に与える影響について、IMR-32 細胞を用いてルシフェラーゼアッセイにて検討した。最後に、MeCP2 タンパク質の過剰発現が、JCV タンパク質の発現に与える影響について、IMR-32 細胞を用いてイムノブロット法にて検討した。

【結果】 今回の研究において以下の新知見が得られた。(1) IMR-32 細胞において、JCV TAg の発現により、MeCP2 プロモーター活性は著明に亢進する。(2) IMR-32 細胞において、JCV TAg による MeCP2 プロモーター活性の亢進には、MeCP2 exon 1 より 307-257 塩基上流と、178 塩基上流から exon1 開始 9 塩基までの配列が重要である。(3) ヒト神経系 7 種および非神経系 6 種の細胞株において、JCV TAg による MeCP2 mRNA 発現上昇は明らかでない。(4) ヒト神経系 10 種および非神経系 6 種の細胞株において、JCV TAg による MeCP2 タンパク質発現亢進は明らかでない。(5) MeCP2 タンパク質の過剰発現は、JCV TAg 共発現下において、JCV 早期および後期遺伝子転写調節領域の活性を亢進させない。(6) MeCP2 タンパク質の過剰発現は、JCV TAg, Vp1, agnoprotein の発現を上昇させない。

【考察】 PML 脳では JCV TAg 発現細胞で MeCP2 陽性細胞を多数認めるが、*in vitro* では JCV TAg により MeCP2 のプロモーター活性は上昇するにも関わらず、MeCP2 の mRNA およびタンパク質発現の亢進は認めず、プロモーター活性と mRNA およびタンパク質発現は乖離していた。この乖離については複数の原因が考えられるが、第一にマイクロ RNA による転写後修飾の可能性や、mRNA あるいはタンパク質が急速に分解される可能性が考えられる。次に PML 患者脳と、今回の *in vitro* の系における、他の様々な転写調節タンパク質をコードする遺伝子の脱メチル化やアセチル化の状態の差異も考慮される。

PML 脳の JCV TAg 陽性細胞において多数の MeCP2 陽性細胞を認めることの意義については未だ明らかにされていないが、MeCP2 はヘルペスウイルスの潜伏感染に関与すると報告されている。JCV も健常人においては潜伏感染しており、PML 脳における JCV TAg 陽性細胞での MeCP2 発現が、PML の病態に直接または間接的に関与している可能性も考えられる。

【結論】 本研究で JCV TAg は、MeCP2 のプロモーター活性を亢進させるが、MeCP2 の mRNA およびタンパク質の発現レベルは変化させなかった。本乖離の原因として、転写後調節等が関与することが示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	志田 壽利
副査	教授	田中 伸哉
副査	教授	有川 二郎
副査	准教授	矢部 一郎

学位論文題名

メチル化CpG結合タンパク質MeCP2とJCウイルスタンパク質の 相関に関する研究

．進行性多巣性白質脳症（PML）は、JC ウイルス（JCV）により惹起される致死性疾患であるが効果的な治療法は未だ確立されていない。Methyl CpG binding protein 2 (MeCP2) は DNA プロモーター領域の転写を制御する分子である。PML 脳では、JCV T 抗原（T antigen, TAg）が発現している乏突起膠細胞において MeCP2 発現細胞が多数認められることが免疫染色にて判明し、MeCP2 の発現が JCV の感染に関与する可能性が考えられた。本研究では *in vitro* の系で JCV TAg による MeCP2 のプロモーター活性を詳細に検討すると共に、JCV TAg による MeCP2 発現の影響を検討した。JCV TAg により MeCP2 プロモーター活性は上昇するにも関わらず、mRNA およびタンパク質発現の亢進は認めず、プロモーター活性と mRNA およびタンパク質発現に乖離が認められた。乖離の原因として、microRNA (miRNA) による転写後修飾機構が関与する可能性が考えられた。また本実験系での episomal なプロモーター活性が endogenous なプロモーター活性を正確に反映していない可能性や、今回の実験系でクローニングした MeCP2 のプロモーター領域外の配列が JCV TAg によるプロモーター活性に影響した可能性も否定できず、乖離の原因にエピジェネティックな制御機構が関与する可能性も考えられた。

発表後、副査の有川二郎教授より、まず PML 脳の脱髄機序について質問があり、JCV が乏突起膠細胞に感染することで髄鞘が破壊され脱髄が生じると回答した。次にメフロキンが JCV 感染に作用する機序について質問があり、メフロキンが JCV DNA 複製を阻害すると回答した。続いて PML モデル動物について質問があり、JCV はヒト特異的に感染するウイルスであり PML モデル動物は存在しないが、サルにおいて、SV40 とサル免疫不全ウイルスの重複感染により PML と同様の白質脳症が発症すると報告されていると回答した。副査の矢部一郎准教授からは、まず JCV 感染経路と潜伏感染、乏突起膠細胞への感染経路について質問があり、JCV は幼・小児期に経気道感染し、扁桃やリンパ節で初期増殖した後、骨髄、腎で潜伏感染し、免疫能が低下した際に血行性

に中枢神経系に到達すると考えられていると回答した。続いて PML 脳での免疫染色において、JCV 感染細胞のうち全てに MeCP2 発現が認められるわけではない理由についての質問では、JCV 感染細胞における感染時期の違いが MeCP2 発現に関与する可能性が考えられると回答した。さらに今回の実験で神経芽細胞種細胞株 IMR-32 を主に使用した理由についての質問で、IMR-32 は JCV 感受性を有する限られた細胞腫の一つで、JCV 感染実験をはじめとした *in vitro* で使用できるヒト乏突起膠細胞株の系が存在しないと回答した。また PML 脳の miRNA 発現の変化について質問があり、今回の実験では検討できなかったが、MeCP2 は脳で高発現する miRNA132 により発現が抑制されており、PML 脳病変部において miRNA132 発現が低下していれば MeCP2 発現が亢進する可能性があるかと回答した。副査の田中伸哉教授からは、エピジェネティックな影響としてゲノムのメチル化やアセチル化の状態は検討したか質問があり、脱メチル化剤 5-azacytidine やヒストン脱アセチル化酵素阻害薬のバルプロ酸を投与した予備実験も行ったが、MeCP2 タンパク質の発現に変化を認めなかったことを回答した。最後に主査の志田壽利教授からは、PML 脳の免疫染色像から MeCP2 が JCV 感染にどう関与すると考えられるか質問があり、本実験系においては明らかにできなかったが MeCP2 発現亢進が JCV 増殖を亢進させる機序が存在する可能性を当初考えていたことを回答した。また *in vivo* の現象を *in vitro* で再現できなかった理由についての質問では、発表中の考察に加え、実験系で使用可能な細胞株が乏突起膠細胞でないため細胞特異性により再現できなかった可能性や、本実験で使用した JCV Mad-1 株が免疫染色で使用した PML 脳から分離培養した株ではないことから、ウイルス株の variant が実験での結果に影響した可能性について回答した。

本研究は PML の病態解明に関する基盤的研究として高く評価され、現在 *in vivo* モデルの存在しない PML の実験系の確立に重要な知見がもたらされると期待される。

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。