

「脳を守る」

平成10年度採択研究代表者

長嶋 和郎

(北海道大学医学部 教授)

「ウイルス性脳障害の発症機構の解明と治療法の開発」

1. 研究実施の概要

本研究は、ウイルスから”脳を守る”ことを主眼とする。ウイルスによる脳の障害は多くの場合致命的であるが、その大きな理由の1つは、脳血管疾患とは異なり、ウイルスによる障害ではその病変が脳の広範囲にわたることである。

また、脳血管疾患では画像診断が発達しており、手術による治療も可能であるが、ウイルス性脳障害は有効な治療法がほとんど確立されていない。現在、神経科学の分野で多くの神経細胞特異的な栄養因子、受容体分子、転写因子をコードする遺伝子が単離されてきているが、損傷された複雑な生命現象を制御する中枢神経系を3次元的に修復する方法は未だ確立されていない。

さらに、近年、ウイルス性脳障害は増加している。なぜならば、HIV感染症の増加、悪性腫瘍に対する化学療法の発達等による免疫不全状態における日和見感染症としての脳炎・脳症が増加しているためである。また、骨髄を代表とする移植治療に伴い脳炎・脳症の頻度は増加しており、ウイルスに起因する脳障害を克服することが、ひいては移植医療の正否を決めることになる。

本研究の画期的な点としては、様々なウイルス性脳障害に対して、従来のように個々のウイルスについて個々にその治療薬を探索する方法は行わないことである。

まず第一にヒト脳組織を特異的な標的とする遺伝子治療用のウイルスベクターを開発する。

次にその応用として個々のウイルスの増殖をゲノムの転写レベルで抑制することを目指す。ヒト脳組織特異的ウイルスベクターはポリオーマウイルスであるJCウイルスを基礎にして開発する。従来のレトロウイルスベクターやアデノウイルスベクターを用いない理由は、JCウイルスは神経親和性が極めて高いこと、他臓器への感染がほとんど認められないことである。本研究では、まずJCウイルスが高い神経親和性を有するメカニズムを、ウイルス受容体、ウイルスゲノムの転写調節領域の塩基配列、転写因子レベルから解明する。さらに、脳障害をひき起こす様々なウイルスを転写レベルで抑制するために、個々のウイルスにおいて神経組織での増殖に必須である分子を同定する。

以上の結果を統合して、最終的にはウイルス性脳障害の治療法を開発することを最終目的とする。

2. 研究実施内容

(1) JC ウイルス受容体の単離

① cDNA ライブラリー発現クローニング

発現クローニング法の第一段階として、JC ウイルス感染細胞である IMR-32 細胞から cDNA ライブラリーを作成した。更に偽ウイルスの作成は外殻蛋白質 VP1,VP2,VP3 を別々に発現させる vector を co-transfection したもの、およびそれらを同時に発現させ得る vector を transfection したものをを用いて発現実験を行っている。さらに昆虫細胞を用いて VP1 を code した recombinant baculovirus を用いて、同様の実験を行い何れの方法が最も良い効率かを検討している。現在各々の plasmid の発現は western blotting で確認したので、cell extract を用いて HA assay、negative staining で粒子形成を確認している段階である。

② 酵母 Two-hybrid 法を用いた VP1 結合分子のクローニング

JC ウイルス最外殻蛋白質である VP1 の全長、および C 端、N 端、細胞結合 domain と考えられている BC、DE、HI 領域を各々 Gal4 DNA binding domain を持つ vector である pGBT9 に subcloning して sequence 後、human brain cDNA ライブラリーをスクリーニングしている。また得られた陽性クローンに関しても sequence を行った後、真核細胞発現 vector に subcloning し、真核細胞での VP1 との結合を免疫沈降法を用いて確認している。また新しい assay 法として myristylation signal を持った cDNA library と Cdc25 を rescue する Sos gene と結合させた bait を用いた CytoTrap 法を用いて VP1 結合分子の screening を行うことを予定している。

③ カラムによる精製

tag として GST を持つ VP1 を code した recombinant baculovirus を作成して昆虫細胞に感染させ、大量の蛋白を作成して、GST との affinity を利用してカラムを作成している。カラムが出来上がり次第、IMR-32 細胞の膜分画蛋白を apply して VP1 結合蛋白の精製を行う。

(2) 神経特異的転写因子の同定

① 酵母 One-hybrid 法による神経特異的転写因子の同定

JC ウイルスの調節領域で原始型(archetype)から PML type へ rearrangement が起こる際に欠失する領域を bait として、human brain cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、5 クローンの未知の蛋白質がその領域に結合することが判明した。現在 IMR-32 細胞を用いて JC ウイルス PML 型の後期転写領域に luciferase を結合した reporter vector を用いて luciferase assay で転写に対する影響を確認

している。

② Dual luciferase assay を用いた JC ウイルス調節領域の転写活性の検索
HTLV-1 陽性の症例で JC ウイルスによって生じる進行性多巣性白質脳症(PML)の
病変が高度であるという事実に基づき、HTLV-1 の機能蛋白質である Tax 存在下
での JC ウイルス調節領域の転写活性を種々のヒト glia 系および末梢神経系の cell
line を用い、Dual luciferase assay により検索した。この実験により cell line に
よって反応は異なっていたが、Tax は JC ウイルスの archetype、PML type と
も転写活性を亢進させ、また Tax の signal pathway の主要因子である NFkB の
結合領域を削除した JC ウイルス調節領域の deletion mutant、NFkB を恒常的に
抑制する機能を持つ IkB の dominant negative mutant、さらに NFkB pathway
を活性化しない Tax の mutant を用いた実験により Tax は JC ウイルス調節領域
の NFkB 結合領域を介して JC ウイルスの転写制御を行っていることが判明した。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- Nagashima T, Mori M, Katayama K, Nunomura M, Nishihara H, Hiraga H, Tanaka S, Goto Y, and Nagashima K: Adult Leigh syndrome with mitochondrial DNA mutation at 8993. *Acta Neuropathol* 97 : 416-422 , 1999
- Takahashi RH, Nagashima K, Kurata T, and Takahashi H: Analysis of human lymphotropic T-Cell virus type II -like particle production by recombinant baculovirus- infected insect cells. *Virology* 256: 371-380, 1999
- Miyazaki H, Okuma Y, Fujii Y, Nagashima K, and Nomura Y: Glial cell line-derived neurotrophic factor protects against delayed neuronal death after transient forebrain ischemia in rats. *Neuroscience* 89: 643-647, 1999
- Suzuki T, Ogata A, Tashiro K, Nagashima K , Tamura M, and Nishihira J: Augmented expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the telencephalon of the developing rat brain. *Brain Res* 816: 457-462, 1999
- Nagashima T, Okawa M, Kitamoto T, Takahashi H, Ishihara Y, Ozaki Y, and, Nagashima K. : Wernicke encephalopathy-like symptoms as an early manifestation of Creutzfeldt-Jakob disease in a chronic alcoholic. *J Neurol Sci* 163: 192-198, 1999.