

「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

ウイルス性脳障害の発症機構の解明およびその知見に基づく治療法を開発する為に、ヒト脳に進行性多巣性白質脳症 (Progressive multifocal leukoencephalopathy; PML) を惹起するJC virus (JCV) をモチーフとし、その脳組織特異性を以下の2つのアプローチにより研究を行っている。

(1) JCV 受容体の研究

JCVの外殻蛋白を用いて作成した人工ウイルス (JCVのウイルス遺伝子を含まない殻だけの粒子) を作成し、粒子の形態をとることを電子顕微鏡、免疫電顕で確認した。さらに人工ウイルスが霊長類のみならず、マウスやラット等のげっ歯類細胞等に対して幅広く細胞内に侵入し核内へ到達すること、この侵入はシアリダーゼにより消失することを蛍光色素で標識した人工ウイルスを用いて明らかにした (Virology, 2001, in press)。以上の結果からJCVの脳組織特異性は受容体非依存性であり、神経特異的転写因子等により特異性が規定されていることが示唆された。

さらにこの人工ウイルスを遺伝子治療用のベクターとして利用することを試みている。人工ウイルスを低浸透圧の条件下にすることにより、一時的に粒子を解離させ、その際蛍光を発する外来遺伝子を殻の中に取り込ませた。この蛍光発色遺伝子を含んだ人工ウイルスを細胞に吸着させ、経時的に観察を行なった所、細胞に蛍光蛋白が発現することが証明され、人工ウイルスが外来遺伝子を細胞に運搬するベクターとしての役割を持つことを証明した。今後はPMLモデルを作成してウイルス蛋白のアンチセンスDNA等を人工ウイルスに取り込ませて病変に対する効果を判定する。

(2) 神経特異的転写因子の研究

受容体の研究により、JCVの神経組織特異性は細胞の転写調節因子により制御されていることが示唆された。神経特異的転写因子の単離を行なう為に以下の実験を行っている。

JCV感染細胞からJCVの種々のクローンを単離した後、調節領域をPCRで増幅

し、塩基配列を検索する。調節領域の塩基配列を比較することにより全てのクローンで共通している塩基配列を決定して、その配列を基にしてプローブを作成し神経系細胞および非神経系細胞の核分画を抽出してゲルシフトアッセイを行ない、差異が有るプローブを決定する。このプローブの塩基を基にしてDNAアフィニティーカラムを作成して、転写因子を単離する。単離後はこの転写因子結合領域を基にして、神経系でのみ発現が onとなるvectorを作成して、(1)で作成した人工ウイルスに取り込ませることにより、神経特異的発現ベクターを構築する。

2. 研究実施内容

研究目的：

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三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成否を決めることになる。

本研究では、まずJCV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遺伝子配列、転写因子レベルから解明する。

以上の結果を統合して、JCVの外殻蛋白、および転写調節領域を有し脳組織特異的に種々の分子を発現させ得るウイルスベクターを作成することにより、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。

研究方法：

(1) JCV受容体の単離

JCVの受容体の単離は以下に述べる

- 1) 人工ウイルスを用いたオーバーレイアッセイ法、
- 2) 外殻蛋白VP1アフィニティーカラムによる単離を組み合わせた方法で行っている。

人工ウイルスは大腸菌およびバキュロウイルスを用いた系でJCV外殻蛋白であるVP1を発現させ、JCVの外殻蛋白を用いて作成した人工ウイルス(JCV

のウイルス遺伝子を含まない殻だけの粒子)を作成し、粒子の形態をとることを電子顕微鏡、免疫電顕で確認した。さらに人工ウイルスが霊長類のみならず、マウスやラット等のげっ歯類細胞等に対して幅広く細胞内に侵入し核内へ到達すること、この侵入はシアリダーゼにより消失することを蛍光色素で標識した人工ウイルスを用いて明らかにした。またこの人工ウイルスをJCV感染細胞の膜分画と混合して、新たに作成した抗VP1抗体を用いてオーバーレイアッセイを行なった。人工ウイルスと結合し、バンドとして確認された分画をMALDI-TOF/MAS法による質量分析を行ない、候補を選択する。候補の蛋白質は再度人工ウイルスをJCV感染細胞の膜分画と混合して抗VP1抗体で免疫沈降した分画を用いたwestern blotting法で確認する。

(2) 神経特異的転写因子の同定

JCV感染細胞からJCVの種々のクローンを単離した後、調節領域をPCR法を用いて増幅し、シーケンサーにより塩基配列を決定する。これら種々のクローンの調節領域の塩基配列を比較することにより、全てのクローンで共通している塩基配列を決定して、JCVの転写に最小限必要である配列を決定する。この配列を基にしてプローブを互いに重なる様に作成する。このプローブを用いてJCV感染が可能である神経系細胞および感染が起こらない非神経系細胞の核分画を抽出してゲルシフトアッセイを行ない、差異が有るプローブを決定する。このプローブの塩基配列を基にしてDNAアフィニティーカラムを作成して、転写因子を単離する。

(3) 細胞内シグナル伝達機構の解析

“脳を守る”という研究を推進して行く上での基礎として、細胞内の蛋白の制御機構を解明することを目的としてキメラ蛋白質SYT-SSX1のクロマチンリモデリング因子との相互作用を検索した。

(4) 多動性障害モデルラットの解析

北海道大学染色体研究所との共同実験で特許出願した注意欠陥多動性行動障害(Attention deficit hyperactive disorder ; ADHD)のモデルラット(wiggling rat)の比較遺伝子地図を作成し、原因遺伝子の単離を進めている。

結論：

(1) JCV受容体

作成した人工ウイルスおよびJCVを種々の細胞に吸着させる実験を行ない、JCVは霊長類のみならず、マウスやラット等のげっ歯類細胞等に対して幅広く細胞内に侵入し核内へ到達すること、この侵入はシアリダーゼにより消失することを明らかにした(Virology, in press)。以上の結果からJCVの脳組織特異性は受容体非依存性であり、神経特異的転写因子等により特異性が規定されてい

ることが示唆された。

(2) 神経特異的転写因子

Adult T-cell leukemia/lymphoma の患者でPML病変が高度であったことから、HTLV-I TaxがJCVを活性化するという仮説を立て、解析を行なった。その結果TaxはJCV調節領域のNF-kappa B結合領域を介してJCVを活性化することを証明した。またこの活性化が神経系細胞特異的であることをNF-kappa B結合領域をプローブとしたゲルシフトアッセイを行ない、その機序を解明した (J Biol Chem, 275 : 17016-17023, 2000)。現在ゲルシフトアッセイにより、神経系細胞および感染が起こらない非神経系細胞の間で差異が有るDNA配列が同定され、それを用いたDNAアフィニティーカラムを用いて転写因子の単離を行っている。

(3) 細胞内シグナル伝達機構の解析

SYT-SSX1発現誘導細胞株を樹立して形質転換能がクロマチンリモデリング因子hBRMを介して細胞を形質転換していることを明らかにし報告した (Proc Natl Acad Sci USA 98, 3843-3848, 2001)。

(4) 多動性障害モデルラットの解析

肝炎・肝癌のモデルであるLEQ (Long Evans Cinnamon) ratの中から異常行動を示すrat (wiggling rat) を見出し、遺伝学的解析によりその行動異常がWilson病とは異なった単一遺伝子による病態であることを確認し、その遺伝子を有するcongenic ratを樹立した。このラットの特許出願を行い (特願平 : 11-375380) その後報告した (Comparative Medicine, in press)。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Okada Y, Sawa H, Tanaka S, Takada A, Suzuki S, Hasegawa H, Umemura T, Fujisawa J, Tanaka Y, William W. Hall and Nagashima K : Transcriptional Activation of JC Virus by Human T-lymphotropic Virus Type I tax protein in Human Neuronal Cell Lines. J Biol Chem 275 : 17016-17023, 2000.

Shintaku M, Matsumoto R, Sawa H, Nagashima K: Infection with JC virus and possible dysplastic ganglion-like transformation of the cerebral cortical neurons in a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. J Neuropathol Exp Neurol 59 : 921-929, 2000

Ozaki Y, Sawa H, Okada Y, Tanaka S, Sawamura Y, Nakamura H, Nagahima K : Investigation of JCV the genome and protein in human medulloblastomas. Brain Tumor Pathology 17 : 72, 2000

Shishido-Hara Y, Hara Y, Larson T, Yasui K, Nagashima K and Gerald L. Stoner.: Analysis of Capsid Formation of Human Polyomavirus JC (Tokyo-1 Strain) by

a Eukaryotic Expression System : Splicing of Late RNAs, Translation and Nuclear Transport of Major Capsid protein VP1, and Capsid Assembly. *J Virol* 74 : 1840-1853, 2000.

Nagashima T, Maguchi S, Terayama Y, Horimoto M, Nemoto M, Nunomura M, Mori M, Seki T, Matsukawa S, Itoh T and Nagashima K : P-ANCA-positive Wegener's granulomatosis presenting with hypertrophic pachymeningitis and multiple cranial neuropathies : Case report and review of literature. *Neuropathology* 1 : 23-30, 2000

Nagashima T, Kato H, Kase M, Maguchi S, Mizutani Y, Matsuda K, Chuma T, Mano Y, Goto Y, Minami N, Nonaka I, Nagashima K : Oculopharyngeal muscular dystrophy in a Japanese family with a short GCG expansion (GCG)₁₁ in PABP 2 gene. *Neuromuscul Disord* 10 : 173-177, 2000.

Fujita M, M.D, Furukawa, M.D, Hattori M, M.D, Todo S, M.D, Ishida Y M.D, and Nagashima K M.D, : Sequential Observation of Liver Cell Regeneration after Massive Hepatic Necrosis in Auxiliary Partial Orthotopic Liver Transplantation (APOLT) *Mod Pathol* 13 : 152-157, 2000.

Suzuki S, Tobiume M, Kameoka M, Sato K, Takahashi TA, Mukai T and Ikuta K: Exposeue of Normal Monocyte-Derived Dendritic Cells to Human Immunodeficiency Virus Type-1 Particles Leads to the Induction of Apoptosis in Co-Cultured CD4+ as Well as CD 8 + T Cells. *Microbiol Immunol* 44 : 111-121, 2000.

Furukawa H, Suzuki T, Maeng Bong Jin, Yamashita k, Taniguchi M, Magata S, Ishikawa H, Ogata K, Masuko H, Shimamura T, Fukai M, Hayashi T, Fujita M, Nagashima k, Omura T, Kishida A and Todo S : Prolongation of Canine Liver Allograft Survival by a Nobel immunosuppressant, FTY20. *Transplantation* 69: 235-241, 2000.

Furuta Y, Fumio O, Fukuda S, Inuyama and Nagashima K : Reactivation fo Varicella-Zoster Virusin Delayed Facial Palsy After Dental Treatment and Oro-Facial Surgery. *J Med Virol.* 62 : 42-45, 2000.

Ohba Y, Mochizuki N, Yamashita S, Andrew M. Chan, Joho W. Schrader, Hattori S, Nagashima K and Matsuda M : Regulatory Proteins of R-Ras, TC21/R-Ras2, and M-Ras/R-Ras3. *J Biol Chem* 275 : 20020-20026, 2000.

Miyazaki H, Ono T, Okuma Y, Nagashima K and Nomura Y : Glial cell line-derived neurotrophic factor modulates ischemia-induced tyrosine hydroxylase expression in rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 12 : 2038-2038, 2000.

Ohba Y, Mochizuki N, Matsuo K, Yamashita S, Nakaya M, Hashimoto Y, Hamaguchi M, Kurata T, Nagashima K and Matsuda M : Rap2 as a Slowly Responding Molecular Switch in the Rap 1 Signaling Cascade. *Mol Cell Biol* 20: 6074-6083, 2000.

Takahashi H, Iwata T, Kitagawa Y, Shoya Y, Takahashi HR, Nagashima K and Kurata T : Monoclonal Antibodies Against Topoisomerase I Suppressed DNA Relaxation and HIV- 1 cDNA Synthesis. *Hybridoma* 19(4) : 331-334, 2000

Yamashita S, Mochizuki N, Ohba Y, Tobiume M, Okada Y, Sawa H, Nagashima K and Matsuda M : CalDAG-GEFIII Activation of Ras, R-Ras, and Rap1. *J Biol Chem* 275 : 25488-25493, 2000.

Kawano N, Ohba Y and Nagashima K : Eosinophilic inclusions in ependymoma represent microlumina : a light and electron microscopic study. *Acta Neuropathol* 99 : 214-218, 2000.

Hiroi Y, Chen R, Sawa H, Hosoda T, Kudoh S, Kobayashi Y, Aburatani H, Nagashima K, Nagai R, Yazaki Y, Medof ME, Komuro I : Cloning of murine glycosyl phosphatidylinositol anchor attachment protein, GPAA1. *Am J Physiol Cell Physiol* 279 : C205-12, 2000