

「脳を守る」

平成10年度採択研究代表者

長嶋 和郎

(北海道大学大学院医学研究科分子細胞病理学 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)を対象とし、その脳組織特異性をJCV受容体の単離、神経特異的転写因子の同定、JCV後期蛋白質agnoのウイルス感染における役割について研究を行い、その基礎的事実に基づいた治療法を開発を研究している。

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が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し、得られた基礎的事実に基づいて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) 許容細胞膜画分を抗原としたモノクローナル抗体を作製し、外殻蛋白VP1から作製した人工ウイルスを蛍光標識し、膜画分への結合を抑制するELISA法を用いて人工ウイルスと膜画分の結合を抑制する抗体を単離して、その認識する蛋白を同定する方法で行っている。

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。

この人工ウイルスを用いて糖蛋白、糖脂質との結合をオーバーレイアッセイで検索して、ウイルス受容体の本体はシアル酸であることを明らかにした。

現在、許容細胞膜画分を抗原としたモノクローナル抗体を作製し、外殻蛋白VP1から作製した人工ウイルスを蛍光標識し、膜画分への結合を抑制するELISA法を用いて人工ウイルスと膜画分の結合を抑制する抗体を単離している。

(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。さらにUVクロスリンク法を用いてプローブと特異的に結合する蛋白をバンドとして認識し、種々のカラムを用いて転写因子を単離した。

(3) JCV の後期蛋白agnoprotein (agno)に関する研究

機能が不明であるJCV agnoproteinの核移行・核外移行シグナルの変異体を作製してagnoproteinの局在の変化およびウイルス粒子の細胞内局在との関係について検討する。

(4) 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明らかにする。

(5) 多動性障害モデルラットの解析

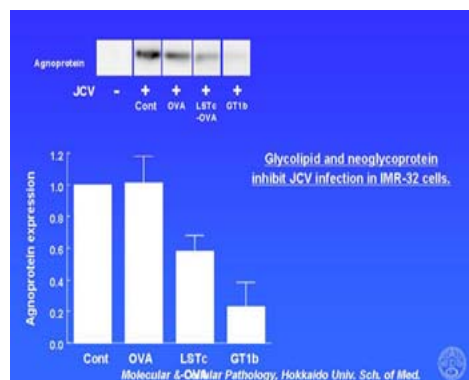
北海道大学染色体研究所との共同実験で既に特許を取得した注意欠陥多動性障害

(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 受容体の研究

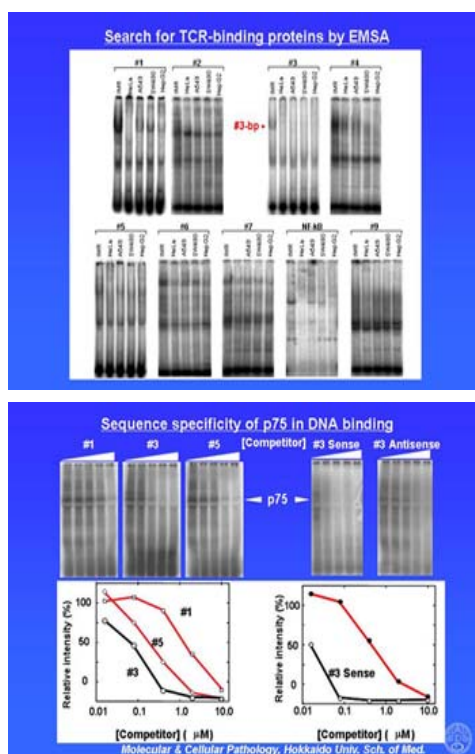
JCVを大量に調整するのは困難ゆえ、JCVの蛋白の中の外殻蛋白を大腸菌で作製し、virus-like particle (VLP: JCVのウイルス遺伝子を含まない殻だけの粒子)を作成した。このVLPがJCVと同様に粒子の形態をとることを電子顕微鏡、免疫電顕法で確認し、また赤血球凝集能も有している事を確認した。以上より、JCVと同様の機能を有するVLPを用いて、VLPが霊長類のみならず、マウスやラット等のげっ歯類細胞等に対して幅広く細胞内に侵入し核内へ到達すること、この侵入はシアリダーゼにより消失することを蛍光色素で標識したVLPを用いて明らかにした(*Virology*, 286: 100-112, 2001)。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の核内因子により特異性が規定されていることが明らかとなった。またVLPの細胞への進入がシアリダーゼにより阻害される事から、その受容体の本体はシアル酸であると予想し、VLPを用いて糖タンパク質と糖脂質に対するoverlay assayを開発した。VLPはシアロ糖タンパク質のFetuin、 α 1-acid glycoprotein、transferrin receptorに、2-3結合シアル酸とN結合糖鎖に依存して結合した。さらに2-3結合シアル酸または2-6結合シアル酸を持つ糖鎖をオバルブミンに結合させたネオ糖蛋白質を合成し、OVA単体ではVLP結合活性を持たないが、糖鎖を結合させたネオ糖蛋白質は結合活性を持つことから、シアル酸を含む糖鎖がJCVの受容体の本体である事を証明した。さらにVLPは様々な糖脂質、ラクトシルセラミド、ガングリオシドであるGM3、GD2、GD3、GD1b、GT1b、GQ1b、GD1aにも結合すること、ネオ糖蛋白質とガングリオシドであるGT1bが、JCVの細胞への感染を抑制することを明らかにし、これらの糖鎖を利用した抗ウイルス剤の開発の基盤を作った(上図)(*J Virol* 76: 12992-13000, 2002)。さらにこのVLPを遺伝子治療用のベクターとして利用することを目的として、VLPをEGTA, DTT存在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、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、経時的に観察を行い、細胞に蛍光蛋白が発現することを確認した。このように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。またVLPに蛋白質である蛍光色素を同様に取り込ませることも確認し、先に述べたJCV感染に対して抑制作用を持つ糖蛋白質をVLPを用いて細胞へ導入することも可能になった。今後はウイルス蛋白のアンチセンスDNAおよびRNAi、またはウイルス蛋白に対する抗体等をVLPに取り込ませてJCVの増殖を抑制することを試み、さらに、神経系細胞特異的にVLPが運ばれるようベクターに神経特異的に発現している蛋白の抗体を結合させて、神経特異的



なベクターを開発する。

(2) 神経特異的転写因子の研究

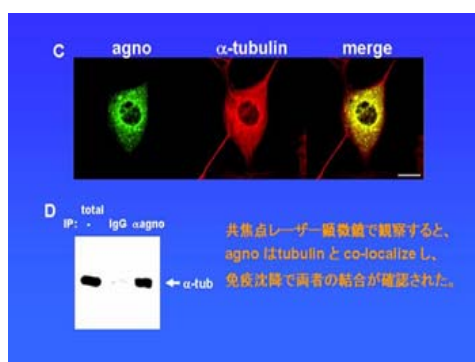
前述したようにJCV受容体は-シアル酸を含む糖鎖である事が明らかになり、JCVの神経組織特異性は細胞の転写調節因子により制御されていることが示唆された。神経特異的転写因子の単離を行なう為に以下の実験を行った。JCV感染細胞からJCVの種々のクローンを単離した後、調節領域を増幅し、塩基配列を検索する。調節領域の塩基配列を比較することにより全てのクローンで共通している塩基配列を決定して、その配列を基にしてプローブを作成し神経系細胞および非神経系細胞の核分画を抽出してElectrophoretic mobility shift assay (EMSA)を行ない、差異が有るプローブを決定する。さらにUVクロスリンク法を用いてプローブと特異的に結合する蛋白をバンドとして認識し、種々のカラムを用いて転写因子を単離した。右上図に示すようにプローブ#3を用いた場合に



JCV許容細胞の核分画のみにバンドが出現しており、これをカラムで精製し、アミノ酸分析をいった結果、p75が単離された。右下図に示すように、p75は配列特異的に、また sense strand特異的にJCV調節領域#3に結合している事が判明した。現在p75を含む転写調節蛋白質複合体を単離している。また上述のEMSAを用いてJCVがHTLV-I Taxにより転写が亢進することも明らかにした (J Biol Chem, 275, 17016-17023, 2000)。

(3) JCV の後期蛋白agnoprotein (agno)に関する研究

機能が不明であるagnoの抗体を作製して、感染細胞でのagnoの局在が主に核周囲の細胞質であり、細胞質ではチューブリンと結合していること(右図)、agno欠損ウイルスはウイルス蛋白の翻訳が抑制されること、agnoはJCV早期蛋白であるlarge T抗原に結合することを報告した、さらにagnogeneを欠損したウイルスでは他のウイルス蛋白のmRNAの合成が遅延する事からagnoをtargetとしたJCV感染の治療法を検討している



(特願2001-356836号、Acta Neuropathol (Berl) 104: 130-136, 2002, J Neurovirol 7: 302-306,

2001、J Virol, 2001, 75: 1476-1486)。また agno proteinの種々の変異体を用いた実験より、agnoは核膜の構造を変化させ、ウイルス粒子の核外放出を制御している事が判明した。この機序によりagnoはJCVの感染に関与していることが示唆された(投稿中)。

現在agnoに対するRNAi法を用いて感染の抑制を試みている。

(4) 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（**特願2002-050894号**、**Proc Natl Acad Sci USA** 98, 3843-3848, 2001）。

(5) 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LEC (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。このラットの特許を取得し（**特願平：11-375380**）、その後報告した（**Comp Med** 51: 245-251, 2001）。

3. 研究実施体制

北海道大学大学院医学研究科グループ

- ① 研究分担グループ長：長嶋和郎（北海道大学大学院医学研究科分子細胞病理学、教授）
- ② 研究項目：JCVの受容体および転写・複製調節因子の同定。神経特異的vectorを用いたウイルス脳炎・脳症の治療法の開発

国立感染症研究所グループ

- ① 研究分担グループ長：高橋秀宗（国立感染症研究所感染病理部、室長）
- ② 研究項目：JCVの神経特異的転写・複製調節因子の研究

国立循環器病センター研究所グループ

- ① 研究分担グループ長：望月直樹（国立循環器病センター研究所、部長）
- ② 研究項目：JCV agnoproteinの解析・細胞内シグナル伝達機構の解析

大阪大学微生物病研究所グループ

- ① 研究分担グループ長：大場雄介（大阪大学微生物病研究所腫瘍ウイルス分野、助手）
- ② 研究項目：神経特異的vectorを用いたウイルス脳炎・脳症の治療法の開発・細胞内シグナル伝達機構の解析

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- Komagome R, Sawa H, Suzuki T, Suzuki Y, Tanaka S, Atwood WJ, Nagashima K: Oligosaccharides as Receptors for JC Virus. **J Virol** 76: 12992-13000, 2002
- Takai H, Naka K, Okada Y, Watanabe M, Harada N, Saito S, Anderson CW, Appella E, Nakanishi M, Suzuki H, Nagashima K, Sawa H, Ikeda K, Motoyama N: Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated

- transcription. **EMBO J** 21: 5195-5205, 2002
- Okada Y, Sawa H, Endo S, Orba Y, Umemura T, Nishihara H, Stan AC, Tanaka S, Nagashima K: Expression of JC virus agnoprotein in progressive multifocal leukoencephalopathy brain. **Acta Neuropathol (Berl)** 104: 130-136, 2002
 - Kobayashi Y, Watanabe M, Okada Y, Sawa H, Takai H, Nakanishi M, Kawase Y, Suzuki H, Nagashima K, Ikeda K, Motoyama N: Hydrocephalus, *situs inversus*, chronic sinusitis, and male infertility in DNA polymerase 1-deficient mice: Possible implications for the pathogenesis of immotile cilia syndrome. **Mol Cell Biol** 22: 2769-2776, 2002
 - Takahashi H, Sawa H, Hasegawa H, Sata T, William W, Nagashima K, Kurata T: Reconstitution of cleavage of human immunodeficiency virus type-1(HIV-1) RNAs. **Biochem Biophys Res Commun** 293: 1084-109, 2002
 - Yoshida H, Okada Y, Kinoshita N, Hara H, Sasaki M, Sawa H, Nagashima K, Mak TW, Ikeda K, Motoyama N: Differential requirement for Apaf1 and Bcl-X(L) in the regulation of programmed cell death during development. **Cell Death Differ** 9:1273-1276, 2002
 - Takahashi H, Sawa H, Hasegawa H, Shoya Y, Sata T, William W, Nagashima K, Kurata T: Topoisomerase I and ATP activate cDNA synthesis of human immunodeficiency virus type 1. **Biochem Biophys Res Commun** 294: 509-517, 2002
 - Takahashi H, Sawa H, Hasegawa H, Sata T, Hall W, Kurata T: Binding and dissociation of human topoisomerase I with hairpin-loop RNAs: implications for the regulation of HIV-1 replication. **Biochem Biophys Res Commun** 297: 593-599, 2002
 - Hasegawa H, Tatsumi M, Ogawa-Goto K, Takahashi H, Iwasaki T, Kurata T, Sata T, Takeuchi T, Sheehy N, Sawa H, Nagashima K, Hall WW: Processing of the HTLV-II envelope precursor glycoprotein, gp63 by furin is essential for cell fusion activity. **AIDS Res Hum Retroviol** 18: 1253-1260, 2002
 - Makita N, Horie M, Nakamura T, Ai T, Sasaki K, Yokoi H, Sakurai M, Sakuma I, Otani H, Sawa H, Kitabatake A: Drug-induced long-QT syndrome associated with a subclinical SCN5A mutation. **Circulation** 106: 1269-1274, 2002
 - Tsuda M, Tanaka S, Sawa H, Hanafusa H, Nagashima K: Signalling adaptor protein v-Crk activates Rho and regulates cell motility in 3Y1 rat fibroblast cell line. **Cell Growth Diff** 13: 131-139, 2002
 - Lyons M, Nagashima K, Zabriskie JB: Animal models of postinfectious obesity: Hypothesis and review. **J Neurovirol** 8: 1-5, 2002
 - Nishihara H, Maeda M, Oda A, Tsuda M, Sawa H, Tanaka S, and Nagashima K: DOCK2 associates with CrkL and regulates Rac1 in human leukemia cell lines.

Blood 100: 3968-3974, 2002

- Arai Y, Tsutsui Y, Nagashima K, Shinmura Y, Yamamoto J: Autopsy case of the cerebellar form of progressive multifocal leukoencephalopathy without immunodeficiency. **Neuropathology** 22: 48-56, 2002
- Nishihara H, Tanaka S, Tsuda M., Oikawa S, Maeda M, Shimizu M, Shimoyama H, Tanigami A, Sawa H, Nagashima K: Molecular and immunohistochemical analysis of adaptor protein Crk in human cancers. **Cancer Lett** 180: 55-61, 2002
- Nishihara H, Maeda M, Tsuda M, Makiko Y, Sawa H, Nagashima K, Tanaka S: DOCK2 mediates T cell receptor-induced activation of Rac2 and IL-2 transcription. **Biochem Biophys Res Commun** 296: 716-720, 2002
- Okamoto T, Tanaka S, Alex C. Stan, Koike T, Kase M, Makita Z, Sawa H, Nagashima K: Advanced glycation end products induce angiogenesis *in vivo*. **Microvasc Res** 63, 186-195, 2002
- Itoh T, Orba Y, Takei H, Ishida Y, Nagashima K: Immunohistochemical detection of hepatocellular carcinoma in the setting of ongoing necrosis after radio frequency ablation. **Mod Pathol** 15: 110-115, 2002
- Matsumoto K, Sawa H, Sato M, Orba Y, Nagashima K, Ariga H: Distribution of extracellular matrix tenascin-X in sciatic nerves. **Acta Neuropathol (Berl)** 104: 448-454, 2002
- Higuchi E, Oridate N, Furuta Y, Suzuki S, Hatakeyama H, Sawa H, Sunayashiki-Kusuzaki K, Yamazaki K, Inuyama Y, Fukuda S. Differentially expressed genes associated with cis-diamminedichloroplatinum(II) resistance in head and neck cancer using differential display and cDNA microarray . **Head Neck** 187-193, 2002
- Yamamoto S, Furukawa H, Kitamoto T, Takamaru Y, Morita N, Yasuda M, Okada Y, Sawa H, Nagashima K: An atypical form of sporadic panencephalopathic Cleutzfeldt-Jakob disease in Japan. **Neuropath Appl Neurobiol** 29: 77-80, 2003
- Endo S, Okafa Y, Orba Y, Nishihara H, Tanaka S, Nagashima K, Sawa H: JC virus (JCV) agnoprotein colocalizes with tubulin. **J Neurovirol** 9: 10-14, 2003
- 仙葉慎吾、澤洋文、長嶋和郎：JCウイルスからみたグリアの生物科学。神経研究の進歩、46 (4), 557-565, 2002
- 大場靖子、澤洋文、長嶋和郎：JC virus の分子神経病理学。脳と神経、54(2), 101-109, 2002
- 中川智子、大場靖子、長嶋和郎：JCウイルス感染症(進行性多巣性白質脳症)。日本臨牀、61 (suppl 2), 122-127, 2003

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：2件（研究期間累積件数：5件）