

「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を解明する為に、ヒト脳に進行性多巣性白質脳症を惹起するJCウイルスを主なターゲットとし、その脳組織特異性の研究を以下の2つのアプローチで行っている。

(1) JCウイルス受容体の研究

JCウイルス(JCV)を人工的に作成して、粒子形成を電子顕微鏡で確認し、さらに人工ウイルスが哺乳類細胞に対してのベクターとしての役割を持つことも証明した。またJCVはヒトO型赤血球を凝集させるが、この人工ウイルスも赤血球凝集能を持ち、酵素処理することにより凝集作用は抑制されたことから赤血球への吸着は特定の糖鎖が関与することが明らかとなった。現在この人工ウイルスを用いてJCウイルス受容体の単離を進めている。

(2) 神経特異的転写因子の研究

JCVの転写調節に関して以下の実験を行っている。病原型および非病原型の各々2種類の転写調節領域(早期および後期転写領域)の下流に発光蛋白を融合させたトランスジェニックマウスを作成している。また成人T細胞白血病の患者で進行性多巣性白質脳症の病変が高度であったことから、白血病の原因ウイルスであるHTLV-Iの構成蛋白TaxがJCVを活性化するという事を証明した(J Biol Chem, in press)。またこの活性化が神経系細胞特異的である機序を解明し報告した。現在はその転写活性化因子の同定を行なっている。

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遺伝子配列、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、JCウイルスの外殻蛋白、および転写調節領域を有し脳組織特異的に種々のmolecule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) JCウイルス受容体の単離

JCVの受容体の単離は以下に述べる 1) pseudovirusを用いたoverlay assay法、2) VP1 affinity columnによる単離、の2つの方法で行っている。

pseudovirusはE. coliおよびbaculovirus-insect cellを用いた系でJC virus (JCV) capsid proteinであるVP1を発現させ、粒子形成(pseudovirus)を電子顕微鏡で確認した。さらにmarker geneであるGFP発現plasmidをE. coliにtransformし、このpseudovirusにpackagingさせ、JCV感染細胞であるIMR-32細胞とincubationしたところ、一部の細胞でGFPの発現が認められ、pseudovirusが細胞へ吸着、侵入することを確認した。またJCVはヒトO型赤血球を凝集させるが、このpseudovirusも赤血球凝集能を持ち、さらに赤血球をsialidase処理することにより凝集作用は抑制され、JCVと赤血球のattachmentにsialic acidが関与することが明らかとなった。現在このpseudovirusを用いてIMR-32細胞の膜分画を抽出してoverlay assayまたVP1 columnを作成して受容体の単離を行なっている。

(2) 神経特異的転写因子の同定

次にJCVの転写調節に関して以下の実験を行っている。病原型および非病原型の各々2種類の転写調節領域(早期および後期転写領域)の下流にmarker geneを融合させたplasmidを作成して、マウス神経細胞を用いてその発現を確認した。さらにそれら4種類のplasmidを用いて、transgenic mouseを作成し、JCVの転写調節の神経特異性について解析を行なっている。また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、dual luciferase assayを用いて解析を行なった。その結果TaxはJCV regulatory regionのNF- κ B binding siteを介してJCVを活性化することをNF- κ B binding siteのmutant、Tax mutant、I κ B を用いて証明した。またこの活性化が神経系細胞特異的であることをNF- κ B binding siteをprobeとしたEMSAを行ない、その機序を解明した (J Biol Chem, in press)。現在はEMSAにより転写活性化因子の同定を行なっている。

(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シグナル伝達分子であるrap1GAPIIの機能を明らかにし、本年Nature: 400 891-894に報告した。Rap1は神経系に特異的な機能があると考えられ、神経突起再生時にrap1GAPIIの作用が抑制されるメカニズムが存在することが予想されている。現在共同研究者の望月らが神経系に特異的に発現するrap1GAPIIのクローニングを進めている。

(4) 多動性障害モデルラットの解析

私達は北海道大学実験生物センターとの共同実験で肝炎・肝癌を発症し、その遺伝子座がヒトWilson病と同じであることが判明しているLEC (Long Evans Cinnamon) ratの中から異常行動を示す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) Wister ratを樹立した。本研究は既に特許申請を行っており、現在、北海道大学動物染色体研究施設の松田洋一先生と共同で原因遺伝子の単離を進めている。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

Mochizuki N, Ohba Y, Kiyokawa E, Kurata T, Murakami T, Ozaki T, Kitabatake A, Nagashima K, Matsuda M: Activation of the ERK/MAPK pathway by an isoform of rap1GAP associated with G β i. Nature 400: 891-894, 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

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 H, Takahashi R H, Hasegawa H, Horiuchi M, Shinagawa M, Yokoyama T, Kimura K, Haritani M, Kurata T and Nagashima K : Characterization of antibodies raised against bovine-PrP-peptides. *J Neurovirol* 5: 300-307, 1999

Ohba Y, Suzuki H, Hiraga H, Ito T, Sawa H, Nagai M, Satoh S, Iwaki H and Nagashima K : Melanotic peritoneal sarcomatosis originating from clear cell sarcoma. *Pathol Int* 49: 653-657, 1999

Nishihara H, Kobayashi S, Hashimoto Y, Ohba F, Mochizuki N, Kurata T, Nagashima K, Matsuda M: Non-adherent cell-specific expression of DOCK2, a member of the human CDM-family proteins *Biochim Biophys Acta* 1452: 179-187, 1999

Egan JF, O'Leary B, Lewis MJ, Mulcahy F, Sheehy N, Hasegawa H, Fitzpatrick F, O'Connor JJ, O'Riordan J, Hall WW: High rate of human T lymphotropic virus type Iia infection in HIV type 1-infected intravenous drug abusers in Ireland. *AIDS Res Hum Retroviruses* 15: 699-705, 1999

長嶋和郎 : ウイルス性脳症の発生機序。第88回日本病理学会会誌 88(1): 83 ,1999,4

Takahashi H, Iwata T, Kitagawa Y, Takahashi RH, Sato Y, Wakabayashi H, Takashima M, Kido H, Nagashima K , Kenney K, Gibbs CJ, JR, Kurata T : Increased Levels of and Isoforms of 14-3-3 Proteins in Cerebrospinal Fluid in Patients with Creutzfeldt-Jakob Disease : *Clin Diagn Lab Immunol* 6 : 983-985, 1999

Nagashima K, Okada Y, Tanaka S, Sawa H, Nagashima T : Correlation of clinicopathological features of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) with molecular findings of JC virus regulatory region. *Neuropathology Applied Neurobiology*.25: 79, 1999