

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 高 橋 健 太

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

【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的疾患であるが、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。