

## ウイルス学部門 Department of Virology

ウイルス学部門の1992年の研究は、以下のプロジェクトについて行った。1) ウイルス感染の生体防御の研究。免疫学部門と協力して(チームリーダー, 古賀助教授), マウスのサイトメガロウイルス持続感染の解析, および HIV-1 の遺伝子機能の, ヒト細胞に対する致死作用の機構の解明, を行った。2) 肺癌の基礎医学的, 臨床医学的研究。ヒト由来の材料の実際的応用に向けて, 専用の実験室を設置して(オープンリサーチラボラトリー), 免疫学部門, ウイルス学部門で協力して運用してきた。臨床(北九州市立医療センター, 九大医学部第2外科), および企業体研究陣と共同研究を行った。3) 正常細胞および癌細胞の増殖と生存の制御の研究。ユニークな増殖制御遺伝子(D123)を新たに分離していたが, その性格付けを終了した。4) 癌細胞に選択的毒性を示す食品成分の研究を, 九大農学部食糧化学工学科の菅野教授と協力して行った。

1992年のウイルス学部門の固有のメンバーは次の通りである。木村元喜(教授), 奥田篤行(助教授), 田中和生(助手), 滝本博明(助手, 1992. 12. 16より), 佐々木正文(技官), 大津真澄(技官), 早川いずみ(研究補助員)。

以下に1992年の研究成果を記す。

### A. マウスのサイトメガロウイルス持続感染の解析

#### a. 感染マウス胸腺細胞のアポトーシス準備状態

サイトメガロウイルス感染は従来は免疫不全個体を中心にその病的意義が検討されてきた。我々は持続感染の状態になったマウスサイトメガロウイルス(MCMV)の感染が胸腺T細胞の成熟分化に異常を与え, その結果胸腺DP細胞(CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup>)は, 抗CD3抗体による活性化刺激により, 顕著なアポトーシスを生じることを見出した。

MCMV Smith株(LD<sub>50</sub> = 5 × 10<sup>5</sup> PFU) 1 × 10<sup>5</sup> PFUを6~7週令BALB/C♂マウス腹腔内に接種すると, BALB-3T3を用いたPFUアッセイではウイルスは唾液腺では2週間後をピークとして高値で検出されたが, 胸腺, 脾等のリンパ組織では1週間後には全く検出できなくなった。感染マウスでは感染4週間後の胸腺細胞数およびそのCD4/CD8各分画はFACSを用いた検索では非感染対照マウスと比べ差は認められなかった。しかしこれらマウスに抗CD3抗体(145-2C11)を20~50μg投与すると感染群では胸腺DP細胞のみが選択的に消失した。一方非感染群ではそのような消失はなかった。電気泳動および電顕を用いた観察により感染マウスの胸腺DP細胞はアポトーシスにより消失していることが分かった。in vitroで感染マウス胸腺細胞を抗CD3抗体で刺激しても同様にアポトーシスが生じることより, DP細胞にアポトーシ

スを誘発する直接の因子は感染マウス個体に増加している TNF 等のサイトカインではなく DP 細胞自身に生じた何らかの変化であることが推定された。実際、感染マウス胸腺細胞を *in vitro* で抗 CD 3 抗体で刺激すると、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度は著しく上昇するのに対し、PKC 活性はむしろ低下することより、細胞内情報伝達系に生じた異常が感染マウス胸腺細胞のアポトーシス準備状態の原因となっていると考えられた。さらに MCMV 感染はこのアポトーシス準備状態にどのように関わっているかについて調べるために MCMV-IE 遺伝子ゲノムを用いた PCR により胸腺組織を検索したところ、感染10日までは胸腺のストローマ細胞に MCMV が潜伏していることが分かった。さらにその時期のストローマ細胞では MHC クラス I の発現が低下していた。以上より MCMV が胸腺ストローマ細胞に感染しその表面抗原を変化させることにより細胞内での T 細胞分化が異常となり、その結果 DP 細胞がアポトーシス準備状態になったものと考えられた。

#### b. サイトメガロウイルス持続感染マウスに抗 CD 3 抗体投与後にみられる間質性肺炎

マウスサイトメガロウイルス (MCMV) の 1/50 致死量を、BALB/c マウス雄 6 週令の腹腔内に投与した。投与 4 週間後には唾液腺にはウイルスが認められたが肺・脾臓・胸腺・骨髄には MCMV は検出できず、これを持続感染モデルとして以下の実験を行った。1) cyclosporin A (10mg/kg)、抗 T 細胞レセプター抗体 (25  $\mu$ g)、抗 CD 3 抗体 (145-2C11, 25  $\mu$ g) を連日 10 日間投与したところ、抗 CD 3 抗体投与群のみに死亡例が認められ (死亡率 28.6%)、且つ死亡例は全例が抗 CD 3 抗体初回投与後 24~48 時間に死亡した。唾液腺でのウイルス価は 3 群とも対照群と比べ増加はなく、他の臓器では 3 群とも対照群と同様 MCMV は検出出来なかった。2) MCMV 持続感染マウスに抗 CD 3 抗体 20, 100, 200  $\mu$ g 投与するとそれぞれ 33%, 63%, 93% のマウスが死亡し、抗体投与後には血中 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  レベルの非感染群に比べ有意の上昇がみられ、重篤な cytokine release 症候群 (CRS) が惹起されていることが解った。非感染マウスでは抗 CD 3 抗体 200  $\mu$ g 投与でも死亡例はなかった。3) 組織検査などから抗 CD 3 抗体投与後の直接死因としては肺胞壁の肥厚による換気不全が考えられた。しかし肺には MCMV は検出出来ず、この肺病変は MCMV ではなく CRS に随伴しているものと思われた。

#### B. HIV-1 の env 遺伝子を発現させたヒト細胞株を用いた HIV-1 感染細胞の致死機構

AIDS における CD 4<sup>+</sup>ヘルパー T 細胞の消失の機序に CD 4 分子が深く関与していることを明らかにした。すなわち種々の CD 4<sup>+</sup>あるいは CD 4<sup>-</sup>ヒト T 細胞株に HIV-env 遺伝子を導入し細胞内で HIV のエンベロープ蛋白を発現させたところ、CD 4<sup>+</sup>細胞株においてのみ細胞死が観察された。それらの細胞内ではエンベロープ蛋白の前駆体である gp160 が CD 4 と複合体を形成し核膜孔周囲に蓄積していた。その結果、核膜孔を介した細胞質と核との間の物質輸送が阻害されていることも明らかになった。この gp160/CD 4 複合体の細胞内蓄積による細胞死は細胞内  $Ca^{2+}$  イオンの上昇を伴うアポトーシスによるが、gp160/CD 4 複合体がいかにしてアポトーシ

スを誘導するかの機序について現在分子レベルでさらに検討を進めている。

### C. 細胞増殖制御遺伝子 D123 の単離とその性格付け

ラット線維芽細胞株 3 Y 1 から、39.8°C の制限温度で G 1 期で増殖停止し、長期間生存可能な温度感受性変異株を多数分離している。この内の 1 株 tsD123 は増殖制御に関してユニークな性質を持つ。33.8°C の許容温度で増殖中の tsD123 細胞を制限温度に移すと一回分裂した後、G 1 期で増殖停止し、その後許容温度に移すと血清もしくは増殖因子の非存在下でも S 期に入る。また許容温度で飽和細胞密度に達して G 1 期で増殖停止した細胞（いわゆる G<sub>0</sub> 期の細胞）に血清刺激を加えると、制限温度でも S 期に入る。tsD123 細胞の変異遺伝子に対応する正常遺伝子を単離し、その機能と発現調節を調べ、G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期での増殖制御機構に関する重要な知見を得ることを一連の研究の最終目標とする。

tsD123 細胞を SV40 でトランスホームした SV-tsD123 細胞に、発現ベクターに組み込まれたヒト線維芽細胞 cDNA ライブラリーを導入し、制限温度で増殖できる一次復帰細胞株を分離し、この細胞の DNA を再び SV-tsD123 に導入し、二次復帰細胞株を分離した。二次復帰細胞株と COS 細胞とを細胞融合して（ここで用いた cDNA ライブラリーのベクター部分は、SV40 の複製開始領域を含む）、二次復帰細胞株の DNA に組み込まれている cDNA ライブラリー DNA をプラスミドとして回収した。それらのプラスミドの内、cDNA ライブラリーの共通マーカである neo 遺伝子と 1.8kb の挿入 cDNA とを含むプラスミドを tsD123 細胞に導入すると、G418 耐性になった細胞株の内、ほぼ半数の株が温度耐性であった。温度耐性になっていない細胞株の DNA には neo 遺伝子が組み込まれていたが、1.8kb の挿入 cDNA は組み込まれていなかった。また温度耐性に復帰した細胞株では、獲得した温度耐性の程度に応じてこの挿入 cDNA の mRNA レベルでの発現が上昇していた。したがってこの 1.8kb の挿入 cDNA は tsD123 細胞の温度感受性の機能を相補する遺伝子 D123 を含むと考えられる。

単離した D123 遺伝子の塩基配列を調べた結果、予想される蛋白は 336 個のアミノ酸を有する 39.1kd の蛋白であり、既存の遺伝子および蛋白には相当するものが無いことが分かった。この D123 遺伝子の中の予想蛋白をコードする部分を pET ベクターにつないで、大腸菌で融合蛋白として発現させると、約 46kd の蛋白が大量に得られた。現在、この融合蛋白に対する抗体を作製中であり、これを用いて細胞増殖制御と D123 遺伝子の蛋白の発現調節との関係を明らかにしたい。

### 原著論文

1. Yoshida, H., Koga, Y., Moroi, Y., Kimura, G., and Nomoto, K. 1992.

The effect of p56<sup>lck</sup>, a lymphocyte specific protein tyrosine kinase, on the syncytium formation induced by human immunodeficiency virus envelope glycoprotein.

- Int. Immunol. 4, 233-242.
2. Umeno, Y., Okuda, A., Shimura, H., Onodera, K., and Kimura, G. 1992.  
Induction of DNA synthesis by fibroblast growth factor in temperature-sensitive cell-cycle mutants of rat 3Y1 fibroblasts arrested at restrictive temperature.  
Cell Struct. Funct. 17, 19-25.
  3. Yoshino, I., Yano, T., Murata, M., Ishida, T., Sugimachi, K., Kimura, G., and Nomoto, K. 1992.  
Tumor-reactive T cells accumulate in lung cancer tissues but fail to respond due to tumor cell-derived factor.  
Cancer Res. 52, 775-781.
  4. Yamada, K., Ohtsu, M., Sugano, M., and Kimura, G. 1992.  
Effects of butyrate on cell cycle progression and polyploidization of various types of mammalian cells.  
Biosci. Biotech. Biochem. 56, 1261-1265.
  5. Yoshida, H., Koga, Y., Nakamura, K., Kimura, G., and Nomoto, K. 1992.  
A lymphocyte-specific protein tyrosine kinase, p56<sup>lck</sup>, regulates the PMA-induced internalization of CD4.  
Biochim. Biophys. Acta 1137, 321-330.
  6. Yoshino, I., Kimura, G., Matsuzaki, G., Nomoto, K., Ishida, T., Sugimachi, K., and Yano, T. 1992.  
T lymphocytes bearing  $\gamma / \delta$ -type T-cell receptor in thymic tumor tissues.  
J. Nat. Cancer Inst. 84, 1755-1756.

## 総説・解説

1. 村田充弘, 木村元喜. 1992.  
培地充てん回転培養装置による LAK 細胞の培養  
バイオサイエンスとインダストリー 50, 40-42.
2. 柏木征三郎, 関口睦夫, 木村元喜, 1992.  
発がんのメカニズム  
臨床と研究 69, 215-228.
3. 木村元喜, 1992.  
研究室で役に立つ細胞株, ラット: 3 Y 1  
生体の科学 43, 434-435.

## 学会発表

1. 奥田篤行, 木村元喜. (1992, 1/16-1/18).  
細胞周期位置とは無関係に行われる S 期開始の制御.  
「細胞制御」ワークショップ – 増殖と分化の分子機構 –, 愛知県浦郡市.
2. 山田耕路, 松尾哲孝, 三井雄史, 野田敏司, 奥田篤行, 木村元喜, 菅野道廣. (1992, 3/31-4/3).  
ラット 3 Y 1 細胞とその形質転換株の増殖に及ぼす飽和脂肪酸の効果.  
1992年度日本農芸化学会大会, 東京.
3. 奥田篤行, 木村元喜. (1992, 6/6-6/8).  
ラット 3 Y 1 細胞の温度感受性 G1 期変異株 tsD123 の変異機能を相補するヒト遺伝子の単離.  
第16回真核 DNA シンポジウム – 細胞周期, DNA 複製とタンパク分子の動態 –, 静岡県裾野市.
4. 田中和生, 大津真澄, 佐々木正文, 古賀泰裕, 木村元喜. (1992, 9/24-9/26).  
抗 TcR- $\alpha\beta$  鎖抗体投与ラットにおける心移植片生着延長と胸腺の変化.  
平成 4 年度日本移植学会 (28回), 大阪
5. 三井雄史, 山田耕路, 松尾哲孝, 奥田篤行, 木村元喜, 菅野道廣. (1992, 10/17-10/18).  
E1 A 3 Y 1 細胞の増殖に及ぼすリン脂質およびポリフェノール類の効果.  
平成 4 年度日本農芸化学会西日本支部会, 鹿児島.
6. 佐々木正文, 古賀泰裕, 木村元喜, 野本亀久雄. (1992, 10/28-10/30).  
HIV-gp160/CD 4 複合体による細胞死におけるアポトーシスの関与.  
第40回日本ウイルス学会, 神戸.
7. 古賀泰裕, 木村元喜, 野本亀久雄. (1992, 10/28-10/30).  
HIV-env による細胞死は gp160 によって起こり gp120 では生じない.  
第40回日本ウイルス学会, 神戸.
8. 田中和生, 古賀泰裕, 張心穎, 佐々木正文, 木村元喜, 野本亀久雄. (1992, 11/25-11/27).  
ラット心移植後の拒絶反応時にみられる胸腺細胞アポトーシス.  
第22回日本免疫学会・学術集会, 名古屋.
9. 中村和彦, 古賀泰裕, 佐々木正文, 大津真澄, 木村元喜, 野本亀久雄. (1992, 11/25-11/27).  
抗 Lck モノクローナル抗体の細胞内注入による T 細胞活性化の抑制.  
第22回日本免疫学会・学術集会, 名古屋.
10. 盧亦愚, 古賀泰裕, 田中和生・大津真澄, 木村元喜, 野本亀久雄. (1992, 11/25-11/27).  
マウスサイトメガロウイルス (MCMV) 潜伏感染による胸腺 DP 細胞のアポトーシス誘導.  
第22回日本免疫学会・学術集会, 名古屋.

11. Miyamoto,H., Murata,M., Yoshino,I., Togami,M., Yano,T., Yasumoto,K., Sugimachi, K., Kimura,G., and Nomoto,K. (1992, 11/30-12/4) .

Development of a new disposable culture system for human lymphokine-activated killer (LAK) cells.

The 5th annual meeting of Japanese association for animal cell technology, Omiya.