

ウイルス学部門 Department of Virology

1994年は、下記の研究課題について研究を行った。課題1)～3)については、免疫学部門野本亀久雄教授の協力を得た。

1) ウイルス感染防御のしくみ、成熟個体の急性全身性ウイルス感染のモデルとしてマウスサイトメガロウイルスをえらんで昨年準備をすすめていたが、本年も継続してこれを行い、準備はほぼ終了した(実験担当: 大津真澄, 李文, 木村元喜)。

2) ウイルス感染の宿主生体防御系に与える影響。マウスサイトメガロウイルスの持続感染を受けた個体で我々が見出していたT細胞分化の修飾について、従来の研究を継続した(実験担当: 田中和生, 木村元喜)(東海大・医・感染症・古賀泰裕教授との共同研究)。

3) ウイルスが感染細胞を殺すしくみ。HIVのenv遺伝子の産物が細胞を殺すしくみをこれまでに明らかにしてきたが、その研究をさらに発展させた(実験担当: 佐々木正文, 木村元喜)(東海大・医・感染症・古賀泰裕教授との共同研究)。

4) 細胞増殖の制御機構。当研究室で分離され研究されてきたユニークな増殖制御遺伝子であるD123を利用して、動物細胞の細胞周期制御の研究をさらに発展させた(実験担当: 奥田篤行, 木村元喜)。

1994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, 1994年10月1日退職), 滝本博明(助手), 原田守(助手), 李文(外国人訪問研究員, 1994年10月1日より), 佐々木正文(技官), 大津真澄(技官), 堤華恵(研究補助員)。

以下に1994年の研究成果を記す。

A. ウイルス感染防御のしくみ

1994年でこの研究の準備がほぼ終了したので、1995年からマウスサイトメガロウイルス急性初感染マウスを用いて、本実験を開始する。

免疫学的に成熟した正常個体のサイトメガロウイルス感染においては、ウイルスは浸入門戸の組織に加えて全身のさまざまな臓器で増殖する。しかしウイルスは比較的短期間に排除され、感染個体には特に認むべき病状は現れない。宿主の生体防御機構が有効に働いたためであると理解される。しかし、この急性不顕性初感染の治癒後も、一部の臓器では不顕性の持続感染または潜伏感染の状態が長期間持続する。このような個体に、病的状態や医原的原因にもとずく免疫不全または免疫抑制が加わると、それらの様式や程度に応じてさまざまな病態が誘発され、それらは重篤あるいは致死的多いことが多いため、臨床医学上の問題となっている。

さらに、このウイルス感染においては逆に、ウイルス感染による宿主の免疫系の抑制あるいは促進がみられることも注目に値する。この最後の点に関しては我々自身も本年までの研究で、マウスサイトメガロウイルスの持続感染個体において、胸腺の CD4⁺8⁺ (ダブルポジティブ) T細胞の分化が促進され CD3 を介する刺激に対して高応答性になっていること、末梢 (脾) の T細胞がポリクローナルにアネルギー状態にあること、及び、抗 CD3 単クローン抗体の生体内投与による T細胞レセプターへの刺激によって間質性肺炎が短時間内に誘導されること、などを記載した。要するにサイトメガロウイルス感染症は、ウイルスと生体防御系との相互関係のあり方によって、多彩な表現型を示すことが特徴である。個々の表現型のメカニズムはほとんど判っていない。

マクロファージは、多くのウイルス感染の初期防御において中心的役割を演じる細胞性生体防御因子である。すなわち、マクロファージはすべての生体組織に分布するが特に外界からのウイルス侵入の機会の多い部位に高密度に存在する。スカベンジャーとしてビリオン及び感染細胞 (及びその死細胞) を処理してウイルス負荷を減らす。所属リンパ節へウイルス (又は抗原) を運ぶ。さらにマクロファージはサイトカインその他の活性物質を分泌して近傍の生体防御系及び非生体防御系の細胞に生物学的作用を及ぼす。逆に他の抗原非特異的細胞性防御因子あるいは特異的細胞性防御因子などが分泌するサイトカインその他の活性物質に反応して自身の機能発現の質と量を変化させる。自身を含めて抗原提示細胞に対して調節作用を及ぼす。T細胞及びB細胞の活性化あるいは抑制に関与する。このようにみえてくると、マクロファージは初期防御の質と量を調節するという役割のみならず、後発する免疫応答及び免疫反応の質あるいは方向性とその度合をも調節している可能性があることが推察される。

この研究では、サイトメガロウイルス感染防御 (あるいは防御不全) の表現型に質的量的多彩さが生じることの原点を、初期感染防御のかなめであるマクロファージに求める。この作業仮説の検証の第一歩としてマクロファージに富む臓器のマウスサイトメガロウイルス急性初感染モデルをアダルトマウスに作成して、1) 感染臓器におけるウイルス量、サイトカインネットワーク、及び細胞性防御因子の種類と数、などの時間的変動とそれらの間の関連性を特に感染初期に注目して調べる。2) 同じことを、マクロファージを局所的にブロックしたマウスの感染において調べて1) の結果と比較する。これらの実験結果から、マクロファージの初期防御における役割を明らかにすると共に後期防御 (特異的防御) への流れの方向づけにおけるマクロファージの役割を考察する。

マクロファージブロック臓器におけるウイルス増殖曲線の変化から、ウイルス排除におけるマクロファージの役割がプラスかマイナスかが、感染後の時間の各点において明らかとなる。併行して行われる細胞性防御因子のポピュレーション解析、及びサイトカインネットワークの解析から、感染中期、後期へと防御因子が引き継がれていく感染防御の流れにおけるマクロファージの役割が明らかになる。また各時間点におけるマクロファージの他の防御因子に対する相対

的重要性が明らかになる。ここで得られる基礎的情報は、ヒトのサイトメガロウイルス感染症の各局面において、治療または予防のターゲットを、どの防御因子に絞るかを定める際に必要となろう。

B. HIV の env 遺伝子産物 gp160が感染細胞を殺すしくみ

我々はこれまでの研究で、CD4陽性細胞株にメタロチオネインプロモーターを組み込んだ HIV-1 env 遺伝子を導入し、gp160を発現させると、1) gp160/CD4複合体形成、2) 細胞内Caイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の増加を伴ったアポトーシスにより死滅、3) このアポトーシスは W7 (カルモジュリン (CaM) 拮抗剤) や GENISTEIN (チロシンキナーゼ阻害剤) により抑制されることを報告してきた。今年 CaM が gp160 に直接結合し、その結果アポトーシスを誘導するの可否かを検討した。

CD4陽性単球様細胞株 U937-2 由来であり、塩化カドミウム (Cd^{2+}) 添加により gp160 を発現する UE160、同じく gp120 を発現する UE120 を用いた。培養液に Cd^{2+} を添加し以下の実験を行った。1) 抗 CaM 抗体、抗 env 抗体を用いた免疫沈降およびイムノプロット、2) 免疫染色標本のレーザー顕微鏡による細胞内 CaM 分布の経時的観察。

得られた実験結果は、1) UE160 の分離した核 lysate で CaM は gp160 に結合 (CaM-gp160) していたが CaM-gp120 は検出できなかった、2) 核 lysate の CaM-gp160 は Cd^{2+} 添加 8 時間後では約 5 倍に増量した、3) CaM は細胞質および核でも染色された、4) UE160 の PLC γ 1 は Cd^{2+} 添加によりリン酸化されなかった、5) UE160 に Cd^{2+} を添加すると 61kD、51kD、32kD チロシンリン酸化タンパクが増量したが UE120 では変化がなかった。

これらの実験結果から、1) HIV-1 感染モデル細胞 UE160 は Cd^{2+} 添加により PLC γ 1 のリン酸化が生じないことから TCR を経由しないシグナル伝達系の関与が示唆された、2) これまでの研究により gp160 の増量 \rightarrow 核内 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇 \rightarrow 核内 Ca^{2+} -CaM-gp160 の増量 \rightarrow 核周囲腔に蓄積 \rightarrow アポトーシスによる細胞死、という図式が考えられる、3) 51kD と 61kD のチロシンリン酸化タンパクはリンパ球のレセプター刺激により誘導され、また 32kD は HIV 感染による細胞融合に関連する事が報告されているが、我々はこれらがアポトーシスに関連したタンパクであろうと推定している。

C. 細胞増殖制御遺伝子 D123 と細胞周期

多細胞生体内では大部分の細胞は増殖を細胞周期の G1 期で停止しており、外界からのシグナルに応答して必要な時に増殖を開始する。また不必要になった細胞は細胞死が起り、排除される。細胞の遺伝子の変化等の原因で増殖あるいは生存の制御が不可能になった細胞が発生し、この細胞が増殖を繰り返してその数を増大し腫瘍になる。したがって細胞の増殖および生存の制御機構を解明することは重要なテーマの一つである。

この目的で分離したラット線維芽細胞 3 Y 1 の温度感受性変異株 3 Y 1 tsD123は以下のようなユニークな性質を持っている。3 Y 1 tsD123は培養温度を許容温度の33.8℃から制限温度の39.8℃に上げると増殖を停止し、細胞周期の G 1 期に集まる。制限温度で増殖停止した3 Y 1 tsD123は許容温度に移すと培養液中の血清の有無に関係無く S 期に移行する。一方飽和細胞密度まで増殖して G 1 期で増殖停止した 3 Y 1 tsD123は血清を加えることにより許容温度のみならず制限温度下でも S 期に移行させることができる。さらに SV40 ラージ T 抗原あるいはアデノウイルス EIA 蛋白が発現すると 3 Y 1 tsD123は制限温度下でも G 1 期を通過して S 期に移行するが、その後細胞死が起きる。

3 Y 1 tsD123の変異遺伝子をクローニングし、この遺伝子の発現と細胞の挙動との関係およびその遺伝子産物の解析により、細胞の増殖および生存の制御機構の解明における新局面を切り開いてゆくことを計画した。3 Y 1 tsD123の変異機能を相補するヒト cDNA のクローニングを行い、この (D123) cDNA の塩基配列から予想される蛋白のアミノ酸配列を調べた結果、この (D123) 蛋白は336個のアミノ酸を有する39.1kDの蛋白であり、既存の蛋白には相当するものが無いこと、およびこの D123蛋白の 3 Y 1 tsD123における発現には増殖状態依存性および温度依存性がないことが昨年までに判明した。

今年は 3 Y 1 細胞の cDNA ライブラリーからラット D123 cDNA をヒト D123 cDNA プロベで釣り上げ、塩基配列を決定した。さらに RT-PCR 法により 3 Y 1 tsD123の mRNA を用いてこの変異株の D123 cDNA を増幅し、その塩基配列を決定した。その結果 3 Y 1 tsD123では点突然変異が D123蛋白をコードする部分 (109番目のアミノ酸がアラニンからバリンに置換) で 1箇所起きていた。さらに 3 Y 1 の D123 cDNA を発現ベクターにつないで 3 Y 1 tsD123に導入すると、制限温度で増殖可能な株が多数得られた。しかし 3 Y 1 tsD123の変異 D123 cDNA を用いた場合はこのような温度耐性株は得られなかった。

許容、非許容温度に関係なく 3 Y 1 tsD123 (あるいは 3 Y 1 tsD123 を SV40 でトランスホームした細胞株, SV-3 Y 1 tsD123) では 3 Y 1 (あるいは 3 Y 1 を SV40 でトランスホームした細胞株, SV-3 Y 1) より著しく細胞当りの D123蛋白量が少なかった。さらに 3 Y 1 tsD123では 3 Y 1 に比べ D123蛋白の分解が激しかった。したがって 3 Y 1 tsD123では D123蛋白の 109番目のアラニンがバリンに置換することによりこの蛋白は不安定になっており、この変異細胞の増殖に関する温度感受性はこの不安定性に起因すると考えられる。

今後細胞の増殖と生存の制御機構における D123蛋白の関与について、細胞の挙動と D123蛋白の挙動との関連をさらに詳細に調べることにより明らかにしたい。D123蛋白は多種類の細胞蛋白と結合することを明らかにしているので、D123蛋白と変異 D123蛋白とで相互作用を異とする蛋白を見つけ、これを D123蛋白の機能解析の突破口にしたい。

原著論文

1. Lu, Y.-Y., Koga, Y., Tanaka, K., Sasaki, M., Kimura, G., and Nomoto, K. 1994.
Apoptosis induced in the CD4⁺ cells expressing gp160 of human immunodeficiency virus type 1.
J. Virol., 68, 390-399.
2. Koga, Y., Nakamura, K., Sasaki, M., Kimura, G., and Nomoto, K. 1994.
The difference in gp160 and gp120 of HIV type 1 in the induction of CD4 downregulation preceding single-cell killing.
Virology, 201, 137-141.
3. Tanaka, K., Koga, Y., Zhang, X.-Y., Lu, Y.-Y., Wang, Y., Kimura, G., and Nomoto, K. 1994.
Murine-cytomegalovirus associated pneumonitis in the lung free of the virus.
J. Clin. Invest., 94, 1019-1025.
4. Koga, Y., Tanaka, K., Lu, Y.-Y., Ohtsu, M., Sasaki, M., Kimura, G., and Nomoto, K. 1994.
Priming of immature thymocytes to CD3-mediated apoptosis by infection with murine cytomegalovirus.
J. Virol., 68, 4322-4328.
5. Matsuo, N., Yamada, K., Noda, S., Yamashita, K., Okuda, A., Kimura, G., and Sugano, M. 1994.
Reversible proliferation arrest of rat 3Y1 fibroblasts and selective killing of simian virus transformed derivation of 3Y1 by short-chain fatty acids.
Int. J. Oncol., 5, 655-660.
6. Nakamura, K., Koga, Y., Yoshida, H., Tanaka, K., Sasaki, M., Kimura, G., and Nomoto, K. 1994.
Inhibition of the T-cell receptor-mediated signal transduction by microinjection of anti-Lck monoclonal antibody into T-cells.
Biochim. Biophys. Acta, 1224, 495-505.

総説

1. 田中和生, 古賀泰裕. 1994.
CD4へのシグナルとアポトーシス.
臨床免疫, 26, 83-91.

2. 奥田篤行. 1994.
化学物質による癌の発生.
薬局, 45, 693-695.

学会発表

1. 三井雄史, 山田耕路, 奥田篤行, 木村元喜, 菅野道廣. (1994, 4/1-4)
ポリフェノール化合物の E1A-3Y1細胞特異的致死機構.
1994年度日本農芸化学会, 東京.
2. 木村元喜. (1994, 6/2-4)
特別講演: 細胞周期とトランスフォーメーション.
第35回日本臨床細胞学会総会, 松江.
3. 田中和生, 古賀泰裕, 木村元喜, 野本亀久雄. (1994, 8/28-9/2)
Pathogenesis of cytomegalovirus (CMV) -associated pneumonitis following anti-CD3 monoclonal antibody (MoAb) treatment in mice persistently infected with murine CMV (MCMV).
第15回国際移植学会, 京都.
4. 佐々木正文, 古賀泰裕, 田中和生, 盧 亦愚, 木村元喜, 野本亀久雄. (1994, 10/19-21)
HIV-gp160/CD4複合体形成に伴うアポトーシス誘導と細胞内 Ca^{2+} 上昇の機序について.
第42回日本ウイルス学会, 東京.
5. 田中和生, 古賀泰裕, 盧 亦愚, 張 心穎, 木村元喜, 野本亀久雄. (1994, 11/24-25)
サイトメガロウイルス (CMV) 持続感染が宿主免疫系に与える影響.
第30回日本移植学会総会, 広島.
6. 原田 守, 尾本和也, 岡本忠雄, 玉田耕治, 竹之山光弘, 平島 親, 李 鉄麗, 木村元喜, 野本亀久雄. (1994, 11/29-12/1)
Anti-CD28 mAb を利用した抗腫瘍 T細胞の in vitro 誘導.
第24回日本免疫学会, 京都.
7. 田中和生, 古賀泰裕, 張 心穎, 木村元喜, 野本亀久雄. (1994, 11/29-12/1)
サイトメガロウイルス持続感染マウスにおける末梢 T細胞の変化.
第24回日本免疫学会, 京都.