

## ウイルス学部門 Department of Virology

1996年は、下記の研究課題について研究を行った。課題1), 2), 3) 及び5) については、免疫学部門野本亀久雄教授及びそのメンバーとの共同研究である。

1) ウイルス感染防御のしくみの臓器特殊性：急性全身性ウイルス感染の動物モデルとしてのマウスサイトメガロウイルス実験系の確立。

2) 抗腫瘍免疫の臓器特殊性及び抗腫瘍免疫療法の動物モデル。

3) HIV-1感染によるCD4陽性細胞致死の機構（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。培養線維芽細胞実験系であるラット3Y1細胞を用いて、正常細胞の増殖制御機構及びがん細胞におけるその異常についての研究の継続、発展。

5) オープンリサーチラボラトリー。このプロジェクトのための専用実験室を設置して行われてきたヒトの肺がんを対象とする研究の継続。

1996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）、滝本博明（助手）、原田守（助手）、佐々木正文（技官）、大津真澄（技官）、堤華恵（研究補助員）。

以下に1996年の研究成果のうちのいくつかについて記す。

### A. ウイルスに対する臓器固有の生体防御機構の動物モデルを用いた研究

高齢者や、臓器移植後、担癌、エイズ罹患などの免疫抑制状態の患者では、健康人では問題にならない日和見感染が生じてしばしば致死性である。その一つがサイトメガロウイルス感染症である。一方、このウイルスによる健康人の感染は、基本的には一過性の不顕性感染であり、感染性ウイルスは比較的短期間内に体内から排除される。生体防御機構が有効に働いたためであると理解される。ところが、サイトメガロウイルス感染に対する宿主の防御機構の理解は不十分である。したがって、このウイルスによる日和見感染においていろいろな臓器に見られる多彩な病態のそれぞれについての理解も、感染防御、発症病理のいずれの面からも不十分である。

ウイルス感染に対する生体防御機構はその大綱においては、ウイルスの侵入に対する物理的バリアー、非特異的液性活性物質、食細胞系、リンパ系などの、系統発生学的に古いシステムから新しいシステムまでの様々な要素が、個々の重要性及び互いの協調性をもって働いている。実際のウイルス感染症は、個々の特定の部位におけるウイルスの増殖が基本となって動くので、ウイルスに対する生体防御機構は感染の場の個性によって様々に修飾される。臨床医学におい

てウイルス感染症に対処する場面では、感染の起こっている場（臓器）が対象となるので、臓器固有の生体防御機構の解明が必要となる。

そこで我々は「サイトメガロウイルスに対する臓器固有の生体防御機構のマウスモデルを用いての解明」と題する研究プロジェクトを設定して、1993年に研究を開始した。外来異物と生体防御系との相互関係が異なると想定される複数の臓器を、研究対象としてとり上げた。

マウスサイトメガロウイルスを、アダルトマウスに、いろいろな接種ルートを用いて初感染させ、時間を追って全身の主要臓器のウイルス量を測定したところ、ウイルス量の時間的推移は各臓器によって特有のパターンを示すことが観察された。肺感染を例にとると（大津ら、ウイルス学会、1996）、気管内ウイルス接種後の肺内ウイルス量は、24時間で $10^{-4}$ に減少（第1相）、その後72時間までに $10^4 \sim 10^5$ 倍に増加（第2相）、72時間から3週までの間ウイルス量に増減なく（第3相）、3週から4週の間急速に減少し検出限界以下となる（第4相）。この時全身的には、多くのウイルス感染に一般的に見られる時間的経過で抗ウイルス免疫応答が起こっていることは、いくつかの解析的実験結果及び免疫応答臓器である脾のウイルス量が5日にピークを示し10日に検出限界以下になったことからわかる。脾に呼応するように肝では5日にピークを示した後10日にウイルスは排除された。ところが腎ではウイルス量の増加は遅れて5日以降に始まり、14日まで高値を続けた後3週に検出限界以下になった。さらに従来から持続感染の場として注目されている顎下腺では、ウイルス量の時間的推移は二相性を示し、7日までは低値を維持した後10日～3週の間高値を続け、その後4週までに急速に検出限界以下となった。このような事実直面し、我々は臓器固有の生体防御機構の解明の必要性をあらためて痛感した。現在、肺、脾、肝、腎、唾液腺について、臓器固有の抗ウイルス機構を解明すべく研究を進展させている。

## B. 抗腫瘍免疫の動物モデルを用いた研究

### a. gut-associated lymphoid tissue (GALT) 特異的抗腫瘍免疫応答

担癌局所リンパ節は抗癌免疫応答の重要な場であることが知られており、大腸癌の場合には、その局所リンパ節は腸管膜リンパ節となる。しかしながら、腸管膜リンパ節は経口摂取抗原に対して常に免疫寛容を誘導している腸管関連リンパ組織 gut-associated lymphoid tissue (GALT) に属している。我々はマウスモデルを用いて、大腸癌の場合には他臓器と比べて、抗癌免疫反応の場が GALT になるという臓器特異性のために生体防御反応が起こりにくく、そのメカニズムとして TGF- $\beta$  が抗癌特異的 CD4 陽性 T 細胞の IFN- $\gamma$  産生を抑制することを報告した。さらに、担癌生体の免疫抑制を改善する免疫賦活剤であるクレスチンの経口投与によりこの抑制が改善することも確認した。

## b. costimulation を利用した抗腫瘍免疫療法

T細胞を効果的に刺激するためには、T細胞レセプターを介した刺激に加えて、CD28分子を介する costimulation が必要なことが明らかとなり、B7分子を transfect した腫瘍細胞を用いたワクチン療法が考案されている。我々は、costimulation 理論を担癌局所リンパ節から抗腫瘍 effector を誘導する培養系に応用することを試みた。同系腫瘍を皮下に移植したマウスの担癌局所リンパ節を、抗 CD3抗体と抗 CD28抗体で刺激し、その後、低濃度 IL-2の存在下で培養することにより7日間で約100倍に増殖させることができた。さらに、この方法で増殖させた担癌局所リンパ節は、in vivo で腫瘍特異的に抗腫瘍効果を示し、我々の考案した培養プロトコルの有効性が確認できた。

## C. HIV-1感染による CD4陽性細胞致死の機構

HIV-1感染個体における CD4陽性T細胞の消失は HIV の直接感染あるいは免疫学的な反応によって生じる事が明らかになってきたが、いずれにしても最終的にはアポトーシスによる細胞死である。例えば、HIV 感染者の末梢血リンパ球を PWM で刺激するとアポトーシスが誘導されるが、健常人ではこのような事は生じない。即ち、HIV 感染そのものが直ちに感染細胞をアポトーシスに誘導するのではなく、HIV 感染によりアポトーシス感受性の高い状態（アポトーシス準備状態）になり、そこに別のシグナルが働くとアポトーシスを誘導するのではないかと推察される。

我々は CD4分子と直接結合する env 遺伝子産物が細胞致死機構の要であると想定して研究を進めてきた。HIV-Env で誘導されるアポトーシスはカルシウムキレート剤やカルモジュリン阻害剤により抑制されることを見だし検討を加えてきた結果、CD4/gp160複合体形成のみではアポトーシスの誘導に充分ではなく、核内カルシウムイオンの上昇が必須条件であった。今回、HIV-Env でアポトーシス準備状態になったモデル細胞を用い、核内カルシウムイオン濃度上昇を伴ったアポトーシス誘導の機序について検討を進めた。元来、Env-gp160は感染細胞由来のプロテアーゼ (furin や PC1) により gp120と gp41に切断され、ゴルジ経由で細胞膜直下へ輸送され HIV 粒子形成にかかわる。しかし、CD4/gp160複合体は切断されずに細胞内で凝集塊を形成し核内カルシウムイオン上昇を伴ったアポトーシスを誘導したが、gp120および gp41単独では誘導できなかった。gp160と gp120の構造の違いは、gp160は gp120領域に加えて gp41領域を有することであり、細胞傷害性を発揮する部位は gp41領域であることが推測され追求することにした。

### a. HIV env-gp160C 末端欠損株の樹立

誘発性プロモーターであるヒトメタロチオネイン IIA プロモーターと G418耐性を有するプラスミドに HIV-env 遺伝子を導入した Env gp160発現ベクター、pSMTE7-gp160を作成した。

同時に gp160の821, 855, 859, 862番目のアミノ酸遺伝子を site-directed mutagenesis によりストップコドンを導入し, gp160のC末端を欠損させた env 遺伝子を作成し, シーケンスにより変異導入を確認した. ヒトリンパ球由来細胞 U937-2に上記のプラスミドをエレクトロポレーションにより導入し, G418セクションによりそれぞれのクローン細胞 UE160, UE160 Δ 821, UE160 Δ 855, UE160 Δ 859, UE160 Δ 862を樹立した.

#### b. 樹立細胞株間の比較

樹立細胞株は誘発性ヒトメタロチオネイン IIA プロモーターを有しており, 10 μM の CdCl<sub>2</sub> を添加することにより env 遺伝子を発現させることができる. (a) Env 蛋白発現量の検討, それぞれ10<sup>5</sup>/mlの細胞に CdCl<sub>2</sub>を添加し, 8時間後の細胞抽出液を常法により作成した. 各々25 μgを SDS-PAGE し, 抗 Env モノクローナル抗体を用いたイムノプロットを行った. その結果, 各細胞株の gp160発現量はほぼ同程度であり, 以下の実験に用いることとした. (b) 細胞増殖曲線による検討, それぞれの細胞株に CdCl<sub>2</sub>を添加し, トリパンブルー染色法で生細胞数を調べ細胞増殖曲線を描いたところ, UE160および UE160 Δ 862のみが死滅したが, 他の3株は正常に増殖した, (c) アポトーシスの検討, 同様に CdCl<sub>2</sub>添加48時間後の細胞を PI 染色の後, フローサイトメーターでアポトーシス率を調べたところ UE160では50%, UE160 Δ 862では60%であったが, 他の3株のアポトーシスは軽度であった, (d) 細胞内カルシウムイオン濃度の検討, CdCl<sub>2</sub>添加直後から30分間の細胞内カルシウムイオン濃度の変化を共焦点レーザー蛍光顕微鏡で測定したところ, UE160および UE160 Δ 862では誘導前の4倍に上昇したが, 他の3株では変化しなかった, (e) 活性型カルモジュリンの検討, CdCl<sub>2</sub>添加4時間後の細胞抽出液から抗 gp120抗体及びプロテイン A セファローズビーズを用いて得た免疫沈降物を, Bergmeyerの方法により活性型カルモジュリンを測定した. その結果, UE160では15.86 ± 3.23 (U/l), UE160 Δ 862では10.17 ± 4.93 (U/l), UE160 Δ 859では5.69 ± 2.54 (U/l), カルモジュリン阻害剤 W7を添加した UE160では7.73 ± 4.39 (U/l) であった. (f) CaM 結合 gp160の検出, CdCl<sub>2</sub>添加4時間後の細胞抽出液100 μgに抗 gp120抗体を5 μg添加し, プロテイン A セファローズビーズを用いて免疫沈降した. SDS-PAGEの後, 抗 CaM モノクローナル抗体でイムノプロットを行ったところ, UE160および UE160 Δ 862で gp160/CaM 結合物が検出されたが, 他の3株は検出できなかった. 以上の知見から, gp160C末端の5アミノ酸残基以上を欠損させると細胞内で CaM と結合できなくなり, かつ, 核内カルシウムイオン濃度の上昇も起こさなくなる事が分かった. また, gp160と結合した CaM はその補酵素 (ホスホジエステラーゼ) 活性が有意に上昇し, 活性型 CaM である事も確認された. すなわち, CD4/gp160複合体形成の後, 直接 CaM に結合すると CaM は活性化され, 核膜のカルシウムイオンポンプが作動し, 核内のカルシウムイオン濃度が上昇, アポトーシスの誘導という一連の事象が推定される. 実際, HIV 非感染細胞 U937-2の抽出核に HIV-env 発現細胞 UE160の細胞質成分を添加すると, すみ

やかに核内カルシウムイオンの上昇が起りクロマチンの凝集像が観察された。

#### c. Fas 抗原の検討

UE160細胞は Fas を発現しており、gp160によるアポトーシスが Fas を介するものである可能性がある。そこで、中和活性を有する抗 Fas 抗体 (ZB4) を加えて Fas を介したシグナルを遮断した状態で、CdCl<sub>2</sub>を添加してインダクションをかけたところ、アポトーシスは同様に誘導された。この結果は、gp160によるアポトーシスは Fas とは異なるシグナル伝達経路を介して起きていることを示すものである。

#### d. 考察

Fisher らは細胞傷害性の低下した HIV mutant 株、X10-1と野生株の env を比較したところ、X10-1は Env C 末端の 5 アミノ酸残基が欠損していたと報告している。また、Srinivas らは cell-free product を用いた実験により CaM が gp160に結合すること、Miller らは CaM は gp160C 末端の約20アミノ酸残基に結合すると報告している。これらは我々の HIV-free の Env 発現系実験結果とほぼ一致している。

### D. 細胞増殖制御遺伝子 D123蛋白の変異と安定性

多細胞から成る生体では細胞の増殖が全体の統一を保つように制御されている。突然変異やがんウイルスにより細胞増殖を制御する遺伝子産物の質的あるいは量的変化が起こることがある。このような細胞が無秩序に細胞増殖を繰り返して腫瘍になる。したがって細胞の増殖の制御機構を遺伝子産物のレベルで解明することは重要なテーマの一つである。

生体内では大部分の細胞は細胞周期の G1期で増殖を停止している。この停止機構を明かにする目的で、ラット線維芽細胞株3Y1から、制限温度 (39.8℃) で G1期で可逆的に増殖停止する温度感受性変異株を多数分離した。これらの温度感受性変異株の一つである3Y1tsD123の温度感受性を引き起こしている変異遺伝子の cDNA を遺伝子相補によりクローニングした。このようにして我々がはじめて見つけた D123遺伝子に、3Y1tsD123では点突然変異が蛋白 (D123 蛋白) をコードする部分 (379番目のシトシンがチミンに置換、すなわち109番目のアラニンがバリンに置換) で 1箇所起きていた。3Y1tsD123では3Y1より著しく細胞当りの D123蛋白量が少なく (これは許容温度と制限温度の両方で認められるが制限温度ではさらに顕著になる)、これは変異 D123蛋白の寿命が短いことによることが蛋白合成阻害実験から分かった。

SV40でトランスホームした3Y1tsD123 (SV-3Y1tsD123) は制限温度に移すと特定の細胞周期に蓄積せずにアポトーシスにより死ぬが、SV40でトランスホームした3Y1 (SV-3Y1) は正常に増殖する。SV-3Y1tsD123にハイグロマイシン B 耐性遺伝子を含む発現ベクターに組み込んだ野生型 D123cDNA をトランスフェットするとハイグロマイシン B 耐性を獲得したクローンの大

部分（40%以上）は予想どおり制限温度で正常に増殖した。これらの温度耐性を獲得したクローンは D123 蛋白を SV-3Y1 と同程度に蓄積しており、またこの D123 蛋白は安定であった。したがって野生型の D123 蛋白が発現すれば SV-3Y1tsD123 は温度耐性に復帰することが分かった。一方、3Y1tsD123 の変異 D123cDNA をトランスフェクトしても大部分（99%以上）のクローンは温度感受性のままであった。しかし 1 株だけ温度耐性に復帰した細胞株（ts3）を得た。この株は許容温度と制限温度の両方で SV-3Y1 の場合以上の変異 D123 蛋白を蓄積した。蛋白合成を ts3 細胞で止めると、変異 D123 蛋白は許容温度と制限温度で同速度で急激に消失した。この時、変異 D123 蛋白は細胞外に分泌されなかったため、細胞内で分解されたと考えられる。ts3 では急激な分解を補うのに十分な速度で変異 D123 蛋白が産生されるものと考えられる。変異 D123 遺伝子コピー数が多いためにこのようなことが起こると予想される。制限温度で ts3 は増殖が非常に遅くしかも到達飽和細胞密度が非常に低いため、充分な変異 D123 蛋白量を有するにもかかわらず完全には温度耐性には復帰していないと考えられる。したがって 3Y1tsD123 および SV-3Y1tsD123 の温度感受性は、変異 D123 蛋白の減少よりこの蛋白の変異による機能不全の関与のほうが大きいと考えられる。

変異 D123 蛋白の分解機構を解明することにより、最近注目された蛋白分解機構に関する新たな知見を得る可能性がある。D123 蛋白の分解を促進するアミノ酸置換とこの蛋白の制限温度で機能不全を起こさせるアミノ酸置換とは同一であることから、変異 D123 蛋白の分解と細胞内での挙動との関係を調べる段階で D123 の機能に関する知見が得られる可能性がある。3Y1tsD123 や SV-3Y1tsD123 と異なり、ts3 は変異 D123 を大量に産生するため、この蛋白の分解機構を解明するのに非常に都合が良い細胞である。

SV-3Y1tsD123 から温度抵抗性の自然復帰株を 2 株分離した。その内 R1 株は D123 遺伝子の cDNA の蛋白をコードする部分での塩基配列には 3Y1tsD123 と比較して変化が無いにもかかわらず、変異 D123 蛋白の細胞当りの量は SV-3Y1tsD123 より顕著に増加しており、これは変異 D123 の分解が抑えられているためであることが判明した。R1 と SV-3Y1tsD123 を細胞融合させると、融合した細胞（薬品耐性のマーカーで調べる）の大部分は温度耐性でしかも変異 D123 蛋白は安定であった。当然 R1 と ts3 を融合した細胞は変異 D123 蛋白を ts3 以上に蓄積し、しかもこの蛋白は安定であった。このことから R1 には変異 D123 の分解機構を優性的に抑える機能を携えていると考えられる。この機能と関係した遺伝子の単離を現在計画中である。

他の 1 株 R2 は 379 番目のチミン（親株の 3Y1 ではシトシン）がグアニンに置換（すなわち 109 番目のバリン（親株の 3Y1 ではアラニン）がグリシンに置換）しており、やはり細胞当りの D123 蛋白量は増加しており、この分解も抑えられていることが分かった。したがってこの株では 109 番目の第二のアミノ酸置換により、D123 蛋白の安定性が回復していると考えられる。

変異 D123 蛋白の分解機構の詳細とそれに関係する遺伝子、および D123 蛋白と他の増殖制御関連遺伝子の機能との関連について今後明かにしてゆきたい。

## 業績目録

### 原著論文

1. Harada, M., Okamoto, T., Omoto, K., Tamada, K., Takenoyama, M., Hirashima, C., Ito, O., Kimura, G., and Nomoto, K. 1996.  
Specific immunotherapy with tumour-draining lymph node cells cultured with both anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies.  
Immunology 87, 447-453.
2. Okuda, A., and Kimura, G. 1996.  
An amino acid change in novel protein D123 is responsible for temperature-sensitive G1-phase arrest in a mutant of rat fibroblast line 3Y1.  
Exp. Cell Res. 223, 242-249.
3. Harada, M., Sumichika, H., Hamano, S., Ito, O., Tamada, K., Takenoyama, M., Kimura, G., and Nomoto, K. 1996.  
IL-3 derived from CD4<sup>+</sup> T cells is essential for the *in vitro* expansion of mast cells from the normal adult mouse spleen.  
Clin. Exp. Immunol. 106, 149-155.
4. Sasaki, M., Uchiyama, J., Ishikawa, H., Matsushita, S., Kimura, G., Nomoto, K., and Koga, Y. 1996.  
Induction of apoptosis by calmodulin-dependent intracellular Ca<sup>2+</sup> elevation in CD4<sup>+</sup> cells expressing gp160 of HIV.  
Virology 224, 18-24.
5. Yasaka, T., Ichisaka, S., Katsumoto, T., Maki, H., Saji, M., Kimura, G., and Ohno, K. 1996.  
Apoptosis involved in density-dependent regulation of rat fibroblastic 3Y1 cell culture.  
Cell Struct. Funct. 21, 483-489.

### 学会発表

1. 原田 守, 松永謙一, 小口義春, 飯島弘子, 木村元喜, 野本亀久雄 (1996, 7/24-26).  
大腸癌に伴う臓器特異的免疫抑制に対する PSK の効果.  
第7回日本生体防御学会総会, 名古屋.
2. 原田 守, 松永謙一, 小口義春, 飯島弘子, 木村元喜, 野本亀久雄 (1996, 10/10-12).  
大腸癌に伴う臓器特異的免疫抑制に対する PSK の効果.  
第55回日本癌学会総会, 横浜.
3. 佐々木正文, 古賀泰裕, 木村元喜, 野本亀久雄 (1996, 10/23-25).

HIV-1 env gp160結合 CaM の生理活性について.

第44回日本ウイルス学会総会, 静岡.

4. 大津真澄, 木村元喜, 滝本博明, 李 文, 野本亀久雄 (1996, 10/23-25).  
マウスサイトメガロウイルス感染防御における肺胞マクロファージの役割.  
第44回日本ウイルス学会総会, 静岡.
5. 濱野真二郎, 吉田裕樹, 滝本博明, M.S.Hossain, 南嶋洋一, 木村元喜, 野本亀久雄  
(1996, 10/23-25).  
マウスサイトメガロウイルス感染におけるマクロファージの役割の検討.  
第44回日本ウイルス学会総会, 静岡.
6. 一坂吏志, 勝本哲央, 佐治真里, 大野耕策, 木村元喜 (1996, 10/23-25).  
ラット3Y1細胞の増殖と生存に関する温度感受性変異株の細胞死.  
第49回日本細胞生物学会総会, 京都.
7. 原田 守, 玉田耕治, 阿部光一郎, 李 鉄麗, 尾上泰宏, 多田 斉, 竹之山光弘,  
安元公正, 木村元喜, 野本亀久雄 (1996, 11/26-28).  
IL-12の全身投与で誘導される抗腫瘍効果における局所リンパ節の意義.  
第26回日本免疫学会総会, 横浜.
8. 濱野真二郎, 吉田裕樹, 滝本博明, M.S.Hossain, 陳 其潔, 南嶋洋一, 木村元喜,  
野本亀久雄 (1996, 11/26-28).  
マウスサイトメガロウイルス感染初期におけるマクロファージの役割.  
第26回日本免疫学会総会, 横浜.
9. 滝本博明, Tak Woh Mak, 木村元喜, 野本亀久雄 (1996, 11/26-28).  
CD31/PECAM-1欠損マウスにおける白血球血管外遊走の解析.  
第26回日本免疫学会総会, 横浜.