ウイルス学部門
Department of Virology

ウイルス学部門の1990年の研究は，これ迄と同様に，三つの研究体制のもとに行なわれた．

1）　ウイルス学部門固有のもの．奥田篤行助教授をチームリーダーとして，細胞増殖の制御機構を細胞培養を用いて解明しつつある（continuum モデルの提唱とその確立）．また細胞の癌化はこの制御機構の攪乱であると把握し，SV40やアデノウイルスなどのDNA 型癌ウイルスの発癌機構を明らかにしようとしている．

2）　免疫学部門（野本亀久雄教授）との相互乗り入れによる共同研究．古賀泰裕助手をチームリーダーとして，ヒトのレトロウイルスの細胞に及ぼす作用を分子遺伝学的手法を用いて解析している．具体的にはHIV による細胞死の機序，Tリンパ球特異的遺伝子であるlck（チロシン特異的たんぱく質リン酸化酵素）の細胞増殖及び細胞分化における意義，成人T細胞白血病ウイルスによるlck 遺伝子の発現異常などについて，顕著な研究業績をあげている．

3）　オープンリサーチシステムによる研究．生体防御医学研究所の発足時から，オープンリサーチシステム専用の実験室を設置して，免疫学部門（野本亀久雄教授）と協力して運用している．他大学や他学部の研究者と，分野や機構の枠にしばられない横割りの共同研究を，ヒト由来の材料を対象として行なっている．特に，九大医学部第二外科（杉町圭蔵教授），東大農学部農芸化学科（小野寺一清教授）の協力により，主として癌を対象として，分子レベル，細胞レベル，免疫学などから臨床応用へと研究を展開している（肺癌チームのリーダー，矢野篤次郎）．

以上の研究活動の他に，当部門は本研究所の共通実験室の一つである中央電子顕微鏡実験室の管理運営をまかせられており（佐々木正文技官），充分な研究成果をあげている．

なお1991年の展望としては，当部門内に設置工事中のバイオハザード防止安全実験室が1991年3月に完成するのを待って，免疫学部門（野本亀久雄教授）との協力により，「ウイルス感染症の生体防御」の研究を新たに開始する予定である．ヒト及びマウスのサイトメガロウイルスを対象とする（チームリーダーは古賀泰裕助教授（免疫学部門））．

1990年に研究に参画したウイルス学部門固有のメンバーは次の通り．木村元喜（教授），奥田篤行（助教授），古賀泰裕（助手，1991. 1. 1に免疫学部門助教授に昇任），半田俊哉（助手，1990. 3. 31. 退職），吉野一郎（大学院生），梅野美一（大学院生，1990.3. 卒業，現九大第一内科），壁村まゆみ（大学院生，1990. 3. 卒業，現九大皮膚科），佐々木正文（技官），大津真澄（技官），谷真由美（研究補助員，1990. 9. 退職），本多佳奈子，（研究補助員，1990.8. より），浜田明子（パートタイム研究補助員，1990. 4. より）．

以下に1990年の研究成果の中のいくつかについて記す．

A. ラット線維芽細胞株３Ｙ１を用いた細胞増殖制御機構の研究（奥田篤行，壁村まゆみ，梅野美一，佐々木正文）

多数の細胞からなる生体内では，個々の細胞は秩序だった挙動をし全体としての統一性を保つ必要がある．したがって生体を構成している細胞は増殖を的確に制御しなければならない．実際，生体内では大部分の細胞は増殖を停止しており，細胞の外からのシグナルに応答して増殖を開始したり，再び停止したりすると考えられている．我々はラット線維芽細胞株３Ｙ１の培養細胞系を用いて，増殖制御機構の研究を行ってきた．本年は増殖制御機構が作動する細胞周期上の位置，癌遺伝子発現の増殖制御に対する影響，細胞間接着と増殖制御との関係について研究を行った．

A．a．細胞発熱量測定による新しい細胞増殖制御モデルの検証

増殖中の細胞は，細胞周期のＧ１期で特異的に起きる一連の反応を細胞外からのシグナルに応答して制御することにより，その増殖を制御しているという考え方が通説である．これに対し，細胞増殖の制御はＳ期の開始の準備過程を制御することにより行われるが，この準備過程はＧ１期に限らず，前の世代のＳ，Ｇ２期を含む全周期で一様に起きているというモデルを提唱してきた．我々のモデルの一つの検証のために，マイクロカロリメーター（微量熱量測定器）を用いて３Ｙ１細胞の細胞周期移行と熱発生との関係を調べた．飽和細胞密度でＧ１期DNA量を持って増殖停止している細胞（静止細胞）に種々の細胞成長因子を加えると，各細胞成長因子が有するＳ期に進入させる能力に対応して発熱量が上昇した．これに対し，Ｓ期の初めに同調した細胞は細胞成長因子が無くてもＳ，Ｇ２期を進行できるが，発熱量は上昇しなかった．これに対しＳ，Ｇ２期を種々の細胞成長因子の存在下で進行させると，各細胞成長因子が静止細胞をＳ期に進入させる能力に相関して発熱量が上昇した．一方，すでに報告してきたようにＳ，Ｇ２期を細胞成長因子存在下で通過してきた細胞は非存在下で通過してきた細胞に比べ，分裂後の細胞成長因子存在下でのＧ１期の長さが短くなる．したがって，今回の結果は，Ｓ期開始の準備過程は発熱量の増加を伴う細胞周期に依存しない反応を含むことを示している．

A．b．３Ｙ１細胞の温度感受性変異株の変異機能のv-H-rasによる克服

３Ｙ１細胞の温度感受性変異株tsD123，tsF121，tsG125，tsH203はそれぞれ相異なる遺伝的相補群に属し，非許容温度で主としてＧ１期で増殖が止まる．これらの変異株に核内癌遺伝子であるSV40のラージＴ抗原もしくはアデノウイルス12型のＥ１Ａたんぱくが発現すると，非許容温度でのＧ１期通過阻害が無くなる．

そこで細胞膜に存在し増殖制御シグナルの伝達機構を撹乱していると考えられているHarvey肉腫ウイルスのv-H-ras遺伝子でこれらの温度感受性変異株をトランスホームして温度感受性機能が克服されるか否かを調べた．その結果，tsF121のトランスホーム細胞のみが制限温度で

増殖できた．他の変異株をトランスホームしてもやはり制限温度でＧ１期の通過が阻害された．tsF121は血清，EGFなどの細胞成長因子の刺激により非許容温度でもＧ１期の進行が可能になることを考慮すると，tsF121は制限温度で増殖制御に関係したシグナル伝達系に異常が生じていると考えられる．v-H-ras遺伝子の発現をtsF121内で自由に制御できる系を作り，増殖制御に関係したシグナル伝達系のv-H-ras遺伝子による攪乱の機構を解明できる可能性がある．

A．c．細胞接着と増殖制御

多くの癌化していない細胞はプラスチック面等の基質に接着して増殖する．また基質面一杯になるまで増殖すると，重層せずに増殖が止まる．一方，癌化した細胞は基質に接着しなくても，また接着した場合には重層して増殖する．このような癌化していない細胞の培養系での増殖制御機構を，細胞表面には他の細胞の接着を阻害する物質があり，もし細胞どうしが接着した場合にはお互いの増殖を抑制する物質が存在するという観点から検討した．デッシュ面一杯まで増殖した３Ｙ１細胞のシートをホルマリンで固定し，その上に３Ｙ１細胞を蒔いても細胞は接着できなかった．同じ細胞シートをエタノールで固定すると，この上ではプラスチック面の上と同様に，細胞は接着伸展ともに正常に起きたが，増殖能が低下した．細胞シートを固定した時に得た，細胞のエタノール抽出液でデッシュをコートすると細胞の接着が阻害された．したがって，３Ｙ１細胞の表面には他の細胞が接着することを拒絶する物質と，接着した場合にはお互いの増殖を抑える物質が存在することが判明した．これらの物質の分離精製は今後の研究課題である．

B．HIV（エイズウイルス）感染によるＴリンパ球致死機構の解明（古賀泰裕，佐々木正文，大津真澄）

HIV virionを用いたHIV感染細胞の病態の解析はHIVゲノムにコードされた多数の遺伝子産物および感染細胞に於て種々の段階にあるHIVのライフサイクルを考慮しなければならず得られた実験結果の解釈は困難であることが多かった．これに対して我々が確立した実験系はenv遺伝子のみを発現するクローン化された細胞株であり（Kawamura, et al. J. Virol. 63:3748, 1989），inducerによるenv遺伝子の発現により確実に細胞死を再現させることができるため（Koga, et al. J. Immunol. 144:94, 1990）確固とした実験結果およびその解釈を得ることが可能である．HIV感染による細胞傷害にはenvとCD４が重要な要因であると考えられているがそれらが関与する細胞傷害の機序についてはこれまで１．合胞体形成，２．envタンパクgp120が細胞表面CD4抗原に結合することによって生じる細胞膜傷害がその主要なものとして提唱されてきた．これに対してCD４$^{+}$およびCD４$^{-}$ヒト細胞株を用いた我々のこれまでの研究により，envタンパクが細胞内でCD４分子との結合により複合体を形成し細胞内に沈着することがenvによる細胞傷害の最初のステップとなることが示された．ゆえにCD４$^{-}$細胞では同様にenvタ

ンパクが産生されてもCD 4 分子が存在しないため複合体を作らず細胞死も生じない．すなわちenvそれ自体は細胞にとって有害ではないがCD 4 と結合して複合体を形成することにより細胞内に蓄積しその結果細胞傷害をもたらすという機序が予想される．それではenv-CD 4 複合体は細胞のどの部位へ沈着するのか，そしてその結果生じたどの様な現象により細胞は死に至るのだろうか．この問に対して免疫電子顕微鏡法を用いた我々の検索により，env-CD 4 複合体が細胞質・核間の物質輸送の通路となる核膜孔周囲に大量に蓄積しているという現象が明らかになった．(Koga, et al. J. Virol. 64:4661, 1990)．このことはenv-CD 4 複合体による核膜孔を介した細胞間物質輸送の阻害がHIV感染における細胞死の主要な機序であるとの可能性を示唆した．さらに我々はこの仮説を実証するために核移行シグナルを持つ合成タンパクをそれらの細胞内に注入して解析を行ったところgp160 (envタンパク) 発現細胞株では細胞死に至る以前より核膜孔を介したタンパク輸送が阻害されていることが実証された (Koga, et al. J. Virol. 65(10), 1991, in press)．HIV感染の病態生理の解明にとどまらずウイルス病原性の分子的基盤の理解を深める上でも本研究により明らかにされている“細胞内の物質輸送の阻害”という新しい病態概念のさらなる伸展が期待される．

HIV-envの病原性は細胞内での蓄積性の多少によって決定されると考えられるが，その細胞側要因としてはこれまで述べてきたようにenvに結合してその蓄積性を増すCD 4 抗原量の多少があげられる．一方，env側要因としてはアミノ酸配列の変異に由来するenvタンパクのCD 4 分子とのbinding affinityの差および細胞外に分泌されないで細胞内に蓄積するgp160の発現量がその可能性としてあげられる．我々のこれまでの実験でもenvタンパクの中のgp160が“細胞傷害性envタンパク”であることを示唆する結果を得ている．

我々は現在これまでのvirion-freeの実験系を用いてgp160の病原性について検討を行っている．細胞内切断酵素活性により決定されると考えられるgp160／gp120生成量比がHIV感染による細胞傷害に関与しているという考えはこれまで提示されておらずその実証はHIV感染における病態生理の解明およびその治療に新しい局面を開くものと期待される．

C. 肺癌のLAK細胞による術後補助療法に関する研究（矢野篤次郎，吉野一郎，村田充弘）

免疫学部門野本亀久雄教授，九大医学部第二外科杉町圭蔵教授との協力のもとに，肺癌摘出手術後の再発抑制目的で，術後補助LAK（リンホカイン活性化キラーリンパ細胞）養子免疫療法を施行している．そのプロトコールは，術中郭清されるリンパ節より分離したリンパ球から，細胞培養法を用いて，LAK細胞を誘導・増殖させ，ステージⅠ肺癌患者を対象に，術後 2 ～ 3 週目に，インターロイキン－2 (IL-2) 投与併用下に移入するものである．1989年11月より開始し，現在までに18例の患者に施行した．このLAK療法の術後アジュバント効果観察と併行して，より有効かつ簡便・安全に行なう方法を研究し，本年は以下のことを明らかにした．

C. a. LAK療法により生体内に，NK細胞由来のLAK活性が誘導されるが，その他にも潜在的

キラー活性を有したＴ細胞が誘導される．このＴ細胞のキラー活性は，Ｔ細胞レセプターを介して，癌細胞と結合させると（抗体を用いて）発現される．そこで癌細胞抗原とＴ細胞レセプター両方に結合能力を有する抗体，すなわちbispecific抗体を併用することによって，現在のＬAK療法をより強力なものにすることが可能であることが示唆された．

C. b. 大量のLAK細胞培養をより簡便に行うために，LAK細胞専用の培養装置を開発したが，現在改良を加え，400mlサイズで最高（２～３）×10^7mlの細胞密度を維持することが可能になった．その際，増殖，誘導されるLAK細胞は，表面マーカー，LAK活性ともに，至適培養条件下に培養したLAK細胞に比べて同等であった．現在，さらにディスポ化を図っており，そのオリジナルタイプ完成の段階まで来ている．

C. c. LAK細胞の培養には，ヒト血清の添加が必要であるが，安全性の面では自己血清が望ましい為，現在は自己血清を用いている．しかし，その供給量には限界があり，培養のスケールアップに支障を来たしている．そこでLAK細胞培養（増殖・誘導両面で）に適した無血清培地をめざし，TYI-101培地を作成した．これまでの検索では，ヒト血清添加時に比し増殖率では同等であるが，LAK活性誘導面では，やや劣っている様である．ヒト血清に含まれるLAK活性誘導に必要な成分を明らかにし，その成分の添加を計画中である

（この研究（C.a.，C.b.，C.c. ）はオープンリサーチシステム専用実験室において行なった）．

原著論文

1．Murata,M., Yano,T., Togami,M., Yasumoto,K., Sugimachi,K., Kimura,G., and Nomoto,K. 1990.
Developmemt of a new culture system for human lymphokine-activated killer cells.
J.Immunol. Meth., 129, 89-95.

2．Okuda,A., and Kimura,G. 1990.
Cell-cycle independent increase in heat production in response to growth factors in cultured rat fibroblasts: Interpretation by continuum model.
Cell Biol. Int. Rep., 14, 15-24.

3．Koga,Y., Sasaki,M., Yoshida,H., Wigzell,H., Kimura,G., and Nomoto,K. 1990.
Cytopathic effect determined by the amount of CD4 molecules in human cell lines expressing envelope glycoprotein of HIV.
J.Immunol., 144, 94-102.

4．Shimura,H., Mitsudomi,T., Matsuzaki,A., Kabemura,M., Okuda,A., and Kimura,G.1990.
Transformation by v-H-*ras* does not restore proliferation of a set of temperature-sensitive cell-cycle mutants of rat 3Y1 fibroblasts.
Cell Struct. Funct., 15, 211-219.

5. Onodera,K., Takahashi,T., Watanabe,R., Ishibashi,Y., Sasaki,M., and Kimura, G. 1990.
Distribution of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the intermediate filaments of the cultured cells from a patient with tuberous sclerosis.
J.Dermatol., 17, 395-402.

6. Okamoto-Inoue,M., Taniguchi,S., Sadano,H., Kawano,T., Kimura, G., Gabbiani,G., and Baba, T. 1990.
Alteration in expression of smooth muscle α-actin associated with transformation of rat 3Y1 cells.
J. Cell Sci., 96, 631-637.

7. Yano,T., Murata,M., Yoshino,I., Ishida,T., Kimura,G., Sugimachi,K., and Nomoto, K. 1990.
Effect of an anti-CD3 antibody on the culture of lymphokine activated killer cells from human lymph node lymphocytes.
Cancer J., 3, 154-158.

8. Oh-hori,N., Koga,Y., Yoshida,H., Morita,M., Kimura,G., and Nomoto,K. 1990.
Human T-cell leukemia virus type-I-infected T-cell lines scarcely produce $p56^{lck}$, whether or not they express *lck* mRNA.
Int. J. Cancer, 46, 315-319.

9. Koga,Y., Sasaki,M., Nakamura,K., Kimura,G., and Nomoto,K. 1990.
Intracellular distribution of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus and its role in the production of cytopathic effect in $CD4^+$ and $CD4^-$ human cell lines.
J.Virol., 64, 4661-4671.

10. Okuda,A., Sasaki,M., and Kimura,G.1990.
Effects of surface substances of untransformed fibroblastic cells on the adhesion and proliferation of neighboring cells: a study using fixed confluent cell sheets.
Cell Struct. Funct., 15, 257-262.

11. Momozaki,N., Ogura,H., Matsuhashi,S., Joh,K., Tabuchi,K., Kimura,G., and Hori,K. 1990.
Selective syncytium formation by murine leukemia virus in rat 3Y1 fibroblasts transformed by adenovirus type 12 or its E1A gene.
Arch. Virol., 115, 123-126.

12. Okuda,A., and Kimura,G. 1990.
Contribution of growth factors to heat production by cultured rat fibroblasts.

Tokai J. Exp. Clin. Med., 15, 363-367.

総説，解説

1．木村元喜．1990.
G $_0$ ／G $_1$ 期と癌化．
実験医学，８，1469-1474.

2．戸上昌紀，木村元喜．1990.
小型高密度培養装置によるLAK細胞の培養．
BIOmedica, 5, 939-942.

3．木村元喜．1990.
バイオテクノロジー素材としての培養細胞（ウイルス発癌）．
蛋白質核酸酵素，35，2913-2914.

4．松崎彰信，奥田篤行，1990.
３Ｙ１クローン１－６，バイオテクノロジー素材としての培養細胞（ウイルス発癌）．
蛋白質核酸酵素，35，2921-2922.

著書

1．奥田篤行，木村元喜．1990.
細胞同調法．
最新動物細胞実験マニュアル（小田鈞一郎，大石道夫，谷口克編），pp. 63-76，エル・アイ・シー，東京．

2．谷川孝彦，高山寿雄，木村元喜，1990.
SV40による株化．
新生化学実験講座　18：細胞培養技術（日本生化学会編），pp. 244-249，東京化学同人，東京．

3．大野耕策，木村元喜．1990.
トランスフォーメーションの定量とトランスフォームした細胞の分離と解析．
新生化学実験講座　18：細胞培養技術（日本生化学会編），pp. 255-264，東京化学同人，東京．

学会発表

1．梅野美一，奥田篤行，志村英生，木村元喜（1990，7/3-7/5）．
FGFとコレラ毒素による細胞周期温度感受性変異株におけるＳ期進入阻害の克服．
第49回日本癌学会総会，札幌．

2. 井上光世，谷口俊一郎，鎌田真司，貞野宏之，木村元喜，馬場恒男（1990, 7/3-7/5).
src-形質転換3Y1細胞へのαアクチンcDNA導入とその発現.
第49回日本癌学会総会，札幌.

3. 戸上昌紀，木村元喜（1990, 7/6).
水平回転培養装置によるLAK細胞の培養.
第3回動物細胞工学研究会，東京.

4. Koga,Y., Kimura,G., and Nomoto,K.(1990, 8/26-8/31).
Cytopathic effect determined by the amount of CD4 molecules in human cell lines expressing *env* of HIV.
VIIIth International Congress of Virology, Berlin.

5. Nakamura,K., Koga,Y., Kimura,G., and Nomoto, K.(1990, 8/26-8/31).
Inefficient translation of lck mRNA in HTLV-I infected cell lines.
VIIIth International Congress of Virology, Berlin.

6. 村田充弘，戸上昌紀，矢野篤次郎，吉野一郎，安元公正，杉町圭蔵，木村元喜，野本亀久雄（1990, 10/8-10/10).
透析灌流培養装置によるLAK細胞の高密度培養.
第43回日本細胞生物学会大会，東京.
Murata, M., Togami,M., Yano,T., Yoshino,I., Yasumoto,K., Sugimachi,K., Kimura,G., and Nomoto,K. 1990.
Development of a new culture systems for lymphokine-activated killer cells.
Cell Struct. Funct., 15, 472.

7. 安本公正，中橋恒，亀井優徳，橋爪秀一，村上浩紀，木村元喜，野本亀久雄（1990, 10/31-11/1).
肺がん特異的ヒト型モノクローナル抗体が認識するチトクロームCを用いた，がんの血清診断.
第31回日本肺癌学会総会，東京.

8. 吉野一郎，村田充弘，矢野篤二郎，杉尾賢二，石田照佳，木村元喜，野本亀久雄，杉町圭蔵（1990, 10/31-11/1).
原発性肺癌に対する術後養子免疫療法の試み.
第31回日本肺癌学会総会，東京.

9. 矢野篤次郎，一瀬幸人，久田友治，麻生博史，原信之，大田満夫，木村元喜，野本亀久雄（1990, 10/31-11/1).
肺癌所属リンパ節から誘導されるCD8陽性T-LAK細胞の特性.
第31回日本肺癌学会総会，東京.

10. 半田俊哉，木村元喜，野本亀久雄（1990, 11/12-11/14).

マウスエクトロメリアウイルス感染におけるNK細胞及びIFN-γの役割.
第38回日本ウイルス学会総会，東京.

11. 古賀泰裕，中村和彦，木村元喜，野本亀久雄（1990, 11/12-11/14).
lck（Tリンパ球特異的チロシンキナーゼ）のHTLV-I 感染T細胞株における挙動.
第38回日本ウイルス学会総会，東京.
12. 佐々木正文，古賀泰裕，木村元喜，野本亀久雄（1990, 11/12-11/14).
HIV感染細胞致死機構の電顕学的分析.
第38回日本ウイルス学会総会，東京.
13. 吉田裕樹，古賀泰裕，木村元喜，野本亀久雄（1990, 11/12-11/14).
HIV-env遺伝子発現ヒト細胞株による合胞体形成機構の研究.
第38回日本ウイルス学会総会，東京.
14. 木村元喜，小野寺一清（1990, 11/13-11/14).
EIAトランスホーム細胞の膜と薬物の相互作用.
第12回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム，広島.
Kimura,G., and Onodera,K. 1990.
Properties and lipid-sensitivity of the cell membrane of adenovirus-transformed rat 3Y1 cells.
J. Pharmacobio-Dyn., 14 : S-83.
15. 古賀泰裕，大津真澄，森田稔，木村元喜，野本亀久雄（1990, 11/27-11/29).
CD 4 $^{+}$, lck mRNA－ヒト細胞株へのlck遺伝子の導入.
第20回日本免疫学会総会，東京.
16. 師井洋一，古賀泰裕，大津真澄，木村元喜，野本亀久雄（1990, 11/27-11/29).
lckトランスジェニックマウスの作製と解析.
第20回日本免疫学会総会，東京.
17. 吉田裕樹，古賀泰裕，中村和彦，木村元喜，野本亀久雄（1990, 11/27-11/29).
リンパ球特異的チロシンキナーゼ$p56^{lck}$によるCD 4 internalizationの抑制.
第20回日本免疫学会総会，東京.
18. 中村和彦，古賀泰裕，木村元喜，野本亀久雄（1990, 11/27-11/29).
２つの異なるプロモーターより転写されたlck mRNAのT細胞分化における役割.
第20回日本免疫学会総会，東京.
19. 吉野一郎，矢野篤次郎，村田充弘，木村元喜，野本亀久雄（1990, 11/27-11/29).
LAK/IL-2療法後における末梢血T細胞の細胞傷害能.
第20回日本免疫学会総会，東京.