

ウイルス学部門 Department of Virology

ウイルス学部門の1991年の研究は三つの研究体制のもとで行われた。A) ウイルス学部門固有のメンバーによる研究。線維芽細胞の培養を用いるモデル実験系を組み、細胞増殖の制御機構の理論の提出とその実証についての研究を進展させた。またDNA型がんウイルスの遺伝子の働きによってこの制御機構が乱されると細胞が癌化することを利用して、細胞癌化の機構を明らかにする研究を進展させた。B) 免疫学部門（野本亀久雄教授）との共同研究。従来から行ってきた研究を進展させ、HIVの感染細胞致死作用の機構をほぼ解明した。またTリンパ球の活性化の機構を、Tリンパ球特異的遺伝子 *lck* を切り口にしてさらに追求した。さらに、1991年3月にバイオハザード防止安全実験室が当部門に整備されたのを待って、ウイルス感染症の生体防御の研究を開始した。免疫学部門とのこれらの共同研究は、古賀泰裕助教授（免疫学部門）をチームリーダーとして行われ、そこで得られた研究成果に加えて、ウイルス学部門におけるウイルス学研究に免疫学を導入することができた点でも大きな意義があった。これとは別に、九大農学部食料化学工学科（菅野道広教授）に協力して、食品成分の細胞に与える影響について共同研究を行った。C) 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に設置したオープンリサーチシステム専用の実験室を免疫学部門（野本亀久雄教授）と協力して運用してきた。分野や所属する体制を異にする研究者が集まって研究チームを組み、ヒトを対象とした共同研究を行っている。主として九大医学部第2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）に、企業体研究陣を加えてチームを組み、主として肺癌を対象として基礎研究から臨床応用へ、また臨床から基礎研究へのフィードバック、と研究を展開している。

1991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である。木村元喜（教授）、奥田篤行（助教授）、田中和生（助手、1991. 6. 1より）、吉野一郎（大学院生）、佐々木正文（技官）、大津真澄（技官）、本多佳奈子（研究補助員、1991. 6.15退職）、富島和美（研究補助員、1991. 6.10より、1991.12.28退職）、早川いずみ（研究補助員、1991.12. 7より）。

以下に1991年の研究成果のうちのいくつかについて記す。

A. a. ラット3Y1細胞の温度感受性細胞周期変異株の変異遺伝子の単離

多細胞からなる動物個体内では、各々の細胞は細胞外からのシグナルを認知しながら自分自身の増殖を制御して、個体全体として統一を保っている。成熟個体内では、大部分の細胞は細胞周期上のG1期のDNA量を持って増殖を止め静止状態にある。それ故に細胞増殖の制御はDNA合成の開始（S期の開始）に必要な準備過程を制御することによって行われると考えられ

ている。細胞増殖制御機構の研究の多くは、培養系で細胞増殖を可逆的に制御できる正常（非トランスホーム）線維芽細胞を用いて行われてきた。

我々はラット正常線維芽細胞株3Y1から39.8℃（制限温度）でG1期DNA量を持って可逆的に増殖停止し、長期間制限温度で生存可能な温度感受性変異株を多数分離し、これらを相補群に分類し、それぞれの相補群に属する代表株を用いてS期の開始に必要な過程を解析してきた。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℃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G1期DNA量を持って増殖停止し、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静止状態に入った細胞（いわゆるG0期細胞）に血清を加えると、制限温度でもS期に入る。

このtsD123細胞の変異遺伝子を単離し、その機能と発現調節を調べることにより、G0/G1期での増殖制御機構を明かにする上での重要な知見が得られると考え、この変異株の温度感受性を相補する遺伝子の単離を試みた。tsD123をSV40でトランスホームしたSV-tsD123細胞は親のtsD123細胞とは異なり（tsD123は制限温度で可逆的に増殖停止している）、許容温度から制限温度に移すと急激に死ぬ。したがって極めて微量しかない相補遺伝子を極めて多数のSV-tsD123にトランスフェクトして、極くわずかししか出てこない温度耐性復帰株の分離ができると予想した。そこでSV-tsD123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（阪大、岡山博人教授より分与）を導入し、制限温度で増殖できる細胞株を7株分離した。この7株の細胞からそれぞれDNAを調製して再びSV-tsD123に導入して、導入cDNAライブラリーの共通マーカーであるG418耐性を有し、かつ温度耐性に復帰した細胞株（二次復帰細胞株）を3株分離した。それぞれの二次復帰細胞株とCOS細胞（ラージT抗原を産生し、SV40が増殖可能な細胞）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）培養し、そこから抽出した細胞DNAに比べ低分子量のDNAを大腸菌に導入して二次復帰細胞のDNAに組み込まれているプラスミドを3種類回収することに成功した。その内の1個はneo遺伝子と1.8kbの挿入DNAとを含んでいた。サザンブロットでこの1.8kbのDNAは上記の3つの二次復帰株のDNAに組み込まれていることを確認した。さらにこのプラスミドをtsD123に導入すると制限温度でも増殖する細胞が得られた。したがってこの1.8kbの挿入DNAはtsD123の温度感受性の機能を相補する遺伝子を含むと考えられる。

ここで単離した遺伝子の構造、発現調節、および機能について調べ、細胞増殖の制御におけるこの遺伝子の作用について明らかにしてゆきたい。

A. b. SV40によるラット3Y1細胞のトランスホメーション頻度のウイルス感染時の細胞状態依存性

DNA型の癌ウイルスの一つであるSV40は、主としてサルの細胞で増殖する。この際自分自

身の DNA 複製のために必要な材料を宿主細胞に依存している。生体内では大部分の細胞は増殖を停止していて静止状態にある。静止状態の細胞に SV40 が感染してウイルスが増殖する時には、まず SV40 の初期遺伝子であるラージ T 抗原が発現し、その作用で DNA の複製の準備ができ、細胞 DNA の複製開始後ウイルス DNA の複製が起こる。一方、ラット線維芽細胞株である 3Y1 に SV40 が感染すると、ウイルス DNA の複製したがってウイルスの増殖はできないが、一部分の細胞ではラージ T 抗原の遺伝子が細胞 DNA に組み込まれ、ラージ T 抗原が持続的に産生されるため、静止状態に入れなくて無秩序に増殖する細胞（トランスホーム細胞、癌化細胞）になる。細胞がトランスホーム状態を維持する時だけでなく、ウイルス遺伝子を細胞 DNA に組み込んでトランスホームさせるときにもラージ T 抗原が必要である。

我々は SV40 による 3Y1 細胞のトランスホームの頻度が、感染時の細胞の状態に依存していることを見出してきた。すなわち、増殖中の細胞は飽和細胞密度で増殖停止した静止細胞に比べ、はるかにトランスホームしにくい。このトランスホーム効率を支配する細胞側の要因について調べた。

静止細胞に高濃度の血清を含む新しい培地を加える（血清刺激）と細胞は増殖サイクルに入り、DNA 合成（S 期）を開始する。血清刺激後、継時的に SV40 を感染させてトランスホーム効率を調べると、S 期に入る時点で感染させた細胞のトランスホーム効率はすでに最低値まで低下していた。このような増殖状態に入ったときのトランスホーム効率の低下は SV40 の DNA の細胞へのトランスフェクションでは起きなかった。SV40 の細胞への吸着は増殖状態に依存しなかったが、ラージ T 抗原の発現は mRNA および蛋白のレベルで増殖状態で減少していた。したがって細胞が静止状態から増殖状態に移行するとウイルスの吸着から核への移行の過程が阻害され、これがトランスホーム効率の低下と関係していると考えられる。現在までほとんど分かっていないこの過程の解明が望まれる。

B. HIV（エイズウイルス）—env 遺伝子発現：ヒト細胞株を用いた HIV 感染細胞の致死機構

HIV virion を用いた HIV 感染細胞の病態の研究は 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おい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、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実験結果の解釈が容易である。

HIV 感染による細胞傷害は env 蛋白と CD4 が重要な要因であることが知られている。それらの要因による細胞傷害の機序としてこれまで、1. 合胞体形成、2. env 蛋白 gp120 が細胞表面 CD4 に結合することによって生じる細胞膜傷害あるいは免疫反応、がその主要なものとして提唱されてきた。これに対して我々は CD4⁺ および CD4⁻ ヒト細胞株を用いて研究を進め、env 蛋

白 gp160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蓄積することが env 蛋白による細胞傷害の最初のステップとなることを示した。免疫電顕法を用いた検索により gp160/CD4複合体は細胞質・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た。このことは gp160/CD4複合体による核膜孔を介した細胞内物質輸送の障害が HIV 感染による CD4⁺細胞の死の原因である可能性を示唆した。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核移行蛋白をそれらの細胞質に注入し、核移行蛋白が核膜孔を通過して核内へ移行するかについて検討した。核移行シグナルを持つ合成核移行蛋白 (BSA-S) はウシ血清アルブミン (BSA) に架橋試薬を用いて13mer 合成ペプチド (CGYGPKKKRKVGG, 下線部は SV-40 T 抗原の核移行シグナルペプチドを示す) を1BSA 分子あたり15~17分子結合させて作った。次に BSA-S を赤血球ゴースト法により細胞内に注入し、抗 BSA 抗体を用いた蛍光抗体法により BSA-S の核への移行を観察した。U2ME7 (CD4⁺細胞で Cd²⁺等のインデューサーを加えると gp160を発現し細胞死を生じる), UPME1細胞 (同様にインデューサー添加により gp160を発現するが U2ME7と異なり CD4⁻であるため細胞死は生じない) のいずれにおいても Cd²⁺添加前には BSA-S の核への移行が容易に観察された (図 1, A, B)。そして U2ME7では Cd²⁺添加 4 時間後の極めて早期の細胞傷害の徴候がまだ出現していない時点において、すでに BSA-S の核移行は阻害されていた (C)。一方同時点の UPME1では核移行の阻害はなかった (D)。以上の結果から U2ME7の細胞死は gp160/CD4複合体の細胞内蓄積による核膜孔の輸送機能障害がその原因となることが推測された。他の研究グループの追試により gp160/CD4複合体は ER (粗面小胞体) 内、かつ特に核膜周囲の ER 内に蓄積することが確認されており、図 2 はこれらの結果から得られた細胞傷害機序をモデル化したものである。現在さらに詳細な検討を進めている。なおこの研究は生医研免疫学部門古賀泰裕助教授との共同にて行われた。

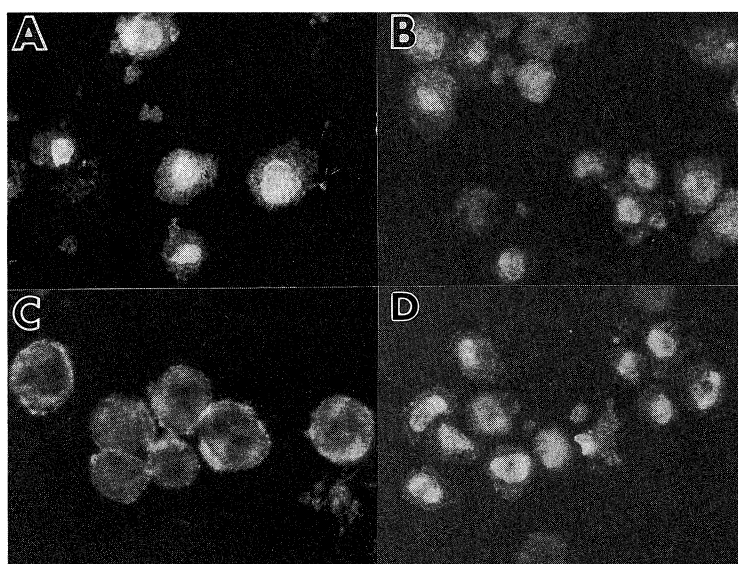


図 1

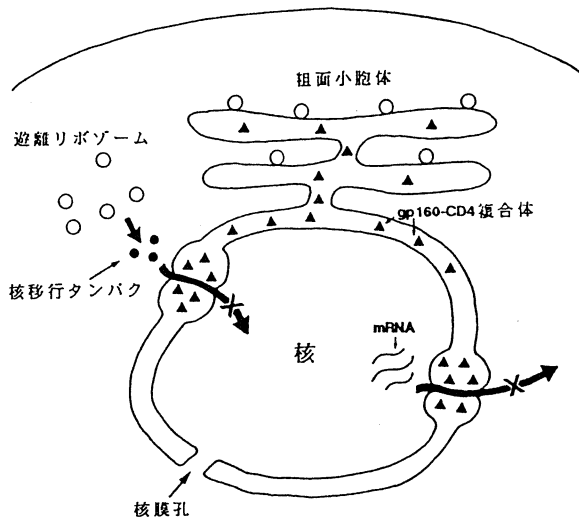


図2 gp160-CD4複合体による細胞質・核間輸送の障害

C. 肺癌の LAK 細胞による術後補助療法に関する研究（オープンリサーチシステムによる研究）

1989年より、肺癌術後補助療法（再発予防）として、LAK細胞養子免疫療法を行ってきた。Stage I 肺癌症例を対象に、所属リンパ節リンパ球を2～3週間培養、誘導したLAK細胞を、平均 7×10^9 （ $2 \sim 11 \times 10^9$ ）個点滴静注移入し、同時にIL-2を 2×10^6 単位/日、6日間皮下投与した。1991年12月で第1次研究終了とし、20例のエントリーを終えた。最終登録症例の観察期間が1年以上になるのを待って、成績の中間検討を行う予定である。なお、免疫学的には、6割の症例でin vitro LAK活性の発現が認められている。これまでに、培養失敗や重篤な副作用による脱落例はなく、独自に開発しているLAK細胞培養用の小型高密度培養装置により、効率的且つ安全に施行できている。

培養装置に関しては、既に1990年までに2週間以上の継続培養で 3×10^7 /mlの高密度培養という性能が達成されており、1991年は、その性能を維持したままディスポーザブル型化することに主眼をおいた。現行の培養装置の原理をそのまま金属・ガラス製からプラスチック製へと変更し、皿状の培養槽と灌流槽を、透析膜をはさんで張り合わせたディスポ化培養装置を試作した。現時点で、 2.5×10^7 /mlまで培養可能であった。

さらに1992年を展望してLAT療法（従来のキラー細胞（LAK）だけでなく、CD4陽性T細胞を含む全てのT細胞サブセットを用いる新規療法）を目指してリンパ球の培養法の基礎実験も開始した。リンパ球をIL-2のみで長期培養すると、リンホカイン産生に必要なCD4陽性T細胞

の減少が起こる。これは、CD4陽性T細胞のIL-2 β -レセプターの発現がない為と考えられた。そこで、まず抗CD3抗体で刺激し、CD4陽性T細胞のIL-2 β -レセプターの発現を増強した後に、IL-2で培養する方式を考案し、ほぼ理論通りにCD4陽性T細胞の増殖を可能にすることが出来た。今後は、増殖したCD4陽性T細胞のリンホカインの産生状況を検索し、より多種且つ多量にリンホカインを産生させる系へと発展させる予定である。さらに、LAT療法の施行に際して、必要とされるT細胞のサブセットが症例によって異なる局面も想定されるので、特定のサブセットを選択的に増殖させる培養法の確立をめざす。

原著論文

1. Yano,T., Ishida,T., Yoshino,I., Murata,M., Yasumoto,K., Kimura,G., Nomoto,K., and Sugimachi,K. 1991.
A regimen of surgical adjuvant immunotherapy for cancer with interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells.
Biotherapy 3, 245-251.
2. Yoshino,I., Yano,T., Yoshikai,Y., Murata,M., Sugimachi,K., Kimura,G., and Nomoto,K. 1991.
Oligoclonal T lymphocytes infiltrating human lung cancer tissues.
Int. J. Cancer 47, 654-658.
3. Yoshino,I., Yano,T., Murata,M., Ishida,T., Sugimachi,K., Kimura,G., and Nomoto,K. 1991.
Cytolytic potential of peripheral blood T lymphocytes following adoptive immunotherapy with lymphokine-activated killer cells and low-dose interleukin-2.
Cancer Res. 51, 1494-1498.
4. Togami,M., Yasumoto,K., Yano,T., Ishida,T., Kimura,G., Sugimachi,K., and Nomoto,K. 1991.
Studies of serum-free medium for the generation of lymphokine-activated killer cells.
Cytotechnology 6, 39-47.
5. Nakamura,K., Koga,Y., Yoshida,H., Kimura,G., and Nomoto,K. 1991.
Differential expression of two lck transcripts directed from the distinct promoters in HTLV-I⁺ and HTLV-I⁻ T-cells.
Int. J. Cancer 48, 789-793.
6. Yano,T., Kimura,G., Hara,N., Ohta,M., Sugimachi,K., and Nomoto,K. 1991.
Cytolytic profiles of interleukin-2-activated lymphocytes derived from various sites in lung cancer.

Cancer J. 4, 174-177.

7. Moroi, Y., Koga, Y., Nakamura, K., Ohtsu, M., Kimura, G., and Nomoto, K. 1991.
Accumulation of p60^{src} in HTLV-I-transformed T cell lines detected by an anti-lck monoclonal antibody, MOL 171.
Jpn. J. Cancer Res. 82, 909-915.
8. Koga, Y., Sasaki, M., Yoshida, H., Ohtsu, M., Kimura, G., and Nomoto, K. 1991.
Disturbance of nuclear transport of proteins in CD4⁺ cells expressing gp160 of human immunodeficiency virus.
J. Virol. 65, 5609-5612.
9. Momozaki, N., Ogura, H., Miyazaki, J., Matsubashi, S., Joh, K., Kimura, G., Tabuchi, K., and Hori, K. 1991.
Suppression of murine leukemia virus-mediated 3Y1 cell fusion by expression of mouse MHC class I.
Arch. Virol. 119, 43-52.
10. Edamura, T., Maruyama, Y., Soeda, E., Kimura, G., and Onodera, K. 1991.
Isolation of cDNA including a reverse transcriptase-like sequence transcribed from the long interspersed repetitive DNA sequence of rat.
Agric. Biol. Chem. 55, 2475-2478.
11. Murata, M., Yano, T., Yoshino, I., Togami, M., Sogabe, M., Yasumoto, K., Sugimachi, K., Kimura, G., and Nomoto, K.
Development of a new culture system for human lymphokine-activated killer cells : Comparison with a conventional static culture method.
Cytotechnology 7, 75-83.

総説、解説

1. 高山寿雄, 木村元喜, 1991.
ウイルスによる株化. 分子細胞遺伝学実験法 (小山秀機, 鮎沢大, 瀬野悍二 編) 蛋白質核酸酵素 (臨時増刊) 36, 2068-2071.
2. 奥田篤行, 大野耕策. 1991.
ラット3Y1細胞周期変異株. 分子細胞遺伝学実験法 (小山秀機, 鮎沢大, 瀬野悍二 編) 蛋白質核酸酵素 (臨時増刊) 36, 2119-2122.
3. 谷川孝彦, 高山寿雄, 木村元喜. 1991.
ウイルス温度感受性株によるトランスホメーション. 分子細胞遺伝学実験法 (小山秀機, 鮎沢大, 瀬野悍二 編) 蛋白質核酸酵素 (臨時増刊) 36, 2128-2130.

著書

1. Ishibashi,Y., Watanabe,R., Nogita,T., Takahashi,T., Onodera,K., and Kimura,G. 1991.
Abnormal gene expression of stroma cells in patients with tuberous sclerosis. In
“Tuberous sclerosis and allied disorders” (W.G.Johnson and M.R.Gomez, Eds.)
Ann. N. Y. Acad. Sci., Vol. 615, pp. 218-242. N. Y. Acad. Sci. New York.
2. Onodera,K., Takahashi,T., Ito,S., Kimura,G., Watanabe,R., and Ishibashi,Y. (1991).
Molecular biology of cultured cells from a patient with tuberous sclerosis. In
“Tuberous sclerosis and allied disorders” (W.G.Johnson and M.R.Gomez, Eds.)
Ann. N.Y.Acad. Sci., Vol.615, pp.372-377. N.Y.Acad. Sci. New York.

学会発表

1. 吉野一郎, 矢野篤次郎, 吉開泰信, 村田充弘, 杉町圭蔵, 木村元喜, 野本亀久雄 (1991, 9
/11-9/12).
肺癌腫瘍内浸潤リンパ球のクローナリティーの解析.
第50回日本癌学会総会, 東京.
2. 豊島宗厚, 相川啓子, 曾我憲二, 柴崎浩一, 白木和子, 木村元喜 (1991, 9/10-9/12).
アデノウイルス12型トランスフォーム細胞に対する温熱効果.
日本癌学会総会, 東京.
3. 田中和生, 木村元喜, 野本亀久雄, J.W.Kupiec-Weglinski, N.L. Tilney, (1991, 9/26-9/
28).
移植片生着延長効果を持つ抗原特異的 Suppressor T cell (Ts) の作成とそのレシピエント
体内に於ける Biodistribution : 抗原特異的免疫抑制に於ける “場” の役割.
第27回移植学会総会, 東京.
4. 佐々木正文, 古賀泰裕, 大津真澄, 木村元喜, 野本亀久雄 (1991, 10/23-10/25).
HIV 感染細胞致死機序への核膜物質輸送阻害の関与.
第39回日本ウイルス学会総会, 福岡.
5. 古賀泰裕, 吉田裕樹, 木村元喜, 野本亀久雄 (1991, 10/23-10/25).
HIV-gp160と HIV-gp120の細胞障害性の差異.
第39回日本ウイルス学会総会, 福岡.
6. 中村和彦, 古賀泰裕, 吉田裕樹, 大津真澄, 木村元喜, 野本亀久雄 (1991, 11/27-11/29).
抗 Lck モノクローナル抗体 MOL294の細胞内注入による T細胞活性化の抑制.
第21回日本免疫学会総会, 熊本.
7. 吉田裕樹, 古賀泰裕, 木村元喜, 野本亀久雄 (1991, 11/27-11/29).
リンパ球特異的チロシンキナーゼ p56^{lck}による CD4 internalization の調節.

第21回日本免疫学会総会，熊本．

8. 吉野一郎，村田充弘，矢野篤次郎，木村元喜，野本亀久雄（1991，11／27-11／29）．

肺癌浸潤T細胞の性質．

第21回日本免疫学会総会，熊本．

9. 寺尾浩，古賀泰裕，大津真澄，木村元喜，野本亀久雄（1991，11／27-11／29）．

マウスサイトメガロウイルス（MCMV）を用いた日和見感染の研究．

第21回日本免疫学会総会，熊本．

10. 師井洋一，古賀泰裕，大津真澄，木村元喜，野本亀久雄（1991，11／27-11-29）．

1ck-トランスジェニックマウスの解析．

第21回日本免疫学会総会，熊本．

11. 奥田篤行，木村元喜（1991，11／21-11／23）．

ラット繊維芽細胞の増殖制御における G1期と G2期の意義．

第44回日本細胞生物学会大会シンポジウム，福岡．

Okuda,A., and Kimura,G. 1991.

Proliferation control in G1 and G2 phases in cultured fibroblasts.

Cell Struct. Funct., 17 : 535.

12. 野田敏司，松尾哲孝，奥田篤行，木村元喜，山田耕路，菅野道広（1991，11／15-11／16）．

SV3Y1細胞の増殖に及ぼす飽和脂肪酸の影響．

平成3年度日本栄養・食糧学会，日本栄養改善学会中国・四国支部，西日本支部連合学会，山口．

13. 松尾哲孝，野田敏司，奥田篤行，木村元喜，山田耕路，菅野道広（1991，11／15-11／16）．

ラット3Y1細胞の増殖に及ぼす飽和脂肪酸の影響．

平成3年度日本栄養・食糧学会，日本栄養改善学会中国・四国支部，西日本支部連合学会，山口．