

ウイルス学部門 Department of Virology

1993年は、免疫学部門の協力を得て主として下記の研究課題について研究を行った。

- 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び、非特異的防御因子とくにマクロファージのウイルス排除における相対的重要性を決定する研究に着手した。
- 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によるマウスの持続感染系を設定し、T細胞の分化、増殖、機能発現に及ぼすウイルス感染の影響を解析し成果を挙げた。
- 3) ウイルスが感染細胞を殺すしくみ。HIVのenv遺伝子をヒト培養細胞に人工的に発現させる実験系を作成し、このウイルス遺伝子産物が細胞を殺すしくみを明らかにした。
- 4) 細胞増殖の制御機構。培養線維芽細胞3Y1の細胞周期変異株を利用して分離された新規の増殖制御遺伝子D123の機能を明らかにしつつある。

1993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、1993. 6. 30より休職）、原田守（助手、1993. 10. 1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、1993. 3. 31退職）、堤華恵（研究補助員、1993. 4. 22より）。

A. ウイルス性疾患の病因論

a. サイトメガロウイルス（CMV）感染症

CMV感染症なかでもCMV間質性肺炎は骨髄移植等の患者において特に問題となり、直接死因ともなりうるので臓器移植の大きな妨げになっている。ウイルス学部門ではこの病因論について以前より解析を行なってきた。昨年までに以下のことを報告してきた。

① BALB/c雄マウスに 1×10^8 PFU (=0.02LD₅₀)のmurine CMV (MCMV)を接種すると接種4週間後にはウイルスは唾液腺でのみ検出され、他の胸腺、脾臓、肝臓、骨髄、肺などでは遺伝子レベルでも検出できなかった。このMCMV持続感染マウスに抗CD3抗体を投与し(50 μ g/mouse)、T細胞をin vivoで活性化すると、悲感染対照群マウスに比べ血中サイトカイン(TNF- α , IFN- γ)レベルが有意に上昇した。このマウスは病理学的には間質性肺炎にて抗CD3抗体投与後24~48時間で死亡した(死亡率60%)。しかしこの肺で遺伝子レベルでもMCMVは検出出来なかった。一方、MCMV非感染マウスでは抗CD3抗体の投与量に関係なく、抗体投与後に死亡は認められなかった。又抗CD3抗体投与と同時にサイクロスポリンAを投与し、血中のサイトカインの上昇を抑えると死亡率も低下し(10%)、間質性肺炎も認められな

くなった。以上のことから CMV 間質性肺炎の病因には MCMV 自体よりもサイトカインが関与していることが明らかとなった。更に、免疫抑制剤として用いられている抗 CD3 抗体は CMV 感染症ではリスクファクターとして働くことを示した。

② MCMV 持続感染 BALB/c マウスに抗 CD3 抗体を *in vivo* で投与すると胸腺の CD4⁺CD8⁺ の double positive (DP) 細胞のみが選択的に消失していた (75.7% → 3.3%)。一方 MCMV 非感染マウスではこの様な抗 CD3 抗体投与後の DP 細胞の消失は見られなかった (78.6% → 73.4%)。電子顕微鏡を用いた形態学的検索などより、この DP 細胞の消失はアポトーシスによることが分った。さらにこのアポトーシスの原因が上述①で示した様な TNF- α 等のようなサイトカインによる二次的なものか、それとも細胞自体の変化によるものかを調べる目的で、MCMV 持続感染マウスの胸腺を摘出し、*in vitro* で抗 CD3 抗体で刺激すると、細胞はアポトーシスを示した。この時の細胞内カルシウムイオン濃度の変化をレーザー顕微鏡で調べたところ、感染マウスでは非感染マウスに比べ抗 CD3 抗体刺激で細胞内カルシウムイオン濃度は著しく増加した。しかしこの時 protein kinase C 活性はむしろ低下しており、胸腺細胞自体の細胞内情報伝達系の異常が MCMV 持続感染マウスでは認められた。

MCMV 持続感染マウスではこの様な CD3 分子に関連した T 細胞系の異常が認められ、これが病因となっていることが明らかとなった。そこで 1993 年度は東海大学感染症学教室 (古賀泰裕教授) との共同実験などで①末梢 T 細胞ではどの様な変化があるのか、②骨髄の T 前駆細胞はどの様に変化しているのか、の 2 点についてを検討した。

① MCMV 持続感染マウスの脾臓を摘出し、脾細胞浮遊液を *in vitro* で抗 CD3 抗体で刺激し、培養上清中の IL-2, IFN- γ , TNF- α の濃度を ELISA 法にて定量した。非感染マウス脾細胞と比較して MCMV 持続感染マウス脾細胞では、TNF- α の産生は同程度であったが IL-2, IFN- γ の産生は亢進していた。ところがこの時の細胞増殖能を MTT 法、³H-TdR 取り込みで調べたところ、MCMV 持続感染マウス脾細胞は抗 CD3 抗体刺激では増殖能を示さなかった。即ち、MCMV 持続感染では末梢 T 細胞は preactivate された状態になっており、CD3 分子を介した刺激に対してサイトカインの産生は行いが増殖はせず、一種のアレルギーの状態になっていることが明らかとなった。

② MCMV 持続感染 BALB/c マウス (H-2^d, Ly1.2) の T 細胞除去骨髄細胞を [BALB/c × DBA/2 (H-2^d, Ly1.2)] F1 マウスに移植し、移植後の胸腺でのキメリズム、GvH の程度で MCMV 持続感染マウスの T 前駆細胞の変化を調べた。骨髄移植 8 週後には MCMV 感染、非感染ドナー由来の細胞はレシピエント胸腺内ではそれぞれ 37, 40% を示しており両者間には差はなかった。また脾臓重量、体重にも両者間に差はなく GvH についても差は認められなかった。さらにこのレシピエントマウスに抗 CD3 抗体を投与してもドナーに関係なく死亡は認められなかった。

以上のように 1993 年度の研究結果より CMV 感染では T 細胞分化の過程で胸腺細胞以降の細

胞で CD3 分子を介したシグナル伝達に変化が起これり、これが病因となっていることが明らかとなった。今後はこの変化を分子、遺伝子レベルで明らかにし、さらにこの病因論に基づいた治療法を検討する予定である。

b. HIV 感染細胞の細胞死のメカニズムの解析

エイズは HIV (human immunodeficient virus) がヒト CD4 陽性細胞に感染し、これを破壊することにより致死的な免疫不全を惹起する症候群である。ウイルス学部門では以前よりこの CD4 陽性細胞の消失の機序について検討してきており、1992 年度迄には以下のことを明らかにしてきた。

① HIV の env 遺伝子をヒトメタロチオネイン 11A プロモーターとネオマイシン抵抗遺伝子を持つベクターにつなぎ、CD4 陽性株にトランスフェクトし、重金属添加により env 遺伝子を発現する細胞株を樹立した。この細胞株を用いて、HIV エンベロープ蛋白 gp120 の前駆体である gp160 と細胞の CD4 分子とが結合することを示した。通常 gp160 単独では細胞内のリソゾームによりこれは消化、処理されてしまうが、gp160/CD4 複合体は細胞内に蓄積し、この複合体は細胞の核の核膜孔を閉塞する。

② この gp160 を大量に発現し、gp160/CD4 複合体を形成した細胞は電子顕微鏡所見では核クロマチンの凝集、生化学的には DNA の断片化を示し、アポトーシスにより死滅する。

③ CD4 陽性細胞株に gp160 を発現させ、レーザー顕微鏡にて観察すると細胞内カルシウムイオン濃度の増加が認められた。

以上の実験結果をもとに、1993 年度は東海大学感染症学教室と共同で、① gp160 発現 CD4 陽性細胞では細胞内カルシウムイオンが直接アポトーシスを誘導するのか、② 核膜孔の閉塞は直接アポトーシスを誘導するのか、の 2 点について研究をおこなって次の結果を得た。

① CD4 陽性単球様細胞株 U937-2 に由来し Cd²⁺ 添加により gp160 を発現する細胞株 UE160 を用いて実験を行った。UE160 に Cd²⁺ を添加し、共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、細胞内カルシウムイオン濃度は添加前の 3 ~ 7 倍に増加し、かつ生化学的に調べると 80% の細胞に DNA の断片化が認められた。この反応においてカルシウムキレート剤、カルモジュリン拮抗剤を Cd²⁺ と同時に添加すると、DNA の断片化を示す細胞はそれぞれ 35%、42% に減少した。また UE160 にカルシウムイオンフォアを添加すると、細胞内カルシウムイオン濃度の増加は認められたが、断片化 DNA 示す細胞の増加は僅か (5.4% → 12%) であった。以上より gp160/CD4 複合体の形成には細胞内カルシウムイオン濃度の上昇は必須であるが、この上昇のみではアポトーシスの誘導には不十分であることが明らかとなった。

現在さらに、gp160/CD4 複合体を形成した細胞における細胞内カルシウムイオンとチロシンキナーゼとの関係を検討している。

② 核膜孔を形成する蛋白のアミノ酸配列より合成ペプチドを作成し、BALB/c マウスに免

疫することにより、数種の抗核膜孔抗体産生ハイブリドーマを得た。今後これらを細胞内に注入し、実際に直接アポトーシスを誘導しうるか、否かを検討する予定である。

B. 細胞増殖制御遺伝子 D123と細胞周期

ラット線維芽細胞株3Y1から得られた温度感受性変異株3Y1tsD123は制限温度の39.8℃に置くと細胞周期のG1期で可逆的に増殖停止する。3Y1tsD123細胞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が前年(1992年)までに分かった。今年度は3Y1tsD123と非変異の親株である3Y1におけるD123遺伝子の発現量の違い、さらに3Y1細胞の細胞周期移行とD123遺伝子の発現量との関係について調べた。

まずD123蛋白を検出するための抗体を作製した。D123cDNAの内のD123蛋白をコードする部分の全体をpETベクターにつないで、17個の余分のアミノ酸配列を含む融合蛋白として大腸菌で大量に発現させた。この融合蛋白に対するウサギのポリクローナル抗体を作製し、融合蛋白カラムで精製した。この抗体を使用して、3Y1細胞と3Y1tsD123細胞におけるD123蛋白の発現量を調べると、許容、非許容温度に関係なく3Y1tsD123では3Y1より著しく少なかった。さらにmRNAレベルでの発現量も3Y1tsD123細胞は3Y1細胞より著しく減少していた。これらの結果から3Y1tsD123細胞ではD123遺伝子の発現量減少により、温度感受性になっていると考えられる。さらに3Y1tsD123細胞ではD123蛋白自身に変異があるのではなく、D123遺伝子の転写制御領域もしくはmRNAの安定性を決定している領域に変異があり、その発現量が減少している可能性が高い。

ヒト胎児肺線維芽細胞およびラット3Y1細胞で細胞周期移行とD123遺伝子の発現量との関係を調べると、両細胞ともに飽和細胞密度でG1期で増殖停止している細胞の方が血清刺激でS期に入った細胞よりD123のmRNAおよび蛋白の量が僅かに少ない傾向を示した。しかし、増殖中の3Y1tsD123細胞のD123蛋白量は増殖停止している3Y1細胞のD123蛋白量より遙かに少なかった。したがって、このようなD123遺伝子の発現量の僅かな違いによって細胞周期移行が制御されているとは考えにくい。

3Y1tsD123は増殖制御に関して奇妙な性質を持つ。33.8℃の許容温度で増殖中の3Y1tsD123細胞を制限温度に移すと一回分裂した後、G1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G1期で増殖停止している細胞に血清を加えると、制限温度でもS期に入る。細胞がS期に入るためには平行して進行する2つの過程、即ち血清依存の過程と血清非依存の過程の両方を完了しなければならないという仮説を設けることにより、この変異株の挙動を説明できる。即ち、制限温度においた3Y1tsD123細胞は、血清非依存のD123遺伝子が関与する過程で増殖停止する一方、血

清依存の過程を増殖停止中に終了してしまうため、許容温度に移すと血清非存在下でもS期に移行できる。飽和細胞密度で増殖停止している3Y1tsD123細胞は、許容温度で血清依存の過程で増殖停止中に、D123遺伝子が関与する血清非依存の過程を終了してしまうため、血清刺激を行うと制限温度下でもS期に移行する。D123遺伝子の発現が飽和細胞密度で増殖停止した細胞で顕著に減少していないという上述の結果はこの仮説を支持する。

現在ラットD123 cDNAのクローニングと塩基配列の決定を完了し、3Y1tsD123細胞における変異部位を調べている。この結果を基に上記の仮説をさらに追求したい。さらに、D123遺伝子の発現調節と細胞分化、あるいは細胞癌化との関連についても追求したい。

原著論文

1. Maeda, Y., Tanaka, K., Koga, Y., Zhang, X.-Y., Sasaki, M., Kimura, G. and Nomoto, K. 1993.
A simple quantitative in vitro assay for thymocyte adhesion to thymic epithelial cells using a fluorescein diacetate.
J. Immunol. Meth. 157, 117-123.
2. Yamada, K., Mitsui, T., Okuda, A., Kimura, G. and Sugano, M. 1993.
Cytotoxic and cytostatic effects of polyphenols against rat 3 Y 1 fibroblasts transformed by E1A gene of human adenovirus type 12.
Int. J. Oncol. 2, 89-93.
3. Moroi, Y., Koga, Y., Nakamura, K., Ohtsu, M., Kimura, G. and Nomoto, K. 1993.
Induction of interleukin 2-responsiveness in thymocytes of the transgenic mice carrying lck-transgene.
Microbiol. Immunol. 37, 369-381.
4. Yoshino, I., Yano, T., Murata, M., Miyamoto, M., Ishida, T., Sugimachi, K., Kimura, G. and Nomoto, K. 1993.
Phenotypes of lymphocytes infiltrating non-small cell lung cancer tissues and its variation with histological types of cancer.
Lung Cancer 10, 13-19.
5. Tanaka, K., Koga, Y., Zhang, X.-Y., Sasaki, M., Wang, Y., Kimura, G. and Nomoto, K. 1993.
Extensive apoptosis occurring in the thymus during accelerated rejection of cardiac allografts in presensitized rats.
J. Immunol. 151, 748-758.
6. Yoshino, I., Yano, T., Miyamoto, M., Yamada, K., Kajii, Y., Onodera, K., Ishida, T.,

Sugimachi,K., Kimura,G. and Nomoto,K. 1993.

Characterization of lung squamous cell carcinoma-derived T-cell suppressive factor.
Cancer 72, 2347-2357.

7. Yoshino,I., Yano,T., Miyamoto,M., Sugimachi,K., Kimura,G., and Nomoto,K. 1993.
Phenotypic and functional modulation of interleukin-2-activated peripheral blood mononuclear cells by anti-CD3 and anti-CD28 antibody.
Lymphok. Cytok. Res. 12, 191-196.

総説

田中和生. 1993.

抗原特異的抑制型T細胞による移植免疫寛容.

今日の移植, 6, 149-154.

学会発表

1. 田中和生, 古賀泰裕, 木村元喜, 野本亀久雄. (1993, 9/16-9/18)
サイトメガロウイルス (CMV) 持続感染が宿主生体防御系に与える影響と免疫抑制剤の選択.
第29回日本移植学会総会, 金沢.
2. 盧亦愚, 古賀泰裕, 田中和生, 佐々木正文, 大津真澄, 木村元喜, 野本亀久雄. (1993, 10/13-10/15)
サイトメガロウイルス (CMV) 感染マウスの胸腺T細胞はアポトーシス準備状態になっている.
第41回日本ウイルス学会, 札幌.
3. 佐々木正文, 古賀泰裕, 田中和生, 木村元喜, 野本亀久雄. (1993, 10/13-10/15)
HIV-gp160/CD4複合体形成に伴うアポトーシスの発生機序について.
第41回日本ウイルス学会, 札幌.
4. 松尾哲孝, 山田耕路, 山下耕平, 奥田篤行, 木村元喜, 菅野道廣. (1993, 10/7-10/8)
ラット3Y1細胞とその形質転換細胞の増殖に及ぼす酪酸の影響.
第220回日本農芸化学会 関西西日本支部合同大会, 神戸.
5. 山下耕平, 三井雄史, 松尾哲孝, 奥田篤行, 木村元喜, 山田耕路, 菅野道廣. (1993, 10/29)
ポリフェノール化合物のE1A-3Y1細胞特異的致死作用.
第47回日本栄養食糧学会 西日本支部大会, 別府.

6. 奥田篤行, 木村元喜. (1993, 11/21-11/23)

ラット3Y1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.
第17回真核 DNA シンポジウム, 小田原.