

ウイルス学部門

Department of Virology

1995年は、下記の研究課題について研究を行った。課題 1), 2), 及び 4) 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。急性全身性ウイルス感染の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) 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）。

3) 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、次に記す項目について研究を継続、発展させ、成果をあげた。(1)増殖制御遺伝子 D123のキャラクテリゼーション、(2)細胞密度依存性増殖抑制（“接触阻止”）の機構の一部解明、(3)DNA ウイルスによる細胞がん化（トランスフォーメーション）の効率を左右する細胞側の条件、(4)ウイルス性がん細胞の、細胞傷害性物質に対する感受性のウイルス遺伝子特異性。

4) 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材料とする研究が、継続された。

1995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）、李文（外国入訪問研究員（笹川財団留学生）、1995年 9 月30日まで）、佐々木正文（技官）、大津真澄（技官）、堤 華恵（研究補助員）。

以下に1995年の研究成果のうちのいくつかについて記す。

A. マウスサイトメガロウイルス実験系の確立

a. ウイルスに対する生体防御の特殊性

微生物という外界由来の異物の特徴は、生体内に侵入した後にその数量が増大あるいはそれにともないその存在が持続することであり、微生物の一つであるウイルスも例外ではない。その上ウイルスの特殊性として、生体防御の標的がウイルス粒子自身とウイルス感染細胞の二つを含むということがあり、当然、対応する生体防御因子もより多岐にわたるため、ウイルス感染防御における防御因子間の比重の決定は容易ではない。この困難を少しでも低減させるために、マウス実験モデルの作製に当たっては、1) 細胞レベルでのウイルスの一段増殖時間が短すぎずかつ長すぎず（20～30時間）、2) 個体あるいは臓器レベルでのウイルスの侵入からウイルスの排除に至る時間経過（感染部位におけるウイルス量の時間的推移）が、いくつかの明

確な時間相に分けられる，ことがウイルスを選定するに当たって必要である。

b. ウイルス感染細胞の多様な存在様式

感染細胞におけるウイルスの増殖様式によって，ウイルス増殖性感染と潜伏感染とに大別される．感染細胞の運命によって，細胞死に到る感染と細胞死に到らない感染とに大別される．また，それぞれについて中間型や移行型が存在する．また感染に伴う感染細胞の質的変化も起こる．この様なウイルスと細胞の多様な相互作用は，特定のウイルスに感染した個体内で起こりうる．実験モデルとしてはこの様な状況すべてを適切に取り扱うことのできるようなウイルスを選定することが望ましい．

c. ウイルス感受性細胞種及びウイルス感受性臓器のレンジの広さ

実験モデルの作製に当たっての理想としては，1)選定すべきウイルスは本質的には個体内の全ての種類の細胞，組織，臓器を増殖の場としうる，2)しかし実際に起こる感染については，感染の場，様式，転起などが，生体防御系の生理的状态や感染に伴う動態，さらに実験的操作による変動などによって規定される，ことが望ましい．

d. 本研究で取り扱うべき生体防御因子の細胞性因子及び物質性因子への限定

発熱は，ウイルス感染防御における重要な防御因子であるが，複雑さを避けるために，この実験モデルで取り扱う防御因子群を表記の二つにとどめたい（温度感受性ウイルス種を選定しない）．“発熱”の防御因子としての意義については，将来別途にとりあげたい．

e. マウスサイトメガロウイルスの選定

モデルウイルスの候補として，1)単純ヘルペスウイルス1型，2)マウスアデノウイルス，3)マウスサイトメガロウイルス，4)マウスボックス（エクトロメリア）ウイルス，をとりあげ，数年間にわたる予備的検討を経て，マウスサイトメガロウイルスを選定した．18～20週令のマウスの急性感染．主要臓器それぞれの生体防御系の個性に注目して研究を行う．

このモデルを用いて，ウイルスに対する生体防御の骨格を明らかにする．生体防御系との相互作用が特殊なウイルスについても，今後一つずつ実験モデルを作成して行く予定である．

B. HIV-1感染によるCD4陽性細胞死の機構

HIV-1感染によるCD4陽性T細胞の消失の機序はHIVの直接感染による細胞死と、そうでない細胞死に分けて考えると解析しやすい．我々はHIV感染細胞のモデルとして細胞傷害性を有するとされるenv遺伝子産物とCD4分子に注目し，メタロチオネインプロモーター応答性HIV-env発現細胞株を用いて研究を進めてきた．

CD4陽性単球様細胞株 U937-2由来であり、 $\text{Cd}^{2+}10\mu\text{M}$ 添加により gp160を発現する UE160, 同じく gp120を発現する UE120を用いて解析し、次の事を明かにしてきた。すなわち、UE160は gp160の発現により、1)gp160/CD4複合体形成、2)gp160/CD4複合体結合カルモジュリン(CaM)形成、3)細胞内 Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の増加、4)gp160/CD4複合体の核周囲腔蓄積、5)チロシン磷酸化タンパク 61KD, 51KD, 32KD の増加、6)アポトーシスによる細胞死、7)このアポトーシスの W7(CaM 拮抗剤), BAPTA(Ca^{2+} キレート剤), GENISTEIN (チロシンキナーゼ阻害剤) による抑制。一方、UE120では gp120の発現によりアポトーシスによる細胞死は生じないこと。本年は、gp160/CD4結合 CaM の生物学的活性を、1)抗 CaM 抗体、抗 Env 抗体による免疫沈降およびイムノブロット、2)活性化 CaM の phosphodiesterase(PDE)酵素法での定量、を用いて検討し、次の結果を得た。1)UE160及び UE120に Cd^{2+} を添加して0, 10分後に 10^{-6}M EGTA 存在下で細胞核抽出液をとり、protein G sepharose beads と抗 CaM モノクローナル抗体を用いて免疫沈降した。免疫沈降物を抗 Env モノクローナル抗体(0.5 β)でイムノブロットしたところ、UE160でのみ Cd^{2+} 非添加時の1.2倍に増量した、2)同一試料の活性化 CaM を PDE 酵素法で定量したところ、UE160では Cd^{2+} 非添加時に 1.3ng/assay であったものが Cd^{2+} 添加10分後では4.7ng/assay に増加した。一方、UE120ではいずれもバックグラウンド程度であった、3)U E160及び UE120の免疫沈降前の核抽出液を抗 CaM モノクローナル抗体を用いてイムノブロットすると、経過時間中に CaM 量は変動しなかった。これらの実験結果から、1)gp160結合 CaM は CaM^{2+} 非存在下でも活性化されている、2)gp160結合 CaM は Cd^{2+} 添加により増量する事が分かった。これまでの研究結果と総合すると、HIV 感染細胞の細胞死はアポトーシスによること、このアポトーシスは gp160/CD4複合体形成のみでは不十分であり、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を伴う必要があることが分かった。更に、アポトーシスは W7添加により抑制され、CaM の関与を検討したところ gp160が直接 CaM に結合し、活性化 CaM となっていた。すなわち、gp160/CD4複合体形成→活性化 CaM-gp160-CD4結合物の増量→核内 Ca^{2+} の上昇→核周囲腔に蓄積→アポトーシスによる細胞死、という一連の事象が考えられる。

C. 細胞増殖制御遺伝子 D123がコードする蛋白の機能解析

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、細胞の補給が必要になると細胞外からのシグナルに応答して増殖を開始する。また細胞が過剰になると細胞死が起きる。突然変異やがんウイルスにより、細胞増殖や細胞死を制御する遺伝子産物の質的あるいは量的変化が生じることがある。このような細胞では細胞増殖や細胞死の制御ができなくなり、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および細胞死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。

細胞増殖および細胞死の制御機構を解明する目的でラット線維芽細胞株3Y1から温度感受性変異株を多数分離し、その細胞生理学的特性を明らかにしてきた。これらの温度感受性変異株

の内、3Y1tsD123は以下のようなユニークな性質を持っている。3Y1tsD123は培養温度を許容温度の33.8℃から制限温度の39.8℃に下げると増殖を停止し、細胞周期のG1期に集まる。制限温度で増殖停止した3Y1tsD123は許容温度に移すと培養液中の血清あるいは細胞成長因子が無くてもS期に移行する。一方飽和細胞密度まで増殖してG1期で増殖停止した3Y1tsD123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E1A蛋白が発現すると3Y1tsD123は制限温度下でもG1期を通過してS期に移行するが、その後細胞死が起きる。

3Y1tsD123の温度感受性を引き起こしている変異遺伝子のcDNAをクローニングし、この遺伝子の機能解析により、細胞増殖および細胞死の制御機構の新局面を解明することを試みている。3Y1tsD123では新たに見つけたD123遺伝子に点突然変異が蛋白(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箇所起きていることが判明した。さらに許容、非許容温度に関係なく3Y1tsD123では3Y1より著しく細胞当りのD123蛋白量が少なく、この蛋白の寿命も短いことが分かった。したがって3Y1tsD123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D123蛋白が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と関係があると考えられる。

10⁶個のSV-3Y1tsD123細胞(SV40でトランスホームした3Y1tsD123細胞で、このD123蛋白は3Y1tsD123のものと同じ変異を有する)から温度抵抗性の自然復帰株を3株分離し、D123蛋白の発現とアミノ酸配列を調べた。その結果、2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、D123蛋白の細胞当りの量は3Y1tsD123とSV-3Y1tsD123のいずれと比較しても明らかに増加していた。1株は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蛋白量は増加していた。したがって前者の復帰細胞株は109番目のアミノ酸の置換に起因するD123蛋白の不安定性を抑制する新たな機能を獲得していることが考えられる。後者では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。

これらの変異および復帰株のD123蛋白の大腸菌での作成に成功しており、これらとD123蛋白のアミノ酸配列の変化を伴わずに自然復帰した細胞株を使用して、どのような細胞成分が変異株のD123蛋白の不安定性に関わっているかを明らかにしようとしている。D123蛋白は細胞内の種々の蛋白と結合することが分かっており、D123蛋白の109番目のアミノ酸変異とこれらの結合蛋白の結合能との関係を調べることにより、D123蛋白と相互作用をして細胞増殖制御作用に寄与する蛋白を見つけ、D123蛋白の機能解析を前進させたいと考えている。

原著論文

1. Harada,M., Okamoto,T., Kurosawa,S., Shinomiya,Y., Ito,O., Takenoyama,M., Terao,H., Matsuzaki,G., Kimura,G., and Nomoto,K. 1995.
The antitumor activity induced by the *in vivo* administration of activated B cells bound to anti-CD3 monoclonal antibody.
Cell. Immunol. 161, 132-137.
2. Mitsui,T., Yamada,K., Yamashita,K., Matsuo,N., Okuda,A., Kimura,G., and Sugano, M. 1995.
E1A-3Y1 cell-specific toxicity of tea polyphenols and their killing mechanism.
Int. J. Oncol. 6, 377-383.
3. Harada,M., Omoto,K., Kimura,G., and Nomoto,K. 1995.
Priming with donor spleen cells and activated B cells can induce prolonged survival of class I disparate skin allografts in cyclophosphamide-treated mice.
Transplantation 60, 517-519.
4. Yoshida,H., Sumichika,H., Hamano,S., He,X., Minamishima,Y., Kimura,G., and Nomoto,K. 1995.
Induction of apoptosis of T cells by infecting mice with murine cytomegalovirus.
J. Virol. 69, 4769-4775.
5. Tamura,H., Okuda,A., Ohtsu,M., Kabemura,M., and Kimura,G. 1995.
Dependency of the efficiency of transformation by simian virus 40 on the proliferative state of cultured fibroblasts at the time of virus inoculation.
Int. J. Oncol. 7, 273-278.
6. Harada,M., Seta,K., Ito,O., Tamada,K., Li,T., Terao,H., Takenoyama,M., Kimura,G., and Nomoto,K. 1995.
Concomitant immunity against tumor development is enhanced by the oral administration of a kampo medicine, Hochu-ekki-to (TJ-41 : Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang).
Immunopharmacol. Immunotoxicol. 17, 687-703.
7. Harada,M., Matsunaga,K., Oguchi,Y., Iijima,H., Ito,O., Tamada,K., Kimura,G., and Nomoto,K. 1995.
The involvement of transforming growth factor- β in the impaired antitumor T-cell response at the gut-associated lymphoid tissue (GALT).
Cancer Res. 55, 6146-6151.

総 説

1. 奥田篤行

細胞周期制御遺伝子のクローニング法—動物細胞変異株の遺伝子相補によるクローニング
細胞周期研究法—発生・分化・癌・細胞死の解明へ（岡山博人編）.
実験医学別冊 バイオマニュアルUPシリーズ pp.80-88.

学会発表

1. 吉田裕樹, 住近 浩, 木村元喜, 野本亀久雄 (1995, 7/10-12).

マウスサイトメガロウイルス感染における脾臓T細胞のアポトーシス.
第6回生体防御学会, 新潟.

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 (1995, 7/10-12).

腸管関連リンパ組織における抗腫瘍免疫反応.
第6回生体防御学会, 新潟.

3. 原田 守, 木村元喜, 野本亀久雄 (1995, 9/23).

消化器癌における免疫抑制とそのメカニズム
—腸管壁移植腫瘍モデルにおける免疫抑制とその指標—.
癌治療学会シンポジウム, 札幌.

4. 原田 守, 松永謙一, 小口義春, 飯島弘子, 木村元喜, 野本亀久雄 (1995, 10/3-5).

腸管関連リンパ組織における抗腫瘍免疫反応.
第54回日本癌学会総会, 京都.

5. 吉田裕樹, 濱野真二郎, 木村元喜, 南嶋洋一, 野本亀久雄 (1995, 10/31-11/2).

マウスサイトメガロウイルス感染による骨髓細胞のアポトーシス.
第43回日本ウイルス学会総会, 岡山.

6. 佐々木正文, 古賀泰裕, 木村元喜, 野本亀久雄 (1995, 10/31-11/2).

カルモジュリンは HIV-1 env gp160 に結合するのか?
第43回日本ウイルス学会総会, 岡山.

7. 濱野真二郎, 吉田裕樹, Mohammad Sohrab Hossain, 木村元喜, 南嶋洋一, 野本亀久雄 (1995, 10/31-11/2).

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43回日本ウイルス学会総会, 岡山.

8. 原田 守, 伊藤 理, 玉田耕治, 木村元喜, 野本亀久雄 (1995, 11/28-30).

腸管関連リンパ組織における抗腫瘍免疫反応の抑制.
第25回日本免疫学会総会, 福岡.

9. 吉田裕樹, 濱野真二郎, 木村元喜, 南嶋洋一, 野本亀久雄 (1995, 11/28-30).

マウスサイトメガロウイルス感染におけるアポトーシスの誘導.

第25回日本免疫学会総会, 福岡.

10. 濱野真二郎, 吉田裕樹, Mohammad Sohrab Hossain, 木村元喜, 南嶋洋一, 野本亀久雄 (1995, 11/28-30).

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25回日本免疫学会総会, 福岡.