

ウイルス学部門 Department of Virology

1997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。この活動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。

1997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1997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。

生体が異物の侵入を受けたり、生体内に異物的成分が発生したときには、それらが存在する場である各臓器においてそれらの処理が行われる。臓器間では、遭遇する異物の種類や量、遭遇の頻度などが異なるので、異物処理の様式に臓器固有性が現われる。

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、個々の臓器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すると、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）。この時全体的には、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、いくつかの解析の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。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の大綱が明らかにされつつある。

B. 抗腫瘍免疫の動物モデルを用いた研究

a. IL-12投与により誘導される抗腫瘍効果における局所リンパ節の意義

IL-12は強力なサイトカインで、担癌後期から投与しても抗腫瘍効果を誘導し得ると報告されている。我々は、担癌状態での局所リンパ節（rLN）の役割や抗腫瘍エフェクター源としての有用性について検討してきたが、今回、担癌後期にIL-12療法を開始した場合の局所リンパ節の役割について検討した。B6マウスに同系腫瘍であるB16メラノーマを皮下接種し、経時的に採取したrLNをin vitroで培養増殖後、肺転移B16メラノーマに対する抗腫瘍効果を検討したところ、担癌20日目や30日目という担癌後期のrLNは抗腫瘍エフェクターに成り得る能力を失っていることが判明した。ところが、担癌18日目からIL-12を投与した場合、皮下接種したB16メラノーマの増殖は有意に抑制され、24日目のrLNはin vitro培養増殖後に肺転移B16メ

ラノーマに対して有意な抗腫瘍効果を示した。また、担癌20日目から IL-12を投与しても B16メラノーマの増殖は抑制されたが、担癌18日目に前もって rLN を外科的に切除した場合には、この効果は半減した。以上の結果より、担癌状態で失われていた rLN の抗腫瘍効果を示し得る potential が、IL-12投与により回復すること、また、IL-12療法のように担癌生体の免疫賦活を介して抗腫瘍効果が誘導される場合、局所リンパ節が重要な役割を担うことが判明した。

b. 抗腫瘍免疫療法における内因性 IL-12の重要性

抗腫瘍免疫にとって Th1-type の反応が有用であるということは言うまでもないが、IL-12はこの反応を強力に促進するサイトカインである。我々は、担癌マウスに IL-12を全身投与した場合、IL-12投与終了後にも数週間に渡って抗腫瘍効果が維持されることに注目し、そのメカニズムの解析を試みた。その結果、IL-12の *in vivo* half life は数時間にも拘らず、IL-12の投与終了4日後の担癌マウスの serum 中の IL-12は control に比べて上昇していた。しかしながら、IL-12の投与終了後担癌局所リンパ節を切除すると serum 中の IL-12の上昇は認めなかった。また、IL-12の mRNA の発現は、脾臓ではなく、担癌局所リンパ節のみに認められ、*in vivo* での抗原特異的 IL-12産生に必要な CD40L の発現も担癌局所リンパ節の CD4陽性 T細胞のみに認められた。以上の結果より、外因性に投与された IL-12により、担癌生体内で抗腫瘍免疫応答が賦活化され、担癌局所リンパ節で内因性 IL-12が産生されたと考えられた。

C. HIV-1感染による CD4陽性細胞致死の機構

われわれは今日までの研究により HIV-1感染個体における CD4陽性 T細胞の消失の一因はアポトーシスによる細胞死であることを示唆してきた。

HIV-1感染モデルとして HIV-1 env gp160発現ヒト単球様細胞 UE160、同じくヒト CD4陽性 T細胞 JME4を用い検討した結果、gp160の発現誘導により核内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の上昇を伴ったアポトーシスで死滅していることを見いだした。このアポトーシスの誘導には env gp160の結合による活性型カルモジュリン (CaM) が重要であり、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇およびアポトーシスを導くシグナル伝達経路への Ca^{2+} 非依存性カルモジュリンプロテインキナーゼ II (CaMK II) の関与について検討した。

CaMK II の検出は GIBCO BRL のキットを用いた。UE160に $10\mu\text{M}$ CdCl_2 を添加し、gp160を発現誘導して0-60分の経過を調べた。CaMK II 測定のコントロールとして PC12細胞に 5mM KCl を添加し同様に調べた。CaMK II 阻害剤 KN93, KN62, KN04, 抗 Fas モノクローナル抗体 (CH11) を添加し CaMK II 測定、アガロースゲル電気泳動法で DNA 断片の検出、共焦点レーザー蛍光顕微鏡で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を測定した。

その結果、1) UE160に gp160発現誘導13分後では Ca^{2+} 非依存性 CaMK II 活性が CdCl_2 非添加時 $2 \pm 1.3\%$ ($\pm\text{SE}$) であったものが $12 \pm 1.8\%$ に上昇し、23分後では $4 \pm 1.8\%$ となった。

2) PC12では5mM KCl添加60分後、非添加時 $3 \pm 1.5\%$ であったものが $8 \pm 1.8\%$ に上昇し90分後では元の値に戻った。

3) UE160を100nM KN93あるいはKN62で2時間前処理をすると Ca^{2+} 非依存性 CaMK II 上昇, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇, DNA 断片化の3事象が阻止されたが, コントロールとして用いた KN04 では3事象共部分的な阻止であった。

4) UE160に10ng/ml 抗 Fas 抗体を添加しても Ca^{2+} 非依存性 CaMK II は変化しなかった。

以上のことは, CaMK II の活性化 (自己リン酸化) がアポトーシス誘導へのシグナル伝達系の要素であることを示唆しており, 抗 Fas 抗体刺激では自己リン酸化 CaMK II および $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇は生じないことから gp160結合活性型 CaM によるアポトーシスは FasL/Fas によるアポトーシスとは異なるシグナル伝達経路で誘導されている事が明確となった。

D. 細胞増殖制御遺伝子 D123蛋白の変異と安定性

D123蛋白の cDNA は, ラット線維芽細胞株の G1期温度感受性変異株の一つである 3Y1tsD123 の温度感受性の遺伝子相補によりクローニングしたものである。3Y1tsD123 の D123遺伝子には点突然変異が蛋白 (D123蛋白) をコードする部分に1箇所ある (379番目のシトシンがチミンに置換, すなわち D123蛋白の109番目のアラニンがバリンに置換)。許容温度 (33.8°C), 制限温度 (39.8°C) に関係なく, 3Y1tsD123 では3Y1より細胞当りの D123蛋白量が著しく少なく, これは変異型 D123蛋白の不安定性による。

SV40でトランスホームした3Y1tsD123 (SV-3Y1tsD123) は制限温度に移すと DNA の断片化が起こり, アポトーシスにより死ぬ。許容温度でも SV-3Y1tsD123 の D123蛋白量は SV-3Y1 (SV40でトランスホームした3Y1) の約1/10に減少している。制限温度では SV-3Y1tsD123 の D123蛋白量は, 許容温度の時の1/4に減少する (SV-3Y1では変化なし)。トランスフェクションにより SV-3Y1tsD123 に野生型 D123遺伝子を発現させると温度耐性になる。変異型 D123遺伝子のトランスフェクションでは温度耐性株は非常に低頻度でしか出現しない。低頻度で得られた二株の温度耐性株 (ts2, ts3) は変異型 D123蛋白を過剰発現する。そのために, 制限温度でも ts2 および ts3 は, 許容温度における SV-3Y1tsD123 よりはるかに高レベルの D123蛋白量を維持している。しかし ts2 および ts3 の制限温度における到達最高細胞密度は SV-3Y1tsD123 の許容温度における到達最高細胞密度よりもはるかに低い。したがって3Y1tsD123 および SV-3Y1tsD123 の温度感受性は, D123蛋白の分解による極端な減少だけでなくこの蛋白の変異による機能低下も関与していると考えられる。

ts3では変異型 D123蛋白は3Y1にみられる野生型 D123蛋白より分子量の大きい2種類以上の分子として検出される。これに対し, 3Y1tsD123, SV-3Y1tsD123 および ts2 では野生型の D123蛋白と同じ分子量のものしか検出されない。さらに変異型 D123蛋白の分解速度は ts2 では温度依存性があるのに対し, ts3 では温度に関係なく速い。このことから変異型 D123蛋白は ts3 で

特に急激に修飾を受けてその分子量を増大しながら分解しているのかも知れない。3Y1tsD123, SV-3Y1tsD123およびts2ではその修飾速度が遅いために修飾後の速い分解とあいまって、変異型D123蛋白の分子量は変化していないように見えるのかも知れない。

SV-3Y1tsD123の温度抵抗性自然復帰株中の1株, R1株は変異型D123を発現しているにもかかわらず、少なくとも許容温度ではその分解が抑えられている。R1とSV-3Y1tsD123を細胞融合すると、融合細胞は温度耐性で、この融合細胞では変異型D123蛋白は少なくとも許容温度では安定である。このことからR1は変異型D123蛋白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。興味あることには、R1とts2の融合株では野生型のD123蛋白と同じ大きさの変異型D123蛋白のみが見られる。

変異型D123蛋白修飾とこの蛋白の分解との関係、R1が有する変異型D123蛋白の分解抑制機構、およびこの分解過程とD123蛋白の本来の機能との関係などを追求することにより、D123蛋白の増殖制御における役割を明らかにしてゆきたい。

業 績 目 録

原著論文

1. Harada, M., Matsunaga, K., Oguchi, Y., Iijima, H., Tamada, K., Abe, K., Takenoyama, M., Ito, O., Kimura, G. and Nomoto, K. 1997.
Oral administration of PSK can improve the impaired anti-tumor CD4⁺ T-cell response in gut-associated lymphoid tissue (GALT) of specific- pathogen-free mice.
Int. J. Cancer. 70 (3), 362-372.
2. Harada, M., Tamada, K., Abe, K., Li, T., Onoe, Y., Tada, H., Takenoyama, M., Yasumoto, K., Kimura, G. and Nomoto, K.
Systemic administration of interleukin-12 can restore the anti-tumor potential of B16 melanoma-draining lymph node cells impaired at a late tumor-bearing state.
Int. J. Cancer in press.
3. Harada, M., Tamada, K., Abe, K., Yasumoto, K., Kimura, G. and Nomoto, K.
Role of the endogenous production of interleukin 12 in immunotherapy.
Cancer Res. in press.
4. Hamano, S., Yoshida, H., Takimoto, H., Sonoda, K., Osada, K., He, X., Minamishima, Y., Kimura, G. and Nomoto, K.
Role of macrophages in acute murine cytomegalovirus infection.
Microbiol. Immunol. in press.

学会発表

1. 原田 守, 玉田耕治, 阿部光一郎, 木村元喜, 野本亀久雄 (1997, 7/28-30).
NK細胞, NK/T細胞が抗腫瘍T細胞免疫応答に及ぼす影響.
第8回日本生体防御学会総会, 東京.
2. 滝本博明, 木村元喜, 野本亀久雄 (1997, 7/28-30).
CD31/PECAM-1欠損マウスにおける白血球血管外遊走の解析.
第8回日本生体防御学会総会, 東京.
3. 佐々木正文, 石川裕樹, 古賀泰裕, 木村元喜, 野本亀久雄 (1997, 9/20-22).
HIV-Env gp160発現CD4陽性細胞のcytosolによる非感染細胞抽出核のカルシウムイオン濃度の上昇.
第45回日本ウイルス学会総会, 京都.
4. 二宮利治, 滝本博明, 濱野真二郎, 木村元喜, 野本亀久雄 (1997, 9/20-22).
マウスサイトメガロウイルス感染におけるNK1.1⁺TCR $\alpha\beta$ ^{int}細胞の動態解析.
第45回日本ウイルス学会総会, 京都.
5. 大津真澄, 木村元喜, 滝本博明, 野本亀久雄 (1997, 9/20-22).
マウスサイトメガロウイルス気道感染における感染防御因子.
第45回日本ウイルス学会総会, 京都.
6. 二宮利治, 滝本博明, 濱野真二郎, 木村元喜, 野本亀久雄 (1997, 10/29-31).
マウスサイトメガロウイルス感染初期に出現する $\gamma\delta$ 型T細胞の解析.
第27回日本免疫学会総会, 札幌.