

ウイルス学部門 Department of Virology

1998年度は、下記の研究課題について研究を行った。課題1), 2), 3), 4) 及び6) 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臓器固有性：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) 抗腫瘍免疫の臓器固有性及び抗腫瘍免疫療法の動物モデル。

3) 細菌感染防御の動物モデル。

4) 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）。

5) 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。

6) 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。

1998年度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）、原田守（助手）、野本摩利（助手）、佐々木正文（技官）、大津真澄（技官）、堤華恵（研究補助員、1998. 9. 30まで）、宮川美保（事務補佐員、1998. 10. 1より）。

以下に1998年度の研究成果のうちのいくつかについて記す。

A. ウイルス感染防御の臓器固有性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、患者にとってはきわめて不快、かつ、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は、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、主として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。遭遇する異物の種類や量、遭遇の頻度などは、臓器によって異なるので、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、ウイルス排除の臓器固有性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感染防御の臓器固有性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。

ウイルスの接種経路のちがいによって、2つのタイプの動物感染モデルを作成した。アダルトマウスへのマウスサイトメガロウイルス（MCMV）の、1）気管内接種による肺へのウイルスの直接曝露と全身の臓器への続発的曝露、及び2）静脈内接種などによる全身の臓器へのウイルスの同時曝露である。ウイルス接種後に経時的に、肺、肝、腎、顎下腺、脾を摘出してそれぞれの感染性ウイルス量を測定すると、すべての臓器で時間経過と共にウイルス量が増加し、やがて減少し、最後には消失した（完全排除）。宿主の生体防御機構が有効に働いたためと理解される。接種ウイルス量を選べば感染マウスに認むべき症状や病変は生じない。ここで注目すべきは、いずれの接種経路を用いても、臓器のウイルス量の時間経過が臓器毎に異なっていたことであった。即ち、ウイルス量の増加の開始時期（ラグの長さ）、ウイルス量のピークの時期と値、ウイルス量のプラトーの有無と持続時間、ウイルスの完全排除の時期、などが臓器毎に明確に異なった。ここで我々は、ウイルス排除に関して臓器固有の生体防御機構が実在することを予感した。その後の研究の進展は、このことが事実であることを示していた。そこで我々は、個々のウイルス感染症毎に感染防御モデルを作る必要性（膨大なエネルギーを要する）を選ぶことよりは、1種類のウイルス（MCMV）をモデルとしてとり上げ感染防御の臓器固有性を追求する道を選ぶことにした。具体的には、対象とする臓器毎に、ウイルス排除に参画する生体防御因子の、時間的に連続するバリアーを確定することを目標として、研究が進展している。

B. 抗腫瘍免疫の動物モデルを用いた研究

a. IL-12投与により回復する局所リンパ節細胞の抗腫瘍効果

IL-12は生体内で Th1型サイトカインを誘導する重要なサイトカインで、担癌生体に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、担癌後期に IL-12療法を開始した場合の局所リンパ節の役割と抗腫瘍エフェクター源としての有用性について検討した。B6マウスに同系腫瘍である B16メラノーマを皮下接種し担癌18日目から IL-12を投与した場合でも、B16

メラノーマの増殖は有意に抑制され、局所リンパ節細胞は肺転移 B16メラノーマに対して有意な抗腫瘍効果を示した。IL-12投与により誘導される抗腫瘍効果は、IL-12投与前に局所リンパ節細胞を外科的に切除した場合には半減した。以上の結果は IL-12投与は担癌後期の局所リンパ節細胞の抗腫瘍効果を回復させること、また、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“場”であることが判明した。

b. 抗腫瘍効果における内因性 IL-12の重要性

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わたって抗腫瘍効果が維持されることに注目し、そのメカニズムを検討した。その効果、IL-12投与終了4日後の担癌マウスの血清中の IL-12はコントロールに比べて上昇しているが担癌局所リンパ節の切除によりこの IL-12の上昇が認められなくなること、また、IL-12の産生の際は脾臓ではなく担癌局所リンパ節であること、また、IL-12の産生には担癌局所リンパ節内での抗原提示細胞と CD4陽性 T 細胞との CD40/CD40L 相互作用が関与することが判明した。以上の効果は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、担癌局所リンパ節内で内因性 IL-12が産生されたことを示唆している。

c. B16メラノーマの MHC クラス I 腫瘍抗原ペプチドの同定

近年、クラス I 腫瘍抗原ペプチドによる抗腫瘍ワクチンが注目されているがその至適プロトコルやワクチンにより誘導される抗腫瘍効果のメカニズムの検討にはマウスモデルが有用である。そこで今回我々は、IL-12投与により B16メラノーマを拒絶した B6マウスの脾臓細胞から B16メラノーマ特異的 CTL 細胞株を樹立し、それが認識するクラス I 抗原の同定を試みた。その結果、B16特異的 CTL 株は H-2K^b 拘束性に B16メラノーマに反応し、Th 1 型サイトカインを産生し、tyrosinase-related protein-2 (TRP-2) 由来のペプチド (TRP-2 180-188) を認識することが判明した。

C. 細菌感染の動物モデル

a. リステリア感染防御機構の動物モデルを用いた研究

Listeria monocytogenes は、細胞性免疫の感染実験系によく用いられ、抗体が無効であることが知られているが、我々は、リステリア免疫マウスの血清中に、抗原特異的に、この菌の感染防御に働く因子が存在することを認めた。この因子は、その作用発現に成熟型 T 細胞の関与が必要であり、かつ、抗 TCR $\alpha\beta$ 抗体に結合する20数 kd の分子であった。in vivo での作用では、本因子投与群と非投与群を比較すると、感染4日目のマクロファージの B7-1の発現増強が認められた。現在、in vitro 実験系も用いた作用機序の解明を行っている。

b. 結核感染の動物モデルおよびヒトでの研究

マウス結核菌の慢性感染期における感染防御機構の解析を産業医科大学微生物学教室の協力を得て行っている。また、九大総合診療部との共同研究で、ヒトでの抗結核免疫の獲得過程のモデルとして、BCGを用いた系を立ち上げている。

D. HIV 感染 CD4陽性細胞のアポトーシス誘導機序の解明

HIV 感染患者では、CD4陽性細胞が減少し最終的には免疫不全に至る。このCD4陽性細胞の減少には、アポトーシスによる細胞死が関与していると考えられている。このアポトーシスの詳細な機序は明らかではない。われわれは、HIV 感染モデル細胞として UE160 を樹立し、それを用いて HIV env gp160 の発現誘導により細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の上昇を伴ったアポトーシスで細胞が死滅する事を明らかにしてきた。このアポトーシスは $[Ca^{2+}]_i$ キレーターやカルモジュリン阻害剤により阻止される事を見出し、また、gp160 のカルモジュリン結合部位欠損タンパク発現株を用いた検討により、C 末端の 5 アミノ酸がカルモジュリンとの結合、およびアポトーシスの誘導に必須である事を明らかにした。近年、HIV 感染患者の末梢血 CD4 陽性リンパ球は、TFP や TMX などの臨床で用いられるカルモジュリン阻害剤の処理によりアポトーシスが抑制されることが報告され、カルシウムを介したアポトーシス誘導機構の解明、およびその制御が臨床面でも期待されている。

基本的なアポトーシスの誘導経路として、1) Fas のような death レセプターを介したカスパーゼ 8 の活性化→カスパーゼ 3, 6, 7 などの活性化→基質タンパクの分解→アポトーシスの誘導という機構と、2) さまざまなアポトーシス誘導刺激によるミトコンドリア傷害、およびミトコンドリア外膜の破壊→チトクロム C などのアポトーシス誘導物質の放出→Apaf 1 を介したカスパーゼ 9 の活性化→カスパーゼ 3, 6, 7 などの活性化→基質タンパクの分解→アポトーシスの誘導という機構が知られている。1) に関して、我々は gp160 発現 UE160 細胞が Fas 刺激に対して高感受性を示すことを明らかにした。さらに、in vitro でのアポトーシス再構築実験系では、正常の U937-2 (親細胞) の抽出核に gp160 を誘導した UE160 細胞抽出液の上清を 1 mg/ml 添加すると $[Ca^{2+}]_i$ が上昇し、24 時間後に核の断片化が生じることを見出した。UE160 細胞を ICE 阻害剤、またはカスパーゼ 3 阻害剤で前処理することによりこの核の断片化は、約 50% 抑制されたことから、このアポトーシスにカスパーゼの活性化が関与していることが示された。2) に関しては、UE160 細胞において gp160 発現誘導後、ミトコンドリアからのチトクロム C の放出が認められ、ミトコンドリアの膜電位の変化や、電顕によるミトコンドリア外膜の損傷も観察されたことから、UE160 に認められるアポトーシスにミトコンドリアを介したアポトーシス誘導機構が関与している可能性が示唆された。また、このアポトーシスはカルシニューリン阻害剤である FK506 により抑制されることから、カルシウム-カルシニューリンシグナルがこのアポトーシスに関与している可能性が示唆された。最近、カルシウム-カルシ

ニューリンを介して Bcl-2 関連タンパクである Bad の脱リン酸化が生じ、Bcl-XL の制御を介してアポトーシスを誘導するという新しい機構が提唱されており、gp160 結合によるカルモジュリンの活性変化や、Fas 刺激によるアポトーシスにおけるカルシウムの関与、そしてカルシニューリンによるアポトーシス誘導といった、カルシウムシグナルを介した新たな細胞致死機構が明らかにされつつある。

E. D123 蛋白の機能と変異 D123 蛋白の分解機構

生体では細胞の増殖が全体の統一を保つように制御されている。突然変異やがんウイルスにより細胞増殖を制御する遺伝子産物の質的あるいは量的変化が生じ、その結果細胞が無秩序に増殖を繰り返して腫瘍が発生すると考えられている。したがって細胞の増殖の制御機構をこれに関係する遺伝子産物の挙動から解明してゆくことは重要なテーマの一つである。

生体内では大部分の細胞は細胞周期の G1 期で増殖を停止している。この停止機構を明らかにする目的で、ラット線維芽細胞株 3Y1 から制限温度 (39.8℃) で G1 期で可逆的に増殖停止する温度感受性変異株を多数分離し、その内の一つである 3Y1tsD123 に温度感受性を引き起こしている D123 遺伝子を単離している。3Y1tsD123 の D123 遺伝子には点突然変異が 1 箇所あり、D123 蛋白の 119 番目のアラニンがバリンに置換している。3Y1tsD123 では制限温度 (39.8℃) で許容温度 (33.8℃) より細胞当りの D123 蛋白量が減少している。これは変異型 D123 蛋白が制限温度でより分解されやすいために起こる。さらに許容温度でも 3Y1tsD123 では親株の 3Y1 に比べ D123 蛋白が極端に分解しやすい。SV-3Y1tsD123 (SV40 でトランスホームした 3Y1tsD123) に変異型 D123cDNA を導入して得た変異型の D123 蛋白を過剰発現する ts2 および ts3 の 2 株では制限温度でも不完全ながら増殖する。一方、SV-3Y1tsD123 に野生型の D123 cDNA を導入して、野生型の D123 蛋白をも発現する W24 および W26 の 2 株では制限温度での増殖は正常である。このことは、分解による D123 蛋白の減少だけでなく、分解に関係した蛋白構造変化による D123 蛋白の活性の低下によっても、制限温度での増殖抑制が起こることを示唆する。変異型 D123 蛋白の分解機構を明らかにすることにより、増殖に関係した D123 蛋白の機能を明らかにする突破口を得ることを目的にこの研究を行った。

プロテオソームの阻害剤である MG132 の存在下では変異型の D123 蛋白の分解が完全に抑えられる。この時、D123 蛋白はわずかながら (数 kDa 以下) 分子量が増加する。しかし変異型の D123 蛋白にはユビキチンは結合していない。D123 蛋白は野生型と変異型の両方でリン酸化されている。変異型の D123 蛋白を過剰発現する株 ts2 と ts3 では D123 蛋白の分子量が増加しているものが見られる。一方、SV-3Y1tsD123 の温度耐性復帰株で変異型の D123 蛋白のみを発現する R1 株では変異型 D123 蛋白の分解と分子量のシフトは起らない。また R1 株と ts2 あるいは ts3 との融合株でも同様なことは起らない。これらのことから変異型の D123 蛋白は特異的に修飾を受け、プロテオソームで分解されると考えられる。さらにこの修飾を抑制する機能を R1

は持っている。この修飾が何であるかということと、この修飾を抑える R1 に特異的に発現している遺伝子は何かが今後の研究課題である。

業 績 目 録

原著論文

1. Harada, M., Tamada, K., Abe, K., Li, T., Onoe, Y., Tada, H., Takenoyama, M., Yasumoto, K., Kimura, G. and Nomoto, K. 1998.
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 75, 400-405.
2. Harada, M., Tamada, K., Abe, K., Yasumoto, K., Kimura, G. and Nomoto, K. 1998.
Role of the endogenous production of interleukin 12 in immunotherapy.
Cancer Res. 58, 3073-3077.
3. Hamano, S., Yoshida, H., Takimoto, H., Sonoda, K., Osada, K., He, X., Minamishima, Y., Kimura, G. and Nomoto, K. 1998.
Role of macrophages in acute murine cytomegalovirus infection.
Microbiol. Immunol. 42, 607-616.
4. Harada, M., Tamada, K., Abe, K., Li, T., Onoe, Y., Tada, H., Tatsugami, K., Ando, T., Kimura, G. and Nomoto, K. 1998.
Characterization of B16 melanoma-specific cytotoxic T lymphocytes.
Cancer Immunol. Immunother. 47, 198-204.
5. Hossain, M.S., Takimoto, H., Hamano, S., Yoshida, H., Ninomiya, T., Minamishima, Y., Kimura, G. and Nomoto, K. 1999.
Protective effects of hochu-ekki-to, a Chinese traditional herbal medicine against murine cytomegalovirus infection.
Immunopharmacology 41, 169-181.

総 説

1. Harada, M., Kimura, G. and Nomoto, K. 1998.
Heat shock proteins and the antitumor T cell response.
Biotherapy 10, 229-235.

学会発表

1. 大津真澄, 木村元喜, 滝本博明, 野本亀久雄 (1998, 10/12-14).
マウスサイトメガロウイルス肺感染における細胞障害性 T 細胞の抗ウイルス性について.
第46回日本ウイルス学会, 東京.
2. 佐々木正文, 古賀泰裕, 木村元喜, 野本亀久雄 (1998, 10/12-14).
HIV-1 env gp160結合活性型カルモジュリンは CaMK II 介在のアポトーシスを誘導する.
第46回日本ウイルス学会, 東京.
3. Sohrab Hossain, M., Takimoto, H., Ninomiya, T., Nukina, H., Chen, Q-J., Kimura, G.,
Nomoto, K. (1998, 12/2-4).
Characterization of CD4⁻ CD8⁻ CD3⁺ TCR $\alpha\beta$ T cells in MCMV infection.
第28回日本免疫学会総会, 神戸.
4. 陳 其潔, 滝本博明, 二宮利治, 大津真澄, 木村元喜, 野本亀久雄 (1998, 12/2-4).
マウスサイトメガロウイルス気道感染における CD 8T 細胞の解析.
第28回日本免疫学会総会, 神戸.
5. 野本摩利, 岸原健二, 木村元喜, 野本亀久雄 (1998, 12/2-4).
リステリア抗原特異的な感染防御増強因子の作用機序.
第28回日本免疫学会総会, 神戸.