

## ウイルス学部門 Department of Virology

1999 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), および 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) 3Y1 細胞の温度感受性変異株 3Y1tsD123 の変異 D123 蛋白の分解制御機構。

1999 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）、宮川美保（事務補佐員）。

以下に 1999 年度の研究成果のうち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。

サイトメガロ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。

我々が確立してきたマウスサイトメガロウイルスのマウス下気道感染モデルでは、ウイルスの増殖はまず肺に始まり、続いて全身の臓器におよび、最終的には全ての臓器からウイルスは排除される。注目すべきは、感染後、一度増加したウイルス量が減少に転じる時期および検出限界以下になる時期が臓器毎に異なることである。このことは、ウイルス排除に関与する防御因子が、その種類及び作働する時期に関して、臓器固有であることを示唆する。そこで、抗体投与により CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞を、時間を変えて全身的に除去する実験を行い、T 細胞のウイルス排除への関与とその様式の臓器による違いを調べた。

マウスサイトメガロウイルスのマウス気管内感染後、一旦増加したウイルスが減少に転じる時点(D点)は、全身的免疫応答を反映する脾では7日目、肺では11日目、顎下腺では24日目、腎では11日目、肝では7日目であった。CD4 陽性 T 細胞の全身的除去を、感染前1日から施すと、顎下腺を除く臓器でD点が遅れた。顎下腺では最大ウイルス量が増加した。CD4 陽性 T 細胞の除去を、感染後11日目から施した時、すべての臓器で変化がなかった。CD8 陽性 T 細胞の除去を、感染前1日から施すと、脾では最大ウイルス量が増加し、D点も遅れた。肺、腎ではD点が遅れた。顎下腺、肝では変化がなかった。CD8 陽性 T 細胞の除去を感染後11日目から施すと、肺、顎下腺では変化は無かったが、腎ではD点が遅れた。感染前1日目から、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞を共に除去したマウスの肺を調べると、D点以降にウイルス量は爆発的に増加した。ヌードマウスの感染では、ウイルス量の爆発的な増加がD点(脾)、D点以降(肺、腎、肝)で起こった。

これらの結果から、以下のことが言える。1)肺を含むすべての臓器におけるウイルスの最終排除に、CD4 陽性 T 細胞の個体内での存在が必要である。しかし、D点以降での存在は必要ではない。2)各臓器からのウイルスのD点以前および以降の排除における、CD8 陽性 T 細胞の個体内存在の必要性の有無、程度、様式は、臓器によって異なる。3)すべての臓器において、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞が共に個体内に存在することが、ウイルスの爆発的増量を抑制している。

このように、本研究の結果は、個体内という共通の体液環境の中に存在する個々の臓器が、ウイルスの全身性感染に際して、それぞれの臓器からのウイルス排除において臓器固有性を表現することを示している。

## B. 抗腫瘍免疫の動物モデルを用いた研究

### a. 担癌後期の免疫抑制因子に関する研究

腫瘍抗原クラス I ペプチドや腫瘍抗原をコードする遺伝子を用いた抗癌ワクチン療法で担癌生体の癌を退縮させるためには、担癌に伴う免疫抑制のメカニズム明らかにする必要がある。特に、担癌状態では、CD4 陽性 T 細胞の機能がより強く抑制されているといわれているが、その詳細は明らかにされていない。そこで、PPD 抗原をクラス II 拘束性に認識する Th1 type CD4 陽性 T 細胞クローンの反応性に対する抑制活性を指標として、担癌生体中に存在する免疫抑制因子の同定を試みた。その結果、担癌、特にその後期においては、IgG と complex を形成している TGF- $\beta$  が CD4 陽性細胞の抗原特異的反応を抑制している可能性が示唆された。

### b. 自己抗原を認識する CD8 陽性 T 細胞に関する研究

近年、T 細胞を用いた antigen cloning 法や抗体を用いた SEREX 法により腫瘍抗原が数多く同定されたが、その多くは自己抗原であり、抗腫瘍 T 細胞応答とは“癌細胞に対する自己免疫反応”と考えることができる。しかしながら、正常状態や担癌状態での自己反応性 CD8 陽性 T 細胞の解析はほとんどされていない。そこで、メラノーマ抗原の一つである TRP-2 抗原を認識する（自己反応性）CD8 陽性 T 細胞の分化、TCR avidity や末梢での frequency を検討した。

## C. 細菌感染防御機構の動物モデルを用いた研究

リステリアは、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。我々はリステリア感染マウス血清中に、この菌に対する感染防御を抗原特異的に増強する因子が存在することを見出した。そこで本因子の感染防御増強の作用機序についての解析を試みた。本因子はリステリアの肝臓への取り込みには影響しなかった。in vitro で本因子はリステリア抗原特異的に脾臓細胞の増殖を増強した。この時、上清中の IFN- $\gamma$  産生量にははっきりした差は認められなかった。in vivo では本因子投与により感染 4 日目に B7-1 の発現の増強が見られた。T 細胞の活性化マーカー（CD25、CD44、CD69 など）は、この時点では大きな変化は見られなかった。IFN- $\gamma$  産生細胞の頻度や感染細胞のアポトーシスの頻度を検討中である。

## D. HIV-1 env gp160 発現 CD4 陽性細胞におけるカルシウム依存性アポトーシスの解析

H I V - 1 e n v g p 1 6 0 発現 C D 4 陽性細胞 U E 1 6 0 は g p 1 6 0 の発現誘導により細胞内カルシウムイオン濃度 [ C a <sup>2+</sup> ]<sub>i</sub> の上昇を伴ったアポトーシスで死滅するが、ア

ポトースの詳細な機序は明かではない。今回、このアポトース誘導機構を明らかにするために g p 1 6 0 発現後のミトコンドリア ( m t ) の生物学的な機能変化と傷害について検討した。m t がさまざまなアポトース刺激により傷害を受けるとシトクロム c が流出し、カスパーゼの活性化を介してアポトースを誘導することが知られている。また、 $Ca^{2+}$  の関与する m t の傷害機序として ( 1 ) カルシニューリン ( C N ) の活性化 B A D / B c 1 - x L 結合による B c 1 - x L の機能阻害 シトクロム c 流出、( 2 ) P T ( permeability transition ) pore の開放 m t マトリクスの膨張 シトクロム c 流出という機構が提唱されており検討課題とした。U E 1 6 0 に g p 1 6 0 を誘導して、S 1 0 0 分画および m t 分画中のシトクロム c の量をイムノプロットで検出したところ g p 1 6 0 誘導 6 時間後で m t からシトクロム c が S - 1 0 0 へ流出した。この流出はカルシウムキレート剤 B A P T A および C N 阻害剤シクロスポリン A や F K 5 0 6 により阻止され  $[Ca^{2+}]_i$  上昇とそれに伴う C N を介した m t の傷害が推測された。次に、D i O C 6 ( 3 ) 染色により m t 膜電位 ( m ) の変化をみると g p 1 6 0 誘導後 8 時間まで変化しなかった m が 2 4 時間以降で低下することが分かった。また、超薄切片法で m t の微細構造変化を観察したところ、8 時間後では m t 外膜の破損が認められた。更に B A D と B c 1 - x L の結合をそれぞれの抗体による免疫沈降とイムノプロットで解析したところ 2 4 時間以降で結合が認められた。以上の結果により、g p 1 6 0 発現により生じるアポトースには細胞傷害 ( 1 )、すなわち、 $[Ca^{2+}]_i$  上昇 C N 活性化により B A D の脱リン酸化と B c 1 - x L への結合 B c 1 - x L の機能障害 m t からのシトクロム c 流出 A p a f 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 アポトースという機構が関与しているものと考えられた。最近、 $[Ca^{2+}]_i$  上昇後、小胞体 ( E R ) ストレスにより活性化されるアポトース誘導機構も報告されており、E R ストレスの指標となる分子の発現などを検討中である。

#### E. 3Y1 細胞の温度感受性変異株 3Y1tsD123 の変異 D123 蛋白の分解制御機構

ラット線維芽細胞株 3Y1 の G1 期温度感受性変異株 3Y1tsD123 では 336 個のアミノ酸からなる D123 蛋白に 1 箇所アミノ酸置換 ( A109 V109 ) がある。細胞あたりの D123 蛋白量は許容温度下でも 3Y1tsD123 では親株の 3Y1 に比べ 1/8 に減少している。制限温度ではさらに 1/4 に減少する。この減少は変異型 D123 の分解による。制限温度と許容温度とでの変異型 D123 蛋白の分解速度の差が 3Y1tsD123 の温度感受性の原因と考えられる。そこでこの分解の機序について調べた。

3Y1tsD123 を SV40 でトランスホームすると、トランスホーム細胞 ( SV-3Y1tsD123 ) は制限温度で死ぬため、変異型 D123 の機能相補の実験を行うのに都合が良い。SV-3Y1tsD123 に変異型 D123 の cDNA をトランスフェクトして得た温度耐性株 ts3 は、許容、制限温度の

両方で D123 を SV-3Y1tsD123 より多量に保持していた。D123 は ts3 で急激に分解した。さらに ts3 では 46 kDa の D123 のほかに 50 kDa のものが抗 D123 抗体により認められた。この 50 kDa のものは 46 kDa の D123 より細胞内での分解速度が速かった。両者ともにプロテアソームの選択的阻害剤 lactacystin あるいは MG132 の存在下で分解が抑制された。その抑制は 50 kDa のものが顕著であった。さらに ts3 と同じようにして得た温度耐性株 ts2 では、通常は認められない 50 kDa のものが lactacystin 存在下で認められるようになった。これらのことから、46 kDa の変異型 D123 は修飾を受け 50 kDa のものになり、プロテアソームで分解されると考えられる。2 種類の蛋白質のみかけの分子量差は 4 kDa でユビキチンの分子量 8.6 kDa より明らかに小さい。さらに 50 kDa のものは抗ユビキチン抗体で検出できないことから、この修飾はユビキチン化以外のものであると考えられる。

SV-3Y1tsD123 の自然復帰温度耐性株 R1 では D123 のアミノ酸置換 (A109 V109) を保持し、他のアミノ酸配列には全く変化が無かった。この株では D123 の分解が抑制された。さらに R1 と SV-3Y1tsD123 との融合細胞の 50%以上が温度耐性であった。さらに R1 と ts3 との融合細胞株では 46 kDa の D123 のみを発現し、50 kDa のものは認められなかった。従って、R1 では 46 kDa の変異型 D123 の 50 kDa への修飾を阻害する因子を発現していると考えられる。

現在 R1 が発現するこの修飾を阻害する因子の遺伝子の単離を行っている。さらにこの遺伝子と蛋白質分解機構との関わりを追求してゆきたい。

## 業績目録

### 原著論文

1. Okuda, A., Ohtsu, M., and Kimura, G. 1999.  
Extensive degradation of mutant-type D123 protein is responsible for temperature-sensitive proliferation inhibition in 3Y1tsD123 cells.  
Cell Struct. Funct. 24, 443-449.
2. Li, T., Tamada, K., Abe, K., Tada, H., Onoe, Y., Tatsugami, K., Harada, M., Kubo, C., and Nomoto, K. 1999.  
The restoration of the antitumor T cell response from stress-induced suppression using a traditional Chinese herbal medicine Hochu-ekki-to.  
Immunopharmacology, 43, 11-21.
3. Kariyone, A., Higuchi, K., Yamamoto, S., Nagasaka-Kametaka, A., Harada, M., Takahashi, A., Harada, N., Ogasawara, K., and Takatsu, K. 1999.  
Identification of amino acid residues of the T-cell epitope of mycobacterium

- tuberculosis alpha antigen critical for V 11<sup>+</sup> Th1 cells.  
Infection and Immunity, 67, 4312-4319.
4. Ninomiya, T., Takimoto, H., Matsuzaki, G., Hamano, S., Yoshida, H., Yoshikai, Y., Kimura, G., and Nomoto, K. 2000.  
V 1<sup>+</sup> T cells play protective roles at an early phase of murine cytomegalovirus infection through production of IFN- .  
Immunology 99, 187-194.
  5. Chen, Q., Yoshida, H., Takimoto, H., Ninomiya, T., Ohtsu, M., Kimura, G., and Nomoto, K. 2000.  
Ineffective control of murine cytomegalovirus by IE1-specific cytotoxic T lymphocytes during protracted infection in the lung.  
Arch. Virol. 145, 1-14.
  6. Kimura, G., Takimoto, H., Yoshida, H., Ninomiya, T., Nukina, H., Ohtsu, M., and Nomoto, K. 2000.  
Organ-dependent T-cell subset requirement in defense against virus in mice acutely and systemically infected with murine cytomegalovirus.  
Biomed. Res. 21, in press.

#### 学会発表

1. 山崎正夫, 満生恵子, 三島寛子, 佐々木正文, 木村元喜, 菅野道廣, 立花宏文, 山田耕路. (1999, 5/28-29).  
共役リノール酸摂食がラット脂肪組織形態およびその脂質パラメーターに及ぼす影響.  
第 53 回日本栄養食糧学会, 東京.
2. 大津真澄, 木村元喜, 滝本博明, 二宮利治, 陳其潔, 吉田裕樹, 野本亀久雄. (1999, 11/7-9).  
マウスの MCMV 下気道感染モデルにおける T 細胞依存性ウイルス排除の臓器固有性.  
第 47 回日本ウイルス学会, 横浜.
3. 佐々木正文, 吉田裕樹, 古賀泰裕, 木村元喜, 野本亀久雄. (1999, 11/7-9).  
HIV-1 env gp160 発現 CD 4 陽性細胞におけるカルシウム依存性アポトーシスの解析.  
第 47 回日本ウイルス学会, 横浜.
4. 吉田裕樹, 宮崎幸造, 古賀泰裕, 木村元喜, 野本亀久雄. (1999, 12/1-3).  
HIV env gp160 発現 CD 4 陽性細胞におけるカルシウム依存性アポトーシスの解析.  
第 29 回日本免疫学会, 京都.
5. Yamasaki, M., Mansho, K., Mishima, H., Kimura, G., Sasaki, M., Kasai, M., and Yamada, K. (1999, 12/12-17).

Effect of dietary conjugated linoleic acid on lipid peroxidation and histological change in the rat liver.

2nd International conference on food factors, Kyoto, Japan.