

教室紹介

東北大学医学系研究科微生物学分野

小柳義夫

(e-mail koyanagi@mail.cc.tohoku.ac.jp)

本研究室は大学院重点化に伴い新設された教室である。平成9年4月に東京医科歯科大学から小柳が赴任した。医学部の講座でもあるので当然、医学生への細菌学、ウイルス学、寄生虫学を含む微生物学教育も担当している。新設講座ゆえに教官は教授と助手のふたりだけである。医学系研究科博士過程の大学院生は4年と3年生にひとりずつ、そして、MD-PhDコースの1年生がふたりという非常に小さな教室である。MD-PhDコースとは聞き慣れないことばであるが、新たにはじめた制度である。6年の医学部の過程のなかで4年あるいは5年を修了後、医学系研究科の大学院生として3年から4年間、自分が選択した専門の研究活動を行い、医学博士を先に取得し、その後、医学部に復学する制度である。平成16年度から始まる医学部卒業後の2年の研修制度が定着する時代のなかでひとつの選択肢として、研究を志向する学生への新たな教育過程としてスタートした。そして、来年度（平成15年度）からは4年制大学卒業者を対象として2年の医学修士過程も開設予定であり、大学院生もさらに増える予定である。東北大学全体の中でもヒトの病原性ウイルスを専門にしているのは珍しいために教育担当の守備範囲も広い。ところが新設講座のために教官も少ないが研究スペースも小さく、P2レベルの一般実験室と安全キャビネットがふたつ入ったP3実験室をプレハブに作って我慢している。しかし、来年には改装した研究棟への移転が予定されている。実は教授室は別棟にあるので、実験室にたどり着くのに雪の中をかきわけていくこともある。こんなプレハブ研究室であるが、上に書いたようにP3施設もあり、FACSもシーケンサーも狭いスペースに備えている。そして、病理解析のための共焦点顕微鏡やマイクロームは他の研究室のそれを使っている。これは小生がアメリカで覚えた作法であるが、必要な機械は同じキャンパスにあれば頭を下げながらしっかりと人類のために使っていこうというのを基本としている。そして、周囲の研究環境として仙台は非常に恵まれている。それはほとんどの学生と教官は徒歩で通えるキャンパスの周囲に住んでいながら、共同実験設備を含めた大学の設備はだいたいのもはそろっている。感染動物実験室など、わたしにとって必要不可欠な設備も整っており、さらにその使用に際し、ほとんど問題はなかった。仙台という学問をたいせつにする土地柄に感謝している。

もっともたいせつな研究テーマに話を移す。わたしは昭和56年に熊本大学を卒業後、耳鼻科研修医生活を半年で切り上げて京大ウイルス研究所の日沼研究室でhuman T cell leukemia virus (HTLV) 研究の手ほどきを受けた。それはわれわれが目の前にしていた成人T細胞白血病の原因という悪性の癌が

HTLVというウイルスにより起こっているという大発見がこの日沼研究室によりなされたからである。その後、この研究室から山口大、そして、東京医科歯科大へ移動した山本直樹研究室ではhuman immunodeficiency virus (HIV) 研究が仕事のほとんどを占めていた。この経緯からその後、HIV研究がもっとも大きな比重を占めていることは現在も変わらない。そのいくつかを紹介する。

まず、第一は神奈川の実験動物中央研究所ならびに当時北里大学の田中勇悦博士（現琉球大学）との共同研究により東京医科歯科大のときにははじめた課題である新規SCIDマウスへのヒト細胞移植マウスのHIV研究への応用である。新規マウスの中でNODというもともと糖尿病を起こすマウスにscid遺伝子を入れたNOD-SCIDマウスに末梢血単核球(PBMC)を移植するとHIV感受性が非常に優れており、HIVの増殖実験の解析系として有用であること(J. Virol. 71: 2417-2424, 1997)、そして、このマウスを使うとアポトーシスが容易に観察できる点を見出した。そして、マウスの脾臓の中に移植されたヒトCD4陽性T細胞がアポトーシスにより死滅するのに必要なシグナル分子はこれまでいわれていたFas ligand (FasL)でなくTRAILが大きく関与することを見つけた(J. Exp. Med. 193: 651-660, 2001)。この実験系を用いて脾臓などのリンパ組織から中枢神経系、すなわち、脳組織にウイルス感染細胞を移動できないかと考えた。当時国内留学で東京医科歯科大の神経内科より大学院生として来ていた三浦がlipopolysaccharide (LPS)の投与を提案し、半信半疑ながら実験をやってみた。LPSはエンドトキシンショックを起こす原因物質そのものであり、マウスは予想どおり半数は死んでしまった。わたしはこの実験系ではだめだとあきらめていたが、三浦は脳切片を粘り強く観察して、明らかにヒト単核球の浸潤が増えることを見つけた。そして、マウスが1日ほど動かなくなるがその後急速に回復する軽度の一過性のショック症状を誘導する程度の少量の投与によっても、移植したヒト単核球の多くは浸潤すること、そして、HIVに感染したマクロファージが脳実質に浸潤するとその近傍にTUNEL染色で染まる神経細胞のアポトーシスが起きることを見出した。ねばり強く免疫染色と顕微鏡をのぞいた彼の力わざにより、その後、感染マウスの膨大な数の免疫染色による解析とTRAILに対する中和抗体がこの神経細胞のアポトーシスを阻害する結果より、神経細胞死に関わるシグナルにもFasLでなくTRAILが関与することが確認された。

東京医科歯科大よりの継続した研究課題はこれだけではない。UCLAのEric Daarはロサンジェルスエイズ患者をもっとも古くから診ている医師のひとりであり、はじめてHIVによる急性感染症というものを世に知らせたひとりである(N. Engl. J. Med. 324: 961-964, 1991)。彼とは小柳がUCLA留学

時からの友人であったので、いちど急性感染者から自分の手でウイルスを分離してみようと考えてに至った。ポストドクだった(現 NIH)の鈴木と大学院生の武内が、今までのやり方は新しいものは見つからないと考え、PHA 刺激 PBMC を使った古典的ウイルス分離に加え、TH1 型あるいは TH2 型の細胞に分化させたもの、そして、以前から使っていた CXCR4 陽性の MT-4 細胞に感染させてみた。その結果、急性期のウイルスは CCR5 というコレセプターを使うものと TH1 型に感染するものが一致し、多くの場合これらのウイルスが分離されるが、一例だけ CXCR4 をコレセプターとして使うウイルスが HIV に対する抗体が誘導される前の抗体陰性期、そして、抗体陽転後 3 ヶ月と 6 ヶ月のいずれの時点からも見つかることがわかった。そして、もっと重要なことはいずれの時点にも非常に似たウイルスは存在していながら、抗体陽転後 6 ヶ月の時点からのみ分離されたウイルスはその塩基配列から似ても似つかないものがあり、superinfection が起こった症例であるとわかった。いずれもサブタイプ B 型のウイルスであり、抗体が誘導された感染者においても新たにウイルスが侵入してくることがあることを示していると考えている。また、これらの患者試料からある種の分離株においては PHA あるいはサイトカインなどの細胞活性化因子を添加せずともウイルス増殖は起こりうること、そして、その細胞は単球マクロファージ細胞であることを見出した。面白いことにこのウイルスの全塩基配列を決めて、その比較を行ってみると *env* 領域はサブタイプ B の中で異なっている。特に V4-V5 領域の糖鎖付加部位が異なる (AIDS Res. Hum. Retroviruses 18: 1127-1133, 2002)。

最近のウイルス研究の変化に沿って当研究室も新たな方向性を模索している。それは遺伝子治療ベクター研究である。HIV はウイルスベクターとしても特異なベクターである。それはこのベクターが血液幹細胞や神経細胞を含めた比較的細胞分裂が起こらない細胞群にも遺伝子導入ができる点である。小柳もヒト血液幹細胞への導入に成功した (J. Virol. 1397-1404, 1997)。そこでこのベクター系の基礎研究を始めた。まずは、なぜ細胞分裂が起こらない細胞群にも遺伝子導入できるのか、その理由を明らかにする必要がある。そのためには、ウイルス前期過程のより詳細な把握が必要である。前出の鈴木は PCR 法を応用してウイルスゲノムの逆転写からウイルス DNA の核内移行、そして、インテグレーション過程のそれぞれの変換過程を定量的に把握するアッセイを開発した。この方法を用いて大学院生の蝦名はウイルス感染細胞内からウイルス DNA が染色体にインテグレーションされる際に構成される preintegration complex (PIC) の実体の把握をめざしている。ウイルス感染後 3 時間から 6 時間後に PIC は細胞質分画のなかで逆転写後 VPR, マトリックス, インテグレースなどのウイルス蛋白質とウイルス DNA からなる非常に大きな複合体を形成している。しかし、p24 などの CA 蛋白質はこの PIC から遊離される。そして、それに関与する細胞因子を明らかにすべく実験を行っている。さらに、助手の河野はこの HIV ベクターをいろんな目的の遺

伝子の導入系として容易に変換できるようにラムダファージの部位特異的組み換え反応 (gateway 法) を応用して、PCR 反応からウイルス作製まで一週間で目的の HIV ベクターを作製できる実験系を構築した。そして、このベクター系に cDNA ライブラリーを挿入し神経細胞変性遺伝子である CAG リポーター遺伝子による神経細胞破壊を阻害する因子の同定をめざしている。さらに、大学院生の青木は特異的遺伝子発現を抑制する small interfering RNA (siRNA) の発現系として HIV ベクターを応用することを試みている。将来、この siRNA を発現するライブラリーを構築できると期待している。遺伝子導入系として新たなものができるのではないかとひとつ期待している実験系がある。それは前述したサイトカインなどの細胞活性化因子を添加せずともウイルス増殖が起こりうる HIV 分離株にヒントがあった。このウイルスから遺伝子を分離し、ベクター作製のための *gag-pol* 発現パッケージングプラスミドとして使用すると今までのそれに比べ、細胞分裂していない小リンパ球や単球に遺伝子導入ができることを見つけた。このパッケージングシステムがなぜ分裂していない細胞に遺伝子を導入できるのか、まだ理由はわからないが、実際に未熟な血球細胞に導入できることよりその有用性は大きいと考える。たとえば HIV 抑制蛋白質をリンパ球から持続的に放出させるにはそのリンパ球の前駆細胞に遺伝子導入することが求められる。実際の臨床の場には宝物がある。

もちろん、HIV 研究についても新たな実験系をつくってそのウイルス増殖機構の解明に取り組んでいる。今までの試験管内の培養系ではなく、生体内の組織構築を保ったままなんとか培養ができないか誰もが考えている。われわれの細胞を試験管内にて維持培養する細胞培養法がウイルス研究に大きく貢献してきたことは間違いないが、実際の生体内を本当に再現しているわけではない。実際の組織は整然とした構造を形成し、その組織構築の中での恒常性を保っている。神経細胞は神経組織に、リンパ球はリンパ組織とそれぞれのすみわけがある。そこで、前出の河野はヒト扁桃の、大学院生の岡田はラット脳海馬のスライス培養を始めた。ミリボアの膜の上に組織スライス片をのせて維持培養する技術である。扁桃スライスに HIV を入れるとウイルスを産生する。海馬のスライスに HIV ベクターで GFP 遺伝子を導入すると神経細胞が蛍光を発する。本格的な実験はこれからであるが、この実験系から HIV がリンパ組織内ではナイーブ T 細胞で増殖することが本当か、その細胞は増殖するのか否か。神経細胞に HIV ベクターにより機能を有する遺伝子の導入が本当にできるか、さらに最近、三浦がみつけたエイズ脳症にみられる神経細胞のアポトーシスに必須のシグナルは TRAIL であるという結果は本当なのか、やるべきことはたくさんある。

以上、当教室を紹介してきた。仕事の紹介だけであったので、最後は教室のメンバーの雰囲気を伝えるべくその出身地を並べておわりとする。教授小柳は佐賀、助手の河野は大分、そして、大学院生は兵庫、青森、東京、大阪とこの仙台出身者は皆無のために仙台弁はだれもしゃべれず、西国人が多いためかへんな

言葉が飛び交うあつい教室である。サイエンスの議論はいつもオープン心を心がけており、今は若いだけがとりえであるが、いつかここから新しいものが飛び立つことを信じて実験に励んでいる。これから若い学生の参加を特に期待している。

当研究室の詳しい紹介はわれわれのホームページ (<http://virology.med.tohoku.ac.jp/home.html>) にも掲載しているので一度のぞいてみていただきたい。