

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しを移す。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な心掛けており、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。

獨協医科大学微生物学講座

増田道明

(e-mail m-masuda@dokkyomed.ac.jp)

獨協医科大学というと、医学分野以外の方にはあまり馴染みの無い大学かもしれません。実は医学関係者の中にも、「獨協医科大学医学部ですか?」とおっしゃる方が時々います。獨協大学も獨協医大も、「獨協学園」という法人の一部ですが、正式にはそれぞれ独立した大学です。「獨協」の名前は、ドイツ文化に根ざした我が国の文教興隆を目的として1881年に設立された獨逸学協会に由来しています。100年以上の歴史を持つ学園組織の中であって、獨協医大は1973年(昭和48年)に開学した、いわゆる新設私立医大です。

私は2001年4月より、この大学の微生物学講座を担当しています。小学校以来、国公立の教育・研究機関で過ごし、アメリカでも公的機関(NIH)で研究していた私にとって、私学で働くのは初めてのことで、当初は不安もありました。しかし着任後1年半を経て、その不安の多くが杞憂であり、この大学が柔軟性や競争力、あるいは将来性という点で大きな希望を感じられる場であることがわかってきました。

栃木県の宇都宮から南に約10km。田畑や森林に囲まれた一角に、NIHのMedical Centerを思わせる大きな建物がそびえています(図1)。基礎医学棟、病院、図書館などの建物はガラス張りの渡り廊下で結ばれており、雨の日や冬の寒い日でも楽に行き来できます。木々や草花が美しく配置されたキャンパスは、四季の移り変わりを楽しませてくれます。私の部屋の窓からも、手入れの行き届いた芝生、それを囲むツツジやハナミズキ、その向こうには見事な銀杏並木が眺められます。ここはかつてゴルフ場だったそうで、今も同じ造園業者がメンテナンスをしているのだとか。なるほど、病院横のヘリポートの周りの芝生ではゴルフ部の学生が時々練習しています。また、構内の桜並木は県内でも有数のもので、3月後半から4月初めにかけては一見の価値があります。

微生物学講座は基礎医学棟3階の西端に位置し、大小合わせて10数部屋(約300m²)から成っています(図2)。青い制服を着た清掃員のおばさん達(通称ブルー・エンジェルズ)のおかげで、部屋も廊下もきれいに保たれています。講座の基本定員は教授1、助教授1、講師1、助手2、技術員2。昨年10月からはこれに加えて、エイズ予防財団のリサーチレジデント(RR)を1名採用させていただいています。このうちウイルス学会員は私自身のほかに、山本勝彦助教授、藤澤隆一助手、

そしてRRの松田真理さん。また、学部の学生が放課後や休暇期間中に実験をしにやって来ます。獨協医大の卒業生はほぼ全員が臨床医としてのキャリアを歩むわけですが、それ故にむしろ学生時代に基礎医学研究を経験したいと考え、それに熱中する人も意外と多いようです。

当講座での研究は、HIV-1 Vprによる宿主細胞周期異常(G₂/M arrest)の分子機構やレトロウイルスの神経病原性機構、マウス同種指向性レトロウイルス受容体の発現制御機構、レトロウイルスのintegration targetの解析など、レトロウイルスの分子生物学を中心に進めています。HIV-1 VprによるG₂/M arrestについては、分裂酵母のモデル実験系を用いた解析を進めています。今までに、Wee1(G₂チェックポイントのブレーキ分子)、Rad24(ヒト14-3-3のホモログ)、Ppa2(protein phosphatase 2Aの触媒サブユニット)が関与していることをつきとめました。現在はこれをヒト細胞における現象に敷衍すべく、新たな実験を行っています。具体的には、細胞周期制御に関わるヒトの蛋白遺伝子をWee1やrad24の欠損変異酵母株に導入し、Vprに対する感受性が回復するか検討しています。また、VprとGFPを共発現する自家製アデノウイルスベクターを用いて、種々の哺乳動物培養細胞にいろいろな条件下でVprを発現させ、その効果を解析しています。Vprは96アミノ酸の小さな蛋白ながら多彩な機能を持ち、HIV-1の複製やエイズの



図1 獨協医科大学

自然豊かなキャンパスに、基礎医学棟、病院、臨床研究棟、図書館、講義・実習棟などが機能的に配置されている。

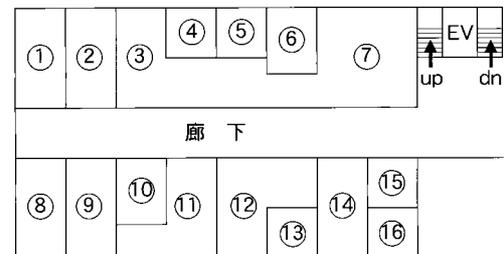


図2 教室の見取り図

①洗浄室, ②ストックルーム, ③機器・測定室, ④低温室, ⑤恒温室, ⑥クリーンルーム, ⑦第1実験室, ⑧P2実験室, ⑨DNA実験室, ⑩暗室, ⑪スタッフルーム, ⑫受付・集會室, ⑬助教授室, ⑭教授室, ⑮書庫, ⑯講師室。この他に、約50m²の実習準備室兼感染実験室がある。

発症に深く関わっている可能性が示唆されています。その解析からは HIV-1 だけでなく宿主細胞の機能についてもいろいろなことが見えてきます。Vpr は腫瘍細胞株にアポトーシスを誘導することも報告されているので、このアデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療の基礎研究も進めつつあります。マウス同種指向性レトロウイルスの受容体については、極性細胞で basolateral 表面に発現すること、同種指向性ウイルスの感染により翻訳以降のレベルで発現が downmodulation されることを見出しています。宿主蛋白分子の細胞内 trafficking がウイルス感染により影響を受けるメカニズムは、ウイルス学はもちろん細胞生物学の見地からも興味深い問題であり、現在その分子機構を解明しようとしています。

実は、私の先々代、つまり初代教授の安村美博先生はアフリカミドリザルの腎臓から Vero 細胞を樹立なさった方です。Vero 細胞はインターフェロン産生能が無いのでウイルス感染に対する感受性が高く、臨床検体からのウイルス分離などに世界中で広く使われています。新たなウイルスの発見に繋がった例もあります。そういう意味でも獨協医大微生物学講座とウイルス学のつながりは深いと言えるかもしれません。

研究に加えて、微生物学教育も講座の重要な任務です。医学教育コア・カリキュラムの導入により90分×23コマ（うち、ウイルス学は9コマ）に講義を圧縮し、その代わりに American Society for Microbiology の問題集を教材とした「症例に基づく微生物学」などの少人数指導も行っています。実習ではウイルス学に関する内容として、培養細胞（もちろん Vero 細胞）を用いた CPE の観察、TCID₅₀ や血球凝集反応（HA）によるウイルス定量、血球凝集抑制（HI）による血清ウイルス抗体価の測定、ファージを用いたブラック定量法などを行っています。従来、HA や HI はインフルエンザウイルスを用いて行っていたようですが、実習後にインフルエンザ様症状の出る学生がいたり、診療施設が近いということもあって、昨年より Echovirus type 12 (Travis 株；国立感染症研究所からご分与) を用いています。このウイルスは健常成人に対する重大な病原性が報告されておらず、米国ではボランティアによる感染実験まで報告されています。また、CPE 形成や HA 所見もわかりやすいので、学生実習には便利です。現在、教育・研究用資材として、このウイルスの感染性 DNA クロームを単離しようとしています、予想外に難航中で苦勞しています。

ところで、こちらの大学に移る際に私が不安に感じたことの一つは、研究のためのリソースが十分だろうかということでした。新設私立医大の一般的イメージとして、臨床重視、基礎研究軽視という印象があったからです。獨協医大でも臨床医学は教育・診療の両面で当然重視されています。しかしそのおかげで大学病院や越谷の分院は北関東の拠点病院としての評価も高く、それが大学経営の安定化や基礎医学講座のサポート体制の充実につながっています。私も着任当初、実験室の整備や改装工事などに要する経費を大学からずいぶん援助していただきました。また私立大学は、文科省や厚労省などの公的科研費以外

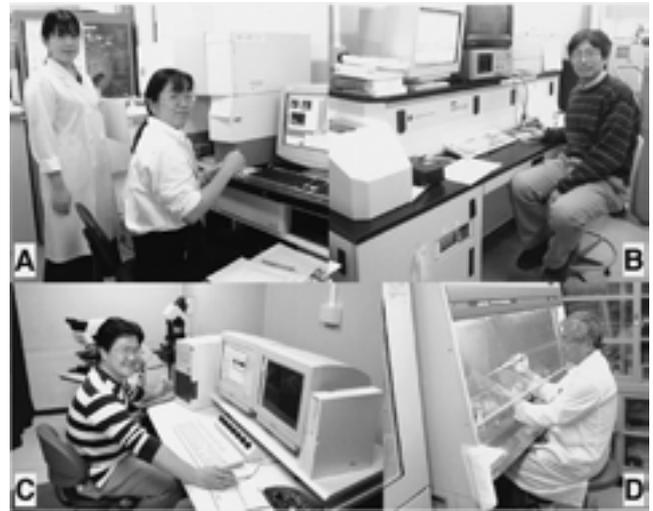


図3 教室スタッフと種々の研究機器。
A. 篠崎技術員（左）とRRの松田さん（右）。FACSで cell cycle の解析中。B. 質量分析器（TOF-MAS）で秘密の（？）実験中の筆者（増田）。C. 藤澤助手と愛用の共焦点顕微鏡。D. 山本助教授@感染実験室。シャイな谷中田技術員はカメラの前から逃亡（残念）。

に、私立学校振興・共済事業団からの研究補助（いわゆる私学助成）を申請することができます。これは、研究費の半額を事業団が、残り半分を大学が負担することによって私学における学術研究を振興しようとするものです。獨協医大のように財政基盤のしっかりした大学は大学の負担分を大きく設定できるので、総額としても大きな研究費を申請することができます。学内数カ所に整備された共同利用実験施設には私学助成により購入された高性能の実験機器が並び、自由に利用することができます（図3）。当講座も少なからずその恩恵に与っています。結局、私が最初に感じた不安は取り越し苦勞だったようです。むしろ独立行政法人化を控えた国立大学から移った私にとって、ある意味ではポスト独法化のモデルを見たような気がします。

ウイルス学の面白さはいろいろあるでしょうが、私自身は“ウイルスを知ることは、宿主（ヒト）を知ることである”という観点から捉えているように思います。ラボの立ち上げはまだ完了したとは言えませんが、講座員の協力や学内外の諸先生のお力添え、友人達の励ましもあって少しずつ軌道に乗ってきています。今後は本学のリソースや特色を最大限に活かして、「獨協医大発」の研究成果を発信していきたいと思っています。私達と一緒に研究してみようという方がいらっしゃれば、ご連絡ください。ちなみに、獨協医大は授業料が高いことで有名なようですが、大学院の学費は国立大学並みです。他大学に籍を置く大学院生や研究生の受け入れ制度もあります。興味のある方は私までお問い合わせください。また、宇都宮の餃子のおいしい店について知りたい方、キャンパスの桜の見頃を知りたい方も、どうぞご連絡ください。

最後に、本稿を執筆する機会を与えてくださいました、「ウイルス」編集委員会の先生方に御礼申し上げます。