

## 教室紹介

京都大学ウイルス研究所・エイズ研究施設・感染病態研究領域

小柳義夫

電話：075-751-4813

FAX：075-751-4812

e-mail：ykoyanag@virus.kyoto-u.ac.jp

http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/koyanagi-lab-home.htm

### はじめに

1986年に京大ウイルス研の大学院を終え、それからUCLA、山口大、東京医科歯科大、東北大を経て、2004年にウイルス研にもどりました。出身の熊本大医学部では学部学生の中でEBV陰性だったので採血用のドナーとして日沼頼夫先生の研究室では大切にされていました。そして、研修医時代、その時にはウイルス研へ移られた日沼先生のHTLV発見のニュースを聞き、大学院生にしてくださいと研究室の門をたたいたのです。その後、日沼先生からはもちろん、現国立感染研エイズセンター長の山本直樹先生、東北大医学部長の菅村和夫先生などの諸氏の薫陶を受けて、HTLVそしてHIVの発見当初に身を置くことができました。その研究所にほとんど20年ぶりに戻ってきました。それまで、1999年から東北大医学部にラボを構えていましたので、スペースとしては3分の2になりました。そして、学生時代に使っていたエレベーターや水道の蛇口も変わっていませんでした。ところが、周辺を歩いてみますと崩れ落ちそうな建物だった京大附属病院もすべて新築され、ウイルス研の建物だけが取り残されていました。この古い建物を見たときは、ここが自分の原点のひとつなんだという感慨を懐きました。幸いにも（いや残念ながら）、P3実験室の改装の都合から、それまでのスペースを帯広畜産大から赴任された宮沢先生にお渡しして、比較的新しい研究棟へ昨年末に移動しました。前のスペースはすき間風が入るために冬は寒く夏は冷房が効かないというところでしたが、今はバイオハザード設備がしっかりした場所です。学生達にはきわめて好評です。前置きはここまでとし、私どもの研究室を紹介します。

### エイズ研究施設・感染病態研究領域とは

私の講座の前任者はSIV研究で有名な速水正憲教授です。よく「サルのはやみです」と電話をいただきます。ウイルス研内に感染症モデルセンターが新たに設置されたことにより転任され、わたしが後任となりました。場所は鴨川が近く、京大吉田キャンパスの中でもっとも南に位置し、歩



いて電車に乗るまで5分ほど、四条河原町の繁華街まで20分ほどという非常に便利なところにあります。4月の桜や11月の紅葉という京都盆地が美しく輝く光景をこの界隈でも垣間見ることができます。今（4月中旬）はやっと花見のシーズンを終え、静けさを取り戻したところです。私の研究室は医学研究科のひとつ（感染病態学）であり、医学領域への研究が使命ですが、幸いなことに京大は生命科学研究科もあり、その学生も私どもの研究室に出入りしており、基礎的なライフサイエンス研究も許されています。さらに、隣接して医学部、薬学部などがあり、一級の研究者たちがラボを構えており、情報交換、共同研究にはきわめて有利な環境にあります。たとえば、このプラスミドが必要と考えると数日後には京大の中で誰かしら持っていることがあります。もちろん、感染実験のためのP3実験室は十分にあり、また、共焦点顕微鏡、FACS、セルソーターと大型の機器も整備されています。すなわち、研究環境として、非常に恵まれています。それでは、わたくしどもの研究室の概要をおはなしいたします。

### 研究テーマ

私自身と学生が取り組んでいますウイルス基礎研究と三浦義治助手が進めるウイルス神経学研究に大きく分けられます。それぞれについて紹介します。現在、教室員は9人です（写真）。

### HIV増殖に介在する細胞性分子群の解明研究

前述しましたようにHTLVとHIVの発見当時には、それぞれのウイルス分離からはじめるきわめて古典的な実験からはじめました。患者さんからウイルス株を分離し、そのウイルスの生物学的性状を明らかにするという手法です。

すなわち、臨床ウイルス学的な研究内容でしたが、組織培養には自信があるという強みは役に立ちました（特にアメリカでは）。そして、ウイルスの性状解析がほとんど終わった時点で思い浮かんだのは、分子レベルでどこまでわれわれはウイルス感染を理解しているかという疑問です。すなわち、ウイルス感染によって *in vitro* で CPE を誘導しても entry, transcription, RNA export, そして, budding 以外に、どこまでわれわれはそれぞれの分子について説明できるのかです。特に細胞学という側面から、細胞性分子はどのように関わっているのか知りたいと考えました。それにはこれまでとは違った新しい手法はないかとアイデアを廻らしているときに、現在九大神経内科に戻った河野祐治助手とともに HIV 感染による CPE を抑制する遺伝子を新たに分離できないかと考えました。そこで、ヒト白血球由来の cDNA ライブラリを HIV にきわめて感受性の高い細胞に導入し、CPE を抑制する遺伝子を拾うという細胞内でのウイルス感染を抑制する遺伝子の単離実験を開始しました。使った細胞は前述の山本先生と熊本大の原田信志先生が見つけた MT-4 細胞です。この細胞は感染後、2-3 日で完全に死滅します。HIV のプラーク法に利用された細胞です。そして、幸運なことに理研の三好先生より分与されたレンチウイルスベクターをつかったところ、これにもきわめて高い感受性があることがわかり、それをういて cDNA ライブラリを導入し、その後 HIV-1 を challenge してみました。その結果、HIV 感染後 1 ヶ月たっても生き残る細胞が明らかになりました。この細胞からサブライブラリを作製し、再び HIV-1 を challenge しても生き残る細胞があります。なお、レンチウイルスベクター導入の確認には GFP が発現するようにデザインしてありますので、なんらかの遺伝子が導入されたことによる CPE の抑制があることには間違いありません。そして、遺伝子クローニングの結果、単球マクロファージのマーカーとして有名な *CD14* 遺伝子が入っていることがわかりました。そして、その導入細胞には HIV は感染しているが CPE は免れること、*CD14* には HIV-1 の entry を抑制する作用があることが判明しました。さらに、別のクローンをみたところ tetraspanin という 4 回膜貫通蛋白のひとつである *CD63* 遺伝子の配列であること、しかも全長ではなく N 末端の細胞外領域を欠いていること、そして、この遺伝子導入細胞には HIV-1 のコレセプターである CXCR4 を細胞表面から消す活性があることがわかりました。その後、院生の芳田の研究から *CD63* そのものに CXCR4 分子の細胞膜への輸送を阻止し、リソソームへ送る活性があり、それが N 末端細胞外領域の欠損により強力に増強されることが証明されました。この研究から CXCR4 を特異的にリソソームへ移行させることができることがわかり、HIV の感染抑止法としてばかりでなく、分子特異的に膜分子移行を修飾できるという membrane trafficking 研究への新たな展開をみせています。さらに、最近、院生

の青木と佐藤により *CD63* とその近縁の tetraspanin 分子には HIV 粒子放出抑制活性があることがわかり、ウイルス構造蛋白との結合も証明されることより、tetraspanin という特異な分子群がウイルス増殖に直接的に関与している可能性を考えています。これらの分子群は tetraspanin web という細胞膜上でラフトとは異なる部位に高分子複合体を形成していることがよく知られています。その機能については受精時における精子との膜融合過程への関与、接着分子との会合による細胞接着活性の制御、また、それに関連したがん細胞の転移活性の修飾、抗原処理と提示機能の制御、そして、ウイルスについても HTLV 感染への関与や *CD81* は HCV のレセプター分子として知られています。このように tetraspanin とウイルスという新しい道を開きたいと考えています。さらに、レンチウイルスベクターはヒト細胞への導入効率がきわめて優れていることより、さらなる応用が考えられ、期待される手法です。最近、院生の篠田は誘導性レンチウイルスベクターを開発しました。

### ヒト化マウスを使った HIV 研究

HIV の宿主域はヒトあるいはチンパンジーに限られています。その病態の解明研究のために小動物モデルマウスの開発は非常に期待されている分野です。その一連の実験系として私どもは現琉球大の田中勇悦先生との共同研究により免疫不全マウスへのヒト細胞移植によりヒト化マウスを作製し、このマウスに HIV-1 を感染させエイズ病態の解明、あるいは、抗 HIV 薬の評価などに利用しています。この一連の実験としてヒト末梢血移植、そして、ヒト血液幹細胞移植による HIV 感受性マウスの作製を行っています。マウスの維持、そして、安全性確保の面からすべて P3 実験室内で行っており、十分に注意を払って行う実験です。この実験系により *CD4* 陽性 T 細胞ならびに神経細胞への apoptosis signal として TRAIL がなりうるということがわかりました。組織内に恒常性維持のための signal と破壊を誘導する signal があり、そのバランスの破綻が病理学的変化として現れると考えています。また、抗 HIV 薬の評価系としても優れており、前臨床段階における有用な *in vivo* 評価系として有望です。教授になってもこの感染実験だけはわたしがやると死守しているのですが、老眼になってマウスの血管が見えずに困っています。現在は、特に幹細胞の移植によるヒト免疫系の構築と潜伏感染モデルができないか試みています。

### ウイルス神経学研究

三浦はそのバックグラウンドが神経内科であることより、神経性疾患におけるウイルス感染の意義について追求しています。そして、小柳も UCLA ではじめに出会ったエイズ患者がエイズ脳症を発症し、ウイルス性脳炎についての思い入れは強いものがあります。その対象ウイルスは HSV と

HIV です。前者は宿主域を選ばず、後者は宿主域がはっきりしており T 細胞とマクロファージです。しかし、いずれのウイルスも脳炎を起こし、きわめて重篤な状態に陥れます。この病態形成メカニズムが共通するものと、まったく異なるメカニズムによるものがあります。いずれも中枢神経組織に対する破壊障害作用により発症すると考えられますが、中枢神経組織内の細胞に対する作用は明らかに違っているようです。HIV は神経細胞には、ほとんど感染しませんが、*in vivo* では脳炎になりこの細胞が死んでいきます。一方、HSV は神経細胞に直接感染してその細胞を殺します。そこで、神経細胞、そして、グリア細胞への作用を細胞レベルはもちろん、神経組織というシステム内で検討する必要があります。そのために神経組織からの分離培養と動物モデルはもちろん、神経組織システムを維持する培養系にも取り組んでいます。それはスライス培養といわれ、海馬、ならびに大脳からのそれが可能です。リアルタイムに神経組織の再構築あるいは破壊過程を追うことができます。脳海馬の各神経細胞層は 1-2 ヶ月維持できますので、ウイルス感染による微細な病理的变化を追うことができます。さらに、神経科学の急速な発展により、種々の分子に対する試薬が整えられつつあり、細胞内、特に軸索内の輸

送過程も明らかになってきました。神経細胞は軸索や樹状突起という局性の形成がその機能にきわめて重要な細胞であり、その分子メカニズムが、最近、明らかになりつつあります。そして、三浦、そして、院生の北山、安藤の結果から、HIV 感染マクロファージがこの局性形成に対して抑制的に働く因子を放出していることがわかりました。彼らはこの分子をひたすら追っています。

#### おわりに

小生は 1981 年以來、レトロウイルス研究に身を投じ、これまでの 25 年間、ウイルスのおかげで未知の世界を経験してきました。サイエンスの醍醐味は未解明の世界をみつけ自分の手で明らかにすることです。この世界を学生にも経験させたいというのが私の思いです。教育という立場では、まず、個人の originality を基礎からつくりあげる、すなわち、考える知力、技、そして、持続力（当研究室では根性といっていますが）の育成を第 1 に考えています。そして、もっとも大切なことがひとつ。「ウイルスがすきか」です。小生は 25 年間、これにつきあっても、いまだに惹かれています。