

部位に關与する HPV 型を特定する事が出来ない。また、PCR に用いるプライマーにより特定の HPV 型が検出されない事も分かつてきている。本研究で示した様に凍結新鮮組織を対象としたコピー数の情報を含む詳細な HPV 型同定研究が世界中で行われ CIN の異形の程度と HPV 型の關連について明確な判断が下されるものとする。

また、先に述べたように、欧米諸国では HPV 検査法を細胞診に変わる癌検診法として研究されている。癌及び前癌の早期発見の観点からも、その重要性は明らかであり、本邦でも厚生行政の一課題として認識される事が望まれる。

E. 結 論

CIN の異形の程度と性器關連 HPV 型との關連を調べた結果、41 種の HPV 型が 3 群に分類された。I 群 17 種 (HPV6,7,11,13,32,40,42,43,44,55,61,62,71,72,74,81,83) は CIN I のみ検出された。II 群 18 種 (HPV 18,26,30,34,39,45,51,53,54,56,59,66,68,69,70,73,82) は CIN I 及び II に検出されたが、CIN III には稀であった。

III 群 7 種 (HPV16,31,33,35,52,58,67) はほとんどの CIN III に検出された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Terai, M., Takagi, M., Matsukura, T. and Sata, T. Oral wart associated with human papillomavirus type 2. J. Oral Pathol. Med. 28:137-140 (1999)
2. Kino, N., Sata, T., Sato, Y., Sugase, M. and Matsukura, T. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a novel human papillomavirus (type 82) associated with vaginal intraepithelial neoplasia. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7:91-95 (2000).

5. 発癌遺伝子領域の染色体脆弱部位の分子機序に関する研究

分担研究者 葛西 正孝 国立感染症研究所免疫部

研究要旨 染色体異常を高頻度に引き起こすヒトゲノムの DNA 領域は、細胞の基本的機能に重要な役割を果たす遺伝子群（細胞分裂、増殖、分化、アポトーシス等に係わる遺伝子）の集中する箇所でもある。癌遺伝子と呼ばれるこのような遺伝子の発現は、腫瘍細胞で頻発する転座、欠失などの染色体異常によって攪乱され、細胞分裂、増殖、分化などに染色体染色体大きな影響を及ぼすことが知られている。本研究では、癌遺伝子発現異常の分子機序を明らかにするために、遺伝子が局在する染色体脆弱領域の生理的意義と染色体切断部位で DNA と相互作用するトランスリン蛋白の機能解析をおこなった。トランスリン蛋白が、細胞の分裂や増殖と密接に関連していることに注目して研究を行った結果、トランスリン遺伝子の発現が MEK/MAPK 経路の活性化によって制御されていることが明らかとなった。一方、このような細胞周期に依存した機能に加えて (1) 放射線などによる DNA 傷害に対応して、トランスリン蛋白が短時間に細胞核内に移行すること。(2) 細胞核内への移行が、nitric oxide synthase (NOS)の関与によることを証明した。

A. 研究目的

白血病、悪性リンパ腫等、染色体異常に起因する造血系細胞疾患の原因は、免疫グロブリン、T 細胞レセプター遺伝子が細胞の増殖、分裂、アポトーシス、細胞周期などに関与する遺伝子の近傍に染色体間組み換えを起こし、それぞれの遺伝子発現に影響を及ぼすことに起因するものと考えられている。従来、このような疾患は免疫グロブリン、T 細胞レセプターの遺伝子再構成に関与する VDJ リンビネースが誤ってシグナル配列(ヘプタマー、ノナマー配列)を認識することによるものと考えられてきたが、大半の症例では染色体切断点の近傍にヘプタマー、ノナマー配列は認められない。われわれは、種々の造血系細胞疾患の染色体転座部位には共通するシグナル様塩基配列が存在することを見出した。更に、この配列を特異的に認識して結合する蛋白、トランスリンを発見し、その遺伝子をクローニングした。

本研究では、細胞に放射線や DNA に損傷を与える薬剤を与えた場合に認められるトランスリン蛋白の細胞内局在の変動を詳細に調べることによって、トランスリン蛋白の機能を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

免疫組織染色

PC12 細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定後、ウサギ抗トランスリン抗体とマウス抗プロムデオキシウリジン(BrdU)抗体で二重染色した。更に、Alexa 546 ヤギ抗ウサギ IgG 抗体と Alexa 488 ヤギ抗マウス IgG 抗体で一次抗体の結合を検出した。また、核染色は DAPI でおこなった。次に、ラット脳組織の染色は、Wistar ラット (P2, P18, P56)を 4%パラホルムアルデヒドと 0.2% ピクリン酸で心臓灌流後、脳組織の凍結切片をウサギ抗トランスリン抗体と反応させた。更に、ビオチン標識抗ウサギ IgG とアビジン標識ペルオキシダーゼで反応させた後、0.05% ジアミノベンチジン(DAB)と 0.01% 過酸化水素水で発色させた。

核蛋白の抽出と Western ブロットティング

培養細胞を Hypotonic buffer (低調緩衝液)中で Dounce ホモジュナイザーによって破碎し、2,000 x g の遠心で核画分と細胞質画分に分離した。次に核画分から Rocking buffer(高調緩衝液)で核蛋白を抽出した。更に、両画分蛋白抽出液から終濃度 10%のトリクロロ酢酸(TCA)で全蛋白を沈殿させ、アセトンで繰り返し洗浄後、SDS sample buffer に溶解した。Western ブロットティングは、サンプルを 10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS)で分離し、PVDF 膜に転写後、enhanced chemiluminescence 法(ECL) (Amersham Pharmacia)

でおこなった。

(倫理面への配慮)

ラットを使用した動物実験に際しては、麻酔処置などの面で動物に苦痛を与えない等、倫理面に十分な配慮をおこなった。

C. 研究結果

脳神経細胞の分裂とトランスリン蛋白の発現

本研究は、ヒト造血器腫瘍に高頻度に認められる染色体転座の研究過程で発見されたトランスリン蛋白の機能を明らかにする目的でおこなわれた。トランスリン蛋白は、分子量 27 kDa の単量体がリング状に 8 個結合した構造を呈して、全ての組織に発現されているが、我々はトランスリン蛋白の発現量と細胞増殖速度と間に正の相関にあることに注目し、脳神経系と造血細胞系をモデルとして次のような研究をおこなった。ラット小脳におけるトランスリン蛋白の発現量を調べてみると、胎生 17 日(E17)から生後 18 日(P18)まで徐々に減少することが判明した。哺乳類の小脳では、急速に分裂する神経前駆細胞は external germinal layer (EGL) に存在し、分化に伴って internal granular layer (IGL) に移行して細胞分裂を停止することが知られている。そこで、トランスリンの発現が、発生過程にある小脳の特定領域に局在しているのかどうかを明らかにするために免疫組織染色による解析をおこなった。その結果、トランスリン蛋白は、EGL の増殖の盛んな神経前駆細胞に強く発現しているが、生後急速に減少し、P18 では IGL にわずかに残るのみであった。更に、トランスリン蛋白の発現と神経前駆細胞の分裂増殖との関連を明らかにするために、NGF (nerve growth factor) による PC12 (phenochromocytoma cell line) 細胞の分化との関連を調べたところ、PC12 の神経細胞への分化に伴う細胞分裂の停止と一致してトランスリン蛋白の発現が減少することが観察された。

造血系細胞の分裂とトランスリン蛋白の発現

以上の現象が造血細胞系においても認められるかどうか確認するために、PMA (phorbol myristate acetate) による K562 細胞の巨核球への分化誘導との関連を調べた。その結果、PMA に

よる K562 細胞の分化誘導と細胞分裂の停止に伴って、脳神経系の場合と同じようにトランスリン蛋白の発現が減少することが観察された。PMA による K562 細胞の分化は、MAPK kinase (MEK)/MAPK 経路によって誘導されることが知られている。そこで、MEK/MAPK 経路の特異的インヒイターである PD98059 の影響を調べたところ、PMA によるトランスリン蛋白の発現の阻害が打ち消されることが判明した。したがって、トランスリン遺伝子の発現は cyclin kinase inhibitor, P21WAF1/CIP1 によって制御されていることが強く示唆された。

放射線による DNA 傷害とトランスリン蛋白の核移行

細胞が種々の傷害を受けると、修復に必要な時間を作るために細胞周期を停止させることが知られている。トランスリン遺伝子の発現と細胞周期が関連することから、DNA 傷害のトランスリン遺伝子の発現に及ぼす影響に着目して研究を進めた。その結果、K562 細胞を 20-Gy の放射線処理した場合、照射 24 hr 後にトランスリン蛋白の発現が減少することが観察された。更に、照射直後のトランスリン蛋白の発現を核と細胞質で解析すると、細胞質に大部分存在するトランスリン蛋白が、約 6hr をピークとして核内に移行することを確認した。一方、細胞核内への移行が, inducible nitric oxide synthase (iNOS) の特異的阻害剤によって打ち消されることから、nitric oxide (NOS) の関与が示唆された。

D. 考 察

以上の結果から、腫瘍細胞で高頻度に認められる染色体転座において、染色体切断部位のコンセンサス塩基配列を特異的に認識して結合する蛋白、トランスリンの機能解析に大きな進歩が得られた。特に、その遺伝子発現や細胞内局在に細胞周期や DNA 傷害が深く関わっていることが明らかにされたことは、今後の研究の方向性と発展性を明確にただけでなく、トランスリン蛋白の機能を解析する上で重要な手掛かりを与えてくれるものと期待される。

E. 結 論

トランスリン遺伝子が、細胞の分裂や増殖と密接に関連して発現されていることが明らかになった。脳神経系と造血細胞系をモデルとして研究をおこなった結果、トランスリン遺伝子の発現が MEK/MAPK 経路の活性化、恐らく cyclin kinase inhibitor, P21WAF1/CIP1 によって制御されていることが示唆された。一方、このような細胞周期に依存した機能に加えて、放射線などによる DNA 傷害後、inducible nitric oxide synthase (iNOS)の関与によって、トランスリン蛋白が短時間に細胞核内に移行することを証明した。以上の結果は、トランスリンが DNA 傷害の初期段階で機能する数少ない蛋白の一つであることを示している。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Meng, G., Inazawa, J., Ishida, R., Tokura, K., Nakahara, K., Aoki, K., and Kasai, M. Structural analysis of the gene encoding RP58, a sequence-specific transrepressor associated with heterochromatin. *Gene* (In press, 1999)
2. Aoki, K., Ishida, R., and Kasai, M. The DNA binding activity of Translin is mediated by a basic region in the ring-shaped structure conserved in evolution. *FEBS Letters*, 443, 61363-61366 (1999)
3. Aoki, K., Meng, G., Suzuki, K., Takashi, T., Kameoka, Y., Nakahara, K., Ishida, R., and Kasai, M. RP58 associates with condensed chromatin and mediates a sequence-specific transcriptional repression. *J. Biol. Chem.*, 273, 26698-26704 (1998)
4. Aoki, K., Inazawa, J., Takahashi, T. and Kasai, M. Chromosomal localization of the gene encoding a recombination hotspot binding protein, Translin. *Genomics.*, 43, 237-241 (1997)
5. Kasai, M., Matsuzaki, T., Katayanagi, K., Omori, A., Maziarz, R. T., Strominger, J. L., Aoki, K., and Suzuki, K. The Translin ring specifically recognizes DNA ends at

recombination hotspots in the human genome. *J. Biol. Chem.*, 272, 11402-11407 (1997)

6. Aoki, K., Ishida, R. and Kasai, M. Isolation and characterization of a cDNA encoding a Translin-like protein, TRAX. *FEBS Letters*, 401, 109-112 (1997)

6. 成人型T細胞白血病の新しい免疫学的治療法の開発

分担研究者 牧野 正彦 国立感染症研究所細菌・血液製剤部

研究要旨 成人T細胞白血病(ATL)は、Human T lymphotropic virus type I (HTLV-I)の感染によって発症し、有効な治療法・予防法が存在しない白血病である。ATL に対する免疫療法の開発をめざし、生体内で最も有能な抗原提示細胞(APC)である樹状細胞(Dendritic cell, DC)の機能解析を行った。ATL 患者末梢単球由来 DC は CD1a・CD86 抗原の低下を示し、病原体の細胞内取り込み能力が低下していた。DC のプレカーサーである単球では CD14 および MHC class II 抗原の発現が低下していた。従って、ATL 患者では単球に機能異常が存在し DC への分化を妨げていると考えられた。そこで、単球への HTLV-I 感染の影響を検索した。HTLV-I 感染単球由来 DC は CD1a の発現低下、FITC-dextran の取り込み能低下を示した。さらに、自己の CD4 および CD8 陽性 T 細胞を刺激する能力が低下していた。従って、HTLV-I の単球への感染は DC の機能低下および ATL の発症に深く関与していると考えられた。一方、ATL の発症の予防法として HTLV-I 感染 T 細胞をアポトーシス機序により体外へ排除することが重要である。HTLV-I 感染 T 細胞は、一般にアポトーシス抵抗性と考えられているが、HTLV-I 感染単球により T 細胞を死のシグナルで感作すると、感染感作 CD4 陽性 T 細胞は T 細胞レセプターを介したシグナルにより、Activation-induced cell death を誘導することが可能であった。このことは、ATL 発症予防法の一つとして重要である。

A. 研究目的

HTLV-I は、ATL および HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) を誘導する。いずれの疾患も乳児期に母乳を介してウイルス感染した後、40-60 年の長い潜伏期間を経て発症する。この長い無症候期においては、ウイルス抗原特異的 CD8 陽性 cytotoxic T lymphocyte (CTL) が作動してウイルス感染細胞および白血化(ATL)細胞の増加を防いでいると想定されている。CD8 陽性 T 細胞が活性化され CTL にまで分化するためには種々の細胞性および液性因子が必要である。この中で、抗原提示細胞 (APC) と T 細胞との接触は、CTL の誘導に不可欠な要素である。APC として種々の細胞が知られているが、樹状細胞(DC)は生体内に存在する最も重要な APC である。ATL の発症には、数段階の要素が関与すると想定されているが、DC を主とした APC の機能異常および感染細胞数過多によって誘導される T 細胞の抗原特異的不応答の獲得などが、免疫不全症の発症および ATL の顕性化に深く関与する免疫機構である。ATL に対する免疫療法の開発および予防法の確立は重要な厚生行政の一つである。本研究では、ATL 患者の末梢血単球由来の DC の機能を解析し、そ

の機能異常の発現機序を明らかにする。さらに、ATL 発症予防法の試みとして、HTLV-I 感染急性期にある CD4 陽性 T 細胞に対してアポトーシスの誘導を試み、その機構解析を行うことを目的とした。

B. 研究方法

細胞調整：鹿児島大学附属病院で診断された ATL (acute type)患者 11 名および正常健康人 10 名より、十分なインフォームドコンセントを行った後、末梢血リンパ球(PBMC)の供与を受けた。プラスチック付着性単球は、PBMC を 60 分間培養した後非付着性細胞を除去して得た。DC の分化誘導には、recombinant (r)GM-CSF 50 ng/ml (キリンビール株式会社)と r-IL-4 10 ng/ml を用いた。

細胞表面抗原の解析：単球および DC の細胞表面抗原の解析は、市販の抗体(CD1a, CD54, CD86, HLA-ABC, HLA-DR)を用い FACScan Γ にて行った。Immature DC の病原体取り込み能は、FITC-dextran をモデル抗原として用い FACScan Γ で測定した。アポトーシスは、FITC-annexin V と Propidium iodide の二重染色により検索した。ウイルスおよびウイルス感染 HTLV-I 産生細胞

株 MT-2 を超音波処理し、細胞外へ放出されたウイルス粒子を cell-free virus として用いた。また、マイトマイシン処理した MT-2 細胞を用い、cell-to-cell により HTLV-I を感染させた。単球・T細胞および樹状細胞への HTLV-I 感染は、HTLV-Igag および px 領域を PCR にて増幅して検索した。同時に、細胞表面への HTLV-Igag 抗原の発現をも調べた。

樹状細胞の抗原提示能の検索：正常健常人および ATL 患者由来の Mature DC および HTLV-I 感染単球より分化誘導した Mature DC の抗原提示能は、自己の CD4 および CD8 T 細胞の増殖応答能にて検索した。

(倫理面への配慮)

血液ドナーのプライバシーを完全に守るため、研究結果発表に際しては個人が特定されないよう配慮し、研究者はドナーのいかなる個人情報も漏出しないよう細心の注意を払った。また、使用目的と使用方法および医学上の貢献予測を十分に説明し理解(インフォームドコンセント)を得た。さらに、結果について守秘義務に基づいて知る権利と知りたくない権利を守った。

C. 研究結果

ATL 患者 T 細胞は機能不全を示すため、患者より得た mature DC の機能は、正常健常人より得た allogenic T 細胞の刺激能により検索した。その結果、3 名の患者のうち 1 名が明らかな機能低下を示した。しかし、mature DC の抗原提示に関わる細胞表面抗原(CD40, 54, 80, MHC class I および class II)の明らかな発現低下は観察されなかった。一方、immature DC は検索した 3 例全例で正常健常人に比し CD1a および CD86 抗原の発現低下および FITC-dextran の取り込み能の低下が認められた。そこで、DC のプレカーサーである単球を検索すると、ATL 患者単球は CD14 抗原および MHC class II 抗原の発現低下を認めた。従って、ATL では単球に何らかの器質的異常が存在し、DC への分化が妨げられている可能性があると考えられた。そこで、単球への HTLV-I の感染の影響を DC の分化という観点より検索した。正常健常人より供与された単球に cell-free

virus および MT-2 細胞を添加すると、単球は容易に HTLV-I 感染し、HTLV-Igag および HTLV-Itax 領域が PCR により増幅され、同時に細胞表面に HTLV-Igag 抗原を発現した。さらに CD14 抗原の発現低下を認めた。HTLV-I 感染単球よりサイトカインを用い immature DC を誘導すると、CD1a, CD86 抗原の発現低下および FITC-dextran の取り込み能の低下を示した。さらに、HTLV-I 感染単球より得た immature DC に、cell-free virus を superinfection させた後 LPS を用い DC を maturation させたが、自己の CD4 T 細胞も CD8 T 細胞も全く刺激することができなかった。従って、HTLV-I 感染単球より誘導した immature および mature DC は明らかな機能低下を示し、ATL 患者 DC の機能異常の発現機序の一つと考えられた。

一方 ATL の発症予防法の一つとして、HTLV-I 感染 T 細胞をアポトーシス機序により体外へ排除する方法が考えられる。そこで、正常健常人より得た T 細胞に MT-2 細胞を用い HTLV-I を感染させると、感染後 1 週では TCR シグナル(CD3 mAb)により、感染 T 細胞は Annexin-V と結合し明らかなアポトーシスを示した。このアポトーシスは感染後経時的に低下し、感染後 4 週ではアポトーシス抵抗性となった。非感染活性化 T 細胞(PHA blast)はアポトーシス抵抗性だった。感染 1 週後の細胞を Annexin-V と抗 HTLV-Igag 抗体を用い二重染色を行うと、HTLV-Igag 抗原陽性細胞に選択的にアポトーシスが誘導されていた。しかし、このアポトーシスは Fas 抗原あるいは Fas L 抗原に対する antagonistic 抗体を添加してもブロックされず、かつ CD8 陽性 T 細胞の関与も否定的であった。一方、アポトーシス感受性 HTLV-I 感染 T 細胞と PHA-blast の細胞表面抗原を比較検討すると、前者で HLA-DR, CD86 および CD25 抗原の発現が増強していた。さらに、感染 1 週のアポトーシス感受性細胞に IL-2 存在下で CD3 mAb を用いて TCR シグナルを施すと、IL-2 の濃度依存性にアポトーシスが增強した。従って、HTLV-I 感染細胞の CD3 mAb によるアポトーシスは、Activation-induced cell death (AICD)と考えられた。そこで、アポトーシス誘導に果たす抗原提示細胞の役割を検討するため、

単球非存在下で HTLV-I を感染させたところ、感染 T 細胞はアポトーシス抵抗性となった。そこで、アポトーシス感受性感染細胞とアポトーシス抵抗性感染細胞の CD3 mAb に対する感受性を感染細胞の増殖応答にて検索した。その結果、前者で有意に高い増殖応答が観察された。しかし、monocytes の有無と感染 T 細胞上への HTLV-Igag 抗原の発現および細胞内 HTLV-Itax 抗原の発現の間には相関は認められなかった。以上の結果より、HTLV-I 感染単球は T 細胞を死のシグナルで感作している可能性が示唆された。この点を明らかにするため、T 細胞を HTLV-I 非感染あるいは感染単球と 1 週間混合培養した後、CD14 抗原陽性単球を完全に除去した後、T 細胞を CD3 mAb で刺激すると感染単球により感作された T 細胞でのみ弱いアポトーシスが観察された。さらに、感染単球で感作された T 細胞を単球非存在下でウイルスに感染させ、アポトーシスを誘導すると強いアポトーシスが誘導された。従って、HTLV-I 感染単球は T 細胞を死のシグナルで感作しているものと考えられた。

D. 考 察

HTLV-I 感染症は、ウイルス抗原に対する高免疫応答が原因となって発症する HAM/TSP と、免疫応答能の低下が原因となって発症する ATL がある。ATL における免疫不全症の発症機構は未だ明らかにされていない。我々は、HAM/TSP 患者の末梢血単球由来 DC は、正常健康人に比し成熟化が進行しており、in vivo において細胞表面にウイルス抗原を保持し、T 細胞の活性化および病変発症に重要な役割を果たしていることを示してきた。そこで、本年度は ATL 患者の DC の機能を解析し、その異常の発現機構を探った。DC は機能的に immature DC と mature DC に大別される。前者は抗原の細胞内取り込みを、後者は MHC 抗原と共に抗原エピトープを発現し T 細胞を抗原特異的に刺激する役割を担っている。ATL 患者では T 細胞の機能異常が存在するため、mature DC の機能は的確に把握し得なかった。しかし、少なくとも HAM/TSP 患者で観察された機能亢進は認められなかった。一方、immature DC は明らかな機能異常を示し、抗原取り込み能力

が低下していた。この機能異常は、T 細胞の機能異常に伴って生ずる二次性のものなのか、単球に異常があり DC の誘導に不可欠な液性因子に対する反応性の低下に立脚するものなのか不明である。そこで、ATL 患者の単球を調べると、CD14, MHC class II 抗原の発現低下が認められ、ATL 患者では単球に内在性の異常が存在する可能性が高いと考えられた。また、単球は in vivo においても in vitro においても HTLV-I 感染性を示すため、単球へのウイルス感染の影響を調べた。その結果、HTLV-I が単球に感染すると、正常な機能を持った immature DC も mature DC も分化誘導できないことが判明した。機能異常を示す DC と接触した T 細胞は不十分に刺激され、その結果として抗原特異的不応答に入る可能性も想定される。従って、ATL においては HTLV-I が単球に感染し、抗原提示細胞および T 細胞の免疫不全をもたらす病変発症を誘導する可能性があると考えられた。

一方、ATL の発症予防法の開発を目的として、HTLV-I 感染 T 細胞に対するアポトーシスの誘導を試みた。従来 HTLV-I 感染 T 細胞はアポトーシスに対して極めて強い抵抗性を示すと考えられてきた。しかし、我々は単球存在下で感染した感染初期(1 週)の T 細胞は、TCR シグナルによりアポトーシスを示すことを観察した。このアポトーシスは、Fas 抗原および CD8 陽性 T 細胞に非依存性であり、IL-2 依存性の activation-induced cell death であった。HTLV-Itax 遺伝子を人為的に導入した Jurkat 細胞では、tax 抗原の発現程度に依存したアポトーシスが観察されている。しかし、今回の MT-2 細胞を用いて自然感染させた T 細胞のアポトーシスには tax 抗原の発現は関与していなかった。HTLV-I 感染 T 細胞の AICD には単球の存在が不可欠であって、HTLV-I 感染単球は T 細胞に対し死のシグナルで感作する役割を果たしていた。従って、HTLV-I 感染 1 週間で誘導が可能であった AICD は、(1) HTLV-I 感染単球の存在、(2) 感染単球による T 細胞の感作、(3) 感作感染 T 細胞に対する TCR シグナルの 3 つの要素が必要十分条件となって誘導されたと考えられた。

E. 結 論

ATL 患者樹状細胞は、病原体を細胞内へ取り込む能力が主に低下していた。この機能異常の一因として、HTLV-I の単球への感染が考えられ、ATL 患者樹状細胞の機能異常発現機序を検索する上で重要なモデルと考えられた。一方、HTLV-I 感染急性期の T 細胞は、ウイルス感染単球存在下で TCR シグナルに反応して activation-induced cell death を示した。ウイルス感染細胞の体外排除に重要な役割を果たすと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

7. Yu, P., R. A. Morawetz, S. Chattopadhyay, M. Makino, T. Kishimoto, and H. Kikutani. CD40-deficient mice infected with the defective murine leukemia virus LP-BM5def do not develop murine AIDS but produce IgE and IgG1 in vivo. *Eur. J. Immunol.*, 29:615-625, 1999.
8. Makino, M., M. Azuma, S. Wakamatsu, Y. Suruga, S. Izumo, M. M. Yokoyama, and M. Baba. Marked suppression of T cells by a benzothioephene derivative in patients with Human T-lymphotropic virus type I-associated Myelopathy/ Tropical Spastic Paraparesis. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 6(3):316-322, 1999.
9. Makino, M., S. Shimokubo, S. Wakamatsu, S. Izumo, and M. Baba. The role of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I)-infected dendritic cells in the development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J. Virol.*, 73(6): 4575-4581, 1999.
10. Wakamatsu, S., M. Makino, C. Tei, and M. Baba. Monocytes Drived Activation Induced Apoptotic Cell Death of HTLV-I-Infected T Cells. *J. Immunol.*, 163:3914-3919, 1999.
11. Umemura, M., W. Wajiwalku, K. Hirose, M. Emoto, H. Nishimura, T. Matsuguchi, Y. Gotoh, M. Takahashi, M. Makino, and Y. Yoshikai. Impaired IL-15 production in murine AIDS mice might underlie susceptibility to mycobacterial infection. *J. Immunol.*, in press.

2. 学会発表

1. The role of HTLV-I-infected dendritic cells in

the development of HAM/TSP. Makino, M., S. Shimokubo, S. Wakamatsu, S. Izumo, and M. Baba. Ninth International Conference on Human Retrovirology: HTLV, April, 1999, Kagoshima, Japan.

2. Cryptic differentiation antigens expressed on the HTLV-I-infected T cells. Shimokubo, S., M. Makino, and M. Baba. Ninth International Conference on Human Retrovirology: HTLV, April, 1999, Kagoshima, Japan.
3. Functional influence of HTLV-I-infection to dendritic cells and their precursor monocytes. Makino, M., S. Wakamatsu, S. Shimokubo, and M. Baba. 11th International Congress of Virology, 9-13 August, 1999, Sydney, Australia.
4. Monocytes derived activation induced apoptotic cell death of HTLV-I-infected T cells. Wakamatsu, S., M. Makino, C. Tei, and M. Baba. 11th International Congress of Virology, 9-13 August, 1999, Sydney, Australia.
5. HIV-1 感染細胞のクリプティック分化抗原を介したアポトーシス誘導. 河村正輝, 牧野正彦, 下窪 敏, 馬場昌範. 第 47 回日本ウイルス学会総会, 1999 年 10 月, 横浜
6. HTLV-I 感染細胞-樹状細胞癒合細胞を用いたウイルス抗原特異的 T 細胞性免疫応答の誘導. 若松伸一, 牧野正彦, 鄭 忠和, 馬場昌範. 第 47 回日本ウイルス学会総会, 1999 年 10 月, 横浜
7. HTLV-I 感染単球由来樹状細胞の機能解析と ATL 発症に果たす役割. 牧野正彦, 若松伸一, 下窪 敏, 馬場昌範. 第 47 回日本ウイルス学会総会, 1999 年 10 月, 横浜
8. HTLV-I 感染樹状細胞の HAM/TSP 発症に果たす役割. 牧野正彦, 下窪 敏, 若松伸一, 出雲周二, 馬場昌範. 第 10 回日本樹状細胞研究会, 1999 年 11 月, 名古屋
9. HTLV-I 感染単球由来樹状細胞の ATL 発症に果たす役割. 牧野正彦, 若松伸一, 下窪 敏, 馬場昌範. 第 29 回日本免疫学会総会, 1999 年 12 月, 京都

7. パリンドローム・オリゴ DNA の抗がん活性の機序に関する研究

分担研究者 山本三郎 国立感染症研究所細菌・血液製剤部

研究要旨： MY-1 は新鮮NK細胞に直接作用してIFN- γ 産生を誘導するが、新鮮T細胞には作用しないことを見出した。また、MY-1のIFN- γ 産生誘導活性には個体差のあることが認められた。そこで健常人NK細胞を用いてオリゴDNAのIFN- γ 誘導活性をスクリーニングしたところ、MY-1添加によってNK細胞から産生されるIFN- γ 量は、DNA非添加時のIFN- γ 産生量に依存していることを見出した。またMY-1は生体内ですでに活性化されたNK細胞に対しても作用し、そのIFN- γ 産生を亢進し得ることが考えられたことから、試験管内でNK細胞を活性化し、そのIFN- γ 産生に対するMY-1の作用を検討した。さらにT細胞が活性化によってMY-1に対する反応性を獲得するか否かについても検討した。一方、オリゴDNAはTh1タイプのサイトカイン産生をもたらすことから、このオリゴDNAの抗腫瘍活性がT細胞を介するか否かを確かめるため、CDF1またはBALB/cヌードマウスに生着させた腫瘍に対する増殖抑制効果を調べたところ、CDF1マウスでみられたオリゴDNAの腫瘍増殖抑制活性はヌードマウスでは認められないことが明らかとなった。

A. 研究目的

MY-1は平均塩基鎖長45merのオリゴDNAを主成分とするBCG由来核酸画分で、皮膚悪性腫瘍や胃癌、成人白血病、リンパ腫および菌状肉症に対する抑制効果が認められている。これまでの研究から、MY-1の腫瘍増殖抑制活性には、CGモチーフを含む6mer以上のパリンドローム配列を有するオリゴDNAの生体防御機能増強が重要であること、細菌DNA及びCGモチーフをもったパリンドローム・オリゴDNAがヒト末梢血単核球(PBMC)やマウス脾臓細胞を刺激してIFN産生をもたらすことを明らかにしてきた。MY-1はマウス・モルモットの実験腫瘍に強い増殖抑制効果を示すほか、NK細胞活性の増強をもたらし、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IL-12、TNF- α の産生を惹起する。これに対し、ウシやサケなど動物DNAや植物DNAでは活性は認められず、生物種による差異がDNA配列中の5'-ACGT-3'または5'-TCGA-3'を含む免疫増強性オリゴDNAによることを明らかにしてきた。今回は、MY-1のこれら免疫増強活性の発現機構を明らかにすべく、IFN- γ 誘導活性に関わる標的細胞について検討した。またオリゴDNAはTh1タイプのサイトカイン産生をもたらすことから、このオリゴDNAの抗腫瘍活性がT細胞を介するか否かを確かめるためヌードマウスに腫瘍を生着させオ

リゴDNAの抑制効果を調べた。

B. 研究方法

細胞の調整及び培養：健常人末梢血単核球から血小板、単球、B細胞を部分除去し、パーコール不連続濃度勾配法によって低比重細胞群と高比重細胞群に分けた。低比重細胞群より、NK細胞を免疫磁気ビーズ法でCD56-positive selectionあるいはCD3/CD14/CD19 negative selectionし精製した。T細胞は高比重細胞群よりCD56/CD14/CD19 negative selectionにて分離精製した。これ等の細胞を、CD16抗体、ダイナビーズM-450-CD3、IL-2、IL-12の存在下又は非存在下にMY-1を加え、10%FCS添加RPMI(エンドトキシン濃度；< 5pg/ml)で20~40時間培養した。オリゴDNAの抗腫瘍活性は、マウスにIMCを生着させた後、オリゴDNAを腫瘍内に週1回連続5週間300 μ gずつ注射することによる腫瘍径および腫瘍重量に及ぼす影響を調べた。

(倫理面への配慮)

動物実験は国立感染症研究所動物委員会の審査・承認により行われた。健常人末梢血は東京西赤十字血液センターより分与されたパフィーコートから調製した。

C. 研究結果

MY-1 は、新鮮 NK 細胞に直接作用して IFN γ 産生を誘導するが新鮮 T 細胞からは誘導できない。PBMC を用いた検索により IFNs/MAF 誘導活性及び抗腫瘍活性を有することが既に明らかにされている活性型オリゴ DNA について、それらの IFN- γ 誘導活性を NK 細胞を用いて検索したところ、5'-G10GACGATCGTCG10-3' (G10GACGA) に強い活性が認められた。健常人 NK 細胞の MY-1 に対する反応性には個体差があり、IFN γ の産生量を指標に分類すると低反応群と高反応群に分けられた。低反応群では MY-1 非添加培養液中に IFN- γ が検出できなかったのに対し高反応群では高く検出され、生体内で既に活性化された NK 細胞も MY-1 に反応することが示唆された。そこで NK 細胞を *in vitro* で活性化し、IFN γ 誘導能の高い G10GACGA と共培養したところ、活性化 NK 細胞の IFN γ 産生は強く亢進された。G10GACGA の亢進作用は IL-2 と相乗した。

次に T 細胞をダイナビーズ M450-CD3 で刺激し、その IFN γ 産生に対する MY-1 の作用を検討したところ、MY-1 は活性化 T 細胞の IFN γ 産生を亢進し得ることが明らかにされた。更に、NK 細胞の IFN γ 産生に対し強い活性を示した G10GACGA は活性化 T 細胞の IFN γ 産生に対しても強い亢進作用のあることが示された。

免疫増強性オリゴ DNA は Th1 タイプのサイトカイン産生誘導をもたらすことが知られている。そこでこのオリゴ DNA の抗腫瘍活性が T 細胞を介するか否かを確かめるため、BALB/c ヌードマウスに生着させた腫瘍に対する増殖抑制効果を調べたところ、CDF1 マウスでみられたオリゴ DNA の腫瘍増殖抑制活性は認められなかった。

D. 考察

BCG 由来 DNA 画分はヒト NK 及び T 細胞に直接作用して IFN- γ 産生を誘導した。その作用は活性化細胞で顕著であり IL-2 産生を伴わなかった。IFN- γ 産生を誘導するモチーフは CG-パリンδροームで構成され、活性化細胞特異配列の存在も示唆された。MY-1 や CG-パリンド

ローム には、上記 NK 活性亢進作用に加えて、マウス脾細胞やヒト末梢血単核球の IFN- γ 産生を誘導する作用がある。従って、これらオリゴ DNA は生体内で Th1 型免疫反応を惹起すると考えられるが、IFN- γ 産生誘導機構は明らかでなく、他の生物活性や免疫反応についても不明な点が多い。そこで、これらオリゴ DNA の免疫刺激活性およびその機序を解明すべく今回は、ヒト末梢血の標的細胞の同定を目的とし、IFN- γ 産生細胞である NK および T 細胞のオリゴ DNA に対する反応性を検討した。

E. 結論

MY-1 はヒト末梢血新鮮 NK 細胞だけでなく活性化 NK/T 細胞にも作用して IFN γ の産生を亢進し得ることが示された。またオリゴ DNA の抗腫瘍活性には T 細胞が必須であることが示された。現在、細胞の活性化と細菌 DNA に対する反応性の関係を検討している。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tokunaga, T., Yamamoto, T. and Yamamoto, S.: How BCG led to the discovery of immunostimulatory DNA. *Jpn. J. Infect. Dis.* 52: 1-11, 1999.
2. Iho, S., Yamamoto, T., Takahashi, T. and Yamamoto, S.: Oligodeoxynucleotides containing palindromic sequence with internal 5'-CG-3' directly act on human natural killer and activated T cells to induce IFN- α production *in vitro*. *J. Immunol.* 163: 3642-3652, 1999.
3. Fujieda, S., Iho, S., Kimura, Y., Sunaga, H., Ikara, H., Sugimoto, C., Yamamoto, S. and Saito, H.: DNA from *Mycobacterium bovis* BCG(MY-1) inhibits the synthesis of immunoglobulin E by interleukin-4-stimulated human lymphocytes. *Am. J. Respiratory Crit. Care Med.* 160: 2056-2061, 1999.
4. Yamamoto, S., Yamamoto, T. and Tokunaga, T.: Oligodeoxyribonucleotides with 5'-ACGT-3' or 5'-TCGA-3' sequence induce production of interferons. *Current Topics Microbiol.*

- Immunol. Immunobiology of Bacterial CpG-DNA 247:23-39, 1999.
5. Yamamoto, S., Yamamoto, T. and Tokunaga, T.: The discovery of immunostimulatory DNA sequence. Springer Seminars in Immunopathology (in press).
 6. Yamamoto, S., Yamamoto, T., Iho, S. and Tokunaga, T.: Activation of NK cell (human and mouse) by immunostimulatory DNA sequence. Springer Seminars in Immunopathology (in press).
 7. 藤枝重治、齋藤等、伊保澄子、山本三郎 : 結核菌 DNA 及び合成単鎖 DNA による IgE 産生抑制の試み. 日本鼻科学会誌 38: 84-90, 1999.
 8. Yamamoto, S., Yamamoto, T. and Tokunaga, T.: Oligodeoxyribonucleotides with 5'-ACGT-3' or 5'-TCGA-3' sequence induce production of interferons. Current Topics Microbiol. Immunol. Immunobiology of Bacterial CpG-DNA 247:23-39, 1999.
 9. Yamamoto, S., Yamamoto, T. and Tokunaga, T.: The discovery of immunostimulatory DNA sequence. Springer Seminars in Immunopathology (in press).
 10. Yamamoto, S., Yamamoto, T., Iho, S. and Tokunaga, T.: Activation of NK cell (human and mouse) by immunostimulatory DNA sequence. Springer Seminars in Immunopathology (in press).
 11. 山本十糸子、Phalen, S., 内田和幸、梅森清子、野島康弘、堀内善信、後藤義孝、McMurray, D.N., 山本三郎 : BCG Tokyo 172 株の抗結核効果 : 結核菌噴霧感染によるモルモット肺結核実験モデルを用いた防御効果の検討. 結核 75: 2000 (in press)
 12. Saburo Yamamoto, Kiyoko Umemori, Yasuhiro Nojima, Syogo Atsumi, Kazue Ohishi, Yoshiharu Takahashi, Masayoshi Inoue, Yumiko Iguchi, Sachiko Toyoo and Toshiko Yamamoto: Immunoadjuvant effect of oligodeoxynucleotides. Proc. US-Japan Cooperative Medical Program on Tuberculosis and Leprosy Research. 34: 282, 1999.
2. 学会発表
 1. 山本三郎、山本十糸子、梅森清子 : ツベルクリンタンパク質抗原の細胞性免疫誘導に及ぼす細菌 DNA 及び合成 DNA のアジュバント効果。第 72 回日本細菌学会総会、1999 年 3 月、東京
 2. 山崎利雄、芳賀伸治、赤川清子、山本三郎 : PCR 法による結核菌群から BCG の鑑別同定法の検討。第 135 回日本結核病学会関東支部総会、1999 年 5 月、東京
 3. 山本三郎、山本十糸子、梅森清子 : 抗 HIV リコンビナント BCG ワクチンの安全性・安定性。第 74 回日本結核病学会総会、1999 年 3 月、宇都宮
 4. Yamamoto, S., Umemori K., Nojima, Y., Atsumi, S., Ohishi, K., Takahashi, Y., Inoue, M., Iguchi, Y., Toyoo, S. and Yamamoto, T.: Immunoadjuvant effect of oligodeoxynucleotides. Thirty-fourth Tuberculosis-Leprosy Research Conferenc of U.S.-Japan Cooperative Medical Science, June 1999, San Francisco
 5. 山本三郎 : 免疫増強性 DNA。第 8 回臨床免疫学学生物学研究会、1999 年 7 月、神戸
 6. Yamamoto, S.: Immunostimulatory DNA from BCG augments host defense mechanisms via induction of interferons. 1st International Workshop on Immunobiology of Bacterial CpG-DNA, September 1999, Schloss Elmau, Germany
 7. 山本三郎、山本十糸子、David N. McMurray: モルモットに対する結核菌噴霧感染に及ぼす BCG ワクチンの効果。第 3 回日本ワクチン学会、1999 年 11 月、名古屋