

## 4. アダプター型癌遺伝子Crkによる発癌機構

分担研究者 松田道行 国立感染症研究所感染病理部研究員

**研究要旨** CT10レトロウイルスの癌遺伝子Crkの活性化機構を解析するために、Crkの活性化を調べるバイオプローブを改良し、細胞内でのCrkのリン酸化の様子を画像化した。

### A. 研究目的

アダプター型癌遺伝子Crkによる癌化の機構を明らかにする。そのために、Crkの活性化が生細胞でどのように起きるかを観察できるバイオプローブを開発し、Crkの活性の様子を画像化する。

### B. 研究方法

**分子プローブの改良：** 緑色蛍光蛋白 (GFP) の黄色変異体 (YFP) および青色変異体 (CFP) をCrkの両側に結合させた分子プローブPicchuについては昨年度に報告した。このPicchuのC末端にK-Ras蛋白のCAAXドメインを融合させた分子プローブを、定法に従い作成し、Picchu-Xと命名した。

**培養細胞における解析：** サル腎由来のCOS 1細胞にpPicchuおよびpPicchu-Xをトランスフェクトし、24時間後から血清飢餓を6時間かけたのちに、上皮細胞増殖因子受容体を10 ng/mlになるように加え、タイムラプス蛍光顕微鏡にて解析した。430 nmの励起フィルターを通した励起光で細胞を照射し、475 nmおよび530 nmの蛍光を冷却CCDカメラに画像として取り込み、日本ローパー社製のMetamorphソフトウェアで、蛍光比率を調べた。

**共焦点レーザー顕微鏡による解析：** 上記COS 1細胞を、オリンパス共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。HeCdレーザーから発振される440 nmの光でCFPを励起した。Z軸方法の画像を撮影し、これをもとにYFP/CFPの蛍光の断面図を作成した。また、アルゴンレーザを用いて、YFPの光褪色実験を行った。

### C. 研究結果

本研究では、Crk癌遺伝子の活性化状態を生細胞で観察するためのプローブのPicchuの改良とそれを用いたCrk癌遺伝子活性化の画像化を行った。

まず、PicchuをCOS細胞に発現させ、血清飢餓の後、上皮細胞増殖因子にて刺激した。すると、刺激後5分をピークとするCrkリン酸化が、細胞質全体に現れた。COS細胞では、このリン酸化は30分以上持続したが、HT1080細胞で同様の実験をしたところ、同じように5分以内に細胞質全体にCrkのリン酸化が観察され、今度はすみやかにリン酸化が消失していった。

上記の実験においてはCrkのリン酸化がどこで始まっているのかは明らかではなかった。その原因として、Crkがリン酸化されると速やかに細胞質内を拡散していくことが原因と推察された。そこで、Crkの拡散の速度を推定するために、FRAP (Fluorescent recovery after photobleaching) を行った。COS細胞にYFP-Crkを発現させ、細胞内の一部にレーザーを30秒間照射し、その後の蛍光回復を観察した。その結果、この30秒間の照射では、特定の領域の蛍光現象は観察できなかった。すなわち、30秒以内には、Crkは細胞内を広範囲に拡散していることがわかった。

上記のPicchuの特性は、Crkのリン酸化がどこで始まっているかの解析を困難にするのみならず、シグナルのS/N比を低くしている原因とも考えられる。そこで、PicchuのC末端側にRasのCAAXボックスを結合させたPicchu-Xを作成した。これは、プローブを細胞膜にとどめることにより、リン酸化がどこでおきるのかを識

別しやすくする目的と、細胞質のプロープを除くことによりS/N比を向上させるという目的がある。

Picchu-XをCOS細胞に発現させ、上皮細胞増殖因子で刺激した。今度は、細胞の辺縁部よりCrkのリン酸化が始まり核へ向けてリン酸化が進んでいくのが観察された。逆に、脱リン酸化は核周囲から始まり、辺縁部の細胞膜でのリン酸化は最後まで残った。また、Crkのリン酸化はPicchuを用いたときは、10 ng/ml以上の上皮細胞増殖因子が必要であったのに対し、Picchu-Xを用いたときは、5 ng/mlでも十分にCrkのリン酸化が観察できた。さらに、20 ng/mlの上皮細胞増殖因子で刺激した場合、Picchuを用いた観察ではCrkのリン酸化は9分で最高に達したのに対し、Picchu-Xでは3分で最高に達した。以上の結果はPicchu-XがS/N比、時空間解像度ともに昨年開発したPicchuよりも向上していることを示している。

#### D. 考察

癌遺伝子の研究はこれまで遺伝学的手法と生化学的手法を用いて進められてきた。これらの研究手法の限界として、細胞内でのいつ、どこで癌遺伝子の活性が変化しているのかを捉えることはできなかった。FRET（蛍光共鳴エネルギー移動）を用いた分子プローブは、蛋白の構造変化を捉えることができるため、癌遺伝子の活性を生きた細胞で観察するのに至適なツールとなる。実際、昨年度、本研究で作成したCrkの活性化を調べるプローブ、Picchu、を用いて上皮細胞増殖因子によるCrkのリン酸化を生きた細胞で画像化することに成功した。

Picchuを用いたリン酸化Crkの分布は、Crkが細胞膜からリン酸化されると速やかに細胞質内に拡散するというこれまでの生化学的な予想とほぼ同じであった。本研究では、さらに、リン酸化がどこで起きているか、を明らかにするためにプローブの改良を行い、CAAXボックスをつけることによりCrkのリン酸化が細胞膜で起きている様子を画像ができた。Crkはまた細胞接着斑でもリン酸化されるとされているの

で、細胞接着斑移行シグナルを付加したのもも作成してみたが、S/N比の向上は認められなかった。これは、細胞接着斑シグナルの特異性が低く、プローブの大部分が細胞質にとどまっているためと考えられた。このことは、プローブを細胞内の限局した場所にのみ発現させることがS/N比向上のために重要であることを改めて示した。

Crkは癌遺伝子Ablにより高い効率でリン酸化されることから、このプローブは将来的には、慢性白血病などAblの活性化が認められる癌において診断に使える可能性もあり、現在、検討中である。

#### E. 結論

CT10ウイルスの癌遺伝子Crkの産物のリン酸化状態を生細胞でモニターするプローブを改良し、Crkリン酸化の様子を画像化した。

#### F. 研究発表

1. K. Kurokawa, N. Mochizuki, Y. Ohba, H. Mizuno, A. Miyawaki, and M. Matsuda. A pair of FRET-based probes for tyrosine phosphorylation of the CrkII adaptor protein in vivo. *J.Biol.Chem.* 276: 31305-31310, 2001.
2. 黒川量雄、松田道行 「生きた細胞で情報伝達を可視化する」 生物物理、印刷中

## 5. 婦人科腫瘍とヒト乳頭腫ウイルス遺伝子型に関する研究

分担研究者 松倉 俊彦 国立感染症研究所 主任研究官

**研究要旨** 子宮頸部腺癌及び腺扁平上皮癌とヒト乳頭腫ウイルス (HPV) 遺伝子型との病因学的関連を明確にするために、PCR 法、サザンブロットハイブリダイゼーション法、in situ ハイブリダイゼーション法を用い HPV DNA の存在を調べた。その結果、3 法全てで検出されたのは腺癌 34 例一例、腺扁平上皮癌 9 例中 3 例に過ぎず、何れも HPV16 型の全長遺伝子が一細胞当たり 200 コピー以上検出された。しかし、組織内分布は腺癌の一部の癌細胞の核のみが陽性であり、腺扁平上皮癌では何れも扁平上皮様癌部が陽性で、腺様細胞癌部は陰性であった。従って、腺癌発生に HPV の関与は少ないものと結論された。

### A. 研究目的

子宮頸部腺癌及び腺扁平上皮癌に存在するヒト乳頭腫ウイルス (human papillomavirus : HPV) を種々の DNA 検出法を用いて検索し、病因 HPV 型を同定する。

### B. 研究方法

子宮頸部腺癌 34 例及び腺扁平上皮癌 9 例の組織検体を各々二分割し、一部から DNA をフェノール法で抽出し、HPV の L1 遺伝子を認識する異なる二種類のプライマー系 (MY と LC) を用い PCR を行い、産物の塩基配列を調べて、HPV 型を同定した。また、サザンブロットハイブリダイゼーションを行い、HPV 遺伝子の長さ及び存在様式を調べた。一方、ホルマリン固定パラフィン包埋した組織切片を用い HPV DNA の組織内存在を in situ ハイブリダイゼーション法により調べた。

### C. 研究成果

PCR 法 : MY プライマーにより、18 例の腺癌に 8 種類の HPV (HPV 6, 11, 16, 18, 33, 52, 58, 61) が、7 例の腺扁平上皮癌に 3 種の HPV (HPV 16, 18, 58) が単独ないし複数同定された。一方、LC プライマーにより、22 例の腺癌に 14 種類の HPV (HPV 6, 16, 18, 33, 34, 35, 45, 52, 53, 56, 59, 61, 62, 82) が、8 例の腺扁平上皮癌に 3 種の HPV (HPV 16, 18, 53) が同様に検出された。

・ サザンブロットハイブリダイゼーション法 : PCR 法で検出された HPV 型をプローブとして検索した結果、一例の腺癌と 3 例の腺扁平上皮癌

にのみ、何れも HPV 16 型が検出された。4 例とも一細胞当たり 200 コピー以上の HPV 全長遺伝子を保持していて、一例の腺扁平上皮癌を除き細胞 DNA に組み込まれていない遊離状態であった。

in situ ハイブリダイゼーション法 : 一症例当たり可能な限り多くの異なるパラフィン組織切片について、PCR 法で検出された全ての HPV 型をプローブとして in situ ハイブリダイゼーションを行った。その結果、サザンブロットハイブリダイゼーション法でも HPV16 型陽性の 4 症例は何れも明瞭な陽性反応を示した。即ち、腺癌の一例にあっては癌部の細胞の核が濃染された、しかし全ての癌部においてではなかった。また、腺扁平上皮癌の 3 例では何れも腺様癌細胞は陰性であったが、扁平上皮様癌細胞の核が濃染された。一方、PCR 法によってのみ検出された多数の他の HPV 型は数症例で一部の癌細胞の核が点状に染色されたにすぎなかった。さらに、特筆すべきは、PCR 法により HPV18 型が検出された 9 例の腺癌において、腺・扁平上皮移行部の正常腺細胞の核だけが点状に染色された。

### D. 考察

従来、子宮頸癌は組織型を問わず HPV が起因子とされ、特に腺癌は HPV18 型が引き起こすと考えられて来た。しかし、その根拠とされる研究は in situ ハイブリダイゼーション法か PCR 法のみによって成されて来た。これらの方法では HPV の遺伝子の長さ、コピー数、存在様式を知る事は出来ない。また、PCR 法では正常頸部にも種々の HPV 型が検出され、婦人下部性器に多様な HPV

が遍在している事は明らかである。HPV の感染から発癌に至る長期の過程を考慮すれば、PCR 法で癌組織に検出された HPV を即く癌の起因子とするのは危険であろう。

最近、世界保健機構はワクチンによる頸癌撲滅に動きだし、HPV 16 型と共に我々が日本人の頸癌からクローニングした HPV58 型を含む多価ワクチンの開発研究が始まった。今後、子宮頸部扁平上皮癌の病因 HPV 型を明らかにする事が有効なワクチンの作成、さらには HPV による発癌機構の解明に最重要課題と考える。

#### E. 結論

子宮頸部腺癌発生に HPV の関与は少ない事が明確になった。また、腺扁平上皮癌においても腺様癌部発生に HPV の関与はないと考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Mitsuishi, T., Kawashima, M., Matsukura T. and Sata T. Human papillomavirus type 58 in Bowen's disease of the elbow. *British Journal of Dermatology* (2001) 144: 384-386.

Matsukura, T. and Sugase M. Relationships between 80 human papillomavirus genotypes and different grades of cervical intraepithelial neoplasia: association and causality. *Virology* (2001) 283: 139-147.

##### 2. 学会発表

なし。

## 6. 成人 T 細胞白血病に対する免疫療法および免疫予防法の開発

分担研究者 牧野 正彦 国立感染症研究所 部長

**研究要旨** 成人 T 細胞白血病(ATL)患者末梢血単球由来樹状細胞(DC)は、抗原の取り込み能および T 細胞の活性化能に障害を示す。この患者 DC の機能異常を補うため、DC と抗原である HTLV-I 感染 T 細胞を人為的に融合させ(fusion DC-T 細胞の作成)、その抗原提示能を検索した。融合効率は 50% であり、fusion DC-T 細胞は HTLV-I 感染 DC に比し、MHC class I および CD86 抗原を強く発現し自己の CD4 および CD8 T 細胞を強く活性化させた。さらに、HTLV-I 感染 T 細胞を 8-Azaguanine 存在下で作成すると、HTLV-I 抗原をより強く発現し、DC と融合させるとより強く CD8 T 細胞活性化させた。従って、fusion DC-T 細胞は ATL に対する免疫療法として有効である可能性が示唆された。

### A. 研究目的

成人 T 細胞白血病 (ATL) に対する免疫療法の開発を目的として、これまで樹状細胞 (DC) に着目してきた。しかし、ATL 患者においては、DC は機能低下を示し、外来抗原の取り込み能および Allogeneic T 細胞の活性化能が低下していた。そのため、DC を用いた ATL に対する免疫療法として、DC の抗原提示能を改善することが不可欠と考えられる。そこで、DC と抗原である HTLV-I 感染 T 細胞を *in vitro* で人為的に融合させ (fusion DC-T 細胞)、その抗原提示能を検索した。

### B. 研究方法

正常健常者末梢リンパ球の供与を受けリンパ球を分離した後、プラスチック付着性単球を得て、recombinant (r) GM-CSF と rIL-4 を用い DC を分化誘導した。DC の抗原提示能は、自己の T 細胞の活性化能で検索した。各 T 細胞サブセットは、magnetic beads 付着モノクローナル抗体を用いて negative selection 法で精製した。DC と HTLV-I 感染 T 細胞は、50% ポリエチレングリコール存在下で融合させた (fusion DC-T 細胞の作成)。DC・T 細胞および fusion DC-T 細胞表面抗原の解析は、FACScalibur (Becton-Dickinson) を用いて行った。**倫理面への配慮** 国立感染症研究所倫理委員会の審査を受け、以下の通り行った。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

T 細胞マーカー CD2 抗原は、DC には発現しないため DC と HTLV-I 感染 T 細胞の融合効率を CD2 抗原の発現により検索した。その結果、fusion DC-T 細胞の約 50% が CD2 抗原陽性となり、融合効率は 50% と考えられた。fusion DC-T 細胞表面を解析すると、MHC, CD86, CD80, CD40, CD54 抗原など抗原提示に関わるほぼ全ての抗原を発現していた。また、HTLV-I 感染 DC と比較すると、MHC class I および CD86 抗原は fusion DC-T 細胞により強く発現していた。DC 同士および T 細胞同士が融合する可能性があるため、これらの融合細胞をコントロールとして fusion DC-T 細胞の抗原提示能を検索すると、コントロール融合細胞は T 細胞を刺激し得なかったのに対し、fusion DC-T 細胞は自己の CD4 および CD8 陽性 T 細胞を活性化させた。さらに、PHA 刺激活性化 T 細胞と DC を融合させたが、T 細胞は活性化しなかった。従って、fusion DC-T 細胞は HTLV-I 抗原特異的に T 細胞を活性化させると考えられた。融合時における DC と T 細胞の関係を調べると、所謂ベル現象を示し DC : T = 3 : 1 で最も強い抗原提示能が観察された。また、一般に *in vivo* では ATL 細胞は HTLV-I 抗原を発現しておらず、抗原性が弱い細胞と想定されている。そこで、代謝拮抗剤である 8-Azaguanine 存在下で HTLV-I 感染細胞を作成したところ、感染 T 細胞上の HTLV-I gag 抗原の発現は増強し、DC と融合させ

ると fusion DC-T 細胞の抗原提示能はさらに増強した。

#### D. 考察

HTLV-I キャリアーでは cytotoxic T lymphocytes (CTL) が働き、ATL 細胞の増殖を抑制していると考えられる。従って、ATL の免疫療法として最も有効と想定される方法は効率良い CTL の誘導であり、CTL の活性化には抗原提示細胞の存在が不可欠である。しかし、ATL においては DC の機能低下が観察されている。本研究では DC の機能を修復するため、成熟化 DC と HTLV-I 感染 T 細胞との融合細胞 (fusion DC-T 細胞) を作成した。HTLV-I 感染 T 細胞は、自己 T 細胞を抗原特異的に活性化させるため、HTLV-I 特異的 CTL の誘導には有効な抗原である。DC とこのウイルス感染 T 細胞の融合効率は 50% と高く、DC に抗原をパルスするには十分な方法と考えられた。また、fusion DC-T 細胞は HTLV-I 感染 T 細胞より MHC class I および CD86 抗原を強く発現し、CD8 T 細胞の活性化に適していた。また、ATL 細胞は in vivo において、ウイルス抗原を細胞表面に発現しておらず免疫原性の弱いがん細胞と考えられるが、8-Azaguanine 存在下で HTLV-I を感染させると T 細胞へのウイルス抗原の発現を増強することが可能であった。従って、本研究で用いたシステムは、ATL に対する免疫療法の一つとして有効であるものと考えられた。

#### E. 結論

ATL 患者樹状細胞の機能障害を改善するためには、DC と HTLV-I 感染 T 細胞の融合細胞が有効であった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nomaguchi, H., N. Jahan, B. C. Mandal, Y. Yogi, K. Kawatsu, Y. Yoshizawa, H. Okamura, and M. Makino. IL-12 and IL-18 synergistically induce the bactericidal activity of murine peritoneal cells against *M. leprae*. *Jpn. J. Leprosy* 70:113-119, 2001.
- 2) Umemura, M., K. Hirose, W. Wajjwaiku, H. Nishimura, T. Matsuguchi, Y. Gotoh, M. Takahashi, M. Makino, and Y. Yoshikai. Impaired

IL-15 production associated with susceptibility of murine AIDS to mycobacterial infection. *J. Leukoc. Biol.* 69(1):138-148, 2001.

- 3) Makino, M., A. Utsunomiya, Y. Maeda, S. Shimokubo, S. Izumo, and M. Baba. Association of CD40 ligand expression on HTLV-I-infected T cells and maturation of dendritic cells. *Scand. J. Immunol.*, in press, 2001.
- 4) Kawamura, M., T. Naito, M. Ueno, T. Akagi, K. Hiraishi, I. Takai, M. Makino, T. Serizawa, K. Sugimura, M. Akashi, and M. Baba. Induction of mucosal immunity following intravaginal administration of inactivated HIV-1-capturing nanospheres in mice. *J. Med. Microbiology*, in press, 2002.

##### 2. 学会発表

- 1) 野間口博子, 與儀ヤス子, 川津邦雄, 牧野正彦, 吉澤雄介, 岡村春樹. マウス腹腔内マクロファージのらい菌殺菌機構の解析. 第 74 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2001 年 5 月 米子
- 2) 鈴木幸一, 石井 健, 木村博昭, 中田 登, 前田百美, 武下文彦, 牧野正彦. 宿主細胞内日本鎖核酸とらい菌感染とによる抗原提示能の活性化. 第 74 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2001 年 5 月 米子
- 3) 前田百美, ブイ・バン・ホアン, 橋本 研, 中田 登, 前田伸司, 柏原嘉子, 牧野正彦. ハンセン病患者血清に反応する未知なる抗原の分子免疫学的解析. 第 74 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2001 年 5 月 米子
- 4) 牧野正彦, 橋本 研, 前田百美, 松岡正典. らい菌の正常健常者末梢単球由来樹状細胞の抗原提示能に及ぼす影響. 第 31 回日本免疫学会総会 2001 年 12 月 大阪
- 5) 梅村正幸, 西村仁志, 松口徹也, 牧野正彦, 須田貴司, 吉開泰信. IL-15 はマウス後天性免疫不全症候群の病態の進展を抑制する. 第 31 回日本免疫学会総会 2001 年 12 月 大阪
- 6) Maeda Y., B. V. Hoang, S. Shrisungngam, S. Maeda, P. J. Brennan, Y. Kashiwabara, and M. Makino. Molecular and immunological analysis of a protein against leprosy. *International Symposium on Mycobacterial Diseases: Pathogenesis, Protection and Control*, Jan., 2001, Bose Institute, Calcutta, India.

# 論文発表

20010152

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので P.6-7 の「G. 研究発表」をご参照ください。