

感染防御学部門

Department of Molecular Immunology

当部門ではヒトおよび動物における免疫応答機構を細胞レベル、分子レベルで解明することを目的にしている。更にそれらの知見をもとに免疫不全症や免疫異常症の原因と治療法について研究を進めたいと考えている。当面は(1)免疫グロブリン遺伝子の発現調節とリンパ球分化との相関、(2)免疫グロブリン遺伝子のスイッチングの分子機構、(3)組換え DNA 法によるヒト型モノクローナル抗体の作成とその応用、(4)胸腺上皮と Tリンパ球分化の制御等について研究を進めている。

人事異動は以下のとおりである。工藤明助教授は昭和63年11月帰国したが、平成元年10月より再びスイス国バーゼル免疫学研究所へ研究員として赴任した。岸裕幸助手は引き続き、バーゼル免疫学研究所に留学中である。小森慎二助手はペンシルバニア大学病理学教室に引き続き留学中。北村大介助手は昭和63年12月より2年間の予定でドイツ国ケルン大学遺伝学研究所に留学中である。中島学助手は平成元年2月より、フィラデルフィアのウイスター研究所へ2年間の予定で留学中である。大学院生の原英夫君は引き続き、トロント大学・オンタリオ癌研究所に留学中。大学院生の岡部泰二郎君はスイス国バーゼル免疫学研究所へ平成元年10月より、同じく大学院生の宮越友子君は平成元年11月よりフランス・パスツール研究所に留学中である。従って本年(1989年)は教員7名が外国留学中で、現在の教員は大学院生6名(4年次1名、3年次2名、2年次2名、1年次1名)と研究生5名の12名である。中堅の人達が海外留学中のため、苦しい年ではあったが全員頑張り続けている。

A. ヒト免疫グロブリンH鎖遺伝子の発現調節機構の解析

数多くの遺伝子が、特定の組織や細胞においてのみ転写され発現してくることが知られている。すなわち、真核細胞の多くの遺伝子が、細胞特異的あるいは分化過程特異的に発現することが知られている。このような遺伝子の発現調節は、個々の遺伝子が有しているシスに働く DNA 領域(調節領域)と、それら DNA 領域に直接あるいは間接的に働きかけるトランスに作用する調節蛋白によって行われる。免疫グロブリン遺伝子は、B細胞系列の細胞でのみ再配列が生ずると共に、再配列を終えた抗体遺伝子であっても、その発現はB細胞でのみ生ずる。我々はヒトH鎖遺伝子を用いて、そのB細胞特異的に発現するメカニズムについて従来より研究を続けてきた。特にそのエンハンサー機能の発現について解析を行い、いくつかの重要な DNA 領域を同定し、そこに結合する蛋白の存在を同定した。

本年はそのうち E 1 領域、HE 2 領域に結合する核蛋白の精製と cDNA クローニングを試みた。E 1 結合蛋白はヒト B リンパ芽球細胞の核蛋白より精製し、32 KD の精製蛋白を得た。トリプシン分解を行った後、各ペプチドについてアミノ酸配列を決定した。決定したアミノ酸部分配列を

もとにオリゴヌクレオチドを合成し、それらをプローブとして cDNA クローニングを行っている。HE 2 結合蛋白は骨髓腫細胞より精製し、96 KD の精製蛋白を得た。この蛋白は、in vivo においてヒト H 鎖遺伝子の転写を誘導する活性を有する。この蛋白をコードする cDNA をクローニング中である。さらに、ヒト H 鎖エンハンサーにはマウスのそれと異なって完全な形のオクタマー配列が存在しない。我々はオクタマー配列に代わる新しい B 細胞特異的に働く DNA モチーフを同定した。新たに見い出された DNA モチーフはそれ単独で B 細胞特異的エンハンサー活性を示した。また B 細胞核中にこのエレメントに結合する特異的な蛋白が存在する事が明らかとなった。

B. 組み換え DNA 法によるヒト型モノクローナル抗体の作製と応用

a. マウスーヒトキメラ抗体の作製と応用

ヒト CEA 抗原を特異的に認識する抗体を産生しているマウスハイブリドーマよりその V_H、V_K 遺伝子をクローニングし、ヒト C_H、C_K 遺伝子とそれぞれ結合し、マウスーヒト抗 CEA・キメラ抗体遺伝子を作製した。またヒト H 鎖エンハンサーをエンハンサーとして用いた。このキメラ遺伝子をマウス骨髓腫細胞に導入しキメラ抗体を産生する細胞株を樹立した。得られたキメラ抗体は特異的に CEA 抗原と結合し、その親和性はもとのマウスモノクローナル抗体と同程度であった。in vitro においてヒトのエフェクター細胞を使った場合、マウスの 2～5 倍以上の抗腫瘍活性が得られ、キメラ抗体が抗ヒト腫瘍抗体として有用であることが示された。同様にして、抗メラノーマ抗体、抗 CA-125 等についても、キメラ抗体を作製した。

b. ヒト型モノクローナル抗体作製のためのベクターとその応用

PCR 法を用いる事によりヒトリンパ球中に存在する抗産生細胞の産生している抗体の遺伝子 (cDNA またはゲノム遺伝子) を増巾する事が可能である。すなわち、PCR 法を用いる事により再配列を終えた活性型の抗体遺伝子の V 領域 (V_H、V_L) DNA を増巾し単離する事が可能である。このようにして得た V_H、V_L の DNA をキメラ抗体作製の際に用いた CH 領域遺伝子、CL 領域遺伝子に結合する事によりヒト型モノクローナル抗体をコードする抗体遺伝子を作る事が出来る。我々はこの目的に応じた CH 領域遺伝子、CL 領域遺伝子をあらかじめ組み込んだ発現型ベクターを開発した。このベクターと PCR 法を組み合わせる事により、ハイブリドーマ法を用いずに組み換え DNA 法により、ヒト型モノクローナル抗体 (抗細菌、抗ウイルス、自己抗体、抗腫瘍抗体、レアギン抗体など) を作製することが可能になると考えている。

c. IgE クラススイッチの調節機構

免疫グロブリン H 鎖遺伝子はクラススイッチをすることが知られている。クラススイッチ再構成においてもエンハンサーをはじめとして、遺伝子発現調節機構が重要な役割を果たしている

考えられている。我々はアレルギー患者における IgE へのクラススイッチに焦点をあてて、IgE クラススイッチのメカニズムを解明することを本年度から始めた。現在三つの方法論を進行させている。第一は $\mu \rightarrow \epsilon$ 、 $\delta \rightarrow \epsilon$ への H 鎖クラススイッチを検出する事の出来るベクター及び細胞株の樹立、第二は IgE へのクラススイッチに先行して生ずる遺伝子転写調節の亢進のメカニズムの解明、第三は IgE へのクラススイッチを強く促進する液性因子の解析である。第一の点については sterile ϵ -transcripts の産生を観察しているがそのメカニズムについては今後の研究が必要である。第三については現在、因子を解析中である。

C. 胸腺上皮細胞株の樹立とその機能

マウス胸腺上皮細胞株を樹立した。この細胞株は形態学的に上皮細胞の特徴を有している。樹立した上皮細胞上にマウス胸腺細胞を加えて培養すると、培養中に CD4⁺、CD8⁻または CD4⁻、CD8⁺のいわゆる成熟型の Single positive-T 細胞が選択的に濃縮されてくる。これは、CD4⁺、CD8⁺の未成熟な double positive な細胞がこの上皮細胞株に選択的に取りこまれて除去されるからである。この double positive 細胞の選択的除去のメカニズムを解析するために、(a)電顕的観察、(b)上皮細胞株に対するモノクローナル抗体の作製を行った。電顕的観察から、(1)樹立した細胞株は胸腺上皮細胞由来であること、(2)上皮細胞は何らかの認識分子を介して未熟な double positive な胸腺細胞と接着する、(3)未熟な胸腺細胞は生きたまま上皮細胞質内に取りこまれ、種々の酵素によってこわされる、(4)成熟した Single positive-T 細胞は上皮細胞と直接、接着することはないが、長期にわたって上皮細胞上で生存し分裂し得る。

このような上皮細胞株の樹立は、T 細胞の成熟過程を試験管内で解析するのに有用であると考えられる。

業 績 目 録

原著論文

1. D. Kitamura, H. Kaneko, Y. Miyagoe, T. Ariyasu and T. Watanabe : Isolation and characterization of a novel human gene expressed specifically in the cells of hematopoietic lineage. *Nucleic Acids Research*, 17 : 9367-9379, 1989
2. M. Nakashima, K. Mori, K. Maeda, H. Kishi, K. Hirota, M. Kawabuchi and T. Watanabe : Selective elimination of double positive immature thymocytes by a thymic epithelial cell line. *Eur. J. Immunology*, 20 : 47-52, 1990
3. H. Koga, H. Kanda, M. Nakashima, Y. Watanabe, K. Endo and T. Watanabe : Mouse-human chimeric monoclonal antibody to carcinoembryonic antigen (CEA); In vitro and in vivo activities. *Hybridoma*, 9 : 43-56, 1990

4. H. Kaneko, M. Nakashima, A. Kudo, R. Iwakiri, M. Harada, and T. Watanabe : Selective IgG deficiency with transcriptional disorder of gamma switching region gene and IL4 gene. *International Immunology*, 2 : 661-668, 1990
5. T. Saga, K. Endo, M. Koizumi, Y. Kawamura, Y. Watanabe, J. Konishi, R. Veda, Y. Nishimura and T. Watanabe : In vitro and in vivo properties of human/mouse chimeric monoclonal antibody specific for common acute lymphocytic leukemia antigen. *J. Nucl. Med.*, 31 : 1077-1083, 1990
6. I. Ezaki, H. Kaneda, K. Sakai, N. Fukui, M. Singu, M. Nobunaga and T. Watanabe : Restricted diversity of the variable region nucleotide sequences of the heavy and light chains of a human rheumatoid factor. *Arthritis and Rheumatism* (in press)
7. K. Mori, K. Hirata, M. Kawabuchi, M. Nakashima and T. Watanabe : A novel MHC class I-related molecule expressed on mouse thymic stroma cells and mature lymphocytes. *Immunogenetics* (in press)
8. J. Wang, M. Oketani and T. Watanabe : Positive and negative regulation of Ig gene expression by a novel B cell specific enhancer element. *Mol. Cell. Biol.* (in press)