

## 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、分子レベルで解析することにより、免疫不全症や免疫異常症の原因の解明と治療法、および癌の診断と治療法の開発に関する研究を進めている。本年は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、特にIgEクラスへのスイッチングの調節機構、3)組換えDNA法によるヒト型モノクローナル抗体の作製とその応用、4)腫瘍特異的なヒトT細胞株の樹立とその抗原レセプター遺伝子の解析、5)胸腺内におけるTリンパ球分化と胸腺上皮細胞との関係等について研究を進めている。

1990年4月から1991年3月までの人事異動は次のとおりである。岸裕幸助手が10月4日スイス・バーゼル免疫学研究所より留学を終えて帰国。小森慎二助手はペンシルバニア大学病理学教室での留学を終えて1990年3月31日帰国し、4月1日より九大を退職し、兵庫医科大学産婦人科へ転出。北村大介助手は引き続き、ドイツ国ケルン大学遺伝子学研究所に留学中、中島学助手もフィラデルフィアのウイスター研究所に引き続き留学中である。

大学院生の原英夫君は1990年3月、カナダのトロント大学、オンタリオ癌研究所より帰国し、引き続き当部門で研究を続行。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に留学中、同じく大学院の宮越友子君はフランス・パスツール研究所に引き続き留学中である。従って1990年度の教室員は助手4名（うち2名は留学中）、大学院生8名（うち2名は留学中）と研究生6名である。

#### A. 免疫グロブリンH鎖遺伝子の転写調節機構の解析

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。

昨年度までに、ヒトH鎖遺伝子エンハンサー領域内に存在する二つのエレメント、E1およびHE2領域に結合し免疫グロブリン遺伝子の転写調節に重要な役割を果たしていると思われる二つの核蛋白、NF-EIとNF-HE2をヒトB-リンパ球より精製し、それぞれの部分的なアミ

ノ酸配列を決定した。本年はそれをもとに、二つの蛋白をコードするcDNAのクローニングを開始した。しかしながら、現在のところ、まだcDNAクローニングに成功していない。特に最近の研究から我々が見い出したHE2エレメントは、遺伝子のB細胞特異的発現のために重要なエンハンサーエレメントである事がわかり、そのcDNAおよび遺伝子を解析することは非常に重要である。一方、教室の王継揚助手らは、同じくヒトH鎖遺伝子エンハンサー領域内に全く新しいエンハンサー・エレメントであるE6を見い出した。このE6エレメントは、それ単独で遺伝子のB細胞特異的なポジティブ発現調節を行うと共に、非B-リンパ球細胞内ではサイレンサーとして作用する非常に興味あるエレメントである。E6に結合する核蛋白NF-E6についてcDNAクローニングを始めた。

## B. 組み換えDNA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-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<sub>H</sub>遺伝子をクローニングし、ヒトC<sub>H</sub>、C<sub>K</sub>遺伝子とそれぞれ結合し、マウス-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髄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倍以内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抗体、抗肺腺ガン特異抗体について、キメラ抗体の作製を試みた。また抗TNF抗体についてもキメラ抗体化を試みつつある。

### 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体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<sub>H</sub>, V<sub>L</sub>) 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<sub>H</sub>, V<sub>L</sub>のcDNAをキメラ抗体作製の際に用いたC<sub>H</sub>領域遺伝子、C<sub>L</sub>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C<sub>H</sub>領域遺伝子、C<sub>L</sub>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。さらに、このような方法により、リコンビナント・ヒト・ガンマグロブリン製剤の作製も可能になると考えられ

る。我々はこれまでに、このような目的に用い得るベクターの開発を行うと共に、ヒト  $V_K V_H$  レパートリーを出来るだけ広くカバーし増巾出来るプライマーの検討、合成を行った。

### C. ヒトのリウマチ因子 (RF) の遺伝子の単離と解析

臨床免疫部門の江崎一子氏と共同し、リウマチ因子産生ハイブリドーマ (江崎氏らが作製した) より、RFをコードする遺伝子をクローニングし、その塩基配列、アミノ酸配列を解析した。

### D. IgEクラススイッチの調節機構

免疫グロブリンH鎖遺伝子のクラススイッチの調節機構とくに遺伝子発現調節機構とクラススイッチの関係について解析するために、1)  $\mu \rightarrow \epsilon$  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、2) 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について、sterile  $\epsilon$ -transcriptsの産生のメカニズムを中心に解析する、3) IgEへのクラススイッチを強く促進する因子の同定と解析、について研究を開始した。

### E. 癌抗原に特異的に反応するヒトT細胞のクローン化.

我々は、メラノーマ転移性リンパ節よりリンパ球を分離し様々なサイトカインを用い癌特異的の反応性免疫細胞のクローン化を試みた。現在まで、十数人のメラノーマ転移性リンパ節よりリンパ球及び癌細胞を分離後、共に、in vitroにて培養し、経時的にそれらの細胞障害性、細胞表面抗原を検索した。その結果、1) IL-4はIL-2によるT細胞増殖を促進し、NK細胞の増殖及びLAK活性誘導を抑制する。2) IL-6はIL-2依存性NK細胞増殖を抑制する。3) TNF $\alpha$ はIL-2によるLAK活性誘導を促進する。ことが明らかになった。さらに、同一坦癌患者のメラノーマ転移性リンパ節より十数種類のCD8<sup>+</sup>クローンを樹立しているが、それらのすべてのクローンはCD3<sup>+</sup>、CD4<sup>-</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD16<sup>-</sup>、CD56<sup>-</sup>、TcR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>、CD45RA<sup>-</sup>、CD11b<sup>-</sup>、の細胞表面抗原を有しており、明らかにT細胞系由来であることを示している。これらの細胞障害特異性を自己及び非自己メラノーマ細胞、K562、Daudi細胞で検索したところ、それぞれE/T比20対1で60-70%、<1%、<2%及び<1%と自己メラノーマ細胞特異的に細胞障害活性を示した。さらに、単クローン抗体による阻害試験では抗HLA-class I、CD3、とCD8にて90%以上の阻害を、抗HLA-Class II、CD4では数%以下の阻害しか示さず、これらがTcRを介して自己メラノーマ細胞上の抗原 (癌特異抗原?) を主要組織抗原と共に認識していることが示唆された。また抗細胞間接着分子抗体 (LFA-1、LFA-2、LFA-3、ICAM-1) による阻害試験ではそれぞれ様々な阻害効果を示した。さらに一部のCD8<sup>+</sup>クローンをIL-2と様々なサイトカインで10日間以上培養し、その細胞障害活性の変化を調べたところ 1) その特異性、障害活性には変化は認められなかった。特に、初期培養で認められたIL-1やTNF $\alpha$ による非

特異的細胞障害活性の誘導は認められず、それらによって非特異的細胞障害活性を誘導されるリンパ球の亜集団が異なる事が示唆された。

2) IL-2 のみの培養では細胞の増殖率が他と比べて著しく低かった。

また、他の坦癌患者のメラノーマ転移性リンパ節よりCD4<sup>+</sup>クローンを樹立することにも成功しており、現在上記同一坦癌患者のメラノーマ転移性リンパ節よりCD4<sup>+</sup>クローンの樹立を試みている。

今後の方針としては、これら樹立されたクローンのTcRの解析、in vivoでの抗腫瘍活性及びCD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>クローン間の相互作用を検討していく予定である。さらに、遺伝子工学的手法を用いて、これらのクローンが認識する抗原の解析も試みたいと思っている。

## F. 未熟胸腺細胞における $\beta$ T細胞抗原受容体(TCR)の発現

胸腺細胞の分化過程において、まずTCR $\beta$ 鎖の再構成が起こり細胞質内にTCR $\beta$ 鎖蛋白質が産生される。次にTCR $\alpha$ 鎖の遺伝子再構成が起こり、TCR $\alpha$ 鎖蛋白質が産生され、細胞表面上に $\alpha\beta$ TCRが発現する。最近、Harald von Boehmer (Basel Institute for Immunology) らとの共同研究により、再構成したTCR $\beta$ 鎖遺伝子を導入したトランスジェニックマウス ( $\beta$ TCRトランスジェニックマウス) を用いて、未熟なCD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>胸腺細胞上へのTCR $\beta$ 鎖の発現を検討した。 $\beta$ TCRトランスジェニックマウスの全ての胸腺細胞表面には導入したTCR $\beta$ 鎖が発現していた。このマウスのCD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>胸腺細胞上にも導入したTCR $\beta$ 鎖が発現していた。未熟CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>胸腺細胞上には通常TCRが発現していない。そこで、このTCR $\beta$ 鎖がTCR $\alpha$ 鎖と結合しているか否かをTCR $\alpha$ 鎖に対する抗体を用いた免疫沈降法を用いて調べたところ、TCR $\alpha$ 鎖と結合せずに細胞表面に発現していることが示された。さらにTCR $\gamma$ 鎖、TCR $\delta$ 鎖およびCD3に対する抗体を用いた免疫沈降法および細胞表面染色により、このTCR $\beta$ 鎖はTCR $\gamma$ 鎖、TCR $\delta$ 鎖とも結合しておらず、CD3複合体とも結合していないことが示された。通常TCRはCD3複合体の非存在下では細胞表面には発現できないので、このTCR $\beta$ 鎖も未知のCD3様の分子といっしょに発現している可能性がある。現在、このTCR $\beta$ 鎖の発現様式をさらに詳しく調べるために、様々な分化過程の胸腺細胞腫を形成することが知られているSV40T抗原遺伝子のトランスジェニックマウスと上記 $\beta$ TCRトランスジェニックマウスを掛け合わせることにより、この分化過程に相当する胸腺細胞腫を確立しようと試みている。

## 業績目録

### 原著論文 (1990年4月—1991年3月)

1. Nakashima, M., Mori, K., Maeda, K., Kishi, H., Hirota, K., Kawabuchi, M., and Watanabe, T. 1990.  
Selective elimination of double positive immature thymocytes by a thymic epithelial cell line.  
*Eur. J. Immunology*, 20:47-52.
2. Koga, H., Kanda, H., Nakashima, M., Watanabe, Y., Endo, K., and Watanabe, T. 1990.  
Mouse-human chimeric monoclonal antibody to carcinoembryonic antigen (CEA); In vitro and in vivo activities.  
*Hybridoma*, 9: 43-56.
3. Kaneko, H., Nakashima, M., Kudo, A., Iwakiri, R., Harada, M., and Watanabe, T. 1990.  
Selective IgG deficiency with transcriptional disorder of gamma switching region gene and IL4 gene. *International Immunology*, 2:661-668.
4. Saga, T., Endo, K., Koizumi, M., Kawamura, Y., Watanabe, Y., Konishi, J., Veda, R., Nishimura, Y., and Watanabe, T. 1990.  
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.
5. Ezaki, I., Kaneda, H., Sakai, K., Fukui, N., Singu, M., Nobunaga, M., and Watanabe, T., 1991.  
Restricted diversity of the variable region nucleotide sequences of the heavy and light chains of a human rheumatoid factor. *Arthritis and Rheumatism* 34:343-350.
6. Mori, K., Hirata, K., Kawabuchi, M., Nakashima, M., and Watanabe, T. 1991.  
A novel MHC class I-related molecule expressed on mouse thymic stroma cells and mature lymphocytes.  
*Immunogenetics* 33:101-107.
7. Wang, J., Oketani, M., and Watanabe, T. 1991.  
Positive and negative regulation of Ig gene expression by a novel B cell specific enhancer element.  
*Mol. Cell. Biol.* 11:75-83.
8. Mori, R., Minagawa, H., Sakuma, S., Mohri, S., and Watanabe, T. 1991.

Herpes simplex virus type I infection in mice with severe combined immunodeficiency (SCID).

Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infection.

9. Nakashima, M., Nishimura, Y., and Watanabe, T. 1991.

Recombinant human-mouse chimeric monoclonal antibody specific for human adenocarcinoma associated antigen.

Hybridoma 10:1-9.

10. Hirata, K., Mori, K., Nakamura, K., Kawabuchi, M., and Watanabe, T. 1991.

Morphological analysis of the cellular interaction between thymocytes and a thymic stromal cell line (TEL-2).

The Anatomical Record 230 : 524-530.

11. Kishi, H., Borgulya, P., Scott, B., Karjalainen, K., Traunecker, A., Kaufman, J. and von Boehmer, H. 1991.

Surface expression of the  $\beta$  T cell receptor (TCR) chain in the absence of other TCR or CD 3 proteins on immature T cells.

EMBO J. 10, 93-100.