

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，癌の診断と免疫学的治療法についての研究を進めている．現在の研究分野は，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) 胸腺内における T リンパ球分化と胸腺上皮細胞との関係及び初期胸腺細胞上の T 細胞レセプターの構造と機能，ポジティブセレクション，ネガティブセレクションについての *in vitro* モデルの確立，5) 遺伝子標的法（ジーンターゲッティング）の免疫学，血液学への応用．これには a) 免疫グロブリン遺伝子及びその関連遺伝子のジーンターゲッティングによって得られた B 細胞変異マウスの解析，b) 造血系に特異的に発現する遺伝子のジーンターゲッティングとその変異マウスの解析を行っている，6) ヒト腫瘍浸潤組織及び転移リンパ節からの自家腫瘍特異的ヒト T リンパ球の大量培養法，それらを用いた新たな免疫療法の開発及び癌ワクチン作製の試み，等について鋭意研究を進めている．

1991年4月より1992年3月までの人事異動が次とおりである．北村大介助手が6月5日ドイツ国ケルン大学遺伝学研究所より留学を終えて帰国．中島学助手も1月31日に米国フィラデルフィアのウイスター研究所より留学を終えて帰国．なお，北村大介助手が，9月3日から11月7日までケルン大学に再び赴き，研究を行った．また，中島学助手も7月1日より9月30日までウイスター研究所に再度赴き，共同研究を行った．王継揚助手は，1991年9月27日に米国アラバマ大学バーミングハム校免疫学教室（Max Cooper 教授）へ留学した．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での留学を終えて，9月30日帰国した．同じく大学院生の宮越友子君は，フランス，パスツール研究所に引き続き留学中である．

1990年6月より1991年4月まで，米国アラバマ大学バーミングハム校医学部助教授の Peter D. Burrows 博士が，日本学術振興会の援助により，10カ月間我々の教室で〔ヒト B 細胞における遺伝子発現制御〕に関する研究を行った．原英夫君は大学院終了後，神経内科にもどったが，引き続き当研究室で共同研究を継続して行っている．

1991年6月より大阪大学医学部大学院生，谷内一郎君が，特別研究生として2年間の予定で当部門で研究を始めた．1992年1月現在の教室員は，助手3名，大学院生5名，特別研究生1名，研究生3名である．

A. ヒト免疫グロブリン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が、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発表した。

特に、我々が同定した二つのエレメント、HE2(μ B)と E6、は、それぞれ単独で B 細胞特異的なエンハンサー活性が示された。HE2(μ B)はマウス H 鎖遺伝子エンハンサーにおいても、オクタマー配列と共に重要であるとされているが、マウスの μ B は単独で B 細胞特異的なエンハンサー活性を示さないのに対して、ヒト HE2(μ B)は、単独で B 細胞特異的なエンハンサー活性を有することが、*in vitro* 及び *in vivo*（トランスジェニックマウス）において示すことができた。現在、HE2に結合するトランスアクティングファクターの遺伝子のクローニングを行っている。

一方、E6はヒト抗体 H 鎖遺伝子エンハンサー下流領域に新たに我々が見いだしたエレメントであり、やはり単独で B 細胞特異的な活性を有する。E6結合タンパクをコードする遺伝子についても現在、クローニング中である。

B. 組換え DNA 法によるヒト型モノクローナル抗体、ヒト・ガンマグロブリン製剤の作製と応用

a. マウスーヒトキメラ抗体の作製と応用

ヒト腫瘍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_L 遺伝子をクローニングし、ヒト C_H 、 C_L 遺伝子とそれぞれ結合し、マウスーヒトキメラ抗体遺伝子を作製した。ヒト H 鎖エンハンサーをキメラ遺伝子発現用の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腫瘍抗原と結合し、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、マウス抗体の 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。

このようにして抗 CEA、抗 CA-125抗体、抗肺腺ガン特異抗体などについて、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法を用いることにより、ヒトリンパ球中に存在する抗体産生細胞から、その細胞が産生している抗体をコードする遺伝子（cDNAまたはゲノム遺伝子）を増巾することが可能である。すなわち、PCR法を用いること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、単離することができる。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 C_H 領域遺伝子、 C_L 領域遺伝子に結合すること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ことができる。我々はこの目的に適した C_H 領域遺伝子、 C_L 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法を組み合わせるにより、ハイブリドーマ法を用いずに組換え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ることのできるベクターの開発を行うとともに、ヒト V_H , V_L レパートリーを出来るだけ広くカバーし増巾できるプライマーを検討し、その合成を行った。

C. IgE クラススイッチの調節機構

I型アレルギー病の原因となるIgE抗体の産生の調節を、IgEクラススイッチの調節機構から解析し、IgE抗体産生を制御する方法を見出し、アレルギー病の治療に結び付く研究を行うことを目的とする。これまでに得られた結果は次の通りである。

(1) ヒトB-リンパ芽球細胞株DND-39(IgM, κ)をIL4で刺激すると $C\epsilon$ germline transcriptsの産生が誘導される。この誘導はボークウィードマイトゲンで刺激したT細胞の培養上清をIL4と共に加えると増強されたが、この増強因子はこれまでに、知られているサイトカインとは異なった新たなサイトカインの作用によることが示唆された。一方、 $TGF\beta$ は $C\epsilon$ germline transcriptsの産生を抑制した。(2) $C\epsilon$ 遺伝子上流のイントロン内にIL4刺激に反応し、 $C\epsilon$ の転写を誘導する活性をもつIL4-responsive elementを同定した。このDNAエレメントはこれまでに報告されていない新たなエレメントである。現在その性状について解析を行っている。

この細胞系を用いることにより、IgEクラスへのクラススイッチの分子機構を解明し、IgE産生を人為的に制御する方法を開発する。これにより、アレルギー病のコントロールについての研究を展開する予定である。

D. 癌の効果的免疫学的治療法の開発

生体の癌細胞排除機構において、様々な免疫細胞群が相互に作用し合っている事が予測されている。我々は、特に腫瘍浸潤性のT細胞群に注目し、癌細胞排除機構におけるこれらT細胞群の相互作用を解析し、より効果的な癌免疫学的治療法を開発しようとしている。本年は、癌

組織に浸潤しているT細胞をin vitroで効率良く増殖させる培養系の開発を行い、すでに、メラノーマ転移性リンパ節より、自己癌細胞特異的細胞障害性T細胞群を特異的に増殖させる培養系を確立し、十数個のクローンを樹立している。これらすべてのクローンは、CD3⁺、CD8⁺、TCR $\alpha\beta$ ⁺、のCTLで、長期培養にてもその細胞障害活性の癌細胞特異性及び効率に変化がないことを確認している。現在、我々はこれらのクローンのin vivoにおける抗腫瘍活性を検討している。さらに、これらCD8⁺CTLが認識している抗原を解明することは、癌細胞排除機構の解析、癌のワクチン療法の開発において重要なことである。

TCRがHLA A class Iと抗原ペプチドを同時に認識することに注目し、自己メラノーマ細胞株表面より、HLA class I複合体に結合している抗原ペプチドを分離し、HPLCにて分画した後、すでに確立されている自己リンパ球株を用いた実験系を利用して、これらCTL株の認識している抗原ペプチドの分離・精製を試みている。また、我々は九州大学医学部産婦人科および皮膚科との共同研究を開始しており、多くの種類の癌組織よりさらに効果的に自己癌細胞特異的反応性T細胞を増殖させる培養系を確立し、これら癌特異的反応性T細胞の癌治療への臨床応用を探索している。

E. 未熟胸腺細胞表面に発現する β T細胞抗原受容体(TCR)の構造および機能の解析

胸腺細胞の分化において、まずTCR β 鎖遺伝子の再構成が起こり、次にTCR α 鎖遺伝子の再構成が起こる。この段階的遺伝子再構成および胸腺細胞の分化におけるTCR β 鎖の果たす役割は明かにされていない。最近我々は、TCR β 鎖遺伝子を導入した β TCRトランスジェニックマウスの未熟胸腺細胞上に β TCRがCD3複合体を伴わずに発現していることを見いだした。この未熟胸腺細胞表面上へのTCR β 鎖の発現の胸腺細胞の分化における意義を調べるために、我々は、 β TCRトランスジェニックマウスとSV40T抗原遺伝子のトランスジェニックマウスとを掛け合わせるにより、様々な胸腺細胞腫を確立した。そのうち一つのクローンは、細胞表面抗原の抗体による染色および免疫沈降による解析により β TCRは発現しているがCD3 ϵ 、 ζ 鎖は発現していないことがわかった。この細胞に再構成した α TCR遺伝子を導入してやることにより、細胞表面に α TCRおよびCD3複合体が発現され、この細胞は α TCR遺伝子が再構成を起こす前の段階の細胞である可能性が示唆された。通常 $\alpha\beta$ TCRはCD3複合体を伴わずに発現することはなく、現在、このCD3複合体を伴わずに細胞表面に発現する β TCR複合体の構造および機能を解析しつつある。

F. 胸腺ストローマ細胞の胸腺細胞の分化に果たす役割のin vitroにおける解析

胸腺ストローマ細胞の胸腺細胞の分化に果たす役割を解析するために、マウス胸腺よりいくつかのストローマ細胞株を確立し、 $\alpha\beta$ TCR遺伝子を導入した $\alpha\beta$ TCRトランスジェニックマウスを用いてその機能を解析している。 $\alpha\beta$ TCRトランスジェニックマウスのほとんどの

CD4+8+胸腺細胞上にはトランスジェニックの $\alpha\beta$ TCRが発現しており、ポジティブセクション、ネガティブセクションによる細胞集団の動きをCD4、CD8およびトランスジェニックの $\alpha\beta$ TCRに対する抗体を用いることにより目で見える形で解析することができる。現在、トランスジェニックマウスの胸腺細胞を胸腺ストローマ細胞上で培養し、in vitroにおいてストローマ細胞が、ポジティブセクションあるいはネガティブセクションを誘導するかを検討している。

G. ジーンターゲティング法（遺伝子標的法）による遺伝子変異マウスの作製と、それを用いたB細胞分化の分子レベルにおける解析

Bリンパ球の分化に従って、免疫グロブリン（Ig）遺伝子H鎖及びL鎖は再構成が生ずる。この再構成は、まずH鎖のD_H-J、次にV_H-D_HJ_H、最後V_L-J_Lという順序で起こる。また、1個の細胞においては、2つの染色体の上で一方のH鎖遺伝子だけが発現型と成り得る（H鎖遺伝子の対立遺伝子排除）。これまでの研究によると、発現V_HD_HJ_H遺伝子から産生された膜型 μ 鎖が他方のH鎖遺伝子の再構成を抑制し、また、L鎖の再構成を促進することが示唆されている。以上の現象はプレB細胞の段階で起こるが、プレB細胞に特異的に発現しているIgL鎖様遺伝子であるVpreBと $\lambda 5$ は、その蛋白が膜型 μ 鎖と結合して、Igレセプター様複合体を形成し得ることが最近示された。骨髓内未分化B細胞におけるIg遺伝子構成の制御にこの膜型 μ 鎖複合体がどのような役割を果たしているかを個体レベルで調べるために、我々はジーンターゲティング法を用いて2種類の遺伝子欠損マウスを作製した。1つは μ 鎖遺伝子膜型エクソンが破壊され膜型 μ 鎖を欠損する μ MTマウス、もう1つは $\lambda 5$ 遺伝子の破壊された $\lambda 5$ Tマウスである。 μ MTマウスの解析から、膜 μ タンパクの初期B細胞表面での発現が、H鎖遺伝子の対立遺伝子排除の機構に必須の要因であることを明かにした。さらに、我々は、 μ MT及び $\lambda 5$ T変異マウスの各リンパ球系細胞の免疫学的解析から、 μ MT及び $\lambda 5$ T変異により骨髓内プレB細胞段階においてB細胞分化が阻害されていることを明かにした。このため、 μ MTホモ接合体マウスではB細胞が欠損している。しかし、同マウスの骨髓細胞を用いた解析で、少なくとも一部のプレB細胞ではL鎖の再構成が生じており、また $\lambda 5$ Tホモ接合体マウスには極少数の正常 μ 鎖を持つB細胞が存在する。このため、従来考えられてきた膜型 μ 鎖複合体からのシグナルがL鎖の再構成を誘導するという機構が存在するかどうかは不明である。また、 μ MT変異マウスと異なり、 $\lambda 5$ Tホモ接合体マウスが有する少数のB細胞においては対立遺伝子排除は正常に起こっており、 $\lambda 5$ 分子がこの機構に関与するかどうかを知るためにはプレB細胞株を樹立し、クローンレベルで解析することが重要であると思われる。

H. 神経系疾患の解析

神経内科との共同研究で次のような研究を行っている。

(1) HTLV-I associated myelopathy (HAM) HTLV-I と T 細胞レセプター (TCR)

HTLV-1 感染による脊髄神経障害が報告されて以来、その発病因子の解明が精力的に行われている。キャリア 2000 人のうち、一人のみが発病する理由として、HLA の関与も報告されているが、意見の一致が得られていない。我々は、HAM 患者髄液中のリンパ球の存在に注目し、その T-リンパ球が発現している T 細胞レセプター (TCR) の V 領域の解析を行っている。HAM 患者髄液リンパ球や髄液より樹立した T 細胞株、および剖検例で脊髄内に浸潤している T 細胞の TCR を解析したところ、特異的な V α 遺伝子が発現されていることがわかった。V β は、有意差はなかった。患者髄液から確立した T 細胞のいくつかは、HTLV-1 の tax, gag のペプチドを認識して細胞障害性を示すことも判明した。今後は、HTLV-1 が神経組織に感染し、その感染細胞に対し、細胞障害性 T 細胞が作用しているのか、あるいは HTLV-1 と類似の抗原性を有している自己神経組織に対し、HTLV-1 抗原に感作された T 細胞が障害を起こすのかということを明らかにするために研究を行う。

(2) 重症筋無力症 (MG)

MG の治療として、胸腺摘出術が非常に有効である。また、胸腺内筋様細胞上にはアセチルコリン受容体が発現していることも知られている。我々は、アセチルコリン受容体に反応する胸腺内 T 細胞株を樹立し、その T 細胞レセプター (TCR) についてその V 領域遺伝子の解析を行っている。

(3) ニューロンの変性に関与する遺伝子 degenerins の cDNA クローニング

C.elegans のニューロンの変性を起こす遺伝子 deg-1 と mec-4 は、一種のファミリーを形成し、膜受容体構造を示している。これらの遺伝子はヒトのゲノム DNA とも cross-hybridize することもわかり、現在、ヒトおよびマウスの脳に特異的に発現している degenerins ファミリーに属する遺伝子の cDNA のクローニングを行っている。

原著

1. Ezaki, I., Kanda, H., Sakai, K., Fukui, N., Singu, 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.
2. Mori, K., Hirata, K., Kawabuchi, 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.
3. 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.

4. 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).

Immunology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infection.

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

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

Hybridoma 10 : 1-9.

6. Hirata, K., Mori, K., Nakashima, 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.

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

Surface expression of the β T cell receptor (TCR) chain in the absence of other TCR or CD3 proteins on immature T cells.

EMBO J. 10 : 93-100.

8. Ariyasu, T., Kimura, N., Kikuchi, M., Kohno, K., Sugamura, K., Watanabe, T. and Minowada, J. 1991.

Induced natural killer-like cytotoxic function in the TCR δ -1 positive human leukemic T cell line.

Leukemia 5 : 807-812.

9. Nakashima, M., Watanabe, T., Koprowski, H., Schuchter, L. and Steplewski, Z. 1992.

In vitro expansion of melanoma specific, HLA restricted CD8+ cytotoxic T lymphocytes.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (in press).

10. Okabe, T., Bauer, S.R. and Kudo, A., 1992.

Pre-B lymphocyte-specific transcriptional control of the mouse VpreB gene.

Eur.J.Immunol. 22 : 31-36.

11. Okabe, T., Watanabe, T. and Kudo, A. 1992.

- A pre-B and B cell specific DNA binding protein, EBB-1, which binds to the promoter of the VpreB1 gene.
Eur.J.Immunol. 22 : 37-43.
12. Kitamura, D., Rose, J., Kuhn, R. and Rajewsky, K. 1991.
A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin μ chain gene.
Nature 350 : 423-426.
13. Kitamura, D. and Rajewsky, K. 1992.
Targeted disruption of μ chain membrane exon causes loss of heavy chain allelic exclusion.
Nature 356 : 154-156.
14. Gu, H., Kitamura, D. and Rajewsky, K. 1991.
B cell development regulated by gene rearrangement; arrest of maturation by membrane-bound D μ protein and selection of D_H element reading frames.
Cell 65 : 47-54.
15. Borgulya, P., Kishi H., Muller, U., Kirberg, J. and H. von Boehmer, 1991.
Development of the CD4 and CD8 lineage of T cells ; instruction versus selection.
The EMBO J. 10 : 913-918.