

## 感染防御学部門

### Department of Molecular Immunology

当部門ではヒト及び動物における免疫応答機構を、分子レベル及び細胞レベルさらには個体レベルで解析することにより、免疫病の原因の解明と治療法の確立、癌の診断と治療法の開発、免疫系と神経系との関わり等について鋭意、研究を進めている。本年も昨年から引き続いて、(1) 遺伝子標的法 (ジーンターゲット) の応用による免疫細胞分化の解析、(2) 免疫細胞におけるシグナル伝達に関わる新しい分子の同定とその機能の解明、(3) 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 クラスへのクラススイッチングの調節機構の分子レベルでの解析、(4) 胸腺内 T リンパ球分化、特に初期未熟 T 細胞の分化機構についてのトランスジェニックマウスを用いた解析、(5) 自己免疫病の発症に関する分子生物学的解析、とりわけ新しい視点からの解析、(6) 癌の効果的免疫学的治療法の開発、子宮癌などのヒト癌抗原の同定、解析、その遺伝子の分離等について研究を進めた。

1993年度中の主な人事異動は次のとおりである。王継揚助手は、本年も引き続いてアラバマ大学バーミングハム校のマックス・クーパー教授のもとで研究を続行、森啓子助手は、フランス国ストラブルグのフランス国立中央科学研究所 (CNRS) マティス教授のもとで研究を行っている。大学院生は、園田顕三君、谷内一郎君の他に本年より、井上勲君、福田隆浩君、蘇東明君、鈴木康弘君が新たに加わってくれた。また研究生として赤司朋之君、小林隆志君、辛島正志君、森田美保子君が研究を行っている。徳島大学医学部大学院より前川洋一君が特別研究生として参加してくれている。さらに大学院を修了した後も我々の研究室で、原英夫君 (神経内科)、遠城寺宗近君 (第三内科)、岡部泰二郎君 (第三内科) が研究を続けてくれている。歓迎すべきことである。

#### A. 免疫細胞の分化と選択に関する分化レベルでの解析

B 細胞表面 sIgM あるいは T 細胞表面抗原受容体 (TCR) からのシグナルはそれぞれのリンパ球の分化、活性化、増殖あるいはアポトーシスを誘導し、それによって免疫反応の誘導あるいは調節を司る。しかし、そのシグナル伝達のメカニズムはまだよくわかっていない。抗原受容体の刺激直後に、受容体と会合する Lyn, Fyn, Blk, Lck 等の Src 型のチロシンキナーゼが活性化され、さらに多くの細胞内蛋白がチロシンリン酸化されることが見出され、これが上記のリンパ球反応を誘導するシグナルにおいて中心的な役割を担っていると考えられている。我々の単離した血球系細胞特異的に発現する遺伝子 HS1 の産物は Src 型チロシンキナーゼの SH2 ドメインと会合し、抗原受容体刺激直後にチロシンリン酸化される。HS1 蛋白は細胞質のみならず核にも存在し、刺激後リン酸化された HS1 蛋白は核に増加してくる。さらに HS1 蛋白は N 末

端側に DNA 結合ドメイン様構造を、C 末端側に多くのシグナル伝達分子が持つ SH3 ドメイン及び酸性  $\alpha$  ヘリックスを有することにより、細胞内シグナル伝達及び転写調節に関与することが示唆される。

WEHI231細胞は表面 IgM 刺激によりアポトーシスを起こす B 細胞株であるが、これに抵抗性の変異株では HS1 の発現量が非常に低いことがわかった。さらに、HS1 発現ベクターを導入し、HS1 高発現となった変異株では、表面 IgM 刺激によるアポトーシスが回復した。これより、表面 IgM からアポトーシスに至るシグナル伝達に HS1 は重要な役割を果たすことが示された。また、ジーンターゲティングにより作製した HS1 欠損マウスを調べたところ、抗 IgM 抗体腹腔内投与により表面 IgM を架橋すると正常腹腔内 B 細胞はアポトーシスにより死滅するが、HS1 欠損マウスの腹腔内 B 細胞はこれに対し抵抗性であった。さらに、このマウスとの交配により HS1 陰性となった雄抗原 (H-Y) 特異的 T 細胞受容体トランスジェニックマウスの雄では、胸腺における陰性選択、すなわち自己 (H-Y) 反応性胸腺 T 細胞の除去が不完全であった。以上より HS1 は、B 及び T 細胞のアポトーシスを誘導する抗原受容体からのシグナル伝達に、ひいては自己免疫を抑止する免疫系トランス機構に深く関与すると考えられた。

我々は現在、これらの細胞株や HS1 欠損マウスをさらに解析し、また、HS1 蛋白に結合する細胞内蛋白や DNA 塩基配列を同定することによって HS1 蛋白の機能や作用機序を探求している。

## B. bc12 遺伝子の組織特異的ノックアウトマウスの作製

Bc12 は様々な組織において細胞のアポトーシスを抑制する働きを持つ。免疫系においては、骨髄や胸腺、末梢リンパ組織において自己反応性クローン除去の際に働くものと思われる。これを調べるために、ジーンターゲティング法を用いて bd12 遺伝子を破壊した Bc12 欠損マウスは有用な系となるとおもわれるが、従来の方法で作製された生殖細胞からの bd12 欠損マウスは多嚢胞性腎症により多くは早期に死亡し、またリンパ球も分化初期における生存率が低下するので、上記の目的、特に末梢リンパ組織における自己反応性クローンのアポトーシスについての解析には適当でない。そこで、我々は大腸菌の組換え酵素 Cre とその標的 DNA 配列 lox-P を用いて成熟 B 細胞特異的な bc12 遺伝子ノックアウトを行っている。すなわち、bc12 エクソンを lox-P で囲んだ形のジーンターゲティングベクターを構築し、ES 細胞を用いてジーンターゲティングを行い、この ES 細胞変異ゲノム由来のマウスを作製する。一方、成熟 B 細胞特異的に発現する Cre のトランスジェニックマウスを作製し、先の変異マウスと交配する。このマウスでは成熟 B 細胞のみで bc12 遺伝子の組換え除去がおり、その他の組織の bc12 遺伝子は正常に機能することが期待される。このマウスを解析して、上記の目的を達成したい。

### C. 免疫グロブリンH鎖遺伝子のクラススイッチの分子機構

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，特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，IL4によるIgE産生系を用いて解析した．我々はIL4刺激と抗CD40抗体によりIgEクラススイッチ反応が起こるヒトB細胞株を見出した．これを用いIL4刺激によってC $\epsilon$ 遺伝子の転写を誘導するDNAシス・エレメントを同定することに成功した．また，このDNAエレメントに結合する核タンパクがIL4刺激によってヒトB細胞内に誘導されることを示した．

### D. 組換えDNA法によるヒトマウスキメラ型モノクローナル抗体の作製と応用

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VH遺伝子をクローニングし，ヒトCH,Ck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，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．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(VH, VL) DNAを増巾し単離することが可能である．このようにして得たVH, VL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．我々はこの目的に応じたCH領域遺伝子，CL領域遺伝子を予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法を組み合わせることにより，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であることを示した．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であることを示した．

### E. 未熟胸腺細胞表面に発現する $\beta$ T細胞抗原受容体( $\beta$ TCR)の構造及び機能の解析

胸腺細胞の分化の過程において $\alpha$ TCRを伴わない $\beta$ TCRの発現がallelic exclusionやCD4-8-からCD4+8+細胞への分化に重要な役割を果たしていることが，トランスジェニックマウス遺伝子欠損マウスなどを用いた研究から明らかになってきた．以前，我々は， $\beta$ TCRが $\alpha$ TCRを伴わずに未熟胸腺細胞表面に発現することを見出した．このような $\alpha$ TCRを伴わずに発現する $\beta$ TCRの構造及び機能を明らかにするために様々な胸腺細胞株を樹立し，解析した．

その内のひとつである LSB11-1細胞は、細胞表面に $\beta$  TCRを発現しているが、 $\alpha$  TCRは発現していない。LSB11-1細胞上の、 $\beta$  TCRの少なくとも一部は glycosyl phosphatidylinositol (GP1) に結合していることがわかった。通常 $\alpha\beta$  TCRを形成している $\beta$  TCRは膜ドメインを介して細胞膜に結合しており、GPI結合型 $\beta$  TCRが胸腺細胞の分化においてどのように役割を果たしているのには興味ある問題である。

## F. 未熟胸腺細胞上の発現する IMT-1抗原の解析

我々は、マウス未熟胸腺細胞株をラットに免疫することにより未熟胸腺細胞上の抗原を認識する IMT-1モノクローナル抗体を作製した。IMT-1抗原は少なくとも C57BL/6マウス及び BALB/Cマウスの CD4-8-及び CD4+8+胸腺細胞の一部に発現している。しかし、CD4+8-あるいは CD4-8+ 成熟胸腺細胞及び末梢 Tリンパ球には発現していない。また、IMT-1抗原は CD3+の胸腺細胞には発現しておらず CD3-の胸腺細胞の一部に発現していた。現在、IMT-1抗原の同定及び胸腺細胞の分化における役割を解析しつつある。

## G. 癌の効果的な免疫学的治療法の開発

### a. 癌組織浸潤性 T細胞 (TIL) の効率的な培養法の確立と応用

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ことが予測されている。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。すでに我々は、癌組織に浸潤している T細胞を *in vitro* で効率よく増殖させる培養系を開発し、ヒト・メラノーマ転移性リンパ節より自己癌細胞特異的細胞傷害性 T細胞 (CTL) クローン (CD3+, CD4-, CD8+, CD11b-, CD56-, TCR  $\alpha/\beta$ ) を数多く樹立しており、長期培養にてもその細胞傷害特異性及び効率に変化がないことを確認している。さらに、これらの自己癌細胞特異的細胞障害性 T細胞のマウス移植自家癌に対する生体内における癌排除効果を検定した。これら CTL は外来性の IL-2 に依存して癌細胞を効率よく排除することが確認された。以上のことは IL-2 産生性の癌細胞特異的 Tヘルパー細胞 (Th) を同時に投与することで、癌局所での CTL による癌細胞排除をより効果的にしてくれるものと予想される。現在、CD4陽性 Tヘルパー細胞クローンの樹立を行っている。

### b. 末梢血リンパ球からの CTL 誘導の効率的な方法の確立

癌患者より樹立された自家癌細胞株に対して自家末梢血リンパ球より自家癌細胞特異的な CTL や Th 細胞を *ex vivo* にて誘導することが出来れば癌免疫療法ばかりではなく免疫系における抗原特異性の獲得における抗原提示細胞-T細胞間相互作用のメカニズムの解明にも貢献するものと思われる。現在、自家癌細胞より分離された HLA-class I 結合性ペプチドを免疫原と

して、サイトカインカクテルを用いて自家末梢血リンパ球より自家癌細胞特異的 CTL 細胞の誘導を検討しており、IL-2, IL-4, GM-CSF を組み合わせることにより HLA-class I 抗体にて阻害される自家癌細胞傷害活性を有する T 細胞集団の誘導に成功している。今後、このような T 細胞集団の解析及び T 細胞のクローニングを試みると共に更に効率よく誘導／増殖させる培養系の開発を行い、癌抗原ペプチドの単離や抗原提示細胞-T 細胞間相互作用のメカニズムの解明を試みる。

#### c. 癌抗原ペプチドの同定・解析

癌細胞特異的 CTL 細胞が認識している抗原を解明することは、癌のワクチン療法の開発において重要なことである。

CTL が抗原を認識するとき TCR が HLA-class I とそれに結合している抗原ペプチドを認識することを利用して、標的細胞である自家癌細胞株より 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、すでに樹立している自家腫瘍特異的 CTL 細胞株を用いた実験系を利用して、これら CTL 株の認識する抗原ペプチドの分離・精製を試みている。

#### d. 癌関連抗原に対するモノクローナル抗体の作成と解析

癌の診断、免疫学的及び経過観察等において、癌抗原特異的なモノクローナル抗体は、相乗的、補助的な役割を担うことが期待される。我々は、子宮頸部腺癌細胞株 (SiSo) を免疫原として用い、IgM 型マウスモノクローナル抗体 (22-1-1) を作製した。この抗体の認識抗原 (22-1-1 抗原) は主として細胞質内に分布し一部細胞表面に存在しており、細胞外にも分泌されている。分泌型の 22-1-1 抗原はゲル濾過にて 600kDa に主要バンドが認められ、さらに他の分子 (約 130kDa) が共沈しており複数の分子が会合している可能性が考えられている。免疫組織染色法にて 22-1-1 抗原は子宮頸部腺癌以外にも子宮頸部扁平上皮癌、卵巣癌、胃癌、大腸癌等にも高率 (70-80% 陽性率) に発現しており、正常組織では腺上皮細胞のみが染色性を有していた。このように 22-1-1 抗原は広く癌組織に発現しておりその機能に興味を持たれる。現在、抗原の機能解析を目的として遺伝子の単離を試み、さらに子宮頸部腺癌患者の腔分泌液中に 22-1-1 抗原が検出されているので癌診断への応用も検討している。

### H. HTLV-I 関連脊髄症 (HAM/TSP) の発症機構の利用

HTLV-I 関連脊髄症 (HAM/TSP) は、日本の九州、南太平洋、カリブ海、アフリカなどの地域に多発する HTLV-I ウイルス感染による脱髄性神経疾患である。これまで我々は、HTLV-I 関連脊髄症 (HAM/TSP) 発症のメカニズムの解明のため、次の点について検索を行った。

(1) 中枢神経系、特に脊髄組織のどの種類の細胞に HTLV-I が感染しているか。(2) 脊髄浸潤

T細胞は、どのような機序で脱髄を起こしてくるのか。

HAM/TSP患者脊髄組織におけるHTLV-IプロウイルスDNAの局在を我々が考案した鋭敏なtwo step PCR in situ hybridization法を用いて丹念に調べたところ、浸潤Tリンパ球の核のみにHTLV-IプロウイルスDNAが認められたが、神経細胞やグリア系細胞及びミクログリアへの感染は全く認められなかった。以上より、HTLV-Iウイルスによる直接的な神経細胞の傷害やHTLV-I感染神経系細胞に対する免疫反応、感染したミクログリアからのリンフォカインの放出による脱髄などの発症仮説は、否定的であると考えられた。HAM/TSP患者脊髄組織に浸潤しているT細胞について、T細胞受容体(TCR) V $\beta$ 鎖の構造について解析を行った。その結果V $\beta$ -D $\beta$ -J $\beta$  CDR3領域に特徴的なアミノ酸配列が高度に保存されていることが認められた。それらは、多発性硬化症の脳脱髄巣浸潤T細胞V $\beta$ 鎖CDR3やラットのエリン塩基性蛋白(myelin basic protein, MBP)特異的T細胞クローンのV $\beta$ 鎖CDR3アミノ酸配列と一致した。これらの結果によりHAM/TSPにおける脱髄病変の原因として、実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)や多発性硬化症と同様の自己免疫的機序がその発症要因であることを明らかにした。

## 原著論文

1. Ichiki, T., Takahashi, W. and Watanabe, T. 1993.  
The effect of cytokines and mitogens on the induction of C $\epsilon$  germline transcripts in a human Burkitt lymphoma B cell line.  
Int. Immunol. 4, 747-754.
2. Moriyama, K., Mohri, S., Watanabe, T. and Mori, R. 1993.  
Latent infection of SCID mice with herpes simplex virus I and latent cutaneous lesions in pregnancy.  
Microbiol. Immunol. 36, 841-853.
3. Ichiki, T., Takahashi, W. and Watanabe, T. 1993.  
Regulation of the expression of human C $\epsilon$  germline transcript ; Identification of novel IL-4 responsive element.  
J. Immunol. 150, 5408-5417.
4. Nakashima, M., Watanabe, T., Koprowski, H., Schuchter, L., Steplewski, Z. 1993.  
In vitro expansion of melanoma specific, HLA restricted CD8+ cytotoxic T lymphocytes.  
Cell. Immunol. 155, 53-61.
5. Kobayashi, H., Sakagara, H., Saga, T., Hosono, M., Shirato, M., Kanda, H., Ishibashi, K., Watanabe, T., Endo, K., Ishiwata, I. and Konishi, J. 1993.  
A human/mouse chimeric monoclonal antibody against CA125 for radioimaging of

ovarian cancer.

Cancer Immunol. Immunother. 37, 143-149.

6. Yamanashi, Y., Okada, M., Senba, T., Yamori, T., Umemori, H., Tsunasawa, S., Toyoshima, K., Kitamura, D., Watanabe, T. and Yamamoto, T. 1993.  
Identification of HS1 protein as a major substrate of protein-tyrosine kinase(s) upon B-cell antigen receptor-mediated signaling.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90, 3631-3635.
7. Arakawa, F., Haruno, M., Kuroki, M., Kanda, H., Watanabe, T., Misumi, Y. and Matsuoka, Y. 1993.  
Construction and expression of two mouse-human chimeric antibodies with high specificity and affinity for carcinoembryonic antigen.  
Hybridoma 12, 365-379.
8. Ehlich, A., Schaal, S., Gu, H., Kitamura, D., Muller, W. and Rajewsky, K. 1993.  
Immunoglobulin heavy and light chain genes rearrange independently at early stages of B cell development.  
Cell 72, 695-704.
9. Takeda, S., Zou Y-R., Bluethmann, H., Kitamura, D., Muller, U. and Rajewsky, K. 1993.  
Deletion of the immunoglobulin  $\kappa$  chain intron enhancer abolishes  $\kappa$  chain gene rearrangement *in cis* but not  $\lambda$  chain gene rearrangement *in trans*.  
EMBO J. 12, 2329-2336.
10. Watanabe, T. 1993.  
HS1 protein and B cell antigen receptor mediated signaling.  
Mechanism of B cell neoplasia. pp207-212, (ed. F. Melchers and M. Potter.)
11. Ezaki, I., Singu, M., Hashimoto, M., Isayama, T., Tohmatsu, J., Kanda, H., Nobunaga, M., and Watanabe, T.  
Analysis of the gene encoding the variable regions of a human IgG rheumatoid factor.  
J. Rheumatol. (in press).
12. Nakasima, M., Watanabe, T., Koprowski, H., Schuchter, L. and Steplewski, Z.  
In vitro expansion of melanoma specific, HLA restricted CD8+ cytotoxic T lymphocytes.  
Cell Immunol. (in press).
13. Tada, H., Kurokawa, T., Suita, T., Watanabe, T. and Iwasa, S.  
Expression and characterization of a chimeric bispecific antibody against fibrin and against urokinase-type plasminogen activator.  
J. Biotechnol. (in press).

14. Hara,H., Morita,M., Iwaki,T., Hatae,T., Itoyama,Y., Kitamoto,T., Akizuki,S., Goto,I. and Watanabe,T.  
Detection of human T lymphotropic Virus Type I (HTLV-1) proviral DNA and analysis of T cell receptor V $\beta$  CDR3 sequences in spinal cord lesions of HTLV-I associated myelopathy/Tropicalspastic paraparesis.  
J. Exp. Med. (in press).
15. Benhamou,L.E., Watanabe,T., Kitamura,D., Cazenave and P-A. and Sarthou,P.  
Signaling properties of anti-immunoglobulin resistant variants of WEHI-231 B lymphoma cells.  
Eur. J. Immunol. (in press).
16. Enjoji,M., Iwaki,T., Nawata,H. and Watanabe,T.  
IgH intronic enhancer element HE2 ( $\mu$ B) functions as a cis-activator in choroid plexus cells at the cellular level as well as in transgenic mice.  
J. Neurochem. (in press).
17. Kanda,H., Mori,K., Koga,H., Taniguchi,K., Kobayashi,H., Sakahara,H., Konishi,J. Endo,K. and Watanabe,T.  
Construction and expression of chimeric antibodies by a simple replacement of heavy and light chain V genes into a single cassette vector.  
Hybridoma (in press).
18. Kukita,T., Kukita,A., Nagata,K., Maeda,H., Kurisu,K., Watanabe,T. and Iijima.  
A novel cell surface antigen expressed on rat osteoclast regulating the function of the calcitonin receptor.  
J. Immunol. (in press).
19. Sato,S., Katagiri,T., Takaki,S., Kikuchi,Y., Hitoshi,Y., Yonehara,S., Tsukada,S., Kitamura,D., Watanabe,T., Witte,O. and Takatsu,K.  
IL-5 receptor-mediated phosphorylation of SH2 /SH3-containing proteins and activation of Btk and Jak2 kinases.  
J. Exp. Med. (in press).