

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、免疫反応の制御機構、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(ジーンターゲットイング)の応用による免疫細胞の分化に関わる分子、遺伝子の解析、(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、特に HSI及び Lyn 遺伝子欠損マウスの作製と解析、(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細胞レベル及び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、とりわけ自己免疫性糖尿病マウス及びヒト HTLVⅠ関連自己免疫病についての解析、(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。

1994年度中の主な人事異動は次のとおりである。岸 助手が富山医科薬科大学免疫学講座助教授へ栄転した。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、フランス国ストラス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の研究を終えて帰国した。大学院生は、園田顕三君、谷内一郎君、井上 勲君、福田隆浩君、蘇 東明君、鈴木康弘君の他に新たに竹下弘道君、加藤 純君、松尾川裕君、呉 暁牧君、ヤスミン・バヌー君が加わってくれた。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。

A. 免疫細胞の分化と選択に関する分子レベルでの解析-ジーンターゲットイングマウスによる解析

B 細胞表面 sIgM あるいは T 細胞表面抗体原受容体(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み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及び Syk/ZAP70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、これらがリンパ球の抗原刺激後の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 HS 1 の産物は Src 型チロシンキナーゼの SH 2 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。HS 1 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 HS 1 蛋白は核に増加してくる。さらに HS 1 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 SH 3 ドメイン及び酸性 α 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 HS 1 の発現量が非常に低いことがわかった。さらに、HS 1 発現ベクターを導入し、HS 1 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 HS 1 は重要な役割を果たすことが示された。昨年度から、本年度にかけてジーンターゲティングにより HS 1 欠損マウスを作製して調べたところ、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、HS 1 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 HS 1 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制する免疫系トレ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受容体内蛋白や 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。さらに現在、Lyn キナーゼ遺伝子ノックアウトマウスを作製して解析をはじめた。

B. c-myc 遺伝子の組織特異的ノックアウトマウスの作製

我々は大腸菌の組換え酵素 Cre とその標的 DNA 配列 lox-P を用いて分化段階特異あるいは B 細胞特異的な c-myc 遺伝子ノックアウトを行っている。すなわち、c-myc 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 c-myc 遺伝子の組換え除去がおり、その他の組織の c-myc 遺伝子は正常に機能することが期待される。さらに本年度は、Cre 遺伝子にインターフェロンによって誘導される Mx プロモーターを結合した Mx-Cre トランスジェニックマウスを作製した。この系を用いれば、外からインターフェロンを投与した時点から以後に各組織で c-myc 遺伝子の欠損が生ずることが期待される。

C. ヒスタミン H1 受容体遺伝子のジーンターゲティング

ヒスタミンは最も古くから知られている活性アミンであり、末梢ではアレルギー反応をはじめとする生体防御反応に関与している。また、脳内にも大量のヒスタミン神経線維が存在することが知られており、脳内アミンとして日内リズム、睡眠、食欲などの制御に関与していると考えられている。ヒスタミン受容体には、H1、H2、H3の3種類が知られているが、特に上記の反応に深く関与するのはH1受容体と考えられている。我々はマウスのヒスタミン H1 受容体ゲノム遺伝子を単離し、これをもとに遺伝子標的用のターゲティングベクターを作成し、ES細胞に導入し、相同組換えにより H1 受容体遺伝子のみが neo 遺伝子に置き換わった変異 ES細胞を単離し、これをもとにヒスタミン H1 受容体遺伝子欠損マウスを作製した。今後は、このマウスのアレルギー反応、免疫反応、行動等を調べてゆく予定である。

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

我々の教室にいた神田ら（現在、栄研化学研究所）は、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 CH₁、C_k 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ることを示した。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行った。さらに、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となった。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を増巾し単離し、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。

E. 未熟胸腺細胞表面に発現する β T細胞抗原受容体（ β TCR）及び IMT-1 抗原の構造及び機能の解析

胸腺細胞の分化の過程において α TCR を伴わない β 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、 β TCR が α T

CR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 α TCRを伴わずに発現する β 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。さらに、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。昨年に引き続き、IMT-1抗原の同定及び胸腺細胞の分化における役割の解析を行っている。

F. 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 α/β)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傷害性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。

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た。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。

我々はヒト子宮頸癌細胞株を樹立し、それに特異的に反応する CTL を確立した。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 600 kDa に主要バンドが認められ、さらに他の分子 (約 130 kDa) 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。

G. HTLV-I 関連脊髄症 (HAM/TSP) の発症機構の解明

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、否定的であることを昨年度に報告した。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 β 鎖の構造について解析を行った。その結果V β -D β -J β 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浸潤T細胞V β 鎖CDR3やラットのミエリン塩基性蛋白(myelin basic protein, MBP) 特異的T細胞クローンのV β 鎖CDR3アミノ酸配列と一致した。

さらにHAM及びMS患者の末梢血リンパ球中にも高頻度で同様のV β 鎖CDRJを保有するT細胞が見出されることを報告した。

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。

業 績 論 文

原著論文

1. Tada,H. Kurokawa,T. Suita,T. Watanabe,T. Iwasa,S. 1994.
Expression and characterization of a chimeric bispecific antibody against fibrin and against urokinase-type plasminogen activator.
J Biotechnol, 33, 157-174.
2. Ezaki,I. Singu,M. Hashimoto,M. Isayama,T. Tohmatsu,J. Kanda,H. Nobunaga,M. and Watanabe,T. 1994.
Analysis of the gene encoding the variable regions of a human IgG rheumatoid factor.
J Rheumatol, 21, 2005-2010.
3. Hara,H. Morita,M. Iwaki,T. Hatae,T. Itoyama,Y. Kitamoto,T. Akizuki,S. Goto,I and Watanabe,T. 1994.
Detection of human T lymphotropic Virus Type I (HTLV-I) proviral DNA and analysis of T cell receptor V β CDR3 sequences in spinal cord lesions of HTLV-I associated myelopathy/Tropicalspastic paraparesis.
J Exp Med, 180, 831-839.
4. Benhamou,L.E., Watanabe,T., Kitamura,D., Cazenave,P-A. and Sarthou,P. 1994.
Signaling properties of anti-immunoglobulin resistant variants of WEHI-231 B lymphoma cells.
Eur J Immunol. 24, 1993-1999.
5. Nakashima,M., Janiszewska,M., Steplewski,Z., Watanabe,T., Schuchter,L., and Koprowski,

H. 1994.

Proliferation, phenotype and cytotoxicity of human lymphocytes isolated from lymph nodes invaded by melanoma cells.

Hybridoma, 13 : 241-246.

6. Kanda,H., Mori,K., Koga,H., Taniguchi,K., Kobayashi,H., Sakahara,H., Konishi,J., Endo,K. and Watanabe,T. 1994.

Construction and expression of chimeric antibodies by a simple replacement of heavy and light chain V genes into a single cassette vector.

Hybridoma, 13, 359-366.

7. Kukita,T., Kukita,A., Nagata,K., Maeda,H., Kurisu,K., Watanabe,T. and Iijima, 1994.

A novel cell surface antigen expressed on rat osteoclast regulating the function of the calcitonin receptor.

J Immunol. 153, 5265-5273.

8. Sato,S., Katagiri,T., Takaki,S., Kikuchi,Y., Hitoshi,Y., Yonehara,S., Tsukada,S., Kitamura,D., Watanabe,T., Witte,O. and Takatsu,K. 1994.

L-5 receptormediated phosphorylation of SH2/SH3-containing proteins and activation of Btk and Jak 2 kinases.

J Exp Med, 180, 2101-2111.

9. Haruno,M., Kuroki,M., Arakawa,F., Kanda,H., Watanabe,T. and Matsuoka,Y. 1994.

In vitro and in vivo characterization of two mouse-human chimeric antibodies with high specificity and affinity for carcinoembryonic antigen.

Antibody, Immunoconjugates, and Radiopharmaceuticals, 7, 133-148.