

感染防御学部門

Department of Molecular Immunology

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を解明し、さらにその破綻の結果生じる感染症、免疫病の解明と治療法の確立を目指す。

また、免疫学的方法による癌の診断と治療法の開発、および免疫系と関わりの深い神経系の分化と神経変性疾患についても鋭意、研究を進めている。すなわち、免疫系の発生分化、免疫応答機構の解明と、その異常によって生ずるアレルギー病、自己免疫病、免疫不全症の解明を、免疫学的、分子生物学的、発生工学的手法を駆使して行っている。

さらにこれらの疾病の治療法の開発に向けての研究を行っている。

また、癌の免疫療法についても新たな視点から研究の推進、特に免疫監視機構からの癌の逸脱 (Escape) 機構に関わる新しい分子の解明に向けて研究を行っている。免疫細胞の増殖、分化、細胞死の制御機構に関与する分子、遺伝子の同定および機能解析を通してその制御機構の解明を行っている。1997年(平成9年)度は、(1) 抗原受容体からシグナル伝達機構と遺伝子発現制御およびその異常によって発症する免疫病の解析と治療にむけての研究、(2) 免疫細胞初期分化の制御の分子機構、(3) B細胞活性化の終息機構、特にCD40リガンド刺激後におけるFas抗原の発現と活性化B細胞死の機構、(4) AIDSなど感染症に対する効果的な人工ヒト抗体の構築、(5) 癌抗原の分子生物学的遺伝子学的研究および癌の免疫監視機構からの逸脱に関わる分子の解明、(6) 遺伝子標的法(ジーンターゲティング)等の発生工学的手法の免疫学研究への応用、(7) 細胞死の制御に関与する分子の同定と作用機構および細胞分化におけるRbとその関連分子の機能の解析、等を主な研究テーマとして研究を進めた。

1997年(平成9年)1月から1998年(平成10年)3月までの主な人事異動は次のとおりである。平成9年4-10月の6ヶ月間、助手の王君が米国に短期留学し、遺伝子標的法を用いた遺伝子機能の解析について最新の方法について学んできた。助手の谷内一郎君は引き続き、ニューヨーク大学医学部のダン・リットマン教授の研究室で研究に従事している。大学院生では、平成9年3月に蘇東明君、鈴木康弘君の両君が研究を終了して学位取得の後、蘇東明君は米国の大学へポストドクとして、鈴木康弘君は熊本大学医学部にそれぞれ赴任した。平成10年3月には、竹下弘道君、加藤純君、勝田仁君、呉暁牧君、増田啓次君(歯学部大学院)の5名が大学院を修了し、学位を取得した。竹下弘道君、加藤純君はそれぞれの臨床教室にもどり、呉暁牧君は九州大学医学部神経内科にて臨床研究生となった。勝田仁君は非常勤研究員(ポストドク)として平成10年4月より当部門で引き続き研究を開始する予定である。増田啓次君は平成9年

10月より、米国アラバマ大学バーミングハム校のクーパー、カーニー両教授のもとに留学した。平成7年度からの大学院生である土井俊郎君、渡辺裕美さん、ヤスミン・バヌーさん、平成8年度からの山本真理さん、大屋和之君、平成9年度からの相川義勝君、越智博文君、ナスリン・バヌーさんが大学院生として研究を続けている。

また、徳永暁憲君が理学部修士課程大学院生として研究を開始し、昨年より引き続き第一内科研究生である近藤しおりさんが研究を行い、平成9年より小河一彦君が同じく第一内科研究生として研究を開始した。平成9年4月から、名古屋市立大学医学部分子医学研究所の細川雅人君が研究に加わった。

一方、大学院生の豊田雅樹君が臨床にもどり、秋田大学医学部眼科教室より国内留学研究員として研究に加わってくれていた小泉敏樹君が秋田大学医学部にもどった。研究生の赤司朋之君は研究を修了し平成9年5月より臨床にもどった。助教授の本山昇君、助手の中島学君、実験補助の古賀律子さんは引き続き研究を行っている。

A. B細胞の分化と選択に関与するシグナル伝達機構の解析

a. Lyn欠損マウスの解析

B細胞表面抗原受容体(BCR)からのシグナルはB細胞の分化、活性化、増殖あるいはアポトーシスを誘導に重要な役割を演じている。B細胞抗原受容体を抗原で刺激すると速やかに、受容体と会合するLyn, Fyn, Blk, 等のSrc型のチロシンキナーゼ及びSyk/ZAP70チロシンキナーゼあるいはBtk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。これらの分子が抗原刺激後の反応を誘導する初期シグナルとして中心的な役割を担っていると考えられている。我々は、Lynチロシンキナーゼ欠損マウスを遺伝子標的法を用いて確立し、これまでにsrc型チロシンキナーゼの免疫反応における役割を解析してきた。

我々が作製したLyn欠損マウスでは、末梢リンパ組織におけるB細胞の減少が観察され、Lyn欠損マウスのB細胞はBCR刺激による増殖反応が低下し、LPSに対する増殖反応も低下していた。また、可溶性CD40Lに対する増殖反応も低下が見られ、CD40刺激により誘導されるB細胞上のFasの発現が低下していた。Lyn欠損マウスのB細胞ではsIgM架橋によるHS1, Vav, PLC- γ 2等タンパクのチロシンリン酸化は全く認められず、B細胞ではLynがこれらの分子のチロシンリン酸化反応に必須である事が示された。Lyn欠損マウスでは、末梢リンパ組織におけるB細胞の減少に反して、各種クラスの血清Ig(特にIgM)は高値を示し、過令を経るにつれ、脾臓及びリンパ節の腫大が認められた。

組織学的検索により、Lyn欠損マウスの脾臓では形質細胞様のリンパ芽球化細胞の増殖が認められ、これが血清Ig高値、脾腫大の原因と考えられた。重要な事は、Lyn欠損マウスでは自己抗体である抗DNA抗体の産生が観察され、自己免疫病変である糸球体腎炎も認められたことである。この様に、Lyn欠損マウスでは、B細胞が正常に分化、増殖せず、しかしながら何

らかの原因により形質細胞様のリンパ芽球化細胞が大量に蓄積することが、自己免疫病変を呈する原因の一つと考えられた。

Lyn 欠損マウスの脾細胞は *in vitro* においても、大量の Ig を非刺激状態でも分泌しており、Lyn を介したシグナルが B 細胞の細胞死の制御および抗体産生細胞への分化に深く関わっていることが示唆された。また、Lyn 欠損マウスで見られる糸球体腎炎は、ヒトの自己免疫病である SLE で見られる糸球体腎炎と組織学上類似していることから、SLE の原因の一つとして Lyn の異常が関与するののかといった問題も重要な課題である。血清 IgM の高値と形質細胞の増加は、モスイートン (me/me) マウスや CD22 ノックアウトマウスにも見られる現象でもある。me/me マウスは、チロシンホスファターゼの一つである SHP1 (PTP1C) の異常がその原因であり、また CD22 分子には SHP1 が会合する。SHP1 は sIgM からのシグナルを負に制御すると考えられているが、Lyn が SHP1 (PTP1C) などのチロシンホスファターゼの活性化と受容体への会合を促進することにより、BCR からのシグナルを負に制御していることを我々が示した。

Lyn 欠損マウスと Btk 異常をもつ *xid* マウスを掛け合わせ、Lyn キナーゼ、Btk キナーゼの両方を欠損するマウスを作成した。このようなマウスでは末梢の成熟 B 細胞数の減少と血清 IgM の減少が見られるが、脾腫大および自己免疫病変は全く消失する。この結果から、Lyn キナーゼは B2 細胞のみならず、B1 細胞の活性化にも重要な制御をしていることが示唆され、自己免疫病発症における抗原受容体からの情報伝達系の解析の重要性を示した。

b. 胚中心形成と抗体親和性の亢進

抗体の親和性が亢進し、種々の免疫グロブリンクラスへクラススイッチすることは免疫反応において重要なイベントである。二次抗原刺激後にリンパ節に形成される胚中心は特に抗体の親和性の亢進が生じる重要な構造と考えられている。Lyn 欠損マウスでは、しかし、抗原刺激後の二次濾胞の成熟と胚中心の形成が生じない。Lyn 欠損マウスを NP ハプテンを用いて二次免疫反応を調べてみると胚中心の形成が全く生じないにもかかわらず、抗体の親和性亢進、免疫グロブリンクラススイッチは正常に生じた。また、免疫グロブリン遺伝子可変領域での体細胞超突然変異も正常マウスの場合と同じ頻度かそれ以上の頻度で二次免疫後、生じることが分かった。この結果は、胚中心という構造が抗体の親和性亢進、免疫グロブリン遺伝子可変領域への体細胞超突然変異の誘導に必ずしも必要でないことを示唆している。

この発見は、これまで抗体の親和性亢進、体細胞超突然変異の誘導には胚中心の形成が必須という考えが場合によってはあてはまらない事を示している。また、Lyn キナーゼを介する抗原受容体からのシグナルは抗体の親和性成熟、クラススイッチに直接関与しない事を示している。

c. HS1に会合する分子 HAX-1の機能解析

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 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。Yeast two hybrid 法を用いて HS1分子に会合するタンパク分子、HAX-1、を単離した。HAX-1は35Kda の分子量を有し、細胞内のミトコンドリア膜、核膜、粗面小胞体膜などに存在する。HS1と HAX-1は非刺激状態の B 細胞内で既に会合しており、HS1のリン酸化はその会合に必要としない。HAX-1タンパクを過剰発現させたヒト T 細胞株は血清除去により誘導されるアポトーシスに抵抗性を示した。また、HAX-1は Bcl-2タンパクファミリーに見いだされている BH モチーフを持つことから、細胞死の制御に関係した分子である可能性が示唆された。そこで、HAX-1遺伝子に CD2プロモーターをつないで HAX-1のトランスジェニックマウスを作成した。現在、このマウスにおけるアポトーシスの状態を検索中である。

d. Lyn キナーゼによるプロテインキナーゼ C 活性の制御

B 細胞抗原受容体 (BCR) の刺激により、Lyn・Syk といったチロシンキナーゼの活性化が誘導される。これにより種々のシグナル伝達因子がリン酸化・活性化され、c-myc など幾つかの遺伝子の発現が誘導される。Syk は PLC- γ 2の活性化とそれに続くフォスファチデールイノシトールの加水分解に必要であり、プロテインキナーゼ C (PKC) の活性化と細胞内 Ca^{2+} の増加を引き起こす。しかし一方、Lyn の機能に関しては、依然不明な点が多い。今回我々は、Lyn を欠損させたニワトリ由来 B 細胞において、BCR 刺激による c-myc 遺伝子プロモーター活性の誘導と、PKC の発現量でなくその活性の誘導が著しく増強していることを見出した。これらの活性の増強は、キナーゼドメインを不活化させた Lyn を外来性に細胞に導入することによって、野生型細胞の活性レベルまで戻すことができた。これらの結果より、Lyn はキナーゼ活性非依存性に、BCR を介する大部分の PKC アイソザイムの活性化を抑制しているものと考えられた。この発見は、BCR シグナル伝達系の負の制御機構における Lyn の新しい役割を明らかにするものである (東京理大・北村大介氏、関西医大・黒崎知博氏との共同研究)。

e. B 細胞抗原受容体複合体の Ig β と会合する分子 (IBAP-1) の同定と解析

プレ B 細胞受容体は免疫グロブリン膜型重鎖と代替軽鎖の複合体が Ig α/β ヘテロダイマーと会合した構造を持つ。B 細胞分化初期においてはそのシグナル伝達は Ig β が重要な役割を担っていることが示されている。しかし Ig β とどのような分子が特異的に会合し、シグナルを伝えているかは充分には明らかになっていない。本研究では、プレ B 細胞期に Ig β と会合

し、プレB細胞受容体からのシグナル伝達に関与すると考えられる新たな分子である「IBAP-1」の同定及びその分子の機能の解析を試みた。マウスプレB細胞株 (1xN2B) cDNA ライブラリーからイースト two-hybrid 法により Ig β との結合活性が高い 2 つのクローンについて cDNA 全長の塩基配列の決定を行った。

これらの遺伝子は未知のものであり、そのコードする蛋白についてホモロジー検索を行ったところ、1 つは粘菌の分化に関係するキナーゼに、もう 1 つはプロ T 細胞性 leukemia に関与することが示唆されている分子に、部分的にホモロジーを有していた。前者を「IBAP-1」と命名しさらに解析を行った。IBAP-1 の cDNA は 653 アミノ酸残基をコードし、その N 末端にはプロリンに富むモチーフが存在し、これは Wicott-Aldrich 症候群タンパクの SH3 ドメインに結合すると考えられている領域と高い相同性を有する。また、N 末には PH ドメインと思われる領域が存在する。IBAP-1 タンパクの分子量は約 80kDa であった。イースト two-hybrid 法では、Ig β の C 末端と IBAP-1 タンパクのチロシン、グリシンを多く含む領域とが会合することがわかった。現在、B 細胞における Ig β 分子との会合、B 細胞内での局在、その機能について解析中である。

B. B細胞の活性化と細胞死の制御機構

CD40 リガンド刺激により B 細胞に Fas 抗原が高率に誘導されることを我々は見出し、CD40 からのシグナルが B 細胞の活性化と共に、活性化の終息にも関与していることを示した。さらに、Fas 抗原の発現は誘導されても B 細胞に与える刺激の種類、並びに期間によって Fas によるアポトーシスの感受性が変化することを示した。この感受性の変化は、アポトーシスを阻害する bcl-X_L 遺伝子の発現によって影響されている可能性があることを示した。Src family チロシンキナーゼの一つである Lyn が CD40 架橋によって活性化されるが、ジーンターゲティングによって作製した Lyn^{-/-}マウスの B 細胞は、CD40 からのシグナルによる Fas 抗原の誘導が著しく低下し、Fas によるアポトーシスも起こりにくくなっていることを見出した。

このことから、Lyn 欠損マウスではいわゆる Activation-induced cell death が生じにくいことが示唆された。その結果、活性化抗体産生 B 細胞が蓄積し、抗 DNA 抗体を含む多量の抗体が産生され、免疫複合体の沈着による腎炎が生じていることが示された。また、マウス腹腔内の B 細胞の Subpopulation である B-1 細胞において、通常の B 細胞 (B-2) に比べて、CD40 による Fas の発現誘導及び Fas によるアポトーシスは明らかに低下していることを見出した。

C. 細胞内シグナル伝達における新規の膜結合型ホスファチジルイノシトール (PI) 輸送タンパク (PITPnm) の機能解析

ホスファチジルイノシトール (PI) はシグナル伝達のセカンドメッセンジャーとして、また細胞内のノシトール代謝系の制御に重要な役割を果たしている。我々は上述の抗原受容体から

のシグナル伝達の研究の過程で、細胞の変性の原因となる分子に興味をもち、ヒトの脳より神経変性に関わる遺伝子のクローニングを行った。

その結果、哺乳類では新規の膜結合型ホスファチジルイノシトール (PI) 輸送タンパク (PITPnm) の遺伝子を同定した。遺伝子の全長は4122bpで1242アミノ酸残基をコードし、マウスでは第19番染色体上にマッピングされた。ノーザンブロットの結果、特に脳および免疫系での発現が顕著に高かった。PITPnmは(1)ショウジョウバエの変異体において光刺激による網膜変性の原因遺伝子である *rdgB* (retinal degeneration B) と36%以上の相同性を有し、そのN末端側196アミノ酸残基ではマウスの可溶性のPI輸送タンパクと36%以上の相同性がある、(2)分子サイズは約170KDaで、細胞分画後では膜画分に検出される、(3)細胞内局在を免疫電顕にて調べたところ、PITPnm分子はゴルジ膜、粗面小胞体膜、細胞膜 coated pits に局在化していた、(4)N末端側196-297a.a領域内はPIおよびホスファチジルコリン (PC) と特異的に結合する、(5)網膜においては光受容体において発現していた、などの諸性質を示した。

さらに我々は、PITPnmが胎生後期段階にその発現量が顕著に増加し、特に脳や脊髄を含めた中枢神経系での発現が高いことを明らかにしている。胚性がん細胞であるP19細胞はレチノイン酸処理後に神経様に分化することが知られているが、興味深いことには、P19細胞がレチノイン酸処理によってニューロンへの分化を誘導するに従い、PITPnmの発現量が顕著に増加した。以上から我々が見い出した新規の分子PITPnmは、細胞内での膜輸送、細胞分化、および細胞内PIシグナル伝達におけるPIターンオーバーなどの制御に重要な役割を果たすことが示唆された。本研究ではPITPnm分子の生理活性を解明している。さらに、神経細胞のみならず、免疫系、造血系における役割についても今後、検討していく予定である。

D. リンパ組織に特異的に発現するマウス Formin 関連遺伝子 *Frl* (Formin related gene in lymphocytes) の単離と解析

我々がクローニングしたマウス Formin 関連遺伝子 *Frl* (Formin related gene in lymphocytes) は、リンパ組織に発現が認められた最初の Formin ファミリー遺伝子である。cDNA は約3.6Kb の長さであり、コードする蛋白は1064アミノ酸で、プロリンに富む領域 (Formin homology 1: FH1) と、Formin ファミリーで保存されている FH2 領域を有している。FH1 領域より N 末側では、Formin ファミリーの一つであるイースト BNI1 蛋白と相同性を有するが、FH1, FH2 以外の領域では他の Formin ファミリーとは殆ど相同性を有しない。*Frl* cDNA 5'側をプローブとした、マウス組織由来の RNA を用いたノーザンブロットでは、胸腺、脾臓、腎臓、大腦に発現を認められたが、組織によりその大きさが異なるため、alternative splicing が示唆された。細胞株を用いたノーザンブロットでは、マクロファージ系の細胞株で強い発現が認められた。しかし、抗体を用いて、タンパクの分布を調べてみると、*Frl* タンパクは脾臓、リンパ節、胸

腺，骨髓に160kDaのタンパクが認められたが，他の臓器，組織では見出されなかったことから，タンパクレベルでは，その発現はリンパ組織特異的であると考えられた．マウス*Frl*ゲノム遺伝子は20Kb以上の大きさであり，少なくとも21個以上のエクソンより構成されていた．*Frl* cDNAをヒト腎細胞株293細胞に導入して得られた細胞の免疫染色において，*Frl*タンパクは核に存在するのが認められた．また，染色体マッピングでは，*Frl*遺伝子は11番染色体の遠位部に存在し，リンパ節形成不全マウスの原因とされる*aly*遺伝子座の1cM以内の近傍に位置するが，*aly*マウスの胸腺，脾臓での*Frl* RNAの大きさには差異は認められていない．

Forminファミリー遺伝子は，細胞の極性や，cytokinesis，発生や分化に重要な役割を果たしている．*Frl*のリンパ組織における機能解析のため，現在，ノックアウトマウスの作成，抗体によるタンパクの解析，マクロファージ系細胞株での発現等の解析を進めている．

E. 新しい癌関連抗原（RCAS-1抗原）の機能の解析

癌の免疫学的診断，経過観察，治療等において，癌抗原あるいは癌関連抗原を特異的に認識するモノクローナ抗体は，有用な役割を担うことが期待される．我々は，ヒト子宮頸癌細胞株SiSoを樹立した事を以前に報告した．ヒト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．この抗原は免疫沈降法により，SDS-PAGEによる解析では78KDの分子量を有していた．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僅かに染色されるのみであった．このように22-1-1抗原は広く癌組織に発現している．

さらに腫瘍細胞の進達度とその発現の強さが関連していること，本抗原の発現と生存率の関係において抗原陽性例が抗原陰性例と比べて有意に低いこと，さらに臨床的に癌細胞と識別が困難な異形成細胞においてはその発現が認められない点において，この抗原が癌関連抗原分子として非常に興味を持たれる．これらの結果から，22-1-1抗体はヒトの癌細胞の同定に非常に有用な新しいモノクローナル抗体である事が示された．

この新しい癌関連抗原分子の機能の解析を目的として，本抗原分子をコードする遺伝子を単離し，その蛋白構造および生物学的活性について検討した．単離されたcDNA断片は，約1.1Kbで，コザック配列を有した642bpよりなるORFが認められ，213個のアミノ酸より成る23～24kDaのコア蛋白分子（RCAS-1）をコードしていた．BLASTによる検索にて未知の分子であり，アミノ酸配列の検討において，N末端側に膜貫通部（N-terminal transmembran segment），C末端側にcoiled-coil構造が存在するII型膜蛋白であることが示唆された．この抗原分子の生物学的な機能解析の為にGST融合蛋白発現システムを用いて，N末端にGSTを融合させた全抗原分子（GST-RCAS-1）を精製した．SDS-PAGEによる解析にて，GST-RCAS-1分子はすく

なくとも homo-trimer 以上の複合体を形成していることが示唆された。

さらに、各種ヒト培養細胞株をもちいて 22-1-1 抗体および GST-RCAS-1 にて染色性を検討したところ、一方にのみ染色性が認められた。以上より RCAS-1 分子に結合する細胞表面分子（受容体）の存在が確認された。さらに、正常ヒトリンパ球においても一部の細胞に受容体の存在が確認された。また、結合分子陽性細胞の一つである K 562 細胞を GST-RCAS-1 とともに培養したところ、細胞死が誘導された。このように、癌細胞に特異的に強く発現している抗原分子である RCAS-1 は、その受容体分子を発現しているリンパ球系細胞に細胞死を誘導すること事が示された。このことは、癌細胞の免疫系細胞からの逸脱において RCAS-1 抗原が重要な作用を担っている可能性を示唆している。現在、この細胞死誘導機構の解明を目的として、受容体遺伝子の単離を試みている。

F. アポトーシスの制御に関わる分子についての研究

a. 赤血球分化における Bcl-x の機能解析

多細胞生物の恒常性は細胞増殖・細胞分化・細胞死（アポトーシス）のバランスによって保たれている。アポトーシスは、増殖因子や Bcl-2 を代表とする Bcl-2 ファミリーによって制御されている。Bcl-2 ファミリーの一員である Bcl-x のノックアウトマウスは、胎生 13 日頃に死亡する。胎仔の発達中の脳・脊椎の未成熟神経細胞および肝臓の未成熟造血細胞にアポトーシスが認められた。そこで、造血細胞の分化における Bcl-x の機能を解析するために、Bcl-x 欠損胚性幹 (ES) 細胞を樹立し、C57BL/6 由来の blastocyst に注入して、Bcl-x 欠損体細胞変異キメラマウスを作成した。末梢血の赤血球を解析した結果、Bcl-x 欠損 ES 細胞由来の赤血球は存在しないことが明らかになった。赤血球分化のどの段階に異常が生じるかを検討するために、M-CSF 欠損ストローマ細胞株 OP9 上での ES 細胞の分化システムを用い、Bcl-x 欠損 ES 細胞の赤血球分化を解析した結果、Bcl-x は primitive erythrocytes, definitive erythrocytes の終末分化の時の細胞の生存維持に必須であることが明らかになった。（大阪大学・微生物病研究所・仲野徹氏との共同研究）

b. Bcl-2 結合因子 Nip3 ファミリーによるアポトーシス制御機構の解析

遺伝的にプログラムされた能動的細胞死と定義されるアポトーシス機構は、線虫から哺乳類までよく保存されている機構の一つであり、また、多細胞生物を宿主とするウイルスにも機能的に似た機構を持つものがある。特にアデノウイルスはその機構がよく知られており、E1A, E1B と呼ばれる遺伝子が動物細胞の不死化、癌化、そしてアポトーシスに関わっている。このうち、E1B19K は Bcl-2 ファミリーと機能的に相同性のある分子であり、E1B19K は E1A 誘導アポトーシス、及び TNF, 抗 Fas 抗体で誘導されるアポトーシスを抑制する。この為、ウイルス産物である E1B19K は、生体内で Bcl-2 結合分子等と何らかの相互作用を及ぼし、調節機構に

働いている可能性が示唆されてきた。この可能性から、イースト Two hybrid 法を用いた遺伝子クローニングが行われ、アポトーシス抑制因子 E1B19K に結合する未知の因子「B5」が単離された。B5は、Bcl-2及び E1B19K との結合が認められている Nip3と、DNA・アミノ酸の両レベルで非常に高い相同性を示した。B5, Nip3は N 末に疎水性の領域を持ち、核膜、ミトコンドリア膜に局在している。イースト Two hybrid 法では B5と Nip3が強く結合することから、ダイマーを形成して働いていることが示唆された。遺伝子の転写産物は、約1.5Kであり、多くの組織において発現が認められた。現在、B5と Bcl-2ファミリーとの関与、及び B5の細胞内機能を解析しており、また、発生日工学的手法により B5遺伝子欠損マウスを作製し、発生、分化、アポトーシスにおける B5の生理学的機構を解析している（東京理大・中島琢磨氏、小田鈞一郎氏との共同研究）。

G. 神経分化時における Rb の細胞周期停止、および細胞死に対する機能の解析

ほとんどの中枢神経細胞は、胎児期に最後の細胞分裂を終えると細胞周期を停止し、G0期にとどまり、その後、分裂することはない。Retinoblastoma Protein (Rb) は、この細胞周期の停止において、重要な役割を果たしている。胎児期の中枢神経系において Rb の発現は、神経の成熟にしたがって不活性型の高リン酸化型から、活性型の低リン酸化型へと変化する。Rb欠損マウスの神経系では、細胞周期の停止が起こらず、未熟神経細胞がアポトーシスによって、死滅する。Rb は少なくとも二つの蛋白結合部位を持つ。転写因子である E2F 等と結合する large A/B pocket と、c-Abl 等と結合する C pocket である。低リン酸化型 Rb はこれらの分子と結合しその活性を抑制することで、細胞周期の停止を起こすと考えられている。C pocket を含む Rb の C 末端 (Rb-SE Δ) は、c-Abl と結合し、不活性化する。Osteosarcoma cell line である SaOS-2細胞に Rb と Rb-SE Δ を同時に強発現させると Rb の細胞増殖抑制能に対して、Rb-SE Δ は dominant-negative な効果を現すが、Rb 結合蛋白と Rb および Rb-SE Δ との結合は保たれており、それらの活性も抑制されたままであることから、Rb のもう一つの役割として、Rb 結合蛋白を一分子の Rb に集め、細胞周期停止において必要な何等かの相互作用の場をつくっていると考えられる。

そこで、神経細胞分化における、Rb-SE Δ の細胞周期停止と細胞死に対する効果を胚性癌細胞株である P19を用いて解析している。P19は、レチノイン酸 (RA) 存在下で培養すると、マウス胎児の中枢神経様に分化誘導される。この細胞株において、Rb は神経分化誘導に伴い発現が高まり、高リン酸化型から、低リン酸化型へと変化した。その他の細胞周期関連蛋白や Bcl-2ファミリーについても、その発現変化を解析中である。この細胞株で、Rb-SE Δ の恒常的発現株を作製し、この細胞株における神経分化誘導時の変化を調べることで神経分化時における Rb の細胞周期停止、および細胞死に対する機能を解析を行っている。

H. HIV 感染細胞を破壊するヒト型 IgM クラス抗体の作成と応用

正常人の約 2 % の血清は、HIV 感染細胞を特異的に強く傷害する活性を持つ。これは HIV 感染細胞に出現する糖鎖抗原に対するヒト型 IgM 抗体が自然抗体として血清中に存在すると補体を活性化して細胞傷害活性反応を起こすためである事が明らかになった。本研究は、HIV 感染細胞に出現する糖鎖抗原または HIV ウイルス膜抗原に対するヒト型 IgM 抗体を組み換え DNA 法で産生し、HIV 感染の治療に使用する事を目標としている。リコンビナント IgM 抗体を産生株を効率よく作成する手段として、HIV 関連抗原反応性抗体 (IgM または IgG 型) を産生しているヒトリンパ球や EB ウイルス変異細胞株より免疫グロブリン遺伝子の H 鎖、L 鎖の V 領域をコードする cDNA を単離したのち、ヒト IgM 型発現ベクターに導入する。

遺伝子導入した細胞の中から HIV 感染細胞に効率よく反応する IgM 抗体を安定して産生する細胞株を樹立する方法を取った。IgM 型抗 GM2 抗体を産生するヒト B 細胞株よりその抗体分子の H 鎖、L 鎖の V 領域をコードする遺伝子を単離し、これらを C μ 、C κ 遺伝子をあらかじめ組み込んだヒト IgM 型抗体発現ベクターに導入し、これらのベクターを CHO 細胞発現させ、J 鎖をもつ IgM 抗体、J 鎖をもたない IgM 抗体をそれぞれ発現する安定形質転換細胞を作成し、IgM 抗体タンパクを特に高産生しているクローンを単離した。その結果、IgM.J (+), IgM.J (-) のそれぞれのクラスのヒト抗 GM2 抗体を得ることが出来た。J 鎖をもつ IgM 抗体と J 鎖をもたない IgM 抗体のそれぞれについて、HIV 感染細胞に対する細胞傷害活性を調べた。

その結果、J 鎖をもたない IgM 型の抗体は、J (+) の抗体より傷害活性がはるかに強く、作成した IgM ヒト型抗 GM2 抗体は低温 ~ 37°C において安定であり、温度によってその結合活性は影響を受けなかった。この研究により、発現ベクターの有用性、ヒト IgM 型抗体の HIV 感染細胞への傷害能、抗体の大量生産の方法等について十分な検討が出来た (名古屋市大・岡田秀親氏のグループと共同研究)。

業 績 目 録

原著論文

1. Suzuki, Y., Demoliere, C., Kitamura, D., Takeshita, H., Deuschle, U. and Watanabe, T. 1997.
HAX-1, a novel intracellular protein, localized on mitochondria, directly associates with HSI, a substrate of Src-family tyrosine kinases.
J. Immunology. 158, 2736-2744.
2. Fukuda, T., Suzuki, Y., Yamanashi, Y., Kitamura, D., Niho, Y., Yamamoto, T., Deuschle, U. and Watanabe, T. 1997.

Role of the non-receptor type protein- tyrosine kinase substrates in signal transduction upon stimulation of B-cell antigen receptors.

In "Kinases and Phosphatases in Lymphocyte and Neuronal Signaling". p122-133, Ed. H. Yakura. Springer-Verlag, Tokyo.

3. Masuda, K., Wang, J. and Watanabe, T. 1997.

Reduced susceptibility to Fas-mediated apoptosis in B1 cells.

Eur. J. Immunology. 27, 449-455.

4. Yamanashi, Y., Fukuda, T., Nishizumu, H., Inazu, T., Higashi, K., Kitamura, D., Ishida, T., Yamamura, H., Watanabe, T. and Yamamoto, T. 1997.

Role of tyrosine phosphorylation of HS1 in B cell antigen receptor-mediated apoptosis.

J. Experimental. Medicine. 185, 1387-1392.

5. Aikawa, Y., Hara, H. and Watanabe, T. 1997.

Molecular cloning and characterization of mammalian homologues of the Drosophila retinal degeneration B (rdgB) gene.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 236, 559-564.

6. Upragarin, N., Nishimura, H., Wajiwalku, W., Ando, Y., Nagafuchi, S., Watanabe, T. and Yoshikai, Y. 1997.

T cells bearing Vb8 are preferentially infected with exogenous mouse mammary tumor virus.

J. Immunology. 159, 2189-2195.

7. Akashi, T., Nagafuchi, S., Anzai, K., Kondo, S., Kitamura, D., Wakana, S., Ono, J., Kikuchi, M., Niho, Y. and Watanabe, T. 1997.

Direct evidence for the contribution of B cells to the progression of insulinitis and the development of diabetes in non-obese diabetic mice.

International Immunology. 9, 1159-1164.

8. Su, D-M, Wang, J., Lin, Q., Cooper, M. D. and Watanabe, T. 1997.

Interferons α/β inhibit IL-7 induced proliferation of CD4-8-CD3- (TN) CD44+25+ thymocytes, but not block that of TN CD44-25- cells.

Immunology. 90, 543-549.

9. Vitetta, E., Tucker, T. F., Racila, E., Huang, Y. W., Marches, R., Lane, N., Schuermann, R. H., Street, N. E. and Watanabe, T. 1997.

Tumor dormancy and cell signaling. V. Regrowth of the BCL1 tumor after dormancy is established.

Blood. 89, 4425-4436.

10. Murai, H., Hara, H., Hatae, T., Kobayashi, T. and Watanabe, T. 1997.
Expression of CD23 in the germinal center of thymus from myasthenia gravis patients.
J. Neuroimmunology. 76, 61-69.
11. Hatae, H., Hara, H., Kobayashi, T. and Watanabe, T. 1997.
The effect of rolipram on the production of cytokines in HTLV-I infected cell lines and peripheral blood mononuclear cells of patients with HTLV-I associated myelopathy (HAM).
J. Neurological Sciences. 148, 87-94.
12. Koga, H., Naito, S., Nakashima, M., Hasegawa, S., Watanabe, T. and Kumazawa, J. 1997.
A flow cytometric analysis of the expression of adhesion molecules on human renal cell carcinoma cells with different metastatic potentials.
European Urology. 31, 86-91.
13. Takeshita, H., Taniuchi, I., Kato, J. and Watanabe, T. 1998.
Abrogation of autoimmune disease in Lyn-deficient mice by the mutation of Btk gene.
International Immunology. 10, 435-444.
14. Wu, X-M., Nakashima, M. and Watanabe, T. 1998.
Selective suppression of antigen specific Th2 cells by continuous micro-dose oral tolerance.
Eur. J. Immunology. 28, 134-142.
15. Akashi, T., Kitamura, D., Nagafuchi, S., Anzai, K., Wang, J., Taniuchi, I., Niho, Y. and Watanabe, T. 1998.
Suppression of lymphoproliferation in B cell-deficient C57BL/6 lpr mice.
Immunology. 93, 238-248.
16. Lin, Q., Taniuchi, I., Kitamura, D., Wang, J., Watanabe, T. and Cooper, M. D. 1998.
Aminopeptidase A-deficient mice have normal T and B cell development.
J. Immunology. 160, 4681-4687.
17. Katsuta, H., Tsuji, S., Niho, Y., Kurosaki, T. and Kitamura, D. 1998.
Lyn-mediated down-regulation of B cell antigen receptor signaling: inhibition of prote in kinase C activation by Lyn in a kinase-independent fashion.
J. Immunology. 160, 1547-51.