

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系の分化および免疫応答の機構を、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、免疫細胞の分化および免疫反応の制御機構を解明することを目指している。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を推進しており、特に免疫監視機構からの癌の逸脱（Escape）機構に関わる我々が見い出した新しい分子、RCAS1、の機能の解明に向けて鋭意研究を行っている。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。1999年（平成11年）度は昨年を引き続き、(1) B細胞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自己免疫病の解析にむけての研究、(2) プレB細胞受容体からのシグナル伝達機構の解析、(3) 免疫細胞初期分化の制御の分子機構、(4) 当部門で見いだされた新しいフォルミン関連遺伝子、Frl 遺伝子産物 FRL の免疫細胞活性化における機能の解析、(5) ヒスタミン H1 受容体遺伝子欠損マウスの作製とその異常の解析、(6) 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、RCAS1 の解明、(7) 遺伝子標的法（ジーンターゲットング）等の発生工学的手法の免疫学研究への応用、(8) B細胞死の制御に関与する分子の同定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。

1999年（平成11年）4月1日から2000年（平成12年）3月末までの主な人事異動は次のとおりである。平成11年3月には、末松佐知子さんが留学先の米国から新たに、助手として赴任した。助手の谷内一郎君は休職による留学期間が3年を越えるため、退職し、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12年3月に、山本真理さん、大屋和之君、相川義勝君、越智博文君の4名が大学院を修了した。このうち相川義勝君は、平成11年9月に早期修了にて学位を取得し、同年9月から理研のポストドクトラルフェローとして赴任した。越智博文君は平成12年3月に学位取得の上、大学院を修了した。山本真理さん、大屋和之君の両名は現在学位を申請中である。山本真理さんは米国テキサス州、サウスウエスタン大学に赴任した。また、大屋和之君は臨床（下関市民病院）に赴任し当部門では研究生となった。勝田 仁君は非常勤研究員（ボ

ストドク)として平成10年4月より当部門で研究を行ってきたが、平成12年3月をもって終了した。平成11年3月には、土井俊郎君、ヤスミン・バヌーさんの両名が学位取得の上、大学院を修了した。土井俊郎君は整形外科教室にもどり、ヤスミン・バヌーさんは神奈川県ガンセンター研究所にポストドクとして就職した。渡辺裕美さんが学位取得の上大学院を修了し、平成12年2月より当部門の助手となった。平成9年度からのナスリン・バヌーさん、平成10年度からの久原尚子さんは大学院生として研究を続けている。平成11年4月から、前沢 浩君が北里大学脳外科より当部門大学院生として入学した。平成11年5月には、老叻英毅君が、九州大学医学部の初めての MD-PhD コースの学生として入学してきた。昨年から引き続き第一内科研究生である小河一彦君、酒井由美子さんが研究を続けている。助手の中島学君、研究補助員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するシグナル伝達機構の解析

a. B細胞表面抗原受容体(BCR)からのシグナル異常と自己免疫病

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。シグナルには、B細胞の活性化に対して正の制御に関わるものと負の制御に関わるものがある。我々は、BCRシグナルを負に制御する機構について研究を行っている。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 Lyn 欠損マウスでは、各種クラスの血清 Ig(特に IgM)は高値を示し、週令を経るにつれ、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、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。さらに自己抗体である抗 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、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。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。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、B1細胞の出現、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た。このような異常は、Lyn キナーゼによる CD22 受容体、Fc RIIB, PIR-B などの ITIM モチーフのチロシ

リン酸化と SH2 フォスファターゼ(SHP1, SHIP)のリクルートメントが障害されたためと考えられ, Lyn キナーゼの BCR からのシグナル伝達系に対する負の制御の重要性が示された。

b. BCR からのシグナルと未熟 B 細胞のアポトーシス

マウス B 細胞株 WEHI-231 を抗 IgM 抗体で架橋すると 24 時間以降にアポトーシスに陥る。この場合, カスパーゼの活性化と DNA の切断が誘導及び細胞膜透過性の亢進を引き起こす。カスパーゼ阻害剤 Z-VAD は核の分画化, DNA 切断を完全に阻止するが, 細胞膜透過性の亢進は阻止しない。マウス未熟 B 細胞株である WEHI-231 細胞では BCR 刺激後, 膜透過性の亢進に先立って, ミトコンドリア膜電位の変化および活性酸素の増加が生ずることを見出した。即ち, BCR からの Death signal はまずミトコンドリアに伝達され, その後にカスパーゼの活性化と DNA 切断及び膜透過性の亢進が生ずると考えられた。即ち, 自己反応性未熟 B 細胞では, 抗原受容体からのシグナルはまずミトコンドリアを標的にして伝達され, その後にアポトーシス及びネクローシスの反応が引き起こされると考えられた。抗原受容体からのどのようなシグナルが, どのような分子の活性化あるいは新たな蛋白の合成を誘導し, どのような機構によってミトコンドリアをアタックするのかについて研究を行っている。その結果, 抗原受容体からのシグナルにより, 新たなタンパク合成がアポトーシス誘導に必要であることを見出した。そこで短時間抗 IgM 抗体で架橋して刺激した WEHI-231 細胞から cDNA library を作製し, ミトコンドリアを標的にしてアタックする新規のタンパク分子の探索を行っている。

c. B 1 細胞活性化の負の制御

自己赤血球に対する自己抗体をコードする H 鎖遺伝子, L 鎖遺伝子を導入した抗自己赤血球抗体産生性トランスジェニックマウスでは, B 細胞の殆ど全てが B 1 細胞であり, 自己赤血球反応性 B1 細胞である。しかし, それらの B1 細胞は全て無反応状態(アナジー)にある。従って, SPF 状態で飼育する場合は, 抗自己赤血球抗体産生性トランスジェニックマウスでは, 自己免疫性溶血性貧血は生じない。一方, このマウスを Lyn 欠損マウスと掛け合わせて, Lyn 欠損抗自己赤血球抗体産生性トランスジェニックマウスを作成した。このような動物において, B1 細胞における無反応性(または自己寛容)は破れて強力な自己抗体産生が引き起こされ, 動物は重症の自己免疫性溶血性貧血に陥った。

以上の結果は, Lyn キナーゼが BCR からのシグナル伝達において強い負の制御を行っており, Lyn キナーゼによる抗原に対する閾値の制御は自己反応性 B 細胞の自己寛容維持に重要な役割を果たしている事が示唆された。B 1 細胞には, その細胞表面に CD 5 が発現されている。B 1 細胞上の BCR を抗原または抗 IgM 抗体で架橋すると, BCR 近傍に位置している CD 5 分子は BCR 架橋によって活性化されたチロシンキナーゼによりリン酸化を受ける。この際に主として機能するのは Lyn キナーゼであることを明らかにした。すなわち, Lyn 欠損マウス

ではCD5のチロシンリン酸化は全く生じない。CD5細胞質ドメインに存在するITIMモチーフがチロシンリン酸化を受けて、それにSHP-1がリクルートしてくる。SHP-1による脱リン酸化により強い負の制御が働く。抗自己赤血抗体産生性トランスジェニックマウスで抗自己赤血抗体産生が見られないのはこの為である。一方、Lyn欠損抗自己赤血球抗体産生性トランスジェニックマウスではこの負の制御が欠損するために、B1細胞は容易に自己抗原刺激により活性化されたと考えられた。さらに、我々はB1細胞の一部にNK細胞上に発現されるLy49受容体の発現を見出した。このLy49受容体もLynキナーゼなどのチロシンキナーゼにより、そのITIMモチーフがリン酸化を受けるとそこにSHP-1がリクルートし負の制御を行う可能性が示唆された。このように、自己抗体産生に深く関わるB1細胞では、CD22、CD5、FcRIIB、PIR-BあるいはLy49など種々の負の制御機構が存在することが分かった。さらにそれらの活性化にはLynキナーゼが重要な働きをしていることがわかった。

d. ヒスタミン H1, H2 受容体遺伝子欠損マウスの作製とこれらの受容体シグナルの免疫反応, アレルギー反応, 胃の構造と機能における役割について

ヒスタミン H1 受容体および H2 受容体は7回膜貫通部位を持ち、三量体型 G-タンパクが共役している受容体である。H1 受容体には特に G タンパクとして G q サブファミリーが会合していることが報告されている。一方、H2 受容体には G s が会合している。ヒスタミン H1 受容体は、平滑筋、心臓その他多くの組織で発現されており、さらに脳中枢にはヒスタミンニューロンが存在し、覚醒、睡眠、食欲、日内リズムなどの制御に関与していることが示唆されている。我々はこれまでに、ヒスタミン H1 受容体欠損マウスにおいて日内リズムの異常、行動の異常について報告してきた。一方、ヒスタミン H2 受容体は、胃および脳中枢に発現している。我々の研究室では、ヒスタミン H1 受容体および H2 受容体遺伝子ノックアウトマウスを作製しその機能について解析を続けている。

1) 我々は、以前から、アレルギー反応の分子機序および活性アミンの免疫反応への影響を調べる目的で、ヒスタミン受容体欠損マウスの作成とその解析を行ってきた。そこでこのような個体における免疫能および即時型アレルギー反応について解析した。ヒスタミン H1 受容体欠損マウスのT細胞あるいはB細胞をそれぞれ、抗 CD3e 抗体あるいは抗 IgM 抗体で架橋して細胞増殖を誘導させると、wild マウスのそれに比べて細胞増殖反応の低下が見られた。そのような増殖反応の低下はマイトゲンや種々のサイトカイン (IL2, IL4, IL7) や CD40L などの刺激では見られず、抗原受容体からの情報伝達に特異的であった。さらに正常脾細胞よりマスト細胞を除去した後に、抗 CD3e 又は抗 IgM で刺激して生ずる細胞増殖反応はヒスタミンの添加により増強された。H1R 欠損マウスの脾細胞ではそのような増強作用は見られなかった。以上の結果は、三量体型 G-タンパクからのシグナルが抗原受容体からのシグナル伝達に対して正の制御を行っていることを示唆している。さらに、リンパ球上のヒスタミン H1 受

容体はその活性化に重要な制御機能を有していることがわかった。特に、Th1 細胞の活性化には正の制御を、Th2 細胞の活性化には負の制御をしていることが明らかとなった。一方、ヒスタミン H2 受容体もまた、免疫細胞上に発現されており、Th1 細胞の活性化には負の制御を行っていることが示され、H1 受容体と H2 受容体が免疫細胞の活性化に対して拮抗的に働いていることがわかった。また、本研究は三量体型 G-タンパクからのシグナルが抗原受容体からの免疫反応に重要な制御機構を發揮していることを初めて証明したものである。

2) 即時型アレルギー反応について調べた。H1R 欠損マウスでは、IgE が引き金となる即時型アレルギー反応は殆ど完全に消失する。一方、ヒスタミン H2 受容体欠損マウスでは即時型アレルギー反応は正常であった。以上の結果から、アレルギー特異的な IgE 抗体を介するヒスタミンによるアレルギー反応はヒスタミンH1受容体を介して起こることが明かに示された。

3) H2 受容体遺伝子ノックアウトマウスにおける胃の異常について。ヒスタミン H2 受容体は胃粘膜細胞、特に壁細胞に多く発現されており、従来より胃酸分泌の促進制御に重要であることが知られている。そこで、H2 受容体遺伝子ノックアウトマウスにおける胃の変化について調べた。予想に反して、ノックアウトマウスの胃酸度は正常であった。しかし、H2 受容体アンタゴニストには全く反応しなかった。一方、H2 受容体遺伝子ノックアウトマウスでは、胃壁が異常に厚くなり、趨壁は巨大になり、胃の hypertrophy が著明となった。また、その壁細胞の構造は異常であった。これらの結果から、H2 受容体からのシグナルは、胃酸分泌の制御のみならず、胃壁細胞、ECL 細胞の増殖、構造維持に重要な機能を有していることが初めて明らかになった。

e. プレB細胞受容体からのシグナルとB細胞初期分化

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 / 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 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 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 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)のcDNAライブラリーからイースト two-hybrid 法により Ig 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 Wiscott-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80 kDaであった。yeast two-hybrid法では、Ig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。本年もB細胞におけるIg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が未だ明確な結論は得られていない。

一方、プレB細胞受容体の架橋により、LAT分子がチロシンリン酸化を受けることを見出した。LAT分子はT細胞にのみ発現されるシグナル伝達のアダプター分子として重要であることは、この分子を欠損させたマウスではT細胞分化の障害、T細胞活性化の低下を示すことから明らかである。我々はこの分子がプロB細胞、プレB細胞でも発現されていることを見出した。しかし、未熟B細胞以降のB細胞では全く発現されていない。プレB細胞受容体を刺激すると、LATの発現は抑制される。すなわち、プレB細胞受容体からのシグナルはLATの発現に対して負の制御を行う。現在、このような幼若B細胞におけるLAT分子の機能とその発現およびプレB細胞受容体シグナルによる発現抑制の意味について研究中である。

f. SLE患者末梢血B細胞でのシグナル伝達分子の解析

SLEをはじめとする全身性の自己免疫疾患患者のB細胞での主なシグナル伝達関連分子を検索している過程で、我々が以前に報告したHS1タンパクの異常およびリンパ球内にShort formのVavタンパクを含むが正常のVavタンパクが減少している症例を見出した。HS1タンパクの異常については、第一内科のグループによって現在解析が行われている。一方、truncated formのVavは分子量約50kDaで、N末側のPHドメイン、DH(Dbl homology)ドメインは完全に保存されているが、C末のSH3、SH2などのドメインが欠失している。特にB細胞ではtruncated Vavの量がintactのVavより多いと思われた。本症例では、末梢血B細胞の減少が見られ、種々の自己抗体産生が見られた。一方、CD5⁺、CD19⁺のいわゆるB1細胞と思われる細胞は健常人に比べて増加していた。このtruncated Vavタンパクの存在がB細胞におよぼす影響を調べるため、truncated VavをコードするcDNAをヒトB細胞株Daudiに導入し、安定形質転換細胞を得た。Daudi細胞を抗IgM抗体で架橋すると細胞死(アポトーシス)が誘導されるが、truncated Vavを導入したDaudi細胞では細胞死が誘導されなかった。さらに、抗IgM抗体による架橋後の細胞質タンパクのチロシンリン酸化に両細胞間で大きな相違が見られた。

このtruncated Vav分子をB細胞で発現するトランスジェニックマウスを確立した。このtruncated Vav分子の出現が免疫系にどのような影響を及ぼすかについて検討を行っている。

B. 免疫組織特異的Formin関連遺伝子Frlの機能解析

我々が単離したマウス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 family遺伝子である。proline rich domain

(Formin homology 1:FH1)と,Formin family で保存されている FH2 領域を有している .FH1 領域のさらにN末側は FH3 領域と呼び, Formin family の一つである yeast BNI1 蛋白と相同性を有する .FH1, FH2, FH3 以外の領域では他の Formin family とは殆ど相同性を有しない .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, 大脳に発現を認める .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 .Frl タンパクは細胞質に存在する .マウス Frl genome 遺伝子は 20Kb 以上の大きさであり, 少なくとも 21 個以上の exon より構成されていた .また, マウス chromosomal mapping 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ことが分かった .

Formin 遺伝子ファミリーは, 細胞の極性や cytokineses, 発生, 分化に関わる事が示唆されている .Frl 蛋白は, FH1 やFH2 領域以外では, drosophilaのdiaphanous ,及びそのmammlian homolog である p140mDia, yeast の BN1 と相同性を示すが, これらの diaphanous タンパク質群は, N端で small G protein である Rho と結合し, FH1 では, actin binding protein である profilin と結合する事によって, 細胞骨格の再構成に関与している .Frl 蛋白は, Rac1 と会合し, その部位はN末に位置すると考えられた .マクロファージ系の細胞株に, FH3 のみを発現させた inducible transformants では, アポトーシスの亢進, 細胞増殖の低下, 接着・遊走能の著明な低下が観察されたが, 他のドメインを欠く truncated form では, 変化は観察されなかった .以上のことより, Frl 蛋白は, 動物細胞においては, FH3 領域を含む N 末端領域で Rac1 と会合し, Rac1 を介して細胞骨格の再構築, 細胞の生存に関わる重要なシグナルを伝えていると考えられた .

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 4 1 2 2 bp で 1 2 4 2 アミノ酸残基をコードし, マウスでは第 1 9 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 3 6 % 以上の相同性を有し, その N 末端側 1 9 6 アミノ酸残基ではマウスの可溶性の PI 輸送タンパクと 3 6 % 以上の相同性がある, (2) 分子サイズは約 1 7 0 KDa 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 196-297 a.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. 新しい癌関連抗原 (RCAS-1 抗原) の機能の解析

我々が作製したモノクローナル抗体「22-1-1」が認識する新たな癌関連抗原、RCAS1 は、その発現が癌細胞に比較的特異的であること、癌の進展とその発現がパラレルであること、子宮癌、大腸癌、肺癌などでの臨床における 5-10 年の経過観察から、RCAS1 陽性の癌ではその予後が陰性の場合に比べて悪いこと等が解ってきた。すなわち、「22-1-1」抗体が認識する抗原の発現は癌の悪性度と強い相関関係がある。

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ル抗体「22-1-1」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。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 は、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 5 6 2 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 .

さらに , 最近 , マウスの RCAS1 cDNA の単離にも成功した . マウス RCAS1 cDNA をプローブとしてノーザンプロットを行ったところ , 胎生初期 (7 - 8 日) に強い発現が見られることがわかった . マウスの系を用いて RCAS1 の発生分化における役割についても検討を加える予定である . また , ジーンターゲットングのために , マウスゲノム遺伝子の単離も行った . RCAS1 タンパクの添加により , 受容体陽性細胞では , 細胞周期の停止が誘導される . ヒト末梢血 T リンパ球を活性化して細胞増殖を誘導しこれに RCAS1 タンパクを添加すると , 細胞増殖は早期に停止する . この時 , cyclin D3 量が 3 - 6 時間以内に , 9 時間以内に PCNA の量的な著明な減少が見られる . さらに , 1 2 時間後には , 高リン酸化 Rb 蛋白の量的減少が認められた . しかし , cyclin B , cyclin E , cdk2 , cdk4 , p16 (ink4a) , p21 (Cip1/Waf1) , p27 (Kip1) , p57 (Kip2)などは全く変化しない . この cyclin D3 および高リン酸化 Rb 蛋白の減少が RCAS1 による細胞周期停止機構に深く関わっていることが示唆された . 現在 , 受容体の遺伝子の単離 , cyclin D3 および高リン酸化 Rb 蛋白の減少を誘導するシグナル伝達系の解明を行っている .

業績目録

原著論文 (英文のみ)

1. M.Nakashima , K.Sonoda and T.Watanabe. 1999.
Inhibition of cell growth and induction of apoptotic cell death by a novel human tumor associated antigen , RCAS1.
Nature Medicine. 5: 938-942.

2. H. Ochi , H.Takeshita , T.Suda , S.Nishitani , T.Honjo and T. Watanabe. 1999.
Regulation of B-1 cell activation and its autoantibody production by Lyn
kinase-regulated signalings.
Immunology 98:595-603.
3. Y.Aikawa , A.Kuraoka , H.Kondo , M.Kawabuchi and T.Watanabe. 1999.
Involvement of PITPnm , a mammalian homologue of Drosophila rdgB , in
phospho- inositide synthesis on Golgi membranes.
J. Biol. Chem. 274:20569-20577.
4. N.Motoyama , T.Kimura , T.Takahashi , T.Watanabe , T.Nakano. 1999.
Bcl-x prevents apoptotic cell death of both primitive and definitive
erythrocytes at the end of maturation.
J. Exp. Med. 189: 1691-1698.
5. Y.Banu and T. Watanabe. 1999.
Augumentation of antigen receptor-mediated responses by histamine H1
receptor signaling.
J. Exp. Med. 189: 673-682.
6. F.Arakawa , T.Yamamoto , H.Kanda , T.Watanabe and M.Kuroki. 1999.
cDNA sequence analysis of monoclonal antibody FU-MK-1 specific for a
transmembrane carcinoma-associated antigen , and construction of a
mouse/human chimeric antibody.
Hybridoma 18:131-138.
7. T. Watanabe. 1999.
Lymphocyte activation signals:transduction. (Review).
Encyclopedia of Life Science. Macmillan Reference Ltd. p.1185.
8. J.Wang and T.Watanabe. 1999.
Antigen presentation to lymphocytes. (Review).
Encyclopedia of Life Science. Macmillan Reference Ltd. p.1227.
9. J.Wang and T.Watanabe. 1999.
Expression and function of Fas during differentiation and activation of B cells.
(Review).
International Review of Immunology , 18: 367-379.
10. Y.Watanabe , T.Watanabe , M.Kitagawa , Y.Taya , K.Nakayama , N.Motoyama.
1999.
pRb phosphorylation is regulated differentially by cyclin-dependent kinase

(Cdk)2 and Cdk4 in retinoic acid-induced neuronal differentiation of P19 cells.

Brain Research. 842:342-350.

11. S.Nagafuchi , H.Katsuta , K.Kogawa , T.Akashi , S.Kondo , Y.Sakai , T.Tsukiyama , D.Kitamura , Y.Niho and T.Watanabe. 1999.
Establishment of an embryonic stem (ES) cell line derived from a non-obese diabetic (NOD) mouse: in vivo differentiation into lymphocytes and potential for germ line transmission.
FEBS Letters 455: 101-104.
12. T.Kaku , K.Sonoda , T.Kamura , T.Hirakawa , K.Sakai , S.Amada , S.Ogawa , H.Kobayashi , M.Nakashima , T.Watanabe , H.Nakano. 1999.
The prognostic significance of tumor-associated antigen 22-1-1 expression in adenocarcinoma of the uterine cervix.
Clinical Cancer Res. 5:1449-1453.
13. T.Doi , N.Motoyama , A.Tokunaga and T.Watanabe. 1999.
The death signals from B cell antigen receptor target mitochondria , activating necrotic and apoptotic death cascades in a murine B-cell line , WEHI-231.
Intern. Immunol. 11:933-941.
14. Y.Nagata , F.Kiefer , T.Watanabe , and K.Todokoro. 1999.
Activation of hematopoietic progenitor kinase-1 by erythropoietin.
Blood 93:3347-3354.
15. K.Morohashi , H.Tsuboi-Asai , S.Matsushita , M.Suda , M.Nakashima , H.Sasano , Y.Hatada , C-L Li , J.Fukuda , J ,Irie , T.Watanabe , H.Nagura , E.Li . 1999.
Structural and functional abnormalities in the spleen of mFtz-F1 gene disrupted mouse.
Blood 93: 1586-1594.
16. Hashimoto , K. Tanigawa , M. Nakashima , K. Sonoda , T. ueda , T. Watanabe , T. Imoto. 1999.
Construction of the single-chain Fv from 196-14 antibody toward ovarian cancer-associated antigen CA125.
Biol. Pharm. Bull. 22: 1068-1072.

17. T.Morimoto , Y.Yamamoto , J-I Mobarakeh , K.Yanai , T.Watanabe , T.Watanabe. 1999.

A.Yamatodani: Involvement of the histaminergic system in leptin-induced suppression of food intake.

Physiology and Behavior (in press).