

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。本年は、(1)遺伝子標的法(ジーンターゲティング)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)ヒト重症無筋力症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自己免疫病の解析、(6)癌の効果的免疫学的治療法の開発、ヒト癌抗原の同定、解析、等について研究を進めた。

1992年度中の主な人事異動は次のとおりである。ドイツ国ケルン大学遺伝学研究に留学中であった北村大介助手、米国フィラデルフィアのウイスター研究所に留学中であった中島 学助手が帰国。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より、宮越友子君はパリ、パスツール研究所よりそれぞれ留学を終えて帰国した。一方、王継揚助手は本年よりアラバマ大学バーミングム校のマックス・クーパー教授のもとに留学し、同じく本年度末に助手になった森 啓子君はフランス国ストラスブルグ大学のマティス教授の研究室に留学した。

A. B細胞分化の制御に関する分子レベルでの解析—ジーンターゲティングによる変異マウスの作成とそれを用いた解析

Bリンパ球細胞が造血幹細胞から分化する過程で、免疫グロブリン(Ig) H鎖およびL鎖遺伝子は段階的に再構成を起す。プレB細胞はH鎖のみ再構成しており、細胞表面IgM(sIgM)陽性B細胞の前段階である。最近、プレB細胞表面に μ 鎖(IgMを構成するH鎖)が新しいL鎖様蛋白、 $\lambda 5$ およびVpre Bと共に複合体を形成し得ることが示された。ジーンターゲティング法を用いて作製した μ 鎖膜型エクソン変異マウス(μ MT)のホモ接合体では末梢リンパ組織にB系細胞が欠如している。その骨髓細胞をフローサイトメトリーを用いて調べると、S7抗原陰性の小型プレB細胞がほとんど無く、それより幼若なS7陽性大型プレB細胞以前の段階で分化が抑制されていた。ホモ $\lambda 5$ 変異マウス($\lambda 5$ T)の骨髓でも同様の分化抑制が見られたことより、 μ 鎖複合体からのシグナルが小型プレB細胞への分化誘導に必要であることが個体レベルで明かにされた。一方、大型プレB細胞までの κ 鎖遺伝子再構成は、正常マウスのものと同頻度でこれら変異マウスにも起きており、 μ 鎖複合体非依存性であることが判った。

ホモ λ 5 Tマウスの末梢組織でごく少数のB細胞がみられるのは、 μ 鎖複合体に依存しない低頻度の κ 鎖遺伝子再構成によるものであり、これに対し正常では μ 鎖複合体により形成される小型プレB細胞において高頻度の κ 鎖遺伝子再構成が起こるものと考えられた。現在、 μ 鎖複合体からのシグナル伝達に関与する可能性のある細胞内分子の遺伝子をこれらの変異マウスに導入し、B細胞分化抑制が回復するかどうかを検討している。

B. B細胞におけるシグナル伝達と HS 1 タンパクーHS 1 タンパクのシグナル伝達における役割の解析およびジーンターゲティングによる HS 1 遺伝子変異マウスの作成

B細胞表面IgM (sIgM)からのシグナルは未熟B細胞では細胞死(アポトーシス)を誘導し、成熟B細胞ではこれを活性化すると考えられている。sIgMを架橋するとLyn, Fyn, Blk, Lck等の非受容体型チロシンキナーゼが活性化され、複数の細胞内蛋白が磷酸化されるが、そのひとつが我々の以前単離した血球系細胞特異的に発現する遺伝子HS 1の産物であり、これがLynと結合することが証明された。B細胞分化増殖におけるHS 1蛋白の意義を明かにするため、B細胞株に種々の変異を施した発現型HS 1遺伝子を導入しその増殖や遺伝子発現に与える影響を検討すると同時に、ジーンターゲティング法を用いてHS 1変異マウスを作製し、現在解析を進めている。また、Blk遺伝子を単離し、Blkトランスジェニックマウスを作製中である。

C. IgE クラススイッチの調節機構の解明

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、IL 4によるIgE産生系を用いて解析した。我々はIL 4刺激と抗CD 40抗体によりIgEへのクラススイッチ反応が起こるヒトB細胞株を見出だし、これを用いIL 4刺激によってC ϵ 遺伝子の転写を誘導するDNAシス・エレメン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IL 4刺激によってヒトB細胞内に導入されることを示した。

D. 組換え DNA によるヒト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, C κ 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、ハイブリドヘ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 β T細胞抗原受容体（ β TCR）の構造および機能の解析

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CD 4⁻8⁻からCD 4⁺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や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 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 α TCRを伴わずに発現する β TCRの構造およ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。そのうちのひとつであるLSB11-1細胞は、細胞表面に β TCRを発現しているが、 α TCRは発現していないLSB11-1細胞上の、 β TCRの少なくとも一部はglycosyl phosphatidylinositol (GPI)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 β 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 β TCRが胸腺細胞の分化においてどのような役割を果たしているのかは興味ある問題である。

F. 未熟胸腺細胞上に発現するIMT-1抗原の解析

最近、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成した。IMT-1抗原は少なくともC57BL/6マウス及びBALB/CマウスのCD 4⁻8⁻及びCD 4⁺8⁺胸腺細胞の一部に発現している。しかし、CD 4⁺8⁻あるいはCD 4⁻8⁺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CD 3⁺の胸腺細胞には発現しておらずCD 3⁻の胸腺細胞の一部に発現していた。現在、IMT-1抗原の同定および胸腺細胞の分化における役割を解析しつつある。

G. 重症筋無力症（MG）

MGの治療法として、胸腺摘出術が非常に有効である。MGの胸腺には正常の胸腺には存在しない筋様細胞が存在し、アセチルコリン受容体を発現していることが知られている。さらに、MGの胸腺には正常胸腺には存在しないリンパ濾胞（GC）がしばしば観察される。われわれはMGの胸腺のGCに発現している分子の検索及びGCのT細胞、B細胞の抗原受容体のV領域遺伝子の解析を行っている。さらに、アセチルコリン受容体に反応する胸腺内T細胞株し、そのT細胞抗原受容体のV領域遺伝子の解析も行っている。

H. 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 SCID 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 SCID マウスの胸腺細胞上にはトランスジェニックの $\alpha\beta$ TCRのみが発現しており、ポジティブセレクション、ネガティブセレクションによる細胞集団の動きを内因性の $\alpha\beta$ TCRの影響を受けることなくCD 4、CD 8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、ポジティブセレクションあるいはネガティブセレクションを誘導するかを検討している。

I. 癌の効果的免疫学的治療法の開発

1) 癌組織浸潤性T細胞 (TIL)

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障害性T細胞 (CTL) クローン (CD 3+, CD 4-, CD 8+, 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障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率的にしてくれるものと予想される。現在、CD 4陽性Tヘルパー細胞クローンの樹立をおこなっている。

2) 末梢血リンパ球

癌患者より樹立された自家癌細胞株に対して自家末梢リンパ球より自家癌細胞特異的なCTL,

Th細胞株が *in vitro* で効率よく誘導することができれば癌免疫療法ばかりではなく免疫系における抗原提示及びT細胞の抗原特異性の獲得のメカニズムの解明にも貢献するものと思われる。抗原の提示においてマクロファージ (MΦ), 樹状細胞 (DC細胞) 等が関与しており, これらの細胞が共同することにより, 取り込み, 処理された抗原のペプチドを MHC 分子と結合させ, それらを細胞表面に提示することにより T細胞を刺激する事が示唆されている。さらに, サイトカイン (GM-CSF, IL-4) の刺激により末梢血単球より MΦ, DC様細胞を誘導・培養することが出来る。以上のことは, 末梢血単球を適当なサイトカインなどにより刺激した後, 自家癌細胞株または共通癌抗原ペプチドを抗原として用いて抗原特異的 T細胞の誘導が可能であるとおもわれる。現在, 九大・産婦人科との共同研究にて自家癌細胞株 (子宮頸部腺癌株, SiSo) が樹立されている外来患者末梢血リンパ球を用いて自家癌細胞株特異的 T細胞の誘導を試みている。また, メラノーマの共通癌抗原として HLA-A 1 分子に結合しているペプチドが報告されており, すでに樹立されたメラノーマ細胞株のうち HLA-A 2 分子を発現している M M-8 株より HLA-A 2 分子に結合している抗原ペプチドを分離し, HLA-A 2 を共通に発現しているアロの末梢血リンパ球を用いて HLA-A 2 拘束性のメラノーマ共通癌抗原特異的 CTL の誘導を試みている。

3) 癌抗原の同定・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事である。

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により, 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。

4) 癌細胞増殖抑制・致死抗体の作成

正常ヒト末梢血リンパ球の一部に発現している Fas/APO-1 抗原を認識する抗体は抗原と結合することにより補体非存在下で細胞死 (アポトーシス) を誘導することが知られている。この抗原は TNF/NGF レセプターファミリーに属している。我々は, 癌細胞においても Fas/APO-1 抗原と同様にリガンドによる細胞死又は増殖抑制をきたす可能性がある抗原の発現を検討するために, 樹立した細胞株を免疫原として用いて細胞死又は増殖抑制抗体の作成を試みている。また, 癌特異的反応性抗体の作成は, 癌の診断・免疫学的治療及び経過観察等において相乗的, 補助的な役割を担うことが期待される。すでに, SiSo細胞株を免疫原として用い, 子宮頸部腺癌細胞株 (HeLa, CAC-1) に比較的特異性のあるモノクローナル抗体を幾つか樹立し, 現在, 九大・産婦人科との共同研究でこれら抗体の認識抗原の組織分布を検討している。

原著論文 (1992年度)

1. Okabe, T., Watanabe, T., Kudo, A., 1992.
A pre-B and B cell specific DNA binding protein, EBB-1, which binds to the promoter of the VpreB1 gene. *Europ. J. Immunol.* 22 : 37-43.
2. Nakashima, M., Watanabe, T., Koprowski, H., Schuchter, L., Steplewski, Z., 1993.
In vitro expansion of melanoma specific, HLA restricted CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Cellular Immunol. Immunotherapy.* (in press).
3. Hosono, M., Endo, K., Sakahara, H., Watanabe, Y., Saga, T., Nakai, T., Kawai, C., Matsu-moto, A., Yamada, T., Watanabe, T., Konishi, J., 1992.
Human/mouse chimeric antibodies show low reactivity with human anti-murine anti-bodies (HAMA). *British J. Cancer*, 65 : 197-200.
4. Ariyasu, T., Kimura, N., Kikuchi, M., Kohno, K., Sugawara, K., Watanabe, T., Minowada, J., 1991.
Induced natural killer-like cytotoxic function in the TCR δ -1 positive human leukemic T-cell lines.
LEUKEMIA, 5 : 807-821.
5. Ichiki, T., Takahashi, W., Watanabe, T., 1992.
The effect of cytokines and mitogens on the induction of C ϵ germline transcripts in a human Burkitt lymphoma B cell line. *International Immunology*, 4 : 747-754.
6. Ichiki, T., Takahashi, W., Watanabe, T., 1993.
Regulation of the expression of human C ϵ germline transcript; Identification of a novel IL-4 responsive element. *J. Immunology*, 150 : 5408-5417.
7. Moriyama, K., Mohri, S., Watanabe, T., Mori, R. 1992.
Latent infection of SCID mice with herpes simplex virus I and latent cutaneous lesions in pregnancy. *Microbiol. Immunol.* 36 : 841-853.
8. Nakashima, M., Koprowski, H., Steplewski, Z., Watanabe, T. 1993.
HLA-B restricted, CD8+ cytolytic human T cell clones derived from a melanoma lymph node. *Cellular Immunol.* (in press)
9. Arakawa, F., Haruno, M., Kuroki, M., Kanda, H., Watanabe, T., Misumi, Y., Matsuoka, Y., 1993.
Construction and expression of two mouse-human chimeric antibodies with high specificity and affinity for carcinoembryonic antigen. *Hybridoma*, 12 : 365-379.
10. Yamanashi, Y., Okada, M., Semba, Y., Yamori, T., Umemori, H., Tsunasawa, S., Toyoshi-ma, K., Kitamura, D., Watanabe, T., Yamamoto, T. 1993.

- Identification of HS 1 protein as a major substrate of protein-tyrosine kinase upon B cell antigen receptor-mediated signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 : 3631-3635.
11. Takeda,S., Zou, Y-R., Bluethmann,H., Kitamura,D., Muller,U., Rajewsky,K. 1993.
Deletion of the immunoglobulin κ chain intron enhancer abolishes κ chain gene rearrangement *in cis* but not λ chain gene rearrangement *in trans*. EMBOJ., 12 : 2329-2336.
 12. Ehlich,A., Schaal,S., Gu,H., Kitamura,D., Muller,W., Rajewsky,K. 1993.
Immunoglobulin heavy and light chain genes rearrange independently at early stages of B cell development. Cell, 72 : 695-704.
 13. Kitamura,D., Kudo,A., Schaal,S., Muller,W., Melchers,F., Rajewsky,K., 1992.
A critical role of $\lambda 5$ protein B cell development. Cell, 69 : 823-831.
 14. Kitamura,D., Rajewsky,K., 1992.
Targeted disruption of the membrane exon of the μ chain results in loss of heavy chain allelic exclusion. Nature, 356 : 154-156.