九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

[001]九州大学生体防御医学研究所年報 : 1982-1985年

https://hdl.handle.net/2324/2186206

出版情報：九州大学生体防御医学研究所年報. 1, pp.1-, 1986. Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University
バージョン：
権利関係：

感染防御学部門

Department of Molecular Immunology

感染防御学部門は昭和60年4月より，生医研に新たにスタートした部門である。当面は細胞工学的手法を応用して免疫学研究を行うことを主たる目的としている。
開設当初のスタッフは以下の如くである。

教　授：渡辺　武
助教授：杉村和久
助　手：工藤　明，山崎則行
大学院生（佐賀医大大学院からの特別聴講学生）
　　　：荒木和男，北村大介，本村光明，緋田めぐみ，横山正俊
研究生：前田浩明，西村有史，内藤　勉，志水　浩

本部門ではヒトおよび動物における免疫応答機構を細胞レベルおよび分子レベルにおいて解明することを目的とし，それによって免疫異常症や免疫不全症の原因と治療法についての研究を進めたいと考えている。その方法論としては，細胞融合などの細胞工学的手法と組み換えDNA法を利用した手法を用いている。昭和60年度は主として以下の4つの項目について研究成果を得た。

A．免疫グロブリン遺伝子の発現機構の解析

すべての細胞にとって必須であるような蛋白をコードしている，いわゆるhouse-keeping genesは別として，多くの遺伝子が細胞特異的あるいは分化過程特異的に発現する。このような遺伝子の特異的発現の解明は，分子生物学における重要な課題である。免疫グロブリン遺伝子は細胞特異的発現を研究するうえで格好のモデルである。免疫グロブリン遺伝子の再配列は，B細胞系列の細胞内のみで起こるうえに最近の研究から再配列を終えた活性型の免疫グロブリン遺伝子であってもB細胞（抗体産生細胞）内のみで発現し，他の細胞内に移入された場合，その発現は一般に起こらない。われわれは，ヒトγ_1鎖をコードするヒト免疫グロブリン全領域を含む遺伝子のクローニングを行い，その塩基配列を決定するとともにマウスの種々の細胞に導入し，その発現について調べた。その結果，抗体産生細胞核内には免疫グロブリン遺伝子の発現を促進する因子(expressor)とそれを抑制する因子(repressor)が存在することが示唆された。

a．ヒトγ_1鎖遺伝子の構造

ヒトIgG産生性形質細胞腫ARH-77細胞よりDNAを抽出し，EcoRIにより切断した後，

ファージライブラリーを作製した。J_Hプローブを用いてplaque hybridizationを行い，21kbpの長さのヒトγ_1鎖遺伝子の全領域を含むクローン(HIGl gene)を得た。HIGl遺伝子は，V_{ARH}遺伝子がJ_6において VDJ recombination を形成している。D-segment は31塩基10アミノ酸から構成されている。V_Hは DNA 塩基配列より規定されたアミノ酸配列からヒト免疫グロブリンH鎖のサブグループIIに属するものである。V遺伝子から約5 kb 下流にC領域遺伝子があり，さらに下流に membrane exon が存在する。

b．エンハンサー領域

J_6領域から約1 kb 3′側にエンハンサー領域と呼ばれる特異な配列が存在する。免疫グロブリン遺伝子のエンハンサー領域はマウスK鎖，マウスH鎖，ヒトH鎖についてすでに報告があり，HIGlにもマウスH鎖のエンハンサー領域の塩基配列と高いhomologyを示す領域が存在する。

c．5′flanking 領域における conserved sequence

HIGl 遺伝子の leader exon の上流には，CACAT という RNA ポリメラーゼの cap site，TATA box様の配列のほかにその上流60bpのところにATGCAAATという免疫グロブリンV_H鎖のすべての遺伝子に共通して見い出される配列が存在する。この配列は前記のエンハンサー領域とともに免疫グロブリン遺伝子の発現（細胞特異的発現）に深いかかわりを有すると考えられている。

d．HIGl 遺伝子のマウス骨髄腫細胞での発現

HIGl 遺伝子をベクターpSV 2 gpt の EcoRI site に組み込み，protoplast fusion によりマウス細胞へ transfect させた。マイコフェノール酸による選択を行って HIGl を組み込んだ細胞（transformants）を選びだした。マウス骨髄腫細胞 NSI あるいは J558細胞に HIGl を組み込んだ場合，HIGl 遺伝子の発現が強く起こり，マウス骨髄腫細胞中に大量のヒトγ鎖の mRNA の合成が得られ，ヒト免疫グロブリンを産生するマウス骨髄腫細胞が得られた。合成されてくるヒトγ鎖 mRNA 量は親細胞である ARH-77細胞の mRNA 量の50－100倍量に達し，このようにして得られる細胞では大量のヒト免疫グロブリンを産生させうることがわかる。

e．マウス線維芽細胞内における HIGl 遺伝子の抑制と発現

HIGl 遺伝子を protoplast fusion 法でマウス線維芽細胞（L細胞）に導入しても，HIGl 遺伝子の発現は起こらない。この細胞（HIGl-L 細胞）をサイクロヘキシイミド（CX）で短時間処理した。CX 処理後，細胞内の mRNA を Northern blotting で調べたところ，CX 処理後 HIGl 遺伝子の発現が誘導され，ヒトγ鎖をコードする mRNA の合成が引き起こされることがわかった。ほとんど mRNA の合成がなかった細胞に大量にヒトγ鎖 mRNA の合成が誘導されたことから，1つの仮説として CX により labile な repressor 蛋白の合成が阻害されたため，

repressor による遺伝子発現の抑制が解除され，そのために rearrenged gene である HIGl 遺伝子の発現が生じたものと考えられた。

すなわち，線維芽細胞中にも免疫グロブリン遺伝子のエンハンサーを認識してそれを発現させる機構は active に存在すると考えられ、その発現が実際にほとんど起こらないのは，transacting なレプレッサー因子の存在によると考えられた。

一方，正常マウス骨髄腫細胞より核を調製し，これより核蛋白を抽出し，得られた核蛋白を赤血球ゴースト内に封入し，核蛋白を封入した赤血球ゴーストをポリエチレングリコールにより HIGl-L 細胞に大量細胞融合して，核蛋白を HIGl-L 細胞へ注入した。注入後，一定時間ごとにRNAを抽出し，Northern blottingを行ったところ，HIGl-L細胞中にヒトγ鎖をコードする mRNA の合成が誘導されてきた。このことは，骨髄腫細胞核蛋白中に免疫グロブリン遺伝子の発現を誘導する transacting な因子が存在することを示唆している。

われわれのシステムは生きた細胞を用いてこれらの制御因子の解析を行うのに適していると考えられ，現在これらの因子の性状を解析中である。

B．組み換え DNA 法によるキメラ抗体作成と応用

マウスモノクロナール抗体を癌免疫療法などに用いる試みは，すでに始められているが，臨床に用いるためにはマウスモノクロナール抗体自身がヒトのなかで抗原性を示すことが問題となる。マウスモノクロナール抗体のなかではV蛋白はほとんど抗原性を示さずC蛋白にその抗原性がある。実際にその報告例は少ないが95％はC蛋白由来でV蛋白由来は５％であったという知見が得られている。したがってC領域はヒトであればほとんど抗原性を示さないと思われる。

われわれは抗ヒト白血病リンパ腫の共通抗原を認識している抗体産生マウスハイブリドーマ NL-1から，そのV領域の遺伝子をクローニングし，ヒトエンハンサーを介して先にクローニングしたヒト$C\gamma_1$遺伝子と結合した。キメラ遺伝子は pSV 2 gpt の EcoRI-BamHI サイトに挿入し，プロトプラスト融合法によってマウス骨髄腫細胞 J588L に導入した。L鎖も同様に組み換えて導入した。得られた stable transformant を調べたところ，その上清中に H_2L_2の形で分泌されており，その量は元のハイブリドーマより数倍多かった。また，この stable transformant を Balb／c マウスに投与したところ，その腹水中からキメラ抗体が得られた。

C．免疫抑制性因子をコードする遺伝子のクローニング

我々の研究室にてハプテン（フォスホリルコリン，以下PCと略す）抗原特異的に免疫反応（抗体産生）を抑制するようなサプレッサー因子（以下，PC-TsF と略す）を分泌しているマウスハイブリドーマを確立した。この PC-TsF 産生性ハイブリドーマの mRNA を用いて cDNA ライブラリーを Okayama-Berg 法にて作製した。得られた cDNA ライブラリーから親細胞の mRNA とハイブリダイズするクローンを除去した後，それぞれの cDNA クローンを用いて

hybridation translationアッセイをXenopus oocytesとin vitro抗体産生系を用いて行った。その結果，PC-TsFの一部をコードすると考えられるcDNAクローン（p 6 − 5）を得た。p 6 − 5でコードされるmRNAはPC-TsF産生性ハイブルドーマでは強く発現されているが，非産生性ハイブリドーマあるいは融合パートナーの親T細胞株には発現されなかった。PC-TsF産生性ハイブリドーマのmRNAのXenopus oocyteでの翻訳産物は強いPC-特異的抑制活性を示すが，p 6 − 5クローンにハイブリダイズするmRNAを除去すると，その活性は消失する。現在p 6 − 5クローンの性状について解析中である。

D．種々のモノクロナール（マウスおよびヒト型）の確立

他の研究室との共同研究により，種々の蛋白抗原，腫瘍抗原，細菌抗原に対するマウス型およびヒト型のモノクロナール抗体を作製した。また，Electro-fusionを用いてハイブリドーマの確立および遺伝子導入の条件を検討し，実用化の条件を決めた。

原　著　論　文（1985年度関係）

1. A. Kudo, T. Ishihara, Y. Nishimura and T. Watanabe : Expression of cloned human immunoglobulin heavy chain gene with a novel direct repeat sequence in 5′ flanking region and an enhancer element in J-C region. Gene 33 : 181−189, 1985
2. T. Ishihara, A. Kudo and T. Watanabe : Induction of Immunoglobulin gene expression in mouse fibroblasts by cycloheximine-treatment. J. Exp. Med. 160 1973−1979, 1984
3. T. watanabe, H. Maeda, A. Kudo, T. Ishihara, J. Ohara, D. Kitamura : Microinjection of cytoplamic and nuclear factors into cells of the immune ststem-A new technique and its application in immunology. Lymphokines 12 : 239−257, 1985
4. A. Kudo, Y. Nishimura and T. Watanabe : The antibody molecule to common acute lymphocytic leukemia（cALL）antigen used the identical or closely related V gene segment as that of MOPC-21 immnoglobulin heavy chain. J. of Immunology 135 : 642−645, 1985
5. K. Sugimura, N. Yamasaki, M. Matuura and T. Watanabe : The cloning of the gene coding for antigen-specific T-cell supressor factor. I. The isolation of a cDNA encoding for a functional polypeptide chain of phoshorylcholine-specific T-cell suppressor factor. Eur. J. Immunology 15 : 837−880, 1985
6. H. Saito, T. Ishihara, H. Suzuki and T. Watanabe : Production and characterization of a murine monoclonal antibody against heavy chain of Hageman factor（factor Ⅻ）. Blood 65 : 1263−1268, 1985
7. Y. Ura, Y. Ochi, M. Hamazu, M. Ishida, K. Nakajima and T. Watanabe : Studies on circulating antibody against carcinoembrynic antigen（CEA）and CEA-like antigen in cancer patients. Cancer Letters 25 : 238−295, 1985

8. T. Miyazaki, H. Koga, M. Nakashima, A. Tomonaga, S. Kohno, M, Hirota, A. Saito K. Hara and T. Watanabe : Production of Monoclonal antibodies against Legionella pneumophilla Serogroup I. Microbiol. Immunol. 29 : 275−284, 1985
9. T. Watanabe, M. Hirata, Y. Yoshikawa, Y. Nagafuchi, H. Toyoshima and T. Watanabe : Role of macrophages on Atherosclerosis. Sequential observation of cholesterol induced rabbit aortic lesion by the immunoperoxidase technique using monoclonal antimacrophage antibody. Laboratory Investigation 53 : 80−90, 1985
10. T. Maeda, T. Eda, K. Nishiyama, Y. Ishikawa, A. Tashiro and T. Watanabe : Production of stable mouse x human hybridoma secreting HBs antigen-specific human monoclonal antibody by using in vitro sensitization. Hybridoma 5 : 33−41, 1985
11. T. Endo, K. Imai, A. Yachi, K. Nakajima and T. Watanabe : Immunohistologic distribution of CEA defined by human anti-CEA antibody in the serum of a colonic cancer patient. Cancer 56 : 2205−2211, 1985
12. K. Yamamura, A. Kudo, T. Ebihara, K. Kamino, K. Araki, Y. Kumahara and T. Watanabe : Cell-type-specific and regulated expression of human γ_1 heavy-chain immunoglobulin gene in transgenic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. 83 : 2152−2156, 1986
13. H. Maeda, D. Kitamura, A. Kudo, K. Araki and T. Watanabe : Trans-acting nuclear protein responsible for induction of rearranged human immunoglobulin heavy chain gene. Cell 45 : 25 -33, 1986