



Specific inhibition of class II MHC gene expression by anti-sense RNA

幡野, 雅彦

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1989-09-27

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1337

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001337>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	はた の まさ ひこ 幡 野 雅 彦 (山梨県)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博ろ第1100号
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位授与の日付	平成元年9月27日
学位論文題目	Specific inhibition of class II MHC gene expression by anti-sense RNA (アンチセンスRNAによるクラスII主要組織適合抗原の 発現抑制)

審査委員	主査 教授 徳 久 剛 史
	教授 伊 東 宏 教授 本 間 守 男

論文内容の要旨

《はじめに》

クラスII主要組織適合抗原(Ia抗原)はヘルパーT細胞の抗原認識分子として重要な役割を担っていることが明らかにされている。しかしT細胞の抗原レパートリー形成やセルフトレランスの成立におけるIa抗原の役割についてはいまだに明らかにされていない。この問題を明らかにするために、は個体発生の初期より生体内でIa抗原の発現を人為的に調節できるシステムの開発が望まれる。Ia抗原を構成する分子としてI-AおよびI-E分子が知られている。これらはいずれも α 鎖および β 鎖のヘテロダイマーよりなり α 鎖および β 鎖のみでは細胞表面に表現されない。また遺伝的にI-E分子の欠失したマウスが存在する。そこでI-E分子の欠失したマウスにおいてI-A分子のいずれか一方の鎖の産生を抑制してI-A分子の発現を抑えることによりIa抗原のないマウスが作成できる。I-A分子の β 鎖の発現を特異的に抑制する方法としてアンチセンスRNAを用いる。ここでは、Ia抗原のないマウスを作成するための第一段階としてIn Vitroの系においてアンチセンスRNA法を用いてI-A分子の発現を調節できるシステムを確立した。

《方 法》

1. I-A β 鎖遺伝子に対するアンチセンスRNA発現ベクターの作成

BALB/cマウス由来のI-A β 鎖genomic DNAより5'非翻訳領域とATG開始コドンを含む100bpをサブクローニングした。この100bpをヒトメタロチオネイン遺伝子のプロモーター(MTIIa)の支配下にジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)cDNA遺伝子の下流にセンス及びアンチセン

スの向きに組み換えた (PMTDH 5'100/s or as)。細胞への遺伝子導入後の選別マーカーとしてNeo耐性遺伝子を用いた。また、アンチセンスとして用いる遺伝子の部位として他に ①5'非翻訳領域100bpを含むさらに長い310bp (PMTDH310) ② β 1ドメインをコードする約500bpの部位 (PMTDH β 1) ③polyA付加シグナルを含む3'非翻訳領域約250bp (PMTDH3')を選んだ。また、5'UT100bp及び3'UTについては、DHFR cDNA遺伝子を含まないアンチセンスRNA発現ベクターも同時に作成した (PMT5'100, PMT3')。

2. 遺伝子導入

作成した各アンチセンスRNA発現ベクターをBALB/cマウス由来でIa抗原陽性のB細胞リンパ腫 (M12.4) に、プロトプラスト融合法で遺伝子導入した。細胞融合後、500 μ g/mlのG418を含む選択培地で培養し、安定なトランスフェクタントを得た。得られたトランスフェクタントをさらに、限界希釈法にてクローン化した。

3. トランスフェクタント細胞表面上のIa分子の量の半定量

5×10^5 の細胞をビオチン化モノクローナル抗I-A^b及び抗I-E抗体とFITC結合アビジンにて染色し、FACSにて細胞表面のIa抗原の量を半定量した。

4. 粗RNAの抽出

1×10^6 のトランスフェクタントより、グアニジン法にて粗RNAを抽出し、吸光度計で定量した。

5. ノザンプロット法

20 μ gの粗RNAを1%ホルムアルデヒド-アガロースゲルにて分離しニトロセルロースフィルターに転写した。これらのフィルターの上のRNAに³²Pで末端標識したオリゴマーまたはランダムプライマーで標識したSV40polyAシグナルをプローベとしてハイブリダイゼーションを行った。42℃で一晩ハイブリダイゼーション後、1%SDS加1×SSCで55℃、30分洗浄し、オーストラジオグラフィーを施行した。

6. 抗原提示能 (APC活性) の測定

マイトマイシンCで処理した各トランスフェクタントをI-A^d拘束性卵白アルブミン (OVA) 特異的T細胞ハイブリドーマ (3DO-54-8) とともに、OVA存在下、および非存在下で2日間培養し、培養上清中のIL-2産生量を測定した。

＜結 果＞

1. I-A β に対するアンチセンスDNA遺伝子導入によるI-A分子発現の特異的抑制

I-A β 鎖をコードするgenomicDNAの5'UT側約100bpのアンチセンスSNA発現ベクター (PMTDH 5'100/as) を遺伝子導入したトランスフェクタントでは約3分の1のクローンにおいて細胞表面のI-A分子の量がM12.4細胞のI-A分子の量の5%以下に減少していた。一方、同じ部位のセンスSNAの発現ベクター (PMTDH 5'100/s) を遺伝子導入したトランスフェクタントでは、細胞表面のI-A抗原の量がコントロールの20%以下に抑制されたクローンは得られなかった。また同じトランスフェクタント上のI-E分子の量はコントロールと比べて変化がなかった。これらのことより、I-A β 鎖の5'UT100bpに対するアンチセンスRNAより特異的にI-A分子

の発現を抑制できることが示唆された。

2. アンチセンスとして用いる I-A β 鎖遺伝子部位と I-A 分子発現抑制効果

PMTDH 5'100/as, PMTDH 5'310, PMTDH 3'などを M12.4細胞へ遺伝子導入して得られたクローンでは、いずれも約 1/3 のクローンにおいて細胞表面の I-A 分子の量が M12.4 の I-A 分子の量の約 10% 以下に減少していた。これに対して PDHMT β 1 を遺伝子導入して得られたクローンでは細胞表面の I-A 分子の量の低下したものは得られなかった。このことより、アンチセンス RNA による遺伝子発現抑制機序にはアンチセンスとして用いる遺伝子の部位が重要でありかつ I-A β 鎖遺伝子では 5'UT 領域及び 3'UT 領域が発現抑制効果をしめすことが示唆された。

3. I-A 分子発現抑制に及ぼす DHFR 遺伝子部位の効果

I-A β 鎖遺伝子の 5'UT100bp 及び 3'UT250bp を NT II a プロモーターの支配下に直接アンチセンスの向きにつなぎ、DHFR のないアンチセンス RNA 発現ベクターを作成した (PMT 5'100, PMT 3')。これらを M12.4細胞へ遺伝子導入して得られたクローンではいずれも I-A 分子の量の抑制は見られなかった。このことよりアンチセンス RNA による遺伝子発現抑制効果にとって DHFR が重要であることが示唆された。

4. アンチセンス RNA 量と I-A 分子発現抑制との相関

PMTDH 5'100/as を遺伝導入して得られたトランスフェクタントクローンについて外来性アンチセンス RNA 及び内在性 I-A β 鎖センス RNA の発現量をそれぞれの RNA と特異的に反応する合成オリゴプローブを用いたノザンプロットにて検出した。さらにデンストメーターにて各クローンのメッセージの発現量を測定したところ センス RNA とアンチセンス RNA の量比が I-A 分子発現抑制の割合と相関していた。

5. トランスフェクタントにおける抗原提示能 (APC 活性) と細胞表面 I-A 分子の量との相関

各トランスフェクタントの細胞表面 I-A 分子の量と APC 活性の間には相関関係が認められた。また I-A 分子の量が M12.4細胞の I-A 分子の量の 20% 以下に減少したクローンでは T細胞ハイブリドーマへの APC 活性が全く認められなかった。

《考 察》

In vitro において I-A 分子の発現を調節できるアンチセンス RNA のシステムを確立した。この系では I-A β 鎖遺伝子の 5'側及び 3'側をアンチセンスとして用いると有効であったが、 β 1ドメイン部では効果がなかった。PMTDH β 1 プラドスミドを遺伝子導入したトランスフェクタントではアンチセンス RNA は転写されていた。このことよりこの部位のアンチセンス RNA では、有効にセンス RNA と 2 本鎖を形成できないと考えられる。また他の報告でもアンチセンスとして有効な遺伝子の部位は各遺伝子により異なっている。これらの実験結果は、アンチセンス RNA 法により遺伝子の発現を調節しようとするとき、それぞれの実験系において最も効率よく遺伝子発現を抑制できるアンチセンス部位を決めなければならないことをよく示唆している。さらに、DHFR のないアンチセンス RNA 発現ベクターは I-A 分子発現抑制効果がなかった。そしてこのトランスフェクタントではアンチセンス RNA が検出できなかった。このことより DHFR 部を含まないアンチセンス

RNAは、細胞内で不安定であることが示唆された。このようにアンチセンスとして用いる遺伝子の長さもそのRNAの安定性に重要であることが示唆された。

各アンチセンスRNAによるI-A分子発現抑制の効率はほぼ同じで、いずれも約1/3のクローンでM12.4のI-A分子の量の10%以下に抑制している。しかし、I-A分子を全く表現していないクローンは得られなかった。このことよりアンチセンスRNAによって遺伝子発現を完全に抑制することは困難であり、多くて99~95%まで抑制出来ると考えられる。

真核細胞におけるアンチセンスRNAによる遺伝子発現抑制のメカニズムについては不明の点が多い。現在までに、アンチセンスRNAがセンスRNAと2本鎖を形成してタンパク質への翻訳を阻止するという可能性、センスアンチセンスの2本鎖が核内で分解されるという可能性などが考えられている。本システムでは細胞質内よりセンスRNAとアンチセンスRNAが検出でき、またセンスRNAとアンチセンスRNAの量比とI-A分子発現抑制の割合の間に相関があったことより、センスアンチセンスの2本鎖形成によりセンスRNAのタンパク質への翻訳が阻止されているものと考えられた。

各トランスフェクタントのI-A分子の量とT細胞への抗原提示能(APC活性)の間には相関が認められた。またI-A分子の量がコントロールの20%以下に低下すると、APC活性を示さなかったことより、T細胞を刺激するに必要なI-A分子の量にはある閾値が存在する事が示唆された。このことよりI-A分子を完全に抑制できなくても閾値レベル以下にする事により、生物学的にその機能を変換しうることが期待される。さらにin vivoでのIa抗原の機能を調べるために、これらのアンチセンス遺伝子をもつトランスジェニックマウスを作成している。

論文審査の結果の要旨

クラスII主要組織適合抗原(Ia抗原)は、B細胞やマクロファージ細胞上にあり、T細胞が抗原を認識するときに抗原とともに認識される分子であることが明らかにされている。しかし、免疫系が自己抗原に対しては反応しない状態、いわゆる自己免疫寛容の成立におけるIa抗原の役割についてはいまだに明らかにされていない。この問題を明らかにするためには個体発生の初期より生体内でIa抗原の発現を人為的に調節できるシステムの開発が望まれる。すなわちIa抗原の発現が調節された個体における自己免疫寛容状態を検索することにより上記の疑問が明らかにされる。そこで本研究は、上記の目的への第一段階としてIn vitroの系を用いてIa抗原の発現を調節できるアンチセンスRNA法の確立を試みた。

方法は、BALB/cマウス由来のI-A β 鎖genomic DNAよりいろいろの部位をサブクローニングした。このDNAをヒトメタロチオネイン遺伝子のプロモーターの支配下にセンス及びアンチセンスの向きに組み換えた。作製した各アンチセンスRNA発現ベクターをBALB/cマウス由来でIa抗原陽性のB細胞リンパ腫(M2.4細胞)に、プロトプラスト融合法で遺伝子導入した。遺伝子導入したトランスフェクタントの細胞表面上のIa抗原の量をFACSにて半定量した。また、アン

センスRNAの存在は、トランスフェクタントからグアニジン法にて粗RNAを抽出し、ノザンブロット法で定性したのち、デンストメーターにて半定量した。

その結果、I-A β 鎖をコードするgenomic DNAの5'UT側約100bpをアンチセンスRNAとして用いた場合、細胞表面のIa抗原の量がM12.4細胞のIa抗原の量の5%以下に減少していた。一方、同じ部位をプロモーターに対してセンスの向きに組み換えたコントロール遺伝子を導入しても細胞表面のIa抗原の量は抑制されなかった。また、I-A β 鎖の3'UT側約250bpをアンチセンスRNAとして用いてもIa抗原の発現を抑制できた。しかし、スプライシングシグナルを含む β ドメイン部約510bpをアンチセンスRNAとして用いても細胞表面のIa抗原の量の低下したトランスフェクタントは得られなかった。このことから、アンチセンスRNAによる遺伝子発現抑制機序にはアンチセンスとして用いる遺伝子の部位が重要であり、かつI-A β 鎖遺伝子では5'UT領域および3'UT領域が発現抑制効果を示すことが明らかにされた。

次に、アンチセンスRNAの量とIa抗原発現抑制能との相関について外来性アンチセンスRNAの発現量をそれぞれのRNAと特異的に反応する合成オリゴマーをプローベとして用いたノザンブロット法にて検索した。その結果、センスRNAとアンチセンスRNAの量比がIa抗原発現抑制の割合と相関していた。このことからアンチセンスRNAの発現量が多ければ多いほどその発現抑制も強いことが明らかとなった。

さらに、実際に細胞表面のIa抗原の低下がその細胞の機能にどの程度影響しているのかをIa抗原陽性細胞のT細胞への抗原提示能で調べた。その結果、各トランスフェクタント細胞表面のIa抗原の量がM12.4細胞のIa抗原の量の20%以下に減少した細胞ではいずれもT細胞への抗原提示能活性が全く認められなかった。

以上明らかなように本研究は、Ia抗原の自己免疫寛容誘導における役割を明らかにする研究目的の第一段階としてIn vitro系においてIa抗原の発現を調節できるアンチセンスRNAのシステムを開発したものである。その中で効率よくIa抗原の発現を調節する遺伝子の部位を明らかにしたことやIa抗原はその発現が80%抑制されるとT細胞への抗原提示能がまったく消失することなどの重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認める。