Osaka University Knowledge Archive

Title	レトロウイルスを使ったマウスーヒトキメラ抗体遺伝子の作成
Author(s)	武田, 俊一
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34638
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【21】

氏名・（本籍）	武田俊一（たけだ しゅんいち）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 6815 号
学位授与の日付	昭和60年3月25日
学位授与の要件	医学研究科 生理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**レトロウイルスを使ったマウス－ヒトキメラ抗体遺伝子の作成**
論文審査委員	（主査） 教授 近藤 宗平 （副査） 教授 濵岡 利之 教授 岸本 進

論文内容の要旨

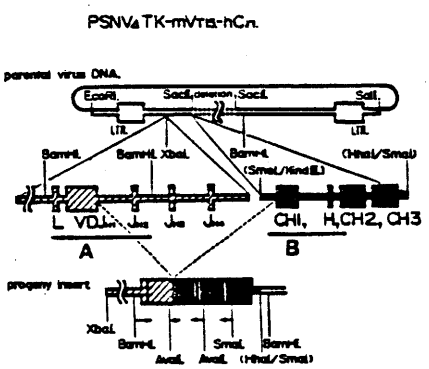
（目　的）

ヒト癌組織に対するモノクローン抗体は，一般にマウスに免疫して作られる。この抗体を癌患者の治療に応用する場合，抗マウスイムノグロブリン抗体が患者体内に誘導されるという問題がある。しかしマウスモノクローン抗体の定常部をヒトのそれに置換できれば，この免疫反応の軽減を期待できる。このマウス－ヒトキメラ抗体を大腸菌などで生産するためのキメラ抗体遺伝子の作成を実験の目的とした。ところで，有核細胞のゲノムは，1つの遺伝子の中の最終的にタンパクに翻訳される部分（＝エキソン）が多くの場合，イントロンと呼ばれる配列に分断されているが，大腸菌などの原核細胞のゲノムにはイントロンがない。そして前者の遺伝子が形質発現する際には，エキソンがイントロンとともにひとつながりのRNAに転写された後，RNAスプライシングと呼ばれる過程によりイントロンのみが除去される。ところが，大腸菌の遺伝子発現系ではこの過程が存在しないのでマウス－ヒトキメラ抗体遺伝子を大腸菌で発現する時には，由来の異なる2種の遺伝子すなわちマウス免疫グロブリン遺伝子のV領域とヒト免疫グロブリン遺伝子C領域をイントロンのない1つの遺伝子として結合したものを用意しなければならない。本研究ではレトロウイルスベクターを用いてイントロンのないマウス－ヒトキメラ抗体遺伝子を作成した。

（方　法）

レトロウイルスは，1本鎖RNAウイルスでRNA ①→DNA ②→RNAの生活環を持つが，②は宿主と同じ転写様式をとるので，もしウイルスゲノムにイントロンを持つ外来遺伝子を挿入すると，この過程で宿主のスプライシングを受け，①の逆転写の段階を経て，イントロンが除去されたDNAがで

きる。そこで，トリ Spleen necrosis virus 由来のベクターにマウスミエローマ，TEPC15由来のH鎖可変領域遺伝子，V_{T15}，Xba I 断片 4.75 kb とヒト $C_{\gamma 1}$ 遺伝子 Hind Ⅲ - Hha I 断片 2.2kb を挿入した組み換えレトロウイルス DNA を作成した（図－1）。これをヘルパーウイルス（Reticuloendotheliosis virus type A）とともに鶏胎児線維芽細胞に Ca-Phosphate 法でトランスフェクトした後，約1週間後にウイルスを含む培養上清を新しい培養細胞にかけ，その感染細胞より Hirt 法により逆転写されたウイルス2本鎖 DNA を回収した。図－2. レーン1，4は図－1の組み換えウイルス DNA を BamH 1 で切断したもの，レーン2，5は Hirt 法で回収した DNA，レーン3，6はそれを Bam H1 で切断したものをそれぞれ 0.8％アガロースゲルに流した後，図－1のA，Bのプローブでそれぞれ Southern blot hybridization をおこなったものである。レーン3，6の 1.7 kb のバンドがスプライスにより生じたキメラ抗体遺伝子と考えられる。この 1.7 kb ふきんの DNA をゲルから回収し，λファージベクターを使ってキメラ抗体遺伝子をクローン化し，図－1の矢印で示した部分の DNA 塩基配列を決定した。

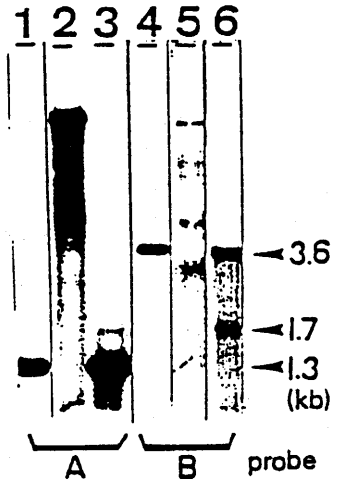


図－1. 斜線部はマウス V_{T15}，黒塗り部分はヒト $C_{\gamma 1}$ 遺伝子を示し，その中の太い部分はエキソンを示す。最下段は，Hirt法で回収されたキメラ抗体遺伝子を示す。

B

	T V S S A
mouse V_{T15}	ACCGTCTCCTCAGGTAAGCTGGCT
human $C_{\gamma 1}$	ACCTCTCTTGCAGCCTCCACCAAG
	S T K
processed DNA	ACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAG

図－3. 下線はスプライスコンセンサスサイト。



図－2.

（結　　果）

ヒト $C_{\gamma 1}$ 遺伝子内とマウスV－ヒトC遺伝子間で，GT－AG ルールにより予想されたスプライシングが起こった（図－3）。由来の異なるV，Cの他の種々の組み合わせにおいても同様の結果が得られた。今回の実験で由来の違う2つの抗体遺伝子をレトロウイルスベクターを用いてスプライスにより結合し，cDNAタイプの遺伝子を回収できることが示された。この方法は，抗体遺伝子だけでなく，由来の異なるエキソンの結合に一般に応用できると考えられる。

論文の審査結果の要旨

本論文は，マウス抗体遺伝子可変部領域とヒト抗体遺伝子定常部領域をレトロウイルスベクターDNAにのせ，それを培養トリ細胞にトランスフェクトし組み換えレトロウイルスを産生させ，そしてそのウイルスを新しい細胞に感染させ，感染細胞より逆転写されたcDNAタイプのキメラ抗体遺伝子を作成したものである。この方法により例えばヒト癌組織に対するマウスモノクローン抗体の定常部をヒトのそれに置換した抗体を大腸菌で大量生産することが可能になった。

本論文は新しい治療手段の開発をおこなったものであり，博士論文に値する。