The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Targeted insertion of a variable region gene into the immunoglobulin heavy chain locus
Author(s)	滝, 伸介
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39191
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【 35 】

氏　　名	滝（たき）　伸（しん）介（すけ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　11558　号
学位授与年月日	平成6年10月5日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Targeted insertion of a variable region gene into the immunoglobulin heavy chain locus （免疫グロブリン重鎖遺伝子座への再構成済み重鎖遺伝子のジーンターゲティングによる挿入）
論文審査委員	（主査） 教授　濱岡　利之 （副査） 教授　谷口　維紹　　教授　辻本　賀英

論文内容の要旨

【目　的】

クラススイッチ並びに体細胞突然変異が正常と同程度に起こりうる免疫グロブリン重鎖トランスジェニックマウスを樹立する。

【方　法】

既に再構成の終了した免疫グロブリン（Ig）重鎖（H）可変部（V_H）遺伝子を，ジーンターゲティングの手法を用い，本来再構成V_H遺伝子が位置するJ_H遺伝子座に挿入し，同時に内在性のDQ52および全てのJ_H遺伝子を削除するためターゲティング・ベクターを構築した。再構成V_H遺伝子としては，抗フォスフォリルコリン（PC）抗体を産生するミエローマS107からクローンされた遺伝子（V_HT15と呼ぶ）を用いた。このベクターを胚性幹（ES）細胞株E14－1に電気穿孔法によって導入した後，G418およびgancyclovirで二重選択した。生存細胞コロニーのうち相同組み換え体をポリメラーゼ連鎖反応（PCR）にて選別し，クローン#5－2を得た。このESクローンをC57BL／6マウス由来の胚盤胞胚にインジェクションし，これを仮親子宮内に移植する事によって，キメラマウスを得た。これらキメラマウス（♂）をC57BL／6（♀）と交配し，変異IgH遺伝子座（IgH^{T15i}）をヘテロに持つ子孫マウスを得た。更に，これらマウス同士を交配し，IgH^{T15i}につきホモ接合体であるマウスを得て，6～10週齢で以下の実験に供した。挿入したV_HT15遺伝子の発現は，抗V_HT15抗体を用いたフローサイトメトリによって検討した。各クラスの血清Ig量及びV_HT15陽性率の決定は，アイソタイプ特異的酵素抗体法（ELISA）によった。in vitroでのIgクラススイッチ頻度は，脾臓細胞をリポポリサッカライド（LPS）中もしくはLPSとIL－4中で培養した後，B細胞ブラスト細胞質内のIgを蛍光標識したアイソタイプ特異的抗体にて染色し，フローサイトメトリによって測定した。またV_HT15遺伝子の体細胞突然変異頻度を以下のようにして検討した。T15iマウスをハプテンPCを結合したkeyhole limpet hemocyanin（PC－KLH）100 μgで免疫し，15日後に脾臓を摘出し，$B220^+$ μ^- δ^-細胞（IgG陽性B細胞を高率で含むと考えられる）を選別した。同細胞10^4個程度からRNAを抽出し，γ鎖に特異的な合成DNAプライマーを用いてcDNAを合成し，その約1／10からPCRにてV_HT15－γ cDNAを増幅した。PCR産物をクローニン

グした後，塩基配列を決定した。

【成　績】

ホモ接合体マウスでは，V_HT15 遺伝子は，末梢血B 細胞の99％以上，脾B 細胞の96％以上に発現しており，また全ての血清 IgM は V_HT15 陽性であった。ヘテロ接合体（$IgH^{T15i/+}$）マウスでは，予想に反して末梢血B 細胞の半数以上が対立遺伝子である野生型 H 鎖を発現していたが，これは，ヘテロ接合体では，ある B 細胞で V_HT15 遺伝子が二次的な遺伝子組み換えによって破壊され，対立遺伝子排除が働かなくなり，野生型 IgH 遺伝子座での V 遺伝子組み換えが起こった為であろう。ホモ接合体マウス血清Igの各クラスの濃度は，IgM が対照に比し150～200％と高値であるのに対し，各IgG，IgA はそれぞれ50～75％と低値であり，クラススイッチは起こるものの効率が低い可能性が考えられた。しかし，*in vitro* で抗原に非特異的な LPS やIL－4で誘導される IgG3およびIgG1へのクラススイッチは対照と全く同率で起こり，従って，血清 IgG, IgA の低値は，全ての B 細胞が唯一の V_H遺伝子を発現しており，抗体の抗原特異性が制限されている事によって，環境抗原によるクラススイッチに至る刺激の機会が減じた為と考えられる。脾臓 $\mu^{low}\delta^{high}$ B細胞および腹腔内のLy－1^+B 細胞が減少しているのも同様に制限された特異性の故である可能性がある。また，PC－KLH で免疫されたマウスの IgG 陽性 B 細胞では，約77％のV_HT15 が変異しており，突然変異率は100塩基あたり1.85 であった。この率は正常マウスで観察される値と同等に高値である。アミノ酸置換を伴う変異数と伴わない変異数の比は，ランダムな変異を仮定した場合に比べ，フレームワーク部で低く，相補性決定領域でより高く，抗原による変異 V_HT15 の選択が起こった事を示す。

【総　括】

ジーンターゲティングを応用して作成した Ig トランスジェニックマウスでは，事実上全ての B 細胞が挿入したV_H遺伝子を発現し，正常マウスと同等な頻度でクラススイッチおよび体細胞突然変異が観察され，従来の Ig トランスジェニックマウスの持っていた欠点が解消されていた。この方法で作成されたマウスは，適当な軽鎖トランスジェニックマウスと組み合わせる事により，T 細胞依存性免疫応答を，単一の特異性のB 細胞について，より生理的な条件下で観察する事を可能にする。また，ここで用いたターゲティングベクターは原理的にいかなる V_H遺伝子にも適用可能であり，クラススイッチや体細胞突然変異の関与する疾患，例えばある種の自己免疫疾患やアレルギーのモデル動物を作成する事に応用できるだろう。

論文審査の結果の要旨

本研究は，これまである遺伝子を破壊することにのみ用いられてきたジーンターゲティングの手法を，機能的遺伝子すなわち抗体重鎖可変部遺伝子を目的の位置に挿入することに応用し，いわば第2世代の抗体トランスジェニックマウスを作り上げることに成功した。更に，作成したマウスにおいて，これまでの抗体トランスジェニックマウスが有した欠点が克服され，単一の可変部遺伝子のみを発現しながら，クラススイッチ並びに体細胞突然変異が正常マウスと同等に生起することを証明した。本法は原理的に全ての抗体遺伝子に適用できるものであり，抗体の関与する各種ヒト疾患のモデルマウスの作成への応用が期待される。このように本研究は免疫学に新しい技術的進歩をもたらしたものであり，博士の学位に値するものと認める。