

ヒトリンパ球の初期発
生と分化に関する研究

水谷修紀

①

ヒトリンパ球の初期発
生と分化に関する研究

水谷修紀

はじめに

小児科領域における疾患の特性は疾患の発生する土壌が発達途上にある小児であるところに存在する。その中でも先天性免疫不全症はリンパ球の初期発生、分化の障害として特徴づけられる。一方小児に発生するがんにおいても細胞の初期分化段階における障害であり、小児がんの約5割を占める小児白血病は血球なかでもリンパ球の初期分化段階に於ける分化増殖機構の障害と位置づけることが可能である。このようにみるとリンパ球の初期発生、分化の分子機構に関する研究が小児疾患の病態に関する研究の中でもとりわけ重要な部分を占める事が理解されてくるであろう。リンパ球は周知のごとくT、及びBリンパ球から構成されている。私はこのような視点に立ち、Tリンパ球の初期分化に関する研究を胸腺上皮細胞との関連でとりあげた(第1章)。また一方Bリンパ球領域における研究テ-

マとしてはイムノグロブリン遺伝子の再構成
に関する分子機構をリンパ球の発生、初期分
化との関連で解析し、考察を加えた（第2章）
。第1章及び第2章における研究をまとめて
ヒトリンパ球の初期発生と分化に関する研究
と題したが、広くT及びBリンパ球の初期発
生と分化の分子機構に関する研究に何等かの
貢献を成し得るとしたら幸いである。

第 1 章

ヒト胸腺上皮細胞の株
化に関する研究

要 約

胸腺微細環境は上皮細胞、マクロファージ、樹状細胞、筋様細胞、線維芽細胞、未熟 T リンパ球など異なったタイプの細胞の複雑な相互関係から構成されている。

今回私はヒト胸腺上皮細胞の中のあるサブセットに相当する上皮細胞を SV40 ori-、及び pSV2neo 遺伝子で形質転換しクローン化した。このクローン化した上皮細胞は被膜直下上皮細胞に相当する免疫学的特徴を有していた。また LFA-3 抗原を発現しており、これを介して T リンパ球と結合した。さらにマクロファージ増殖因子を分泌し、マクロファージとの共存下で IL-1 産生を誘導した。これらの特徴はこの細胞が T リンパ球分化の earliest stage を解析する為のモデルシステムを作成する上で役立つ可能性を示唆した。

緒 言

先天性免疫不全症の多くは小児にみられ、その病態の本体はリンパ球の初期分化過程における成熟分化の障害にあると考えられる。一方、小児期に発生する悪性腫瘍の内5割近くが白血病によって占められるが、その7割のものはリンパ性の白血病である。白血病化を導く分子遺伝学的メカニズムが標的とするリンパ球はTリンパ球、Bリンパ球のいずれでもありうるが、そのいずれにおいても未熟なリンパ球である所に小児白血病の特殊性が存在する。これら小児期に特徴的で重大な疾病に共通する生物学的特徴の一つはリンパ球の初期分化過程における何等かの障害に存在すると考えられる。これらの障害の発生機構を解明する上でヒトT及びBリンパ球の初期分化過程に関する細胞生物学的、分子生物学的研究の重要性が認識されつつある。Tリンパ球の初期発生、分化のメカニズムを探る上でTリンパ球初期分化の為の母地を

形成する胸腺ストローマの機能の解析が必要であるが、その組織学的構造の複雑性は細胞生物学的研究の進歩を妨げてきた。胸腺ストローマの持つ複雑な機能を明らかにしていくことは単に T リンパ球の胸腺内での成熟、増殖のメカニズムを明らかにしていく上で重要ばかりでなく、外来抗原の認識、自己抗原の認識のメカニズムを解明していく上でも重要である。しかし従来複雑な細胞群からなる胸腺ストローマ細胞を単離することが困難で、その機能については十分な研究がなされなかった。私は複雑な細胞群からなる胸腺微細環境の構造を細胞生物学的に解析することによりこれらの課題に答えるべく、SV40 遺伝子を胸腺上皮細胞の初代培養系に導入し、上皮細胞を株化しクローン化することを試みた。

材料及び方法

ヒト胸腺上皮細胞の培養

新鮮ヒト胸腺は約16週令の胎児から得た。得られた胸腺を細切し、5% Fetal calf serum (FCS), 1.8×10^{-4} M adenine (Sigma), $5 \mu\text{g/ml}$ insulin (Sigma), 10^{-10} M cholera toxin (Sigma), $0.4 \mu\text{g/ml}$ hydrocortisone (Sigma), 20 ng/ml epidermal growth factor (EGF) (BRL) 含有MEM培地にて培養した¹⁾。培養は5% CO₂, 37°Cで行なつた。

胸腺上皮細胞への遺伝子導入

上記の条件下で培養開始後3週目には多角形の上皮細胞が優位を占める状態にまで上皮細胞を増殖させる事ができた。このようにして増殖させた上皮細胞に富む細胞群にSV40 ori⁻ ($10 \mu\text{g}$)及びpSV2-neo 遺伝子 ($1 \mu\text{g}$)を混合し、リン酸カルシウム法によって遺伝子導入を行なった^{2, 3, 4, 5)}。リン酸カルシウ

本法による操作を加えた2日後 G418 (GIBCO) 1mg/mlによる遺伝子導入細胞の選択を開始した。選択開始1ヶ月の後に2株の neomycin 耐性株を得たが (SM1, SM2と命名した)、3-6代目の細胞を用いて単離された細胞の性格の決定を行なった。細胞の特徴に関する解析は各種の抗原に対する抗体を用いる免疫学的方法とその機能的側面を解析するためのサイトカインの分析を中心に行なった。

免疫学的検索

一般的な間接蛍光抗体法を用いて細胞膜表面の抗原、細胞骨格蛋白、その他の細胞内蛋白の同定を行なった。細胞表面抗原は対象にした細胞がプラスチックプレートに付着する性格を有することを利用して、Lab-Tek チャンバーに 1×10^5 /mlの濃度で一晩培養し、チャンバーの底面に付着した細胞を未固定のまま蛍光抗体法によって解析した。細胞骨格あるいは細胞内蛋白の同定は同様にして得ら

れたサンプルをエタノールにより固定した後第一抗体と反応させた。第二抗体は蛍光標識抗マウス IgG ヤギ IgGF(ab)2, あるいは蛍光標識抗マウス IgM ヤギ IgGF(ab)2 抗体 (カベル社) を用いた。一次抗体のリストは Table 1-a に示した。造血系細胞に反応する抗体として RFD7, 3.9, C.7 (抗マクロファージ)、抗 CD1, CD2, CD3, CD4, CD8, CD7, CD45 (T200/LCA) の各抗体を、細胞骨格に対する抗体として抗サイトケラチン (Le 61), 抗ビメンチンなどの抗体を、また胸腺間質細胞を分析する為の抗体として Thyl (Subcapsular cortex), A2B5 (Subcapsular cortex, Medulla)、909 (Subcapsular cortex)、910 (ハッサル小体、Medullary epithelium)、PE-35 (Medullary epithelium)、908 (ハッサル小体)、899 (Cortex) を用いた。その他 B7/8 (HLA-A and B)、B7/21 (HLA-DP)、Genox3.53 (HLA-DQ)、DA2 (HLA-DP/DQ/DR)、DA6.164 (HLA-DQ/DR)、OKT9 (Transferrin receptor)、R1

(EGF receptor)などのマウスモノクローナル抗体を用いた。また反応は 37°C 30分間湿潤箱の中で行なった。

細胞成長因子の解析

a) コロニーアッセイ

得られた上皮細胞はその造血因子の産生能について二重軟寒点法にて検討した⁹⁾。まず SM1, SM2 株及びそのコントロールとしてマウス L 細胞の 1×10^4 個を 35x10mm ペトリディッシュにて一晚培養した。培養液は 10% FCS 含有 MEM 培地を用いた。この付着細胞に 30 Gray の放射線照射を施したものを feeder 細胞としてその上を 0.3% の軟寒点で覆った。一方造血幹細胞としては比重遠沈法にて単核球に分離したヒト胎児肝細胞を用いた。即ち 1×10^4 個の単核球を 0.3% 軟寒点を含む MEM 培地に再浮遊し、先の feeder 細胞からなる軟寒点層に重層した。培養は 5% CO₂、37°C の条件で CO₂ 培養器にて行なった。培養開始

後 2 週間で得られたコロニーはその数を算定した後、微細毛細管ピペットで顕微鏡下にコロニーをつりあげ、サイトスピン法により細胞を固定し、細胞生化学的、免疫学的検索に供した。CSF-1 は抗 CSF-1 抗体を用いてラジオイムノアッセイによっても解析した⁷⁾。

b) IL1, IL2 アッセイ

SM1, SM2 の培養上清及び SM1, SM2 と胎児肝細胞単核球の混合培養の培養上清について IL1 活性を PHA 刺激 C3H/HeJ マウス胸腺細胞 (1×10^6 /well) 或いは D.10 細胞 (1×10^5 /well) の増殖反応の増強作用によって測定した^{8,9)}。IL2 産生能は Con A 刺激マウス胸腺細胞¹⁰⁾ 或いは CT6 細胞 (1×10^4 /well) に対する刺激能¹¹⁾を解析することによって行なった。細胞増殖刺激能は [3H]thymidine ($1 \mu\text{Ci}$) の取込みによって測定した。

胸腺リンパ球とのロゼット形成反応

上皮細胞 (2×10^5 /0.1ml 5%FCS, RPMI)

をトリプシン液 (0.5mg trypsin/ml PBS) で 1-5 分処理により浮遊細胞にした後、胸腺 T リンパ球 (2×10^6 / 0.1ml 5% FCS, RPMI) と混合し、4°C 380 xg で 5 分遠心し、90 分反応させたのち細胞をゆるやかに再浮遊し、顕微鏡下に観察した。T リンパ球を 3 ケ以上結合したものを陽性とした。抗体によるロゼット形成阻止反応は過剰量の抗体の存在下に 4°C で全ての反応を行なった¹²⁾。阻止試験に用いた抗体は抗 LFA-3, 抗 Thy-1, 抗 CD7, 抗 CD2 の各抗体である。

電子顕微鏡による形態の解析

35mm のペトリ皿で上皮細胞を 2 時間培養し 1% グルタルアルデヒド含有 PBS で細胞を固定し、電子顕微鏡による観察に供した¹³⁾。

結 果

胸腺上皮細胞株の樹立

SV40 Ori⁻、及び pSV2-neo 遺伝子による Cotransfection の結果 2 種類の胸腺上皮細胞株の不死化に成功した。それぞれを SM1, SM2 と名付けた。SM2 細胞は多角形に近い形態をもった細胞であり、SM1 細胞は多角形の細胞と紡垂形の細胞よりなっていた。SM1 は限界希釈法により多角形の細胞と (SM1.9) と紡垂形の細胞 (SM1.1) の subclone に分離できた (Fig 1a, 1b)。

細胞株の性格決定

SM1, SM1.1, SM1.9, SM2 のそれぞれにおいて、SV40 large T 抗原の発現を蛍光抗体法により確認することができた (Fig. 1d)。また Le 61 (抗 cytokeratin 抗体) によりケラチンの存在を (Fig. 1C) 確認し、デスモゾーム (Fig. 2A, 2C)、トノフィラメント (Fig. 2B, 2D) の発現を電子顕微鏡による超微細構造

と単クローン抗体により確認することができた。これらの所見はこれらの細胞が上皮細胞であることを決定づける所見と考えられた。上皮細胞のタイプを更に詳細に決定する為に Table 1-a のような抗体を用いて更に検討した。その結果抗ヒト Thy-1 抗体、抗 LFA-3 抗体、A2B5 抗体、909 (MR19) など Subcapsular cortex に特異的に反応する抗体に対して陽性反応を示した。Thymic medulla に特異的な PE-35 や Thymic cortex やハッサル小体に特異的な反応性を示す MR7, MR9, MR13¹⁷⁾ に対する反応性は認めなかった。HLA-A, B, C は陽性を示したが HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP は陰性の所見であった。Table 1 にかがげたようなリンパ球や単球に特徴的なマーカーは全て陰性であった。その他クロモグラニン、ヴァソプレッシン、ニューロフィジン II、シナプトフィジンなど Neuroendocrine system との関連を示唆する所見は得られなかった。またサイモポイエチン、サイ

ムリンなどの発現は認められなかった。

以上の結果分離された細胞は上皮細胞であり、しかも Thymic subcapsular cortex に由来する細胞であると結論づけることができた。

T リンパ球との結合反応

既に cortical epithelial cell と T リンパ球が LFA-3 と CD2 の各抗原を介して結合する事が報告されているが¹²⁾、subcapsular cortex 由来の細胞株 SM1, SM2 においても LFA3 が発現されており、同様の現象を SM1, SM2 において解析した。その結果 SM2 では約 50-70% の細胞が T リンパ球とロゼット形成を示した。この結合反応は SM1, SM2 を抗 LFA3 抗体で処理したり、T リンパ球を抗 CD2 抗体で処置することによって有意に阻止することができた (Table 2, Fig. 3)。

Subcapsular cortex における hemopoietic growth factor の産生

Subcapsular cortex の上皮細胞が造血細胞の分化にどのような役割を果しているかを明らかにすることは胸腺の生体に於ける役割を考える上で大変興味のあることである。このような観点からこれらの細胞が分泌するサイトカインを解析する目的で SM1,あるいは SM2 を feeder 細胞として用い、ヒト胎児肝細胞単核球からコロニーが出現するか否かを観察した。その結果 SM1, SM2 を feeder として用いる事によって多数のコロニーが出現することを確認した。(Table 3)コロニーの形態及びサイトスピン標本による細胞の形態を Fig 4A-D に示す。これらのコロニー形成細胞の帰属を決定する目的で細胞生化学的解析を行なった。その結果 α ナフチルブチレートエステラーゼやアシッドフォスファターゼなど単球に特異的な陽性反応を得た。これらの細胞が HLA-DR や単球特異抗原であ

る RFD-7 を発現し、TdT や 細胞質内 T3 抗原⁽¹⁰⁾を 発現しないことからこれらは単球よりなるコロニーであると結論することができた。Fig 4 B, 4 D に サイトスピン標本のメイギムザ染色による形態を示す。同様のコロニーは胸腺上皮細胞の primary culture を feeder layer とすることによっても得ることができた。これらの結果 SM1, SM2 は CSF-1 を産生していると結論した。SM1 の培養上清を R. Stanley 博士の研究室に依頼しラジオイムノアッセイ法によってさらに解析した。その結果この方法によっても CSF-1 の産生を確認することができた。その他インターフェロン、IL2, IL1、マイコプラズマなどの検索も行なったが、これらはいずれも陰性であった。

IL1 産生能

SM1, SM2 細胞はそれぞれ単独では IL1 は産生しなかった。また CSF-1 によって

単球に分化誘導された胎児肝細胞単核球もそれ単独では IL-1 を産生することはなかった。しかし興味あることには SM1、あるいは SM2 と胎児肝細胞単核球との混合培養によって IL-1 の産生を確認することができた (Fig. 5)。

考 察

SV40 ori⁻遺伝子の導入によって単離されたヒト胸腺上皮細胞株 SM1, SM2 は subcapsular cortex 由来のものと考えられた。このことは電子顕微鏡所見、Cytokeratin, Thy-1 抗原、909 (MR19), A2B5 等の subcapsular cortex に特徴的と考えられる抗原の発現によって裏づけられ、マクロファージ、繊維芽細胞、ハッサル小体、cortex や medulla epithelium に発現される抗原^{17, 19, 20, 21)}が発現されていないことなどからさらに subcapsular cortex であることが確認できた。

Thymic subcapsular cortex が胸腺細胞の分

化と増殖を促すメカニズムについては不明の点が多い。しかし一つの重要なメカニズムとして胸腺上皮細胞の産生する増殖因子や上皮細胞との接触が未熟 Tリンパ球の増殖分化を促すと考えらる。従来サイモポイエチンやサイモシン、サイムリン^{21, 22)}などと呼ばれる胸腺ホルモンがこの過程で関与しているといわれてきたが、SM1, SM2 はいずれもこれらのファクターを産生していなかった。これは SV40 遺伝子の影響によって因子を産生しなくなった為か、或いはもともと産生していない細胞が単離された所為かかもしれない。しかし一方 SM1, SM2 が CSF-1 を産生しマクロファージを分化誘導したり、そのマクロファージとの共存下で IL1 の産生に synergistic な作用を示すという今回の知見は胸腺の histogenesis や Tリンパ球の増殖分化を考察する上で重要な示唆を与えていると考えられる。実際マクロファージは IL1 の分泌を通して Tリンパ球の増殖や分化、とりわ

け免疫学的寛容の誘導に重要な役割を果たしていると考えられる^{23, 24})。IL1が未熟Tリンパ球に働くことによってTリンパ球のIL2レセプターの発現にプラスのシグナルを与えることも予想されることである。Subcapsular cortexがCSF-1を産生するという現象は胸腺にmigrateしたマクロファージ前駆細胞の胸腺内での増殖と分化を促し、更にマクロファージに働いてIL1の産生を促進するという一連の現象を誘導することが予想される。

今回 subcapsular cortex と Tリンパ球がLFA-3とCD2抗原を介して結合するという現象¹²⁾も確認することができた。この機構もまたTリンパ球の分化やclonal diversificationに重要な役割を果たしていると考えられる。

われわれの知見を総合するとT前駆細胞は上皮細胞との接触及び上皮細胞とマクロファージの相互作用によって産生されるIL1に

よって活性化され、また更に分化の新しいカスケードへと導かれることが予想される。そのような意味で株化された胸腺上皮細胞を得たことの意義は大きいと考えられるし、また最近見出された IL6²⁵⁾、IL7²⁶⁾ などの新しいリンフォカインとの関連を明らかにしていく上で重要な役割を果たしてくれるものと期待している。

第 2 章

リンパ球の初期分化に
おけるイムノグロブリン
遺伝子の再構成に関
する研究

要 約

イムノグロブリン遺伝子や T 細胞抗原受容体遺伝子の再構成は必ずしも lineage specific ではない。このことはこれらの遺伝子の再構成に与る recombinase などの酵素が共通であることを示唆している。私はこの抗原レセプター遺伝子の cross lineage rearrangement に関し、新しい現象を発見した。T 細胞における Igh 遺伝子の再構成は多くの場合 D セグメントの中でも、J 領域に最も近い D (DQ52) を用いていた。この D セグメントは一つの重要な例外を除いて一般に B リンパ球では欠落していた。そしてその例外とは最も未熟な B 前駆細胞であった。これらの所見は 3' D 領域が Igh 遺伝子の再構成を導く上で recombinase に対して最も accessible な領域であり、B リンパ球の初期分化過程で重要な役割を演じていることを示唆している。

緒言

リンパ球の分化に関する細胞生物学的研究、分子生物学的研究は歴史的にリンパ系腫瘍細胞、あるいはヒトにおいては EB ウィルス、マウスにおいては Abelson 白血病ウィルス (A-MuLV) によってトランスフォームされた正常 B リンパ球を対象としてなされてきた。とりわけ A-MuLV で形質転換された B 細胞を用いたマウスにおける B 細胞の分化過程と、それに伴うイムノグロブリン (Ig) 遺伝子の再構成に関する研究は、現在我々が知っている B 細胞の分化に関する細胞生物学的、分子生物学的知識の大部分を提供してきた²⁷⁾。

すでにヒトにおいては白血病の細胞生物学的研究が目覚しく進歩し、細胞膜表面に発現される分化形質によってリンパ系腫瘍をリンパ球分化途上における腫瘍化として理解する立場が確立されており、ヒトにおけるリンパ球

の初期分化過程の研究はこれらの腫瘍細胞を対象としてなされた。

Tリンパ球や、Bリンパ球において発現されるT細胞抗原受容体(TCR)や免疫グロブリン(Ig)は、リンパ球の分化過程でDNAの再構成を示す一連の遺伝子によって遺伝情報がコードされている。抗原に対する特異性を担う可変部領域(V領域)はV、D、Jセグメントの広い領域から成立っており、この領域におけるD-J結合それに引続くV-DJ結合はintrachromosomal deletionメカニズムによって引き起こされる。この中でもDJ結合がactiveなV領域を構成する為にまず最初に必要とされる再構成であり、リンパ球の初期分化段階におけるlineageの選択、決定という立場からみるとこの第一ステップの遺伝子再構成は興味をもたれる。

そこで私はイムノグロブリンH鎖(IgH)遺伝子の構造との関連でBリンパ球の初期分化を解析しようと試みた。

材 料 及 び 方 法

白血 病 細 胞

形態学的、細胞生化学的及び免疫学的解析によって T あるいは B 細胞型白血病と診断された細胞を材料として用いた。免疫学的解析に用いられた抗体は CD3, CD4, CD8, CD7, CD2, CD10, CD19, Tdt, などに対する抗体である。対象とした T 細胞型白血病 8 例、B 細胞型白血病 21 例の白血病細胞の免疫学的特徴及び TCR β 鎖遺伝子の構造を Table 4 に示した。

サザンハイブリダイゼーション

細胞からの high molecular weight DNA の抽出は既報によった¹⁴⁾。P. Leder より供与された入 CH28-6 をプローブとして用いた¹⁵⁾がさらに DQ52 領域の 5' 側をコードする BamHI/BglII fragment (A)、DQ52 を跨ぐ SmaI/SmaI fragment (B)、DQ52 の 3'

側で J1、J2 を含む SmaI/Pst fragment (C)、
J1 から J3 までをカバーする BstEII frag-
ment (E) をプローブとして用いた。プローブ
A、C、E は λ CH28-6 より切出したものを、ま
たプローブ B は Bluescrip vector に sub-
clone 化したものを用いた (Fig. 6)。プロー
ブの ^{32}P 標識はランダムプライマー法によっ
た¹⁶⁾。制限酵素としては BamHI (B)、HindIII
(H)、SmaI (S)、BstEII (Bs) (ペーリンガー社)
を用いた。制限酵素によって消化された
DNA を 0.7% アガロースにて電気泳動ののち、
アルカリ変性し、ニトロセルロース膜に移し
た。ニトロセルロース膜を 80°C で 2 時間熱
処理ののち ^{32}P ラベルしたプローブと 68°C
で一晩ハイブリダイゼーションを行なった。フ
ィルターは 0.1xSSC (15mM NaCl, 1.5mM
NaCitrate), 0.1% Sodium dodecyl sulfate
(SDS) を用いて 68°C で洗浄し、Kodak XAR
フィルムに感光した。

結 果

T 細胞に於けるイムノグロブリン重鎖遺伝子の再構成

2 株の T 細胞株を含めた T 細胞クローン 8 サンプルのうち 6 サンプルにおけるイムノグロブリン重鎖遺伝子の再構成は 5' JH 領域の欠落を伴っていなかった (Fig. 7, Table 5)。このことはこれらの再構成が DQ52 の再構成であることを示唆しているが、それを確認する目的でプローブ C、E による解析をおこなった。その結果再構成バンドからはこれらのプローブとハイブリダイズする領域が欠落していた (Fig. 8)。このことからこれらは DQ52 と J3-J5 の再構成からなりたっていることが示された。

B 前駆細胞に於けるイムノグロブリン重鎖遺伝子の再構成

Nadler 分類による Stage II, III の

各 10 例のサンプルにおいて同様の検索を試みた。その結果 Stage II の 3 例において 5' JH 領域の欠落を伴わない IgH 遺伝子再構成即ち DQ52 の再構成を認めた。残りの 7 例、及び Stage III の 10 例は全て 5' JH 領域の欠落を伴っており、DQ52 より上流の D を使用していることが示唆された (Fig. 9, Table 6)。

考 察

ヒトにおけるリンパ球初期発生、分化の分子機構をめぐる疑問にアプローチする一つの方法として初期分化過程で分化が凍結したと考えられる未分化なリンパ性白血病を研究の対象として選んだ。Bリンパ球に見られる再構成と比較する目的で IgH 遺伝子の再構成を示す T 細胞型白血病を選んだが、これらの T 細胞型白血病 8 サンプルはいずれも TCR β 鎖遺伝子の再構成やその遺伝子発現、或いは分化抗原の発現の状況から考え

て T 細胞型の白血病であり、Tdt や 細胞内 CD3 蛋白の発現状況も考え合わせると、未熟な T リンパ球としての分化段階を反映している¹⁵⁾。

今回の解析の結果 T 前駆細胞における IgH 遺伝子の再構成が非常にしばしば DQ52 の再構成を伴っていることを明らかにした。このような DQ52 再構成の足跡は比較的成熟した B リンパ球 (stage III) では認められず、B リンパ球の中では非常に未熟な B リンパ球 (stage II) の一部 (30%) に於いてのみ認められた。T 細胞という一般に Ig 遺伝子の再構成を起こすには不適當な細胞内環境の中で、ある限られた範囲の遺伝子再構成をみ、それと同様の再構成が最も未熟な B 前駆細胞の一部でみられたことを次の様に解釈した。一般にリンパ系幹細胞では DQ52 及び J の領域が recombinase に対し Accessibility がかなり高く、したがって T リンパ球、B リンパ球のいずれの方向に分化するにしても Ig 遺伝子

DQ52-J の再構成は起こりやすい。また TCR 遺伝子や Ig 遺伝子においてみられる recombination signal sequence-即ち heptamer, nonamer sequence-の相同性から考えると、それぞれの recombinase がお互いに他の遺伝子の再構成にある限られた範囲で関与している可能性が予想される²⁷⁾。即ち T 細胞においては TCR 遺伝子の再構成に関与する recombinase が働いて Igh 遺伝子の部分的な再構成を誘導している可能性がこの研究からは示唆されよう。この事は pre-B 細胞株に導入された TCR β 遺伝子が再構成を起こすという P. Altらの研究²⁸⁾によっても示唆されている。一方彼等の用いた細胞株における本来の TCR β 鎖遺伝子は再構成を起こしていないことから遺伝子再構成の制御は recombinase に対する遺伝子の accessibility によっても強く制御されるものであると考えられる。この遺伝子の accessibility については、最近 DNase I に対する hyper-

sensitive site としてその構造を捉える努力がなされている。それによればリンパ系幹細胞においては最も sensitive な領域として Igh Enhancer の領域が挙げられ、それに引き続いて DQ52 の近辺に hypersensitive な領域があるとされている²⁹⁾。このような所見は、今回解析した未熟な T 細胞及び一部の未熟な B 細胞に於いて Igh 遺伝子の DQ52 の狭い領域が recombinase に対し高い accessibility を示したとの解釈を裏づけるものであろう。

DQ52 が正常 B リンパ球のイムノグロブリンレパートリーの中でどのような役割を果たしているか今の所不明である。なぜなら我々が解析した多数例の成熟 B リンパ球に於いては DQ52 を用いた再構成は殆どなく、またこれまで 3rd hypervariable 領域をコードする蛋白の報告の中にも DQ52 が見出されたことがないからである。このような現象を P. Alt らのたぐり寄せの理論³⁰⁾にのっとり正常 B

リンパ球の分化過程で早期に再構成を示す D として DQ52 は存在するが、リンパ球の分化に伴いより上流の D と J の joining によって DQ52 再構成は脱落しマスクされると解釈した。その後 F. Alt らによってヒト胎児肝細胞由来 B 細胞株に於ける解析の結果、DQ52 が B リンパ球の初期分化に見られる再構成であるという考えが支持され³¹⁾、さらに最近ではマウス B リンパ球の初期分化過程に於いて DQ52 の関与する頻度が高く、その後の分化成熟に伴いこの DQ52 complex は脱落するという報告 (Tsukadara) によっても支持された³²⁾。

その後我々は 5' JH 領域の遺伝学的多型性を示すもの³³⁾の他に Igh 鎖が germ line を示す B 前駆細胞を 3 例発見した³⁴⁾。これらはそれぞれ Stage I, II, III に属するものであった。電子顕微鏡による超微細構造の解析や、細胞膜表面の分化抗原の発現様式は Non-lymphoid の特徴を否定するものであっ

た。これらの事から IgH 遺伝子構造からみた B リンパ球の分化段階が必ずしも Nadler³⁰⁾らの分化抗原からみた分化段階とは一致しないものであることが示唆された。また同時に IgH 遺伝子構造から見た B リンパ球分化に関する研究を今後さらに発展させる上で DNA 結合蛋白等の発現様式との関連で解析していく事が必要と考えられた。

B リンパ球の初期分化過程を解析する事は無γグロブリン血症などの B 細胞性免疫不全症の病態解明において重要であるばかりか小児白血病の重要な部分を占める B 前駆細胞型白血病の病型診断や病態の解析においても重要な意味をもつ。近年分子生物学的研究の進歩によりリンパ系腫瘍における染色体転座の生物学的意義が明らかにされてきた。染色体転座の結果、myc や bcl-2³⁰⁾などのがん遺伝子とイムノグロブリン遺伝子が相互に接近し、これらのがん遺伝子の発現がイムノグロブリン遺伝子の支配下におかれるというもの

であり、更に最近ではイムノグロブリン κ 鎖
遺伝子結合蛋白をコードする E2A 遺伝子が
p_{rl} 癌遺伝子の近傍に転座し、E2A/p_{rl}⁽³⁷⁾の
新しい活性型がん遺伝子を作り出す等の事が
明らかにされてきた。すなわちこれらに共通
する原理はリンパ球の分化を司さざる遺伝子
が何等かの機序でがん遺伝子の活性化を促し
ているという事である。このような研究は細
胞の分化を遺伝子レベルで解析する事が単に
細胞の lineage や分化段階を決定する上で重
要であるばかりでなく、がん化の分子機構を
解析する上でもさらに重要であることを指摘
している。血球の分化、及びがん化の分子機
構に関する研究のさらなる展開が期待されて
いる。

参考文献

Cloning of human thymic subcapsular cortex epithelial cells with T lymphocyte binding sites and hemopoietic growth factor activity.
S. Mizutani et al.
Proc Natl Acad Sci USA 84: 4999-5003, 1987

Rearrangement of immunoglobulin heavy chain genes in human T leukaemic cells shows preferential utilization of the D Segment (DQ52) nearest to the J region.
S. Mizutani et al.
The EMBO Journal 5: 3467-3473, 1986

文 献

1. Singer, K. H., Harden E. A., Robertson A. L., Lobach D. F., Haynes B. F. (1985) *Human. Immunol.* 13, 161-176
2. Graham F. L., van der Eb A. J. (1973) *Virology* 52, 456-467
3. Gluzman Y., Sambrook J. F., Frisque R. J. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3898-3902
4. Nagata Y., Diamond B., Bloom B. R. (1983) *Nature (London)* 306, 597-599
5. Southern P. J., Berg P. (1982) *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 327-341
6. Gualtieri R. J., Shaddock, R. k., Baker D. G., Quesenberry P. J. (1984) *Blood* 64, 516-525
7. Stanley E. R., Guilbert L. J. (1981) *J. Immunol. Methods* 42, 253-284
8. Kay J., Porcelli S., Tite E., Jones B., Janeway C. A. (1983) *J. Exp. Med.* 158, 836-856
9. Trechsel U., Murphy J., Reynolds J. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 720, 364-369
10. Coutinho A., Larsson E., Bronisk K., Anderson J. (1979) *Eur. J. Immunol.* 9, 687-592
11. Gillis S., Fern. M. M., Smith K. A. (1978) *J. Immunol.* 120, 2027-2030
12. Singer K. H., Wolf L. S., Lobach D. F., Denning S. M., Tuvk D. T., Robertson A. L., Haynes B. F. (1986) *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA 83, 6588-6592

13. Kuhn G. (1981) *J. Histochem. Cytochem.* 29, 84-86
14. Ford A. M., Molgaard H. V., Greaves M. F., Gould H. J. (1983) *EMBO J.* 2, 997-1001
15. Ravetch J. V., Siebenlist U., Korsmeyer S., Waldman T. A., Leder P. (1981) *Cell* 27, 583-591
16. Feinberg A. P., Vogelstein B. (1984) *Anal. Biochem.* 137, 266-267
17. Ritter M. A., Sauvage C. A., Cotmore S. F. (1981) *Immunology* 44, 439-446
18. Furley A. J., Mizutani S., Weilbaecher K., Dhaliwal H. S., Ford A. M., Chan L. C., Molgaard H. V., Toyonaga B., Mak T., van den Elsen P., Gold D., Terhost C., Greaves M. F. (1986) *Cell* 46, 75-87
19. Shurman H. J., Ritter M. A., Brekhuizen R., Ladyman H., Larche M. (1987) in *Leukocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens*, eds. McMichael A. J., Berverley P. C. L., Cobbold S., Crumpton M. J., Gilks W., Gotvh S. M., Hogg N., Horton M., Ling N., MacLennan I. C. H., Mason D. Y., Milstein C., Spiegelhalter D., Waldmann H. (Oxford University Press, Oxford)
20. Haynes B. F. (1984) *Adv. Immunol.* 36, 87-142
21. Jannosy G., Bofill M., Trejdosiewicz L. K., Willcox H. N. A. & Chilosi M. (1986) in *Current Topics in Pathology: The Human Thymus*, ed. Muller-Hermelink H. K. (Springer, Berlin),

22. Oates K. K. & Goldstein A. L. (1984) Trends Pharmacol. Sci. 5, 347-352
23. Durum S.K., Schmidt J. A. & Oppenheim J. J. (1985) Annu. Rev. Immunol. 3, 263-287
24. Ready A. R., Jenkinson E.J., Kinston R. & Owen J. J. T (1984) Nature (London) 310, 231-233
25. Kawano M., Hirano T., Matsuda T., Kishimoto T. (1988) Nature (London) 332, 83-85
26. Namen E., Schemierer E., March J. (1988) J Exp Med. 167, 988-1002
27. Alt F. W., Blackwell T. K., DePinho R. A., Reth M. G. & Yancopoulos G. D. (1986) Immunol. Rev. 89, 5-30
28. Yancopoulos G. D., Blackwell T. K., Suh H., Hood L. & Alt F. W. (1986) Cell 44, 251-259
29. Ford A., Watt S., Furley A., Molgaard H., Greaves M. (1988) EMBO J. 7; 2393-2399
30. Reth M. G., Jackson S. & Alt F. W. (1986) EMBO J. 5, 2131-2138
31. Nickerson K. G., Berman J., Clickman E., Chess L. & Alt F. W., (1989) J. Exp. Med. 169, 1391-1403
32. Tsukada S., Sugiyama H., Oka Y., Kishimoto S. (1990) J. Immunol. 144:4053-4059
33. Ozaki M., Asada M., Tamura C., Zhong W.-K., Nakamura K., Fujimoto J., Miyashita T., Kobayashi N., Mizutani S.

(1990) Leukemia 4: 415-418

34. Nakamura K., Sasaki M., Fujimoto J., Enomoto Y., Kaneko Y.,
Miwako O., Miyashita T., Tsunematsu Y., Hata J., Kobayashi N.

Mizutani S. (1990) Leukemia 4, 106-110

35. Nadler L. M., Korsmeyer S. J., Anderson K. C., Boyd A. W.,
Slaughenhoup B., Park E., Jensen J., Coral F., Mayer R. J.,

Sallan S. E., Ritz J. & Schlossman S.F. (1984) J. Clin.

Invest. 74, 332-340

36. Tsujimoto Y., Gorham J., Cossman J., Jaffe E., Croce C.M.

(1985) Science 229: 1390-1393

37. Nourse J., Mellentin J.D., Galili N., Wilkins J.,

Stanbridge E., Smith S.D., Cleary M.L. (1990) Cell 60, 535-

545

Table 1-a

免疫学的特徴を解析する為に用いた抗体及びその抗体の特異性

LFA 3, Lymphocyte function associated antigen 3;

Factor VIII, blood coagulation factor VIII;

EGF, Epidermal growth factor;

HPCA, hemopoietic progenitor cell antigen 1;

gpn, glycopeptin of nkDa;

CALLA, common acute lymphoblastic leukemia antigen;

LCA, Leukocyte common antigen;

T antigen, large tumor antigen;

ND, no designation.

†. Reactive with subcapsular cortex and medulla (a),

Hassal's corpuscles and a subset of medulla (b),

Hassal's corpuscles (c),

cortex (d),

or mesoderm derived fibrous connective tissue and vessels

in thymus (e).

Table 1-a

Antibody	
Specificity (ref.)	Name
Thy-1 glycoprotein	Thyl
GQ gangliosides	A ₂ B ₃
Thymic epithelium, a [†]	RFD4
LFA-3	TS2/9
Thymic epithelial subsets [†]	
a	909 (MR19)
b	910 (1st 8.18)
c	908 (MR13)
d	899 (MR9)
d	899 (MR7)
Thymic medullary epithelium	PE-35
Cytokeratin	Le61
Vimentin	Clone 9
Factor VIII	VIII R:Ag
Macrophages	RFD7
	3.9
	C.7
Transferrin receptor	OKT9
EGF receptor	R1
HLA-A and -B	B7/8
HLA-DP	B7/21
HLA-DQ	Genox 3.53
HLA-DR/DP/DQ	DA2
HLA-DR/DQ	DA6.164
HPCA-1/gp100-120	BI.3C5
CALLA/gp100	AL2
T-lymphocyte subsets	Anti-Leu-6 (CD1), -Leu-5 (CD2), -Leu-4 (CD3), -Leu-3a (CD4), -Leu-2 (CD8), -Leu-9 (CD7)
Chromogranin	ND
Synaptophysin	SY38
Vasopressin	ND
Neurophysin II	WP13-3-72
T200/LCA	F8.11.13
Thymus, c [†]	TE-7
SV40 large tumor antigen	SV-40

Table 1-b

SV40-ori-によって形質転換された胸腺上皮細胞に発現されている
抗原

*+: > 98% of cells positive unless otherwise shown:

-, < 2% of cells positive

Table 1-b

Specificity	Reactivity with thymic subcapsular cortex epithelium	
	<i>In situ</i>	SV40 ori ⁻ cells
Thy-1 glycoprotein	+	+
GQ gangliosides	+	+(54-83%)
Thymic epithelium, a [†]	+	-
LFA-3	+	+
Thymic epithelial subsets [†]		
a	+	+
b	-	-
c	-	-
d	-	-
d	-	-
Thymic medullary epithelium	-	-
Cytokeratin	+	+
Vimentin	+	+
Factor VIII	-	-
Macrophages	-	-
Transferrin receptor	+	+
EGF receptor		+
HLA-A and -B	+	+
HLA-DP		-
HLA-DQ		-
HLA-DR/DP/DQ	-	-
HLA-DR/DQ		-
HPCA-1/gp100-120	-	-
CALLA/gp100	-	-
T-lymphocyte subsets		
	-	-
Chromogranin		-
Synaptophysin		-
Vasopressin		-
Neurophysin II		-
T700/LCA	-	-
Thymus, e [†]	-	-
SV40 large tumor antigen	-	+

Cells	% Rosette				
	Untreated	Anti-LFA-3	Anti-Thy-1	Anti-CD7	Anti-CD2
<i>Experiment 1</i>					
SM1	66 ± 2	6 ± 2	60 ± 2	68 ± 4	4 ± 2
SM2	60 ± 3	10 ± 9	63 ± 3	60 ± 13	5 ± 1
A431	49 ± 5	2 ± 1	55 ± 1	53 ± 8	3 ± 2
Flow 5000	5 ± 2	ND	ND	ND	ND
<i>Experiment 2</i>					
SM1	48 ± 3	10 ± 2	52 ± 18	48 ± 12	14 ± 10
SM2	77 ± 5	12 ± 4	58 ± 12	50 ± 4	11 ± 3
A431	49 ± 5	15 ± 3	36 ± 17	36 ± 17	10 ± 6
Flow 5000	11 ± 1	ND	ND	ND	ND

Table 2

各種の抗体の T リンパ球ロゼット阻止反応
triplicate サンプルの ± SD 値を示した。
Flow 5000 はヒト胎児繊維芽細胞。
A431 はヒト epidermoid Carcinoma 細胞株
ND, not done

Feeder layer	Macrophage colonies per 10 ⁵ cells plated	
	Day 7	Day 14
None	0 ± 0	0 ± 0
Mouse L cells	0 ± 0	0 ± 0
SM1	71 ± 31	112 ± 8
SM1.1	175 ± 76	348 ± 134
SM1.9	96 ± 46	107 ± 53
SM2	103 ± 51	150 ± 23

Table 3

ヒト胎児肝細胞に対する増殖刺激能

値は 4 回の実験の平均値 ± SD で示した。ストローマ細胞 (2×10^5) を 35mm のプレートに撒き 3000rad の irradiation の後胎児肝細胞をソフトアガーに撒いた。7, 14 日目での 50 細胞以上のコロニーを算定した。

Leukemia	CD1	CD2	CD3	C-CD3 ^h	CD4	CD5	CD7	CD8	DR	CD10	My9 ^a	Tdt ^b	TCR β ^c
T-Lineage													
1	10	nt	nt	+	nt	nt	75	nt	-	-	-	75	G/G
2	-	95	33	+	19	9	95	-	-	-	-	90	R/R
3	-	86	-	+	-	25	81	66	-	-	-	55	R/R
4	-	30	15	+	10	-	88	-	12	-	-	60	R/R
5	-	17	31	nt	-	88	91	-	-	-	-	-	R/R
6	34	88	69	nt	75	84	78	-	-	-	-	65	R/R
7 ^e	>50	>50	>50	nt	>50	>50	-	>50	-	>50	-	>50	R/R
8 ^c	-	-	-	+	-	-	>50	-	-	-	-	-	R/R
B-Lineage													
					CD7	DR	Tdt	My9		CD10 (cALLA ^e)		CD19	
stage III (cALL ^e)													
10-19		-		70-80	>90	-		>70		nt			
stage II													
20-29		-		70-80	>90	-		0		>70			
mature B ^e)													
30		-		>95	-	-		-		nt			

Table 4

検索に用いたTリンパ性白血病 8 検体、及び Stage II, III, mature B 21 検体の免疫学的マーカーを示す。

- a: My9 は骨髄球系抗原
 b: 単クローン抗体 (Tdt はウサギ抗 Tdt 抗体)。間接蛍光抗体によって測定。数値は全て%で示した。
 c: 7 細胞株 HPB-ALL; 8 細胞株 CCRF-CEM
 d: cALL 抗原陽性 B 前駆細胞は Stage III, cALL 抗原陰性 CD19 陽性 B 前駆細胞は Stage II に分類される。
 e: Sample 19 以外は全て患者由来新鮮サンプル。
 Sample 19 は Nalm 6 B 前駆細胞株
 f: EB ウイルストランスフォーム B 細胞株
 CD: Cluster of Differentiation
 nt: not tested
 g: C β 1 プロブを用いてサザンハイブリダイゼーションで解析した。
 G: Germ line Allele
 R: Rearranged Allele
 h: Cytoplasmic CD3 は文献 18 (Furley, Mizutani et al. Cell 1986) に準じて検索した。

Summary of 5' J and J region rearrangement patterns in T precursor leukaemias

Leukaemia	<i>Bam</i> HI			<i>Hind</i> III				<i>Eco</i> RI		<i>Xba</i> I		
	D*	A	C	D	A	C	E	D*	A	D	A	
T lineage												
1	R/R	R/D	D	R/R	D/R	D	D	R/R	D/R			
2	G/R	G/R	G/D	G/R	G/R	G/D	G/D	G/R	G/R			
3	D/R	D/R	D									
4				R/R	R/D							
5								R/R	D	R/R	D	
6								R/D	D	R/D	D	
7	G/R	G/R		G/R	G/R	G/D	G/D	G/R	G/R			
8	G/R	G/R		G/R	G/R	G/D	G/D	G/R	G/R			

Table 5

T ALL における J 領域の再構成のまとめ

* は用いたプローブ

D は deletion を示す。

R は rearrangement を示す。

8 サンプルのうち 6 サンプル (Sample No. 1, 2, 3, 4, 7, 8) で 5' JH (プローブ A) の retention が認められた

Summary of 5' J and J region rearrangement in B lineage leukaemias						
Leukaemia	HindIII		EcoRI		XbaI	
	D ^a	A	D	A	D	A
<u>cALL (stage III)</u>						
10			oligo ^b	D	oligo	D
11			D/R	D	D/R	D
12			oligo	D	R/R	D
13			oligo	D	oligo	D
14			R/R	D	R/R	D
15			R/R	D	R/R	D
16			D/R	D	D/R	D
17			R/R	D	R/R	D
18			R/R	D	R/R	D
19	R/R	D				
<u>null ALL (stage II)</u>						
20			G/R/R	G/D	G/R	G/D
21			R/R	D	R/R	D
22	R/R	D				
23	oligo/G	D/G				
24	oligo	D				
25	R/G	R/G				
26	R/R	D				
27	oligo	D				
28	oligo/G	R/G				
29	oligo/G	D/R/R/G				
<u>Mature B cell</u>						
30	R/R	D				

Table 6

B lineage ALL における J 及び 5' J 領域の再構成のまとめ

a は 用いたプローブ (A, D はそれぞれ Fig 6 におけるプローブを意味する)

b oligo は 2 本以上の再構成バンドを示す。

D は Deletion

R は Rearrangement

Stage II ALL の 3 例 (case 25, 28, 29) で 5' JH の retention が認められた。

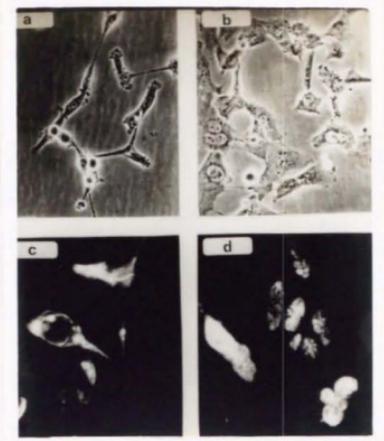


Fig 1.

SMI のサブクローンである SMI.1(a) 及び SMI.9(b) の光顕像。
c, d はそれぞれ Cytokeratin, 及び SV40 large T 抗原の蛍光抗
体像を示す。

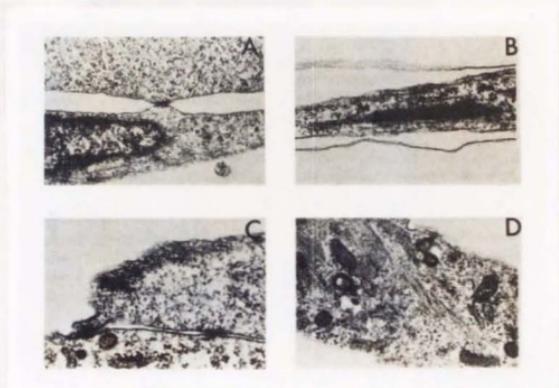


Fig 2.

SM1 (A, B) および SM2 (C, D) の電顕所見。A, C でデスマゾーム、B, D でトノフィラメントを示す。

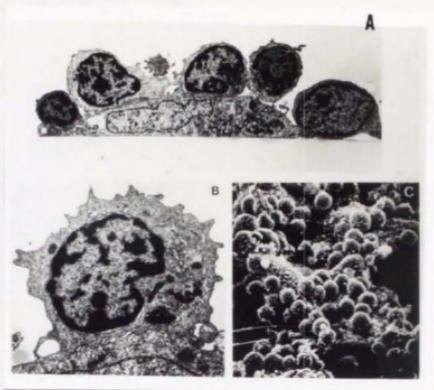


Fig. 3

SM1 と T リンパ球の結合反応。

SM1 を培養した後、T リンパ球を加え 4°C で 90 分反応させた。

その後非結合細胞を除き、グルタルアルデヒドで固定し電顕所見を観察した。

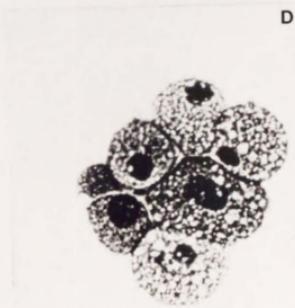
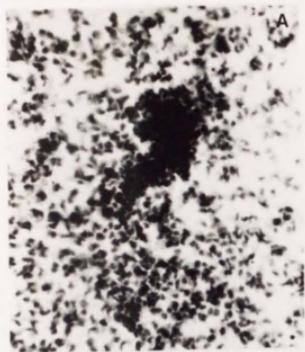


Fig 4

胎児肝細胞単核球より SM1 株を feeder layer にして得られたコロニーの弱拡大所見 (4-A, 4-C) 及びそのサイトスピン標本 (4-B, 4-D)。

4-B, 4-D はそれぞれ単球、マクロファージ様の形態を示した。

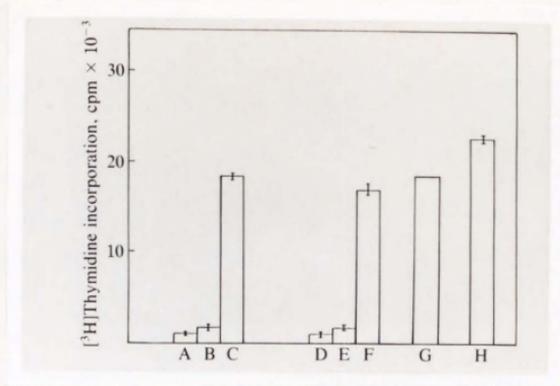


Fig 5.

IL1 産生能の検討

D.10 細胞に対する刺激能を [3H]thymidine の取込みで調べ値を示した。

A, D は negative control

B, E は SM2, SM1 の培養上清。

C, F は 胎児肝細胞と SM2, SM1 の共培養の培養上清。

G は recombinant IL1

H は primary thymic epithelial cell の培養上清

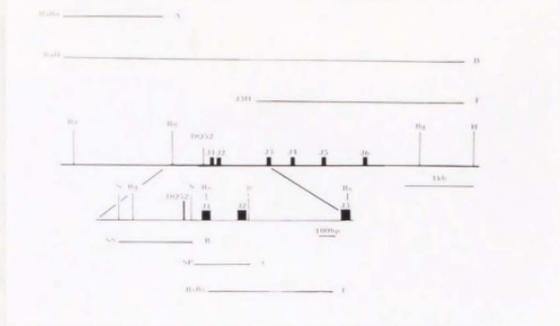


Fig 6

DNA プローブを切り出すのに用いたヒト IgJH 領域のマップ。

Ba は Bam HI, Bg は Bgl II; Bs は Bst EII; H は Hind III; S は Sma I; P は Pst I の酵素切断部位をそれぞれ示す。

A: BamHI/BglII fragment

B: SmaI/SmaI fragment

C: SmaI/PstI fragment

D: λ CH28-6

E: BstEII/BstEII fragment

F: J3H fragment

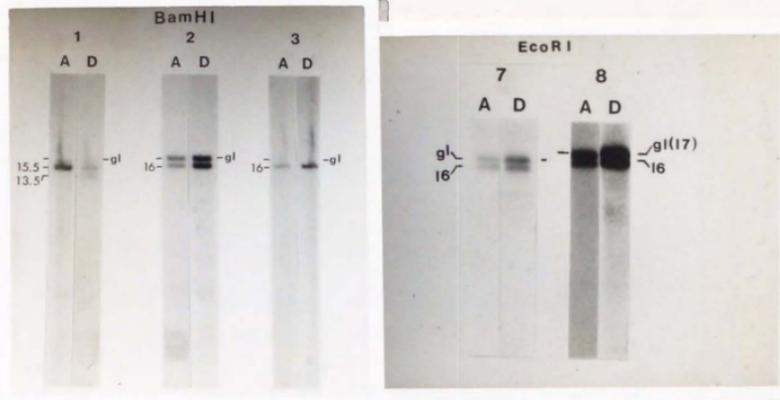


Fig 7

T細胞型白血病に於ける IgJH 遺伝子の再構成と 5' JH 領域の解析。
 DNAを Bam HI (case 1, 2, 3), 又は Eco RI (case 7, 8)で消化
 後、電気泳動しサザンハイブリダイゼーションを行なった。プロー
 プは A, D で同一のプロットに順次ハイブリダイズさせた。再構成
 バンドはキロベースで示した。プローブはそれぞれのトラックの上
 に示した。

gl は germ line を示す。

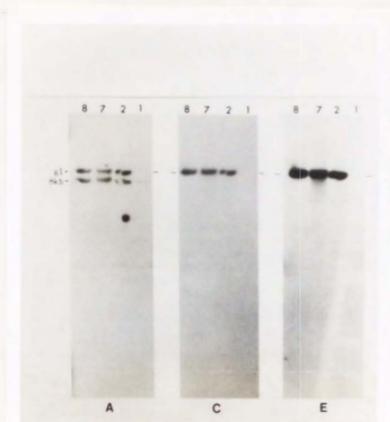


Fig 8

J領域の再構成と J1-J3 領域の欠落を示す。case 8, 7, 2, 1 の DNAを Hind III で消化後サザンハイブリダイゼーションに供した。プローブとしては順次 A, C, E (Fig. 6)を用いた。

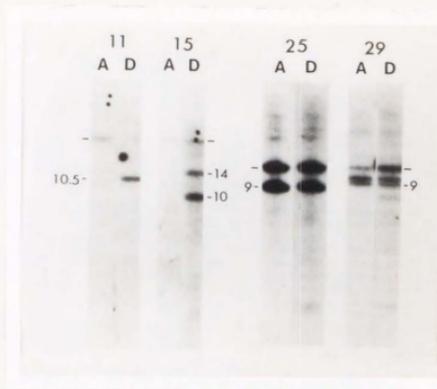


Fig 9

cALL (stage III) と null ALL (stage II) における J 遺伝子の再構成。Table 5 に示す case 11, 15 (Eco RI 消化)、case 25, 29 (Hind III 消化) をそれぞれプローブ A, D で順次ハイブリダイズした。

- は germ line を示す。

数字は再構成バンドのサイズを示す。



