



# Coexpression of Cell-Surface Immunoglobulin (slg), Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) and Recombination Activating gene 1 (RAG-1) : two cases and derived cell lines

中村, 文彦

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1997-01-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1592

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001592>

※ 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)	中 村 文 彦 (兵庫県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博い第1055号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成9年1月31日
学位論文題目	Coexpression of Cell-Surface Immunoglobulin (sIg), Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) and Recombination Activating Gene 1 (RAG-1): Two Cases and Derived Cell Lines (膜表面免疫グロブリン(sIg), TdTおよび遺伝子再構成活性化遺伝子-1(RAG-1)の同時発現: 2症例とそれらに由来する株細胞について)
審査委員	主査 教授 熊谷 俊一 教授 片岡 徹 教授 前田 盛

## 論文内容の要旨

### 緒言

一般にB細胞の分化地図において膜表面免疫グロブリン (sIg) と terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) を同時に発現する段階はないとされている。しかし、いくつかのsIg<sup>+</sup> TdT<sup>+</sup> のB細胞性急性リンパ性白血病 (B-ALL) が過去に報告されている。遺伝子再構成活性化遺伝子 (recombination activating gene) 1および2 (RAG-1, RAG-2) は、免疫グロブリンとT細胞受容体のVDJ再構成に必要な不可欠な遺伝子である。これらの遺伝子はsIg<sup>+</sup>の成熟したB細胞には発現しないとされていた。しかし近年sIg<sup>+</sup> RAG<sup>+</sup>のB細胞がマウスの骨髄内に存在することがしめされ、また、sIg<sup>+</sup> RAG<sup>+</sup>の株細胞も記載されている。今回我々は、2つのsIg<sup>+</sup> TdT<sup>+</sup>の形質を持った症例を経験し、それらに由来する株細胞 (Bay91およびTree92) を樹立した。これらの株細胞はRAG-1をも発現することを見いだした。さらにTree92細胞のsIgを抗μ鎖抗体でクロスリンクする事によりRAG-1の遺伝子発現が抑制されることを見いだした。これは、RAG-1の遺伝子発現がsIgを介する刺激により調整されうること示している。

### 材料と方法

症例1は24才女性で、出血傾向のため1991年5月に入院した。形態的にALL(L2)と診断され多剤併用化学療法を施行されたが、肺出血のため全経過4週間で死亡した。症例2は9か月女児で右頬部の腫瘤のため1991年6月に入院した。組織診断によりBurkitt-like small-cell non-cleaved diffuse lymphomaと診断され、化学療法を施行された。一時は寛解に至ったが、やがて白血化し全経過16ヶ月で死亡した。これらの患者末梢血より分離した単核球を10%FCS添加RPMI1640培地にて培養する事により、症例1より株細胞Bay91を、症例2より株細胞Tree92を樹立した。患者の末梢血細胞および樹立した株細胞について複数のモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を用いflow cytometryにより表面抗原解析を行った。EBウイルス特異的核抗原(EBNA)はReedmanらによる3段階法により検出した。また間接蛍光抗体法によりTdTの検出もおこなった。核型はトリプシン法によ

て得たG-band分裂像を解析し判定した。樹立した株細胞についてTdTおよびRAG-1の遺伝子発現をノザンプロット法により解析した。さらに株細胞Tree92細胞について、抗 $\mu$ 鎖抗体を使用してsIgのクロスリンクを行い、RAG-1の遺伝子発現の変化をノザンプロット法により検討した。

## 結果

症例1の新鮮白血病細胞および株細胞Bay91はともにCD20, CD22, CD24, HLA-DR, HLA-DQ, sIg ( $\kappa, \lambda$ ) を発現していたが、T細胞系抗原 (CD7, CD5, およびCD2), また骨髄球系抗原 (CD11b, CD13およびCD33), CD21, CD25およびCD34の発現はみられなかった。新鮮白血病細胞でみられなかったCD10の発現が株細胞Bay91で認められた。症例2の新鮮白血病細胞および株細胞Tree92はともにCD19, CD24, HLA-DRおよびHLA-DQを発現していたが、T細胞系抗原および骨髄球系抗原, CD10, CD20, CD25, CD34の発現はみられなかった。新鮮白血病細胞でみられなかったCD22およびsIg ( $\mu, \lambda$ ) の発現が株細胞Tree92で認められた。Bay91, Tree92ともにEBNAは検出されなかった。Bay91の核型はt(14;18)(q32;q21)を含む複雑な異常を示し、Tree92の核型はt(8;14)(q24;q32)を含む複雑な異常を示した。症例1および症例2の新鮮白血病細胞, 株細胞Bay91, Tree92全てにて蛍光抗体法でTdTの発現を認めた。さらにノザンプロット法で株細胞Bay91, Tree92が、TdTおよびRAG-1の遺伝子発現陽性であることを確認した。抗 $\mu$ 鎖抗体を使用して株細胞Tree92に対しsIgのクロスリンクをおこなったところ、ノザンプロット法でRAG-1遺伝子発現の有意な低下が認められた。

## 考察

TdTは永く未熟段階のリンパ球のマーカーとして使用されており、sIg<sup>+</sup>のB細胞では発現がないとされている。しかし、少数のTdT<sup>+</sup> sIg<sup>+</sup>のALL症例が過去に報告されてきた。TdTもRAG-1, および-2の遺伝子産物同様にVDJ再構成に参加する分子であるため、これらの症例もRAG-1を発現している可能性がある。TdTの発現はRAG-1より未熟な分化段階に限られていることがマウスの骨髄中のB細胞で示されており、TdTとsIgの同時発現よりRAG-1とsIgの同時発現のほうが頻度が高いと考えられる。

RAG-1および-2が最初に同定された際、T細胞受容体(TCR)やsIgが発現するともはやRAGは不要となり発現しなくなるものと考えられていた。しかしTCRを発現しているCD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>の胸腺段階のT細胞はRAGを発現していることがわかっている。B細胞においては、明らかにsIgが陽性の成熟した腫瘍性B細胞はRAGを発現しないことがすでに報告されている。しかし、Bay91やTree92の他に、少数のヒトおよびマウスのsIg<sup>+</sup> RAG<sup>+</sup>の形質を持つ株細胞が報告されており、また、正常のマウスの骨髄中に微量のsIg<sup>+</sup> RAG<sup>+</sup>の細胞の存在が報告されている。

これらの結果は単なる抗原受容体の存在だけではRAG遺伝子発現の抑制に至らない事を示している。従って、抗原受容体を介する刺激がRAGの発現調節に重要な役割を担っている事が推察されてきた。実際、胸腺段階のT細胞においてTCR-CD3複合体のクロスリンクがRAG遺伝子発現の抑制をきたすことが知られている。MaらはE $\mu$ -N-mycトランスジェニックマウスに発生するB細胞性腫瘍から樹立した株細胞で、sIgのクロスリンクが急速なRAG遺伝子発現の抑制を惹起することを示した。一方、Verkoczyらはヒトのリンパ腫から樹立したsIg<sup>+</sup> RAG<sup>+</sup>の株細胞においてsIgのクロスリンクがRAG遺伝子発現を逆に亢進させることを示した。今回の我々の結果はMaらの報告に近いものであったが、sIgのクロスリンクでRAG-1の遺伝子発現を完全には抑制できなかった。これらの観察からsI

gを介する刺激のRAG遺伝子発現調節における役割は、B細胞の分化段階、sIgを介する刺激の強度、あるいはサイトカインやT細胞を介してなされる刺激などにより影響されるものと考えられる。

#### まとめ

B-ALLより樹立した2つの株細胞を報告し、それらがsIg、TdT、RAG-1を同時に発現することを示した。正常B細胞における、sIg<sup>+</sup> TdT<sup>+</sup> RAG<sup>+</sup>の分化段階の存在が示唆され、sIgを介する刺激がRAG-1遺伝子発現調節に関与するものと考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

遺伝子再構成活性化遺伝子1および2(RAG-1,RAG-2)は、免疫グロブリン(Ig)とT細胞受容体(TCR)のVDJ再構成に必要不可欠な遺伝子である。一方、terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)は遺伝子再構成に際しVDJ結合部にN-nucleotideを付加し、IgとTCRの多様性を増大させる。これらは通常未熟段階のリンパ球でのみ発現し、膜表面免疫グロブリン(sIg)を発現するまでに成熟したB細胞では存在しないとされている。これらの遺伝子発現は、リンパ球の分化過程の各段階において厳密に調節をうけており、その調節機構の解明が現在重要な課題となっている。本研究は、その機構解明を目的として、リンパ性腫瘍患者から、従来同時に発現しないとされていたTdT、RAG-1、sIgの3つを同時発現する株細胞を樹立し、そのRAG遺伝子発現調節を検討したものである。

まず著者は24才女性のALL症例および9ヶ月女児の白血化したリンパ腫症例の腫瘍細胞より2つの株細胞Bay91およびTree92を樹立した。Bay91はCD20、CD22、CD24、HLA-DR、HLA-DQ、sIg( $\gamma$ , $\kappa$ )を発現し、t(14;18)(q32;q21)を含む染色体異常を呈していた。Tree92はCD19、CD24、CD22、HLA-DR、HLA-DQ、sIg( $\mu$ , $\lambda$ )を発現し、t(8;14)(q24;q32)を含む染色体異常を呈していた。Bay91、Tree92ともに蛍光抗体法でTdTの発現を認め、さらにノザンプロット法によりTdTおよびRAG-1の遺伝子発現が陽性であることを確認した。このように両細胞株は、sIg陽性であることから成熟B細胞と考えられるにもかかわらず、この分化段階では消失しているはずのTdT、RAG-1をmRNAのレベルでも発現していた。この結果は、同様の形質をもった一群の細胞が正常のB細胞分化においても存在する可能性を示唆するものである。

さらに著者はこのTree92細胞を使用して抗 $\mu$ 鎖抗体によるsIgのクロスリンク実験を行ったところ、有意にRAG-1遺伝子発現が抑制されることを見出した。正常B細胞の分化成熟にともなうRAG-1遺伝子発現の抑制機構は現在も不明であるが、本研究はsIgを介する刺激によりRAG遺伝子発現が抑制されることを証明したものである。同時にこの結果は単なる抗原受容体(sIg)の存在のみではRAG遺伝子発現の抑制に至らない事も示している。このように、本研究はRAG遺伝子発現調節機構の一部を解明するとともに、貴重なin vitroにおける実験モデルを提供したものである。

以上、本研究は白血病細胞から樹立した2つの株細胞がTdT,RAG-1,sIgを同時に発現することを証明し、RAG遺伝子発現調節におけるsIgを介する刺激の重要性を明らかにしたものであるが、従来知られていなかったB細胞分化におけるRAG遺伝子発現調節機構についての重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。