



Title	INDUCTION OF 19s IgM SECRETION IN A MURINE PRE-B CELL LINE, 70Z/3, BY CELL HYBRIDIZATION WITH NON-SECRETING MYELOMA CELLS
Author(s)	Yoshida, Nobuaki
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/33315
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名・(本籍)	吉 田 進 昭
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	第 6 0 1 1 号
学位授与の日付	昭 和 58 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医学研究科 内科系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	細胞融合法によるプレ B 細胞腫瘍株における 19S IgM 産生の誘導
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岸 本 進 (副査) 教 授 岸 本 忠 三 教 授 濱 岡 利 之

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

IgM の H 鎖 (μ 鎖) のみを産生している Pre-B 細胞において、将来産生するであろう免疫グロブリンの L 鎖の特異性もすでに決定されているのかどうか、又、マイトージェン以外に、細胞融合によっても Pre-B 細胞に免疫グロブリンの産生、分泌を誘導することができるのかどうかを、Pre-B 細胞腫瘍株を用いて検討した。

〔方法ならびに成績〕

細胞質内に μ 鎖を有するが、L 鎖は産生せず、細胞表面 IgM や分泌型の IgM を産生していない Pre-B 細胞腫瘍株、70Z/3 細胞 (TK 欠損株) と、非分泌型ミエローマ、P₃U₁ 細胞 (HGPRT 欠損株) を、ポリエチレングリコールにより融合させ、HAT 選択培地により融合細胞を選別、寒天培地にてクローニングを行ない、7 つのクローンを確立した。これらのハイブリドーマは、両親株の総和に近い染色体数を有し、蛍光染色法により、7 つのクローンのうち 4 つが細胞質内に IgM を有することがわかった。又、これらの 4 つのクローンは、培養上清中に IgM を分泌していることがラジオイムノアッセイにて確認された。これらの分泌されている IgM が、7 S サブユニットか 19S ペンタマーかを、SDS-PAGE で検討した。細胞を ¹⁴C-アミノ酸含有培地で 8 時間培養し、培養上清を抗 IgM 抗体と *Staphylococcus aureus* Cowan I で処理した後、非還元状態で SDS-PAGE を行なった結果、IgM ミエローマ蛋白、MOPC-104E と全く同じ移動度を示した。又、還元状態で SDS-PAGE を行なった場合にも、MOPC-104E の H、L 鎖と同じ位置に μ 鎖、 κ 鎖が泳動されていることがわかり、ハイブリドーマが分泌している IgM は 19S ペンタマーであり、 μ 鎖は分泌型であることがわかった。親株の

一方として用いた非分泌型ミエローマ、 P_3U_1 は、もとはIgGを分泌しているミエローマであったことから、このハイブリドーマの分泌するIgMの μ 鎖は、70Z/3細胞由来と考えられる。一方、ハイブリドーマにおいて産生された κ 鎖が、70Z/3細胞由来か、 P_3U_1 細胞由来かを知るために、非平衡二次元電気泳動を行った。70Z/3細胞は、リボ多糖体(LPS)刺激により κ 鎖の産生が誘導され、細胞表面にIgMをもつことが知られているので、LPS刺激した70Z/3細胞を κ 鎖のソースとして用いた。一方、 P_3U_1 細胞は非分泌型ミエローマなので、それが由来したIgG分泌型ミエローマ、X63を κ 鎖のソースとして用いた。その結果、ハイブリドーマの κ 鎖は、LPS刺激した70Z/3細胞由来 κ 鎖と同じ位置に泳動され、X63細胞の κ 鎖とは異なることが示され、ハイブリドーマにおいて誘導された κ 鎖は、70Z/3細胞遺伝子由来であることが明らかとなった。次に、ハイブリドーマの産生するIgMのイディオタイプと、LPSで誘導された70Z/3細胞表面IgMのイディオタイプが同じものであるかを、ハイブリドーマ由来のIgMに対する抗イディオタイプ抗体を作成して検討した。1つのハイブリドーマクローンのIgMに対して作成した抗イディオタイプ抗体は、他のクローンのIgMとも特異的に結合するが、他のミエローマのIgMやIgG、正常血清とは反応しないことが明らかとなった。ラジオイムノアッセイの結果より、この抗イディオタイプ抗体は、 μ 鎖とは部分的にしか反応しないことより、ハイブリドーマIgMのイディオタイプは、 μ 鎖、 κ 鎖両方により担われていることがわかる。次に、この抗イディオタイプ抗体で、LPSで誘導された70Z/3細胞表面のIgMを蛍光染色した所、細胞表面に誘導されたIgMは、どの細胞においても、すべて同じイディオタイプをもつことが示された。

[総括]

Pre-B細胞株として知られる70Z/3細胞と非分泌型ミエローマとの細胞融合により、Pre-B細胞遺伝子由来の19S IgMの分泌が誘導されうること示した。70Z/3細胞のLPS刺激は、 κ 鎖の産生を誘導し、細胞表面にIgMを出現させるが、IgMの分泌を誘導することはできない。しかし、ミエローマとの細胞融合によっては、細胞表面IgMを誘導せず、分泌型IgMを誘導した。このことは、すでに遺伝子レベルで明らかにされている膜型及び分泌型 μ 鎖に対して、細胞融合がmRNAのスプライシングの変化を誘導したことを示唆する。又、19S IgMの産生は、細胞融合が κ 鎖のみならず、J鎖遺伝子をも活性化したことを示唆する。又、細胞表面に抗原結合基としての免疫グロブリンレセプターを表出していないPre-B細胞が、LPS刺激によっても、細胞融合という手段によっても、全てのクローンに同じイディオタイプをもつIgMを産生したことは、Pre-B細胞のレベルにおいて、将来どの抗原に対応する抗体を作るかという特異性の決定が、すでになされているということを示すものである。

論文の審査結果の要旨

本研究はPre-B細胞(70Z/3)と、非分泌型ミエローマ(P_3U_1 細胞)を融合させ、Pre-B細胞由

来の19S IgMを産生分泌するハイブリドーマクローンをつくり、そのイデオタイプを解析すると、これらクローンでは同一であるところから、Pre-B細胞レベルにおいて、将来つくられる抗体の特異性が決定されていることを明らかにしたものである。

B細胞系の分化の研究に寄与するところ大である。