



|              |                                                                                     |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Isotype switching in murine pre-B cell lines                                        |
| Author(s)    | Akira, Shizuo                                                                       |
| Citation     | 大阪大学, 1984, 博士論文                                                                    |
| Version Type | VoR                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/33963">https://hdl.handle.net/11094/33963</a> |
| rights       |                                                                                     |
| Note         |                                                                                     |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

【1】

|         |                                              |        |         |        |
|---------|----------------------------------------------|--------|---------|--------|
| 氏名・（本籍） | あき<br>審                                      | ら<br>良 | しず<br>静 | お<br>男 |
| 学位の種類   | 医                                            | 学      | 博       | 士      |
| 学位記番号   | 第                                            | 6381   | 号       |        |
| 学位授与の日付 | 昭和59年3月24日                                   |        |         |        |
| 学位授与の要件 | 医学研究科 病理系専攻<br>学位規則第5条第1項該当                  |        |         |        |
| 学位論文題目  | マウスプレB細胞株におけるクラススイッチ機構の解析                    |        |         |        |
| 論文審査委員  | (主査)<br>教授 松本 圭史<br>(副査)<br>教授 本庶 佑 教授 岸本 忠三 |        |         |        |

論文内容の要旨

（目的）

Bリンパ球は、その分化過程で免疫グロブリン(Ig)遺伝子の再構成を伴う。造血幹細胞は、細胞質内に $\mu$ 鎖だけを産生する pre-B 細胞に分化し、その際H鎖遺伝子において未分化細胞では離れて存在するV,D,J 遺伝子の間でV-D-J 結合がおこる(可変部形成)。つづいてL鎖遺伝子のV-J結合によりL鎖が形成されると、pre-B細胞は、細胞膜表面にIgMをもつB細胞となる。その後抗原やT細胞の助けで、B細胞はIgM産生形質細胞や他のアイソタイプ(IgG, IgAあるいはIgE)のB細胞を経たのち、各アイソタイプの形質細胞に分化する。その際、IgMで形成されたのと同じV-D-J 結合が、介在するC<sub>H</sub> 遺伝子を欠落して他のC<sub>H</sub> 遺伝子と連結する(クラススイッチ)。以上がB細胞分化とそれに伴うIg遺伝子再構成との関係の一般に認められたモデルであるが、このモデルは最終分化段階にある形質細胞腫と未分化細胞の遺伝子の比較から得られたデータに基づき推測されたもので、pre-B細胞レベルでの実際の解析やクラススイッチ前後でのsequentialな変化を見たものは少ない。一方、pre-B細胞の段階ですでにクラススイッチがおこりうる可能性やB細胞やpre-B細胞の段階ではDNA再構成を伴わない、RNAスプライシングによるアイソタイプ発現の存在が示唆されている。

本研究で我々は Abelsonマウス白血病ウイルスでpre-B細胞を腫瘍株化し、その中にin vitroで培養中に自然にクラススイッチを行なうものを見出し、その前後におけるIg遺伝子の状態を検索し、pre-B細胞におけるクラススイッチの機構を解析した。

（方法ならびに成績）

1.  $\gamma 2b$  産生 pre-B細胞株の発見とそのクローニング

Abelsonウィルスを、Balb/c及びCBA/Nマウスの腹腔内に注入し、1カ月後腫大した脾臓より腫瘍細胞をとり出し、in vitro で培養し継代可能な株細胞を樹立した。これらの細胞株のH鎖、L鎖産生を、蛍光抗体法もしくはSDS-PAGE法により調べた。樹立した細胞株は、表面免疫グロブリンを有せず、一部に $\mu$ 鎖を細胞質内に有するものはあったが、L鎖産生はみられなかった。CBA/Nマウス由来のSL2-1株は、最初なんらIg産生がみられなかったがin vitro で培養中に、0.1~0.2%の細胞が $\gamma$ 2b鎖を細胞質内に有するようになり、軟寒天培地上でクローニングを行ない100% $\gamma$ 2b陽性株SL2-1-52を得た。一方、Balb/cマウス由来の $\mu$ 陽性株AT24-6も、in vitro で培養中にクラススイッチを行ない100% $\gamma$ 2b陽性株AT24-6-99を得た。

## 2. SL株におけるクラススイッチ

SL2-1株(non-producer)とSL2-1-52株( $\gamma$ 2b producer)からDNAをとり、サザンブロット法により各Ig遺伝子の解析を行なった。SL2-1株、SL2-1-52株ともにK鎖は胎児型でDNA再構成はみられず、pre-B細胞レベルにあることが示された。またSL2-1株、SL2-1-52株ともに、一方の染色体でC $\gamma$ 2b遺伝子の上流に存在するC<sub>H</sub>遺伝子(C $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ 3,  $\gamma$ 1)を欠落していた。SL2-1株、SL2-1-52株は、ともに両方のJ<sub>H</sub>部はDNA再構成をおこしていたが、一方のフラグメントは同じ泳動位置にあり、もう一方のフラグメントは異なる位置にあった。このことは、 $\gamma$ 2b産生には、SL2-1株の一方のJ<sub>H</sub>部でさらにDNA再構成がおこったことが示唆された。以上より、SL2-1株は、Ig産生のみられない細胞であるが両方のJ<sub>H</sub>遺伝子はすでにDNA再構成をおこしており、K鎖はDNA再構成がないのに、すでにクラススイッチを行ない $\gamma$ 2b鎖より上流のC<sub>H</sub>遺伝子が欠落していること、その後J<sub>H</sub>部にさらにDNA再構成がおこり機能的な可変部が形成され直接 $\gamma$ 2b鎖を産生するようになったことが示された。

## 3. AT株におけるクラススイッチ

AT24-6株( $\mu$  producer)とAT24-6-99株( $\gamma$ 2b producer)からDNAをとり出し、同様にサザンブロット法により各Ig遺伝子の解析を行なった。J<sub>H</sub>遺伝子はどちらの細胞株も同一のパターンを示していたが、AT24-6-99株では、C $\mu$ 遺伝子以下C $\gamma$ 2bより上流のC<sub>H</sub>遺伝子が一方の染色体で欠落していた。以上より、AT24-6-99株は、AT24-6株で発現していたV-D-J結合をそのまま保ちながら介在するC<sub>H</sub>遺伝子を欠落することにより $\gamma$ 2b鎖を産生するようになったことが示された。

(総括)

1. Abelsonマウス白血病ウイルスで腫瘍株化したpre-B細胞株中に、in vitro で培養中に自然にクラススイッチを行なうものを見出し、pre-B細胞レベルでもクラススイッチのおこりうることを示した。
2. pre-B細胞におけるクラススイッチも形質細胞で見られたと同様に介在するC<sub>H</sub>遺伝子が欠落することによることを示した。
3. 可変部形成に先行してC<sub>H</sub>遺伝子の欠落をみる場合があり、必ずしもクラススイッチに $\mu$ 鎖の発現が先行する必要のないことを示した。

## 論文の審査結果の要旨

本研究は、in vitro で自然にクラススイッチを行なうマウスプレB細胞株を見出し、その前後における遺伝子解析から、B細胞及び形質細胞の段階でおこると考えられていたクラススイッチが明らかにプレB細胞の段階でおこりうることを、そのクラススイッチが形質細胞腫でみられたと同様のC<sub>H</sub>遺伝子欠落によりおこること、また可変部形成に先行してC<sub>H</sub>遺伝子の欠落がおこりうる可能性を示し、Bリンパ球分化機構の解明に新たな知見を加えたものと思われる。