



Title	Molecular Cloning and Chromosomal Mapping of a Bone Marrow Stromal Cell Surface Gene, BST2, That May Be Involved in Pre-B-Cell Growth
Author(s)	石川, 淳
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40335
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

氏 名	いし かわ じゅん 石 川 淳
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 6 8 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 年 9 月 19 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	Molecular Cloning and Chromosomal Mapping of a Bone Marrow Stromal Cell Surface Gene, BST2, That May Be Involved in Pre-B-Cell Growth (pre-B 細胞の増殖に関与する骨髄ストローマ細胞上の新規膜蛋白の遺伝子クローニング)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松 沢 佑 次 (副査) 教 授 越 智 隆 弘 教 授 平 野 俊 夫

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

B前駆細胞の増殖には IL-7 などの液性因子だけではなく、骨髄ストローマ細胞との直接接触が必要であるとされているが、その機構は不明である。慢性関節リウマチや多発性骨髄腫患者の骨髄より樹立した骨髄ストローマ細胞株は正常由来の骨髄ストローマ細胞株に比し、pre-B 細胞株の増殖支持能が高く、しかもこの増殖支持能は未知のストローマ細胞膜上の膜蛋白を介していることが示唆された。この知見をもとに、本研究では pre-B 細胞の増殖に関与する骨髄ストローマ細胞上の新規膜蛋白を同定し、B 前駆細胞の増殖機構を明らかにすることを目的とした。

(方法と成績)

pre-B 細胞の増殖支持能の高いヒト骨髄ストローマ細胞株を Balb/c マウスに免疫し、これらのストローマ細胞株とは反応するが、正常由来で pre-B 細胞の増殖支持能を持たないストローマ細胞株とは反応しない抗ヒトストローマ細胞抗体 RF3, SG2, RS38 を樹立した。RF3 と SG2 は互いに他の結合を阻害することから同一の分子を認識するものと考えられた。RF3/SG2 および RS38 の認識する蛋白をそれぞれ bone marrow stromal antigen1, 2 (BST-1, BST-2) と名付けた。各種細胞株での発現をフローサイトメーターで検討するとストローマ細胞株以外では BST-1 は単球性白血病細胞株 U937 や臍帯血由来血管内皮細胞に、BST-2 は CL4 等の B 細胞系の細胞株に発現していた。

BST-1, 2 を高発現しているストローマ細胞株から発現ライブラリーを作製し、ヒト胎児腎細胞株, 293T 細胞にリン酸カルシウム法で transfection したのち RF3, RS38 抗体を用いてフローサイトメーターでスクリーニングし、RF3, RS38 の認識する膜蛋白をコードする cDNA を単離した。BST-1 の cDNA は全長1418 bp で最長 open reading frame (ORF) から318アミノ酸からなり、N 末及び C 末に疎水性部分が存在し、それぞれ signal sequence, transmembrane region と推定された。また、BST-2 の cDNA は全長996 bp で最長 ORF から180アミノ酸からなり、N 末の20個の親水性部分に続いて28個の疎水性部分が存在し、N 末が細胞質内にある typeII の膜蛋白と推定された。

BST-1 はアミノ酸レベルでヒトリンパ球抗原 CD38 と 33%, アメフラシ cyclase と 26% の homology が認められた。BST-2 は有意なホモロジーは認められなかった。また BST-1 は phosphatidylinositol-specific phospholipase C

処理にて発現が低下することから glycosyl-phosphatidylinositol anchor 型の膜蛋白であることが証明された。

種々の組織での発現をノザンプロット法で検討すると BST-1 は腎, 肺, 胎盤に, BST-2 は肝, 肺, 胎盤, 心に強く発現していた。また細胞表面をビオチン化した後, モノクローナル抗体で免疫沈降した結果, BST-1, -2 の分子量はそれぞれ約 45 kDa, 約 35 kDa であった。

BST-1, 2 が pre-B 細胞の増殖にかかわるか検討するため, マウス繊維芽細胞株 BALB3T3 に発現させた stable transfectant を作製し, マウスストローマ細胞依存性 pre-B 細胞株 DW34 と共培養を行い, 回収した DW34 の細胞数を算定した。BST-1, 2 を発現させた細胞株では非発現株に比し DW34 の細胞数が約 2 倍に増加しており, BST-1, 2 が pre-B 細胞の増殖に関与している可能性が示唆された。

(総括)

1. 骨髓ストローマ細胞上に発現している新規膜蛋白 BST-1, 2 を認識するモノクローナル抗体 RF3/SG2, RS38 を樹立し, 発現クローニング法により BST-1, BST-2 をコードする遺伝子を単離した。最長 ORF より BST-1 は 318 アミノ酸, BST-2 は 180 アミノ酸からなると推定された。
2. BST-1 はアミノ酸レベルでヒトリンパ球抗原 CD38 と 33%, アメフラシ cyclase と 26% の homology が認められた。
3. BST-1 は分子量 45 kDa で GPI-anchor 型の, BST-2 は 35 kDa で typeII の膜蛋白であった。
4. マウス繊維芽細胞株に BST-1, BST-2 を発現させることにより, pre-B 細胞株の増殖が約 2 倍助長された。このことから, BST-1 と BST-2 は B 前駆細胞の増殖に関与している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は pre-B 細胞の増殖に関与する骨髓間質細胞上の新規膜蛋白 BST-1, BST-2 の cDNA クローニングを行ったものである。pre-B 細胞株の増殖支持能の高い骨髓間質細胞株と反応し, pre-B 細胞株の増殖支持能のない骨髓間質細胞株とは反応しないモノクローナル抗体 RF3/SG2, RS38 を樹立した。また, 発現クローニング法により, これらのモノクローナル抗体が認識する新規膜蛋白 BST-1, BST-2 をコードする cDNA を単離することに成功した。

BST-1 は, 318 アミノ酸からなり, ヒトリンパ球抗原 CD38 と 33% のホモロジーが認められ, 分子量 45 kDa の GPI-anchor 型の膜蛋白であった。また, BST-2 は, 180 アミノ酸からなり, 分子量 35 kDa の N 末が細胞質内にある typeII の膜蛋白であった。種々の組織での発現をノザンプロット法で検討すると, BST-1 は腎, 肺, 胎盤に, BST-2 は, 肝, 肺, 胎盤, 心に強く発現していた。

さらに, BST-1 と BST-2 を発現させた繊維芽細胞と pre-B 細胞株を共培養した結果から, BST-1, BST-2 が pre-B 細胞株の増殖に関与していることを明らかにした。BST-1, BST-2 の同定は, B lymphopoiesis の機構を明らかにする上で意義深いものであり, 学位に値すると考えられる。