Osaka University Knowledge Archive

Title	Induction of Recombination Activating Gene Expression in a Human Lymphoid Progenitor Cell Line : Requirement of Two Separate Signals From Stromal Cells and Cyotkines
Author(s)	田合, ひろみ
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41159
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【 24 】

氏　　名	田合（たごう）　ひろみ
博士の専攻分野の名称	博　　士（医　　学）
学 位 記 番 号	第　14021　号
学位授与年月日	平成10年4月23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	Induction of Recombination Activating Gene Expression in a Human Lymphoid Progenitor Cell Line: Requirement of Two Separate Signals From Stromal Cells and Cyotkines. (ヒトリンパ球前駆細胞におけるRecombination activating gene (RAG) 発現の誘導：ストローマ細胞およびサイトカインからの2つのシグナルの必要性)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 吉崎 和幸 (副査) 教 授 平野 俊夫　教 授 宮坂 昌之

論 文 内 容 の 要 旨

[目　的]

B/Tリンパ球の第一次レパトアー形成は，recombination signal sequense (RSS) を介したV(D)J再構成によって行われる。recombination activating gene (RAG)：RAG-1，RAG-2は，線維芽細胞に導入されたRSSを有する組み換え基質に対し，V(D)J再構成を誘導する遺伝子として同定された。RAGの発現はリンパ球初期分化過程に特異的に見られ，B/T細胞受容体遺伝子の再構成に一致して発現し，再構成完了後shut offされる。RAG-1あるいはRAG-2欠損マウスにおいては，V(D)J再構成を行うことができず，成熟リンパ球は発現しない。すなわち，RAG発現がリンパ球初期分化に必須であると考えられるが，このRAG発現を制御するシグナルについては未だ明らかとなっていない。本研究では，in vitro培養系でヒトリンパ球前駆細胞に対しRAG発現を誘導する系を確立し，RAG発現誘導にかかわるシグナルについての解析を行った。

[方法]

ヒトリンパ球前駆細胞株として胎児肝由来細胞株FL8.2.4.4 ($CD2^+$，$CD19^+$，Ig，TCR遺伝子非再構成型)，ストローマ細胞株としてマウス骨髄由来細胞株PA-6，マウス線維芽細胞株として3T3を用いた。FL8.2.4.4を，ヒトサイトカイン (IL-2，IL-3，IL-4，IL-6，IL-7，SCF，GM-CSF) 存在下，非存在下でPA-6あるいは3T3細胞と共培養を行った。一定時間培養後細胞を回収し，全RNAを抽出，RT-PCR法にてRAGの発現を調べた。リコンビナーゼ活性の測定は，マウスIgH鎖DQ52-JH2のRSSを含む組み換え基質，MHSDR (1/2) ST-13を用いて行った。FL8.2.4.4に対し組み換え基質を導入後，ヒトIL-3，IL-6，IL-7存在下でPA-6と共培養を行い，導入された基質プラスミドのクロラムフェニコール耐性および制限酵素ApaLI認識配列の獲得をもってリコンビナーゼ活性とした。

[成績]

ヒトサイトカイン存在下でPA-6と共培養することにより，FL8.2.4.4にRAGの発現が誘導されたが，ヒトサイト

カインのみ，あるいはサイトカイン存在下で3T3と共培養を行ってもRAGの発現は誘導されなかった。このとき誘導されるRAGの発現は，ヒトプレB細胞株Nalm 6細胞における発現量の約10^{-3}～10^{-4}である。この誘導に必要なサイトカインはヒトIL-3，IL-6，IL-7であり，これらは単独でもRAGの発現を誘導するが，三者が共存することによってさらに強い誘導活性を示した。メンブレンフィルターを用いて，FL8.2.4.4をPA-6と分離して培養すると，RAGの発現誘導は全く見られなかった。このことは，FL8.2.4.4に対するRAG発現誘導にはPA-6との物理的接触が必要であることを示している。

組み換え基質を用いたリコンビナーゼ活性の測定を行ったところ，培養前のFL8.2.4.4にはリコンビナーゼ活性は認められなかったが，IL-3，IL-6，IL-7存在下でPA-6と共培養後，リコンビナーゼ活性が検出された。この活性はRAGを強く発現しているNalm 6細胞における活性の約1/100であった。このことから，サイトカインおよびストローマ細胞からのシグナルによって，ヒトリンパ球前駆細胞株FL8.2.4.4にRAG発現のみならずリコンビナーゼ活性も誘導されることが明らかとなった。

［総括］

本研究では，ヒトリンパ球前駆細胞株FL8.2.4.4に対しRAGの発現を誘導する系を確立し，その発現誘導にかかわるシグナルについての解析を行った。その結果，ヒトリンパ球前駆細胞株FL8.2.4.4に対するRAG発現誘導には少なくとも2つのシグナル，1つはサイトカインを介するシグナル，もう1つはストローマ細胞との接触によるシグナルが必要であることが明らかとなった。このとき，サイトカインとしてはIL-3，IL-6あるいはIL-7がRAG発現誘導活性を示した。また，サイトカイン＋ストローマ細胞からのシグナルでRAGのみならずリコンビナーゼ活性も誘導された。

このような系は，RAG発現誘導のメカニズム，それにかかわる分子/シグナルの解析，さらにはリンパ球初期分化機構の解析に有用であると思われる。

論文審査の結果の要旨

遺伝子再構成を誘導するRecombination activating gene（RAG）は，リンパ球分化過程の中でB/T細胞受容体遺伝子の再構成の時期に一致して発現する。また，RAG遺伝子欠損マウスにおいては成熟リンパ球が出現しない。すなわち，RAGの発現はリンパ球分化過程における必須のステップであり，このRAG発現制御機構を知ることはリンパ球初期分化過程を解明する上で重要であると考えられる。しかしながら，RAG発現を制御するシグナルについては未だ明らかとなっていない。

本研究は，リンパ球初期分化メカニズムを解明する目的でヒトリンパ球前駆細胞に対しRAGの発現を誘導する系を確立し，その発現誘導にかかわるシグナルについての解析を行ったものである。ヒト胎児肝細胞由来細胞株（FL8.2.4.4）はRAGを発現する以前の未熟な細胞であるが，この細胞に対し，ヒトサイトカイン（IL-3，IL-6，IL-7）およびマウスストローマ細胞株PA-6との物理的接触という2つのシグナルによってRAGの発現が誘導されることが示された。このことは，リンパ球初期分化過程におけるサイトカインとストローマ細胞の役割について解明する上で重要な知見である。よって，本研究は学位の授与に値するものと考える。