
研究報文

マウスの胸腺と脾臓における IgE 転写の比較

浅貝 愛美, 木下 裕子, 瀧本 優子, 辻 朋子,
長谷 麻子, 山本 愛子, 宮田 堅司

A Comparison of IgE Gene Transcription in the Thymus with That in the Spleen of the Mouse

Manami Asagai, Yuko Kinoshita, Yuko Takimoto, Tomoko Tsuji,
Asako Nagatani, Aiko Yamamoto and Kenji Miyata

Immunoglobulin heavy chain gene transcription was investigated by reverse transcription PCR both in the thymus and in the spleen of BALB/c mice of age 1 to 5 weeks old. A definitive difference in IgE transcriptions was found between in the thymus and in the spleen. IgE transcriptions were demonstrated clearly in the thymus of all mice, while, in the spleen, not detected in 1 to 3 weeks old. Therefore, the cells transcribing antibody genes in the thymus of mouse are neither B lymphocytes in blood vessels, nor invaded B lymphocytes after proliferation and development in the spleen. Those will be specific cells which proliferate and develop in the thymus from stem cells which immigrated at embryonic stage.

(Received September 1, 2005)

1. はじめに

胸腺は、発生期に原基に流入した幹細胞から胸腺細胞が分化増殖し T リンパ球となり、T セルリセプター (TCR) を介してポジティブ-ネガティブ二重選択を受ける器官である^{1,2)}。選択された T リンパ球は、脾臓、リンパ節および粘膜のリンパ組織へ移行し、B リンパ球に作用し抗体産生を促す³⁾。前報において、BALB/c マウス胸腺において胎生期から抗体遺伝子が転写されていること、抗体のクラススイッチが起きていること、胸腺分離細胞の一次培養上清中に抗体が検出されることから、胸腺には抗体産生細胞も存在することを示し、胸腺内で T リンパ球が抗体産生細胞に作用している可能性を示唆した⁴⁾。

また、生後 1.5 日齢のマウスの胸腺と脾臓におけ

る抗体遺伝子の転写に僅かに差異が認められることから、胸腺で抗体遺伝子を転写し抗体を産生している細胞は、脾臓等の二次リンパ組織で分化し胸腺に流入してきた細胞、あるいは、胸腺内に分布する血管内のリンパ球である可能性を否定した。本報では、生後数週齢間の胸腺と脾臓における抗体遺伝子の転写を比較した結果、IgE 遺伝子の転写に明瞭な差異が認められることを見出した。

II. 方 法

1. 材料

コンベンショナル BALB/c マウスを用いた。出生後 3 週間は母親マウスと同居させ、21 日齢で雌雄別々のケージに移した。固形試料 (MF, オリエンタル酵母) および水道水は自由に摂取させた。頸椎脱臼させたマウスを開腹、開胸し胸腺および脾臓を摘出した。摘出した試料はサンプルチューブに入れ、直ちに液体窒素中で凍結した後、 -80°C で保存した。

2. RNAの抽出

凍結した組織より、酸性グアニジンチオシアン酸—フェノール—クロロホルム法によってトータル RNA を抽出した⁵⁾。エタノール沈殿法により精製したトータル RNA は、濃度 100 ng/ μ l に調整した。

3. RTPCR

トータル RNA 300 ng を鋳型として RTPCR を行った。逆転写反応は M-MLV リバーストランスクリプターゼ (RT-PCR high, 東洋紡), 6 塩基のランダムプライマーを用い, 30°C で 10 分間, さらに 42°C で 1 時間行った。99°C で 5 分間処理することにより反応を停止させるとともに鋳型 RNA を分解した。この反応産物に, 抗体 IgM, IgG3, IgA および IgE の H 鎖を増幅するためのプライマーおよびリコンビナントタック DNA ポリメラーゼを加えて PCR を行った。PCR に用いたプライマーを下記に示した。これらのプライマーは, 少なくとも一つのイントロン領域を間に含むエクソン領域に相補的に結合するように設定した。したがって, 目的の mRNA に基づく増幅 DNA とトータル RNA 中に混入したゲノム DNA に因り増幅されてくる DNA との区別が可能である。プライマー IgM-F TGGCTGAACCTGAATGTGTACA
プライマー IgM-B GCACTGGTCACATACTTCTCTT
プライマー IgG3-F TTGTCAAAGGCTACTTCCCTGA
プライマー IgG3-B TTGTTGACCTTGCAATTTGAACT
プライマー IgA-F AACCCCGTCCAAGAATTGAA
プライマー IgA-B TTTAGGGTTGAAAGCTCGCA
プライマー IgE-F AACATGAGCACTGTGAACTT
プライマー IgE-B AGCACCGTTTTGATACAGGT

これらのプライマーを用いることにより, IgM では 581 塩基対の, IgG3 では 541 塩基対の, IgA では 490 塩基対の, IgE では 537 塩基対の DNA フラグメントが増幅される。PCR の条件は, 反応溶液容量 50 μ l, 鋳型変性温度 96°C および変性時間 30 秒, プライマーアニーリング温度 55°C およびアニーリング時間 1 分, 相補鎖合成反応温度 72°C および反応時間 2 分, 35 サイクルに設定した。

4. デンシトメトリー

PCR 終了後, 反応溶液 10 μ l をアガロースゲルで電気泳動した。マーカー DNA (λ /Hind III) 0.5 μ g を同時に電気泳動した。エチジウムブロマイドによる染色像を Laboratory Imaging and Analysis System (UVP) に取り込み, マーカー DNA の 564 塩基対のフラグメントのデンシティーに対する IgE のデンシティーの比を求めた。

III. 結 果

コンベンショナルな状況下で飼育した, 生後 1 週齢から 5 週齢, 雌雄の BALB/c マウスの胸腺および脾臓のトータル RNA を用いて, 抗体 H 鎖遺伝子の転写を RTPCR 法で調べた。IgE の転写量に関して, 胸腺と脾臓で, また, 雌雄によって差異が認められた。

1. 雌マウスの抗体遺伝子の転写

生後 7 日齢雌マウスでは, 胸腺では調べた全てのクラスの抗体の H 鎖が転写されていた。IgE の mRNA に因る増幅された DNA 断片も明瞭に検出された。一方, 脾臓では IgM および IgG3 の転写は検出されたけれども, IgA および IgE の転写は検出されなかった (図 1a, b)。14 日齢, 21 日齢でも同様の結果が得られ, IgE の転写は胸腺では検出されたけれども, 脾臓では検出されなかった。23 日齢, 29 日齢では, 脾臓においても IgE の転写が検出される個体も存在した。これらの個体では, 脾臓での IgE の転写量は, IgM や IgG3 に比較すると僅かであった (図 1c, d, e, f)。

2. 雄マウスの抗体遺伝子の転写

生後 7 日齢雄マウスでは, 胸腺では調べた全てのクラスの抗体が転写されていた。しかし, 脾臓では IgE の転写は検出されなかった (図 2a, b)。14 日齢, 21 日齢でも同様の結果が得られ, 胸腺では IgE の転写が検出されたけれども, 脾臓では検出できなかった。35 日齢においても, 脾臓では IgE の転写は検出できなかった (図 2c, d)。

3. 胸腺および脾臓における IgE 転写量の比較

電気泳動のマーカーとして用いた λ -HindIII DNA の 564 塩基対の DNA 断片の染色度を基準として, IgE の染色度を求めた。雌雄ともに胸腺における IgE の転写量は加齢に伴い増大する傾向が認められた。脾臓における IgE の転写量は僅かであった。雌では, 3 ~ 4 週齢の間で脾臓での IgE 転写の僅かな増大が認められた (図 3)。

IV. 考 察

一次リンパ組織である胸腺は, T リンパ球が増殖, 分化しポジティブ・ネガティブ二重選択を受ける場であり, 適度に自己 MHC を認識し, 自己抗原に反応しない T リンパ球のみが脾臓やリンパ節等の二次リンパ組織に移動し, B リンパ球を活性化することにより抗体産生に関与する²⁾。

前報において, BALB/c マウスの胸腺において, 胎

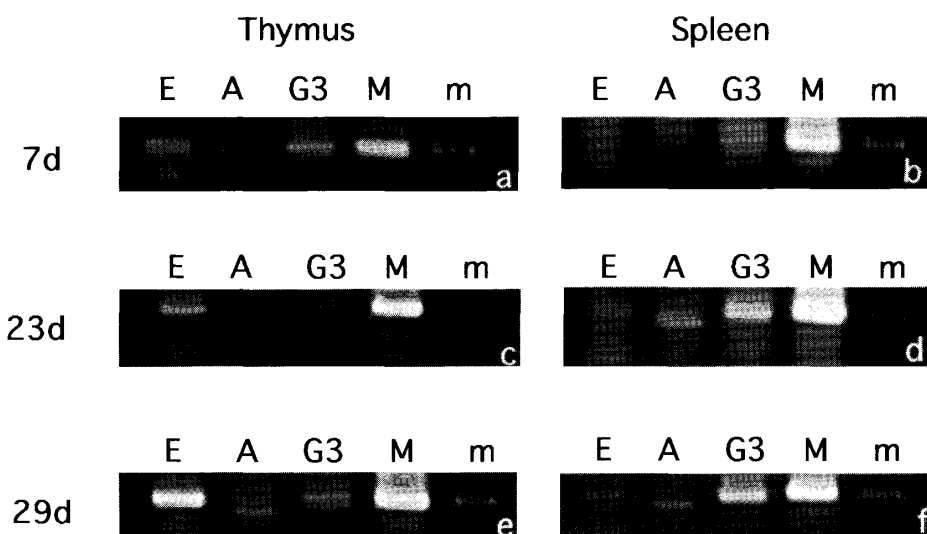


図 1 BALB/c 雌マウス胸腺および脾臓における抗体遺伝子の転写
a, b; 7 日齢, c, d; 23 日齢, e, f; 29 日齢。胸腺 (Thymus) では IgE の転写産物が明瞭に認められ、加齢に伴い増大する傾向を示した。7 日齢の脾臓 (Spleen) では、IgE は検出できなかった。23 日齢, 29 日齢では、脾臓においても IgE の転写が検出された。レーン m; λ -DNA/HindIII の 564 b.p. フラグメント, M; IgM, G3; IgG3, A; IgA, E; IgE

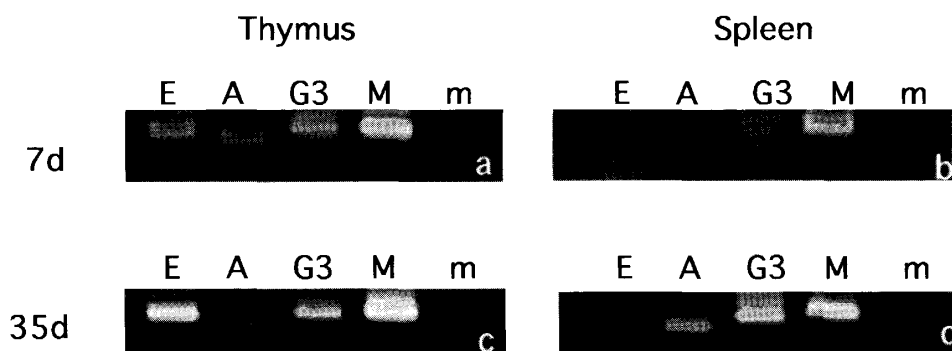


図 2 BALB/c 雄マウス胸腺および脾臓における抗体遺伝子の転写
a, b; 7 日齢, c, d; 35 日齢。胎生 18 日齢。胸腺では IgE の転写産物が明瞭に認められた。脾臓では、IgE の転写産物は 35 日齢でも検出できなかった。レーン m; λ -DNA/HindIII の 564 b.p. フラグメント, M; IgM, G3; IgG3, A; IgA, E; IgE

生期から抗体遺伝子が転写されていること、胎生期胸腺細胞の一次培養上清中に抗体が産生されていることより、胸腺にも抗体産生細胞が存在することを示した⁴⁾。本報では、生後 1 週齢から 5 週齢間の胸腺および脾臓での抗体遺伝子の転写を検討した。IgM, IgG3 および IgA の転写に関しては、胸腺と脾臓で差異は認め難かったけれども、IgE の転写に関しては明瞭な差異が認められた。雌雄ともに胸腺では、IgE は 1 週齢から転写が起きていたけれども、脾臓では 3 週齢までは検出できなかった。雌では、3 週齢から 4 週齢の間で、脾臓でも IgE の転写が検

出され始めた。雄では、5 週齢まででは、脾臓で IgE の転写は検出できなかった。デンストメトリーの結果では、雌雄ともに、胸腺における IgE の転写量は加齢にともない増大する傾向が認められた。脾臓では転写量は僅かであり、雌では 3 ~ 4 週齢の間で僅かな増大が認められた。IgE の転写は、雌雄ともに脾臓よりも胸腺で先に開始されることが明らかとなった。胸腺における IgE の転写が血液中の B リンパ球によるものであるならば、血液細胞がより多く存在する脾臓でも IgE の転写が検出されるはずである。また、脾臓で分化した B リンパ球が胸腺へ流入

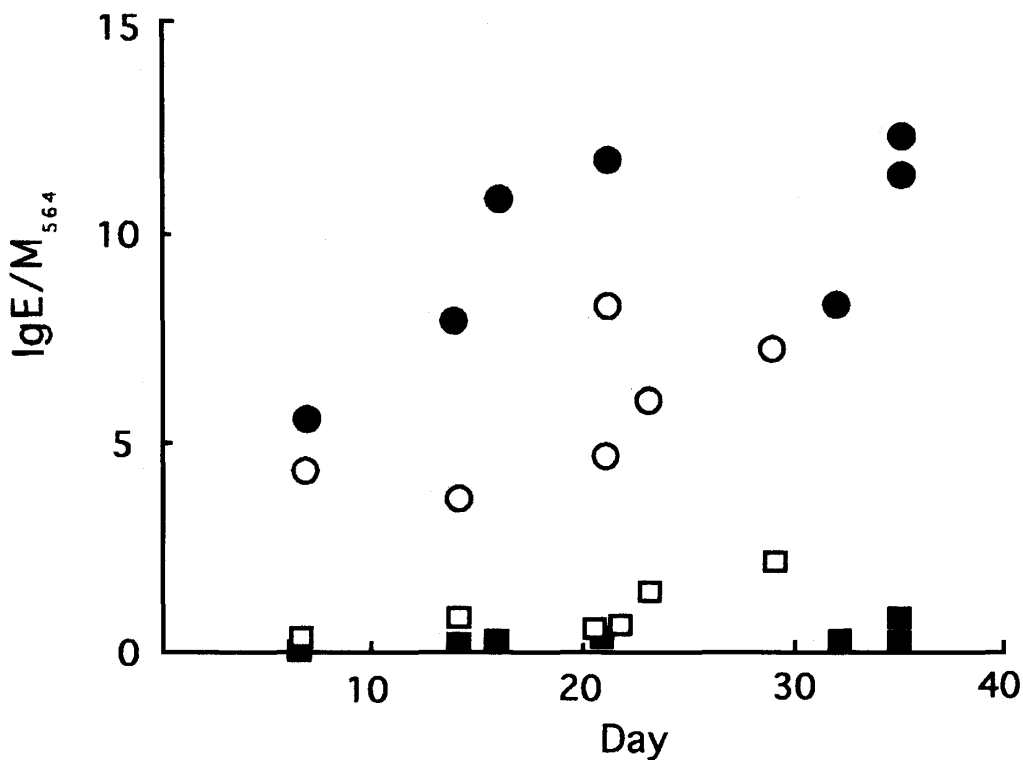


図3 IgE 転写産物のデンストメトリー

UVP 社の Laboratory Imaging and Analysis System により, λ -DNA/HindIII の 564 b.p. のフラグメントのデンスティビー (M_{564}) に対する IgE のデンスティビーの比を求めた。雌雄ともに, 胸腺における IgE の転写は加齢に伴い増大する傾向が認められた。胸腺と脾臓の IgE 転写量の差異は明瞭であった。脾臓では, 雌では 3 ~ 4 週齢の間で僅少量の IgE 転写産物が検出された。雄では 35 日齢まででは検出できなかった。○; ♀胸腺, □; ♀脾臓, ●; ♂胸腺, ■; ♂脾臓

したのであれば, 脾臓で検出されないとは考え難い。したがって, 生後数週齢の胸腺での抗体遺伝子の転写細胞は, 少なくとも IgE 遺伝子を転写している細胞は, 胸腺固有の細胞と考えられる。

胎生期には IgM および僅少量の IgG3 が転写されており, 生後には IgA や IgE も転写され始めることから⁴⁾, 胸腺でも抗体遺伝子の H 鎖の V-D-J および L 鎖の V-J 組換え, および抗体のクラススイッチが起きている^{6,7)}。すなわち, 抗体産生細胞の分化も胸腺内で進行していると考えられる。抗体遺伝子のクラススイッチには, 必ずしも抗原を必要としないことが示されているけれども⁸⁾, 胸腺内には抗原呈示細胞として多くの樹状細胞 (DC) が存在することが知られているので⁹⁾, 抗原に依存したクラススイッチも起きていると考えられる¹⁰⁾。胸腺 DC は自己抗原を呈示することにより, T リンパ球のネガティブセレクションに関与する以外にも多様な機能を持つことが示唆されており¹¹⁾, 抗体産生細胞への外来抗原の呈示もおこなわれていると考えられる。

胸腺と脾臓での IgE の転写開始時期の差異は顕著であり, この機構は不明であるけれども, 胸腺で分化した抗体産生細胞が, T リンパ球と同様に選択を受けた後に, 脾臓へ移動する可能性も考えられる。マウスの胸腺は, これまで, T リンパ球分化の器官として考えられてきたけれども, 抗体産生細胞も分化することを考慮すれば, 鳥類に特異的な器官とされているファブリキウス嚢の機能をも兼ねているとみなすことも可能であろう。

V. 要 約

1 週齢から 5 週齢 BALB/c マウスの抗体遺伝子の転写を, 胸腺と脾臓で比較した。調べた抗体のクラスなかで, IgE の転写量に関しては, 胸腺と脾臓で明瞭な差異が認められた。胸腺では, 雌雄ともに, IgE は 1 週齢から転写されていた。脾臓では 3 週齢までは検出できなかった。雌では, 3 週齢から 4 週齢の間で, 脾臓でも IgE の転写が検出され始めた。雄では, 5 週齢まででは, 脾臓で IgE の転写は検出

できなかった。IgE の転写に関して胸腺と脾臓で明瞭な差異が認められることから、胸腺で抗体遺伝子を転写している細胞は、胸腺内の血管内の B リンパ球ではなく、また、脾臓で分化した B リンパ球が流入したものでもなく、発生段階で流入した幹細胞から胸腺内で分化したリンパ球であると考えられる。

(平成 17. 9. 1. 受付)

文 献

- 1) I. Roitt, J. Brostoff and D. Male: *Immunology*, 5th ed. (Mosby), 158 (1998)
- 2) R. Rugh: *The Mouse, Its Reproduction and Development* (Burgess Publishing), 265 (1968)
- 3) C.E. Butcher and J.L. Picker: *Science*, 272, 60–66 (1996)
- 4) 池田江季, 伊藤真紀子, 今井由実, 木村望美, 中嶋真理, 西川美絵, 若林明日香, 宮田堅司: 本誌, 59, 31–36 (2004)
- 5) P. Chomczynski and N. Sacchi: *Analytical Biochem.*, 162, 156 (1987)
- 6) I. Roitt, J. Brostoff and D. Male: *Immunology*, 5th ed. (Mosby), 102 (1998)
- 7) K.T. Blackwell and W.F. Alt: *Annu. Rev. Immunol.*, 23, 605–636 (1989)
- 8) H. Karasuyama, A. Rolink and F. Melchers: *Adv. Immunol.*, 63, 1–41 (1996)
- 9) C. Ardavin: *Immunol. Today*, 18, 350–361 (1997)
- 10) I. Roitt, J. Brostoff and D. Male: *Immunology*, 5th ed. (Mosby), 166–167 (1998)
- 11) M. T. Lotze and A. W. Thomson ed.: *Dendritic Cells; Biology and Clinical Applications*, (Academic Press), 15–28 (1999)