

マウス胸腺の抗体遺伝子転写細胞の分化

安達綾希子, 井上 摩耶, 大野 理絵, 城 清佳,
長尾美沙子, 宮田 堅司

Differentiation of Immunoglobulin Gene-Transcribing Cells in the Thymus of the Mouse

Akiko Adachi, Maya Inoue, Rie Ohno, Sayaka Joh,
Misako Nagao and Kenji Miyata

Immunoglobulin(Ig) heavy chain gene-transcribing cell differentiation was investigated in the thymus of BALB/c mice by the Realtime PCR for membrane-bound form IgM(IgM_m). The ratio of IgM_m to total IgM(IgM_t) was approximately 1 from fetus period to 14 days after the birth, and IgM transcriptions were almost processed to membrane-bound form. Then IgM_m transcriptions decreased and secretory form IgM(IgM_s), the difference between IgM_t and IgM_m, started being detected. It was concluded that thymus Ig gene-transcribing cells underwent the similar differential processes in which B cells developed from immature type having IgM_m to mature type secreting IgM_s in secondary lymphoid tissues.

(Received September 1, 2006)

1. はじめに

胸腺は、発生期に原基に流入した幹細胞に由来する T リンパ球が分化増殖する一次リンパ器官とされている^{1,2)}。これまでに、マウス胸腺には、胎生期から抗体遺伝子を転写している細胞が存在し、生後には種々のクラス・サブクラスの抗体遺伝子転写産物が検出されることから、クラススイッチも起きており、抗体遺伝子転写細胞が胸腺内で分化することを示唆した³⁾。また、胸腺と二次リンパ器官である脾臓とを比較すると、IgE の転写に関して明瞭な差違が認められることから、胸腺の抗体遺伝子転写細胞は、脾臓の B リンパ球とは性質が異なることを示した⁴⁾。しかし、この胸腺に存在する抗体遺伝子転写細胞の生理的な意義は不明である。本報では、胸腺に存在するこれらの抗体遺伝子転写細胞が分化する過程を明らかにするために、抗体 μ 鎖遺伝子の転写産物のうち、膜結合型 IgM の転写産物量の加齢に伴う変化を Realtime PCR 法で検討した。胸腺では、加齢に伴い、膜結合型 IgM の転写産物量が減少し、分

泌型 IgM の転写産物量が増加してくることから、胸腺内の抗体遺伝子転写細胞は、B リンパ球が抗原受容体としての膜結合型 IgM を持つ未成熟段階の細胞から、分泌型 IgM あるいは他のクラスの抗体を産生する成熟段階の細胞へと分化するのと類似の分化過程を経ることが示唆された。

II. 方 法

1. 材料

コンベンショナルな条件下で飼育した BALB/c 雄マウスを用いた。出生後 3 週間は母親マウスと同居させ、21 日齢で分離、飼育した。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。胎生期マウスに関しては、1 晩雌雄同居させ翌朝交配を確認できた場合を胎生 0.5 日齢とした。胎仔の胸腺および脾臓は実体顕微鏡下に摘出した。胎生期マウスの雌雄の判定は困難であり、区別は行わなかった。

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 を、濃度 100ng/μl に調整した。

3. 逆転写反応およびRealtime PCR

トータル RNA 300ng を鋳型として逆転写反応を行った。逆転写反応は M-MLV リバーストランスクリプターゼ (ReverTra Ace-α, 東洋紡), oligodT20 プライマーを用い, 30°C で 10 分間, さらに 42°C で 20 分間行った。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。この反応産物を水で 15 倍に希釈した溶液 (15 倍希釈試料) を試料として Realtime PCR (LineGene, BioFlux) を行った。反応溶液はメーカーのプロトコールに従い, SYBR Green mix (Realtime PCR Master Mix, 東洋紡) 5 μl, forward primer および reverse primer (4pmol/μl) を各 1 μl, 15 倍希釈試料 3 μl, 合計 10 μl とした。PCR 反応は, 95°C 10 分の後, 変性 94°C 15 秒, アニーリング 60°C 15 秒, 伸長反応 72°C 30 秒のサイクルを 45 回行い, 各サイクルの伸長反応終了時点毎に蛍光強度を測定し, トータルの IgM(IgM_t) および膜結合型 IgM(IgM_m) の増幅曲線を得た。

増幅反応終了後に, 増幅された DNA の融点解析を行い, 増幅された DNA が均一なものであるかどうかを調べた。増幅反応に用いたプライマーを下記に示す。プライマーは, 少なくとも一つのイントロン領域を間を含むエクソン領域に相補的に結合するように設定した。

プライマー IgM_t-R AACGTGTCCTCCACATGTGC

プライマー IgM_t-F ACAGGTCAGGTTAGCGGACT

プライマー IgM_m-R TATACCTGTGTTGTAGGCCA

プライマー IgM_m-F AGGTTCTCAAAGCCTTCCTC

これらのプライマーを用いることにより, IgM_t および IgM_m とともに 110 塩基対の DNA フラグメントが増幅される。

4. IgM_m/IgM_t比の解析

Realtime PCR のインターカラー法では, 増幅された 2 本鎖 DNA に取り込まれた色素が励起されて発する蛍光強度を測定することにより, 増幅曲線がリアルタイムに得られる。得られた増幅曲線より, 蛍光強度が一定値 (相対強度 30) に達するまでに要した PCR のサイクル数を読み取った。取り込まれる色素分子数は DNA 鎖長によって決まり, 色素一分子の発する蛍光の強さは周囲の塩基対の種類に因

らず一定であると仮定する。読み取ったサイクル数を n_m および n_t とすると, 15 倍希釈試料中に存在した IgM_m と IgM_t のコピー数の比の対数値 $\log_{10} \text{IgM}_m/\text{IgM}_t$ は

$$\log_{10} \frac{\text{IgM}_m}{\text{IgM}_t} = (n_t - n_m) \log_{10} 2 \quad (1)$$

となる。

また, IgM_t と IgM_m のコピー数の差が分泌型 IgM_s のコピー数とすると

$$\log_{10} \frac{\text{IgM}_s}{\text{IgM}_m} = \log_{10} (2^{n_m - n_t} - 1) \quad (2)$$

が成立する。

III. 結 果

1. 加齢に伴う IgM_m/IgM_t 転写産物量比の変化

BALB/c 雄マウスの生後 7 日齢および 35 日齢の胸腺および脾臓の IgM_t および IgM_m の増幅曲線の例を図 1 に示した。

蛍光強度のバックグラウンド値は 10 から 15 の間であったので, 各増幅曲線の相対蛍光強度が 30% に達した時のサイクル数 n_t および n_m を求めた。胸腺では, 7 日齢では, $n_t=23.9$, $n_m=24.2$, 35 日齢では, $n_t=23.1$, $n_m=24.8$ となり, 35 日齢の方が n_t と n_m との差が大きくなった。式 (1) より, 7 日齢では $\log_{10} \text{IgM}_m/\text{IgM}_t = -0.0903$, 35 日齢では $\log_{10} \text{IgM}_m/\text{IgM}_t = -0.512$ となった。同様にして求めた, 胎生 19 日齢から生後 70 日齢までの $\log_{10} \text{IgM}_m/\text{IgM}_t$ の値を図 2a に示した。生後 14 日齢までは, ほぼ一定となり -0.1 程度であった。その後 35 日齢までは減少した。脾臓でも同様の傾向が認められ, $\log_{10} \text{IgM}_m/\text{IgM}_t$ の値は加齢に伴い減少した (図 2b)。

2. IgM_s/IgM_m 転写産物量比

式 (2) より, 胸腺での IgM_s/IgM_m 比を求めた (図 3)。生後 35 日齢までは増大する傾向が認められた。胎生期および生後 2 週齢までは負の値となり, 3 週齢くらいで正の値となった。すなわち, 生後 2 週齢までは膜結合型の IgM_m の転写産物量の方が多けれども, 加齢に伴い分泌型の IgM_s の転写産物量の方が多くなった。

IV. 考 察

マウスでは, 一次リンパ組織である胸腺にも抗体遺伝子を転写している細胞が存在する。また, 生後数週間にわたって, 胸腺での IgE の転写量が, 脾臓での転写量を明らかに上回ることから, 胸腺で抗体遺伝子を転写している細胞は, 胸腺に分布する血管

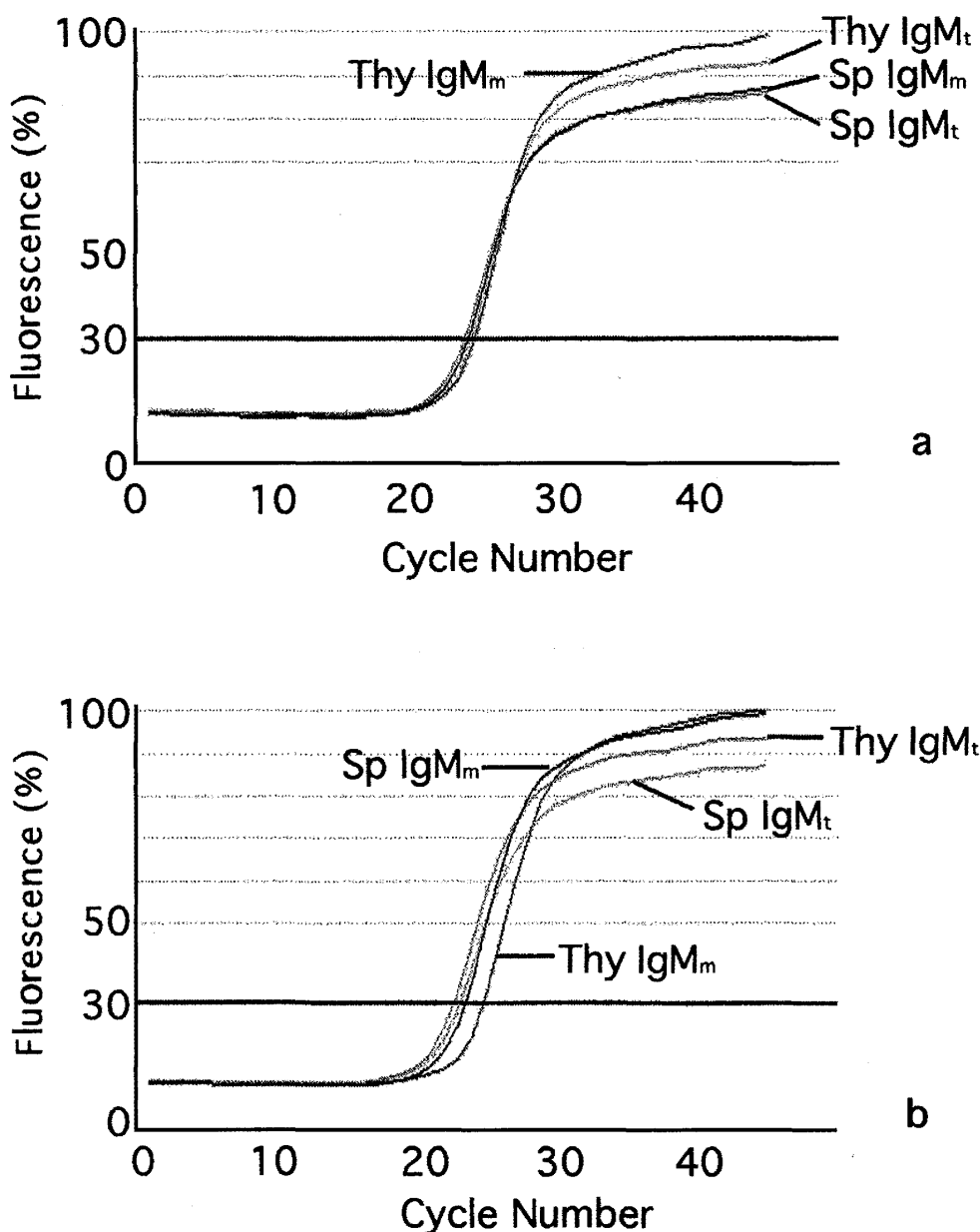


図 1 胸腺および脾臓の IgM_t, IgM_m 増幅曲線
 増幅曲線が相対蛍光強度 30 に達するのに要したサイクル数を読み取った。
 a. 7 日齢; 胸腺および脾臓ともに, IgM_t と IgM_m とではほとんど差が認められない。
 胸腺では $n_t=23.9$, $n_m=24.2$ となり, 式 (1) より $\log_{10} \text{IgM}_m/\text{IgM}_t=-0.0903$, 脾臓では $n_t=23.4$, $n_m=23.8$ となり, $\log_{10} \text{IgM}_m/\text{IgM}_t=-0.120$ が得られた。b. 35 日齢; 胸腺および脾臓ともに, IgM_t と IgM_m との差が明瞭である。胸腺では $n_t=23.1$, $n_m=24.8$ となり, 式 (1) より $\log_{10} \text{IgM}_m/\text{IgM}_t=-0.512$, 脾臓では $n_t=22.7$, $n_m=23.8$ となり, $\log_{10} \text{IgM}_m/\text{IgM}_t=-0.211$ が得られた。

内の B リンパ球や脾臓から流入した B リンパ球ではなく, 胸腺内で分化した細胞であることが示唆されている⁴⁾。しかし, これらの細胞の生理的機能は不明である。本報では, 胸腺に存在するこれらの細胞が, 分化する過程を明らかにする一環として, 加齢に伴う膜結合型 IgM のコピー数の変化を検討した。

マウスの B 細胞の分化過程では, リンパ球系幹細

胞から分化したプロ B 細胞は, 抗体 H 鎖 DNA の再編成を行う⁶⁾。さらに, プレ B 細胞を経て未成熟 B 細胞の段階にいたると, 膜結合型の IgM を抗原受容体として発現する⁷⁾。成熟 B 細胞の段階では, クラススイッチを起こしアイソタイプの異なる抗体を産生する⁸⁾。クラススイッチを起こさない細胞は分泌型の IgM を産生する。したがって, 加齢に伴う膜結

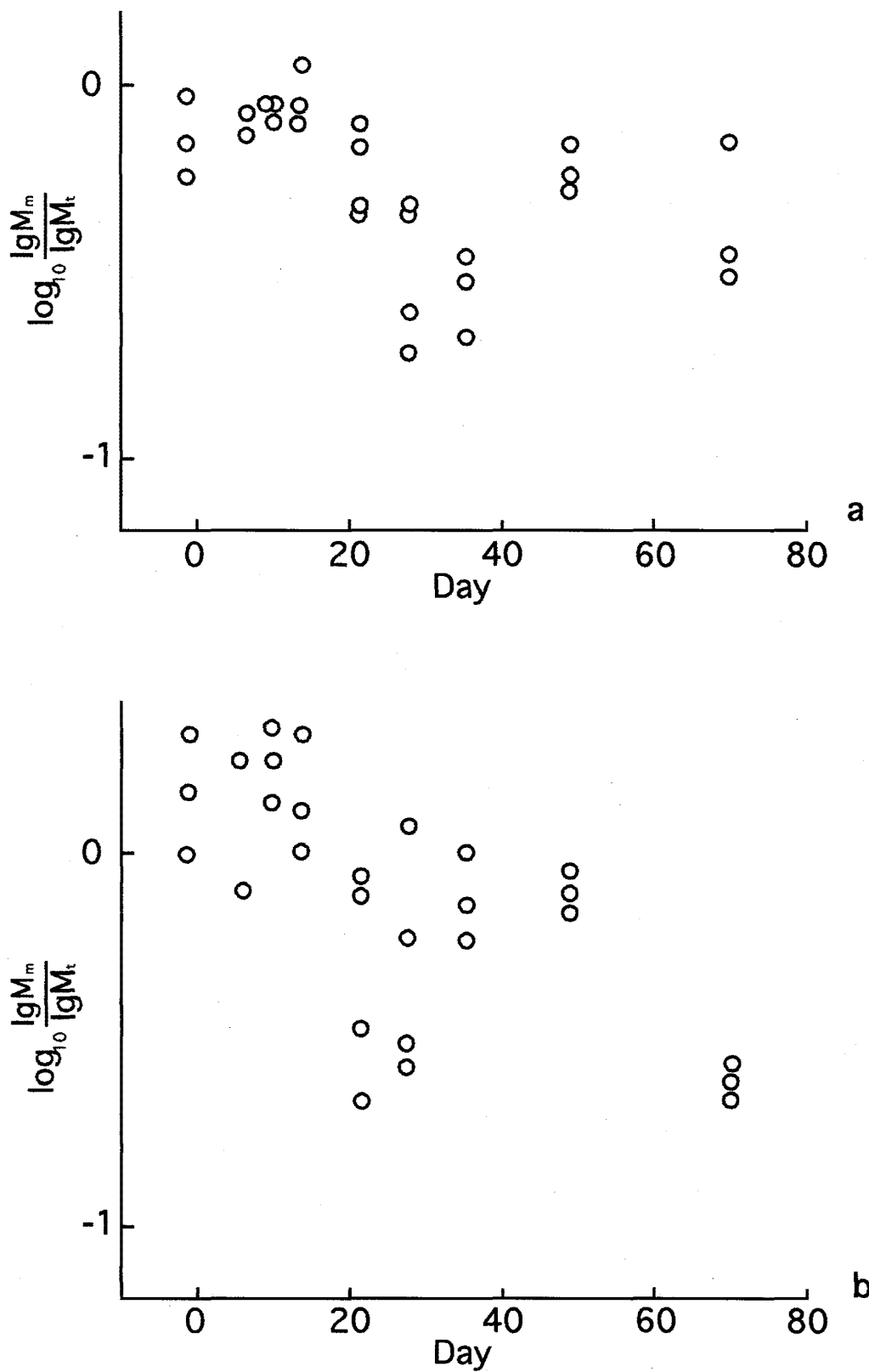


図2 加齢に伴う $\log_{10} \text{IgM}_m/\text{IgM}_t$ 値の変化
 a. 胸腺； $\log_{10} \text{IgM}_m/\text{IgM}_t$ 値は胎生期から 14 日齢までは、ほぼ -0.1 となった。すなわち、転写されている IgM はほとんど膜結合型 IgM_m であった。その後、減少傾向を示した。b. 脾臓；加齢に伴い $\log_{10} \text{IgM}_m/\text{IgM}_t$ 値は減少した。

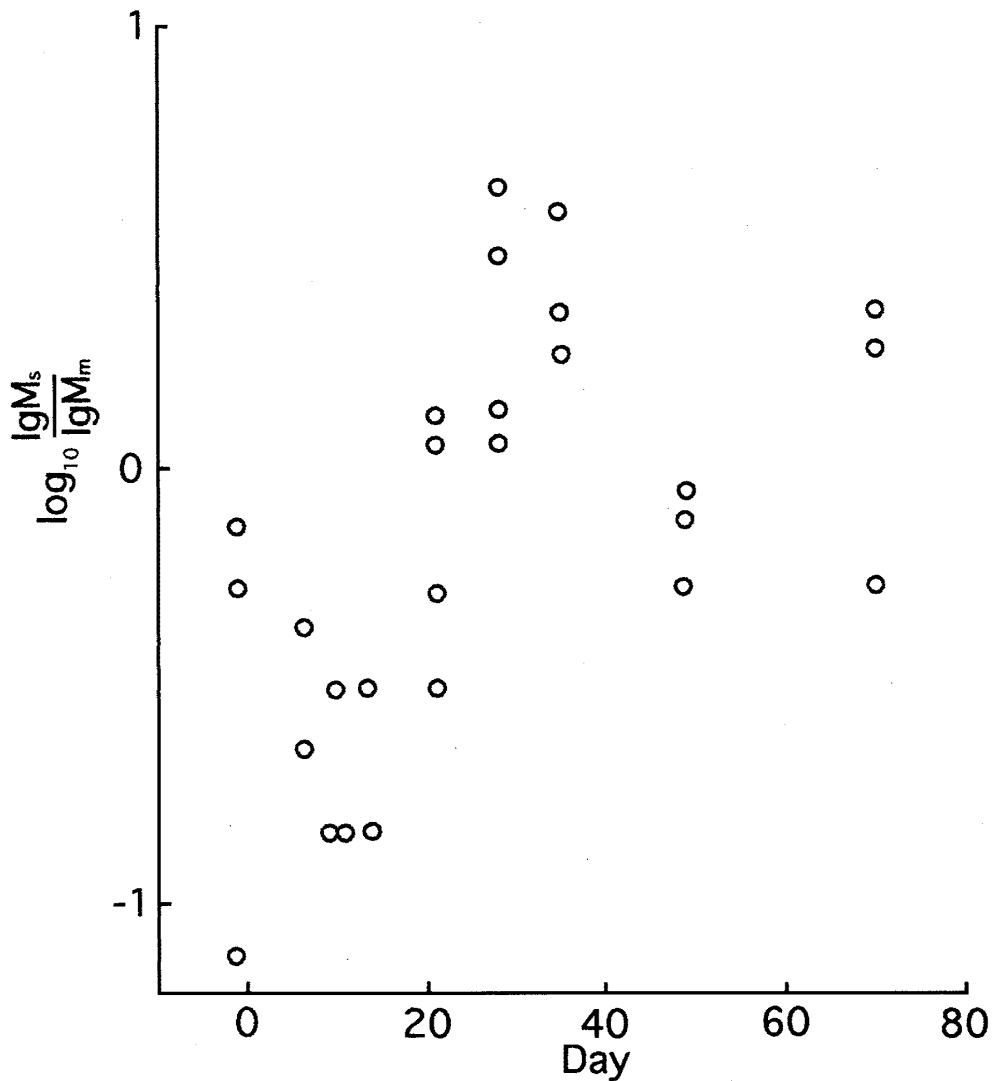


図 3 加齢に伴う分泌型／膜結合型比の対数 $\log_{10}\text{IgM}_s/\text{IgM}_m$ の変化
 加齢に伴い負の値から正の値に変化した。21 日齢以降分泌型が多くなった。これは、胸腺内で抗体遺伝子転写細胞が分化していることを示している。

合型 IgM の転写産物量の変化を調べることにより、胸腺内に存在する抗体遺伝子転写細胞が、B 細胞の分化と同様に成熟過程を履行するのかどうかを Realtime PCR 法で検討した。

胸腺では、トータル IgM_t に対する IgM_m の値は、生後 5 週齢までは減少傾向を示した (図 2a)。すなわち、相対的に膜結合型の IgM_m の転写産物が減少し、分泌型の IgM の転写産物が増加していることから、 IgM を産生する細胞、あるいは、クラススイッチによりアイソタイプの異なる抗体産生細胞へと分化した細胞が増加したと考えられる。分泌型 IgM_s は抗原非依存的に産生される可能性も存在するけれども、マウスは飼育環境により種々の抗原に曝されており、抗原依存的に IgM 分泌細胞への分化が進んだ

と考えられる。抗体を産生する B 細胞が増殖、分化する脾臓でも、トータル IgM_t に対する IgM_m の値は加齢に伴い減少した (図 2b)。胸腺および脾臓において、加齢に伴い $\text{IgM}_m/\text{IgM}_t$ 比が同じように変化したことは、胸腺の抗体遺伝子転写細胞も、未成熟段階から成熟段階へと、脾臓の B 細胞と同様の分化過程を経過することを示している。

胸腺での膜結合型 IgM_m と分泌型 IgM_s のコピー数の比を式 (2) で計算した結果は、加齢に伴い増大する傾向を示した。生後 1, 2 週齢では膜結合型のコピー数の方が多く、3 週齢あたりで膜結合型と分泌型のコピー数がほぼ等しくなり、それ以降では分泌型のコピー数の方が多くなった。このことも、胸腺内に存在する抗体遺伝子転写細胞が、B 細胞が未

成熟段階から成熟段階へと分化する過程と同様の過程を履行していることを示している。

(平成 18. 9. 1. 受付)

引用文献

- 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) 池田江季, 伊藤眞紀子, 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)
- 4) 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: 本誌, 60, 1-5 (2005)
- 5) P. Chomczynski and N. Sacchi: *Analytical Biochem.*, 162, 156 (1987)
- 6) N. Hozumi and S. Tonegawa: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 73, 3628-3632 (1976)
- 7) I. Roitt, J. Brostoff and D. Male: *Immunology*, 5th ed. (Mosby), 163 (1998)
- 8) R. C. Mackay: *Adv. Immunol.*, 53, 217 (1993)