

[展望]

## リンパ球の分化と腫瘍化

竹 森 利 忠\*

(昭和62年3月1日受付)

**Key words:** Lymphoid differentiation / Abelson murine leukemia virus / ts mutant / leukemogenesis

### I. はじめに

造血細胞 (hematopoietic cell) は、全能性造血幹細胞 (haematopoietic stem cell) により分化する。造血幹細胞はそれ自身を複製する (self renewal) とともに、種々の異なった系 (リンパ球系, 赤血球系, 骨髄球系, 血小板系) へコミットされた幹細胞へと分化する<sup>1,2)</sup>。多能性幹細胞から各造血系細胞への分化はランダムに誘導され, また, 幹細胞から最終的に分化する細胞の表現型は常に各系への細胞に固有の表現型をとる。例えば, 赤血球とリンパ球の両者の表現型を合わせもつ多能形質を示す細胞の産生は認められない。すなわちこの事実は特定の造血系細胞への分化が決定されると他の系への分化・成熟に関連する遺伝子の発現は抑制されることを示唆する。

リンパ球系へコミットされた細胞はリンパ球幹細胞と呼ばれ, この細胞は異なった機能と性質を持つ T, B 細胞へと分化していく。他の系に属する造血細胞と比較して, リンパ球系細胞における分化の様式の特徴は分化に伴った多様性 (heterogeneity) の獲得にある。T, B 細胞クローンは, ある特定の抗原に対して特異性をもつレセプターを表現するが, これらの細胞集団は総和として  $10^6$ - $10^8$ 個とも言われる多数の異なった抗原と反応する多様なレセプターを分化の過程で発現する<sup>4,5)</sup>。同時に, これらの細胞は機能的多様性も獲得する。すなわち, T 細胞分化の過程では, 幼若 T 細胞からキラー, ヘルパー, サプレッサーといったような異なった機能をもつ T 細胞が産生され, 一方, B 細胞分化の過程では異なったタイプの抗原に反応する (T 細胞依存性抗原, T 細胞非依存性抗原) 異なったサブセットに属する細胞が産生される。この多様性の中から一つの秩序が生まれ, 一つの

平衡状態に向けられたベクトル, すなわち免疫システムが形成される<sup>6)</sup>。

リンパ球分化・成熟の段階はそのレセプター発現の様式によって識別される。レセプターをコードする遺伝子はレセプター可変部群 (V 領域) と定常部 (C 領域) とに別れて存在し, 更に V 領域関連遺伝子群は V, D, J のフラグメントより構成される。細胞分化の過程で V-D-J あるいは V-J 間の結合が誘導され (遺伝子再構成) これをきっかけとしてレセプター遺伝子が発現される<sup>4,5)</sup>。遺伝子再構成の開始は幼若リンパ球に誘導される初期分化のサインであるが, この機構がリンパ球分化という一大事業の中でどのような位置にあるのか, また, この機構がどのように誘導されるかは明らかでない。レセプター発現をきっかけとして, リンパ球は幼若型から成熟型に分化するが, このようなりセプター陽性細胞は 1 日にヒトでは  $10^{10}$ - $10^{12}$ , ネズミでは  $10^7$  というように高率に産生され骨髄から末梢へ移動する。これらの産生されたリンパ球のあるものは長期の寿命をもって末梢を循環するが, 大部分は 2-3 日のうちに死滅する。

このようにリンパ球の一生に関してのおおよそ何が起こるのかについて観察はされているが, どのような機構があるかじめプログラムされたリンパ球初期分化を調節するのか, 分化がどのようなプロセスで導入されるのかについての遺伝子・分子レベルでの詳細な理解はまだない。この稿ではリンパ球分化の遺伝子・蛋白レベルでの解析のために我々が最近確立した新しいシステムを中心として述べるとともに相互に密接に関連すると思われる分化と腫瘍化についての survey をしてみたい。

### II. リンパ球分化解析のアプローチ

上述したリンパ球分化に関する問題は正常骨髄細胞を

\* 千葉大学医学部附属環境疫学研究施設, 免疫研究部

Toshitada TAKEMORI: Differentiation and Leukemogenesis in Lymphoid Cells.

Department of Immunology, Institute of Environmental Health, School of Medicine, Chiba University, Chiba 280.

Received for publication, March 1, 1987.

対象とした *in vitro* 培養システムを用いて、あるいはレトロウイルスによるトランスフォーメーションされた幼若リンフォーマを対象として解析されている。しかし前者のシステムでは解析の対象となる幼若細胞の頻度が非常に少ないために、後者では対象とする細胞は特定の分化段階に固定されて増殖し人為的な分化誘導の調節が不可能であるためにそれぞれ実験上の制約が生じる。

我々はこのような実験上の制約を解除するために幼若リンパ球に tropism をもつ Abelson マウス白血病ウイルス (A-MuLV) より温度感受性変異株 (ts mutant) の単離を試みた<sup>7)</sup>。Ts mutant ウイルスでトランスフォームされた細胞は低温度では特定の分化段階に固定されたまま増殖を続けるが、高温度の培養条件では *v-abl oncogene* の産生産物の働きが不活化され、細胞は *oncogenic* な状態から脱して種々の刺激のもとに分化・成熟することが期待される。すなわちこのシステムでは、同一クローンにおける分化・成熟過程を蛋白・遺伝子レベルで解析できることが可能である。

我々は A-MuLV 産生細胞である ANN-1/M を mutagen で処理し培養上清を濃縮透析した後、これを用いて幼若マウスの骨髄細胞を感染させた。感染後出現するトランスフォームしたコロニーをそれぞれ単離して骨髄支持細胞上で培養した。これらの単離した約600個のコロニー由来細胞株は細胞表面 Ig リセプター陰性 (sIg) の pre-B 細胞の成熟段階に属していることが蛍光抗体法による解析により示唆された。各細胞株はそれぞれ 35.5°C と 39.5°C とで培養され、高濃度で sIg 陽性細胞を産生する細胞株を ts mutant ウイルス感染細胞候補として選別した。これらの細胞株の内、もっとも高頻度に Ig 陽性細胞を産生する 4-9 細胞株をその後の解析に用いた。4-9 はクローニングされ、これより 4-9-6 というクローンを得た。この細胞は親株と同様に高温度の培養条件で 30-40% の細胞が Ig 陽性となる。

4-9 あるいは 4-9-6 で観察される温度依存性の形態の変化 (ts phenotype) は、これらの細胞より得られたウイルスを用いて新たな標的細胞へ高率に導入することが可能である。一方コントロールとして用いた wild type のウイルスによる感染では、ts phenotype を表現する細胞株は極めて低い頻度でしか出現しない。さらに 4-9 あるいは 4-9-6 より得たウイルスを用いて非リンパ球系細胞である NIH/3T3 を感染した所、この細胞に出現する 15-30% の Focus を構成するウイルス感染細胞が温度感受性にその形態を変えることが認められ、4-9 系細胞で認められた ts phenotype がリンパ球系のみならず非リンパ球系細胞へもウイルスにより伝達さ

れることが明らかにされた。

A-MuLV に由来する分子量 12 万の蛋白は、(p120) チロシンナーゼの活性を有し、自身の蛋白のチロシン基をリン酸化する。また、この活性は A-MuLV の感染により誘導される細胞の腫瘍化に強く関連することが知られている<sup>8)</sup>。A-MuLV のチロシンキナーゼの活性は、4-9 系細胞に感染するウイルス由来の p120 にも強く認められるが、しかし、高温度で培養した細胞で認められる活性は 1/10-1/100 に低下する<sup>7)</sup>。この事実は、リンパ球系あるいは非リンパ球系細胞で見られた温度感受性の形態変化が A-MuLV の性状に関連し、また、このウイルスが温度感受性変異株であることを示唆する。

前述したような ts mutant ウイルスで感染した幼若 B リンパ球は温度シフトにより sIg 陰性から陽性細胞へとその表現型を変える。また高温度で培養した後、B 細胞のマイトゲンである LPS で刺激すると細胞はさらにその表現型を変え、sIg 陽性細胞から Ig を細胞外に分泌する Ig 分泌細胞へと変化する。これらの一連の変化を遺伝子レベルで追跡すると一連の Ig 発現の変化は、遺伝子の転写時あるいは転写後に関与する調節因子により誘導されたことが明らかになった<sup>7)</sup>。この Ig 発現を促す調節因子は恐らくは幼若リンフォーマの状態では“off”になっており、A-MuLV 由来蛋白の活性低下に伴い“on”に作動したものと考えられる。Ig の RNA レベルの発現には種々の Ig 遺伝子調節領域に結合するいわゆる DNA-binding 蛋白の関与が示唆されている<sup>9,10)</sup>。これらの蛋白には幼若リンパ球では非活性型蛋白として存在しているが恐らくはプロテインキナーゼ C により活性化され Ig 発現の促進因子として働くものと考えられている<sup>11)</sup>。現在我々は上述した温度のシフトにより分化するリンフォーマを対象として各分化段階で発現・消失する遺伝子のクローニングを行なっている。いくつかの単離されるであろう遺伝子の性状の解析により、免疫グロブリン (Ig) を離れて新しい分化のマーカーを得ることが期待される。

### III. 脱腫瘍化と分化誘導

Oncogene (癌遺伝子) の発現が細胞の腫瘍化に大きな役割を果すことは現在、数多くのシステムにおいて明らかにされている。Oncogene は正常細胞に存在する遺伝子、proto-oncogene が種々の機構により修飾されたものであり、proto-oncogene の質と量的な変化を伴った発現が細胞を腫瘍化することが示唆される<sup>12)</sup>。

造血系細胞腫瘍化 (白血病細胞化) においてもいくつかの oncogene の関与が明らかにされている。この際、

腫瘍化により造血細胞にあらかじめプログラムされていた分化成熟誘導の機構は阻害され、腫瘍細胞はほぼ固定された分化・成熟段階に属し増殖を続ける<sup>7,13)</sup>。そして正常細胞に分化・成熟を誘導する細胞因子、マイトゲン等で腫瘍細胞を刺激しても多くの場合腫瘍細胞の性状に変化は認められない。

種々の確立された A-MuLV トランスフォーマントではウイルス由来 oncogene である v-abl の発現と c-myc, c-myb の発現に高い頻度で相関が認められることが知られている。これらの c-oncogene 発現の増強は遺伝子増幅 (c-myc の場合)、遺伝子再構成 (c-myb の場合) により誘導される<sup>12)</sup>。

我々の温度感受性 A-MuLV により確立した細胞株でもウイルス由来 oncogene (v-abl) の発現に伴って proto-oncogene である c-myc, c-myb, c-ras の強い発現が認められる。この細胞株で見られる c-myc, c-myb の発現は RNA 転写レベルでの調節に由来するが興味あることに、高温度で培養後細胞に分化を誘導すると c-myc の発現は強く抑制される。A-MuLV によりトランスフォームされた細胞では、一方、多くの核内蛋白がそのチロシン基にリン酸化を受けており、また、これらの蛋白は DNA-結合蛋白であることが最近明らかにされた<sup>14)</sup>。すなわちこの事実は v-abl の発現をきっかけとして、リン酸化を受ける多くの蛋白が特定の遺伝子の発現を制御している可能性を示唆し、我々のデータはさらに v-abl から核内蛋白の産生遺伝子である c-myc に至る調節レベルの機構が存在することを示すものである。

現在我々は、ts リンフォーマの分化前 (腫瘍状態)・後 (脱腫瘍状態) での v-abl 蛋白活性の発現と消失に関連する、c-myc 遺伝子産物を含めた細胞内シグナル伝達の機序を解析中であり、分化と癌化の接点を理解することを試みている。

## 文 献

- 1) Till, J. E. and McClouch, E. A.: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* **14**, 213-222, 1961.
- 2) Wu, A. M., Till, J. E., Sminovitch, L., and McClouch, E. A.: A cytological study of the capacity for differentiation of normal hemopoietic colony forming cells. *J. Cell. Physiol.* **69**, 177-184, 1967.
- 3) Lala, P. K. and Johnson, G. R.: Monoclonal origin of B lymphocytes colony forming cells in spleen colonies formed by multipotential nemopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* **148**, 1468-1477, 1978.
- 4) Perlmutter, R. M., Crews, S. T., Douglas, B., Sorensen, G., Johnson, N., Niura, N., Gerhart, P. and Hood, L.: The generation of chirality in Phosphorylcholine-binding antibodies. *Adv. Immunol.* **35**, 1-273, 1984.
- 5) Kronenberg, M., Siu, G., Hood, L. E. and Shatri, N.: The molecular genetics of the T-cell antigen receptor and T-cell antigen recognition. *Ann. Rev. Immunol.* **4**, 529-591, 1986.
- 6) Jerne, N. K.: Towards a network theory of the immune system. *Ann. Immunol.* **125C**, 373-389, 1974.
- 7) Takemori, T., Miyazoe, I., Shirasawa, T., Taniguchi, M. and Graf, T.: A temperature-sensitive mutant of Abelson murine leukemia virus confers inducibility of IgM expression to transformed lymphoid cells. *EMBO J.* **6**, 951-956, 1987.
- 8) Whitlock, C. A. and Witte, O. N.: The complexity of virus-cell interactions in Abelson virus infection of lymphoid and other hematopoietic cells. *Adv. Immunol.* **37**, 74-98, 1985.
- 9) Maeda, H., Kitamura, D., Kudo, A., Araki, K., and Watanabe, T.: Trans-acting nuclear protein responsible for induction of rearranged human immunoglobulin heavy chain gene. *Cell* **45**, 25-33, 1986.
- 10) Staudt, L. M., Singh, H., Sen, R., Wirth, T., Sharp, P. A. and Baltimore, D.: A lymphoid-specific protein binding to the octamer motif of immunoglobulin genes. *Nature* **323**, 640-643, 1986.
- 11) Sen, R. and Baltimore, D.: Inducibility of K immunoglobulin enhancer-binding protein NF-KB by a posttranslational mechanism. *Cell* **47**, 921-928, 1986.
- 12) RNA Tumor viruses, 2/supplements and Appendixes, ed by Weiss, R., Teich, N., Varmus, H. and Coffin, J. Cold Spring Harbor Laboratory, 1985.
- 13) Graf, T., Ade, N. and Beug, H.: Temperature-sensitive variant of avian erythroblastosis virus suggests a block of differentiation as mechanism of leukemogenesis. *Nature* **275**, 496-501, 1978.
- 14) Bell, J. C., Mahaderan, L. C., Colledge, W. H., Frackelton, A. R., Sargent, M. G. and Fowlkes, J. G.: Abelson-transformed fibroblasts contain nuclear phosphotyrosine proteins which preferentially bind to murine DNA. *Nature* **325**, 552-554, 1987.