

---

## 研究報文

---

### マウス胸腺における抗体遺伝子の転写

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

#### Transcription of Immunoglobulin Genes in the Mouse Thymus

Eri Ikeda, Makiko Ito, Yumi Imai, Nozomi Kimura,  
Mari Nakashima, Yosie Nishikawa, Asuka Wakabayashi, and Kenji Miyata

T and B cell developmental and functional status were investigated in the fetal and newborn mice. Interleukin (IL2) produced by activated T cells and immunoglobulin (Ig) heavy chain transcriptions were examined in thymus and spleen by RTPCR. In the 18 day embryo, T cells located in both organs because T cell receptor  $\beta$  chain (TCR  $\beta$ ) was transcribed. IL2 mRNA, however, was detected in the thymus, but little, if any, in the spleen of the embryonic stage. IL2 transcription was clearly observed in the spleen after birth. IgM heavy chain was transcribed both in the thymus and in the spleen of the embryo, and IgG3 and IgA were also done a little in the embryonic thymus. Because in aged thymus IgM, IgG3, IgA and IgE transcriptions could be clearly detected, the class-switching of heavy chain gene occurred in the thymus. Supernatant of primary cultured embryonic thymus cells for 48 hrs contained IgG3 and  $\kappa$  chain of light chain.

We conclude that lymphocytes in the embryonic thymus are already activated and able to interact with B cells of which Ig genes recombine the V domain for IgM, and that the class-switching of Ig heavy chain genes happen in the thymus. It should be clarified what antigens stimulate the thymus-cells to produce immunoglobulins, especially in embryo.

#### 1. はじめに

マウスでは胎生 12 日頃に第 3 咽頭溝および咽頭嚢に由来する上皮様細胞から胸腺原基が形成される<sup>1)</sup>。この胸腺原基に多分化能を有した幹細胞が流入し、上皮様細胞の影響下にリンパ様細胞である胸腺細胞に分化増殖する。胸腺細胞は皮質から髄質へ移行しながら T リンパ球へと分化する。この間に、T セルリセプター (TCR) を発現し、ポジティブ-ネガティブ二重選別を受け、自己の MHC に対する適度の親和性を有し、かつ自己抗原に対しては親和性を示さない 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する<sup>2)</sup>。T リンパ球が脾臓等の

二次リンパ組織へ移動し始める時期は明らかでない。胎生期には外来抗原と接触し得ないので、出生時の T リンパ球は未成熟な状態であると考えられている。

脾臓は胎生 13 日に胃の背側に認められるようになり、17 から 18 日には細長くなり、成体と類似の形態となる<sup>3)</sup>。脾臓等の二次リンパ組織では、T リンパ球と B リンパ球の相互作用により抗原に対する抗体が産生される。胎生期から新生仔期のマウス胸腺および脾臓に局在するリンパ球の分化段階および機能状態を検討する目的で、活性化された T リンパ球が産生する IL2<sup>4,5)</sup> および B リンパ球の抗体遺伝子の転写を RTPCR 法で調べた。

## II. 方 法

### 1. 材料

#### 1) マウス

BALB/c マウスの雌を用いた。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、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。胎生期マウスの日齢は、1 晩雄と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、区別は行なわなかった。

#### 2) 一次培養細胞

無菌的に摘出した胸腺、脾臓を 5 ml 生理食塩水中で細切し、組織片を軽く圧迫し遊離してくる細胞を遠心操作で集め、FBS 10% 含有 GIT 培養液（日本製薬）に懸濁し培養ディッシュ（Tissue Culture Dish 10 mm, IWAKI）に播種した。48 時間後に浮遊細胞を集め、生理食塩水で十分洗浄し液体窒素中で凍結した後、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。また、48 時間後の培養上清を回収した。

### 2. RNA の抽出

凍結した組織あるいは培養浮遊細胞より、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<sup>9)</sup>。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/ $\mu\text{l}$  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、 $30^{\circ}\text{C}$  で 10 分間、さらに  $42^{\circ}\text{C}$  で 1 時間行った。 $99^{\circ}\text{C}$  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、IL2 および IL4、TCR の  $\beta$  鎖 (TCR $\beta$ )、および抗体 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 IL2-F CTGTGTCACATTGACACTTG

プライマー IL2-B CAGAGCCCTTTAGTTTTACA

プライマー IL4-F GCTATTGATGGGTCTCAACC

プライマー IL4-B TCAGTGATGTGGACTTGGAC

プライマー TCR $\beta$ -F AGGATCTGAGAAATGTGACTC

プライマー TCR $\beta$ -B ACCAGCACAGCATATAGGGT

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 TTGTTGACCTTGCATTTGAACT

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、IL2 および IL4 では 380 塩基対の、TCR $\beta$  では 475 塩基対の、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  $\mu\text{l}$ 、鋳型変性温度  $96^{\circ}\text{C}$  および変性時間 30 秒、プライマーアニーリング温度  $55^{\circ}\text{C}$  およびアニーリング時間 1 分、相補鎖合成反応温度  $72^{\circ}\text{C}$  および反応時間 2 分、35 サイクルに設定した。

PCR 終了後、反応溶液 10  $\mu\text{l}$  をアガロースゲルで電気泳動した。電気泳動終了後、エチジウムブロマイド液で染色し、ポラロイド撮影を行った。マーカー DNA ( $\lambda$ /Hind III) 0.5  $\mu\text{g}$  を同時に電気泳動し、PCR で増幅されたバンドの大きさを確認した。

### 4. 培養上清中の抗体の検出

胎生 18 日齢および 3 週齢マウスの胸腺および脾臓から分離した細胞を GIT 培地（日本製薬）で培養し、48 時間後に上清を回収した。培養上清中の抗体を、マウスモノクローナル抗体アイソタイプキット（Serotech Ltd, UK）を用い、メーカーのプロトコールにしたがって検出した。

## III. 結 果

### 1. 胸腺および脾臓における IL2 の転写開始時期

抗原提示細胞 (APC) 等により活性化された T リンパ球のマーカーとして IL2 遺伝子の転写を、また同時に IL4 遺伝子の転写を RTPCR 法で調べた。胎生 18 日齢のマウスでは、胸腺では IL2 および IL4 が転写されていたけれども、脾臓での転写は確認できなかった (図 1a)。生後 0.5 日齢では、脾臓では IL4 の転写が検出されたけれども、IL2 の転写は確認できなかった (図 1b)。脾臓で IL2 の転写が確認できたのは生後 2.5 日齢以降であった (図 1c)。

脾臓では、IL2 遺伝子が転写され始める時期が胸

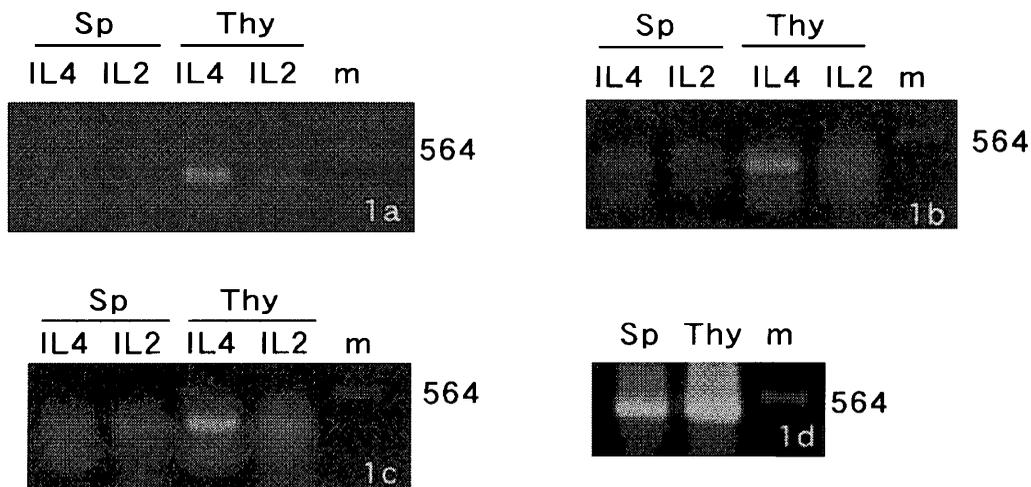


図 1 胸腺 (Thy) および脾臓 (Sp) における IL および TCR の転写  
 1a; 胎生 18 日齢。胸腺では IL2 および IL4 の特異的な DNA が増幅された。  
 1b; 生後 0.5 日齢。胸腺では IL2 および IL4 の特異的な DNA が増幅された。IL4 は脾臓でも僅かに増幅されていた。  
 1c; 生後 2.5 日齢。脾臓で IL2 の特異的な DNA が増幅された。  
 1d; 胎生 18 日齢。脾臓でも TCR の特異的な DNA が増幅され、T リンパ球の分布は胎生期からおきていた。レーン m には  $\lambda$ -DNA/HindIII の 564 b.p. の DNA フラグメントを示した。

腺よりも遅れることが明らかとなったけれども、これは脾臓への T リンパ球の分布が遅れることに因る可能性が考えられるので、T リンパ球のマーカーとして TCR の  $\beta$  鎖を検出した。胸腺および脾臓ともに、胎生 18 日齢以降全ての試料で TCR $\beta$  遺伝子は転写されおり (図 1d)、胎生 18 日齢の脾臓にも T リンパ球が存在していた。これらの結果から、胸腺および脾臓には胎生期から T リンパ球が存在し、IL2 遺伝子の転写を指標とすると、胸腺内の T リンパ球は胎生期から活性化されており、脾臓での活性化に先行することが明らかとなった。

2. 胸腺および脾臓における抗体遺伝子の転写

抗体産生が開始される時期を明らかにする目的で、抗体の H 鎖遺伝子の転写を RTPCR 法で調べた。二次リンパ組織である脾臓と同様に、一次リンパ組

織である胸腺においても抗体遺伝子が転写されていた。胎生 18 日齢で、脾臓および胸腺で IgM および IgG3 の H 鎖の遺伝子が転写され、スプライシングも起きていた (図 2a)。ただし、IgG3 の転写は IgM と比較すると僅かであった。胎生 19.5 日齢の出生直前の胸腺では、僅かな IgA の転写も認められた (図 2b)。生後 1.5 日齢胸腺では IgM と比較すると僅かではあるけれども、IgG3、IgA および IgE の転写を示す増幅 DNA が認められた (図 3)。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 の転写は確認できなかった。胸腺および脾臓での抗体遺伝子の転写は、加齢に伴い、より明瞭に検出されるようになった。340 日齢の結果を図 4 に示した。脾臓と同様に胸腺においても、調べた全てのクラスの抗体が転写されていた。

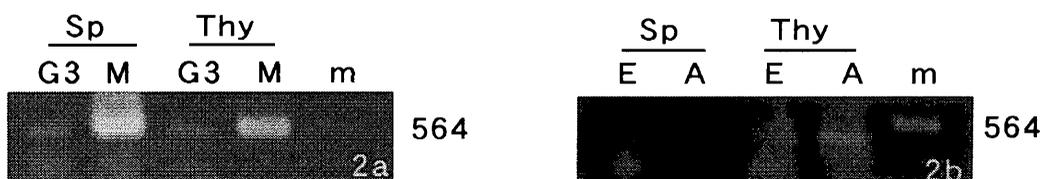


図 2 胎生期胸腺 (Thy) および脾臓 (Sp) における抗体 H 鎖の転写  
 2a; 胎生 18 日齢。脾臓と同様に胸腺でも IgM が転写されていた。IgG3 も僅かに転写されていた。M; IgM, G3; IgG3  
 2b; 胎生 19 日齢。試料によっては胸腺で IgA が転写されていた。A; IgA, E; IgE  
 レーン m には  $\lambda$ -DNA/HindIII の 564 b.p. の DNA フラグメントを示した。

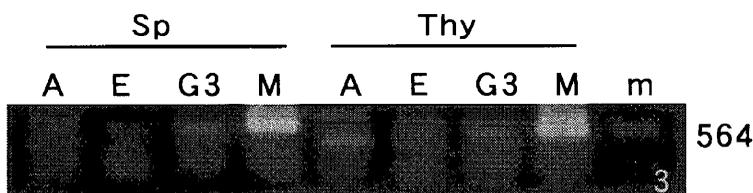


図 3 生後 1.5 日齢胸腺 (Thy) および脾臓 (Sp) における抗体 H 鎖の転写  
 胸腺では調べた全ての抗体, IgM, IgG3, IgA および IgE が転写されていた。IgM 以外の抗体の転写は僅かであった。脾臓では IgA および IgE は検出できなかった。レーン m には  $\lambda$ -DNA/HindIII の 564 b.p. の DNA フラグメントを示した。M; IgM, G3; IgG3, E; IgE, A; IgA

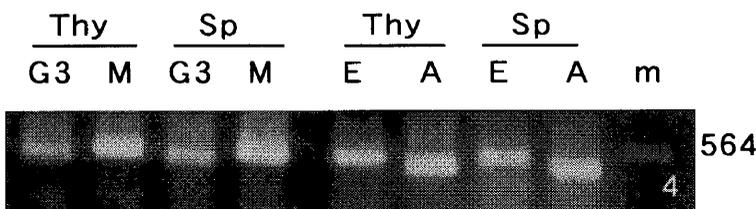


図 4 加齢に因る抗体 H 鎖転写の増大  
 340 日齢。脾臓 (Sp) と同様に胸腺 (Thy) においても各クラスの抗体 H 鎖遺伝子の転写が起きていることが明瞭であった。レーン m には  $\lambda$ -DNA/HindIII の 564 b.p. の DNA フラグメントを示した。M; IgM, G3; IgG3, E; IgE, A; IgA

### 3. 一次培養浮遊胸腺細胞の抗体産生

生後 1.5 日齢の胸腺および脾臓から分離した細胞を 48 時間培養した。浮遊細胞では, IgM の転写は検出されたけれども他のクラスの転写は検出できなかった (図 5)。

次に, 胎生 18 日齢および 3 週齢の胸腺および脾臓の分離細胞を 48 時間培養した培養上清中の抗体の検出を, マウスモノクローナル抗体のアイソタイプ検査キットを用いて試みた。胎生 18 日齢の胸腺および脾臓では IgG1, IgG2a, IgG2b および IgG3 の

存在が認められたけれども, IgM 検出できなかった。抗体 L 鎖の  $\kappa$  鎖はいずれの試料でも検出され, 胎生期の胸腺でも抗体が産生されていることが明らかとなった (図 6)。3 週齢では, 脾臓で IgM も検出されたけれども, 胸腺では明瞭ではなかった。

### IV. 考 察

マウスの抗体産生の機構はよく知られている<sup>7,8)</sup>。すなわち, リンパ組織で APC により活性化されたヘルパー T リンパ球 (Th) が増殖分化し, B リンパ球を活性化し抗体産生を促すとされている。APC の MHC に結合した抗原を認識することにより Th は活性化され IL2 を産生する。IL2 は autocrine および paracrine 様式で作用し, Th の増殖および分化を促進する<sup>9)</sup>。胎生 18 日齢マウスの胸腺では, 既に IL2 が転写されていることから, 胎生期の胸腺では, 活性化された T リンパ球が存在していると考えられる。しかしながら, 胎生期には外来抗原との接触はおこらないと考えられているので<sup>10)</sup>, おそらく APC により提示されている抗原は, 自己由来抗原である可能性が考えられる。脾臓では, 胎生期には IL2 の転写は確認できず, 生後 2.5 日齢で始めて明瞭な転写が認められた。しかし, TCR $\beta$  が転写されていることから明らかに胎生期の脾臓にも T リンパ球が分布しているけれども, Th の活性化が可能な環境が整

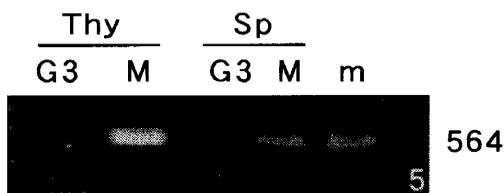


図 5 生後 1.5 日齢胸腺および脾臓の培養細胞の抗体 H 鎖の転写  
 生後 1.5 日齢胸腺および脾臓を細切し, 軽く圧迫することにより遊離した細胞を 48 時間培養した。回収した浮遊細胞での抗体 H 鎖の転写を調べた。胸腺および脾臓で IgM が転写されていた。その他の H 鎖の転写は検出できなかった。レーン m には  $\lambda$ -DNA/HindIII の 564 b.p. の DNA フラグメントを示した。M; IgM, G3; IgG3

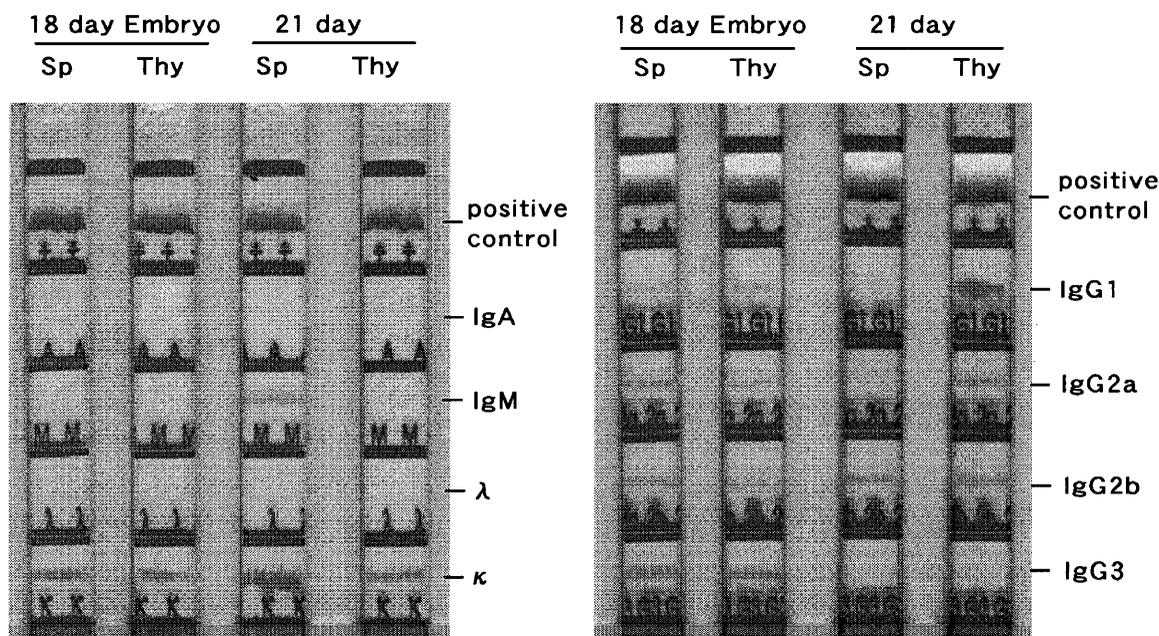


図 6 胸腺および脾臓の培養細胞の抗体産生

胎生 18 日齢および生後 3 週齢の胸腺および脾臓から分離した細胞を 48 時間培養した。マウスモノクローナル抗体のアイソタイプを調べるキットを利用して、回収した培養上清中の抗体の検出を試みた。胎生期の胸腺および脾臓細胞の培養上清中には IgG3 が存在していた。しかし、IgG3 よりも遺伝子の転写が明瞭であった IgM 抗体は検出されなかった。3 週齢の脾臓細胞の培養上清では IgM が検出された。その他の IgG のサブクラス抗体、さらに抗体 L 鎖の κ 鎖も検出された。

う時期は出生後であり、胸腺よりも遅れることが示唆された。

次に、抗体の H 鎖遺伝子の転写時期を検討した。H 鎖特異的なプライマーを用いた RT-PCR により、胎生期の胸腺および脾臓で IgM の転写が検出された。また、この時期の胸腺では、IgM と比較するとごく僅かではあるけれども IgG3 や IgA の転写が検出される試料も存在した。セルソーターにより、胸腺から IgM を表面抗原として持つ細胞集団が分離されることが知られているので<sup>11)</sup>、胎生期胸腺でも抗体の mRNA が翻訳されているか検討した。マウスモノクローナル抗体アイソタイプ検査キットを利用して、胎生 18 日齢の胸腺の分離細胞を 48 時間培養した上清中の抗体を調べた結果、IgG3、IgG2a、IgG2b、IgG1 および L 鎖の κ 鎖が検出され抗体が産生されていた。しかし、明瞭な IgM は検出できなかった。この結果から、この時期の胸腺リンパ球の大部分はプレ B リンパ球、あるいは未成熟な分化段階にあり、IgM は細胞質内に局在し分泌されないか、膜結合型であると考えられる<sup>12)</sup>。

生後 1.5 日齢の胸腺では、IgA や IgE の転写も僅かに検出された。さらに、胸腺での抗体遺伝子の転写は加齢に伴い増大し、80 日齢および 340 日齢では

調べたすべてのクラスの抗体 (IgM、IgG3、IgA および IgE) が転写されており、胸腺においても抗体遺伝子のクラススイッチがおきることが明らかとなった。抗体のクラススイッチには IL4 が関与していることが知られているけれども、胸腺では胎生期から IL4 が転写されていた。1.5 日齢の胸腺では IgA や IgE の転写も検出されたけれども脾臓では確認できなかった。すなわち、IgA や IgE 抗体へのクラススイッチがおこる時期も胸腺の方が脾臓に先行する傾向が認められた。

B リンパ球の分化過程において、プレ B リンパ球では既に抗体遺伝子の V 領域にランダムな組換えがおきており、種々のイディオタイプの異なる IgM 抗体が産生されている。さらに分化して、成熟 B リンパ球では IgM および IgD を細胞膜表面に提示する。二次リンパ組織では、これらの成熟 B リンパ球のなかから、活性化された Th と同じ抗原に親和性を示すクローンが増殖分化し、クラススイッチがおこり抗体産生細胞となると考えられている<sup>13)</sup>。しかし、胸腺でも抗体遺伝子が転写されていること、さらに、胸腺の分離細胞を 48 時間培養した上清では、アイソタイプ検査キットにより、IgG や L 鎖の κ 鎖が検出され、抗体が産生されていることが明らかとなっ

た。すなわち、一次リンパ組織である胸腺においても、胎生期から B リンパ球系列の細胞が存在し、抗体を産生していると考えられる。T リンパ球が胸腺内でポジティブ-ネガティブ二重選別を受け、自己の MHC を認識しないものや自己抗原に親和性を示すものはアポトーシスにより取り除かれ、自己抗原に親和性を示さない一部の T リンパ球のみが胸腺の毛細血管後小静脈から流出し、脾臓やリンパ節等の二次リンパ組織に移動し B リンパ球の活性化等に関与することが知られている<sup>10)</sup>。胸腺内に存在する B リンパ球系列の細胞は、胎生期から膜結合型の種々のイデオタイプの異なる IgM を産生し、これらの中には自己抗原に親和性を示す IgM も存在すると考えられる。さらに、胸腺内では、この様な自己反応性を示す未成熟 B リンパ球が、同じ抗原親和性を示す TCR を持つ T リンパ球と接触する機会が存在すると考えられる。胸腺内の B リンパ球に関する報告は少なく、この様な B リンパ球がどのような経過をたどるのかは不明である。

胸腺に存在する B リンパ球系列の細胞の由来は明らかではないけれども、胸腺の形成過程で原基に侵入した幹細胞は、*in vitro* で種々の細胞に分化可能であることが知られているので<sup>2)</sup>、この細胞から分化したものである可能性が考えられる。また、加齢に伴い二次リンパ組織から胸腺に流入してくる可能性も考えられるけれども、その場合には自己抗原に対する親和性を有してはいないものと考えられる。

## V. 要 約

マウスの胎生期から新生仔期の胸腺および脾臓に分布するリンパ球の分化状態および機能状態を検討した。IL2 を指標とした T リンパ球の活性化は、胸腺では胎生期から、脾臓では生後開始されることが明かとなった。また、脾臓と同様に胸腺において胎

生期から抗体の遺伝子が転写され、抗体も産生されていることが明らかとなった。しかし、胎生期では IgM の転写が著しいけれども、細胞外への IgM の分泌は検出できないことから、この時期の B リンパ球は大部分が未成熟な段階にあることが示唆された。胎生期から胸腺内で産生される抗体の意義は不明である。

## 文 献

- 1) R. Rugh: *The Mouse, Its Reproduction and Development* (Burgess Publishing), 253 (1968)
- 2) I. Roitt, J. Brostoff and D. Male: *Immunology*, 5th ed. (Mosby), 158 (1998)
- 3) R. Rugh: *The Mouse, Its Reproduction and Development* (Burgess Publishing), 265 (1968)
- 4) G. C. Fathman and G. J. Frelinger: *Annu. Rev. Immunol.*, 1, 633 (1983)
- 5) B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J. D. Watson: *Molecular Biology of The Cell*, 3rd ed. (Garland Publishing), 1242 (1994)
- 6) P. Chomczynski and N. Sacchi: *Analytical Biochem.*, 162, 156 (1987)
- 7) W.R. Chesnut and M.H. Grey: *Adv. Immunol.*, 39, 51 (1986)
- 8) R. C. Mackay: *Adv. Immunol.*, 53, 217 (1993)
- 9) T. Taniguchi and Y. Minami: *Cell*, 73, 5 (1993)
- 10) I. Roitt, J. Brostoff and D. Male: *Immunology*, 5th ed. (Mosby), 162 (1998)
- 11) M. Takizawa, J. Chiba, S. Haga, T. Asano, N. Yamamoto and M. Honda: *Exp. Anim.*, 53, 321 (2004)
- 12) A. Rolink and F. MeLchers: *Cell*, 66, 1081 (1991)
- 13) W. F. Alt, K. T. Blackwell and D. G. Vancopoulos: *Science*, 238, 1079 (1987)