赤血球前駆細胞に対する選択的培養法を用いた赤血球の 分化と A および B 抗原の発現について

津本 順史¹⁾ 梶井 英治¹⁾ 小幡 隆²⁾
雨宮 洋一²⁾ 須田 年生³⁾ 池本 卯典¹⁾

¹⁾自治医科大学法医学・人類遺伝学, ²⁾同 輸血部,

³⁾熊本大学医学部附属遺伝発生医学研究施設分化制御部門

(平成 5 年 3 月 4 日受付)

THE MECHANISM OF EXPRESSION OF A AND B ANTIGENS ON ERYTHROID CELLS CULTURED BY A TWO PHASE LIQUID CULTURE SYSTEM

J. Tsumoto¹⁾, E. Kajii¹⁾, T. Obata²⁾, Y. Amemiya²⁾, T. Suda³⁾ and S. Ikemoto¹⁾

Department of Legal Medicine and Human Genetics¹⁾ and Division of Blood Transfusion²⁾, Jichi Medical School and
Department of Cell Differentiation, Institute of Molecular Embryology and Genetics,
Kumamoto University School of Medicine³⁾

In order to examine productions of A and their reactivities, we applied a selective two phase liquid culture system for human erythroid progenitors. The erythroid progenitors were prepared from peripheral blood of three healthy volunteers with blood group A, B and O in the ABO blood group system. The cultured cells were analyzed with flow cytometry employing monoclonal anti-A, anti-B and anti-A + B antibodies. On day 11 of the second phase, the A and B antigens were detected on 72.1% and 49.9% of the cultured cells from blood group antigen of A and B, respectively. When two of erythroid progenitors from three volunteers were co-cultured, no transformation of phenotype in the ABO blood system was observed. This result suggested that the A and B transferases only affected the erythroid cultured cells which produced them.

序 言

赤血球膜の遺伝標識 ABO システムは、1900年 Landsteiner によって発見され以来多くの研究者によって、その亜型や変異型の存在も明らかにされ、その数は30を超える¹⁾。なお、人類にとって最も重要な ABO システムは輸血学や人類遺伝学、法医学などの分野に数多くの重要な知見を提供してきた。また、その血液型を決定する A 型および B 型抗原決定基としての糖鎖構造も明らかとなった²⁾。その A 型および B 型抗原物質は A および B 転移酵素の作用によって生合成される二次的な遺伝子産物である。近年、Yamamoto らは A 抗原を決定する A 転移酵素をコードする相補的 DNA のクローニングとその塩基配列の決定に成功し、

それを手掛かりに A、B および O(H) 転移酵素の塩基置換を明らかにした^{3,4)}。すなわち、A 転移酵素と B 転移酵素の cDNA 間には 7 塩基置換と、4 アミノ酸置換を認めた。この転移酵素が共通の基質に型特異的な糖を転移することにより、A 型抗原、B 型抗原は生成される。また、O 型遺伝子は A 型遺伝子の一つの塩基欠失により、フレームシフトが起こり、終止コドンが生じ、糖転移酵素活性を持たなくなる。

なお、A、B 転移酵素は、A、B それぞれの抗原を発現する細胞から産生され、その産生細胞にのみ作用するのか、あるいは細胞外に分泌され、他の細胞にも及ぶのか、そのいずれであるかはまだ明らかではない。今回、私達は赤血球系細胞にお

ける A, B 転移酵素の産生および A, B 各抗原の発現メカニズムについて, Wada ら⁵⁾の開発した赤血球前駆細胞に対する選択的液体培養法を用いて検討をおこなったので報告する。

材料および方法

1. 血液

A, B, O 型の健常人よりヘパリン存在下で末梢血液を採血し遠心比重法により単核細胞を分離し, 実験に用いた。

2. 選択的液体培養法

選択的培養法は Wada ら⁵⁾の方法に従い二段階法でおこなった。培養第 1 相では, 末梢血液より遠心比重法で分離した単核細胞を Iscove's modified Dulbecco's medium (以下 IMDM) (Gibco, 米国)を用いて, 2 度洗浄した後, 5% phytohemagglutinin-stimulated leukocyte conditioned medium (以下 PHA-LCM), 10% ウシ胎児血清 (以下 FCS) (Flow Laboratorie, オーストラリア)を含む IMDM に浮遊させた。細胞数は $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し, 25cm^2 の組織培養フラスコ (Corning, 米国)を用いて, 5% CO_2 , 37°C の条件下で 5 日間培養した。なお, PHA-LCM は, Suda ら⁶⁾の方法に従い末梢血より得られた単核細胞 ($2 \times 10^6/\text{ml}$) を 1% PHA と 10% FCS を含む IMDM に浮遊させ, 5% CO_2 , 37°C の条件下で 7 日間培養して得られた上清を用いた。培養第 1 相終了後, 培養細胞中の貪食細胞は Tebbi ら⁷⁾の方法に従いカルボニル鉄を用いて除去した。

培養第 2 相では, 培養細胞中の非貪食細胞を 30% ウシ胎児血清, 1% ウシ血清アルブミン (Sigma, 米国) そして $2\text{U}/\text{ml}$ エリスロポエチン (Epo, 雪印乳業, 日本)を含む IMDM に浮遊させてその細胞数を $1 \times 10^6/\text{ml}$ とし, 5% CO_2 , 5% O_2 , 37°C の条件下で再培養した。なお, ここでは A, B, O 各血液型細胞の単独および混合培養をおこなった。第 2 相で得られた培養細胞は, 各培養系においてその経過を追うため, サイトスピンで塗抹標本を作成して検鏡した。

3. フローサイトメトリー法

A および B 抗原の解析は橋本ら⁸⁾の方法に従い, モノクローナル抗 A, 抗 B および抗 A+B 抗

体を用い, 器材は Ortho (米国) 製 Spectrum III を使用した。解析用試料の調製は, まず, 約 1×10^6 個の赤血球および培養細胞を pH 7.3, 0.06M PBS で 2 回洗浄した後, PBS で 0.3% 細胞浮遊液とした。その細胞浮遊液に当教室で作製したモノクローナル抗 A, 抗 B および抗 A+B 抗体を $100\mu\text{l}$ ずつを混合し, 37°C で 30 分間感作した。その後, FITC で標識した抗マウス免疫グロブリン抗体で再度感作し, PBS で 2 回洗浄した後, Spectrum III によって解析を試みた。なお, 単核細胞の観察時には, サイトグラム上でリンパ球分画と単核球分画にそれぞれ粹組みし, 陽性細胞数を分析した。

4. A および B 転移酵素活性の測定

ガルサーブ AB (住友精化, 日本) および RIA 法を用いて培養上清中の A および B 転移酵素活性を測定した。培養上清は第 2 相 day 7 および day 11 のものを使用した。

ガルサーブ AB では, 培養上清を UDP-GalNAc または UDP-Gal の存在下で O 型血球と反応させ, 上清中に含有される A または B 転移酵素を作用させた後で抗 A, 抗 B 血清に対する被凝集価を求め, これを A, B 転移酵素の力価とした。

RIA 法では, 培養上清を UDP-GalNAc または UDP-Gal の存在下で O 型血球と反応させ, マウス由来抗 A, 抗 B モノクローナル抗体を添加し, さらに ^{125}I 標識抗マウス IgG 抗体を反応させた。その後, 感作血球を洗浄し, ガンマカウンターを用いて測定した。

結 果

選択的液体培養法による培養第 2 相 day 0 および day 9 における培養細胞像を Fig. 1 に示す。day 0 ではほとんどが芽球である。しかし, day 9 においては多数の正染性赤芽球に加え赤血球も認められた。

培養第 2 相 day 0 から day 9 の各培養日における培養細胞の形態学的変化を Fig. 2 に示す。すなわち, 培養第 2 相 day 0 においては, 芽球が 99.9% を占め, day 1 には前赤芽球と好塩基性赤芽球, day 4 には多染性赤芽球, day 5 には正染性赤芽球, そして day 6 には赤血球の出現を認めた。

培養第 2 相における A, B 各抗原の発現状態は

Fig. 1 Morphological changes on cultured cells during the second phase of the culture. (A) at day 0; and (B) at day 9.

Fig. 2 Morphological profile of cultured cells during the second phase.

Fig. 3に示す. すなわち A, B 各抗原は day 2に若干出現し始め, day 4には急激な増加を示した. そして day 6にはほぼプラトーに達した.

A, B, O 型健常人由来の赤血球前駆細胞を A 型+O 型, B 型+O 型, A 型+B 型の組み合わせで混合培養し, 培養第 2 相 day 11における正染性赤芽球および赤血球の出現率を観察したところ, いずれの組み合わせにおいてもその出現率は 80% であり, 各混合培養間における分化, 成熟には特に差異は認められなかった.

フローサイトメトリー法による解析の結果は Table 1 に示すように, A 型+O 型混合培養では抗 A 21.3%, 抗 B 1.1%, 抗 A+B 25.9%, B 型+O 型混合培養では抗 A 1.7%, 抗 B 14.2%, 抗 A+B 19.4% の陽性率を示し, O 型細胞には A および B 抗原は認められなかった. A 型+B 型混合培養では抗 A 18.5%, 抗 B 15.1%, 抗 A+B 37.6% であり, A, B 抗原陽性率に著しい差は認められなかった.

ガルサーブ AB および RIA 法を用いた培養上

Fig. 3 Expression of the A and B antigens on cultured cells in the second phase detected by flow cytometric analyses using monoclonal anti-A and anti-B antibodies.

清中の A および B 転移酵素活性の測定結果は、A および B 転移酵素活性はいずれも検出されなかった。

考 察

血液型物質に関する生化学的研究によると A および B 抗原は O 抗原物質を前駆体として合成されると説明されている。しかし、これを血球細胞分化の過程で実験的に説明した報告はない。そこで著者らは Wada ら⁵⁾によって開発された、選択的培養法を応用し、O 型血球由来培養細胞の A および B 型への転換を検討してみた。すなわち、A、B および O 型赤血球前駆細胞を A 型+O 型、B 型+O 型、A 型+B 型の組み合わせで混合培養し、フローサイトメトリー法により抗 A、抗 B、抗 A+B モノクローナル抗体を用いて A 抗原および B 抗原の発現を試みた。しかし、O 型培養細胞の A、B 型への転換、A 型培養細胞の B 型への転換、B 型培養細胞の A 型への転換などは惹起されなかった。

また、ガルサーブ AB および RIA 法を用いた培養上清中における糖転移酵素活性の検出も試みたが、A および B 転移酵素活性は検出されなかったにもかかわらず、培養細胞には A および B 抗原の発現は認められた。この事実は A および B 転移酵素は、A 型および B 型血球細胞自体に存在し、当該細胞における型物質の産生に関与していることを示唆するものかも知れない。

同種骨髄移植においては、ABO システムは組織適合抗原としては重要ではなく、ドナーとレシ

Table 1 Flow cytometric analyses of various cultured cells at day 11 of the second phase using monoclonal anti-A, -B and -A+B antibodies

Blood groups of cultured cells	Monoclonal antibodies		
	Anti-A	Anti-B	Anti-A+B
A	72.1	1.8	53.3
B	2.0	49.9	56.7
O	3.2	2.6	0.8
A+O	21.3	1.1	25.9
B+O	1.7	14.2	19.4
A+B	18.5	15.1	37.6

Values are percentage of A, B or A+B antigen-positive cells.

ピエントの ABO システムが不一致でも、溶血性輸血副作用を予防しながら移植をおこなうことは可能であると報告されている⁹⁾。ABO システムの不適合骨髄移植においては、レシピエントの赤血球膜の ABO 型抗原は移植後15~57日よりドナー型の赤血球抗原が検出されるようになり、やがてドナー型に変わる。しかし、血清中にはどの時期においてもドナー型の転移酵素活性は認められないとする報告もある¹⁰⁾¹¹⁾。これは、培養上清中には A-および B-転移酵素活性を認めなかった今回の実験結果とも合致する。

さらに、本研究は A および B 転移酵素は cDNA クローニングより細胞膜外に活性部位 (C 末端側) を有する膜貫通性蛋白であることを予測した Yamamoto ら³⁾⁴⁾の報告を裏付けるのではなかろうか。

なお、赤血球前駆細胞に対する選択的液体培養法は、造血器官としての骨髄を介することなく、成熟赤血球に至る血球分化を追うことも可能である。最近 Kajii らは糖転移酵素を必要としない蛋白性抗原である Rh システムについて、この系を用いて赤血球の分化と抗原の発現およびその遺伝子の分子生物学的解析を試み、新しい情報を得ている¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾。こうした実験系の確立は血液型不適合骨髄移植などにおける生着判定法の in vitro における実験系としても、その応用は期待できよう。

結 語

選択的液体培養法を用いて A、B、O 型各種赤血

球前駆細胞の混合培養をおこなったところ、O型細胞にはAおよびB抗原は検出されず、同様にA型細胞にはB抗原、B型細胞にはA抗原は検出されなかった。また、培養上清中にA、B-転移酵素活性は検出されなかった。なお、O型細胞のA、B型への転換、A型細胞のB型への転換、B型細胞のA型への転換は惹起されないと考えられる。

謝辞 本稿を終えるにあたり、本研究の実施に際し貴重なご意見を頂いた本学法医学・人類遺伝学教室の諸先生方に深く感謝申し上げます。

本論文の要旨は第39回日本輸血学会総会（京都）において発表した。

文 献

- 1) 池本卯典, 富田 功: 一赤血球の遺伝標識, 特に亜型および変異型のリスト. 日本医事新報, 2694: 27-34, 1975.
- 2) Yamakawa, T.: Forty years of my study on erythrocyte glycolipids. Rinshoken 15 years of Research, p. 1-16, 1991.
- 3) Yamamoto, F., Marken, J., Tsuji, T., White, T., Clausen, H. and Hakomori, S.: Cloning and characterization of DNA complementary to human UDP-GalNAc: Fuc α 1 $\rightarrow$ 2Gal α 1 $\rightarrow$ 3GalNAc transferase (Histo-blood group A transferase) mRNA. J. Biol. Chem., 265: 1146, 1990.
- 4) Yamamoto, F., Clausen, H., White, T., Marken, J. and Hakomori, S.: Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. Nature, 345: 229-233, 1990.
- 5) Wada, H., Suda, T., Miura, Y., Kajii, E., Ikemoto, S. and Yawata, Y.: Expression of major blood group antigens on human erythroid cells in a two phase liquid culture system. Blood, 75: 501-511, 1990.
- 6) Suda, T., Suda, J., Miura, Y., Hayashi, Y., Eguchi, M., Tadokoro, K. and Saito, M.: Clonal analysis of basophil differentiation in bone marrow culture from a Down's syndrome patient with megakaryoblastic leukemia. Blood, 66: 1278, 1985.
- 7) Tebbi, K., Rubin, S., Cowman, D.H. and McCulloch, E.A.: A comparison of granulopoiesis in culture from blood and marrow cells of nonleukemic individuals and patients with acute leukemia. Blood, 48: 235, 1976.
- 8) 橋本好一, 中木陽子, 雨宮洋一: フローサイトメトリーによる赤血球膜抗原, 抗体の測定法, 免疫と血液, 8: 457, 1986.
- 9) 原田実根, 中尾真二, 上田幹夫, 近藤邦夫, 尾高和亮, 大竹茂樹, 塩原信太郎, 末永孝生, 森 孝夫, 吉田 喬, 服部絢一: ABO 不適合ドナーからの同種骨髄移植. 臨床血液, 25: 45-51, 1984.
- 10) 森 孝夫, 吉本良三, 安江静香, 湯上礼子, 原田実根, 松田 保: ABO 式血液型不適合同種骨髄移植後の型転移酵素活性, 血液凝集素価の推移. 医学のあゆみ, 133: 327, 1985.
- 11) Ikemoto, S., Kajii, E., Tsuchida, S., Amemiya, Y., Kato, K. and Miura, Y.: Behavior of genetic markers in recipients after bone marrow transplantation and problems in forensic medicine. J. Foren. Sci., 35: 548-553, 1990.
- 12) Kajii, E. and Ikemoto, S.: A new method for isolation of Rh polypeptide mRNAs using a liquid culture system. Proc. Jap. Acad., 68: 51-56, 1992.
- 13) Kajii, E., Umenishi, F. and Ikemoto, S.: A cDNA clone encoding a Rh polypeptide detected in RhD-negative erythroid cells. Vox Sang., 64: 196, 1993.
- 14) Kajii, E., Umenishi, F., Iwamoto, S. and Ikemoto, S.: Isolation of a new cDNA clone encoding an Rh polypeptide associated with the Rh blood group system. Hum Genet., 91: 157-162, 1993.