教育講演 III

形質細胞の腫瘍化と Pax-5 遺伝子

河野 道生

山口大学医学部寄生体（免疫）学

Oncogenesis of human plasma cells and Pax-5 gene

Michio Kawano

Department of Parasitology & Immunology Yamaguchi University School of Medicine

形質細胞はBリンパ球系細胞の最終分化細胞であり、IgGを産生する形質細胞の多くは、リンパ組織から骨髄に移行して最終分化を遂げる¹⁾。胚中心B細胞で形質細胞へ運命付けられた細胞（前駆形質細胞）は末梢血を通り、骨髄に入り未熟、中間型さらに成熟形質細胞へと分化することが最近明らかになった。骨髄の形質細胞が腫瘍性に増殖している疾患に骨髄腫がある。この骨髄腫を形質細胞の腫瘍化を考える上でモデルとして取り上げた。その腫瘍細胞集団の不均一性が正常の骨髄形質細胞の分化過程を反映していることが明らかとなり、特に未熟骨髄腫細胞が増殖因子インターロイキン6 (IL-6)²⁾に反応して増殖し、いわば腫瘍前駆細胞と考えられる。更に、骨髄腫細胞では表面抗原CD19の発現が全く消失していることから、そのCD19遺伝子の発現に関与する転写因子BSAP (B-cell specific activator protein) をコードするPax-5遺伝子の発現の変異が形質細胞の腫瘍化に関連する可能性が考えられつつある³⁾。

はじめに

形質細胞はBリンパ球系の最終分化細胞である。Bリンパ球系の幹細胞は骨髄にあり免疫グロブリン (Ig) の重鎖 (H鎖) の再構成を起こしてPre-B細胞となりB細胞のレパートリーを構築する。次に、

末梢リンパ組織つまりリンパ節などにて対応する抗原に遭遇すると、活性化され胚中心B細胞となる。胚中心B細胞はIgのclass switchを起こした後、記憶B細胞 (memory B cell) あるいは形質細胞 (plasma cell) へと分化してゆく。更に、形質細胞は短寿命の形質細胞がリンパ節等に留まるが、一部が骨髄へと向かい長寿命の形質細胞に分化するものと考えられている (図1)。骨髄での形質細胞の分化過程は、最近の形質細胞の表面抗原の解析により明らかにされつつある⁴⁾。

骨髄での形質細胞分化過程

骨髄中の形質細胞は長寿命と考えられている。骨髄中の形質細胞の腫瘍性増殖疾患に骨髄種がある。その腫瘍細胞である骨髄腫細胞の表面抗原の解析は抗CD38抗体を使用した2カラー解析法 (図2) により急速に進歩した⁵⁾。つまり、1) 形質細胞 (骨髄腫細胞) のみがCD38抗原強陽性であること、2) 多クローン性形質細胞はCD19抗原陽性であるが単クローン性形質細胞 (骨髄腫細胞) はCD19抗原陰性であること、3) 接着分子MPC-1⁶⁾、CD49e (VLA-5) およびCD45の発現の有無により未熟、中間型および成熟骨髄腫細胞が識別されることが明らかとなった⁷⁾。これらの結果をもとに、正常の形質細胞の骨髄での分化過程がいかなるものかまずはin vitroの系で検

Development of Plasma cells

図1 B幹細胞から長命の骨髄形質細胞までの分化過程

討した。胚中心B細胞から形質細胞へと運命付けられた細胞は末梢血中に検出できる、つまり前駆形質細胞 (early plasma cells) である⁸⁾。この前駆形質細胞は *in vitro* で培養液のみで培養すると速やかにアポトーシスに陥るが、骨髄ストローマ細胞株 KM-102 と共培養するとアポトーシスから免れ分化できる⁹⁾。形態学的にも、表面抗原の発現の上からも前駆形質細胞は最終的に成熟形質細胞へと分化できる。CD38 抗原を中等度陽性に発現している前駆形質細胞 (CD38++MPC-1-CD45+CD49e-) は、CD38 抗原を強陽性に発現する未熟形質細胞 (immature plasma cell) (CD38+++MPC-1-CD45-CD49e-) になる。次に、接着分子 MPC-1 を発現する中間型形質細胞 (intermediate plasma cell) (CD38+++MPC-1+CD45-/CD49e) となり、更に接着分子 VLA-5 (CD49e) をも発現して成熟形

質細胞 (mature plasma cell) (CD38+++MPC-1+CD45+CD49e+) になる (図3)。この *in vitro* 分化過程に骨髄ストローマ細胞株 KM-102 の存在は必要であり、特に骨髄ストローマ細胞から産生されるインターロイキン 6 (IL-6) は必須である。

以上より、骨髄へと入るべく運命付けられた前駆形質細胞は骨髄で骨髄ストローマ細胞のもとで長寿命の骨髄形質細胞へと分化する。骨髄ストローマ細胞を含む微小環境は骨髄に構築される長寿命の形質細胞の checkpointer として機能しているものと思われる。骨髄にホーミングしてきた前駆形質細胞のどれくらいが成熟形質へと分化してゆくのか、それはいかに規定されているのか等が今後の残された問題である。

Differentiated expression of CD38 in Bone Marrow Cells

図2 抗CD38抗体を使用した2カラー解析

- ① : mature B cells, ② : pre-B cells, ③ : plasma cells,
 ④ : mature T cells, ⑤ : myeloid cells, ⑥ : NK cells

Plasma Cell Differentiation

図3 形質細胞の分化過程における表面抗原の発現

図4 形質細胞および骨髄腫細胞の in vitro 培養での viability (FDA/PI 法)

A : FDA/PI 染色法による viable, apoptotic および dead cell の展開

B : セル・ソーターで分取した正常成熟形質細胞

C : 骨髄腫患者より分取した成熟骨髄腫細胞

D : 未熟骨髄腫細胞

%は viable cell の比率を示す。

未熟骨髄腫細胞の IL-6 による増殖

骨髄腫患者の骨髄中には正常の骨髄と比較して未熟形質細胞および中間型形質細胞が目立つ。再発増悪した骨髄腫患者の骨髄には未熟形質細胞（骨髄腫細胞）が著増しているし、末梢血中に流出している骨髄腫細胞は未熟骨髄腫細胞である。このような状況から、未熟骨髄腫細胞がいわば腫瘍前駆細胞（clonogenic tumor cell）と考えられる。

そこで未熟骨髄腫細胞、中間型および成熟骨髄腫細胞とて細胞生物学的の性状にどのような差異があるのか検討してみた⁷⁾。in vitro 系での増殖能と Ig 産生能をみると、未熟骨髄腫細胞は増殖因子 IL-6 に反応して増殖するが、成熟骨髄腫細胞は IL-6 に反応せずほとんど増殖しない。逆に、Ig 産生は成熟骨髄腫細胞では高く、未熟骨髄腫細胞では低い。中間型骨髄腫細胞はどちらかと言うと成熟骨髄腫細胞に近い性状である。興味深いことに、未熟骨髄腫細胞は in vitro 培養にてアポトーシスに陥りやすいことである。図 4 に示すごとく、in vitro 培養での細胞生存率（cell viability）を fluorescein diacetate (FDA) と propidium iodide (PI) による二重染色法で定量できる⁹⁾。その原理を簡単に述べると、FDA は細胞内に自由に移行し細胞内の esterase 活性が十分であれば（細胞が viable であれば）蛍光性の FDA に変換される（FDA+）。アポトーシスを起こした細胞では esterase 活性は消失しており蛍光性 FDA は産生されない（FDA-）。壊死細胞では細胞膜機能が破壊されているので PI を取り込む（PI+）。従って、viable cell は FDA+PI-、apoptotic cell は FDA-PI-、次に dead cell は FDA-PI+ に展開される。セル・ソーターで分取した未熟骨髄腫細胞（MPC-1-CD49e-）は培養液（medium）のみで 1 日間培養すると速やかにアポトーシスに陥る（FDA+PI-viable cells; 4.3%）。IL-6 の存在（+IL-6）によりアポトーシスからある程度逸脱できる（FDA+PI-cells; 24.8%）。一方、成熟骨髄腫細胞（MPC-1+CD49e+）は培養液のみでも viability がよく保たれ（FDA+PI-cells; 40.4%）、IL-6 の存在でもその viability に変化はない（FDA+PI-cells; 42.4%）。これは正常成熟形質細胞の動態と同様である。これらのことは、未熟骨髄腫細胞が細胞周期を回っている細胞であり、逆に成熟骨髄腫細胞は静止期の細胞であることを示している。更に、細胞周期を正に調節するサイクリン（cyclin）D1 あるいは負に調節す

Myeloma cells

図5 形質細胞および骨髄腫細胞における CD19, BSAP (Pax-5), E2A および Id mRNA 発現 (RT-PCR 法)

る cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor, p16 の発現の有無からも確認された。つまり、未熟骨髄腫細胞は G1 期を進行させうる cyclin D1 を発現し、逆に G1 期の進行を抑制する p16 の発現はない¹⁰⁾。一方、成熟骨髄腫細胞では正常の成熟形質細胞と同様に cyclin D1 の発現はなく、逆に p16 の発現が誘導されている。以上より、未熟骨髄腫細胞が増

Nucleotide Sequence of the Human Pax-5 Gene Upstream Sequence

```

-1050  GTAAGCAGGAATGTGGCAGACAGCAGAAGTGAGACTGTACCAGAAGCTTCCAAAGTTCTC
-990  CTGAGAGTCATTCTTTTGTATTACGGTCAGTCACAATTATTGGTGGTGGTTCTATGCG
-930  ATTTCTTACTTTTAACTTTTGAAGTACTTTTCTTGATCTTAACCTTAGTTCTGCG
-870  CAGTAGTTTTGTAGATCACAAATTTCTGTTTTGCACACTTCTCAGGTGTTTCGGAGTGG
-810  GCTCTGCTGTATTGGACTAAACCTATCTGACACAGTTACCCATGAGTCTTCTGGTAGGG
-750  AATGCTATGTGATTTTCTGATTCTACATGCTTCACGTAGGGATCCACCAAATAATATAC
-690  AACAAAGTAATTTTCTGATTAACAATATTTTCTATGATACCATGGGGATGCAGAGCAC
-630  GTTATTTTCAAGCTGGGATCTTACAGCAGCAACCAACAAACGTATGTAAGTGCCTATT
-570  CTGCACCTCATCGTAACCTTCTCATTGTAACAAGAGACAGGCTGCTCTCCATCCTTCTT
-510  TGAATTTTGTTTCAACATCTCCTTTCTTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTT
-450  TCTTTTCTTTCTTTCTTTTTCGTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTT
-390  TTCCCTTTTGGGGGACAGAGCCTCAGTCTGTACCCAGGCTGGAGTACAATGGCGTGGTC
-330  TTGGCTCACTGCAACCTCTGCCTCCCAGGTTCAAGTGTTTCTCCACCTCAGTCTCCTTA
-270  GTAGCTAAGTGCCACCACAACCGCTAATTTTGTATTTTGAAGAGATGGGGTTTCAC
-210  TATGTTGGCCAGGCTGGTCTCGAACACCTGACCTCGTGAACCCACCTTGACCTCCCA
-150  AAGTGTCTGGGGACATCTTGTGATGTGGCGAGAACAGGACATGATCTCACATGGCGAGA
-90  AGCTCTTTAGTTCCTTAATCATTTTCGCGGTGCCTTCGGACGCTTTTTTCCACCTAAAAC
-30  GTTTAGTTTTCAGCTCAGTGATCAGCTACCCAGCTCGCGGGGGGAGCGGAAGGCTTGA
      ATTATTCGACCTGTGAGCGGCCCTGGCACCCAAAAAAGAAAAAAGAAAAA
      AAAGGCACAAAAAAGTGGAACTTTTCCCTGTCCATTCCATCAAGTCCTGA

```

Specific Binding Activity of the Predicted Regulatory Sites

図6 ヒト Pax-5 遺伝子の 5' 上流 (約 1Kb) の DNA 塩基配列と転写因子結合モチーフ

殖因子である IL-6 に反応して in vitro ではアポトーシス誘導を免れ、細胞周期を進行して増殖しうると考えられる。

骨髄腫細胞での CD19 発現の消失と Pax-5 遺伝子発現

これまで、ヒト骨髄腫においてもいわゆる癌および癌抑制遺伝子の構造的および発現の変異の有無が

Altered Expression of Pax-5 Gene & Proliferation of Immature Myeloma Cells by IL-6

図7 未熟骨髄腫細胞における Pax-5 遺伝子の発現変異と IL-6 による増殖との関係 (仮説)

検討されてきた。c-myc, H-ras, p53, bcl-2 および Rb などの報告¹¹⁾があるが、いずれも骨髄腫の癌化との関連を強く示しうるものではなかった。我々は最近の表面抗原の解析の結果から、正常形質細胞には CD19 抗原の発現はあるが (CD19+), 悪性形質細胞 (骨髄腫細胞) には CD19 の発現が見られない (CD19-) ことを見出した⁵⁾。骨髄腫細胞での細胞表面の CD19 抗原の発現の消失は、CD19mRNA 発現が見られないことによるものであった。更に、CD19 遺伝子の発現を正に調節する転写因子 BSAP の発現も認められなかった。転写因子 BSAP は Pax-5 遺伝子にコードされており、骨髄腫細胞ではこの Pax-5 遺伝子の発現が消失していることがわかった³⁾ (図5)。Pax-5 遺伝子の発現調節には、これまで正に調節する E2A と負に調節する Id (inhibitor of DNA binding proteins) が考えられていた¹²⁾¹³⁾。そこで、骨髄腫細胞、骨髄腫細胞株、B細胞株および正常形質細胞等で E2A および Id mRNA 発現を調べた。しかし、これらの発現は骨髄腫細胞と正常形質細胞とで差異はなかった。従って、骨髄腫細胞

では Pax-5 遺伝子の発現に変異が生じており、これにより CD19 遺伝子発現がなく細胞表面に CD19 抗原の発現が見られない。

Pax-5 遺伝子は pair domain, homeobox などの特徴的構造をもった Pax 遺伝子群の一つであり、B細胞の初期分化を制御する重要な転写因子と考えられている¹⁴⁾。Pax-5 遺伝子ノックアウトマウス (Pax-5^{-/-}) では、pre-B細胞の前段階で完全に分化が抑制されてしまう¹⁵⁾。また、これまでB細胞から形質細胞へと分化すると Pax-5 遺伝子の発現は消失すると考えられていたが、これは骨髄腫細胞株での Pax-5 発現消失を正常の形質細胞での Pax-5 発現消失と捉えたためであろう。

骨髄腫細胞での Pax-5 遺伝子の発現消失の機構を明らかにするべく、まず Pax-5 cDNA をプローブとして骨髄腫細胞からの DNA で常法のごとくサザンブロット解析を行ったが、特に大きな構造的変異は見られなかった。そこで、Pax-5 遺伝子の転写調節の機構を明らかにするべく、Pax-5 遺伝子の 5' 上流領域の DNA 塩基配列を決定した¹⁶⁾。約 1Kb 上

流の転写調節領域と思われる領域には, Ikaros (Lyf. 1, Ik-2), Sox-5, E2A (E47), c-Ets 等の転写因子の結合モチーフの存在することが明らかとなった(図6)。しかし, 今のところ骨髓腫細胞でこれら転写因子の発現には正常の形質細胞と比して差異は見出されていない。現在, 更に詳細に検討を加えている状況である。

骨髓腫細胞の増殖における CD19 分子の消失の意義

前述のように Pax-5 遺伝子の発現消失により, 骨髓腫細胞には CD19 分子の発現がない。CD19 分子は CD21 分子と複合体を形成しシグナル伝達に関与している。このシグナルは CD21 を受容体とするものと考えられており, CD21 受容体のリガンドとして補体 C3d (C3b) あるいは CD23 が考えられている。骨髓ストローマ細胞上には CD23 分子が発現しており, 前駆形質細胞および未熟形質細胞(骨髓腫細胞)には CD21 分子の発現が認められる。実際, 未熟骨髓腫細胞株と骨髓ストローマ細胞株との接着現象をみると, CD21 と CD23 分子とが機能していることが確認された¹⁷⁾。このような状況で, 骨髓腫細胞の CD19 分子が発現していないことによるシグナル伝達の変異が十分想定されるが, いまだ確証を得て

いない(図7)。今後, 精力的に検討しなければならない点である。

おわりに

骨髓で最終分化を遂げる長命の形質細胞の詳細な分化過程が接着分子 MPC-1, VLA-5 (CD49e) および CD45 の発現から明らかになった。その腫瘍化を考える時に, ヒト骨髓腫はそのモデルである。骨髓腫患者の骨髓には, 未熟, 中間型あるいは成熟骨髓腫細胞が混在しており, それら細胞亜群の細胞生物学的性状は大きく異なる。中でも未熟骨髓腫細胞は増殖因子 IL-6 に反応して増殖する, いわば腫瘍前駆細胞 (clonogenic cell) と考えられる。正常であれば, 末梢血中の前駆形質細胞は骨髓へホーミングした後速やかに未熟形質細胞から中間型更に成熟形質細胞へと分化していく。しかし, 未熟骨髓腫細胞は増殖能力を獲得している(分化が抑制されているとも考えられる)。この変異の機構を説明し得るものとして, 我々は Pax-5 遺伝子の発現変異による CD19 分子の発現消失に注目している。未熟骨髓腫細胞における IL-6 によるシグナルと CD19/CD21 複合体からのシグナルの変異がどのような関係にあるのか今後明らかにしていかなければならない重要な課題である。

文

- 1) Dilosa RM, Maeda K, Masuda A, et al: Germinal center B cells and antibody production in the bone marrow. *J Immunol* 146:4071-4078 1991
- 2) Kawano M, Hirano T, Matsuda T, et al: Auto-crine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* 332:83-85 1988
- 3) Mahmoud MS, Hunag N, Nobuyoshi M, et al: Altered expression of Pax-5 gene in human myeloma cells. *Blood* 87:4311-4315 1996
- 4) 河野道生: 骨髓腫前駆細胞と分化 *日本臨床* 53: 552-556 1995
- 5) Harada H, Kawano MM, Huang N, et al: Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood* 81:2658-2663 1993
- 6) Huang N, Kawano MM, Harada H, et al: Het-

献

- erogeneous expression of a novel MPC-1 antigen on myeloma cells. *Blood* 82:3721-3729 1993
- 7) Kawano MM, Huang N, Harada H, et al: Identification of immature and mature myeloma cells in the bone marrow of human myelomas. *Blood* 82:564-570 1993
- 8) Harada Y, Kawano MM, Huang N, et al: Identification of early plasma cells in peripheral blood and their clinical significance. *Br J Haematol* 92:184-191 1996
- 9) Kawano MM, Mihara K, Huang N, et al: Differentiation of early plasma cells on bone marrow stromal cells requires interleukin-6 for escaping from apoptosis. *Blood* 85:487-494 1995
- 10) Kawano MM, Mahmoud MS, Ishikawa H: Cyclin D1 and p16^{INK4A} are preferentially expressed in immature and mature myeloma cells, re-

- specitively. *Br J Haematol* (in press) 1997
- 11) Barlogie B, Epstein J, Selvanayagam P, et al: Plasma cell myeloma: New biological insights and advances in therapy. *Blood* 73: 865-879 1988
 - 12) Bain G, Maandag ECR, Izon DJ, et al: E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell* 79: 885-892 1994
 - 13) Benezra R, Davis RL, Lockshon D, et al: The protein Id: A negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 61: 49-59 1990
 - 14) Dorshkind K: Transcriptional control points during lymphopoiesis. *Cell* 79: 751-753 1994
 - 15) Urbanek P, Wang S, Dorfler P, et al: Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax-5/BSAP. *Cell* 79: 901-912 1994
 - 16) Mahmoud MS, Kawano MM: Cloning and analysis of the human Pax-5 gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 228: 159-164 1996
 - 17) Huang N, Kawano MM, Mahmoud MS: Expression of CD21 antigen on myeloma cells and its involvement in their adhesion to bone marrow stromal cells. *Blood* 85: 3704-3712 1995