原 著

順天堂医学 39 (4)
P. 474~483 (1994)

B細胞性慢性リンパ性白血病 (B-CLL) 発症モデルとしての H-2^zホモ接合体 New Zealand マウス系: CD5 B細胞の前癌状態及び腫瘍細胞における *bcl-2* の発現増加

H-2^z Homozygous New Zealand mice as a model for B-cell chronic lymphocytic leukemia : elevated *bcl-2* expression in CD5 B-cells at premalignant and at malignant stages.

岡 本 完*1)2) 篠 崎 文 子*1) 西 村 裕 之*1)
HIROSHI OKAMOTO, M.D. AYAKO SHINOZAKI, Ph.D. HIROYUKI NISHIMURA, Ph.D.
鶴 井 博 理*1) 広 瀬 幸 子*1) 白 井 俊 一*1)
HIROMITI TSURUI, M.D. SACHIKO HIROSE, M.D. TOSHIKAZU SHIRAI, M.D.

New Zealand マウスに好発する B細胞性慢性リンパ性白血病 (B-CLL) の発生が主要組織適合遺伝子複合体 (MHC, マウスでは H-2) の特定のハプロタイプによって統御されていることを明らかにした。B-CLL 好発系は、H-2^z/H-2^zホモ接合体 New Zealand マウスであり、加齢に伴い末梢血に CD5陽性 B細胞の増殖が認められた。これらの B細胞は徐々に oligoclonal から monoclonal へと変化し、結果的に可移植性の CD5⁺B-CLL が発生した。proto-oncogene *bcl-2* の発現について調べたところ、B-CLL 細胞はもとより、oligoclonal な前癌状態の細胞においても発現増強が認められた。このことから、アポトーシスを免れた長期生存可能な CD5 陽性 B細胞が自己増殖する過程において、形質転換するものと考えられた。以上の結果から、このモデルマウス系は B-CLL 発生に関与する遺伝的素因や、その発生過程における多段階の発癌関連遺伝子の変化を解析するために有力な手掛かりを与えてくれるものと考えられた。

キーワード: B細胞性慢性リンパ性白血病, 主要組織適合遺伝子複合体ハプロタイプ, ニューゼーランドマウス, CD5 B細胞, *bcl-2* 遺伝子

Key words: B cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL), MHC (H-2) haplotype, New Zealand mice, CD5 B cells, *bcl-2* gene

緒 言

慢性リンパ性白血病 (CLL) は、家族性に発症する白血病のひとつであり¹⁾²⁾、しかも自己免疫

疾患患者の家族に多く認められることが知られている^{3)~6)}。また、CLL 患者は自己免疫疾患患者と HLA ハプロタイプを一部共有することも報告されている²⁾。欧米における CLL の大部分は B細胞由来の B-CLL であり、腫瘍細胞は表面に CD5 分子を持つ、所謂 CD5 B細胞に由来するものと考えられている^{7)~13)}。通常の B細胞が獲得免疫に関与するのに対して CD5 B細胞は多反応性の自然抗体や自己抗体産生に関与すると考えられている¹⁴⁾。従って、CD5 B細胞の増殖・分化を統御する要因が自己免疫疾患および B-CLL 発症に関

* 1) 順天堂大学医学部病理学第二講座
Department of Pathology (II), Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan
* 2) 順天堂大学医学部内科学教室 (膠原病)
Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan
〔Aug. 13, 1993 原稿受領〕 (Oct. 14, 1993 掲載決定)

与すると考えられる。

われわれは、H-2-congenic New Zealand マウス系を確立し、自己免疫疾患と B-CLL の発症に異なる MHC ハプロタイプが関与することをすでに報告してきた。この際、H-2^d/H-2^eヘテロ接合性は自己免疫疾患の、また、H-2^e/H-2^eホモ接合性は B-CLL 発症の一つの遺伝的素因であることを明らかにした¹⁵⁾¹⁶⁾。後者、つまりH-2^eハプロタイプをホモ接合性に有する New Zealand マウスでは、脾臓において CD5 B 細胞の異常な増殖が起こるが、これらは加齢に伴い oligoclonal からさらに monoclonal になり、B-CLL に至ると考えられる¹⁷⁾。

ヒト B-CLL において、*bcl-2* や *c-myc* の染色体転座に伴う発現異常が報告されている¹⁸⁾¹⁹⁾。さらに、*c-fgr* や *lck* などの proto-oncogene の活性化が腫瘍化に関与するという報告もある²⁰⁾。従って、多段階の遺伝子変化的蓄積が CD5 B 細胞の腫瘍化に関与すると考えられる。しかし、現在まで B-CLL の前癌状態についてはほとんど検討がなされておらず、この遺伝的変化的蓄積過程はよく理解されていない。

今回われわれはH-2^e/H-2^eホモ接合性 New Zealand マウスが、B-CLL の格好のモデルであることを示すとともに、その発生過程における proto-oncogene の活性化の過程を調べるのに非常に優れたモデルであることを確認したので報告する。

実験材料と実験方法

1. マウス

NZB (H-2^d)・NZW (H-2^e)・NZB×NZW F1 (NZB/WF1. H-2^d/H-2^e) および C57BL/6 (H-2^b) マウスは、静岡動物センター (静岡) から購入した。H-2-congenic 系である NZB. H-2^e と NZW. H-2^d は、NZB/W F1 を NZB および NZW にそれぞれ12世代退交配することによって確立した²¹⁾。

2. モノクローナル抗体

モノクローナル抗体マウス IgM (clone 331.12)²²⁾・

CD5 (Ly-1) (clone 53-7.3)²³⁾・CD45R (6B2) (clone RA 3-6B2)²⁴⁾・CD45RA (Lp-2)²⁵⁾ および CD11b (Mac1) (clone M1/70)²⁶⁾ 抗体に fluorescein isothiocyanate (FITC) および biotin を結合させて実験に用いた。

3. Flow cytometry 解析

末梢血は傍眼窩洞より採取し、Giemsa 染色にて血液像を検討した。総白血球数 (WBC) は Coulter Counter (Coulter Co., Miami, FL) にて測定した。脾臓組織をガラスホモジナイザーで処理して得られた細胞から、塩化アンモニウム処理により赤血球を除去した細胞を脾臓細胞として、細胞 5~10×10⁵ 個を 0.2% BSA と 0.05% NaN₃ を加えた 20ml PBS (pH 7.4) 中で FITC 標識および biotin 化モノクローナル抗体と反応させた後、phycoerythrin (PE) 標識 avidin (Becton Dickinson 社) を加えて二色蛍光染色を行った。反応は 4℃30分にて行った。染色した細胞の解析は FAC Star (Becton Dickinson 社) を用いて forward vs. side scatter によって識別したリンパ球集団について行った。CD5 + /IgM + 細胞は FACStar を用いてソーティングした。蛍光強度は対数表示で示した。

4. RT-PCR 解析

細胞の RNA は Favalaro らの方法²⁷⁾にて vanadylribonucleoside complex の存在下にて抽出し、マウス *bcl-2* cDNA は逆転写酵素により、以下のように合成した²⁸⁾。750ng の RNA を 1p mol の primer #1 (5'GCCATATAGTTCCACAAAGGCA) (マウス *bcl-2* 遺伝子²⁹⁾の第二エクソンに存在する塩基配列) と 55mM Tris-HCl (pH 8.3)・83mM KCl・11mM dithiothreitol・3.3mM MgCl₂・1.1mM dGTP・dATP・dTTP・dCTP を含む総量 18μl の反応液中で 65℃1分・54℃5分ハイブリダイズさせた。一本鎖の *bcl-2* cDNA は Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD) 200単位と human placental ribonuclease inhibitor (Takara Shuzo, Shiga, Japan) 10単位の存在下で 42℃15分反応させた。Polymerase chain

reaction (PCR)³⁰⁾は50p mole の primer #2 (5'ATGGCGCAAGCCGGGAGAACAGGG) (マウス *bcl-2* 遺伝子²⁹⁾の第一エクソンに存在する塩基配列)と50p mole の primer #1と2単位の Ampli Taq DNA polymerase (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT)を加えた80 μ lのPCR反応液(12.5mM of Tris-HCl, pH 8.3・62.5mM of KCl・1.88mM of MgCl₂, and 0.0013% of gelatin)中で93°C 1分・55°C 1分72°C 1分反応させた。総反応回数は30回で行った。10 μ lのPCR産物を1%のアガロースゲルで電気泳動後、ナイロンメンブレン(Biodyne Nylon Membrane; Pall Biosupport Division, Glen Cove, NY)に転写し、600bpのマウス *bcl-2* cDNAをプローブとして検出した。マウス *bcl-2* cDNAはマウス脾臓細胞のDNAからPCRにて増幅し、pSKM13+ベクターにサブクローニングし、塩基配列を確認したものを用いた。サザンハイブリダイゼーションにて得た各バンドはBAS 2000 Bio-Imaging Analyzer (Fuji Photo Film Co., Tokyo, Japan)にて定量化した。

5. サザンブロット解析

脾臓から抽出した約10 μ gのDNAをEcoRIで消化し、0.7%のアガロースゲルで電気泳動により分画後、ナイロンメンブレンに転写し、免疫グロブリン J_H領域のプローブ(PMJH)を用いてサザンブロット解析を行った。PMJHプローブはBamHIとEcoRIで消化して得た約2000塩基の断片で、JH3およびJH4セグメントを含んでいる。

結 果

1. H-2-congenic New Zealand マウスの脾臓および末梢血における CD5 B細胞比率

脾臓および末梢血における CD5 B細胞比率をH-2ハプロタイプの異なるH-2-congenic NZBおよびNZWマウス(6から18カ月齢)で比較した結果を図-1に示してある。いずれのマウス系においても、H-2^d/H-2^dあるいはH-2^d/H-2^zハプロタ

図-1 Frequencies of CD5 B cells in peripheral blood and spleen B cells from NZB and NZW mice congenic for either H-2^z/z, H-2^d/z or H-2^d/d. Note that higher frequencies of CD5 B cells were observed for mice homozygous for H-2^z.

イプのものに比較して、H-2^z/H-2^zハプロタイプのものでより高かった。

2. H-2-congenic New Zealand マウスの末梢血リンパ球の Flow cytometry 解析

図-2 Aには12カ月齢のH-2-congenicマウスの末梢血リンパ球を、CD5とIgMに対するモノクローナル抗体で二色蛍光染色し、Flow cytometry解析したものの代表的なprofileを示してある。H-2^z/H-2^zホモ接合体のNZBおよびNZWでは、H-2^d/H-2^dあるいはH-2^d/H-2^zハプロタイプのものに比較して、明らかにCD5 B細胞比率が高く認められることがわかる。図-2B a~fには、それぞれ2 8 9 10 11 12カ月齢のH-2^z/H-2^z NZW系マウスの末梢血リンパ球を抗CD5と抗IgMモノクローナル抗体で二色蛍光染色し、Flow cytometry解析したものを示してある。加齢にもなってCD5 B細胞の比率が高くなるとともに(a~e), CD5 B細胞表面のIgM発現量が比較的均一になる傾向がみられる。12カ月齢ではCD5 B細胞が一つの均一なパターンを示すものが現れ、クローナルな増殖をしている可能性が示唆される(f)。この均一なパターンを示すB細胞は、CD45 R (6B2)とCD11b (Mac 1)が軽度陽性という

図-2 A Two color flow cytometry profiles for sIgM and CD5 expressions.

Peripheral blood lymphocytes from 12-mo-old H-2 congenic NZW and N2B mice. Note that H-2^z/H-2^z homozygous mice showed remarkably high CD5 B cell frequencies, as compared to mice with other haplotypes (H-2^d/H-2^d or H-2^d/H-2^z).

図-2 B Peripheral blood lymphocytes obtained from NZW mice (H-2^z) at varying ages (2, 8, 9, 10, 11 and 12-mo).

Age-dependent increase in CD5 B cell frequencies was evident (a-e) and the expansion of homogeneous population was observed in a 12-mo-old NZW mouse (f).

所謂 CD5 B 細胞の特徴を有していた。また、これらの CD5 B 細胞は同系の若齢マウスへの移植が可能であり、白血病細胞と考えられた。

3. B-CLL細胞の形態的特徴

図-3 Aに示すように、末梢血中の白血病細胞は中等度の大きさで円形の核をもち、核細胞質比の高い細胞であった。ヒト B-CLL 細胞はその脆弱性から、しばしば脱核し<smudge cell>と呼ばれる形態的特徴を有することが示されているが、マウスの B-CLL でも同様の特徴がみられた。白血病細胞の臓器浸潤はヒトの B-CLL と同様に、脾臓・リンパ節・肝臓・腎臓・唾液腺・肺 (図-3 B) など多臓器に及んでいた。

4. B 細胞のクローン性増殖のサザンブロット解析

H-2^z/H-2^z New Zealand マウス脾臓 B 細胞の加齢に伴うクローナリティーの変化を調べるために、J_Hプローブを用いて H-2^z/H-2^z NZB マウス脾臓細胞由来の DNA のサザンハイブリダイゼーション解析を行った。結果は図-4 に示すように、加齢に伴い免疫グロブリン DJ および VDJ の rearrangement のパターンは smear から oligoclonal そして monoclonal に変化することが明らかになった。

5. proto-oncogene *bcl-2* の発現

図-5 は NZW マウスから得た可移植性 B-CLL 細胞株と、若齢期 (2 カ月齢) および老齢期 (12 カ月齢) の NZW 脾臓 B 細胞における proto-oncogene *bcl-2* の発現を調べた結果である。図に示すように、2つの B-CLL 細胞株において *bcl-2* の高度の発現増加が認められた (lanes 1 and

図-3 A, Stained blood smear obtained from a 12-month-old NZW mice with B-CLL. B leukemic cells have round nuclei and a high nuclear-to-cytoplasmic ratio. Owing to excessive fragility, neoplastic lymphocytes were often damaged, giving rise to several "smudge" cells.

B, Histological picture of the lung obtained from a NZW mouse with B-CLL. Medium-sized leukemic cells were massively infiltrated in alveolar walls and subendothelial and perivascular spaces of a small vessel (HE).

図-5 Levels of *bcl-2* expression in transplantable B-CLL cells from aged $H-2^z/H-2^z$ homozygous NZW mice and spleen cells from young and old NZW mice. High levels of *bcl-2* expression was observed for two transplantable B-CLL cell lines (lanes 1 and 2). There was an age-associated increase in the *bcl-2* expression in spleen cells from NZW mice (lane 3; 2-month-old, lane 4; 12-month-old). No age-associated increase in the *bcl-2* expression was observed for C57BL/6 mice (lane 5; 2-month-old, lane 6; 12-month-old).

図-4 Southern hybridization analysis using a J_H probe on genomic DNA obtained from $H-2^z/H-2^z$ homozygous NZB mice at varying ages (4, 6, 10 and 16-month-old). Patterns of rearrangement of immunoglobulin DJ or VDJ gene segments changed from smear to oligoclonal and even to monoclonal bands with increasing age of the animals.

2). また、未だ白血病細胞の出現していない12カ月齢の NZW マウス脾臓細胞においても、2カ月齢マウスのそれと比較し *bcl-2* の発現増加が認められた (lanes 3 and 4). この12カ月齢 NZW の脾臓細胞は、サザンハイブリダイゼーションにおいて oligoclonal な CD5 B 細胞を含むもので、若齢期 NZW マウスへの移植は不可能であった。従って、この脾臓B細胞は B-CLL の前癌状態の細胞と考えられた。

考 案

今回われわれは、H-2^d/H-2^dホモ接合性 New Zealand マウスにおいて、CD5 B細胞が加齢に伴い oligoclonal から monoclonal へと変化すること、また、この時期に末梢血中に CD5 陽性の B-CLL 様 B細胞の増加することを発見した。このクローナルに増殖した細胞は可移植性であり、明らかに白血病細胞と考えられた。このことは、これらの細胞がヒト B-CLL におけると同様に、さまざまな臓器に浸潤していることから裏付けられた。B-CLL 病態を発症するマウス系で protooncogene *bcl-2* の発現について調べたところ、monoclonal な可移植性 B-CLL 細胞はもとより、未だ oligoclonal な前癌状態の B細胞においても高い発現が認められた。以上の事実より、H-2^d/H-2^dホモ接合性 New Zealand マウスは CD5 B細胞の腫瘍化過程を解析するための有用なモデルであると考えられた。

マウス CD5 B細胞は conventional B細胞とは分化段階において異なる lineage に属する B細胞と考えられており、生体内において conventional B細胞とは異なる分布パターンを示すことが知られている¹⁴⁾。細胞表面形質も CD5 陽性・CD45R (6B2)弱陽性・IgM 強陽性・IgD 弱陽性・Mac-1 陽性 (特に腹腔内 CD5 B細胞) というように conventional B細胞とは異なっているし、また自己増殖能を持つという点も大きな特徴である。最近のヒトおよびマウスでの研究から、CD5 B細胞は獲得免疫には関与せずに、自然免疫や自己免疫に関与する B細胞系と考えられている。実際に、CD5B細胞は主に IgM クラスの自然抗体や DNA・胸腺細胞・赤血球などに対する自己抗体を産生することが知られている³¹⁾。

New Zealand マウス系、特に NZB/W F1 マウスには全身性エリテマトーデス (SLE) が好発するが、われわれはこの SLE 病態形成に関わる抗 DNA 抗体が CD5 B細胞に由来する可能性を示してきた¹⁵⁾¹⁶⁾。抗 DNA 抗体のうち、IgG 抗 DN A 抗体の産生が SLE の発症と密接に相関する

が、この現象は厳密に H-2^d/H-2^d ヘテロ接合性に拘束されており、H-2^d/H-2^d や H-2^d/H-2^k のホモ接合体ではこれが産生されない。今回、H-2^d/H-2^d ホモ接合体マウスでは SLE の代わりに B-CLL が好発することを示したが、このことは CD5 B細胞の異常な分化を伴う SLE と異常な増殖の結果発生する B-CLL とが、ともに MHC に強く影響を受けていることを示すと同時に、自己抗体産生細胞への分化に必要な遺伝的素因 (H-2^d/H-2^d) を欠く個体では、自己反応性 CD5 B細胞は増殖のシグナルのみを受け白血病化する可能性が考えられる。

われわれは、H-2^d/H-2^d New Zealand マウスから得た B-CLL の cell line において、*bcl-2* の発現増加を認めた。*proto-oncogene bcl-2* は、ヒトろ胞性リンパ腫に認められる t (14, 18) 染色体転座によって、活性化される遺伝子としてクローニングされた³²⁾。詳細な機能は明らかにされていないが、*bcl-2* は programmed cell death (apoptosis) の抑制に関与すると考えられており、*bcl-2* を人工的に異常発現させた B細胞の寿命の延長が観察されている³³⁾。しかし、*bcl-2* には細胞増殖作用はなく、細胞の apoptosis に関与する細胞内情報伝達のある過程をブロックして細胞に延命効果を促すと考えられている。従って、*bcl-2* は B細胞に延命効果を促し、その間に他の癌遺伝子の活性化を含めた遺伝的変化の起こるチャンスを増すという形で、白血病化に関与する可能性が考えられる。この仮説はわれわれが示したように、B-CLL の前癌状態にある CD5 B細胞において *bcl-2* の発現増加が認められるという結果とも一致する。このような apoptosis に抵抗性で長期生存性の CD5 B細胞には、白血病化に必要な多段階の遺伝子変化が起こりやすいことは容易に想像される。現在、New Zealand マウスにおける B-CLL 発症過程における他の癌遺伝子・癌抑制遺伝子の異常について研究を進めている。

ヒト B-CLL の約10%において、染色体転座により *bcl-2* 遺伝子座が免疫グロブリン遺伝子座に隣接して存在すること、またこれにより、*bcl-2* 遺

伝子の正常な遺伝子発現制御機構に異常の起っていることが報告されている³⁴⁾。われわれは数種の制限酵素を用い、B-CLL 由来 *bcl-2* ゲノムのサザンハイブリダイゼーション法による解析を行ったが、いまのところ *bcl-2* 領域の染色体転座を示唆する結果は得られていない（未発表結果）。現在まで、種々のマウス系由来の B-CLL cell lines において、*bcl-2* 領域の染色体転座の有無が調べられているが、その存在を示した報告はない。従って、マウスの B-CLL における *bcl-2* 遺伝子の発現増加は、染色体転座に伴うものではなく、その発現制御に関与する cis-element の体細胞性突然変異など、他の遺伝子変化による可能性が考えられる。

H-2^d/H-2^bホモ接合性が、どのような機構で B-CLL 発症に関与していくかについては未だ明らかでない。その効果が劣性、あるいは抑制優性の様式であることを考えると³⁵⁾、MHC 遺伝子複合体のごく近傍に存在する未知の癌抑制遺伝子が H-2^dハプロタイプにおいては欠失、ないしは異常である可能性がある。このような素因に加え、先にも述べたように CD5 B 細胞の自己抗体産生細胞への分化に必要な遺伝的素因（H-2^d/H-2^bヘテロ接合性）を欠くこれらのマウスでは、CD5 B 細胞に対し増殖刺激のみが持続している可能性も考えられる。他の遺伝的素因の関与をも含め、B-CLL の発症機構についてさらに研究を進める必要がある。

このように、われわれが今回提示した B-CLL のモデルマウス系は、CD5 B 細胞の腫瘍化に関与する遺伝的素因や、その過程における多段階の遺伝子変化の解析のみでなく、B-CLL と自己免疫疾患の発症過程に介在する共通の要因の解明のためにも有用であると考えられる。

結 論

1. 主要組織適合遺伝子複合体（MHC マウスでは H-2）のハプロタイプを変えた H-2-congenic New Zealand マウスで、脾臓や末梢血における

CD5 B 細胞の比率について検討したところ、H-2^d/H-2^bホモ接合体マウス系で、その比率がいちじるしく高いことを見出した。しかも、flow cytometry 解析と J_Hプローブを用いたサザンハイブリダイゼーション解析で、これら CD5 B 細胞は加齢にともない oligoclonal から monoclonal な増殖へと変化し、B 細胞性慢性リンパ性白血病（B-CLL）となることが明らかになった。以上の結果から、この B-CLL の発生は、NZW 系マウス由来の主要組織適合遺伝子複合体ハプロタイプ（H-2^d）の近傍に存在する遺伝子座によって、支配されている可能性が強く示唆された。遺伝子効果が劣性であることから、未知の癌抑制遺伝子の関与が示唆された。

2. これらのマウスの B-CLL CD5 陽性、CD45 R（6B2）・CD11b（Mac1）軽度陽性であり、いわゆる CD5 B 細胞 lineage に属すると考えられた。末梢血液像では、腫瘍細胞はヒト B-CLL と酷似し、中等大の核細胞質比の高い細胞であり、多くの脱核細胞を認めた。また、腫瘍細胞は脾臓・リンパ節・肝臓・腎臓・唾液腺・肺など多臓器に及ぶ組織浸潤を示していた。

3. これらのマウスの脾臓細胞と B-CLL における proto-oncogene *bcl-2* の発現を検討したところ、B-CLL において *bcl-2* の高度の発現増加を認めた。また、老齢期の前癌状態にある CD5 B 細胞を含んだ脾臓においても、*bcl-2* の発現増加が認められた。以上の結果から、B-CLL の腫瘍化に *bcl-2* の発現増加が関与する可能性が示唆された。

4. 以上の結果から、H-2^d/H-2^bホモ接合性 New Zealand マウス系は B-CLL の発生に関与する遺伝的素因や、その発生過程における多段階の遺伝子変化を解析するための有力なモデルであると考えられた。

文 献

- 1) Linet, M. S., Van Natta, M. L. and Szklo, M. : Familial cancer history and chronic lymphocytic leukemia. Am. J. Epidemiol.,

- 130 : 655~664, 1989
- 2) Conley, C.L., Misiti, J. and Laster, A.J. : Genetic factors predisposing to chronic lymphocytic leukemia and to autoimmune disease. *Medicine*, **59** : 323~334, 1980
- 3) Zulman, J., Jaffe, R. and Talal, N. : Evidence that malignant lymphoma of Sjogren's syndrome is a monoclonal B-cell neoplasm. *N. Engl. J. Med.*, **229** : 1215~1220, 1978
- 4) Green, J.A., Dawson, A.A. and Walker, W. : Systemic lupus erythematosus and lymphoma. *Lancet*, **ii** : 753~755, 1978
- 5) Wyburn-Mason, R. : SLE and lymphoma. *Lancet*, **i** : 156~157, 1979
- 6) Pirofsky, B. : Clinical aspects of autoimmune hemolytic anemia. *Semin. Hematol.*, **13** : 251~256, 1976
- 7) Boumsell, L., Coppin, H., Pham, D., Raynal, B., Lemerle, J., Dausett, J. and Bernard, A. : An antigen shared by a human T cell subset and B cell chronic lymphocytic leukemic cells. *J. Exp. Med.*, **152** : 229~234, 1980
- 8) Royston, I., Majda, J., Baird, S.M., Meserve, B.L. and Giffiths, J.C. : Human T cell antigens defined by monoclonal antibodies : The 65,000-dalton antigen of T cell (T65) is also found on chronic lymphocytic leukemia cells bearing surface immunoglobulin. *J. Immunol.*, **125** : 725~731, 1980
- 9) Kocks, C. and Rajewsky, K. : Stable expression and somatic hypermutation of antibody V regions in B-cell developmental pathways. *Ann. Rev. Immunol.*, **7** : 537~559, 1989
- 10) Casali, P. and Notkins, A.L. : Probing the human B-cell repertoire with EBV : Polyreactive antibodies and CD5⁺ B lymphocytes. *Ann. Rev. Immunol.*, **7** : 513~535, 1989
- 11) Casali, P. and Notkis, A.L. : CD5⁺ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire. *Immunol. Today*, **10** : 364~368, 1989
- 12) Hayakawa, K., Hardy, R.R. and Herzenberg, L.A. : Peritoneal Ly-1 B cells: genetic control, autoantibody production, increased lambda light chain expression. *Eur. J. Immunol.*, **16** : 450~456, 1986
- 13) Betata, A. and Shen, B. The importance of surface immunoglobulin, mouse rosettes, and CD 5 in the immunophenotyping of chronic lymphocytic leukemia and reactive lymphocytosis. *Cancer*, **68** : 355~361, 1990
- 14) Herzenberg, L.A., Stall, A.M., Lalor, P.A., Sidman, C., Moore, W.A., Parks, D.R. and Herzenberg, L.A. : The Ly-1 B cell lineage. *Immunol. Rev.*, **93** : 81~102, 1986
- 15) Shirai, T., Hirose, S., Okada, T. and Nishimura, H. : CD5⁺ B cells in autoimmune disease and lymphoid malignancy. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **59** : 173~186, 1991
- 16) Shirai, T., Okada, T., Nishimura, H. and Hirose, S. : Genetic regulation of CD5⁺ B cell in autoimmune disease and in chronic lymphocytic leukemia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **651** : 509~526, 1992
- 17) Okada, T., Takiura, F., Tokushige, K., Nozawa, S., Nakauchi, H., Hirose, S. and Shirai, T. : Major histocompatibility complex controls clonal proliferation of CD5⁺ B cell in H-2 congenic New Zealand mice : a model for B cell chronic lymphocytic leukemia and autoimmune diseases. *Eur. J. Immunol.*, **21** : 2743~2748, 1991
- 18) Rechavi, G., Katzir, N., Brok-Simoni, F., Holtzman, F., Mandel, M., Gurfinkel, N., Givol, D., Ben-Bassat, I. and Ramot, B. : A search for *bcl-1*, *bcl-2* and *c-myc* oncogene rearrangements in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, **3** : 57~60, 1989
- 19) Raghoebier, S., van Krieken J.H.J.M., Kluin-Nelemans, J.C., Gillis, A., van Ommen, G. J.B., Ginsberg, A.M., Raffeld, M. and Kluin, M. : Oncogene rearrangements in chronic B-cell leukemia. *Blood*, **77** : 1560~1564, 1991
- 20) Abts, H., Jucker, M., Diehl, V. and Tesch, H. : Human chronic lymphocytic leukemia cells regularly express mRNAs of the protoonco-

- genes *lck* and *c-fgr*. Leuk. Res., **15** : 987~997, 1991
- 21) Hirose, S., Kinoshita, K., Nozawa, S., Nishimura, H. and Shirai, T. : Effects of major histocompatibility complex on autoimmune disease of H-2-congenic New Zealand mice. Int. Immunol., **2** : 1091~1095, 1990
 - 22) Kincade, P.W., Lee, G., Sun, L. and Watanabe, T. : Monoclonal rat antibodies to murine IgM determinants. J. Immunol. Methods, **42** : 17~26, 1981
 - 23) Ledbetter, J.A. and Herzenberg, L.A. : Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens. Immunol. Rev., **47** : 63~90, 1979
 - 24) Coffman, R.L. : Surface antigen expression and immunoglobulin gene rearrangement during mouse pre-B cell development. Immunol. Rev., **69** : 5~23, 1982
 - 25) Ishida, Y., Ueda, G., Noguchi, K., Nagasawa, R., Hirose, S., Sato, H. and Shirai, T. : Unique cell surface phenotypes of proliferating lymphocytes in mice homozygous for *lpr* and *gld* mutations, defined by monoclonal antibodies to MRL/Mp-*lpr*/*lpr* T cells. Cell Immunol., **105** : 136~146, 1987
 - 26) Springer, T., Galfre, G., Secher, D.S. and Milstein, C. : Mac-1 A macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody. Eur. J. Immunol., **9** : 301~306, 1979
 - 27) Favaloro, J., Treisman, R. and Kamen, R. : Transcription maps of polyoma virus-specific RNA : Analysis by two-dimensional nuclease S1 gel mapping. Methods Enzymol., **65** : 718~749, 1980
 - 28) Maniatis, T., Fritsch, E. and Sambrook, J. : In "Molecular Cloning : A Laboratory manual", vol. **1** : p73, 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New, York,
 - 29) Negrini, M., Silini, E., Kozak, C., Tsujimoto, Y. and Croce, C.M. : Molecular analysis of *mbcl-2* : Structure and expression of the murine gene homologous to the human gene involved in follicular lymphoma. Cell, **49** : 455~463, 1987
 - 30) Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullic, K. B. and Erlich, H.A. : Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. Science, **239** : 487~491, 1988
 - 31) Shirai, T., Hirose, S., Okada, T. and Nishimura, H. : Immunology and immunopathology of the autoimmune disease of NZB and related mouse strains. In "Immunological Disorders in Mice," ed. B. Rihova and V. Vetvicka, pp. 95~136, 1991. CRC Press, Florida.
 - 32) Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E. and Croce, C.M. : Involvement of the *bcl-2* gene in human follicular lymphoma. Science, **228** : 1440~1443, 1985
 - 33) Tsujimoto, Y. : Overexpression of the human *bcl-2* gene product results in growth enhancement of Epstein-Barr virus-immortalized B cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **86** : 1958~1962, 1989
 - 34) Adachi, M., Tefferi, A., Greipp, P.R., Kips, T.J. and Tsujimoto, Y. : Preferential linkage of *bcl-2* to immunoglobulin light chain gene in chronic lymphocytic leukemia. J. Exp. Med., **171** : 559~564, 1990
 - 35) Stanbridge, E.J. : Human tumor suppressor genes. Annu. Rev. Genet., **24** : 615~657, 1990

Original paper

Summary**H-2^Z Homozygous New Zealand mice as a model for B-cell chronic lymphocytic leukemia : elevated *bcl-2* expression in CD5 B-cells at premalignant and at malignant stages.**

In New Zealand mice, the major histocompatibility complex (MHC) controls the development of both autoimmune disease and B cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). While H-2^d/H-2^z heterozygosity acts as one major predisposing genetic element for autoimmune disease, H-2^z/H-2^z homozygosity acts as an element for B-CLL. In the H-2^z/H-2^z homozygotes, there was an age-dependent increase in the percentage of CD5 B cells in the blood and spleen, and such CD5 B cells were oligoclonal to monoclonal expansion, giving rise to B-CLL. B-CLL cell from these mice had surface phenotypes typical of the CD5 B lineage cells, and expressed high levels of proto-oncogene *bcl-2*. Expression was also observed in the premalignant B cells in the aged mice, thereby suggesting that apoptosis-resistant, long surviving CD5 B cells with a self-renewal capacity form the basis of malignant transformation. This model is useful for analyzing multiple steps of genetic alterations involved in the generation of B-CLL, and for clarifying the relationship between B-CLL and autoimmune disease.

Key words : B cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL), MHC (H-2) haplotype, New Zealand mice, CD5 B cells, *bcl-2* gene

HIROSHI OKAMOTO, M.D.¹⁾²⁾ AYAKO SHINOZAKI, Ph.D.¹⁾
HIROYUKI NISHIMURA, Ph.D.¹⁾ HIROMITI TSURUI, M.D.¹⁾
SACHIKO HIROSE, M.D.¹⁾ TOSHIKAZU SHIRAI, M.D.¹⁾

1) *Department of Pathology (II), Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan*

2) *Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan*