

CLONING OF PHENOTYPICALLY DIFFERENT HPRT MUTANT  
HUMAN LYMPHOCYTES ORIGINATING FROM A SINGLE STEM CELL

1個の幹細胞に由来する異なった表現型を有する  
HPRT 突然変異ヒトリンパ球のクローニング

MASAYUKI HAKODA, M.D. 箱田雅之  
YUKO HIRAI, Ph.D. 平井裕子  
HACHIRO SHIMBA, M.S. 榛葉八郎  
YOICHIRO KUSUNOKI, Ph.D. 楠 洋一郎  
SEISHI KYOIZUMI, Ph.D. 京泉誠之  
YOSHIAKI KODAMA, M.D. 児玉喜明  
MITOSHI AKIYAMA, M.D. 秋山實利



RADIATION EFFECTS RESEARCH FOUNDATION  
財団法人 放射線影響研究所

A cooperative Japan - United States Research Organization  
日米共同研究機関

## ACKNOWLEDGMENT

### 謝 辞

We thank Kyoko Ozaki, Yoshiko Watanabe, and Hisae Okamitsu for their technical assistance and Michiko Takagi for manuscript preparation.

技術的支援をいただいた尾崎恭子、渡辺芳子及び岡光久恵の各氏、並びに原稿作成に御協力いただいた高木迪子氏に対して謝意を表する。

## RERF TECHNICAL REPORT SERIES

### 放影研業績報告書集

The RERF Technical Reports provide the official bilingual statements required to meet the needs of Japanese and American staff members, consultants, and advisory groups. The Technical Report Series is not intended to supplant regular journal publication.

放影研業績報告書は、日米専門職員、顧問、諮問機関の要求に応えるための日英両語による公式報告記録である。業績報告書は通例の誌上発表論文に代わるものではない。

---

*The Radiation Effects Research Foundation (formerly ABCC) was established in April 1975 as a private nonprofit Japanese Foundation, supported equally by the Government of Japan through the Ministry of Health and Welfare, and the Government of the United States through the National Academy of Sciences under contract with the Department of Energy.*

放射線影響研究所(元ABCC)は、昭和50年4月1日に公益法人として発足したもので、その経費は日米両政府の平等分担により、日本は厚生省の補助金、米国はエネルギー省との契約に基づく米国学士院の補助金とをもって運営されている。

## CLONING OF PHENOTYPICALLY DIFFERENT HPRT MUTANT HUMAN LYMPHOCYTES ORIGINATING FROM A SINGLE STEM CELL

1 個の幹細胞に由来する異なった表現型を有する  
HPRT 突然変異ヒトリンパ球のクローニング

MASAYUKI HAKODA, M.D. (箱田雅之)<sup>1</sup>; YUKO HIRAI, Ph.D. (平井裕子)<sup>1</sup>;  
 HACHIRO SHIMBA, M.S. (榛葉八郎)<sup>2</sup>; YOICHIRO KUSUNOKI, Ph.D. (楠洋一郎)<sup>1</sup>;  
 SEISHI KYOIZUMI, Ph.D. (京泉誠之)<sup>1</sup>; YOSHIAKI KODAMA, M.D. (児玉喜明)<sup>2</sup>;  
 MITOSHI AKIYAMA, M.D. (秋山實利)<sup>1</sup>

*Departments of Radiobiology<sup>1</sup> and Genetics<sup>2</sup>*

放射線生物学部<sup>1</sup> 及び遺伝学部<sup>2</sup>

### SUMMARY

Thioguanine-resistant T, NK, and B cells have been cloned from the peripheral blood of an atomic bomb survivor in Hiroshima. The cloned lymphocytes possessed the same chromosome aberration and the same alteration of DNA at the hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) locus, but exhibited different surface phenotypes and different rearrangements of T cell receptor or immunoglobulin genes. These results indicate that the cloned lymphocytes originated from a single undifferentiated stem cell. The chromosome aberration in the cloned lymphocytes suggested that the original stem cell started differentiation after the A-bomb exposure (the person studied was exposed to the A-bomb at age 17). The present study has provided a novel method to investigate the differentiation of human lymphocytes using the HPRT gene alterations and chromosome aberrations as cellular markers.

### INTRODUCTION

The analysis of lymphocytes derived from a single stem cell at various stages of development of the immune system would provide a fascinating model for studying the differentiation of these cells. In mice, this is possible by the transplantation of cells containing stem cell population which carry some specific markers such as chromosome aberrations, alloantigens, and exogenous genes.<sup>1-3</sup> Using these methods, the existence of stem cells committed

### 要約

チオグアニン耐性の T, NK 及び B リンパ球を 1 人の広島市の被爆者よりクローニングした。クローニングしたリンパ球は同一の染色体異常と同一の hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) 遺伝子座 DNA の変化を有していたが、異なった表面抗原の型と異なった T 細胞抗原レセプター、あるいは免疫グロブリン遺伝子の再構成を示していた。これらの結果は、クローニングされたリンパ球が 1 個の未分化な幹細胞より由来していることを示している。クローニングされたリンパ球に見られた染色体異常により、これらのリンパ球が由来した幹細胞は被爆後に分化を開始したと考えられた(解析の対象となった被爆者の被爆時年齢は 17 歳であった)。本研究では、HPRT 遺伝子の変化と染色体異常を細胞マーカーとして用いてヒトリンパ球の分化を解析する新しい方法を示した。

### 緒言

免疫系の様々な発達段階における 1 個の幹細胞に由来するリンパ球を解析することにより、リンパ球の分化を研究するための優れたモデルが得られる。マウスにおいては、このような解析は染色体異常、アロ抗原及び外来遺伝子などの特定のマーカーを有する幹細胞集団を含む細胞の移植により可能である。<sup>1-3</sup> これらの方法により、T 細胞系への分化に関与する

to differentiate into T cell lineage has been suggested. Interleukin 3-dependent, bone marrow-derived mouse cell lines which can differentiate into either T cells or B cells also have been reported.<sup>4,5</sup> In humans, myeloproliferative disorders such as chronic myelogenous leukemia, polycythemia vera, and primary thrombocytosis have been found to be unicellular in origin and diseases of the pluripotent hematopoietic stem cells.<sup>6-8</sup> However, useful models or cell lines for the study of human lymphocyte differentiation have not been established.

If we could find *in vivo*-derived cellular markers in humans, we would not have to use procedures such as bone marrow transplantation which is widely used for the study of lymphocyte differentiation in mice. It has become possible to clone selectively rare (in the order of  $10^{-5}$  to  $10^{-6}$ ) T cells lacking the enzyme activity of HPRT, a member of the purine salvage pathway, from the human peripheral blood.<sup>9,10</sup> HPRT-deficient cells can be selectively grown taking advantage of their ability to grow in the presence of the purine analogue, 6-thioguanine (TG). These TG-resistant (TG<sup>r</sup>) T cells have been shown to result from gene mutation at the HPRT locus.<sup>11,12</sup> Thus, it should be possible to collect T cells originating from a single stem cell in which a HPRT mutation has occurred. Lymphocytes are known to express several cell surface markers depending on their functions as they mature<sup>13,14</sup> and to rearrange the genes of antigen receptors to produce diversity.<sup>15,16</sup> Thus, it is possible to demonstrate the mutation at the stem cell level using HPRT gene alteration as a marker for single cell origin and cell surface markers and receptor gene rearrangements as differentiation markers.

We have been studying somatic cell mutations by the cloning of TG<sup>r</sup> T cells in A-bomb survivors in Hiroshima.<sup>17,18</sup> In this population, there should have been a decrease in the number of stem cells for hematopoiesis due to whole-body irradiation by the A-bomb. Therefore, the residual or induced TG<sup>r</sup> mutant stem cells should have expanded in the body of the survivors during the process of the hematopoietic recovery. We describe here the cloning of T, natural killer (NK), and B cells originating from a single stem cell by the identification of such a stem cell mutation in one A-bomb survivor who showed an exceptionally high mutant T cell frequency.

幹細胞の存在が示唆された。T細胞とB細胞のいずれにも分化し得るインターロイキン3依存性骨髄由来マウス細胞株についての報告もある。<sup>4,5</sup> ヒトの慢性骨髄性白血病、真正赤血球増加症及び原発性血小板増加症などの骨髄増殖性疾患は単細胞由来であり、多能性造血幹細胞の疾患であることがわかっている。<sup>6-8</sup> しかし、ヒトリンパ球分化の研究のために有益なモデル又は細胞株はまだ確立されていない。

ヒトの生体内由来細胞マーカーを発見できれば、マウスのリンパ球分化の研究に広く用いられている骨髄移植などの方法を用いる必要はなくなる。プリンサルベージ経路の一つであるHPRTの酵素活性を欠損したまれな( $10^{-5}$  ~  $10^{-6}$ の頻度)T細胞をヒト末梢血液から選択的にクローニングすることが可能になった。<sup>9,10</sup> HPRT欠損細胞は、プリン構造類似体の6-チオグアニン(TG)の存在下でも増殖可能という性質を利用して選択的に増殖させることができる。このTG耐性(TG<sup>r</sup>)T細胞はHPRT遺伝子座における遺伝子突然変異の結果生じたものであることが示された。<sup>11,12</sup> したがって、HPRT突然変異が生じた1個の幹細胞に由来するT細胞を採取できるはずである。リンパ球は成熟するに従って、それぞれの機能により幾つかの細胞表面マーカーを発現し、<sup>13,14</sup> 抗原レセプター遺伝子を再構成して様々な遺伝子を生産することが知られている。<sup>15,16</sup> したがって、HPRT遺伝子の変化を単一細胞由来のマーカーとして、また、細胞表面マーカー及びレセプター遺伝子再構成を分化マーカーとして用いることにより、幹細胞レベルでの突然変異を証明することができる。

我々は、広島原爆被爆者におけるTG<sup>r</sup>T細胞をクローニングすることにより、体細胞突然変異の研究を行ってきた。<sup>17,18</sup> この集団においては、原爆による全身被曝のために造血幹細胞数が減少したはずである。したがって、造血能の回復過程において、被爆者の体内では残留又は誘発TG<sup>r</sup>突然変異幹細胞が増大したと考えられる。例外的に高い突然変異T細胞頻度を示した1人の原爆被爆者にこのような幹細胞突然変異を確認し、1個の幹細胞に由来するT、ナチュラルキラー(NK)及びB細胞のクローニングを行ったので、本報ではその結果について述べる。

## MATERIALS AND METHODS

### Preparation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

PBMC were obtained from a male A-bomb survivor in Hiroshima, whose DS86 radiation dose (shielded kerma)<sup>19</sup> from the bomb was 1.99 Gy. He was 59 years old at the time of examination (age at the time of exposure to the bomb was 17) and had no apparent physical disorders.

Venous peripheral blood was defibrinated with glass beads and PBMC were recovered by Ficoll-Hypaque density centrifugation. PBMC were washed twice with Earle's balanced salt solution (EBSS, Nissui, Japan) before use.

### Cloning of interleukin 2 (IL 2)-dependent normal and TG<sup>r</sup> T cells

Full details of our cloning method have been described previously.<sup>17</sup> The basic methodology was originally reported by Albertini et al.<sup>9</sup> Briefly, fresh PMBC, mixed with phytohemagglutinin (PHA, Difco), IL 2, and feeder cells were inoculated into the wells of microtiter plates. On the average, 1 or  $5 \times 10^3$  cells per well were inoculated into the wells without or with TG, respectively. After 15 days of culture, each well was observed using an inverted microscope and growing colonies were isolated and subcultured for further analysis.

Cloning efficiencies (CE) were calculated from the proportion of colony-negative wells, assuming a Poisson distribution of the cells with the ability to form colonies. Frequency of TG<sup>r</sup> mutant lymphocytes was obtained by dividing the CE of TG-selected lymphocytes by the CE of normal cells.

### Cloning of normal and TG<sup>r</sup> B cells

For the isolation of normal and TG<sup>r</sup> mutant B cell colonies, PBMC were infected with EB virus by incubating cells at 37°C with a culture supernatant of the B 95-8 marmoset cell line. After two hours of incubation, the culture supernatant was replaced with fresh RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 1% L-glutamine. An average of  $10^3$  or  $10^5$  infected cells were inoculated into the wells of microtiter plates (Costar) without or with TG, respectively. After 2-4 weeks of culture, changing half of the medium of each well once a week, colonies were isolated and subcultured.

## 材料及び方法

### 末梢血単核細胞 (PBMC) の作成

原爆による DS86 放射線量 (遮蔽カーマ)<sup>19</sup> が 1.99 Gy の広島在住の男性被爆者から PBMC を入手した。この男性は検査時に 59 歳 (被爆時年齢は 17 歳) であり、臨床上明らかな疾病は認められなかった。

静脈末梢血をガラスビーズで脱フィブリン化した後、Ficoll-Hypaque 比重遠心法により PBMC を分画した。PBMC は Earle's balanced salt solution (EBSS, 日水, 日本) で 2 回洗浄した後に用いた。

### インターロイキン 2 (IL 2) 依存性正常及び TG<sup>r</sup> T 細胞のクローニング

我々が用いたクローニング法に関する詳細は前報で述べた。<sup>17</sup> 基本的な方法は、Albertini ら<sup>9</sup> によって最初に報告されたものである。簡単に述べると次のとおりである。まず、phytohemagglutinin (PHA, Difco), IL 2 及びフィーダー細胞とともに新鮮 PMBC をマイクロタイター・プレートに播種した。TG を含まない well と含む well のそれぞれに、平均 1 個又は  $5 \times 10^3$  個/well の細胞を播種した。15 日間培養を行った後に各 well を倒立顕微鏡で観察し、増殖したコロニーは、更に解析を行うため継代培養した。

コロニー形成能を有する細胞は Poisson 分布を示すと仮定して、コロニー無形成 well の割合からクローニング効率 (CE) を算出した。TG 選択リンパ球の CE を正常細胞の CE で割って TG<sup>r</sup> 突然変異リンパ球の頻度を算出した。

### 正常及び TG<sup>r</sup> B 細胞のクローニング

正常及び TG<sup>r</sup> 突然変異 B 細胞コロニーを分離するために、PBMC を B95-8 マーモセット細胞株の培養上清と 37°C でインキュベートし、EB ウイルスに感染させた。2 時間のインキュベーションの後、培養上清を 10% の牛胎児血清 (FCS) 及び 1% の L-グルタミンを添加した新鮮 RPMI 1640 培地と取り換えた。マイクロタイター・プレート (Costar) の TG を含まない well と含む well のそれぞれに、平均して  $10^3$  又は  $10^5$  個の感染細胞を播種した。各 well の培地の半分を 1 週間に 1 回交換し、2 ~ 4 週間培養を行った後、コロニーを分離し、継代培養を行った。

CE and the frequency of TG<sup>r</sup> B cells were calculated in the same way in which those of IL 2-dependent lymphocytes were calculated.

### Chromosome analysis of the lymphocyte colonies

Lymphocyte colonies were examined for karyotype analysis from three weeks to two months after the initiation of culture. Standard cytogenetic procedures were used for preparing G-banded chromosomes.<sup>20</sup> From 1 to 10 metaphases per colony were examined.

### Extraction of genomic DNA

For the isolation of DNA, lymphocyte colonies were expanded to more than  $3 \times 10^6$  and were frozen in liquid nitrogen. Frozen cells were thawed, suspended in 0.3 ml of phosphate-buffered saline (PBS), then 1-5 ml of digestion buffer (20 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% SDS) containing 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNase A (Sigma) was added. After one hour of incubation at 37°C, 1-5 ml of digestion buffer containing 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of proteinase K (Boehringer Mannheim) was added and the mixture incubated at 37°C for four hours. The solution was phenol/chloroform (2:1) extracted, then dialyzed against T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) and stored at 4°C.

### Southern blot hybridization

For the southern blots, 5  $\mu\text{g}$  of DNA was digested to completion with restriction enzymes, fractionated on a 0.7% agarose gel in Boyer's buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM Na-Acetate, 2 mM EDTA, 10 mM NaCl) and transferred to nitrocellulose filters (Schleicher & Schuell) using 20× SSC. Prehybridization was for three hours at 65°C in 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM EDTA, 1 M NaCl, 10× Denhart's solution, 0.1% SDS. Hybridization was carried out for 12-16 hours at 65°C in 2 ml of the same solution used in prehybridization, containing 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  denatured salmon sperm DNA. The probes were labeled with [<sup>32</sup>P] d CTP (Amersham) to a specific activity of  $2-7 \times 10^7$  cpm/ $\mu\text{g}$  using a random primer method (Amersham kit) and 15-30 ng of probes was added to one filter. Washing of hybridized filters was performed at 65°C in 0.5× SSC, 0.1% SDS in the case of HPRT, and in 0.1× SSC, 0.1% SDS in the case of the other probes. Autoradiography was done at -80°C with Dupont intensifying screens.

TG<sup>r</sup> B細胞の CE 及び頻度を IL 2 依存リンパ球の CE 及び頻度を計算したのと同じ方法で算出した。

### リンパ球コロニーの染色体分析

培養開始後3週間から2か月経過した時点で、リンパ球コロニーの核型分析を行った。標準的な細胞遺伝技法を用いてGバンド染色体を作成した。<sup>20</sup> 1コロニー当たり1~10個の中期分裂像を調べた。

### ゲノム DNA の抽出

DNA を分離するために、リンパ球コロニーを  $3 \times 10^6$  個以上にまで増やし、液体窒素中で凍結させた。この凍結細胞を解凍し、0.3 ml のリン酸緩衝液中で浮遊させ、次に、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の RNase A (Sigma) を含む 1-5 ml の digestion buffer (20 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5 % SDS) を加えた。37°C で 1 時間インキュベートした後、400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の proteinase K (Boehringer Mannheim) を含む 1-5 ml の digestion buffer を加え、この混合液を 37°C で 4 時間インキュベートした。この溶液をフェノール/クロロフォルム (2:1) で抽出し、T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) で透析し、4°C で保存した。

### Southern プロットハイブリダイゼーション

Southern プロットイングのために、5  $\mu\text{g}$  の DNA を制限酵素で完全に消化させ、Boyer 緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM Na-Acetate, 2 mM EDTA, 10 mM NaCl) を用いて 0.7% アガロースゲル上で分離した後、20×SSC でニトロセルロースフィルター (Schleicher & Schuell) 上に移行させた。50 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM EDTA, 1 M NaCl, 10×Denhart 液及び 0.1% SDS を用いて、65°C で 3 時間 prehybridization を行った。Prehybridization で用いたのと同じ溶液 2 ml に 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の変性サケ精子 DNA を加え、65°C で 12~16 時間ハイブリダイゼーションを行った。プローブは random primer 法 (Amersham 社製キット) により  $2-7 \times 10^7$  cpm/ $\mu\text{g}$  の比活性になるまで [<sup>32</sup>P] d CTP (Amersham) で標識し、一つのフィルターに 15~30 ng のプローブを添加した。ハイブリダイゼーション後のフィルターを、HPRT の場合は 0.5×SSC, 0.1% SDS で、他のプローブの場合は 0.1×SSC, 0.1% SDS で、それぞれ 65°C で洗浄した。Dupont 増感板を用いて -80°C でオートラジオグラフィーを行った。

## Probes

Alterations of the HPRT gene were detected with a 941-base pair (bp) full-length cDNA of the gene,<sup>21</sup> (cleaved with Pst I from pHPT30) kindly provided by Dr. C.T. Caskey, Howard Hughes Medical Institute, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA. Gene rearrangements of T cell receptor (TcR)  $\beta$  and  $\gamma$  chains were studied with a 770 bp cDNA constant region probe of the gene,<sup>22</sup> kindly provided by Dr. T.W. Mak, Ontario Cancer Institute, Toronto, Ontario, Canada and a 700 bp genomic probe of J $\gamma$ , by the courtesy of Dr. T.H. Rabbitts, Medical Research Council, England, UK, respectively. Immunoglobulin heavy chain gene rearrangements were analyzed with a 4.5 kb Eco RI-Hind III fragment of a germ-line C $\mu$  gene clone,<sup>23</sup> a generous gift from Dr. T. Honjo, Kyoto University, Kyoto, Japan.

## Analysis of surface phenotypes

Surface phenotypes of the cloned lymphocytes were analyzed using a FACS Analyzer (Becton-Dickinson). Monoclonal antibodies used were Leu 4 (anti-CD3), Leu 3 (anti-CD4), Leu 2 (anti-CD8), Leu 5 (anti-CD2), Leu 11 (anti-CD16), Leu 7, anti-Kappa, anti-Lambda, all obtained from Becton-Dickinson, and NKH-1 from Coulter.

## Cytotoxicity assay

Cytotoxic activity of the IL 2-dependent colonies against K562 cells was measured using the <sup>51</sup>Cr releasing method. Target cells were labeled with 100  $\mu$ l <sup>51</sup>Cr (New England Nuclear) for one hour at 37°C and were washed extensively before use. Target cells,  $1 \times 10^3$  in 100  $\mu$ l and effector cells in 100  $\mu$ l were plated in microtiter plates with U-bottom wells (Costar). The effector to target cell ratio ranged from 5:1 to 20:1. After three hours of incubation at 37°C, the plates were centrifuged and the supernatant was assayed for the release of <sup>51</sup>Cr from the target cells. Two or three replicates per experimental group were employed, and the percentage of specific lysis was calculated by the formula:

$$\text{Percent specific lysis} = \frac{\text{cpm in experimental wells} - \text{cpm in wells with target cells alone}}{\text{cpm incorporated in target cells}}$$

細胞溶解率 =  $\frac{\text{実験 well における cpm} - \text{標的細胞のみの well における cpm}}{\text{標的細胞に取り込まれた cpm}}$

## プローブ

HPRT 遺伝子の変化は、米国 Texas 州 Houston 市 Baylor 医科大学 Howard Hughes 医学研究所の Dr. C.T. Caskey の御好意により供与された 941 塩基対 (bp) の full length cDNA<sup>21</sup> (pHPT30 から Pst I により分割) を用いて検出した。T 細胞レセプター (TcR)  $\beta$  及び  $\gamma$  鎖の遺伝子再構成は各々カナダ、Ontario 州 Toronto 市 Ontario 癌研究所の Dr. T.W. Mak よりいただいた 770 bp 定常部 cDNA プローブ<sup>22</sup> 並びに英国の医学研究協議会の Dr. T.H. Rabbitts より供与された J $\gamma$  の 700 bp ゲノムプローブを用いて調べた。また、京都大学の本庶佑博士の御好意によりいただいた germ-line C $\mu$  遺伝子クローン<sup>23</sup> の 4.5 kb Eco RI-Hind III 断片を用いて、免疫グロブリン H 鎖の遺伝子再構成について分析した。

## 細胞膜表面表現形質の分析

リンパ球クローンの細胞膜表面表現形質を FACS 分析機 (Becton-Dickinson) を用いて分析した。使用したモノクローナル抗体は、Becton-Dickinson から入手した Leu 4 (抗 CD3), Leu 3 (抗 CD4), Leu 2 (抗 CD8), Leu 5 (抗 CD2), Leu 11 (抗 CD16), Leu 7, 抗 Kappa 及び抗 Lambda 並びに Coulter から入手した NKH-1 である。

## 細胞傷害性検定

K562 細胞に対する IL 2 依存性コロニーの細胞傷害活性を <sup>51</sup>Cr 放出法を用いて測定した。標的細胞は 37°C で 1 時間 100  $\mu$ l の <sup>51</sup>Cr (New England Nuclear) で標識し、使用する前に入念に洗浄した。100  $\mu$ l 当たり  $1 \times 10^3$  個の標的細胞とエフェクター細胞溶液 100  $\mu$ l を U 底のマイクロタイター・プレート (Costar) に播種した。エフェクター細胞と標的細胞の比率は 5:1 から 20:1 であった。37°C で 3 時間インキュベートした後、プレートを遠心分離し、得られた上清で標的細胞から放出された <sup>51</sup>Cr を調べた。各実験は 2~3 重複検査で行い、細胞溶解の割合を次式で算出した。

## RESULTS

### Cloning of in vivo-derived TG<sup>r</sup> T and NK cells

After 15 days of culture, growing colonies were observed in 19 of 96 nonselected wells and in 21 of 96 TG-selected wells. Cloning efficiencies, calculated from the proportion of colony-negative wells, were 0.22 and  $0.50 \times 10^{-4}$  for normal and TG<sup>r</sup> cells, respectively, yielding a TG<sup>r</sup> mutant frequency of  $2.3 \times 10^{-4}$ . This mutant frequency is 20-100 times higher than the frequencies observed in 30 other A-bomb survivors<sup>18</sup> or the frequencies reported for normal individuals.<sup>9,10,17</sup> PBMC were obtained again five months later and a similar frequency of TG<sup>r</sup> cells was observed ( $2.6 \times 10^{-4}$ ). IL 2-dependent colonies obtained from these two experiments were used for further analysis.

### Cloning of TG<sup>r</sup> B cells

Growing colonies were observed 2-4 weeks after initiation of the culture in the wells which were inoculated with EB virus-infected cells. Thirty eight of 96 nonselected wells and 73 of 240 TG-selected wells showed colony growth, yielding a TG<sup>r</sup> B cell frequency of  $7.2 \times 10^{-3}$ . Colonies were isolated and subcultured for further analysis.

### Chromosome analysis of the lymphocyte colonies

Chromosome analysis was performed on 32 TG<sup>r</sup> IL 2-dependent and 30 EB virus-transformed lymphocyte colonies. As shown in Figure 1, all the TG<sup>r</sup> colonies showed the same aberration, a terminal deletion of the long arm of chromosome 20. This indicates that all the TG<sup>r</sup> lymphocytes were derived from a single cell. Chromosomes of normal lymphocyte colonies were also analyzed and 7 of 14 IL 2-dependent and 11 of 24 EB virus-transformed lymphocyte colonies showed various different types of radiation-induced aberrations (mostly reciprocal translocations).

### Alterations of the HPRT gene of the TG<sup>r</sup> colonies

The single cell origin of the TG<sup>r</sup> lymphocytes was also indicated by the Southern blotting analysis using a HPRT cDNA as a probe. As shown in Figure 2, all the TG<sup>r</sup> lymphocyte colonies showed the same alterations (appearance of novel bands) when DNAs were cut with the restriction enzyme Pvu II or Bgl II. No alterations were observed when DNAs were cut with Bam HI, Eco RI, Hind III, Pst I or Msp I (data not shown). Southern blotting analysis of HPRT genes of spontaneously occurring in vivo-derived TG<sup>r</sup> T cells has revealed that 10%-

## 結 果

### 生体内由来 TG<sup>r</sup> T 及び NK 細胞のクローニング

15日間の培養後、非選択 well 96個中19個及び TG 選択 well 96個中21個にコロニーの増殖が認められた。コロニー無形成 well の割合から算出したクローニング効率は、正常細胞では0.22, TG<sup>r</sup> 細胞では  $0.50 \times 10^{-4}$  であり、TG<sup>r</sup> 突然変異細胞頻度は  $2.3 \times 10^{-4}$  であった。この突然変異細胞頻度は、他の30名の原爆被爆者で観察された頻度<sup>18</sup> 又は健康人について報告された頻度<sup>9,10,17</sup> の20~100倍である。PBMC は5か月後にも採取されたが、TG<sup>r</sup> 細胞の頻度は同様であった ( $2.6 \times 10^{-4}$ )。これら二つの実験により得られた IL 2 依存性コロニーは、その後の解析に用いられた。

### TG<sup>r</sup> B 細胞のクローニング

培養を開始して2~4週間後に、EB ウイルス感染細胞を播種しておいた well にコロニーの増殖が観察された。96個の非選択 well 中38個、及び240個の TG 選択 well 中73個にコロニーの増殖が認められ、TG<sup>r</sup> B 細胞頻度は  $7.2 \times 10^{-3}$  であった。コロニーを分離し、以後の解析のために継代培養した。

### リンパ球コロニーの染色体分析

32個の TG<sup>r</sup> IL 2 依存リンパ球コロニーと30個の EB ウイルス形質転換リンパ球コロニーについて染色体分析を行った。図1に示したように、すべての TG<sup>r</sup> コロニーは同一の異常、すなわち、第20染色体長腕の末端欠失を示した。このことは、すべての TG<sup>r</sup> リンパ球が1個の細胞に由来することを示している。正常リンパ球コロニーの染色体についても分析を行い、14個の IL 2 依存リンパ球コロニーのうちの7個、及び24個の EB ウイルス形質転換リンパ球コロニーのうちの11個が種々の放射線誘発異常(大部分は相互転座)を示すことがわかった。

### TG<sup>r</sup> コロニーの HPRT 遺伝子の変化

HPRT cDNA をプローブとして用いた Southern プロット法によっても、TG<sup>r</sup> リンパ球が1個の細胞に由来することが示された。図2に示したように、DNA を制限酵素 Pvu II 又は Bgl II で切断すると、すべての TG<sup>r</sup> リンパ球コロニーは同じ変化(新しいバンドの出現)を示した。DNA を Bam HI, Eco RI, Hind III, Pst I 又は Msp I で切断した場合には変化は認められなかった(データは示していない)。生体内由来の自然発生 TG<sup>r</sup> T 細胞の HPRT 遺伝子について Southern プロット法による分析を行ったところ、突然変異細胞の10~20%が種々の変化を示すことがわかつ



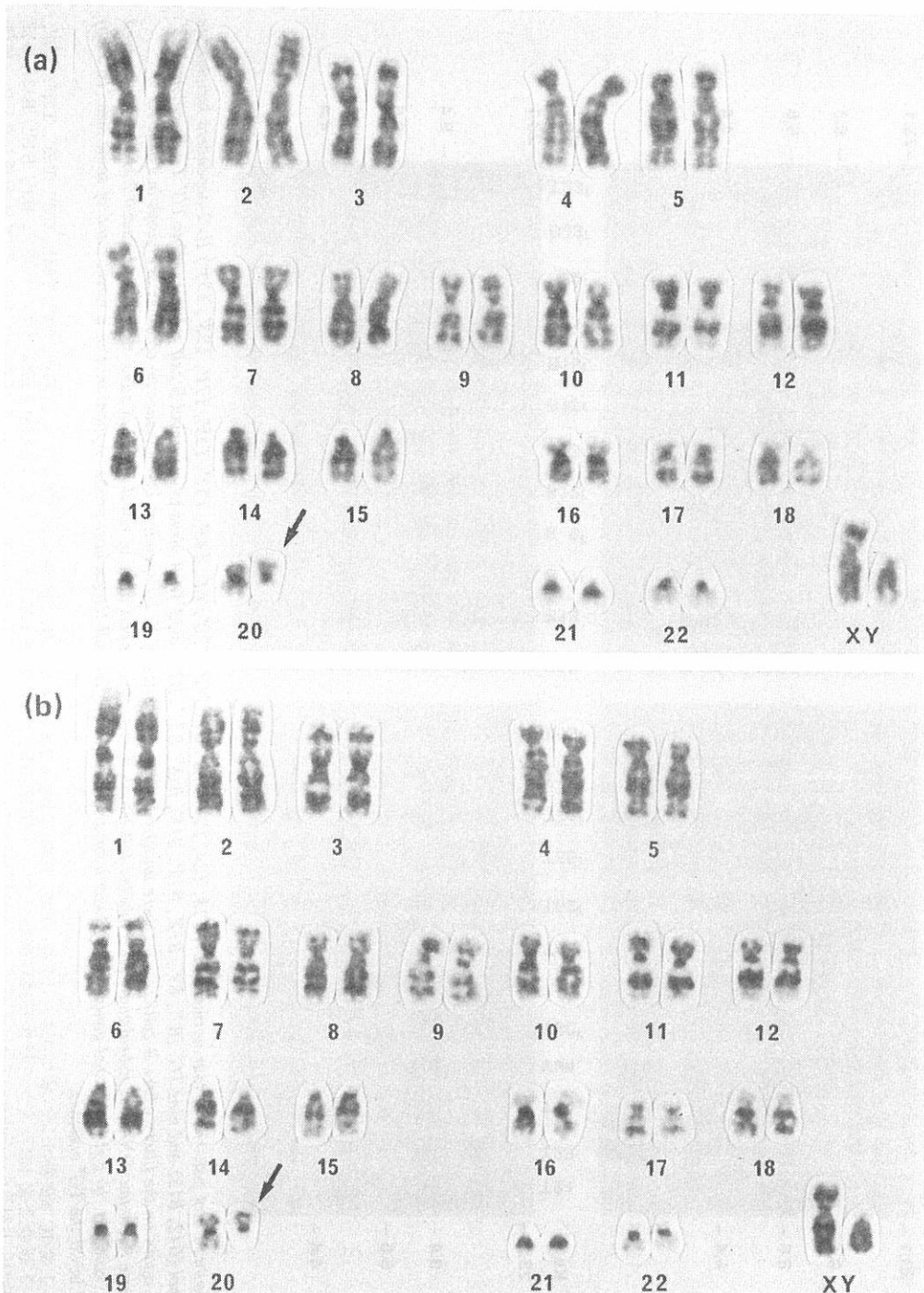


Figure 1. Representative karyotype with G-band from the TG<sup>r</sup> lymphocyte colonies, T23<sup>r</sup> (a) and B13<sup>r</sup> (b). In both colonies, G-banding revealed a terminal deletion (arrow) of the long arm of chromosome 20 with the breakpoint at q11.2. Identical karyotype was observed in the other TG<sup>r</sup> colonies.

図1 TG<sup>r</sup>リンパ球コロニーのT23<sup>r</sup>(a)及びB13<sup>r</sup>(b)においてGバンドを有する代表的核型。両コロニーにおいて、G分染法によりq11.2を切断点とする第20染色体長腕の末端欠失(矢印)が認められた。他のTG<sup>r</sup>コロニーにも同一の核型が認められた。

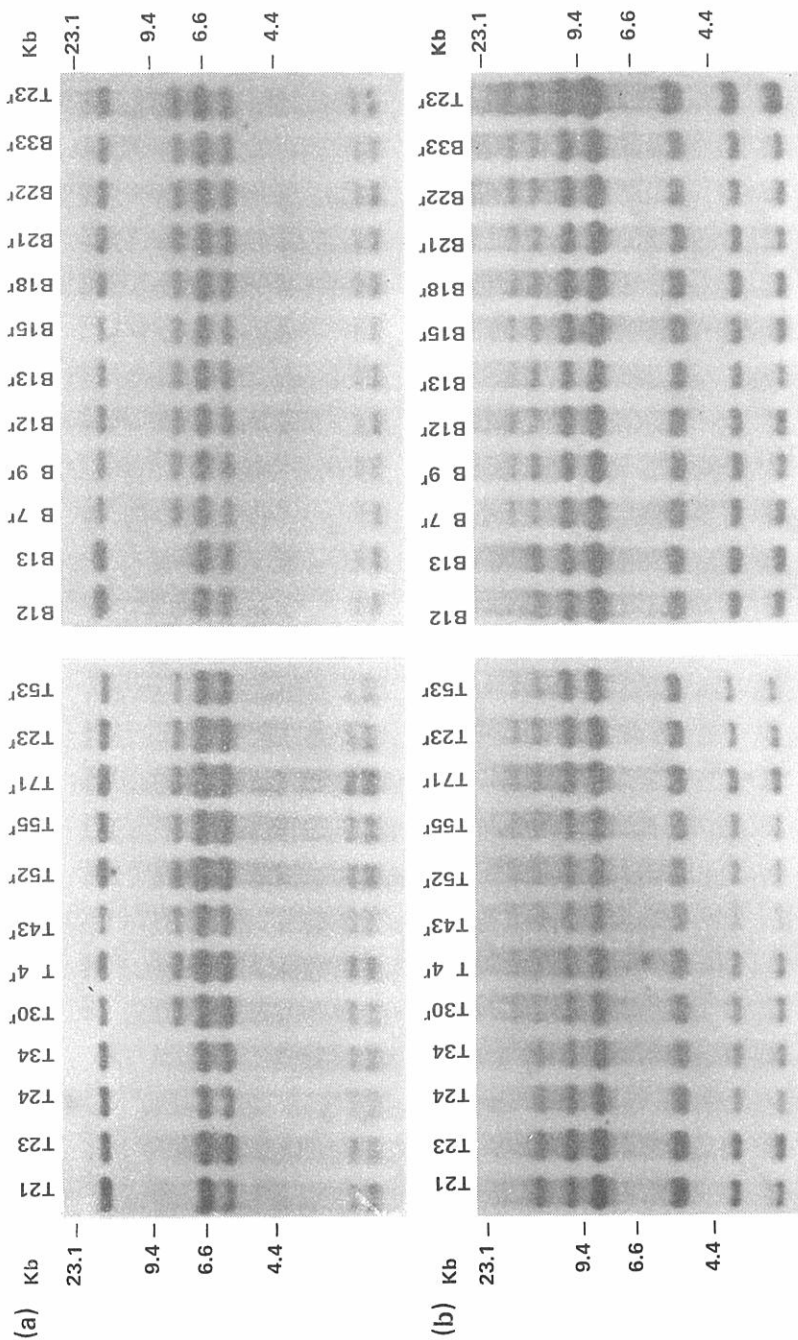


Figure 2. Southern blot patterns of four normal (T21, T23, T24, T34) and eight TG<sup>f</sup> (T30<sup>f</sup>, T4<sup>f</sup>, T43<sup>f</sup>, T52<sup>f</sup>, T55<sup>f</sup>, T71<sup>f</sup>, T73<sup>f</sup>, T77<sup>f</sup>) and two normal (B12, B13) and nine TG<sup>f</sup> (B7<sup>f</sup>, B9<sup>f</sup>, B12<sup>f</sup>, B13<sup>f</sup>, B15<sup>f</sup>, B18<sup>f</sup>, B21<sup>f</sup>, B22<sup>f</sup>, B33<sup>f</sup>) EB virus-transformed B cell colonies. One TG<sup>f</sup> T cell colony T23<sup>f</sup> was analyzed again on the filters where B cell colonies were analyzed. Characteristics of IL 2-dependent TG<sup>f</sup> lymphocyte colonies are given in Table 1. a) Pvu II-digested genomic DNA was hybridized with a labeled full-length hprt probe. Appearance of novel bands of same sizes (27 kb and 9.2 kb) were observed in all the TG<sup>f</sup> colonies. b) Bgl II-digested genomic DNA was hybridized with a labeled full-length hprt probe. Appearance of a novel band of same size (18.5 kb) was observed in all the TG<sup>f</sup> colonies.

図2 4個 normally IL 2依存リンパ球コロニー (T21, T23, T24, T34) 及び8個の TG<sup>f</sup> IL 2依存リンパ球コロニー (T30<sup>f</sup>, T4<sup>f</sup>, T43<sup>f</sup>, T52<sup>f</sup>, T55<sup>f</sup>, T71<sup>f</sup>, T73<sup>f</sup>, T77<sup>f</sup>) 並びに2個の正常 EBウイルス形質転換 B細胞コロニー (B12, B13) 及び9個の TG<sup>f</sup> EBウイルス形質転換 B細胞コロニー (B7<sup>f</sup>, B9<sup>f</sup>, B12<sup>f</sup>, B13<sup>f</sup>, B15<sup>f</sup>, B18<sup>f</sup>, B21<sup>f</sup>, B22<sup>f</sup>, B33<sup>f</sup>) の Southern ブロットパターン。B細胞コロニーを分析したフィルター上で、1個の TG<sup>f</sup> T細胞コロニー、T23<sup>f</sup> も分析した。IL 2依存リンパ球コロニーの特徴を表1に示した。a) Pvu II で消化させたゲノム DNA を標識した full length hprt フローブと反応させた。すべての TG<sup>f</sup> コロニーに同じ大きさ (27 kb 及び 9.2 kb) の新しいバンドが現れた。b) Bgl II で消化させたゲノム DNA を標識した full length hprt フローブと反応させた。すべての TG<sup>f</sup> コロニーに同じ大きさ (18.5 kb) の新しいバンドが現れた。

20% of those mutant cells possess various types of alterations<sup>11,12,24,25</sup> (i.e., no HPRT gene "hot spots" have been observed). Thus, the observed common alteration in this study gives the evidence for the single cell origin of the TG<sup>r</sup> lymphocytes. As both IL 2-dependent and EB virus-transformed lymphocytes were found to derive from a single cell, the original cell is probably the stem cell which can be differentiated into both T and B cells. In order to further characterize the original stem cell, we investigated rearrangements of T cell receptor and immunoglobulin genes and surface phenotypes of the TG<sup>r</sup> lymphocyte colonies.

### Analysis of T cell receptor and immunoglobulin gene rearrangements

Figure 3 shows the gene rearrangements of TcR  $\beta$  and  $\gamma$  chains of IL 2-dependent colonies. All the normal and TG<sup>r</sup> colonies showed multiple rearrangement patterns except for T30<sup>r</sup> and T4<sup>r</sup>, which possessed NK cell phenotype (see below). Immunoglobulin heavy chain genes also showed multiple rearrangements among EB virus-transformed TG<sup>r</sup> colonies (Figure 4).

た<sup>11,12,24,25</sup> (すなわち, HPRT 遺伝子のホットスポットは観察されなかった). このように, 本研究で共通して観察された変化は, TG<sup>r</sup> リンパ球が1個の細胞に由来することを示している. IL 2 依存リンパ球と EB ウイルス形質転換リンパ球のいずれも1個の細胞に由来することが明らかになったので, 元になる細胞は, 恐らく, T細胞とB細胞のいずれにも分化できる幹細胞と考えられる. この元の幹細胞の特徴を更に調べるために, TG<sup>r</sup> リンパ球コロニーのT細胞レセプター及び免疫グロブリン遺伝子の再構成並びに細胞表面表現形質について検討した.

### T細胞レセプター及び免疫グロブリン遺伝子の再構成の分析

IL 2 依存コロニーの TcR  $\beta$  及び  $\gamma$  鎖の遺伝子再構成を図3に示した. NK細胞表現型(下記参照)を有する T30<sup>r</sup> 及び T4<sup>r</sup> を除いて, すべての正常コロニー及び TG<sup>r</sup> コロニーが種々の再構成パターンを示した. 免疫グロブリンH鎖遺伝子も EB ウイルス形質転換 TG<sup>r</sup> コロニーにおいて種々の再構成を示した(図4).

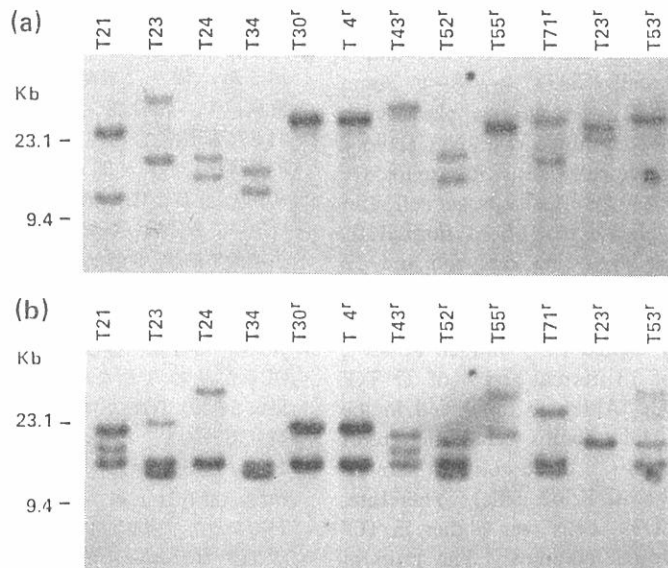


Figure 3. Southern blot patterns of four normal (T21, T23, T24, T34) and eight TG<sup>r</sup> (T30<sup>r</sup>, T4<sup>r</sup>, T43<sup>r</sup>, T52<sup>r</sup>, T55<sup>r</sup>, T71<sup>r</sup>, T23<sup>r</sup>, T53<sup>r</sup>) IL 2-dependent lymphocyte colonies.

図3 4個の正常IL 2依存リンパ球コロニー(T21, T23, T24, T34)及び8個のTG<sup>r</sup> IL 2依存リンパ球コロニー(T30<sup>r</sup>, T4<sup>r</sup>, T43<sup>r</sup>, T52<sup>r</sup>, T55<sup>r</sup>, T71<sup>r</sup>, T23<sup>r</sup>, T53<sup>r</sup>)のSouthernプロットパターン.

a) Bam HI-digested genomic DNA was hybridized with a labeled TcR  $\beta$  chain constant region probe.

Bam HIで消化させたゲノムDNAと標識TcR  $\beta$ 鎖定常部プローブとを反応させた.

b) The same filter was rehybridized with a labeled J region genomic fragment of TcR  $\gamma$  chain.

このフィルターをTcR  $\gamma$ 鎖の標識したJ領域ゲノム断片と再反応させた.

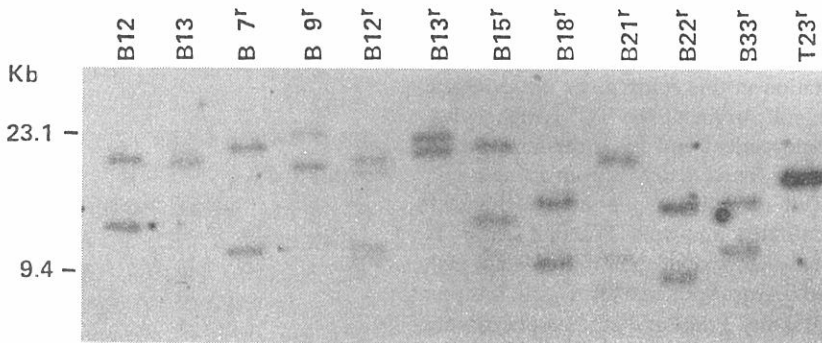


Figure 4. Southern blot patterns of two normal (B12, B13) and nine TG<sup>r</sup> (B7<sup>r</sup>, B9<sup>r</sup>, B12<sup>r</sup>, B13<sup>r</sup>, B15<sup>r</sup>, B18<sup>r</sup>, B21<sup>r</sup>, B22<sup>r</sup>, B33<sup>r</sup>) EB virus-transformed B cell colonies and of one TG<sup>r</sup> T cell colony (T23<sup>r</sup>). Eco RI-digested genomic DNA was hybridized with a labeled immunoglobulin heavy chain J region genomic probe.

図4 2個の正常のEBウイルス形質転換B細胞コロニー(B12, B13)及び9個のTG<sup>r</sup> EBウイルス形質転換B細胞コロニー(B7<sup>r</sup>, B9<sup>r</sup>, B12<sup>r</sup>, B13<sup>r</sup>, B15<sup>r</sup>, B18<sup>r</sup>, B21<sup>r</sup>, B22<sup>r</sup>, B33<sup>r</sup>)並びに1個のTG<sup>r</sup> T細胞コロニー(T23<sup>r</sup>)のSouthernプロットパターン。Eco RIにより消化させたゲノムDNAと標識免疫グロブリンH鎖J領域ゲノムプローブを反応させた。

### Surface phenotypes

The cell surface phenotypes of lymphocyte colonies were studied using immunofluorescence staining. As shown in Table 1, IL 2-dependent TG<sup>r</sup> colonies possessed various phenotypes including classic T cells (CD3+, 4+, 8- or CD3+, 4-, 8+) and a "double negative" T cell (CD3+, 4-, 8-). Some of the mutant colonies with various phenotypes (such as CD3-, 16+) exhibited cytotoxic activity against the NK sensitive cell line, K562 (cytotoxic activity was 50%-80% at an effector/target cell ratio of 20:1). Surface phenotypes of 13 normal IL 2-dependent colonies were also analyzed and 12 colonies showed phenotypes of CD3 positive classic T cells (9 were CD4+, 8- and 3 were CD4-, 8+) and one colony lacked CD3 antigen (CD3-, 4-, 8+). Thus 1 of 13 normal and 6 of 27 TG<sup>r</sup> colonies lacked CD3. Although not listed in the table, additional six TG<sup>r</sup> colonies were a mixture of CD3+ and CD3- cells (all these colonies showed cytotoxic activity against K562 cells). Therefore, the proportion of CD3- cells was higher in TG<sup>r</sup> colonies than in normal colonies. The ratio of CD4+ to CD8+ classic T cells was similar in TG<sup>r</sup> and normal colonies, which was also similar to the reported results from different donors.<sup>17</sup>

Light chain isotypes of the surface immunoglobulin of EB virus-transformed lymphocyte colonies were analyzed. Of 13 TG<sup>r</sup> colonies analyzed, 9 had  $\kappa$  and 4 had  $\lambda$  isotypes, and of 12 normal colonies, 9 had  $\kappa$  and 3 had  $\lambda$  isotypes.

### 細胞膜表面表現形質

リンパ球コロニーの細胞膜表面表現形質を免疫蛍光染色法を用いて調べた。表1に示したように、IL 2依存TG<sup>r</sup>コロニーは、古典的なT細胞(CD3+, 4+, 8-又はCD3+, 4-, 8+)及び"double negative"のT細胞(CD3+, 4-, 8-)を含む様々な表現型を示した。様々な表現型(CD3-, 16+)を有する突然変異コロニーの幾つかは、NK感受性細胞株K562に対して細胞傷害活性を示した(エフェクター細胞対標的細胞の比率が20:1のとき、細胞傷害活性は50~80%)。正常なIL 2依存コロニー13個の膜表面表現形質についても分析したが、12個のコロニーはCD3+の古典的T細胞(9個はCD4+, 8-で、3個はCD4-, 8+)であり、1個のコロニーはCD3抗原を欠いていた(CD3-, 4-, 8+)。このように、13個の正常コロニー中1個、並びに27個のTG<sup>r</sup>コロニー中6個にCD3が認められなかった。表には示さなかったが、更に6個のTG<sup>r</sup>コロニーがCD3+とCD3-の混合型であった(これらのコロニーはすべてK562細胞に対して細胞傷害活性を示した)。したがって、CD3-細胞の割合は正常コロニーよりもTG<sup>r</sup>コロニーの方が高かった。古典的T細胞のCD4+とCD8+の比率はTG<sup>r</sup>コロニーと正常コロニーとで類似しており、また、異なる供与者についての結果とも類似していた。<sup>17</sup>

EBウイルス形質転換リンパ球コロニーの表面免疫グロブリンのL鎖アイソタイプを分析した。分析した13個のTG<sup>r</sup>コロニーのうち、9個は $\kappa$ アイソタイプを、4個は $\lambda$ アイソタイプを示し、また、12個の正常コロニーのうち、9個は $\kappa$ アイソタイプを、3個は $\lambda$ アイソタイプを示した。

TABLE 1 CHARACTERISTICS OF MUTANT COLONIES PROPAGATED IN IL 2

表1 IL 2において増殖した突然変異コロニーの特徴

| Mutant Colonies   | Surface Phenotype |     |     |     |      |       |       | Cytotoxicity against K 562 | Number of Mutant Colonies with Similar Characteristics |
|-------------------|-------------------|-----|-----|-----|------|-------|-------|----------------------------|--|
|                   | CD3               | CD4 | CD8 | CD2 | CD16 | NKH 1 | Leu 7 |                            |  |
| T 30 <sup>f</sup> | —                 | —   | —   | +   | +    | +     | —     | +                          | 3  |
| T 4 <sup>f</sup>  | —                 | —   | +   | +   | +    | +     | —     | +                          | 2  |
| T 43 <sup>f</sup> | —                 | +   | —   | +   | —    | —     | —     | —                          | 1  |
| T 52 <sup>f</sup> | +                 | —   | —   | +   | —    | —     | —     | +                          | 1  |
| T 55 <sup>f</sup> | +                 | +   | —   | +   | —    | —     | +     | +                          | 3  |
| T 71 <sup>f</sup> | +                 | +   | —   | +   | —    | —     | —     | +                          | 2  |
| T 23 <sup>f</sup> | +                 | +   | —   | +   | —    | —     | —     | —                          | 9  |
| T 53 <sup>f</sup> | +                 | —   | +   | +   | —    | —     | —     | —                          | 3  |

Mixture of CD3+ and CD3- cells was observed in six TG<sup>f</sup> colonies which were not included in this table.

本表には含まなかったが、CD3+とCD3-の混合細胞が6個のTG<sup>f</sup>コロニーに認められた。

Thus the stem cell from which the TG<sup>f</sup> lymphocytes originated has been shown to have been able to differentiate into several subsets of T cell lineage and NK cells and also B cells.

## DISCUSSION

Different human HPRT(-) lymphocytes originating from a single stem cell have been cloned. The cloned lymphocytes were shown to belong to several subsets of T cells, NK cells, and B cells. T and B cell colonies showed multiple rearrangement patterns of the genes of TcR  $\beta$  chains and immunoglobulin heavy chains, respectively, indicating the diversity of their antigen specificities.

Estimation as to when the original stem cell started differentiation into mature lymphocytes is possible from the chromosome analysis of cloned TG<sup>f</sup> lymphocytes. This estimation is important for explaining several results obtained from this study. The chromosome aberration observed in TG<sup>f</sup> lymphocytes indicates that the stem cell started differentiation after the exposure to A-bomb radiation. The reason is as follows. It has been reported that the frequency of bone marrow cells and peripheral lymphocytes bearing chromosome aberrations is very low (0%-1%) in healthy persons not exposed to radiation. However, in A-bomb survivors, the frequency is much higher,<sup>26-28</sup> (more than 10% in persons exposed to the bomb within 1,000 m). The aberration frequency of blood T cells of the person studied here was 21%. Thus, most of the chromosome aberration observed in the person was considered to be induced by the A-bomb radiation. This indicates that the chromosome aberration observed

このように、TG<sup>f</sup>リンパ球の由来である幹細胞は、幾つかのT細胞系サブセット、NK細胞及びB細胞に分化し得ることが示された。

## 考 察

1個の幹細胞に由来する種々のヒトHPRT(-)リンパ球をクローニングした。クローン化されたリンパ球は、T細胞の幾つかのサブセット、NK細胞及びB細胞に属することが示された。T及びB細胞コロニーでは、それぞれ、TcR  $\beta$ 鎖及び免疫グロブリンH鎖の遺伝子に種々の再構成パターンが認められたが、このことは、それぞれの抗原特異性が多様であることを示唆している。

元の幹細胞が成熟リンパ球への分化を開始する時期の推定は、TG<sup>f</sup>リンパ球クローンの染色体分析により可能である。この推定は、本研究で得られた幾つかの結果を説明する上で重要である。TG<sup>f</sup>リンパ球に観察された染色体異常は、幹細胞が原爆放射線被曝後に分化を開始したことを示唆している。その理由は以下のとおりである。染色体異常を有する骨髄細胞及び末梢リンパ球の頻度は放射線に被曝していない健常人では非常に低い(0~1%)ことが報告されている。しかし、原爆被爆者においてはこの頻度は高く、<sup>26-28</sup>爆心地から1,000 m以内で被爆した人では10%以上である。今回検討した被爆者の血中T細胞の異常頻度は21%であった。したがって、この研究対象者に観察された染色体異常の多くは原爆放射線により誘発されたものと考えられる。これは、TG<sup>f</sup>コロニーに観察された染色体異常が原爆

in the TG<sup>r</sup> colonies was most probably induced by A-bomb radiation. This hypothesis is supported by the following. If the TG<sup>r</sup> cell population derived from the stem cell had existed at the time of A-bomb exposure, various other types of aberrations should have been induced in various subsets of the TG<sup>r</sup> colonies because of the high level of induction of chromosome aberrations by the bomb. However, the TG<sup>r</sup> colonies (32 IL 2-dependent and 30 B cell colonies were examined) did not have any structural aberrations other than the common partial deletion of the long arm of chromosome 20. Analysis of the normal colonies, on the other hand, showed that approximately 50% of both T and B cell colonies (7 of 14 IL 2-dependent and 9 of 21 B cell colonies) had various types of aberrations demonstrating that a high number of aberrations were induced in this individual. A previous study showed that 9 of 20 normal and 22 of 49 TG<sup>r</sup> T cell colonies obtained from 9 other A-bomb survivors had various types of radiation-induced aberrations (manuscript in preparation) indicating that chromosome aberrations could have been induced in TG<sup>r</sup> cells equally to normal cells if the cells had existed at the time of A-bomb exposure. Thus, it is indicated that the TG<sup>r</sup> T, NK, and B cells came out after the exposure to the A-bomb. Since the person studied was 17 years old when he was exposed to the bomb, it has been suggested that some stem cells are able to differentiate into at least T, NK, and B cells even after the age of 17.

The difference in the mode of stem cell differentiation into different cell types might explain why the frequency of TG<sup>r</sup> cells was higher in B cells (approximately 35 times higher) than T cells in this subject. The thymus is known to be the central organ for the differentiation of the cells of T cell lineage<sup>29</sup> and is well known to involute after adolescence.<sup>30</sup> Since the age of 17 is considered to be old enough for the start of the thymic involution, there might have been some disturbance for the mutant stem cell to differentiate into the cells of T cell lineage. A higher frequency of CD3-negative IL 2-dependent (NK) cells in TG<sup>r</sup> lymphocyte population than in normal population might also be attributable to this age-dependent thymic involution. High levels of NK activity observed in nude mice and neonatally thymectomized mice support this hypothesis because the observation admits an interpretation that NK cells accumulate when the ability to differentiate into mature T cells is blocked by the absence of the thymus.<sup>31</sup>

放射線により誘発された可能性が大きいことを示唆している。この仮説は以下により支持される。当該幹細胞に由来する TG<sup>r</sup> 細胞集団が原爆被爆時に存在していたとすれば、原爆による染色体異常誘発頻度は高いので、様々な TG<sup>r</sup> コロニー・サブセットに種々の異常が誘発されたはずである。しかし、TG<sup>r</sup> コロニー（32個の IL 2 依存コロニーと30個の B 細胞コロニーを調べた）には、第20染色体の長腕に共通して見られた部分的欠失以外の構造異常は認められなかった。他方、正常コロニーの分析では、T 及び B 細胞コロニーの約 50% (IL 2 依存コロニー14個中7個、B細胞コロニー21個中9個) が種々の異常を示し、本対象者に多数の異常が誘発されたことを証明している。前回の研究では、他の9名の被爆者より入手した20個の正常T細胞コロニー中9個、及び49個の TG<sup>r</sup> T細胞コロニー中22個に種々の放射線誘発異常が認められたが(報告書作成中)、これは、TG<sup>r</sup> 細胞が被爆時に存在していたとすれば、正常細胞と同様 TG<sup>r</sup> 細胞にも染色体異常が誘発されたはずであることを示唆している。したがって TG<sup>r</sup> T, NK 及び B 細胞は被爆後に生じたものであることが示唆される。研究対象者は被爆時に17歳であったので、一部の幹細胞は17歳以後も少なくとも T, NK 及び B 細胞に分化できると考えられる。

幹細胞の異なる細胞へ分化する形態の差異が、本研究対象者において TG<sup>r</sup> 細胞の頻度が T 細胞よりも B 細胞で高い(約35倍)理由を説明するかもしれない。胸腺は T 細胞系細胞の分化における中心的な臓器であることが知られており、<sup>29</sup> また、思春期以降退縮することもよく知られている。<sup>30</sup> 17歳は胸腺の退縮開始には十分な年齢と考えられるので、突然変異幹細胞が T 細胞系細胞に分化する際、何らかの障害が生じた可能性がある。正常リンパ球集団よりも TG<sup>r</sup> リンパ球集団に CD3<sup>-</sup> の IL 2 依存(NK)細胞が高頻度に見られるのも、この年齢依存性胸腺退縮によるものかもしれない。ヌードマウス及び新生児期に胸腺を摘出されたマウスに高レベルの NK 活性が認められることも、この仮説を支持している。なぜならば、このような観察に基づけば、成熟 T 細胞への分化能が胸腺の欠如により阻害されると NK 細胞が蓄積すると考えられるからである。<sup>31</sup>

Another possibility is that the difference of the frequency between TG<sup>r</sup> T cells and B cells and the difference of the frequency of CD3-negative cells between TG<sup>r</sup> and normal IL 2-dependent cells might be attributable to the deficiency in the activity of HPRT enzyme in TG<sup>r</sup> cells. However, a decrease in the number of peripheral T cells has not been found in the patients of Lesch-Nyhan syndrome,<sup>32</sup> in whom all the cells lack the HPRT activity. Comparison of the lymphocyte subsets of IL 2-dependent cells in relation to the resistance to TG has also been reported<sup>33</sup> using peripheral lymphocytes obtained from Lesch-Nyhan heterozygotes in whom only a part of lymphocytes lack the HPRT activity and the others not. The result showed no difference of lymphocyte subsets between the two types of the cells. We have previously reported on the surface phenotypes of the spontaneously occurring TG<sup>r</sup> cells in normal individuals and no difference was observed in the distribution of lymphocyte subsets in relation to TG resistance.<sup>17</sup> Thus, it seems unlikely that HPRT enzyme deficiency solely suppressed the differentiation of the cells of T cell lineage.

The present study has suggested the presence of the common stem cells for at least T, NK, and B cells in humans after the age of 17. Further investigations to identify the stem cell mutations which have occurred at various stages of differentiation will provide valuable information concerning the process of lymphocyte differentiation. We have already cloned even from a normal nonirradiated person 3 TG<sup>r</sup> T cell colonies which possess the same HPRT gene alterations but different gene rearrangements of TcR  $\beta$  and  $\gamma$  chains (submitted for publication). Thus, the HPRT gene mutations at the stem cell level do not seem to be very rare events. Because there should have been a decrease in the number of hematopoietic stem cells due to A-bomb radiation, the residual or induced TG<sup>r</sup> stem cells should have expanded in the survivors. Thus, it will be easier to find additional stem cell mutations in the survivors than in the normal population. Furthermore, since a high number of chromosome aberrations were induced in the cells of this population and the pattern of the aberration is very random, we are able to use chromosome aberration as a cellular marker for the determination of the clonality as well as the HPRT gene alterations. Our studies have provided a novel way to investigate the differentiation of human lymphocytes by the use of the *in vivo* somatic mutational assay.

また、TG<sup>r</sup> T細胞及びB細胞の頻度の差異並びにTG<sup>r</sup>及び正常IL 2依存細胞のCD3-細胞の頻度の差異はTG<sup>r</sup>細胞におけるHPRT酵素活性の欠損によるとも考えられる。しかし、すべての末梢T細胞がHPRT活性を失ったLesch-Nyhan症候群患者には、同細胞の数の減少は認められない。<sup>32</sup>また、一部のリンパ球のみがHPRT活性を失ったLesch-Nyhanヘテロ接合体から入手した末梢リンパ球を用いて、TGに対する耐性についてIL 2依存細胞のリンパ球サブセットの比較が行われ、その結果が報告<sup>33</sup>された。2種の細胞の間にリンパ球サブセットの差異は認められなかった。我々は前報で健常人に自然発生するTG<sup>r</sup>細胞の細胞膜表面表現形質について検討したが、TG耐性に関してリンパ球サブセットの分布に差異は認められなかった。<sup>17</sup>したがって、HPRT酵素欠損のみによってT細胞系細胞の分化が阻害されたとは考えられない。

今回の研究の結果、17歳以上のヒトにも少なくともT, NK及びB細胞に共通の幹細胞が存在することが示唆された。分化の各段階で生ずる幹細胞突然変異を探知するため更に研究を行えば、リンパ球の分化過程について重要な情報が得られるであろう。我々は既に、健常非被爆者からもHPRT遺伝子変化は同一であるがTcR  $\beta$ 及び $\gamma$ 鎖の遺伝子再構成は異なる3個のTG<sup>r</sup>T細胞コロニーを得て、クローニングした(雑誌に投稿)。したがって、幹細胞レベルでのHPRT遺伝子突然変異は極めてまれな事象とは考えられない。原爆放射線のために造血幹細胞数が減少したはずであるから、被爆者においては残留又は誘発のTG<sup>r</sup>幹細胞が増大したはずである。故に、健常人よりも被爆者において新しい幹細胞突然変異を発見するのは容易であろう。更に、多数の染色体異常が被爆者の細胞に誘発されており、また、異常のパターンは極めて無作為であるので、染色体異常をHPRT遺伝子変化と同様、クローン形成評価の細胞マーカーとして用いることができる。我々の研究では、生体内体細胞突然変異検定を用いてヒトリンパ球の分化を調べるための新しい方法を示した。

## REFERENCES

## 参考文献

1. ABRAMSON S, MILLER RG, PHILLIPS R: The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. *J Exp Med* 145:1567-79, 1977
2. DICK J, MAGLI M, HUSZAR D, PHILLIPS R, BERNSTEIN A: Introduction of a selectable gene into primitive stem cells capable of long-term reconstitution of the hemopoietic system of W/W<sup>v</sup> mice. *Cell* 42:71-9, 1985
3. KINGSTON R, JENKINSON EJ, OWEN JJT: A single stem cell can recolonize an embryonic thymus, producing phenotypically distinct T-cell populations. *Nature* 317:811-3, 1985
4. PALACIOS R, STEINMETZ M: IL3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain Ig genes in germ-line configuration, and generate B lymphocytes in vivo. *Cell* 41:727-34, 1985
5. PALACIOS R, KIEFER M, BROCKHAUS M, KARJALAINEN K, DEMBIC Z, KISIELOW P, BOEHMER H: Molecular, cellular and functional properties of bone marrow T lymphocyte progenitor clones. *J Exp Med* 166:12-32, 1987
6. FIALKOW PG, FAQUET GB, JACOBSON RJ, VAIDYA K, MURPHY S: Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell. *Blood* 58:916-9, 1981
7. WILLIAMS CKO, OGUNMOLA GB, ABUGO O, UKAEJIOFO EO, ESAN GJF: Polycythaemia rubra vera associated with unbalanced expression of the X chromosome and monoclonality of T lymphocytes. *Acta Haemat* 70:229-35, 1983
8. CHAMPLIN RE, GOLDE DW: Chronic myelogenous leukemia: Recent advances. *Blood* 65:1039-47, 1985
9. ALBERTINI RJ, CASTLE KL, BORCHERDING WR: T-cell cloning to detect the mutant 6-thioguanine-resistant lymphocytes present in human peripheral blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:6617-21, 1982
10. MORLEY AA, TRAINOR KJ, SESHADRI R, RYALL RG: Measurement of in vivo mutations in human lymphocytes. *Nature* 302:155-6, 1983
11. TURNER DR, MORLEY AA, IHALIANDROS M, KUTLACA R, SANDERSON BJ: In vivo somatic mutations in human lymphocytes frequently result from major gene alterations. *Nature* 315:343-5, 1985
12. ALBERTINI RJ, O'NEILL JP, NICKLAS JA, HEINTZ NH, KELLEHER PC: Alterations of the HPRT gene in human in vivo-derived 6-thioguanine-resistant T-lymphocytes. *Nature* 316:369-71, 1985
13. THOMAS Y, ROGOZINSKI L, CHESS L: Relationship between human T cell functional heterogeneity and human T cell surface molecules. *Immunol Rev* 74:113-28, 1983
14. ROYER HD, CAMPEN TJ, RAMARLI D, CHANG HC, ACUTO O, REINHERZ EL: Molecular aspects of human T lymphocyte antigen recognition. *Transplantation* 39:571-82, 1985
15. TONEGAWA S: Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302:575-81, 1983
16. TOYONAGA B, MAK TW: Genes of the T-cells antigen receptor in normal and malignant T cells. *Ann Rev Immunol* 5:585-620, 1987
17. HAKODA M, AKIYAMA M, KYOIZUMI S, KOBUE K, AWA AA, YAMAKIDO M: Measurement of in vivo HGPRT-deficient mutant cell frequency using a modified method for cloning human peripheral blood T-lymphocytes. *Mutat Res* 197:161-9, 1988 (RERF TR 14-86)



18. HAKODA M, AKIYAMA M, KYOIZUMI S, AWA AA, YAMAKIDO M, OTAKE M: Increased somatic cell mutant frequency in atomic bomb survivors. *Mutat Res*, in press (RERF TR 18-87)
19. CHRISTY RF, TAJIMA E: US-Japan Joint Reassessment of Atomic Bomb Radiation Dosimetry in Hiroshima and Nagasaki – Final Report. RERF Hiroshima, Japan, 1987
20. SEEBRIGHT M: A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2:971-2, 1971
21. PATEL PI, NUSSBAUM RL, FRAMSON PE, LEDBETTER OH, CASKEY CT, CHINAULT C: Organization of the HPRT gene and related sequences in the human genome. *Somatic Cell Molec Genet* 10:483-93, 1984
22. YANAGI Y, YOSHIKAI Y, LEGGETT K, CLARK SP, ALEXANDER I, MAK TW: A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin genes. *Nature* 308:145-8, 1984
23. TAKAHASHI N, NAKAI S, HONJO T: Cloning of human immunoglobulin  $\mu$  gene and comparison with mouse  $\mu$  gene. *Nucleic Acids Res* 8:5983-91, 1980
24. BRADLEY WEC, GRAEAU JL, SEIFERT AM, MESSING K: Molecular characterization of 15 rearrangements among 90 human in vivo somatic mutants shows that deletions predominate. *Mol Cell Biol* 7:956-60, 1987
25. NICKLAS JA, HUNTER TC, SULLIVAN LM, BERMAN JK, O'NEILL JP, ALBERTINI RJ: Molecular analysis of in vivo hprt mutations in human T-lymphocytes. I. Studies of low frequency 'spontaneous' mutants by Southern blots. *Mutagenesis* 2:341-7, 1987
26. KAMADA N, TSUCHIMOTO T, UCHINO H: Smaller G chromosomes in the bone-marrow cells of heavily irradiated atomic-bomb survivors. *Lancet* 14:880-1, 1970
27. KAMADA N, TANAKA K: Cytogenetic studies of hematological disorders in atomic bomb survivors. In *Radiation-induced Chromosome Damage in Man*. New York, Alan R. Liss, Inc., 1983. pp455-74
28. AWA AA, SOFUNI T, HONDA T, ITOH M, NERIISHI S, OTAKE M: Relationship between the radiation dose and chromosome aberrations in atomic bomb survivors of Hiroshima and Nagasaki. *J Radiat Res* 19:126-40, 1978 (RERF TR 12-77)
29. CANTOR H, WEISSMAN IL: Development and function of subpopulations of thymocytes and T lymphocytes. *Prog Allergy* 20:1-64, 1976
30. BOYD E: The weight of the thymus gland in health and in disease. *Am J Dis Child* 43:1162-214, 1932
31. HERBERMAN RB, HOLDEN IIT: Natural cell-mediated immunity. *Adv Cancer Res* 27:305-77, 1978
32. ALLISON AC, WATTS WE, HOVI T, WEBSTER ADB: Immunological observations on patients with Lesch-Nyhan syndrome, and on the role of de-novo purine synthesis in lymphocyte transformation. *Lancet* 2:1179-82, 1975
33. YAMANAKA H, NISHIDA Y, MORI M, KAMATANI N, NISHIOKA K: Comparison of surface differentiation antigens between separated HGPRT-positive and negative T-cell populations from two Lesch-Nyhan heterozygotes. *Jap J Rheumatol* 1:41-51, 1986