



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Title	Molecular analysis of B-cell differentiation in selective or partial IgA deficiency(内容の要旨(Summary))
Author(s)	浅野, 勉
Report No.(Doctoral Degree)	博士 (医学) 甲 第584号
Issue Date	2004-03-25
Type	博士論文
Version	
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/14547

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏名(本籍)	浅野 勉 (岐阜県)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 584 号
学位授与日付	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Molecular analysis of B-cell differentiation in selective or partial IgA deficiency
審査委員	(主査) 教授 近藤 直実 (副査) 教授 高見 剛 教授 岡野 幸雄

論文内容の要旨

選択的IgA欠損症は、欧米では原発性免疫不全症の中で一般的にみられる病気である。しかしながら欧米と日本では頻度に差があり、欧米では約700人に1人、日本人では約18,500人に1人である。患者によっては上気道感染や腸管感染に罹患しやすい。IgA欠損症の頻度は高いが、分子メカニズムはいまだ解明されていない。また、時にIgGサブクラス欠損症や分類不能型免疫不全症と関連し、その機構には異質性があると考えられる。B細胞のIgA産生細胞への分化はクラススイッチというDNA組み換えを通して起こり、IgAへのクラススイッチはI α germline transcriptsの発現から開始する。IgAへのクラススイッチの後、B細胞は膜型IgA産生細胞からIgA分泌細胞へと分化する。IgA欠損症は、これらの過程のどこかが障害されるためにおこると考え、IgA欠損症患者の病態解析のために、B細胞の分化がどの段階で障害されているかを検討した。

1. 研究方法

- 1) 対象：血清IgA値が検出感度以下を示す選択的IgA欠損症患者3人(患者1, 2, 3)、血清IgA値が5mg/dl以上で正常値より-2SD以下を示す部分IgA欠損症3人(患者4, 5, 6)。
- 2) 細胞分離・培養：ヘパリン加血を採取し、Ficoll-paqueを用いて分離した末梢血単核球(PBMCs)を10%胎児牛血清を含むRPMI1640の培養液にて 1×10^6 個/mlに調整し、phorbol myristate acetate (PMA) (10ng/ml) およびTGF- β 1(1ng/ml)の存在、非存在下で24時間培養した。さらに選択的IgA欠損症患者から得たPBMCsを、抗CD40抗体、IL-4、IL-10の存在、非存在下で7日間培養した。
- 3) サザンブロット解析：好中球からSepa Gene kitを用いてゲノムDNAを抽出し、C α プローブを使用して、サザンブロット解析を施行した。
- 4) α 1遺伝子のシーケンス：ゲノム上のI領域、エクソン1, 2, 3、および膜型エクソンをPCRにて増幅し、シーケンスを施行した。
- 5) α 1hs 1, 2エンハンサー領域の増幅： α 1遺伝子の発現を強く調節する α 1hs 1, 2エンハンサー領域をPCR法にて増幅した。
- 6) I α germline transcriptsの半定量：培養後のPBMCsよりIsogen kitを用いてRNAを抽出し合成したcDNAを用い、半定量的PCRを施行した。無刺激では異なるサイクル数でPCRを施行し、刺激後ではcompetitor DNAを用いて競合的PCRを施行した。
- 7) α circle transcriptsの解析：クラススイッチの存在を示す α circle transcriptsの発現をnested PCRにて評価した。
- 8) C α mature transcriptsの半定量：異なるサイクル数でのPCRにより、半定量を行った。
- 9) IgA分泌の解析：選択的IgA欠損症患者(患者1, 2, 3)において、抗CD40抗体、IL-4、IL-10の存在、非存在下

で7日間培養した上清中のIgA濃度をELISA法にて測定した。

2. 研究結果

- 1) C α 遺伝子のサザンプロット解析: IgA欠損症患者において, IgA1, IgA2の定常部領域をコードしているC α 1, C α 2遺伝子の大きな欠失を認めなかった。
- 2) C α 1遺伝子シーケンス: IgA欠損症患者のゲノム上で, α 1遺伝子のI領域, エクソン1, 2, 3, および膜型エクソンに変異を認めなかった。患者1, 3, 5ではC α 1遺伝子多型882G→C(E175D)を認めた。この多型はコントロールでも認められた。
- 3) α 1hs1,2エンハンサー解析: IgA欠損症患者と正常者の α 1hs1,2エンハンサーの遺伝子配列には有意な差は見られなかった。
- 4) I α germline transcriptsの発現: 無刺激では, コントロールに比して患者1, 2, 3で発現が著明に低下し, 患者4, 5, 6で軽度低下していた。PMA+TGF- β 1刺激後では, IgA欠損症患者においてもコントロールと同等の発現が誘導された。
- 5) α circle transcriptsの発現: 無刺激では, 患者1, 2, 3で発現が見られなかったが, PMA+TGF- β 1刺激後では発現が誘導された。患者4, 5, 6では無刺激でも発現がみられた。
- 6) C α mature transcriptsの発現: 無刺激では, 患者1, 2, 3, 4で発現が低下しており, 患者5, 6では軽度低下していた。PMA+TGF- β 1刺激後では, 患者1, 2で発現が誘導され, 患者3では誘導されなかった。
- 7) IgA分泌の誘導: 抗CD40抗体, IL-4, IL-10により, コントロール及び患者1ではIgA分泌が誘導された。患者2では軽度誘導され, 患者3では誘導されなかった。

3. 考察

この研究により, 選択的IgA欠損症患者では, I α germline transcriptsの発現が著しく低下し α circle transcriptsが検出できないこと, また, それらはPMAとTGF- β 1刺激により誘導されることが示された。これにより今回解析した選択的IgA欠損症患者では, I α germline transcriptsの発現低下が病因として重要であり, 刺激によりIgAへのクラススイッチ組み換えが誘導できることが明らかとなった。選択的IgA欠損症患者においてPMAおよびTGF- β 1に相当する刺激が低下または障害されている可能性が示された。また, 選択的IgA欠損症患者の中でも, 誘導の程度が異なることより, 異なる刺激伝達経路の障害が示唆された。選択的IgA欠損症では主としてクラススイッチ組み換え以前, 部分IgA欠損症ではクラススイッチ組み換え以後の段階でB細胞分化が障害されていることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

申請者 浅野 勉は, 選択的IgA欠損症患者ならびに部分IgA欠損症患者の末梢血を用いて, 分子生物学的手法によりゲノムDNAおよびcDNAの解析を行い, 選択的IgA欠損症の病因のひとつとして, IgAへのクラススイッチ組み換え以前のI α germline transcriptsの発現低下に関連する病態が重要であることを明らかにした。この成果は小児病態学ならびに免疫学研究の進歩・発展に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Molecular analysis of B-cell differentiation in selective or partial IgA deficiency
Clinical and Experimental Immunology (in press)