



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Expression of surrogate light chain in common variable immunodeficiency

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2008-02-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 矢野, 充 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/15328">http://hdl.handle.net/20.500.12099/15328</a>

氏名（本籍）	矢野 充（岐阜県）
学位の種類	博士（医学）
学位授与番号	乙第 949 号
学位授与日付	平成 7 年 2 月 15 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Expression of surrogate light chain in common variable immunodeficiency
審査委員	（主査）教授 折居 忠 夫 （副査）教授 大谷 勲 教授 高見 剛

### 論文内容の要旨

VpreB geneとλ-like geneは会合してsurrogate light chain (SLC) と呼ばれる免疫グロブリンL鎖様分子をつくる。これらは特異的にヒトのpro-B細胞とpre-B細胞に発現し、免疫グロブリンH鎖μ蛋白と結合し、抗原レセプターとよく似た構造をつくる。その機能に関してはまだ詳細は明らかにされていないが、B細胞分化の初期段階で重要な役割を果たしていると考えられている。

申請者は、B細胞に欠陥を有するタイプの7人のcommon variable immunodeficiency (CVI: 分類不能型免疫不全症)を対象に、その病因解明の一助となると考えてVpreBとλ-like geneの発現について研究を行った。

#### <研究方法>

1. 対象：7人のCVI患者（症例1-7）を対象とした（症例1, 2は兄弟例）。症例1-6は血清IgM, IgG, IgAのいずれもが低値を示す型で、症例7はIgMは正常に存在しIgGとIgAが低値を示す型であった。これらの症例の末梢血単核球（PBMCs）の表面マーカーの検索をモノクローナル抗体を用いて行った。コントロールとして健常人とLCL（EBV感染株化リンパ芽球様細胞）を使用した。

2. Polymerase chain reaction (PCR) 法：まず、2.5 μgのRNAにprimerと逆転写酵素を加えて反応させることによりcDNAを作製した。それぞれ50pmolずつの2種類のprimerと共にcDNAを用いて次のような一連の反応を30回繰り返した。94°Cでdenaturation (DNAの熱変性)を1分間、58°Cでannealing (primerの結合)を2分間、72°Cでextension (2本鎖DNAの合成・伸長)を3分間（最終は7分間）を行った。VpreB geneの検出には、primerとして5'-CTGAGATATTTCTCACAATCAGACAAGAGCCAG-3'と5'-TGCAGTGGGTTCATTTCTTC C-3'を使用した。増幅されるPCR productのサイズは210bpである。λ-like geneの検出には3つのλ-like geneに共通する部分をprimerとして使用した。増幅されるPCR productのサイズは190bpである。

3. ABC法による単染色：10分間アセトン固定された骨髓細胞に一次抗体（mouse anti-human IgM (μ)またはmouse anti-human IgG (κ))をつけて40分間静置する。次に、二次抗体（biotin-goat anti-mouse IgG）に30分間、更にABC (avidin-biotin complex) 液に30分間つけて静置した後、PBS (phosphate-buffered saline) で30分間洗浄した。DAB (diaminobenzidine) につけて（5分以内）発色させた後、ヘマトキシリン染色を行った。

4. サザンブロット法：probeはVpreB, J<sub>H</sub>, C<sub>μ</sub>, C<sub>γ1</sub>をそれぞれ文献に従って作製した。好中球から抽出した8 μgのDNAを制限酵素で切断した。DNA断片の大きさに従ってDNAを分離するためにアガロースゲル中で電気泳動を行った。ゲル中のDNAをアルカリ変性で1本鎖にしたあと、ナイロン膜に移した。probeはバッファー中でナイロン膜上のDNAに特異的に結合させた（ハイブリダイゼーション）。ナイロン膜を洗浄して非特異的結合を除いた後、X線フィルムでDNA断片をバンドとして検出した。

### 〈研究結果〉

1. 全患者においてT細胞マーカーであるCD 3, CD 4, CD 8 は正常値であったが, B細胞マーカーであるCD 19は低下していた。

2. PCR法: PBMCsでは健常人, 症例 1, 2, 4, 6 に, またLCLや骨髄細胞では健常人で210bpのbandが確認され, VpreBの発現が証明された。更に症例 1, 2 の骨髄細胞でも痕跡程度ではあるが210bpのbandが確認された。λ-like geneの発現に関しては, LCLのみに190bpのbandが確認された。尚, λ-like geneに関しては骨髄細胞は使用していない。

3. ABC法: 症例 1, 2 の骨髄においてμ, κ抗体で染色される細胞が確認された。

4. サザンブロット法: 健常人, 症例 1-7 の好中球から抽出されたDNAはVpreB probeと結合して15kb (EcoR I で切断), 2.7kb (Hind III で切断) の位置にbandとして確認された。健常人, 症例 1, 2 のDNAはC<sub>μ</sub> probeと結合して11.5kb (Hind III で切断), 1.9kb (Pst I で切断), 1.3kb (EcoR I で切断) の位置に, J<sub>H</sub> probeと結合して17.0kb (EcoR I で切断), 9.0kb (Hind III で切断) の位置に, C<sub>γ1</sub> probeと結合して10.0kb (BamH I で切断), 2.1kb (Pst I で切断) の位置にbandとして確認された。これらの結果はコントロールのDNAと比較して症例 1-7 のDNAにdeletionやlarge mutationがないことをあらわしていた。

以上より, あるタイプのCVIの患者ではSLCの発現が欠損しているわけではなく, 正常人と比較して弱いことが推測され, これはCVI患者におけるB細胞機能不全の病因解明の一助となると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

申請者矢野 充は, B細胞に欠陥を有するタイプの7人のcommon variable immunodeficiencyを対象にVpreBとλ-like geneの発現について検討し, 以下の結果を得た。検索し得た2症例の骨髄細胞ではVpreBの発現が対照に比して弱い, μ, κ抗体により染色されL鎖の再構成は生じていた。これは, あるタイプのCVIの症例ではsurrogate light chainの発現が欠損しているわけではなく, 正常人と比較して弱いことが推測された。このことは, CVIの病因解明につながるものと考えられる。

この研究は小児科学ならびに臨床免疫学の研究の進歩発展に, 少なからず寄与するところが大きいものと認める。

---

#### [主論文公表誌]

Expression of surrogate light chain in common variable immunodeficiency

平成7年発行予定 Experimental and Clinical Immunogenetics