

氏名 (本籍)	鈴木 啓子 (愛知県)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	甲第 753 号
学位授与日付	平成 20 年 3 月 25 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Induction of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ gene expression in selective immunoglobulin A deficiency
審査委員	(主査) 教授 近藤 直実 (副査) 教授 高見 剛 教授 清島 満

論文内容の要旨

IgA には IgA1, IgA2 の 2 つのサブクラスが存在し, それらをコードする $\alpha 1$, $\alpha 2$ 遺伝子は極めて相同性が高いが, ヒンジ領域において $\alpha 2$ 鎖は $\alpha 1$ 鎖と比較し 13 個のアミノ酸配列が欠如している。IL-4, IL-10, TGF- β などのサイトカインが IgA サブクラスの産生において重要な働きをしていることが報告されている。

IgA 欠損症は最も頻度の高い免疫不全症である。日本人において約 18,000 人に 1 人と報告されている。IgA 欠損症は IgA のみの低下を示し, 他の免疫グロブリンや T 細胞機能には異常が認められないことが多い。その病態には IgA へのクラススイッチの障害等が想定されているが, 不明な点も多い。一部の症例に α 遺伝子の欠損や transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor (TACI) の遺伝子変異等の報告がされている。IgA 欠損症の病態を詳細に明らかにするために IgA サブクラスの発現比を検討することは有用と考えられる。そこで, IgA 欠損症患者について IgA サブクラスの発現比を PCR と ELISA を用いて解析した。

1. 研究対象および研究方法

- 1) 3 例の選択的 IgA 欠損症患者, 5 例の部分 IgA 欠損症患者, 2 例の二次性 IgA 欠損症患者, 10 例の健常コントロールを対象とした。
- 2) ヘパリンを加えた末梢血より末梢血単核球細胞 (PBMCs) を分離し, phorbol myristate acetate (PMA) と recombinant human TGF- $\beta 1$ にて刺激を行う群と, 刺激を行わない群 (無刺激) に分け, 24 時間の培養を行った。
- 3) 培養後の PBMCs を用い, 2 μ g RNA より cDNA を合成。 $\alpha 1$, $\alpha 2$ 遺伝子の全く相同な部位にプライマーを設定し, PCR 法を施行した。 $\alpha 1$, $\alpha 2$ の PCR 産物の 39 塩基の差を利用し, これらの PCR 産物を 4% アガロースゲルにて 120 分電気泳動を行った。
- 4) ethidium bromide にて染色後, ゴンデンシトメーターにてバンドのシグナルの強度の計測を行い, $\alpha 1/\alpha 2$ 遺伝子の発現比を算出した。
- 5) ELISA にて血漿中の IgA, IgA1, IgA2 蛋白量の定量を行い, IgA1/IgA2 比を算出した。

2. 結果

- 1) 健常コントロールにおける $\alpha 1$ および $\alpha 2$ 遺伝子の発現
電気泳動により, $\alpha 1$, $\alpha 2$, hetero-duplex formation の 3 つのバンドを認めた。いずれの健常コントロールにおいても, $\alpha 1$ 遺伝子優位の発現を認めた。 $\alpha 1/\alpha 2$ 遺伝子の発現比は無刺激と TGF- $\beta 1$ および PMA の刺激を比較した場合, 有意差を認めなかった。
- 2) IgA 欠損症患者における $\alpha 1$ および $\alpha 2$ 遺伝子の発現
選択的 IgA 欠損症患者 3 例において, 無刺激では $\alpha 1$ および $\alpha 2$ 遺伝子の発現が認められなかった。 TGF- $\beta 1$ および PMA の刺激により 2 例において $\alpha 1$ および $\alpha 2$ の遺伝子発現が誘導され

た。部分および二次性 IgA 欠損症患者においては、TGF- β 1 および PMA の刺激下で、1 例を除き α 1 および α 2 遺伝子の発現を認めた。1 例では α 2 遺伝子の発現のみ認めた。この症例のゲノム遺伝子を解析した結果、本邦で 2 例目の α 1, γ 2, γ 4, ϵ 遺伝子欠損症であることが判明した。 α 1/ α 2 遺伝子の発現比は選択的 IgA 欠損症患者においては、他の IgA 欠損症患者と比較して高値であった。

3) IgA, IgA1, IgA2 の血漿中濃度

健常コントロールにおいて ELISA にて計測した血漿中の IgA1/IgA2 比は 7.96 ± 4.14 に対し、ゾーンデンストメーターにて計測した PBMCs の α 1/ α 2 の遺伝子の発現比は無刺激にて 2.56 ± 1.22 、刺激で 2.35 ± 1.20 であった。ELISA にて計測した IgA1/IgA2 比と α 1/ α 2 遺伝子の発現比は、強い相関を認めた ($p < 0.05$)。IgA 欠損症患者においても IgA1/IgA2 比と α 1/ α 2 遺伝子の発現比は、強い相関を認めた。

3. 考察

IgA 欠損症患者においては、ELISA での IgA サブクラスのタンパクの計測は、その感度の点から困難であることが多い。また、PCR を用いて遺伝子発現を検討する場合、定量性が問題となる。この検討により、一つのプライマーセットを用いて、同一ゲル上で比較することで、健常コントロール、IgA 欠損症患者におけるサブクラスの遺伝子発現の解析が可能となった。

健常コントロールにおいては、 α 1 遺伝子優位の発現を認めた。しかし、TGF- β 1 および PMA の刺激ではその比には変化なく、この刺激はサブクラスに特異的な刺激ではなく α 1, α 2 遺伝子とも誘導することが明らかになった。選択的 IgA 欠損症患者 3 例中 1 例では遺伝子発現が誘導されなかった。また、部分 IgA 欠損症患者のうち 1 例は刺激存在下にて発現を認めず、さらに他の 1 例においては α 1 遺伝子発現の欠損を認めた。これらのことより、IgA 欠損症には様々な病態が存在すると考えられた。選択的 IgA 欠損症患者では、 α 1/ α 2 遺伝子の発現比は他の IgA 欠損症患者と比較して高値であり、 α 1 遺伝子の発現抑制がその病態に関与している可能性が示唆された。 α 1/ α 2 遺伝子の発現を、それぞれ分けて、検討することは IgA 欠損症の病態の分類に有用であると考えられた。

末梢血単核球細胞の α 1/ α 2 遺伝子の発現比と、血漿中のタンパクの発現比は強い相関を示したが、その程度には乖離を認めた。これは、末梢血 B 細胞と、リンパ節等の局所に存在する B 細胞とでは、IgA サブクラスの遺伝子またはタンパクの発現パターンが異なる可能性が示唆された。今後、さらにこの系を用いて多数例の IgA 欠損症の患者での検討が必要と考えられた。

論文審査の結果の要旨

申請者 鈴木啓子は、IgA 欠損症患者の病態解明を行うため、PCR と ELISA を用いて IgA 欠損症患者における IgA サブクラスの発現について検討を行った。末梢血単核球細胞の α 1/ α 2 遺伝子の発現比は、血漿中のサブクラスのタンパクの発現比と強い相関を示した。TGF- β 1 および phorbol myristate acetate の存在下で、 α 1/ α 2 遺伝子の発現比が高値を示す群と低値を示す群が存在し、IgA 欠損症の病態の多様性が明らかになった。さらに、この方法を用いて本邦 2 例目の α 1 遺伝子欠損患者を同定し得た。

この成果は、小児病態学並びに免疫学の進歩及び発展に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Induction of α 1 and α 2 gene expression in selective immunoglobulin A deficiency
Molecular Medicine Reports 1, 395-398 (2008).