

Title	Neoplastic epithelial cells express α -subunit of muscle nicotinic acetylcholine receptor in thymomas from patients with myasthenia gravis
Author(s)	Hara, Yasuo
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	https://doi.org/10.11501/3054486
DOI	10.11501/3054486
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	原	保	夫
学位の種類	医	学	博
学位記番号	第	9601	号
学位授与の日付	平成3年3月14日		
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当		
学位論文題目	Neoplastic epithelial cells express α -subunit of muscle nicotinic acetylcholine receptor in thymomas from patients with myasthenia gravis (重症筋無力症の胸腺腫瘍におけるニコチン性アセチルコリン受容体の発現)		
論文審査委員	(主査)	教授 垂井清一郎	
	(副査)	教授 西村 健	教授 津本 忠治

論文内容の要旨

(目的)

胸腺腫患者血中に種々の自己抗体が認められる。なかでも骨格筋ニコチン性アセチルコリン受容体 (AChR) に向けて抗体が産生されると、その結合により受容体の崩壊は亢進する。その結果、受容体数は減少して神経筋伝達が障害され、重症筋無力症 (MG) が発症する。しかし受容体抗体の産生過程における胸腺腫の病的意義は不明である。本研究では胸腺腫細胞が筋細胞 AChR 類似の蛋白を発現し、抗原の供給源となる可能性を AChR mRNA の発現を指標として検討した。

(方法ならびに成績)

(1) RNA の分離とノザンプロット解析

手術時に抽出した MG 患者の胸腺腫組織からグアニジンチオシアネート/セシウムクロライド法にて総 RNA を抽出した。AChR は 2 つの α と、 β 、 γ 、 δ サブユニットから構成される 5 量体で、 α サブユニットはアセチルコリン結合部位を有しており受容体の一次的役割を担う。そこで、ヒト骨格筋 AChR α サブユニット cDNA をプローブとしてノザンプロット解析を行った。正常筋組織から抽出した対照 RNA 30 μ g では α サブユニット mRNA 発現を同定できたが、胸腺腫 RNA では検出できなかった。

(2) PCR による RNA の増幅

α サブユニット遺伝子のアセチルコリン結合部位をコードする DNA 断片を標的として、その上流のセンス鎖、下流のアンチセンス鎖の配列をもつオリゴヌクレオチドプライマーを用いて PCR (Polymerase Chain Reaction) を行った。 α サブユニット cDNA を鋳型とすると 245 塩基対 (bp) の DNA 断片が増幅されることを確認した。一方、この二つのプライマーはそれぞれエクソン 5 とエクソン 6 の領域に結

合するためゲノムDNAを鋳型とすると一つのイントロンを含む約650bpのDNA断片が特異的に増幅された。この塩基長の差からmRNAを鋳型とする増幅実験におけるゲノムDNAの混入を除外できる。

MG患者の胸腺腫と非MG患者の脳、心、筋の各組織より抽出したRNAを鋳型として、ランダムヘキサプライマーと逆転写酵素を用いてcDNAを合成した。次に、その一本鎖cDNAより二つの合成プライマーを用いて標的DNA断片を増幅した。胸腺腫及び、筋組織から抽出、段階希釈したRNAを鋳型としてPCRを行い、両組織における α サブユニットmRNAの発現量を比較した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動後のエチジウムブロマイド染色で標的断片を検出するには、筋組織で1.9ng、胸腺腫組織では35ngの鋳型RNAを必要とした。

(3) RNA増幅産物の解析

胸腺腫5例より抽出したRNAのうち4例から245bpのDNA断片が増幅され、この断片は α サブユニットcDNAプローブとハイブリダイズした。脳および心組織より抽出したRNAを鋳型とすると、 α サブユニットプローブと結合する増幅産物は検出されなかった。

次に、胸腺腫の上皮細胞における α サブユニットmRNAの発現について検討した。まず胸腺腫より上皮細胞を分離培養した。培養細胞が抗ケラチン抗体で染色されることから上皮由来の細胞であることを確認し、さらに胸腺筋様細胞の混入は継代培養を行うことにより除外した。その分離培養した上皮細胞RNAを鋳型として増幅実験を行った。塩基配列解析から増幅DNA断片が α サブユニットのアセチルコリン結合部位とされるアミノ酸配列をコードする領域を含むことを確認した。MG患者白血球RNAからは α サブユニットDNA断片は増幅されなかった。以上から、胸腺腫上皮に α サブユニットmRNAが特異的に発現していることが確認された。

(総括)

重症筋無力症の胸腺腫瘍にAChR α サブユニットmRNAの発現を証明した。さらにその発現の場は、腫瘍化した上皮細胞であることを明らかにした。この成績から、重症筋無力症における胸腺腫はAChRを自己抗原として提供する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、重症筋無力症患者(MG)の胸腺腫における骨格筋ニコチン性アセチルコリン受容体(AChR) α サブユニットmRNAの発現をノザンプロット解析と、より高感度なpolymerase chain reaction(PCR)法を用いて検討したものである。

その結果、ノザンプロット解析では胸腺腫における α サブユニットmRNAの発現は認められなかったが、PCR法を用いることによりその発現を証明した。さらに胸腺腫より分離培養した腫瘍性上皮細胞に α サブユニットmRNAの発現を認めた。この結果は、MGにおける胸腺腫上皮細胞がAChRを自己抗原として提示しうることを示したものであり、MGの病態解明に貢献する知見である。以上より本研究は学位に値すると考える。