OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	PNHの1症例に由来する表現型の異なるB細胞3株における病因遺伝子の解析
Author(s)	西村, 純一
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38912
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	西村純一（にしむらじゅんいち）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 11293 号
学位授与年月日	平成6年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	**PNHの1症例に由来する表現型の異なるB細胞3株における病因遺伝子の解析**
論文審査委員	（主査） 教授 木谷 照夫 （副査） 教授 木下タロウ　教授 北村 幸彦

論文内容の要旨

【目的】

発作性夜間血色素尿症（paroxysmal nocturnal hemoglobinuria:PNH）患者の血液細胞はGPI（glycosyl phosphatidylinositol）アンカー型蛋白を欠損している。自己細胞を補体から保護している膜上補体インヒビターであるDAF（decay accelerating factor）やCD59もGPIアンカー型膜蛋白であり，これらの蛋白が欠損するために自己補体の攻撃を受け，溶血性貧血を起こす。PNHは後天性の疾患で，血液系の細胞でしかこの異常は検出できないので，体細胞突然変異が血液幹細胞に生じ，その変異はGPIアンカーの生合成にかかわる遺伝子に起きているであろうと考えられていた。そこで，患者からEBウイルスを用いB細胞株を樹立しこの異常を解明しようとした。その時期に，我々のグループはPNHの病因遺伝子PIG-A（phosphatidylinisitol glycan class-A）のクローニングに成功した。しかし，PNH患者においてGPIアンカー型膜蛋白の発現をみた時，完全欠損の細胞以外に低レベル発現している分画を検出する症例が存在する。赤血球の補体感受性でも正常と非常に感受性の高い細胞の中間の感受性を示す細胞が存在する症例がある。このような事実より，異常クローンは症例によっては複数存在する可能性もあり，このことはPNHの病態解析の上でいまだ未解決の問題点である。そこで，PNHの1症例より得た3細胞株におけるPIG-A遺伝子異常の解析を詳細に行った。

【方法・結果】

1）PNH患者由来B細胞株の樹立

末梢血B細胞が高率にGPIアンカー型膜蛋白を欠損する患者（TK）を選び，そのBリンパ球をEBウイルスによりトランスフォームし3種の細胞株を得た。これらの細胞株がPNH型か正常型かを，GPIアンカー型蛋白であるDAF，CD59，LFA-3に対する単クローン抗体を用い膜蛋白発現様式により判定した。患者TKからは正常細胞株（TK-4^{+}）と異常細胞株（TK-1^{-}，TK-14^{-}）を樹立した。この2種類の異常株のうちTK-14^{-}株は，GPIアンカー型蛋白の発現が全くみられないのに対し，TK-1^{-}株は低レベル発現しており異なったクローンであることが示唆された。次に，B細胞系マーカーであるCD19（Leu12，B4），CD20（Leu16，B1），CD21（CR2）を調べたところ，TK-4^{+}株でCD21の発現が若干低かったが，異常株では全て正常レベル発現されており，ペプチドアンカー型蛋白の発現は正常で，GPIアンカー型蛋白だけが選択的に欠損しているというPNHの性格を保持した細胞株であることが確認された。

2）PNH患者由来B細胞株におけるPNH病因遺伝子PIG-Aの解析

PIG-A 遺伝子の発現をこれら細胞株においてノーザン•ブロッティングにて解析したところ，完全欠損株（TK-14$^-$）では全くバンドを認めず，不完全欠損株（TK-1$^-$）では正常サイズのバンドを少量認めた。PIG-AmRNA の発現をさらに RT-PCR 法を用いて半定量法にて解析したところ，ノーザン・ブロッティングと同様の量的差異を認めた。この原因を解明するために，まずプロモーター領域の解析を Luciferase assay を用いて行ったが，いずれの細胞株においてもプロモーター活性の差異を認めなかった。次に，PIG-A 遺伝子の翻訳領域を PCR 法にて増幅し，MDE（mutation detection enhancement）ゲルで解析したところ，TK-14$^-$ 株においてエクソン 5 に異常を認め，シークエンスにてエクソン 5 の前半部にチミンの挿入を確認したが，TK-1$^-$ 株では同部に異常を認めなかった。この異常を持った cDNA を人工的に作成し発現ベクターに組み込み，PIG-A 欠損 GPI アンカー型蛋白欠損ヒトリンパ芽球（JY-5）にトランスフェクションして GPI アンカー型蛋白の発現を回復するか検討した。この異常を持った PIG-AcDNA には発現回復の活性はなかった。TK-1$^-$ 株は，全エクソン領域を MDEゲルにて解析したが異常は検出できなかった。

【考察】

患者 TK より樹立した 2 細胞株（TK-14$^-$, TK-1$^-$）は，ペプチドアンカー型蛋白の発現は正常で，GPI アンカー型蛋白だけが選択的に欠損しているという PNH 性格を保持した細胞株であった。TK-14$^-$ 株は，完全欠損株，TK-1$^-$ 株は不完全欠損株であった。PIG-A遺伝子 mRNA も TK-14$^-$ 株では検出感度以下，TK-1$^-$ 株では低レベル発現しており，GPI アンカー型膜蛋白の発現と対応していた。TK-14$^-$ 株においては PIG-A のエクソン 5 内に体細胞突然変異がみられたが，TK-1$^-$ 株にはこの変異が存在しなかった。すなわち，この 2 株は異なる異常クローンであることが示された。この結果は，PNH において複数の異常クローンを持つ症例が存在することをはじめて明確にした。

論文審査の結果の要旨

本研究は，PNH における形質発現の多様性を解明する目的で，PNH の 1 症例より得た 3 細胞株における PIG-A 遺伝子異常の解析を行ったものである。患者 TK より樹立した 2 細胞株（TK-14$^-$, TK-1$^-$）は PNH の性格を保持した細胞であり，TK-4$^+$ 株は正常株であった。PNH 細胞株のうち，TK-14$^-$ 株は完全欠損株，TK-1$^-$ 株は不完全欠損株であり，この GPI アンカー型膜蛋白の発現は PIG-A 遺伝子 mRNA 量とそれぞれ対応していた。TK-14$^-$ 株においては PIG-A のエクソン 5 内に体細胞突然変異がみられたが，TK-1$^-$ 株にはこの変異が存在しなかった。すなわち，この 2 株は異なる異常クローンであることが示され，この結果は，PNH において複数の異常クローンを持つ症例が存在することをはじめて明確にしたものであり，PNH の病態を解明する上で極めて重要であり学位に値する研究であると考えられる。