

P-7.

アンチセンス DNA を用いた vav 機能の解析

(小児科学)

○加藤直樹, 小町昭彦, 星加明德

(免疫学)

豊田博子, 浅倉英樹, 水口純一郎

【目的】 vav は造血系に特異的に発現し, リンパ球系細胞の成熟・分化に重要な役割を果たしている. 複数のドメインを有している構造より, 多数の因子との相互作用を示唆している. 実際, SLP-76, PI-3キナーゼ等と複合体を形成し, リンパ球受容体を介するシグナル伝達の連結に重要な役割を果たしていることが報告されている. 今回, 我々は, アンチセンス DNA を用いて, 細胞増殖・分化における vav の果たす役割を検討することを試みた.

【方法】 RT-PCR 法は定法により行った. vav 発現はウエスタンブロット法を用いて検討した. 遺伝子導入はエレクトロポレーション法を用いた.

【経過および結果】 マウス脾臓 RNA より RT-PCR 法を用いて vav 遺伝子を増幅し, 発現ベクター (pMKITNeo; 丸山博士より供与) にアンチセンス方向で挿入した. ウエスタンブロット法で vav の発現が認められた B リンフォーマ細胞株 CH31 にアンチセンス vav 遺伝子を導入した. 薬剤 (G418) 耐性を示した細胞株を vav 発現を指標としてスクリーニングし, 内因性 vav が著明に抑制されている数種類の細胞株を得た. これらの細胞株の増殖やアポトーシスに対する感受性をミトコンドリア膜電位の測定, 細胞表面上の IgM, class II の発現, フローサイトメーターを用いた抗 IgM 抗体誘導性のアポトーシス感受性などについてワイルドタイプと比較検討した.

※ P-8.

MPO-ANCA 関連血管炎における MPO-ANCA 産生機序および血管内皮細胞障害に果たす細胞接着因子, CD40/CD40L の関与について

(八王子・腎臓科)

○岩堀 徹, 吉田雅治, 稲田英毅, 伊保谷憲子

【目的】 ANCA は, 好中球細胞質内酵素に対する自己抗体である. Wegener 肉芽腫症, 壊死性半月形形成性腎炎など細小血管炎の病態形成に関与することが知られている. 我々は今回, ANCA 関連血管炎における自己抗体産生機序と血管炎発症機序の解明を試みた.

【方法】 1. ANCA 対応抗原の一つミエロペルオキシダーゼ (MPO) 未分化型にのみ存在する上流部を MPO の cDNA から PCR で増幅後, pET11d ベクターに組み込み, 大腸菌に導入して発現させた (preMPO). preMPO と患者血清との反応性を ELISA にて検討した. 2. ANCA 関連血管炎患者血清から ProteinA カラムを用いて IgG 分画を精製し, 培養人臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) 上に 5 mg/ml の濃度で添加した. 数時間培養した後, ICAM-1, VCAM-1, E-selectin の HUVEC 上での発現を蛍光抗体法 (IF) により染色した. また, Th₁ 系免疫反応に関与するとされる細胞表面抗原 CD40 とそのリガンド CD40-L の発現を血管炎部組織標本を用いて酵素抗体法にて染色した.

【結果】 ANCA 関連血管炎患者 30 例中 preMPO に対する陽性率は 25% だった. preMPO に対して陽性例は臨床経過が急速だが予後が良く, 陰性例は臨床経過は緩慢だが死亡率 30% と予後不良であった.

ANCA 血管炎患者血清 IgG 単独を HUVEC 上に添加すると, E-selectin の発現が IF にて認められ, 一部の ANCA 血管炎患者血管炎局所で, CD40, CD40-L の発現が酵素抗体法にて認められた.

【結論】 ANCA 関連血管炎の認識抗原の一部に未分化型 MPO が重要である可能性が示唆された.

ANCA 血管炎発症に E-selectin, CD40/CD40-L 相互作用が関与している可能性が示唆された.