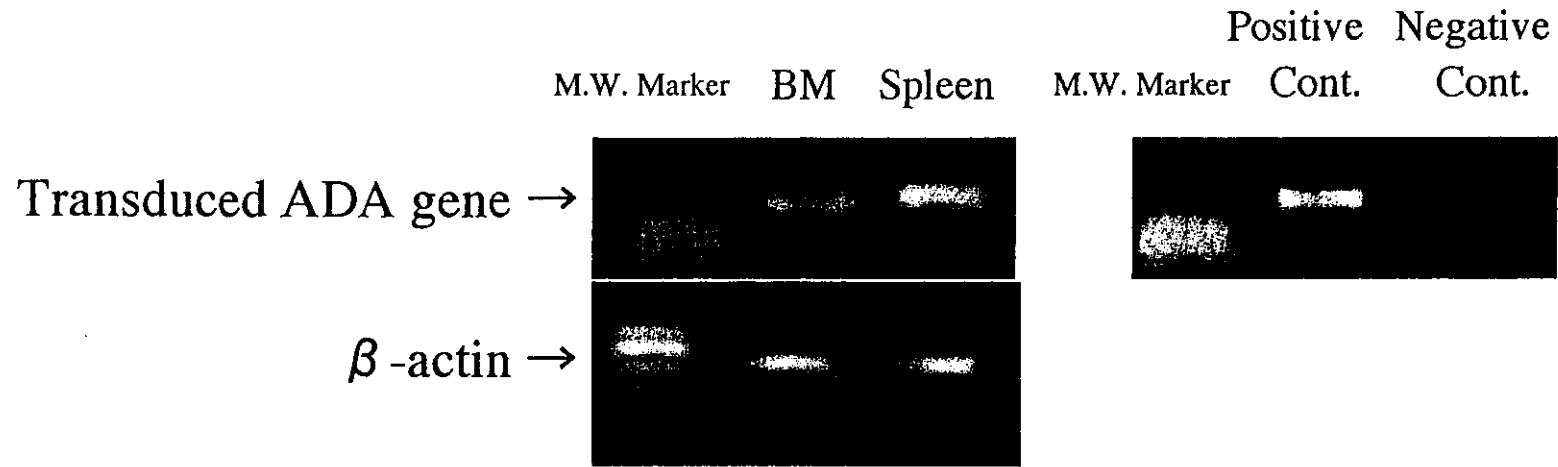


NOD/SCIDへの遺伝子導入臍帯血CD34陽性細胞移植実験 導入遺伝子の検出



研究成果7

研究成果 7

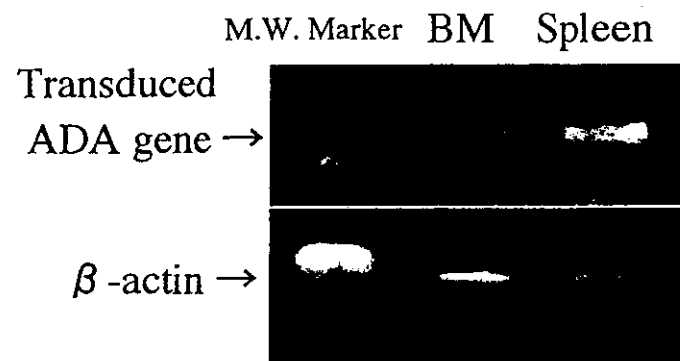
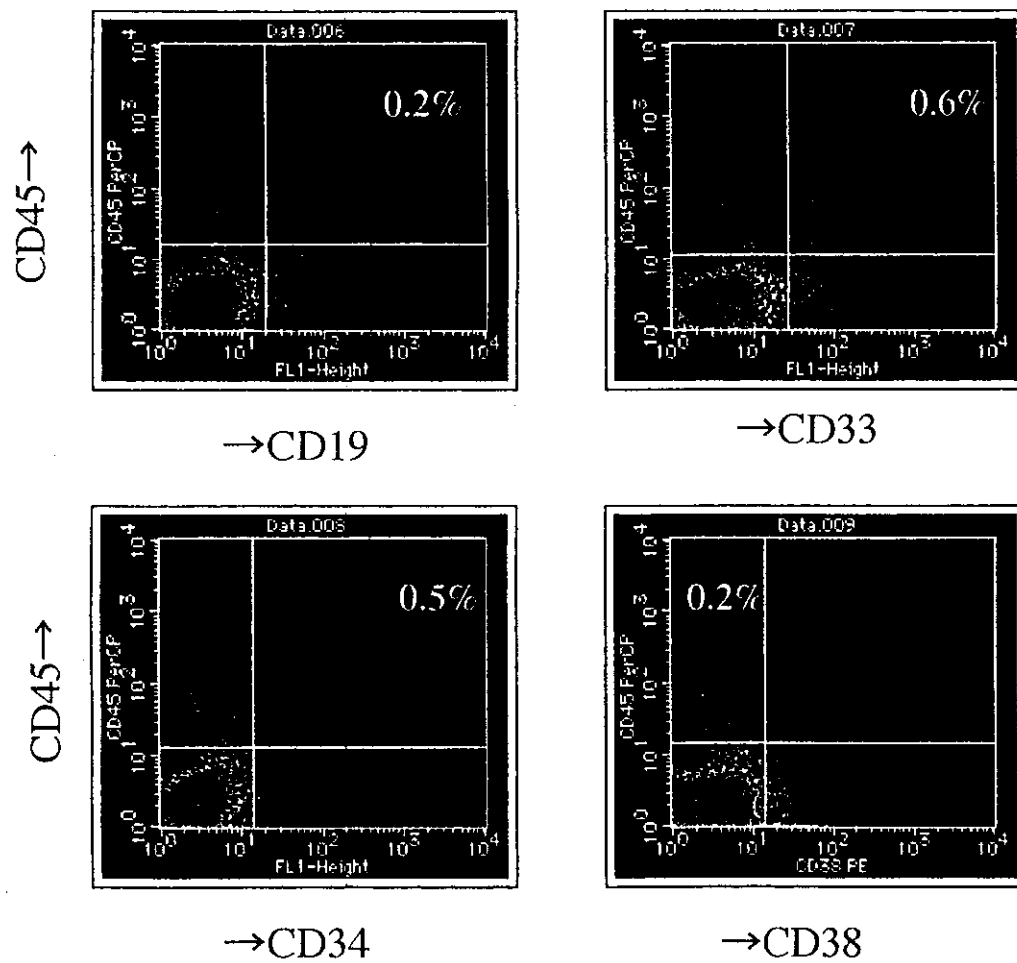
NOD/SCID マウスへの遺伝子導入臍帯血 CD34 陽性細胞の移植実験
；導入遺伝子の検出

研究成果 6 で検討した NOD/SCID マウス骨髄、脾臓細胞から DNA を抽出し、ベクターにて導入した ADAcDNA を PCR 法にて検出した。コントロールの遺伝子として β -actin を用いた。

骨髄(BM)、脾臓(Spleen)由来のサンプルの結果を左に示す。

骨髄、脾臓それぞれの細胞から導入遺伝子が検出された。

NOD/SCIDマウスへの遺伝子導入患児骨髄CD34陽性細胞の移植実験



研究成果8

骨 髄

研究成果 8

NOD/SCID マウスへの遺伝子導入患児骨髓血 CD34 陽性細胞の移植実験

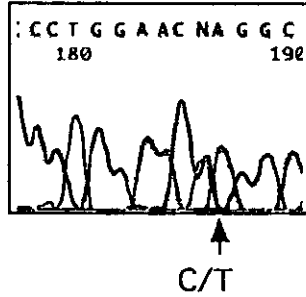
研究成果 6, 7 同様に症例 1 からの骨髓血を用いて遺伝子を導入・NOD/SCID マウスへ移植後、FACS 解析と導入遺伝子の検出を試みた。

左は FACS の結果、右に導入遺伝子検出の結果を示す。

患者由来の遺伝子導入骨髓血 CD34 陽性細胞でも研究成果 6, 7 同様に移植した遺伝子導入後の血液幹細胞がマウスの体内で、いくつかのリネージのヒト細胞に分化したことが示された。またマウス骨髓・脾臓細胞に導入遺伝子が検出された。

症例 2 の変異解析

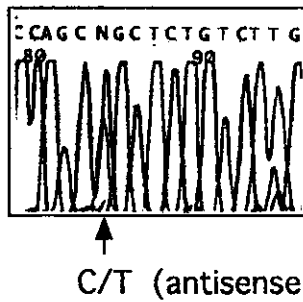
Mutation #1(paternal origin) in exon 4



Gln 119 → stop

creates Bfa I recognition site(CTAG)

Mutation #2(maternal origin) in exon 8

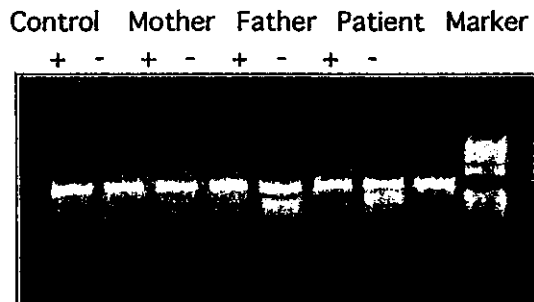


Arg 235 → Gln

creates Pvu II recognition site(CAGCTG)

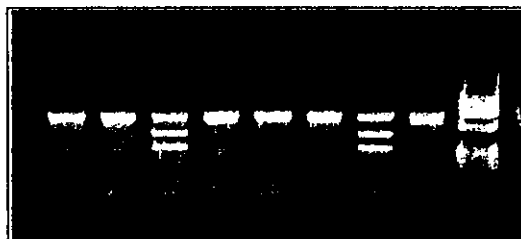
Bfa I digestion

Fragment exon 4



Pvu II digestion

Fragment exon 7-9



研究成果9

研究成果 9

症例 2 の変異解析

上部；それぞれの ADA 遺伝子のアリルの変異解析（変異を矢印で示す）

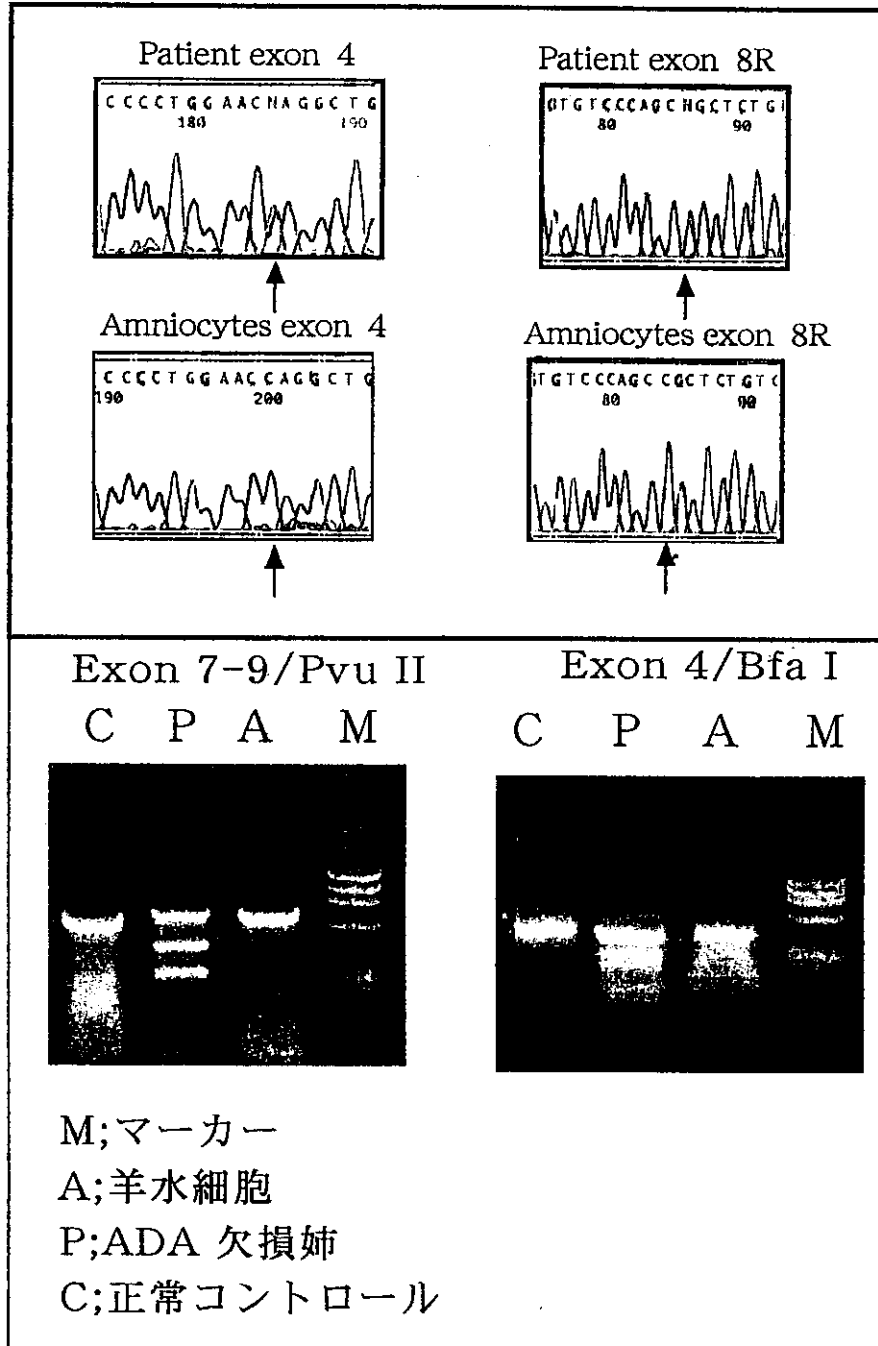
ADA 遺伝子をいくつかのフラグメントに分割・増幅して塩基配列を検索し、変異を同定した。

父由来の変異を上段(Glu119→stop)、母由来の変異(Arg235→Glu)を下段に示す。

下部；制限酵素による ADA 遺伝子変異の確認

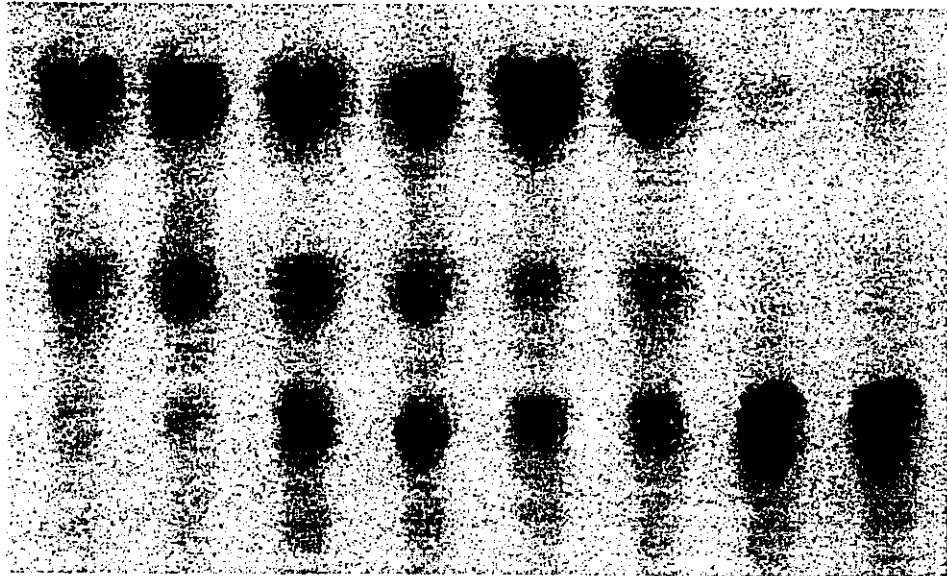
それぞれの変異により制限酵素(Bfa I と Pvu II)認識部位が生じ、簡便に変異が確認可能であった。それぞれの変異が両親から由来したことが示された。酵素処理の有無を + と - で示した。

症例2同胞の出生前診断-遺伝子解析



研究成果 10-A

症例2同胞の出生前診断 -ADA活性の解析



羊水細胞 Hela細胞 EBLCL back ground

ADA活性(U)	
症例2 同胞胎児羊水細胞1	323.54
症例2 同胞胎児羊水細胞2	321.68
Hela細胞1	228.93
Hela細胞2	256.28
正常者 EB LCL1	276.39
正常者 EB LCL2	283.74

研究成果 10

出生前診断の同意の後、妊娠中の母から羊水細胞を採取し、
遺伝子解析(A)、 ADA 活性(B)を検討した。

10-A ;

上部 ; ADA 遺伝子アレルの変異解析

上段の症例 2 に認める変異は下段の羊水細胞 (同胞胎児由来) に
は認めなかった (矢印)。

下部 ; 制限酵素による確認

レーンはそれぞれ、コントロール (C)、症例 2 (P)、羊水細胞 (A)、
分子量マーカー (M) を示す。症例 2 のみに異常バンドを認めた。

10-B ; ADA 活性の解析

上段 ; 薄層ロマトグラフィーの展開像

^{14}C -ADA を用いた薄層クロマトグラフィーにて羊水細胞の ADA
活性を測定した。それぞれのスポットの放射線量を定量し、ADA
活性を算定した。

下段 ; ADA 活性値

羊水細胞は正常細胞に匹敵する酵素活性を示した。