

HLAと抗体

2008.8
6号

臨床と検査の架け橋をめざして…

Contents

●KIRのHLA認識と造血幹細胞移植	1	●虎の門ニュース	8
●HLAと抗体など	7	●数独	8

KIRのHLA認識と造血幹細胞移植

東京都赤十字血液センター 屋部 登志雄

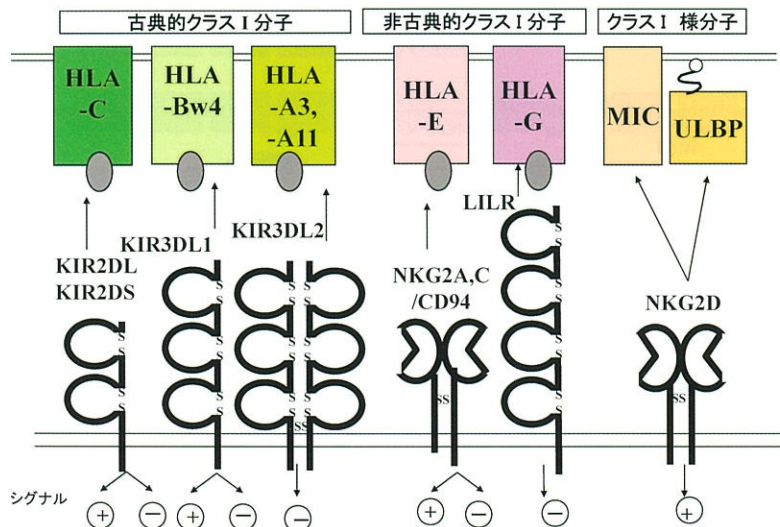
はじめに

ナチュラルキラー細胞（NK）はその名が示すように自然免疫系に属するリンパ球で、微生物感染細胞やがん細胞を傷害する一方、サイトカイン産生や他の細胞との相互作用により獲得免疫系の反応調節も行います。NKは細胞表面に発現した受容体を用いて、ウイルス感染やがん化した標的細胞を認

識し排除しますが、その際に正常細胞から標的細胞への変化を表す危険信号のひとつとしてHLA抗原を利用しています。Killer Ig-like receptor (KIR)が古典的クラスI抗原、特にHLA-Cの発現変化を認識する一方、NKG2Dが感染、がん化、ストレス刺激などにより細胞表面に発現してくるMICやULBPなどのクラスI関連分子を認識します。またNKG2A/Cが非古典的ク

ラスI抗原のHLA-Eを、LILRがHLA-Gを認識します(図1)。抗体やT細胞受容体による認識においてあまり中心的ではないこれらの分子をNK受容体が利用するのは、B細胞、T細胞による生体防御反応をNKが補っているためとも考えられます。NKが同種(アロ)細胞を認識する場合があります。ここではKIRによる古典的クラスI認識について述べます。

図1 HLA認識NK受容体の種類



KIR, LILRはイムノグロブリン様型、NKG2はレクチン様型です

KIRとリガンド特異性

KIRによる標的細胞の認識は“ミッシングセルフ”と呼ばれる機構によります。古典的クラスI抗原はほぼ全ての有核細胞表面に発現し自己マーカーとして機能しています。感染細胞やがん細胞のクラスI分子上の非自己抗原ペプチドをCD8陽性キラーT細胞が認識し細胞の破壊除去を行います。しかし、感染細胞やがん細胞の中には細胞表面のクラスI発現を低下、あるいは消失しているものがあります。これらの細胞はキラーT細胞の監視からは逃れますが、NKが反応して破壊除去を行います。抑制型KIRは正常自己細胞のクラスIの存在を認識し、抑制性のシグナルを出すことでNKの自己反応性を防止しています。しかしクラスI発現が低下あるいは消失すると、抑制性シグナルが減弱しNKは活性化して細胞傷害性や炎症性サイトカイン分泌により標的細胞排除を行います。つまり自己マーカーを消失した“ミッシングセルフな”細胞を攻撃するわけです。

抑制型KIRはリガンドクラスI分子と結合すると細胞質部分のITIMと呼

ばれる配列領域により細胞の活性化を抑える負のシグナルを伝達します。一方活性化型KIRはDAP12分子と膜貫通部分の荷電アミノ酸残基を介して結合して、リガンド分子と結合するとDAP12のITAMと呼ばれる配列領域を介して細胞を活性化する正のシグナルを伝達し、パーフォリン、FasLによる標的細胞傷害性の惹起やIFN- γ 、TNF- α といった炎症性サイトカイン分泌などを起こします。活性化型KIRもクラスIをリガンドとして認識するのでKIRおよび他の受容体からの正負のシグナルのバランスによりNK活性は調節されますが、抑制型シグナルが優位に働く場合が多いようです。KIRの命名法は細胞外イムノグロブリン様ドメインの数により2Dと3Dに、細胞質領域の長さ（ITIMあり、抑制型）、長さ（ITIMなし、DAP12と結合、活性化型）によりそれぞれL（Long）、S（Short）に分類され、さらに遺伝子座、アミノ酸配列の違いなどにより、KIR2DL1～5のようなサブタイプが存在します。単一のNKが抑制型、活性化型を含めて複数の受容体を表面発現することが可能なので、個体の中の

NKは多様な受容体発現レパートリーを持つ不均一な亜集団から構成されています。KIRは一部のT細胞でも発現し、T細胞受容体からのシグナルを抑制または増強します。

KIRリガンドの中心はHLA-Cであり、KIR2Dが認識します（図2）。HLA-CはCw1-w8の抗原特異性に加えアレルレベルでは300種類以上が報告されていますが、KIRはそれらをわずか2種類のリガンド特異性（C1,C2）として識別します。認識に重要な領域は α 1ドメインの77～83番付近の配列で、C1（Cw1,w3,w7,w8）は80番目のアミノ酸がアスパラギンであり、2DL2、2DL3、2DS2に認識されます。一方、C2（Cw2,w4,w5,w6）は80番目のアミノ酸がリシンで、2DL1、2DS1に認識されます。HLA-B46も例外的にC1エピトープをもっています。HLA-A、Bを認識するのはKIR3Dで3DL1、3DS1がHLA-Bw4（HLA-AおよびHLA-Bの一部）、3DL2がHLA-A3、-A11を認識します。日本人健常者集団におけるKIRリガンドのおよその頻度を図3に示しました。クラスIアレルのかなり

図2 HLA-C抗原KIRリガンド

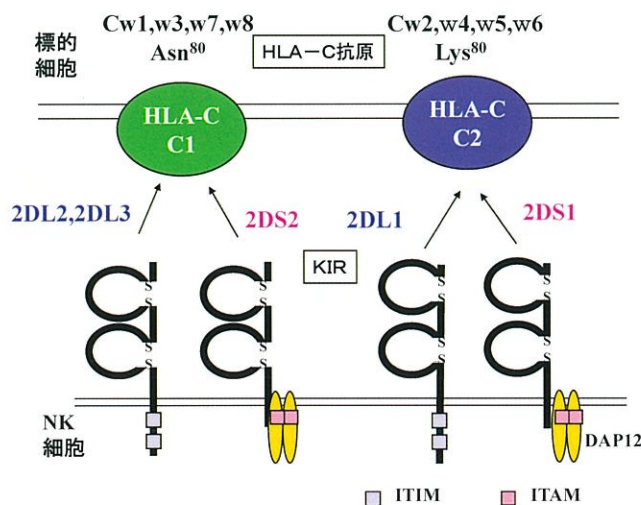


図3 日本人集団KIRリガンド特異性頻度

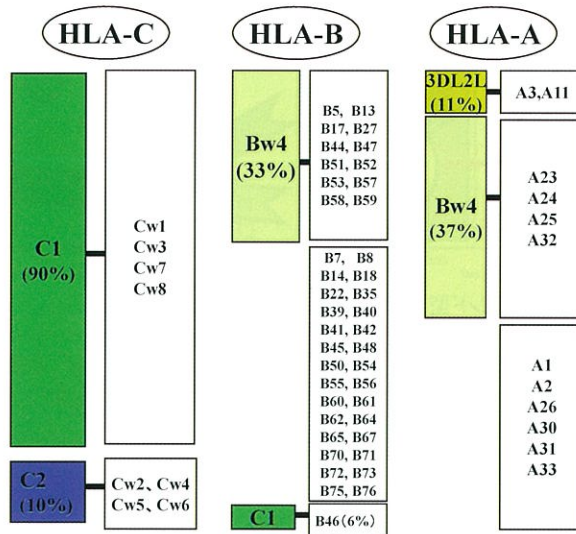
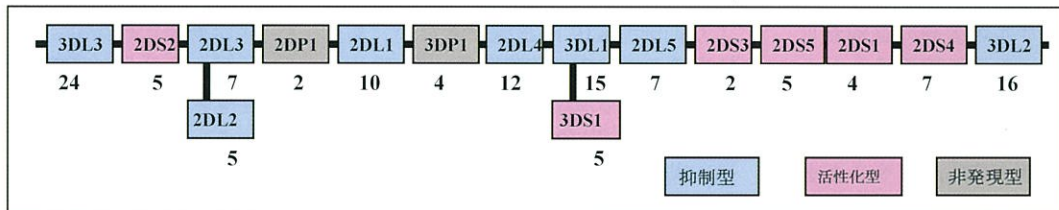
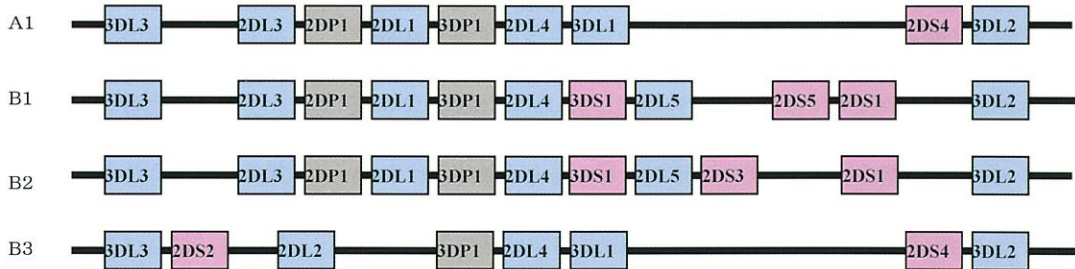


図4 KIR遺伝子構成とハプロタイプ



代表的ハプロタイプ



各遺伝子の下の数字は報告されているアレル数を示します。2DL2と2DL3、3DL1と3DS1はそれぞれ同じ遺伝子座のアレルの関係になります。ハプロタイプは日本人集団の報告はまだないので韓国人集団の報告によりました (Whang DH et al. Hum Immunol. 2005; 66: 146-154)。

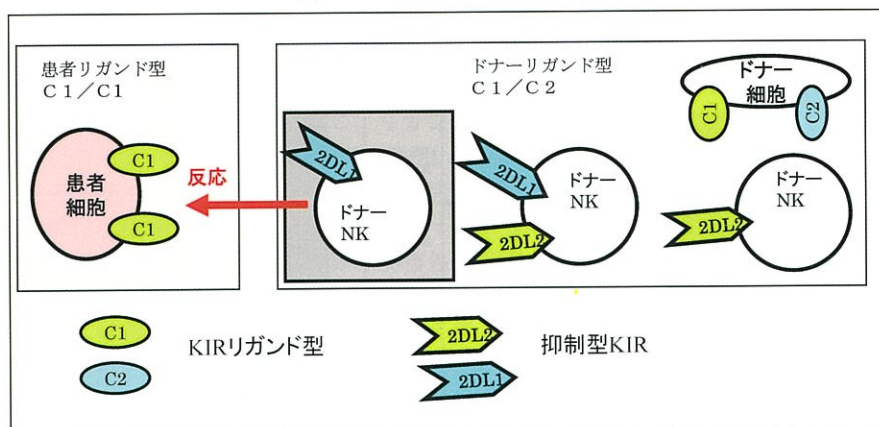
分かります。

KIR 遺伝子領域には6～14個の遺伝子座が非常に近接して存在し、各座には多型性があり20以上のアレルが報告

されている座もあります(図4)。そのために個人のもつKIR遺伝子レパートリーは多様なものとなります。日本人集団の場合ほとんどの個体が大部分の

抑制型KIR遺伝子をもつことが判明しています。一方活性化型KIR遺伝子数は個人により差が大きく(0～6個)、日本人では活性化KIRをまったくもた

図5 KIRリガンド不適合



患者のリガンドに対応する抑制型 KIR を表面発現しないドナー NK 細胞亜集団が存在する場合

ない場合が他の集団よりも多いようです。T 細胞受容体や抗体は分化過程での遺伝子再構成により膨大な抗原レパートリーを獲得し、HLA-A、-B、-DR 座の数百種類ものアレルの差異の識別が可能ですが、KIR は遺伝子再構成をしない代わりに、遺伝子座数やアレル数を増やし、NK 上に複数の KIR を共発現させ、さらに複数の HLA アレルが共有するエピトープを認識することで、多様なクラス I 特異性に対応する戦略を採用しているものと考えられます。逆に言えば古典的クラス I 側もこうしたリガンド特異性を保持するような選択を受けてきたためにこれらのエピトープが保存されているのかもしれませんが、KIR 遺伝子レパートリー解析は 16 種類の KIR 遺伝子の有無について主として PCR-SSP 法で行われていますが、最近蛍光ビーズを用いた PCR-SSO 法によるタイピングも開発されました。

KIR 適合性と移植成績

以前から NK が移植反応に関与することが報告されていましたが、その効果には不明な点が多くありました。KIR が発見され HLA との関係が解明

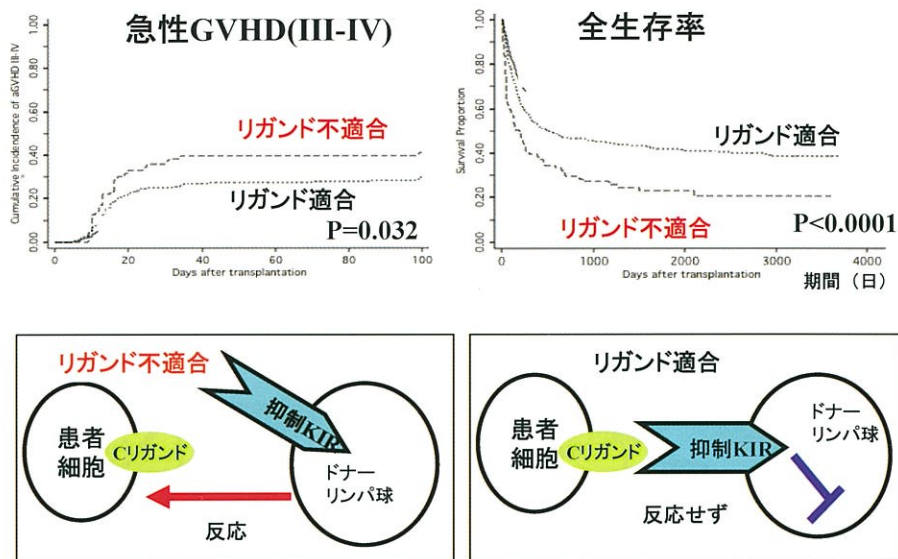
されたことにより具体的な NK の効果がわかってきました。移植における NK 反応性としては、古典的クラス I 抗原型の差異や結合ペプチドの違いにより抑制型 KIR が認識できない、あるいはそれらを活性化型 KIR が認識することでアロ反応性が起きる場合と、移植ストレスでクラス I 関連分子 MICA/B や ULBP が発現して NK が活性化する場合などが考えられます。また移植後感染症に対する NK 応答性も関係しています。認識する標的細胞やリガンド、受容体、シグナルの種類に加えて、傷害性、サイトカイン産生など機能性の違いにより、NK のアロ反応性が移植成績に有利に働く場合だけでなく不利となる場合が考えられます。

KIR と移植の研究は患者ドナー間の抑制型 KIR リガンドの比較（リガンド適合性解析、ミッシングリガンド解析など）と KIR 遺伝子型解析とに大別されます。ここでは最も多く行われているリガンド適合性解析について説明します。これはミッシングセルフ説に基づく考え方で、抑制型 KIR 発現レパートリーが自己クラス I リガンド型に合わせて形成されるとすると、ドナーが持つリガンドを患者が持っていない場

合（ドナーからみて患者細胞は“ミッシングセルフ”ということになります）には、ドナー NK の中には患者のリガンドでは抑制型 KIR が反応しないような亜集団が存在し、これらは患者細胞に対してアロ反応性を発揮することになります。この組み合わせを KIR リガンド不適合と呼びます。抑制型 KIR は“自己リガンドの不在”に対して反応するので適合性の方向は“非自己の存在”に反応する T 細胞の場合と反対になります（この時活性化型 KIR のことは考慮していません）。日本人集団では C1 リガンド頻度が高いため、リガンド不適合のほとんどは患者が C1 ホモ、ドナーが C1C2 ヘテロの組み合わせの場合となります（GVH 方向不適合です）。この時に C1 抑制型 KIR (2DL2 および 2DL3) 陰性、C2 抑制型 KIR (2DL1) 陽性のドナー NK 亜集団は患者細胞に C2 が不在なため抑制性シグナルが出ないので患者細胞に対するアロ反応性を発揮します（図 5）。

森島らは骨髓バンク (JMDP) を介した非血縁者間 HLA-A、B、DR 血清型一致移植の中から T 細胞除去処理をせず Anti-thymocyte globulin (ATG) 投与を行わず、GVHD 予防法としてシク

図6 KIRリガンド不適合の効果（文献3より引用改変）



KIR リガンド不適合の場合、III-IV 度の重症の急性 GVHD 発症率が高く、全生存率が有意に低下しています。抑制型 KIR からのシグナルがなくドナー NK が活性化するためと考えられます。

ロスボリンおよび短期メトトレキセート投与を行った移植症例について解析しました¹⁾。GVH 方向 KIR リガンド不適合では重症の急性 GVHD 発症率が高く、生存率が低下していました（図 6）。NK が患者細胞に反応して活性化され、炎症性サイトカインの分泌によりアロ T 細胞反応性を増強する、あるいは NK の細胞傷害性により直接的に GVH 反応を引き起こすことが考えられます。一方期待していた NK アロ反応性の GVL 効果による白血病再発抑制効果は見られませんでした。生存率が低下するので JMDP の場合は患者ドナーの KIR リガンドを適合させる方が良いと考えられます。HLA-C 型を適合させると KIR リガンド型も適合するので HLA-C 適合ドナーを選択することで移植成績の向上が期待されます。

一方血縁者間ハプロ一致（つまりハプロタイプ片方が不一致）移植からは正反対の結果がイタリアペルージャ大学グループから報告されています²⁾。

KIR リガンド不適合（HLA-C および HLA-B リガンド）急性白血病移植では拒絶及び急性 GVHD 発症が起こらず、AML の場合は再発がなく、無病生存率も良好でした。一方 ALL では再発の抑制や生存率向上は観察されませんでした。彼らはドナー由来 NK が AML 腫瘍細胞をアロ特異的に傷害する実験結果を得たので、AML 患者では NK のアロ反応性による GVL 効果で再発が起きなかったと推測しています。またマウス実験でドナー NK がレシピエント抗原提示細胞を傷害する結果が得られたことから、アロ反応性ドナー NK が患者の抗原提示細胞を傷害したためにドナーキラー T 細胞への患者のアロ抗原提示が低下し、GVHD 発症が抑制されるというモデルを提出しました。これらの結果は KIR 適合性を考慮したドナー選択による移植成績の向上と NK 細胞アロ反応性を利用した細胞治療への期待を抱かせるものです。彼らの場合 HLA がハプロ不一致であり、

また T 細胞除去、CD34 抗体による幹細胞純化处理、患者に ATG は投与で、サイクロスポリン、タクロリムス、メトトレキセートなどの GVHD 予防薬は非投与という移植レジメです。これは移植細胞中にドナー成熟 T リンパ球が殆ど存在しない系です。一方 JMDP の場合はかなりの数のドナーリンパ球が混在する移植レジメでありアロ反応性ドナー成熟 T 細胞の効果がより大きいものと考えられます。このようにアロ反応性ドナー NK の効果は疾患や移植レジメの違いで変わるために詳細な条件検討が重要となります。

以上は抑制型 KIR の効果を見たものですが、活性化型 KIR と HLA リガンドの組み合わせの効果もわかってきました。我々は KIR リガンド不適合症例においてドナーの KIR 遺伝子の有無を PCR-SSP 法で調べました³⁾。前述したようにほとんどの個体が大部分の抑制型 KIR 遺伝子を持っていたので、患者クラス I リガンドに対する抑制 KIR 遺



連載 HLAと抗体など

(株)ベリタス顧問 小川公明

今回はMICについて解説を致します。これまでの、腫瘍免疫分野で注目されていたMICが近年、移植分野でも注目を集めるようになりました。

MICとは

MICとは、MIC (MHC class I chain-related gene protein) 分子であり、抗原としてMICAとMICBが知られています。

MICを規定する遺伝子は、第六染色体 短腕部分のMHC Class I領域に存在し、HLA-Bよりほんの少しセントロメア側にMICA、やや離れてMICBの順に並んでいます。

MHCクラスI分子では、かつての血清学的タイプング時代から知られているHLA-A、B、Cを古典的HLAと呼ぶのに対して、MIC、HLA-E、F、G等は非古典的HLAと呼ばれています。MIC分子構造は、MHCクラスI分子のα鎖とよく似たポリペプチド鎖を持っていますが、β2ミクログロブリンを結合していない特徴を持っています。

MICAは、非古典的HLAの中では、最も多型性に富んでいます。(表1、2)

MICA遺伝子はHLA-B遺伝子の近接しており強い連鎖不平衡を有しています。(表3)

MIC分子の発現

MIC分子の発現は偏在しており、ストレスを受けた組織やがん細胞などで

表1 非古典的HLAクラスIアリル数

遺伝子	アリル数
HLA-E	9
HLA-F	21
HLA-G	36
MICA	64
MICB	30

2008年7月現在

の発現が有名ですが血管内皮細胞にも発現しています。発現したMIC分子はNK細胞 (natural killer cells: ナチュラルキラー細胞) のリガンドとなる事があり、NK活性に関与する事が知られており特に腫瘍免疫分野で注目を集めております。

臓器移植では、臓器が生まれ育った自己の体内環境から、移植により非自己の体内環境に置き換えられること自体が移植臓器には大きなストレスと思われれます。

また、多型性に富んでいるという事

表2 MICアリルの種類

MICA		MICB
MICA*001	MICA*025	MICB*001
MICA*00201	MICA*026	MICB*0020101
MICA*00202	MICA*027	MICB*0020102
MICA*004	MICA*028	MICB*003
MICA*005	MICA*029	MICB*0040101
MICA*006	MICA*030	MICB*0040102
MICA*00701	MICA*031	MICB*0050101
MICA*00702	MICA*032	MICB*0050201
MICA*00703	MICA*033	MICB*0050202
MICA*00801	MICA*034	MICB*0050203
MICA*00802	MICA*035	MICB*0050204
MICA*00803	MICA*036	MICB*00503
MICA*00804	MICA*037	MICB*00504
MICA*00901	MICA*038	MICB*00505
MICA*00902	MICA*039	MICB*006
MICA*010	MICA*040	MICB*007
MICA*011	MICA*041	MICB*008
MICA*01201	MICA*042	MICB*009N
MICA*01202	MICA*043	MICB*010
MICA*01203	MICA*044	MICB*011
MICA*013	MICA*045	MICB*012
MICA*014	MICA*046	MICB*013
MICA*015	MICA*047	MICB*014
MICA*016	MICA*048	MICB*015
MICA*017	MICA*049	MICB*016
MICA*01801	MICA*050	MICB*018
MICA*01802	MICA*051	MICB*019
MICA*019	MICA*052	MICB*020
MICA*020	MICA*053	MICB*021N
MICA*022	MICA*054	MICB*022
MICA*023	MICA*055	
MICA*024	MICA*056	

2008年7月現在

は、非自己としての免疫原となりうる可能性もあり、抗体産生も十分に推測されます。しかし、MIC分子は、Tリンパ球やBリンパ球には発現していないため、移植前検査として必須のダイレクトクロスマッチでは残念ながらMIC抗体を確認することは出来ません。

MIC抗体の検出

MIC抗体の検出には、各種MIC分子をコーティングしたポリスチレン微細ビーズと患者血清を反応させ、さらに蛍光色素をラベルした二次抗体を反応させて、その蛍光量をルミネックスで測定する方法がキット化されており、これを用いた研究が進んでいます。

近年の研究では、腎移植の廃絶症例で、HLA抗体と同様にMIC抗体も陽性頻度が高くなる事がわかり移植関連検査として注目を集めてきています。

移植する臓器が極度に不足している現在は、移植された臓器を長持ちするように、体内で如何にして守り続ける事が非常に重要と思えます。

そのため、移植後の拒絶兆候の速やかな把握のため、HLA抗体のモニタリングと同様にMIC抗体のモニタリングも重要になってくるものと思われれます。

表3 日本人におけるMICAとHLA-Bとの連鎖不平衡

MICA	連鎖不平衡にあるHLA-B
MICA*002	B35 B39
MICA*004	B44
MICA*007	B13
MICA*008	B7 B60
MICA*009	B51 B52
MICA*010	B46 B62 B75
MICA*012	B54 B55 B56 B59
MICA*016	B70
MICA*048	B61
null	B48

虎の門 ニュース

お知らせ

・朗報!!! 手間いらずでDNA抽出しませんか!!!

プロメガ社の Maxwell 16 は、血液、スワブ、から前処理なしに完全自動で DNA 抽出が可能です。

専用カセットを使用し全くの手間いらずで DNA 抽出が可能となりました。

たとえば末梢血の場合、末梢血を DNA 抽出専用カセットに分注しカセットをセット後スイッチ ON! 約 40 分後には必要十分量の DNA が回収できます。

純度もバッチリ! * パフィーコートならさらに DNA 収量 UP!! その他材料からの DNA 抽出も専用のプロトコールで十分可能です!!!!

百聞は一見にしかず!! 一度お試しください。デモ機をご用意しますのでご一報ください。お待ちしております!!!!



ベリタスのホームページが新しくなりました!!

平素は弊社販売製品をお引き立て頂き誠にありがとうございます。

<http://www.veritastk.co.jp>

会員特典満載!! 会員用メールニュースも充実!! 簡単登録!! 是非ご登録ください!!

ベリタスへのお問合せは下記までお願いします。

TEL : 03-3593-3211 FAX : 03-3593-3216

営業販売部 小林

e-mail : veritas@veritastk.co.jp

数独のススメ

HLAに携わっている方、興味のある方、あまりにもたくさんあるHLA型の数字に悩まされていることはありませんか。数字に強くなるために、数独に挑戦してみてください!

遊び方

表の空いているところに1から9までの数字を入れるだけです。ルールは縦列、横列と、太枠で区切られた3×3マスに、1から9までの数字を重ならないように入れるだけです。入れる数字は確定したものだけにしましょう。2つ以上の可能性がある場合は鉛筆で薄く書いたりして、やり直しができるようにしましょう。

ヒント

- 縦列、横列、3×3マスで、空白の少ないものに目をつけてみましょう。
- 空白には残っている数字の中から、他の条件を参照して入れていけばよいのです。
- 全体の中で一番よく使われている数字に目をつけてみましょう。入る場所が限られていて、その位置の縦横の関係を見るとわかるはず。縦列、横列、3×3マスの数字を組み合わせて、どんな数字が使われているのか、いないのかを見ると、入れる数字が決まるはず。

【前回の解答】

1	7	3	8	4	5	9	1	6	2
2	6	4	9	1	2	3	7	8	5
3	1	5	2	6	7	8	3	9	4
4	2	9	6	7	3	4	5	1	8
5	4	8	3	5	9	1	6	2	7
6	5	7	1	8	6	2	4	3	9
7	8	2	7	3	4	6	9	5	1
8	3	1	5	9	8	7	2	4	6
9	9	6	4	2	1	5	8	7	3

1	2	3	4	5	6	7	8	9
1		3	5		7	8	4	9
2		7	1				5	
3	8			3	2			
4		1				2	7	5
5	2	5	9			4		3
6	3							1
7			4		5		1	6
8	4	9	6		7	1		2
9	5	8			2		7	

今回は非常に難しい問題です。初めての力が独力で15分間で解くことが出来ました。皆さんふるってご参加ください!

赤く塗られたマスに入る数字は何でしょう?

氏名、住所、所属病院・企業、電話、e-mailアドレスを明記のうえ、「数独プレゼント係」までご回答をお送りください。

送り先

ベリタス (e-mail/veritas@veritastk.co.jp)

または F A X (03-3593-3216)

数独プレゼント

電卓付きノートとTシャツ

正解応募者から抽選のうえ2名様にお送りします。



正解応募者全員に右の品をお送りします。



応募期限は11月末とさせていただきます。

編集委員

編集顧問 木村 彰方

編集委員長 小川 公明

編集委員 佐田 正晴 佐治 博夫 赤座 達也

編集スタッフ 松本 佳子 小林 俊太 甲田 純也 児玉 千恵

発行者 飯田 真作

発行

株式会社

ベリタス

〒105-0001 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八洲ビル
TEL.03-3593-3211(代) FAX.03-3593-3216
E-mail: veritas@veritastk.co.jp

<http://www.veritastk.co.jp/>