
今号では KAMON23 号などでお知らせし、4 月から 6 月にかけて 4 回開催致しました『KAMON 講演会』のうち、今年 4 月 27 日に札幌で行われた第一回の KAMON 講演会の模様を防衛大の小林 賢先生にご協力いただき、誌上での再現を試みました。

ご参加いただけなかった方々の一助に、また各地でご参加下さった方々の復習にしていいただければ幸いです。

なお、プログラムは次の通りです。

「HLA 研究：その現状と将来」

東京医科歯科大学難治疾患研究所 木村彰方 第一回、第二回
東海大学医学部分子生命科学系 猪子英俊 第三回、第四回

「HLA タイピング技術に関する基礎知識」

国立循環器病センター研究所 再生医療部 移植外科 佐田正晴

「骨髄移植における組織適合性」

特定非営利活動法人 HLA 研究所 所長 佐治博夫

司会：

この講演に先立ちまして本日の内容について一言ご説明させていただきます。私は KAMON 編集部の飯田と申します。今講演会の名称となっております「KAMON」は弊社で発行しております HLA の情報誌のことで、発行して 10 年になります。KAMON が発行されました経緯は、元々 HLA の検査は特殊検査に属していて、各検査部、輸血部で検査をされている方々に情報が届き難い状況に対して、組織適合性学会の先生方特に佐治博夫先生が中心になられて、ティッシュタイパーの方向けの情報誌として、学会が発行している学術的な雑誌とは違った形のものを作ろう、という趣旨で出されているものです。また今回 KAMON 講演会が開かれます経緯は、HLA 検査を取り巻く環境が過去 10 年の間に著しく変化してまいり、血清学的検査から遺伝子検査に、またその目的も、親子鑑定、臓器移植から、造血幹細胞移植へと拡大し、HLA の精度もより高いものが要求されてきております。そこで実際に検査を行っておられる方々や臨床の先生方に HLA に関してより正確な情報を持って頂くために、組織適合性学会の有志の先生方で実際 KAMON の編集をされている先生方が企画され、本年度は北海道を皮切りに、東京、大阪、福岡で開催を予定しております。この講演が皆様の検査のお助けになることを希望致しております。

『特集 KAMON 講演会 誌上再現』

収録・まとめ 小林 賢』



特集 KAMON 講演会

「HLA 研究：その現状と将来」

東京医科歯科大学難治疾患研究所

演者：木村 彰方

1. HLA とは

HLA 研究がどのように進められてきて、今どのような状況にあるのかということこれからお話してみたいと思います。

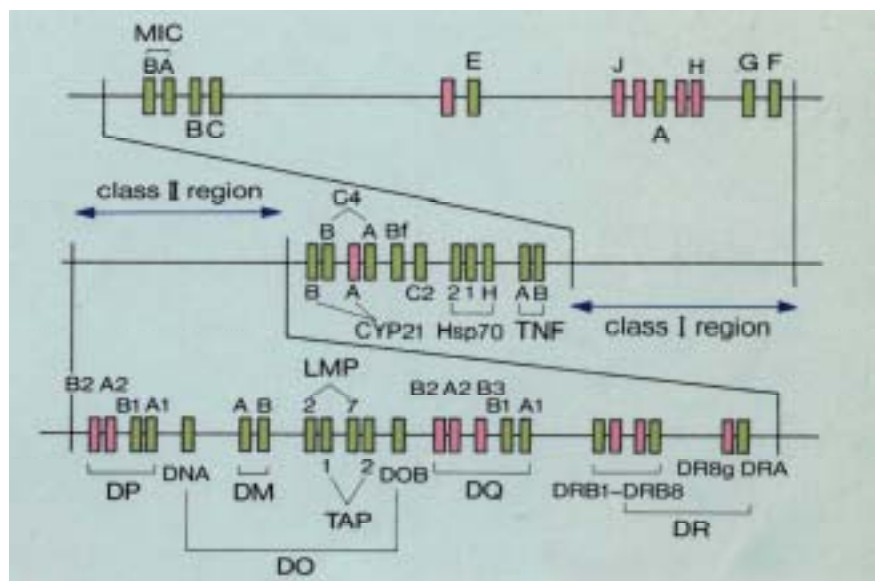
ヒトでは HLA という名前では呼ばれていますが、組織適合性を決める主要な遺伝子座ということで、MHC (major histocompatibility complex) という呼び方が一般名です。MHC はマウスで皮膚を移植した時に、系統が違えば拒絶反応を起こすということで最初に見つかりましたが、その拒絶反応を規定する遺伝子がある位置 (遺伝子座) を H-2 と名づけました。ヒトにおいても、これと同じような現象、つまり移植が行われた時に拒絶反応が起こることを遺伝的に決めているものがあります。それがどのようにして分かったかといいますと、頻回に輸血を受けている人あるいは妊婦に、他人の白血球を凝集させるような抗白血球抗体が見つかり、その抗白血球抗体が認識する抗原を規定する遺伝子座のことを HL-A と呼びました。この白血球抗原は human leukocyte antigen ですので、遺伝子座についても、現在の HLA という呼び方になったわけです。

2. HLA の遺伝子構成と機能

最初に遺伝子座として決められていた HLA は、東海大学の猪子先生らのグループが精力的に解析されて、現在では HLA 領域の全配列が分かるまでになっています。HLA 領域は第 6 番染色体上の短腕に存在しますが、それは約 400 万塩基 (4000 kbp) にわたる領域で、スライド 1 のような構成です。クラス I 領域には、古典的なクラス I 遺伝子と呼ばれる HLA-A、HLA-B、HLA-C の遺伝子が存在します。また、非古典的なクラス I 遺伝子と呼ば

れる HLA-E、HLA-F、HLA-G の遺伝子もここにあります。そして、最近見つかった MIC 遺伝子 (クラス I 遺伝子と非常によく似ているけれども違った働きをしている) もここに存在します。クラス I 領域と反対側のセントロメア側はクラス II 領域と呼ばれ、そこにはクラス II の遺伝子である HLA-DR、HLA-DQ、HLA-DP 分子をコードする遺伝子が存在しています。

このような遺伝子によってタンパクがつくられますが、HLA クラス I 領域にあるクラス I 遺伝子から H 鎖がつくられ、この H 鎖と $\beta 2$ ミクログロブリンとが非共有的に結合したものがクラス I 分子と呼ばれ、スライド 2 に示したような構造をしています。これに対して、クラス II 分子と呼ばれる HLA-DR、HLA-DQ とか HLA-DP では、 α 鎖の遺伝子と β 鎖の遺伝子が別々に存在していて、それぞれから α 鎖と β 鎖がつくられて、その 2 つが非共有結合で会合することによってクラス II 分子を構成しています。クラス I 分子とクラス II 分子は、それぞれがまったく別の違った遺伝子からつくられていますが、その立体構造は比較的似ており、また機能も似ています。



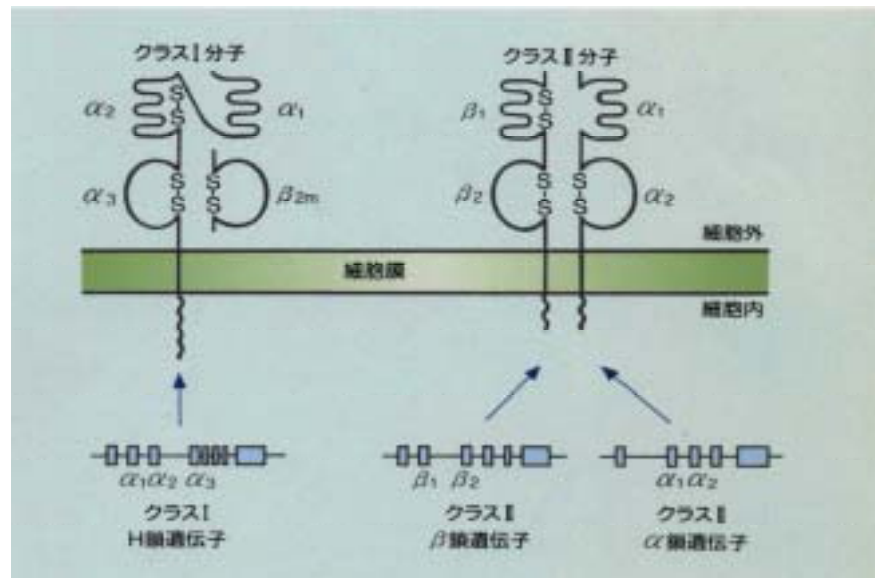
スライド1

その第一の機能は、クラス I 分子にしる、クラス II 分子にしる、その頭の部分にペプチドを挟んで T 細胞に提示することです。しかし、クラス I 分子が提示するペプチドと、クラス II 分子が提示するペプチドは、その生成過程が違います。スライド 3 に示すように、細胞の中でつくられたタンパク質（これを内因性抗原といいます）がプロテアソームで分解されたペプチドは、トランスポートの働きによって小胞体の中に入り、そこで HLA クラス I 分子と結合して細胞の表面に出えます。

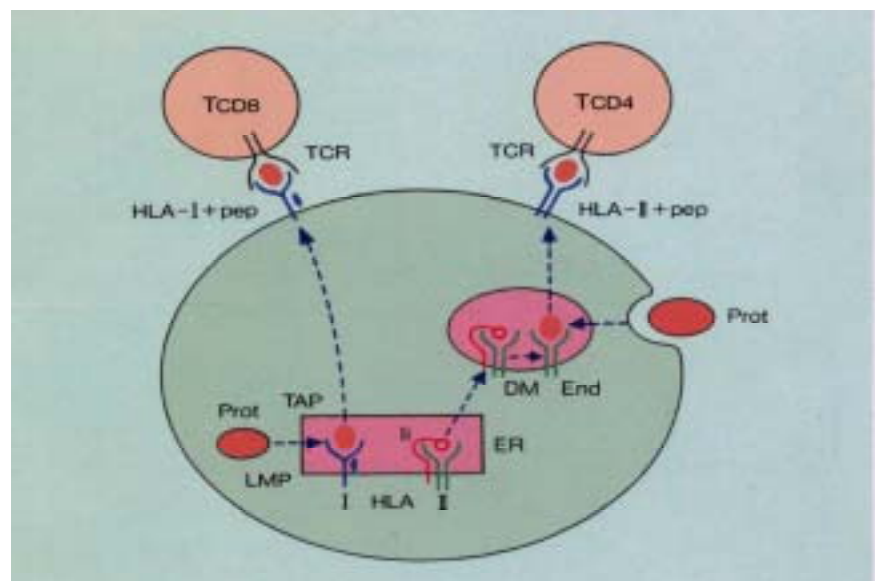
その細胞の表面に出てきた HLA クラス I 分子と内因性抗原の分解産物ペプチドとの複合体が CD8 陽性の T 細胞によって認識されます。これに対して、クラス II 分子は、CD4 陽性の T 細胞によって認識されますが、このクラス II 分子が提示するペプチドは細胞の外から取り込まれた外来抗原のタンパク質がエンドソームで分解されたものであることが知られています。つまり、クラス I 分子の提示するペプチドは、細胞の中でつくられたタンパク質の分解産物が小胞体の中に取り込まれて、ここでクラス I 分子と会合したものととして細胞表面に出ますが、クラス II 分子の方は、細胞の外から取り込まれたタンパク質がエンドソームの中で分解されて、ここでクラス II 分子と会合して細胞の外に出て来るわけです。クラス I 分子とクラス II 分子は、そのどちらもがペプチドを細胞の外に汲み出して T 細胞に提示をするということに関しては共通の事象ですが、それぞれが提示しているペプチドは、そもそもの由来が違うということがこれでわかると思います。これらのことをスライド 4 にまとめましたが、クラス I 分子は HLA-A、HLA-B、HLA-C、クラス II 分子は HLA-DR、HLA-DQ、HLA-DP と呼ばれるものです。構造としては、ク

ラス I 分子は H 鎖と $\beta 2$ ミクログロブリン（第 15 番染色体）とが会合したもので、クラス II 分子は α 鎖と β 鎖の会合です。また、この HLA には多型が存在いたします。つまり、人によってアミノ酸配列が違うという個体差があるわけですが、その多型はクラス I 分子では H 鎖に著明です。クラス II 分子では、 α 鎖と β 鎖のどちらにも多型が存在しますが、主には β 鎖に多型が集中していることが知られています。

クラス I 分子とクラス II 分子のもう一つの違いは、そ



スライド 2



スライド 3

の発現する細胞の違いです。クラス I 分子の場合は、すべての有核細胞で発現しますし、インターフェロンとか TNF（腫瘍壊死因子）のようなサイトカインが存在すると、発現量の増強が認められます。ところが、クラス II 分子は、どんな細胞でも発現しているわけではありません。マクロファージ、樹状細胞、B 細胞などの、いわゆる抗原提示細胞と呼ばれる一群の細胞にだけ発現することが知られています。クラス I 分子が提示するのは内因性のペプチドで、長さにして 8 から 12 個のアミノ酸で構成されています。これに対し、クラス II 分子が提示するのは外来性のペプチドで、クラス I 分子よりも長いペプチドを提示することが知られています。この MHC-ペプチド複合体を認識する細胞は、クラス I 分子では CD8 陽性の T 細胞、クラス II 分子では CD4 陽性の T 細胞です。CD8 陽性 T 細胞はいわゆるキラー T 細胞であり、これに対して、CD4 陽性 T 細胞はヘルパー活性があるヘルパー T 細胞です。

クラス I 分子とクラス II 分子では発現する細胞が違うというお話をいたしました。それによって担われているかを説明いたしますと、遺伝子には mRNA として転写される領域の上流部分にプロモータと呼ばれる領域があります。この領域に、クラス I の場合はエンハンサー A、インターフェロンコンセンサスシーケンス、および Y ボックスなどの塩基配列が存在しています。そこに NF-Y や KBF1 などの転写因子が結合すると、転写が始まります。インターフェロンが存在する場合には、このような転写複合体にインターフェロンコンセンサス結合タンパク質という別の転写因子がさらに結合することによって転写量が増えるということが知られています。TNF が存在する場合は、ここに NFκB と呼ばれるタンパク質が新しく結合することによって転写が活性化されます（スライド 5）。

一方、クラス II の場合は、やはり遺伝子の上流のプロモータと呼ば

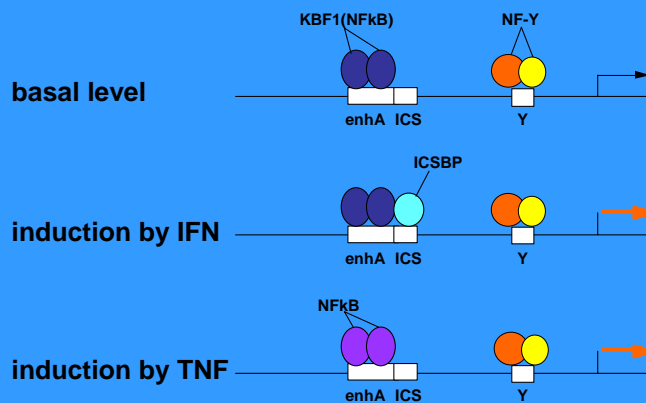
れる領域に Y ボックスというシーケンスがあって、そこに NF-Y というクラス I の場合とまったく同じ転写因子が結合することが知られています。それ以外にも、X2 ボックスとか、X ボックスと呼ばれる配列がありますが、そこに RF-X とか X2BP などの転写因子が結合して、さらにそれらの加えて CIITA がコンプレックスをつくることによって、はじめて転写がスタートをするということが知られています。クラス II を発現しない細胞でも、NF-Y や X2BP などの転写因子が存在しています。しかし、全体のコンプレックスをつくる CIITA という転写因

HLA分子の構造と機能の比較

| | クラス I 分子 | クラス II 分子 |
|---------|-------------------------|--------------------------------|
| 種類 | HLA-A, B, C | HLA-DR, DQ, DP |
| 構造 | H鎖 + β2m | α鎖 + β鎖 |
| 多型 | H鎖 | β鎖 >> α鎖 |
| 発現 | 全ての有核細胞 IFNやTNFで増強 | 抗原提示細胞 (マクロファージ、樹状細胞、B細胞など) |
| 提示抗原 | 内因性ペプチド (8 - 15 mer) | 外来性ペプチド (12 - 20 mer) |
| 認識 T 細胞 | CD8陽性 T 細胞 (キラー活性) | CD4陽性 T 細胞 (ヘルパー活性) |

スライド4

Regulation of MHC Class I Gene

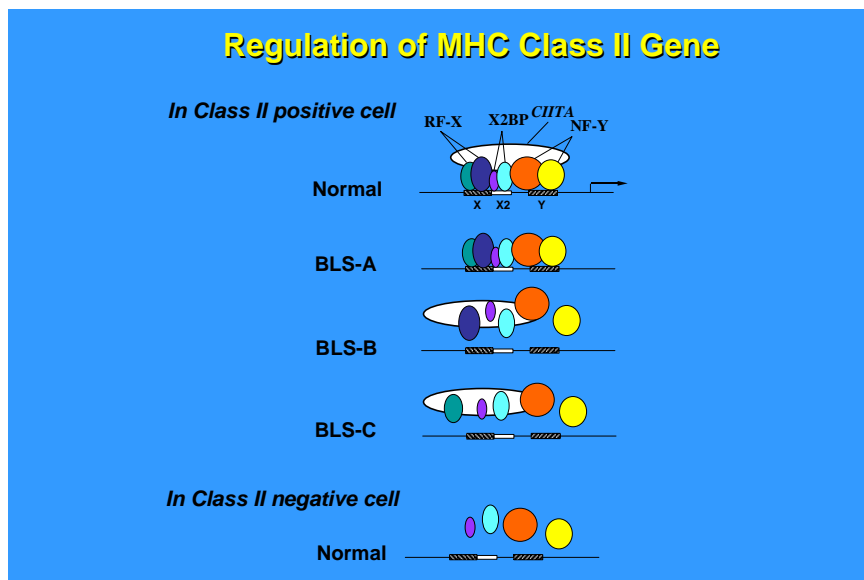


スライド5

子や RF-X という転写因子が普通の細胞には存在しないために、転写が始まらないことが知られています (スライド6)。このようにクラス II の場合は、特異的な転写因子が存在している細胞でのみ発現するというメカニズムが知られています。

3. HLA 分子の多型

HLA には著明な多型性があるということが以前から知られていました。その多型を検出するために以前より血清学あるいは細胞学的方法を用いたタイピングが行われてきましたが、最近、DNA タイピングという手法が新しく出てきており、これらによるタイピングが相まって色々な研究が展開してきました。では、この多型性はどういう有様なのでしょうか？



スライド6

MHC遺伝子の遺伝的多型性(DRB1)

| Allele | Exon 1 | | Exon 2 | | Exon 3 | | Exon 4 | |
|----------|--------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|
| | -1 | 1 | 22 | 23 | 32 | 33 | 42 | 43 |
| A*01:01 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:02 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:03 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:04 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:05 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:06 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:07 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:08 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:09 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:10 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:11 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:12 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:13 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:14 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:15 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:16 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:17 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:18 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:19 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:20 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:21 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:22 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:23 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:24 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:25 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:26 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:27 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:28 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:29 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:30 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:31 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:32 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:33 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:34 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:35 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:36 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:37 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:38 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:39 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:40 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:41 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:42 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:43 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:44 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:45 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:46 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:47 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:48 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:49 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:50 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:51 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:52 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:53 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:54 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:55 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:56 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:57 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:58 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:59 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:60 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:61 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:62 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:63 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:64 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:65 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:66 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:67 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:68 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:69 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:70 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:71 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:72 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:73 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:74 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:75 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:76 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:77 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:78 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:79 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:80 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:81 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:82 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:83 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:84 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:85 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:86 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:87 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:88 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:89 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:90 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:91 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:92 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:93 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:94 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:95 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:96 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:97 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:98 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:99 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |
| A*01:100 | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG | CTG |

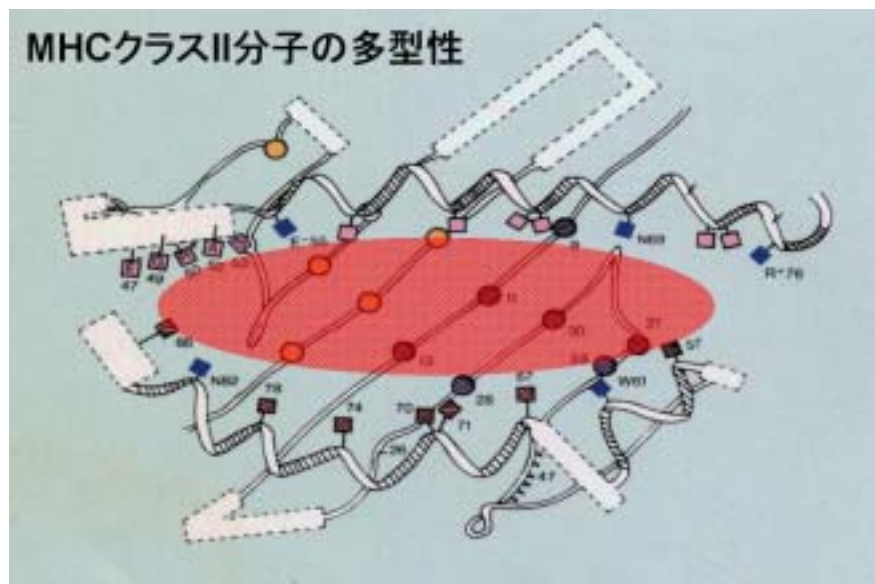
スライド7

3. 1. ペプチド結合ドメインの多型

HLA 分子における最大の多型性は、遠位細胞外ドメイン (先ほど述べました抗原ペプチドを結合するドメイン) に集中しています。ところが、そこだけが多型性を示すわけではなく、例えば、CD4、あるいは CD8 が認識するような配列のあるドメイン (近位細胞外ドメイン) にも多型性が存在します。一例としてあげられるのが HLA-A68 というタイプですが、このタイプは CD8 が結合する配列に変異が存在し、このため CD8 がうまく結合できないことが知られています。このように特定のタイプの場合には、CD8 との相互作用が少しおかしくなってしまうということもあります。また、シグナル伝達に参与していると考えられている細胞内ドメインにも多型性があるということが知られています。

このスライド7には、クラス II の DRB1 遺伝子配列の一部を並べて書いてあります。それぞれの配列をアレルという言葉で呼びますが、アレル間で配列が違う部分が多型です。HLA 遺伝子では、多型が認められる部分はランダムに分布しているわけではなく、特定の部分に集中して多型性が認められています。DRβ 鎖分子でいえば、だいたい8番目から15、6番目のアミノ酸になります。あるいは、25番目から32番目あたりのアミノ酸に多型性というものがあります。こういうところが立体構造でどういう位置になるかということを示します。このスライド8は、クラス II 分子を上から見た図だと考えてください。αヘリックスでつくられた壁があって、その両方の壁で挟まれた部分の下に床があります。床の配列は、βシートで構成されています。先ほど述べました人によつての違いが集中する部分が、8番目から13番目のアミノ酸、あるいは25番目から32番目のアミノ酸といたしましたが、実はこれらは床の部分

を構成していたということが分かります。もちろん、それら以外にも多型がたくさん存在していますが、その多型性がどこに存在するかといいますと、実はこの壁の内側で、スライド8で四角で示したもの、あるいは丸で示したところにあたります。では、こういう部分は何をしているかといいますと、先ほどお話ししたように HLA 分子はペプチドを挟みますが、このペプチドを挟む機能、つまり、ペプチドとクラス I ないしクラス II 分子が相互作用するために必要なアミノ酸の部分に多型性が存在することになります。このことは何を意味しているかといいますと、HLA 分子がこのよう



スライド8

Peptide-motif bound to HLA-A and -B molecules

| Allele | length | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | C termini |
|--------|--------|----|---------|---------|-------|-----|-----------|
| A*0101 | 9 mer | | (T/S) | E/D | | | |
| *0201 | 9 | | L/M | | (D/E) | | V/L |
| *0204 | 9 | | L/M | | | | L |
| *0205 | 9 | | V/L/I/Q | | | | L/V |
| *0206 | 9 | | V/L/I/Q | | (D/E) | | L/V |
| *0207 | 9 | | L | D/P | (D/E) | | L/V |
| *0301 | 9 | | L/V/M | | | | Y/K |
| *1101 | 9 | | T/V | | | | K |
| *2402 | 9 | | Y | | | | F/L |
| *6801 | 9 | | V | | | | K/R |
| B*0702 | 9 | A | P | R | | | L |
| *0801 | 8 | | (L/P) | K/R | | K/R | |
| *2705 | 9 | | R | | | | K/R |
| *3501 | 9 | | P | | | | Y |
| *3701 | 9 | | D/E | | | | I/L |
| *5101 | 8 | D | A/P/G | Y/F/L/I | | | I |
| *5201 | 8 | | Q | | | | I |
| *5301 | 9 | | P | | | | |

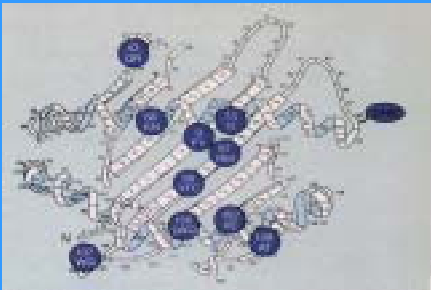
スライド9



Sequence differences in HLA-A subtypes

| HLA-A2 | 9 | 43 | 66 | 73 | 95 | 97 | 99 | 107 | 149 | 152 | 156 | 163 | 236 | |
|--------|------------------------|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| *0201 | F | Q | K | T | V | R | Y | W | A | V | L | T | A | |
| *0202 | F | R | K | T | L | R | Y | W | A | V | W | T | A | |
| *0203 | F | Q | K | T | V | R | Y | W | T | E | W | T | A | |
| *0204 | F | Q | K | T | V | M | Y | W | A | V | L | T | A | |
| *0205 | Y | R | K | T | L | R | Y | W | A | V | W | T | A | |
| *0206 | F | Q | K | T | V | R | Y | W | A | V | L | T | A | |
| *0207 | F | Q | K | T | V | R | C | Y | W | A | V | L | T | A |
| *0208 | Y | R | N | T | V | R | Y | W | A | V | W | T | A | |
| *0209 | F | Q | K | T | V | R | Y | W | A | V | L | T | E | |
| *0210 | Y | Q | K | T | V | R | F | G | A | V | L | T | A | |
| *0211 | F | Q | K | I | V | R | Y | W | A | V | L | T | A | |
| *0212 | F | Q | K | T | V | R | Y | W | A | V | Q | T | A | |
| *0213 | F | Q | K | T | V | R | Y | W | A | E | Q | T | A | |
| *0214 | Y | R | K | T | L | R | Y | W | A | V | L | T | A | |
| *0215N | Non - expressed allele | | | | | | | | | | | | | |
| *0216 | F | Q | K | T | V | R | Y | W | A | V | L | E | A | |
| *0217 | F | Q | K | T | L | M | F | W | A | V | L | T | A | |

HLA-A2 subtypes



HLA-A24

| HLA-A24 | 62 | 65 | 70 | 76 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 144 | 156 | 166 | 167 |
|---------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|
| *2402 | E | G | H | E | R | I | A | L | R | K | Q | D | G |
| *2403 | E | G | H | E | R | I | A | L | R | K | Q | E | W |
| *2404 | E | G | H | A | G | T | L | R | G | K | Q | D | G |
| *2405 | E | G | H | E | R | I | A | L | R | K | Q | D | G |
| *2406 | E | G | H | E | R | I | A | L | R | Q | W | D | G |
| *2407 | E | G | Q | E | R | I | A | L | R | K | Q | D | G |
| *2408 | G | R | H | E | R | I | A | L | R | K | Q | D | G |

HLA-A26

| HLA-A26 | 74 | 76 | 77 | 115 | 116 | 163 |
|---------|----|----|----|-----|-----|-----|
| *2601 | D | A | N | Q | D | R |
| *2602 | D | A | N | Q | N | R |
| *2603 | H | V | D | Q | D | R |
| *2604 | D | A | N | Q | D | L |
| *2605 | D | E | N | Q | D | R |
| *2606 | H | V | D | R | D | R |

スライド10

多様性をもっているということは、取りも直さず、ここに挟まれるペプチドのレパートリが違うということの意味するわけです。

HLA分子に結合しているペプチドを取り出して、その配列を決めるという研究が行われています。例えば、同じHLA-A2という特異性を示すサブタイプであるA*0201、A*0204、A*0205、A*0206に結合しているペプチドの配列を比較してみると、スライド9に示すように、2番目の位置の配列が少し違ってきますし、3、4、5番目の位置で少しずつ違う配列をもっています。これが何を意味するかといいますと、同じHLA-A2であっても、サブタイプが違くとそこに結合するペプチドが違う、つまり、T細胞に提示しているペプチドの配列が違うということを示します。同じ特異性を示すサブタイプは、1ないしせいぜい3、4個

のアミノ酸配列が違うだけです。そういうサブタイプ間の違いをHLA分子上にマップしてみると、スライド10のように、床の部分、あるいは壁の部分に違いが存在することが分かります。つまり、サブタイプ間の違いもペ

Distribution of HLA-A2 subtypes in A2-positive populations

| HLA-A2 subtypes | Japanese n=214 | North American populations #1 | | | |
|-----------------|-------------------|-------------------------------|---------------|--------------------|-----------------|
| | | Caucasoid n=54 | Black n=34 | Amerindian n=10 | Chinese n=20 |
| A*0201 | 49.5 % | 96.3 % | 70.6 % | 70.0 % | 50.0 % |
| *0202 | 0.0 | 0.0 | 23.5 | 0.0 | 0.0 |
| *0203 | 0.5 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 10.0 |
| *0204 #2 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| *0205 | 0.0 | 1.9 | 8.8 | 0.0 | 0.0 |
| *0206 | 37.7 | 3.7 | 2.9 | 30.0 | 30.0 |
| *0207 | 17.9 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 20.0 |
| *0210 | 3.2 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |

#1: data from Fernandez-Vina et al. Hum. Immunol. 33: 163-173,1992.

#2: *0204 and *02New-1 (*0217) were found in South Amerindians.

スライド11

プチドを挟むポケット部分の配列の違いに反映され、このことは取りも直さず、提示しているペプチドが違うということを意味しています。

もうひとつHLAの多型で興味深いところは、人種や民族によってサブタイプの分布が違う、つまりそれぞれのサブタイプの頻度が違うということです。例えばHLA-A2サブタイプがどういう頻度分布をしているかということを、このスライド11に示しています。日本人ですと、HLA-A2の半分くらいはA*0201というタイプであり、A*0206、A*0207とか、A*0210というタイプもいくらか存在しています。ところが、A*0202、A*0203、A*0204とか、A*0205は日本人にほとんど存在しません。白人に目を移してみますと、ほとんどがA*0201であって、A*0206が多少いますが、その他のタイプはマイナーであるということが分かります。一方、黒人でもA*0201がメジャーですが、A*0202というタイプが結構な頻度で存在します。また、アメリカンインディアンでもA*0201がメジャーですが、A*0206が日本人と同じようにかなりの頻度を占めるということが知られています。さらに、中国人に目を移すと、A*0206やA*0207が日本人と同じように結構ありますが、中国人の特徴としてA*0203というサブタイプがかなりの頻度で存在します。このよう

に、同じHLA-A2であっても人種や民族によって、そのサブタイプの分布が大きく違うということが分かると思います。

3.2. その他のHLA多型

HLA分子で主に抗原ペプチドを結合するドメインの多型性についてお話を致しました。HLA遺伝子では、それ以外にも、発現を制御する領域に多型性がある、あるいは遺伝子の数が違うという多型性があります。また、その他の特徴として、強い連鎖不平衡が存在します。これらについて少し説明します。

まず、発現制御領域の多型性についてお話します。このスライド12は、DQ α 鎖の遺伝子(DQA1遺伝子)のプロモータ領域の配列を示しています。色々なアレルについてその配列を決めると、それぞれに多少配列が違っていました。これは、プロモータ領域にも多型性があるということを意味していますが、特に重要なのは、転写因子が結合するところにも多型性が存在することです。そしてこの意味するところは何かといいますと、転写因子が結合するところに多型が存在するために、転写因子がうまく結合できないというアレルが存在するわけです。つまり、この例でいえば4.2とか4.1のアレルですが、こ



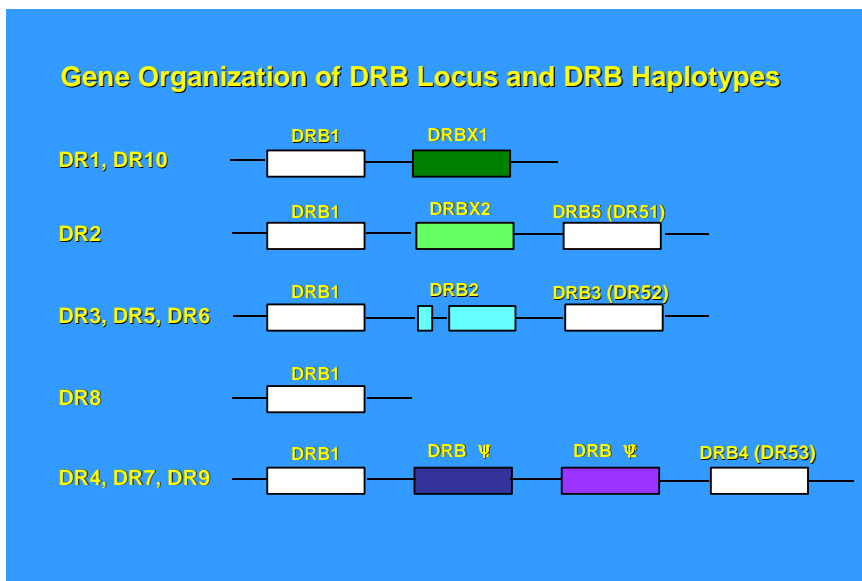
スライド12

これらのアリルは転写量が非常に低いということが知られています。したがって、HLA 遺伝子は、そのコードするタンパク質自体に個体差があるということと同時に、その遺伝子がどれくらい転写されているか、つまりどの程度のレベルで発現するかということにも多型性が存在することになります。

一方、DRB 遺伝子のように、人によってその数が違うことも知られています。スライド 13 に示すように、HLA-DR1 と DR10 ハプロタイプの場合、機能的な DRB1 遺伝子が 1 個あり、それとは別にもう 1 個偽遺伝子が存在します。HLA-DR2 ハプロタイプでは、HLA-DR2 をコードする DRB1 遺伝子があって、それ以外にもう 1 個 HLA-DR51 をコードする DRB5 遺伝子が同じハプロタイプ上に存在しています。HLA-DR3、5、6 ハプロタイプは、HLA-DR3、5、6 を規定する DRB1 遺伝子以外に HLA-DR52 を規定する DRB3 遺伝子が存在します。HLA-DR8 ハプロタイプでは、HLA-DR8 をコードする遺伝子が 1 個あるのみです。HLA-DR4、7、9 ハプロタイプでは、HLA-DR4、7、9 を規定する DRB1 遺伝子と HLA-DR53 をコードする DRB4 遺伝子がありますが、それ以外にも 2 つの偽遺伝子が存在します。このように、ハプロタイプによって遺伝子の数が違うという多型性も存在するわけです。このような、ハプロタイプ構成は極めて強い連鎖不平衡の結果生じたものです。

この連鎖不平衡は DR 遺伝子座だけにあるものではなく、HLA 領域全般にも及びます。このスライド 14 は日本人での HLA アリルの間での連鎖不平衡を示していますが、HLA-B61 の場合の HLA-A26 の多くは A*2601 です。HLA-B62 も A26 と繋がりが

ますが、HLA-B62 の場合の A26 の多くは A*2602 です。つまり、HLA-B61 に繋がっている A26 と、B62 に繋がっている A26 はそれぞれ違うということになります。さらに、B62 では A26 が A*2603 の人もいます。このように、特定の遺伝子座のアリルと別の遺伝子座のアリルが連なって存在することを連鎖不平衡という言葉で呼びますが、HLA では特徴的な連鎖不平衡が存在します。しかも、この連鎖不平衡の有り様というのは、人種や民族によってそれぞれ特徴的であるわけです。



スライド13

Linkage disequilibria between alleles of HLA-A and HLA-B in Japanese

| HLA-A | HLA-B | t value ^a |
|--------|-------|----------------------|
| A*0201 | B75 | 2.49 |
| *0207 | B46 | 5.42 |
| *0210 | B61 | 2.34 |
| *1101 | B39 | 2.44 |
| *1101 | B55 | 2.00 |
| *1101 | B62 | 3.18 |
| *1101 | B67 | 2.19 |
| *2402 | B 7 | 5.13 |
| *2402 | B52 | 9.39 |
| *2402 | B59 | 4.25 |
| *2601 | B61 | 3.51 |
| *2602 | B62 | 2.60 |
| *2603 | B62 | 2.16 |
| *3101 | B51 | 2.62 |
| *3303 | B44 | 8.17 |
| *0101 | B37 | 1.42 |
| *0301 | B44 | 1.64 |
| *1102 | B27 | 1.41 |
| *3303 | B58 | 1.92 |

^a; When t value is more than 2.0, the linkage disequilibrium is statistically significant.

スライド14

4. HLA-DNA タイピング

HLA には著名な多型性があり、たくさんのアリルの存在が知られています。例えば、スライド15に示すように、HLA-A は血清学的には 25 タイプ、もっと詳しくは 28 タイプまで分けることができます。これだけでもたくさんタイプが存在するのですけれども、DNA レベルで解析をすると、2001 年の時点で 239 のアリルが存在することが分かりました。つまり、同じ血清学タイプであっても、DNA レベルで解析をすると、非常にたくさんのサブタイプに分かれていくことを意味します。最も著名な多型性は HLA-B にあり、現在、500 を越えるアリルが存在します。HLA-DR の場合は、DRB1 が特に多型性を示し、400 ぐらいのアリルが知られています。

色々なアリルが存在することと同時に、DNA タイピングという方法論でタイプをすると、今まで血清学でタイプをしていたものに結構間違いのあったことが分かってきました。このスライド16はそのような間違いを分類したものです。例えば、血清学でタイプすると片側は決まったが片側がブランクであった人を遺伝子レベルでタイピングすると、ブランクが何か別の抗原であったというケースが、HLA-A で 3%、HLA-B で 5%、HLA-DR で 10% ぐらいありました。つまり、DNA タイピングをすることによってブランクが解消してくるという現象があります。ということで現在では、血清学的なタイピングから、より正確な DNA タイピングに移っているというのが現状です。

では、DNA タイピングを行うときに、どこを対象とするかといいますと、クラス I 遺伝子の場合は、主にエクソン 2 とエクソン 3 です。この両方の多型性を調べるのがクラス I の DNA タイピングの主流であります。クラス II の場合には一

番著明な多型性が認められるのがエクソン 2 ですので、第 2 エクソンの多型性部分を対象として調べるのが一般的です。

タイピング方法については次に佐田先生がお話しされますので、詳しくは述べませんが、色々な方法論があります。SSP、SSO、RFLP、SSCP、SBT、RSCA などの略称で呼ばれる原理的に異なる方法論があります。それぞれに特徴があり、また長所、短所がありますので、どれかひとつだけで常に全部のアリルが決められるというわけではありませぬので、アリルを正確に決めるにはい

Number of HLA alleles (2001)

| | |
|--|---|
| HLA-A serological type: 25 (28) DNA type: 239 | HLA-DR serological type: 18 (21) DNA type: DRA ; 2, DRB1 ; 376 |
| HLA-B serological type: 50 (59) DNA type: 475 | HLA-DQ serological type: 7 (9) DNA type: DQA1 ; 22, DQB1 ; 49 |
| HLA-C serological type: 9 (19) DNA type: 114 | HLA-DP cellular type: 6 DNA type: DPA1 ; 20, DPB1 ; 96 |

スライド15

Frequency of HLA discrepancies between serotype and genotype

| serotype | genotype | HLA-A | HLA-B | HLA-DR |
|--------------|----------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| a, - | a, b | 2.8 % | 5.3 % | 10.9 % |
| a, - | b, - | 0.3 % | - | 0.8 % |
| a, - | b, c | - | 0.8 % | 2.4 % |
| a, b | a, - | 1.1 % | - | 1.6 % |
| a, b | a, c | 0.6 % | 6.4 % | 7.5 % |
| a, b | c, d | - | - | 0.5 % |
| total | | 17 /357 (4.8%) | 33 /266 (12.4%) | 148/626 (23.6%) |

スライド16

くつかを組み合わせてタイピングしなければならないと思います。

5. HLA タイピングの応用

HLA タイピングにどういう意味があるのか、あるいはどういう事に应用ができるのかという現状について、少し紹介します。実践的に使われているのは、移植における HLA タイピングです。また、疾患感受性としては、癌、微生物感染症、そして原因不明の疾患についての HLA 研究が行われています。さらに、それら以外に、集団遺伝学的な解析だとか、あるいは進化学的な解析でも HLA が用いられています。これらの中で移植、癌、それから原因不明疾患の感受性解析に関連する HLA 研究について、いくつか例をとってお話します。

5. 1. HLA と移植

まず、移植における HLA 検査の意義づけですけれども、このスライド 17 は現在の日本での臓器移植ネットワークにおける HLA 検査の位置づけを示しています。腎臓移植や膵臓移植では HLA 検査の結果でドナーとレシピエントの選択が行われています。ところが、心臓、肝臓、小腸、肺については HLA 検査は行われますが、登録者の選択には HLA は使われません。何故かといいますと、このような臓器の移植では、HLA が合わなくても生着しますし、またドナーもレシピエントも少ない状況でありますので、実際には HLA 一致を選択することができないということがあります。ところが、腎臓や膵臓の場合には、HLA が合わなくても生着しますが、HLA が適合しているとより予後がいいということが知られています。

このスライド 18 は

UNOS のデータですが、UNOS でも HLA-A、B、DR 3 つの遺伝子座の HLA 型の一致が、レシピエント選択の条件になっています。ヒトの染色体は 2 本ありますから、HLA-A、B、DR で合計 6 つのタイプが存在します。その 6 つのタイプのうち、ドナーとレシピエントでミスマッチがどれくらいあったか、生着率あるいはメディカルコストがどれくらいかかったかということを示したものです。これを見ていただくと分かるように、ミスマッチが全然ない場合の 5 年後の生着率は 83% です。これに対して、全部にミスマッチがあったという場合の 5 年後の

臓器移植における HLA 検査

腎臓、膵臓: HLA 適合度は登録者選択の要件

心臓、肺、小腸、肝臓: 登録者選択の要件でない

臓器移植における PRA 検査

心臓: PRA 検査と移植予後に関連あり

腎臓: PRA > 50% は生着率が 5-6%/年低い
PRA は短期生着と関連、長期予後とは関連少ない

肝臓: PRA 検査と移植予後の関連ほとんどない

スライド 17

Correlation of HLA mismatches with %graft survival and medical costs in cadaveric kidney transplantation

| HLA mismatches | %graft survival (at 5 yr) | USD medical cost (at 5 yr) |
|----------------|---------------------------|----------------------------|
| 0 | 83±1.0 | 60,434± 736 |
| 1 | 79±1.0 | 63,569±1,044 |
| 2 | 78±0.7 | 64,853± 565 |
| 3 | 77±0.6 | 66,584± 417 |
| 4 | 74±0.5 | 71,031± 461 |
| 5 | 74±0.6 | 72,115± 571 |
| 6 | 72±1.0 | 80,807±1,061 |

(Schnitzler et al, N Engl J Med 341: 1440, 1999)

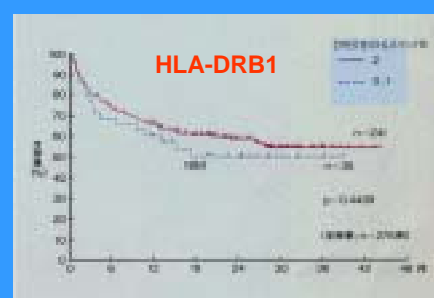
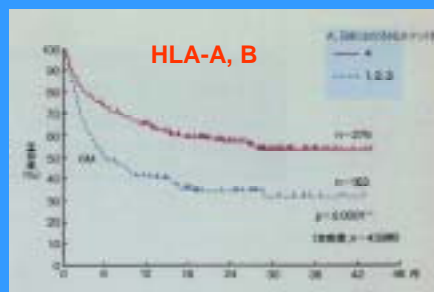
スライド 18

わが国の非血縁者間骨髄移植におけるHLA型一致の意義

HLA mismatch and prognosis of serological A, B, DR-identical unrelated bone marrow transplantation

| locus | mismatch | %AGVH (III) | ρ | %1y-survival | ρ |
|-------------|----------|-------------|--------|--------------|---------|
| A | + | 29 | 0.001 | 38 | <0.0001 |
| | - | 15 | | 63 | |
| B | + | 33 | 0.008 | 43 | 0.03 |
| | - | 16 | | 58 | |
| C | + | 12 | 0.001 | 53 | 0.79 |
| | - | 32 | | 57 | |
| DRB1 | + | 24 | 0.11 | 45 | 0.02 |
| | - | 17 | | 58 | |
| DQA1 | + | 22 | 0.58 | 41 | 0.07 |
| | - | 17 | | 58 | |
| DQB1 | + | 19 | 1.00 | 42 | 0.015 |
| | - | 18 | | 59 | |
| DPA1 | + | 19 | 0.90 | 57 | 0.76 |
| | - | 18 | | 55 | |
| DPB1 | + | 18 | 1.00 | 55 | 0.38 |
| | - | 19 | | 57 | |

(n = 436 - 439)



スライド19

生着率は約70%ですので、明らかに10%の差があります。ところが、このことはHLAが全く合っていないでも70%は生着していることを意味しています。ですから、HLAは合わせた方がいいのだけれども、合わせる事が必須ではない、ということがわかると思います。ただ、合わせた方が生着率もいいし、メディカルコストも少なく済むということもこれでわかると思います。では、HLA-A、B、DRのどれも同じだけ合えばいいかといいますと、そうではありません。もちろん、合うほどいいのですが、特にHLA-DRが合っている方が成績は良好です。つまり、HLA-AやBよりHLA-DRの方が大きな影響をもっていることが知られています。

ところが、骨髄移植の場合にはがらりと様子が変わります。日本における非血縁者間骨髄移植の場合は、スライド19に示すように、HLAクラスIの方にミスマッチがあると、成績が悪くなるということが知られています。また、

クラスIが違ってくるとGVHDの発症率も有意に高くなるということが知られています。それに対してDRB1は多少違っていてもあまり予後には影響しない、というのが日本での骨髄移植におけるHLA一致の意義とされています。

移植におけるHLA検査

血清学タイピングからDNAタイピングへの移行

理由

- 1) 血清収集の困難さ(特異性検定、試料取得に関する同意など)
- 2) タイピング精度の問題(交叉反応、ドナータイピングなど)
- 3) タイピング結果の再現性(試薬精度の再現性など)

問題点

- 1) 遺伝子検査ガイドラインとの関連(検査に関する同意など)
- 2) タイピング精度(アレル、遺伝子型レベルのアンビギュイティーなど)
- 3) ブランクの取扱(決定不可能アレルの存在する可能性など)
- 4) ヌルアレルの取扱(A*0215N, A*2611N, B*1526Nなど)

スライド20

移植における HLA 検査は、血清学的タイピングから DNA タイピングに移行してきました。その理由は何かといいますと、スライド 20にあるように、血清収集の困難さと、タイピングの精度と再現性がより高いということで、DNA タイピングに移行してきています。しかしながら、これには少し問題があります。いくつかの問題点をスライド 20 に示していますが、そのひとつとして遺伝子解析ガイドラインとの関連があります。

5. 2. HLA—DNA タイピングと遺伝子解析ガイドライン

ヒトゲノムプロジェクトは、ヒトの遺伝子を明らかにすることによって、病気に罹りやすいとか、罹りにくいということが分かるのではないかとすることで進んできています。ですが、こういう遺伝子解析をすると、その人が将来どのような病

気に罹るかということが予測されてしまう懸念があります。遺伝子解析のデータは、個人情報の最たるものですから、個人情報保護法案との関連からも非常に慎重な取

遺伝子解析指針とDNAタイピングによるHLA検査の関連

遺伝子解析指針の基本理念

遺伝子情報は、個人情報の最たるものであるため、**試料の提供を受ける以前に、本人または代諾者へのインフォームドコンセント(文書での説明と文書での同意)が必要**

ただし、被験者個人の診療上有用であることが確立している遺伝子検査は指針の対象外として、関連学会などによるガイドラインの策定に委ねる

移植レシピエントのHLA検査は、

- 1) 被験者本人の診療に有用であることが確立している
- 2) 登録における必須要件である

ドナーのHLA検査は、

- 1) ドナー本人の診療に関わるものではない
- 2) 被験者が脳死者の場合は心臓死を迎えた後に代諾者の承諾を得ることで足る

疾患解析の場合は、患者・コントロールどちらのHLA解析も遺伝子解析指針に沿うことが必要

スライド21

HLA and disease associations in the Japanese population

| Disease | HLA class I | HLA class II |
|----------------------|----------------------|---|
| RA | A11 A2 | DRB1*0405-DQB1*0401 DPB1*0201 |
| IDDM | B54 B61 | DRB1*0405-DQB1*0401, DRB1*0802-DQB1*0302 DRB1*0901-DQB1*0303 |
| Graves | A2 (A*0206) | DPB1*0501 |
| Hashimoto | A2 (A*0207) | DRB4*0101 |
| Takayasu | B52 B39.2 | DRB1*1502-DQB1*0601-DPB1*0901 |
| SLE | B39 | DRB1*1501-DQB1*0602 |
| MCTD | not tested | DRB1*0401-DQB1*0301 |
| Behcet | B51 B61 | DPB1*0201 DRB1*0802-DQA1*0401, DPB1*0501 |
| Crohn | not tested | DRB1*0405-DQB1*0401 DRB1*0410-DQB1*0402 |
| Ulcerative colitis | not tested | DRB1*1502-DQB1*0601-DPB1*0901 |
| subacute thyroiditis | B67 B35 | DRB1*1602-DQB1*0502 |
| JRA (systemic) | no association | DRB1*0405-DQB1*0401 |
| JRA (pauciarticular) | A*02 | DRB1*0401-DQB1*0301 |
| Kawasaki | no association | DPB1*0202, DPB1*0601 |

スライド22

扱いが要求されます。そのようなことから、遺伝子解析ガイドラインが厚生労働省、文部科学省、経済産業省の三省合同でつくられています。スライド21にあるように、遺伝子解析ガイドラインの中に書かれている基本理念は、「遺伝子情報は個人情報の最たるものであるため、試料の提供を受ける前に本人または代諾者へのインフォームドコンセントが必要である」ということです。ただし、「被験者個人の診療上有用であることが確立している遺伝子検査は指針の対象外として関連学会などによるガイドラインの策定に委ねる」と書かれています。

ここでHLA検査について、例えば臓器移植のドナー検査とレシピエント検査がどのような位置づけにあるかを考えてみたいと思います。レシピエントのHLA検査をDNAで行う場合は、診療上有用であると確立している遺伝子検査の範疇に入ります。したがって、これに関しては何の問題もありませんが、ドナーのHLA検査はドナー本人の医療に関わることはありません。ドナーのHLAタイピングをすることは、ドナーの診療には何のメリットもないし、診療に関わることではないということです。この「被験者個人の診療上有用である遺伝子検査」からは除外されてしまいます。しかしながら、ドナーの検査は移植医療における必須事項であります。つまり、ドナーのHLA検査をDNAレベルで行うことは、このガ

イドラインのグレイゾーンに入ってきます。この取扱いについては、日本組織適合性学会においてしっかりと考えていかなくてはならないと考えています。それ以外の場合、色々な疾患で遺伝子解析を行いますけれども、HLA解析でもDNAタイピングで行う以上は、遺伝子解析ガイドラインに沿って行わなければなりません。つまり、ガイドラインに沿ってインフォームドコンセントのもとに血液を採取しなければなりませんし、あらかじめ適切な倫理審査委員会での研究計画が審議、承認されなければならないということになります。

5. 3. HLAと自己免疫疾患感受性

病気との関係でHLAの研究が進んでいます。色々な病気についてHLA解析を行い、クラスI、あるいはクラスIIの特定のアリルとの相関が認められてきました。我々もスライド22に示すような色々な疾患でHLAとの相関を報告してきました。ここではそのうちいくつかの例をとりながら、HLAと疾患との相関の意義に関して説明致します。

まず、グレーブス病についてのHLA解析を紹介します。グレーブス病は、バセドウ病とも呼ばれますが、甲状腺機能亢進を主徴とした病態を示し、臓器特異的な疾患の典型例です。日本人の通常のグレーブス病患者を集めて

| HLA analysis of common Graves' disease | | | | | |
|--|--------------------|--------------------|------|--------|-------|
| 1. HLA-A and -B | | | | | |
| HLA | patient (n=141) | control (n=317) | RR | p | pc |
| A*02 | 58.2 % | 41.0 % | 2.00 | <0.001 | <0.01 |
| B*35 | 19.2 | 13.1 | 1.60 | ns | ns |
| B*46 | 17.0 | 9.5 | 1.96 | 0.02 | ns |

| 2. HLA-DPB1 | | | | | |
|-------------|--------------------|--------------------|------|-----------|----------|
| HLA-DPB1 | patient (n=141) | control (n=317) | RR | p | pc |
| *0201 | 34.0 % | 37.9 % | | | |
| *0202 | 8.5 | 6.0 | 1.46 | ns | ns |
| *0301 | 4.3 | 8.8 | | | |
| *0401 | 5.0 | 10.1 | | | |
| *0402 | 12.8 | 17.0 | | | |
| *0501 | 87.2 | 61.8 | 4.22 | <0.000001 | <0.00001 |
| *0601 | 1.4 | 0.3 | | | |
| *0801 | 0.0 | 1.6 | | | |
| *0901 | 13.5 | 20.5 | | | |
| *1001 | 0.7 | 1.5 | | | |
| *1301 | 1.4 | 3.8 | | | |
| *1401 | 1.4 | 4.1 | | | |
| *1601 | 0.7 | 0.6 | | | |
| *1701 | 0.0 | 0.3 | | | |
| *1901 | 4.3 | 1.3 | | | |

スライド23

タイピングを行ってみますと、スライド23のように、HLA-A2 と HLA-DPB1*0501 の頻度が高いということが分かりました。そこで、グレーブス病への疾患感受性は、HLA-A2 と HLA-DPB1*0501 で決まっているのではないかと考えられます。では、HLA-A2 と HLA-DPB1*0501 というのはどのような関係にあるのでしょうか？

そこでスライド24に示すように、HLA-A2 と HLA-DPB1*0501 の両方を持っている場合、HLA-A2 のみを持つ場合、HLA-DPB1*0501 のみを持つ場合とに分け、どちらも持たない場合とを比較してオッズ比を計算してみました。そうすると、両方持つ場合はどちらか一方を持つ場合よりもオッズ比が高くなるということが分かりました。このことは、HLA-A2 と HLA-DPB1*0501 はお互いが独立しているけれども、相乗効果があるような危険因子であると推定されます。通常のグレーブス病ではこのような結果になりますが、グレーブス病には治療をしてもなかなか治らない治療抵抗性の人と、逆に治りやすい人がいます。これらの臨床的特徴に基づいて患者を分類してタイピングしてみました。その結果をスライド25に示しますが、治りやすいグレーブス病は HLA-A2 以外に HLA-B46 と関連してきます。しかし、HLA-DPB1*0501 との相関は見られず、HLA-DPB1*0202 との相関が認められるという特徴がありました。これに対して、治療抵抗性のグレーブス病は、HLA-A2 には相関を示しませんが、HLA-B35 との相関が認められます。一方 HLA-DPB1 については、*0501 との相関は見られますが、治りやすい患者群で見られた HLA-DPB1*0202 との相関は認められませんでした。このように、同じグレーブス病であり

ながら HLA との相関は全然違います。これはどういうことかといいますと、スライド26にあるように、グレーブス病の組織が壊れるかどうかということを決めているような遺伝子がクラス I 側にあつて、そしてどういう抗体ができるかを決めているような遺伝子が DP 側にあるのではないかと考えられます。

次に、高安病と HLA との相関の解析について紹介します。高安病というのは、大動脈炎症候群といわれるもので、日本で発見された自己免疫疾患のひとつです。大動脈とその主要分枝に炎症と閉塞が生じ、このため脈が触

Two-marker analysis of common Graves' disease

| disease-associated allele | | patient (n=141) | control (n=317) | # OR | p |
|---------------------------|-----------|--------------------|--------------------|---------|-----------|
| A*02 | DPB1*0501 | | | | |
| + | + | 51.8 % | 30.9 % | 7.37 | <0.000001 |
| + | - | 6.4 | 10.1 | 2.78 | 0.04 |
| - | + | 35.5 | 30.9 | 5.05 | <0.000001 |
| - | - | 6.4 | 28.1 | 1.00 | - |

#: odds ratios were calculated against panels negative for both A*02 and DPB1*0501

スライド24

Frequency of disease-associated HLA alleles in patients with various subtypes of Graves' disease

| HLA allele | patients with Graves' disease | | | control (n=317) |
|------------|-------------------------------|-------------------|-------------------------|--------------------|
| | tr-resistant (n=58) | common (n=141) | TBII-negative (n=96) | |
| A*02 | 40.0 % | 58.2 % | 59.4 % | 41.0 % |
| B*35 | 27.6 | 19.2 | 18.0 | 13.1 |
| B*46 | 18.0 | 17.0 | 24.0 | 9.5 |
| DPB1*0501 | 88.0 | 87.2 | 69.8 | 61.8 |
| DPB1*0202 | 10.0 | 8.5 | 19.8 | 6.0 |

■ ; significant association

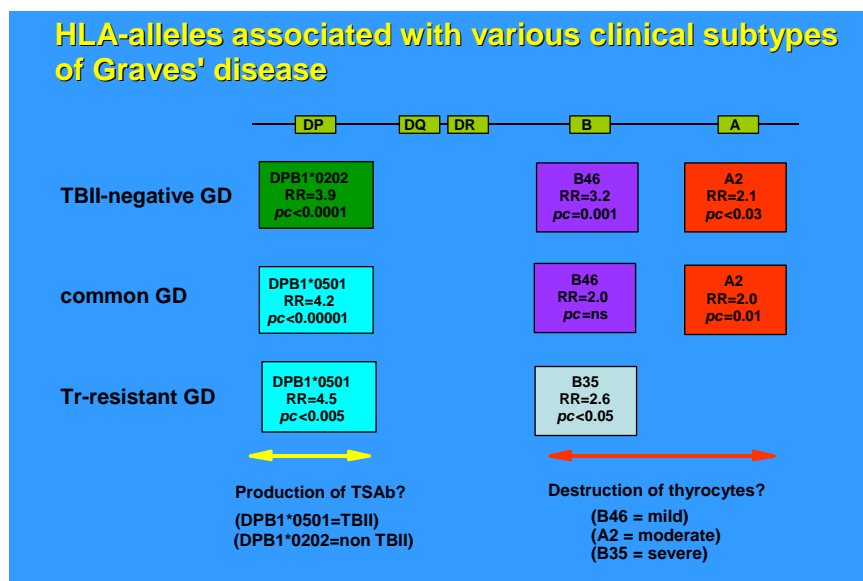
スライド25

れない、網膜症が起こるとい疾患です。高安病と HLA との相関をみますと、スライド 27 のように、HLA-B*5201 との非常に強い相関が認められました。また、B52 を持たない患者さんでは HLA-B*3902 との相関が出てきました。クラス II では HLA-DRB1*1502 との相関が認められましたが、HLA-B52 と HLA-DRB1*1502 とは互いに強い連鎖不平衡にありますので、このような相関が見られたときに HLA-B52 と HLA-DRB1*1502 のどちらが利いているのか、あるいは両方とも利いているのか、ということはこれだけでは分かりません。そこで、先ほどのグレーブス病と同様に、

HLA-B52 と HLA-DRB1*1502 の両方を持つ場合、HLA-B52 だけを持つ場合、HLA-DRB1*1502 だけを持つ場合とに分けて、両方を持たない場合とオッズ比で比較してみました。その結果、スライド 28 に示すように、HLA-DRB1*1502 があっても HLA-B52 のない群ではオッズ比が決して高くなりませんが、HLA-B52 を持つ群では HLA-DRB1*1502 を持つ、持たないに関係なくリスクが高くなります。このことから高安病の原因遺伝子は、おそらく HLA-B52 の側にあると推定されます。そこで私たちは、この HLA-B52 の近くで原因遺伝子となるものが何であるのかという解析を行っています。

HLA-B 遺伝子座近辺のマイクロサテライトと呼ばれるマーカーを調べてみました。その結果、スライド 29 に示すように、すべてのマーカーアレルを持っている人たちと一部のマーカーアレルを持たない人たちのそれぞれの相対危険度を解析しました。まず、HLA-B52 関連はプロタイプについて見てみたいと思います。TNF 遺伝子座から HLA-B 遺伝子座あたりまでを見てみますと、全部のマーカーを持っている人た

ちは確かに高いリスクを示しますが、TNF 側のマーカーを持たない人たちのリスクは決して高くありませんでした。つまり、B52 があっても TNF 側のマーカーがないとリスクは高くなりません。一方、TNF 側のマーカーを持っていても B52 がない人たちのリスクは決して高くないということもわかります。このことから、高安病と関係している遺伝子は、TNF 遺伝子座周辺にひとつと HLA-B 遺伝子座周辺にひとつの両方がないといけなように見えます。では HLA-B39 に関連したハプロタイプの方はどうかといいますと、全部のマーカーを持つ



スライド26

Association of HLA alleles with Takayasu's arteritis

| HLA allele | patients (n=97) | controls (n=308) | RR | p |
|------------|-----------------|------------------|------|----------|
| B*5201 | 50.5 % | 24.1 % | 3.21 | <0.00001 |
| B*39 | 8.2 | 3.1 | 2.79 | <0.04 |
| B*3901 | 4.1 | 2.7 | 1.56 | ns |
| B*3902 | 4.1 | 0.5 | 9.59 | <0.02 |
| DRB1*1502 | 44.3 | 25.0 | 2.39 | <0.0005 |
| B*5401 | 6.2 | 11.6 | 0.50 | ns |
| DRB1*0405 | 14.3 | 25.5 | 0.49 | <0.03 |

スライド27

ている人たちというのは確かにリスクが高いのですが、TNF側のマーカーを持たない人たちではリスクが低くなります。ということから B39 の場合も TNF 遺伝子座周辺に原因遺伝子があるように見えます。さらに興味あることに、この TNF 側のマーカーは、HLA-B52 ハプロタイプと HLA-B39 ハプロタイプでまったく同じでした。そこで、TNF 側には HLA-B52 ハプロタイプと HLA-B39 ハプロタイプとに共通の原因遺伝子があり、HLA-B 遺伝子側にはそれぞれに特異的な原因遺伝子があるのではないかという推定が成り立ちます。

では一体、TNF 側の原因遺伝子が何であるかということ調べてみたら、IKBL1 という遺伝子であることが分かりました。IKBL1 の色々な多型を調べてみますと、ス

Odds ratio of risk for Takayasu's arteritis associated with HLA-B*5201 and/or DRB1*1502

| HLA allele | | patients (n=97) | controls (n=224) | O.R.# | p |
|------------|-----------|-----------------|------------------|-------|----------|
| B*5201 | DRB1*1502 | | | | |
| + | + | 42 | 51 | 3.8 | <0.00001 |
| + | - | 7 | 3 | 10.7 | <0.00001 |
| - | + | 1 | 5 | 0.9 | ns |
| - | - | 47 | 165 | - | - |

#; O.R. was calculated against panels negative for both B*5201 and DRB1*1502

スライド28

ライド30に示すように、特定のアルルが高いリスクを示すということが分かりましたので、この IKBL1 遺伝子の多型が HLA-B39 や HLA-B52 に共通した原因であろうと推定しています。ここで重要なことは、HLA との相

Mapping of HLA-linked genes controlling the susceptibility to Takayasu's arteritis by using recombinant populations

| | TNFα (119) OR=3.2 | C1-2A (238) OR=3.6 | MICA (A6) OR=1.7 | MIB (326) OR=1.7 | C1-4-1 (217) OR=2.1 | B (*5201) OR=3.0 | C1-2-5 (208) OR=2.8 | RR |
|----------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|------------------------|---------------------|------------------------|-----------------------|
| B52 haplotype | + | + | + | + | + | + | + | 2.67 (p<0.001) |
| | + | + | + | + | + | + | - | 2.22 (p=ns) |
| | - | - | + | + | + | + | + | 1.09 (p=ns) |
| | + | + | + | + | + | - (B51 or 44) | - | 1.09 (p=ns) |
| | - | - | + | + | + | - (B51 or 44) | - | 0.97 (p=ns) |
| B39 haplotype | + | + | + | + | + | + | + | 4.96 (p<0.013) |
| | - | - | + | + | + | + | + | 2.20 (p=ns) |

スライド29

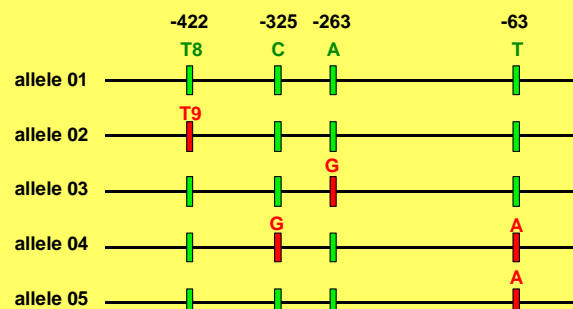
TNF-MiCB間のIkappaB様遺伝子の多型と高安動脈炎感受性との相関

Polymorphisms in the promoter region of IKBL1

```

aaattttgcatctcactgccccatcctacgatagcttcttccgctt
-422
ttgtctgtatftttctftttttgatctgtccctgtgtgcccactg
+1
tggttttgftttgftttccatgfttaatgafittatctctgtctt
-325
atctctctatfttctctctctctctcttctctccatcactgaacca
g
tctctctctctccaagftagaggagcgagg aaaaaacctcaataac
-263
g
tctcttctctctccccctccccctctctctctctctctctcagtc
agttctctgggttcagacggccccttaatttaagtcctctagttcccc
tgggagatctggccaagaactaccggctggggcggaacacatccgta
-63
acgccctcacagftcactctctctctctcactcctctctctctctctct
a
attctctcagctggaggtctctctccctctctctctctctctctctct
CCGAG
CTTCTTAAACACAGGCCTTGGGCCCTACGGCTCTGGGGGTACT
CGGGGGCAGGATGAGTAACCCCTCCCCCAGGTTCCAGAGG
GCCTCCACATCTGTCTGGGCGGCTGATTCAATTCTAGATCATA
tggagattatctgtgact
    
```

Polymorphism in the promoter region of IKBL1 gene



Association of IKBL alleles with Takayasu's arteritis in Japanese

| allele | % patients (n=94) | % controls (n=213) | RR | p | pc |
|--------|-------------------|--------------------|------|---------|--------|
| 01 | 45.7 | 59.2 | 0.58 | 0.03 | ns |
| 02 | 9.6 | 15.5 | 0.58 | ns | ns |
| 03 | 60.0 | 35.2 | 2.84 | 0.00004 | 0.0002 |
| 04 | 10.6 | 14.1 | 0.73 | ns | ns |
| 05 | 45.7 | 49.8 | 0.85 | ns | ns |

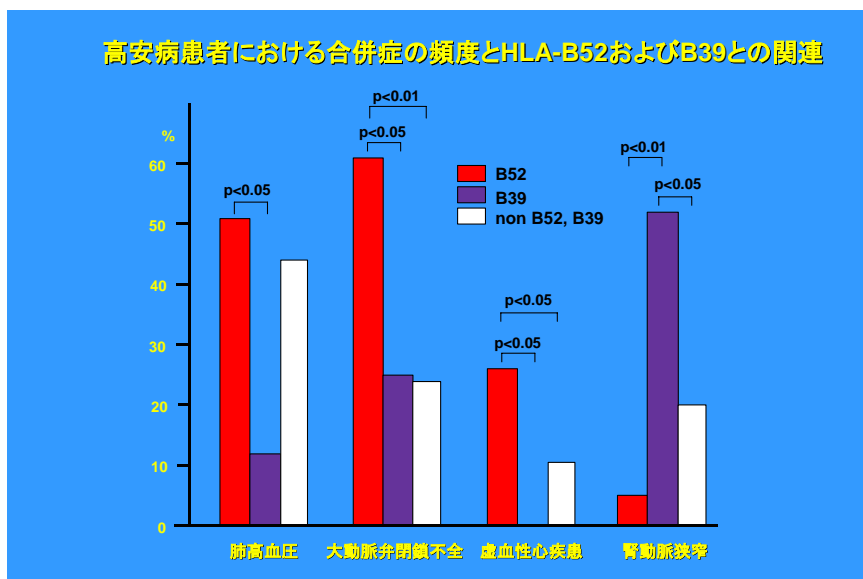
スライド30

関があるからといって、必ずしも HLA それ自身が疾患感受性に関わるのではなく、HLA 領域にある HLA 以外の遺伝子が疾患に関わる可能性があるということです。

HLA-B52 ハプロタイプ、HLA-B39 ハプロタイプでは

今述べましたように IKBL1 の多型が共通であることが分かります。この部分が共通ですが、ではここだけで疾患感受性が決められているかということ、そうではありません。前のスライド29に示したように、B52 ハプロタイプの場合、B52 が無いとい

けないということが分かっています。このようなことから B52 と B39 タイプとでは病気が違うのではないかと推定されます。そこで、私たちは高安病の患者さんで B52 あるいは B39 を持っている方々の合併症の頻度を調べてみました。すると、スライド31にあるように、B52 を持つ人たちでは、肺高血圧症、大動脈弁閉鎖不全症や虚血性心疾患の合併症が有意に多く見られました。一方、B39 の人たちでは腎動脈狭窄の合併が有意に認められました。このことから、B52 タイプと B39 タイプとふたつの別な高安動脈炎



スライド31

が存在しているのではないかと、私たちは考えています。

5. 4. HLA と癌

最後のテーマは癌と HLA であります。癌が何故癌になっているかといいますと、スライド 32 に示すように、色々な遺伝子に変異を重ねることによって、増殖の優位を獲得する、増殖抑制から回避する、あるいはアポトーシスから逃れる機構が働いています。それと同時に癌細胞は、色々な遺伝子に変異が存在しますから、変異したタンパク質は当然クラス I 分子によって提示されてしまいます。そうすると、CD8 陽性 T 細胞によって認識されてしまいますから、癌はこのような免疫監視細胞から認識されないようにしなければ癌として成立できません。

ではいったいどのようなメカニズムでもって、癌は免

Molecular pathogenesis of colon cancer

1. mutations in cancer-related genes
 - for growth advantage: Ki-ras, etc
 - for growth inhibition: p53, APC, TGFBR11, etc.
 - for apoptosis: BAX, etc.
2. mutations in immune-related genes
 - for escape from immune recognition by CD8 T cells
 - for resistance to cytokine-mediated death

スライド32

疫監視細胞から逃れているのでしょうか？スライド 33 に図示しますが、癌細胞表面のクラス I 分子に癌特異的なペプチドが提示された場合、これが CD8 陽性 T 細胞に認識され、癌細胞は壊されてしまいます。これに対抗し

Recognition of tumor-specific antigen by an anti-tumor CTL

Recognition of tumor antigens by CTLs requires

- A. presence of HLA class I molecules
 1. on the cell surface
 2. with affinity to antigenic peptide
- B. presence of antigenic peptide
 1. binding to restriction molecule
 2. tissue specificity
 3. tumor specificity
 - carcinoembryonic antigen
 - somatic mutation

↓

Loss of HLA may be caused by

1. defects in HLA gene or allele
2. defects in β 2-microglobulin gene
3. defects in TAP/LMP system

スライド33

で癌細胞側から見た場合、どのようにして CD8 陽性 T 細胞から認識されないでいられるかといいますと、まずクラス I 分子を発現しなければいいというのが最も簡単な方法であります。

ではいったい本当に癌細胞は HLA 分子を発現していないのかということが大腸癌を例にとりて調べてみました。正常な大腸粘膜と大腸癌について PCR-SSCP 法で HLA クラス I 遺伝子を解析してみますと、スライド 34 に示すように、一部の症例で正常よりも癌細胞で HLA-A のバンドの一部が薄くなっているところが見られます。

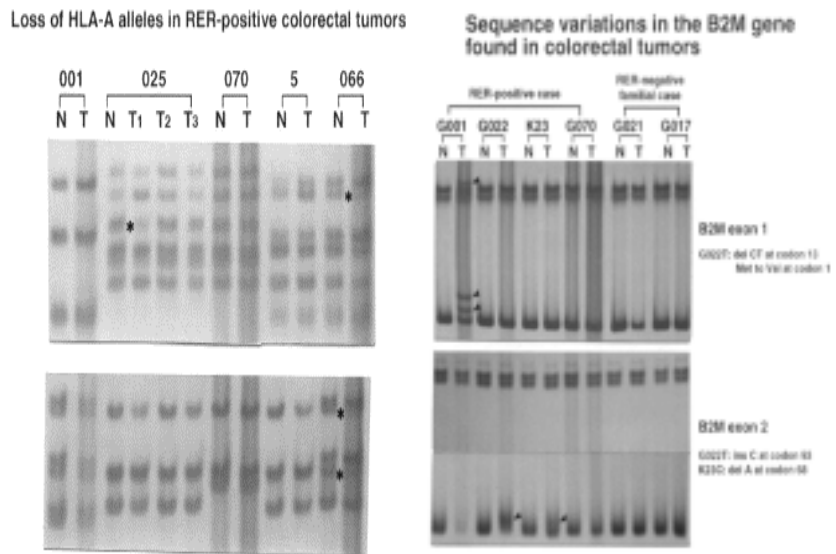
これは、2 本ある染色体の片側がロスしているということを意味しています。このような変異を LOH (loss of heterozygosity) 型の変異といいます。癌の一部にこのような変異が認められるということが分かりました。また、 $\beta 2$ ミクログロブリン遺伝子についても調べてみましたところ、一部の癌でこの遺伝子に変異が認められました。

つまり、一部の癌で HLA-A、HLA-B、HLA-C に LOH 型の変異が、また一部の癌で $\beta 2$ ミクログロブリン遺伝子にフレームシフト型の変異がそれぞれ見つかりました。その頻度は、スライド 35 にあるように、HLA-A、HLA-B、HLA-C では約 10%、 $\beta 2$ ミクログロブリン遺伝子では約 5% に異常が認められました。また、HLA クラス I 遺伝子ないし $\beta 2$ ミクログロブリン遺伝子のどちらかに変異があるという癌の頻度は、20% ぐらいでありました。では、このような HLA 関連遺伝子に変異のある癌に何か特徴がないかということ調べてみました。そうすると、スライド 36 に示すように、 $\beta 2$ ミクログロブリン遺伝子に異常を示す癌では、複製エラーが非常に強く起こっていました。また、 $\beta 2$ ミクログロブリン遺伝子に異常が認められた癌では HLA クラス I 遺伝子に変異は見られませんでしたし、その逆に、HLA クラス I 遺伝子

の LOH 型変異が見られる癌では $\beta 2$ ミクログロブリン遺伝子に異常を示さないという特徴が認められました。

そこで、複製エラーがある癌というものかどのような癌であるかということマイクロサテライトを用いて解析してみました。スライド 37 に示すように、正常と比較して癌で異常なバンドが認められることがあります。このようなバンドについて塩基配列を調べてみますと、マイクロサテライトの繰り返し数が増えているということが分かってきました。

これはどういうことかといいますと、スライド 38 に



スライド34

Somatic mutation in genes for HLA class I molecules in colon cancers

| locus | type of mutation | frequency |
|--------------------|------------------|-------------|
| HLA-B | LOH | 8.6 % |
| HLA-C | LOH | 13.6 |
| HLA-A | LOH | 9.9 |
| HLA class I | | 16.0 |
| B2M | frameshift | 6.2 |
| combined | | 22.2 |

スライド35

Mutations in genes for HLA class I molecules in colorectal cancers

| Tumor ID | RER (%loci) | HLA class I heavy chain gene** | | | | β2M gene** |
|----------|-------------|--------------------------------|-------|-------|-------|-------------|
| | | MICA | HLA-B | HLA-C | HLA-A | |
| G022T | 81 | - | - | - | - | 93ins1 |
| K23C | 76 | - | - | - | - | 68del1 |
| G106T | 74 | - | - | - | - | 13del2 |
| G001T | 57 | - | - | - | - | 13del2/1Met |
| G092T | 57 | - | - | - | - | 13del2 |
| 025T1 | 62 | LOH | LOH | LOH | LOH | - |
| 025T2 | 62 | - | LOH | - | - | - |
| 085T | 52 | LOH | LOH | LOH | LOH | - |
| 070T | 56 | - | LOH | - | - | - |
| ----- | | | | | | |
| 066T | 13 | - | - | LOH | LOH | - |
| ----- | | | | | | |
| 093T | 0 | LOH | LOH | LOH | - | - |
| 15C | 0 | LOH | LOH | LOH | LOH | - |
| 032T | 0 | - | LOH | LOH | - | - |
| 068T | 0 | - | LOH | - | - | - |
| 1C | 0 | - | - | LOH | LOH | - |
| 101T | 0 | - | LOH | - | - | - |
| 14C | 0 | LOH | LOH | LOH | LOH | - |
| 090T | 0 | - | LOH | LOH | LOH | - |

*; RER in tumors detected in 32 loci.

**; mutations in tumors, LOH; loss of one allele, -; mutation was not detected

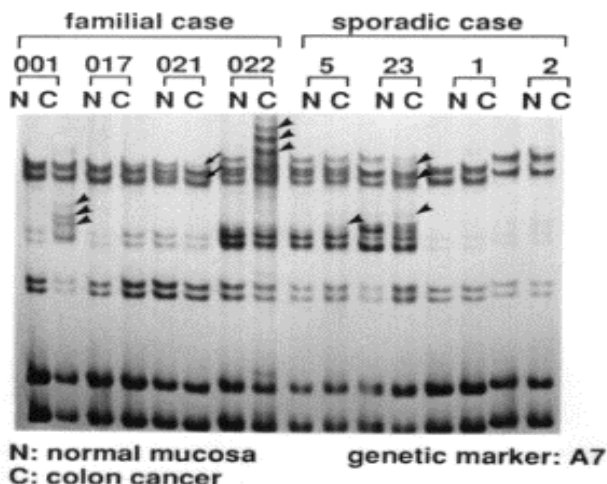
スライド36

示すように、細胞の中で DNA を複製する際に少し間違えることがあります。間違えて複製された場合には、ミスマッチ修復酵素がその部位に結合し、これらの DNA を除去した後、もう一度合成することでミスマッチを除去機構があります。ところが、この酵素に異常があると、ミスマッチが生じて修復できずにそのままエラーを残すことになります。このような複製エラーは、マイクロサテライトで簡単に検出することが出来るわけです。また、マイクロサテライト以外にも、G-T ミスペアを正常に直せないとか、同じ塩基が何回も繰り返している単塩基リピートでも複製エラーが生じてしまうということが分かっています。つまり、複製エラーがある癌はマイクロサテライトに変異があることで検出できますが、その癌ではどんな遺伝子にも変異が起こりやすいということが推定できると思います。

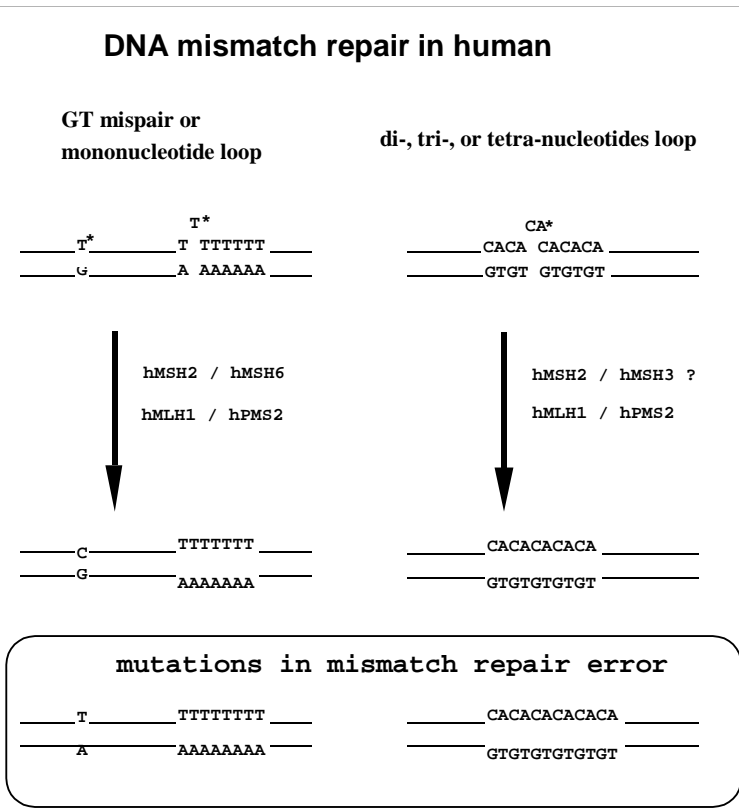
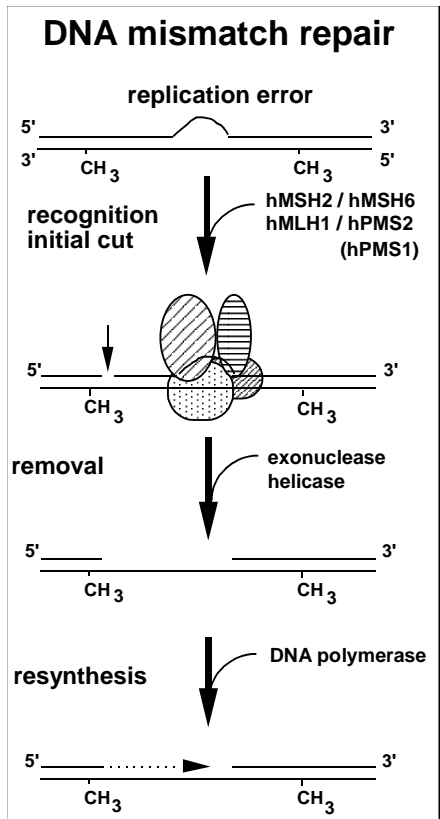
そこで、複製エラーがある癌とな
い癌（一般の癌）についてどのよう
な遺伝子に異常があったかという

ことを調べてみました。スライド39に示すように、複製エラーのある癌では、癌関連遺伝子といわれる p53 や APC などの遺伝子の変異率はそれほど高くなく、むしろ一般の癌よりも少ないくらいです。このことから、複製エラーのある癌は普通の癌とは違った発癌メカニズムを

Genomic instability of a (CA)_n repeat on the chromosome 18 in non-polyposis colon cancers



スライド37



スライド38

持っているものと考えられます。そこで色々な遺伝子の変異を検索してみたところ、複製エラーを示す癌で変異が多く見られるのは、TGFBR2 や BAX などの増殖抑制あるいはアポトーシスに関わる遺伝子であることが分かりました。それと同時に、β2 ミググロブリンの異常と HLA の LOH 型変異も複製エラーを示す癌に特徴的な事象であることが分かりました。

複製エラーがある癌は、より多くの遺伝子に高率に変異が起こり、そのために癌細胞は、より自己ではなくなってしまうと言えます。つまり、そのような癌では、スライド40に示すように、色々な変異を起こしたペプチドを T 細胞に提示してしまうことを防ぐために、HLA の LOH 型の変異ないしβ2 ミググロブリンの遺伝子異常を持つことによって、癌特異的な抗原を T 細胞に提示しないようにしていると考えられます。ではなぜ LOH により片側のアルルだけを落としているかといいますと、両方のアルルがな

くなる、あるいは、β2 ミググロブリンの遺伝子を完全に失ってしまうと、HLA 分子の発現そのものがなくなり、その結果として NK 細胞に認識されるようになります。ということから、癌細胞は CD8 陽性 T 細胞と NK 細胞の両方から逃れるために、HLA の LOH 型変異またはβ2

Frequency of somatic mutations in colorectal tumors

| RER | n | familial case | Ki-ras | p53 | APC | DCC | DPC4 |
|----------------|----|---------------|--------|------|-----|------|------|
| ++ (>20% loci) | 11 | 64 % | 36 % | 18 % | 0 % | 29 % | 33 % |
| + (4-20% loci) | 10 | 20 | 20 | 30 | 10 | 50 | 50 |
| - (<3% loci) | 61 | 18 | 38 | 44 | 21 | 52 | 48 |

DCC and DPC4; LOH on adjacent microsatellite loci

| RER | n | TGFBR2 | BAX | PoIb | p21 | p16 | B2M | HLA |
|----------------|----|--------|------|------|-----|-----|------|------|
| ++ (>20% loci) | 11 | 91 % | 45 % | 18 % | 9 % | 9 % | 45 % | 36 % |
| + (4-20% loci) | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| - (<3% loci) | 61 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13 |

TGFBR2, BAX; alteration at (A)10 repeat and (G)6 repeat
PoIb, B2M, p21, p16, and DPC4; in whole coding region
HLA; LOH in HLA-A, B, or C

スライド39

ミググロブリン遺伝子変異を起こしているのであろうと推測されます。

6. HLA 研究の展開

ここで紹介して来ましたように、HLA の研究は移植医療と実際に関わっていますし、また癌や病気の感受性を解明する研究とも関わっているわけです。時間の関係で詳しくは述べることが出来ませんが、スライド41に示すような色々な領域において、今後とも HLA の応用研究は進められていくことになると考えられます。

Defects of HLA-related genes in colon cancers

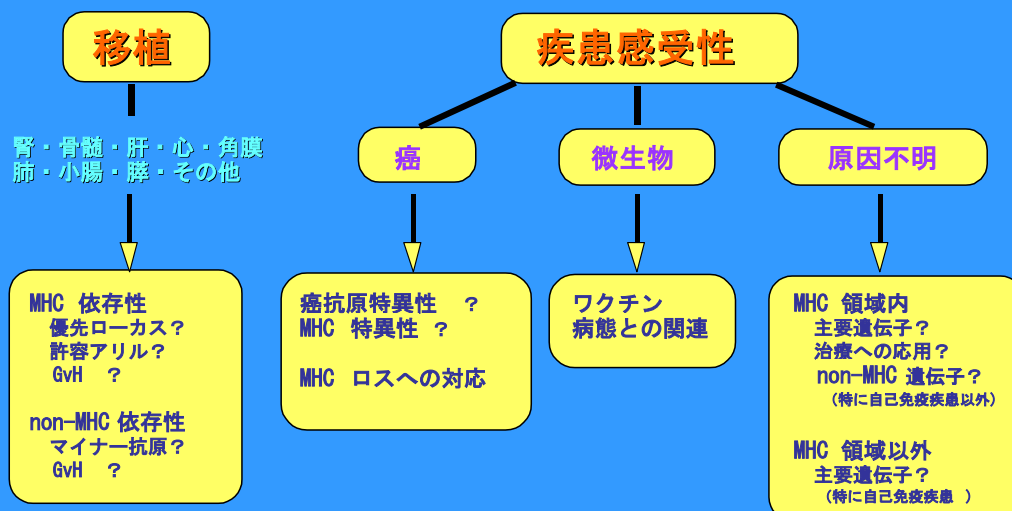
1. LOH type mutations in HLA class I heavy chain genes
- defects in presentation of allele-specific tumor antigen?
2. heterozygous mutations in B2M gene
- reduced expression of HLA class I molecules?

why the complete loss of HLA did not occurs?

- complete loss of HLA would be a target of NK cells

スライド40

MHC研究の展開



スライド41

特集 KAMON 講演会

「HLA タイピング技術に関する基礎知識」

国立循環器病センター研究所

演者：佐田 正晴

血清学的タイピングの歴史

1960～1970年代は、経産婦や頻回輸血患者から様々な特異性を持つ抗HLA抗体が同定されました。HLA抗体を調べる方法としては、白血球凝集試験や血小板補体結合試験が主流でしたが、再現性などが乏しいという欠点があり、1964年にUCLAのP.I. Terasakiらがウサギの補体を使用したリンパ球細胞傷害試験（lymphocyte cytotoxicity test, LCT）を確立しました。この方法は、非常に微量のサンプルで精度の高い抗体検索ができるということで世界中に広まりました。1970から1980年代は、いわゆる血清学的時代で、抗血清を利用したHLA抗原の検査が行われ、移植との関連性、疾患感受性などが研究されました。また、リンパ球を利用した細胞学的検索が免疫応答の研究などに応用されていました。1980年代に入ると、DNAタイピングの研究が行われるようになり、HLA検査に応用されるようになってきました（スライド1）。

血清学的に同定される抗原をSD（serologically defined）抗原、細胞学的方法で同定される抗原をLD（lymphocyte defined）抗原とそれぞれ呼びます。前者にはLCT法が、後者にはMLR（mixed lymphocyte reaction）法やPLT（primed lymphocyte test）法などが代表例としてあります。

血清学的方法は、まず、抗凝固剤を添加した末梢血を遠心分離してパフィーコートを取り、それをフィコールコンレイ比重遠心法で単核球にし、その後、トロンビン処理を行い、純度の高いリンパ球を得ます。それから、ロゼット形成法、ナイロンウールカラム法や磁気ビーズ法などでTとB細胞を分離します。現在では、後者2つの方法が利用され、ロゼッ

ト形成法は用いられなくなっています。

T細胞はクラスI、B細胞はクラスII抗原のタイピングにそれぞれ用いられています。タイピングの方法としては、マイクロプレートの各ウェルに予め分注されている抗血清に細胞浮遊液を入れ、抗原-抗体反応を行わせた後、ウサギ血清を補体として加え、補体反応を行わせます。反応終了後にエオジンで細胞を染色し、ホルマリンで固定します。その後、倒立位相差顕微鏡を利用して判定を行います。感作リンパ球に補体が結合して反応した場合には、細胞に穴があき、エオジンを細胞内に取り込みます。これにより、抗原-抗体反応が起きたか否かを判定することができます（スライド2）。

HLA検査に用いられる抗体は、同種の抗血清で、その由来はHLA抗原で免疫された人から採取した血清です。すなわち、妊娠・輸血・移植を受けた人たちがHLA抗血清の供給源となります。しかしながら、これらの対象血清中に抗HLA抗体が存在するのか、存在するとしたらどのような特異性なのかを調べなければなりません。すな

HLAタイピング技術の歴史

| | | |
|---------------|------------------------------------|---|
| 1950s ~ 1970s | HLA抗原の発見 | 白血球凝集試験 血小板補体結合試験 細胞傷害試験 |
| 1970s ~ 1980s | 国際HLA workshop 移植、疾患感受性 免疫応答 | SD, LD, MLR PLT 単クローン抗体 |
| 1980s ~ 2000s | 移植、疾患感受性 免疫応答機構 | Southern blotting class II DNA typing class I DNA typing SBT |
| 2000s ~ | | |

スライド1

わち、抗体スクリーニングと同定を行う必要があります。そのときに、パネル細胞というものが 필요합니다。抗体スクリーニングの段階では **HLA** の特異性が未知のリンパ球を 30~50 種類用いて検査を行い、抗体の有無を調べます。陽性の血清については、**HLA** 抗原の特異性が既知のパネルリンパ球を用いた反応性からセログラムを作成して単一の特異性なのか、複合した特異性なのか、あるいは **CREG** (cross reacting group) を含むのかを見極め、その血清中に含まれている抗 **HLA** 抗体の特異性を同定します。セログラムとは、パネル細胞と複数の抗血清との反応性が同じもの同士を集めクラスタリングし、それぞれの抗血清の特異性を決定する手法です (スライド 3)。

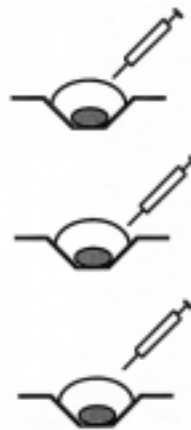
クラス II に対する抗体を含む血清中には、クラス I に対する抗体を含むことが多く、そのような場合にはクラス II 抗原を発現していない血小板を用いて血清中のクラス I 抗体を吸収します。主な **HLA** 抗血清の供給源は、経産婦の分娩血ですが、どのくらいの出現率で抗 **HLA** 抗体が認められるのかといいますと、出産回数が 1 回だと 10~20%、2 回だと 20~30%、3 回以上だと 30~50% 程度です。妊娠による抗 **HLA** 抗体は、必ずしも配偶者由来の不適合 **HLA** 抗原に対するものばかりでなく、それらに関連した抗原決定基 (**CREG** など) に対して抗体を産生してることがあります。

抗血清がつくられるまでの過程で、力価、安定供給、**QC**、パネル細胞の確保、保存や輸送などが問題になってきます。抗血清の力価が低いと反応性が弱くなり、偽陰性を生じやすくなります。**HLA** の抗血清は人由来ですから、たとえどんなに素晴らしいものであっても同じ人から何回も提供を受けるわけにはいきません。このようなことから、特異性、力価ともに素晴らしい抗血清を維持す

ることは非常に困難です。スクリーニングや同定に用いるパネル細胞は、生きていなくてはなりません。このような細胞を数多く確保することは非常に難しい問題であるといえます。また、輸送の際に使用するドライアイスが抗血清に触れると **pH** が変動し、抗体の力価が低下してしまうことがあります。

古典的な **HLA** の検査法として **LCT** 法以外に、リンパ球混合反応 (**MLR**) があります (スライド 4)。この方法は、2 個体のリンパ球を 1 つのウェルの中に入れて培養し、免疫応答が起きたか否かを見る方法です。この培養

HLA class I/II抗原同定法 - タイピング



- HLA抗血清
+
- T/Bリンパ球浮遊液
- 補体 (ウサギ血清)
- エオジン染色
- ホルマリン固定
- 抗原判定

スライド2

セログラム解析 - 抗体特異性の決定



| 血清 panel 特異性 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
|--------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| m13 31,33 | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| m11 2,31 | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| m15 2,31 | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| m19 2,11 | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| m17 11,24 | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| m10 2,24 | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| m12 24,26 | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| m14 24,26 | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| m16 24,26 | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| m18 26,26 | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |

↑ 31+33 ↑ 2 ↑ 11 ↑ 2+24 ↑ 24 ↑ 26

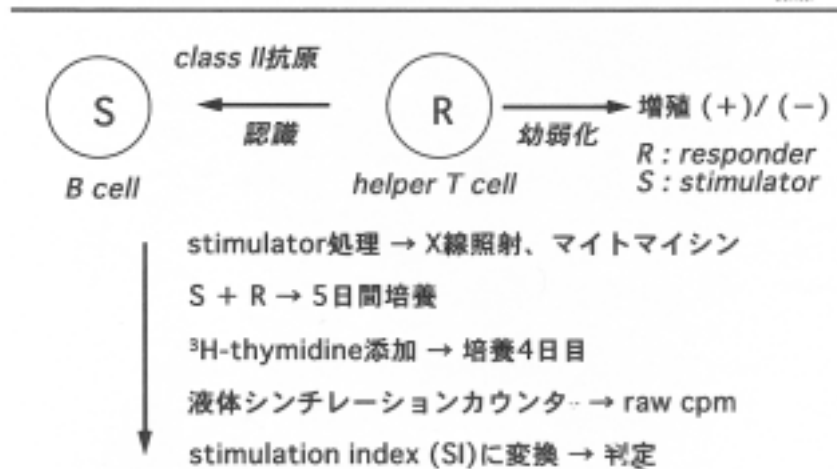
スライド3

を行う際にそのままの状態ではどちらのリンパ球が免疫応答を起こしたのか半別することができません。そこで、片方のリンパ球をマイトマイシンや放射線照射で処理し、免疫応答が起こらないようにしてしまいます。このような状態にしたリンパ球を「刺激細胞」といいます。それに対してもう一方のリンパ球は何も処理しません。このような細胞を「応答細胞」といいます。刺激細胞と応答細胞をひとつのウェルに入れて培養すると、刺激細胞の HLA 抗原と応答細胞の HLA 抗原とが違っていった場合には応答細胞が免疫応答を起こし増殖が起こります。これに対し、両者の HLA 抗原が一致している場合には何も起こりません。この反応は HLA クラス II 抗原によって引き起こされますので、反応したか否かで HLA クラス II 抗原の相違が分かります。この反応の有無は、³H-チミジンの取り込みを液体シンチレーションカウンターで数値化し、stimulation index (SI) を算出して判定します。移植において移植後にドナーとレシピエント間でどのような反応が起こるのかというシミュレーションとして、この MLR が現在でも応用されています。

この MLR は、HLA-D 特異性の判定に今まで利用されてきました。この際に使用する刺激細胞がヘテロ接合ですと、どちらの特異性によって反応が起きたのかが分かりません。そのため、HLA 抗原をホモ接合でもつ刺激細胞が使用されてきました。このようなホモ接合の刺激細胞は、HTC (homozygous typing cell) と呼ばれています。このような HTC の収集は非常に苦勞が多いことが知られています。HTC は、ホモ接合が生まれる確率の高い隔離された地域や近親婚の人たちから集められてきました。これらの細胞は生きた状態で使用されますから、EBV transform した後、液体

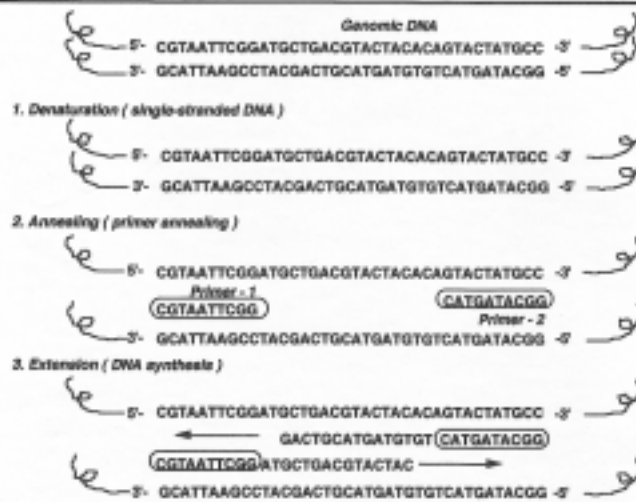
窒素で保存されます。HTC を使用した HLA の D タイピングは、①HTC の収集が非常に難しい、②すべての過程を無菌操作で行わなくてはならない、③³H-チミジンという放射性同位元素を取り扱わなくてはならない、それから④再現性が悪いというような問題点があります。しかしながら、この方法で得られる情報が多いということで現在まで利用されてきました。

リンパ球混合培養反応 (MLR)



スライド4

PCR (polymerase chain reaction) の原理



スライド5

DNA タイピングの手法

今まではクラス I にしてもクラス II にしても細胞表面に発現した HLA 抗原を LCT や MLC という方法を利用して同定してきました。近年、DNA タイピングが利用できるようになり、HLA 抗原タンパク質を規定している遺伝子そのものを直接調べることが行われるようになってきました。

血清学的に同定される抗原型と DNA タイピングで同定された遺伝子型との関連がどのようになっているかといいますと、遺伝子型は 4 桁とか 5 桁の数字でアリルを表しています。その上 2 桁の数字が HLA 抗原のタイプを表しています。例えば、クラス I でいいますと、遺伝子型の HLA-A*0101 を抗原型で表すと HLA-A1 ということとなります。クラス II では、遺伝子型 HLA-DRB1*0404 は抗原型に置き換えると HLA-DR4 になります。

DNA タイピングができるようになった最大の理由は、PCR という方法が確立されたことにあります (スライド 5)。今までは HLA 領域のサザンブロットという複雑な方法を利用してタイピングを行ってきましたが、PCR 法が確立されて非常に簡単に行えるようになりました。

HLA の DNA タイピングの手順は、まず末梢血、細胞、組織、口腔粘膜や毛根などのサンプルから DNA を抽出することから始まります。DNA の抽出に関しては色々なキットが市販されているので簡単に分離を行うことができました。この抽出された DNA にプライマーセット、Taq DNA ポリメラーゼや dNTP 混合液などを含む反応液を PCR 装置にかけて増幅し、HLA アリルの判定を行います。

HLA の DNA タイピング法には現在様々な方法が開発されています。これらの方法を大別すると 3 つに分類すること

ができます (スライド 6)。第 1 は、単一のプライマーセットを用いて共通の領域を増幅してアリルを決定する方法 (PCR-RFLP、PCR-SSOP、reverse PCR-SSOP、PCR-HPA、PCR-MPH)、第 2 に、複数の HLA の多形性領域に対して特異的なプライマーセットを設定して増幅させる方法 (PCR-SSP)、第 3 に、塩基配列を直接、シーケンサーを利用してアリルを決定する方法 (PCR-SBT) に分けることができます。

実際にタイピングに利用されている方法の一つとして PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism) 法があります (スライド 7)。この方法

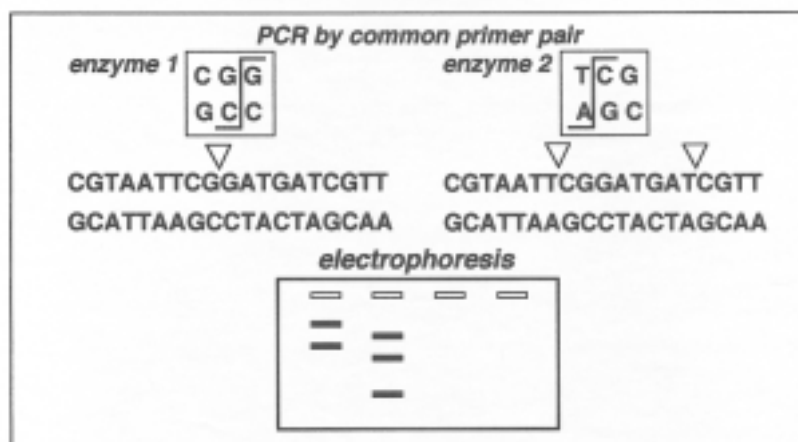
HLA DNA typing 法の種類



- * 共通領域を増幅：単一-primer
 - PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism)
 - PCR-SSOP (PCR-sequence specific oligonucleotide probes)
 - reverse PCR-SSOP
 - PCR-SSCP (PCR-single stranded conformational polymorphism)
 - PCR-HPA (PCR-hybridization protection assay)
 - PCR-MPH (PCR-microplate hybridization)
- * 多型領域を増幅：複数primer
 - PCR-SSP (PCR-sequence specific primers)
- * 塩基配列を直接解析
 - PCR-SBT (PCR-sequence based typing)

スライド6

PCR-RFLP 法の原理



スライド7

は、PCR 増幅した産物を特定の塩基配列を認識して切断する制限酵素を利用して特異的に切断した後に電気泳動して DNA 断片のサイズに従って分離します。そのサイズの違いによってアリルを特定します。

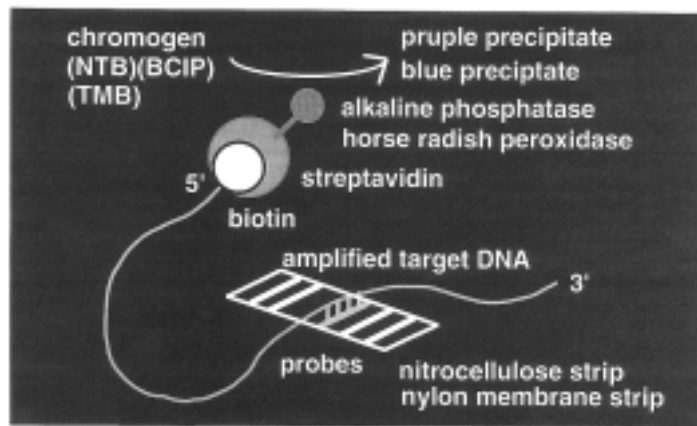
また、PCR-SSOP (PCR-sequence specific oligonucleotide probe) 法は増幅領域で多形性に富んでいる部位の塩基配列に相補的な配列を持つプローブをそれぞれに対して作成し、RI やビオチンなどで標識してから PCR 産物とハイブリダイズさせます。プローブと相補的な配列をもつアリルは結合しますが、違っていると結合しません。これをオートラジオグラフィや発色などの形で検出する方法です。

しかし、PCR-SSOP 法は、日常の検査法としては不向きな面があり、今日の HLA 検査にはリバース PCR-SSOP 法が利用されています(スライド8)。この方法は、予めナイロンの膜などにプローブを結合させておき、そこにビオチン標識しておいたプライマーで増幅した PCR 増幅産物を添加してプローブとハイブリダイズさせます。PCR 増幅産物は、相補的な配列をもつプローブとのみ結合しますが、配列が非常によく似ているとミスハイブリダイズすることがあります。そこで、そのような結合はハイブリダイズした後に洗浄操作で取り除いてあげます。結合した PCR 産物には通常、ビオチンが標識されていますので、ペルオキシダーゼなどを結合させたストレプトアビジンを作動させた後、どのプローブとハイブリダイズしたかを発色で検出します。どのような反応パターンでプローブが陽性かをメーカーが提供している反応表と比較し、アリルを決定します。実際には、HLA のアリルが非常に多いことから反応表による判定は困難な場合もあり、コンピュータに陽性プローブの番号を入力し、アリルを判定し

てもらおうということが行われています。また、プローブの判定ミスや結果の入力ミスについてもコンピュータが判断し、適切な情報を提供してくれます。

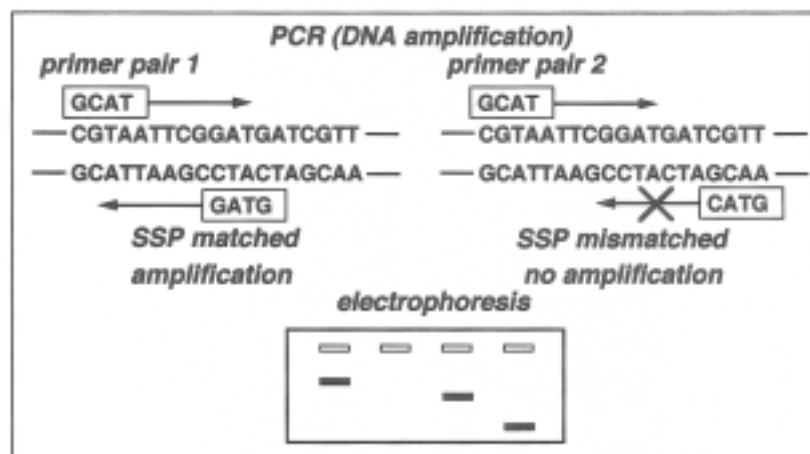
PCR-SSP (PCR-sequence specific primers) 法は、多形性に富む領域にプライマーをそれぞれ設定し、数多くのプライマーセットを用いて PCR 増幅する方法です(スライド 9)。プライマーの配列と適合しているアリルは PCR により増幅されますが、一致していない場合にはプライマーが結合しないので増幅反応は起こりません。これらの結果は、電気泳動によって増幅された PCR 産物の

reverse PCR-SSOP 法の原理



スライド8

PCR-SSP 法の原理



スライド9

バンドの有無を見て判断します。アレルの判定は、どのプライマーによって増幅されたかを判断することで行います。HLAのアレルが非常に多いことからこの方法もコンピュータに増幅バンドの見られたプライマーセットの番号を入力し、アレルを判定してもらうということが行われています。

前述の方法は、PCR産物と特異的プローブとの結合や特異的プライマーによるPCR増幅によってHLAアレルを判定するというものでした。最近になり、PCR増幅領域の塩基配列を直接調べ、HLAアレルを決定するというPCR-SBT (sequence based typing) という方法が開発されました (スライド10)。この方法は、PCR産物を4種類の蛍光色素で標識したプライマーを用いてシーケンス反応を行った後、シーケンサーにかけます。シーケンサーに付属したコンピュータに情報が転送され、判定用のアプリケーションを利用することでHLAのアレルが判定されます。シーケンス反応は、センス鎖とアンチセンス鎖の両方について行われ、この2つの配列に矛盾がない場合にのみアレルが自動的に判定されます。シーケンサーで測定される蛍光強度にはばらつきが見られることがあり、正しい塩基に判定されないことがあるため、蛍光強度を波形で示した図を目視で判定し、修正しなければならぬことがあります。この修正については多少の熟練を要することがあります。

代表的なDNAタイピング法の原理などを述べてきましたが、それぞれの特性を比較しておきたいと思います (スライド11)。何れの方法においてもプロトコールの完成度は高く、問題にならないと思います。アッセイにかかる時間は、SSP法のような早い方法で2時間程

度から6時間程度で、以前よりも短縮されています。タイピング技術に関しては、全体的にやさしくなっていますが、SSOP法については陽性バンドの判定に、SBTについては塩基の自動判定の修正に多少の熟練を要します。処理能力は、RFLPやSSOP法がかなり高いのに対して、SSPやSBT法はあまり高くありません。

DNAタイピング法のトラブルシューティングとしては、PCR増幅とその産物の検出時の2つがあげられると

PCR-SBT (PCR-sequence based typing) の原理



- * genomic DNA
- * PCR detection allele group
- * dye primer cycle sequencing
- * DNA sequencing gel electrophoresis
 - forward sequencing
 - reverse sequencing
- * computer analysis
- * detection of nucleotide sequence

スライド10

HLA DNA typing 法の比較



| 方法 | protocol 完成度 | assay 時間 | typing 技術 | 器材 cost | kit化 | 処理能力 | 検出 allele |
|------------------------|--------------|----------|-----------|---------|------|------|-----------|
| PCR-RFLP | 高度 | >6時間 | 安易 | 高価 | 有り | 高い | high |
| PCR-SSOP | 高度 | >6時間 | 中度 | 高価 | 無し | 高い | high |
| PCR-SSOP (reverse dot) | 高度 | >6時間 | 中度 | 高価 | 有り | 高い | high |
| PCR-SSOP (microplate) | 高度 | >6時間 | 中度 | 高価 | 有り | 高い | low |
| PCR-SSP | 高度 | ≧2時間 | 安易 | 安価 | 有り | 低い | high |
| PCR-SSP (microplate) | 高度 | ≧2時間 | 安易 | 安価 | 有り | 低い | high |
| PCR-SBT | 高度 | 2-8時間 | 高度 | 高価 | 有り | 低い | high |

スライド11


思います (スライド 12)。最初の PCR 増幅時で問題となるのは、増幅されたバンドが見られないということです。その原因としては、DNA 抽出に使用した血液に添加した抗凝固剤が違っているということが考えられます。通常は、EDTA を抗凝固剤として用いますが、ヘパリンを使用した場合には PCR 増幅が起こらないことがあります。それ以外の原因としては、使用した DNA サンプルの濃度が極度に薄かったり、濃かったりした場合、PCR 増幅装置のプログラムミスや試薬類の添加ミスなどがあります。検出系に関する問題点は、SSOP 法の場合、使用するプローブのハイブリダイゼーション効率に差があるため、発色に濃淡が見られます。濃いバンドは判定上ほとんど問題になりませんが、薄いバンドが本当のハイブリダイゼーションによるバンドなのか、クロスハイブリダイゼーションによって起きたものかを見分けなくてはならないことがあります。その他の問題点としては、ハイブリダイゼーションや洗浄温度の設定が間違っていると正しい結果を得ることができないことがあります。また、SSOP 法は操作手順が他の方法に比較して多いために試薬の調製ミスや入れ忘れなどが起こりやすく、それにより正しい結果にならないこともあります。SSP 法の場合、電気泳動に使用するアガロースゲル濃度、通電時間や電圧の間違えによって判定エラーを生じてしまうことがあります。また、プライマーのミスアニーリングによる副生成物と鑑別ミスによる判定エラーなどが問題となります。

HLA 検査と臓器移植



HLA 検査の臨床応用のひとつである臓器移植について触れてみたいと思います (スライド 13)。臓器移植における組織適合性検査としては、移植前のドナーとレシピエント間の

HLA 適合度を見るためのタイピング、レシピエント血清中の前感作抗体検査、移植シュミレーションとしての MLR 法、直前リンパ球交差適合試験などがあります。また、移植後の検査として抗体のモニタリングなどがあります。


UNOS (United Network for Organ Sharing) のデータに基づいて腎移植の成績と HLA の関連について見てみますと、HLA ミスマッチがない群と A、B、DR がすべてミスマッチの群では血縁者間も、非血縁者間もそれぞれ 15% 程度の差が見られます。A、B、DR がすべてミ

Troubleshooting 

- * PCR
 - 抗凝固剤の選択ミス
 - DNA濃度
 - PCRプログラムミス
 - 試薬の調整ミス/入れ忘れ
- * PCR-SSOP/reverse PCR-SSOP
 - hybri./post wash温度ミス
 - 試薬調整ミス順番ミス
 - probeの発色濃淡
- * PCR-SSP
 - ゲル濃度ミス
 - ゲル貫通による流出
 - 電位泳動時間/電圧/電流ミス
 - weak band

スライド12

移植と組織適合性検査 

- * 抗原検査
 - donor/recipient間HLA適合度
- * 抗体検査
 - recipient血清中の前感作抗体検査
 - 直接交差試験：移植直前の抗donor抗体検査
- * その他の検査
 - MLR試験：シュミレーション
 - マイナー組織適合性抗原系検査
 - 移植後モニタリング検査

スライド13

スマッチの群でも非血縁者間の5年生着率は60%程度ありますから、腎移植におけるHLAの適合性はそれほど重要ではないけれども、適合しているとそれだけ成績が良いということが分かります。

アメリカにおける臓器移植待機者数と臓器提供者数の関係を見てみますと、1997年の時点で待機者数が約87,000人であるのに対して提供者数は僅か20,000人しかありません。そのような状況下で、公平に臓器を提供するために臓器移植ネットワークが設立されています。腎移植ではHLAをもとにドナーと適合し、リンパ球交差適合試験が陰性なレシピエントが選択されています(スライド14)。

レシピエントが前感作抗体を持つか、持たないかで移植の成績は、非常に左右されます。もし、前感作抗体を持っている場合には、抗体が結合することで最終的には血栓を生じ、その臓器の機能が失われてしまいます。そのためにも、移植前に前感作抗体の有無を検査しておくことが大切になります。

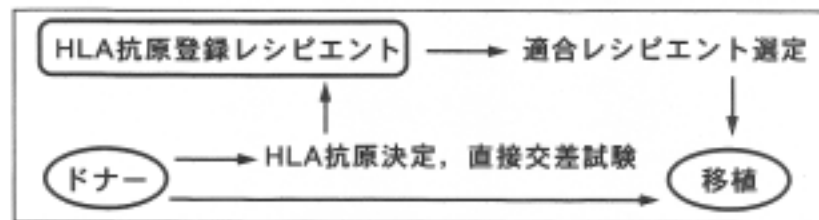
HLA抗体スクリーニングとその特異性を調べる検査法としては、LCT法が従来から使用されてきましたが、その際に使用するパネル細胞は30から50種類程度を用意しなくてはならず、大変手間の掛かる検査でした。また、検査に時間が掛かるという問題点も指摘されていました。しかし、近年、精製HLA抗原結合ピーズを用いたFlow PRA法が開発され、短時間で簡単に抗体の検査が行えるようになってきました。それ以外にもドナーとレシピエントとのリンパ球交差適合試験がLCT法やフローサイトメトリー法で行われます(スライド15)。

LCT法を利用したリンパ球交差適合試験が陽性であれば、移植しないというのが基本です。しかし、このLCT法ではIgG抗体とIgM抗体の

区別をつけることはできません。臨床的にIgG抗体は重要ですが、IgM抗体は問題にならないため、場合によってはこれらを区別して抗体検査をする必要があります。IgM抗体はジチオスレイトールによってジスルフィド結合がはずされ反応しなくなります。この原理を利用してIgGとIgM抗体を区別して交差適合試験が実施されます。

HLAの抗体を調べる場合、LCT法が従来から利用されていますが、結果がうまく得られなかったり、結果がでるまでに時間を要したりしていることから、もっと簡便で短時間に結果を得るためにFlow PRA法が開発され

死体移植システムと臓器移植ネットワーク



UNOS (United Network for Organ Sharing)
 SEOPF (Southeastern Organ Procurement Foundation)
 Eurotransplant
 OPO (Worldwide Organ Procurement Organization)
 日本臓器移植ネットワーク

スライド14

抗体検査と免疫応答検査

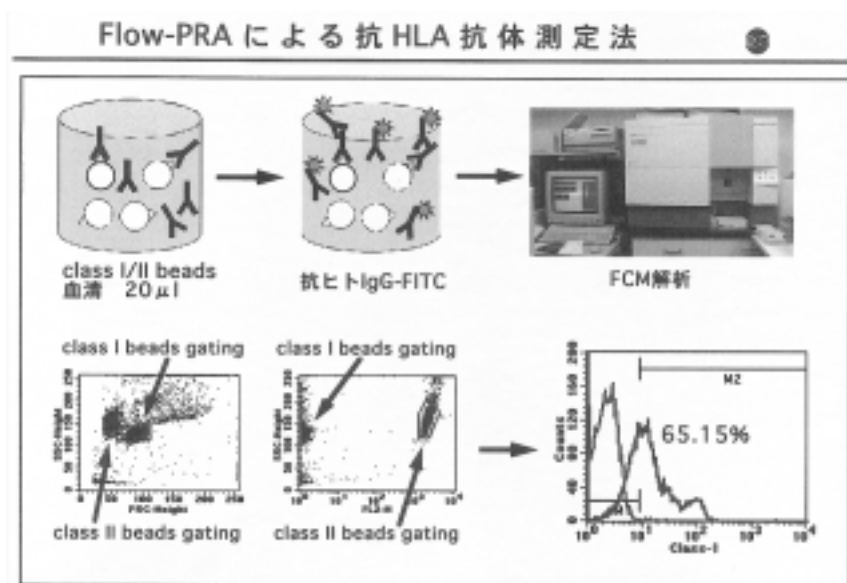


- * recipient血清中の前感作抗体検査：抗体有無、特異性解析
 LCT法：30 - 50パネル細胞
 Dithiothreitol (DTT) 処理法：IgM activity ↓
 Flow PRA法：精製HLA抗原結合ピーズ
- * 直接交差試験：移植直前の抗donor HLA抗体検査
 LCT法：donorリンパ球 x recipient血清
 Flow法
- * MLR法：移植シュミレーション
 responder : recipient, stimulator : donor

スライド15

ました。Flow PRA 法は、HLA クラス I 抗原とクラス II 抗原が結合しているビーズに患者の血清を添加して、抗原抗体反応を行った後、FITC で標識した抗ヒト IgG 抗体を作用させます。反応終了後にフローサイトメータを使用してその反応性を測定する方法です(スライド16)。私たちは現在、この方法が心臓移植後に生じる拒絶反応の予測に使用できないかということを検討しています。

最後に、HLA の DNA タイピング法は、SBT 法を除いてほぼ完成されてきています。しかし、実際に検査を行う場合にひとつの方法でタイピングすることは危険性を伴うことから、複数の方法論を併せて検査することが望まれます (スライド17)。



スライド16

移植における組織適合性検査の意義

- * HLA抗原検査 : LCT → DNAタイピング
正確な抗原同定
→ 長期生着、慢性拒絶回避、公平な移植
- * HLA抗体検査 : LCT → Flow
前感作抗体検査
→ 同種抗原に対する免疫応答能の把握
交差試験
→ 超急性拒絶反応の回避
- * モニタリング : LCT/MLR → Flow
拒絶/感染の診断、免疫抑制剤の増減

スライド17

特集 KAMON 講演会

「骨髄移植における組織適合性」

特定非営利活動法人 HLA 研究所

演者:佐治 博夫

HLA の呪縛を解く

造血幹細胞移植の三大予後要因は、年齢、病態・病期と HLA 適合性であります。これははっきりしたことで、10 年間変わっておりません。非血縁者間移植のデータ解析の結果、HLA 適合性が多変量解析において予後の最大要因であることが分かりました。年齢は、天命で変えられません。病態・病期は、制限条件になります。唯一、人智が及ぶのは HLA 適合性であります。我々が造血幹細胞移植の予後に関与するとすれば、この HLA の適合性だけです。このことについてお話いたします。

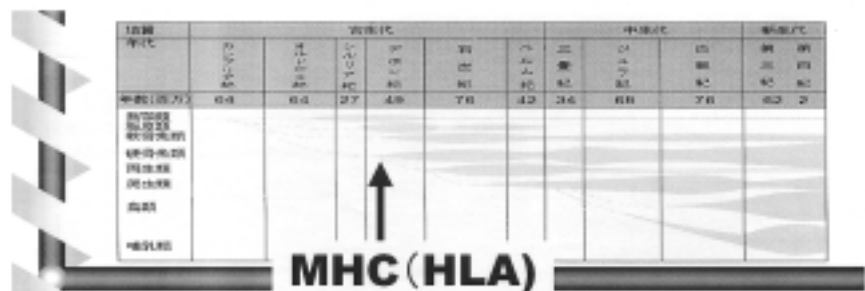
今日のテーマは、「HLA の呪縛」をみなさんから取り除くことです。それは組織適合性を単純に見ないで、総合的に見ていただきたいということです。

MHC は、約 3 億年前のデボン紀に有顎類が分岐した時にその機能を発揮したと考えられています (スライド 1)。世界中の 99% の免疫学者は、いわゆる HLA をキーとする adaptive immunity (獲得免疫) を研究しています。抗原特異的な免疫を 99% の人たちが行っているわけです。生命が誕生して 30 億年、そのたった一割の時期に進化して出てきた分子をキーとする免疫ばかりを研究しているわけです。免疫というのは、こればかりではないはず。すなわち、27 億年間生命の維持に役立ってきたのは innate immunity、いわゆる抗原非特異的な自然免疫であります。それをもっと勉強していかなければならないという意味で「HLA の呪縛」を解いていただかなければなりません。もう一つ、現世を見てみましょう。HLA をキーとする獲得免疫で生体防御をしているのは有顎類以上です。それ以前に分岐し

た、例えば、昆虫や細菌などの動物や植物は獲得免疫なしに生体防御を営んでいるわけです。すなわち、このような獲得免疫を利用しているのは地球上の生命の 1% にも満たません。それ以外の生命は、自然免疫によって生体防御ができていることになります。我々人類においてもこの自然免疫が生体防御に占める割合が相当であると推測されるわけです。アロ臓器移植、アロ造血幹細胞移植においてもその部分があるに違いないという発想で見て欲しいということです。

HLA 多型性の意義

HLA 分子の祖先は、熱ショックタンパク質ファミリーの HSP70 であることを北海道大学の笠原先生が世界に先駆けて提唱されました。結晶解析の結果、その三次構造は HLA 分子と非常によく似ています。この HSP70 は、MHC クラス III 領域に存在しています。HLA 分子は、遺伝子重複が起きて、クラス I とクラス II へ進化したと



- 3億年前、硬骨魚類(有顎類)分岐時にMHCが機能を発揮した。
- このとき動物は革命的な免疫能力を獲得した。
- 免疫多様性の需要はMHCの多様化を促進した。

NPO HLA Laboratory, Kyoto

スライド1

考えられています。

HLAの著しい特徴としては、多型性があります。HLAのアリルは、今でもどんどん増えています。このような多型性を有する遺伝子は極めて珍しいです。HLA-A、-Bや-DR座などはハプロタイプを形成します。そのハプロタイプを日本人で考えてみますと、A座で30、B座で50、DR座で30種類のアリルがあるとしますと、理論的には $30 \times 50 \times 30$ で45,000種類となります。一人の人は父親から一つ、母親から一つの二つのハプロタイプを持つこととなりますから、 $45,000 \times 45,000$ で約20億種類のハプロタイプが理論的に日本人で存在することとなります。ハプロタイプの中のある特定の組み合わせが日本の風土、パラサイトやその他に適応的なのであります。HLA-A24、B52、DR15というハプロタイプは、日本列島に適応的で、それが進化的に保存されたのであって、決してハプロタイプはランダムに組み合わさるわけではありません。そのことを考慮すると、日本人にはおおよそ2,000種類のハプロタイプが存在するものと推測されます。

何故、このような凄い多型性が進化的に保存されたのか。それはHLAの多様性が多いほど種の維持に有利であったということです。パラサイトや他の非自己に対する免疫応答能力が多様性に富むが故に、一つのHLAタイプをもつ人がおそらくウイルスのような地球外生命体によって滅ぼされたとしても別のHLAを有する人が生き残るというような種の維持に有利な点があるからだと思われる。この多様性のヘテロ接合のことをスーパードミナント（超優性）といいます。この超優性を維持する本能がオスとメスのある動物や植物に備わっています。それは近親婚を排除する能力です。近親相姦を悪とするのはホモサピエンスの道徳律といわれていますが、これは道徳律ではなくて、本能なのです。すべての雌雄がある動物・植物は、近親交配を避ける能力があるものが選択的に地球上に選択されております。スイスのベルン大学で男子学生40名と女子学生38名を集めて、それぞれのHLAを調べました。そして、男子学生に一週間シャワーを浴びないで同じTシャツを着続けてもらいました。そのTシャツを机の上に並べて、女子学生にその臭いを嗅いで、もっとも好ましい臭いのするTシ

ャツを選んでもらい、その臭いが恋人を連想させるかという質問をしました。その結果、女子学生は自分のHLAとは異なるHLAを有する男性の臭いのするTシャツを選択しました。これによって超優性が維持されているのではないかということが考えられます。ただし、避妊剤であるピルを飲んでいる女性にはこのような傾向がありませんでした。

赤の女王は居るのか

赤の女王というのは「鏡の国のアリス」の中のある世界の統括者です。赤の女王の世界というのはもの凄いスピードで動いています。一カ所にとどまりなければ、その世界の二倍の速さで走らなければ移動できません。すなわち、忙しい世界なのであります。忙しい世界のホストとパラサイトの果てしない闘いにおいて、極めて短期間に進化が起ころうということを赤の女王仮説と呼んでいます。HLAというのはウイルス抗原の提示分子です。ホストはパラサイトを排除するように進化します。そうすると、ホストはパラサイトを排除できる個体が選択されます。パラサイトはその逆で、排除されないように進化します。よって、排除されない個体が選択されます。その結果、ひとつは共生ということが起こります。もう一つは、果てしない競争に行ってしまう。例えばマラリアとホモサピエンスとの競争です。どうもこれがHLAを進化させたみたいだというのが赤の女王仮説です。

人は、けっこう致命的ウイルスに遭遇しています。私

赤の女王は本当にいたか？ HLA分子上の進化の刻印を見る

- DNAの同義置換と非同義置換
 - GTT (Val) → GTC, GTA, GTG → Val (同義)
 - GTT (Val) → ATT → Leu, GCT → Ala
- 蓄積された変異は同義置換が多い
 - なぜなら、同義置換は生命現象に無影響
- HLA分子の抗原ペプチド結合部位であるαヘリクスと底面のβストランドは例外的に非同義置換が多い⇔進化の淘汰圧
- 赤の女王はいた！

ory, Kyoto

スライド2

が HLA に携わって 30 年経ちますが、その間にラッサ熱、エボラ出血熱やエイズという人類にとって致命的なウイルスが出現してきました。これが正しいとすると、10 年に一種類ぐらいの割合で致命的なウイルスが出現していることになります。人類の歴史に換算すると 1,000 から 10,000 種類ぐらいの致命的なウイルスに遭遇していることになります。その度に人類の獲得免疫のキーワードである HLA は進化してきたわけですから、それが今、あのような多様性になって保存されているとお考えください。

やはり赤の女王は居るのかという話です。この仮説は根井先生のところにいる研究者によってきちんと証明されました。詳しい話について今回はいたしません。HLA の分子上に進化の刻印として赤の女王が居たということが証明されています (スライド 2)。

メジャー VS マイナー

今日一番お話ししたいことは、組織適合性抗原にはメジャーとマイナーがあるということです。メジャーというのが HLA で、マイナーというのがマイナー抗原です。どちらが臨床的にメジャーなのかという話です。もう一つの HLA の呪縛から解かれるというのはこのことがあります。何故ならば、HLA のことを major histocompatibility antigen、主要組織適合性抗原という名前が付いているものだから、HLA 抗原は組織適合性の主要なものであって、その他のものはマイナーだからあまり重要視しなくてもいいという呪縛が諸君にありますし、私にもありました。それがそうでないのだということをこれから少しお話ししたいと思います。これが新しい組織適合性コンセプトです。

マイナー組織適合性抗原と

いうのは、血液型とか HLA のようなタンパク質分子ではありません。掻き摘んでいいますとペプチド抗原です。糖鎖でも脂質でもありません。タンパク質を構成しているオリゴペプチド、9ないし 12 mer のペプチド抗原です。これが HLA の分子を入れ物として表現されるのがマイナー抗原であります (スライド 3)。ゲノムサイエンスの結果分かった SNPs、特にコーディング SNPs です。だ

マイナー組織適合性抗原とは?

- MHC (HLA) 以外の同種多型性であり、
- 多型がペプチドとして HLA に表現され、
 - 蛋白として細胞表面への表現を必須としない。
- HLA (通常はクラス I) 拘束性があり、
- T cell receptor によって認識され、
- 自己および同種免疫反応を引き起こす。
- 臓器または組織特異性がある。

NPO HLA Laboratory, Kyoto

スライド 3

分子として特定できたマイナー組織適合性抗原

| mHa | Source protein | Restriction molecules |
|-------------------------------------|--------------------|----------------------------|
| ヒト | | |
| HA-1 | KIAA0223 protein | HLA-A*0201 |
| HA-2 | Class I myosin | HLA-A*0201 |
| H-Y | SMCY protein | HLA-B7, -B60, -A1, -A*0201 |
| HB-1 | ? | HLA-B44 |
| HA-8 | KIAA0020 protein | HLA-2 |
| マウス | | |
| AAPDNRETF | Unknown | H-2D ^b |
| COI | Cytochrome oxidase | H-2M3 |
| mHA produced by Mitochondria | | H-2K ^b |
| H-Y | UTY protein | H-2D ^b |
| NDI | NADH dehydrogenase | H-2M3 |

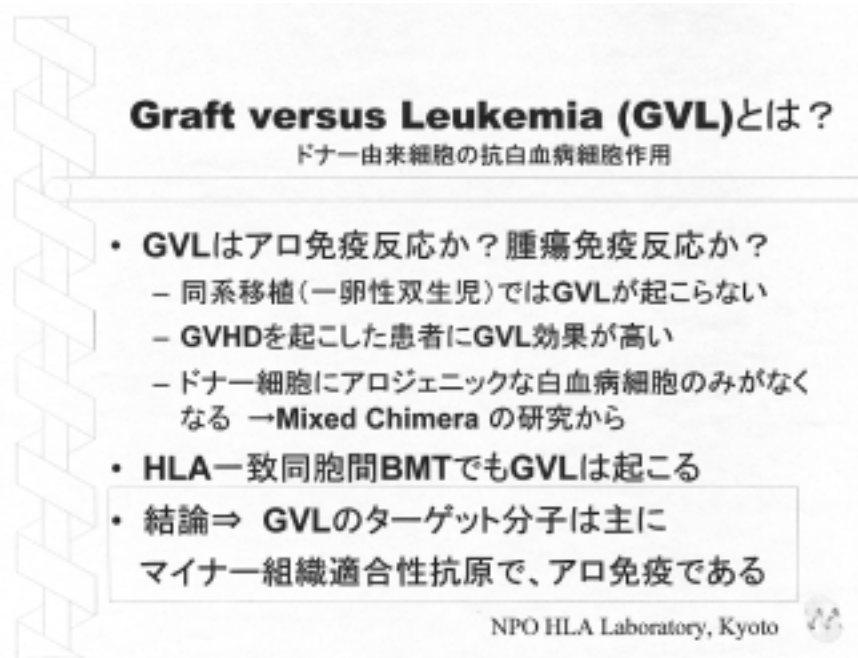
NPO HLA Laboratory, Kyoto

スライド 4

いたい 50 万ぐらいあるのではないかと考えられます。それから、マイナー抗原は臓器・組織特異性があります。50 万種類ぐらい存在していると考えられるマイナー抗原ですが、実際に分かっているのは僅かです (スライド4)。注視していただきたいのは、ヒトではまだ見つかっていませんが、マウスのマイナーとしてチトクロム C オキシダーゼの多型性が見つかっています。これはミトコンドリアの産物です。ミトコンドリアの産物がマイナーになりうるということは、非常に重要なことです。

私の親友である Els Goulmy は、師匠である van Rood からマイナーの研究を 20 才代に言われました。それから十何年間も論文を出せないでいました。ヒトのマイナーについて誰も知らないし、世界中で研究をしているのは彼女だけでした。だから、論文が出せるはずがなかったわけです。それが 1999 年に HLA 界ではもっとも主要な Rose Payne Award を受賞しました。そのときの keynote のタイトルが "Now, from Minor League to Major League!" で、ここには一生懸命にマイナーを研究してきて、メジャーな賞を貰ったという彼女の気持ちが込められています。

造血幹細胞移植において、抗白血病効果が大事です。その抗白血病効果を GVL (graft versus leukemia) 効果といいます (スライド5)。ドナーのキラーT細胞がホストの持っている残存した白血病細胞を殺すときの標的分子は何かといいますと、つい最近までは白血病特異抗原だと言われていましたが、マイナー抗原であることが明



Graft versus Leukemia (GVL) とは？
ドナー由来細胞の抗白血病細胞作用

- GVLはアロ免疫反応か？腫瘍免疫反応か？
 - 同系移植(一卵性双生児)ではGVLが起こらない
 - GVHDを起こした患者にGVL効果が高い
 - ドナー細胞にアロジェニックな白血病細胞のみがなく
なる →Mixed Chimera の研究から
- HLA一致同胞間BMTでもGVLは起こる
- 結論⇒ GVLのターゲット分子は主に
マイナー組織適合性抗原で、アロ免疫である

NPO HLA Laboratory, Kyoto

スライド5

らかとなりました。GVL 効果を現すのはマイナー抗原であって、HLA ではありません。

造血幹細胞移植で HLA 一致の同胞、不適合の同胞、一致の非血縁、不適合の非血縁と GVHD の発症率を見てみたいと思います (スライド6)。HLA が一致しているにも関わらず非血縁では約 45%において GVHD が発症します。これは HLA 不一致の同胞よりも多いということなのです。この意味は HLA が一致しているのであるから、これがマイナーによって起こることが分かると思います。HLA の一致と不一致の同胞間、非血縁者間で起こる GVHD 発症率の差が、HLA の不適合効果です。

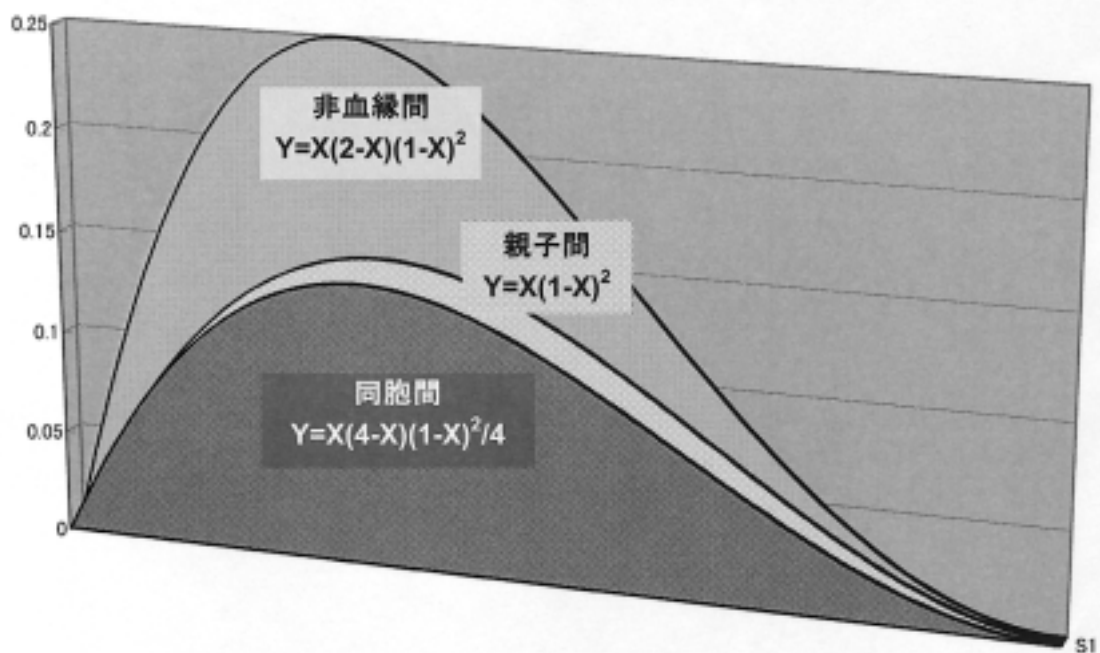
HLA 一致同士の同胞と非血縁の差が何かということをお話する前に、次のことを説明しておきたいと思います。

マイナー抗原の不適合というのは、マイナー抗原陰性

ドナー種類別・HLA 適合別 SCT 後 a-GVHD 発症率(%)。

| 関係 | HLA 適合 | IV | III | II | >II |
|-----|----------|------|------|------|------|
| 同胞 | 同胞一致 | 2.8 | 5 | 14.4 | 22.2 |
| 同胞 | 同胞不適合 | 6.3 | 9.1 | 17.9 | 33.3 |
| 非血縁 | 非血縁適合 | 6.6 | 8.8 | 21 | 36.4 |
| 非血縁 | 非血縁不適合 | 12.1 | 13.7 | 21.6 | 47.4 |
| 非同胞 | 非同胞血縁適合 | 3.5 | 7.9 | 17.3 | 28.7 |
| 非同胞 | 非同胞血縁不適合 | 7.4 | 10.4 | 22.3 | 40.1 |

日本造血幹細胞移植学会 Data Base より。



非血縁間では抗原アレル頻度 0.29 のとき最大 25%に不適合が生じ、親子間ではアレル頻度 0.33 であるとき、最大 14.8%に、同胞間ではアレル頻度 0.31 のとき最大 13.6%に mHA 不適合が生じる。総合的不適合確率は計算式の積分値であるから、面積を比較すればよい。非血縁間では親子間・同胞間の約 2 倍に mHA 不適合が生じることがわかる。

ドナー種類別・HLA 適合別 SCT 後 a-GVHD 発症率の差(%)。

| 関係 | HLA 適合 | >III | 差 | >II | 差 |
|-------|--------|------|------|------|------|
| 血縁同胞 | 一致 | 7.8 | 7.6 | 22.2 | 11.1 |
| | 不適合 | 15.4 | | 33.3 | |
| 非血縁 | 適合 | 15.4 | 10.4 | 36.4 | 11 |
| | 不適合 | 25.8 | | 47.4 | |
| 血縁非同胞 | 適合 | 11.4 | 6.4 | 28.7 | 11.4 |
| | 不適合 | 17.8 | | 40.1 | |

の遺伝子のホモ接合体がマイナー抗原陽性のヘテロ接合体またはホモ接合体をみる不適合であります。すなわち、ホモ接合体対立遺伝子のヘテロ接合にホモ接合体を足した組み合わせを不適合といいます。血縁者間と非血縁者間のマイナー抗原の不適合確率は 0.6 倍ということになります。逆にいいますと、非血縁者間は血縁者間のざっと倍の不適合確率になります。これらを引き算して見てみますと、HLA 不一致の同胞における GVHD 発症率から HLA 一致の同胞のそれを引くと、その差は約 10%

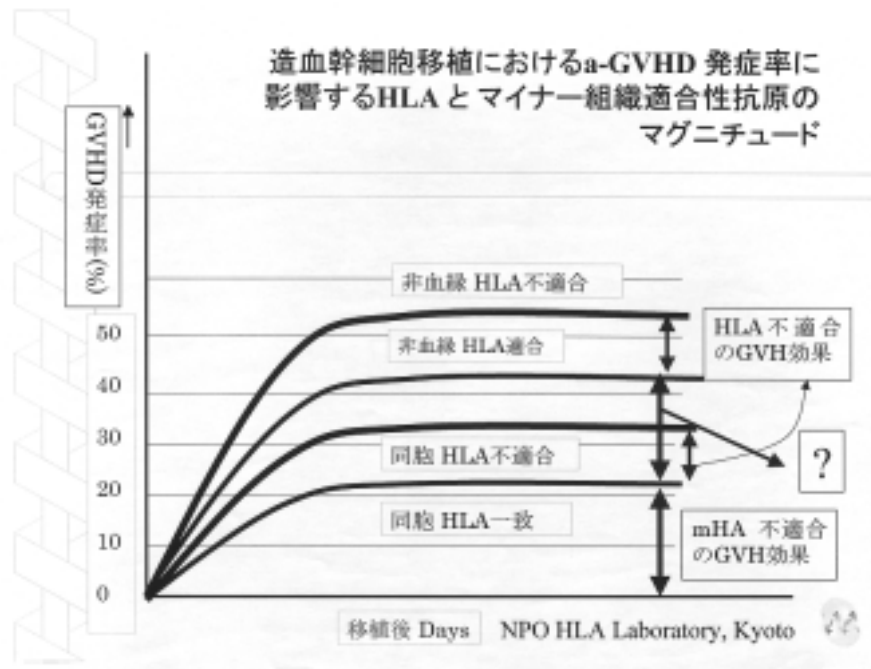
です。また、非血縁者間でもその差は約 10%です。これが HLA 効果です。ところが、HLA 一致の同胞間では GVHD の発症率は、21%です。また、HLA が一致した非血縁者間での GVHD 発症率から HLA 一致の同胞間のそれを引くと、16%となります。これらの二つの数値は、HLA 効果の 10%と比較して大きいということが分かっていただけたと思います。このことから、GVHD が起こしている不適合は、HLA の不一致よりもマイナーの不一致の方が主要な役割をしているということでもあります。

だから、二つの点、一つはGVL効果のターゲットはマイナー抗原である。二つ目はGVHDもマイナー抗原の方がマグニチュードの高いということから、決してマイナー抗原でないということがお分かりいただけると思います。結論はマイナー組織適合性抗原は、メジャーリーグプレイヤーであるということです。このことから、私が発想したことは、非血縁よりも血縁を臓器移植においても造血幹細胞移植においても重視しようではないかということです。その有利性を挙げると、ハプロタイプマッチングが可能ですし、マイナー組織適合性抗原の適合性が高くなります。

母児免疫寛容とは？

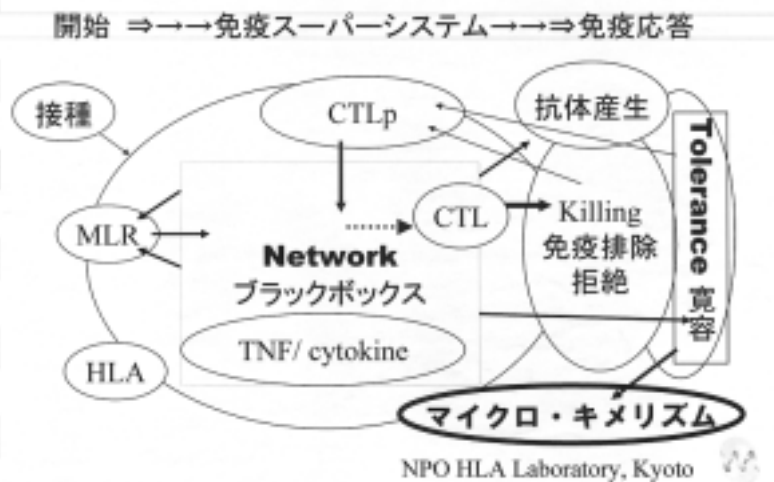
このことから、私が昔から構想していた母児免疫寛容コンセプトが浮上ってきます。デボン紀のはじめにHLAが出現し、また哺乳動物は1億9000万年前のジュラ紀に出現しました。このとき哺乳動物は、胎児を出産まで子宮内に維持し続けるという画期的な能力を獲得しました。すなわち、母は子供を寛容でき、子供は母を寛容できるという能力を獲得しました。これを母児免疫寛容といいます。この現象は妊娠の継続に必須ですが、分娩後にこの寛容は解消されるのであろうか。私は、この現象は分娩後も継続されると考えています。子供は母のミスマッチHLAを寛容する。そのときの胎児は免疫的に非常に未熟です。未熟な免疫システムが母親の胎内で成熟するときにすでに母親のHLAを寛容してしまうということが起こります。自分が持っていない母親のHLAのことをnon inherited maternal antigens (NIMA) と呼びます。何故、私がマイクロキメリズムに注目しているかといいますと、母児免疫寛容を証明したいわけで

す(スライド7)。証明できないと母児間の移植ができません。寛容が成立していない親子間もありますから。寛容が成立している母児間では移植を行おうということです。免疫スーパーシステムにインプットする、接種するとそこからアウトプットが出てきます。これが免疫応答です。免疫応答がポジティブであればkillingとか抗体産



スライド6

母児免疫寛容の証明 なぜ マイクロ・キメリズムか？



スライド7

生となって、ネガティブの場合には寛容となります。ではいったいこのスーパーシステムは分かっているのでしょうか。結論は、まったく分かっていません。分かったようなことをいっばい言っています、けれども、それが総合的にどのような相互関係でポジティブシグナルが出るのか、ネガティブシグナルが出るのか、抗体産生に至るのか、ということになると全く分かっていません。すなわち、免疫スーパーシステムの部分はブラックボックスであります。それでアウトプットを予測するために今までに行われてきたことは、MLR、CTLの前駆体の定量やCTLそのものの測定です。場合によっては、TNFとかIL-2というようなサイトカインを定量します。ということですが、これではだめなのです。これらの項目を測定しても平均値での差異しか得られません。個々で見た場合にそれが寛容なのか、非寛容なのかを臨床で見なくてはなりません。そこで私は、マイクロキメリズムに注目しました。何故ならマイクロキメリズムはデジタルなのであります。あるかないかなのです。もう一つ重要なことは、ブラックボックスの免疫スーパーシステムにインプットされる情報、アウトプット直後の情報ではなくて、寛容が起こった後の結果として得られる現象だと言うことです。

70%ぐらいの母親は、子供の有核球を持っています。すなわち、母親にとって配偶者の片方のHLAハプロタイプを持った有核球を最長50年間維持していました（IPA, inherited paternal antigens、遺伝父HLA抗原）。子供の方は母親由来の細胞を66%ぐらいの人たちが最長46年間維持していました（スライド8）。これはHLAに関していいますと、子対母の不適合抗原です。子は母

親のNIMA（非遺伝母HLA抗原）を許容します。このことは、腎移植においても輸血分野でも見事に証明されています。IPAに対して母は寛容するかもしれません。これらのことが事実であるとしたら、すべての母と子の間で移植が実施可能となります。

父親から子供に遺伝されたHLAハプロタイプをIPA

母と子におけるマイクロキメリズムの成立頻度

| 母 末梢血中の児細胞 マイクロキメリズム | | | 児 末梢血中の母細胞 マイクロキメリズム | | |
|-------------------------|-------|------|-------------------------|-------|------|
| 例数 | 検出数 | 非検出数 | 例数 | 検出数 | 非検出数 |
| 56 | 46 | 10 | 76 | 50 | 26 |
| | (82%) | | | (66%) | |

NPO HLA Laboratory, Kyoto

スライド8

NIMA/ IPA コンセプト



- **NIMA: 非遺伝母HLA抗原**
 - Non-inherited maternal antigens
 - 子対母の不適合抗原
 - 子はNIMAを許容する
- **IPA: 遺伝父HLA抗原**
 - Inherited paternal antigens
 - 母対子の不適合HLA抗原
 - 母は子のIPAを許容する

NPO HLA Laboratory, Kyoto

スライド9

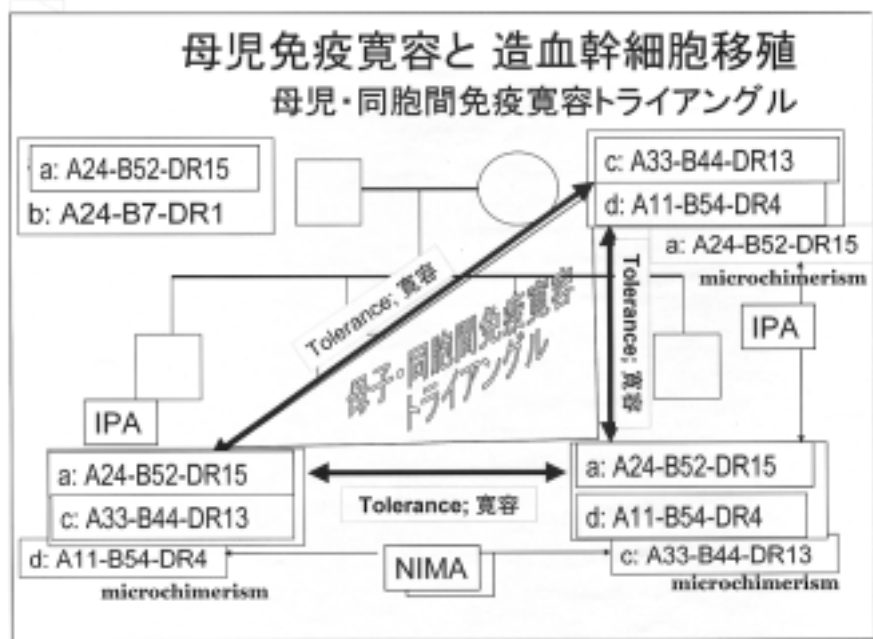
と、遺伝されなかったハプロタイプを NIPA とそれぞれいいいます。また、母親から子供に遺伝された HLA ハプロタイプを IMA と、遺伝されなかったハプロタイプを NIMA とそれぞれいいいます (スライド9)。

兄弟がふたりいたとして、この子供たちは母親との間で双方向に寛容になっています。ここで注目していただきたいのは、この同胞間の関係です。HLA が一致する同胞と、不一致の同胞と、それと半分一致する同胞の 3 つのタイプがあります。その内、父親から遺伝された HLA ハプロタイプ (IPA) が共通で、母親由来の HLA ハプロタイプ (IMA) が異なる同胞間においては、非遺伝母 HLA ハプロタイプ (NIMA) も異なることとなります。ここで、それぞれの子供は NIMA に対してマイクロキメリズムが成立します。また、母親は IPA を持ちますから、同胞間で共通のハプロタイプに対してマイクロキメリズムが成立します。このことにより、母と子供との間、同胞間のすべてで寛容が成立しますから、どの組み合わせであっても移植が可能となります。このことを母子・同胞間免疫寛容トライアングルと呼んでいます (スライド10)。

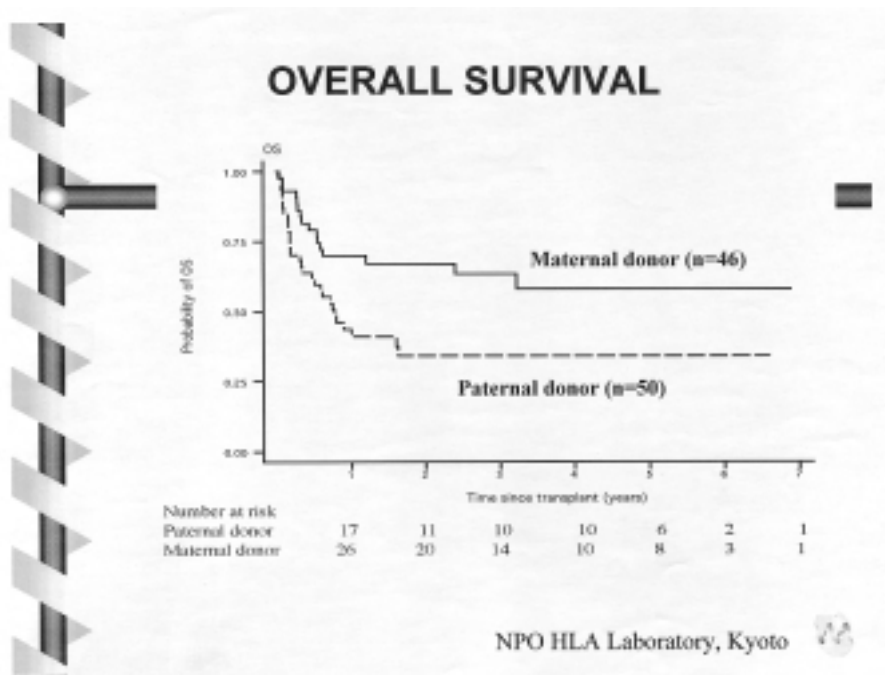
Overall survival を母親から移植を受けた子供 (46 例) と、父親から受けた子供 (50 例) とに分けてみました (スライド11)。その結果、見事に差があり、母親からの移植成績の方が良好でした。これをさらにマッチとミスマッチとに分けて検討してみました。そうすると、マッチでは両者に有意な差異は見られませんでした。ミスマッチ・ペアでは明らかに父子間より母子間の方が移植成績は良好でした。母親から移植した場合にはマッチとミスマッチではあまり差が見られ

ませんでした。このことから提唱している母児免疫寛容が臨床的に証明されたこととなります。

以前から臍帯血バンクに母児免疫寛容を提唱していますが、骨髄バンクと異なりなかなか人の意見を取り入れてくれません。母親の HLA を調べれば、臍帯血の NIMA を特定することができます。臍帯血が NIMA に対して寛



スライド10



スライド11

容ですから、GVHD を起こしにくくなります。ですから、そのハプロタイプを許容抗原として登録することができます。このことをニューヨークの血液センターでは採り入れて実施しているようです。

臍帯血移植の最大の欠点は、非腫瘍性の患者さん、重症の再生不良性貧血や代謝性疾患の患者さんなどへ移植した場合、50%に拒絶が起こり死亡してしまいます。これは由々しき問題でありまして、患者のNIMAは、母親のHLAを調べることで特定することができます。ですから、このNIMAをミスマッチとした臍帯血を選択すれば拒絶の少ない移植を実施することができるはずで

す。NIMA と IPA のどちらが安定した寛容であるか。Frans Claas が提唱している子供のNIMA寛容は、未熟なときの寛容獲得ですから、一生の間続くであろうと言われてい

ます。それに対し、母の子供IPA寛容は成熟してからで、妊娠期間中のみ起こっている現象であるから破綻する可能性があります。その臨床的証拠として、子供から母親へのミスマッチ移植ではIII度以上の急性GVHDは起きていませんが、母親から子供への移植では約40%にIII度以上の急性GVHDが起きています。2座以上のミスマッチ間での移植で、子供から母親へのoverall survivalは高いのに対し、母から子への移植は、それが約50%と低いものでした。

以上のことから、移植の選択順位は、第一選択肢がNIMA相補同胞間(3座ミスマッチまでOK?)、第二選択肢が子供から母親(3座ミスマッチまでOK?)、第三選択肢が母親から子供(2座ミスマッチまでOK?)、第四選択肢が父子間で1座ミスマッチまで、第五選択肢が他の血縁者間で1座ミスマッチまでです。これらに該当するドナーがない場合には、骨髄バンクをお願いすることにはいかがでしょう。

血縁者間での移植は、ハプロタイプのマッチングが可能、マイナー組織適合性抗原の適合性、移植の最適なタイミング、ミニ移植とDLI(ドナーリンパ球輸注)が可能、患者と家族の心理、および支払う医療費の抑制などの有利性があります(スライド12)。

腫瘍は猛烈な進化能力をもっています。進化能力は高度な変異能です。分子標的療法は強力ですが、ただし例えるとライフルです。一発で仕留められればいいのですが、撃ち損じたら耐性ができて効かなくなります。この高度な変異能に対しては、ライフルではなく、ショットガンが最適です。あるものが効かない場合には、別な弾で行くというように、次から次へと弾が出てくる連発銃が最適です。そのときの連発銃の標的は、マイナー組織適合性抗原であり、連発銃は、同種造血幹細胞移植、あるいはDLIであります。

すなわち、マイナー組織適合性抗原を標的とするアロ免疫療法が造血幹細胞移植であります。血液腫瘍だけではなく、固形がんに対しても造血幹細胞移植によって治療される日が来ると信じています。

血縁間移植の有利性(まとめ)



- ハプロタイプ・マッチングが可能
- マイナー組織適合性抗原 適合性
- 最良のタイミングで移植可能
- ミニ・トランスプラント、DLI適応可能
- 患者さんと家族の心理
- コスト(社会的、個人的)が低い

NPO HLA Laboratory, Kyoto



スライド12

司会：この様な機会に皆さんお越しく下さりありがとうございました。今後も「KAMON」を通して色々な情報をお届けして参りたいと存じますので、何かリクエストなどございましたらご遠慮無く「KAMON 編集部」までご一報下さい。これを持ちまして「第一回 KAMON 講演会」を終了させていただきます。

13th IHWC 学会レポート

東京大学大学院 医学系研究科人類遺伝学教室

明坂 珠生

平成 14 年 5 月 18 日から 22 日まで、米国シアトルの高層ビル群の一つであるワシントン州コンベンションアンドトレードセンターにて、13th International Congress of Histocompatibility and Immunogenetics が開催された。会期中は、雨の多いシアトルらしくよく雨が降っていたが、そんな天気によって広まったコーヒーを楽しみつつ、学会での発表を拝聴した。

はじめに

学会会場のあるビルディングのエントランスをくぐると、そこは大きな吹き抜けになっており、上階から光が降り注ぎ開放的な空間が広がっていた。その空間に 1 階から 3 階の会場へと続く 1 列のエスカレーターがあり、明るい場所へと昇りながら学会への期待と高揚を覚えたのを記憶している。

学会の会場は基調講演、特別講演、Featured Symposia(抄録審査委員会によって選ばれた 18 組の口演)などが行われた大きな会場が 1 つと、オーラルセッションが行われた小さな会場が 7 つ、ポスターセッション兼企業展示の会場が 1 つという構成であった。学会運営に携わった方に参加人数を伺った所、800 人位とのことであった。

学会スケジュールは少々詰め込みすぎの感があり、午前に Featured Symposia とポスターセッションが同時に開催されたり、午後には 7 つのオーラルセッションとポスターセッションが同時に行われたりと、聞きたいプレゼンテーションが重なってしまうということが度々あった。

セッション

今回のトピックの一つはヒトと他の哺乳類の MHC 領域のシーケンスを比較した研究であったように思う。東海大の Dr.安西のグループはチンパンジーの MHC クラス I 領域の約 80%である 1288kb を決定し、ヒトの MHC クラス I 領域と塩基配列の比較を行った。その結果、この領域の相同性は MHC および MIC 遺伝子で 97.6%、非 MHC 遺伝子で 98.8%、総じて 98.6%であった。塩基配列やアミノ酸配列の比較研究は遺伝子の進化あるいは生物の進化や疾患に関する知見が得られるだけでなく、保存されている配列から遺伝子の存在が示唆されることがある。シアトル・システムバイオロジー研究所の Dr.Xie のグループは、ヒトとマウスの MHC class



(シアトルの街)

IIIにおける塩基配列の比較研究を行い、ヒトで 62 遺伝子、マウスで 63 遺伝子を同定した。遺伝子のエクソン部分はよく保存されており、遺伝子制御に関わっていると考えられる 5'UTR や一部のイントロンでは保存が見られたが、ほとんどのイントロン部分や、遺伝子間領域に保存はみられなかった。見つかった遺伝子の塩基配列をアミノ酸に変換し、モチーフプロファイル解析および相同性検索を行うと、免疫関連遺伝子、転写・調節・シグナル遺伝子など機能によってクラスタリングができた。

他のトピックとして、NK(ナチュラルキラー)細胞および KIR (ナチュラルキラー細胞のイムノグロブリン様レセプター) があげられるだろう。KIR は HLA-A,B,C または G を認識し、NK 細胞の細胞障害性を調節する。KIR 遺伝子ファミリーには 17 の KIR 遺伝子および偽遺伝子が知られており、そのサブセットの組み合わせからなる様々なハプロタイプが存在する。骨髄移植において、HLA のエピトープがミスマッチであると NK 細胞のアロ抗原

に対する反応が起きることはよく知られているが、KIR 遺伝子のミスマッチによる移植への影響については解析が進んでおり、いくつかの発表があった。

フランスの EFS Pays de la Loire の Dr.Gagne のグループは、ドナーとレシピエントの HLA 対立遺伝子が同一かつ KIR 遺伝子がミスマッチの症例で、骨髄移植後の急性 GVHD の発症について解析した。レシピエントの KIR 遺伝子の genotype にドナーの genotype が含まれていない場合、非血縁間移植の全ての例で急性 GVHD を発症していたが、血縁間では全く発症していなかった。非血縁間と血縁間の症例を比較すると活性化型 KIR 遺伝子のミスマッチ数に大きな違いが見られたため、活性化型 KIR が急性 GVHD の発症に強く関与していることが示唆された。このようなことから、KIR 遺伝子ファミリーのタイピングは重要であると考えられるため、KIR 遺伝子のタイピング法の開発は時代の要請である。

フレッド ハッチンソン キャンサーリサーチセンターの Dr.Geraghty のグループは、KIR 遺伝子ファミリーのハプロタイプ（彼らはハプロタイプと呼んでいるが、厳密にはファミリーの各遺伝子の並びという意味）を PCR-SSP 法によってタイピングする方法を確立した。その方法のうち一つは遺伝子特異的な SSP プライマーを用いて KIR の各遺伝子の有無を確認する short SSP 法、もう一つはある遺伝子の 3' 末端にフォワードプライマー、隣の遺伝子の 5' 末端にリバースプライマーを設け、特定の遺伝子同士が並んで存在するかどうかを確認する order SSP 法である。彼らは 27 組の short SSP プライマー対と 28 組の order SSP プライマー対を作成し、白人で 10 種類のハプロタイプを確認し、そのうち 7 種類は日本人にも存在することを確認した。このグループはこの他にも、Long range PCR 法という長い増幅断片が得られる PCR 法とシーケンシングを組み合わせた KIR 遺伝子のハプロタイプのタイピングを行う方法を開発してい

る。この Long range-PCR と先の SSP 法を組み合わせることでほとんどのヘテロ接合体のハプロタイプを決めることができ、彼らは新たに 7 種のハプロタイプを見出した。しかし、KIR ファミリーの遺伝子是对立遺伝子が存在しているものが多く、この方法では対立遺伝子の区別まで行うには不十分であるため、さらなる開発が望まれる。

学会の休憩時間には近くのカフェによく行ったが、ゆったりしたソファに体を預けながらコーヒーの香りを楽しむと凝り固まった全身が弛緩する思いがした。カプチーノ、カフェラテ、マッキャートなどいろいろなメニューがあり、私が好きなものはカプチーノであるが、それらの違いをご存知だろうか？いずれもエスプレッソとミルクで作るもので、カプチーノはエスプレッソに泡立てたミルクをカップ一杯にいれてシナモンを振ったもの、カフェラテはエスプレッソに温めたミルク(ラテ)を加えたもの、マッキャートは温めたミルクにエスプレッソを少量加え表面に色をつけた(マッキャート)ものである。これらの名前はすべてイタリア語で、イタリアンコーヒーの代表的なものである。シアトルでは街のあちこちにスターバックスなどのカフェがあり、雨宿りをしたい時や、ちょっと落ち着きたい時などに便利である。

コーヒーを片手に学会会場から 15 分くらい歩くと小さなお店がたくさん並んでいるマーケットにたどり着く。野菜・果物・シーフードなどの食料品や、花、本、民芸品、洋服、アクセサリなどがあり、“あなたの名前を美しい漢字で書きます”という書道家のおじいさんまでいた。海に近いのでシーフードは新鮮で、海老・蟹・牡蠣・帆立や大きな魚など、品揃えが豊富であった。豪勢に買い込んでその日の夜はバーベキューを楽しんだ。



(カプチーノの絵)

カプチーノの表面に絵を描いて
出してくれるお店もある。



(カフェ)

HLA タイピングのテクノロジー

HLA タイピングに関しては、多くの方法が発表されていたが、その主なものをあげる。

- 1.SSP+real time PCR を組み合わせたもの
- 2.SSP+SSO を組み合わせたもの
- 3.SSP+SBT を組み合わせたもの
- 4.100 プローブを 1 チューブ内で反応させるリバース SSO
- 5.サンガー法シーケンス反応とマスペクトロメトリーを組み合わせた TOF-MS シーケンス
- 6.パイロシーケンス

面白かったテクノロジーをあげるとするならば、ピッツバーグ大学の Dr.Ringquist のグループが発表したパイロシーケンスである。

彼らの方法は、片方のみビオチンのついたプライマーを用いて PCR を行い、ビオチン付加フラグメントをビーズで集め、洗浄して 1 本鎖 DNA とし、それをテンプレートとして片側のプライマーに 1 塩基ずつ dNTP を付加させながら塩基配列を読み取っていくというものである。この塩基付加反応の時に産出されるピロリン酸を ATP に変換し、ルシフェラーゼで発光させ、シグナルを読み取っていく。パイロシーケンスは PCR 反応を阻害する 1 つのファクターとして考えられているピロリン酸を利用するという新しい方法である。また、通常のシーケンシングと異なり定量が可能のため、プールした DNA にも対応できる。しかし、酵素を 4 種類も使うため、特定の SNP を解析したい場合にはよいが、SNP のディスカバリーなど長いフラグメントを解析したい場合にはコストがかかり、不向きであると考えられる。

2002 年 5 月から東京大学人類遺伝学教室の中に「ヒト SNP タイピングセンター」という施設ができ、そこで採用しているテクノロジーの 1 つについて発表をさせて頂いた。蛍光相関分光法 (FCS) という新しい測定系で、溶液中約 10^{-15} L の極微小領域にある、数個の蛍光分子のブラウン運動が作り出す光の揺らぎを測定・解析する方法である。分子の揺らぎの速さは、小さい分子ほど速く、大きな分子ほど遅くなる。また、分子数が少ないと大きな揺らぎとなるが、分子数が



(マーケット)

多いと平均化した揺らぎとなる。これを自己相関関数で解析すると、分子の大きさや数を求める事ができる。FCS の反応系を PCR-SSP 法にすると、PCR 反応溶液中の小さなプライマー分子と大きな PCR 増幅断片の量比が得られ、高感度に増幅の有無がわかり、SNP のタイピングができる。必要な測定量が非常に少ないことから、反応系の微量化が可能であり、将来の遺伝子検査などの汎用に耐えうる低コスト化と高速化が期待できる技術と考えている。

次回の 14th IWHC は、オーストラリアのパーズにて開催される予定である。



(筆者のポスターの前にて)

左から、徳永先生、スタンフォード大学の林玲先生、坂内先生、筆者

先端トピックス ～研究夢想(第二話)～

東海大学医学部分子生命科学

猪子 英俊

2002年のこの春、私は‘地中海号’(Mediterranean)と呼ばれるフランスが誇る世界最高速列車 TGV 特急がパリから地中海に向かって疾駆する新しい路線の終着駅、ニースの郊外の高級住宅地シミア地区にひっそりと佇むアレヌローマ円形闘技場の遺跡を前に、悄然とした思いでローマ帝国時代に思いを馳せていました。このほぼ原型を残す広大なアレヌローマ円形闘技場は、ニースをこよなく愛した画家マチスの美術館を擁する平和な公園の一角にあります。ローマ帝国時代には、他の円形闘技場と同じく、トラ、ライオン、ゾウ、牛などの猛獣の餌食として処刑された多くの罪人達の血で洗われた、と聞きます。春眠を誘う霞に煙る地中海を望む南仏のこの地は大勢のリゾート客で賑わっていましたが、この円形闘技場の遺跡周辺のみは、はるか昔の多くの罪人達の悲運を慮ってか、ひっそりと静寂の時を刻んでいました。このような残忍な処刑にみられる、権力者達の自らの思考が到達する結論を迷いもなく決断し、衆目のもとと実行(処刑)する西洋人達の強い意思は、少なくとも我々日本人には理解できないと私は思います。

私は、このアレヌローマ円形闘技場を訪れる直前に幕を閉じた“尋常性乾癬発症に関わる遺伝子”に関するニースでの国際会議で、“尋常性乾癬の感受性遺伝子は HLA-Cw6 そのものである”という、私にとっては信じられない早急な結論にヒステリックなまでに急ごうとする多くの西洋人研究者達の思考回路と重ね合わせていました。

皮膚疾患である尋常性乾癬は、いうまでもなく HLA の分野では HLA 型 (アレル: 対立遺伝子) と関連する疾患として代表的なものです。西洋人では HLA-Cw6、日本人では HLA-Cw7 との強い相関があります。しかしながら、この疾患の真の感受性遺伝子が

HLA-Cw6(Cw7)そのものなのか、それとも HLA-C 遺伝子の近くに存在するいまだ未知の新遺伝子の多型 (変異) なのかは、この 20 年以上にわたり論争が繰り返されてきた未解決な重要な問題でした。我々は、この問題が決着できない最大の理由は、相関解析で感受性遺伝子の位置をつきとめる (マッピング) ために必要な遺伝多型マーカーの不足である、と思いました。すなわち、HLA-C 遺伝子周辺に相関解析に利用できる遺伝多型マーカーはおよそ 100 kb 左横 (セントロメ側) に存在する HLA-B 遺伝子のみです (図 1)。この HLA-B 遺伝子側には利用できる遺伝多型マーカーはさらに 1,000 kb 離れた HLA-DRB1 遺伝子までありません。一方、反対側の右側 (テロメア側) には、1,000 kb 離れた HLA-A 遺伝子まで、遺伝多型マーカーは全くありません。これでは、いくら HLA 遺伝子が多型性に富んでいるといっても、尋常性乾癬遺伝子を相関解析によって捕まえることができません。尋常性乾癬に一義的に相関するのは HLA-C 遺伝子であり、HLA-B や HLA-DRB1 遺伝子ではないことか

尋常性乾癬はHLA-Cw6と関連する

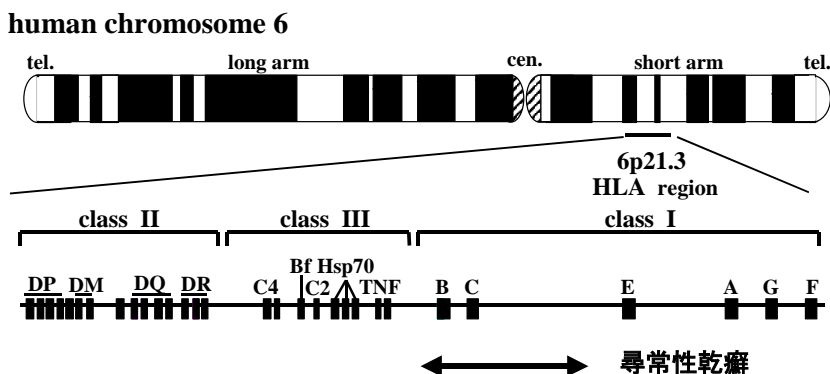


図 1 : 尋常性乾癬の HLA 領域内の感受性遺伝子候補領域

尋常性乾癬は HLA-Cw6 や Cw7 と相関しているため、真の感受性遺伝子は矢印でしめされている領域内に存在するはずである。

ら、尋常性乾癬遺伝子は HLA-C 遺伝子より右側（テロメア側）にあるであろうことは想像できます。しかしながら、HLA-A 遺伝子とは一義的に相関しないことから、尋常性乾癬遺伝子は HLA-C 遺伝子と HLA-A 遺伝子の間に存在する遺伝子である可能性が考えられます（HLA-C 遺伝子も含めて）。

そこで、私はこのような尋常性乾癬遺伝子を含めて、100 種以上も存在する HLA と関連する遺伝子の位置を突き止める（マッピング）には、HLA のような遺伝多型マーカーをもっと多く設定すれば良い、と思いました。HLA 領域には、そのような遺伝多型マーカーは HLA-A、-B、-C、-DRB1、-DQA、-DPB1 遺伝子の 6 個しかないで、もっと数多く増やせばもっと精細に疾患の遺伝子の位置がわかるはずでした。しかし、現実には HLA 遺伝子を HLA ゲノム領域に増やすことは、もちろん“God（神）”ではありませんから、不可能です。それで、それに代わる遺伝多型マーカーを HLA ゲノム領域から見つけ出さなければなりません。ヒトゲノム領域にたくさん散在するそのような遺伝多型マーカーとしては、2 つあります。SNP（single nucleotide polymorphism：一塩基多型）とマイクロサテライトです。SNP は塩基の置換（例えば、T と A）による多型です（図 2）。一方、マイクロサテライトは 2 塩基から 6 塩基までの繰り返し配列のことで、その繰り返しの回数に多型性があります（図 3）。SNP はヒトゲノム上に 1,000 万個が、マイクロサテライトは 120 万個あることが知られているので、マッピングするには数は十分です（多型 HLA 遺伝子がゲノム上に 6 個しかないのに比べて）。しか

しながら、SNP は型（対立遺伝子）の数が 2 つと少ないので、私は HLA の多型を用いた相関解析による疾患遺伝子マッピングの経験から直感的に、疾患遺伝子のマッピングには使えないと思いました。一方、マイクロサテラ

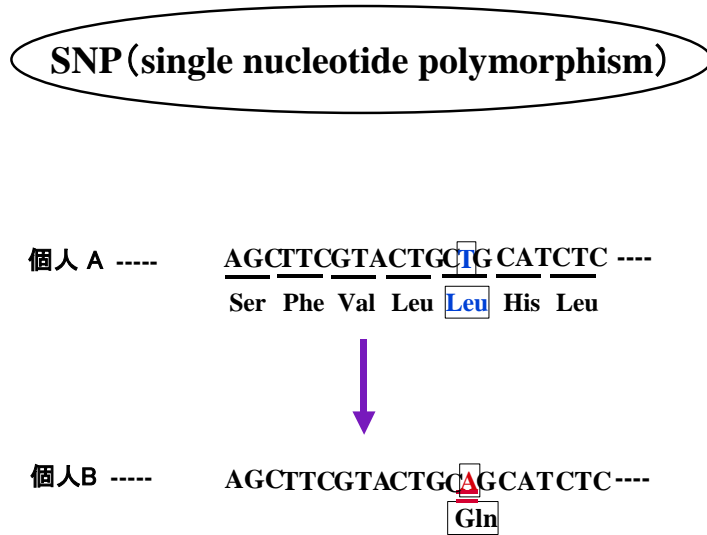


図 2：SNP（single nucleotide polymorphism：一塩基多型）

SNP（single nucleotide polymorphism：一塩基多型）は、一塩基の置換（例えば、図のように T と A）による多型である。

マイクロサテライト繰り返し多型の検出

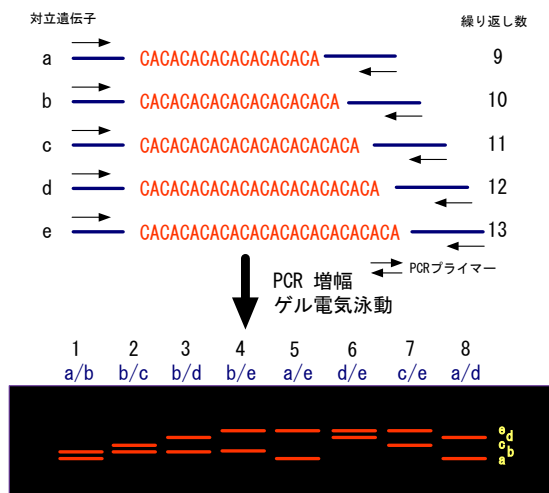


図 3：マイクロサテライト

マイクロサテライトは 2 塩基から 6 塩基までの繰り返し配列のことで、図では CA の 2 塩基繰り返しの例がしめされている。その繰り返しの回数に多型性がある。一般的には、マイクロサテライトはその PCR 産物を電気泳動によって（DNA シークエンサーを用いる）、その長さを調べることにより、多型（繰り返し回数）が決定でき、容易にタイピングが可能である。

イトは型（対立遺伝子）の数は平均10個ですので、HLA 遺伝子ほどではないにしても、十分多型性があり、疾患遺伝子のマッピングに使えるのではないかと感じました。このマイクロサテライトをゲノムから拾いだすのは、ゲノム塩基配列さえ決定されていれば、コンピューターを使えば簡単です。我々のグループは、椎名君達の努力でHLA クラス I 領域を中心に2.2 Mb (2,200 kb)のゲノム塩基配列を決定し、1999年に外国の3つ研究室（Sanger Centre, Fred Hutchinson Center, University of Washington）と共同で、HLA 全領域3.6 Mbの塩基配列を発表していました。したがって、HLA 領域からマイクロサテライトを拾い出すのは簡単にできました。その結果、HLA 全領域3.6 Mbの78個の多型マイクロサテライトを設定することができました。これは、いわば、HLA 領域に新たに78個の新しいHLA 遺伝子が加わったようなもので、相

関解析による疾患遺伝子のマッピングがより詳細にできることを意味します。

そこで、早速我々はこれらのマイクロサテライトを用いて、HLA タイピングを行なうような感覚で、相関解析による尋常性乾癬の遺伝子のマッピングを行いました。その結果、興味あることに、一番強い相関をしめしたのはHLA-C 遺伝子より右側（テロメア側、HLA-A 側）約150 kbの3つのマイクロサテライトでした。それらの相関は、HLA-Cw6やCw7より強いものでした。したがって、真の尋常性乾癬遺伝子はHLA-C 遺伝子ではなく、その150 kb右隣の領域の約100 kb間に存在することがわかりました。すなわち、マイクロサテライトを用いることによって、尋常性乾癬遺伝子が100 kb領域にまで絞り込むことができました。100 kbという小さな領域にまで絞り込めれば、この領域から最終的に疾患遺伝子を

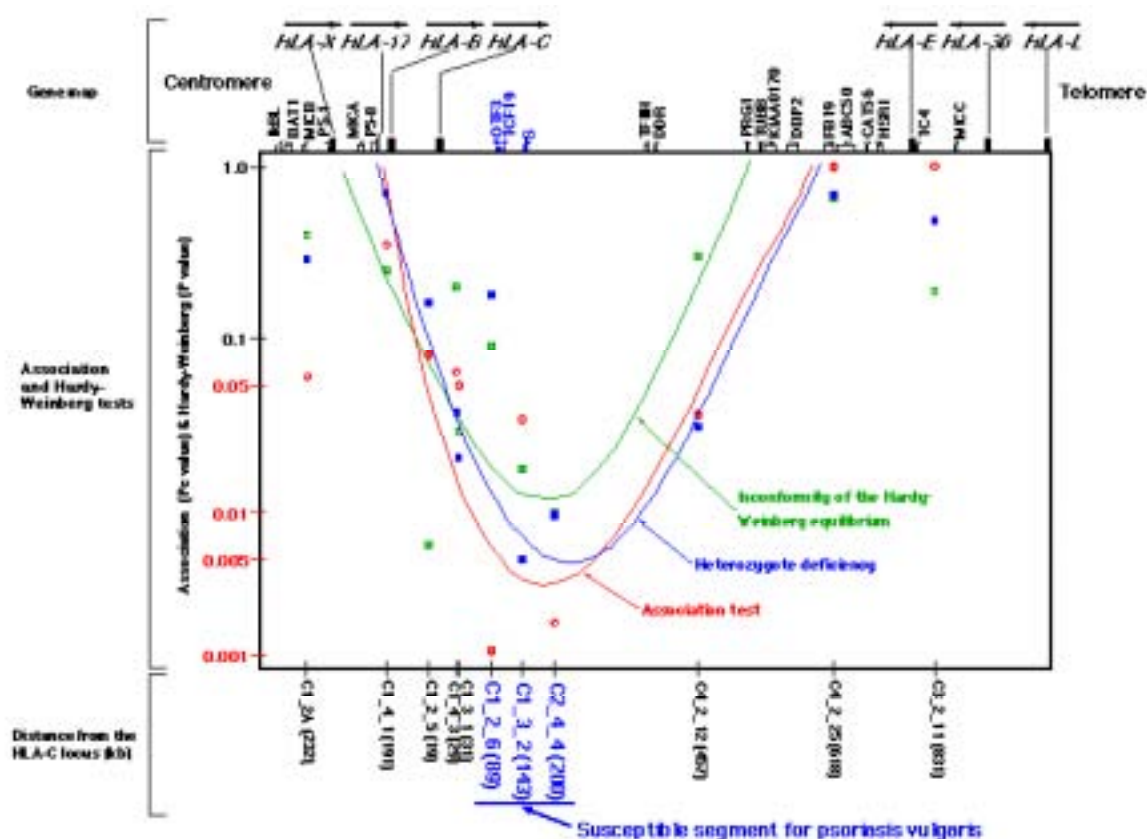


図4：マイクロサテライトによる相関解析を用いた尋常性乾癬の感受性遺伝子のマッピング

最下段は、相関解析に用いたマイクロサテライトの位置がしめされている。縦軸は、相関解析によってえられたP値であり、0.05以下が有意と判定される。図では、3種の異なる方法で行なったP値検定が3本のグラフでしめされている。いずれも、HLA-C 遺伝子より、150 kb 右側（セントメア側）に相関の高いピークがみられ、このピーク周辺約100 kbが、尋常性乾癬遺伝子候補領域であることを示唆している。

同定するのは比較的簡単です。実際、100 kb 領域のなかには 7 つの遺伝子がみつかりましたが、さらに詳しい相関解析により **SEEK1** 遺伝子と呼ばれる遺伝子が、尋常性乾癬の感受性遺伝子の最も有力候補であることがわかりました。このマイクロサテライトを用いて、尋常性乾癬遺伝子が **HLA-C** 遺伝子ではなく、**HLA-C** 遺伝子右隣の領域の約 100 kb 間に絞り込まれたことを我々は 1998 年に自信を持って、発表しました。

そこで、いよいよ主役の登場である。世界の尋常性乾癬の遺伝分野を牛耳るドン、アメリカ某大学 J T 博士である。ニースで行なわれた“尋常性乾癬発症に関わる遺伝子”国際会議も、もちろんこの J T 博士により主催された。この我々のこの分野での最大のライバルの J T 博士、いやライバルと呼ぶ際には尊敬の気持ちも込められているので、単なるコンペティターと呼ぶべきか、彼は我々がマイクロサテライトを用いて、**HLA-C** 遺伝子右隣の領域に尋常性乾癬発症遺伝子を絞り込む研究を、いち早く察知すると、我々と全く同様なアプローチで、全く同様の結論（尋常性乾癬遺伝子候補領域を **HLA-C** 遺伝子右隣の領域の約 100 kb 間に絞り込む）を、我々の論文の発表一年後の 1999 年後に、J T 博士グループの独自の研究ならびに結果のごとく発表しました。しかも、我々と同一のマイクロサテライトを用いながら、全くそれらの名前を変えた姑息な手段で。しかしながら、J T 博士グループは、その後 2 年間この絞り込まれた 100 kb の尋常性乾癬遺伝子候補領域から、真の感受性遺伝子を見つけだすことは出来ませんでした。そして、この春のニースで行なわれた“尋常性乾癬発症に関わる遺伝子”国際会議では、突然何ゆえか最初に記したとうり、“尋常性乾癬の感受性遺伝子は **HLA-Cw6** そのものである”という主張に心変わりした。おそらく、100 kb の尋常性乾癬遺伝子候補領域から真の感受性遺伝子を見つけだすことが出来なかったことと、世界の尋常性乾癬の遺伝分野の大半を占める臨床分野関連の人たちが古くから知られている **HLA-Cw6** との相関が理解しやすい、という会議の雰囲気を感じたらしいのが、その理由のようです。実際、アイスランド全人口 10 万人を対象に行なわれている遺伝調査 **population analysis** の一環として、尋常性乾癬患者数千人を対象にした相関解析の結果がニースの会議で発表され、**HLA-Cw6** が $P < 10^{-25}$ （マイナス 25 乗）というとても低く低い P 値での有意の相関が、極めて印象的に報告されました。**HLA-Cw6** が尋常性乾癬遺伝子の最有力候補であり、それ以外の遺伝子は考えられない、というわかりやすい主張が感情的に受け入れられたらしい、のです。

もちろん、何かを主張することはもちろん研究者の世

界では必要ですが、節操がない単なる情緒的なドグマで、客観的な思考にもとづく主張を追いやるのは、我々小さく思考をまとめたがる日本人にはどうかと思います。しかしながら、西洋人の業か、思い込めば突っ走ってしまうことができる思考回路には、違和感とともに羨望も禁じませんでした。思えば、メンデルの遺伝の法則にしても、ニュートン、ガリレオ、ルイセンコ、ワトソン、クリック達の主張は結果的には多くは正しい部分はあったにしても、少ないデータや根拠から大言壮語する迫力には、圧倒されます。最近では、ヒトゲノム塩基配列が全体の 90% ぐらいしか決定されていない、しかもギャップが千箇所以上も残されているのに、**Nature** や **Science** 上に全一冊の特集号として、“ヒトゲノムの全解読を行なった”と堂々と豪語する論文や世界に向けた記者発表（アメリカや英国大統領も同席した）は、日本人からすれば何か気がひけてしまいます。しかしながら、信じて疑わない西洋人の単純回路は“**about**”ではありますが、的を射ていることも少なくありません。このように科学に対する考え方が伝統的に異なる人種を相手に研究をやりぬくには、我々はどうに対抗すれば良いのであろうか？ニースのアレヌローマ円形闘技場で、夏時間のせいか夜 9 時を過ぎても明るい太陽の日差しが、強く、赤く輝いて行く手を遮ぎるため、私は、夢を育む静かな夜を、ただじっと待つしかなかったのです。



基礎講座 「HLA の基礎の基礎②」

防衛医科大学校検査部 小林 賢

はじめに

前回は、HLA の始まりと HLA 抗原タンパク分子そのものの構造について説明をした。今回は、この HLA 抗原タンパク分子（ポリペプチド鎖）を規定している遺伝子の構造について説明することにする。HLA 抗原タンパク分子をコードする遺伝子群は、ヒトの第 6 染色体の短腕部（6p21.3）に位置し、その領域を HLA 遺伝子領域または MHC 遺伝子領域と呼んでいる。この遺伝子領域には、現在判明している限りで 230 種類以上の遺伝子が存在している。また、HLA-A、B、C、DR、DQ、DP と呼ばれる古典的な HLA アリルだけでも 2002 年 6 月の段階で 1488 種類が公認されている。このように非常に高度な遺伝的多型性を有している HLA 遺伝子を紙面の関係で個々に説明するだけの余裕がないので、ここでは代表的な HLA 遺伝子である HLA-A、B、C（クラス I）と HLA-DR、DQ、DP（クラス II）の各遺伝子構造について説明することにする。

MHC 遺伝子領域の構造

ヒトの MHC 遺伝子領域には、HLA-A、B、C 抗原をコードする遺伝子群やそれに関連した遺伝子群が存在するクラス I 遺伝子領域と、HLA-DR、DQ、DP 抗原などをコードする遺伝子群が存在するクラス II 遺伝子領域とが存在する。また、クラス I とクラス II 領域の間には、補体（C2、C4 など）や腫瘍壊死因子（TNF）などをコードする遺伝子群が存在するクラス III 領域が位置している。このように複数の遺伝子領域から構成されている MHC 遺伝子領域のサイズは、 3.5×10^6 塩基対にも及び、これは大腸菌のゲノムサイズにほぼ匹敵する大きさである。この MHC 遺伝子領域に存在する遺伝子を図 1 に示す。

クラス I 抗原タンパク分子をコードする遺伝子

HLA クラス I 抗原は、各 HLA クラス I 抗原遺伝子によりコードされた H 鎖タンパク質と 15q21-q22 にある $\beta 2$ ミクログロブリン遺伝子によりコードされた $\beta 2$ ミクログロブリン・タンパク質とが非共有的に結合した四次構造をとる分子である。HLA クラス I 抗原の H 鎖タンパク質を規定しているコード領域は、1092 から 1101 塩基対からなり、7（HLA-A と HLA-C）ないし 8 個（HLA-B）

のエクソンに跨って存在している。HLA クラス I 抗原の H 鎖は、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、細胞膜結合・膜貫通部分と細胞内部分の 5 つのドメインからできている。HLA クラス I 抗原分子の $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ ドメインは、クラス I 遺伝子のエクソン 2、3、4 にそれぞれ対応する。また、細胞膜結合・膜貫通部分はエクソン 5 に、細胞内部分はエクソン 6、7 と 8（HLA-B は 6 と 7）にそれぞれ対応する。HLA クラス I 抗原遺伝子は、2 種類のエンハンサー（エンハンサー A、エンハンサー B）、インターフェロン応答シーケンス、CAAT ボックス、そして TATA ボックスからなるプロモータ領域によってその発現が調整されている。例えば HLA-B*6702 の場合、エンハンサー A は、コード領域から 187 から 199 塩基上流にかけて、インターフェロン応答シーケンスは、165 から 178 塩基上流にかけて、エンハンサー B は、92 から 102 塩基上流にかけて、CAAT ボックスは、74 から 77 塩基上流にかけて、そして TATA ボックスは、46 から 50 塩基上流にかけて、それぞれ位置している（図 2）。この位置は、遺伝子座やアリル間で多少の違いがある。

HLA-A 遺伝子座

HLA-A 抗原遺伝子は、1098 塩基対のコード領域が 8 つのエクソンに跨って存在している。最後の 3 塩基はナンセンスコドンで、アミノ酸をコードしていない。1095 塩基対の DNA により翻訳された 365 個のタンパク分子は、生成過程で N 末端側の 24 個のアミノ酸（シグナルペプチド）が除かれ、最終的に 341 個のアミノ酸からなる抗原タンパク質（ポリペプチド鎖）として発現される。古典的な HLA クラス I と HLA クラス II 抗原遺伝子のエクソン構造と、その発現タンパク質の大きさについては、表 1 にまとめて示した。

HLA-B 遺伝子座

HLA-B 抗原遺伝子は、363 個のアミノ酸をコードする 1092 個の塩基が 7 つのエクソンに跨って存在している。最後の 3 塩基はナンセンスコドンである。363 個からなるタンパク分子は、シグナルペプチドである N 末端の 24 個のアミノ酸が生成過程で除かれ、339 個のアミノ酸でできた抗原タンパク質として発現される。

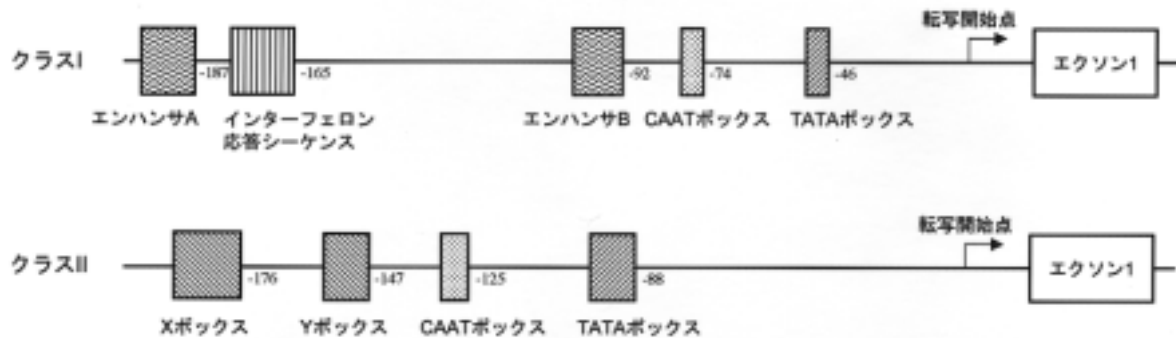


図2 HLA 遺伝子のプロモータ構造

HLA-C 遺伝子座

HLA-C 抗原遺伝子は、1101 個の塩基からなるコード領域が 8 つのエクソンに跨って存在している。最後の 3 塩基はナンセンスコドンで、1098 塩基対の DNA がアミノ酸をコードしている。1098 塩基の DNA から翻訳された 366 個のアミノ酸からなるタンパク分子は、シグナルペプチドである 24 個のアミノ酸が生成過程で N 末端側が除かれ、最終的に 342 個のアミノ酸で構成された抗原タンパク質として発現される。

クラス II 抗原タンパク分子をコードする遺伝子

HLA クラス II 抗原は、各 HLA クラス II A 鎖抗原遺伝子によりコードされた α 鎖タンパク質と、各 HLA クラス II B 鎖抗原遺伝子によりコードされた β 鎖タンパク質とが非共有的に結合した四次構造をとる分子である。α 鎖、β 鎖ともに 4 つのドメインから形成されている。α 鎖は、α1、α2、細胞膜結合・膜貫通部分と細胞内ドメインからできている。β 鎖も同様に、β1、β2、細胞膜結合・膜貫通部分と細胞内ドメインからできている。HLA クラス II α 鎖抗原タンパク質を規定するコード領域は 765 から

783 塩基対からなり、4 個のエクソンに跨って存在している。一方、HLA クラス II B 鎖抗原遺伝子は、777 から 810 塩基対からなるコード領域が 5 ないし 6 個のエクソン (DPB1 遺伝子は 5 個で、DQB1 は 5 個と 6 個のタイプとがある) に分かれて存在している。HLA クラス II α 鎖抗原分子の α1 と α2 ドメインは、エクソン 2 と 3 にそれぞれ対応する。HLA クラス II β 鎖抗原分子の β1 と β2 ドメインも、エクソン 2 と 3 にそれぞれ対応する。一方、細胞膜結合・膜貫通部分と細胞内部分は、α 鎖ではエクソン 4 に対応するのに対し、β 鎖では、細胞膜結合・膜貫通部分がエクソン 4 に、細胞内部分がエクソン 5 と 6 (DPB1 はエクソン 5 のみ) にそれぞれ対応する。HLA クラス II 抗原遺伝子は、CAAT ボックス、TATA ボックス、X ボックスや Y ボックスからなるプロモータ領域によってその発現が調整されている。例えば HLA-DRB1*0802 の場合、X ボックスは、コード領域から 176 から 190 塩基上流にかけて、Y ボックスは、147 から 156 塩基上流にかけて、CAAT ボックスは、125 から 130 塩基上流にかけて、そして TATA ボックスは、88 から 93 塩基上流にかけてそれぞれ位置している。この位

表1 HLAクラスIとHLAクラスII遺伝子のエクソン構造と発現タンパク分子の大きさ

| Gene | Exon 1 | | Exon 2 | | Exon 3 | | Exon 4 | | Exon 5 | | Exon 6 | | Exon 7 | | Exon 8 | | HLA Molecule From to | Amino Acid Residue | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|----------------------|--------------------|------|------|----|------|------|---|----|------|-----|--|----|-----|-----------|
| | From | To (bp) | From | To (bp) | From | To (bp) | From | To (bp) | From | To (bp) | From | To (bp) | From | To (bp) | From | To (bp) | | | | | | | | | | | | | | | |
| Class I | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A | 1 | 73 | 73 | 74 | 343 | 270 | 344 | 619 | 278 | 620 | 695 | 276 | 696 | 1012 | 117 | 1513 | 1045 | 33 | 1046 | 1092 | 48 | 1094 | 1098 | 5 | 73 | 1095 | 341 | | | | |
| B | 1 | 73 | 73 | 74 | 343 | 270 | 344 | 619 | 278 | 620 | 695 | 276 | 696 | 1015 | 120 | 1516 | 1048 | 33 | 1049 | 1092 | 44 | | | | 73 | 1089 | 330 | | | | |
| C | 1 | 73 | 73 | 74 | 343 | 270 | 344 | 619 | 278 | 620 | 695 | 276 | 696 | 1015 | 120 | 1516 | 1048 | 33 | 1049 | 1096 | 48 | 1097 | 1101 | 5 | 73 | 1098 | 342 | | | | |
| Class II | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| DRA | 1 | 62 | 62 | 63 | 326 | 248 | 329 | 610 | 262 | 611 | 765 | 155 | | | | | | | | | | | | | | | | | 76 | 762 | 229 |
| DRB | 1 | 100 | 100 | 101 | 370 | 270 | 371 | 652 | 262 | 653 | 763 | 111 | 764 | 767 | 34 | 768 | 801 | 14 | | | | | | | | | | | 88 | 796 | 237 |
| DQA1 | 1 | 62 | 62 | 63 | 331 | 248 | 332 | 613 | 262 | 614 | 768 | 155 | | | | | | | | | | | | | | | | | 70 | 765 | 232 |
| DQB1* | 1 | 100 | 100 | 110 | 379 | 270 | 380 | 661 | 222 | 662 | 772 | 171 | 773 | 796 | 34 | 797 | 810 | 14 | | | | | | | | | | | 67 | 807 | 237 (225) |
| DPA1 | 1 | 100 | 100 | 101 | 346 | 246 | 347 | 626 | 262 | 629 | 783 | 195 | | | | | | | | | | | | | | | | | 94 | 780 | 229 |
| DPB1 | 1 | 100 | 100 | 101 | 364 | 264 | 365 | 646 | 262 | 647 | 757 | 111 | 758 | 777 | 20 | | | | | | | | | | | | | | 88 | 774 | 229 |

* HLA-DQB1遺伝子のエクソン8は、アレルによって存在したり、なかったりする。各エクソンに記載されている数値は、塩基番号を示す。

置は、遺伝子座やアレル間で多少の違いがある。プロモータの構造がクラス I 遺伝子とクラス II 遺伝子で異なることから、その制御機構についても差異を示す。クラス I とクラス II 抗原ではその発現様式が異なり、クラス I はすべての有核細胞と血小板に発現しているのに対し、クラス II は、抗原提示細胞と B 細胞などに限定されている。すなわち、制御の仕組みが違っていることを意味している。詳細については、この号の 2 ページよりの「HLA 研究：その現状と将来」をご参照下さい。

HLA-DR 遺伝子座

HLA-DR 抗原の α 鎖タンパク分子を規定している DRA 遺伝子は、765 塩基対のコード領域が 4 つのエクソンに分かれて存在している。最後の 3 塩基はナンセンスコドンとなっているので、タンパク質をコードしているのは 762 塩基対である。翻訳された 254 個のアミノ酸からなるタンパク分子は、75 塩基分の 25 個のアミノ酸がシグナルペプチドとして生成過程で除かれる。最終的には、229 個のアミノ酸が DR α ポリペプチド鎖として発現される。

HLA-DR 抗原の β 鎖タンパク分子を規定している DRB 遺伝子は、801 塩基対のコード領域が 6 つのエクソンに跨って存在している。最後の 3 塩基はナンセンスコドンなので、実際にタンパク質を規定しているのは 798

塩基対ということになる。ここから合成された 266 個のアミノ酸の内、29 個のアミノ酸からなるシグナルペプチドが生成過程で除かれる。最終的には、237 個のアミノ酸が DR β ポリペプチド鎖として発現される。

DRA 遺伝子からつくられた DR α ポリペプチド鎖と DRB 遺伝子からつくられた DR β ポリペプチド鎖とが会合して HLA-DR 抗原を形成している。

DRB 遺伝子座に存在する遺伝子の数は、HLA のタイプによって異なることが知られている。HLA-DR1、DR2 または DR10 抗原をもつ人の場合、HLA-DR1、DR2 または DR10 抗原をコードする 1 個の機能的な DRB1 遺伝子と 2 個の機能を持たない偽遺伝子 (DRB6 と DRB9) が同一のハプロタイプ上に存在する (図 3)。HLA-DR2 抗原をもつ人はそれ以外に、HLA-DR51 抗原をコードする DRB5 遺伝子が同じハプロタイプ上に存在している。HLA-DR3 (DR17、DR18)、DR5 (DR11、DR12) または DR6 (DR13、DR14) は、HLA-DR3 (DR17、DR18)、DR5 (DR11、DR12) または DR6 (DR13、DR14) をコードする DRB1 遺伝子以外に、HLA-DR52 抗原を規定する DRB3 と呼ばれる遺伝子が存在している。偽遺伝子としては、DRB2 と DRB9 が同一ハプロタイプ上に存在する。また、HLA-DR4、DR7 または DR9 抗原をもつ人は、HLA-DR4、DR7 または DR9 をコードする DRB1 遺伝子と HLADR53 をコードする DRB4 遺伝子とがそ

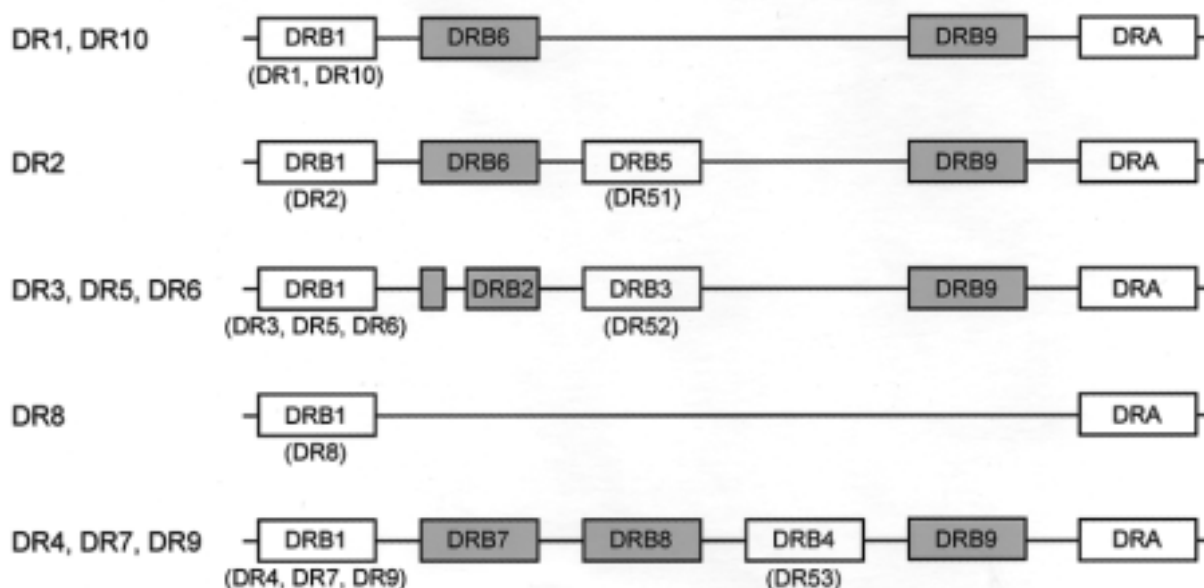


図 3 HLA-DR ハプロタイプ

□は発現遺伝子を、■は偽遺伝子を意味する。

それぞれ 1 個ずつ同じハプロタイプ上に存在している。このハプロタイプ上には、それ以外にも 3 個の機能を持たない偽遺伝子 (DRB7、DRB8 と DRB9) が存在する。一方、HLA-DR8 抗原をもつ人は、HLA-DR8 をコードする DRB1 遺伝子が 1 個あるのみである。

DR1 から DR18 の抗原タンパク分子は、DRA 遺伝子からつくられた DR α ポリペプチド鎖と DRB1 遺伝子からつくられた DR β ポリペプチド鎖とが会合して HLA-DR 抗原を形成している。また、DR51 抗原タンパク分子は、DR1 から DR18 の抗原タンパク分子をコードする DRA 遺伝子と同じ遺伝子からつくられた DR α ポリペプチド鎖と DRB1 とは異なる DRB5 遺伝子からつくられた DR β ポリペプチド鎖とが会合して HLA-DR51 抗原を形成している。DR52 と DR53 抗原についても同様に、DR1 から DR18 の抗原タンパク分子と同じ DR α ポリペプチド鎖と DR3 または DR4 遺伝子からつくられた DR β ポリペプチド鎖とが会合してそれぞれの抗原を形成している。

これらの連鎖関係は、ほとんど例外なく認められることから、例えば HLA-DR4 抗原をもつ人は、それ以外に HLA-DR53 抗原も同時にもつことになる。

HLA-DQ 遺伝子座

DQA1 遺伝子は、4 つのエクソンから構成され、768 塩基対がコード領域になっている。しかし、最後の 3 塩基はナンセンスコドンであるから、タンパク質を規定しているのは 765 塩基対 (255 アミノ酸) ということになる。69 塩基対のシグナルペプチドをコードする 23 個のアミノ酸は生成過程で除かれ、最終的には 232 個のアミノ酸が DQ α ポリペプチド鎖として発現される。

DQB1 遺伝子は、786 ないし 810 塩基対のコード領域が 5 ないし 6 個のエクソンに跨って存在している。最後の 3 塩基はナンセンスコドンなので、実際にタンパク質を規定しているのは 783 ないし 807 塩基対ということになる。このコード領域から翻訳された 261 ないし 270 個のアミノ酸の内、シグナルペプチドである 32 個のアミノ酸が生成過程で除かれる。最終的には、229 ないし 237 個のアミノ酸で構成された DQ β ポリペプチド鎖が発現される。なお、DQB1 遺伝子のエクソン 5 は、存在するアリルと、存在しないアリルとがあるため、237 個のアミノ酸でポリペプチド鎖を形成しているアリルと、229 個のアミノ酸で形成しているアリルと、2 つのタイプが存在する。

DQA1 遺伝子からつくられた DQ α ポリペプチド鎖と DQB1 遺伝子からつくられた DQ β ポリペプチド鎖とが会合して HLA-DQ 抗原を形成している。

DQ 遺伝子座には機能的な A1 と B1 遺伝子以外に、機

能がないと考えられている偽遺伝子が存在している。機能がないと考えられている DQ 遺伝子としては、DQA2、DQB2 と DQB3 が明らかにされている。

HLA-DP 遺伝子座

DPA1 遺伝子は、783 塩基対のコード領域が 4 つのエクソンに跨って構成されている。ナンセンスコドンを除いた 780 塩基対から翻訳された 260 個のアミノ酸の内、93 塩基分の 31 個のアミノ酸はシグナルペプチドとして生成過程で除かれる。最終的には、229 個のアミノ酸で DP α ポリペプチド鎖を形成している。

DPB1 遺伝子は、777 塩基対からなるコード領域が 5 つのエクソンに分かれて存在している。最後の 3 塩基はナンセンスコドンで、実際にタンパク質を規定しているのは 774 塩基対ということになる。生成過程において 87 塩基分に相当する 29 個の N 末端側のシグナルペプチドが除かれ、最終的には 229 個のアミノ酸でできた DP β のポリペプチド鎖が発現される。

DPA1 遺伝子からつくられた DP α ポリペプチド鎖と DPB1 遺伝子からつくられた DP β ポリペプチド鎖とが会合して HLA-DP 抗原を形成している。

DP 遺伝子座には機能的な A1 と B1 遺伝子以外に、機能がないと考えられている偽遺伝子として DPA2、DPA3 と DPB2 遺伝子が存在している。



集団遺伝学の基礎講座(2)

－ 対立遺伝子頻度変化の決定論的扱い －

東京大学医学部人類遺伝学教室 大橋 順

集団遺伝学は、集団中における対立遺伝子頻度が世代経過に伴って変化する様子を解析する学問であり、生物進化の基本メカニズムを理解する手助けをしてくれます。今回は、突然変異によって誕生した新規対立遺伝子の頻度が、突然変異や自然淘汰にさらされながら、集団中でどのように変化するかについて解説したいと思います。

前回はハーディ・ワインバーグの法則について解説しました。ハーディ・ワインバーグ平衡が成り立っている集団では、対立遺伝子頻度も遺伝子型頻度も世代が経過しても変化しません。しかし、突然変異や自然淘汰が存在すると、対立遺伝子頻度や遺伝子型頻度は変化します。その過程は決定論的な方程式を用いて簡潔に記述することができます。はじめに、絶えず突然変異が起こる環境において、対立遺伝子頻度がどのように変化するかを考えます。

ある遺伝子座には2つの対立遺伝子Aとaがあるとします。Aからaへの突然変異は世代当たり配偶子当たり u の確率で起こり、aからAへの突然変異は世代当たり配偶子当たり v の確率で起こるとします。aの初期頻度を $q(0)$ とし、その t 世代後の頻度を $q(t)$ のようにあらわすとします。 $q(t)$ を用いて $q(t+1)$ をあらわすことを考えます。世代 t から世代 $t+1$ に移行する過程で、aはAに v の確率で突然変異し、 $1-v$ の確率で突然変異しません。そのため、 $q(t)$ のうち $vq(t)$ がAに変化し、 $(1-v)q(t)$ がaのまま残ります。一方、Aの対立遺伝子頻度は $1-q(t)$ であり、このうち $u(1-q(t))$ がaに変化し、 $(1-u)(1-q(t))$ がAのまま残ります。したがって、次世代のaの頻度 $q(t+1)$ は

$$\begin{aligned} q(t+1) &= (1-v)q(t) + u(1-q(t)) \\ &= (1-u-v)q(t) + u \end{aligned} \quad (2.1)$$

であらわされます。この漸化式は容易に解くことができ、

$$q(t) = (1-u-v)^t \left(q(0) - \frac{u}{u+v} \right) + \frac{u}{u+v} \quad (2.2)$$

となります。図1に、 $q(0)=0.01$ 、 $u=0.001$ 、 $v=0.001$ である場合の頻度変化の様子を示します。式(2.2)において、 t を大きくすると $q(t)$ は $u/(u+v)$ に近づきます。これが、究極の平衡頻度になります。図1の例では0.5です。

次に、自然淘汰が作用する環境下での対立遺伝子頻度変化について考えます。自然淘汰は個体（遺伝子そのものではなく）に作用するとし、各遺伝子型AA、Aa、aaの相対適応度をそれぞれ $1-s$ 、 $1-h$ 、 1 と仮定します。 $(0 \leq h \leq s \leq 1)$ 。相対適応度とは、各遺伝子型において次世代に残ることのできる、生殖年齢まで生き延びる子供数

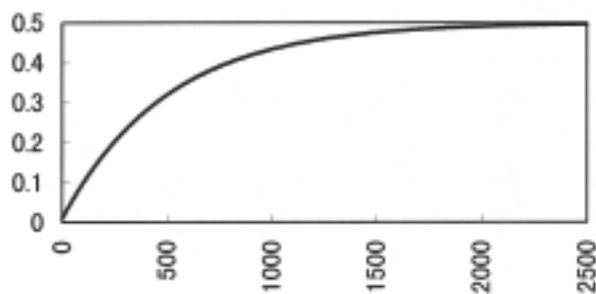


図1. a対立遺伝子の頻度変化。
aの初期頻度を0.01、Aからaへの突然変異率を世代当たり配偶子当たり0.001、aからAへの突然変異率を世代当たり配偶子当たり0.001と仮定した。

の相対値のことです。ここでは、aa 個体が淘汰上有利な個体で、AA 個体が不利な個体ということになります。t 世代目の a 遺伝子の対立遺伝子頻度を $q(t)$ とおくと、t+1 世代目の子供の AA、Aa、aa 遺伝子型頻度はそれぞれ $(1-q(t))^2$ 、 $2q(t)(1-q(t))$ 、 $q(t)^2$ になります。これらの個体のうち生殖年齢まで生き延びる個体は、AA、Aa、aa 遺伝子型でそれぞれ $(1-s)(1-q(t))^2$ 、 $2(1-h)q(t)(1-q(t))$ 、 $q(t)^2$ になります。そのため、a 遺伝子の頻度 $q(t+1)$ は

$$q(t+1) = \frac{(1-q(t))q(t)(1-h) + q(t)^2}{w} \quad (2.3)$$

と表すことができます。ここで、

$$w = (1-s)(1-q(t))^2 + 2(1-h)q(t)(1-q(t)) + q(t)^2 \quad (2.4)$$

であり、これは集団の平均淘汰値とよべれます。計算を繰り返すことで順次 $q(t)$ を求めることが可能です。図 2 に、初期頻度 $q(0) = 0.01$ から開始した計算結果を示します。最終的に a は A に完全に置き換わりますが、適応度に関するパラメータの与え方によってその経路はかなり異なります。 $s=0.5, h=0$ の場合は急速に a 対立遺伝子頻度は増加します。一方、 $s = 0.5, h = 0.5$ の場合、100 世代を超えたあたりで急速に遺伝子頻度は増加し、120 世代を越えたあたりでは $s=0.5, h=0$ の場合より頻度が上回ります。

次に、少し視点を変えて、重篤な単一遺伝子疾患の原因となる遺伝子（以下では原因変異といいます）が集団中に存在し続ける理由について考えてみます。原因変異は淘汰上明らかに不利ですので、集団から消え去るのは時間の問題のように思えます。しかし、原因変異が無くなり、疾患自体が無くなることはありません。その原因は、何度も起こる突然変異にあります。すなわち、原因変異は淘汰と突然変異のバランスによって集団中に維持されているのです。そこで、このバランスを数理的に解析してみます。突然変異はその遺伝子中の様々な site で起こり、その結果正常ではない遺伝子（疾患の原因となる遺伝子）が誕生すればそれらを総称して A ということにします。いま a から A へ世代当たり配偶子当たり v で突然変異が起きるとします。A から a への復帰突然変異は確率的に無視できると仮定します。世代 t における A の頻度を $p(t)$ とおき、先ほどと同様に、各遺伝子型 AA、Aa、aa の相対適応度をそれぞれ $1-s$ 、 $1-h$ 、 1 と仮定します。 $(0 \leq h \leq s \leq 1)$ 。この場合、世代当たりの対立遺伝子頻度変化量は

$$\begin{aligned} p(t+1) - p(t) &= \Delta p(t) \\ &= \frac{(1-p(t))p(t)\{2hp(t) - h - sp(t)\}}{w} + v(1-p(t)) \end{aligned} \quad (2.5)$$

のようにあらわすことができます。式(2.5)の $v(1-p(t))$ は、a から A へ突然変異が起こることによる A の増加分を表しています。平衡状態では遺伝子頻度変化を起こさないのので、平衡点においては

$$\Delta q(t) = 0 \quad (2.6)$$

が成立します。これより、

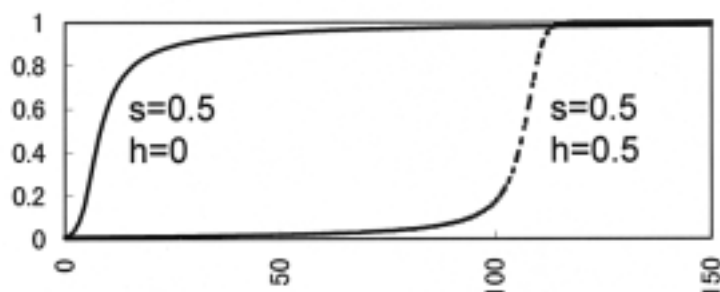


図2 a対立遺伝子の頻度変化。
aの初期頻度を0.01、AA、Aa、aa遺伝子型の相対適応度を1-s、1-h、1と仮定した。

$$v = \frac{p(t)\{h + sp(t) - 2hp(t)\}}{w} \quad (2.6)$$

という関係式がえられます。一般に淘汰係数 (s や h) のうちの少なくとも1つが v に比べて十分大きければ、突然変異遺伝子の平衡頻度は非常に低い値であり、 w はほぼ 1 とみなしてよいことになります。この近似により、式(2.6)を $p(t)$ の2次方程式として解くことができ、平衡頻度は次のようになります。

$$\bar{p} = \frac{\sqrt{h^2 + 4v(s-2h)} - h}{2(s-2h)} \quad (2.7)$$

上のモデルで、遺伝子 A が完全劣性 ($h=0$) の場合と、完全優性 ($h=s$) の場合の遺伝子 A の平衡頻度を式(2.7)から求めてみます。 $h=0$ の場合は、

$$\bar{p} = \frac{\sqrt{4vs}}{2s} = \sqrt{\frac{v}{s}} \quad (2.8)$$

となります。 $h=s$ の場合は、 s が \sqrt{sv} より十分大きいとして、 $s\sqrt{1 - \frac{4vs}{s^2}} = s\left(1 - \frac{2v}{s}\right)$ の近似を用いることで、

$$\bar{p} = \frac{v}{s} \quad (2.9)$$

のようになります。したがって、 s と v が同じであれば、完全優性の場合に比べて完全劣性の場合、かなりの頻度で原因変異が集団中に保たれることになります。

今回解説した決定論的方程式は、自然淘汰の作用が強い場合には実際の遺伝子頻度変化を精度よく表現できることが分かっていますが、適用できる範囲は非常に限られています。次回は、対立遺伝子頻度変化を確率的に表現できる一般的な手法を紹介したいと思います。



「HLAコンサルタントの日々」

特定非営利活動 (NPO) 法人 HLA 研究所 佐治 博夫 saji@mbx.kyoto-inet.or.jp

hla@hla-labo.org

今回の1例目は『再生不良性貧血の9才男児の NIMA 相補同胞兄はドナー候補になるか?』というご相談、2例目は『複数候補 (造血幹細胞移植) からベストを選択する時の1例: HLA 研究所での研修医のご経験』をご紹介します。(編集部)

『再生不良性貧血の9才男児の NIMA 相補同胞兄はドナー候補になるか?』

〇口子先生、e-mail ありがとうございます。

患者は9才男児で、再生不良性貧血です。

家族 (両親と同胞2名) の HLA Typing を行いました。

父 IPA a : A11-C03-B35-DR04-DQ04

NIPA b : A02-C07-B07-DR01-DQ05

母 (IMA) c : A11-C01-B54-DR04-DQ03

(NIMA) d : A24-C08-B48-DR09-DQ03

患児 IPA a : A11-C03-B35-DR04-DQ04

IMA c/d : A11-C01-B54-DR09-DQ03

(B-DR 間で Crossing Over)

兄 a / d

弟 b / c となりました。

現在患児は ATG 療法で著効していますが、もし再発時に移植が必要になった時のドナーとして兄が NIMA 相補同胞なのでドナー候補になるかと思われます。

そのようですね、HLA-A,B,DR をまとめてみます。(そのほうが分かりやすい)

患児 : A11,-, B35,54, DR4,9 (Cw1,3) a(c/d)

兄 : A11,24, B35,48, DR4,9 (Cw1,8) a/d

変則 NIMA 相補同胞で、GVHD 方向 B 座 1 ミスマッチ、HVG 方向 A,B 座 2 ミスマッチですね。たまたま患児に IMA ハプロタイプで B-DR 座間リコンビネーションが起こって、DR 座が適合になったと考えて良さそうです。血液腫瘍なら第一選択でしょうね。再不貧のときは、HVG 方向 2 座ミスマッチが気になります。再不貧では拒絶が多いですからね。

父と母の A11 ですが、A*1101-1105 までしかわからず、アリルレベルの同定に至っていません。日本人の頻度からすれば A*1101 か A*1102 でしょうか。

A*1102 は東南アジアに dominant なもので、日本人に

はまれです。たまたま、血清学で検出しやすいので (A11.2 として) 印象に残りますが A*1101 と A*1102 の差違は Exon 4 の一塩基置換で、抗原ペプチドの受容部位とは離れたところの変異です。拒絶・GVH など T 細胞に関わる部位は同じ、と考えていいと思います。(多分 A*1101 でしょう。日本人の A*1102 は A11.2-Cw*1202-B27 というハプロタイプが dominant です。A*1102 である可能性は極わずかに残りますが、気にしなくても良いでしょう)

抗原レベルで A11 を一致と見れば、兄をドナーとすると GVHD 方向に 1 座不一致、HVG 方向に 2 座不一致となるでしょうか?

はい、そのとおりです。上述したとおりです。

この場合、もし移植対象になると、移植前にマイクロキメリズムの検査が必要でしょうか? マイクロキメリズムの検査ですが原則的には NIMA で 1 座不一致の場合は不要で、2 座以上不一致なら必要と考えてよろしいのでしょうか?

はい、そのように考えて良いと思います。でも、再不貧の移植で拒絶を心配するときは、同胞間マイクロキメリズム検査をすることも選択肢にあります。再不貧の患者さんにマイクロキメリズムを検出することは通常困難です (拒絶への寛容は患児に兄の NIMA (母細胞) を検出することが重要になります)。

◆血縁間の 1 座不適合は

GVHD 発症頻度、重症化頻度、overall survival などから、非血縁間フルマッチに優るか同等と考えられる data が蓄積されつつあります。(神田善伸先生@東京大学無菌治療部が先の臨床血液学会/血液学会 横浜) で発表された解析から (R-PL-6、抄録集 320 頁) もそのように敷衍できると思います。見事な解析で優秀抄録に選ばれていました。

注 1) “優秀抄録” がどんな内容なのかご興味のある方は文末をご参照下さい。

よって非血縁間より優位の選択肢です。移植必須のときは第一選択になりますし、EBM に照らしても倫理的にも問題はありませぬ。

ただし、2 座以上の不適合移植は実験治療ですし、移植必須とはいえ、NIMA/IPA コンセプトがあるとはいえ、実施には何らかの根拠が必要です。EBM (Evidence Based Medicine) 的には後述する retrospective study の Paper があるとはいえ、、、。

この根拠を得るため prospective に臨床研究が行なわれていますので、それに参加されることは許容されるでしょう。その研究は「FK506 を GVHD 予防に用いた NIMA 相補血縁者間造血幹細胞移植に関する臨床試験」(小寺班) です。ここではマイクロキメリズム検出を条件にしております。

=====
Van Rood JJ, Loberiza Jr FR, Zhang Mj, et al: Effect of tolerance to noninherited maternal antigens on the occurrence of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation from a parent or an HLA-haploidentical siblings. Blood 2002; 99: 1572-1577.

Tamaki S, Ichinohe T, Matsuo K et al: Parental donor transplant; Superior survival of blood and marrow stem cell recipients given maternal grafts over recipients given paternal grafts. Bone Marrow Transplantation. 2001, 28: 375-380.

=====

別症例ですが昨年に ALL の患児で NIMA 相補同胞の 1 座不一致の兄から骨髄移植を行い、成功しております。(これは移植前にマイクロキメリズムの検査はせず)

それは良かったですね。マイクロキメリズム検査は不要です。

【複数候補 (造血幹細胞移植) からベストを選択する時の 1 例】

細かいことだけど、考え方として大事なこと。京大の実例です。

◆症例◆ (超簡単に)

KH さん (63 才男性) AML、造血幹細胞移植希望、副主治医は Dr. M.H (大学院生)

◆Story◆

患者さんは経済的に恵まれず、移植目的の HLA 検査の費用を出せないと相談がありました。(今なら淳彦基金で受けるのですが(^^)当時は基金がありませんでした) 副主治医の MH 先生はちょうど HLA 研究所へ研修に来

ていました。

試薬などは提供するから主治医が自分でタイプすれば、患者さんの負担はないですよと提案し、丸屋悦子先生の指導下に副主治医がタイピングしました。(丁寧な操作で信頼性抜群の大学院生です。今でも丸屋悦子@師範代のお気に入り)

結果は (両親は亡) =====
患者さん 63 才 : A*02,-, B*46, *4001, DRB1*08,*0901
同胞 (次弟) 59 才 : A*02,-, B*46, *4001, DRB1*08,*0901
同胞 (三弟) 56 才 : A*02,*24, B*46,*5201, DRB1*08,*15
同胞 (次妹) 53 才 : A*02,-, B*46, *4001, DRB1*08,*0901
同胞 (三妹) 51 才 : A*02,*24, B*46,*5201, DRB1*08,*15
=====

○次弟と次妹が患者さんと HLA identical sibling のように見え、

○三弟と三妹が別の HLA identical sibling に見え、すべての同胞に

◇A2-B46-DR8 ハプロタイプがあるように見えます。そして、推定できるハプロタイプはその他に次の二つがあるようです。

◇A24-B52-DR15 ; おなじみ日本列島最強のハプロタイプ。

◇A2-B60-DR9 ; 南中国由来でしょう。

(注目点 : 両親/同胞には 4 種のハプロタイプがあるはずですが。ここでは 3 種のハプロタイプしか同定できません。そのとき、HLA 同型を HLA identical sibling と決めてよいか?)

MH 先生「二人候補があります。若い方がいいから、次妹をドナーにしましょうか」

丸屋悦子「ご両親のどちらかが A2-B46-DR8 の homozygote であるか、ご両親が A2-B46-DR8 ハプロタイプを共有しているか、を否定できません。日本人にはよくあることです。後者なら、HLA identical sibling といってもいいですが、前者なら HLA identical sibling または phenotype identical sibling です。日本人の A2 にはアレル型多様性があり、そのアレル型不適合が予後因子になりますね、、、。どうしますか?」

MH 先生はしばらく考えました。

MH 先生「ご両親の HLA 検査が必要と思います。でも亡くなっていますので、、、。」

丸屋悦子「実際臨床的には次弟と次妹のどちらを選んでもいいですが、ベストを科学的に選んでください」

MH 先生さらに考えて、

MH 先生「A2 と DR8 の high resolution typing をさせて下さい」

丸屋悦子はにんまり笑って試薬を渡し説明しました。

結果=====

患者さん 63 才 : A*0201,*0207, B*46, *4001, DRB1*0803,*0901

同胞 (次弟) 59 才 : A*0201,*0207, B*46, *4001, DRB1*0803,*0901

同胞 (次妹) 53 才 : A*0201,-, B*46, *4001, DRB1*0803,*0901

すなわち、

- 次弟が患者さんと HLA identical sibling であり (ほぼ確定)、
- 次妹は phenotype identical であり、
- ご両親のどちらかが A2 アリル型が異なる A2-B46-DR8 の homozygote (?) であろうことが分かりました。 A*0201-B46-DRB1*0803/A*0207-B46-DRB1*0803
- そして、一応 4 種のハプロタイプが同定できました (リコンビナントがあれば別ですか^^)

◆epilog◆

次弟を donor として reduced intensity regimen で移植が行なわれ、II 度の GVHD も controllable で、移植後 18 ヶ月のいま通院のみでお元気だそうです (MH 先生談)。

○問題点 :

- 1, たとえ、次妹を選んでいたとしても GVHD 方向は HLA-A,B,DR に関する限り 0 ミスマッチですから、実際上はそこまでしなくてもいいかもしれませんね。
 - 2, A*0201 と A*0207 はアミノ酸 99 番 ($\alpha 2$ domain, β strand、抗原ペプチド受容溝の底) がチロシン (0201) →システイン (0207) の 1 アミノ酸置換です。
- ペプチド・モチーフに差があるかどうか知りません。
- A*0201 対 A*0207 不適合は臨床予後へ影響があるかどうか知りません。
- ご存知の方教えてください。

佐治博夫@HLA コンサルタント 拝

注 1)

R-PL-6 HLA 不一致血縁ドナーからの同種造血幹細胞移植の成績

Hematopoietic stem cell transplantation from family members other than HLA-identical siblings

- 神田 善伸、千葉 滋、平井 久丸、坂巻 壽、井関 徹、小寺 良尚、鳥野 隆博、岡本 真一郎、平林 憲之、岩戸 康治、丸田 壱郎、藤盛 好啓、古川 達雄、峯石 真、松尾 恵太郎、浜島 信之、今村 雅寛

(日本造血細胞移植学会ワーキンググループ 3)

【背景】HLA 不一致血縁ドナーからの移植と HLA 一致同胞からの移植の成績を比較した過去の複数の研究結果は互いに矛盾している。そこで、HLA 不一致の影響をより正確に評価するために、DNA レベルでの HLA 不一致も考慮した大規模な解析を行った。

【方法】1991 年から 2000 年の間に第 1 回の同種造血幹細胞移植を行った 2,947 人の白血病・骨髄異形成症候群患者のデータを日本造血細胞移植学会全国調査のデータベースから抽出した。主要評価項目は生存期間とし、生着不全、GVHD の発症を二次的評価項目として解析した。

【結果】HLA の不一致、高年齢、進行病期の 3 因子が生存期間およびグレード III 以上の急性 GVHD の発症に対する独立した危険因子として同定された。HLA 不一致の影響は病初期の患者において顕著であった。HLA 不一致がクラス I に属するか、クラス II に属するかは生存や GVHD の発症に影響を与えなかった。HLA 不一致を血清レベルで評価した場合も DNA レベルで評価した場合にも同様の結果が得られた。

【結論】進行病期の患者においては、HLA 一座不一致血縁ドナーからの移植は臨床研究としてのみ行われるべきであろう。(日本臨床血液学会より許諾をいただき転載)

コラム「評価を考える」

東京医科歯科大学 難治疾患研究所 木村 彰方

6月初めから2か月ほど文部科学省の在外研究員制度を利用して、パリの筋疾患研究所で研究を行った。日頃は自分の手を動かして実験することがほとんどないが、その2か月間はドクターコースの学生やポスドクに混じって朝から晩まで実験した。実験のテーマは申請書に記載した通りこちらから持って行ったが、培地作りからシークエンスまで全て自分の手を動かした。また、筋肉疾患に関する基礎から臨床までに及ぶ幅広い知識を教えるための ECOLLE d'ETE (サマースクール。世界中から約40名の神経内科医、病理医、研究者などが参加した)が開講された2週間は、午前中は講義を聴き、午後には実験をする毎日であった。まるで学生時代、ポスドク時代に戻ったかのような日々を過ごした。多少老眼気味になっているのでシークエンサー(ABI373)のゲルに反応産物をロードするのに苦労したりもしたが、バカンスシーズンでもあったため実働研究者数が少なかったこともあり、種々の機械等もあまり順番待ちをせず使用することが可能で、予定していた実験の大半を期間内に済ませることが出来た。また、帰国後に研究実施(成果)報告書を提出しなければならなかったが、予定通りの研究成果が達成されたと記載出来た。

いずこの世界でも同様であると思うが、我々研究者も、立案した研究計画にそって研究費を申請し、審査の結果認められた研究費を使って研究を行い、研究費の収支決算と共に、その成果を研究費を支給した組織に報告する。研究費の収支決算が厳しくチェックされることは以前より当然のことであったが、昨今では、特に目的指向型の研究費については、研究内容や成果についても「評価」を受けることが当たり前になって来た。筆者自身もミレニアムゲノムプロジェクトと総称される研究に関わっていることもあり、毎年10月には中間報告書、年度末には成果報告書の提出を義務付けられている。ある意味当然とも言えるが、それらの報告書には、研究計画に対してどれだけの成果があがったか、その達成状況、達成出来なかったこと、その理由を含めて記載することが求められる。さらにその達成状況や成果に応じて次年度の研究費の額が左右される。この毎年のチェックに加えて、ミレニアムゲノムプロジェクトは今年で3年目であり全体の予定期間の半分が終了するために、中間評価を受けることになっている。さらに、研究期間が終了すれば、最終評価を受ける。つまり、国家予算、税金を使っ

ての研究である以上、複数回の厳しいチェックを受けることが義務付けられている。昨今の研究には多額の研究費が必要であるが、研究費を獲得すればするほど、自分の興味だけで研究を進める訳にはいかないと言うジレンマに陥る。

研究が終了した後に評価を行い、そこで当初の目的を達成していなければ、何らかのペナルティーを与える(単純に言えば、数年間は当該組織からの研究費は与えない)ような方策もあろうかと思うが、こと研究に関しては、予想通りの結果が出ないことも多く、また予定通りに研究が進む訳でもない。言い訳に聞こえるかも知れないが、最初から予想出来ることであれば、研究テーマとして取り組む必然性に乏しくなる。独創的で興味ある研究テーマであればあるほど、達成出来ないリスクを背負っていることになる。つまり、最終的な結果を見てその後に繋がる厳しい評価を下すことは、研究そのものの性格に馴染まない。そこで勢い中間評価が重視され、中間評価を行うことでその研究の軌道修正を期待することになる。しかしながら、毎年あるいは2年程度の短い期間で評価を行うことが、真の意味での科学研究の発展に繋がりが得るかと言えば、疑問がなきにしも非ずである。もちろん、とんでもなく間違った研究方針、当初から達成出来そうもない研究計画は論外であるが、そんな研究は当初の申請の審査段階で振り落とすべきものである。一旦審査を通過して開始された重要な研究でも、中間評価をクリアするために近視眼的な研究、いかにも成果が出そうなある意味当たり前とも言える内容の研究を行ってしまう可能性がないであろうか。簡単には解決出来ない重要な課題に積極的に取り組んでいるが、目に見える成果が出ていない研究は切り捨てられていないだろうか。

最近よく「国民に対する説明責任」が重視される。税金を使っている以上実績を示すのは当然のことであるが、使った金額に見合う実績であるかどうかとのコスト・パフォーマンス面からの評価はまだあまり行われていないと思う。また、言葉は悪いが、捨て金になってしまう可能性があっても、進めなければならない研究があることも忘れてはならないであろう。たまたま超新星の爆発に遭遇してニュートリノが発見されなかったら、カミオカンデは無用の長物になりかねなかったのである。評価を受ける立場としてはともかく、他の研究の評価をしている立場からの自省でもある。