

第17回 近畿HLA研究会

会 期 : 2000年2月5日 (土)
会 場 : 奈良県新公会堂
世話人 : 石谷 昭子
奈良県立医科大学法医学教室

ワークショップ

HLA class I DNA Typing

東京医科歯科大学難治疾患研究所
日赤中央血液センター
湧永製薬、創薬研究所DNA診断薬研
福岡大学 腎センター
兵庫県赤十字血液センター

木村 彰方
柏瀬 貢一
川井信太郎
小河原 悟
秋田 真哉

特別講演

NKレセプターのリガンドとしてのHLA class Ib分子

Fred Hutchinson Cancer Research Center Daniel E. Geraghty

癌と自己免疫とHLA: 今後のHLA研究は?

東京医科歯科大学難治疾患研究所

木村彰方

HLA-E、HLA-F、HLA-Gの発現について

下嶋典子¹、石谷昭子¹、大村素子^{1, 3}、川崎明彦¹、岸田 学¹、赤崎正佳²、
Daniel E Geraghty⁴、羽竹勝彦¹

¹奈良県立医科大学・法医学教室、²赤崎クリニック、³兵庫県立西宮病院、

⁴Fred Hutchinson Cancer Reserch Center

我々はこれまでHLA class Ibの機能の解明を目的として、HLA-GおよびHLA-Eのモノクロナル抗体を作製し、HLA-G、HLA-Eの胎盤および各種組織における発現を免疫組織化学染色により研究してきた。その中でHLA-Gの発現は、胎盤に局在しており、一方HLA-Eは、広範な組織に弱く発現している

ことを明らかにしてきた。

今回我々は、新たにHLA-Fに対するモノクロナル抗体作製に成功し、これで、HLA-E、-F、-Gすべてに対する抗体をそろえることができたので、これらを用いて胎盤はじめ各種組織におけるHLA class Ibの発現について総合的に検討した。

【方 法】

サンプル：正常妊娠4・12週の胎盤およびその他数種の組織を用いた。

抗HLA-F抗体の作製：HLA-F遺伝子を導入したE.Coliより得られたHLA-Fタンパクをマウスに免疫し、ハイブリドーマを作製し、以後は定法に従ってモノクロナル抗体を作製した。

抗HLA-F抗体の特異性の検定：FACSおよびWestern blotにより検定した。

抗体：抗HLA-G抗体として、87G、抗HLA-E抗体として、3D12を用いた。さらに今回新たに作製した抗HLA-F抗体、3D11、4A11 (subclass: mouse IgG1) を用いた。ネガティブコントロールとしてmouse IgG1 (PHAMINGENE) を用いた。

免疫染色：内因性ペルオキシダーゼを失活させ、非特異的反応のブロッキングを行った後、抗HLA-G、HLA-EおよびHLA-F抗体と反応させた。この反応をヒストファインシンプルステインPO(M)キット(ニチレイ)を用いて検出した。

【結果と考察】

抗HLA-F抗体の特異性：HLA class Iを細胞表面に発現していない221細胞に、HLA -A、-B、-C、-G、-E遺伝子を導入したtransfectantを用いて本抗体との反応をFACSにより調べたところ、抗HLA-F抗体はこのいずれのtransfectantとも反応しなかった。また、E.ColiにHLA -A、-B、-G、-Eのそれぞれを導入し作製した、各HLA class Iタンパクと本抗体との反応をWestern blotにより調べたところ、HLA-F以外のHLA class Iタンパクに、抗HLA-F抗体が反応しないことを確認した。

今回、抗HLA-G、抗HLA-E、抗HLA-F抗体を用いて、胎盤における各抗原の発現について抗体との反応時間を長くする等して再度検討した結果、これまで、トロホブラスト全体に弱くしか発現していないと考えていたHLA-Eが、extravillous trophoblastにより強くその発現がみられたが、HLA-Gの発現については、これまでと変わりなかった。HLA-Fについては、皮膚で明らかに陽性の部位が存在したが、胎盤では、明らかな発現がみられなかった。現在、ネガティブコントロール抗体との比較などを行い検討中である。

絨毛性疾患におけるHLA-Gの発現の検討

石谷昭子¹、梅影秀史²、下嶋典子¹、山崎峰夫²、森川肇²、羽竹勝彦¹

¹奈良県立医科大学、法医学教室、²同、産婦人科学教室

【目 的】

HLA遺伝子クラスIbに分類されるHLA-Gは母児接点の場である胎盤を構成する絨毛細胞に発現していることが知られている。HLA-Gは他の古典的遺伝子と異なり、多型性に乏しい。そのため、母体のTリンパ球が胎盤を“非自己”として拒絶できず、その結果として妊娠が維持されると考えられている。一方、絨毛性腫瘍は、妊卵に由来し、その絨毛組織を構成している上皮細胞から成立する腫瘍性疾患の総称である。今回我々は、絨毛性腫瘍における

HLA-Gの発現を検討した。

【方 法】

サンプル：手術により得られた胞状奇胎および侵入奇胎の標本を用いた。

抗体：87 (抗HLA-G) を用いた。

染色：内因性ペルオキシダーゼを失活させ、内因性アビジン・ビオチンのブロッキングを行ったのち、87Gと25℃で2時間反応させた。この反応を、ヒストファイン・シンプルステインPO (M) キット

(ニチレイ)を用いて検出した。

【結 果】

胞状奇胎は正常絨毛と異なり、絨毛間質の浮腫、液化に基づき、壁がトロホプラストよりなる囊胞が連珠状に連なった病的組織であり、同時に増殖像を示すことより腫瘍的性格を兼ね備えている。

また、侵入奇胎は奇胎の組織が筋層にまで及び、時に遠隔臓器への転移を認めることがある。今回の検討ではHLA-Gは正常絨毛と同様に胞状奇胎に

においてもトロホプラストに発現しており、また子宮筋層に侵入した侵入奇胎においても発現が認められた。

【考 察】

胞状奇胎と臨床的に転移性腫瘍の性格を持つ侵入奇胎のいずれにおいても認められるHLA-Gが母体の免疫を抑制し腫瘍の進展に関与している可能性が示唆された。

マイナー組織適合性抗原HA-1の適合性とGVHまたはGVLへの影響

丸屋悦子^{1,11}・岡本真一郎²・塩原信太郎³・関 茂樹⁴・甲斐俊朗⁵・藤井康彦⁶・加藤剛二⁷
河敬世⁸・藤井浩⁹・原田実根¹⁰・伊藤和彦¹¹・徳永勝士¹²・十字猛夫¹³・佐治博夫¹

¹⁾京都府赤十字血液セ, ²⁾慶応大医血内, ³⁾金沢医大輸血, ⁴⁾佐久総合内, ⁵⁾兵庫医大輸血,

⁶⁾山口大医三内, ⁷⁾名古屋第一赤, ⁸⁾大阪府立母子保健総合医療セ小, ⁹⁾京都第一赤内,

¹⁰⁾岡山大医二内, ¹¹⁾京大輸血, ¹²⁾東大人類遺, ¹³⁾日赤中央血液セ

【目 的】

1996年GoulmyらによりHLA-A2 (A*0201) に拘束性を示し、CTLにより検出されるマイナー抗原、HA-1の不適合とGVHD発症の相関が報告された。その後HA-1が認識するペプチド (VLHDDLLEA) がKIAA0223遺伝子由来で、1塩基置換の対立遺伝子 (His; H vs. Arg; R) が存在することが明らかになった。我々はHA-1の遺伝子typing法と日本人のHA-1 allele 頻度とHLA一致血縁間骨髄移植で不適合性がGVHD発症と相関を示さなかったことを報告した(8JSHI, 1999)。今回、HA-1のそれぞれのalleleの適合性がHLA一致血縁間骨髄移植でGVH反応やGVL効果におよぼす影響を調べた。またDutchのHLA-A2 alleleはほとんどがA*0201であるが、日本人のそれはA*0201 (46%) と A*0206 (38%)、A*0207 (11%) が存在する。これらalleleの違いによるHA-1の適合性がおよぼす影響も合わせ検討した。

【方 法】

HLA一致血縁間BMTのペア (n=223) のうち、HLA-A2を保有するペア (n=107) のg-DNAを用い、HA-1の変異部位を含む領域をPCRで増幅後、RFLP法 (TSP45I) でアリル判定を行なった。

HA-1の適合性の移植成績への影響：移植全症例、悪性腫瘍症例のみ、白血病のみに分類し、不適合群 (IC)、適合群 (C) における無病生存率 (DFS)、再発率 (RR) およびGVHD (≥1) 発症率を比較した。

【結果と考察】

HA-1のHis (H) の適合性について、全症例でIC群の%DFSがC群より高く (IC=86%, C=72%)、悪性腫瘍疾患群 (IC=86%, C=69%) でも同様の傾向があった。Arg (R) の適合性について、全症例でIC群の%DFSがC群より高く (IC=88%, C=72%)、悪性腫瘍疾患 (IC=88%, C=69%) でも同様の傾向があり、HA-1不適合によるGVL効果を示す傾向が

あった。

GVHDとの相関はHを標的にした場合、IC群の%GVHDは29%でC群は53%、Rを標的にした場合IC群で50%、C群で52%であり、昨年の8JSHIの報告結果（GVHDとの相関はない）が確認された。例数は少ないがHLA-A2のアリル別検討（主にA*0201 vs. A*0206）において、A2 alleleの違いに

よりHA-1適合性が移植成績におよぼす影響にきわだった違いは認められなかった。

今後、症例を増やし、HLA-A2 allele 別のHA-1によるGVL効果の検証を重ね、アロセルセラピーの可能性の追求や、他のHLA抗原による拘束性の存在の有無を検証したい。

抗HLA抗体測定試薬の評価（FCM法）

森 勝志¹⁾・米田孝司¹⁾・片山善章¹⁾・佐田正晴²⁾・中谷武嗣²⁾

¹⁾国立循環器病センター臨床検査部, ²⁾同・研究所実験治療開発部

【はじめに】

HLA抗体が産生される原因としては妊娠や出産、輸血や移植が挙げられる。当センターにおいても血小板輸血無効患者においてHLA抗体が存在することをしばしば経験した。

一般的に行われているHLA抗体検査法はLCT (Lymphocyte cytotoxicity test)やAHG-LCT(anti human globulin-LCT)であるが、これらの方法は用いている抗原が新鮮なリンパ球であるがゆえに有効期限が短く、保存条件や解凍時に注意を要するなど問題点も多い。このような問題点を解決すべく、マイクrobeにHLA抗原をコートし、反応したHLA抗体をフローサイトメーターにて検出する測定試薬が開発された。

今回われわれは本法によりHLA抗体を測定し、その有効性について検討した。

【対象と方法】

測定対象はHLA抗体スクリーニング検査の依頼のあった12例ならびにHLA抗体陽性であった症例について追跡調査を行った。また、血小板輸血が行われた症例についてその前後におけるHLA抗体の検索を行った。

測定方法はFlowPRAクラスⅠ、クラスⅡ(OneLambda社)を用いてFlowcytometer(FCM)にて測

定した。すなわち、血清20 μ lにクラスⅠ、クラスⅡビーズを5 μ l加え30分間反応させた。反応後洗浄しFITC-抗ヒトIgG F(ab')₂を100 μ l加えて30分暗所にて反応させた。反応後洗浄しPBSにて500 μ lに浮遊させた検体をFCMにて測定、解析した。

測定器機は、FACSCalibur(ベクトンディッキンソン社)を用いた。

結果判定については、negative controlのヒストグラムよりCut offを設定し、Cut offより陽性域10%以上を陽性とした。

【結 果】

HLA抗体スクリーニング検査を行った結果、12例中4例が陽性となった。1例目はクラスⅠ;99.94%、クラスⅡ76.59%、2例目はクラスⅠ;43.61%、クラスⅡ0.76%、3例目はクラスⅠ;0.74%、クラスⅡ92.21%、4例目はクラスⅠ;86.24%、クラスⅡ0.39%であった。HLA抗体陽性であった症例について追跡調査を行った結果は、クラスⅠ;86.24%、クラスⅡ0.39%であったものが、T細胞をコントロールすることにより10日目にはクラスⅠ;17.45%、クラスⅡ3.14%まで低下したことが確認できた。

血小板輸血によるHLA抗体の産生については、無

作為に抽出した7症例中、3症例にHLA抗体の産生が確認された。

【まとめ】

本法はHLA抗体スクリーニング法として開発された測定試薬である。測定機器としてFCMを必要

とするものの従来法に比し、操作性・客観性にすぐれ治療効果を適格に反映することが確認できた。また、血小板輸血等を行った際は、一定期間後にHLA抗体のスクリーニング検査を行うことが望ましいと思われた。

近畿臍帯血バンクにおけるHLA予備検索について

国分寺 晃、藤林由佳、高木斉子、前田和宏、郡谷哲男、谷脇清助、甲斐俊朗、原 宏^{以上1)}

秋田真哉、荒木延夫、能勢義介、神前昌敏^{以上2)}

山岡正暢、仁田 浩、佐治博夫^{以上3)}

河本順雄、松本雅則、藤村吉博、 朴 永東^{以上4)}

¹⁾兵庫医科大学病院 輸血部, ²⁾兵庫県赤十字血液センター, ³⁾京都府赤十字血液センター, ⁴⁾奈良県立医科大学 輸血部, 小児科

近畿臍帯血バンク発足(平成7年11月)から平成11年12月末までの約4年間に於ける凍結標本数は493標本にのぼる。保存条件の変更・追加等により、現在は205標本が提供可能な状況にあり、これまでに30標本を提供した。

提供するまでにはHLA予備検索依頼、移植臍帯血検査依頼(本登録)等によりHLA(Class I: A, B Class II: DRB1)の適合度を検索し、完全一致、1ミス一致(一部2ミス一致)に分類し報告している。

しかし、患者側の検索用抗原がDR2やDR6という様なスプリットされていない表現型による依頼形式が多く見受けられ、最近の約1年間(平成11年1~12月)に行った予備検索依頼は419件で、その内66件(15.8%)がこの様な検索依頼であった。この様なケースの場合、適合の可能性のあるもの(全てのスプリット抗原)については一致として取り扱わなければならない、その後の追加検査や再検査により最終的な適合は大きく異なってくる。

骨髄移植や臍帯血移植は、可能な限り患者本人に一致するものが検索時に選ばれ、移植までの期間を

短縮し、より多くの救命治療に結びつける体制を整備しなければならない。そのためには、検査体制の充実・強化を図るためゲノムDNAを用いたHLAアレルタイピングは、出来る限り精度が高く、簡便・迅速・省力化・低コストな方法を模索しなければならない。今後、兵庫臍帯血バンクとしては日本臍帯血バンクネットワーク(平成11年8月設立)に登録する標本のDRB1はHigh resolution(4桁)レベルまで検索できる体制を目指し、各関係機関と協力し整備を進めている。

MRHAによるHLAクラス I DNAタイピング

○森部 豊輝, 平井 博美, 兼重 俊彦

塩野義製薬・診断医学事業部

【目 的】

HLAクラスI遺伝子の多型解析には様々な手法が用いられているが、我々は操作の簡便性・データの正確性に優れたMicrotiter plate-reverse hybridization assay (MRHA) を確立した (Moribe T. et al. Hum Immunol 60: 539, 1999)。MRHAの基本原理は、SSOプローブをマイクロプレートにcovalentlyに固相化し、ピオチン化プライマーを用いたPCR増幅物とのハイブリダイゼーションによって特定の塩基配列を検出するものである。今回、我々はこのシステムを用いたHLAクラス I DNAタイピングの実用面での評価を行ったので報告する。

【方 法】

①HLA-A, -B, -Cタイピングについて至適条件の検討を行った。②自動判定システムにより、MRHA法で得られたOD値からタイピングを行った。③末梢血からのDNA抽出をグアニジンチオシアネート／フェノール・クロロホルム法（標準法）、Proteinase K／Tween法および市販DNA抽出キット；Genとるくん（宝酒造）、MagExtractor（東洋紡）、QIAamp（QIAGEN）、SepaGene（三光純薬）を用いて行い、HLA-A, -B, -CローカスのPCR増幅およびタイピングデータを比較した。

【結果と考察】

①条件検討することによってMRHAをHLA-A, -B, -C DNAタイピングに適用することができた。このタイピング法は、(i)ハイブリダイゼーション反応温度が37℃かつ洗浄温度が室温であること、(ii)陽性シグナルが強くバックグラウンドが低いためにシグナルのcut-off値が明瞭であることが特長である。ま

た、HLA-A, -B, -C全てのローカスについてPCR増幅反応から検出反応まで同じ条件であるので同時にアッセイすることができる。従って、MRHAによるHLAクラス I DNAタイピングは操作の簡便性・データの正確性に優れた実用性の高い方法である。②自動判定システムについてはイムノリーダーによって測定されたOD値をもとに判定することができる自動判定システムを開発した。この判定システムを用いれば、HLA-A, -B, -Cのタイプを迅速に判別することができるのでMRHAによるHLAクラス I DNAタイピングの日常検査への適用も容易である。③DNA抽出法については全ての方法で標準法と同程度の増幅が認められた。ただし、Proteinase K／Tween法およびMagExtractorを用いた場合にHLA-BローカスのPCR増幅が他の方法よりも弱かった。日常検査においては種々の抽出法が用いられているが、基本的にはほとんどのDNA抽出法および市販DNA抽出キットがMRHAによるHLAクラス I DNAタイピングに適用できると考えられた。

以上のようにMRHAによるHLAクラス I DNAタイピングは非常に実用面に優れたタイピングシステムである。

サルコイドーシスの予後と免疫遺伝学的特徴

○立花暉夫¹⁾、石井博之²⁾、福森泰雄²⁾、永尾暢夫²⁾、檜垣実男³⁾

¹⁾大阪簡易保険総合健診センター、²⁾大阪府赤十字血液センター、³⁾大阪大学大学院医学系研究科加齢医学

【目 的】

サルコイドーシス（以下サ）の臨床経過、予後と免疫遺伝学的データとの関連性を検討した。

【対 象】

最近経験した、呼吸器症状を訴え胸部X線像で著明なびまん性肺陰影を呈した肺サ重症症例、初診時から重症でpacingを必要とした心サ症例各1例、および経過中悪化を認め1/2はpacingを必要とした心サ症例2例計重症サ4例および長期経過追求中のサ症例。後者は、経過不良例（初診後、5年以上サ病変長期持続例）、経過良好例（初診後、2年以内サ病変著明改善例）に分け、またサの全身性病変の中で生命予後上最も重要な心サ症例も研究対象とした。

【方 法】

サ症例のHLA-DQB1, DPBI DNA TypingをPCR-RFLP法で、最近の重症例はHLADRB1 DNA Typingも、大阪府赤十字血液センターで実施した。重症2/4および長期経過追求中の症例について、ACE遺伝子型をRigatの方法で大阪大学加齢医学教室で実施した。得られた成績とサの予後との関連を検討した。また立花、岩井、武村他による1996年迄の全国サ剖検例死因調査で、サによる死亡の主要死因

は心サ病変と確認し、得られた成績と心サとの関連性についても検討した。

【成 績】

（1）最近の重症サ症例についての成績。サ経過不良と関連性を示すHLA DQB1*0601, DPB1*0501は上記サ重症例4例共陽性、HLADRB1*0803は2/4で陽性。サ経過不良と関連性を示すACE遺伝子DD, DIは実施2例で陽性、かつ2例共HLADQB1*0601陽性であった。

（2）サの臨床経過との関連について。経過不良症例と経過良好症例について、HLADQB1*0601、DPB1*0501頻度を比較検討した結果、何れも、後者に比して、前者で高頻度であり、ACE遺伝子型DD、DI陽性も前者で高頻度であった。次にHLADQB1*0601陽性かつACE遺伝子型DD、DI陽性は、後者に比して、前者で高頻度であった。

（3）心サ症例について。心サ症例と経過良好症例との比較で上記同様の成績を得た。

【結 論】

我々の成績及び国内、国外の成績から、サ症例の予後を考える際、宿主の背景因子として、単一でなく複雑な免疫遺伝学的背景因子の存在が考えられる。

日本人天疱瘡患者におけるHLA class II遺伝子の検討

山科 幸夫¹⁾、島谷育子¹⁾、宮川幸子¹⁾、白井利彦¹⁾、高木圭一²⁾

¹⁾奈良医大・皮膚科, ²⁾NTT西日本大阪病院・皮膚科

【目 的】

天疱瘡は表皮角化細胞の接着分子に対する自己抗体を産生し、表皮内水疱を形成する疾患で、その臨床像、病理組織所見から尋常性天疱瘡 (pemphigus vulgaris, 以下PV) と落葉状天疱瘡 (pemphigus foliaceus, 以下PF) という2つの主な病型に分類される。

PVは従来よりユダヤ人ではHLA-DR4との相関が、他の民族ではDR4およびDR6との相関が報告されている。さらに、近年の研究では HLA-DRB1*0402/DQA1*0301/DQB1*0302、とDRB1*14/DQA1*01/DQB1*0503のhaplotypeとの相関が示唆されている。またPFの亜型とされるブラジル天疱瘡ではPVとの相関が強いとされるDRB1*04およびDRB1*14に加えて、DRB1*01 alleleとの相関が報告されている。

このようにHLA class II遺伝子は天疱瘡の病因に関連していることが明らかにされてきたが、分子レベルでの多型性に対する検討を加えた研究は少ない。今回の研究では、日本人のPV、PFとの相関の強いHLA class II alleleを明らかにし、さらに分子レベルでの検討を加える。

【対象と方法】

奈良医大付属病院とその関連施設を受診した日本人天疱瘡患者33例を対象とした。患者の病型はPVが20例、PFが13例であった。すべての患者は病理組織学的、また蛍光抗体法によって診断された。これらの患者のHLA class II alleles (DRB1, DQA1, DQB1) のタイピングをPCR-RFLP法により行った。

【結果と考察】

PV患者では20例全例でDRB1*04あるいはDRB1*14のサブタイプのアリル (DRB1*0403, *0404, *0406, *1401, *1405, *1406) がみられた。これらの各アリルにおいてDRB1 ?鎖可変領域のPhe26, Leu67, Arg71, Val86のアミノ酸残基が共通であった。これまでに他民族でPV患者と関連が報告されているアリルと比較すると、先にあげたアミノ酸残基のうちPhe26, Val86が一致しており、また、67位がLeuあるいはIleであり、70位と71位が親水性残基という共通点がみいだされた。

一方、PF患者では13例中9例 (69.2%) の患者でDRB1*04あるいはDRB1*14のサブタイプのアリル (DRB1*0403, *0405, *0406, *1401, *1405) がみられた。PF患者では、共有の多型性アミノ酸残基はみいだせなかったが、26位と67位に疎水性残基を、70位と71位に親水性残基をもつDRB1アリルを少なくとも1つ有していた。

以上の結果よりHLA-DRB1 ?鎖可変領域の26位、67位、70位、71位、86位のアミノ酸残基がPV、PF両疾患の発症に対して大きな役割を果たしている可能性が示唆された。

新生児エリテマトーデス：母児のHLA class II 遺伝子の検索

宮川幸子¹⁾, 木戸口公一²⁾, 吉岡 章³⁾, 兼重俊彦⁴⁾

¹⁾奈良医大皮膚科, ²⁾大阪府立母子保険総合医療センター母性内科, ³⁾奈良医大小児科, ⁴⁾塩野義バイオメディカルラボラトリーズ

【はじめに】

新生児エリテマトーデス (NLE) は, 先天性心ブロック (CHB), 皮膚の紅斑, 血球減少, 肝障害など多臓器の障害を生じる比較的まれな新生児の疾患である。母親由来の自己抗体 (抗 Ro/SSA・La/SSB) が児の臓器障害の発症に関与していると考えられているが, その詳細な機序は明らかではない。過去の NLE 母児における HLA 検索では, 母親の抗 Ro/SSA・La/SSB 免疫応答と HLA-DR3/DQ2 (白人) または DR8/DQ6 (日本人) との関連が明らかにされている。

本研究では, NLE の症状発現と母児の HLA class II 遺伝子の相互関係について検討した。

【対 象】

NLE 15 家族の母児 23 ペア:

NLE 児 18 名 (CHB 7, CHB + 皮膚症状 2, 皮膚症状のみ 9)

無症状の同胞 5 名, 母親 15 名

【方 法】

PCR-RFLP 法による HLA-DRB1, DQA1, DQB1, DPB1 genotyping とハプロタイプ解析

【結 果】

CHB 児 9 名のうち 4 名 (44 %) が, それぞれの母親と heterozygous HLA-DRB1-DQA1-DQB1 haplotype identical (Table 1) であった。CHB 症状のない 14 児 (Table 1, Table 2) にはこのような所見はなく, 4/9 対 0/14 の差は有意 ($P < 0.01$) であった。母児の HLA-DRB1-DQA1-DQB1 haplotype identity は DPB1 allele には extend しなかった。

【結 論】

CHB 母児ペアの約半数に HLA-DRB1, DQA1, DQB1 遺伝子の一致 (heterozygous HLA-DRB1-DQA1-DQB1 haplotype identity) の所見があるという我々の成績は, 最近スウェーデンのグループにより追試確認された。母親から胎児へ移行した自己抗体が惹起する心刺激伝達経路の炎症によると考えられている CHB の発症機構に, 母児の HLA-DR/DQ 分子の相同性が関与している可能性が示唆された。

【文 献】

1. Miyagawa S, et al: Arthritis Rheum 40: 982-983, 1997
2. Siren MK, et al: Lupus 8: 60-67, 1999
3. Miyagawa S, et al: Lupus 8: 751-754, 1999

Table 1. HLA-DRB1-DQA1-DQB1 haplotypes in children with CHB, their unaffected siblings, and their mothers

No	Patient Sex/age	Symptoms	HLA-DRB1-DQA1-DQB1	
			(child)	(mother)
1-1	M/14y	Asymptomatic	1403-0503-0301	1501-0102-0602
		1501-0102-0602	1502-0103-0601	
1-2	M/13y	CHB	1403-0503-0301	
		1501-0102-0602		
2-1	F/11y	CHB	0405-0303-0401	0405-0301-0302
			1602-0102-0602	1602-0102-0602
2-2	F/9y	Asymptomatic	0405-0303-0401	
			0405-0301-0302	
3-1	F/8y	Asymptomatic	0405-0303-0401	0405-0303-0401
			1301-0103-0603	08032-0103-0601
3-2	F/7y	CHB	0405-0303-0401	
			1301-0103-0603	
3-3	M	CHB	not examined (died at 3 years of age)	
4-1	F/3y	CHB	0405-0303-0401	0405-0303-0401
			1501-0102-0602	1501-0102-0602
4-2	M/1y	Skin lesions	1501-0102-0602	
		1501-0102-0602		
5	F/13y	CHB	08032-0103-0601	08032-0103-0601
		& skin lesions	0405-0303-0401	1406-0503-0301
6	M/11y	CHB	0405-0303-0401	0405-0303-0401
		0901-0302-0303	0901-0302-0303	
7	F/11y	CHB	0405-0303-0401	0405-0303-0401
		& skin lesions	1501-0102-0602	1501-0102-0602
8	M/4y	CHB	0901-0302-0303	0901-0302-0303
			1501-0102-0602	1501-0102-0602
9	M/4mo	CHB	0802-0301-0302	0405-0303-0401
			1202-0601-0301	0802-0301-0302
10-1	M	CHB	not examined (died at 2 months of age)	
10-2	M/13y	Asymptomatic	08032-0103-0601	08032-0103-0601
			1501-0102-0602	08032-0103-0601
10-3	M/10y	Asymptomatic	08032-0103-0601	
			0901-0302-0303	

Table 2. HLA-DRB1-DQA1-DQB1 haplotypes in children with skin lesions of NLE, and their mothers

No	Patient Sex/age	Symptoms	HLA - DRB1 - DQA1 - DQB1	
			(child)	(mother)
11-1	M/17y	Skin lesions	1101-0505-0301	1101-0505-0301
		0405-0303-0401	1101-0505-0301	
11-2	M/16y	Skin lesions	1101-0505-0301	
		0405-0303-0401		
12-1	F /7y	Skin lesions	1101-0505-0301	1101-0505-0301
		1401-0104-0502	1406-0503-0301	
12-2	M/4y	Skin lesions	1401-0104-0502	
	& thrombocytopenia		1406-0503-0301	
13-1	F/3y	Skin lesions	0405-0303-0401	1101-0505-0301
		& pancytopenia	1302-0102-0604	1302-0102-0604
13-2	M/5mo	Skin lesions	1101-0505-0301	
			1501-0102-0602	
14	M/5mo	Skin lesions	1405-0104-05031	0410-0303-0402
			1502-0103-0601	1405-0104-05031
15	F/4mo	Skin lesions	0901-0302-0303	08032-0103-0601
			1201-0301-0302	1201-0301-0302

腎細胞癌におけるHLA-DRB抗原の疾患感受性の検討

土岐清秀¹⁾、高原史郎¹⁾、児島康行¹⁾、三浦秀信¹⁾、野々村祝夫¹⁾、奥山明彦¹⁾
西村健作²⁾、藤岡秀樹²⁾、佐田正晴³⁾

¹⁾大阪大学医学部泌尿器科, ²⁾大阪警察病院泌尿器科, ³⁾国立循環器病センター実験治療開発部

【目 的】

腎細胞癌におけるHLA-DRB抗原の疾患感受性について検討したので報告する。

【対 象】

大阪大学医学部附属病院および大阪警察病院において、腎摘出術を施行された症例のうち病理組織学的所見にて腎細胞癌と診断された57例を対象とした。性別は男性が33例、女性が24例であった。

Grade分類ではG1が24例、G2が20例、G3が5例であり、stage分類ではT1が5例、T2が30例、T3が11例、N0M0が35例、N1以上あるいはM1が16例であった。

【方 法】

各症例の末梢血に対し、PCR-SSP法 (low resolution) を用いてHLA-DR抗原を解析し、出現頻度、allele頻度を算出した。同じくPCR-RFLP法

(high resolution) を用いてHLA-DRB1 alleleのDNAタイピングを行い出現頻度、allele頻度を算出した。コントロールとして第11回国際HLAワークショップで報告された健常日本人1216名のallele頻度を用いて、それぞれ患者群と対照群とで χ^2 検定あるいはフィッシャーの直接確率法を用いて有意差検定を施行した。

【結 果】

腎細胞癌41症例に対し、HLA-DR抗原とHLA-

DRB1抗原についてそれぞれDNAタイピングを行った結果、DRとDRB1とのdiscrepancyは3.6%であった。DRではDR8がコントロール群に比べて出現頻度が低い傾向であったが、統計学的有意差は認められなかった。対象症例57例のhigh resolutionの結果ではDRB1*0403および1202のallele頻度がコントロール群に比較し有意に高い相関を示し、疾患との関連の可能性が考えられた。またDRB3、DRB4、DRB5についても検討したが、そのallele頻度にコントロール群との有意差は認められなかった。

HLAクラスⅠ領域の進化と形成

猪子英俊、椎名 隆

東海大医学部、分子生命科学

我々は、HLAクラスⅠ領域1.8 Mbのゲノム塩基配列を決定した。その結果、本領域には、クラスⅠ遺伝子の他に、8個のHCGII、11個のHCGIV、15個のP5、5個の3.8-1、5個のHCGIX、6個のMICの存在をはじめとして、多くの重複の痕跡が認められた。そこで、本研究ではこの重複の痕跡をもとに、HLAクラスⅠ領域の進化・形成の過程について追究した。まず、クラスⅠ全領域におけるDot matrix解析を行った結果、セントロメア側293 kbおよびテロメア側297 kbの領域は、28個の8-50 kbの比較的長い領域が多層的に重複していることを見出した。そこで、重複ユニットの割り出し、上記の各遺伝子間における遺伝的距離の推定および反復配列を用いた分子進化学的解析を遂行した。

それらの結果、クラスⅠ領域の進化・形成モデルとして、まず、MICEからduplication (倍化) によりHLA-Fが形成され、MICE-HLA-Fからなる祖先的なクラスⅠ遺伝子の基本的ユニットがまず誕生し、その後、この30 kbの重複基本ユニットが、

MICA、MICBへの倍化をはじめとして、少なくとも8回の重複を起こして進化・形成されたものと予想された。すなわち、HCGII-HLAクラスⅠ-HCGIV-P5-3.8-1-HCGIX-MICを繰り返し基本ユニットとする倍化が、クラスⅠ領域の形成の原動力であると考えられた。

クラスⅡ領域ではこのような多層的な重複が認められないことから、クラスⅠ領域の形成にゲノム倍化が大きく貢献し、しかもその原型をとどめていること、すなわち、クラスⅠ領域はクラスⅡ領域に比べて、進化的に新しく形成されたことをしめしている、と考えられる。

HLA-DR遺伝子領域に存在する新規RNA結合タンパク質遺伝子の分子生物学的解析

千田昇平、北條浩彦、徳永勝士

東京大学医学部、人類遺伝学教室

我々は、新規の二本鎖RNA結合蛋白質をコードする遺伝子候補をヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen: HLA) クラスII領域中に見出し、その分子生物学的解析を行った。その塩基配列から予測されるアミノ酸配列は、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 由来の二本鎖RNA結合蛋白質 (Xlrpb)、及びヒト免疫不全ウイルスRNAのtransactivation response (TAR) 領域に結合するヒト細胞質由来の蛋白質 (TRBP) と高い相同性を有しており、この予測される遺伝子候補をhomo sapiens RNA binding protein (HSRBP) と命名した。

HSRBP遺伝子産物が生体内に存在しているかどうかを調べるために、まずヒト末梢血から抽出したpoly(A)⁺ RNAを用いてreverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法による解析を行い、その転写産物の生体内における存在を明らか

にした。そして、5'、3'-rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法によりその転写産物の全長が約1.8kntであることを確認した。またウサギ網状赤血球溶解液を用いた無細胞系タンパク質翻訳法により、open reading frame (ORF) 内の最初のATGコドンからHSRBPタンパク質が翻訳されることも確認した。さらに、サザンブロッティング法によるゲノム解析から、ヒトゲノム中にHSRBP遺伝子、又はそれに類似した配列が複数存在することも見出した。HSRBP遺伝子と高い相同性を示す幾つかの遺伝子がすでに単離同定され、それらは二本鎖RNAと高い親和性を示すことが知られている。従って、今回の結果は、二本鎖RNA 結合タンパク質をコードする遺伝子がヒトゲノム中に複数存在し、multigene familyを形成している事を示唆するものであった。