

地方会 (第 20 回近畿 HLA 研究会) 抄録

会 期： 2003 年 2 月 1 日(土)

会 場： 大阪国際会議場・12 階特別会議場

世話人： 高原 史郎

大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学講座

● 特別講演 I ●

The Humoral Theory of Transplantation

Paul Terasaki

Terasaki Foundation Laboratory

50 years ago, one of the early debates was whether allografts are rejected by antibodies (humoral theory) or by cells. In the subsequent years, mainly due to the influence of Peter Medawar, we have come to believe that transplant rejection is cellular. However, especially in recent years, evidence has accumulated that antibodies cause 1) hyperacute rejection, 2) acute

rejection as shown by c4d detection in biopsies, and 3) chronic rejection. Antibodies are postulated to trigger a cascade of reaction in the vessel walls which produces endothelial thickening. This procedure may take years. Recent evidence shows that the antibodies appear first before rejection. Moreover, almost all patients who reject have antibodies.

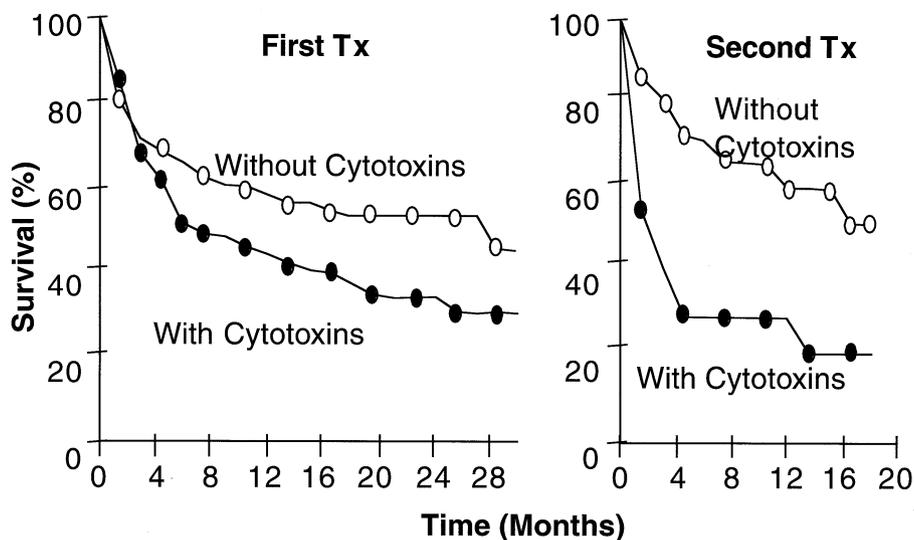


Figure 1. Terasaki PI, Kreisler M, Mickey RM. Postgraduate Medical Journal 1971; 47: 89-100.

This was the first demonstration that antibodies present in patients before transplantation can damage kidneys.

Using the idea that antibodies cause rejection, one can remove antibodies by various means and measure its effectiveness by monitoring antibody levels. Whether chronic rejection can be prevented by this means remains to be tested. Also if antibodies cause rejection, immunosuppression in patients who do not have antibodies might be reduced, while monitoring the patients.

We believe that there is now strong evidence for

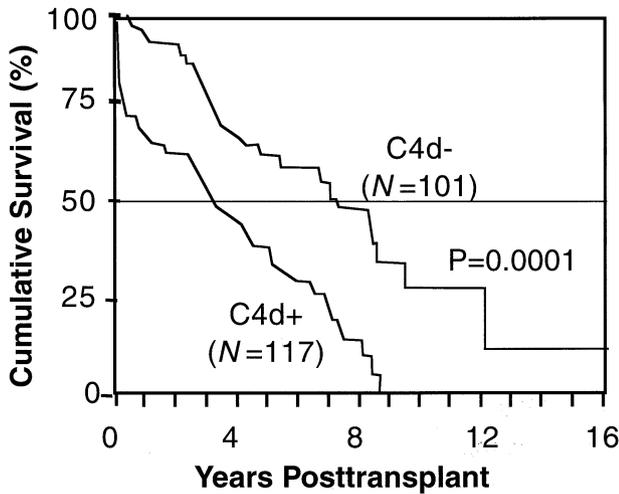


Figure 2. Lederer, et al. *Kidney International* 59: 334–341, 2001 This is the best evidence that antibodies adhered to kidneys as shown by detection of c4d will result in early loss of kidney transplants

the humoral theory. If accepted, this would alter the way in which we follow-up patients and monitor the effectiveness of various immunosuppressive treatments.

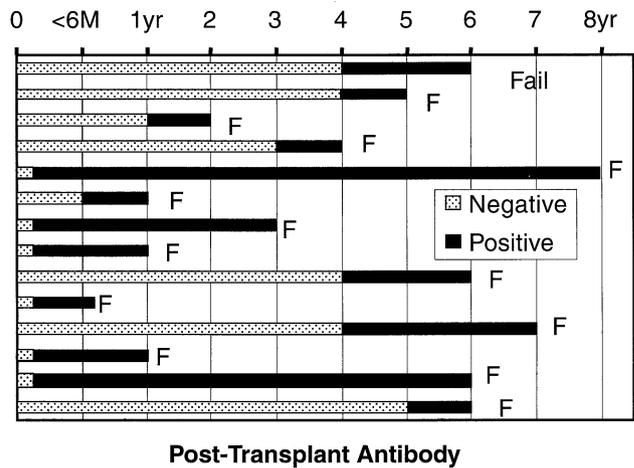


Figure 3. 14 patients who did not have antibodies pre transplantation subsequently developed antibodies as shown by the dark bars. It can be seen that AFTER this development of antibodies all these graft had chronic rejection failures. Often, antibodies do not cause immediate failure of grafts. This process may take years.

Lee PC, Terasaki PI, Takemoto SK, et al. All chronic rejection failures of kidney transplants preceded by development of HLA antibodies. *Transplantation* 2002; 74(8): 1192.

● 特別講演 II ●

FROM MAC TO MIC AND BEYOND: THE ONGOING ADVENTURE OF MHC-I LOCI

Seiamak Bahram

Human Molecular Immunogenetics, School of Medicine, Louis Pasteur
University, Strasbourg Cedex, France

The past century has witnessed the unfolding of perhaps the most formidable saga of human genetics and biology. First identified genetically and serologi-

cally, then characterized biochemically, and finally defined at the nucleotide and structural levels, the Major Histocompatibility Complex (MHC), approxi-

mately one-thousandth of the genome, encompasses its most polymorphic members. This diversity enables the MHC to counter-act the extraordinary diverse microbiological threats and, paradoxically, also engenders the not well understood susceptibility to a large number of pathologies. The MHC is defined by two gene classes, I and II, which are structurally related but functionally distinct, each displaying a different set of peptide antigens to T-cell receptor expressing killer and helper T cells respectively. Class II molecules are restricted to the MHC proper, located on the sixth chromosome in man, but the MHC-I molecules are dispersed throughout the genome and accomplish a variety of unrelated tasks. Following a general and historic introduction, this lecture will mainly focus on a separate set of MHC-encoded class

I genes, the MHC class I Chain-related gene family; *MIC*. Differing from the prototypical class I genes in structure, transcription, diversity and potential function, they exemplify the versatility of the MHC-fold. The *MIC* gene family is defined by seven members, *MICA-G*. *MICA* and *MICB* encode epithelia-specific, single-chain, cargo-free, membrane-bound glycoproteins interacting with C-type lectin activatory NKG2D receptor. *MICC-G* are pseudogenes. The unusual diversity of both *MICA* and *MICB*, as well as the identification of *MIC*-deficient individuals, should facilitate a rapid grasp of their role in immunobiology. Upon the end of the lecture the audience will be briefly exposed to other important biological functions carried out by a host of other MHC class I genes, for most located outside the MHC.

MHCからゲノム多様性への挑戦

猪子 英俊

東海大学医学部 分子生命科学系 分子生命科学2

HLA と相関する疾患の感受性遺伝子が HLA 自身そのものなのか、それとも HLA 遺伝子に近接して存在する非 HLA 遺伝子なのかは、長らく解決が待たれていた重要な問題であった。しかしながら、近年の HLA 全領域のゲノム塩基配列の決定により、少なくとも理論的にはこの問題の解決の糸口がみいだされた。

すなわち、HLA 領域のゲノム塩基配列の情報にもとづいて、マイクロサテライト (2~6 塩基からなる繰り返し配列。繰り返し回数に多型性がみられる) や SNP (single nucleotide polymorphism: 一塩基多型, または変異) などの多型マーカーを密に設定し, それらの多型マーカーを HLA 多型による相関解析と全く同様に, 相関解析することにより, 詳細なマッピングを行い, 感受性遺伝子候補領域を 100 kb レベル

まで絞り込むことが可能となった。この絞り込まれた 100 kb の感受性遺伝子候補領域について, その領域に存在する遺伝子をゲノム塩基配列より同定し, それらの遺伝子より SNP (single nucleotide polymorphism: 一塩基多型, または変異) などをみだし, それらの SNP を用いた相関解析により, もっとも強く相関する SNP を, 感受性を規定している多型 (変異) として同定できる。我々は, 感受性遺伝子候補領域を 100 kb まで絞り込む多型マーカーとして, マイクロサテライトを用いた相関解析によるマッピングを行い, HLA-Cw6 と相関する尋常性乾癬の感受性遺伝子として HLA-C 遺伝子より 100 kb テロメア側の新規遺伝子, DR4 と相関するリウマチの第 2 の感受性遺伝子としてクラス III 領域テロメア側末端の新規遺伝子 *IkBL*, HLA-B51 と相関するペー

チェック病の感受性遺伝子については HLA-B51 それ自身であることを同定することなどに成功した。

以上のアプローチは、HLA に代わる遺伝多型マーカーを HLA 領域に密に設定して、HLA 相関解析と同様の相関解析を行ったものであり、原理的には HLA 相関解析から得られた原理、手法、技術を応用しているに過ぎない。ヒトゲノム塩基配列がほぼ決定されたいま、全く同様な手法でゲノムワイドな相関解析が、生活習慣病をはじめとする複合遺伝疾患の感受性遺伝子の単離を中心に、ポストゲノムシーケンシングプロジェクトの大きな重要な柱である「ゲノム多様性解析」として、進められようとしている。このゲノムワイドな相関解析にも、HLA 領域で得られた知見を大いに利用すべきであろう。

ゲノムワイドな相関解析の戦略として、次の方法が考えられている。

- 1) まず、ゲノムワイドに密に設定した多型マーカーを用いて、ゲノムワイドなマッピングにより疾患遺伝子候補領域を絞り込む
 - 2) その候補領域に存在する遺伝子について、SNP を中心に多型を網羅的に同定して、最も疾患と関連する変異あるいは多型をみいだし、また遺伝子の発現解析により、発現組織やパターンが対象疾患の病態と整合性がみいだされる遺伝子を探索する
- この 1) については、SNP またはマイクロサテライトなどのいわゆる多型マーカーを用いた、ゲノムワイドな相関解析によるマッピングが考えられている。我々の上記の HLA 領域でのマッピングの経験からいえば、SNP に比較して、より高度な多型、優れた分解能、高い精度を有するマイクロサテライトを多型マーカーとして、用いることを我々は提唱している。すなわち、マイクロサテライト 3 万マーカー(ゲノム上に 100 kb に一個を設定する)について相関解析を遂行することにより、100 kb 前後に疾患遺伝子候補領域が絞り込まれると予想される。この手法は、移植の適合に関係するマイナー組織適合遺

伝子の単離にも応用しうる。

一方、ゲノムワイドな疾患感受性遺伝子のマッピングと単離には、上記 1) と 2) の行程で明らかのように、何万、何十万もの SNP、あるいはマイクロサテライトを、500 人~1000 人単位のサンプルについて、ハイスループットに多型解析しなければならないことから、高精度、多検体処理能力、短時間、簡便、低価格の多型のタイピング技術が要求される。これらの多型解析技術についても、高度な多型をしめす HLA-DNA タイピングでえられたノウハウを大いに生かすべきであろう。

このように、疾患感受性遺伝子の同定を中心とする「ゲノム多様性解析」は HLA 解析で培われた知見をいかにうまく取り込んでいくかが重要であり、したがって HLA フィールドで多年の経験をつんだ我々こそが、活躍しうる場であるともいえる。逆に、ハイスループット下に追求された「ゲノム多様性解析」で得られた多型解析に関する新しい知見や技術を、HLA 解析にもフィードバックさせることも重要であろう。

また、このようなアプローチは疾患のみならず、ヒトのあらゆる遺伝的素因をもつ表現型の遺伝子も、理論的には同定可能である。体型(身長、体重など)、老化、顔貌、視力、嗜好、性格、学習能力、記憶といったヒトらしさを規定している形質である。これらの形質の遺伝要因の同定はヒトの「ヒト」たる所以の分子的な解明のための基盤となりうる。したがって生物学的かつ文化的観点から「ヒトとは何か?」という人類が持つ根源的な問いに対する真剣な挑戦を意味する。この一般的なヒト「形質」に迫る試みは世界的にも独創かつ先端的であり、ゲノムサイエンスの成果としてこれからの生命科学が目指すべき方向を指向し、さらには社会的には「ヒト」の理解を目的としている他の多くの学術分野に貴重な情報をもたらし、21 世紀の社会の枠組みやライフスタイルを考える上で有用な概念を生み出すであろう。

T細胞の抗原認識：その基礎と臨床応用

西村 泰治

熊本大学大学院医学研究科 脳・免疫統合科学系免疫識別

この講演では免疫系による癌細胞の排除において、主役を担う T 細胞が認識する MHC (ヒトでは HLA) により提示される腫瘍特異的抗原ペプチドをどのようにして同定するのか、その方法と抗腫瘍ワクチンとしてより理想的なものを探索するための DNA マイクロアレイを応用した新しい戦略について紹介する。さらに遺伝子改変マウス胚性幹 (ES) 細胞から *in vitro* において機能をもつ樹状細胞 (DC) を分化誘導し、これ (ES-DC) を利用して *in vivo* における抗原特異的な強い免疫応答を誘導する方法について紹介する。これらの研究成果をヒトの抗腫瘍免疫療法に応用する夢について語りたい。

1. MHC 分子を介した腫瘍抗原の T 細胞への提示

MHC (ヒトでは HLA) 分子は形質膜上に発現する糖蛋白質であり、抗原が分解されて出来た非自己抗原ペプチドを結合して、これを T 細胞に見せて活性化する役割を担っている。MHC クラス I 分子 (MHC-I) は、すべての有核細胞において核あるいは細胞質蛋白がユビキチン/プロテアソーム系により分解されて出来たペプチドを結合して細胞表面に発現する。CD8 陽性キラー T 細胞 (CTL) は、MHC-I と共にウイルスあるいは腫瘍抗原ペプチドなどを発現する細胞を認識して傷害する。いっぽう抗原提示細胞のエンドソームに取り込まれた膜あるいは可溶性蛋白質は、カテプシンなどにより分解されてペプチドとなり MHC クラス II 分子 (MHC-II) に結合して細胞表面に発現する。MHC-II・非自己ペプチド複合体を認識した CD4 陽性ヘルパー T (Th) 細胞は、種々のサイトカインを産生して様々な免疫応答を誘導する。DC は MHC-I および MHC-II 経路により T 細胞に提示される抗原のプロセッシングと、以下に述べるナイーブ T 細胞への抗原提示能力に優れているため、生体内における主要な抗原提示細胞となっており、腫瘍免疫や感染免疫を誘導する細胞ワクチン療法に盛んに利用されている。たとえ非自己抗原が存在していても、MHC 分子の大多数は自己

蛋白に由来するペプチドを結合しているが、これを認識する T 細胞は存在しないか、存在しても免疫応答を示さない (免疫寛容の成立)。

腫瘍細胞は以下に詳細について述べるような腫瘍特異抗原を発現し、これを認識した T 細胞は腫瘍拒絶をもたらす免疫応答を開始する。多くの癌細胞は HLA クラス I 分子を発現するが HLA クラス II 分子を発現しないので、キラー T 細胞だけが直接癌細胞を認識できる。しかし、一度も抗原を認識したことがないナイーブ T 細胞が活性化されるためには、T 細胞の抗原受容体 (T cell receptor; TCR) が MHC・ペプチド複合体を認識すると共に、T 細胞上の CD28 分子が抗原提示細胞表面の CD80/86 などの副刺激 (co-stimulatory) 分子と結合する必要がある。しかし、腫瘍細胞は CD80/86 分子などを発現していないために、ナイーブ T 細胞を活性化して、腫瘍細胞を排除する能力をもつエフェクター T 細胞を誘導することはない。腫瘍細胞の一部はアポトーシスやネクロトーシスにより絶えず死滅しており、腫瘍特異抗原を含む破壊された細胞成分の一部は DC などの抗原提示細胞により取り込まれ、蛋白抗原が分解されてできたペプチドは HLA-II を介してヘルパー T 細胞のみならず、いわゆる交叉提示 (cross presentation) により HLA-I によりキラー T 細胞にも提示される。

DCは抗原との遭遇により成熟しCD80/86などの副刺激分子を細胞表面に高密度で発現するため、ナイーブT細胞を活性化してエフェクターT細胞にすることができる。いったん活性化されたエフェクターT細胞は、副刺激分子を発現しない腫瘍細胞のHLA・腫瘍抗原ペプチド複合体を認識して腫瘍拒絶に関わる免疫応答を示すことができる[図1]。腫瘍拒絶に関わるT細胞で最も重要なものは、CD8陽性キラーT細胞であるが、キラーT細胞が十分に増殖して活性化されるためには、CD4陽性ヘルパーT細胞の存在が重要である。ヘルパーT細胞は、抗原提示細胞をも活性化するため、適切な抗腫瘍免疫の誘導には両方のT細胞を活性化することが重要である。

2. 抗腫瘍免疫を誘導するHLA結合性腫瘍抗原ペプチドの同定方法と腫瘍抗原の性格

これまでに以下の方法などにより、ヒトの腫瘍抗原が同定されている。1) 腫瘍細胞に特異的に反応するモノクローナル抗体を作製して、その認識分子の抗原性を解析する。2) 発癌関連分子や癌細胞に発現が強いことが既知の分子の中から、抗原性をもち免疫応答を誘導するものを選び出す。3) 腫瘍細胞に特異的なポリクローナルT細胞あるいはT細胞クローン

を用いて、腫瘍細胞由来のcDNAライブラリーとT細胞への抗原提示に関わるHLA遺伝子を発現する細胞トランスフェクタントの中から、T細胞に免疫応答を誘導するものを選びだし、その細胞に発現する腫瘍抗原の遺伝子を同定する。4) 腫瘍細胞由来のcDNA発現ライブラリーの中から、癌患者の血清中のIgG抗体に反応する蛋白質をコードする遺伝子で発現の癌特異性が高い物を選別する(SEREX法)。

この10数年間の研究によりヒトの悪性黒色腫(メラノーマ)の抗原ペプチドがHLA-Iと共にキラーT細胞に認識され、メラノーマ細胞が破壊されることがわかった。これまでに同定されているヒト腫瘍抗原としては、1) 癌細胞と免疫学的に隔離され免疫系から攻撃されることがない精巣にのみ発現するcancer-testis (CT) 抗原, 2) 癌細胞と胎生期の組織にのみ発現し、正常な成人の体細胞には発現しない癌胎児性蛋白, 3) 癌細胞が発生したもとの組織に特異的に発現する抗原, 4) 癌細胞に特有の蛋白質の突然変異により生じたアミノ酸配列が変異したペプチド抗原, 5) 発癌と関連した癌遺伝子あるいは癌抑制遺伝子の産物, 6) 正常細胞と比較して、癌細胞で発現が増強している蛋白などに分類される[表1]。癌抗原をワクチンとして癌の免疫療法への応用を考える際

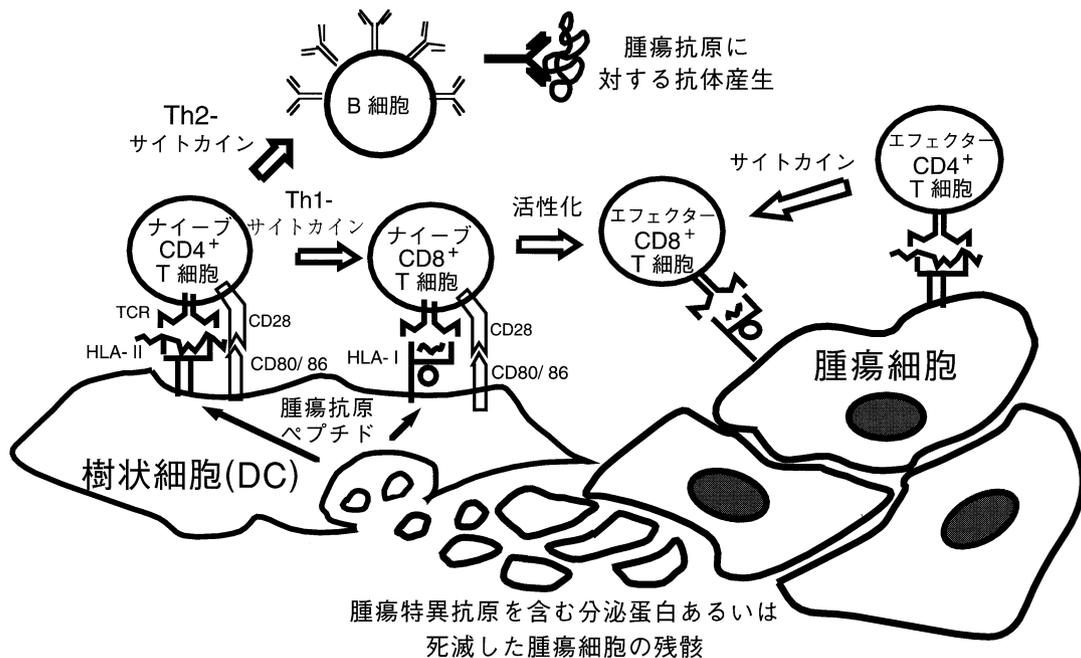


図1 HLA・腫瘍抗原ペプチド複合体を認識したT細胞による腫瘍細胞の排除

表1 T細胞によって認識されるヒトの腫瘍抗原

1) 組織特異的に発現する蛋白質 (分化抗原や癌胎児性抗原) チロシナーゼ, gp100, Melan-A/MART-1, TRP-1/2, CEA, PSA, PSMA (メラノーマ、大腸癌ほか)
2) 癌・精巣 (cancer-testis, CT) 抗原 MAGE-1/3, BAGE, GAGE-1/2, GnT-V, NY-ESO-1 (メラノーマ、食道癌ほか)
3) 癌細胞に過剰発現する蛋白質 HER-2/neu, SART-1, p15, Proteinase 3, WT1, hTERT, PRAME (乳癌、消化器癌ほか)
4) 発癌に関連した癌遺伝子、癌抑制遺伝子、融合遺伝子の産物 K-ras, p53, HER-2/nue, BCR-ABL, ETV6-AML1, DEK-CAN (消化器癌、白血病ほか)
5) 腫瘍特異的変異ペプチド (RNAスプライシングやORF異常を含む。) CDK4, MUM-1, β -catenin, CASP-8, CDC27, K-ras, p53, NY-CO-37/38, restin, M-CSF (消化器癌, ホジキン病, 腎癌ほか)
6) T/B細胞クローンに特異的に発現している抗原受容体蛋白 (イディオタイプ) Igイディオタイプ (B細胞性白血病/リンパ腫), TCRイディオタイプ (T細胞性白血病/リンパ腫)
7) 癌細胞に特異的な蛋白質のプロセッシングにより生じる抗原ペプチド MAGE-3 (AELVHFLLL/HLA-B40) (IFN- γ 処理後のメラノーマ細胞株)
8) 発癌関連ウイルス遺伝子の産物 HPV16-E7, EBV-EBNA-2/3/4/6, EBV-LMP2, HTLV1 Tat (子宮頸癌、リンパ腫ほか)

には、1) 多くの患者に利用できるかどうか、2) 自己の正常細胞を破壊せずに腫瘍細胞のみに破壊を誘導できるか、などを十分に考慮する必要がある。

3. DNAマイクロアレイによる遺伝子発現のプロファイリングを利用した腫瘍特異抗原の同定

近年、DNAマイクロアレイ解析が可能となり、組織・細胞における3万種類にもおよぶ多様な遺伝子のmRNAレベルでの発現を網羅的に検討することが可能となった。我々は東大医科研ヒトゲノム解析センターの中村祐輔教授との共同研究により、種々の癌組織と正常組織における発現遺伝子のプロファイリングに関する情報を入手し、癌組織に発現が限定して高発現しているCT抗原、癌胎児性抗原などを探索した。その結果、Glypican-3 (GPC-3) が肝細胞癌 (HCC) 特異的に高発現することを発見した。GPC3はHCC細胞株から分泌される性質があり、HCC患者の約40%の血清中にGPC3が検出されることが明らかとなった。いっぽう健康対照群、慢性肝炎、肝硬変や他の消化器系癌患者の血清中には検出されなかった。さらに、HCCを切除などにより除去した患者では、GPC3の血中濃度が著明に減少した。つまりGPC3は、 α フェト蛋白 (AFP) および

PIVKA-IIに続くHCCの第3の腫瘍マーカーとして利用できることが明らかとなった[図2]。HCC患者の中にはGPC3のみが陽性でAFPおよびPIVKA-IIは陰性の者が存在し、また比較的に早期のHCC患者がGPC3陽性を示す傾向があった。

HLA-A24結合ペプチドの構造モチーフをもつペプチドを10数種類合成し、これをHCC患者および健康人の末梢血単核細胞と培養することにより、ペプチド特異的なキラーT細胞を誘導することができた。このようにして誘導されたキラーT細胞は、*in vitro*においてHLA-A24とGPC-3を共に発現するHCC細胞を傷害したが、どちらか一方しか発現しないHCC細胞を傷害することはなかった[図3]。このようにGPC3はHCCの腫瘍マーカーとしてのみならず、抗腫瘍免疫応答を誘導することにより免疫療法にも応用できる可能性を秘めた抗原であり、現在その可能性を検討中である。

今後、腫瘍の免疫療法の基礎研究および臨床応用において解決すべき課題として以下の事項があげられる。1) より理想的な腫瘍抗原の性状の決定; ペプチド, 蛋白質, 腫瘍細胞丸ごとなど, 2) 免疫方法の選別; ワクチンの投与方法の選定, アジュバントの選別と開発, 樹状細胞の応用など, 3) 抗体療法の有

ELISA による HCC 患者 16/40 (40%) における血清 GPC3 蛋白の検出

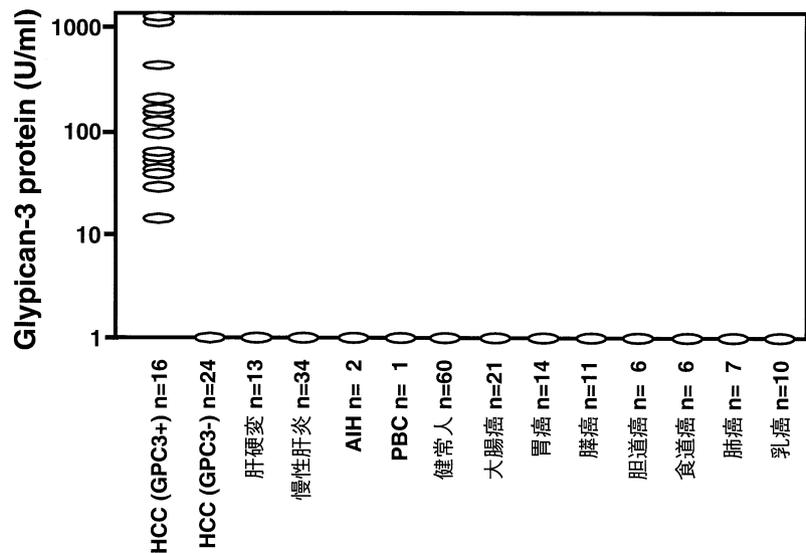


図 2 血清 GPC3 蛋白は肝細胞癌の腫瘍マーカーになりうる

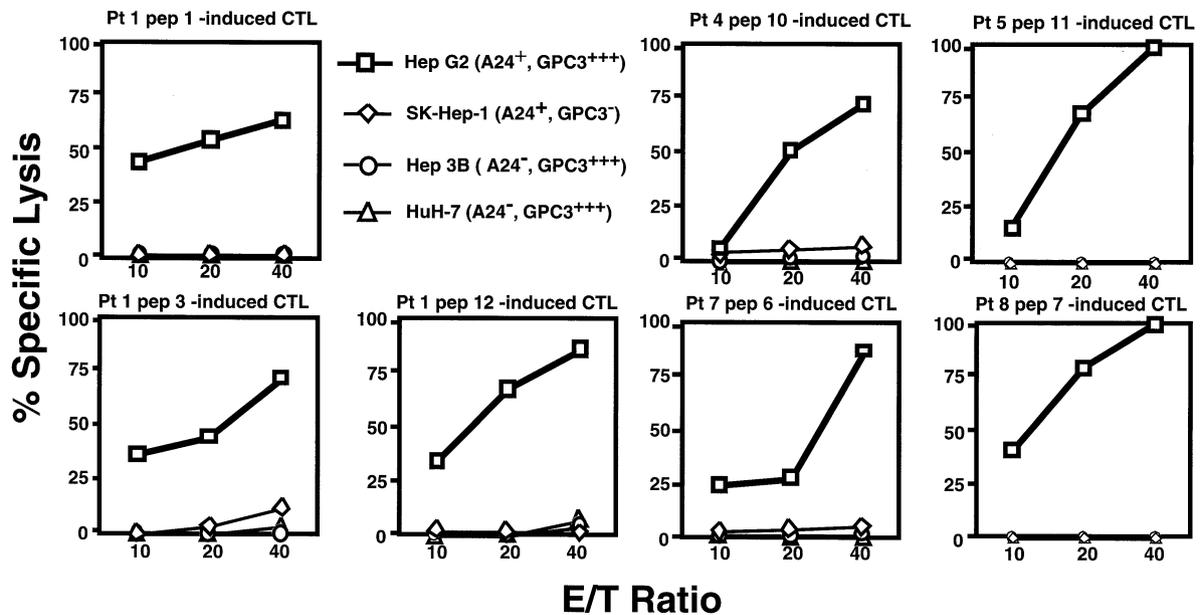


図 3 HLA-A24 結合モチーフを持つ GPC3 ペプチドで、末梢血単核細胞を刺激して誘導した多数の CTL 株が、HLA-A24 陽性で GPC3 を高発現する肝細胞癌細胞株 Hep G2 に対して特異的な細胞傷害活性を示した

効性の再認識, 4) 抗腫瘍免疫応答のモニタリングシステムの確立, 5) 腫瘍の免疫逃避機構の解明とその克服, 6) 我が国において遅れているトランスレーショナルリサーチの体制の確立

4. 遺伝子改変胚性幹 (ES) 細胞より分化誘導した樹状細胞を用いた免疫療法の開発

我々はマウスES細胞を OP9 (M-CSF 欠損マウス骨髄ストローマ細胞株) と GM-CSF を用いて, in vitro で DC (ES-DC) を分化誘導する方法を確立した[図 4]。このES-DCは、骨髄由来 DC に特有の

マーカー、貪食能、抗原提示能などを持ち、DCとしての機能を有することを確認した。さらに、ES細胞に任意の抗原遺伝子を電気穿孔法で導入してES-DCを分化誘導したところ、細胞はMHC-IおよびII上に当該導入抗原由来するペプチドを提示することが確認された。OVA遺伝子発現ES-DCをin vitroでマウス脾細胞由来のナイーブT細胞と培養することにより、OVA特異的キラーT細胞を誘導することができた。またOVA遺伝子発現ES-DCをマウスの腹腔内へ投与することにより、in vivoにおいてOVA特異的キラーT細胞を誘導することが可能であり、さらにOVAを発現するメラノーマ細胞のin vivoにおける増殖を抑制した。この効果はES-DCにケモカ

インの一つであるSLC遺伝子を同時に発現させることにより著明に増強した[図5]。生体内DCへの遺伝子導入には困難を伴うが、我々の手法を応用して、抗原および免疫制御・調節分子の遺伝子を安定に共発現させたES-DCを用いて新しい免疫調節細胞療法の開発が可能であると期待される。

5. マイクロアレイ解析で同定した腫瘍抗原と腫瘍抗原発現ES-DCを利用した腫瘍免疫療法への夢

今後の腫瘍免疫の研究に関する我々の夢を以下に語る。DNAマイクロアレイ解析データを用いて、さらなる新規癌特異抗原ならびにCTLエピトープの同定に努める一方で、ヘルパーT細胞(Th細胞)エ

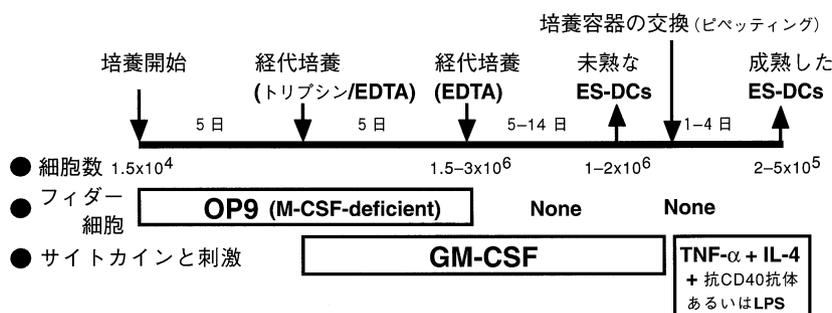


図4 in vitroにおけるマウスES細胞からの樹状細胞(DC)の分化誘導法

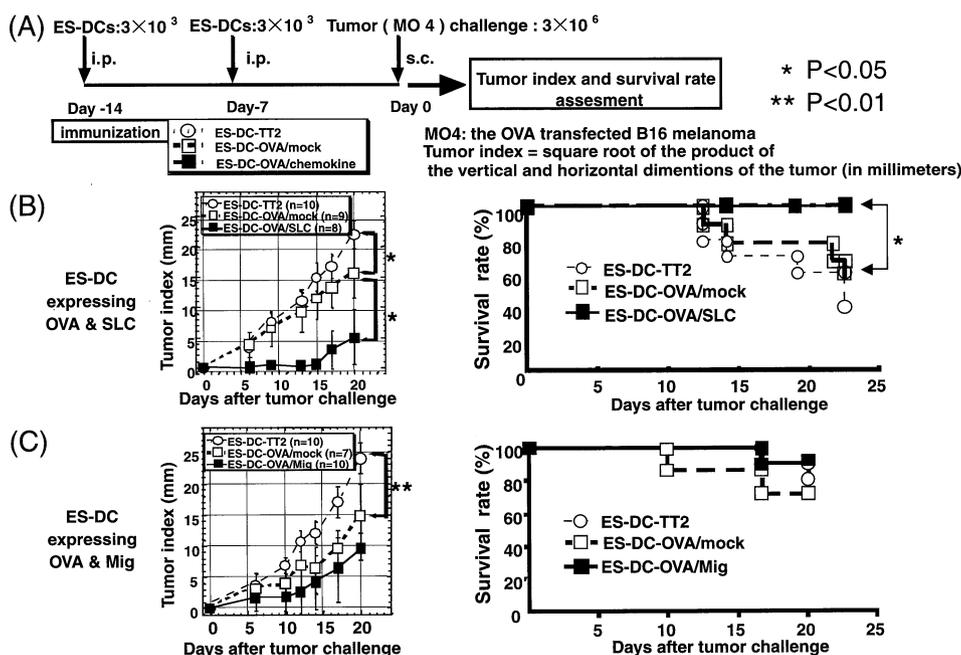


図5 OVAおよびケモカイン SLC 遺伝子を発現するES-DCのin vivo投与による、OVA発現メラノーマの増殖抑制

トープの同定も進める。また効率のよいエピトープ特異的なT細胞株およびクローンの樹立法を確立する。マウスを用いた *in vivo* 実験で、抗腫瘍効果および有害事象の有無の観察を行い、有効な治療法の確立を目指す。さらに遺伝子改変を加えたマウスES細胞より *in vitro* で誘導した樹状細胞などを利用して、*in vivo* 抗腫瘍免疫の効率よい誘導法を確立する。同時に、癌の免疫エスケープ機構の解明および解除の方法の開発についても着手する。以上の基礎データを積み重ねて、同定した腫瘍特異的抗原の抗腫瘍免疫療法への応用を目指す。[表2]に腫瘍の免疫療法に応用が可能な、理想的な腫瘍抗原が備えているべき性質について我々の考えをまとめておく。

表2 理想的な腫瘍拒絶抗原が備えているべき性質

- 癌患者の体内において免疫応答を誘導する抗原
癌細胞の拒絶にまでは至らないとしても、癌患者の血液中に抗原特異的な抗体やT細胞の存在が検出できるもの。
- 組織分布
癌細胞での発現は強いが、正常組織には、ほとんど発現しておらず、腫瘍抗原に対する免疫応答が重篤な自己免疫疾患を誘導しないもの。たとえば、胎生期組織および癌細胞にのみ発現する「癌胎児性抗原 (Oncofetal antigens)」や、癌細胞と免疫系から隔離された組織にのみ発現する「癌精巣抗原 (Cancer testis antigens)」など。
- 免疫系からの逃避が起こりにくい抗原
癌細胞の悪性形質転換、組織浸潤や転移に重要な役割を担っている抗原分子で、癌細胞がその発現を欠落すると、癌の悪性形質を失うもの。

〒860-0811 熊本市本荘 2-2-1

熊本大学大学院・医学研究科・免疫識別学

西村 泰治

Phone: 096-373-5310, Fax: 096-373-5314

E-mail: mxnishim@gpo.kumamoto-u.ac.jp

和文総説、英文原著論文および研究内容についての詳細は、下記 HP 参照

URL: <http://www.medic.kumamoto-u.ac.jp/dept/immunoge/immunoge.html>または熊本大学医学部 HP (<http://www.medic.kumamoto-u.ac.jp>) に掲載されている「大学院医学研究科の構成」を開き、当研究室のHPにアクセスください。

MHC の臨床応用：疾患の診断と治療は可能か？

木村 彰方

東京医科歯科大学 難治疾患研究所 成人疾患研究部門 分子病態

MHC (HLA) は抗原提示に関わる分子であり、その著明な多型性は提示可能な抗原ペプチドのレパートリーを決定する重要な要件となる。そのため HLA の多型は感染症、自己免疫疾患、悪性腫瘍における外来抗原あるいは自己抗原への免疫応答性を制御する一因となる。

以前より自己免疫疾患を中心とする原因不明の疾患で HLA 多型との相関が報告されていたが、我々を含めた最近の研究は、多くの疾患について、HLA 領域には疾患感受性遺伝子が複数存在し、それらの相互作用が疾患の病因あるいは病態形成に関わることを示唆する。現時点では、個々の疾患感受性遺伝

子の本態はまだ不明なものが多く、またそもそも多因子疾患では特定の遺伝子はリスクファクターとなるに過ぎないため、MHC ないし MHC 領域内の感受性遺伝子に関する知見に基づく疾患診断は困難である。しかしながら、多くの疾患では、特定のアリルを有することが疾患との関連を示している。従って、病巣の抗原提示細胞でその特定の HLA アリルを欠損させることが出来れば、疾患の治療がある程度まで可能となるかも知れない。

一方、腫瘍細胞の一部では HLA 領域の LOH 型変異が生じることが知られている。大腸癌を対象とした我々の研究は、ミスマッチ修復酵素が欠損した癌細胞では特に高率に LOH 型変異が生じていることを示す。また、LOH 型変異が特定のアリルに頻繁に起こる現象は知られていなかったが、最近の知見は、一部の白血病で特定の HLA-B アリルが欠損し

やすいことを示している。このような HLA の LOH 型変異は、その癌細胞が有する癌関連抗原を提示しないために生じるもの (LOH 型変異を持つ癌細胞の方が増殖に有利) と理解されるため、この LOH 変異は癌が癌である由縁とも言える。それでは、いかなる手法を用いれば癌に対抗できるのでしょうか？ 最も単純には癌細胞に欠損した HLA 遺伝子を導入することであるが、それとは別の戦略として、癌細胞特異的に $\beta 2$ ミクログロブリンを欠損させ、NK 細胞による癌細胞の排除を期待することが考えられる。

このように、いわゆる遺伝子補充療法とはまったく逆の発想をもって、対象とする細胞特異的に HLA 領域遺伝子の機能を欠損させることが、新たな疾患治療の道を拓くのではなかろうか？

MHCと人類遺伝—過去から現在,そして将来へ

徳永 勝士

東京大学 大学院医学系研究科 人類遺伝学分野

HLA 遺伝子群は機能を持つ遺伝子として最高度の多型を示すことから、人類集団の遺伝的関係を探る有用な標識になってきた。我々は国内外の共同研究者とともに、東アジア諸集団の類縁関係について解析し、形成過程を考察してきたので、その主な結果を報告したい。現代の東アジア諸集団は北のグループと南のグループに大別され、さらに北のグループは、大陸側のサブグループと島嶼側のサブグループ (日本列島の集団を含む) に分けられる。日本列島に住む人々のうち本土日本人は、韓国人、北部漢族や沖縄集団と近縁である。主として朝鮮半島経由で渡来した新石器時代人の影響を受けて弥生人が形成され、現代の本土日本人につながると推定される。沖縄集団は本土日本人と近縁であるとともに、アイヌ民族ともやや近縁である。縄文人の特徴をより多く

残しており、さらに南中国のいずれかの集団の影響を受けたと推定される。アイヌ民族に関しては、沖縄集団、ニブヒ族、本土日本人とやや近縁である。東アジアの大陸側諸集団と中南米先住民との中間的な位置にあることから、東アジア後期旧石器時代人、そして縄文人の特徴を多く残すと推定される。いずれにせよ、日本列島に住む人々の成立過程においては、近隣の多様な先祖集団が異なる時代にさまざまなルートを経て移住・拡散した後、混血あるいは重層化してきた。そして現在も均質化は完了していないと考えられる。

HLA 複合領域における疾患遺伝子の研究が、ヒトゲノム全域にわたる多因子疾患感受性遺伝子探索のフロントランナーであることは、他の演者によって紹介されると思う。これに関して指摘しておきたい

こととして、そもそも現代社会における common disease の多くは、人類史上最近まで、すなわち農耕・牧畜の発明による食糧革命以後の都市化・文明化の以前には、ほとんど見られなかった疾患だということである。人類が自ら作りだした環境・文化の変容が、これらの病気の引き金となっている。また、多くの common disease や生活習慣病は、成人になり、子供をもうけたのちに発病する。子孫に遺伝子が伝わるので遺伝学的には淘汰されない形質といえ

る。したがって、我々の子孫も我々と同じ common disease や生活習慣病の感受性遺伝子を背負ってゆくことになる。感受性遺伝子を多く持てば持つほど発病危険率は高まるが、これに環境要因が加わらなければ発病には至らない、すなわち予防可能性があることを強調しておきたい。これらの遺伝子とうまくおりあって生きる知恵を得ることの意義はとて大きい。

マイナー組織適合性抗原はマイナーリーガーか？

佐治 博夫

特定非営利活動法人 HLA 研究所

アロ免疫は輸血と移植におけるレシピエントの免疫学的反応として定義され、輸血では主として液性免疫の現象が、移植では拒絶という細胞性免疫が焦点となった。その後、造血幹細胞移植後や輸血後 GVHD が重要なアロ免疫現象として注目された。

アロ免疫の主要分子は？

アロ免疫を定義すれば、同種間の自他認識の output である。自他認識のマーカー分子は HLA 分子であるから、アロ免疫のイニシエーションは HLA が担う。HLA 多型性の桁外れに強いアロ免疫原性はこの本質に由来する。HLA 多型性に対する前駆 T 細胞クローンは他の抗原に比して桁外れに多いことが知られている。「他の抗原」は数万～数 10 万種あり、HLA 拘束性に免疫原性を表すので、細胞上の密度は $10^{\wedge}2 \sim 10^{\wedge}4$ 程度であり、免疫の発動へのマグニチュードは格段に低い。HLA が主要組織適合性抗原といわれる所以である。

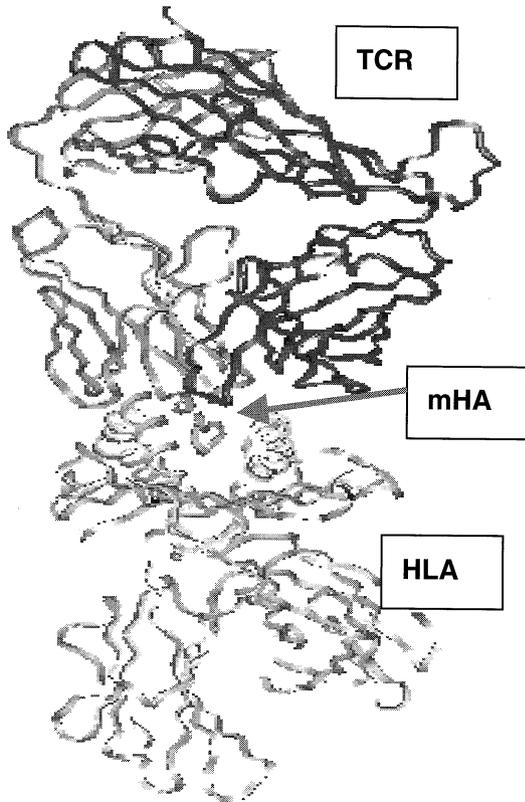
主要組織適合性抗原以外の「他の抗原」のうち、抗原ペプチドとして提示されアロ免疫反応を引き起こす多型性をマイナー組織適合性抗原 (mHA) と定義している。

メイジャーとマイナーどちらが強い？

Snell が皮膚移植実験から名づけた「マイナー」抗原という名称は、「主要」組織適合性抗原 (HLA) に対する言葉であるが、その語感から、重要性が低いような印象を与える。造血幹細胞移植の臨床においても mHA はマイナー・リーグの適合抗原であろうか？ 造血幹細胞移植症例の蓄積と骨髄バンクによる非血縁間移植のデータ解析は、HLA 適合性が最大の予後要因であることを明らかにし、そして移植後 GVHD 発症に影響するマグニチュードは mHA が必ずしも「マイナー・リーグ」でないことを示した。すなわち、HLA 不適合が GVHD 発症に与える影響力を 1 とすると、mHA はその 1.5～2 倍のマグニチュードを持つことがわかってきた。組織適合性において MHC と mHA は J-1 対 J-2 リーグの関係ではなく、J-1 とアジアリーグの関係に近い。

血縁における mHA 不適合性

mHA 不適合は mHA(-) アリル型 homozygote 対 mHA (+) アリル型 homozygote および heterozygote の組合せのときに起る。その不適合確率は計算でき



る。図1に示すように非血縁間では血縁間の約2倍不適合確率がある(積分値;面積を比較)。

造血幹細胞移植におけるGVHD頻度

ドナー種別, HLA 適合別に急性GVHD頻度を見ると表1の如くである(日本造血幹細胞移植学会データベースより)これを図示すると図2のグラフのよう

になる。

マイナー抗原不適合がGVHD発症に与えるマグニチュードはメイジャーとよばれるHLAに勝るとも劣らないことが分かる。

マイナー組織適合性抗原の臨床的定義

臨床的に定義されるmHAは, HLA一致同胞間(HLA identical sibling)の造血幹細胞移植において生じるGVHD(graft versus host disease)の原因となる不適合抗原である。GVHDはドナーのCTL(cytotoxic T cells)がレシピエントのアロ抗原を認識して, それを表現する細胞を傷害する現象と定義できる。一方, GVL/T(Graft versus Leukemia/Tumor, 抗白血病/抗腫瘍効果)は明らかな症状を伴わないので回顧的に定義する現象であるが, 後述するようにGVLの主たるターゲット分子もまたmHAである。

「抗原」とはいえ, mHAは古典的な蛋白や脂質や糖鎖抗原ではなく, CTLのターゲットとなるペプチド抗原である。ペプチド抗原は核で蛋白が産生された後, 細胞質内で処理され細胞内器官である粗面小胞体内でHLAクラスI分子にはめ込まれる。よって, mHAは蛋白や脂質や糖鎖として細胞表面や細胞外へエピトープを曝す必要はない。細胞内微小器官の構成分子や細胞内に限局する酵素, 蛋白のシグナル・ペプチド, ミトコンドリアDNAの産物なども

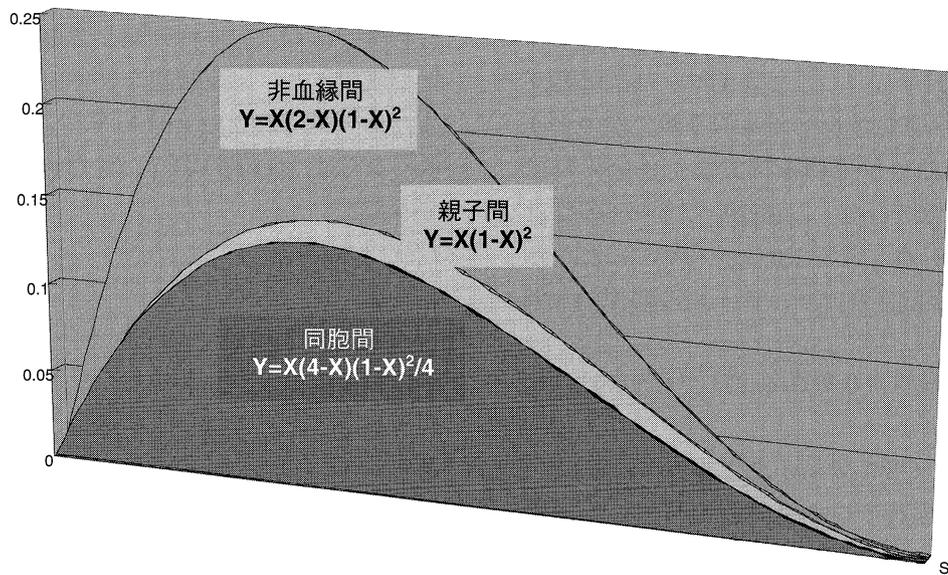


図1 マイナー組織適合性抗原の不適合確率

表1 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	< I
同胞	同胞一致	2.8		4.9	13.9	21.6 75.5
同胞	同胞不適合	5.9	9	16.3	31.2	65.1
非血縁	非血縁適合	7.1	8.4	22.4	37.9	60.7
非血縁	非血縁不適合	12.3	12.9	21.3	46.5	50.8
非同胞	非同胞血縁適合	3.8	7.7	16.9	28.4	70
非同胞	非同胞血縁不適合	6.8	10.5	23.7	41	56

mHA の候補になり得る。HLA 分子はその抗原ペプチド受容部位に高度の多様性があり、HLA 抗原(アリル)型毎に受容できる抗原ペプチド特異性(モチーフ)を持っている。これを抗原ペプチド提示の HLA 拘束性とよんでいる。すなわち、HLA 多型性ごとに提示される mHA が規定されている。

T 細胞の活性化はある閾値以上のシグナルが TCR (T cell receptor) を介して得られるとき誘導される。アロ免疫反応が開始されるためには、抗原ペプチド/HLA クラスI複合体が、細胞上に十分な密度で提示されることが条件になる。誘導された抗-mHA-T 細胞は mHA が高度に表現される細胞・組織を標的として特異的に傷害する。すなわち、mHA は HLA とは異なり組織特異性を特徴とする。

GVL の主たる標的分子は何か？

ドナー CTL の標的分子は白血病特異抗原であろうか、それとも mHA か？ つまり GVL は抗腫瘍反応か、あるいはアロ免疫反応であろうか。次のような傍証から、標的分子は腫瘍抗原または変異自己(altered self) 抗原ではなく、mHA であり GVL はアロ免疫反応であると考えている (GVL における NK の関与を無視できないが、テーマの関係から省略する)。

1. 同系 SCT (一卵性双生児間 SCT) では GVL は起りにくい。
2. GVHD 症例に GVL 効果が強く認められる。
3. 白血病動物に同種の白血病細胞を移植し、同種 CTL を移入すると、CTL に対してアロの白血病細胞のみが排除される。

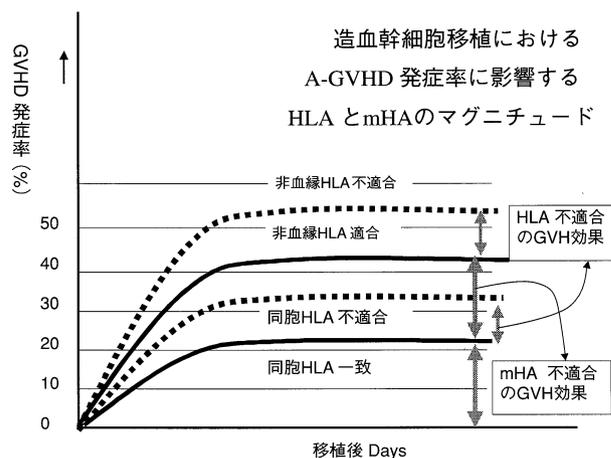


図2

すなわち、CTL の標的分子が immuno-dominant mHA であり、それが白血病細胞に表現されているとき、ほぼ確実に GVL 効果が得られる。組織臓器への特異的発現は HLA クラス I になく、mHA にある特徴である。白血病細胞を含む血液細胞に高い密度で表現され、上皮細胞など他組織に低密度で発現または表現されない mHA をターゲットに CTL が働くならば、GVHD のない理想的な GVL 効果が期待できる。

結論

造血幹細胞移植におけるマイナー組織適合性抗原の役割は次の2点において、決してマイナー・リーグ・プレイヤーではなく、メイジャー・リーガーである。

1. その不適合性は移植後 GVHD の主たる原因になっている。
2. アロ免疫療法としての GVL/T 効果はその不適合

性が主因である。

付 記

臓器移植におけるマイナー組織適合性抗原の影響は未だ明らかではない。しかし、生体腎移植や血縁間部分肝移植の拒絶エピソードは、屍体腎および屍体肝移植に比して低頻度であることは、移植医の経験から確かなように思われる。図3に示すアメリカ UNOS の「生体腎移植対屍体腎移植の5年生存率の

Kaplan-Meier 図」は、視点を変えれば「マイナー組織適合性抗原の影響」と評価することも可能である。すなわち、生体腎移植とは「血縁間移植」(夫婦間移植というまれな例外があるとはいえ)であり、屍体腎移植は「非血縁間腎移植」であり、血縁間のマイナー組織適合性抗原不適合確率は非血縁間の約半分であることの影響と見ることが出来るからである。今後の検討の引き金としてコンセプトを述べるにとどめる。

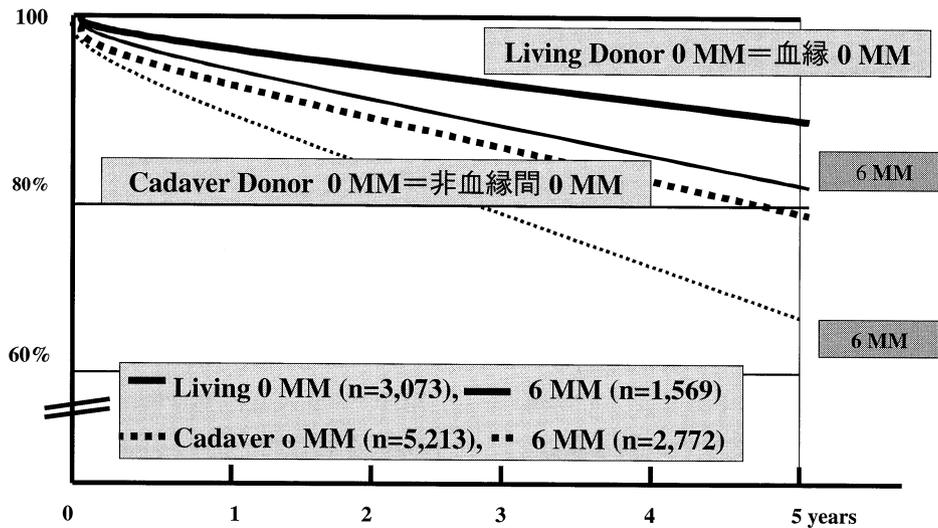


図3 腎移植におけるHLA適合効果=マイナー組織適合性抗原適合効果？
UNOS, USA, 1999

同種移植および異種移植免疫寛容の誘導戦略における MHC の重要性

山田 和彦

国立循環器病センター研究所 再生医療部

ドナーからの移植臓器をレシピエント自身の自己のものとして認識させる免疫寛容(トレランス)の誘導は、移植医療の目標の1つである。シクロスポリン(CyA)が登場して以来移植臓器生着率は著しく向上したが、(1)免疫抑制剤の継続的な投与の必要性、

(2)それに伴う副作用(成長障害、悪性腫瘍など)と医療コスト、(3)慢性拒絶反応は、いまだ解決すべき大きな問題である。本講演では、おもに“MHC(主要組織適合性抗原)と同種移植免疫寛容”についてミニブタを用いた前臨床実験の結果から解説する。

CyA が免疫抑制剤として使用されて以来、臨床において、ドナーとレシピエント間の MHC 適合度の臓器生着率に及ぼす要素としての重要性は薄れつつある。しかし、“強力な維持免疫療法で MHC のバリアーをこえて非特異的に免疫抑制をかけている”現在の免疫抑制療法から MHC とトレランスの誘導を論じ得ない。強力な免疫抑制の継続投与は免疫反応を非特異的に抑える反面、過度な免疫抑制はトレランス誘導に不可欠なドナー特異的免疫応答を妨げることが考えられるからである。

以上のことから、“トレランスの誘導における MHC の重要性”を研究の場で解析することはトレランスの臨床誘導に大きな意義を持つ。これまでに MHC が確立し、genetic manipulation が比較的容易で、かつ廉価であるマウスまたはラットが移植実験に多く用いられてきた。それらを用いた実験結果として、MHC の相違によるトレランス誘導の難易性の違いも報告されている。しかし、これまでのマウス、ラットの実験からトレランスの誘導が可能とされたレジメンを用いて大動物でのトレランスの誘導を試みても、その成功は限られたものに過ぎない。この理由としては、小動物と大動物の飼育環境また、抗原提示細胞などの免疫反応の違いが考えられる。抗原提示細胞に関しては、血管内皮細胞の MHC クラス II 抗原発現の相違が上げられる。血管内皮細胞は、レシピエントの免疫担当細胞特に T 細胞が移植臓器に最初に遭遇する場である。この血管内皮細胞に、マウスでは活性化されていない状態 (resting な状態) では抗原提示を担当する MHC クラス II が発現していない。一方、ヒト、ブタでは resting な状態でも MHC クラス II は発現している。このような免疫学的相違点から、臨床でのトレランス導入を目的とした研究を行うには MHC の確立した大動物を用いた実験が大変重要な役割を担う。

現在、MHC が確立していくつかのハプロタイプの組み合わせをもつ大動物は、ハーバード大学マサチューセッツ総合病院 (MGH) の Sachs 教授が開発した MGH Miniature Swine が代表的である。MGH Miniature Swine が正式名称であるが、Sachs 教授は 1991 年まで NIH に在籍していたため日本では NIH ミニブタとして知られている。演者は、1993 年から

2002 年まで Sachs 教授のもとに在籍し、後半の 5 年は Senior Investigator であり、今回の講演ではその MGH Miniature Swine を用いたトレランス誘導実験結果を軸として話を進める。MGH Miniature Swine は、これまで 20 年にわたり改良が加えられ、現在、図 1 に示す 3 種の Homozygo (SLA^{aa}, SLA^{cc}, SLA^{dd}) と 5 種の Intra SLA recombinant (SLA^{ff}, SLA^{gg}, SLA^{hh}, SLA^{jj}, SLA^{kk}), そして最近さらに SLA^{ll} が開発された。MGH Miniature Swine を用いることで、表 1 に示すような臨床での移植の組み合わせをシュミレートすることが可能である。また、この MHC 確立した背景のもとで移植トレランス誘導実験を行うことで、これまでにドナー・レシピエント間の MHC の相違とトレランス誘導の関係が確認されている。

図 2 は、この MGH Miniature Swine を用いた短期間高濃度 (10mg/kg/day 12 日間経静脈投与) CyA を用いた腎移植トレランス誘導実験の結果を示している。(図 a) は、MHC クラス I 不適合間、b は、MHC クラス II 不適合間、c は、One haplotype full MHC 不適合間、d は、Two haplotype full MHC 不適合間移植の移植腎生着率を示す。実線は 12 日間 CyA 投与群、破線は免疫抑制剤非投与群である。CyA 非投与群では MHC の不適合度に関わらず、MHC 不適合間であれば移植腎は全例 3 週間以内に拒絶された。しかし、CyA 投与群では、MHC の不適合度の違いにより移植腎の生着率に明らかな相違を認めた。MHC クラス I 不適合間 (図 a) では、CyA 12 日間投与により移植腎は全例生着しトレランスが誘導された。しかし、ドナー・レシピエント間に MHC クラス II 不適合が存在すると 1/3 の症例で移植腎は拒絶され (図 b, c), MHC 完全不適合間 (図 d) では移植腎は全例拒絶された。この結果は、“MHC 不適合が増すことでトレランスの誘導が困難になる”ことを示している。また、CyA 誘導性末梢トレランスにおいては、“ドナー・レシピエント間で少なくとも一つの MHC 抗原の sharing が必要である”ことが示唆される。この MHC 抗原の sharing が必要性は、これまでに小動物を用いた実験において Lambらによって報告されている。

本講演では、以上のほかに中枢性トレランスに重

要な働きを示す胸腺に焦点を当て、MGH Miniature Swine を用いた胸腺移植による MHC 完全不適合間

移植トレランスの誘導実験結果を示すとともに、ミニブタを用いたブタ・ヒヒ間異種移植を紹介する。

表 1 MHC からみた臨床臓器移植モデルとしての miniature swine 移植モデルの妥当性

Miniature swine MHC disparities	Clinical situation
SLA match (SLA ^{dd} →SLA ^{dd})	HLA siblings
One haplotype mismatch (SLA ^{ac} →SLA ^{ad})	Parent to offspring
Full two haplotype mismatch (SLA ^{cc} →SLA ^{dd})	Cadaveric or unmatched living donors
One haplotype class I mismatch/class II match (SLA ^{ag} →SLA ^{ad})	Not generally available clinically, but useful for dissecting the mechanism of tolerance and/or tolerance
Two haplotype class I mismatch/class II match (SLA ^{gg} →SLA ^{dd})	
Others :	
One haplotype class II mismatch	
Two haplotype class II mismatch	

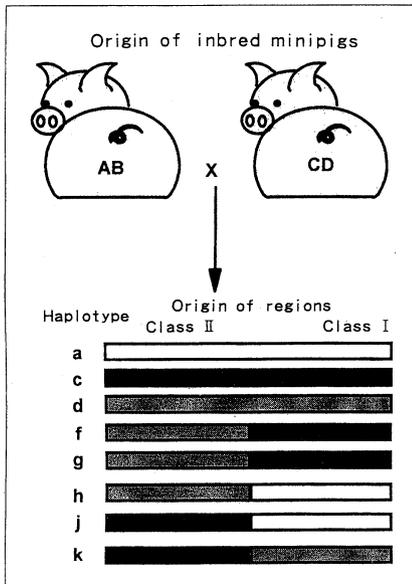


図 1 Miniature swine の主要組織適合性抗原(MHC)の表現型

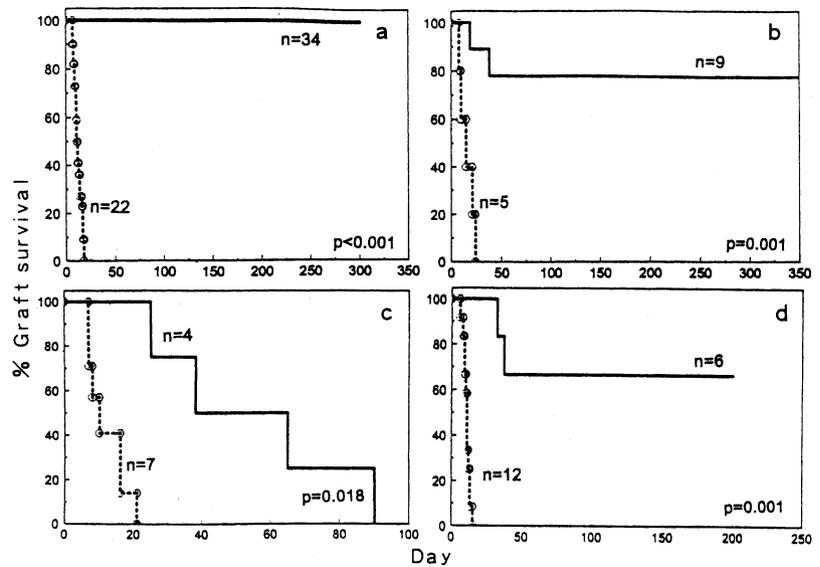


図 2 ドナー・レシピエント MHC の適合と miniature swine 同種移植腎生着率 ——— CYA 投与群. ……: 無投与群

a : two haplotype class I 不適合/class II 適合同種腎移植. b : two haplotype class II 不適合/class I 適合同種腎移植. c : two haplotype full MHC 不適合同種腎移植. d : one haplotype full MHC 不適合同種腎移植 (Pierre R Gianello et al. : Human Immunology 50 : 1-10, 1996. より引用)