

MHC

日本組織適合性学会誌

Major Histocompatibility Complex

Vol. 10 No. 1, 2003

Contents

日本組織適合性学会からのお知らせ	
第 12 回日本組織適合性学会大会のご案内	1
第 7 回アジア・オセアニア組織適合性学会のご案内	5
組織適合性技術者認定制度委員会・部会名簿	9
[原著論文]	
日常検査において見出された HLA-A,B,DRB1 の新対立遺伝子 (A*0259, A*020107, B*5609, B*5131, B*5205, DRB1*1444, DRB1*1445) について 清水まり恵, 柏瀬貢一, 田中秀則, 植木純一, 峯元睦子, 市原孝浩, 菅原直子, 栗田裕子, 中島文明, 中村淳子, 内野郁代, 津久井和夫, 佐竹正博, 中村榮一	11
PCR-Luminex 法を用いた, HLA-A, HLA-B および HLA-DRB1 遺伝子の日本 人対応 4 桁 DNA タイピング方法の検討 吉川枝里, 宮原詞子, 成瀬妙子, 島田和典, 東 史啓, 原 啓高, 猪子英俊	21
[総説]	
Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) 遺伝子領域の構造, ハプロタイプ 及び多型に関する解析 千田昇平, Daniel E. Geraghty	33
地方会(第 20 回近畿 HLA 研究会)抄録	45
〈日本組織適合性学会誌 MHC 投稿規定〉	63
新編集委員長挨拶	65

日本組織適合性学会誌 MHC 編集委員会

編集委員長

徳永 勝士 東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野

編集委員

間 陽子 理化学研究所分子ウイルス学研究ユニット
猪子 英俊 東海大学医学部分子生命科学系遺伝情報部門
大谷 文雄 北里大学医学部免疫学講座
木村 彰方 東京医科歯科大学難治疾患研究所成人疾患部門
小林 賢 防衛医科大学検査部
中島 文明 神奈川県赤十字血液センター検査部
成瀬 妙子 東海大学医学部分子生命科学系遺伝情報部門

編集協力者

石川 善英 東京都赤十字血液センター技術部
石谷 昭子 奈良県立医科大学法医学教室
今西 規 産業技術研究所生物情報解析研究センター
太田 正穂 信州大学医学部法医学教室
小河原 悟 福岡大学病院第4内科
柏瀬 貢一 東京都赤十字血液センター検査部
斎藤 敏 長野県赤十字血液センター検査課
佐治 博夫 HLA 研究所
佐田 正晴 国立循環器病センター研究所再生医療部移植外科
高原 史郎 大阪大学医学部泌尿器科学講座
滝口 雅文 熊本大学エイズ学研究センターウイルス制御分野
西村 泰治 熊本大学大学院医学研究科免疫識別学教室
能勢 義介 兵庫県赤十字血液センター検査課
平山 謙二 長崎大学熱帯医学研究所環境医学部門
福西 孝信 兵庫県立西宮病院腎移植センター
前田 平生 埼玉医科大学総合医療センター輸血細胞治療部
丸屋 悦子 HLA 研究所
森島 泰雄 愛知県がんセンター血液化学療法部
脇坂 明美 日本赤十字社血漿分画センター

組織適合性検査技術者認定制度
認定 HLA 検査技術者講習会のお知らせ

組織適合性検査技術者認定制度委員会
委員長 佐田 正晴
組織適合性検査技術者認定制度委員会教育部会
部会長 西村 泰治

日 時：平成 15 年 9 月 15 日 (月曜日) 16 時から 18 時 (予定)
場 所：軽井沢プリンスホテル西館
参加費：2,000 円程度を予定 (テキスト代を含む)

内 容

HLA 分子の構造と機能	西村泰治 (熊本大学)
HLA 遺伝子のタイピング法	石川善英 (東京都赤十字血液センター)
HLA の疾患感受性解析への応用	安波道郎 (東京医科歯科大学)

(参加希望者の皆様方には事前に、講習会の内容について資料を配布する予定です。)

この講習会は、平成 15・16 年度に HLA 検査技術者認定を取得しようとする者を対象に実施されますが、それ以外の者であっても自由に参加することができます。ただし、平成 15 年度の特例 HLA 検査技術者認定を取得しようとする者で、平成 14 年度に講習を修了している方には、受講義務はありません。

平成 15 年度の取得予定者以外にあっては、以下の申込書に必要事項を記入し、認定制度委員会事務局宛に FAX (0463-94-8884) で平成 15 年 6 月 28 日(金)までに送付してください。あるいは、Eメールで件名を「認定講習会」とし、申込書の必要事項を書き込んで「tnaruse@is.icc.u-tokai.ac.jp」宛に、上記締め切り日までに送信してください。テキストは、申込数に応じて作成し、申込者に優先して配布します。そのため当日の申し込み者については、テキストの配布を受けられない場合がありますことを、あらかじめご了承ください。

平成 15 年度認定 HLA 検査技術者講習会 受講申込書

氏 名：

所 属：

住 所：〒

電 話 番 号：

FAX 番 号：

E メール：

HLA 検査技術者認定取得予定 なし あり →平成 年度を予定

● Contents ●

日本組織適合性学会誌 第10巻第1号 平成15年5月31日発行

日本組織適合性学会からのお知らせ

第12回日本組織適合性学会大会のご案内	1
第7回アジア・オセアニア組織適合性学会のご案内	5
組織適合性技術者認定制度委員会・部会名簿	9

[原著論文]

日常検査において見出された HLA-A,B,DRB1 の新対立遺伝子 (A*0259, A*020107, B*5609, B*5131, B*5205, DRB1*1444, DRB1*1445) について 清水まり恵, 柏瀬貢一, 田中秀則, 植木純一, 峯元睦子, 市原孝浩, 菅原直子, 栗田裕子, 中島文明, 中村淳子, 内野郁代, 津久井和夫, 佐竹正博, 中村榮一	11
PCR-Luminex 法を用いた, HLA-A, HLA-B および HLA-DRB1 遺伝子の日本人対応 4 桁 DNA タイピング方法の検討 吉川枝里, 宮原詞子, 成瀬妙子, 島田和典, 東 史啓, 原 啓高, 猪子英俊	21

[総説]

Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) 遺伝子領域の構造, ハプロタイプ及び多型に関する解析 千田昇平, Daniel E. Geraghty	33
地方会(第20回近畿 HLA 研究会)抄録	45
〈日本組織適合性学会誌 MHC 投稿規定〉	63
新編集委員長挨拶	65

第12回日本組織適合性学会大会の御案内

第12回日本組織適合性学会大会
大会長 猪子 英俊

初夏の候、皆様には益々御清祥のことと御慶び申し上げます。

この度、第12回日本組織適合性学会大会を下記の要領で開催致します。特に今大会は、第7回アジア・オセアニア組織適合性会議との併催となっております。会員の皆様の多数の御参加をお待ち致しております。

会 期：2003年9月15日(月)～9月17日(水)

会 場：軽井沢プリンスホテル西館
長野県北佐久郡軽井沢町軽井沢
TEL: 0267-42-1111
FAX: 0267-42-7139

主なプログラム

1日目(9月15日)

- ◆クオリティーコントロールワークショップ (QCWS)
- ◆認定 HLA 検査技術者講習会

2日目(9月16日)

- ◆オープニングセレモニー
- ◆シンポジウム

「ゲノム多様性を考える」

座長：猪子英俊(東海大学)

演者：SNP 中村祐輔(東京大学医科学研究所)
比較ゲノム 榎 佳之(東京大学医科学研究所)
HLA 木村彰方(東京医科歯科大学・難治疾患研究所)
移植 赤塚美樹(愛知県がんセンター研究所)
再生工学 岡野栄之(慶應義塾大学)

「HLA タイピングの標準化」

座長：佐治博夫(HLA 研究所)

演者：田中秀則(東京都赤十字血液センター)
齋藤克行(One Lambda, USA)
小林 賢(防衛医科大学校)
島田和典(ゲノムサイエンス研究所)
川井信太郎(湧永製薬)
木村彰方(東京医科歯科大学・難治疾患研究所)

- ◆一般演題
- ◆懇親会

3 日目 (9 月 17 日)

◆第 7 回アジア・オセアニア組織適合性会議の御案内の項をご参照願います。

一般演題募集要項

1. 発表形式

発表形式は口演(日本語)とポスター(英語)により行います。演者は本学会員であることが必要です。

2. 申し込み方法

1) 抄録形式

- ・抄録は、日本語、または英語ワードプロセッサのテキストファイルを用いて、和文、または英文にて作成願います。演題名、演者、所属、本文の順に記載し、発表者には○印を付けてください。また、和文抄録の場合には、演題名の下に英語タイトルを付記してください。
- ・本文は 800 字以内とし、目的、方法、結果、考察等に分類して記載願います。英数字は半角文字を使用し、2 文字で 1 字とします。

2) 演題申し込み票ファイルの作成

- ・抄録とは異なるファイルにて作成願います。希望する発表形式(口演、またはポスター)を第一行目に記載の上、改行後に演題名、演者、所属と、代表者の連絡先住所、電話番号、FAX、e-mail アドレスを記載してください。

3) e-mail による申し込み

- ・演題受付は、原則として e-mail により行います。件名は ENDAI として、1) 抄録、2) 演題申し込みファイルの 2 つのファイルを、添付書類にて第 12 回大会事務局アドレスにお送りください。
- ・e-mail による申し込みが困難な場合は、郵送によっても受け付けます。その場合は、ファイルを 3.5 インチフロッピーディスクに保存し、プリントアウトした書類 1 セットを簡易書留にて大会事務局までお送り下さい。

3. 演題申し込み締め切り

演題はすでに締め切りました。

4. 演題受領通知および採択通知

演題受付後 7 日以内に、e-mail または FAX にて演題受領の通知を致します。演題発表の形式および日時につきましては、2003 年 7 月下旬頃迄に、e-mail または FAX にて通知を致します。

参加登録費について

本大会は、第 7 回アジア・オセアニア組織適合性会議 (7th AOH) との併催のため、大会参加の事前登録を行います。第 12 回大会 (JSJI) と 7th AOH の両方に登録の方には割引料金が適用されますので是非御利用下さい。

事前登録参加費は下記の銀行口座に振り込みをお願いします。参加証(領収書兼用)は、当日学会受け付けにてお渡し致します。なお、お振り込みの際にはお名前のあとに会員番号を必ず御記入願います。

〈振込先〉

みずほ銀行 厚木支店

普通 8055561

7th AOH 登録 木村彰方

※JSJI のみ参加の場合も、上記の口座にお振込をお願い致します。

※7th AOH の参加登録は、オンラインにより行っております。詳細は、別送の 7th AOH セカンドアナウンスメントを御参照頂き、ウェブサイト (<http://www.congre.co.jp/7thaoh/>) よりアクセスしてください。

参加費

	JSHI	AOH	JSHI + AOH
Early (by 5/31)	¥12,000	¥30,000	¥35,000
On Site (after 6/1)	¥15,000	¥35,000	¥45,000
Student (by 5/31)	¥12,000	¥20,000	¥30,000
Student (after 6/1)	¥15,000	¥25,000	¥38,000
Accompanying Person		¥10,000	¥15,000

懇親会

2003年9月16日(火)19:00 ごろより懇親会を開催致します。参加費 ¥3,000 は、当日受付にて申し受けます。

宿泊・交通の御案内

本大会に御参加の皆様には、第7回アジア・オセアニア組織適合性会議のための学会割引宿泊、交通プランを御利用頂けます。本誌前号、または7th AOH セカンドアナウンスメントを御参照の上、お早めにお申し込みください。

TFB 学術奨励賞(仮称)の募集

昨年の本学会において決定致しました通り、2003年度より、TFB 学術奨励賞(仮称)として、若手学会員への助成が開始されます。今大会においては、以下の要領で助成金の授与を行いますので奮って御応募下さい。

1. 助成内容

今大会、および第7回アジア・オセアニア組織適合性会議に応募された一般演題抄録の中から、優秀と認められた演題の筆頭演者に授与されます。授与件数は数件で、1件につき10万円程度の助成金授与を予定しております。

2. 応募資格

助成金応募にあたっては、以下の条件のすべてを満たしていることが必要です。

- 1) 本年9月15日時点で満45才未満、かつ2002年度までの会費を納入済であること
- 2) 応募しようとする演題の内容において、筆頭演者が中心的な役割を果たしていること
- 3) 共同演者を含めた演者全員が、本学会の会員であること(賛助会員は除く)
- 4) 応募しようとする演題の内容が、本学会にふさわしく、かつ未発表であること

3. 応募方法

以下の書類一式を簡易書留にて、大会事務局まで郵送願います。

必要書類

- 1) 抄録 30部

一般演題に応募した抄録を A4 用紙にプリントアウトしたもの(コピー可)

2) 申し込み用紙

A4 用紙に、演題名、演者(全員)、所属(全員)と、応募者(筆頭演者)の連絡先住所、電話番号、FAX、e-mail アドレス、生年月日、年齢を記入したもの

3) 返信用定型封筒 1 通 (80 円切手を貼付のこと)

4. 応募締め切り

応募はすでに締め切りました。

5. 審査および採択通知について

応募された演題については、MHC 編集委員および編集協力者が審査を行い、結果は7月中旬頃までに郵送にて通知致します。

6. 助成金の使途

特に制限はありません。

7. 受賞者口演について

助成金受賞者は、第 12 回日本組織適合性学会大会において、受賞口演のセッションにおいて発表を行って頂きます。

大会事務局

本大会に関するお問い合わせ、一般演題、TFB 学術奨励賞(仮称)の応募は、下記の大会事務局にお願い致します。

〒259-1193 神奈川県伊勢原市望星台
東海大学医学部 分子生命科学系 2 遺伝情報部門内
第 12 回日本組織適合性学会大会事務局
TEL: 0463-93-1121 内線 2312 FAX: 0463-94-8884
E-mail: tnaruse@is.icc.u-tokai.ac.jp

第7回アジア・オセアニア組織適合性会議の御案内

第7回アジア・オセアニア組織適合性会議
会長 猪子 英俊

早春の候、皆様には益々御清祥のことと御慶び申し上げます。

この度、第7回アジア・オセアニア組織適合性会議会長の任をお引き受けすることとなり、鋭意準備をすすめております。

本会議は、アジア・オセアニアはもとより、広く世界各国の組織適合性、およびヒトゲノム多様性に関する研究成果を発表し、情報交換を行うことを目的に、第12回日本組織適合性学会との併催により、長野県軽井沢にて開催する運びとなりました。

本国際会議によって、アジア・オセアニア地域におけるヒト HLA 遺伝子をはじめとするヒトゲノム多様性研究のレベルも向上するものと期待されます。9月の軽井沢に広がる青い空のもと、盛り沢山の企画を御用意致しまして、多数の皆様の御参加をお待ち致しております。

会 期: 2003年9月15日(月)～9月17日(水) 第12回日本組織適合性学会大会
2003年9月17日(水)～9月19日(金) 第7回アジア・オセアニア組織適合性会議

会 場: 軽井沢プリンスホテル西館
長野県北佐久郡軽井沢町軽井沢
TEL: 0267-42-1111
FAX: 0267-42-7139

7th AOH の主なプログラム

1日目(9月16日)

- ◆レジストレーション
- ◆ポスター展示
- ◆第12回日本組織適合性学会大会

2日目(9月17日)

- ◆特別講演
演者: Paul I Terasaki (Terasaki Foundation, USA)
- ◆スポンサードシンポジウム (株)ノバルティスファーマ
“Histocompatibility and Immunology”
座長: 吉村了勇(京都府立医科大学)
木村彰方(東京医科歯科大学・難治疾患研究所)

1. HLA と移植

- 1) 臓器移植—HLA バリアをこえられるか
 - ① 免疫抑制方法と長期成績
演者: Gerhard Opelz (University of Heidelberg, Germany)
 - ② ABO 不適合移植

演者：高橋公太(新潟大学)

2) 細胞移植—HLA と GVHD コントロール

HLA と造血幹細胞移植の現状 US と日本

演者：John A Hansen (Fred Hutchinson Cancer Research Center, USA)

森島泰雄(愛知県がんセンター)

2. HLA と自己免疫疾患

1) 再生不良性貧血

演者：中尾眞二(金沢大学)

2) ベーチェット病

演者：大野重昭(北海道大学)

◆ワークショップ

“HLA haplotype diversity”

演者：Stephan Beck (The Sanger Centre, UK)

木村彰方(東京医科歯科大学・難治疾患研究所)

椎名 隆(東海大学)

徳永勝士(東京大学)

◆ウエルカムレセプション

3 日目 (9 月 18 日)

◆シンポジウム

“Genome Diversity”

演者：John Trowsdale (Cambridge University, USA)

Seiamak Bahram (Centre de Recherche d’Immunologie et d’Hematologie, France)

Dan Geraghty (Fred Hutchinson Cancer Research Center, USA)

Stephan Beck (The Sanger Centre, UK)

Bo Dupont (Sloan-Kettering Cancer Center, USA)

◆ベストアブストラクト賞受賞者講演

◆一般口演

◆バンケット

4 日目 (9 月 19 日)

◆シンポジウム

“Immune Response”

演者：Frans Claas (Immunohematology & Blood Transf Bldg, The Netherlands)

西村泰治(熊本大学)

笹月健彦(国際医療センター)

滝口雅文(熊本大学エイズ学研究センター)

Eric Thorsby (The National Hospital, Norway)

◆シンポジウム

“MHC evolution”

演者：Henry Erlich (Roche Molecular Systems, USA)

Masatoshi Nei (Pennsylvania State University, USA)

Peter Parham (Stanford University, USA)

高畑尚之 (総合研究大学大学院)

◆ポスターディスカッション

◆一般口演

参加登録受け付け

参加登録は、オンラインによる受付をおこなっております。7th AOH ホームページ (<http://www.congre.co.jp/7thaoh/>) より、登録専用サイトへアクセスしてください。

参加登録費について

本大会は、第7回アジア・オセアニア組織適合性会議 (7th AOH)、第12回日本組織適合性学会大会 (JSHI) の併催のため、両方に登録の方には割引き料金が適用されます。

参加費一覧

	JSHI	AOH	JSHI + AOH
Early (by 5/31)	¥12,000	¥30,000	¥35,000
On Site (after 6/1)	¥15,000	¥35,000	¥45,000
Student (by 5/31)	¥12,000	¥20,000	¥30,000
Student (after 6/1)	¥15,000	¥25,000	¥38,000
Accompanying Person		¥10,000	¥15,000

オンライン登録後、事前登録参加費は下記の銀行口座に振り込みをお願いします。参加証は、当日学会受け付けにてお渡し致します。なお、JSHI 会員の方は、お振り込みの際にはお名前のあとに会員番号を必ず御記入願います。

※ JSHI のみ参加の場合も、上記の口座にお振込をお願い致します。

〈振込先〉

みずほ銀行 厚木支店

普通 8055561

7th AOH 登録 木村彰方 (7th AOH トウロク キムラアキノリ)

Abstract 募集要項

1. 発表形式

発表形式は口演とポスター(英語)により行います。

2. 申し込み方法

オンラインによる受付を行っております。7th AOH ホームページ (<http://www.congre.co.jp/7thaoh/>) より、Abstract submission サイトへアクセスしてください。

3. 演題申し込み締め切り

演題はすでに締め切りました。

4. 演題受領通知および採択通知

オンラインによる演題受領通知後、演題発表の形式および日時につきましては、2003年7月下旬頃迄に、e-mail または FAX にて通知を致します。

宿泊・交通の御案内

御参加の皆様には、第7回アジア・オセアニア組織適合性会議のための学会割引宿泊、交通プランを御利用頂けます。7th AOH ホームページ (<http://www.congre.co.jp/7thao/>) より、オンラインにてお申し込み頂くか、組織適合性学会誌「MHC Vol. 9, No. 3」の日本語版御案内を御参照の上、お早めにお申し込みください。

連絡先・お問い合わせ

事務局 第7回アジア・オセアニア組織適合性会議運営委員会

〒259-1193 神奈川県伊勢原市望星台

東海大学医学部分子生命科学系

担当者：成瀬 妙子

TEL: 0463-93-1121 (内線 2312) FAX: 0463-94-8884

E-mail: Aoh7th@m.med.u-tokai.ac.jp

組織適合性技術者認定制度委員会・部会名簿

組織適合性技術者認定制度委員会

委員長：佐田 正晴

副委員長：小林 賢

委員：赤座 達也，猪子 英俊，大谷 文雄，木村 彰方，佐治 博夫，中島 文明，成瀬 妙子，
西村 泰治，徳永 勝士

資格審査部会

部会長：赤座 達也

部員：石川 善英，柏瀬 貢一，小林 賢，田中 秀則

教育部会

部会長：西村 泰治

部員：太田 正穂，小河原 悟，木村 彰方，小林 賢，酒巻 建夫，佐治 博夫，佐田 正晴，
中島 文明，成瀬 妙子，徳永 勝士，丸屋 悦子

試験問題検討部会

部会長：徳永 勝士

部員：石川 善英，石谷 昭子，太田 正穂，小河原 悟，柏瀬 貢一，木村 彰方，小林 賢，
中島 文明，西村 泰治，平山 謙二，丸屋 悦子

QC ワークショップ部会

部会長：木村 彰方

部員：太田 正穂，柏瀬 貢一，小林 賢，酒巻 建夫，田中 秀則，佐田 正晴，中島 文明，
成瀬 妙子，丸屋 悦子，安波 道郎

● 原著論文 ●

日常検査において見出された HLA-A, B, DRB1 の 新対立遺伝子 (A*0259, A*020107, B*5609, B*5131, B*5205, DRB1*1444, DRB1*1445) について

清水 まり恵¹⁾, 柏瀬 貢一¹⁾, 田中 秀則¹⁾, 植木 純一¹⁾, 峯元 陸子¹⁾, 市原 孝浩¹⁾,
菅原 直子¹⁾, 栗田 裕子¹⁾, 中島 文明²⁾, 中村 淳子²⁾, 内野 郁代³⁾, 津久井 和夫¹⁾,
佐竹 正博¹⁾, 中村 榮一¹⁾

-
- 1) 東京都赤十字血液センター
2) 神奈川県赤十字血液センター
3) 静岡県赤十字血液センター

(平成 15 年 3 月 14 日受付)

要約: 我々は日常, HLA-A, B, C 検査に血清学的検査法と DNA タイピング法を, HLA-DRB1 検査に DNA タイピング法をそれぞれ実施している。DNA タイピング法としては PCR-microtiter plate hybridization (PCR-MPH) 法と PCR-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) 法を通常用いている。これらのタイピングで, HLA 抗原型または HLA アリルが確定できなかった場合に, sequencing based typing (SBT) 法により HLA アリルの確認を行なっている。SBT 法で新対立遺伝子を含むヘテロ接合体が検出された場合は, 新対立遺伝子を含む一方の染色体の遺伝子領域を増幅し, その塩基配列の決定を行なった。それらのアリルのうち, 7 種類が WHO HLA 命名委員会によりそれぞれ公認, 命名された (A*0259, A*020107, B*5609, B*5131, B*5205, DRB1*1444, DRB1*1445)。A*0259 は, A*020101 と比較して第 2 エクソンに位置する塩基 125 の G が A に置換することにより, コドン 18 の Gly が Ser に変異していた。また, このアリルはハプロタイプとして, A*0259-B*350101-DRB1*120101 を形成していると推測された。A*020107 は, A*020101 と比較して第 2 エクソンの塩基 123 が C から T に一塩基の置換が認められたが同義置換であった。このアリルのハプロタイプとしては, A*020107-B*4002-DRB1*140501 が推測された。B*5609 は, 血清学的検査より検出され, B*5502 または B*5601 などの第 2 エクソンと B*350101 などの第 3 エクソンの間の遺伝子変換によって形成されたものと考えられた。B*5131 は, 血清学的検査にて外国人(人種不明)より見出され, B*5116 と比較して第 3 エクソンの塩基 527 の A が T に置換することにより, コドン 152 の Glu が Val に変異していた。B*5205 は, B*5201 と比較して第 2 エクソンの塩基 134 の G が C に置換することにより, コドン 21 の Arg が Pro に変異していた。この B*5205 アリルにコードされた B5201V2 抗

筆者連絡先 〒150-0012 東京都渋谷区広尾 4-1-31
東京都赤十字血液センター検査部
清水 まり恵

電話 03-5485-6009
F A X 03-3406-7892
E-mail ma-shimizu@tokyo.bc.jrc.or.jp

原は、一種類の B51 + B5102 + B59 抗血清と弱い反応を示したが、他の B51 や B52 の特異性を含む抗血清とは反応しなかった。DRB1*1444 は、DRB1*140501 と比較して、塩基 344 と 345 の TG が GT に置換することによりコドン 86 の Val が Gly に変異していた。DRB1*1445 も同様に、DRB1*140501 と比較して、塩基 286 の C が A に置換することによりコドン 67 の Leu が Ile に変異していた。

キーワード: HLA タイピング, 新対立遺伝子, SBT 法

はじめに

非血縁者間の骨髄移植において、HLA の対立遺伝子(アリル)レベルでの適合が移植成績に影響を与えることが報告されている (1), (2)。移植成績を向上させるためには、HLA アリルを正確にタイピングすることは重要である。

我々は日常検査の HLA タイピングとして、HLA-A, B, C 検査に血清学的検査法と DNA タイピング法を、HLA-DRB1 検査に DNA タイピング法をそれぞれ用いて行なっている。血清学的検査には通常の lymphocyte cytotoxicity test (LCT) 法を、DNA タイピング法としては PCR- microtiter plate hybridization (PCR- MPH) 法 (3), (4) と PCR- single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) 法 (5) を用いている。これらのタイピングにおいて、既知の HLA 抗原型または HLA アリルと異なる場合に、sequencing based typing (SBT) 法により HLA アリルの確認を行なっている。さらに、この方法で新対立遺伝子を含むヘテロ接合体が検出された場合は、*cis/trans* の関係などの詳細な塩基配列の解析を行なった。今回我々は、新対立遺伝子を含む一方の染色体について、HLA-A および HLA-B では第 2 および第 3 エクソンの全領域を、HLA-DRB1 では第 2 エクソンの全領域を増幅し、新対立遺伝子の塩基配列の決定を行なった。その結果、7 種類のアリルが 2002 年に The WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System (WHO HLA 命名委員会) より、それぞれ公認、命名された (A*0259, A*020107, B*5609, B*5131, B*5205, DRB1*1444, DRB1*1445)。これらのアリルについて、アミノ酸の変異の有無や、既知のアリルとの相同性を比較し、可能であればハプロタイプの推定を行なった。

材料および方法

材 料

1999 年 8 月から 2001 年 10 月までに、HLA-A, B, C および HLA-DRB1 の HLA タイピングを実施し、その中から見出された 7 種類の新対立遺伝子について解析を行なった。

方 法

血清学的検査法

HLA-A, B, C 抗原のタイピングは、HLA タイピング用全国共通トレイ(日赤)を使用し、LCT (lymphocyte cytotoxicity test) 法で行なった。リンパ球の分離は、フィコール・コンレイ比重法または免疫磁気ビーズ法を用いて行なった。

DNA 検査法

DNA 抽出

末梢血リンパ球から、DNA 抽出キット (QIAamp DNA Blood Kit, QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。また、すでに血清学的検査を行なったサンプルからは、使用した残りの細胞をプロテイナーゼ K および Tween20 で処理して DNA を抽出した (6)。

HLA-A および HLA-B の DNA タイピング

HLA-A および HLA-B の DNA タイピングには PCR-MPH (湧永製薬) 法と PCR-SSCP 法を併用した。まず、PCR-MPH 法をキットの添付文書に従って行なった。次に PCR-MPH 法に使用した増幅産物から第 2 および第 3 エクソンのそれぞれを増幅して PCR-SSCP 法を行なった (7)。PCR-SSCP 法の PCR 反応は、増幅試薬 [80 mM Tris-HCl (pH9.0), 2 mM MgCl₂, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 2.5 mM dNTP, 2 mM センスプライマー, 2 mM アンチセンスプライマー,

2.5 単位 Taq DNA ポリメラーゼ(タカラバイオ)] に, PCR-MPH 法に使用した増幅産物に加え, GeneAmp™ PCR System 9600 (アプライドバイオシステムズジャパン)を用いて, 96°C 3分を 1 サイクル, 95°C 30 秒-62°C 1 分-72°C 30 秒を 15 サイクル行なった。PCR-SSCP 法は, 標準 DNA とともに以下の条件で泳動し, その泳動パターンを比較した。HLA-A2 グループは, 10% ポリアクリルアミドゲル(アクリルアミド: ビスアクリルアミド=49:1, グリセロールは含まない)を使用し, 第 2 エクソンは 30°C, 第 3 エクソンは 22°C でそれぞれ 120 分間の泳動を行い, 銀染色(銀染色試薬「第一」, 第一化学薬品)によりバンドの検出を行った。

HLA-DRB1 の DNA タイピング

HLA-A および HLA-B のタイピングと同様に, PCR-MPH 法と PCR-SSCP 法を併用した。PCR-SSCP 法は, 10% ポリアクリルアミドゲル(アクリルアミド: ビスアクリルアミド=49:1, グリセロールは含まない)を用いて, 22°C で 80 分間の電気泳動を行い, 泳動パターンを比較した。

SBT 法

HLA-A および HLA-B は, SBT キット (HLA-A and HLA-B Sequencing-Based Typing Kits, アプライドバイオシステムズジャパン) を使用して, PCR 反応およびサイクルシーケンス反応を行った。さらに, その産物をエタノール沈殿法により精製し,

キャピラリーシーケンサー (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, アプライドバイオシステムズジャパン) で電気泳動を行った。解析は, 判定ソフト (MatchMaker™ Allele Identification Software, アプライドバイオシステムズジャパン) を使用した。一方, HLA-DRB1 は PCR-MPH 法の増幅産物から, その増幅用プライマーを使用してサイクルシーケンス反応 (ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, アプライドバイオシステムズジャパン) を行った。その後, HLA-A および HLA-B と同様に, エタノール沈殿法により精製後, 電気泳動を行い, 塩基配列を解析した。

新対立遺伝子の特異的な増幅と塩基配列の解析

新対立遺伝子を含むヘテロ接合体のサンプルから, 新対立遺伝子の特異的に増幅するためのプライマーを設計し(表 1), 塩基配列の解析を行なった。PCR 反応液は, 増幅試薬 [80 mM Tris-HCl (pH9.0), 2 mM MgCl₂, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 2.5 mM dNTP, 2 mM センスプライマー, 2 mM アンチセンスプライマー, 2.5 単位 Taq DNA ポリメラーゼ(タカラバイオ)] に, ゲノム DNA (200-500 ng) を加えた。PCR 反応は, GeneAmp™ PCR System 9600 (アプライドバイオシステムズジャパン) を用いて, 96°C 3分を 1 サイクル, 95°C 30 秒-62°C 1 分-72°C 30 秒を 30 サイクル行なった。HLA-A および HLA-B についてのサイクルシーケンス反応は, 新対立遺伝子を含む第 2 および第 3 エクソン領域の増幅産物を

表 1 新対立遺伝子の特異的な増幅に使用したプライマー

Specific amplification	Primer name	Sequence (5' to 3')	Specificity	Position
A*0259, A*020107	5Aint1-S	CSGCCTCTGYGGGAGAAGCAA	A	intron 1
	AE4-621G	GAGTCATATGCGTTTTGGGGGC	A	exon 4
B*5609, B*5131, B*5205	5Bint-TA	GGCGGGGCGCAGGACCTGA	B	intron 1
	3Bint3+1	GAGGCCATCCCCGCGACCTAT	B	intron 3
DRB1*1444, DRB1*1445	GH46-1	CCGGATCCTTCGTGTCCCCACAG	DR	intron 1
	CRX37	GAATTCCCGCGCCGCGCT	DR	intron 2

用いて、SBTキット (HLA-A and HLA-B Sequencing-Based Typing Kits, アプライドバイオシステムズジャパン) の一部 (Six Ready Reaction Sequencing Mixes, アプライドバイオシステムズジャパン) を使用して行った。一方、HLA-DRB1 のサイクルシーケンス反応については増幅に用いたプライマーを使用した。その後、その産物をエタノール沈殿法により精製し、電気泳動を行った。塩基配列の解析は、判定ソフト (MT Navigator™, アプライドバイオシステムズジャパン) を使用した。さらに、得られた塩基配列は日本 DNA データバンク (国立遺伝学研究所) に登録した後、WHO HLA 命名委員会に申請した。

結果

日常検査の HLA タイピングから、7 種類の新対立遺伝子が見出された。新対立遺伝子を含む一方の染色体の遺伝子領域を増幅するために設計したプライマーを用いて、新対立遺伝子の塩基配列を決定した。その結果、WHO HLA 命名委員会より、新しいアレル名がそれぞれ公認、命名された (A*0259, A*020107, B*5609, B*5131, B*5205, DRB1*1444,

DRB1*1445)。

新たに見出された 7 種類のアレルについて、塩基配列の置換部位、アミノ酸変異の有無と部位および日本 DNA データバンクに登録した際のアクセッション番号を表 2 に、また各サンプルの HLA アレルを表 3 に示した。

考察

新対立遺伝子の特異的増幅と塩基配列の解析

通常に使用されている HLA-A と HLA-B 用の SBT キットは、ローカス特異的に増幅する。したがって、両鎖の塩基配列が同時に得られるため、新対立遺伝子を解析する際に *cis/trans* の関係が明確にならないという欠点がある。そこで今回、我々は新対立遺伝子を含む一方の染色体の遺伝子領域を増幅することが可能なプライマーを設計し、クローニング操作なしに、その新対立遺伝子の塩基配列を決定した。また、HLA-DRB1 アレルを増幅するプライマーは、通常、第 2 エクソン内に設定されているため、第 2 エクソンすべてを増幅することができない。そこで、新たに第 2 エクソンの外側にプライマーを設計し、塩基配列を決定した。

表 2 WHO HLA 命名委員会より命名された新対立遺伝子

HLA allele	Previous equivalent	Substituted nucleotide	Substituted amino acid	Accession number
A*0259	A*02011V4	125G>A	Gly18Ser	AB086836 AB086837 AB086838
A*020107	A*02011V6	123C>T	17Arg Synonymaous	AB087507 AB087508 AB087509
B*5609	B55V2	Exon2=B*5502 Exon3=B*3501		AB087513 AB087514
B*5131	B5116V1	527A>T	Glu152Val	AB087515 AB087516
B*5205	B5201V2	134G>C	Arg21Pro	AB087517 AB087518
DRB1*1444	DRB1*1405V1	344T>G, 345G>T	Val86Gly	AB087875
DRB1*1445	DRB1*1405V2	286C>A	Leu67Ile	AB087876

表3 各サンプルのHLA アリル

HLA allele	Previous equivalent	A locus	B locus	C locus	DRB1
A*0259	A*02011V4	0259, 24020101	070201, 350101	n.t.	080302, 120101
		0259, 310102	15010101, 350101	n.t.	040501, 120101
A*020107	A*02011V6	020107, 24020101	070201, 4002	n.t.	010101, 140501
B*5609	B55V2	020101, 0206	5502, 5609	1, 9	150101, 0406
B*5131	B5116V1	0103, 680102	5131, 5702	4, 6	1503, 090102
B*5205	B5201V2	24020101	4002, 5205	10	150101, 150201
DRB1*1444	DRB1*1405V1	24020101, 2601	15010101, 5401	n.t.	1444, 0406
DRB1*1445	DRB1*1405V2	2603, 310102	4002, 510101	n.t.	040101, 1445

HLA C locusについては、B*5609、B*5131、B*5205のみ血清学的検査の結果を記載した

A*0259 アリルの1例目とA*020107 アリルを含むサンプルは、もう一方のアリルがともにA*24020101であったため、A2グループのみが増幅される特異的プライマーAE4-621Gと、Aローカス特異的プライマー5Aint1-Sを使用し、A*02アリルのみを増幅した。また、B*5609、B*5131およびB*5205 アリルのサンプルは、もう一方のアリルがそれぞれB*5502、B*5702およびB*4002とのヘテロ接合体であったため、目的のアリルのみが増幅される特異的プライマー5Bint-TA (8)と、Bローカス特異的プライマー3Bint3+1を組み合わせ使用した。DRB1*1444とDRB1*1445アリルの特異的な増幅には、Scharf (9)らが報告したプライマーの一部を変更したGH46-1とDR2、DR7およびDR9以外のDRB1すべてのアリルが増幅するとされているCRX37 (10)を使用した。今回の解析において、DRB1*1444とDRB1*1445アリルのサンプルのもう一方のアリルであるDRB1*040101とDRB1*0406は増幅しなかったことから、これらのプライマーが認識する塩基配列に、今までに報告されていない変異が存在している可能性があると思われた。

A*0259 (A*02011V4)

PCR-MPH法ではA*020101 (A*0201/09/+)と判定されたが、PCR-SSCP法では、第2エクソンでA*020101と異なるバンドが検出された。

A*0259は、第2エクソンに位置する塩基125の

GがAに置換することにより、コドン18のGlyがSerに変異していたが、それ以外の第2エクソンにおける塩基配列は、A*020101と同じであった。この塩基置換は、既知のHLAアリルにみられないユニークな変化であった。A*0259を含むヘテロ接合体のサンプルは、これまでに2例検出され、その共通のHLAアリルから推定すると、A*0259はハプロタイプとして、A*0259-B*350101-DRB1*120101を形成していると思われた。

A*020107 (A*02011V6)

A*020107は、PCR-MPH法でA*020101 (A*0201/09/+)と判定されたが、PCR-SSCP法では第2エクソンでA*020101と異なるバンドが検出された。

A*020107はA*020101と比較して、第2エクソンの塩基123がCからTへの一塩基の置換が認められたが同義置換であった。このサンプルのHLAアリルから、一つのハプロタイプは、日本人において特徴的なハプロタイプA*24020101-B*070201-DRB1*010101 (11)と推定されるので、A*020107のハプロタイプは、A*020107-B*4002-DRB1*140501と考えられる。また、日本人においてA2-B61-DR14またはA2-B61-DRB1*1405のハプロタイプは、約0.5%の頻度で存在している(12)ことから、A*020107がこれらのハプロタイプに由来する可能性は高いと思われた。

B*5609 (B55V2)

B55V2 は、血清学的検査において一部の B56 + B22N の特異性を持った抗血清に反応を示さなかった(表4)。

B55V2 をコードしている B*5609 の塩基配列は、第2エクソンは B*5502 または B*5601 などと同じ配列で、第3エクソンは B*350101 などと同じ配列であった(図1)。また、このサンプルの B 遺伝子座は B*5502 と B*5609 で、C 抗原は Cw1 と Cw9 であった。日本人で、B*5502 は Cw1 (Cw*0102) と、B*350101 は Cw9 (Cw*0303) と強い連鎖不平衡を示す(11)ことから、このサンプルにおいて、B*5502 は Cw1 と、B*5609 は Cw9 とそれぞれ連鎖しているものと思われた。このことから、B*5609 は B ローカスの B*5502 または B*5601 などの第2エクソン部分と、B*350101 などの第3エクソン部分と C ローカスの Cw9 のハプロタイプが、B ローカスの第2エクソンと第3エクソンの間の遺伝子変換によって形成されたものと考えられた。

B*5131 (B5116V1)

B5116V1 は外国人(人種不明)により見出され、血清学的検査において、B51 と思われたが、モノク

ローナル抗血清 (01M023: 特異性 B51 + B14 + B8 + B18 + B78 + B75 + B70w) に反応を示さなかった(表5)。

B5116V1 をコードしている B*5131 の塩基配列は、B*510101 と比較して第3エクソンに位置する三塩基に違いが認められた。最も相同性が高い B*5116 と比較すると、第3エクソンに位置する塩基 527 の A が T に置換することによりコドン 152 の Glu が Val に変異していた。B*5116 にコードされる抗原は、血清学的に低頻度な B51 バリエーションとして報告されている(13)。

B*5205 (B5201V2)

B5201V2 は血清学的検査において、B51 + B5102 + B59 抗血清のみに弱い反応を示した(表5)。

B5201V2 をコードしている B*5205 の塩基配列は、第2エクソンに位置する塩基 134 の G が C に置換することによりコドン 21 の Arg が Pro に変異していたが、それ以外の第2エクソンにおける塩基配列は B*5201 と同じであった。この塩基置換は既知の HLA アリルにみられないユニークな置換であった。B*5205 にコードされる B5201V2 抗原と B*5201 にコードされる B52 抗原のアミノ酸配列の違いは一つ

表4 B55V2 (B*5609) の血清学的な反応結果

Antisera No.	B55V2 (B*5609)	Specificity
55706	+	B56+B22N
531137	-	B56+B22N (W)

+ : positive - : nagative

表5 B5116V1 (B*5131) の血清学的な反応結果

Antisera No.	B5116V1 (B*5131)	Specificity
7096031	W	B51+B5102+B52
01M023	-	B51
78N765	+	B51+B5102
44888	-	B35+B5102+B60+B48
44819	-	B35+B5102
01M021	+	B35+B51+B5102+B52+B37

+ : positive W : weak positive - : nagative

Codon	Exon2							Exon3							
	45	47	50	67	69	70	71	74	94	95	97	105	114	116	163
B*5609	GAG	CCG	CCG	TAC	GCC	CAG	GCA	GAC	ATC	ATC	AGG	CCC	GAC	TCC	CTG
B*5502	---	---	---	---	---	---	---	---	-CT	TGG	-C-	--G	A--	-TA	AC-
B*5601	---	---	---	---	---	---	---	---	-CT	TGG	-C-	--G	A--	-TA	---
B*350101	AC-	--C	--AG	-T-	A--	A-C	A--	T--	---	---	---	---	---	---	---

図1

B*5609 と B*5502, B*5601, B*350101 の塩基配列の(第2および第3エクソン)比較
第2および第3エクソンの多型のあるコドンを示した

□: 第2エクソンの B*5502 と同一のコドン

□□: 第3エクソンの B*350101 と同一のコドン

であったが、B5201V2 抗原は血清学的に B52 抗原特有の反応を示さなかった。さらに、B*5205 の塩基配列から推測して、その抗原は Bw4 のエピトープをもつが、Bw4 の抗血清に反応を示さなかった。そのため、フローサイトメトリーや等電点電気泳動法などによるリンパ球膜表面の発現量を詳細に解析する必要があったと思われる。

DRB1*1444 (DRB1*1405V1)

HLA-DR3/11/13/14 の PCR-MPH 法において、DRB1*1444 はプローブ 4, 9 と 11 に陽性反応を示した(表 7)。その発色パターンは、DRB1*140501 の発色パターン(プローブ 4, 9 と 12 に陽性反応を示す)に近いが、既知のアリルに対応する判定パターンに一致するものがなかった。PCR-SSCP 法で、DRB1*140501 と泳動パターンの比較を行なったが、それと異なるバンドが検出された。

DRB1*1444 は、DRB1*140501 と比較して、塩

基 344 と 345 の TG が GT に置換することにより、コドン 86 の Val が Gly に変異していた。PCR-MPH 法のプローブ DRB8601 (プローブ 11) が陽性反応を示すのは、コドン 86 の配列が GGT の場合で、DRB8603J (プローブ 12) は、GTG の場合である。したがって、DRB1*140501 はコドン 86 の塩基が GTG のためプローブ 11 が陰性反応を、プローブ 12 が陽性反応を示し、また、DRB1*1444 はコドン 86 の塩基が GTG から GGT に置換したためプローブ 11 が陽性反応を、プローブ 12 が陰性反応を示したと考えられた。

DRB1*1445 (DRB1*1405V2)

PCR-MPH 法において DRB1*140501 と判定されたが、PCR-SSCP 法で DRB1*140501 と異なるバンドが検出された。

DRB1*1445 は、DRB1*140501 と比較して、塩基 286 の C が A に置換することにより、コドン 67 の Leu が Ile に変異していた。

表 6 B5201V2 (B*5205) の血清学的な反応結果

Antisera No.	B5201V2 (B*5205)	Specificity
161756	W	B51+B5102+B59
01M016	—	B51+B70
5335	—	B51+B5102
14701	—	B52
63350	—	B52
44D699	—	B35+B54+B55+B56
7097310	—	B35+B5102
01M021	—	B35+B51+B5102+B52+B37

W : weak positive - : negative

表 7 DRB1*1444 の PCR-MPH (HLA-DR3/11/13/14 試薬) におけるタイピング結果

DR allele	Probe											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	2809J	3703	3713LM12	5708	5704	7002	7003	7007	7009J	7012J	8601	8603J
DRB1*1444	0.20	0.13	0.11	0.60	0.09	0.07	0.06	0.07	0.52	0.08	2.46	0.28
DRB1*1405	0.20	0.14	0.10	0.56	0.09	0.07	0.08	0.10	0.57	0.11	0.29	2.42

absorbance at 415nm

参考文献

1. Sasazuki T, Juji T, Morishima Y, *et al.*: Effect of matching of class I HLA alleles on clinical outcome after transplantation of hematopoietic stem cells from an unrelated donor. Japan Marrow Donor Program. *N. Engl. J. Med.* **22**: 1177–1185, 1998.

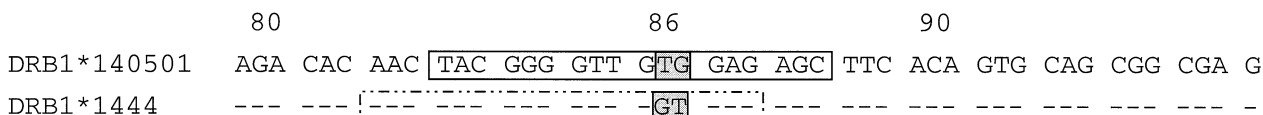


図 2

DRB1*140501 と DRB1*1444 の塩基配列 (第 2 エクソンの一部分) の比較

PCR-MPH 法 (HLA-DR3/11/13/14 試薬) のプローブも記載した

■: 変異部位 □: プローブ DRB8603J □: プローブ DRB8601

2. Petersdorf EW, Longton GM, Anasetti C, *et al.*: The significance of HLA-DRB1 matching on clinical outcome after HLA-A, B, DR identical unrelated donor marrow transplantation. *Blood* **15**: 1606–1613, 1995.
3. 中野浩美, 川井信太郎, 柏瀬貢一ら: PCR-MPH 法による HLA-A2, A26, および B61 対立遺伝子のタイピング. *日本組織適合性学会誌* **3**: 205–212, 1997.
4. Kawai S, Maekawajiri S, Tokunaga K, *et al.*: Routine low and high resolution typing of the HLA-DRB gene using the PCR-MPH (microtitre plate hybridization) method. *Eur.J.Immunogenet.* **23**: 471–486, 1996.
5. Bannai M, Tokunaga K, Lin L, *et al.*: Discrimination of human HLA-DRB1 alleles by PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism) method. *Eur.J.Immunogenet.* **21**: 1–9, 1994.
6. Fujiwara K, Tokunaga K, Isa K, *et al.*: DNA-based typing of human platelet antigen systems by polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism method. *Vox Sang.* **69**: 347–351, 1995.
7. Mitunaga S, Tokunaga K, Kashiwase K, *et al.*: A nested PCR-RFLP method for high-resolution typing of HLA-A alleles. *Eur.J.Immunogenet.* **25**: 15–27, 1998.
8. Cereb N, Yang SY: Dimorphic primer derived from intron 1 for use in the molecular typing of HLA-B alleles. *Tissue Antigens* **50**: 74–76, 1997.
9. Scharf SJ, Long CM, Erlich HA: Sequence analysis of the HLA-DR beta and HLA-DQ beta loci from three Pemphigus vulgaris patients. *Hum. Immunol.* **22**: 61–69, 1988.
10. Scharf SJ, Griffith RL, Erlich HA: Rapid typing of DNA sequence polymorphism at the HLA-DRB1 locus using the polymerase chain reaction and nonradioactive oligonucleotide probes. *Hum Immunol.* **30**: 190–201, 1991.
11. 中島文明, 中村淳子, 横田敏和: 日本人の4桁レベルの HLA ハプロタイプ分布. *日本組織適合性学会誌* **8**: 1–32, 2001.
12. Imanishi T, Akaza T, Kimura A, *et al.*: *HLA 1991 vol.1.* (eds Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T), Reference tables: Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups. Oxford University Press, Oxford, 1992, p. 1146.
13. Tamouza R, Carbonnelle E, Schaeffer V, *et al.*: A novel HLA-B*51 allele (B*5116) identified by nucleotide sequencing. *Tissue Antigens* **55**: 182–184, 2000.

Seven new HLA alleles discovered during routine typing

(A*0259, A*020107, B*5609, B*5131, B*5205, DRB1*1444 and DRB1*1445)

Marie Shimizu¹⁾, Kouichi Kashiwase¹⁾, Hidenori Tanaka¹⁾, Junichi Ueki¹⁾, Mutsuko Minemoto¹⁾, Takahiro Ichihara¹⁾, Naoko Sugahara¹⁾, Yuko Kurita¹⁾, Fumiaki Nakajima²⁾, Junko Nakamura²⁾, Ikuyo Utino³⁾, Kazuo Tsukui¹⁾, Eiichi Nakamura¹⁾

1) Tokyo Metropolitan Red Cross Blood Center, Tokyo, Japan

- 2) Kanagawa Red Cross Blood Center, Kanagawa, Japan
- 3) Shizuoka Red Cross Blood Center, Shizuoka, Japan

Summary: We reported herein seven new HLA alleles, A*0259, A*02017, B*5609, B*5131, B*5205, DRB1*1444 and DRB1*1445, discovered during routine typing and identified by the sequencing based typing method using specific primers. The A*0259 allele showed a single nucleotide difference at position 125 (guanine *vs* adenine). This was a novel difference in nucleotide position in the HLA-A, B and C alleles. This nonsynonymous difference may lead to an amino acid change at residue 18 (glycine *vs* serine). The A*020107 allele was a synonymous substitution by a single nucleotide change at position 123 (cytosine *vs* thymine). These alleles may be generated by the nucleotide changes from the A*020101 allele. A new B*5609 allele may be generated by a gene conversion of two segments originating from exon 2 of the B*5502 or B*5601 allele and exon 3 of the B*350101 allele. The B*5131 and B*5205 alleles showed a single nucleotide difference at position 527 (adenine *vs* thymine) and at 134 (guanine *vs* cytosine). These nonsynonymous differences caused to amino acid mutations at residue 152 (glutamic acid *vs* valine) in the B*5131 allele and at 21 (arginene *vs* proline) in the B*5205 allele. The B*5131 allele was identical to the B*5116 allele, and the B*5205 allele was to the B*5201 allele except for the nucleotide differences. The B*5131 allele was found in a non-Japanese blood donor. The DRB1*1444 allele had two nucleotide differences at positions 344 (thymine *vs* guanine) and 345 (guanine *vs* thymine), and the DRB1*1445 allele had that at 286 (cytosine *vs* adenine) compared with the DRB1*140501 allele. These nonsynonymous differences caused amino acid mutations at residue 86 (valine *vs* glycine) in the DRB1*1444 allele and at 67 (leucine *vs* isoleucine) in the DRB1*1445 allele.

Key words: HLA typing, new alleles, sequencing based typing

● 原著論文 ●

PCR-Luminex 法を用いた, HLA-A, HLA-B および HLA-DRB1 遺伝子の日本人対応 4 桁 DNA タイピング方法の検討

吉川 枝里¹⁾, 宮原 詞子¹⁾, 成瀬 妙子¹⁾, 島田 和典²⁾, 東 史啓²⁾,
原 啓高²⁾, 猪子 英俊¹⁾

1) 東海大学医学部 分子生命科学 遺伝情報部門

2) 株式会社ゲノムサイエンス研究所 研究開発部

(平成 15 年 4 月 2 日受付)

要約: 蛍光ビーズを用いた Luminex 法は, 簡便, 正確かつ短時間で多検体処理が可能 (high-throughput) な新しい遺伝子多型判別法である。この Luminex 法を用いて, HLA-A, HLA-B および HLA-DRB1 遺伝子に関して, 日本人を対象とする 4 桁 DNA タイピングを検討した。HLA-A で 33 種類, HLA-B で 46 種類, HLA-DRB1 で 44 種類のプローブを 1 ウェルに混合し, 日本人集団で遺伝子頻度が 0.1% 以上みられる対立遺伝子 (allele) が 4 桁レベルで判別可能な方法を構築した。遺伝子型が既知の 138 検体で検討した結果, HLA-A と HLA-B で各々 1 検体, 増幅不良による判定不能があったもの以外は 4 桁の判定が可能であった。本法は, HLA-A と HLA-B について 1 ウェル, HLA-DRB1 について 1 ウェルの, 計 2 ウェルでタイピングが可能な, 迅速な方法であり, 計 47 検体について約 5 時間で HLA-A, -B および -DRB1 遺伝子の 4 桁レベルのタイピングが 1 名の検査員で行える。特に, 大量検体を短時間で行う HLA 検査方法として有用であると考えられる。

キーワード: 蛍光ビーズ, Luminex 法, HLA 遺伝子型判定法, 4 桁レベルタイピング,

はじめに

HLA の遺伝子型判定法は PCR-SSO (Sequence Specific Oligonucleotide) 法, PCR-SSP (Sequence Specific Primer) 法, SBT (Sequence Based Typing) 法など, 多様な方法を用いたキットが製品化されている。しかしながら, 従来の海外メーカーの製品キットでは, 日本人の遺伝子型に対応していないものが多く, 2 桁レベルの判定では問題ないが, 4 桁レベルでは日本人に存在する遺伝子型で, 判別不能な

場合がある。また, 4 桁判定が可能なキットにおいても, 希な遺伝子型との識別不能 (ambiguity) の問題がある。蛍光ビーズを用いた Luminex 法は, 簡便, 正確かつ短時間で多検体処理が可能 (high-throughput) な新しい遺伝子多型判別法である (図 1) (1)。Luminex 法は 2 種類の蛍光物質により 100 種類の色調となるポリスチレンビーズと, 2 種類の検出用レーザーを有する専用の測定装置を使用する。2 種類のうち 1 種類のレーザーでビーズ表面の蛍光

代表者連絡先 〒259-1193 神奈川県伊勢原市望星台
東海大学医学部生命科学遺伝情報部門
吉川 枝里

電話 0463-93-1121 内線 2653
F A X 0463-94-8884
E-mail kikkawa@is.icc.u-tokai.ac.jp

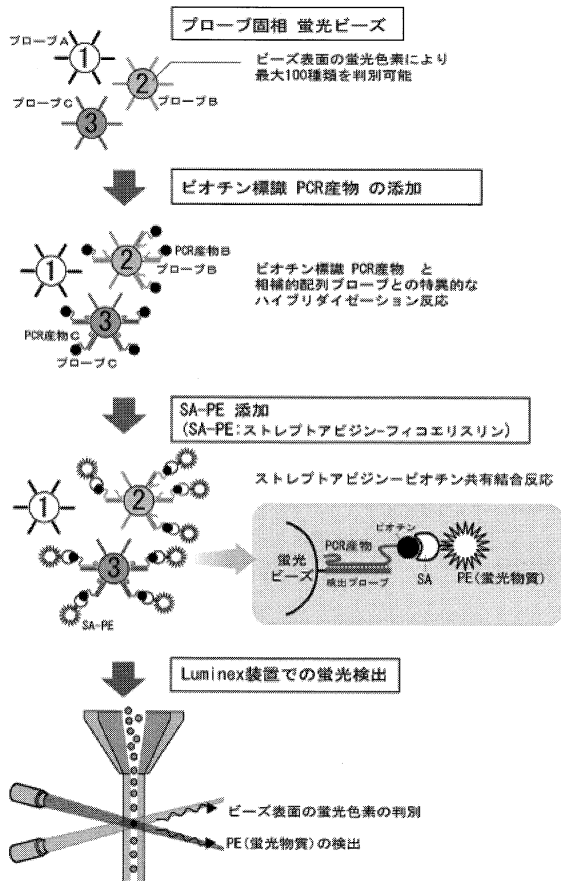


図1 蛍光ビーズを用いたLuminex測定法の原理

物質の色調によりビーズを特定し、もう1種類のレーザーにより、ビーズ表面に標識されたフィコエリスリンの蛍光強度を数値データとして得ることができる方法である。ビーズ表面にオリゴプローブを固相し、ビオチン標識した遺伝子増幅産物とハイブリダイゼーションさせ、SA-PE (ストレプトアビジン標識フィコエリスリン)を反応させる、PCR-SSO法に応用することにより、1ウェル内で100種類までのオリゴプローブとの反応を同時に測定しうるので、大量検体を短時間で行えるHLA検査方法として優れていると期待される。本論文では、判定の対象を日本人限定の4桁レベルとしたプローブセットを設定し、Luminex法による新しい測定プラットフォームを用いた遺伝子型判定方法の検討を行った。

材料と方法

1. 検体とDNA抽出

検体は日本人健常者あるいはそれら由来B細胞よ

りEBウイルスを用いて樹立した培養細胞の計138検体から、QIAGEN社のキットを用いてゲノムDNAを抽出、精製した。260nmと280nmの吸光度を測定することにより、DNAの定量と純度の測定を行い、10-20ng/μlの濃度に調製した。これらの検体のHLA遺伝子型はSBT法などの別法での判定により既知である。

2. PCR

HLA-AおよびHLA-B遺伝子は、exon 2およびexon 3をPCR法によりそれぞれ増幅した。exon 2増幅用の5'-プライマーはHLA-A、-Bとも3種類をintron 1領域に、3'-プライマーはHLA-A、-Bとも1種類をintron 2領域、exon 3増幅用5'-プライマーはHLA-Aで3種類、HLA-Bで2種類をintron 2領域に、3'-プライマーはHLA-A、-Bとも2種類をintron 3領域に設定し、exon 2およびexon 3ともにプライマーを混合し、HLA-AおよびHLA-Bを各々1チューブでPCR増幅した(表1)。HLA-DRB1については、exon 2をPS1とPS2の2種類のプライマーセットで増幅した。PS1は、5'-プライマーをintron 1領域、3'-プライマーをexon 2領域に設定し、PS2は、Fプライマー4種類とRプライマー1種類全てについてexon 2領域内に設定し、プライマーを混合して1チューブでPCR増幅した(表1)。使用するプライマーは、5'側についてビオチンで修飾を行った。増幅産物のサイズはHLA-A遺伝子のexon 2が466bp、exon 3が318bp、HLA-Bのexon 2が448bp、exon 3が359bp、HLA-DRB1はPS1が280bp、PS2が265-271bpである。増幅用緩衝液は最終濃度50mM KCl、10mM Tris-HCl pH8.3、1.5mM MgCl₂、2% DMSO、0.2mM dNTPsとした。これに0.5-1.0μMの上記プライマーセット、50U/mlのTaq DNAポリメラーゼおよび検体ゲノムDNA50-100ngを加え、全量を25μLとした。準備した4種類(HLA-A、B、DRB1-PS1およびDRB1-PS2)の遺伝子増幅溶液をGeneAmp 9700 (Applied biosystems社)にセットし、93°C、30秒→65°C、30秒→72°C、30秒、40サイクルでPCR増幅を行った。なお、GeneAmp 9700に関してはブロック部分がゴールドのタイプとアルミのタイプが使用可

表1 PCR プライマーの塩基配列

HLA-A exon2 primer set

AF2-1	AAACCGCCTCTGCGGGGAGAAGCAA
AF2-2	AAACGGCCTCTGTGGGGAGAAGCAA
AF2-3	AAACGGCCTCTGCGGGGAGAAGCAA
AR2	GATCTCGACCCGGAGACTGT

HLA-A exon3 primer set

AF3-1	GGGCTGACCGCGGGGT
AF3-2	CGGGCTGACCTCGGGGT
AF3-3	CTGGGCTGACCGTGGGGT
AR3-1	GTGGCCTCTGGTACCCGT
AR3-2	GTGGCCCCTGGTACCCGT

HLA-B exon2 primer set

BF2-1	AGGAGAGAGGGGACCGCAG
BF2-2	AGGAGCAAGGGGACCGCAG
BF2-3	AGGAGCGAGGGGACCGCAG
BR2	GATCTCGACCCGGAGACTCG

HLA-B exon3 primer set

BF3-1	CGGGGCTGACCGCGGGGG
BF3-2	GGGGCTGACCGCGGGGG
BR3-1	AGGCCATCCCCGCCGACCTAT
BR3-2	AGGCCATCCCCGGCGACCTAT

HLA-DRB1-PS1 primer set

DF1	GTTCGTGTCCCCACAGCACGT
DR1	CTGCACTGTGAAGCTGTCACC

HLA-DRB1-PS2 primer set

DF2-1	CCCACAGCACGTTTCTTGAGTACTC
DF2-2	CAGCACGTTTCTTGAGCAGGTTAAACA
DF2-3	GCACGTTTCTTGAGCAGCCTAAGAGG
DF2-4	GCACGTTTCTTGAGCAGCCTAAGTT
DR2	GCTGCACTGTGAAGCTTTCCA

能であった。GeneAmp 9600 に関しては変性の温度の変更により、条件の最適化が必要であった。

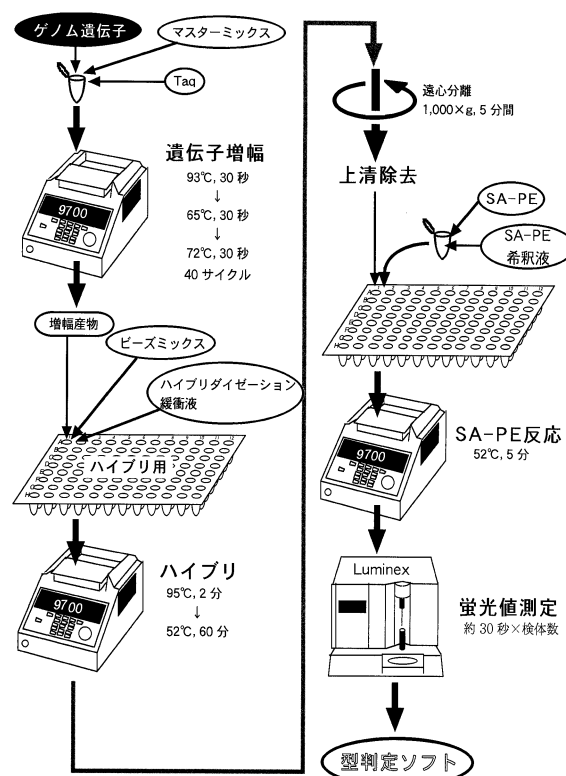


図2 測定方法のフローチャート

3. Luminex 法(図2)

日本人集団で遺伝子頻度が 0.1% 以上みられる対立遺伝子 (allele) (2-4) について判別可能なタイピングを目的として、HLA-A 遺伝子で 33 種類、B で 46 種類、DRB1-PS1 で 24 種類、DRB1-PS2 で 20 種類のプローブを設計した(表2)。これらの中には、HLA-A および B では exon 2 と exon 3 に、HLA-DRB1 では PS1 と PS2 用に設計した増幅産物確認用プローブ(陽性コントロールプローブ)を含む。上記、配列特異的オリゴプローブは末端にアミノ基を修飾して合成し、Luminex 用の蛍光ビーズに Luminex 社が推奨する方法で固相化した。これらのビーズは 100 ビーズ/ μL になるように混合し、HLA-A、-B、DRB1-PS1 および DRB1-PS2 用のビーズミックスを、それぞれ作製した。ハイブリダイゼーション反応緩衝液 (3.75 M TMAC, 62.5 mM TB pH8.0, 0.5 mM EDTA, 0.125% N-ラウロイルサルコシン) を 40 μL に、上記ビーズミックスを 5 μL と、PCR 増幅産物を 5 μL 加えて、50 μL とした。ビーズミックスと PCR 増幅産物は HLA-A、B、DRB1-PS1 お

表2 プローブに用いたオリゴヌクレオチドの塩基配列

HLA-A probe set	HLA-B probe set	HLA-DRB1 probe set
A01	B01	D01
A02	B02	D02
A03	B03	D03
A04	B04	D04
A05	B05	D05
A06	B06	D06
A07	B07	D07
A08	B08	D08
A09	B09	D09
A10	B10	D10
A11	B11	D11
A12	B12	D12
A13	B13	D13
A14	B14	D14
A15	B15	D15
A16	B16	D16
A17	B17	D17
A18	B18	D18
A19	B19	D19
A20	B20	D20
A21	B21	D21
A22	B22	D22
A23	B23	D23
A24	B24	D24
A25	B25	D25
A26	B26	D26
A27	B27	D27
A28	B28	D28
A29	B29	D29
A30	B30	D30
A31	B31	D31
AP2	B32	D32
AP3	B33	D33
	B34	D34
	B35	D35
	B36	D36
	B37	D37
	B38	D38
	B39	D39
	B40	D40
	B41	D41
	B42	DB3
	B43	DP1
	B44	DP2
	BP2	
	BP3	

よび DRB1-PS2 でセットとなるため、ABDR 同時判定の場合には4チューブが必要となる。これらを GeneAmp 9700 にセットし、95°C、2分 → 52°C、60分 で変性およびハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、スイング型のプレート遠心機にて150×g、15分間遠心分離し、上清を除いた。次にストレプトアビジン標識フィコエリスリン (SA-PE, Sigma 社) を PBS-tween (1×PBS

pH7.5, 0.01% Tween-20) で100倍に希釈し、35μL ずつ加えた。ピペッティングで攪拌した後、HLA-A, B まとめて1ウェルに混ぜて70μLとし、同様に DRB1-PS1, DRB1-PS2 を1ウェルに混ぜて70μLとした。それらを GeneAmp 9700 にセットし、52°C、5分間反応させた後、Luminex 100 システム (96 サンプル用) にセットし、測定を行った。えられた反応パターンを入力した判定ソフトウェアを用い

て、型判定をおこなった。この判定ソフトウェアは、日本人の HLA 遺伝子頻度 0.1% 以上の型のすべてについて対応し、識別不能な組み合わせについても、それらすべてが表示されるように開発されている。

結果

日本人由来の 138 検体ゲノム DNA について PCR 増幅を行い、材料と方法に従って Luminex 法による HLA-A, HLA-B および HLA-DRB1 遺伝子タイピングを行った。Luminex 法の場合、ビーズ自家蛍光値の検出とコンタミネーションの確認のため常に陰性コントロールの測定が必要であるため、同時に測定可能な最大数は 95 検体であった。今回の試験では、最大検査数の半分である 48 検体を 1 セットとし、陰性コントロールを除く 47 検体について、3 回試験を行った。ルミネックス装置を用いた検出の段階は HLA-A と B の 79 ビーズ、HLA-DRB1 では PS1 と PS2 を混合した 44 ビーズの同時測定を行った。表 3-5 に、HLA-A, HLA-B および HLA-DRB1 遺伝子タイピングのプロープ判定パターンをそれぞれしめた。本方法は日本人集団で遺伝子頻度が 0.1% 以上みられる対立遺伝子 (allele) (表 3-5 参照)) について、ホモ、ヘテロの組み合わせについて 4 桁レベルのタイピングが可能である。また、日本人以外の他集団では頻繁に観察される A29 や A32 の判定についても、型判定可能な方法であるが、今回用いた 138 検体には A29 や A32 は含まれていない (白人由来の検体で型判定可能なことは確認している)。

検出された蛍光強度と各々のビーズについて設定したカットオフ値で陽性と陰性を判定し、遺伝子型判定ソフトウェアを用いて判定を行った結果、HLA-A で 1 検体、HLA-B で 1 検体を除き、既知の HLA 型と 4 桁レベルで一致した。したがって、判定達成率ならびに精度はともに、HLA-A 遺伝子 99.3%、HLA-B 遺伝子 99.3%、HLA-DRB1 遺伝子 100% であった。表 6 に、HLA-A, HLA-B および HLA-DRB1 遺伝子タイピングの代表例をしめた。判定不能であった 2 検体は、再検査を行っても判定不能であり、陽性ビーズの蛍光値が低いことから、マルチプレックス PCR であるため DNA サンプルから

の持ち込みの未知の成分による遺伝子増幅の不良が原因である可能性が考えられた。また、図 3 にしめたように、HLA-B タイピングに用いたオリゴプローブ結合ビーズ B17 の蛍光強度とカットオフ値の判定で、増幅不良の陽性検体の蛍光値と増幅過多の陰性検体の非特異蛍光値がほぼ同程度の数値となることがあり、これらの検体については再検査による確認を行った。

以上の結果、[A*2402, 2601] と [A*2404, 2605] の識別不能 (ambiguity) な組み合わせを除き、想定した日本人対応 4 桁遺伝子型のタイピングが可能であった。本法は、日本人での存在がいまだ確認されていない遺伝子型について、例えば HLA-A で [A*3201, —] の検体については [A*3201, 7401] との識別が不可能となるなど(表 3)、識別不能 (ambiguity) となる何種類かの遺伝子型の組み合わせの存在が確認された。日本人での存在が確認されている対立遺伝子については、前述のように [A*2402, 2601] と [A*2404, 2605] の組み合わせのみであった。したがって、本論文で開発した Luminex 法は [A*2402, 2601] と [A*2404, 2605] の組み合わせを除き、HLA-A, HLA-B および HLA-DRB1 遺伝子の日本人の対立遺伝子のどのような組み合わせでも、4 桁レベルで識別可能である、精度の高いタイピングであることが明らかとなった。

考察

HLA-A 用 33 プロープ、HLA-B 用 46 プロープ、HLA-DRB1-PS1 用 24 プロープ、HLA-DRB1-PS2 用 20 プロープを固相化した蛍光ビーズを用いた Luminex 法により、日本人で遺伝子頻度が 0.1% 以上みられる対立遺伝子について、すなわち、HLA-A 遺伝子で 33 種類、HLA-B で 55 種類、HLA-DRB1 で 34 種類について、[A*2402, 2601] と [A*2404, 2605] の識別不能 (ambiguity) となる組み合わせを除き、4 桁レベルのタイピングがヘテロの組合せも含めて判別可能であった(表 3-5)。今回の試験で生じた識別不能 (ambiguity) となる組み合わせは、[A*2402, 2601] と [A*2404, 2605] の 1 種類のみであった。この [A*2402, 2601] と [A*2404, 2605] の識別不能 (ambiguity) な組み合わせについては、A*2404 と

表3 HLA-Aのブローブ判定パターン

遺伝子型	頻度	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A09	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A17	A18	A19	A20	A21	A22	A23	A24	A25	A26	A27	A28	A29	A30	A31	A32	AP2	AP3		
A*0101	0.57	■																																			
A*0201	10.71	■																																			
A*0203	r	■																																			
A*0206	8.99	■																																			
A*0207	2.87	■																																			
A*0210	0.76	■																																			
A*0218	r	■																																			
A*0301	0.57	■																																			
A*0302	r	■																																			
A*1101	10.71	■																																			
A*1102	r	■																																			
A*2301	-	■																																			
A*2402	36.52	■																																			
A*2404	r	■																																			
A*2408	r	■																																			
A*2501	-	■																																			
A*2601	11.28	■																																			
A*2602	r	■																																			
A*2603	1.91	■																																			
A*2605	r	■																																			
A*2901	-	■																																			
A*3001	0.38	■																																			
A*3101	6.88	■																																			
A*3201	-	■																																			
A*3303	7.84	■																																			
A*3401	-	■																																			
A*3601	-	■																																			
A*4301	-	■																																			
A*6601	-	■																																			
A*6801	r	■																																			
A*6901	-	■																																			
A*7401	-	■																																			
A*8001	-	■																																			

頻度は中島らの報告を参考に記載した(3)。「r」とは0.1%以下であるが日本人で認められる遺伝子型,「-」は日本人では認められず,他集団で認められる遺伝子型で,2桁での判定が可能な遺伝子型をしめた。

表 4 HLA-B のプローブ判定パターン

遺伝子型	B*01	B*02	B*03	B*04	B*05	B*06	B*07	B*08	B*09	B*10	B*11	B*12	B*13	B*14	B*15	B*16	B*17	B*18	B*19	B*20	B*21	B*22	B*23	B*24	B*25	B*26	B*27	B*28	B*29	B*30	B*31	B*32	B*33	B*34	B*35	B*36	B*37	B*38	B*39	B*40	B*41	B*42	B*43	B*44	B*45																																																														
頻度	B*0702	3.63	r	B*0801	-	B*1301	1.91	B*1302	0.57	B*1401	-	B*1501	9.37	B*1502	-	B*1507	0.38	B*1511	0.96	B*1518	1.72	B*1528	r	B*1538	r	B*1801	-	B*2704	0.38	B*2705	r	B*3501	8.80	B*3701	0.76	B*3802	r	B*3901	4.02	B*3902	0.38	B*3902	r	B*3904	0.19	B*3923	r	B*4001	5.35	B*4002	8.41	B*4003	0.38	B*4006	4.78	B*4101	-	B*4201	-	B*4402	0.38	B*4403	6.69	B*4501	-	B*4601	3.44	B*4701	-	B*4801	5.54	B*4901	-	B*5001	-	B*5101	6.88	B*5102	0.19	B*5201	10.90	B*5301	-	B*5401	7.07	B*5502	2.87	B*5504	0.38	B*5601	0.38	B*5603	0.57	B*5701	r	B*5801	0.19	B*5901	1.72	B*6701	0.76	B*7301	-	B*8101	-	B*8201	-

表 3 に同じ

2605 はともに日本人で希な対立遺伝子ではあるが、識別不能 (ambiguity) となる A*2402, 2601 が、今回の 138 検体中に 8 検体が確認されているので、新たなプローブが必要と考えられる。そこで、A*2402 と A*2404 を判別するプローブを新たに一個追加し、

HLA-A は計 34 プローブとすることでこの識別不能 (ambiguity) の問題を解決する予定である。

低い蛍光値が HLA-A で 1 検体、HLA-B で 1 検体で認められ、DNA サンプルからの持ち込みの未知の成分に起因する PCR 増幅不良が原因と考えられ

表5 HLA-DRB1 のプローブ判定パターン

遺伝子型	頻度	D01	D02	D03	D04	D05	D06	D07	D08	D09	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28	D29	D30	D31	D32	D33	D34	D35	D36	D37	D38	D39	D40	D41	D83	DP1	DP2																		
DRB1*0101	3.88	■																																																													
DRB1*0102	r		■																																																												
DRB1*0301	r																																																														
DRB1*0401	1.36		■																																																												
DRB1*0403	3.88																																																														
DRB1*0404	r																																																														
DRB1*0405	13.18		■																																																												
DRB1*0406	3.49																																																														
DRB1*0407	0.39																																																														
DRB1*0410	2.13																																																														
DRB1*0701	0.78																																																														
DRB1*0802	3.49																																																														
DRB1*0803	6.40																																																														
DRB1*0809	r																																																														
DRB1*09012	13.76																																																														
DRB1*1001	0.58																																																														
DRB1*1101	3.68																																																														
DRB1*1201	2.52																																																														
DRB1*1202	2.13																																																														
DRB1*1301	0.39																																																														
DRB1*1302	5.62																																																														
DRB1*1307	0.19																																																														
DRB1*1401	4.26																																																														
DRB1*1402	r																																																														
DRB1*1403	0.78																																																														
DRB1*1405	3.10																																																														
DRB1*1406	2.13																																																														
DRB1*1407	0.39																																																														
DRB1*1412	0.19																																																														
DRB1*1501	11.63																																																														
DRB1*1502	8.91																																																														
DRB1*1602	0.78																																																														

表3と同じ。DRB1*1201と1301はDRB3の遺伝子型によって2種類のパターンが存在する。

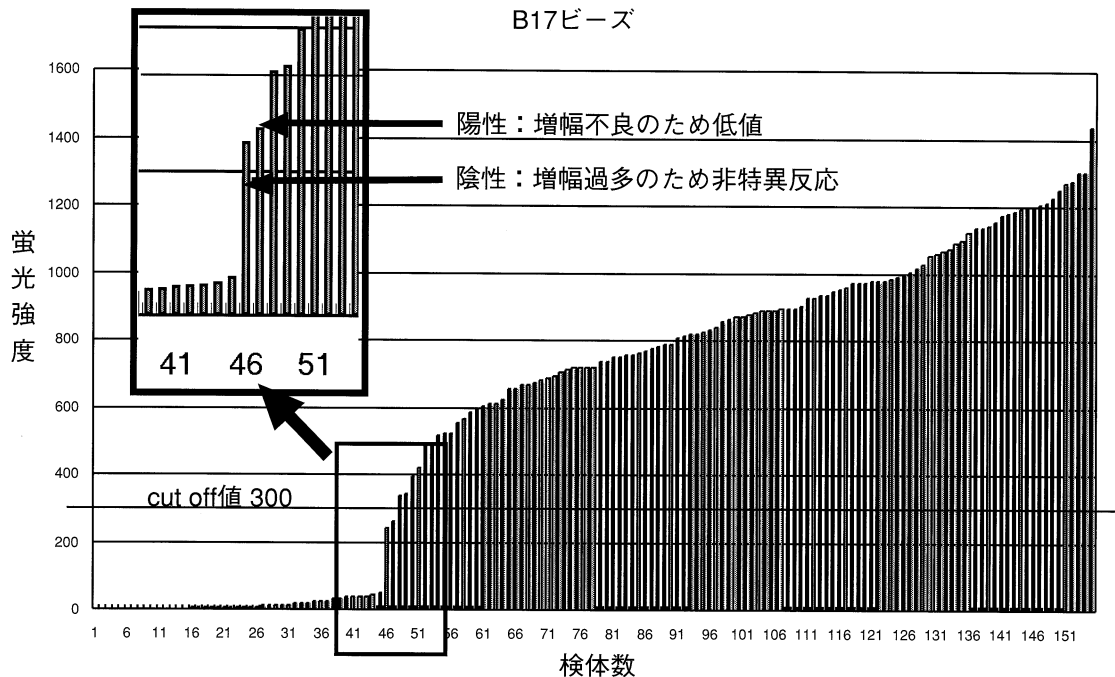


図3 B17ビーズの蛍光強度

Bで46種類のプローブの一つであるB17ビーズについて、138検体の蛍光強度をしめた。縦軸に蛍光強度、横軸に検体数をしめた。検体数は陰性コントロールや再検査分を含む。矢印で記載した2検体の他、カットオフ (Cut off) 値周辺の検体については再検査を実施した。

た。すなわち、複数のプライマーを含むマルチプレックスPCRであるため、DNAの純度やヘテロの組合せなどに増幅効率が依存すること、またゲノム上の相同遺伝子の存在のため、ゲノムDNAの溶液の組成などの持ち込みの未知の成分などが、PCR増幅に影響を及ぼしているのかもしれない。これ以外にも使用するサーマルサイクラーによる増幅効率の違いも確認された。今回の試験では、図3のように増幅不良の陽性検体の蛍光値と増幅過多の陰性検体の非特異蛍光値がほぼ同程度の数値となることがあり、これらの検体については再検査による確認を行う必要があった。このように、本測定系では比較的純度の高いDNAの使用による、安定した遺伝子増幅が不可欠であると考えられる。この点に関しては、今後更なる多数検体で追試を行う予定である。

Luminex法による測定において、より簡便に4種類を個別に測定することも可能であるが、Luminex法は最大100種類のビーズを同時に測定可能なため、HLA-Aと-Bを合わせた79種類、およびDRB1-PS1とPS2を合わせた44種類は同時に測定でき、

多検体処理が可能 (high-throughput) な特性を生かした。したがって、本方法はABDR同時判定の場合、ビーズアドレスの設定と判定ソフトウェアの性能から、Luminex 100システムを用いた測定を、4回から2回にすることが可能である。

本測定方法の操作時間は抽出されたDNAを用いて、Luminex装置での蛍光値検出まで、約5時間であった。遺伝子増幅条件、ビーズとの反応条件などがHLA-A、HLA-BおよびHLA-DRB1で共通であるため、GeneAmp 9700が2台とLuminex本体1台(96サンプル用)のセットで47検体の同時測定が可能である(HLA-A、-Bをまとめて1ウェルとし、同様にDRB1-PS1、DRB1-PS2をまとめて1ウェルとして、陰性コントロールとともに、Luminex 100システムにて蛍光を計測するため、一度に47検体分の同時計測が可能となる)。更に、この機械セットをもう1セット準備することでA、BおよびDRB1が1名の検査員で同時に95検体測定することも可能であり、大量検体を判定する方法としては非常に有用であると考えられる。

表 6 蛍光値と判定結果

HLA-A

番号	遺伝子型	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A09	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A17	A18	A19	A20	A21	A22	A23
1	A*0201, A*0207	613	111	146	-3	36	465	60	13	1598	56	5	1284	0	-5	-2	613	636	15	-23	2	1231	19	2
2	A*2402, A*3101	7	68	1458	416	89	797	1619	2	50	2455	7	22	-1	1043	147	19	29	113	-3	8	506	11	-1
3	A*0206, A*2402	30	1315	1317	44	88	777	101	30	1421	2867	30	1145	35	1253	162	125	841	136	83	25	1175	71	39
4	A*2601, A*2603	37	1471	47	34	58	519	55	2627	28	53	23	965	988	32	37	104	998	59	140	649	92	52	772
5	A*2402, A*3101	34	97	1277	252	59	613	1639	54	124	2665	36	59	25	1186	147	31	40	65	90	28	561	106	28
6	A*2402, -	16	48	1666	24	43	612	33	15	61	2855	-2	4	11	1325	169	10	-11	112	16	10	802	7	3
	Cut off値	200	500	500	100	250	200	300	300	300	300	300	300	300	300	300	250	400	250	200	250	250	250	250

番号	遺伝子型	A24	A25	A26	A27	A28	A29	A30	A31	AP2	AP3
1	A*0201, A*0207	190	-1	25	1784	153	59	1151	990	2253	2026
2	A*2402, A*3101	1114	11	1674	1291	111	1485	795	744	2622	2432
3	A*0206, A*2402	276	38	1664	1431	166	1598	926	1108	2729	2546
4	A*2601, A*2603	45	34	74	101	27	129	1275	45	2869	2080
5	A*2402, A*3101	1086	37	1490	1286	130	1435	808	714	2659	2223
6	A*2402, -	114	21	1705	26	35	1619	14	906	2777	1821
	Cut off値	500	300	400	400	400	400	400	1000	1000	

HLA-B

番号	遺伝子型	B01	B02	B03	B04	B05	B06	B07	B08	B09	B10	B11	B12	B13	B14	B15	B16	B17	B18	B19	B20	B21	B22	B23
1	B*3501, B*4601	415	1	0	38	12	499	272	263	-13	304	38	-2	1603	-7	0	313	-2	0	-5	3	-3	104	1396
2	B*4001, B*4002	-1	520	3	547	975	45	0	-2	-7	271	22	-5	0	-2	-3	0	1175	2	6	85	-5	164	1702
3	B*3501, B*5401	513	59	38	100	79	409	73	332	443	421	94	46	45	1514	28	528	53	33	55	54	46	1226	1863
4	B*4001, B*5601	395	59	29	594	850	389	50	52	89	349	79	53	54	1351	35	37	875	35	42	60	40	1093	1783
5	B*0702, B*5101	409	53	613	80	66	525	65	336	85	406	86	52	47	1408	25	918	73	31	58	49	44	1126	1433
6	B*5401, -	460	-1	6	48	17	58	7	7	601	261	28	9	2	1617	11	3	4	2	4	7	8	1221	1486
	Cut off値	100	250	150	350	300	150	150	100	150	100	300	300	300	300	300	200	200	300	300	300	300	300	300

番号	遺伝子型	B24	B25	B26	B27	B28	B29	B30	B31	B32	B33	B34	B35	B36	B37	B38	B39	B40	B41	B42	B43	B44	BP2	BP3
1	B*3501, B*4601	9	-7	113	611	23	23	48	509	-7	12	655	-2	1119	37	13	1169	28	2	0	-2	2	3201	1902
2	B*4001, B*4002	13	-1	-1	993	481	7	884	-3	9	7	1002	-2	48	1162	36	1036	22	1837	-3	-2	-4	3177	1687
3	B*3501, B*5401	67	768	249	32	37	75	861	598	552	61	1133	42	966	140	507	1325	93	37	32	382	34	3530	2171
4	B*4001, B*5601	55	572	27	770	81	56	985	37	403	41	1048	37	993	1190	109	1242	65	2036	41	317	39	3173	1951
5	B*0702, B*5101	1206	523	31	40	596	523	506	203	39	66	867	34	1028	1200	92	907	1404	2032	29	38	46	3512	1835
6	B*5401, -	13	693	9	10	11	0	813	-2	536	29	998	2	21	58	494	1292	42	6	8	430	6	3283	2216
	Cut off値	250	250	50	250	250	250	200	100	100	300	250	300	300	300	200	400	400	300	300	50	300	2000	1000

HLA-DRB1

番号	遺伝子型	D01	D02	D03	D04	D05	D06	D07	D08	D09	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23
1	DRB1*0803, DRB1*1501	17	37	34	3193	68	13	45	49	951	26	33	123	30	1715	31	31	58	87	28	65	57	2069	30
2	DRB1*09012, DRB1*1201	145	38	29	27	2456	17	25	26	21	30	38	281	20	41	27	22	31	26	58	43	1238	392	28
3	DRB1*0403, DRB1*0405	33	1713	28	608	24	27	37	33	41	37	32	161	39	2423	81	35	40	36	972	281	221	516	34
4	DRB1*1101, DRB1*1405	19	40	30	39	11	23	1380	28	614	32	41	643	773	47	2217	25	34	41	58	146	119	248	2586
5	DRB1*0101, DRB1*09012	1287	46	40	193	2209	32	18	31	25	34	39	216	964	89	43	27	45	19	782	191	984	441	26
6	DRB1*0405, -	31	1542	15	424	24	24	25	27	39	27	30	77	32	2260	16	25	27	24	854	210	183	319	19
	Cut off値	300	500	500	1000	500	500	500	600	200	200	300	350	300	300	1000	200	200	200	300	550	400	800	300

番号	遺伝子型	D24	D25	D26	D27	D28	D29	D30	D31	D32	D33	D34	D35	D36	D37	D38	D39	D40	D41	DB3	DP1	DP2	
1	DRB1*0803, DRB1*1501	25	36	27	656	20	30	28	27	1223	59	36	45	36	49	35	98	1671	49	72	2634	2296	
2	DRB1*09012, DRB1*1201	28	35	25	12	1272	28	18	26	24	1958	125	51	43	46	28	72	825	40	193	1971	2188	
3	DRB1*0403, DRB1*0405	1852	41	690	139	36	892	61	31	36	28	46	51	1995	47	30	1432	52	73	91	2567	2064	
4	DRB1*1101, DRB1*1405	32	323	40	137	32	43	37	39	47	21	52	52	319	46	40	1472	55	87	614	2479	2286	
5	DRB1*0101, DRB1*09012	28	47	18	26	37	46	28	37	34	28	46	51	49	42	42	27	38	35	146	2194	62	
6	DRB1*0405, -	25	34	23	28	18	34	31	26	36	26	34	34	39	39	27	20	33	37	56	2297	53	
	Cut off値	200	500	200	300	350	350	200	200	300	200	200	500	450	200	200	300	300	800	150	1000	1000	

陽性陰性は「カットオフ (Cut off) 値」により決定し、白抜きの部分を陽性と判定した。蛍光値は、蒸留水を用いた陰性コントロールの数値を差し引くため、マイナスとなる場合がある。

参考文献

1. Fulton RJ, McDade RL, Smith PL *et al*: Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system. *Clin. Chem.* **43**: 1749-1756, 1997.
2. 坂内誠, 柏瀬貢一, 石川善英ら: 日本人集団を対象とした HLA-A, B, DR の SSOP タイピング

法, 日本組織適合性学会誌, **8**: 175-186, 2002.

3. 中島文明, 中村淳子, 横田敏和: 日本人の 4 桁レベルの HLA ハプロタイプ分布, 日本組織適合性学会誌, **8**: 1-32, 2001.
4. 赤座達也: 日本人の HLA -HLA 頻度についての一考察, 日本組織適合性学会誌, **5**: 18-22, 1998.

Evaluation of the PCR-Luminex method for four-digital level genotyping of the HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 genes in the Japanese population.

Eri F Kikkawa¹⁾, Noriko Miyahara¹⁾, Taeko K Naruse¹⁾, Kazunori Shimada²⁾,
Fumihiro Azuma²⁾, Hirotaka Hara²⁾, Hidetoshi Inoko¹⁾

1) Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine.

2) Genome Science Laboratories co., ltd.

Summary: The PCR-Luminex method using fluorescence microsphere was developed for high-resolution HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 genotyping in the Japanese population. This genotyping method allowing to define all the possible combinations of alleles at each loci existing in Japanese at the four-digital level except for A*2402, 2601 and A*2404, 2605 was accomplished using 33 probes for HLA-A, 46 probes for HLA-B and 44 probes for HLA-DRB1. This method was evaluated with 138 Japanese samples and concordance rates of this typing to the predetermined assignments were 99.3% at the HLA-A and HLA-B loci, and 100% at the HLA-DRB1 locus. Collectively, the PCR-Luminex method is a simple, accurate and high-through put (HLA-A, -B and DRB1 typing of 47 samples for 5 hours) genotyping system offering the efficient routine platform in the HLA field.

● 総 説 ●

Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) 遺伝子領域の構造, ハプロタイプ, 及び多型に関する解析

千田 昇平, Daniel E. Geraghty

Clinical Research Division
Fred Hutchinson Cancer Research Center
Seattle, WA.

(平成 15 年 2 月 4 日受付)

序 文

Natural Killer (NK) 細胞は, 腫瘍による形質転換やウイルス感染などによる, あらゆるストレスに曝されたアブノーマルな細胞を認識し, 傷害することができる, リンパ系エフェクター細胞の一種である。キラー T 細胞と標的細胞の関係のように 1 対 1 の対応性は持たず, 1 個の NK 細胞が数種類の異なった標的細胞を傷害できることが一つの特徴である。NK 細胞は通常の免疫応答 (T 細胞/抗原提示細胞を介した系) に先駆けてより早い段階で免疫応答を引き起こし, サイトカインやモノカインを放出することによって免疫機構に寄与する (1, 2)。

NK 細胞はその細胞表面に活性化シグナルを伝える受容体 (activating receptor) と抑制化シグナルを伝える受容体 (inhibitory receptor) を発現しており, それらの種類, 数は多岐に渡っている。NK 細胞のエフェクター細胞としての機能はこれら活性化/抑制化受容体を通じた, 細胞内への“正と負のシグナルのバランス”によって決められる (3-5)。

1990 年に *in vitro*, *in vivo* 両方の系で NK 細胞が主要組織適合性複合体 (major histocompatibility complex: MHC) class I 抗原の発現が欠損している標的細胞によって活性化されることが腫瘍細胞を用いて明らかにされた (“missing self” モデルの提唱)

(6)。標的細胞が MHC class I の発現を何らかの理由で欠損する状況に置かれた場合, NK 細胞表面の inhibitory receptor に対するリガンドが無くなり負のシグナルが入力されず, その結果として NK 細胞のエフェクター機能が発揮されることになる。このモデルを例にすると, MHC class I と inhibitory NK receptor の ligand/receptor 相互作用で調節される負のシグナルにより NK 細胞の機能は調節されると考えられる (7, 8)。一方 activating NK receptor の一つである NKG2D のリガンド (MHC class I chain [MIC] related antigens: MICA, MICB, Rae-1, ULBPs 等) を発現する腫瘍細胞を用いた研究により, 標的細胞が class I 抗原を提示している場合でも NK 細胞は活性化されることが示された (9-12)。これらのことから, 正と負のシグナルがいかにして協奏し, NK 細胞のエフェクター機能を誘導するシステムについては現在のところ厳密には解明されていない。MHC class I 抗原が inhibitory receptor と作用し負のシグナルが NK 細胞の機能を調節していることは明らかであるが, 最終的な NK 細胞の応答 (標的細胞の傷害, インターフェロンの産生による T 細胞やマクロファージ等の他の免疫担当細胞の活性化) を導くためにどのような経路が細胞内で稼働しているのか, まだ完全に理解されていない。

代表者連絡先 Correspondence to: Shohei Chida
Clinical Research Division
Fred Hutchinson Cancer Research Center

1100 Fairview Ave. N. D4-100
Seattle, WA. USA. 98109-1024
e-mail: schida@fhcrc.org

NK 受容体に関する遺伝子は、1992 年にマウスの MHC class I 分子をリガンドとして特異的に認識する分子、Ly49 が同定されたのが最初である (13)。その後 HLA class I 分子をリガンドとする Killer cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR) 遺伝子がヒトゲノム中に存在することが複数のグループにより明らかにされた (14–16)。マウス Ly49 遺伝子とヒト KIR 遺伝子群は機能上のアナログと考えられるが、KIR は免疫グロブリン分子群に、Ly49 は C-type レクチン分子群にと、それぞれ構造上は異なるタンパク質ファミリーに分類される (17–20)。構造上の相違があるものの、KIR, Ly49 タンパク質ファミリーは多くの類似点を示す。両方の遺伝子群とも HLA class I 分子を認識する inhibitory receptor をコードする遺伝子を含む。これらの受容体は細胞内ドメインに存在する immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) を通じてリン酸化酵素を誘導し、負のシグナルを細胞内に伝える。一方 activating receptor は細胞内に ITIM を欠き、そのかわりに immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) と呼ばれる部分を持つ DAP12 分子と会合して、正のシグナルを伝える。KIR, Ly49 両遺伝子群とも正と負の受容体を持ち、それらの細胞外ドメ

インに相当する塩基配列はお互いに非常に高い相同性を示すことも特徴の一つである。Ly49 遺伝子の pseudogene (偽遺伝子: LY49L) がヒト 12 番染色体短腕の Natural Killer Complex (NKC) 領域に見いだされており、ヒトが Ly49 遺伝子を含む祖先から派生してきたことが考えられる (21)。

NK 細胞表面に発現する受容体遺伝子の多くはヒト染色体上、2 カ所にクラスターを形成して存在している。一つは上述した免疫グロブリンファミリーに属する KIR 遺伝子群で、19q13.4 上の Leukocyte Receptor Complex (LRC) と呼ばれる領域に存在する。もう一つは C-type レクチンファミリーに属する CD94 や NKG2 等の受容体遺伝子で、12p13.1 上の NKC 領域に位置する (図 1)。それぞれの分子群とも正と負の両方の受容体を持っており、特に負の受容体に関してはそのリガンドが HLA class I 分子であることが明らかにされている。正の受容体は DAP10, DAP12 等の分子と会合してリガンドと相互作用すると考えられているが、リガンドがはっきりと同定された物はまだ数少ない (22, 23)。

本稿ではこれらの NK 細胞受容体をコードする遺伝子の中から、KIR を取り上げ、その高度な多型性、多様な遺伝子構造の詳細、遺伝子型のタイピング法

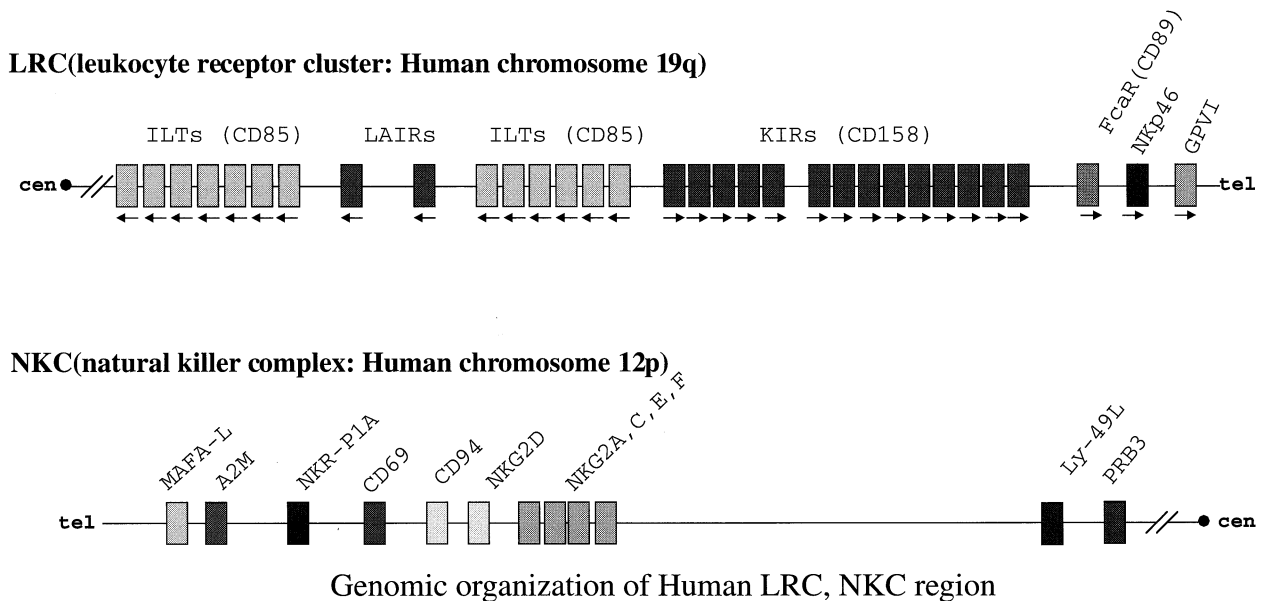


図 1

ヒト LRC (leukocyte receptor cluster) 領域と NKC (natural killer complex) 領域のゲノム構造を模式的に示した。矢印は遺伝子の転写方向を表す。

を中心に現在進行中のトピックも合わせて、いま明らかになりつつある *KIR* の本態を整理してみたい。

2. *KIR* 遺伝子領域のゲノム構造

2.1. 構造上の特徴

ヒトの *KIR* 遺伝子は 19q13.4 上の LRC 領域内に位置し、最大 200 kb に渡る。セントロメア側には *CD22*, *CD66* を含む sialic-acid-binding-Ig-like lectins (Siglecs) や正のシグナル伝達時に必要な分子 *DAP10*, *DAP12* 遺伝子が存在し、また Ig-like transcripts (*ILTs*) や leukocyte-associated inhibitory receptors (*LAIRs*) など、多くの遺伝子がクラスターをなして存在する。テロメア側には *FcαR* (CD89) や natural cytotoxicity receptor である *NKp46* 遺伝子、platelet collagen receptor VI (*GPVI*) が位置している(図 1) (20)。*KIR* 遺伝子領域は非常に高い多様性に富むが、個々の *KIR* 遺伝子は規則的に配置されて

いる。現在の所、14 個の *KIR* 遺伝子(偽遺伝子を含む)が同定されているが、それらの転写方向は全て同じ(セントロメア → テロメア)であり、各遺伝子間は 2.4 kb ではほぼ一定している。唯一の例外が *KIR3DP1* と *2DL4* の間で、約 14 kb の間隔がある。*3DL3*, *3DP1*, *2DL4*, *3DL2* の各遺伝子は全てのハプロタイプに共通して存在する。その他の遺伝子はそれぞれのハプロタイプによって有無が分かれる(図 2)。そのため *KIR* 遺伝子領域の構造は非常に多岐に渡っており、頻度の低い物も含めると 20 種類以上のハプロタイプが存在すると推察されている。また同一のハプロタイプ上の異なる座位に 2 つ存在する遺伝子 (*2DL5A*) が見いだされているのも構造上の特徴の一つである (24)。これらの事実に加えて、それぞれの遺伝子中には single nucleotide polymorphism (SNP) が多数あり、各遺伝子がさらに幾つかのアリルへ区分されると仮定すると、*KIR* のハプロタイプの総数

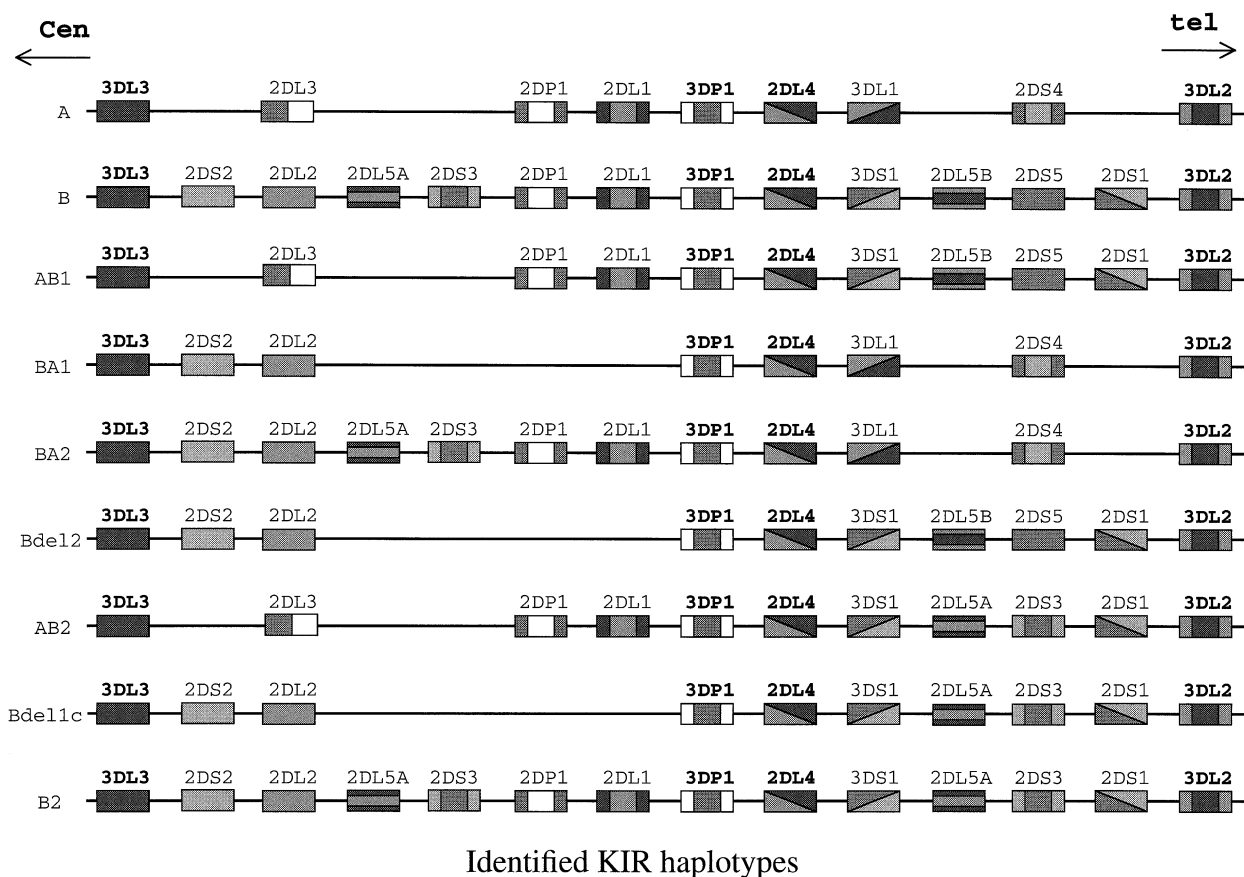


図 2

代表的な *KIR* ハプロタイプのゲノム構造を示す。遺伝子間距離は全て 2.4 kb であることに注意 (3DP1-2DL4 間のみ 14 kb)。遺伝子名が太字のものは Framework gene (3DL3, 3DP1, 2DL4, 3DL2) を表す。

は相当な物になる。この多様性は時間と共に変化する外界への適応度を高めるために進化の過程で獲得されたものと推察される。

2.2. 主要なハプロタイプ

KIR 遺伝子領域の解析が始まった当初は遺伝子型のタイピングが主な手法で、AハプロタイプとBハプロタイプ(以下それぞれA, Bと省略する)に大別されていた(25–30)。1997年, UhrbergらによってA, B両ハプロタイプが提唱された当初は, それぞれに含まれる*KIR* 遺伝子の種類を検出することはできたが, 染色体上における位置関係は不明であった(25)。ヒトゲノムの解析が進んだ2000年にはWilsonらによって, *KIR* 遺伝子領域を含むBACクローンを用いて塩基配列決定を元に遺伝子構造解析が行われ, A, Bハプロタイプに含まれる各遺伝子の配置が明らかにされた(20)。後に我々のグループにより行われた独自の同一のBACクローンの塩基配列決定, 新規タイピングシステムの構築, さらにHsuらによる家系を使った連鎖不平衡解析の結果から, Wilsonらが提唱したA, Bハプロタイプを構成する*KIR* 遺伝子の並びに注目すべき違いがあることが明らかになった(31, 32)。*KIR* 遺伝子はお互いに非常

に高い相同性を持つために, 塩基配列が決定されたBACクローンの断片でコンテイングを作成する際に正しい位置関係を把握できなかったためと思われる。後述するタイピングシステムと連鎖不平衡解析を併せ用いることで, A, Bの他のハプロタイプの存在を明らかにすることが可能となった。今までは新規の*KIR* 遺伝子を同定した際の命名法に統一性が無かったため, 2001年にCambridgeにて*KIR* polymorphism meetingを開き, その後HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC)の承認をうけて, 系統立った命名法が確立された(表1)。Aハプロタイプ中に存在する遺伝子の多くがinhibitory receptorで占められており, activatory receptorは*KIR2DS4*だけである(図2)。それに対してBはactivatory receptorが複数個存在し, 遺伝子の総数も多いのが特徴である。集団中における頻度は圧倒的にAを含む個体が多く, 我々が解析した健常人(Caucasian)と骨髄移植対象の患者, 提供者(Caucasian)合わせて300人中, 少なくともAを1本持つ個体の割合が0.92, そのうちAAホモ接合体の割合は0.40である。それに対しBではハプロタイプ頻度で0.046, 未だホモ接合体は見つかっておらず, まれなハプロタイプと

表1 Nomenclature for *KIR* genes

Symbol(Aliases)	Ig domain*	Signal	Ligand
KIR2DL1 (p58.1)	D ₁ -D ₂	Inhibition	Group 2 HLA-C alleles [¶]
KIR2DL2 (p58.2)	D ₁ -D ₂	Inhibition	Group 1 HLA-C alleles [§]
KIR2DL3 (p58)	D ₁ -D ₂	Inhibition	Group 1 HLA-C alleles
KIR2DL4 (103AS)	D ₀ -D ₂	Activation?	HLA-G?
KIR2DL5A (KIR2DL5.1)	D ₀ -D ₂	Inhibition?	
KIR2DL5B (KIR2DL5.2)	D ₀ -D ₂	Inhibition?	
KIR2DS1 (p50.1)	D ₁ -D ₂	Activation	HLA-C
KIR2DS2 (p50.2)	D ₁ -D ₂	Activation	
KIR2DS3 (nkat7)	D ₁ -D ₂	Activation	
KIR2DS4 (p50.3)	D ₁ -D ₂	Activation	
KIR2DS5 (nkat9)	D ₁ -D ₂	Activation	
KIR2DP1 (KIRZ,15)	D ₁ -D ₂	Unknown	
KIR3DL1 (p70)	D ₀ -D ₁ -D ₂	Inhibition	HLA-Bw4 (e.g. HLA-B27)
KIR3DL2 (p140)	D ₀ -D ₁ -D ₂	Inhibition	HLA-A3, -A11
KIR3DL3 (KIRC1)	D ₀ -D ₁ -D ₂	Inhibition	
KIR3DS1 (nkat10)	D ₀ -D ₁ -D ₂	Activation	HLA-B
KIR3DP1 (KIRX)	D ₀ -D ₁ -D ₂	Unknown	

*The individual extracellular Ig domains are named D₀ for the most membrane distal domain followed by D₁ and D₂

[¶] HLA-Cw2, -Cw4, -Cw5, -Cw6 (Asn77, Lys80)

[§] HLA-Cw1, -Cw3, -Cw7, Cw8 (Ser77, Asn80)

表 2 Frequency of KIR haplotype and genotype in Caucasian population

Haplotype frequency (n=300)		Genotype frequency (n=300)	
A	0.660	A/A	0.400
B	0.033	A/AB1	0.193
AB1	0.110	A/AB2	0.033
BA1	0.063	A/BA1	0.093
BA2	0.040	A/BA2	0.053
Bdel2	0.030	A/B	0.047
AB2	0.020	A/Bdel2	0.053
B2	0.027	B/BA1	0.013
Bdel1	0.010	B/BA2	0.007
Unknown	0.007	B/AB1	0.007
		BA1/BA2	0.013
		Others	0.033

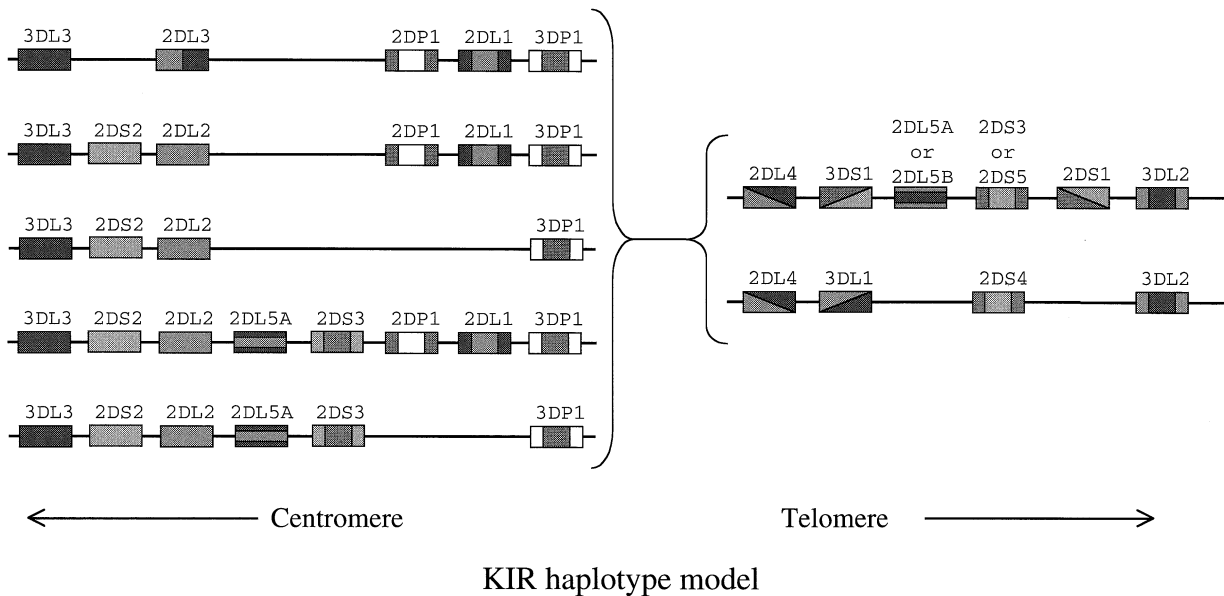


図 3

KIR ハプロタイプモデルの模式図。セントロメア側半分から 5 種類、テロメア側から 3 種類 (2DL5.1 と 2DS3、及び 2DL5.2 と 2DS5 は常に連鎖する) の部分ハプロタイプを組み合わせることで、15 種類のハプロタイプを表すことができ、現存する殆どのハプロタイプを含む。3DP1、2DL4、2DS4 遺伝子はそれぞれさらに 3DP1-long/shot、2DL4A/B、2DS4-long/short にアレリックな違いとして分別される。

言える。同集団内に見いだされた A, B 他のハプロタイプ頻度を表 2 に示す。

2.3. ハプロタイプモデル

AB1, BA1 といった他のハプロタイプは A, B と共通した遺伝子 (3DL3/3DP1/2DL4/3DL2) を全て持っており、これらの遺伝子は KIR ハプロタイプを形成する上での Frame work KIR 遺伝子と言える。この基幹となる遺伝子をもとに既知のハプロタイプを説明するためのモデルが図 3 である。3DP1 と

2DL4 の間を境界とするセントロメア側部分とテロメア側部分に 2 分され、それぞれ Frame work KIR 遺伝子である 3DL3/3DP1 と 2DL4/3DL2 に挟まれる配置をとる。上流部分、下流部分から任意のハプロタイプを組み合わせることによって、現時点で確認されているハプロタイプの殆どを説明することが可能である。非常に低い頻度でモデルに当てはまらないハプロタイプも幾つか見いだされているが、これらも全て組み替えや遺伝子重複、領域の欠落が起

こった結果として説明できる。

3. KIR ハプロタイプタイピング

3.1. タイピングの留意点

GeneBank 上に公開されたゲノム配列や、BAC クローン、HLA-homozygous Cell line (33) を用いた Long Range PCR から得られるシーケンスデータを解析することによって、現存するハプロタイプのゲノム構造が把握された。これらのハプロタイプに基づき、我々は PCR-Sequence Specific Primer (PCR-SSP) 法を用いたタイピング法を開発し、多様な個体の解析に応用している。

KIR ハプロタイプ中には 2DL5.2 遺伝子のように、異なる座位に位置するものがあるため、各遺伝子の有無だけでなく、その位置情報も合わせて得られるタイピングの系を構築する必要がある。また長期保存された臨床検体などを扱う際に DNA が量的、質的に制限される場合があり、必要最小量の DNA でハプロタイプを決定できるように方策を立てるべきである。

3.2. PCR-SSP 法

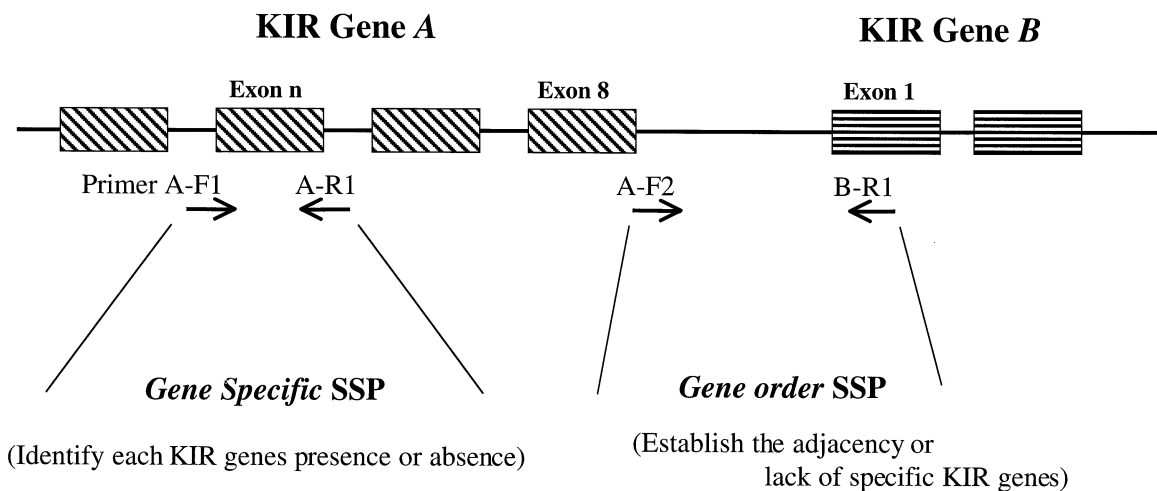
我々が構築した SSP の系は 2 種類の反応で構成されている。一つは 14 種類あるそれぞれの遺伝子の有

無を検出する “Gene Specific SSP” で、もう一方が任意の遺伝子とその前後に連なって位置する遺伝子を検出する “Gene Order SSP” である。Gene Specific SSP は任意のエクソン内に存在する遺伝子特異的な一塩基置換 (SNP) をそれぞれの KIR 遺伝子の cDNA 配列同士を比較して選び出し、プライマーの設計を行う。Gene Order SSP では、ある KIR 遺伝子の 3' 領域に近い部分に特異的な配列と、その下流に存在可能な遺伝子の 5' 領域に特異的な配列をプライマーに利用し、“特定の遺伝子間”を増幅する(図 4)。両方の SSP とも SNP 以外にも数 bp 程度の欠損も同様にプライマーの 3' 端に利用できる。KIR 遺伝子領域において、遺伝子間の距離は 2.4 kb 程度 (KIR3DP1 と 2DL4 間を除く) であるため、通常の PCR 条件で十分増幅可能である。

Gene Specific SSP, Gene Order SSP とともに 24 種類の SSP 反応から構成されており、計 48 個の反応を行うことによって、一個体の KIR ハプロタイプが決定される(図 5)。

3.3. アリルレベルでの変異

14 個の KIR 遺伝子の幾つかはさらに細かくタイピングすることが可能である。例として 2DL4 は特異的な SNP が dimorphic (consensus 配列を含むと tri-

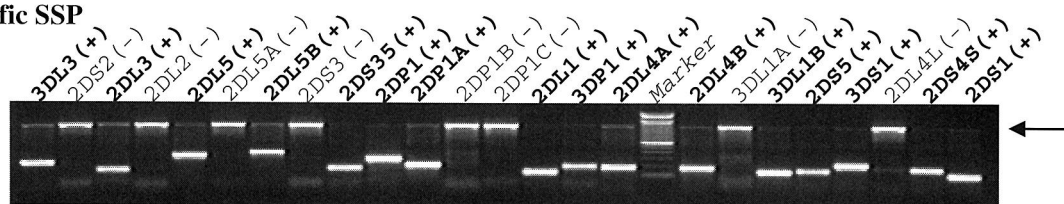


Schematic draw of KIR SSP typing

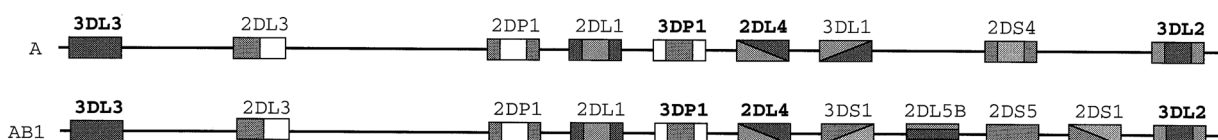
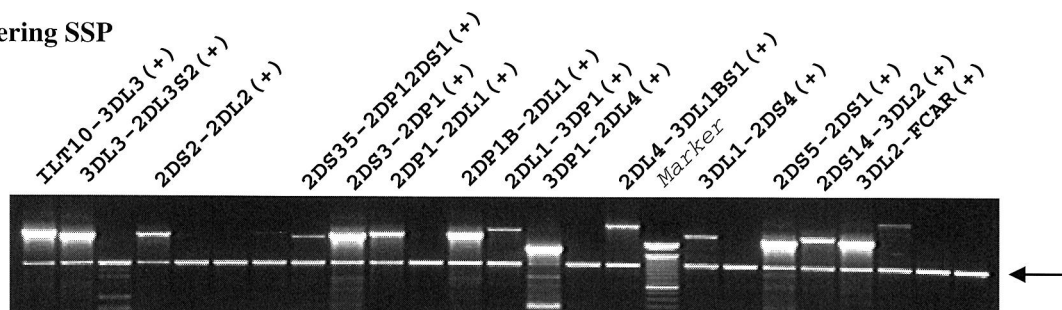
図 4

Gene Specific SSP, Gene Order SSP の模式図。Gene Specific SSP では任意のエクソン内に存在する SNP を利用してプライマーを設計する (Primer A-F1, Primer A-R1)。24 種類の PCR 反応から構成され、増幅産物はほぼ 500 bp 以下である。Gene Order SSP では KIR 遺伝子 A の 3'UTR に近い部分、及びその下流にあると予測される KIR 遺伝子 B の 5'UTR に近い部分にプライマーを設定する。24 種類の PCR 反応から構成され、増幅産物は 1~2 kb である。

Gene Specific SSP



Gene Ordering SSP



Result of KIR typing

図 5

実際の KIR ハプロタイプタイピングの一例を示す。両方の SSP ともアガロースゲル電気泳動 (Gene Specific SSP は 1.5%, Gene Oder SSP は 1.0% ゲル濃度) で解析した。矢印は内部コントロールのバンドを示す。Marker は 100 bp ladder を使用した。上段は Gene Specific SSP をアガロースゲル電気泳動で解析した写真。各レーンの上にそれぞれの反応で特異的に検出される遺伝子名を示す。太字がポジティブと判定される反応。下段は Gene Order SSP を同様に解析したもので、ポジティブと判定される反応のみ写真上に遺伝子の組み合わせを記した。ILT-10, FcaR は KIR 遺伝子領域の外側に位置する最も近い遺伝子。

Gene Specific SSP の結果から各 KIR 遺伝子の有無を判断し、図 2 に示したハプロタイプの中から、考えられる組み合わせの候補をあげ、Gene Order SSP の結果に矛盾しないかどうかを確認する。例に挙げた個体は、ハプロタイプ A と AB1 のヘテロ接合体と決定される。

morphic) になっており、2DLAA と 2DLAB に大別される。また偽遺伝子の 2DP1 や 3DP1 では、遺伝子中に数十 bp の欠損があり、2DP1-short, -long のように区分できる。

点突然変異や相同組み替えによって生じたアレルの多型は 14 個全ての KIR 遺伝子で同定されている (34-41)。アレルレベルでの多型が、KIR 領域のゲノム構造の多様化に大きく寄与してきた事は明らかで、実際アレルレベルの多型も考慮してより厳密なタイピングを行うと KIR2DL1, -2DL3, -3DL1, -3DL2 の変異体だけで 22 種類の A ハプロタイプに

分類することができる。この場合、非血縁関係にある 2 つの個体が同一のハプロタイプを共有する確率は 0.24% に過ぎない (34)。

KIR 遺伝子において DNA 多型と遺伝子の機能の関係は未だ明らかにされていない。KIR2DL5 遺伝子プロモーター領域の多型が発現レベルに影響するとした例が報告されているが、おそらく転写因子 AML1 の結合に関わるものと予測されている (42)。コーディング領域に存在する多くの変異が KIR 分子の機能に及ぼす影響はまだ不明である。inhibitory KIR 分子が HLA class I と相互作用するとき重要

と考えられているアミノ酸残基は *KIR* 遺伝子群の中で高度に保存されている (43, 44)。免疫グロブリン様ドメインのループ部分に高頻度で見られる多型は、*KIR* 分子のリガンドに対するアフィニティへ影響すると予測され、その影響の程度を調節するために存在すると考えられる。

4. *KIR* と疾患、骨髄移植

KIR と疾患に関する最近の知見として、今までその役割が不明であった activatory *KIR* 分子と疾患との関連が幾つかあげられている。まず *KIR3DS1* と HLA-B (Bw4-80Ile) の組み合わせが、HIV-1 陽性者集団で AIDS 発症までの無病期間が長い個体集団との間で関連することが明らかにされた (45)。この結果は *Bw4-80Ile* アリルが *KIR3DS1* のリガンドとして働いていることを示唆し、また *HLA-Bw4* ホモ接合体が HIV-1 感染者の AIDS 発症に負の相関があることを示した先行研究 (46) とも一致する。さらに自己免疫疾患とのつながりも報告されている。CD4⁺CD28^{null} 細胞上における *KIR2DS2* の発現と rheumatoid vasculitis の発症に関連がみられ (47)、同様に *KIR2DS1* と *KIR2DS2* の有無が psoriatic arthritis や psoriasis に伴う inflammatory arthritis と関連していることも示された (48)。後者の研究において特記すべきは、疾患との関連が inhibitory *KIR* 分子の HLA リガンド (HLA-C) が存在しないときに限って有意にみられることである。これらの疫学的研究の結果は、activating *KIR* の HLA class I 特異性と、inhibitory *KIR* による抑制されている NK 細胞の活性化を担っている可能性を裏付けているのかもしれない。NK 細胞内へ伝達される正と負のシグナルのバランスが、疾患の発症機序にどのような影響を及ぼしているのかを明らかにするために、*KIR* 分子の様々な疾患における疫学的研究がさらに期待される。

NK 活性を調節する遺伝的素因が異なるマウスの系で、NK 細胞は骨髄移植における移植片の拒絶に関わっていると示唆されてきた (49)。ヒトにおいては、recipient-donor 間での *KIR* 分子のミスマッチが急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia: AML)

患者の再発の危険性を増大させていることが最近報告された (50)。この結果からは *KIR* 分子のミスマッチが移植片対白血病細胞 (graft versus leukemia: GVL) 効果にだけでなく、移植片対宿主 (graft versus host: GVH) 効果や移植片の拒絶 (graft rejection) に関与していないように思われる。しかし、graft rejection に関しては、我々のグループで *KIR* ハプロタイプのミスマッチと非血縁の骨髄移植における拒絶との間に相関を示すデータが得られている (51)。我々のグループでは非血縁の骨髄移植を受けた慢性骨髄性白血病 (chronic myeloid leukemia: CML) 患者とドナー間での *KIR* ハプロタイプの分布に相違があるかどうかを調べた。31 組の移植片が拒絶された組を case とし、対照群として 62 組の移植片拒絶を起こさなかった組を用いて、*KIR* のタイピングを行った。conditional logistic regression model を用いて統計学的解析を行い、両群で *KIR* ハプロタイプの分布の偏向を比較したところ、ハプロタイプが全く異なる (例 患者 *KIR* が A/B, ドナーが AB1/BA1) recipient-donor の組が case 群において、有意に多くなっていることが確認された。単一の SNP ではほとんど相関が検出されない場合でも、SNP を組み合わせてハプロタイプとするとより効率的な検出が可能なのは今までの HLA 領域の解析に多くの実例がある。同様に 14 種類の *KIR* 遺伝子を個々に調べるよりも、ハプロタイプを単位として *KIR* 遺伝子のトータルな寄与の度合いを考慮した解析のほうが、統計学的な検出力も上がり、より有効な解析手法となりうるだろう。

5. 今後の展望

免疫グロブリン様受容体遺伝子として、*KIR* 分子群はその多様に渡る多型性とゲノム構造の大きな違いを特徴に種を越えて進化を遂げてきた。多くの遺伝子に関してリガンド特異性は未だ明らかではないが、これらの受容体が自然免疫、獲得免疫応答の際に重要な役割を果たしている事は容易に想像がつく。自己免疫疾患や感染症疾患感受性遺伝子として *KIR* 遺伝子をとらえた研究が報告され、*KIR* 遺伝子産物が HLA class I アロ抗原と相互作用していることも予測されるようになった。つまり異物が生体内で免

疫機構に認識される過程を、新しい側面から解釈しうる可能性が得られたと言える。またNK細胞が同種造血幹細胞移植の場面において果たす役割は多大であり、*KIR* 遺伝子の一致不一致が、移植片生着やGVL、再発といった現象に関与しているだろう。Martinらの研究で*HLA-Bw4*, *KIR3DS1* 単独では相関がみられなくとも、両者を組み合わせた疫学的アプローチを行うことで新たに有意な相関を検出できることが示された(45)。すなわち免疫応答に関与する遺伝子の中でも特に高い多様性を持つ*KIR* 遺伝子と*HLA* 遺伝子、両者のタイピングを組み合わせた疫学的研究に大きな将来性、可能性を感じさせるものである。簡便かつ正確な*KIR* 遺伝子のタイピングシステムが構築された今日、疾患との関連のみならず、ゲノム構造の進化や人種間の差異の解析など、様々な分野において強力なツールとして汎用されることが期待される。

引用文献

1. Biron, C. A., K. B. Nguyen, G. C. Pien, L. P. Cousens, and T. P. Salazar-Mather. 1999. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annual Review of Immunology* 17: 189.
2. Biron, C. A., and L. Brossay. 2001. NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. *Current Opinion in Immunology* 13: 458.
3. Long, E. O. 1999. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annual Review of Immunology* 17: 875.
4. Lanier, L. L. 1998. NK cell receptors. *Annual Review of Immunology* 16: 359.
5. Raulet, D. H., R. E. Vance, and C. W. McMahon. 2001. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annual Review of Immunology* 19: 291.
6. Ljunggren, H. G., and K. Karre. 1990. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition.[comment]. *Immunology Today* 11: 237.
7. Ljunggren, H. G., K. Sturmhofel, E. Wolpert, G. J. Hammerling, and K. Karre. 1990. Transfection of beta 2-microglobulin restores IFN-mediated protection from natural killer cell lysis in YAC-1 lymphoma variants. *Journal of Immunology* 145: 380.
8. Hoglund, P., H. G. Ljunggren, K. Karre, and G. Jay. 1990. Role of major histocompatibility complex class-I molecules in tumor rejection. New insights from studies with synthetic peptides and transgenic mice. *Immunologic Research* 9: 298.
9. Diefenbach, A., E. R. Jensen, A. M. Jamieson, and D. H. Raulet. 2001. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 413: 165.
10. Diefenbach, A., A. M. Jamieson, S. D. Liu, N. Shastri, and D. H. Raulet. 2000. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages.[comment]. *Nature Immunology* 1: 119.
11. Cerwenka, A., C. A. O'Callaghan, J. A. Hamerman, R. Yadav, W. Ajayi, D. C. Roopenian, S. Joyce, and L. L. Lanier. 2002. Cutting edge: the minor histocompatibility antigen H60 peptide interacts with both H-2Kb and NKG2D. *Journal of Immunology* 168: 3131.
12. Cerwenka, A., J. L. Baron, and L. L. Lanier. 2001. Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 11521.
13. Karlhofer, F. M., R. K. Ribaldo, and W. M. Yokoyama. 1992. MHC class I alloantigen specificity of Ly-49 + IL-2-activated natural killer cells.[comment]. *Nature* 358: 66.
14. Wagtmann, N., R. Biassoni, C. Cantoni, S. Verdiani, M. S. Malnati, M. Vitale, C. Bottino, L. Moretta, A. Moretta, and E. O. Long. 1995. Molecular clones of the p58 NK cell receptor re-

- veal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains. *Immunity* 2: 439.
15. Colonna, M., and J. Samaridis. 1995. Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. [comment]. *Science* 268: 405.
 16. D'Andrea, A., C. Chang, K. Franz-Bacon, T. McClanahan, J. H. Phillips, and L. L. Lanier. 1995. Molecular cloning of NKB1. A natural killer cell receptor for HLA-B allotypes. *Journal of Immunology* 155: 2306.
 17. Barten, R., M. Torkar, A. Haude, J. Trowsdale, and M. J. Wilson. 2001. Divergent and convergent evolution of NK-cell receptors. *Trends in Immunology* 22: 52.
 18. Trowsdale, J. 2001. Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. [comment]. *Immunity* 15: 363.
 19. Makrigiannis, A. P., A. T. Pau, P. L. Schwartzberg, D. W. McVicar, T. W. Beck, and S. K. Anderson. 2002. A BAC contig map of the Ly49 gene cluster in 129 mice reveals extensive differences in gene content relative to C57BL/6 mice. *Genomics* 79: 437.
 20. Wilson, M. J., M. Torkar, A. Haude, S. Milne, T. Jones, D. Sheer, S. Beck, and J. Trowsdale. 2000. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 4778.
 21. Barten, R., and J. Trowsdale. 1999. The human Ly-49L gene. *Immunogenetics* 49: 731.
 22. Campbell, K. S., M. Cella, M. Carretero, M. Lopez-Botet, and M. Colonna. 1998. Signaling through human killer cell activating receptors triggers tyrosine phosphorylation of an associated protein complex. *European Journal of Immunology* 28: 599.
 23. Katz, G., G. Markel, S. Mizrahi, T. I. Arnon, and O. Mandelboim. 2001. Recognition of HLA-Cw4 but not HLA-Cw6 by the NK cell receptor killer cell Ig-like receptor two-domain short tail number 4. *Journal of Immunology* 166: 7260.
 24. Gomez-Lozano, N., C. M. Gardiner, P. Parham, and C. Vilches. 2002. Some human KIR haplotypes contain two KIR2DL5 genes: KIR2DL5A and KIR2DL5B. *Immunogenetics* 54: 314.
 25. Uhrberg, M., N. M. Valiante, B. P. Shum, H. G. Shilling, K. Lienert-Weidenbach, B. Corliss, D. Tyan, L. L. Lanier, and P. Parham. 1997. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 7: 753.
 26. Valiante, N. M., M. Uhrberg, H. G. Shilling, K. Lienert-Weidenbach, K. L. Arnett, A. D'Andrea, J. H. Phillips, L. L. Lanier, and P. Parham. 1997. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 7: 739.
 27. Crum, K. A., S. E. Logue, M. D. Curran, and D. Middleton. 2000. Development of a PCR-SSOP approach capable of defining the natural killer cell inhibitory receptor (KIR) gene sequence repertoires. *Tissue Antigens* 56: 313.
 28. Norman, P. J., H. A. Stephens, D. H. Verity, D. Chandanayingyong, and R. W. Vaughan. 2001. Distribution of natural killer cell immunoglobulin-like receptor sequences in three ethnic groups. *Immunogenetics* 52: 195.
 29. Toneva, M., V. Lepage, G. Lafay, N. Dulphy, M. Busson, S. Lester, A. Vu-Trien, A. Michaylova, E. Naumova, J. McCluskey, and D. Charron. 2001. Genomic diversity of natural killer cell receptor genes in three populations. *Tissue Antigens* 57: 358.
 30. Witt, C. S., C. Dewing, D. C. Sayer, M. Uhrberg, P. Parham, and F. T. Christiansen. 1999. Population frequencies and putative haplotypes of the killer cell immunoglobulin-like receptor sequences and evidence for recombination. [com-

- ment]. *Transplantation* 68: 1784.
31. Gassner, C., S. Chida, T. Yamashita, L. M. Williams, and D. E. Geraghty. 2002 Sequencing of a complete long KIR haplotype from chromosome 19: a derivation of tools for the precise identification of KIR haplotypes from genomic DNA. *Genomics* in press
 32. Hsu, K. C., X. R. Liu, A. Selvakumar, E. Mickelson, R. J. O'Reilly, and B. Dupont. 2002. Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *Journal of Immunology* 169: 5118.
 33. Yang, S.Y., E. Milford, U. Hammerling, B. Dupont. 1989 Description of the reference panel of B-lymphoblastoid cell lines for factors of the HLA system: the B-cell line panel designed for the Tenth International Histocompatibility Workshop. *Immunobiology of HLA; Dupon, B. ed* 11–19.
 34. Shilling, H. G., L. A. Guethlein, N. W. Cheng, C. M. Gardiner, R. Rodriguez, D. Tyan, and P. Parham. 2002. Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype. *Journal of Immunology* 168: 2307.
 35. Steffens, U., Y. Vyas, B. Dupont, and A. Selvakumar. 1998. Nucleotide and amino acid sequence alignment for human killer cell inhibitory receptors (KIR), 1998. *Tissue Antigens* 51: 398.
 36. Gardiner, C. M., L. A. Guethlein, H. G. Shilling, M. Pando, W. H. Carr, R. Rajalingam, C. Vilches, and P. Parham. 2001. Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polymorphism. *Journal of Immunology* 166: 2992.
 37. Vilches, C., M. J. Pando, R. Rajalingam, C. M. Gardiner, and P. Parham. 2000. Discovery of two novel variants of KIR2DS5 reveals this gene to be a common component of human KIR 'B' haplotypes. *Tissue Antigens* 56: 453.
 38. Rajalingam, R., C. M. Gardiner, F. Canavez, C. Vilches, and P. Parham. 2001. Identification of seventeen novel KIR variants: fourteen of them from two non-Caucasian donors. *Tissue Antigens* 57: 22.
 39. Chwae, Y. J., S. E. Cho, S. J. Kim, and J. Kim. 1999. Diversity of the repertoire of p58 killer cell inhibitory receptors in a single individual. *Immunology Letters* 68: 267.
 40. Vyas, Y., A. Selvakumar, U. Steffens, and B. Dupont. 1998. Multiple transcripts of the killer cell immunoglobulin-like receptor family, KIR3DL1 (NKB1), are expressed by natural killer cells of a single individual. *Tissue Antigens* 52: 510.
 41. Kwon, D., Y. J. Chwae, I. H. Choi, J. H. Park, S. J. Kim, and J. Kim. 2000. Diversity of the p70 killer cell inhibitory receptor (KIR3DL) family members in a single individual. *Molecules & Cells* 10: 54.
 42. Vilches, C., C. M. Gardiner, and P. Parham. 2000. Gene structure and promoter variation of expressed and nonexpressed variants of the KIR2DL5 gene. *Journal of Immunology* 165: 6416.
 43. Snyder, G. A., A. G. Brooks, and P. D. Sun. 1999. Crystal structure of the HLA-Cw3 allotype-specific killer cell inhibitory receptor KIR2DL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 3864.
 44. Fan, Q. R., E. O. Long, and D. C. Wiley. 2001. Crystal structure of the human natural killer cell inhibitory receptor KIR2DL1-HLA-Cw4 complex. [comment]. *Nature Immunology* 2: 452.
 45. Martin, M. P., X. Gao, J. H. Lee, G. W. Nelson, R. Detels, J. J. Goedert, S. Buchbinder, K. Hoots, D. Vlahov, J. Trowsdale, M. Wilson, S. J. O'Brien, and M. Carrington. 2002. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progres-

- sion to AIDS. *Nature Genetics* 31: 429.
46. Flores-Villanueva, P. O., E. J. Yunis, J. C. Delgado, E. Vittinghoff, S. Buchbinder, J. Y. Leung, A. M. Uglialoro, O. P. Clavijo, E. S. Rosenberg, S. A. Kalams, J. D. Braun, S. L. Boswell, B. D. Walker, and A. E. Goldfeld. 2001. Control of HIV-1 viremia and protection from AIDS are associated with HLA-Bw4 homozygosity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 5140.
47. Yen, J. H., B. E. Moore, T. Nakajima, D. Scholl, D. J. Schaid, C. M. Weyand, and J. J. Goronzy. 2001. Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. *Journal of Experimental Medicine* 193: 1159.
48. Martin, M. P., G. Nelson, J. H. Lee, F. Pellett, X. Gao, J. Wade, M. J. Wilson, J. Trowsdale, D. Gladman, and M. Carrington. 2002. Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles. *Journal of Immunology* 169: 2818.
49. Yu, Y. Y., V. Kumar, and M. Bennett. 1992. Murine natural killer cells and marrow graft rejection. *Annual Review of Immunology* 10: 189.
50. Ruggeri, L., M. Capanni, E. Urbani, K. Perruccio, W. D. Shlomchik, A. Tosti, S. Posati, D. Rogaia, F. Frassoni, F. Aversa, M. F. Martelli, and A. Velardi. 2002. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. [comment]. *Science* 295: 2097.

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.

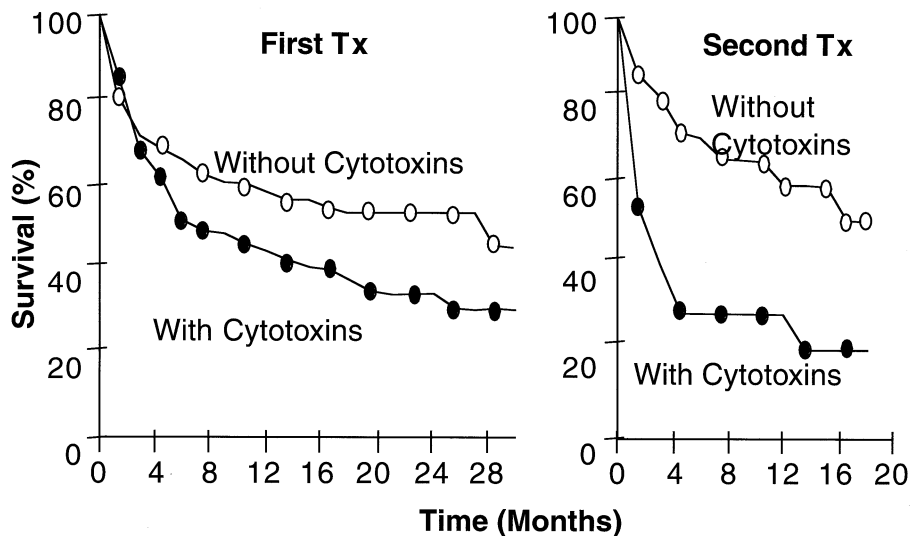


Figure 1. Terasaki PI, Kreisler M, Mickey RM. Postgraduate Medical Journal 1971; 47: 89-100.

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

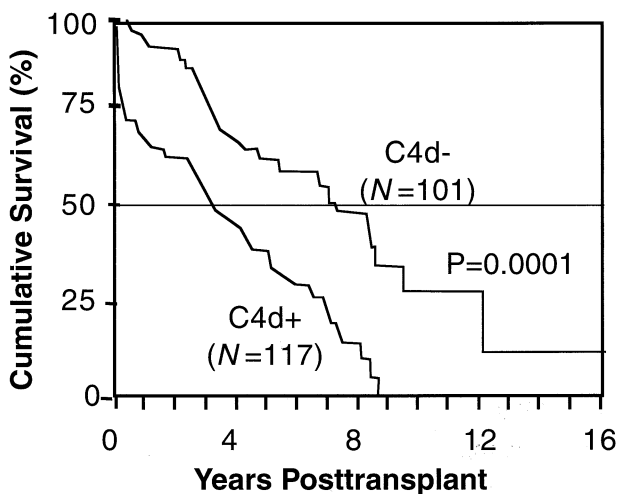


Figure 2. Lederer, et al. *Kidney International* 59: 334–341, 2001 This is the best evidence that antibodies adhered to kidneys as shown by detection of c4d will result in early loss of kidney transplants

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

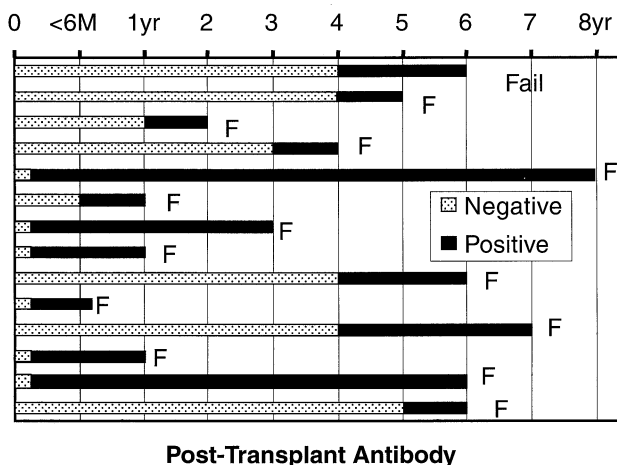


Figure 3. 14 patients who did not have antibodies pre transplantation subsequently developed antibodies as shown by the dark bars. It can be seen that AFTER this development of antibodies all these graft had chronic rejection failures. Often, antibodies do not cause immediate failure of grafts. This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

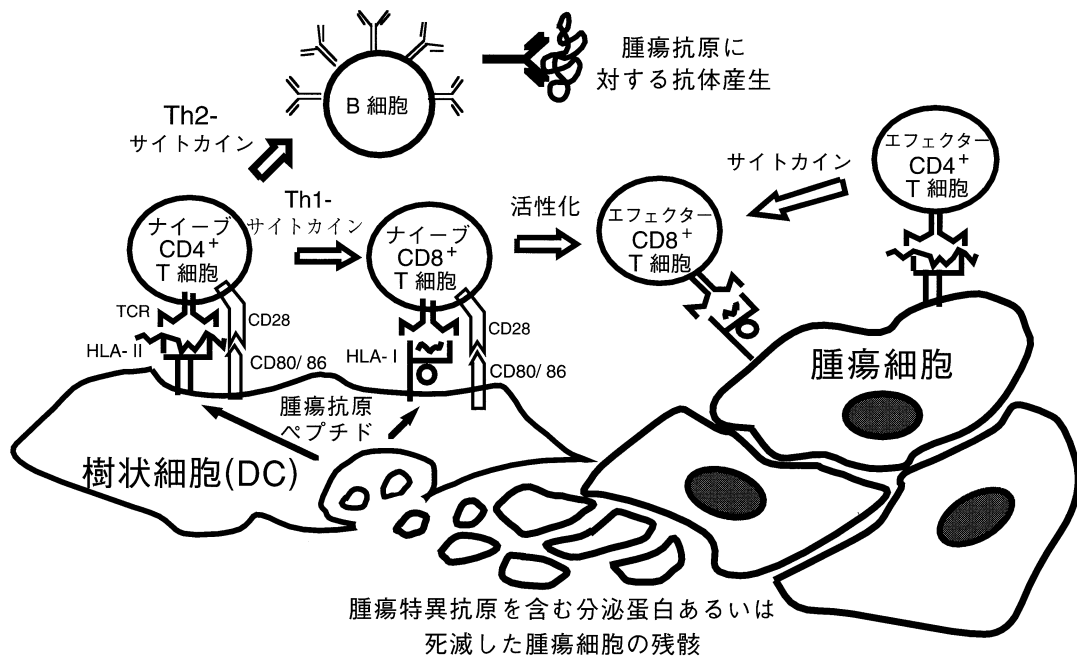


図1 HLA・腫瘍抗原ペプチド複合体を認識したT細胞による腫瘍細胞の排除

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

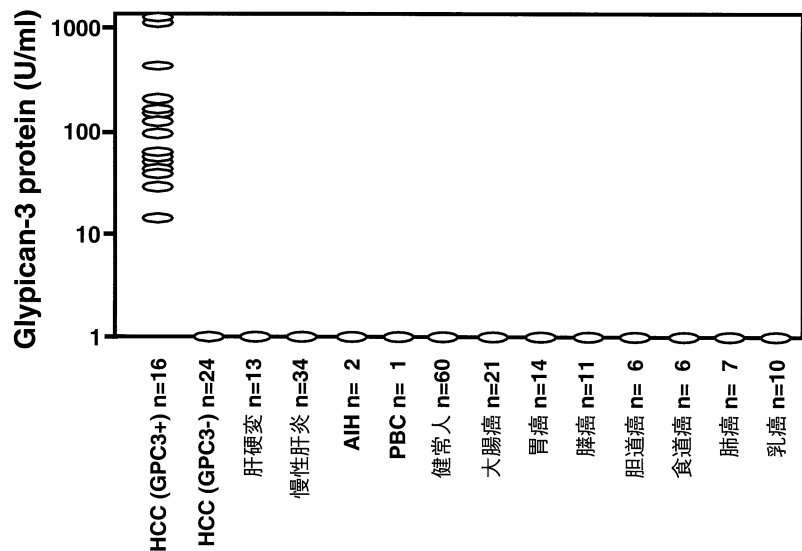


図 2 血清 GPC3 蛋白は肝細胞癌の腫瘍マーカーになりうる

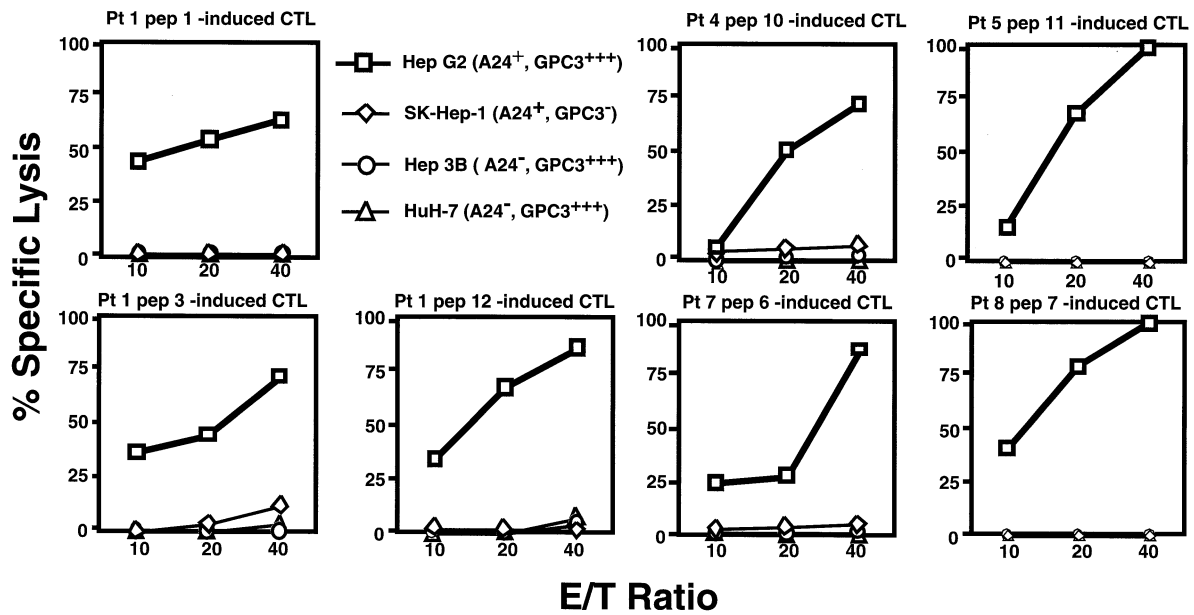


図 3 HLA-A24 結合モチーフを持つ GPC3 ペプチドで、末梢血単核細胞を刺激して誘導した多数の CTL 株が、HLA-A24 陽性で GPC3 を高発現する肝細胞癌細胞株 Hep G2 に対して特異的な細胞傷害活性を示した

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上に当該導入抗原に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) エピ

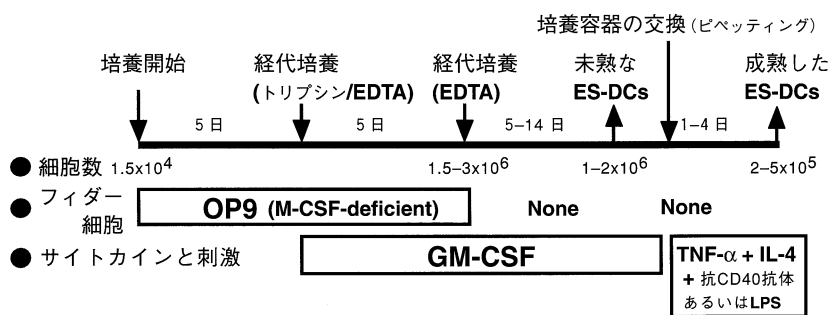


図4 *in vitro* におけるマウスES細胞からの樹状細胞(DC)の分化誘導法

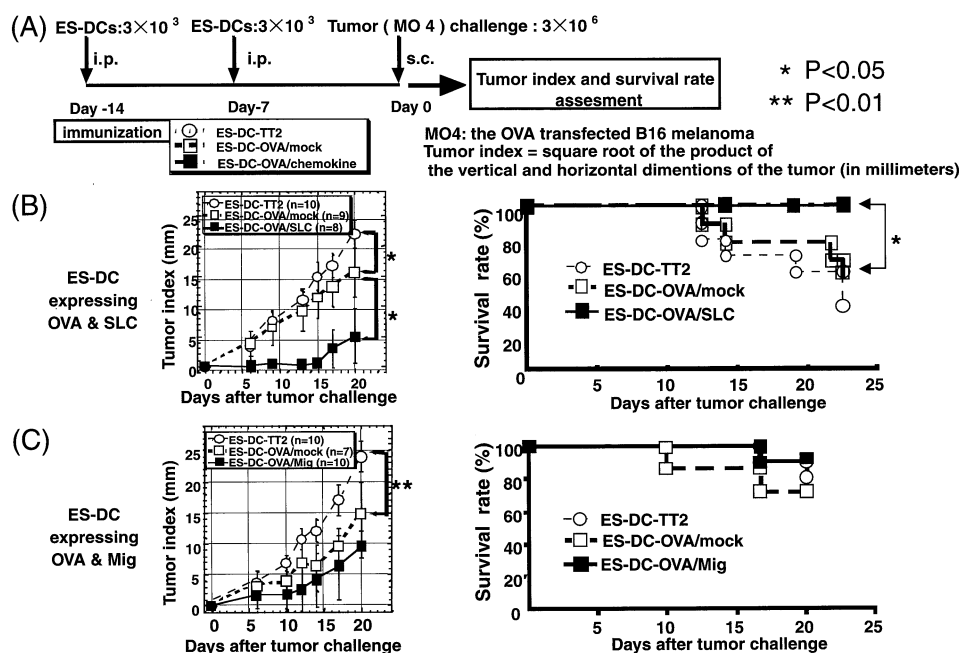


図5 OVA およびケモカイン SLC 遺伝子を発現する ES-DC の *in vivo* 投与による、OVA 発現メラノーマの増殖抑制

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。

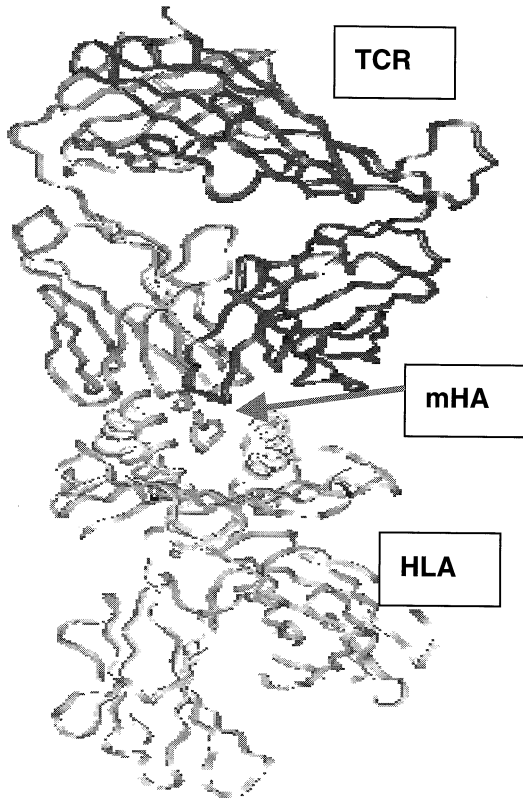
主要組織適合性抗原以外の「他の抗原」のうち、抗原ペプチドとして提示されアロ免疫反応を引き起こす多型性をマイナー組織適合性抗原 (mHA) と定義している。

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

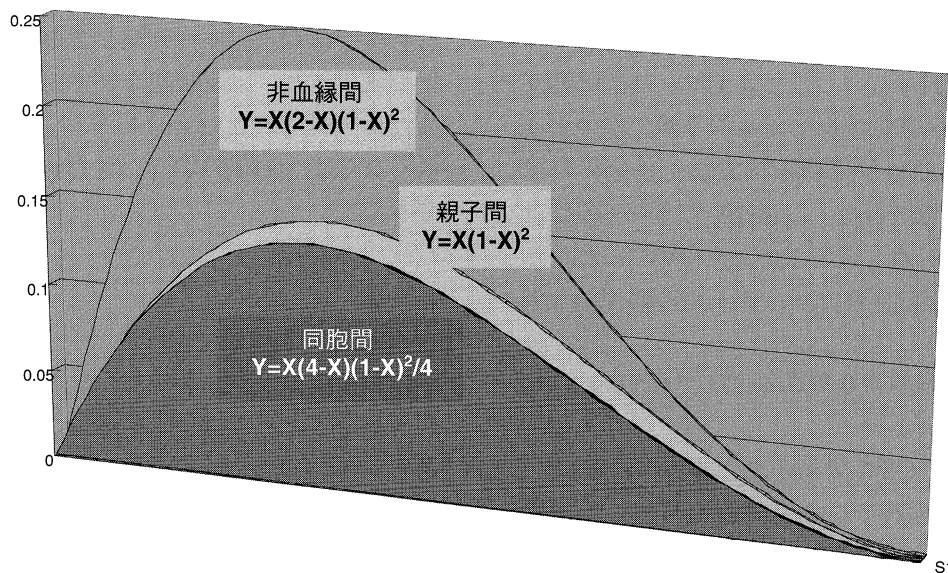


図1 マイナー組織適合性抗原の不適合確率

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

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(アレル)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 効果が高く認められる。
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。

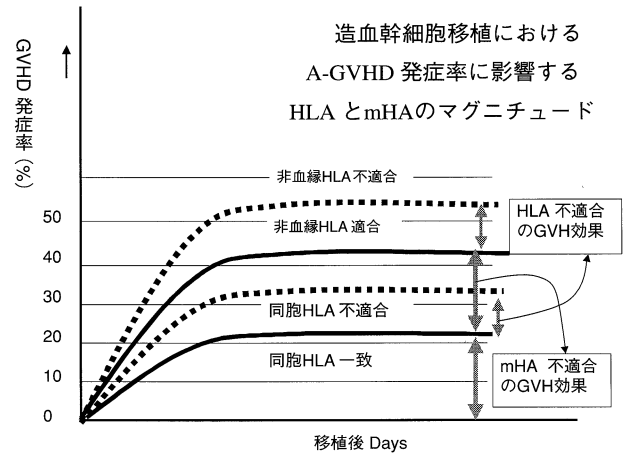


図 2

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。

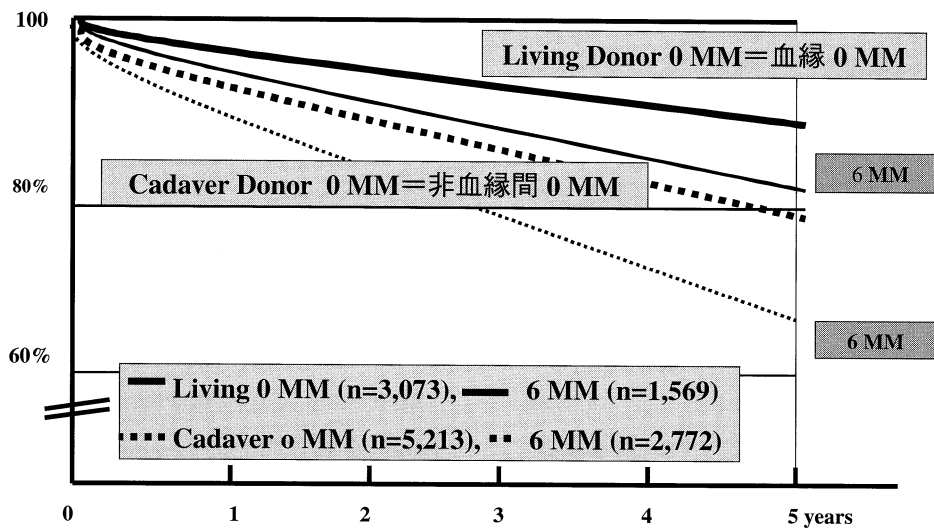


図3 腎移植におけるHLA適合効果=マイナー組織適合性抗原適合効果？
UNOS, USA, 1999

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 教授の開発した 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	

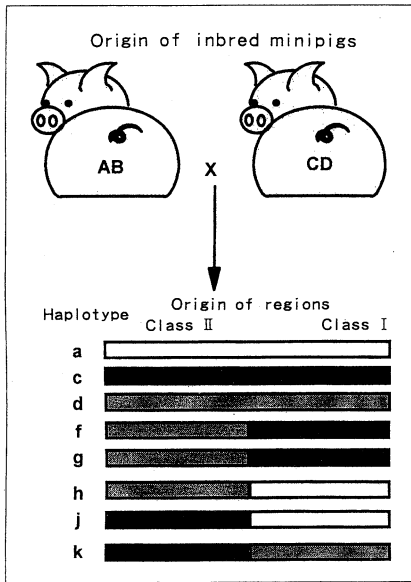


図 1 Miniature swine の主要組織適合性抗原(MHC)の表現型

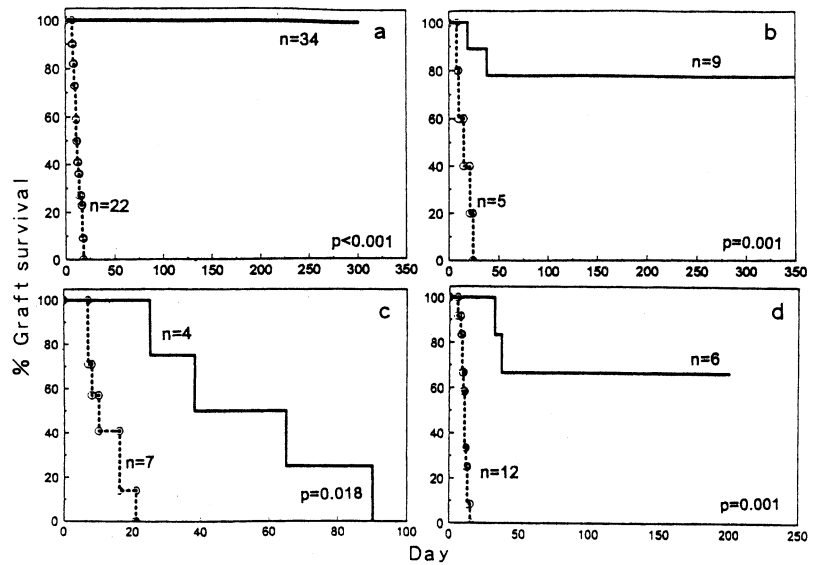


図 2 ドナー・レシピエント MHC の適合と miniature swine 同種移植腎生着率 ——— CYA 投与群, …… 無投与群

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)

日本組織適合性学会誌 MHC の投稿規定

1. 投稿規定

1.1. 原稿様式

提出原稿がそのまま電算写植で印刷できるように、原稿は全て、コンピューターのフロッピーディスクとA4サイズでプリントアウトしたものの両者を提出する。ソフトはMSWordとする。字体、サイズ、行の字数、行間、などの体裁は自由とする。また、図表については、写植でそのまま掲載できるものを提出するが、挿入箇所を本文に指定する。図については天地を明示する。印刷の際に、縮小または拡大する場合があるので、考慮すること。また、図表の題や説明はワードで、本文とは別頁に添付する。なお、掲載された論文等の著作権は、日本組織適合性学会に属し、インターネットを通じて電子配信されることがあります。

1.2. 原著論文

会員からの投稿を原則とするが、編集委員会が依頼することもありうる。日本語、英語を問わない。最初の一頁はタイトルページとし、タイトル、著者名、所属、脚注として代表者とその連絡先(電話、FAX、E-mail、郵便番号、住所)を記す。タイトル、著者名、所属は次の様式にしたがう。

Nucleotide sequence for a Cw8 subtype, Cw8N, and its association with HLA-B alleles. Fumiaki Nakajima¹⁾, Yoshihide Ishikawa²⁾, Junko Nakamura¹⁾, Toshio Okano¹⁾, Chieko Mori¹⁾, Toshikazu Yokota¹⁾, Ling Lin^{2) 3)}, Katsushi Tokunaga¹⁾ and Takeo Juji¹⁾

- 1) Kanagawa Red Cross Blood Center, Kanagawa, Japan
- 2) Department of Research, Japan Red Cross Central Blood Center, Tokyo, Japan
- 3) Department of Transfusion and Immunohematology, University of Tokyo, Tokyo, Japan

HLA-Cw8 のサブタイプ “Cw8N” の塩基配列および

HLA-B 座との関連分析

中島 文明¹⁾, 石川 善英²⁾, 中村 淳子¹⁾, 岡野 俊生¹⁾, 森 知恵子¹⁾, 横田 敏和¹⁾, 林 玲^{2) 3)}, 徳永 勝士²⁾, 十字 猛夫²⁾

- 1) 神奈川県赤十字センター, 検査課,
- 2) 日本赤十字中央血液センター, 研究一課,
- 3) 東京大学医学部附属病院, 輸血部,

内容は二頁目よりはじめ、要約 (Summary), はじめに (Introduction), 材料と方法 (Materials and Methods), 結果 (Results), 考察 (Discussion), 参考文献 (References) の順に記載する。また、要約の末尾に日本語で5語以内のキーワードを加える(英文の場合には英語の Key words を加える)。脚注は適宜、設けてもよい。日本語で投稿の場合には、末尾に英語のタイトル、著者名、所属(様式は上述に従う)、英語の要約と英語で5語以内の Key words をつける。枚数に特に指定はないが、速報的な短報(全体で、2,000~3,000字、出来上りA4版で2~4枚程度)を中心とする。もちろん、full articleも歓迎する。また、新対立遺伝子、日本人に認められた希な対立遺伝子に関する報告も受け付ける。なお、参考文献 (References) の記載については、下記 1.5 を参照すること、オリジナル1部にコピー3部を添えて、編集長宛(下記3参照)に送付する。

1.3. 総説, シリーズその他

編集委員会からの依頼を原則とするが、会員からの投稿も大いに歓迎する。日本語を原則とする。タイトル、著者名、所属は上記 1.2. の通りにしたが、要約と要約の末尾に日本語で5語以内のキーワードを添える。その他の体裁は自由とするが、構成がいくつかの章、節などから成る場合には、次の番号に従い、適当な見出しを添える。

1. 2. 3. 4. ………

1.1. 1.2. 1.3. ………

1.1.1. 1.1.2. 1.1.3. ………

脚注は適宜，設けてもよい。なお，参考文献(References)の記載については，下記1.2.を参照すること。

1.4. 校正

校正は編集委員が行い，特別な場合を除き，執筆者は校正を行わない。

1.5. 参考文献

参考文献は，本文中に数字で，例えば(3)，の様に表示し，末尾にまとめて，次のようなスタイルで記載する。ただし，著者名，または編集者名は，筆頭3名まで記載し，以下は省略する。

1. Komatsu-Wakui M, Tokunaga K, Ishikawa Y, *et al.*: Wide distribution of the MICA-MICB null haplotype in East Asian. *Tissue Antigens* **57** (1): 1–8, 2001.
2. Tokunaga K, Imanishi T, Takahashi K, *et al.*: On the origin and dispersal of East Asian populations as viewed from HLA haplotypes. *Prehistoric Mongoloid Dispersals* (eds. Akazawa T, Szathmary

EJ), Oxford University Press, p. 187–197, 1996.

3. 徳永勝士，尾本恵市，藤井康彦ら：HLAに連鎖した遺伝標識に関するハプロタイプ調査，移植，**18**: 179–189, 1983.
4. 徳永勝士，大橋 順：疾患遺伝子の探索．わかる実験医学シリーズ「ゲノム医学がわかる」(菅野純夫編)，羊土社，p. 48–55, 2001.

2. 別刷

原著論文については，別刷は有料とする。その費用は部数，頁数による。

3. 原稿送付先

〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1
東京大学大学院医学系研究科
人類遺伝学分野
日本組織適合性学会誌 MHC
編集長 徳永 勝士

TEL: 03-5841-3692

FAX: 03-5802-2907

E-mail: tokunaga@m.u-tokyo.ac.jp

編集委員長挨拶

この度、猪子英俊 前編集長から日本組織適合性学会誌 MHC の編集長を引き継ぎました。猪子先生には草創間もない MHC 誌を軌道に乗せて 8 年間もの長きに渡り順調に発刊され、誠に御苦労さまでした。深く感謝いたします。

近年、組織適合性研究の潮流に変化が生じているように思われます。これまでは主要組織適合性抗原としての HLA 型の検査を如何に正確に行うか、そしてその HLA 型と移植成績や疾患感受性との関連を明らかにすることに大きな力が注がれ、HLA 遺伝子群の DNA タイピング技術が急速に発展しました。勿論これらは今後も続く課題ですが、今や、移植に際して許容される HLA のミスマッチ、マイナー組織適合性抗原の探索、拒絶反応や GVHD の分子機構といった課題の比重が増してくるとともに、NK レセプターとの相互作用、がん免疫、再生医学、ゲノム多様性と進化など、組織適合性に関連する分野はますますの広がりを見せています。MHC 誌がこのような潮流を共有する良い場となるよう、編集委員一同力を合わせてゆきたいと思えます。また、MHC が速報誌としての役割を果たすとともに、特に若手の学会員にとって論文発表の経験を積む機会を提供できるよう切に願っています。学会員の皆様には従来にも増して積極的な御投稿をお願いいたします。

幸い、猪子先生をはじめ、これまでの編集委員の先生には引き続き MHC の編集に御尽力いただき、

また新たに、間 陽子先生が御参加下さいます。編集協力者の刷新も図りました。従来の方針を受け継ぎつつ、学会員の皆様の新しい成果や展望が盛り込まれ、充実した学会誌となるよう勤めますので、どうぞよろしく御支援のほどお願いいたします。

徳永 勝士

MHC バックナンバー

一冊 ¥2,000 にて購入可能です。学会事務局までお問い合わせ下さい。発行より 2 年を経過したものは、在庫が少数になっている場合もありますのでご了承ください。

入会・変更

新入会、住所変更は学会事務センターまでお問い合わせください。また、日本組織適合性学会ホームページの入会申込書もご利用下さい。

(社)学会事務センター

〒113-8622

東京都文京区本駒込 5-16-9 学会センター C21

TEL: 03-5814-5810

FAX: 03-5814-5825

日本組織適合性学会ホームページ

学会活動に関する情報や HLA 遺伝子の塩基配列情報が利用できます。

<http://square.umin.ac.jp/JSHI/mhc.html>

<http://jshi.umin.ac.jp/mhc.html>

MHC

Major Histocompatibility Complex

Official Journal of Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics

2003 年 5 月 31 日発行 10 巻 1 号, 2003

定価 2,000 円

発行 日本組織適合性学会(会長 猪子 英俊)

編集 日本組織適合性学会編集委員会(編集担当理事 徳永 勝士)

平成 8 年 7 月 24 日 学術刊行物認可

日本組織適合性学会事務局(事務担当理事 十字 猛夫)

〒259-1193 神奈川県伊勢原市望星台 東海大学医学部分子生命科学系遺伝情報部門内

印刷・研究社印刷株式会社

〒352-0011 埼玉県新座市野火止 7-14-8