

第 13 回日本組織適合性学会大会

The 13th Japanese Society for
Histocompatibility and Immunogenetics (JSHI)
Annual Meeting

「MHC: 基礎と臨床のバリアフリーと協調を目指して」

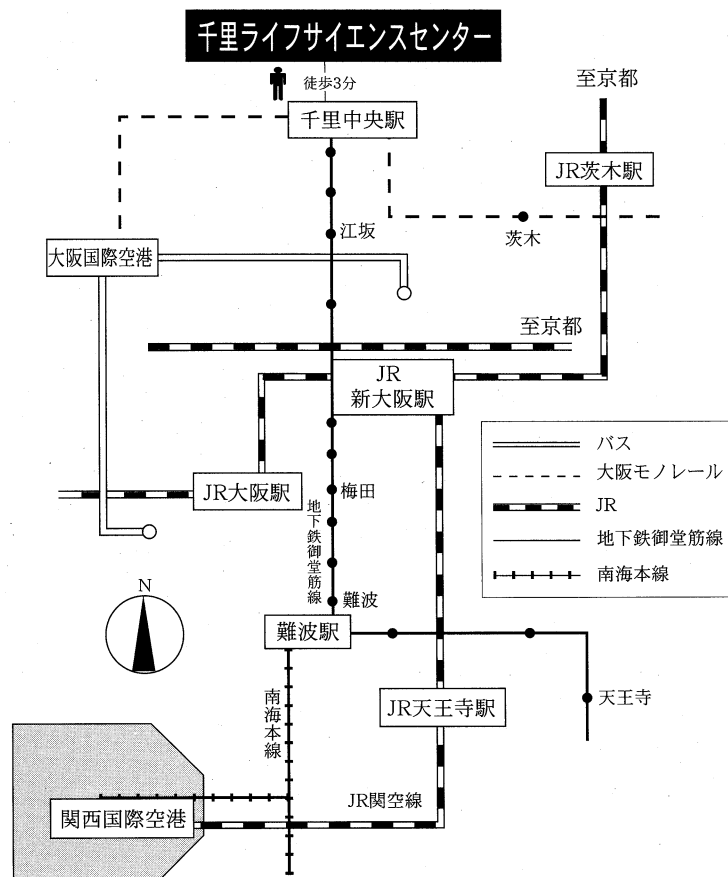
大会長 佐田 正晴 国立循環器病センター研究所 再生医療部

会 期 2004 年 9 月 23 日(木・祝)～9 月 25 日(土)

会 場 千里ライフサイエンスセンター
〒560-0082 大阪府豊中市新千里東町 1 丁目 4 番 2 号
TEL: 06-6873-2010 FAX: 06-6873-2011

事務局 国立循環器病センター 研究所 再生医療部
〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1
事務担当 鳥山 恵
TEL: 06-6833-5012 内線 2516 FAX: 06-6835-5496
E-mail: megutori@ri.ncvc.go.jp

交通案内



- 地下鉄御堂筋線「千里中央」駅北口すぐ（御堂筋→北大阪急行）
- 大阪国際空港からモノレールで約13分、「南茨木」駅から約11分、「門真市」駅から約24分
- 地下鉄御堂筋線「梅田」駅から約19分、「新大阪」駅から約13分
- 大阪国際空港からお車で約15分

地下鉄で御来場の方は

先頭車両(千里中央方面)に乗り北出口に出場して、正面の階段を上がり(1Fに出ます)、更に正面右手の階段を上がり陸橋を渡りますと、左手が千里ライフサイエンスセンターです。

千里ライフサイエンスセンター

〒560-0082 大阪府豊中市新千里東町1-4-2
 TEL : 06-6873-2011 FAX : 06-6873-2011
 HP.<http://www1.senri-lc.co.jp>

御案内

学会・懇親会参加の皆様へ

1 登録

- 1) 総合参加受付は千里ライフサイエンスセンター 5 階ロビーです。
- 2) 受付時間
 - 9 月 23 日(木)10:00～17:00
 - 9 月 24 日(金) 8:30～17:00
 - 9 月 25 日(土) 8:30～14:00
- 3) 事前登録者: 事前登録受付にて受領書提示の上、参加証をお受け取り下さい。
- 4) 当日参加費: 理事・評議員は 10,000 円、一般会員は 8,000 円です。それぞれの受付にて参加費をお支払いの上、参加証をお受け取り下さい。
- 5) ネームカードが参加証兼領収書となります。会期中、着用下さい。参加証は認定 HLA 検査技術者・認定組織適合性指導者の申請・更新の際に必要となります。
- 6) 学会にはこの抄録集(本号)をお持ち下さい。学会期間中、総合受付にて一部 2,000 円にて頒布も致します。
- 7) 日本組織適合性学会に入会される方、年会費の納付は「学会事務センター」にてお手続き下さい。大会会場では行っておりません。

2 懇親会

日 時: 9 月 24 日(金)18:30～20:30

会 場: 千里阪急ホテルプールサイド(雨天の場合はホテル 2 階クリスタルホールにて開催)
神戸女子大学音楽学部「音楽によるアウトリーチ」によるコンサート

参加費: 2,000 円

多数のご参加をお待ちしております。参加希望者は総合受付にて参加費をお支払いの上、参加証をお受け取り下さい。

演者の皆様へ

1 発表時間

- 1) シンポジウム, ワークショップ発表者は、指定された時間内での発表をお願いいたします。
- 2) TFB 学術奨励賞受賞発表者は**発表 10 分, 討論 4 分**です。
- 3) 一般口演発表者は**発表 7 分, 討論 3 分**です。
- 4) ポスター発表者は**発表 5 分, 討論 2 分**です。

2 口演発表

- 1) 発表は PC (パソコン)による発表のみにさせていただきます。

スライドは、使用できませんのでご注意ください。

原則として、Windows MS Power Point 2000 以上とし CD-R もしくは USB メモリーによるメディア持込みとさせていただきます。発表データに動画がある場合のみ、ご自身の PC をお持込み下さい。持込みの方の OS は Windows (Windows98 以上), Macintosh (MacOS 8.6 以上)とし、アプリケーションは Power Point とさせていただきます。なお、MO, FD, ZIP などの受付は出来ません。

◆ 発表データのファイル名は、「【演題番号】【氏名】」としてください。

◆ 会場では、演者ご自身で演台上の機材を操作していただきます。

◆ 提出後のデータの変更等は出来ません。

- 2) 発表は1面投影です。
- 3) 発表の30分前までに会場前のPCプレビューセンターで受付を終え、15分前までに次演者席にお着きください。

3 ポスター発表

- 1) ポスター会場は、502号室、503号室です。
- 2) パネルのサイズは、幅90cm、高さ180cm(演題名を含む)です。演題番号は事務局で用意しますが、演題名、所属、氏名は演者をご用意下さい。ポスター貼付用の画鋏は総合受付でお受け取り下さい。
- 3) ポスター貼付・撤去は、下記の時間内をお願いします。所定時間内に撤去されない場合は事務局で処分させていただきますので、ご了承下さい。

◆ 貼付時間: 9月24日(金) 9:00~12:00

◆ 撤去時間: 9月25日(土)14:00~16:00

- 4) 9月25日(土)13:00~14:00にポスター発表を行います。演者は所定の討論時間帯にポスター会場に待機して下さい。

お願い

- 1 発表時間、質疑応答時間を遵守下さい。
- 2 会場内でのポケットベルや携帯電話のご使用はご遠慮下さい。
- 3 参加者の呼び出しは掲示板で行います。

QCワークショップ集会

日 時: 9月23日(木)13:00~16:00

会 場: 千里ライフサイエンスセンター 5階 ライフホール

参加費: QCWS参加者および集会のみ参加者で、既に参加費を振り込んでおられる方は受付にて参加証をお受け取り下さい。当日、集会のみ参加希望の方は当日受付にて参加費2,000円をお支払い下さい。但しQCワークショップ資料を配付できないことがありますのでご了承下さい。

認定制度技術者講習会

日 時: 9月23日(木)16:00~19:00

場 所: 千里ライフサイエンスセンター 5階 ライフホール

参加費: 2,000円(テキスト代を含む)、既に参加費を振り込んでおられる方は、受付にて出席確認を済ませてから御入場下さい。当日参加も可能ですが、講習会資料の数に限りがありますので御了承ください。

内 容: HLAの検査法; タイピングとクロスマッチについて

中島 文明(神奈川県赤十字血液センター)

HLAの遺伝学と研究倫理

木村 彰方(東京医歯大・難研・分子病態分野)

HLAの構造と機能; 移植免疫との関連

千住 覚(熊本大学・院医薬・免疫識別学分野)

移植臨床におけるHLA; 造血幹細胞移植を中心に

一戸 辰夫(京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科)

認定制度指導者講習会

第 13 回日本組織適合性学会大会中の下記の特設講演 4 題, およびワークショップ 1 題の合計 5 題のうちから 3 題以上の聴講をもって, 指導者認定あるいは認定更新に必要な講習を受講したものと認めます。なお, 会場の入り口付近に準備いたします, 受講者記帳名簿へのサインをもって受講証明といたします。

認定制度技術者筆記試験

日 時: 9 月 23 日(木)16:00~17:00

場 所: 千里ライフサイエンスセンター 5 階 502・503 号室

会議等日程

- 1 理事会 9 月 23 日(木) 11:00~12:00
千里ライフサイエンスセンター 5 階 503 号室
- 2 評議員会 9 月 23 日(木) 19:00~20:00
千里ライフサイエンスセンター 5 階 502・503 号室
- 3 総会 9 月 24 日(金) 13:00~13:30
千里ライフサイエンスセンター 5 階 ライフホール
- 4 認定制度委員会 9 月 24 日(金) 12:00~13:00
千里ライフサイエンスセンター 20 階 千里クラブ 2001 号室
- 5 QCWS 部会 9 月 23 日(木) 12:00~13:00
千里ライフサイエンスセンター 5 階 502 号室

機器展示

日 時: 9 月 24 日(金)9:00~17:00

9 月 25 日(土)9:00~14:00

会 場: 千里ライフサイエンスセンター 5 階 サイエンスホール

9/23 (木)		9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
ライフホール	5F												
サイエンスホール	5F												
502	5F												
503	5F												

9/24 (金)		9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
ライフホール	5F	開 会	一般口演 座長 徳永勝士	一般口演 座長 安波理郎	特別講演(1) 座長 木村彰方	認定制度委員会	総会	特別講演(2) 座長 佐田正晴	ワークショップ 座長 木村彰方 赤藤達也	特別講演(3) 座長 白藤良太	スポンサード シンポジウム 座長 太田正徳 谷川 亨		
サイエンスホール	5F												
502	5F												
503	5F												
千里駒急ホテル													

9/25 (土)		9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
ライフホール	5F	一般口演 座長 西村泰治	TFB賞受賞者口演 座長 潮子英俊	特別講演(4) 座長 西村泰治	ランチョンセミナー 座長 高原史郎								
サイエンスホール	5F												
502	5F												
503	5F												

プログラム

特別講演 (1)**9月24日(金) 11:00~12:00****座長** 木村彰方(東京医科歯科大学)

SL-1 再生医療の将来: 臨床応用を目指して

中畑龍俊 京都大学大学院医学研究科発達小児科学

特別講演 (2)**9月24日(金) 13:30 ~14:30****座長** 佐田正晴(国立循環器病センター)

SL-2 Immunologic monitoring of transplant patients

Paul I. Terasaki Terasaki Foundation Laboratory, USA

特別講演 (3)**9月24日(金) 16:00 ~17:00****座長** 白倉良太(大阪大学医学部)

SL-3 移植における免疫寛容導入-同種から異種移植へ

山田和彦 Transplantation Biology Research Center,
Harvard Medical School**特別講演 (4)****9月25日(土) 11:00 ~12:00****座長** 西村泰治(熊本大学大学院)

SL-4 造血幹細胞移植におけるNK細胞受容体適合性の意義

屋部登志雄 東京都赤十字血液センター技術部

ワークショップ**「HLA 抗体検査の意義と展望」****9月24日(金) 14:30~16:00****座長** 木村彰方(東京医科歯科大学)

赤座達也(日本赤十字社中央血液センター・技術顧問)

W-1 Current and future HLA test for transplant In USA

水谷一夫 Terasaki Foundation Laboratory, USA

W-2 13th JSHI HLA 抗体検査ワークショップの概要と総括

中島文明 神奈川県赤十字血液センター

W-3 HLA 抗体検査法の検討: Reference ラボ報告

スポンサードシンポジウム

9月24日(金) 17:00 ~ 18:00

「医用ミニブタの医学・生物学的応用」

共催 (株)中外医科学研究所, (株)ジャパンファーム, (財)日本生物科学研究所

座長 太田正穂(信州大学医学部)
谷川 学(株・中外医科学研究所)

- S-1 医用ミニブタの SLA 解析の意義と必要性
太田正穂 信州大学医学部法医学
- S-2 医科学研究分野におけるミニブタの利用
内田昌樹 (株)中外医科学研究所
- S-3 日生研ミニブタ (NIBS 系)を用いた移植実験およびユーザー側からの要望
小林孝彰 名古屋大学医学部第二外科

ランチョンセミナー

9月25日(土) 12:00 ~ 13:00

共催 藤沢薬品工業株式会社

座長 高原史郎(大阪大学大学院)

タクロリムス誘導性末梢移植免疫寛容の誘導——MHC 確立大動物を用いた前臨床臓器移植実験
山田和彦 Transplantation Biology Research Center,
Harvard Medical School

市民公開講座

9月25日(土) 14:00 ~ 17:00

『贈る愛, 贈られる命—移植と共に生きる—』

司会 山下りら

コーディネーター 佐治博夫(HLA 研究所)
高原史郎(大阪大学大学院)

- Paul. I. Terasaki (Terasaki Foundation Laboratory, USA)
河野太郎(衆議院議員)
- パネリスト 小寺良尚(名古屋第一赤十字病院・骨髄移植センター長)
一戸辰夫(京都大学大学院医学系研究科血液腫瘍内科)
埴岡健一(日経メディカル編集部/骨髄移植推進財団・前事務局長)

会員研究発表 I

TFB 学術奨励賞優秀賞受賞者口演

9月25日(土) 9:50 ~ 11:00

座長 猪子英俊(東海大学医学部)

T-1 末梢血および胎盤 NK 細胞における HLA-E tetramer を用いた receptor 解析

○下嶋典子¹⁾, Daniel E Geraghty²⁾, 羽竹勝彦¹⁾, 石谷昭子¹⁾

1) 奈良県立医科大学法医学教室

2) Fred Hutchinson Cancer Research Center

T-2 比較ゲノム解析による霊長類 HLA-B/C 祖先領域の推定

○椎名 隆¹⁾, 柳谷和代¹⁾, Lutz Walter²⁾, 猪子英俊¹⁾

1) 東海大学医学部分子生命科学

2) ゲッティンゲン大学免疫遺伝学

T-3 HLA クラス I 領域に位置する DNA 修復関連遺伝子 MDC1 の比較ゲノム解析および比較機能解析

○清水佐良子¹⁾, 椎名 隆¹⁾, 桜井敬之¹⁾, 安西達也¹⁾, 重成敦子¹⁾, 安藤麻子¹⁾,

坂本修一²⁾, 小松賢志²⁾, 猪子英俊¹⁾

1) 東海大・医・分子生命科学

2) 京大・放射線生物研究センター・ゲノム動態研究部門

T-4 HLA-A*3303-B*4403-DR*1302 ハプロタイプにおける HLA クラス I 領域のゲノム塩基配列

○高須美和¹⁾, 椎名 隆²⁾, 石川義英³⁾, 徳永勝士¹⁾, 猪子英俊²⁾

1) 東京大・医学部・人類遺伝

2) 東海大・医学部・分子生命科学 2

3) 日赤中央血液センター

T-5 LR-PCR 法による HLA クラス I 領域の多様性解析

○橋本奈美¹⁾, 椎名 隆¹⁾, 勝山善彦²⁾, 太田正穂³⁾, 猪子英俊¹⁾

1) 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

2) 信州大学病院薬剤部

3) 信州大学医学部法医学教室

会員研究発表 II (口演発表)

HLA 遺伝子解析

9月24日(金) 9:00~9:50

座長 徳永勝士(東京大学大学院)

O1-1. 霊長類を含めた HLA クラス I 領域の Cross-species SNP 解析

○勝山善彦¹⁾, 椎名 隆²⁾, 橋本奈美²⁾, 太田正穂³⁾, 猪子英俊²⁾

- 1) 信州大学病院薬剤部
- 2) 東海大学医学部分子生命科学
- 3) 信州大学医学部法医学教室

O1-2. HLA 領域における SNPs, マイクロサテライトの LD ブロック解析

○成瀬妙子¹⁾, 志知大輔¹⁾, 吉川枝里¹⁾, 重成敦子¹⁾, 河田寿子¹⁾, 割田貴之¹⁾, 勝山善彦²⁾, 太田正穂²⁾, 猪子英俊¹⁾

- 1) 東海大学医学部基礎医学系
- 2) 信州大学医学部法医学

O1-3. HLA 領域内マイクロサテライトのハプロタイプ解析

○太田正穂¹⁾, 勝山善彦²⁾, 成瀬妙子³⁾, 猪子英俊³⁾, 佐田正晴⁴⁾, 福島弘文¹⁾

- 1) 信州大学医学部法医学教室
- 2) 信州大学付属病院薬剤部法医学教室
- 3) 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学
- 4) 国立循環器病センター再生医療部

O1-4. 各胎生期胎盤トロホプラストにおける HLA-F の発現について

○富山 舞¹⁾, 下嶋典子¹⁾, 正武孝則^{1,2)}, 羽竹勝彦¹⁾, 石谷昭子¹⁾

- 1) 奈良県立医科大学法医学研究室
- 2) 林産婦人科病院

O1-5. カニクイザル ES 細胞から分化誘導した HLA-DRB 遺伝子導入樹状細胞による DR53 拘束性ヒト T 細胞株への抗原提示

○千住 覚¹⁾, 末盛博文²⁾, 松吉秀武¹⁾, 平田真哉¹⁾, 植村靖史¹⁾, Yu-Zhen Chen¹⁾, 福間大喜¹⁾, 古谷正敬³⁾, 中辻憲夫⁴⁾, 西村泰治¹⁾

- 1) 熊本大学大学院医学薬学研究部免疫識別学分野
- 2) 京都大学再生医科学研究所幹細胞医学研究センター
- 3) 慶応大学医学部産婦人科学教室
- 4) 京都大学再生医科学研究所発生分化研究分野

HLA と疾患

9月24日(金) 9:50~11:00

座長 安波道郎(東京医科歯科大学)

O2-1. 食道癌拒絶抗原 PP-RP 由来の HLA-A24 拘束性 T 細胞エピートープの同定

○西村泰治¹⁾, 吉武義泰^{1,2)}, 門司幹男¹⁾, 福間大喜^{1,1)}, 生田義明¹⁾, 篠原正徳²⁾,
片桐豊雅³⁾, 古川洋一³⁾, 中村祐輔³⁾, 中面哲也¹⁾

- 1) 熊大大学・院医薬研究部・免疫識別学
- 2) 熊本大学・顎口腔病態学
- 3) 東大・医科研・ヒトゲノム解析センター

O2-2. 結核菌の新規感染防御抗原である MPT51 の MHC 拘束性エピートープの同定

○小出幸夫, 鈴木美奈, 青枝大貴, 永田 年
浜松医大・微生物学

O2-3. ヒトナルコレプシー候補領域のマイクロサテライトマーカーを用いた fine mapping

○川嶋実苗¹⁾, 生田智樹²⁾, 田宮 元²⁾, 本多 裕³⁾, 十字猛夫⁴⁾, 徳永勝士¹⁾,
猪子英俊²⁾

- 1) 東京大学医学系研究科人類遺伝学
- 2) 東海大学医学部分子生命科学 2
- 3) 精神神経センター附属清和病院
- 4) 日本赤十字中央血液センター

O2-4. HLA 全領域にわたる SNPs によるスギ花粉症感受性遺伝子の検索

○中西真理¹⁾, 芦田恒夫²⁾, 井手 武³⁾, 益尾清恵⁴⁾, 佐田正晴⁵⁾, 羽竹勝彦¹⁾,
石谷昭子¹⁾

- 1) 奈良県立医科大学・法医学
- 2) 芦田耳鼻咽喉科
- 3) 奈良県立医科大学・化学
- 4) 株式会社 Veritas
- 5) 国立循環器病センター

O2-5. C 型肝炎ウイルスに起因した心筋症の疾患感受性遺伝子探索

○志知大輔¹⁾, 吉川枝里¹⁾, 太田正穂²⁾, 勝山善彦²⁾, 日野原邦彦³⁾, 高橋めぐみ³⁾,
安波道郎³⁾, 木村彰方³⁾, 松森 昭⁴⁾, 成瀬妙子¹⁾, 猪子英俊¹⁾

- 1) 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学
- 2) 信州大学医学部法医学教室
- 3) 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態
- 4) 京都大学医学研究科循環病態学

O2-6. HLA-B*510101 の民族間比較検討～ベーチェット病は日本にどのようなルートでもたらされたか

○竹本裕子¹⁾, 成瀬妙子²⁾, 南場研一¹⁾, 水木信久³⁾, 猪子英俊²⁾, 大野重昭¹⁾

- 1) 北海道大学医学部視覚器病学講座
- 2) 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学系
- 3) 横浜市立大学医学部眼科学講座

O2-7. Lymphotoxin A 遺伝子多型 A252G と心筋梗塞の関連解析

○安波道郎^{1,2)}, 高橋めぐみ¹⁾, 宝田 茂³⁾, 笹岡大史³⁾, 和泉 徹³⁾, Jeong Euy Park⁴⁾, 木村彰方^{1,2)}

- 1) 東京医科歯科大学・大学院疾患生命科学部
- 2) 東京医科歯科大学・難治疾患研究所
- 3) 北里大学医学部
- 4) Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine

HLA と疾患

9月25日(土) 9:00～9:50

座長 西村泰治(熊本大学大学院)

O3-1. KIR 遺伝子多型による慢性関節リウマチ疾患感受性遺伝子の検索

○岡本威明¹⁾, 亀岡陽子¹⁾, 山下隆博²⁾, 村田紀和³⁾, 芦田恒雄⁴⁾, 井手 武⁵⁾, 中西真理¹⁾, 羽竹勝彦¹⁾, Daniel E. Geraghty⁶⁾, 石谷昭子¹⁾

- 1) 奈良県立医科大学・法医学
- 2) 東京大学大学院医学系研究科・産婦人科学
- 3) 協和会病院リウマチセンター
- 4) 芦田耳鼻咽喉科
- 5) 奈良県立医科大学・化学
- 6) Fred Hutchinson Cancer Research Center

O3-2. 慢性肺血栓塞栓症における, HLA と臨床像との相関の解析

○小南聡志^{1,2)}, 田邊信宏²⁾, 高橋めぐみ¹⁾, 柴田宏樹¹⁾, 安波道郎^{1,3)}, 栗山喬之²⁾, 木村彰方^{1,3)}

- 1) 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態
- 2) 千葉大学大学院医学研究院加齢呼吸器病態制御学
- 3) 東京医科歯科大学大学院疾患生命科学部ゲノム多様性

O3-3. 維持血液透析中の糖尿病性腎症における C 型肝炎抗体陽性率と HLA との相関

○渡辺真穂, 小河原悟, 森本順子, 斉藤喬雄

福岡大学医学部第四内科

O3-4. 帯状疱疹および帯状疱疹後神経痛における疾患感受性遺伝子マッピング

○炭山大輔¹⁾, 品川はる美²⁾, 馬淵智生²⁾, 太田正穂³⁾, 小澤 明²⁾, 成瀬妙子¹⁾,
猪子英俊¹⁾

- 1) 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学
- 2) 東海大学医学部皮膚科
- 3) 信州大学医学部法医学

O3-5. Graves 病における HLA と Thyroglobulin 遺伝子多型の相互作用の解析

○高橋めぐみ¹⁾, 安波道郎^{1,2)}, 木村彰方^{1,2)}

- 1) 東京医科歯科大学・難治疾患研究所
- 2) 東京医科歯科大学・大学院疾患生命科学部

会員研究発表 III (ポスター発表)

HLA と疾患

9月25日(土) 13:00 ~ 14:00

座長 成瀬妙子(東海大学医学部)

P1-1. キノコ栽培者でのアレルギー発症機序における HLA クラス II 抗原遺伝子多型性についての検討

○鈴木一彦^{1,2)}, 成瀬妙子¹⁾, 田中裕士¹⁾, 阿部庄作¹⁾, 佐藤昇志³⁾, 津島健司⁴⁾,
久保恵嗣⁴⁾, 猪子英俊²⁾

- 1) 札幌医科大学医学部第三内科
- 2) 東海大学医学部分子生命科学系遺伝情報部門
- 3) 札幌医科大学医学部病理学 I
- 4) 信州大学医学部第一内科

P1-2. 蛍光マイクロアレイビーズシステムによる日本人ベーチェット病患者の HLA 遺伝子解析

○伊藤良樹¹⁾, 佐々木爽¹⁾, 山根敬浩¹⁾, 滝山直昭¹⁾, 伊藤典彦¹⁾, 西田朋美¹⁾,
水木信久¹⁾, 猪子英俊²⁾

- 1) 横浜市立大学大学院視覚器病態学
- 2) 東海大学分子生命科学

P1-3. デング出血熱の重症化を決定する宿主要因の解析

○菊池三穂子¹⁾, Vu Thi Que Huong²⁾, Vu Thien Thu Ngu²⁾, Vo Dinh Tham³⁾,
Tran van Dat, M⁴⁾, Do Quang Ha²⁾, 森田公一⁵⁾, 平山謙二¹⁾

- 1) 長崎大学・熱帯医学研究所・分子免疫遺伝学
- 2) Arbovirus laboratory, Pasteur Institute Ho Chi-minh City, Vietnam
- 3) Pediatric Hospital No. 2, Ho Chi Minh City, Vietnam.
- 4) Center for Preventive Medicine, Vinh long Province, Vietnam

P1-4. Malaria pressure influenced the frequency of a susceptible allele of TNF- α promoter region in Vanuatu

○Ratawan Ubalee¹⁾, Takahiro Tsukahara²⁾, Mihoko Kikuchi¹⁾, Koji Lum³⁾,
Mawuli Dzodzomenyo²⁾, Akira Kaneko^{2,4)}, ○Kenji Hirayama¹⁾

- 1) Department of Molecular Immunogenetics, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University
- 2) Department of International Health and Tropical Medicine, Tokyo Womens' Medical College
- 3) Department of Anthropology, Binghamton University, Binghamton, New York,
- 4) Malaria Research Laboratory, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden

P1-5. 非閉塞性無精子症における HLA-DRB1*1302-DQB1*0604 haplotype と AZF および精巣組織との関連について

○辻村 晃¹⁾, 佐田正晴²⁾, 太田正穂³⁾, 勝山善彦⁴⁾, 古賀 実⁵⁾, 竹山政美⁵⁾,
藤岡秀樹⁶⁾, 高尾徹也¹⁾, 藤田和利¹⁾, 小森和彦¹⁾, 松岡庸洋¹⁾, 宮川 康¹⁾,
高田晋吾¹⁾, 松宮清美¹⁾, 高原史郎¹⁾, 奥山明彦¹⁾

- 1) 大阪大学医学部泌尿器科
- 2) 国立循環器病センター研究所再生医療部
- 3) 信州大学医学部法医学
- 4) 信州大学医学部薬剤部
- 5) 健保連大阪中央病院泌尿器科
- 6) 大阪警察病院泌尿器科

P1-6. U1-snRNP-A 遺伝子における SNP 解析とその意義

○大久保光夫, 今井厚子, 関 佐織, 平田蘭子, 前田平生
埼玉医大総合医療センター輸血・細胞治療部

HLA 遺伝子解析

9月25日(土) 13:00 ~ 14:00

座長 田中秀則(東京都赤十字血液センター)

P2-1. HLA 遺伝子の LOH 現象を示した症例のマイクロサテライト解析

○太田正穂¹⁾, 勝山善彦²⁾, 丸屋悦子³⁾, 海田勝仁⁴⁾, 佐治博夫³⁾

- 1) 信州大学医学部法医学教室
- 2) 信州大学附属病院薬剤部法医学教室
- 3) 特定非営利活動法 HLA 研究所
- 4) 東大医学部附属病院血液内科

P2-2. ハプロタイプの推測により見出された日本人に稀な HLA-A29, A32 について

○盛山芳恵, 加藤和江, 村 徹, 十字猛夫

日本赤十字社中央血液センター・中央骨髄データセンター

P2-3. 日本人に検出された B54 new allele (BKAW) について

○河村久美子, 秋田真哉, 荒木延夫, 能勢義介, 井本しおん, 三戸 壽

兵庫県赤十字血液センター

P2-4. 検査センターにおける HLA-C の 4 桁レベルの遺伝子型頻度

○泉澤康弘, 山本芳子, 齋藤まみ絵, 笹 啓二, 小川公明, 白濱秀也, 石原義盛

株式会社エスアールエル 遺伝子・染色体解析センター

解析方法

9月25日(土) 13:00~14:00

座長 中島文明(神奈川県赤十字血液センター)

P3-1. 抗 HLA 抗体検査法の検出感度比較——AHG-LCT, LIFT, PIFT, M-MPHA および FlowPRA について——

○斉藤 敏¹⁾, 太田正穂¹⁾, 勝山善彦²⁾, 牧島秀樹³⁾, 玉井豊広⁴⁾, 高柳カヨ子¹⁾,
浅村英樹¹⁾, 福島弘文¹⁾

1) 信州大学医学部法医学

2) 信州大学医学部附属病院薬剤部

3) 信州大学医学部第二内科

4) オリンパス株式会社

P3-2. An approach to high-throughput HLA-DPB1 typing using reverse-SSO method.

○K.Saito, L. C. Blair, S. Argounova, A. Bedrossian, D. Berman and J. Lee

One Lambda, Inc. Canoga Park, California USA.

P3-3. 蛍光ビーズを用いた HLA 遺伝子タイピング法の開発

○宮城 徹¹⁾, 長門正貴¹⁾, 松永裕也¹⁾, 久保裕之¹⁾, 直原 寛¹⁾, 永田のぞみ¹⁾,
森川 諭¹⁾, 松下正毅¹⁾, 川井信太郎¹⁾, 岡 孝紀¹⁾, 峯元睦子²⁾, 柏瀬貢一²⁾,
佐竹正博²⁾

1) 湧永製薬株式会社 創薬研究所

2) 東京都赤十字血液センター

P3-4. 蛍光マイクロアレイビーズシステムを用いた HLA-A, HLA-B, HLA-C および HLA-DRB1 の遺伝子型判定方法の検討

○東 史啓¹⁾, 原 啓高¹⁾, 島田和典¹⁾, 越坂卓也¹⁾, 峯元睦子²⁾, 柏瀬貢一²⁾, 佐竹正博²⁾

1) 株式会社ゲノムサイエンス研究所・研究開発部

2) 東京都赤十字血液センター・検査部

臓器・骨髄移植

9月25日(土) 13:00~14:00

座長 小河原 悟(福岡大学医学部)

P4-1. 移植腎慢性拒絶反応におけるサイトカインおよび抗 HLA 抗体の解析

○太田沙千恵¹⁾, 藤田麻由子¹⁾, 吉田一成²⁾, 大久保みどり³⁾, 篠原信賢³⁾, 田岡佳憲²⁾, 竹内康雄⁴⁾, 遠藤忠雄^{2,5)}, 馬場志郎²⁾, 小幡文弥¹⁾

1) 北里大・医療衛生学部・免疫

2) 北里大医学部・泌尿器科

3) 北里大医学部・免疫

4) 北里大医学部・内科

5) 埼玉県中央病院

P4-2. 腎移植後の血管型拒絶反応と血清中 soluble CD30 値との関連

○小林孝彰¹⁾, 小原節子²⁾, 長尾栄子²⁾, 水野美紀子²⁾, 三輪祐子¹⁾, 劉大革¹⁾, 馬 勇¹⁾, 長坂隆治¹⁾, 片山昭男³⁾, 幅 俊人³⁾, 富永芳博³⁾, 両角國男³⁾, 打田和治³⁾, 中尾昭公¹⁾

1) 名古屋大学第二外科

2) 名古屋第二赤十字病院組織適合検査室

3) 名古屋第二赤十字病院腎センター

P4-3. Correlation between disparity for microsatellites markers and clinical outcome after unrelated HLA identical Hematopoietic stem cell transplantation

○Suyun. Li¹⁾, H. Kawata¹⁾, T. Kikuchi²⁾, M. Ota³⁾, Y. Morishima⁴⁾, T. Naruse¹⁾, H. Inoko¹⁾

1) Department of Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine, Kanagawa, Japan

2) Department of Pathology, Sapporo Medical University

3) Department of Legal Medicine, Shinshu University Graduate School of Medicine, Nagano, Japan

4) Department of Hematology and Cell Therapy, Aichi Cancer Center, Nagoya, Japan.

- P4-4. 造血幹細胞移植における Interleukin-10 Promoter Polymorphism と acute GVHD の相関
 ○丸屋悦子¹⁾, 二神貴臣¹⁾, 二家本哲生¹⁾, 大沼 豪¹⁾, 丸屋かおり¹⁾, 一戸辰夫²⁾,
 玉木茂久³⁾, 佐治博夫¹⁾

- 1) 特定非営利活動法人 HLA 研究所
- 2) 京都大学医学部附属病院
- 3) 山田赤十字病院

- P4-5. 日本骨髄バンク登録者における都道府県別 HLA 遺伝子頻度・ハプロタイプ頻度 (HLA-A-B-DR) について

- 盛山芳恵, 加藤和江, 村 徹, 十字猛夫
 日本赤十字社中央血液センター・中央骨髄データセンター

動物遺伝子解析 (I)

9月25日(土) 13:00~14:00

座長 椎名 隆(東海大学医学部)

- P5-1. カニクイザルの MHC クラス II 遺伝子の多型解析

- 柳谷和代¹⁾, 清水佐良子¹⁾, 椎名 隆¹⁾, 小原 栄²⁾, 鳥居隆三³⁾, 小笠原一誠⁴⁾,
 猪子英俊¹⁾

- 1) 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学
- 2) 新日本科学先端技術部ゲノム情報チーム
- 3) 滋賀医科大学動物生命科学研究センター
- 4) 滋賀医科大学医学部病理学第二講座

- P5-2. カニクイザル MHC 領域の BAC コンテイングの作製によるゲノム解析

- 渡邊淳史¹⁾, 椎名 隆¹⁾, 鳥居隆三²⁾, 小笠原一誠³⁾, 猪子英俊¹⁾

- 1) 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学
- 2) 滋賀医科大学動物生命科学研究センター
- 3) 滋賀医科大学医学部病理学第二講座

- P5-3. マウス中枢神経系に発現している非古典的 MHC クラス Ib 抗原の同定

- 重成敦子, 大場幸枝, 吉村眞一, 安藤麻子, 猪子英俊
 東海大医学部・分子生命科学

- P5-4. マウス MHC クラス Ib 遺伝子の組織特異的発現

- 大場幸枝¹⁾, 重成敦子¹⁾, 山形哲司²⁾, 吉村眞一¹⁾, 安藤麻子¹⁾, 猪子英俊¹⁾

- 1) 東海大医学部・分子生命科学
- 2) 理研・脳センター・神経遺伝

P5-5. シークエンシングによるウズラ MHC クラス II 領域のハプロタイプ解析

○細道一善¹⁾, 椎名 隆²⁾, 清水佐良子²⁾, 猪子英俊²⁾, 半澤 恵¹⁾

- 1) 東京農業大学農学部家畜生理学研究室
- 2) 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

P5-6. ペンギン類の MHC 遺伝子における多型解析

○吉川枝里¹⁾, 成瀬妙子¹⁾, 炭山大輔¹⁾, 福田道雄³⁾, 栗田正徳⁴⁾, 村田浩一⁵⁾,
津田道雄¹⁾, Rory P. Wilson⁶⁾, Yvon LeMaho⁷⁾, 津田とみ^{1,2)}, 猪子英俊¹⁾

- 1) 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学
- 2) 徳島文理大学人間生活学部
- 3) 東京都葛西臨海水族園
- 4) 名古屋港水族館
- 5) 日本大学生物資源科学部
- 6) IM/Kiel, Germany
- 7) CEPE/CNRS, France

動物遺伝子解析 (II)

9月25日(土) 13:00~14:00

座長 安藤麻子(東海大学医学部)

P6-1. 親子鑑定を目指したハンドウイルカ MHC クラス II 遺伝子の多型解析

○二橋夕紀¹⁾, 椎名 隆²⁾, 大泉 宏¹⁾, 田中 彰¹⁾, 猪子英俊²⁾

- 1) 東海大学海洋学部水産学科水産資源開発過程
- 2) 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

P6-2. ブタ MHC クラス I, II 遺伝子の多型性解析——SLA ホモ接合体サンプルを用いた解析——

○安藤麻子¹⁾, 河田寿子²⁾, 重成敦子¹⁾, Christine Renard³⁾, Patrick Chardon³⁾,
Joan Lunney⁴⁾, 北川 均⁵⁾, 今枝紀明⁶⁾, 太田正穂⁷⁾, 佐田正晴⁸⁾, 猪子英俊¹⁾

- 1) 東海大・医・基礎医学系・分子生命科学
- 2) 東海大・伊勢原研究推進部・教育・研究支援センター
- 3) LREG INRA CEA Jouy en Josas, France
- 4) USAD, ARS, BARC, Beltsville, MD, USA
- 5) 岐阜大・農・家畜内科
- 6) 岐阜県畜産研・養豚研究部
- 7) 信州大・医・法医学
- 8) 国立循環器病センター研究所・再生医療部

P6-3. ウシ MHC (BoLA) class I 新規アリルの単離と解析

○赤松大基, 竹嶋伸之輔, 間 陽子

理化学研究所 分子ウイルス学研究ユニット

- P6-4. ウシ MHC クラス II *DQA* 遺伝子のタイピング法の開発とそれを用いた牛白血病ウイルス誘発性白血病発症と *DQA* 遺伝子の相関解析

○竹嶋伸之輔, 三木晶未, 加堂真由, 間 陽子
理研・分子ウイルス

- P6-5. ウシ MHC クラス II *DOA* および *DOB* 遺伝子の完全長 cDNA の単離と解析

○竹嶋伸之輔, 間 陽子
理研・分子ウイルス

- P6-6. ウシ TAP トランスポーター遺伝子の単離と解析

○間 陽子, 加藤美緒, 竹嶋伸之輔
理研・分子ウイルス

特別講演

SL-1

再生医療の将来: 臨床応用を目指して

中畑龍俊

京都大学大学院医学研究科発達小児科学

再生医療という言葉がマスコミにしばしば登場し、広く社会の関心を集めている。再生医療の基盤となる細胞は幹細胞であり、この細胞は自己複製能と様々な細胞への分化能を併せ持った細胞として知られている。われわれの身体の中には造血幹細胞をはじめ血管内皮、皮膚、腸上皮、生殖器、肝臓、腎臓、神経組織など種々の組織において体性幹細胞の存在が知られ、体性幹細胞の可塑性も話題となっている。現在行われているあるいは計画されている再生医療はこのような体性幹細胞を利用したものであるが、将来的にはほぼ無限の自己複製能と全ての細胞への分化能を持つ胚性幹細胞 (ES 細胞) の利用も考えられている。

最近、わが国では、従来から行われていた造血幹細胞移植に加え、心筋梗塞患者に対して自家骨髄の直接心筋内に移植、閉塞性動脈硬化症 (ASO)、バージャー病に自己の骨髄細胞を局所注入する治療、骨髄から培養誘導した間葉系幹細胞を用いた骨疾患の治療、体外で増幅した臍帯血中の造血幹細胞を用いた移植など、再生医療は爆発的な広がりを見せようとしている。また、多くの倫理的、社会的問題を内在する ES 細胞や胎児脳組織から樹立した神経幹細胞を用いた脊髄損傷やパーキンソン病などの神経疾患に対する治療法の開発に向けた研究も急速に進展している。

しかし、今後わが国で再生医療を健全な形で進めていくためには、科学性、安全性、倫理性、社会性、公開性が保証される必要があり、そのための指針作りが進められている。本講演では我々が長年取り組んできた造血幹細胞、神経幹細胞を中心とした再生医療に向けた研究を紹介するとともに、再生医療の現状、将来について述べてみたい。

SL-2

Immunologic monitoring of transplant patients

Paul Terasaki, Ph.D.

Terasaki Foundation Laboratory, Los Angeles

It has been recently shown that HLA antibodies develop BEFORE rejection of kidney transplants. It is of some interest that these antibodies often persist for many years in the patient, even though the graft remains functioning well. We postulate that the damage produced by HLA antibodies produced AFTER transplantation has a very slow effect because it may take many years for the process of vessel intimal constriction occurs. This process of damage and hypertrophy of the endothelium, probably in an attempt to repair damage is a slow process.

It can also be monitored by C4d staining, which shows the deposition of complement in the vessel wall. In the case of kidney transplants, even if the vessel lumen is constricted in half, the serum creatinine of the patient would be normal. Only when the vessel constricts to a certain threshold does the function of the kidney become impaired, and the serum creatinine rises. It is known that once the serum creatinine starts to rise, there is nothing which can be done with increased immunosuppression. Thus the objective of monitoring should be to detect the vessel damage long before the vessel constricts to a point of no return. HLA antibodies may be exactly the test needed to monitor chronic rejection early. In currently functioning patients, we have seen that roughly a third will have antibodies. We suggest that it is these patients who are undergoing silent chronic rejection.

Evidence to support these ideas will be presented.

SL-3

移植における免疫寛容導入—同種から異種移植へ

STRATEGIES TO INDUCE XENOGENEIC TOLERANCE USING GALT KNOCKOUT (PIG-TO-BABOON MODEL)

Kazuhiko Yamada, M.D., PhD.

Associate Professor of Department of Surgery, Harvard Medical School Head, Organ Transplantation Tolerance and Xenotransplantation Laboratory, Transplantation Biology Research Center, Massachusetts General Hospital

The use of animal organs for human transplantation could potentially alleviate the worldwide critical shortage of donor organs, and thus has stimulated investigation of novel strategies directed at making xenotransplantation applicable to the clinic. The latter will likely require overcoming barriers of rejection through strategies utilizing either immune suppression or tolerance induction, or a combination of the two.

We have previously reported that vascularized donor thymic tissue grafts, transplanted either as composite thymokidneys (TK) or vascularized thymic lobe (VTL) grafts, induced tolerance across fully allogeneic barriers in miniature swine. Recently, we have applied the strategy of VTL transplantation in a model of hDAF pig-to-baboon xenotransplantation and demonstrated that these grafts induced donor-specific unresponsiveness for up to 2–3 months following transplantation, at which time the grafts were lost from apparent humoral rejection. We have now extended these studies using cloned α -1,3-Galactosyltransferase knockout (GalT-KO) pigs as donors. We report here our initial experience in a pre-clinical model of pig-to-baboon xenotransplantation.

This abstract presents clinical data on recipients of GalT KO kidneys, especially focusing on four long-term recipients of GalT KO kidney plus thymus transplantation in detail. Briefly, Three of four long-term survivors maintained normal plasma creatinine levels (Cre < 1.5 mg/dl) for 56, 68, and 83 days, respectively, before expiring from unexpected causes. Another recipient experienced an apparent rejection crisis starting on POD 53, which reversed with anti-T cell rejection therapy; however, the recipient expired on POD 81 from pneumonia. Neither hyperacute nor accelerated humoral rejection was observed in any animal. Only a patchy thrombotic microangiopathy was seen in the renal xenografts on histological examination. Both CTL and MLR assays on day 78 in one long-term acceptor showed that the baboon maintained anti-allo responses but lost anti-pig responses, indicating donor-specific unresponsiveness.

In contrast to the baboons that received a GalT-KO thymus and kidney together, all baboons (n = 3) that received a GalT-KO kidney alone rejected their grafts within 34 days (PODs 20, 33 and 34), even with similar immunosuppressive regimens.

Use of GalT-KO donors markedly extends the survival of vascularized thymus plus renal xenografts in baboons. Although the induction regimen still needs to be modified to reduce complications, these initial results are encouraging with regard to the potential of co-transplanting vascularized thymic tissue with organ xenografts as a means of achieving long-term tolerance across pig-to-primate barriers.

SL-4

造血幹細胞移植における NK 細胞受容体適合性の意義

屋部登志雄

東京都赤十字血液センター技術部

造血幹細胞移植において患者，ドナー間での MHC 抗原の適合が重要であることが非血縁者間骨髄移植成績と HLA 抗原解析から示されている。拒絶，GVHD 発症予防には出来る限り HLA 型を適合させたいが，一方で白血病患者への移植の場合にドナー細胞のアロ反応性による GVL 効果で腫瘍再発抑制が期待され HLA 型の一部不適合が有効な場合も考えられる。NK 細胞は腫瘍細胞やウイルス感染細胞を排除する機能をもつが，強力なアロ反応性もあるため移植における役割が示唆されてきた。最近 HLA 抗原を認識する Killer Immunoglobulin-like Receptor (KIR) が発見され NK 細胞の標的認識機構の詳細が明らかとなり，移植成績への NK 細胞の影響を評価できるようになった。また KIR が主なりガンドとして HLA-C 抗原上のエピートープを認識することから HLA-C 抗原適合性と移植成績についてもこれらを考慮した上で再評価することが必要となった。T 細胞除去 CD34 純化幹細胞を用いた血縁者間 HLA-haplo-identical 移植において，KIR リガンド不適合 (GVH 方向)の場合に拒絶及び急性 GVHD 発症が抑制され，さらに AML 患者では再発抑制により生存率が上昇したことから NK のアロ反応性は移植成績の向上をもたらすとペルージャ大学の Velardi らは報告した。一方森島らは T 細胞非除去非血縁者間骨髄移植ペアの KIR リガンド特異性を調べ移植成績との相関を解析し，GVH 方向 KIR リガンド不適合では急性 GVHD 発症が高く生存率が低下したことから KIR リガンド適合の重要性を報告した。このように NK 細胞アロ反応性の移植への影響は移植レジメや疾患の違いで大きく異なってくると考えられる。今回はわれわれが行っている患者，ドナーペアの KIR ゲノタイプ解析も含めて国内での KIR 適合性と移植成績の解析結果を報告し，海外の結果との相違点についても考察したい。

シンポジウム

S-1

医用ミニブタの SLA 解析の意義と必要性

太田正穂

信州大学医学部法医学

医学生物学の発展には多種の実験動物が利用されてきた。近年、大動物として医学研究に用いられていたイヌが社会的事情により使用の制約が課せられ、代わってミニブタが実験動物として注目されている。ミニブタは、解剖学的・生理学的にヒトと類似性が高く、しかも小型で穏和な性格を持つため、移植や実験動物として医学分野での需要が高まってきた。特に、異種移植、再生医療、疾患発症モデルと遺伝子診断・治療、ゲノム創薬のための研究に医用動物としての重要性が認められてきた。ミニブタを医学研究や医用で使用するには、遺伝学的背景が明らかなミニブタが必要である。そこでマウスやラットで行われてきたように、遺伝学的指標を得るには MHC のタイプを知るのが最適であると考えられる。

我々はブタの MHC である SLA (swine leukocyte antigen) 遺伝子を固定化した SLA 純系ミニブタの作出と家系樹立を目的として作成されたミニブタ(クラウン系)を用いて SLA-DNA タイピング法により、SLA 遺伝子の多型性解析を試みている。解析には3個の非古典的クラス I 遺伝子 (*SLA-1*, *SLA-2*, *SLA-3*) と2個のクラス II 遺伝子 (*DRB1* と *DQB1*) の多型を PCR-SSP 法と PCR-RFLP 法を併用して検査している。これまで、我々の解析したクラウン系のミニブタでは、3種類のハプロタイプが確認された。

ミニブタの SLA 遺伝子多型解析は、ヒトに比べ遙かに遅れているのが現状である。ヒトのようにアリル命名の nomenclature もまだ確立されておらず、アリル名が混沌としているものもあることから、世界的な統一が必要である。

脳死移植に関する法律が制定され、臓器移植の機会が増加したが依然慢性的なドナー不足に陥っている今日、何らかの打開策が求められている。果たして可能になるか未知の領域であるが、ミニブタからヒトへの異種臓器移植の実施を見据えて、SLA の遺伝子領域の構造解析と多型解析は極めて重要であると考えられる。また、SLA 多型解析は、SLA 純系のミニブタの作成、臓器移植における慢性拒絶反応の機序解析、免疫学寛容導入実験、各種疾患発症や抑制遺伝子の解析、遺伝子治療のシュミレーションや疾患発症モデル動物の作成など医学分野での研究に多大な情報をもたらすと期待している。

S-2

医科学研究分野におけるミニブタの利用

内田昌樹

(株)中外医科学研究所

実験動物としてのミニブタの歴史は古く、1950 年台には「miniature swine」が登場し、1962 年にはブルトニウムの毒性試験に用いられている。現在では数多くの系統が開発されているが、当社は 1976 年にドイツのゲッティンゲン大学よりゲッティンゲン系ミニブタを導入しコロニーを維持している。ミニブタは医科学研究分野での中型実験動物として欧米で着実に利用が拡大しつつある。ミニブタの最も期待の大きい分野は異種臓器移植のドナーとしての可能性であろう。SLA 固定化ミニブタの作出、高度な臓器移植技術、抗原性欠損ミニブタの作出などのブレイクスルーによってよりいっそうの現実味を帯びてきている。一方で、医薬品開発においてもミニブタの利用は活発化してきており、海外において毒性試験への使用は決して希なことではない。病態モデルを用いた薬理・薬効試験も増えており、生活習慣病領域での利用も活発化してきている。さらに最も有効な骨粗鬆症治療薬であるビスフォスフォネートの薬効評価はミニブタの骨粗鬆症モデルで行われ、アメリカおよび日本での認可申請資料に使用されている。また、ヒトゲノムの MHC 領域には数多くの遺伝子がコードされており、そのいくつかは疾患との関連性が示唆されている。SLA 領域においてもヒトと同様に多数の遺伝子が確認されており、原因遺伝子の単離や病態モデルの作出、さらにはゲノム創薬への可能性がうかがわれる。

当社では、元来創薬研究への貢献を目的にこのコロニーを維持しているが、その利用・取り組みはさまざまである。各種薬の毒性試験はもとより、血清生化学値の集積、循環器値の集積、泌尿器系病態モデルの作出、骨粗鬆症モデルによる薬効評価、内視鏡的アプローチによる製品評価、遺伝的統御への SLA の利用、果ては遺伝子改変ミニブタの作出にいたる。

本シンポジウムでは医科学研究分野でのミニブタの現状と、我が社での取り組みについて話題提供したい。

S-3

日生研ミニブタ (NIBS 系)を用いた移植実験およびユーザー側からの要望

小林孝彰

名古屋大学医学部第二外科

私どもは、免疫抑制剤の拒絶反応治療および抑制効果判定のためにブタ同種移植実験を企画しました。この時に日生研ミニブタ (NIBS 系)を使用する経験を得ましたので、移植実験内容およびユーザー側からみた医用実験ミニブタに関する要望について報告させていただきます。

ブタの同種移植実験では、拒絶反応が起きにくいことも報告されており、拒絶反応を引き起こすドナーレシピエントの組み合わせを考慮する必要があります。MGH (NIH) ミニブタなど MHC (SLA) が固定されているブタの入手は困難であり、費用の面、定期的にまとまった数の入手が可能であること、比較的系の離れた組み合わせとなることを考慮し、Landrace/Yorkshire ブタおよび NIBS 系ミニブタを使用しました。

NIBS 系の特徴は、ピットマンムーア × 台湾小耳 × ゲッチングンの三元交配であり、MHC class II の DRB1, DQA, DQB 座位の遺伝子型は全てホモ型で固定されているということでした。ドナー・レシピエントはアジア系と西洋系のブタの組み合わせであり、移植後 1-2 週で血管型拒絶反応がほとんど全ての移植に見られました。ドナー splenocyte を用いた、flow cytometry crossmatch においても、抗ドナー抗体の産生がみられました。

しかしながら、ドナーの何に対する抗体が産生されたかという問題は解決されていません。SLA に対する抗体とも考えられますが、抗 SLA 抗体などによる詳細な検討ができず今後の課題として残されています。最近になりやっと、2.4 Mb の SLA クラス II, III, I の全領域のゲノム塩基配列が解析され、Nomenclature が制定されようとしています。この DNA typing の結果についても一部報告します。

ミニブタは、ヒトの疾患モデルや、医薬品、化学物質などの安全性・毒性チェックのための実験用動物として、また異種移植、再生医療、(医薬品)などを目的とした遺伝子組み換えブタ(医療用材料)として注目されています。ユーザーの立場からは、移植実験に必要なブタは、SPF 化など感染症対策よりも、SLA 純系(固定されている)、低価格、安定供給(繁殖数、搬送方法)、ストレスに強いことが重要であると考えます。

TFB 学術奨励賞優秀賞受賞者口演

T-1

末梢血および胎盤 NK 細胞における HLA-E tetramer を用いた receptor 解析

○下嶋典子¹⁾, Daniel E Geraghty²⁾, 羽竹勝彦¹⁾, 石谷昭子¹⁾

1) 奈良県立医科大学法医学教室

2) Fred Hutchinson Cancer Research Center

【目的】 HLA-E は, HLA-E 以外の他の class I 分子の signal peptide を結合してはじめて細胞表面に発現し, CD94/NKG2A, CD94/NKG2C NK receptor の ligand として働く。この 2 種の receptor との反応性は, この signal peptide で異なる。

NK 細胞は, 末梢血中で約 10%, 脱落膜中では約 80% 存在すると報告されており, その population も異なる。我々は, HLA-A, -B, -C および -G の signal peptide を持つ 4 種の HLA-E tetramer を作製し, 末梢血, 胎盤絨毛間血および胎盤脱落膜中リンパ球について, NK receptor と HLA-E 分子の反応性を解析した。

【方法】 HLA-A2, -B7, -C14, -G のそれぞれの signal peptide を結合した HLA-E の tetramer を作製した。4 種の tetramer, および抗 CD94, 抗 CD56, 抗 NKG2A, 抗 NKG2C 抗体を用いて, 正常成人末梢血リンパ球, 絨毛間血リンパ球, NKL cell line を FACS で, 脱落膜リンパ球を免疫染色で解析した。

【結果】 CD56, CD94, NKG2A, NKG2C および 4 種の HLA-E tetramer 陽性細胞はいずれも末梢血, 胎盤絨毛間血液中に認められた。脱落膜 NK 細胞は, CD56, CD94, NKG2A がそれぞれ陽性であり, HLA-G の signal peptide を結合した HLA-E (HLA-E/G) の tetramer が非常に強く反応した。NKG2C については, 用いた抗 NKG2C 抗体が免疫染色に不適であったため, 脱落膜組織の NKG2C 陽性細胞は検出できなかった。

【考察】 HLA-G が正常組織で発現しているのは, 胎盤 trophoblasts のみである。そのため HLA-E/G が発現する組織も胎盤であることから, HLA-E/G と脱落膜 NK 細胞の反応性が, 他の HLA 由来の peptide を結合した場合と異なって, 際だって高いことは, HLA-E と -G の相互作用こそが, 胎盤における NK 活性およびサイトカイン分泌を制御していると考えられる。我々は, 脱落膜への CD56^{bright}CD94 陽性 NK 細胞集積が, HLA-E/G と NK receptor の反応の高さによるものであると推測しており, HLA-E 分子が, homing receptor 様の機能をもつのではないかと考えている。

T-2

比較ゲノム解析による霊長類 HLA-B/C 祖先領域の推定

○椎名 隆¹⁾, 柳谷和代¹⁾, Lutz Walter²⁾, 猪子英俊¹⁾

1) 東海大学医学部分子生命科学

2) ゲッティンゲン大学免疫遺伝学

【目的】 マダガスカルに生息する原猿類は約 6000 万年前にヒトの祖先と種分化した生物種であり, 我々のこれまでの知見から, ほぼ同時期に MHC クラス I 遺伝子と MIC 遺伝子が現在の HLA-B/C 領域に誕生した可能性が高い。もし両者間の種分化直前にこれらの遺伝子が誕生したのであれば, 原猿類のゲノムは原始的な HLA-B/C 祖先領域を保持していると考えられる。そこで本研究では, 原猿類に属するネズミキツネザルの HLA-B/C 直系領域の塩基配列を決定し, 霊長類間にて比較解析することにより HLA-B/C 領域の進化形成過程を明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】 BAC ライブラリーには, CHORI257 を用いた。そのスクリーニングには, ネズミキツネザルの MHC クラス I 遺伝子をプローブとした。ゲノム配列はショットガン法により決定した。比較には, ヒト, チンパンジー, アカゲザルのゲノム配列を用いた。

【結果および考察】 HLA-B/C 領域を含む 1 個の BAC クローンのゲノム配列を決定した結果, BAT1 と POU5F1 の間の 122kb に 1 個ずつのクラス I 遺伝子と MIC 遺伝子が同定されたが, いずれの遺伝子ともに明らかな偽遺伝子であった。ところが, HLA-B/C とゲノム構造が類似する HLA-L の直系領域を網羅する BAC クローンに, 複数個のクラス I 遺伝子が存在することから, ネズミキツネザルではこれらが HLA-B/C の機能を担っていると考えられた。また, 霊長類間の比較解析から, ネズミキツネザルが保持する原始的な HLA-B/C 祖先領域は, ヒトとアカゲザルとの種分化前の約 3000 万年前まで, クラス I 遺伝子の数を増す方向に進化したが, その後は逆に数を減らしながら現在の HLA-B/C 領域を形成したと推察された。

T-3

HLA クラス I 領域に位置する DNA 修復関連遺伝子 MDC1 の比較ゲノム解析および比較機能解析

○清水佐良子¹⁾, 椎名 隆¹⁾, 桜井敬之¹⁾, 安西達也¹⁾, 重成敦子¹⁾, 安藤麻子¹⁾, 坂本修一²⁾, 小松賢志²⁾, 猪子英俊¹⁾

1) 東海大・医・分子生命科学

2) 京大・放射線生物研究センター・ゲノム動態研究部門

【目的】 HLA クラス I 領域に位置する MDC1 遺伝子は、15 kb 内に 14 個のエクソンから構成されており、その分子は DNA 損傷センサーとして DNA の損傷を早期に感知、精密に修復し、染色体の安定性を保持する機能の一旦を担う。我々は、ホメオスタシスに働く MDC1 の構造の多様性および機能についてのヒトおよび種々の生物種における総合的な解析は、タンパク質がもつ機能の起源や分子進化と種分化の関連性を明確にする研究の基盤をなすと考えている。そこで本研究では、ヒトからマウスまでの 8 生物種における MDC1 遺伝子の比較ゲノム解析をおこなうこと、ヒト MDC1 発現プラスミドを構築し、人工的な組み換え体より発現させた変異 MDC1 タンパクの比較機能解析をおこなうことを目的とした。

【方法】 8 生物種(ヒト, チンパンジー, アカゲザル, カニクイザル, マーモセット, ブタ, マウス, ラット)の各 MDC1 陽性 BAC クローンあるいは MDC1 遺伝子の全域を含む PCR 産物のシーケンシング解析により MDC1 遺伝子の塩基配列を決定し、比較解析をおこなった。ヒト MDC1 発現プラスミドを MDC1 cDNA クローン(かずさ DNA 研究所)より構築し、繰り返し領域の人工的な組み換え体を作成した。

【結果および考察】 機能に関わる 2 つのドメイン構造 (FHA ドメイン, BRCT ドメイン) は全ての生物種で高度に保存されていたが、エクソン 9 内部の 41 アミノ酸残基の繰り返し回数はヒトでは 13 回, チンパンジーでは 15 回, アカゲザルでは 14 回, マウス, ラットでは 8 回と生物種により異なっていた。したがって、ヒトの繰り返し領域は進化に伴い欠失, 挿入を繰り返しながら形成されたと考えられた。この繰り返し領域にモチーフは見い出されていないことから、この領域の生物学的意義を明らかにするために、ヒト MDC1 の繰り返し領域の人工的な組み換え体およびヒト MDC1 遺伝子に種々の生物種の繰り返し領域を置き換えた組み換え体を作成し、これに成功した。現在、これら組み換え体のタンパク質を発現させ、詳細な解析を進めている。

T-4

HLA-A*3303-B*4403-DRB1*1302 ハプロタイプにおける HLA クラス I 領域のゲノム塩基配列

○高須美和¹⁾, 椎名 隆²⁾, 石川善英³⁾, 徳永勝士¹⁾, 猪子英俊²⁾

1) 東京大・医・人類遺伝

2) 東海大・医・分子生命科学 2

3) 日赤中央血液センター

【目的】 HLA クラス I 領域は約 1.9 Mb の中に多くの遺伝子を有し、高度な遺伝子多様性を示し、多くの疾患感受性領域が存在する。近年、ヨーロッパ系集団で頻度が高い HLA ハプロタイプについて HLA 全領域のゲノム塩基配列の解析が進められている。今回我々は、日本人および韓国人で頻度が高い HLA-A*3303-B*4403-DRB1*1302 ハプロタイプについて、クラス III 領域のテロメア側にある LTB 遺伝子からクラス I 領域の HLA-F 遺伝子の間に存在する発現遺伝子を中心に、50 遺伝子の塩基配列を PCR-ダイレクトシーケンシング法により解析した。

【方法】 ロング PCR は、HLA-A*3303-B*4403-DRB1*1302 ホモ接合の日本人非血縁者 2 名の末梢血より抽出した高分子ゲノム DNA を鋳型とし、発現遺伝子のプロモーター領域から 3' 末端非翻訳領域をコードする 90 種のロング PCR 用プライマーペアを用いて 2 段階温度 PCR 法で行った。各 PCR 産物の塩基配列は、3,893 個のプライマーを使用し PRISM 3730 DNA シーケンサー (Applied Biosystems) で決定した。

【結果および考察】 それぞれのホモ接合試料について 434 kb のゲノム塩基配列を決定した結果、興味深いことに 2 人の非血縁者間で完全一致した。日本人で頻度が高い A24-B52-DR15 および A24-B54-DR4, ヨーロッパ系で頻度が高い A1-B8-DR3 および A3-B7-DR15 ハプロタイプのゲノム塩基配列と比較したところ、HLA-A, -B および -C 遺伝子についての差異は日本人ハプロタイプとの間では約 2% であったのに対し、ヨーロッパ系ハプロタイプとの間では約 3% であった。一方、非 HLA 遺伝子においてはいずれのハプロタイプとの間でも約 0.15% と低いことが分かった。さらに、Neighbor Joining 法により遺伝子の系統樹を作成したところ、近傍の遺伝子どうしで類似した分岐パターンが得られたことにより、クラス I 遺伝子群がブロック単位で進化したことが示唆される。

T-5

LR-PCR 法による HLA クラス領域の多様性解析

○橋本奈美¹⁾, 椎名 隆¹⁾, 勝山善彦²⁾, 太田正穂³⁾, 猪子英俊¹⁾

1) 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

2) 信州大学病院薬剤部

3) 信州大学医学部法医学教室

【目的】 演者らは日本人および世界的に頻度の高い代表的な単一 HLA ハプロタイプにおける HLA 領域のゲノム塩基配列を決定することにより, これらゲノム塩基配列間における SNP 同定, SNP カタログの構築, HLA 領域における SNP 間の連鎖不平衡の強度の分布, 組換えスポットの同定, ハプロタイプブロックの推定など HLA 領域のゲノム多様性を詳細に明らかにし, HLA 遺伝子座のみならず一般的なゲノム情報より疾患感受性遺伝子特定のための戦略を確立することが必要不可欠であると考えている。そこで, 本研究では日本人に頻度の高い単一 HLA ハプロタイプにおける HLA クラス I 領域の塩基配列を Long Ranged PCR (LR-PCR) 法により決定し, 既知塩基配列を加えた HLA ハプロタイプ間の多様性解析から, SNP の検出とその分布さらには, SNP と疾患感受性遺伝子との関係を明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】 LR-PCR は LKT3 (A24-B54-DR4) と AKIBA (A24-B54-DR4) よりそれぞれ抽出したゲノム DNA を鋳型として, HLA クラス I 領域に位置する 54 遺伝子を網羅する 100 セットの LR-PCR プライマーを用いておこなった。これらの PCR 産物を 4403 本のシーケンスプライマーを用いて塩基配列を決定した。その後, ヨーロッパ人に頻度の高い COX (A1-B8-DR3) と PGF (A3-B7-DR15) を含めたアライメントを作成し, SNP を算出した。

【結果および考察】 54 遺伝子中, 52 遺伝子の塩基配列を決定した結果, LKT3 では 475,879 bp, AKIBA では 475,686 bp の塩基配列が得られた。これらの配列に COX, PGF を含めて解析した結果, 総数 1,770 個の SNP が見い出された。また, HLA-A, -B, -C 領域近傍の非 HLA 領域の多様度はその他の非 HLA 領域と比較して顕著に高く, さらにこの領域には疾患感受性遺伝子が集約されて見い出された。これは, HLA クラス I 遺伝子が多型を蓄積する正の選択圧を受けているため, その近傍の負の選択圧がかかるべき非 HLA 遺伝子に有害な多型がヒッチハイク効果のため保存された結果, 特定の疾患の発症を誘起するようになったと示唆された。

一般口演発表

O1-1

霊長類を含めた HLA クラス I 領域の Cross-species SNP 解析

○ 勝山善彦¹⁾, 椎名 隆²⁾, 橋本奈美²⁾, 太田正穂³⁾, 猪子英俊²⁾

- 1) 信州大学病院薬剤部
2) 東海大学医学部分子生命科学
3) 信州大学医学部法医学教室

【目的】 4種類の HLA ハプロタイプ (LKT3, AKIBA, COX, PGF) 475 kb に同定された 1770 個の SNPs の分布は, HLA クラス I 遺伝子の正の淘汰圧に起因するヒッチハイキング効果がクラス I 遺伝子領域内に存在する疾患感受性遺伝子を誘導することを示唆した。また, 非 HLA クラス I が密集する領域は, ハプロタイプ間でよく保存されていた。本研究では, チンパンジー, アカゲザルの塩基配列をアウトグループとした詳細な Cross-species SNP 解析を行い, これら SNPs の誕生時期を推定し, HLA 領域の多型性生成のメカニズム解析を行った。

【材料および方法】 LTB から HLA-F の間に位置する 40 遺伝子領域, 387 kb について 4 種類の HLA ハプロタイプ, チンパンジーおよびアカゲザルの塩基配列を整列化させた。その後, 各遺伝子領域に同定された SNPs を, HLA ハプロタイプ形成後(①), HLA ハプロタイプ形成前かつチンパンジーとの種分化後(②), チンパンジー系統(③)にそれぞれ分類した。

【結果および考察】 387 kb における合計の SNP 数は 22593 個であった。この内, ①の時期に誕生した SNP は平均 1.6% (平均 351 個), ②の時期に誕生した SNP は 6.6% (1484 個), ③に誕生した SNP は 8.0% (1818 個)であった。したがって, ヒトとチンパンジーとの種分化後にヒトの系統に誕生した SNP 数 1835 個(351 + 1484)は, チンパンジーの系統に誕生した SNP 数とはほぼ同数であったことから, チンパンジーにもヒト同様にヒッチハイキング領域が存在することが推察された。これらの SNP 数を非 MHC クラス I 領域, MHC-E, -F 領域, MHC-A, -B 領域に分類した場合, 非 MHC クラス I 領域と MHC-E, -F 領域は, ①の時期で 1.3% と 1.5%, ②の時期で 6.7% と 6.9%, ③の時期で 7.9% と 8.8% をそれぞれ占めていることから, はほぼ同じ速度で SNP が誕生したといえる。これに対して, MHC-A, -B 領域は, それぞれ 9.7%, 1.2%, 9.1% であることから, MHC-A, -B 領域の SNP は極めて最近に誕生したと考えられた。

O1-2

HLA 領域における SNPs, マイクロサテライトの LD ブロック解析

○ 成瀬妙子¹⁾, 志知大輔¹⁾, 吉川枝里¹⁾, 重成敦子¹⁾, 河田寿子¹⁾, 割田貴之¹⁾, 勝山善彦²⁾, 太田正穂²⁾, 猪子英俊¹⁾

- 1) 東海大学医学部基礎医学系
2) 信州大学医学部法医学

【目的】 HLA 領域は遺伝的多型に富み, 領域内に存在する HLA およびいくつかの遺伝子は, 強い連鎖不平衡 (LD) を示すことが知られている。今回我々は, 日本人の代表的な HLA ハプロタイプについて, 領域内に存在する遺伝子の一塩基多型 (SNPs) 及び多型マイクロサテライトマーカーを用いて多型解析を行ない, LD ブロックの形成について考察した。

【対象と方法】 対象は, 家計調査により, HLA-A, B, C, DRB1, DQA1, DQB1 遺伝子のハプロタイプが確定している非血縁者 139 例を用いた。方法は, HLA クラス I, II, II 領域内に設定された 18 種の多型マイクロサテライト, 及び TNFA, IkBL, ATP6G 遺伝子のプロモーターまたはイントロン部に存在する, 計 12 箇所の SNPs の多型解析を行ない, HLA-A 遺伝子より, TAP1 マイクロサテライトマーカーまでの約 2.8 Mb の領域についてハプロタイプを推定し, 連鎖を検討した。

【結果】 日本人の代表的なハプロタイプである以下の 5 種, HLA-A*2402-B*0702-C*0702-DRB1*0101-DQB1*0101 (12 例中 7 例: LD 0.025)
HLA-A*3303-B*4403-C*1403-DRB1*1302-DQB1*0604 (8 例中 6 例: LD 0.022)
HLA-A*0207-B*4601-C*0102-DRB1*0803-DQB1*0601 (5 例中 4 例: LD 0.014)
HLA-A*2402-B*5901-C*0102-DRB1*0405-DQB1*0401 (5 例中 4 例: LD 0.014)
HLA-A*2402-B*5201-C*1202-DRB1*1502-DQB1*0601 (19 例中 13 例: LD 0.046)
において, すべてのマーカー多型が完全な LD を示し, 2.8 Mb にも及ぶ領域で LD ブロックを形成していることが明らかとなった。一方, はほぼ完全な LD にある HLA-A*2402-B*5401-C*0102-DRB1*0405-DQB1*0401 ハプロタイプでは, HLA-E 近傍のマイクロサテライト 1 種のみが 3 パターンに分類された。その他のハプロタイプにおいても, 領域内で多型を示すマイクロサテライトは各 HLA ハプロタイプに特徴的であり, LD の形成過程は HLA ハプロタイプによって異なることが示唆された。

O1-3

HLA 領域内マイクロサテライトのハプロタイプ解析

○ 太田正穂¹⁾, 勝山善彦²⁾, 成瀬妙子³⁾, 猪子英俊³⁾, 佐田正晴⁴⁾, 福島弘文¹⁾

- 1) 信州大学医学部法医学教室
- 2) 信州大学付属病院薬剤部法医学教室
- 3) 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学
- 4) 国立循環器病センター再生医療部

【目的】 HLA 遺伝子は、各遺伝子座間において民族による特徴的な連鎖不平衡を示すハプロタイプが知られているが、そのハプロタイプ内におけるマイクロサテライトの連鎖については詳細な報告は見られていない。今回、我々は一般健康人 102 人の HLA アリルタイプをもとに、HLA 領域内に設けた 41 種類のマイクロサテライト解析から HLA ハプロタイプとマイクロサテライトとの連鎖について調べ、ハプロタイプ形成機序について考察した。

【材料と方法】 HLA 5 座 (A, B, C, DRB1, DQB1) がホモの DNA サンプルを 8, 4 座がホモのサンプルを 2, 3 座がホモのサンプルを 12, 2 座がホモのサンプルを 12, 1 座がホモのサンプルを 68 種類、総数 102 種類についてマイクロサテライト多型を検査した。マイクロサテライトは HLA-F 遺伝子のセントロメアー側近傍から DOA 遺伝子のテロメアー側近傍 3,140 Kb 間に存在するマイクロサテライト 41 種類を使用した。マイクロサテライト多型は、プライマーの一方に蛍光色素 FAM, TET, HEX で標識し、PCR を行った後、ABI377 自動シーケンサーを用いたフラグメント解析で決定した。また、アリル決定のためのコントロールには、遺伝子配列が既知の B セルライン PGF と COX の DNA を用いた。

【結果と考察】 日本人でよく見られるハプロタイプ A*2402-C*1202-B*5201-DRB1*1502,DQB1*0601 と A*3303-C*1403-B*4403-DRB1*1302-DQB1*0604 をホモ接合体としてもつサンプルのマイクロサテライト解析から、3Mb に渡り連鎖が殆ど保たれていたが、亜型も僅かに見られた。各 HLA 遺伝子座間で連鎖を示すハプロタイプの解析から、その遺伝子間にあるマイクロサテライトの多くは同型を示した。今回の解析から HLA ハプロタイプに依存してマイクロサテライトを含めた特徴的なハプロタイプが形成されていることが示唆され、亜型の形成は HLA ハプロタイプ形成後に生じたと思われる。今後、マイクロサテライト解析を行うことにより、HLA ハプロタイプ形成の新旧について考察できるか検討する予定である。

O1-4

各胎生期胎盤トロホプラストにおける HLA-F の発現について

○ 富山 舞¹⁾, 下嶋典子¹⁾, 正武孝則^{1,2)}, 羽竹勝彦¹⁾, 石谷昭子¹⁾

- 1) 奈良県立医科大学法医学研究室
- 2) 林産婦人科病院

【緒言】 我々はこれまで、HLA-E, F, G 遺伝子の機能解析を目的としてモノクローナル抗体を作成しその発現を調べてきた。その中で、HLA-G は母体と胎児の直接の接点である胎盤トロホプラストに強く発現していた。HLA-E は HLA class I 分子が発現しているすべての組織に発現していた。これまで HLA-F の発現については人体のいかなる細胞においても細胞表面には発現されていないと報告されてきた。しかし、Geraghty らによって EBV Transformed 細胞においてその細胞表面に発現することが報告された。一方我々は、いくつかの Cell line において細胞質内に発現していることを明らかにした。また、正常満期胎盤のトロホプラスト細胞の表面に HLA-F が発現していることを見いだした。今回これらの分子について、初期、中期、後期の各胎生期胎盤トロホプラストにおける発現について検索した。

【方法】 モノクローナル抗体、87G (HLA-G), 3D11 (HLA-F), 3D12 (HLA-E) と HISTOFINE SIMPLE-STAIN MAX-PO (M) kit (NICHIREI Co., Japan) を用いて免疫染色を行った。HLA-F を発現する細胞は、蛍光色素を付与した 3D11 と抗サイトケラチン、もしくは抗ビメンチンモノクローナル抗体を用いた 2 重染色を行い同定した。

【結果】 いずれの胎生期でも HLA-G は extravillous trophoblast (EXTs) に強く発現しており、HLA-E はすべてのトロホプラストと脱着膜に弱く発現していた。HLA-F は全てのタイプのトロホプラストに弱く発現し、特に母胎脱着膜に浸潤する EXTs には強く発現していた。

【考察】 我々は各胎生期において、絨毛トロホプラスト、特に EXTs に強く HLA-F が発現していることを発見した。これらのことから HLA-E, -F, -G が相互作用して、胎児を母体免疫細胞から保護することが示唆される。

O1-5

演題名 カニクイザル ES 細胞から分化誘導した HLA-DRB 遺伝子導入樹状細胞による DR53 拘束性ヒト T 細胞株への抗原提示

○ 千住 覚¹⁾, 末盛博文²⁾, 松吉秀武¹⁾, 平田真哉¹⁾, 植村靖史¹⁾, Yu-Zhen Chen¹⁾, 福岡大喜¹⁾, 古谷正敬³⁾, 中辻憲夫⁴⁾, 西村泰治¹⁾

1) 熊本大学大学院医学薬学研究部免疫識別学分野

2) 京都大学再生医科学研究所幹細胞医学研究センター

3) 慶応大学医学部産婦人科学教室

4) 京都大学再生医科学研究所発生分化研究分野

【目 的】 我々は、以前の研究でマウスの ES 細胞から樹状細胞への *in vitro* 分化誘導法を開発している。さらに、この方法を用いて作製した抗原分子と免疫制御分子を同時に発現する、遺伝子改変樹状細胞をマウスへ投与することにより、マウス個体の免疫応答を抗原特異的に制御できることを示している。今回、この技術の医療への応用を目指して、霊長類の ES 細胞からの樹状細胞への分化誘導法、および、これを用いた遺伝子改変樹状細胞の作製方法の開発を試みた。

【方 法】 ES 細胞由来樹状細胞の作製: カニクイザル ES 細胞をマウス由来の造血支持細胞である ST2 および OP9 と順次共培養し、血球系細胞への分化誘導を誘導した。さらに、樹状細胞への分化と成熟を促すために、GM-CSF, M-CSF, IL-4, Flt-3L, TNF- α , および LPS を培養系へ添加した。遺伝子改変樹状細胞の作製: ヒトとカニクイザルの DRA 遺伝子の相同性から、DRB4 遺伝子のみを導入により DR53 分子の発現が可能と予想されたため、HLA-DRB4*0103 発現ベクターを電気穿孔法により ES 細胞へ導入した。これを、上記の方法により樹状細胞へと分化誘導した。この遺伝子改変樹状細胞の抗原提示活性を、DR53 拘束性 GAD (グルタミン酸脱炭酸酵素) 特異的ヒト T 細胞クローン (SA35.2) に対する刺激活性により解析した。

【結 果】 約 25 日間の分化誘導培養により、ES 細胞から樹状細胞を分化誘導することが可能であった。ES 細胞由来の樹状細胞は、MHC class II, CD80, CD86, CD40, および IL-12 を発現しており、また、アロ MLR 刺激活性を有していた。HLA-DRB4*0103 発現ベクターを導入した ES 細胞由来の樹状細胞は、GAD タンパクをプロセスし SA35.2T 細胞クローンに提示して細胞増殖反応を誘導することができた。

【結 論】 カニクイザルの ES 細胞から T 細胞刺激活性

と抗原提示活性のある樹状細胞を分化誘導する手法、さらに、この手法を用いて樹状細胞の遺伝子改変を行う技術を確認した。ほぼ同様の方法が、ヒト ES 細胞にも適応できると予想される。

O2-1

食道癌拒絶抗原 PP-RP 由来の HLA-A24 拘束性 T 細胞エピトープの同定

Identification of HLA-A24-restricted and esophageal cancer-specific tumor rejection antigen, PP-RP-derived epitopes for tumor-reactive cytotoxic T cells

○ 西村泰治¹⁾, 吉武義泰^{1,2)}, 門司幹男¹⁾, 福岡大喜^{1,2)}, 生田義明¹⁾, 篠原正徳²⁾, 片桐豊雅³⁾, 古川洋一³⁾, 中村祐輔³⁾, 中面哲也¹⁾

1) 熊大・院医薬研究部・免疫識別学

2) 熊大・顎口腔病態学

3) 東大・医科研・ヒトゲノム解析セ

【目 的】 食道癌において、腫瘍拒絶抗原を同定する。

【方 法】 食道癌組織において、9,216 種類の遺伝子について cDNA マイクロアレイ解析を行い、腫瘍特異的抗原として 1,717 アミノ酸からなる Proliferation potential-related protein (PP-RP) を同定した。HLA-A24 結合モチーフをもつ PP-RP 由来ペプチドを用い、食道癌患者の末梢血単核球を刺激し、PP-RP 特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 株を誘導した。さらにヒト食道癌細胞株を生着させたヌードマウスに CTL 株を養子免疫し、腫瘍拒絶効果を観察した。

【結 果】 食道癌患者 26 名中 22 人で非癌部より癌部で高発現 (平均 396.2 倍) する、新規ヒト癌抗原 PP-RP を同定した。Northern blot 解析では、PP-RP は胎盤と精巣以外のヒト正常臓器にはほとんど発現せず、調べた 9 種類すべての食道癌細胞株で PP-RP の発現を認めた。食道癌組織の免疫染色では、患者 22 人中 20 人において発現が認められた。細胞内染色によると、PP-RP は分裂期に染色体に局在した。PP-RP は E3 ubiquitin ligase domain と DNA topoisomerase I domain を有し、PP-RP 高発現癌細胞株において PP-RP 遺伝子の発現を抑制することにより、細胞増殖速度が遅くなった。したがって PP-RP は細胞増殖に関連した機能を持ち、食道癌の癌化と関係している可能性が示唆された。食道癌患者より 10 種類の PP-RP ペプチドのそれぞれに特異的に反応し、癌細胞株に対して細胞傷害活性を示す CTL 株が誘導でき、これらをヒト食道癌細胞株を生着させたヌードマウスに養子免疫することにより、腫瘍の増殖抑制効果が認められた。

【結 論】 cDNA マイクロアレイ解析より同定された PP-RP は、癌拒絶抗原として免疫療法の標的分子となる可能性が示された。

O2-2

結核菌の新規感染防御抗原である MPT51 の MHC 拘束性エピトープの同定

○ 小出幸夫, 鈴木美奈, 青枝大貴, 永田 年
浜松医大・微生物学

【目 的】 我々は DNA ワクチンを用いることにより、結核菌の分泌蛋白である MPT51 分子が結核菌に対する感染防御抗原として機能する結果を得た。そこで、MPT51 分子によって誘導される細胞性免疫を解析するため、T 細胞エピトープの同定を行った。

【方 法】 MPT51 遺伝子を発現プラスミドに挿入し、pCI-MPT51 を得た。これを BALB/c, V57BL/6 および HLA-A*0201 Tg/H2 クラス I KO マウスに遺伝子銃で免疫した。その後、免疫マウスの脾細胞を、MPT51 分子を網羅する 20 アミノ酸からなる overlapping peptide library で刺激し、培養上清中の IFN- γ 量を ELISA で測定した。エピトープ反応性 T 細胞亜集団は CD4, CD8 と細胞質内 IFN- γ の三重染色で同定し、MHC 拘束性分子の同定は RMA-S による MHC 安定化試験で行った。また、テトラマー法により、MPT51 特異的 CD8⁺T 細胞を測定した。

【結果と考察】 1) BALB/c (H2^d) マウスでは、p21-40 に CD8⁺T 細胞エピトープが存在することが判明した。アルゴリズムを用いることにより、p24-32 がエピトープであり、MHC 安定化試験により、その拘束性分子は H2-D^d であることが判明した。以上の結果から、テトラマーを作製し、特異的 T 細胞を測定したところ、CD8⁺T 細胞の約 3% を占めることが判明した。2) C57BL/6 (H2^b) マウスでは、CD4⁺T 細胞エピトープとして、P171-190 及び p191-210 を同定した。前者は dominant, 後者は subdominant エピトープであった。拘束性分子は H2-A^b と推測された。3) HLA-A*0201 拘束性 CD8⁺T 細胞エピトープは p53-62 であることが判明した。これらのエピトープの同定は特異的 T 細胞の解析、細胞傷害性 T 細胞活性の測定のために必須である。

O2-3

ヒトナルコレプシー候補領域のマイクロサテライトマーカーを用いた fine mapping

○ 川嶋実苗¹⁾, 生田智樹²⁾, 田宮 元²⁾, 本多 裕³⁾, 十字 猛夫⁴⁾, 徳永勝士¹⁾, 猪子英俊²⁾

- 1) 東京大学医学系研究科人類遺伝学
- 2) 東海大学医学部分子生命科学 2
- 3) 精神神経センター附属清和病院
- 4) 日本赤十字中央血液センター

ヒトナルコレプシー発症には複数の遺伝的要因と環境要因が関与していると考えられている。既に、ヒト白血球抗原 (HLA) 領域に存在する HLA-DRB1*1501-DQB1*0602 ハプロタイプの関与が知られているが、HLA のみではその発症や病態を説明できず、また、推定 λ s 値からも、他の遺伝的要因の関与が考えられる。本研究は、HLA 以外のナルコレプシー感受性遺伝子探索を目的としている。

約 3 万種類のマイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイドな関連分析を行っている。1 次・2 次スクリーニングでは患者群 110 名、対照健常者群 210 名ずつのゲノム DNA を等量ずつ混合した pooled DNA を使用した。Pooled DNA を用いたマイクロサテライトマーカー解析は GeneScan ソフトウェアを用いた自動シーケンサー (ABI Prism 3700 DNA sequencer) によりおこない、波形の高さの比率から推定アレル頻度をもとめ、統計解析に用いた。両スクリーニングを通して有意差を示したマーカーのうち、患者 pool どうし対照者 pool どうしの波形を比較して特に再現性の高かったマイクロサテライトマーカーについて、個別試料 (患者: 95 名、対照者: 95 名) を用いて関連分析を行った。そこで強い関連が観察されたマイクロサテライトマーカー近傍領域に、さらに高密度にマイクロサテライトマーカーを設定して関連分析を行った。

1 次・2 次スクリーニング終了後、327 マイクロサテライトマーカーが少なくとも 1 つの統計量において有意差を示した。個別試料を用いた関連分析の結果、14 マイクロサテライトマーカーについて依然として有意差が観察された。特に、3 つのマイクロサテライトマーカーでは p 値が低かった ($p < 0.001$)。これら 3 つのマイクロサテライトマーカー近傍の複数のマーカーにおいても関連が確認できた。現在、さらに候補領域を狭めるため、SNP を用いた関連分析および連鎖不平衡解析を行っている。

O2-4

HLA 全領域にわたる SNPs によるスギ花粉症感受性遺伝子の検索

○ 中西真理¹⁾, 芦田恒夫²⁾, 井手 武³⁾, 益尾清恵⁴⁾, 佐田 正晴¹⁾, 羽竹勝彦¹⁾, 石谷昭子¹⁾

- 1) 奈良県立医科大学・法医学
- 2) 芦田耳鼻咽喉科
- 3) 奈良県立医科大学・化学
- 4) 株式会社 Veritas
- 5) 国立循環器センター

【目的】 現在、国民の 15% 以上がスギ花粉症を発症していると推測されており社会的問題になってきている。しかし、その遺伝的要因に関してはまだ十分に知られていない。我々は、これまでに全 HLA 領域にわたる single nucleotide polymorphisms (SNPs) を検索し、これら SNPs を SSP 法でタイピングすることにより疾患感受性遺伝子の検索を行ってきた。今回は、検体数を増加させ、さらに MICA 遺伝子の多型解析を加えて、感受性遺伝子の検索を行った。

【方法】 患者群としては、大阪府近辺在住でスギ開花時期に花粉症状のある者 177 名、健常対照群として、同地域在住で本人と両親に I 型アレルギー症状のない者 187 名より、インフォームドコンセントを得て末梢血を採取し、それより DNA を抽出した。

スギ、イネ科、キク科、ダニの 4 種の抗原特異的 IgE 抗体を RAST 法により測定した。SNPs タイピングは SSP 法により、HLA 領域の 153 SNPs をタイピングした。HLA タイピングはラボタイプ SSO 法により、low resolution レベルで行った。MICA タイピングは、exon 5 のマイクロサテライトを ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer を用い、GeneScan Analysis ソフトウェアにより解析した。

【結果】 健常群の中にも、何らかの特異的抗原に対して RAST 陽性の人が約半分存在した。健常群を対照として相関解析を行ったところ、HLA-A 遺伝子近辺の SNP GA54 ($P = 0.0015$) と MICA 遺伝子近辺の SNP ($P = 0.0003$) で相関が認められた。また、マイクロサテライトを用いた MICA の相関解析でも、アレル A5.1 が有意に減少し ($P = 0.0158$)、A6 が有意に増加し ($P = 0.0086$)、有意の相関が認められた。

O2-5

C型肝炎ウイルスに起因した心筋症の疾患感受性遺伝子探索

○ 志知大輔¹⁾, 吉川枝里¹⁾, 太田正穂²⁾, 勝山善彦²⁾, 日野原邦彦³⁾, 高橋めぐみ³⁾, 安波道郎³⁾, 木村彰方³⁾, 松森昭⁴⁾, 成瀬妙子¹⁾, 猪子英俊¹⁾

- 1) 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学
- 2) 信州大学医学部法医学教室
- 3) 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態
- 4) 京都大学医学研究科循環病態学

【目的】 C型肝炎ウイルス (hepatitis C virus; HCV) 感染により慢性肝炎以外にも拡張型心筋症 (DCM) や肥大型心筋症 (HCM) を発症することが明らかとなってきた。これまでに我々は HLA クラス III 領域に位置する *TNFA* から *MICB* までの 80 kb 内に HCV-DCM 及び HCM への感受性遺伝子候補領域を特定している。また、解析を行った候補遺伝子 (*TNFA*, *IkBL*, *ATP6G*) のうち、HCV-DCM において *IkBL* プロモーターの SNP (*IkBLp**-422T9) が第一義的相関を示す知見を得ている。今回、我々は *BAT1* プロモーター領域多型に注目し、相関解析や連鎖不平衡解析から第一義的な相関を示す多型の特定を試みた。

【方法】 本研究では HCV-DCM 22 例, HCV-HCM 39 例, 日本人一般集団 100 例を用いた。標的とする多型を含む *BAT1* 遺伝子上流の 1.5 kb を PCR 法により特異的に増幅し、直接塩基配列法により多型の検索を行った。ついで、集団間での頻度比較解析を行うとともに、連鎖不平衡係数 (D' , r^2) により各多型間の連鎖不平衡の強さを評価した。

【結果】 HCV-DCM 及び HCV-HCM ともに、*BAT1* 多型との有意な相関は見出されなかった。また連鎖不平衡解析から、HCV-DCM に有意な相関を示した *IkBLp**-422T9 は、*ATP6G intron2* + 22A ($D' = 1.0$, $r^2 = 1.0$) だけでなく、同じく相関を示した *HLA-B**0702 ($D' = 1.0$, $r^2 = 0.54$) とも強い連鎖不平衡にあることが見出された。

【考察】 HCV-DCM と HLA 多型との一連の相関は、*IkBLp**-422T9 と *HLA-B**0702 を軸とする HLA ハプロタイプと感受性遺伝子との強い連鎖不平衡によって説明可能である。これまでの結果から、HCV-DCM の感受性は、*HLA-B* 遺伝子というよりはむしろ *IkBL* プロモーター多型の *IkBLp**-422T9 にコントロールされるものと考えられる。また、HCV-DCM と HCV-HCM それぞれが異なる HLA 領域多型と相関を示すことから、HCV 感染後にそれぞれの病態へと至る分子機序に違いがあることが示唆される。現在、疾患感受性遺伝子をさらに絞込むべく、*LTA* についての解析を進めている。

O2-6

HLA-B*510101 の民族間比較検討～ベーチェット病は日本にどのようなルートでもたらされたか～

○ 竹本裕子¹⁾, 成瀬妙子²⁾, 南場研一¹⁾, 水木信久³⁾, 猪子英俊²⁾, 大野重昭¹⁾

- 1) 北海道大学医学部視覚器病学講座
- 2) 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学系
- 3) 横浜市立大学医学部眼科学講座 教授

【目的】 ベーチェット病は眼炎症、口腔内アフタ、外陰部潰瘍、皮膚症状を主症状とする疾患で、HLA-B*510101 との相関が知られている。また、ベーチェット病は日本、中国などの東アジアからイラン、トルコなどの中東までのシルクロード地域に多く見られることから「シルクロード病」とも呼ばれている。そこで、今回我々は異なる民族のベーチェット病患者の HLA-B 遺伝子領域を比較検討することで、ベーチェット病がどのようなルートで日本にもたらされたかの解明を試みる。

【方法】 日本人、イラン人、トルコ人、ヨルダン人のベーチェット病患者の末梢血から DNA を抽出し、これを用いて HLA タイピングを行なった。対象のうち HLA-B*510101 を持つ検体を選出し、直接塩基配列決定法により HLA-B 遺伝子を含む約 4.6 kb の塩基配列を決定した。さらに、決定した塩基配列の多型の有無、部位等を比較検討することで、B*51 が原因遺伝子の一つと考えられた場合、ベーチェット病がどのようなルートで日本にもたらされたかを検討した。

【結果】 民族に関わらず、HLA-B*510101 遺伝子はエクソンのみならず、プロモーターおよびイントロンを含む全塩基配列が完全に一致した。しかし、HLA-B 遺伝子のエクソン 7 の下流 750 bp から 1005 bp にまたがる領域には 7 ケ所の一塩基多型が見られた。これらの一塩基多型を民族ごとに比較すると中東のイラン、ヨルダン、トルコでは 7 ケ所全てに多型が見られたが、白人では 3 ケ所のみ、日本人では白人では多型が見られなかった 4 ケ所のみが多型が見られた。

【考察】 HLA-B*510101 アリルの起源は一つであると考えられる。また、下流の 1 塩基多型のハプロタイプからベーチェット病は中東から西側に向かった一群と東側に向かった一群に分岐したと考えられた。

O2-7

Lymphotoxin A 遺伝子多型 A252G と心筋梗塞の関連解析

○ 安波道郎^{1,2)}, 高橋めぐみ¹⁾, 宝田 茂³⁾, 笹岡大史³⁾, 和泉 徹³⁾, Jeong Euy Park⁴⁾, 木村彰方^{1,2)}

- 1) 東京医科歯科大学・大学院疾患生命科学部
- 2) 同・難治疾患研究所
- 3) 北里大学医学部
- 4) Samsung Medical Center・Sungkyunkwan University School of Medicine

【目 的】 心筋梗塞は冠状動脈の動脈硬化巣の破綻による血栓形成により惹き起こされ、発症・進展に炎症機転の関与が示唆されている。最近、日本人集団を対象とした患者-対照研究により、HLA クラス III 領域の Lymphotoxin A (LTA) 遺伝子多型 LTA A252G との関連が報告され、LTA *252G に伴う LTA 遺伝子発現の増強を介して心筋梗塞発症に寄与することが想定された。心筋梗塞についてこれまでに多くの疾患関連遺伝子多型が報告されたが、その中で別の研究によって追認されたものは少ない。我々は、LTA 遺伝子多型と心筋梗塞の関連を明らかにするべく日本人、韓国人の2民族集団での患者-対照研究を施行した。

【方 法】 日本人患者群 537 名、対照群 683 名、韓国人患者群 483 名、対照群 154 名について、PCR-NcoI RFLP により LTA A252G の遺伝子型を決定した。また、患者群について冠状動脈造影検査の所見から、冠状動脈主要3枝の動脈硬化病変によって階層化した解析も加えた。

【結 果】 心筋梗塞との関連が報告された遺伝子型の頻度は GG vs GA + AA の $2 \times 2 \chi^2$ 検定で、日本人集団では $P = 0.94$ 、韓国人集団では $P = 0.74$ といずれの集団でも差を認めなかった。しかし、患者群を冠状動脈硬化病変から0枝群、1枝群、2枝群、3枝群と階層化し、Mann-Whitney の U 検定により遺伝子型 GG vs GA + AA を比較すると、日本人患者群で $P = 0.013$ 、韓国人患者群で $P = 0.0007$ と動脈硬化病変の広がりが増すにつれて遺伝子型 GG の頻度上昇を認めた。

【考 察】 LTA *252G と心筋梗塞の関連は日本人、韓国人のいずれの民族集団においても追認できなかった。しかし LTA *252G は患者群内では冠状動脈硬化病変の程度と関連が認められ、LTA 遺伝子多型は心筋梗塞自体の危険因子ではなく、その基礎となる動脈硬化の進展に寄与していることが示唆された。

O3-1

KIR 遺伝子多型による慢性関節リウマチ疾患感受性遺伝子の検索

○ 岡本威明¹⁾, 亀岡陽子¹⁾, 山下隆博²⁾, 村田紀和³⁾, 芦田恒雄⁴⁾, 井手 武⁵⁾, 中西真理¹⁾, 羽竹勝彦¹⁾, Daniel E. Geraghty⁶⁾, 石谷昭子¹⁾

- 1) 奈良県立医科大学・法医学
- 2) 東京大学大学院医学系研究科・産婦人科学
- 3) 協和会病院リウマチセンター
- 4) 芦田耳鼻咽喉科
- 5) 奈良県立医科大学・化学
- 6) Fred Hutchinson Cancer Research Center

【目 的】 これまでの結果では、Killer Immunoglobulin-like Receptor (KIR) 遺伝子と疾患との相関はほとんど認められなかったが、慢性関節リウマチ (RA) 群において、わずかに 3DL1 遺伝子のうちサブタイプの 3DL1B において弱い相関が認められた。そこで、試料数を増加させるとともに、この 3DL1 の allele typing を行い、3DL1B 遺伝子のうちのいずれの allele が相関しているのかを明らかにした。

【方 法】 健常対照群 198 名、RA 群 114 名、花粉症群 167 名よりインフォームドコンセントを得て末梢血を採取し、それより DNA を抽出し DNA 解析に用いた。KIR 遺伝子の typing には、我々のデザインした 24 セットの primer を、3DL1 allele typing には、Gardiner らの 4 セットの primer を用いて SSP 法により行った。

【結 果】 RA 群において、KIR3DL1B 遺伝子発現が健常対照群と比較すると、有意に増加した ($\chi^2 = 4.46$, odds ratio = 1.69, $P = 0.035$)。さらに、allele レベルで検討した結果、3DL1*001 が有意に減少し ($\chi^2 = 3.95$, odds ratio = 2.69, $P = 0.046$)、3DL1*005 が有意に増加した ($\chi^2 = 9.54$, odds ratio = 2.28, $P = 0.002$)。

【考 察】 KIR3DL1 は抑制性 NK レセプターであり、3DL1 の各 allele と KIR3DL1 に対する特異的モノクローナル抗体 DX9 との親和性においては、3DL1*001 が高く、3DL1*005 が低いことが報告されている。従って、RA 群において、KIR3DL1 と各種リガンドとの親和性が減少し、NK 細胞に対して負のシグナルが入力されず、その結果として NK 細胞の傷害活性が誘導されていることが示唆された。

O3-2

慢性肺血栓塞栓症における, HLA と臨床像との相関の解析

○ 小南聡志^{1,2)}, 田邊信宏²⁾, 高橋めぐみ¹⁾, 柴田宏樹¹⁾, 安波道郎^{1,3)}, 栗山喬之²⁾, 木村彰方^{1,3)}

- 1) 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態
- 2) 千葉大学大学院医学研究院加齢呼吸器病態制御学
- 3) 東京医科歯科大学大学院疾患生命科学部ゲノム多様性

【目的】 血栓の肺動脈内塞栓により循環呼吸不全を来す肺血栓塞栓症はほとんどが急性例で我が国でも増加傾向にあるが, 慢性肺血栓塞栓症の頻度は極めて少なく日本での登録症例数は約 500 である。慢性肺血栓塞栓症では深部静脈血栓の継続的流入が想定されていたが, 最近の報告では深部静脈血栓症の合併はむしろ少なく, 多くの症例ではその成因が不明である。我々は本疾患の病態形成に関わる遺伝要因の解明を目的として, HLA を解析した。

【対象と方法】 対象は日本人本症患者 80 例(女性 61 例, 男性 19 例, 年齢 53 ± 12 [SD] 歳)であり, HLA-A, B, DPB1, DRB1 の DNA タイピングを行い, 本症と有意な関連を示したアレルの有無と臨床像を比較検討した。一般日本人集団 678 例における HLA 分布を対照とした。

【結果】 慢性肺血栓塞栓症は, B*5201 (患者 40% vs. 対照 24%, odds 比 2.14, corrected $p = 0.037$) 及び DPB1*0202 (患者 19% vs. 対照 6%, odds 比 3.41, corrected $p = 0.0014$) と有意な関連を示したが, これらの HLA アレルは日本人集団で連鎖不平衡になく, 層別化解析によって, それぞれ独立した危険因子であると考えられた。また, B*5201, DPB1*0202 のいずれかを有する群では, いずれも有さない群に比して深部静脈血栓症の頻度は有意に低かった ($16.2\% \text{ vs. } 40.5\%$, $p = 0.007$)。臨床像との関連では, B*5201 陽性例は女性に多く比較的軽症であるのに対し, DPB1*0202 陽性例は心機能及びガス交換能障害がより高度であった。

【結語】 HLA-B*5201 及び DPB1*0202 は, 慢性肺血栓塞栓症への疾患感受性及び異なる臨床病態形成に関連することが示唆された。

O3-3

維持血液透析中の糖尿病性腎症における C 型肝炎抗体陽性率と HLA との相関

○ 渡辺真穂, 小河原悟, 森本順子, 斉藤喬雄
福岡大学医学部第四内科

【目的】 近年, 維持血液透析患者数は急増し現在では 23 万人に達し, 今後も増加の一途をたどると予想される。透析導入の原因疾患の第一位は糖尿病性腎症であり, 糖尿病性腎症を原疾患とする維持血液透析患者の予後は慢性糸球体腎炎を原疾患とする維持血液透析患者に比べてきわめて不良である。また維持血液透析患者や糖尿病性腎症に C 型肝炎の合併が多いことが報告され, 今回, 2 型糖尿病性腎症による末期慢性腎不全患者の C 型肝炎抗体陽性率と HLA を検討した。

【方法】 2 型糖尿病性腎症を原疾患とした維持血液透析患者 75 名に対し, 患者背景, HCV 抗体及び HLA-DRB1 DNA タイピングを比較した。日本人 195 名を正常対照 (C 群) として使用した (第 12 回国際 HLA ワークショップ)。

【成績】 HCV 抗体陽性 (P 群) は 15 名 (20.0%) であった。性別 (M:F) では P 群は 11:4, HCV 抗体陰性 (N 群) は 42:18。平均年齢では P 群 68 ± 7.0 , N 群 62 ± 7.6 ($P < 0.01$)。糖尿病発症平均年齢では P 群 51 ± 10.2 , N 群 44.0 ± 9.4 ($p < 0.05$)。透析導入時平均年齢では P 群 64.1 ± 7.6 , N 群 57.9 ± 8.4 ($p < 0.05$)。透析平均年数では P 群 4.0 ± 3.4 , N 群 4.1 ± 3.1 (ns)。HLA-DRB1*0901 の頻度は P 群 53.8%, N 群 32.0%, C 群 20.4%, P 群 vs C 群: オッズ比 4.4, $p = 0.006$ 。DRB1*0101 の頻度 P 群 13.3%, N 群 20%, C 群 10.3%, N 群 vs C 群: オッズ比 2.2, $p = 0.043$ 。

【結論】 HCV 抗体陽性者は糖尿病発症年齢, 導入時年齢がいずれも高かった。HLA-DRB1*0901 は HCV 感染成立に, DRB1*0101 は HCV 感染防御に関係する可能性が示唆された。

O3-4

帯状疱疹および帯状疱疹後神経痛における疾患感受性遺伝子マッピング

○ 炭山大輔¹⁾, 品川はる美¹⁾, 馬淵智生²⁾, 太田正穂³⁾, 小澤 明²⁾, 成瀬妙子¹⁾, 猪子英俊¹⁾

1) 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

2) 東海大学医学部皮膚科

3) 信州大学医学部法医学

帯状疱疹 (HZ: herpes zoster) は、小児期の水痘罹患時に感染した水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV: varicella zoster virus) が、その後も脳や脊髄の神経節に潜伏し続け、後年免疫能の低下などによって再発したものである。また、帯状疱疹後神経痛 (PHN: postherpetic neuralgia) は、VZV の再帰感染により引き起こされ、皮膚症状の治癒後も激しい疼痛の残る治療困難な疾患である。HZ や PHN は、発症過程に必ず VZV 感染をすることや、免疫力の低下した高齢者に多発することから、VZV 感染と HLA 遺伝子との相関を明らかにするため、我々はヒト免疫応答を担う HLA 領域について疾患感受性遺伝子解析を行っている。

これまでのところ、PHN 発症者 (102 人)、HZ 未発症者 (52 人)、PHN 未発症者 (60 人) ならびに一般集団 (90 人) の 4 集団において HLA タイピングを行い、その結果 PHN 発症群と日本人一般集団との比較では、HLA-A*3303, -B*4403, -DRB1*1302 に有意な増加が認められ、これらによって構成されるハプロタイプが HZ 罹患後 PHN への発症過程に関与している可能性が考えられた。また HZ 未発症群と一般集団との比較では、HLA-B*5101 の有意な増加が認められ、HZ 発症群と HZ 未発症群との比較では、発症群において B*5101 の有意な減少が認められたことにより、B*5101 保有者は、HZ に対し疾患抵抗性を示すことが示唆された。さらに多型マイクロサテライトマーカーによる相関解析を行い、疾患感受性遺伝子は HLA クラス I 領域内の A, B 遺伝子周辺に存在する可能性が強く示唆された。そこで今回我々は、HLA-A および B 領域を中心に、さらに高密度なマイクロサテライト解析を行っている。

併せて、最近明らかにされた VZV の全塩基配列データより、HLA-A*3303, -B*4403 と特異的に結合可能なペプチドモチーフ検索を行っている。

O3-5

Graves 病における HLA と Thyroglobulin 遺伝子多型の相互作用の解析

○ 高橋めぐみ¹⁾, 安波道郎^{1,2)}, 木村彰方^{1,2)}

1) 東京医科歯科大学・難治疾患研究所

2) 同・大学院疾患生命科学研究所

【目的】 Graves 病 (GD) は甲状腺濾胞細胞表面の TSH 受容体を自己抗原とする自己免疫疾患である。HLA との強い関連が知られており、我々も日本人の GD と HLA-A, B および DP アリルとの関連を報告している。最近白人集団での研究で Thyroglobulin (Tg) 遺伝子多型との関連およびその多型と HLA-DR3 との相互作用の存在が報告された。Tg は甲状腺特異的自己免疫の標的分子の一つであり、GD の病態成立に関わると想定されることから、日本人において GD と Tg 遺伝子多型の関連解析を行なった。

【対象と方法】 HLA との関連解析に用いた GD 患者群と健常者対照群 (n = 249) を対照とし、患者群を通常見られる病型である TSH 結合阻止抗体 (TBII) 陽性群 (n = 141) と比較的軽症に経過する TBII 陰性群 (n = 97) に分けて解析した。Tg 遺伝子 exon 33 の SNP C5992T は PCR-SSCP 法により決定した。アリル頻度、遺伝子型頻度について χ^2 検定を行ない、また階層化解析によって HLA 多型との相互作用を検討した。

【結果と考察】 以前報告したように GD の病型により HLA との関連は異なっているが、白人集団で GD との関連が観察された Tg 5992C/C 遺伝子型については、TBII 陽性群 62.4% (vs 対照群 63.5%, OR = 0.96, P = 0.84), TBII 陰性群 58.8% (OR = 0.82, P = 0.42) と両病型とも関連を認めなかった。また、TBII 陽性群では、HLA-A2 (OR = 1.62, P = 0.02), DP*0501 (OR = 4.14, P = 0.00000002) は Tg 5992C/C 遺伝子型の背景の有無に関わらず関連を示し、また、TBII 陰性群においても HLA-A2 (OR = 1.86, P = 0.01), DP*0202 (OR = 4.42, P = 0.00003) の関連は Tg 5992C/C 遺伝子型の背景の有無に関わらず認められた。以上の結果から、日本人の GD への易罹患性について、Tg 遺伝子多型は何ら関与していないと考えられた。

一般ポスター発表

P1-1

キノコ栽培者でのアレルギー発症機序における HLA クラス II 抗原遺伝子多型性についての検討

○ 鈴木一彦^{1,2)}, 成瀬妙子²⁾, 田中裕士¹⁾, 阿部庄作¹⁾, 佐藤昇志³⁾, 津島健司⁴⁾, 久保恵嗣⁴⁾, 猪子英俊²⁾

1) 札幌医科大学医学部第三内科

2) 東海大学医学部分子生命科学系遺伝情報部門

3) 札幌医科大学医学部病理学 I

4) 信州大学医学部第一内科

【目 的】 バイオテクノロジーの進歩により、屋内で大量のキノコが一年を通じて栽培可能となったが、これに伴い、これまでにない新たな呼吸器アレルギー疾患の発生が問題となっている。我々は、これまでにキノコ栽培工場における従業員の約 70% で職場での慢性咳嗽、気道過敏性の亢進が認められ、5% に過敏性肺炎がみられること、3 年間の就労でキノコ抗原に対する血中の IgG 抗体は 90% 以上の従業員で陽性であったことを報告した (H. Tanaka, et al: Respir Med 2001, H. Tanaka, et al: Chest 2002)。またキノコ栽培従事者の末梢血の解析では、T 細胞, NKT 細胞, CD4 陽性細胞, Th2 細胞が対照群より有意に増加し、血中インターロイキン-13 の増加, インターフェロン γ の減少がみられ、この傾向は就労時間が長いほど顕著であった (T. Saikai, et al: Clin Exp Immunol 2004)。そこで今回我々は、ヒト免疫応答に重要な役割を果たしている HLA クラス II 抗原遺伝子の多型性と、キノコ抗原による呼吸器アレルギー発症との関連について検討することを目的とし、アレルギー発症の遺伝的背景について調べた。

【対象と方法】 アレルギー疾患の既往のないキノコ栽培工場従業者を対象とし、キノコによるアレルギー発症群および非発症群にわけ、性、年齢、喫煙歴、就労期間、マスク装着の有無、アトピー、症状について検討した。また末梢血より DNA を抽出し、PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) 法、一部は SBT (sequencing based typing) 法を用いて解析した。なお、対象には本研究の主旨を説明し書面にて同意を得た。

【結 果】 ブナシメジ (*Hypsizygus marmoreus*) によるアレルギー発症群と非発症群との比較の結果、非発症群において DQB1*0601 および DRB1*0803 が有意に増加していた。特にブナシメジアレルギー発症群では、DR8 を有するものは一例も認められなかった。一方、他のキノコ (シメジ; *Lyophyllum aggregatum*) のアレルギー発症群と非発症群についての検討も行ったが、この様な傾向は見られなかった。

【結 論】 キノコ抗原による呼吸器アレルギー発症抑制に HLA クラス II 抗原遺伝子の多型性が関与している可能性が示唆された。またこれは、キノコの種に特異的である可能性が考えられた。

P1-2

蛍光マイクロアレイビーズシステムによる日本人ベーチェット病患者の HLA 遺伝子解析

○ 伊藤良樹¹⁾, 佐々木爽¹⁾, 山根敬浩¹⁾, 滝山直昭¹⁾, 伊藤典彦¹⁾, 西田朋美¹⁾, 水木信久¹⁾, 猪子英俊²⁾

1) 横浜市立大学大学院視覚器病態学

2) 東海大学分子生命科学

【目的】 ベーチェット病 (BD) は口腔粘膜の再発性アフタ性潰瘍, 結節性紅斑などの皮膚症状, 虹彩毛様体炎などの眼症状, 外陰部潰瘍を 4 主症状とする難治性全身性炎症疾患であり, その発症に HLA-B51 分子が直接関与する可能性が示唆されている。今回, 蛍光ビーズを用いた蛍光マイクロアレイビーズシステム (ゲノムサイエンス研究所開発) により日本人 BD 患者の HLA-A, -B および -DRB1 遺伝子の対立遺伝子 (アレル) タイピングを行ったので報告する。

【対象と方法】 日本人の BD 患者 280 人と健常者 254 人を対象とし, 末梢血よりゲノム DNA を抽出した。HLA-A および -B 遺伝子では第 2, 第 3 エクソン領域を, -DRB1 遺伝子では第 2 エクソン領域をそれぞれグループ特異的なプライマーセットを用いて, PCR 法にて増幅を行った。プライマーは 5' 側についてピオチンで修飾を行った。各アレルに特異的な塩基配列 (SSO: Sequence Specific Oligonucleotide; HLA-A: 41 種類, -B: 51 種類, -DRB1: 44 種類) をプローブとして, 固相化した蛍光ビーズを用いてハイブリダイゼーションを行った後, 増幅産物とストレプトアビジン標識フェイコエスリンを反応させた。その後 Luminex100 システムにて蛍光色素の測定を行い, 反応パターンを判定ソフトウェアにて解析し, 各 HLA アレルを決定した。ソフトウェアは, 日本人に存在するといわれている HLA アレルを判定できるように設定されている。

【結果】 蛍光マイクロアレイビーズシステムによる健常者の HLA-A, -B および -DRB1 遺伝子のアレル頻度は過去の報告とほぼ同様であった。BD 患者では B*5101 アレル頻度が 31.6% であり, 健常者に比べて顕著に増加していた。一方, A*3303 アレルと DRB1*0405 アレルが患者群で有意に増加していた。これらの結果は過去の報告とほぼ同様であった。

【考察】 蛍光マイクロアレイビーズシステムは, 多検体を対象として簡便かつ短時間に, 正確な 4 桁レベルでの HLA アレルタイピングが可能であると考えられた。BD 患者では B*5101 アレルが顕著に増加していることが再確認された。

P1-3

デング出血熱の重症化を決定する宿主要因の解析

○ 菊池三穂子¹⁾, Vu Thi Que Huong²⁾, Vu Thien Thu Ngu²⁾, Vo Dinh Tham³⁾, Tran van Dat, M⁴⁾, Do Quang Ha²⁾, 森田公一⁵⁾, 平山謙二¹⁾

1) 長崎大学・熱帯医学研究所・分子免疫遺伝学

2) Arbovirus laboratory, Pasteur Institute Ho Chi-minh City, Vietnam

3) Pediatric Hospital No. 2, Ho Chi Minh City, Vietnam.

4) Center for Preventive Medicine, Vinh long Province, Vietnam

5) 長崎大学・熱帯医学研究所・ウイルス学

デング熱は蚊によって媒介されるアルボウイルス感染症で, 世界の熱帯, 亜熱帯地域のほぼ全域にみられ, 特に東南アジアでは患者が多く小児では死亡する例も多い。病原ウイルスであるデングウイルスには 4 型があり, 初感染ではふつう臨床症状は軽度で風邪様の症状を呈するが, 初感染と異なる型のウイルスに再感染すると重症化することがあり, デング出血熱と呼ばれる。このデング出血熱の重症化には病原体側の病原性と共に宿主側の遺伝的な背景が寄与していると考えられている。そこで, ケースコントロールスタディによる相関解析を行った。対象は, ホーチミン市第 2 小児病院およびビンロン県予防医学センター小児病院の外来患者あるいは, 入院した小児デング熱・デング出血熱患者 (Kinh 族) で, WHO の基準に基づきデング熱の診断およびその重症度の判定を行った。デング出血熱軽症群 (WHO standard: Grade I, II) は各施設それぞれ 98 名, 129 名, 同重症群 (Grade III, IV) は各施設それぞれ 66 名, 203 名であった。また, ビンロン県では一般集団の採血も行い, それぞれ採取した血液より染色体 DNA を抽出した。HLA クラス I 遺伝子領域 (HLA-A, B) のアレルタイピング, TNF- α プロモーター遺伝子領域について SNP タイピングを行い相関解析を行ったところ, HLA-A, HLA-B アレルと重症度との相関は認められなかったが, TNFP-D アレルが 2 カ所の対象地域においてデング出血熱重症群で軽症群に比べ有意に増加する事が明らかとなった。

P1-4

Malaria pressure influenced the frequency of a susceptible allele of TNF-promoter region in Vanuatu

○ Kenji Hirayama¹⁾, Ratawan Ubalee¹⁾, Takahiro Tsukahara²⁾, Mihoko Kikuchi¹⁾, Koji Lum³⁾, Mawuli Dzodzomenyo²⁾, Akira Kaneko^{2,4)}

- 1) Department of Molecular Immunogenetics, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University
- 2) Department of International Health and Tropical Medicine, Tokyo Womens Medical College
- 3) Department of Anthropology, Binghamton University, Binghamton, New York,
- 4) Malaria Research Laboratory, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden

Tumor necrosis factor- α (TNF- α) is one of the key cytokines that influence the pathology of microbial infections. The genetic susceptibility to severe form of falciparum malaria is associated with TNF- α promoter gene polymorphism (TNFP alleles). In our previous study, we identified a TNFP-allele characterized by a T to C transition at position-857 (TNFP-D allele) as a strong susceptibility marker for cerebral malaria in Myanmar. To investigate whether malaria selection pressure on this susceptibility marker has influenced its prevalence, the frequency of the TNFP alleles was estimated in six islands in Vanuatu, Melanesia within the South Pacific. Within the Vanuatu archipelago there is an overall decreasing North to South cline of malaria endemicity. Of the four alleles of the TNFP gene detected, the susceptible TNFP-D allele frequency decrease corresponded to the malaria endemicity increase; TNFP-D varied from 0.55 in the lowest malarial endemicity population to 0.26 in the highest malarial endemicity population ($r = -0.855$, $p = 0.03$). This is the first report indicating that malaria selection pressure has selected an allele related to immunity.

P1-5

非閉塞性無精子症における HLA-DRB1*1302-DQB1*0604 haplotype と AZF および精巣組織との関連について

○ 辻村 晃¹⁾, 佐田正晴²⁾, 太田正穂³⁾, 勝山善彦⁴⁾, 古賀実⁵⁾, 竹山政美⁵⁾, 藤岡秀樹⁶⁾, 高尾徹也¹⁾, 藤田和利¹⁾, 小森和彦¹⁾, 松岡庸洋¹⁾, 宮川 康¹⁾, 高田晋吾¹⁾, 松宮清美¹⁾, 高原史郎¹⁾, 奥山明彦¹⁾

- 1) 大阪大学医学部泌尿器科
- 2) 国立循環器病センター研究所再生医療部
- 3) 信州大学医学部法医学
- 4) 信州大学医学部薬剤部
- 5) 健保連大阪中央病院泌尿器科
- 6) 大阪警察病院泌尿器科

【背景と目的】 生殖補助技術の普及で非閉塞性無精子症患者の約半数に精巣内精子採取が可能となり、無精子症責任遺伝子(群)が次世代に伝承されるリスクが危惧されている。無精子症責任遺伝子(群)としては Y 染色体長腕上の azoospermia factor (AZF) 欠失が知られているが、その割合は無精子症患者の 10% 程度である。我々はこれまでに HLA typing や microsatellite marker による解析で、HLA-DRB1*1302 および -DQB1*0604 が日本人の非閉塞性無精子症に強い疾患感受性を認めることを報告してきた。ただし現在までに HLA 領域に無精子症責任遺伝子(群)候補は報告されていない。今回、非閉塞性無精子症患者における HLA haplotype (HLA-DRB1*1302-DQB1*0604) と AZF の関連性および精巣組織所見との関連性を検討した。

【対象と方法】 非閉塞性無精子症患者 60 例を対象とし、HLA-DRB1*1302-DQB1*0604 の haplotype 26 例とその他の haplotype 34 例の 2 群にわけ、AZF 微小欠失を 18 個の STS を用いて比較し、同時に精巣組織所見にも検討を加えた。

【結果】 HLA-DRB1*1302-DQB1*0604 群の 11.5%、その他の群の 14.7% に AZF 微小欠失が認められたが、両群間に有意差は認めなかった。しかし Johnsen score で評価した精巣組織所見では HLA-DRB1*1302-DQB1*0604 群の精巣組織の方に有意な悪化を認めた。

【結論】 HLA-DRB1*1302-DQB1*0604 haplotype と AZF の欠失はそれぞれ独立した因子であること、HLA-DRB1*1302-DQB1*0604 近傍に無精子症責任遺伝子(群)が存在する可能性、それらが造精能を高度に障害することが推測された。

P1-6

U1-snRNP-A 遺伝子における SNP 解析とその意義

○ 大久保光夫, 今井厚子, 関 佐織, 平田蘭子, 前田平生
埼玉医大総合医療センター 輸血・細胞治療部

【目的】 ゲノム全シーケンス解析プロジェクトの成果により, ヒトゲノムには全体で 300 万から 1000 万の SNP が存在する事が明かとなっている。しかし, これらの SNP がどのような臨床的意義を持つかについて示されたものは少ない。U1-snRNP-A (RNP-A) はヒトのすべての細胞の核に存在するユビキタスな蛋白で, mixed connective tissue disease (MCTD) の対応自己抗原であるが, 近年まで塩基配列に多型は存在しないと言われていた。この U1-snRNP-A 遺伝子の SNP 解析を RNP-A 自己抗体陽性者(患者)と健常人(倫理委員会が認められた研究内容および同意説明のもと)において行い, この疾患における SNP の意義を求めた。

【方法】 予備実験による塩基配列決定法の結果と NIH および Celera 社のデータベースから得られた SNP を含む配列に primer を設定し Taqman PCR を行い SNP を検出し, 健常人 DNA プールの結果と比較した。

【結果】 (患者において) 1% 以上の頻度で存在した SNP は Exon 6 #1006 の T/C, Exon6 #1127 の T/C の 2 ケ所であった。それらの頻度は Exon 6 #1006 の SNP は患者 5/32 に対し健常人 0/37 で $p=0.042$ (統計学的有意差あり), Exon6 #1127 の SNP は患者 2/32 に対し健常人 0/37 で $p=0.41$ (統計学的有意差なし)であった。その他 Intron の SNP は頻度比較では有意差を認めなかった。

【考察】 有意差の認められた SNP は 3'-UTR に存在し, mRNA の安定性に作用している可能性があり, この SNP は抗 RNP-A 自己抗体産生の一因として臨床的意義があると考えられた。(この報告は北里大学近藤啓文先生のグループとの共同研究結果の一部である)

P2-1

HLA 遺伝子の LOH 現象を示した症例のマイクロサテライト解析

○ 太田正穂¹⁾, 勝山善彦²⁾, 丸屋悦子³⁾, 海田勝仁⁴⁾, 佐治博夫³⁾

- 1) 信州大学医学部法医学教室
- 2) 信州大学付属病院薬剤部法医学教室
- 3) 特定非営利活動法 HLA 研究所
- 4) 東大医学部付属病院血液内科

【目的】 染色体上に均一に分布し, 高度な多型性を示すマイクロサテライト多型形質は, 疾患感受性遺伝子, 原因遺伝子の検索, 親子鑑定や個人識別をはじめ多くの分野で応用されている。造血幹細胞移植時の HLA 検査の結果, 造血器腫瘍の急性期に HLA-B, C 座において LOH (loss of heterozygosity) が見られた症例に遭遇した。今回, この LOH 現象についてマイクロサテライトを用いたフラグメント解析を行い, 遺伝子欠損領域の絞り込みを試みた。

【材料と方法】 ATL 細胞が末梢液に 70% 存在時の血液由来の DNA と口腔粘膜(体細胞)由来の DNA を用いて HLA タイピングを行い, 体細胞由来 DNA では B*5901-C*0102 が検出されたが, 血液由来 DNA ではこれらのアリルは検出されなかったサンプルについてマイクロサテライトを用いた DNA 多型解析を行った。マイクロサテライトは HLA-A 遺伝子のセントロメアー側 31 Kb に位置する D6S510 から DQA1 遺伝子のセントロメアー側 8 Kb に位置する DQCARI までに局在する 28 種類を用いた。

【結果と考察】 本症例の口腔粘膜 DNA からの HLA タイピング結果は, A*0206/10 A*2402, B*5201 B*5901, Cw*1202 Cw*0102, DRB1*0802 Cw*0405 であり, ATL 細胞では B*5901 と Cw*0102 が確認されなかった。マイクロサテライト解析の結果は, HLA-C のテロメアー側 247 kb に位置する C2-2-2 から HLA-B のセントロメアー側 512 Kb に位置する D6S2924 間で LOH の現象が見られ, HLA-C, B 遺伝子を含む総長ほぼ 844 Kb に渡り遺伝子の欠損が示唆された。造血幹細胞移植目的のタイピングでは LOH 検出が, ドナーと GVL 効果の評価には重要と考えられており, 多型性に富むマイクロサテライト解析は, HLA 遺伝子の LOH 現象確認に有効な検査法であると考えられた。

P2-2

ハプロタイプの推測により見出された日本人に稀な HLA-A29, A32 について

○ 盛山芳恵, 加藤和江, 村 徹, 十字猛夫
日本赤十字社中央血液センター 中央骨髄データセンター

【目 的】 HLA-A29, A32 は, 日本人遺伝子頻度が 0% (11th International Histocompatibility Workshop: 11th IHW) と報告されている。そのため, 骨髄バンクドナーの登録時血清学的検査では HLA-A29, A32 をタイプする抗血清が入っていない状況である。しかし, HLA-A29, A32 を保有している骨髄バンク登録患者が存在していることから, ドナーにも HLA-A29, A32 が存在していると考えられる。今回, HLA-A29, A32 を検出することを目的として, 中央骨髄データセンターが保有する別途確認検査等で得られた HLA-A29, A32 を持つドナーと患者の HLA データから/特定のハプロタイプの推測を行ない, 登録時データが A locus ブランクだったドナーから, 再検査により HLA-A29, A32 のドナーを見出すことができたので報告する。

【推測したハプロタイプ】 HLA-A29, A32 を保有している骨髄バンク登録ドナーと患者データから下記のハプロタイプが推測された。

1. A29-Cw15-B7-DR8
2. A29-Cw7(-)-B7-DR1(-)
3. A29-Cw16-B44-DR7
4. A32-Cw2-B61-DR11
5. A32-Cw5-B44-DR4

【対象データ】 骨髄バンク登録ドナーの約 15 万件から上記のハプロタイプの可能性があるものを選択し DNA typing を行なった。

【結 果】 A29-Cw15-B7-DR8 の可能性があるドナーは, HLA-A29 の検出率が 92.9% であった。その他のハプロタイプの可能性があるドナーは HLA-A29 または A32 の検出率が約 25% であった。

【考 察】 今まで HLA-A29, A32 は日本人に存在しない HLA 型とされてきたが, 骨髄バンクに登録している患者・ドナーを解析することにより HLA-A29, A32 を見出すことができた。可能性のある全ての骨髄ドナーについて検査することはできなかったが, 従来データ以上に日本人にも存在すると推測される。今後は DNA typing が導入されることで HLA-A29, A32 をタイプすることは可能となるが, 今までに登録されたドナーデータのブランク部分に, HLA-A29, A32 またはそれ以外にも何か隠された HLA 型が存在する可能性があり, 今後過去データの見直しが必要だと考える。

P2-3

日本人に検出された B54 new allele (BKAW) について

○ 河村久美子, 秋田真哉, 荒木延夫, 能勢義介, 井本しお
ん, 三戸 壽
兵庫県赤十字血液センター

【目 的】 日本人のクラス I タイピングにおいて B22 関連抗血清の一部に反応せず, B15 関連抗血清の一部に反応する B54 new allele BKAW を検出したので報告する。

【方 法】 血清学的検査は日赤共通トレイを使用し, LCT 法で行った。DNA タイピングはワンラムダマイクロ SSP-1L, ダイナル SSP (HLA-B), Luminex によるジェノサーチ HLA-B を用いた。また, 塩基配列をダイレクトシークエンスにて解析した。

【結 果】 LCT 法は B54 を含む B22 関連抗血清 9 種類中 2 種類に弱陽性, 7 種類に陰性を示した。また, B15 関連抗血清 9 種類中 2 種類に強陽性, 7 種類に陰性を示した。そして, Bw6 関連抗血清 4 種類中 3 種類に強陽性, 1 種類に弱陽性を示し, A2, A24, B59, B?, Bw4, Bw6, Cw1, Cw- と判定された。SSP 法の結果は, B*5901, B*5401, B*1501, B*5603 などを含む primer, Bw4 に陽性バンドを示し, B54 の new allele の存在が示唆された。また, Luminex の結果も B*5901, B*5401? となり同様の可能性が示唆された。そして, ダイレクトシークエンスの結果, exon2 領域が B*5401, exon3 領域が B*1501/B*5603 の抗原と推測された。

【まとめ】 BKAW は, B22 関連抗血清の一部に反応を示さず, B15 関連抗血清の一部に反応を示し, exon2 領域が B*5401, exon3 領域が B*1501/B*5603 の塩基配列をもつ B54 の new allele と推測された。なお, BKAW のその他のアリルは, A*0201, A*2402, B*5901, DRB1*0405, DR- を示した。

P2-4

検査センターにおける HLA-C の 4 桁レベルの遺伝子型頻度

○ 泉澤康弘, 山本芳子, 齋藤まみ絵, 笹 啓二, 小川公明, 白濱秀也, 石原義盛
株式会社エスアールエル遺伝子・染色体解析センター

【目 的】 我々は PCR-rSSO 法を用いた HLA-A, HLA-B, HLA-DR の HLA 型(血清対応型) DNA タイピングを昨年 7 月から開始し, 本学会で方法および検出された遺伝子型の頻度を報告した。HLA-C についてはこれまで PCR-SBT 法により 4 桁レベルでの DNA タイピングを実施してきた。今回, PCR-SBT 法を開始した 2003 年 7 月より集積された 4 桁レベルの HLA-C の遺伝子型頻度を報告する。

【方 法】 当社の HLA-C (DNA タイピング)検査にご依頼のあった血液検体 (EDTA・2Na) から, QIAGEN BioRobot 9604 (QIAGEN 社)にて DNA を抽出した。AlleleSEQR HLA-C (Forensic Analytical Molecular Genetics 社)を用いて PCR 増幅後, シーケンス解析にてタイピングを判定した。

【結 果】 現時点(2004 年 5 月)においては 877 症例の集計が可能であり, 学会報告時点で 1000 件程度を予定している。これまで大別して 17 アリルに分類され, Cw*0102 が 29.2% と最も高頻度で, 次いで Cw*03031 の 18.0%, Cw*0702 の 15.8%, Cw*03041 の 15.5% であった。数症例においては変異が認められ, PCR-SBT 法の有用性が確認された。

【考 察】 当社にご依頼のある検体はおもに患者とその家族であり, 一般的な日本人集団と相違があることは否めないが, 877 症例を超える HLA-C の 4 桁レベルの遺伝子型頻度は非常に有意義であると考ええる。

P3-1

抗 HLA 抗体検査法の検出感度比較—AHG-LCT, LIFT, PIFT, M-MPHA および FlowPRA について—

○ 齊藤 敏¹⁾, 太田正穂¹⁾, 勝山善彦²⁾, 牧島秀樹³⁾, 玉井 豊広⁴⁾, 高柳カヨ子¹⁾, 浅村英樹¹⁾, 福島弘文¹⁾

- 1) 信州大学医学部法医学
- 2) 信州大学医学部附属病院薬剤部
- 3) 信州大学医学部第二内科
- 4) オリンパス株式会社

【はじめに】 血小板輸血や移植の際の抗 HLA 抗体スクリーニング・クロスマッチには, 検出感度が高く, 非特異反応の少ない方法を用いなければならない。そこで, 当施設で行っている AHG-LCT, LIFT, PIFT, M-MPHA, FlowPRA 法の検出感度について比較を試みた。

【材料と方法】 15 種類の抗 HLA クラス I 血清に対し, 対応する抗原を持つ O 型 5 人から得たリンパ球および血小板を用い, 方法別に抗血清の力価測定を行った。さらに, 血小板輸血歴のある 145 人の患者血清に対し, O 型 20 人から得たリンパ球, 血小板を用い抗体スクリーニングを実施した。

【結 果】 方法別力価測定において, AHG-LCT は, LIFT, PIFT および M-MPHA より検出感度が概ね 3 管低かった。LIFT, PIFT, M-MPHA 間において差は認められなかったが, これらの方法は, FlowPRA と比べると, 2 管低かった。患者 145 血清の抗体スクリーニングにおける方法別抗体検出数は, AHG-LCT: 28, LIFT: 40, PIFT: 32, M-MPHA: 38, FlowPRA: 44 であり, AHG-LCT では, LIFT で検出された抗体の 70.0%, PIFT の 81.2%, M-MPHA の 68.4%, FlowPRA の 59.1% しか検出できなかった。また PIFT でも, LIFT, M-MPHA で検出された抗体の約 80% しか検出できなかった。AHG-LCT および LIFT において, 薬剤によると考えられる疑陽性反応が 2 例存在した。

【考 察】 FlowPRA は, 抗 HLA 抗体の検出感度において, 他法と比較し, 1 管から 2 管高く, スクリーニングにおいても, 抗体検出数が最も多いこと, 薬剤等による偽陽性もないことから, 抗 HLA 抗体スクリーニングには最適な方法と考えられる。移植のクロスマッチには LIFT が最適と考えられるが, 血小板輸血時のクロスマッチには同時に抗血小板抗体検出も可能である M-MPHA が有用と考えられる。

P3-2

An approach to high-throughput HLA-DPB1 typing using reverse-SSO method.

K. Saito, L. C. Blair, S. Argounova, A. Bedrossian, D. Berman and J. Lee

One Lambda, Inc. Canoga Park, California USA.

HLA DP genes encode alpha and beta chains of a heterodimeric Class II HLA molecule. Certain HLA-DPB1 alleles have been reported to confer susceptibility to diseases such as type 1 diabetes, chronic beryllium disease, childhood common acute lymphoblastic leukemia, and sarcoidosis.

Current 105 DPB1 alleles are mostly defined by DNA method and not by serology. As a result, some alleles are given individual designation, and are not subdivided into serological groups. Alleles above DPB1*2801 are mostly considered rare, and can introduce ambiguities to common allele assignment. In order to facilitate DPB1 typing using the reverse SSO method, we have developed 39 probe set in Luminex platform along with customized analysis software. The probe set includes probes that bind two target sequences to resolve more ambiguities. The software displays allele assignment sorted in frequency-based or user-selectable groups. The groups are defined as follows: (1) group 1 results shows when both alleles belong to user-selected group of alleles; (2) Group 2 includes one allele from the group 1, and other alleles; (3) Group 3 includes results with both alleles outside of the group 1. All possible allele assignments are always displayed and no alleles are hidden in the result window.

Typing of random 96 samples from our reference DNA collection, we found 100% concordance with known DNA typing of the samples using the DPB1 probe set and the analysis software. Except one sample that included both alleles outside of the group 1, all typing in the group 1 were concordant with known typing. We will further discuss application of this approach for typing Japanese population.

P3-3

蛍光ビーズを用いた HLA 遺伝子タイピング法の開発

○ 宮城 徹¹⁾, 長門正貴¹⁾, 松永裕也¹⁾, 久保裕之¹⁾, 直原 寛¹⁾, 永田のぞみ¹⁾, 森川 諭¹⁾, 松下正毅¹⁾, 川井信太郎¹⁾, 岡 孝紀¹⁾, 峯元睦子²⁾, 柏瀬貢一²⁾, 佐竹正博²⁾

1) 湧永製薬株式会社 創薬研究所

2) 東京都赤十字血液センター

【目的】 Luminex 社 LabMap 技術を利用し、簡便で迅速かつ多数検体処理に適した HLA 遺伝子タイピング法の開発を行い、従来のタイピング方法による結果と比較した。

【方法】 HLA-A, HLA-B, 及び HLA-C 抗原遺伝子について、日本人集団での遺伝子頻度が 0.1% 以上のアリルを対象に、4 桁レベルでの判別が可能となるようにプローブを設計し、蛍光ビーズ担体に固定した。各ローカスのタイピングに使用したプローブは A 抗原が 45 種類、B 抗原が 59 種類、C 抗原が 26 種類であった。各ローカス毎に特異的なビオチン標識プライマーを用いて PCR を行い、得られた増幅物をアルカリ変性した後、プローブが固定された蛍光ビーズを加え、55°C で 30 分間ハイブリダイゼーションを行った。この時、SAPE (Streptavidin-Phycoerythrin) を反応液に加えることにより、ハイブリダイゼーション反応と検出用の蛍光標識を同時に行った。1 回の遠心洗浄の後、Luminex100 により測定を行い、得られたデータを専用のソフトウェアを用いてタイピングを行った。本方法により 200 検体についてタイピングを行い、PCR-MPH 法および PCR-SBT 法によるタイピング結果と比較した。

【結果および考察】 本方法により得られた結果は PCR-MPH 法および SBT 法による結果と全て一致した。本方法はハイブリダイゼーション反応が 30 分と迅速で、一度の遠心操作で洗浄を行える点で非常に簡便な方法である。本法によれば、96 検体のタイピングに要する時間は PCR から判定まで含めて 4 時間であり多数検体の処理に適した方法と思われる。なお、現在、HLA-DRB1 遺伝子についても同方法の検討を行っている。

P3-4

蛍光マイクロアレイビーズシステムを用いた HLA-A, HLA-B, HLA-C および HLA-DRB1 の遺伝子型判定方法の検討

○ 東 史啓¹⁾, 原 啓高¹⁾, 島田和典¹⁾, 越坂卓也¹⁾, 峯元 陸子²⁾, 柏瀬貢一²⁾, 佐竹正博²⁾

1) 株式会社ゲノムサイエンス研究所研究開発部

2) 東京都赤十字血液センター検査部

【はじめに】 蛍光マイクロアレイビーズシステムは、複数の変異を効率よく検出することが可能な Suspension Array Technology (SAT) を実現した革新的な技術である。我々はこのシステムを用い、日本国内で使用した場合に出現する可能性の高いアレルを判定の対象とする、HLA-A, HLA-B, HLA-C および HLA-DRB1 の遺伝子型判定方法を開発した。本方法により、UCLA から配布された DNA 150 検体を対象として、判定可能な遺伝子型と判定の精度に関して検討したので報告する。

【方法】 抽出したゲノム DNA を鋳型として、HLA-A, HLA-B, HLA-C に関しては exon2 と exon3 領域を、HLA-DRB1 に関しては exon2 領域を、それぞれビオチン標識した特異的プライマーを用いた PCR により増幅した。これらの増幅産物を、特異的オリゴ DNA プローブを固相した検出用蛍光ビーズに加えてハイブリダイズさせた。次に、ビーズ表面にハイブリダイズされた増幅産物と、ストレプトアビジン標識フィコエリスリンとを反応させた。これを Luminex100 を用いて蛍光検出し、専用の判定ソフトウェアにより HLA 遺伝子型の判定を行った。

【結果】 このシステムにより得られた判定結果は、HLA-A, HLA-B, HLA-C および HLA-DRB1 とも、UCLA の結果と一致した。使用した検体には日本国内ではレアな遺伝子型が多く含まれていたが、本方法のコンセプトである「日本国内での使用を想定した対象アレル」に関しては、全て判定可能であった。さらに、「想定した対象アレル」以外に関しても、「判定の対象を全アレル」に拡大した判定ソフトウェアを使用することで、判定可能であった。本検討の結果、今回検討した蛍光マイクロアレイビーズシステムは、HLA の遺伝子型判定に非常に有用であることが確認できた。

P4-1

移植腎慢性拒絶反応におけるサイトカインおよび抗 HLA 抗体の解析

○ 太田沙千恵¹⁾, 藤田麻由子¹⁾, 吉田一成²⁾, 大久保みどり³⁾, 篠原信賢³⁾, 田岡佳憲²⁾, 竹内康雄⁴⁾, 遠藤忠雄^{2,5)}, 馬場志郎²⁾, 小幡文弥¹⁾

1) 北里大・医療衛生学部・免疫

2) 同医学部・泌尿器科

3) 同医学部・免疫

4) 同医学部・内科

5) 埼玉県中央病院

【目的】 慢性拒絶反応の解明と克服は、現在の移植医療の重要課題である。腎移植後の慢性拒絶反応に関わるサイトカインおよび抗 HLA 抗体の解析を行った。

【方法】 腎移植後に慢性拒絶反応を惹起した患者 37 例 (CR 群) および拒絶反応を起こさなかった患者 40 例 (NR 群) の末梢血清を用いた。IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10, TGF- β 1 は市販の ELISA キットを用いて測定した。抗 HLA IgG および IgM 抗体は FlowPRA beads を用いて検出した。ドナー・レシピエント間の HLA ミスマッチ度は Duquesnoy の MatchMaker program を用いて算出した。

【結果・考察】 血中サイトカイン濃度を CR 群と NR 群間で比較した結果、IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10 に関しては両群間で有意差は検出されなかった。一方、TGF- β 1 は CR 群において有意に低値を示した ($p < 0.006$)。血中クレアチニン値とサイトカインとの相関を調べた解析においても、TGF- β 1 のみが弱いながらも有意な負の相関を示した ($r = -0.24, p < 0.05$)。TGF- β 1 は慢性拒絶反応の進行に寄与するとの報告があるが、今回の結果は、その効果よりむしろ免疫抑制あるいは抗炎症サイトカインとしての TGF- β 1 の側面が顕著であったと推測される。抗 HLA 抗体陽性度の解析においては、いずれの抗体 (anti-class I or II, IgM or IgG) においても、CR 群と NR 群間に有意差は検出されなかった。HLA ミスマッチ度と抗体陽性度との相関解析においては、抗 HLA クラス I IgM 抗体のみが、有意な相関を示した ($r = 0.68, p < 0.01$)。慢性拒絶反応における抗 HLA 抗体の関与は今回は確認できなかったが、今後のさらなる検証のために移植患者の経過観察と抗体解析を継続中である。

P4-2

腎移植後の血管型拒絶反応と血清中 soluble CD30 値との関連

○ 小林孝彰¹⁾, 小原節子²⁾, 長尾栄子²⁾, 水野美紀子²⁾, 三輪祐子¹⁾, 劉大革¹⁾, 馬勇¹⁾, 長坂隆治¹⁾, 片山昭男³⁾, 嶋俊人³⁾, 富永芳博³⁾, 両角國男³⁾, 打田和治³⁾, 中尾昭公³⁾

1) 名古屋大学第二外科

2) 名古屋第二赤十字病院組織適合検査室

3) 名古屋第二赤十字病院腎センター

【はじめに】 免疫抑制療法の進歩により, 拒絶反応発現率は減少したが, 予後不良である抗体の関与した血管型拒絶反応 (Acute Vascular Rejection: AVR) は, 依然として大きな問題となっている。HLA 以外の免疫学的予後因子を見出すことは重要な課題である。最近, 腎移植において移植前の soluble CD30 (sCD30) 高値は, 予後不良であるとの報告がある。sCD30 は, Th2-type activation marker であり, 抗 donor 抗体産生に関与する可能性がある。sCD30 と AVR との関連を調べ, 免疫学的予後因子となるか検討した。

【方 法】 初回生体腎移植, one haplotype identical, DRB1 1 mismatch 症例を対象とした。移植グラフト生検の病理組織検査により, AVR と診断された 21 例 (AVR 群) と急性拒絶反応 (AR) をおこさなかった 27 例 (AR (-) 群) の移植前の血清中 sCD30 を ELISA にて測定した。また, これらのうち拒絶反応発現時 (n = 19) または移植後 2-4 週 (AR (-) 群: n = 20) の血清, コントロールとして健常人血清 (n = 9) も調べた。

【結 果】 移植前血清では, AVR 群: 32.2 ± 17.5 U/mL, AR (-) 群: 34.2 ± 23.6 U/mL, 健常人: 7.6 ± 2.6 U/mL であった。AVR 群, AR (-) 群との差を認めなかったが, 健常人と比較して有意に高い値を示した。移植後血清では, AVR 群: 14.6 ± 8.8 U/mL, AR (-) 群: 6.2 ± 4.4 U/mL であり, AVR 群が有意に高い値を示した。また, 移植前との推移 (後 / 前 × 100) では, AVR 群 51.4 ± 32.8%, AR (-) 群 23.1 ± 15.1% であり, AVR 群で有意に高かった。

【考 察】 sCD30 値は, 透析患者では健常人と比べ高く, sCD30 値から移植前に AVR 発現を予測することは不可能であった。sCD30 値は移植後低下するが, AVR 発現時には低下が少ないと考えられた。AVR 発現例において Cr 値上昇より早期に診断が可能かどうか詳細な検討が必要である。

P4-3

Correlation between disparity for microsatellites markers and clinical outcome after unrelated HLA identical Hematopoietic stem cell transplantation

○ Suyun. Li¹⁾, H. Kawata¹⁾, T. Kikuchi²⁾, M. Ota³⁾, Y. Morishima⁴⁾, T. Naruse¹⁾, H. Inoko¹⁾

1) Department of Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine, Kanagawa, Japan

2) Department of Pathology, Sapporo Medical University

3) Department of Legal Medicine, Shinshu University Graduate School of Medicine, Nagano, Japan

4) Department of Hematology and Cell Therapy, Aichi Cancer Center, Nagoya, Japan.

Despite HLA identity between donor and recipient, several patients develop GVHD after HSCT because of minor histocompatibility antigen (mHag) incompatibilities. The impact of multiple mHag disparities on the clinical outcome after HSCT still remains to be determined. Existing data indicate that non-HLA immunogenetic polymorphisms influence the risk of complications after HSCT. In this study our ultimate goal is to identify better markers for minor histocompatibility genes in linkage disequilibria with microsatellites as potential predictive markers for the occurrence of acute GVHD and survival rate in HSCT.

A retrospective analysis of 200 recipient/donor pairs who had received a human HLA genotypically matched transplantation through the JMDP was conducted using genome-wide microsatellites typing method to determine whether the disparities are associated with clinical outcomes. Polymorphisms at 13 microsatellites within the MHC and 37 microsatellites from 13.0 Mb to 23.0 Mb within chromosome 22 were genotyped.

Different percentages 46%-97% of allele matching were obtained for 13 microsatellites loci within the HLA region. The microsatellites near the HLA-DR, HLA-DQ, HLA-B, HLA-C or HLA-A locus have high percentages of allele matching. These suggest that matching of microsatellites polymorphisms is a good indicator for the outcome of HSCT from unrelated donors. Further, there were statistically significant associations between mismatched donor-recipient pairs at 3 out of 37 microsatellites loci in chromosome 22 and acute GVHD.

We are now studying microsatellites polymorphisms

around 6q24.2-q25.3 RAET1, 1q21-23 CD1, 7q22.1 AZGP1, 19q13.3 FCGRT, 20q811.2 PROCR in order to identify and correlate mHag distribution with the occurrence of aGVHD after HSCT from HLA-matched unrelated donors.

P4-4

造血幹細胞移植における Interleukin-10 Promoter Polymorphism と acute GVHD の相関

○ 丸屋悦子¹⁾, 二神貴臣¹⁾, 二家本哲生¹⁾, 大沼 豪¹⁾, 丸屋かおり¹⁾, 一戸辰夫¹⁾, 玉木茂久²⁾, 佐治博夫²⁾

1) 特定非営利活動法人 HLA 研究所, 京都大学医学部付属病院

2) 山田赤十字病院

【はじめに】 造血幹細胞移植における重篤な副作用である a-GVHD を軽減することは移植成績向上のため責務である。GVHD には多くのサイトカインが関与し、サイトカインストームが起こると重症度を増すことは周知のことである。Lin MT がサイトカイン合成阻害因子である IL-10 の promoter 領域 (A/C) と a-GVHD の相関を調べ、Recipient の多型が C (low producer) のとき重症 GVHD が高頻度にかかることを報告した(2003)。我々は日本人移植ペアについて、IL-10 の promoter 領域 592 の多型 (A/C) と重症な a-GVHD 発症率との相関について検討した。

【対象と方法】

◆ IL-10 promoter 領域 592 の多型頻度

健常人(297)の DNA を用い IL-10-592 の多型を PCR-RFLP 法を用い検査した。

◆ IL-10 promoter 592 多型と a-GVHD の相関

HLA identical 移植ペア, 101 組につき, ドナーとレシピエントの IL-10 592 多型を検査した。それぞれの genotype 別に a-GVHD (≥ 3 , ≥ 2) の発症頻度を比較した。

【結果と考察】

◆ IL-10 592 (A/C) Gene Frequencies

日本人: A = 0.64, C = 0.36 (n = 297)

アメリカ人: A = 0.28, C = 0.72 (n = 570)

The association of IL-10 position 592 polymorphism in recipients and donors and grade II-IV acute GVHD in the 101 transplants (HLA identical sibling pair)

Japanese		Recipient		Donor		
		Incidence of GVHD (odds)		Incidence of GVHD		
IL-10 position-592	No. of Recipients	$\geq$ III	$\geq$ II	No. of Donors	$\geq$ III	$\geq$ II
A/A or A/C	89	3.4% (1.0)	18% (1.0)	90	7%	22%
C/C	12	25.0%* (7.3)	33% (1.7)	11	0%	18%

* p < 0.05

◆ 重篤な GVHD はレシピエントが A/A, A/C の場合, C/C に比して起こりにくい。この現象は日本人の造血幹移植において欧米人より a-GVHD の発症が少ない理由のひとつとして IL-10 592 多型頻度の違いがクローズアップされた。

P4-5

日本骨髓バンク登録者における都道府県別 HLA 遺伝子頻度・ハプロタイプ頻度 (HLA-A-B-DR) について

○ 盛山芳恵, 加藤和江, 村 徹, 十字猛夫
日本赤十字社中央血液センター 中央骨髓データセンター

【はじめに】 平成4年の骨髓バンク設立から平成16年4月末日現在で、累計骨髓バンク登録者数は237,410人である。この骨髓バンク登録者の HLA データを解析することにより、日本人の HLA 頻度が予測できると考え、骨髓バンク登録者全体(全国)での HLA 遺伝子頻度・ハプロタイプ頻度、さらに登録された都道府県別での解析を行なったので報告する。

【解析対象データ】 クラス(監)検査に DNA 検査が導入された1996年4月以降の約16万件データから解析を行なった。

【結 果】

1. HLA 遺伝子頻度 (Gene Frequency GF)

11th International Histocompatibility Workshop (以下11th IHW) の報告では見つからなかった HLA 型でも、骨髓バンク登録者には存在していた。都道府県別の頻度集計結果は HLA 型によって差が見られたが、特に沖縄県が全国に比べて有意な差があった。

2. ハプロタイプ頻度 (Haplotype Frequency HF)

全国のハプロタイプ頻度の上位5位までは、11th IHW の順位と同一であったが、それ以後のものについては違いが見られた。都道府県別の頻度集計結果はハプロタイプによって差が見られたが、特に沖縄県が全国に比べて有意な差があった。また、A33-B44-DR13 は中部地方に、A24-B7-DR1 は山陰、山陽地方に頻度が高い傾向がみられた。

【考 察】 今までに日本人頻度として報告があったデータ(11th IHW, 12th IHW, JWS 等)は、解析に使用したデータ数が少なかったが、今回、我々が行なった解析データ数は、非常に多いので、ほぼ日本人頻度として扱っていいと考える。都道府県別頻度集計結果での都心近郊の頻度については、遠隔地域から移り住んで来た方が多いと考えられ、参考値とした方がよいと考える。

【最後に】 都道府県別の頻度集計を行なった目的の1つは、ドナーと HLA 型が適合しない患者の稀なハプロタイプを、日本人のハプロタイプから推測し、そのハプロタイプがどの都道府県に多く分布しているかを調査することでした。今回はそこまで行なえなかったが、今後、稀なハプロタイプを持つ患者の為に、どの都道府県で登録者を増やせばいいかさらに調査をすすめていく予定です。

P5-1

カニクイザルの MHC クラス II 遺伝子の多型解析

○ 柳谷和代¹⁾, 清水佐良子¹⁾, 椎名 隆¹⁾, 小原 栄²⁾, 鳥居隆三³⁾, 小笠原一誠⁴⁾, 猪子英俊¹⁾

1) 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

2) 新日本科学先端技術部ゲノム情報チーム

3) 滋賀医科大学動物生命科学研究センター

4) 滋賀医科大学医学部病理学第二講座

【目 的】 東南アジアに幅広く分布するカニクイザルは、臓器移植や骨髓移植ならびに疾患の生成機序の解明などの医学的研究における実験動物として有用な生物種である。ところが、カニクイザルにおける MHC 遺伝子の多型解析や MHC 領域のハプロタイプ解析はこれまでにこなわれておらず、もしカニクイザルを MHC 型に分類することが可能であれば、医学的研究に貢献できることは間違いない。そこで本研究では数百頭のカニクイザルを MHC 型に分類するために、カニクイザル MHC クラス II 遺伝子 (*Mafa-DQA1*, *-DQB1*, *-DPB1*) における多型解析法を確立することを目的にした。

【材料および方法】 PCR はカニクイザル臓器由来 DNA を鋳型として、*Mafa-DQA1*, *-DQB1*, *-DPB1* のエクソン2をそれぞれ特異的に増幅させるプライマーを用いておこなった。その際、最適な PCR 増幅のためのアニーリングの温度を検討した。得られた PCR 産物をサブクローニングした後、その塩基配列を決定し、相同性解析をおこなった。

【結果および考察】 相同性解析の結果、3 遺伝子座ともにデータベース上のカニクイザル (*Mafa*), アカゲザル (*Mamu*) の MHC クラス II 遺伝子と相同性のある配列が見い出された。すなわち、*Mafa-DQA1* の一方は *Mamu-DQA1*0502* と 100%, 他方も *Mamu*09* および *Maar-DQA1*01* (*Maar*: ベニガオザル) と 100% の相同性がそれぞれ認められた。また、*Mafa-DQB1* の一方は *Mafa-DQB1*0614* と 100%, 他方も *Mamu*, *Mafa* 双方の *DQB1*1503* と 100% の相同性がそれぞれ認められた。さらに *Mafa-DPB1* は *Mamu-DPB1*04* と 98% の相同性が認められた。したがって、今回得られた *Mamu-DPB1* の塩基配列はこれまでに報告されていない新しいアレルではないかと推測された。さらに東南アジア各地由来の DNA サンプル 40 個体に対して、同様の方法にて PCR 増幅をおこなったところ、すべての個体において明瞭な PCR 産物が得られた。したがって、本法は *Mafa* クラス II 遺伝子の多型解析に有効であると考えられ、今後これらの塩基配列の決定とともに、各アレル全長の塩基配列を決定する予定である。

P5-2

カニクイザル MHC 領域の BAC コンティグの作製によるゲノム解析

○ 渡邊淳史¹⁾, 椎名 隆¹⁾, 鳥居隆三²⁾, 小笠原一誠³⁾, 猪子英俊¹⁾

1) 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

2) 滋賀医科大学動物生命科学研究センター

3) 滋賀医科大学医学部病理学第二講座

【目 的】 カニクイザルは約 3000 万年前にヒトの祖先と種分化した旧世界ザルに属し、比較的小柄でヒトと近縁であることから、機能不明遺伝子の発現解析はもとより異種移植への応用や疾患の生成機序の解明などに有効な優れた実験動物として注目されている。これまでにカニクイザルと近縁種であるアカゲザルの MHC 領域の塩基配列が決定されている。そこで本研究では、近縁種であるアカゲザルとカニクイザル間のゲノム構造の相違を明らかにするために、カニクイザル MHC 領域 (*Mafa*) の BAC コンティグを作製し、アカゲザルやヒトの MHC 領域と比較解析することを目的とした。

【方 法】 カニクイザルの腎臓から抽出したゲノム DNA より、5.4 ゲノム分に相当する約 22 万クロンの BAC ライブラリーならびに PCR スクリーニング系を構築した。ライブラリーのスクリーニングには、MHC 領域内に位置する 51 個の遺伝子領域に設計したプライマーを用いて PCR 増幅により陽性クロンを単離した。その後、BAC の末端配列の塩基配列を決定し、ヒトやアカゲザルのゲノム配列と比較することにより、BAC クロンの位置を同定し、BAC コンティグを作成した。

【結果および考察】 ライブラリーのスクリーニングにより、これまでに 104 個の BAC クロンを分離し、ほぼ MHC 領域を網羅する BAC コンティグを作成した。したがって、今回作成したライブラリーは MHC のみならず、あらゆるゲノム領域の BAC マッピングに有効であると考えられた。これらのクロンの一部の塩基配列を決定し、アカゲザルのゲノム配列との位置関係を調べたところ、非 MHC 遺伝子領域は両者間にてよく保存されていたが、MHC-A、-B 遺伝子領域はクラス I 遺伝子の重複や欠失により大きく異なっていると推測された。また、*Mafa-E* 遺伝子もハプロタイプにより複数個存在することが示唆された。さらに、DRB 亜領域において、カニクイザルの一方のハプロタイプはすでにアカゲザルにて報告されているものと一致したが、もう一方は新規に見出されたものであった。

P5-3

マウス中枢神経系に発現している非古典的 MHC クラス Ib 抗原の同定

○ 重成敦子, 大場幸枝, 吉村眞一, 安藤麻子, 猪子英俊
東海大・医・分子生命科学

免疫応答に関与している MHC 分子には、多型に富む古典的 MHC クラス Ia 抗原と、多型の少ない非古典的 MHC クラス Ib 抗原が存在する。マウスのクラス Ib 抗原は Q, T, M, の 3 つの領域に分布する遺伝子によりコードされており、遺伝子構成や役割は未だ解明されていないものも多い。我々は、免疫組織染色により MHC クラス Ib 抗原である Qa-1 遺伝子(ヒトでは HLA-E 遺伝子に相当する)が中枢神経系で発現していることが明らかにした。そこで、我々は神経系で発現しているクラス Ib 抗原を網羅的に解明するために C57BL/6 マウスゲノムのドラフトシーケンスを基に、24 個を MHC クラス Ib 候補遺伝子をコンピューター解析により予測した。これらの候補遺伝子を増幅可能なユニバーサルプライマー、および候補遺伝子を個々に増幅するプライマーを設計し、大脳および、小脳の RNA を鋳型とした RT-PCR 解析を行なった。その結果、C57BL/6 マウスの脳において Qa-1, T22 遺伝子など 11 個の MHC クラス Ib 遺伝子が発現していることが明らかになった。特にユニバーサルプライマーによる解析の結果より、Qa-1 遺伝子は脳内で最も多く発現していることが判明した。さらに、ヒトでは HLA-A から HLA-F 遺伝子領域に存在する M5 遺伝子のみがマウス脳に組織特異的に発現していることが明らかになった。以上の結果より、多数の MHC クラス Ib 遺伝子が中枢神経系で発現し、何らかの役割を果たしている可能性が認められた。今後、脳内で発現が確認された Qa-1, T22, M5 遺伝子について遺伝子構造の解明を行うとともに、In situ-hybridization などにより中枢神経系に発現している細胞の同定を行なう予定である。

P5-4

マウス MHC クラス Ib 遺伝子の組織特異的発現

○ 大場幸枝¹⁾, 重成敦子¹⁾, 山形哲司²⁾, 吉村眞一¹⁾, 安藤麻子¹⁾, 猪子英俊¹⁾

1) 東海大・医・分子生命科学

2) 理研・脳センター・神経遺伝

免疫応答に重要な役割をしている MHC 分子の中で古典的 MHC クラス Ia 抗原は多くの組織で高い発現性を示し、遺伝的多型も高く抗原提示に直接的に関与している分子である。それに対し非古典的 MHC クラス Ib 抗原は遺伝的多型が少なく、発現レベルも全体として低く、生理的役割についてもその多くがほとんど解明されていない。本研究は各クラス Ib 分子の組織特異的な発現を明らかにすることを目的とした。クラス Ib 遺伝子はマウス MHC 領域の Q, T, M の領域に分布している。既知の H2-T3 遺伝子と相同性が高い 24 個のクラス Ib 候補遺伝子をコンピューター解析により予測し、これらを個々に増幅可能なプライマーを設計した。材料として 5 週令の C57BL/6, ♂マウスを用いた。十二指腸, 胸腺, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 大脳皮質, 大脳髄質, 小脳+延髄の組織を取り出し total RNA を抽出した。これらの RNA を鋳型とした RT-PCR により, 24 個のクラス Ib 候補遺伝子の組織特異的な発現を確認した。

24 個の候補遺伝子の内, 5 個は偽遺伝子, 2 個の遺伝子は発現が認められなかった。全ての組織で発現していた遺伝子は 9 個, 胸腺・脾臓の免疫系に特異的に発現する遺伝子は 2 個, 十二指腸・胸腺で発現している遺伝子は 1 個, 脳のみ発現している遺伝子は 1 個であった。以上のことから, マウスクラス Ib 遺伝子の一部に組織特異性があることが判明した。

さらに 24 個のクラス Ib 候補遺伝子を FANTOM データベースにて検索したところ一部に anti-sense RNA のみが登録されている領域が存在することを見出した。そこでこの anti-sense RNA に特異的な RT-PCR を行った所, T 領域の一部に sense, anti-sense の両方向に転写される遺伝子が存在することが明らかになった。今後 anti-sense RNA の全長の配列を決定し, 遺伝子構造を解明する予定である。

P5-5

シーケンシングによるウズラ MHC クラス II 領域のハプロタイプ解析

○ 細道一善¹⁾, 椎名 隆²⁾, 清水佐良子²⁾, 猪子英俊²⁾, 半澤 恵¹⁾

1) 東京農業大学農学部家畜生理学研究室

2) 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

【目 的】 演者らはこれまでに, ウズラの発現 MHC クラス IIB 遺伝子 (*CojaIIB*) の PCR 解析から, その MHC 領域 (*Coja*) には少なくとも 5 種類のハプロタイプ (*Coja* ハプロタイプ 1~5) が存在すること, ハプロタイプ 1 における発現量の多い *CojaIIB* 遺伝子座 (主働遺伝子座) は *Tapasin* と *RING3* 遺伝子座間領域 (*Tapasin-RING3*) の約 10 kb に集約されることを明らかにした。そこで本報告では, 各 *Coja* ハプロタイプの持つ意味を明らかにするために, 各 *Coja* ハプロタイプのゲノム塩基配列を決定し, *Tapasin-RING3* のゲノム構造を近縁種であるニワトリを含めて比較解析することを目的とした。

【方 法】 *Coja* ハプロタイプが 2/3 および 4/5 ヘテロ接合体に分類されたウズラ 2 個体のゲノム DNA よりそれぞれコスミドライブラリーを構築し, *Tapasin-CojaIIB-RING3* を含むコスミドクローンをスクリーニングし, 各ハプロタイプを有するクローンの塩基配列を決定した。

【結果および考察】 これまでのスクリーニングの結果, *Coja* ハプロタイプがそれぞれ 2 および 5 と確認された 2 個のコスミドクローンが得られた。そこで, これら 2 クローンの塩基配列を決定し, *Tapasin-RING3* について, ハプロタイプ 1 を含む 3 配列間にて比較したところ, ハプロタイプ 1 では 2 個の *CojaIIB: Coja-DAB1* および *-DBB1*, が座位するのに対し, ハプロタイプ 2 および 5 では 1 個の *CojaIIB: CojaIIB-13* および *-14* がそれぞれ座位していた。また, これらはいずれも主働遺伝子であった。ニワトリの同領域には 1 個の主働遺伝子 (*BLB2*) が存在していることから, ウズラはハプロタイプによりニワトリに類似したゲノム構造が存在すると考えられた。さらに, *CojaIIB* の類似性およびイントロン構造から, ハプロタイプ 2 に存在する *CojaIIB-13* はエクソン 2 の前半部に位置する欠落部位を境に, ハプロタイプ 1 に存在する *Coja-DBB1* および *Coja-DAB1* を合わせ持つ融合遺伝子であり, 2 つの *CojaIIB* の間の約 5 kb のゲノム領域が欠失したことにより形成されたと考えられた。

P5-6

ペンギン類の MHC 遺伝子における多型解析

○ 吉川枝里¹⁾, 成瀬妙子¹⁾, 炭山大輔¹⁾, 福田道雄³⁾, 栗田正徳⁴⁾, 村田浩一⁵⁾, 津田道雄¹⁾, Rory P. Wilson⁶⁾, Yvon LeMaho⁷⁾, 津田とみ^{1,2)}, 猪子英俊¹⁾

- 1) 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学
- 2) 徳島文理大学人間生活学部
- 3) 東京都葛西臨海水族園
- 4) 名古屋港水族館
- 5) 日本大学生物資源科学部
- 6) IM/Kiel, Germany
- 7) CEPE/CNRS, France.

主要組織適合抗原複合体 (MHC) は高度な多型性を示すことで知られており, 進化学的に保存されている遺伝子が多く存在することや数多くの生物種の塩基配列情報が報告されていることからゲノムの動態を追求するには最適な領域といえる。現在では, ヒト MHC の全塩基配列 3.6 M が決定され, ニワトリなどの鳥類 MHC も積極的に研究されているが, ペンギン類を含む海鳥類についての MHC の報告は我々の報告以外にはない。そこで, 我々は MHC 遺伝子の中でも, 特に多型性に富んでいることで知られているクラス II DRB1 様遺伝子に注目し, ペンギン類の多型解析を行ってきた。

昨年の本学会において, 我々はフンボルトペンギンの DRB1 様遺伝子第2エキソンから第3エキソン全体を増幅させるペンギン類由来の PCR プライマーを作成し, 807 bp の塩基配列を決定し報告した。

今回我々は, 以前報告したアデリー属, コガタペンギンの第2エキソン 198 bp の結果と新しく決定したフンボルトペンギンの第2エキソンの塩基配列の比較を行った。その結果, フンボルトペンギンに3種, アデリー属に3種, コガタペンギンに1種の特有な多型を見いだした。このことから, 他の属及び種においても, 第2, 第3エキソンの塩基配列を決定し, 比較解析を行うことで, ペンギン類の種間識別や個体識別ができる可能性が高くなると考えられた。そこで, 現在, 同じくフンボルト属に属するケーブペンギン4検体, マゼランペンギン7検体についても同様に塩基配列決定を行っているので報告する予定である。

P6-1

親子鑑定を目指したハンドウイルカ MHC クラス II 遺伝子の多型解析

○ 二橋夕紀¹⁾, 椎名 隆²⁾, 大泉 宏¹⁾, 田中 彰¹⁾, 猪子 英俊²⁾

- 1) 東海大学海洋学部水産学科水産資源開発過程
- 2) 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

【目的】 限られた空間でイルカを集団で飼育する水族館では, 複数のオスとメスが同居飼育されている場合が多く, このような環境下で繁殖が行われたとき, 母子関係については行動観察によって容易に確認することができるが, 父子関係については推測の域を出ない場合が多い。一方, 生物保全の場としての役割を期待されている水族館では, 飼育個体の近親交配による近交弱勢を回避することは極めて重要で, 信頼度の高い父子鑑定法によって父子関係を明らかにする必要がある。そこで本研究では, 脊椎動物にて数多くの多型が見い出されている MHC クラス II DQB 遺伝子において, ハンドウイルカにおける親子鑑定のための多型解析を行った。

【材料および方法】 サンプルは江ノ島水族館, 横浜・八景島シーパラダイス, 南知多ビーチランドで飼育されているハンドウイルカ 16 頭の血液, あるいは死亡したイルカの組織より抽出したゲノム DNA を用いた。プライマーはウシやヒツジの MHC クラス II DQB 遺伝子の塩基配列から, エクソン 2 からイントロン 2 領域, 約 600 bp の増幅が予想されるプライマーを設計し, 本研究に供した。

【結果および考察】 16 頭全てのイルカにおいてウシやヒツジと同様に約 600 bp の増幅が確認された。そこでこれらの PCR 産物をクローニングし, 塩基配列を決定することにより多型解析を行ったところ, 16 頭中に 13 種類のアレルが見い出された。これらの塩基配列から予測されるエクソン 2 領域のアミノ酸配列 (63 aa) に一致するものはなく, それらの間の類似性は 78~95% であった。また, これらの多型情報を基にして親子鑑定を行った結果, 親子関係が明らかな家系に矛盾は生じなかった。以上の結果から, MHC クラス II DQB 遺伝子が今後イルカの親子鑑定を行う上で有用な遺伝多型マーカーになることが示唆され, 今後さらに個体数を増やして各アレルの頻度など詳細な多型解析を進めていく予定である。

P6-2

ブタ MHC クラス I, II 遺伝子の多型性解析
—SLA ホモ接合体サンプルを用いた解析—

○ 安藤麻子¹⁾, 河田寿子²⁾, 重成敦子¹⁾, Christine Renard³⁾,
Patrick Chardon³⁾, Joan Lunney⁴⁾, 北川 均⁵⁾, 今枝
紀明⁶⁾, 太田正穂⁷⁾, 佐田正晴⁸⁾, 猪子英俊¹⁾

- 1) 東海大・医・基礎医学系・分子生命科学
- 2) 東海大・伊勢原研究推進部・教育・研究支援センター
- 3) LREG INRA CEA Jouy en Josas, France
- 4) USAD, ARS, BARC, Beltsville, MD, USA
- 5) 岐阜大・農・家畜内科
- 6) 岐阜県畜産研・養豚研究部
- 7) 信州大・医・法医学
- 8) 国立循環器病センター研・再生医療部

【目 的】 我々は移植実験などに有用なブタ MHC (SLA) 純系ミニブタの開発並びに, SLA タイプと相関を示す疾患の解析を進めるために, SLA 遺伝子の多型性の特徴を解析している。本研究では, SLA ホモ接合体ブタサンプルを中心に, SLA-DNA タイピングを行い, SLA 遺伝子の多型の特徴とハプロタイプを解析した。

【方 法】 血清学的タイピングにより, SLA ハプロタイプ既知のホモまたは, ヘテロ接合体サンプルである NIH ミニブタ 11 頭と種々の系統のホモ接合体 (H01~H61) のブタ 16 頭, 並びに雄, 雌各 1 頭から, 5 世代まで交配を行っているデュロック種 20 頭の末梢血の全 RNA を抽出した。これらの RNA 及び SLA クラス I (SLA-1, -2, -3) とクラス II (DRB1, DQB1) の各遺伝子座を特異的に増幅するプライマーを用いて RT-PCR を行い, PCR 産物の塩基配列決定により多型性を解析した。

【結 果】 DNA タイピングの結果, NIH ミニブタは 3 種, デュロック種は 2 種, 種々の系統のホモ接合体のブタでは, 13 種のハプロタイプが見られた。さらに H01 ハプロタイプを示す 4 サンプルの中で 1 サンプルは, クラス II タイプが他の 3 サンプルと異なっていた。また, これらのサンプルの中で SLA-1 または, SLA-2 遺伝子が 2 個発現している可能性のあるハプロタイプや, SLA-1 または, SLA-3 遺伝子が発現していない可能性のあるハプロタイプが見られた。以上の結果とこれまでのクラウンミニブタの 3 ハプロタイプの結果を合わせると, 合計 21 種の SLA ハプロタイプが見出された。

【考 察】 ハプロタイプ既知のブタサンプルの SLA-DNA タイピングの結果より, 血清学的 SLA タイピングの結果から報告されているように, ハプロタイプにより発現 SLA クラス I 遺伝子の数が異なる可能性が示された。

P6-3

ウシ MHC (BoLA) class I 新規アリルの
単離と解析

○ 赤松大基, 竹嶋伸之輔, 間 陽子
理化学研究所 分子ウイルス学研究ユニット

【目 的】 ウシ第 23 番染色体に位置するウシ MHC (BoLA) 領域は, class IIb, class IIa 後方に class III と class I が位置した遺伝子構成をとっている。BoLA class I はヒト MHC (HLA) class I と比べ, CY ドメインに相当する exon 数に違いがあるものの, mRNA の大きさ, 構造, 機能など基本的に類似している。BoLA class I cDNA は, 現在までに 28 種類単離されているが, 日本特有の黒毛和種においては, 未だ単離解析がなされていない。そこで, 本研究では白血球発症牛の B リンパ腫由来細胞 (KU-1 細胞株) より作製された cDNA ライブラリーより BoLA class I の cDNA を単離し, 解析を行った。

【方 法】 BoLA class I の開始コドンと終始コドンにプライマーを設計し, PCR で増幅後, pBluescriptSK⁺II ベクターにクローニングし, 塩基配列を決定した。また, 単離した 3'UTR 塩基配列も決定した。得られた配列と既知の配列をもとに相同性及び系統樹解析を行った。

【結 果】 1092 bp の新規アリルを 2 種類得た。それら遺伝子は他の生物の class I 同様, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, TM 及び CY ドメインを有し, 糖鎖結合及びシステイン結合部位が保存されていた。次に, これらのアリルが class I の遺伝子座においてどのような関係にあるかを検討するため, 今回決定した遺伝子及び既知遺伝子の TM, CY, 3' 側 UTR 配列を比較した。その結果, ウシ class I ではアライメントは大きく 3 つに分類でき, 今回単離した遺伝子は同じ系統に属していた。また, 霊長類, 齧歯類, 偶蹄類及び奇蹄類の MHC class I との相同性及び系統樹解析を行った結果, 近縁な種は 88.5% の相同性を示したヒツジであり, 遠縁な種は 77.2% を示したラットであった。ヒトとの相同性は 85.1% であった。

【考察】 BoLA class I の遺伝子座は配列情報から 3 つ存在すると考えられ, 今回単離した 2 つのアリルは同遺伝子座に位置することが予想される。BoLA class I は進化系統的に偶蹄類, 奇蹄類, 霊長類, 齧歯類の順に近いと考えられる。

P6-4

ウシ MHC クラス II *DQA* 遺伝子のタイピング法の開発とそれを用いた牛白血病ウイルス誘発性白血病発症と *DQA* 遺伝子の相関解析

○ 竹嶋伸之輔, 三木晶未, 加堂真由, 間 陽子
理研・分子ウイルス

【目 的】 牛白血病ウイルス (BLV) は成人 T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) に最も近縁なレトロウイルスで、長い潜伏期間を経て B 細胞の悪性腫瘍である牛白血病を引き起こす。その病態には HTLV-1 と同様、疾患感受性の個体差が存在する。我々は以前、その原因の一つがウシ MHC (BoLA) DR 分子の多型性にある事を示した。一方、*BoLA-DQA* 及び *DQB* はそれぞれ 5 種類ずつの遺伝子座が存在するが、そのタイピング法は未だ確立されていない。そこで、本研究では、新たに *BoLA-DQA1* 及び *-DQA2* の PCR-SBT 法を開発し、牛白血病の発症と相関する *DQA* アリルの探索を試みた。

【方 法】 *BoLA-DQA1* 及び *-DQA2* exon 2 近傍のイントロンの塩基配列を決定し多型塩基を特定し、*DQA1* と *DQA2* の全アリルを遺伝子座特異的に増幅可能なプライマーの設計に初めて成功した。続いて exon 2 を増幅後、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。

【結 果】 開発した PCR-SBT 法を用いて、国際 BoLA ワークショップの標準ウシ DNA 52 サンプルのタイピングを行った。その結果、52 頭全てのタイピングに成功し、*DQA1* は既知アリル 31 種類中の 14 種類が、*DQA2* は 13 種類中の 7 種類が検出された。次に、BLV 感染健康牛 29 頭及び白血病発症牛 23 頭の計 52 頭の *DQA1* 及び *DQA2* を決定した。その結果、12 種類の *DQA1* アリルと 7 種類の *DQA2* アリルを得た。各々の *DQA* アリルを 2 群で比較したところ、BLV 感染健康牛では *DQA1*0101* を有する個体の頻度が有意に高かった (健康牛 37%, 発症牛 0%, $p = 0.001185$)。さらに、我々が以前に同定した抵抗性 *DRB3* (*DRB* 鎖 71, 77, 78 番に ERV のアミノ酸を有する) アリルも含めて解析すると、両アリルのどちらかを有する個体の頻度は発症牛の 9% に対し、健康牛は 67% であった ($p = 0.000019$)。

【考 察】 本研究で、ウシ *DQA* のタイピング法を開発し、*DQA* のアリル頻度の解析を初めて可能とした。それにより、以前同定した抵抗性 *DRB3* アリルに加えて *DQA1* アリルも発症抵抗性に関与する可能性が示唆された。

P6-5

ウシ MHC クラス II *DOA* および *DOB* 遺伝子の完全長 cDNA の単離と解析

○ 竹嶋伸之輔, 間 陽子
理研・分子ウイルス

【目 的】 ウシ MHC (BoLA) クラス II は、古典的 MHC の *DR* 及び *DQ* 遺伝子座を有するクラス IIa と、非古典的 MHC である *DM*, *DY*, *DO* 遺伝子座が位置するクラス IIb 領域から構成される。*DO* 分子は B 細胞に特異的に発現し、*DM* 分子の機能を阻害することで、抗原提示されるペプチドの種類を変化させたり、抗原提示を抑制する機能を有する事が知られている。本研究では、ウシクラス II 分子の中で唯一未だ転写の確認がされていない、*DOα* 及び *DOβ* 鎖をコードする *DOA* 及び *DOB* 遺伝子の cDNA の単離と解析を行った。

【方 法】 *BoLA-DOB* 遺伝子はウシ B リンパ腫由来 KU-1 細胞から調整した cDNA ライブラリーを用い、既知の *DOB* ゲノム配列をもとに、その 3' 側及び 5' 側をそれぞれ増幅後、pBlueScriptSK + II にクローニングし、塩基配列を決定した。*BoLA-DOA* 遺伝子の単離はウシ末梢血単核球 (PBMC) の mRNA より、TAKARA の 3'-RACE 及び 5'-RACE キットを使用して単離した。

【結果・考察】 ウシ PBMC mRNA より単離した *BoLA-DOA* 遺伝子はコード領域 753 bp を含め、全長 1124 bp であり、既知のヒト MHC (*HLA*)-*DOA* 遺伝子とコード領域の長さは同一であった。コード領域の *HLA-DOA* との塩基配列の相同性は signal peptide (SP) が 81.3%, $\alpha 1$ ドメインが 82.7%, $\alpha 2$ ドメインが 82.3%, Connecting peptide (CP) が 53.8%, Transmembrane (TM) は 69.2%, Cytoplasmic tail (CY) では 72.7% であった。KU-1 ライブラリーより単離した *BoLA-DOB* 遺伝子はコード領域 816 bp を含め全長 1362 bp で、*HLA-DOB* と比較して TM が 6 bp 欠損していた。*HLA-DOB* のコード領域との塩基配列の相同性は SP が 66.7%, $\beta 1$ ドメインが 83.3%, $\beta 2$ ドメインが 83.3%, CP が 96.7%, TM は 81.0%, CY では 65.4% であった。また、 $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ 及び $\beta 2$ に存在する糖鎖結合部位および S-S 結合部位は全て保存されていた。このことから、ウシにおいてもヒトと同様に機能的な *DO* 分子が免疫応答に関与している事が示唆された。

P6-6

ウシ TAP トランスポーター遺伝子の単離と解析

○ 間 陽子, 加藤美緒, 竹嶋伸之輔

理研・分子ウイルス

【目 的】 MHC クラス II 領域中に存在する *TAP1* 及び *TAP2* 遺伝子がコードする抗原プロセシングトランスポーター (TAP) は, 細胞質中のプロテアソームで分解されクラス I 分子に提示される抗原ペプチドを小胞体に輸送するヘテロ二量体の蛋白質である。ウシ MHC では *TAP2* 遺伝子がクラス IIb 領域に位置している事が明らかとなっているものの, *TAP1* は未だ同定されていない。本研究ではウシ *TAP1* 及び *TAP2* の cDNA を単離し, その分子構造及びヒト TAP との比較を行った。

【方法・結果】 ウシ *TAP1* はウシ B リンパ腫由来 KU-1 細胞から作成した cDNA ライブラリーより, ヒト *TAP1* の配列を基に作成したプライマーを用いて増幅, 単離した。はじめにヒト *TAP1* cDNA の 1825-2230 番の塩基配列と 86% 相同性のある 405 bp の塩基配列を得, この配列情報をもとに, ヒト *TAP1* cDNA の 1127-1983 番の配列と 86% 相同性のある 857 bp の塩基配列を得た。一方, ウシ *TAP2* はウシ末梢血単核球の mRNA より既知のウシ *TAP2* cDNA の塩基配列を基に増幅, 単離した。開始コドンから終止コドンまでの 2160 bp (720 aa) の, 既知のウシ *TAP2* 配列とは異なる cDNA 塩基配列が得られた。この配列をヒト *TAP2* と比較したところ, 塩基配列の相同性は 81% であり, さらに, ウシ *TAP2* の方が塩基レベルで 48 bp (14 aa) 長い事が示された。さらに, *TAP2* の分子構造を比較したところ, ヒト異なり, 多型がペプチド結合部位に存在している事が明らかとなった。

【考 察】 本研究において, ウシで *TAP1* が発現している事, ウシ *TAP2* に多型がある事及び *TAP2* がヒト-ウシ間で高度に保存されており, ヒトと同様のドメイン構造を持つであろう事が明らかとなった。この事から, ウシ MHC クラス I による抗原提示に TAP がヒトと同様な機能を有する事が推察される。また, ペプチド結合部位にアミノ酸置換が見つかった事から, *TAP2* のアリルがクラス I を介した免疫応答に影響を与えている可能性が示唆された。