

# 第3回日本組織適合性学会近畿地方会抄録

日 時： 2005年2月5日(土)  
 会 場： 参天製薬株式会社本社  
 大阪市東淀川区下新庄3-9-19  
 TEL: 06-6321-7000  
 当番世話人： 一戸 辰夫  
 京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科  
 〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54  
 TEL/FAX: 075-751-3164  
 共 催： 財団法人 大阪腎臓バンク

## ● オープニングセミナー ●

### HLA-E, -F, -G update

下嶋 典子

奈良県立医科大学法医学教室

妊娠において胎児は、遺伝子の半分が父親由来であり、母体にとっては一種の同種移植片である。ドナーとレシピエントのHLAを適合させず移植を行った場合は、急激な拒絶反応が起こる。しかし全くHLAを適合させていないにも関わらず、母体がなぜ、この移植片を拒絶せず10ヶ月もの間生着させつけられるのかという疑問は、未だ解明されていない。しかし、1990年、母児の境界にあり、HLA-A、-Bやclass II抗原を発現していない胎盤トロホプラスト上に未知のHLA分子が発現しており、これが、HLA-Gであるということが明らかとなって以来、HLA-Gがこの母児免疫寛容を制御していると推測され、脚光をあびることとなった。HLA-Gを含む、class Ib遺伝子であるHLA-E、-F、-Gは1987年から1990年にGeraghtyらにより発見された遺伝子である。これらの遺伝子の共通点として非常に多型

に乏しいことがあげられる。

HLA-GはHLA-A、-B、class II分子を発現していない胎盤トロホプラストに限局して強く発現し、NK抑制レセプターの一つであるimmunoglobulin like transcript (ILT)-2や、ILT-4と結合し、NK細胞活性を抑制する。そのため、妊娠の母児免疫寛容に関わる分子と考えられている。HLA-Eは、他のclass I分子と異なって、主に、HLA-E以外のclass I分子のシグナルペプチドを提示して、HLAを発現するあらゆる細胞表面に発現し、NK細胞レセプターの一つであるCD94/NKG2と結合する。そのため、HLA-Eは自身が発現する細胞のHLA分子とその発現量をT細胞やNK細胞に提示し、これらの細胞の活性を調節していると推測されている。HLA-Fについては、その発現、機能解析の研究は始まったばかりであるが、現在、細胞表面にタンパク

として発現が確認されているのは、EBV を transfect した B 細胞と、後期胎盤のトロホプラストの細胞表面のみである。しかし、HLA-F がいかなるペプチドを結合し細胞表面に発現しているのか、あるいはペプチドを結合していないのかはわかっておらず、機能については明らかではない。我々は、これら 3 分子の全てが胎盤トロホプラストに発現していることから、母児免疫寛容に HLA-E, -F, -G 分子の相互作用が必要であると考えている。

しかし最近では、妊娠免疫以外におけるこれらの分子の機能に関する報告が多くみられる。HLA-E がウイルスや細菌由来のペプチドを提示しうることが報告されているが、さらに、この HLA-E を介しウイルスや細菌由来のペプチドを提示した感染細胞は、HLA-E 拘束性の T 細胞により排除されると報告された。また HLA-E の 2 種の多型により、ペプチド結合能や膜表面における発現の安定性が異なることが報告された。すなわちこれは HLA-E の 2 種の多型が、CD94/NKG2 レセプターを介する NK 細胞活性調節に影響を与える可能性を示唆している。HLA-G は、免疫抑制分子として腫瘍細胞に発現し、体内

の腫瘍免疫から回避させているということが相次いで報告され、同時にこれを否定する報告も相次いでいる。また、肝腎移植が成功した患者のリンパ球には、HLA-G が発現し、免疫寛容が誘導されているなど、妊娠免疫以外での免疫抑制分子として報告されているが、確定されていない。これらの報告は、HLA-E, -G が妊娠に関与しない免疫系においても、免疫調節分子として機能している可能性を示すものであるが、特に HLA-G の発現に関しては、相反する報告が多く、混沌としている。また、HLA-G の非翻訳領域における多型により、可溶性 HLA-G 抗原の産生能が異なり、その結果、人工受精卵の着床率や、さらには臓器移植においてその生着率に影響を与えるという報告もあるが、これも明らかではない。

我々はこれまで、これら HLA-E, -F, -G の 3 分子が妊娠における母児免疫寛容を維持しているのではないかと推測し、その発現を中心に報告してきた。今回は、これら 3 分子が母児免疫寛容にどのように関わっているか、さらには母児免疫寛容以外の免疫反応にいかに関与しているかについて考察したい。

### ● 特別講演 ●

## 「がん免疫療法への新戦略」

西村 泰治

熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫識別学分野

癌細胞に対する免疫応答が、我々の体内において確実に生じていることは、免疫不全状態のヒトや動物において癌の発生率が高いことから明確である。HLA 分子は細胞の表面に発現する蛋白質であり、癌細胞では、その一部が癌特異的に発現する抗原蛋白質の分解産物であるペプチドを結合して、癌細胞の表面に提示する。HLA 分子により提示された癌特異抗原ペプチドを認識した T 細胞は、活性化されて癌細胞を殺したり、種々のサイトカインを分泌することにより、癌細胞を排除する免疫応答を開始する。我々は免疫療法に適した理想的な腫瘍抗原が備えているべき性格として、以下のような要件を考えている。1) 多くの癌患者のすべての癌細胞に高発現しているという汎用性、2) 癌細胞および腫瘍組織だけに発現し、成人の正常組織では発現が低いという特異性、3) 抗原性があり、癌化に関連した分子で癌細胞から脱

落しにくい性質。すなわち腫瘍拒絶能が高く、癌化に関連しているために抗原消失を起こしにくく、さらに自己免疫などの有害事象誘導の危険性が低いなどの観点から、免疫療法に応用可能な腫瘍抗原を厳選する必要があると考えている。我々は、東大医科研・ヒトゲノムセンターの中村祐輔博士との共同研究により、最新の cDNA マイクロアレイ解析データを利用して、このような理想的な癌特異抗原を複数同定すると共に、ES 細胞より分化誘導した樹状細胞の腫瘍免疫への応用の可能性を提案しているので紹介する。

## 1. 肝細胞癌とメラノーマに発現する新規癌胎児性抗原 Glypican-3 (GPC3)

肝細胞癌と正常組織における cDNA マイクロアレイ解析データを用いて、HBV, HCV 感染に関係なく、ほとんどの肝細胞癌で特異的に高発現する新しい癌胎児性抗原 Glypican-3 (GPC3) を同定した。GPC3 は胎生期の肝臓に高発現するが、成人では胎盤で高発現する以外は、他のあらゆる正常臓器において、ほとんど発現していない。GPC3 は GPI アンカー膜蛋白であるが肝細胞癌細胞株より分泌され、ELISA により肝細胞癌患者 40 人中 16 人 (40%) の血清中に GPC3 蛋白を定性的にも定量的にも検出できた。GPC3 蛋白は肝硬変・慢性肝炎などの他の肝疾患、健常人、さらには他の様々な癌患者の血清中には全く検出されなかった。また肝細胞癌を外科的に治療することにより、患者血清中の GPC3 濃度は、著明に減少した。したがって、血清 GPC3 は既知の  $\alpha$  フェトプロテイン (AFP) および PIVKA-II につぐ、肝細胞癌の第 3 の腫瘍マーカーとして有用であることを証明した。

また、多くのヒトメラノーマ組織、細胞株および色素性母斑組織に GPC3 の mRNA および蛋白質が発現していた。ヒトメラノーマ細胞株 11 種類中 5 種類の培養上清中に GPC3 蛋白が検出されたが、培養メラノサイトの培養上清中には GPC3 蛋白は検出されなかった。術前メラノーマ患者 91 名中 36 名 (40%) の血清中に GPC3 蛋白が検出されたが、巨大色素性母斑 5 人ならびに健常人 60 人には、まったく検出されなかった。したがって血清 GPC3 は、メラノーマの腫瘍マーカーとしても有用であることを証明した。Stage 別にみると、Stage 0 (Carcinoma in situ) の患者であっても約 40% が血清 GPC3 陽性であった。Stage I, II, III, IV の患者でも約 40% が血清 GPC3 陽性であり、従来の腫瘍マーカーである 5-

S-cysteinyldopa (5-S-CD) が進行癌でのみ検出されるのと比較して、有意に高い診断率を示した。いずれの Stage においても、外科的に腫瘍を全摘された患者群では、血清 GPC3 は検出されなくなった。

さらに、HLA-A24 陽性肝細胞癌患者の末梢血単核球を、HLA-A24 結合モチーフを有する GPC3 由来ペプチドで刺激することにより、GPC3 特異的かつ HLA-A24 拘束性に肝細胞癌細胞株を傷害する複数のキラー T 細胞 (CTL) 株を樹立できた。また、GPC3 ペプチドで誘導した BALB/c マウスの CTL は、H-2K<sup>d</sup> 拘束性かつ GPC3 抗原特異的に GPC3 遺伝子を強制発現させた大腸癌細胞株 Colon26-GPC3 を傷害した。そこで、GPC3 ペプチドを骨髄由来樹状細胞にパルスした樹状細胞ワクチンを用いて、GPC3 陽性腫瘍の発生の *in vivo* 予防モデルを構築した。Colon26-GPC3 細胞株の皮下腫瘍モデルでは、BALB/c マウスに樹状細胞ワクチンを腹腔内に 1 週間の間隔をおいて 2 回投与することにより、その 1 週間後に皮下に移植した Colon26-GPC3 細胞株の生着を、自己免疫現象を惹起したり、妊娠に影響を与えることなく、完全に拒絶できた。

## 2. 食道癌特異的な癌・精巣様抗原 Proliferation potential-related protein (PP-RP)

食道癌の cDNA マイクロアレイ解析データを利用することにより、食道癌に特異的に高発現する新規抗原、Proliferation potential-related protein (PP-RP) を同定した。PP-RP は正常組織では、胎盤や精巣などに限定して発現する核蛋白である。また、PP-RP を高発現している食道癌患者は、そうでない食道癌患者と比較して有意に生存期間が短かった。さらに食道癌細胞株における PP-RP の発現を RNAi により抑制したところ、細胞増殖が抑制された。したがって、PP-RP は食道癌の癌化と関連し、また患者

の予後予測因子となりうる可能性が示唆された。HLA-A24 陽性食道癌患者 5 症例の末梢血単核球を、HLA-A24 結合モチーフを持つ PP-RP 由来ペプチドを提示させた樹状細胞を用いて刺激した結果、5 症例のすべてより PP-RP ペプチドを認識し、PP-RP と HLA-A24 を発現する食道癌細胞株を傷害する CTL を誘導することができた。さらに食道癌細胞株を生着させたヌードマウスに PP-RP 特異的 CTL を養子免疫したところ、腫瘍の増殖抑制効果と生存期間の延長が観察された。

3. 抗原およびケモカイン遺伝子を発現させた ES 細胞より分化誘導した樹状細胞による腫瘍免疫の誘導  
我々はマウスおよびサル ES 細胞から *in vitro* で

樹状細胞を分化誘導することに成功している。さらに遺伝子導入を確実に効率良く行うことができる ES 細胞の特徴を生かして、ES 細胞にモデル腫瘍抗原と T 細胞遊走活性をもつケモカインの遺伝子を発現させ、これより樹状細胞を分化誘導させた。これをマウスの腹腔内に投与した後に、モデル腫瘍抗原を発現するマウスメラノーマ細胞株を接種したところ、腫瘍の増殖が著明に抑制されるとともに、生存期間の延長が観察された。今後、倫理委員会の承認を得た後に、ヒト ES 細胞を用いた樹状細胞の誘導についても検討する予定である。

講演では、以上のような我々の研究成果とその臨床応用に関して、その可能性と問題点について論じる。

## ● シンポジウム ●

# NK 細胞受容体 KIR, LILR 型適合性と 非血縁者間骨髄移植成績

屋部 登志雄<sup>1)</sup>, 平安 恒幸<sup>1)</sup>, 柏瀬 貢一<sup>1)</sup>, 佐竹 正博<sup>1)</sup>, 森島 泰雄<sup>2)</sup>

1) 東京都赤十字血液センター, 2) 愛知県がんセンター

造血幹細胞移植において 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 型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。HLA クラス I 抗原を認識する受容体としては従来 T 細胞受容体, B 細胞受容体(抗体)が知られていたが, NK や T 細胞で発現する Killer Ig-like Receptor (KIR), 抗原提示細胞群にも発現する Leukocyte Ig-like receptor (LILR) ファミリーなどもクラス I 抗原を認識できることが明らかにされた。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

てきたが KIR による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。我々は国内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ていることから KIR リガンド適合の重要性を報告した (Morishima Y et al. ASH meeting 2003)。これらは T 細胞除去処理を行わない通常の骨髄移植法によるものを解析したので, 移植細胞中に混在するドナー由来成熟リンパ球によるアロ反応性と考えられる。これとは対照的にペルージャ大学のグループは

血縁者間 HLA-haplo-identical 末梢血幹細胞移植において、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 患者では腫瘍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を向上させると報告した (Ruggeri L et al. Science 295: 2097, 2002)。これらでは全症例において T 細胞除去処理ならびに CD34 選択処理を行っており移植幹細胞中にドナー由来成熟リンパ球の混入は殆どない状況なので、このアロ反応性はドナー幹細胞から患者体内で新たに分化してきた NK 細胞によるものと考えられる。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ムの違いで大きく異なってくる。マウスにおいてクラス I 抗原を認識するペア型イムノグロブリン

様受容体 PIR (Paired Ig-like receptor) が GVHD 発症に関与することが報告された (Nakamura A et al. Nat Immunol. 5: 623, 2004)。ヒトの PIR 相同分子が LILR ファミリーであり 19 番染色体上の LRC (Leukocyte receptor complex) 領域内の KIR 座の隣に遺伝子座が局在している。PIR や KIR と同様に抑制型と活性化型が存在するペア型である。LILR には 10 個以上の遺伝子座があり一部で遺伝的多型性の存在がすでに報告されている。また LILR 分子の幾つかはクラス I 抗原との結合性が示されている。我々は分泌型と考えられる LILRA3 分子に注目し日本人集団における多型性と移植成績との関連を解析している。

## 同種免疫応答におけるマイナー組織適合性抗原の役割

村田 誠

名古屋大学医学部附属病院 血液内科

マイナー組織適合性抗原(マイナー抗原)とは、主要組織適合性抗原(ヒトでは HLA) の上に提示される細胞内タンパク由来のペプチド断片のうち、遺伝子多型または性差により患者とドナー間で異なるアミノ酸配列を持ち、T リンパ球の標的抗原となるものをさす。その内白血病細胞を含む造血細胞中心に発現しているマイナー抗原に対する T リンパ球応答は主として移植片対白血病 (GVL) 効果を誘導し、また上皮細胞など造血細胞以外の組織で発現しているマイナー抗原に対する T リンパ球応答は移植片対宿主病 (GVHD) を誘導すると考えられている。従ってマイナー抗原を同定しその組織分布を明らかにすることは、同種移植後の免疫応答の解明に役立ち、GVHD 発症の危険性の高い患者/ドナーの組み合わせの予測や、GVL 効果の増強を目的とした再発予防法・治療法などの開発を可能にし、最終的には同種移植術の治療成績の向上をもたらすと期待されてい

る。ところで、移植後 T リンパ球免疫応答において重要な役割を果たしているマイナー抗原は、ヒトにおいて少なくとも数十個あるいはそれ以上存在するといわれている。しかしこれまでに分子レベルで同定されたヒト・マイナー抗原はわずか十個程にすぎない。それらは Y 染色体上の遺伝子に由来するものと(それらを HY と総称することがある)、常染色体上遺伝子に由来するものとに分類することが出来る。前者は Y 遺伝子と X 遺伝子の相違が抗原性をもたらすもので、即ち常に女性 (XX) に対し男性 (XY) が抗原陽性となる。一方、常染色体由来マイナー抗原の抗原機序としては、これまでのところ一塩基多型、一塩基挿入/欠失、遺伝子欠損などの遺伝子多型が報告されており、またそれぞれのアレル頻度はマイナー抗原の種類によってまた人種によってさまざまである。シンポジウムではこれら同定されたヒト・マイナー抗原について概説し、それぞれの臨床

的意義についてまとめたい。

## GVHD 発症における炎症性サイトカインパラダイム —マクロファージにおける炎症性 サイトカイン産生の意義—

塚田 順一, 田中 良哉

産業医科大学医学部 第一内科学講座

同種造血幹細胞移植において, Graft versus Host Disease (GVHD) の発症は依然大きな問題であり, 時に致死合併症となる。急性 GVHD はドナー由来 T 細胞が宿主由来抗原提示細胞 (antigen-presenting cell; APC) を認識することにより誘導されるが, 移植前処置による宿主障害組織における tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$  · interleukin (IL-1) · interferon (IFN)  $\gamma$  の産生亢進・これによるドナー由来 T 細胞および宿主由来 APC の活性化・ドナー由来 T 細胞の増殖や活性化による細胞障害性の亢進など, GVHD は発症までに多くのステップを経ることが明らかになった。この GVHD 発症・進展において, HLA 非関連分子である TNF $\alpha$  · IL-1 · IFN $\gamma$  などの炎症性サイトカインは極めて重要な働きをしている。

事実, 炎症性サイトカイン産生を抑制する副腎皮質ステロイドや, 可溶性 TNF $\alpha$  や膜型 TNF $\alpha$  に結合し受容体へのシグナルを遮断する抗 TNF $\alpha$  抗体 infliximab は, 急性 GVHD 治療薬として認知されつつある。特に infliximab は炎症を主要病態とする関節リウマチやクローン病などの自己免疫疾患に極めて高い有効性を示している。

さらに, ある一定の誘発因子に暴露されても発症には個体差が存在する。個体差を遺伝子レベルで説明する一つとして遺伝子多型があり, 炎症性サイトカイン IL-1 · TNF $\alpha$  及び抗炎症性サイトカイン IL-10 の遺伝子多型がクローン病・潰瘍性大腸炎・慢性炎症性肺疾患・喘息・胃炎・歯周病などの炎症性疾

患や胃癌の発症に関連する。これは多型が遺伝子発現に影響を与えるためと考えられるが, 多型による炎症性・抗炎症性サイトカイン遺伝子の分子生物学的な機能変化は未だに解明されていない。ここにおいて, 近年, 炎症性・抗炎症性サイトカインもしくはその受容体の遺伝子多型が GVHD や移植後生存に影響しうることが報告されている。

移植に伴う生体内ストレスのターゲットとして, 最も強力な炎症惹起細胞であるマクロファージがあげられる。マクロファージはグラム陰性桿菌由来エンドトキシンやウイルス蛋白などにより活性化され極めて大量の IL-1 や TNF $\alpha$  を産生し, このマクロファージ活性化は GVHD 発症において重要であることが知られている。その産生機構は刺激の種類により異なり, さらにマクロファージには細胞特異的産生機構が存在する。エンドトキシンは Toll/IL-1 レセプターファミリー (TIR) に属する Toll 様レセプター (TLR) 4 に結合し, MyD88 · IRAK · TRAF 経路を活性化する。さらに, ヒト IL-1 遺伝子活性化に不可欠な核内転写因子として PU.1 · NF-IL6 (C/EBP $\beta$ ) · CREB · LIL/STAT が同定された。これらの研究より, マクロファージ特異的な炎症性サイトカイン産生が, 受容体・転写因子の発現プロファイルという少なくとも 2 段階において規定されていることが明らかとなった。従来から GVHD 発症機構を解明し, それを制御しようとする数多くの試みがなされてきたが, 炎症機構を細胞の遺伝子・分子レ

バルまで完全に解明することにより、GVHD 制御の

多くのヒントが得られる可能性がある。

● 一般演題 ●

## Luminex 法による日本人 HLA 遺伝子多型性の検討

荒木 延夫, 秋田 真哉, 河村 久美子, 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】

今回、我々は造血幹細胞移植前検査などの HLA タイピングを通じて、PCR-reverse SSOP 法の原理による蛍光マイクロビーズアレイシステム法 (Luminex 法) により、日本人の HLA 遺伝子多型性を検討したので報告する。

### 【材料・方法】

材料は当センターに HLA タイピングを依頼された日本人検体を用いた。4 桁アリルタイピングは、Luminex 法を用い、ゲムノサイエンス社のジェノサーチ HLA-A、ジェノサーチ HLA-B、ジェノサーチ HLA-C、ジェノサーチ HLA-DRB1、そして、ジェノサーチ用日本人対象判定ソフトを使用した。

### 【結果】

表に日本人に遺伝子の多型性が認められた HLA-A の日本人抗原頻度を特に示したが、これまで、日本人にほとんど多型性がないと考えられている HLA-A24 に遺伝子の多型性が認められた。内訳は日本人にまれとされている A\*2408 が A24 抗原陽性者 297 例中 3 例 (1.01%) そして、極めてまれと報告されている A\*2420 が 9 例 (3.03%) を示した。他の HLA-B, C, DRB1 についても併せて報告する。

表 日本人に遺伝子の多型性が認められた HLA-A の日本人抗原頻度 (低頻度により今回の調査で検出されなかったアリルを rare とした)

HLA-A (n=504)			
抗原名と 抗原頻度	アリル名	n	割合 (%)
A2 (n=263) 52.2%	A*0201	117	44.5
	A*0203	1	0.4
	A*0206	109	41.4
	A*0207	35	13.3
	A*0210	1	0.4
A3 (n=4) 0.8%	A*0301	3	75.0
	A*0302	1	25.0
A24(n=297) 58.9%	A*2402	285	96.0
	A*2408	3	1.0
	A*2420	9	3.0
A11 (n=70) 13.9%	A*1101	70	100
	A*1102	0	rare
A26(n=122) 24.2%	A*2601	76	62.3
	A*2602	24	19.7
	A*2603	22	18.0

## Luminex を用いた抗体スクリーニング / 同定システムの構築について(その1)

二神 貴臣, 二家本 哲生, 大沼 毅, 丸屋 かおり, 宮崎 豊人,  
丸屋 悦子, 赤座 達也, 佐治 博夫

特定非営利活動法人 HLA 研究所

### 【はじめに】

近年, 造血幹細胞移植領域で, 移植方法の多様化が進み, 臍帯血移植などの HLA ミスマッチ移植症例が急増し, 急性拒絶または生着不全を経験する機会が増えている。よって液性免疫機序が造血幹細胞移植の予後に与える影響についての研究が急務となっている。Luminex 法を用いた液性抗体検査の利点は HLA のように多型性が多い抗原系について抗体特異性の同定を, HLA 抗原をコートした多種類のビーズを1本のチューブ内で反応させることにより, 血清学では何日も要した実験期間を1日に短縮でき, さらに蛍光抗体法を用いた検出系で高い感度が得られることである。この利点を最大限に生かし, 再現性の高い, コストパフォーマンスも良好な抗体検査をめざしスクリーニングシステムの構築をした。

### 【抗体スクリーニングシステムの概要】

1. 1次スクリーニング: HLA 抗体 (class I & class II) の有無を判別
2. 2次スクリーニング: 1次スクリーニングで陽性となった検体につき抗体の特異性を同定。特に許容抗原の同定に重点を置く。
3. 3次スクリーニング: 2次スクリーニングで同定された特異性につき, さらに詳しい特異性の同定を行う。

### 【材料・方法】

上記システム構築のため, Luminex を用いた市販の抗体スクリーニングキット (LABScreen Mixed),

抗体特異性同定用キット (LABScreen PRA) について, 健康人 60 家系(夫, 妻, ベビーの DNA および夫・妻の妊娠 3 ヶ月, 8 ヶ月, 出産後の各血清)を用い, 以下のような方法で有用性の検定を試みた。

1. 夫・妻・ベビーの DNA を用い HLA-A, B, DR を判定し, 今回の妊娠での免疫原となりうる HLA 抗原を特定した。
2. 夫・妻の妊娠後の各血清 (n = 236) について, 2種のキットを用いテストをした。
3. 結果の解析には, LABScreen Mixed はキット付属のソフトで LABScreen PRA は開発中のソフトを用いた。

### 【結果・考察】

- ◆ LABScreen Mixed による抗体スクリーニングは, 指定された判定基準では, 夫の血清にも陽性の結果が得られ, 非特異反応や cut off 値の設定・解析方法など改良しなければならない点がある。
- ◆ LABScreen PRA による特異性の同定を兼ねたスクリーニングにより免疫原である抗原の特異性の同定ができた。ただし, 血清により全体に高い反応がみられることがあり解析を困難にしている。この点を改良するため, 現在さまざまな方法を試みている。

Luminex を用いた抗体検出系の利点を十分発揮させるため, 更なる工夫が必要である。

## ITP に早期胃癌を合併した 2 例の HLA 解析

山岡 学<sup>1)</sup>, 松崎 龍典<sup>1)</sup>, 阿部 操<sup>1)</sup>, 細川 美香<sup>1)</sup>,  
岸本 裕二<sup>1)</sup>, 石井 一慶<sup>2)</sup>, 野村 昌作<sup>2)</sup>, 福原 資郎<sup>3)</sup>

1) 関西医科大学輸血部 2) 岸和田市民病院血液内科  
3) 関西医科大学第一内科

### 【はじめに】

特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) と悪性腫瘍の合併は、一部の報告によると稀ではないとされている。これは、ITP と悪性腫瘍との合併に遺伝的免疫学的因子が関与していることを示唆している。一方、ヘリコバクターピロリは胃癌や胃潰瘍との関連性が指摘されているが、最近ピロリ菌の除菌による ITP 患者の血小板数増加効果が注目されている。今回我々は、早期胃癌を合併したピロリ菌陽性の ITP の 2 症例を経験し、その HLA の解析から興味ある知見を得たので報告する。

### 【症例 1】

55 歳女性。ITP にてステロイド治療中に、下血と貧血が出現し、胃内視鏡検査の結果早期胃癌(胃体下部前壁 III + IIc) と診断された。

### 【症例 2】

73 歳男性。健診で胃癌の疑いと血小板減少を指摘。入院後 ITP と診断されステロイド治療開始し、胃内視鏡検査で早期胃癌(胃体中部 II 型) と診断され

た。2 例とも  $\gamma$  グロブリン大量療法後、胃全摘術および摘脾を施行し、血小板数が正常化した。ともに、ピロリ菌陽性で、HLA 解析から DQB1\*0301 が検出された。

### 【考 察】

1. 早期胃癌を合併した ITP の 2 症例を経験した。
2. 2 例とも  $\gamma$  グロブリン大量療法後、胃全摘術および摘脾を施行し、血小板数が正常化した。
3. ともに、ピロリ菌陽性で、HLA の解析からそれぞれのハプロタイプに胃癌の疾患感受性が報告されているアリル (DQB1\*0301) が検出された。
4. ITP 57 症例の HLA 解析の結果、ピロリ菌への感受性・抵抗性を示すアリルは、本例とは異なっていた。
5. 本 2 例における胃癌と ITP 発症に対するピロリ菌の関与は、異なったメカニズムによると考えられた。

## 日本人先天性胆道閉鎖症患者における HLA 型 —生体肝移植レシピエント 392 人の解析—

辻 博昭<sup>1)</sup>, 湯浅 健<sup>1)</sup>, 木村 晋也<sup>1)</sup>, 万木 紀美子<sup>1)</sup>, 江川 裕人<sup>2)</sup>, 田中 紘一<sup>2)</sup>,  
丸屋 悦子<sup>3)</sup>, 佐治 博夫<sup>3)</sup>, 浅野 弘明<sup>4)</sup>, 前川 平<sup>1)5)</sup>

1) 京都大学医学部附属病院輸血細胞治療部, 2) 京都大学医学部附属病院移植外科, 3) HLA 研究所,  
4) 京都府立医科大学医学部看護学科, 5) 京都大学医学部附属病院分子細胞治療センター

### 【背景】

先天性胆道閉鎖症 (biliary atresia: BA) は肝外胆管が線維的に閉塞することによって主に新生児期に発症する閉塞性胆管症である。Kasai 法などの外科的治療が行われているが成績は満足するものではなく、現在も最終的に肝移植が施行されることが多い。心奇形や内臓逆位などの合併奇型を伴う *Embryonic* タイプと、合併奇型を認めず新生児期に発症する *perinatal* タイプに分類されるが、病因については明らかにされておらず、遺伝子的要因、ウイルス説、免疫異常説などの要因が考えられている。この研究では主として *perinatal* タイプの日本人 BA 患者の組織適合抗原 (human leukocyte antigen: HLA) の頻度を正常対照群と比較検討し、疾患感受性を調べることを目的とする。

### 【対象と方法】

1990 年 6 月から 2003 年 11 月までの間に京都大学医学部附属病院にて施行された生体肝移植症例か

ら肝外奇形を合併した 13 例を除く 392 人の日本人 BA 患者を対象とし、健康な日本人のボランティア (n = 828) を正常対照群とした。

### 【結果】

BA 患者では HLA-DR2 が有意に多く見られたが (odds ratio (OR) = 1.46, 95% CI = 1.5–5.1,  $P = 0.029$ ), Two-locus 分析法では HLA-DR2 単独ではなく HLA-A24 および -B52 も BA 患者群に多く見られることがあきらかとなった。さらにハプロタイプ HLA-A24-B52-DR2 の頻度は文献上の日本人頻度よりも BA 患者群において著しく高かった (OR = 2.20,  $P = 0.00124$ )。

### 【結語】

HLA 近傍にある遺伝子が BA の病因に重要な役割をしているか、あるいは胆管上皮に発現する HLA-DR2 抗原が直接 BA の病因に関連していることが推測された。

# 日本人における慢性関節リウマチ疾患と KIR3DL1 の各 allele との相関関係

岡本 威明<sup>1)</sup>, 亀岡 陽子<sup>1)</sup>, 山下 隆博<sup>2)</sup>, 村田 紀和<sup>3)</sup>, 芦田 恒雄<sup>4)</sup>, 井手 武<sup>5)</sup>,  
中西 真理<sup>1)</sup>, Pyo Chul-Woo<sup>6)</sup>, 羽竹 勝彦<sup>1)</sup>, Daniel E. Geraghty<sup>6)</sup>, 石谷 昭子<sup>1)</sup>

- 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 haplotype ならびに genotype 解析の結果では, 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, 3DL1 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 183 名, RA 群 114 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, 3DL1B allele typing には, Gardiner らの 4 セットの primer を用いて SSP 法により検討し, また 3DL1A allele typing には direct sequence 法を用いて行った。

## 【結果】

3DL1A サブタイプの各 allele についてはいずれも有意の相関は認められなかった。3DL1B サブタイ

プにおいては, 弱い有意の増加が認められた ( $\chi^2 = 4.46$ , odds ratio = 1.69,  $P = 0.035$ )。さらに, これを allele レベルで検討した結果, 3DL1B に属する 3DL1\*001 が有意に減少し ( $\chi^2 = 3.85$ , odds ratio = 2.66,  $P = 0.049$ ), 3DL1\*005 が有意に増加していた ( $\chi^2 = 10.16$ , odds ratio = 2.36,  $P = 0.001$ )。

すなわち, 3DL1\*005 allele は RA の疾患感受性遺伝子の一つであると考えられる。日本人 DNA を用いた本研究においては 3DL1\*002, \*004, \*006, \*008 allele 頻度は 0% であった。日本人の KIR 遺伝子の多型性の乏しさは遺伝子の種類のみならず, allele の種類においても乏しいと考えられる。

## 【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。

# HLA 遺伝子欠損: 移植後の再発で LOH を検出した 症例と A 座欠損遺伝子を疑う症例

二家本 哲生, 二神 貴臣, 大沼 豪, 丸屋 かおり, 宮崎 豊人,  
丸屋 悦子, 赤座 達也, 佐治 博夫, 田中康博<sup>1)</sup>

特定非営利活動法人 HLA 研究所, 1) 神戸市立中央病院血液内科

## 【はじめに】

造血幹細胞移植後の再発で, Mixed Chimera が認められ, 再移植を目的とした患者 HLA 型確認検査で LOH が発見された 1 症例, および HLA-A 欠損遺伝子が示唆された新たな 1 家系について報告する。

## 【材料・方法】

**Case 1:** 患者 (MDS) の移植後生着確認検査を以下の方法で行った。患者の口腔内粘膜細胞および患者移植後の末梢血 (PB) を全血 (WB)・T 細胞分画・non-T 細胞分画に分離し, それぞれを DNA に

分離し, サンプルとした。14 種のマイクロサテライト (MS) を用い患者とドナーを識別しうる MS のスクリーニングを行い, 該当した MS を用い各サンプル中の患者とドナーの混合比を求めた。口腔内粘膜細胞由来 DNA・移植後の各 DNA を用い HLA-A, B, DR タイピングをおこなった。

**Case 2:** 造血幹細胞移植希望患者とその家族 7 名の HLA-A, B, DR の allele typing を行なった。

## 【結果・考察】

母ハプロタイプ c の A 座遺伝子欠損が考えられ,

**Case 1:** 幹細胞移植後の患者 PB の MS 多型性は mixed chimera であり, %Recipient は細胞分画により異なり, WB で 82%, T cells で 6%, non-T cells で 98% であった。  
各細胞分画の HLA 型は以下のとおりであった。

	HLA-A	HLA-B	HLA-DR
*口腔内粘膜由来 DNA	A*0201/A*3101	B*3501/B*4002	DRB1*0901/DRB1*1501
**T 細胞分画由来 DNA	A*0207/A*3101	B*0702/B*4006	DRB1*0901/DRB1*1502
***Non-T 分画由来 DNA	A*0201/-	B*3501/-	DRB1*1501/-

\*Recipient 本来の HLA, \*\*Donor の HLA, \*\*\*再発後増殖した Recipient 腫瘍細胞の HLA

**Case 2:** 患者と両親および 4 人の同胞の HLA-A, B, DR 型を以下に示す。

続柄	A-locus		B-locus		DR-locus		haplo
本人	*31	-(x)	*46	*35	*0803	*1406	a/c
父	*31	-	*46	*35	*0803	*0403	a/b
母	*02	-(x)	*3901	*35	*1501	*1406	c/d
兄	*02	*31	*3901	*46	*1501	*0803	a/d
妹	*31	-(x)	*35	-	*1406	*0403	b/c
弟	*02	*31	*3901	*46	*1501	*0803	a/d
妹	*31	-(x)	*46	*35	*0803	*1406	a/c

a: A31-B46-DR8

b: A31-B35-DR4

c: A deficient (x)-B35-DR14

d: A2-B39-DR15

そのハプロタイプが3人の娘に遺伝していた。昨年報告した DRB1 欠損遺伝子に続き A 座欠損遺伝子の存在も示唆される。

腫瘍の免疫監視機構からのエスケープ戦略とされる LOH 現象はさほど稀な現象ではなく、HLA 遺

伝子に欠損遺伝子が存在する可能性が強くなった。造血幹細胞移植目的のタイピングではこのような現象の存在を把握しておくことが、ドナー選択と GVL 効果の評価に重要と考える。

## 腎移植後長期経過症例における液性因子 (抗 HLA 抗体)の影響

難波 行臣<sup>1)</sup>, 石黒 伸<sup>1)</sup>, 今村 亮一<sup>1)</sup>, 史 屹<sup>1)</sup>, 市丸 直嗣<sup>1)</sup>, 高原 史郎<sup>2)</sup>,  
奥山 明彦<sup>1)</sup>, 小角 幸人<sup>3)</sup>, 京 昌弘<sup>4)</sup>, 守山 敏樹<sup>5)</sup>, 佐田 正晴<sup>6)</sup>

- 1) 大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学(泌尿器科), 2) 大阪大学大学院医学系研究科先端移植基盤医学  
3) 公立学校共済組合近畿中央病院泌尿器科, 4) 桜橋循環器クリニック  
5) 大阪大学健康体育部健康医学第二部門, 6) 国立循環器病センター再生医療部

### 【目的】

移植腎において液性因子は、急性期だけでなく慢性期においても移植腎機能低下の原因の一つとして重要である。2003年、慢性液性拒絶反応診断基準案が提唱されが、長期生着例に対する検討は不十分である。腎移植後10年以上経過症例における慢性液性拒絶反応の影響を検討したので報告する。

### 【対象】

腎移植後10年以上経過かつ抗HLA抗体の有無を検索した症例のうち、同時期に移植腎生検術を施行した12例。

### 【方法】

抗C4d抗体を用いた免疫染色法、抗HLA抗体

(One Lambda社)の有無および組織学的所見を用いて、C4d陰性/PRA陰性をA群(n=9例)、C4d陽性/PRA陽性をB群(n=3例)とした。

この2群について1年後のクレアチニンクリアランス(CCr)変化を検討した。

### 【結果】

B群は、A群に比べてCCrの悪化は有意であった。(P=0.033)

### 【考察】

慢性液性拒絶反応の有無は移植腎機能に影響を与えるが、移植後PRA検査陽性患者に対して腎生検による病理所見の検討は、治療方針決定に貢献する可能性が示された。

## リシピエント HLA 抗体がドナー細胞クロスマッチ陽性の造血幹細胞移植に与える影響について

荒木 延夫<sup>1)</sup>, 秋田 真哉<sup>1)</sup>, 河村 久美子<sup>1)</sup>, 能勢 義介<sup>1)</sup>,  
井本 しおん<sup>1)</sup>, 三戸 壽<sup>1)</sup>, 甲斐 俊朗<sup>2)</sup>, 原 宏<sup>2)</sup>

1) 兵庫県赤十字血液センター 2) 兵庫さい帯血バンク

### 【目的】

非血縁者間臍帯血移植では、HLA 不一致の移植が数多く実施されているため、患者が HLA 抗体を保持する場合には、移植細胞との反応性と生着率・造血回復速度および予後との関連は、重要な検討課題と思われる。今回、我々は非血縁者間臍帯血移植前の HLA 適合検査において患者血清中の HLA 抗体スクリーニング及び、患者・ドナー間のクロスマッチを導入し、知見を得たので報告する。

### 【材料・方法】

HLA 抗体スクリーニングはワンラムダ社 LAT を用いて抗クラス I とクラス II 抗体の両方を実施した。また、抗クラス I 抗体陽性の場合、患者血清とドナーリンパ球によるクロスマッチ検査(ドナーリンパ球のクロスが不能な場合は、HLA タイプが同じ自家凍結リンパ球を使用した)を LCT 法、AHG-LCT 法を用いて実施した。

### 【結果及び考察】

抗体スクリーニング検査において、245 例中 26 例(陽性率 10.61%)の陽性を得た。抗体の内訳は、抗クラス I が 11 例、抗クラス II が 3 例そして、抗クラス I+II が 12 例であった。

クロスマッチ検査において、クラス I 抗体陽性患者 23 例中 6 例(陽性率 26.09%)の陽性を得た。クロスマッチ陽性は、移植後早期拒絶のリスクが考えられるため、内 2 例はドナー変更された。また、3 例に移植が行われたが、1 例は生着、他 2 例は生着不全であった。なお、他 1 例は移植予定である。

クロスマッチ陰性で抗クラス II 陽性が 15 例を示した。内 6 例(陽性率 40.00%)の抗クラス II 抗体がドナー細胞に陽性であると推定され、1 例が移植中止、3 例がドナー変更された。また、2 例に移植が行われたが、2 例共に生着不全であった。

抗クラス I、抗クラス II 抗体の不適合が生着率に関与する可能性が示唆される結果を得た。症例を追加し、更に検討していきたい。

# 新しいマイナー組織適合性抗原 ACC-2 適合性と a-GVHD および Relapse との相関

丸屋 悦子, 二神 貴臣, 二家本 哲生, 大沼 豪, 丸屋 かおり,  
宮崎 豊人, 赤座 達也, 赤塚 美樹<sup>1)</sup>, 佐治 博夫

特定非営利活動法人 HLA 研究所, 1) 愛知県がんセンター研究所 腫瘍免疫部

## 【はじめに】

HLA-B\*4403 拘束性の新しいマイナー組織適合性抗原 (ACC-2) が最近同定され, 養子免疫療法への応用の可能性が示唆されている。SSCP を用いた ACC-2 の簡便な DNA typing 法を開発し, 日本人における遺伝子頻度および非血縁間・親子間・同胞間での不適合確率をもとめた。次に HLA identical sibling 間造血幹細胞移植例(161 例)での, ACC-2 適合性と a(acute)-GVHD 発症率および再発率との相関について, HLA 拘束性を含め解析したので報告する。

## 【解析対象と方法】

健康人 (n = 366) の DNA を用い, PCR-SSCP 法で ACC-2 のアリル (A/G) をタイプした。遺伝子頻度は直接カウント法を用い, 不適合確率は池亀らの方法を用い計算した。HLA-identical sibling 間造血幹細胞移植例(161 ペア)につき, ACC-2 のアリル型を決定し, HLA 拘束性は本来拘束性を示す B\*4403 だけではなく HLA super family (HLA-A3 like, A2 like, B44 like, B7 like) ごとに a-GVHD や Relapse rate との相関の有無を解析した。

## 【解析結果と考察】

◆ ACC-2 の遺伝子頻度と GVH 方向不適合確率(塩基置換 A/G, A = ACC-2 positive)

ALLELE	#OBSERVED	FREQ.	ACC-2	ALLELE	FREQ.
A/A	13	3.55%	ACC-2 (+)	A	0.19
A/G	116	31.7%			
G/G	237	64.8%	ACC-2 (-)	G	0.81
Total	366				1.00

### Pair ACC-2(-) Donor versus (+) Recipient

Unrelated pair	0.260	26% incompatible
Parent/ Offspring pair	0.156	16% incompatible
Sibling pair	0.143	14% incompatible

## ◆ ACC-2 の適合性と a-GVHD, Relapse との相関

HLA-B44 like* (N=81)	a-GVHD (≥1)	再発率
GVH 方向不適合群 (8)	75% (6/8)	25%
GVH 方向適合群 (73)	38% (28/73)	18%

HLA super family による拘束性での解析でも本解析対象中では不適合数が少なく解析不能であった。さらに B44 を保有する不適合ペアは 2 例しか得られず、今後の解析が期待される。

\*HLA-B44 like superfamily = B37, B41, B44, B45, B49, B50, B60 & B61