

日本組織適合性学会誌

第 28 卷第 2 号 2021 年 8 月 10 日発行

目 次

日本組織適合性学会からのお知らせ

第 29 回 日本組織適合性学会大会のご案内	69
認定 HLA 技術者講習会（大会教育講演を兼ねる）	71
認定制度指導者講習会	72
日本組織適合性学会 会告（教育項目の改訂について）	73
第 20 回日本組織適合性学会・近畿地方会のご案内	75
令和元年度認定 HLA 検査技術者認定制度試験問題に関する報告の訂正	76

2021 年度認定 HLA 検査技術者講習会テキスト

基礎知識：認定制度試験問題—解説とポイント整理—	成瀬 妙子	77
HLA DNA タイピング検査技術	東 史啓	83
臓器移植のための免疫プロファイリングと免疫モニタリング	大段 秀樹	94

総説

HLA-G 遺伝子の構造，発現および多型性	鈴木 進悟，亀谷 美恵，椎名 隆	102
-----------------------	------------------	-----

第 4 回 関東 HLA 研究会 抄録集	111
第 4 回 東海北陸 HLA 研究会 抄録集	120

日本組織適合性学会誌 MHC 投稿・執筆規定	137
Instructions to Authors	141
編集後記	145

第 29 回日本組織適合性学会大会のご案内

第 29 回日本組織適合性学会大会

大会長 田中 秀則

(公益財団法人 HLA 研究所 所長)

副大会長 河本 宏

(京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 再生免疫学分野 教授)

日本組織適合性学会・会員の皆様におかれましては益々ご清祥のこととお慶び申し上げます。

第 29 回日本組織適合性学会大会は、京都での現地開催から WEB 開催に変更となりました。また、参加登録期限も延長しましたので、多くの会員の皆様のご参加をお待ちしております。詳細については、大会ホームページ (<https://procomu.jp/jshi2020/index.html>) をご覧ください。

【テーマ】「MHC 多様性と医療における適合性」

【開催期間】 2021 年 9 月 3 日～9 月 5 日

【開催方式】 WEB によるライブ配信

大会終了後：大会の内容をオンデマンドで配信予定（参加者登録者限定）

【特別講演】

特別講演 1：奥野恭史先生（京都大学医学部人間健康科学系専攻ビッグデータ医科学 教授）

特別講演 2：Daniel E Geraghty（Fred Hutchinson Cancer Research Center）

特別講演 3：坂口志文先生（大阪大学免疫学フロンティア研究センター 実験免疫学 特任教授）

【シンポジウム】（5 シンポジウム）

1) シンポジウム 1：iPS 細胞を用いた再生医療のこれから

2) シンポジウム 2：がん免疫療法の新潮流：免疫反応をデザインする戦略

3) シンポジウム 3：第 25 回 QCWS レポート ―そこから見える現状と課題

4) シンポジウム 4：造血細胞移植における組織適合性研究 ―エビデンス作りを目指して―
日本造血・免疫細胞療法学会との合同シンポジウム

5) シンポジウム 5：DSA subclass and clinical outcome ―日本移植学会との合同シンポジウム―（スポンサー
ドシンポジウム）

【一般演題】 全演題 WEB によるライブでの口演となります。

【事前参加登録・振込期間】

2021 年 3 月 23 日（火）～

銀行振込：～8 月 27 日（金）、クレジットカード決済：～9 月 5 日（日）

【その他開催事項】

学会賞受賞講演, 学術奨励賞口演, 教育講演 (HLA 認定技術者講習会), 教育講演 (Advance stage) (初開催), QCWS 集会, 初心者講習会, 一般演題 (口演), ランチョンセミナーなどを開催致します。

大会事務局・運営事務局

大会事務局：公益財団法人 HLA 研究所内

第 29 回日本組織適合性学会大会事務局

〒 600-8813 京都市下京区中堂寺南町 134

京都リサーチパーク 1 号館 2 階

TEL: 075-313-5201 FAX: 075-313-5202 E-MAIL: jshi2020@hla.or.jp

学術集会運営事務局：株式会社プロコムインターナショナル

〒 135-0063 東京都江東区有明 3-6-11TFT ビル東館 9 階

TEL: 03-5520-8821 FAX: 03-5520-8820 E-MAIL: jshi29@procom-i.jp

認定 HLA 技術者講習会（大会教育講演を兼ねる）

本講習会は、今後 HLA 検査技術者認定を取得あるいは更新しようとする方々を対象に実施されます。大会参加者は自由に参加することができます。受講に関しましては、事前登録をしていただく必要はございません。

日 時：令和 3 年 9 月 5 日（日曜日）9 時 00 分～11 時 00 分

開催方法：WEB 開催

テキスト：テキストの販売はいたしません。以下の URL に掲載されたテキストを必要に応じてダウンロードしてご使用ください。

<http://jshi.umin.ac.jp/journals/latestlist.html>

受講証明書：認定制度に関わる受講証明書は、オンライン受講に限り発行いたします。オンデマンドで受講された場合は、受講証明書発行の対象外になりますのでご注意ください。

受講証明書を必要とされる方は以下の点にご留意ください。

1. 講習会への入室時刻を確認するために必ず自らのログイン ID とパスワードで入室し視聴していただくをお願いします。また、当日までに視聴可能なデバイス（PC、タブレット、スマートフォン）を各自ご準備ください。Wi-Fi 環境で視聴することをお勧めします。
2. 原則として、途中退出、中途入場の場合は受講証明書を発行しません。開始時間までに指定 URL から余裕をもって入室し、終了後に退室していただくことを厳守してください。なお、予期せぬ通信トラブル等により、やむを得ず短時間で退出された方は 9 月 10 日までに認定制度関連事務支局に理由を添えてご連絡ください。
3. 大会専用サイトに掲載されるアンケートを期日（9 月 19 日 24:00）までに必ずご提出ください。
4. アンケート項目「受講証明書の発行を希望」には、「希望する」とご回答ください。
5. アンケート項目「講習会でお知らせした 2 桁の番号を記入してください」には、講習会で掲示する 2 桁の番号をご入力ください。
6. 講習会開催 1 か月後を目途に受講証明書を発行します。準備が整いましたらメール等でお知らせしますので、各自マイページからダウンロードをお願いします。

内 容：

- (1) HLA に関する基礎医学的な講演
成瀬 妙子 先生（長崎大学熱帯医学研究所）
「基礎知識：認定制度試験問題 一解説とポイント整理」
- (2) HLA タイピングあるいは抗 HLA 抗体検査に関する講演
東 史啓 先生（日本赤十字社血液事業本部）
「HLA DNA タイピング検査技術」
- (3) 移植に関する臨床医学的な講演
大段 秀樹 先生（広島大学大学院医系科学研究科）
「臓器移植のための免疫プロファイリングと免疫モニタリング」

認定制度指導者講習会

第29回日本組織適合性学会大会中の下記の教育講演（認定HLA検査技術者講習会）、特別講演3企画、シンポジウム4企画、合計8企画から、5企画以上の受講をもって、指導者新規申請および更新申請に必要な講習を受講したものと認めます。大会専用サイトの単位申請用フォームにおける自己申告をもって受講証明といたします。

内 容：

- 1) シンポジウム1：9月3日（金）13:00～14:00
「iPS細胞を用いた再生医療のこれから」
- 2) 特別講演1：9月3日（金）14:10～15:00
「日本人疾患ゲノム情報統合データベース“MGeND”」
- 3) シンポジウム2：9月3日（金）15:10～16:30
「がん免疫療法の新潮流：免疫反応をデザインする戦略」
- 4) シンポジウム3：9月4日（土）9:00～10:20
「第25回QCWSレポート ―そこから見える現状と課題」
- 5) 特別講演2：9月4日（土）10:30～11:10
「From structure to function to polymorphism: the discovery of the HLA-E, F, G genes to genotyping the immune system through novel approaches for deciphering polymorphism—my path of research」
- 6) シンポジウム4：9月4日（土）11:20～12:40
「日本造血・免疫細胞療法学会総会との合同シンポジウム
造血細胞移植における組織適合性研究 ―エビデンス作りを目指して―」
- 7) 特別講演3：9月4日（土）16:10～17:00
「制御性T細胞研究の40年」
- 8) 教育講演（HLA技術者講習会を兼ねる）：9月5日（日）9:00～11:00
 - ①「基礎知識：認定制度試験問題 ―解説とポイント整理―」
 - ②「HLA DNA タイピング検査技術」
 - ③「臓器移植のための免疫プロファイリングと免疫モニタリング」

日本組織適合性学会 会告（教育項目の改訂について）

認定制度委員会では、認定 HLA 検査技術者および認定組織適合性指導者が習得しておくべき HLA (MHC) に関する知識の教育項目を会告として 2002 年に通知しました (MHC Vol.9 No.1 62-65)。その後、約 20 年が経過し、習得すべき新たな教育項目が増加したことから、この度、教育項目を刷新することにしました。

2002 版との違いは、教育項目を初心者レベル、技術者レベル、指導者レベルの 3 つの段階に分け、それぞれのレベルに見合ったキーワードを列記した点になります。それぞれのレベルの到達目標と主な参考図書や講演を以下に記します。

初心者レベル

到達レベル：遺伝子、生体防御、HLA、検査方法や測定機器の原理に関する基礎知識を理解する。

参考図書や講演：高等学校「生物基礎」、学会誌 MHC の総説「HLA の基礎知識 1, 2, 3」、初心者講習会

技術者レベル

到達レベル：HLA 検査のために必要な基礎知識、技術的知識並びに検査結果の解釈法を理解する。

参考図書や講演：移植・輸血検査学、QCWS 参考プロトコール集、認定技術者講習会、QCWS

指導者レベル

到達レベル：HLA 検査の精度管理に必要な知識、世界情勢を踏まえた基礎・臨床研究および新たに開発された検査技術を理解する。

参考図書や講演：移植・輸血検査学、教育講演 (Advanced Stage)

今後は、この教育項目に準じた教育講演等のカリキュラムを提供します。

日本組織適合性学会認定制度委員会教育部会

教育項目一覧

		初心者レベル	技術者レベル	指導者レベル
大区分	中区分	小区分		
倫理、法令、指針に関する知識	倫理、法令、指針	生命倫理, 生命倫理4原則, 研究倫理, e-ラーニング	ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針, 個人情報保護法, 利益相反	人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針, コンプライアンス, 倫理教育
HLAに関する知識	研究の歴史	HLA/MHC発見の経緯, HLAタイピング技術の歴史	日本組織適合性学会, ワークショップ(国際, アジア/オセアニア, 国内), ワークショップの必要性, 移植(臓器, 造血細胞, 輸血, 幹細胞), 研究史(クローニング, 立体構造, ゲノム構造)	
	HLAゲノム領域の構造	染色体, ゲノム, 複製, 遺伝子, ローカス, 各領域の特徴(伸長クラスI領域, クラスI領域, クラスIII領域, クラスII領域, HLA-DR遺伝子領域, 伸長クラスII領域), 遺伝子の位置(クラスI遺伝子, クラスII遺伝子)	各領域の特徴(GC含量, 遺伝子密度, 遺伝子重複, 高度反復配列), HLA関連遺伝子の位置(TAP, PSMB, C2, C4, TNFなど), クラスI様遺伝子の位置(MIC, HFE, CD1など), 比較ゲノム学, 分子進化, 系統発生, 相同ゲノム領域	
	HLA遺伝子の種類と構造	遺伝子の種類(古典的クラスI分子, 非古典的クラスI分子, 古典的クラスII分子, 非古典的クラスII分子), 遺伝子の基本構造(古典的クラスI遺伝子, 古典的クラスII遺伝子), ドメイン構造との対応	遺伝子の基本構造(非古典的クラスI遺伝子, 非古典的クラスII遺伝子), ドメイン構造との対応, プロモーター領域, スプライスバリエント, 偽遺伝子の種類, クラスI様遺伝子(MIC, HFE, CD1など)の種類と構造, スプライスバリエント, 分子進化, 系統発生	
	HLA分子の種類と構造	分子の種類(古典的HLAクラスI分子, 古典的HLAクラスII分子), エクソン構造との対応, 立体構造, α 鎖, β 鎖, β 2ミクロglobulin, ドメイン構造, α ヘリックス, β シート, ターン, 糖鎖, ペプチド結合モチーフ, ジスルフィド結合, ペプチド結合クレフト内因性ペプチド, 外来(外因性)ペプチド	分子の種類(非古典的HLAクラスI分子, 非古典的HLAクラスII分子), エクソン構造との対応, アイソフォーム, クラスI様分子(MIC, HFE, CD1など)の種類と構造, ペプチド提示, β 2ミクロglobulin	
	HLA分子の発現	セントラルドグマ, 転写, 翻訳, アミノ酸, タンパク質, 細胞小器官, 発現細胞(古典的クラスI分子, 非古典的クラスI分子, 古典的クラスII分子, 非古典的クラスII分子), 抗原提示細胞	プロテアソーム, TAPトランスポーター, エンドサイトーシス, エクソサイトーシス, 内因性ペプチド, 外来(外因性)ペプチド, インバリエント鎖, DM分子, DO分子, プロモーター, エンハンサー, 転写因子, スプライスバリエント, エピジェネティクス, マイクロRNA, クラスI様分子(MIC, CD1など)の発現細胞, ウイルス感染細胞, がん細胞, 体細胞変異, LOH	
	HLAの機能	自己と非自己, 抗原提示, 古典的クラスI分子, 古典的クラスII分子, TCR, CD8陽性T細胞, CD4陽性T細胞, 内因性抗原ペプチド, 外来(外因性)ペプチド	非古典的クラスI分子, 非古典的クラスII分子, 細胞障害活性, ミッシングリガンドモデル, NK細胞, KIR, LILR, NKG2/CD94, HLAクラスI様分子(MIC, CD1など)の機能, HLA関連遺伝子(TAP, PSMB, C2, C4, TNFなど)の機能	
	HLA分子の抗原特異性とHLA遺伝子の多型性	第1~4区域, 接尾辞(N, L, S, Q, C, A), エピトープ, プロト抗原, スプリット抗原, アンシエート抗原, 抗原特異性, Bw4, Bw6, 共通エピトープ, 表記法, 突然変異, アレル, nullアレル, ハプロタイプ, 連鎖不平衡, 遺伝様式, 共優性, 疾患関連性, 遺伝子多型の特徴(古典的クラスI遺伝子, 非古典的クラスI遺伝子, 古典的クラスII遺伝子, 非古典的クラスII遺伝子)	抗原頻度, アレル頻度, コモンハプロタイプ頻度, 民族差, 集団差, 情報検索(JSHI, IPD-IMGT/HLA, Nomenclature, 造血幹細胞移植情報サービスなど), 新規アレルの登録法, NMNDP表記, G group, P group, CWD, 分子進化, 系統発生, 遺伝的多様性, 連鎖不平衡の成立要因, ハプロタイプブロック	
免疫系と免疫応答の概要	自然免疫, 獲得免疫(適応免疫), 細胞性免疫, 液性免疫, マクロファージ, 好中球, リンパ球, T細胞, B細胞, 樹状細胞, NK細胞, 炎症, 抗原, 抗体, 免疫グロブリン, 抗体産生細胞, 抗原抗体反応, 免疫寛容, 免疫記憶, アレルギー, 自己免疫疾患, 免疫不全, ワクチン	補体系, 異物認識, TLR, 食作用, NK細胞, 抗原提示, Th1/Th2, 細胞傷害, Ig遺伝子の再構成, α β T細胞の分化, 胸腺細胞の分化, T細胞レパトワ, MHC拘束性, 免疫寛容, アロ反応性, マイナー組織適合抗原, 免疫グロブリンスーパーファミリー		
HLAの臨床応用	移植医療, 輸血医療, 拒絶反応, GVHD, ドナー, レシビエント, 移植片, 生着	各移植の概要(臓器移植, 造血幹細胞移植, 組織移植, 細胞移植, 輸血), 移植成績, 臓器移植ネットワーク, 日本骨髓バンク, さい帯血バンク, ハプロ移植, 免疫抑制	感染免疫, ワクチン, 自己免疫疾患, 腫瘍免疫, 法医学, 生殖免疫, HLA関連疾患, 非免疫関連疾患, 薬剤副作用, 診断補助	
最先端医療や技術とHLA			ペプチド療法, 免疫療法, オーダーメイド医療, プレシジョンメディシン, がんゲノム医療, 再生医療, 遺伝子治療, 遺伝子診断, 標的治療, ゲノム創薬, 異種移植, 移植モデル動物, 疾患モデル動物, ゲノム編集技術, バイオデータベース, バイオマーカー, HLA imputation	
HLA検査に関する知識	HLA抗原検査	検査法の原理(LCT(CDC)法, MLR(MLC)法, PLT法, リンパ球分離法), 抗HLA抗体, 補体, エオジン染色, 蛍光二重染色	抗原型判定と結果解釈(LCT(CDC)法, MLR(MLC)法, PLT法, リンパ球分離法), SD抗原, LD抗原	マニュアル整備, 遺伝子検査ガイドライン, 検体品質管理マニュアル, 機器管理, 検査精度管理, 精度管理物質, データ管理, セキュリティー, トラブルシューティング, リスクマネジメント, 施設認証・認定, 検査環境, 臨床検査学, 情報共有, コミュニケーション, 業績評価, キャリア支援, 科学リテラシー, 科学教育, 知的財産法, 著作権法, プロジェクトマネジメント, 労働安全, 研究費獲得, 社会への還元(論文報告, 学会報告, 公開セミナーなど)
	HLA遺伝子検査(DNAタイピング)	検査法の原理(DNA抽出法, PCR法, 電気泳動法, シーケンス法, PCR-SBT法, PCR-SSO(PCR-SSOP)法, PCR-SSP法, NGS-SBT法), 使用機器(分光光度計, PCR装置), 検査試薬(プライマー, プロブ, 蛍光ビーズ), 検査の手技(スナッピング, フリッキング), 検出機器(シーケンサー, ルミネックス装置, NGS), 検査の結果(反応パターン, ambiguity)	アレル判定とカットオフ値(PCR-SBT法, PCR-SSO(PCR-SSOP)法, PCR-SSP法, NGS-SBT法), 結果解釈(ambiguity, 同義置換, 非同義置換)	
	抗HLA抗体検査	検査法の原理(LCT(CDC)法, AHG-LCT法, PRA法, 蛍光ビーズ法, ICFA法), 検査の意義(スクリーニング検査, 抗体特異性検査), 検査結果の意味(DSA, NDSA, 抗体特異性, エピトープ, 交差反応, CREG), 検査の手技(スナッピング, フリッキング), 検査機器(フローサイトメトリー, ルミネックス装置)	判定基準とカットオフ値(LCT(CDC)法, AHG-LCT法, PRA法, 蛍光ビーズ法, ICFA法, nMFI, Ratio解析, 反応スコア), 結果の解釈(エピトープ解析法, 補体結合性, 自然抗体, プロゾーン様現象)	
	クロスマッチ検査	検査法の原理(ダイレクトクロスマッチ(FCXM, CDC-XM, ICFA), 仮想クロスマッチ)	判定基準と結果解釈(ダイレクトクロスマッチ(FCXM, CDC-XM, ICFA), 仮想クロスマッチ)	
	HLA検査の臨床応用	移植医療, 輸血医療への応用(組織適合性検査, クロスマッチ検査, 移植後モニタリング検査)	移植・輸血臨床での検査結果報告(組織適合性検査, クロスマッチ検査, 移植後モニタリング検査)	疾患関連解析, バイオインフォマティクス, 疫学, 統計的推測, 多変量解析, 構造生物学, 集団遺伝学

第 20 回日本組織適合性学会・近畿地方会のご案内

会 期：2022 年 3 月（土曜日）（予定）

会 場：大阪府赤十字血液センター 7 階会議室
（大阪市城東区森之宮 2 丁目 4 番 43 号）

世話人：諫田淳也先生（京都大学医学部附属病院 血液内科）

会 費：正会員 2,000 円 学生 1,000 円

共 催：財団法人 大阪腎臓バンク

本会参加は、JSHI 認定技術者・指導者の新規および更新時の単位となります。

令和元年度認定 HLA 検査技術者認定制度試験問題に関する報告の訂正

MHC26(3): 181-188, 2019 に掲載された「令和元年度 認定 HLA 検査技術者認定制度試験問題に関する報告」において、問題 33 の【解説】に誤記がありましたので、以下のとおり、訂正いたします。

木村彰方（日本組織適合性学会組織適合性技術者認定制度委員会試験問題検討部会）

問題 33. HLA と自己免疫疾患との関連に関して正しい記述の組合せを a～e のうちから一つ選べ。

1. 強直性脊椎炎と HLA-B*27 との関連には民族差がある。
2. ナルコレプシーと DRB1*15:01 との強い関連は東アジア民族に特有である。
3. European descendants（ヨーロッパ系民族）では、I 型糖尿病と DRB1*03:01 とが関連する。
4. ベーチェット病と B*51:01 の関連はシルクロード沿いの民族に多く観察される。
5. ヨーロッパ系民族では、関節リウマチと DRB1*04:05 とに最も強い関連が観察される。

a 1,2 b 1,3 c 2,3 d 3,4 e 4,5

正解：d

正解率：14.3%（代表的な誤答：a, b, c, e）

【解説】強直性脊椎炎は、どの民族であっても HLA-B*27 と関連する。ナルコレプシーは、どの民族であっても *DQB1*06:02*~~*DQB1*06:01*~~ との関連を示すが、ヨーロッパ系民族やアジア民族では *DQB1*06:02*~~*DQB1*06:01*~~ が DRB1*15:01 と連鎖不平衡にある。このため、これらの民族では、この連鎖不平衡の反映としてナルコレプシーと DRB1*15:01 が関連を示す。なお、アフリカ系民族において *DQB1*06:02*~~*DQB1*06:01*~~ と連鎖不平衡にある DRB1 アレルは DRB1*15:03 である。ヨーロッパ系民族には DRB1*04:05 はほとんど存在せず、関節リウマチと関連する DR4 アレルは DRB1*04:01 である。

2021 年度認定 HLA 検査技術者講習会テキスト

基礎知識：認定制度試験問題—解説とポイント整理—

成瀬 妙子¹⁾

¹⁾長崎大学熱帯医学研究所

1. はじめに

日本組織適合性学会では、組織適合性検査の技術標準、知識の向上を目的とした認定制度を設けており、本年度で発足 20 年を迎える。技術者認定においては毎年の大会時に筆記試験と、指導者にはさらに面接試験を実施している。近年組織適合性検査および知識の重要性はさらに増しており、最近の認定試験受験者数の増加がそのニーズを示している。

本教育講演は、組織適合性技術講習会として受験者に必須の受講項目となっており、2017 年からは本教育講演にて筆記試験施行時に行われる模擬試験での難問（模擬試験における正答率が概ね 40% 未満）解説が行われてきたところであるが、昨年度は大会延期に伴い、講演も今年度に延期、模擬試験は中止されて本試験のみ実施となった。そこで今回は昨年（2020 年度）に予定していた 2019 年度模擬試験を基にした難問解説に加えて、2020 年度に実施された本試験での問題についても若干の解説を行いたい。

2. 2019 年度模擬試験 難問解説

模擬試験正答率が 40% 未満の問題は 19 問で、うち 3 問（問題 33、問題 38 および問題 50）は正答率 20% 未満であった。難問の内訳について考察すると、基礎知識に関する問題での正答率が低い傾向にあった。これは経験が比較的浅い会員に受験希望があるようにも読み取れる。そこで、本講演では今後の一助となるよう、技術者受験に必須である基礎知識に関する問題に絞って、ポイントと共に解説する。その他の難問については既報¹⁾を

参照頂きたい。

問題 16. HLA-DRB 遺伝子ハプロタイプに関して誤っている記述の組合せを a～e のうちから一つ選べ。

1. DR1, DR8, DR10 ハプロタイプにパブリック抗原をコードする DRB 遺伝子はない。
2. DR2 ハプロタイプにおいて発現している DRB 遺伝子は 2 個である。
3. DR3, DR5, DR6 ハプロタイプのパブリック抗原は DR53 である。
4. DR4, DR7, DR9 ハプロタイプにおいて発現している DRB 遺伝子は 3 個である。
5. すべてのハプロタイプにおいて、DR α 鎖をコードする遺伝子は 1 個である。

a 1, 2 b 1, 5 c 2, 3 d 3, 4 e 4, 5

正解：d

正解率：27.4%（代表的な誤答：b）

【解説】HLA-DR β 鎖遺伝子ハプロタイプに関する問題である。それぞれの項目について、図 1 を用いて確認してみると、DR3, DR5, DR6 ハプロタイプのパブリック抗原は DR52 であるので 3 は間違っている。また、DR4, DR7, DR9 ハプロタイプにおける発現 DRB 遺伝子は、DRB1 と DRB4 の 2 個であるので、4 も間違いである。その他の選択肢は正しい。

本問題のポイントは、各 DRB 遺伝子と抗原特異性との対応がついているか？また、ハプロタイプ、パブリック抗原等の用語が理解できているか？という点である。例えば、DRB1*15:01 アレルが DR2 ハプロタイプグルー

受付日：2021 年 7 月 15 日，受理日：2021 年 7 月 15 日

代表者連絡先：成瀬 妙子 〒 852-8523 長崎市坂本 1-12-4 長崎大学熱帯医学研究所 原虫学分野
TEL: 095-819-7838 FAX: 095-819-7805 E-mail: t-naruse@nagasaki-u.ac.jp

ブに分類される (DR15 や DR16 は DR2 から分岐した抗原特異性で, DR15 や DR16 のことをスプリット抗原, DR2 をブロード抗原, またはオリジナル抗原と呼ぶ) ことを理解していなければ解答することは難しい。

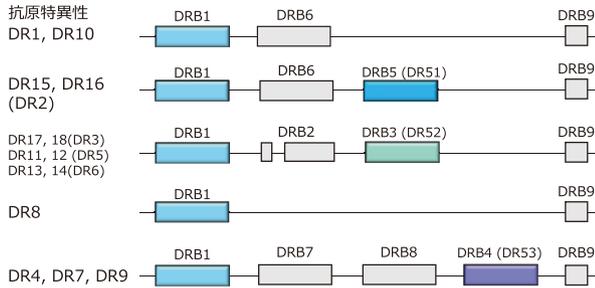


図1 HLA-DRB 遺伝子のハプロタイプ構成 (Kotsch K et al. J Immunol 165: 5664-5670, 2000. より改変)

グレーは偽遺伝子である。カッコ内はそれぞれのブロード (オリジナル) 抗原特異性を示す。

問題 25. 胸腺皮質における T 細胞の分化と選択の過程で T 細胞に生じる現象として最も適切なものを a ~ e のうちから一つ選べ。

- a. 免疫グロブリン遺伝子の再編成
- b. 抗原のプロセッシング
- c. TCR の体細胞変異
- d. MHC 拘束性の獲得
- e. T 細胞レパートリーのネガティブセレクション

正解：d

正解率：22.4% (代表的な誤答：e)

【解説】胸腺は T 細胞の分化・成熟に不可欠であり, なかでも重要とされるのが, 胸腺皮質における自己 MHC 拘束性を獲得する正の選択 (ポジティブセレクション) である。代表的な誤答である e. の, T 細胞レパートリーのネガティブセレクションは, 胸腺髄質で自己反応性 T 細胞がアポトーシスを起こす現象である。また, 免疫グロブリン遺伝子の再編成 (B 細胞) や抗原のプロセッシング (抗原提示細胞) は T 細胞では起こらない。さらに, 遺伝子の再編成の過程で B 細胞レセプター (BCR: 膜結合型免疫グロブリン) では体細胞変異が生じるが,

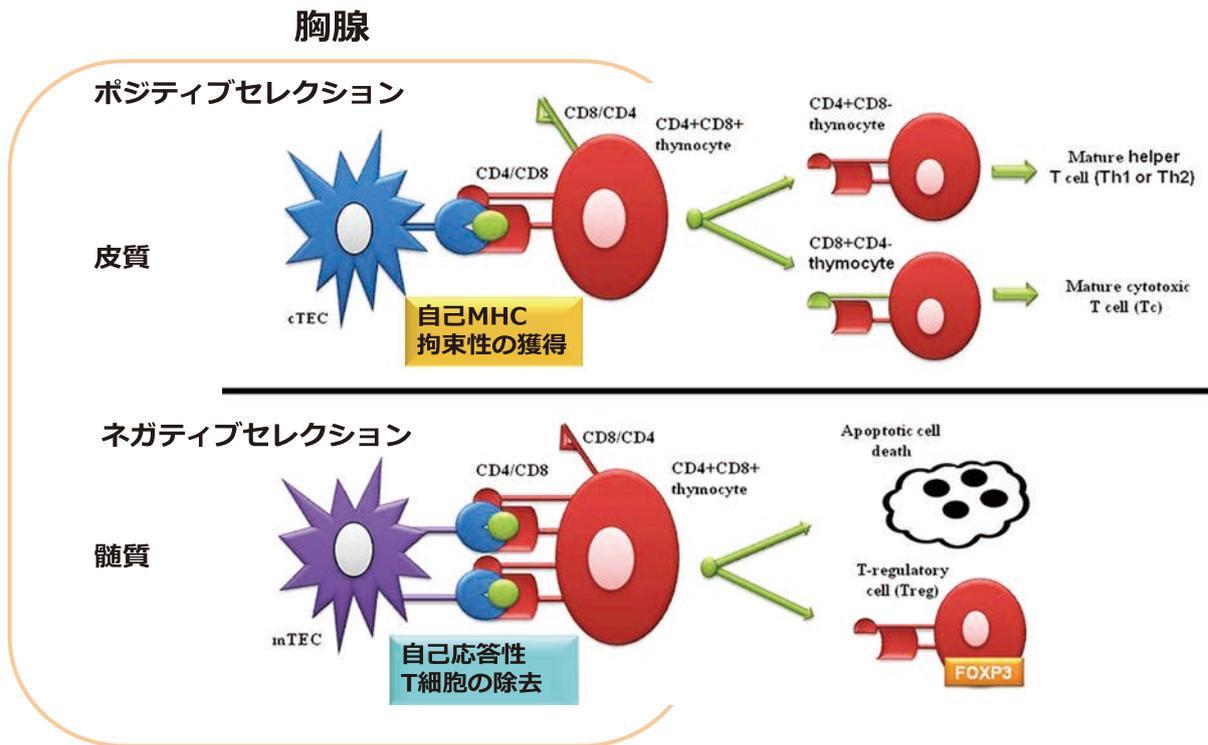


図2 胸腺皮質上皮細胞 (cortical thymic epithelial cells; cTEC) におけるポジティブセレクション (上段) と胸腺髄質上皮細胞 (medullary thymic epithelial cells; mTEC) におけるネガティブセレクション (下段)。Martino LD, et al. Frontiers in Immunol 4: 331, 2013 より改変

表1 HLA との関連を示す代表的な自己免疫疾患の日本人の頻度（文献3より抜粋・改変）

疾患名	関連を示す HLA 型または HLA アレル #	患者集団中の頻度 (%)	一般集団中の頻度 (%)	オッズ比
強直性脊椎炎	<i>HLA-B*27</i>	83.3	0.5	1056.3
ナルコレプシー	<i>HLA-DRB1*15:01</i>	100	12.4	1372.7
	<i>HLA-DQB1*06:02</i>	100	12.4	1372.7
I型糖尿病	<i>HLA-B*54:01</i>	44.1	14.0	4.8
	<i>HLA-B61 (HLA-B*40:02, HLA-B*40:03, HLA-B*40:06)</i>	39.6	22.7	2.2
	<i>HLA-DRB1*04:05</i>	56.6	24.7	4.0
	<i>HLA-DQB1*04:01</i>	58.3	24.7	4.3
	<i>HLA-DRB1*09:01</i>	36.0	29.5	1.3
ベーチェット病	<i>HLA-B*51:01</i>	59.4	13.6	9.3
関節リウマチ	<i>HLA-DRB1*04:05</i>	58.8	24.7	4.4
	<i>HLA-DQB1*04:01</i>	58.8	24.7	4.4

#: 遺伝子レベルでの関連が明らかな場合はアレル名を示した。

TCR では体細胞変異は生じない。

なお、本過程に関連する免疫の仕組みについては、今大会の副大会長の京都大学ウイルス・再生医科学研究所再生免疫学分野 河本 宏 先生の研究室ホームページ (URL 参照)²⁾にて、一般の方に向けた記事として、分かり易いイラストと共に楽しく解説を学ぶことができる。特に初心者は参照されたい。

問題 33. HLA と自己免疫疾患との関連に関して正しい記述の組合せを a ~ e のうちから一つ選べ。

1. 強直性脊椎炎と *HLA-B*27* との関連には民族差がある。
 2. ナルコレプシーと *DRB1*15:01* との強い関連は東アジア民族に特有である。
 3. European descendants (ヨーロッパ系民族) では、I 型糖尿病と *DRB1*03:01* とが関連する。
 4. ベーチェット病と *B*51:01* の関連はシルクロード沿いの民族に多く観察される。
 5. ヨーロッパ系民族では、関節リウマチと *DRB1*04:05* とに最も強い関連が観察される。
- a 1, 2 b 1, 3 c 2, 3 d 3, 4 e 4, 5

正解: d

正解率: 14.3% (代表的な誤答: a, b, c, e)

【解説】疾患関連研究の問題。特定の HLA と自己免疫

疾患や慢性炎症性疾患との関連は、遺伝子検査法の開発以前、血清学的検査法が主流であった 1970 年代より世界中の研究者から報告されてきた。本設問に挙げられているのは、どれも HLA の疾患関連研究の歴史の中では頻出する自己免疫疾患である。ポイントは、どのような民族においても同一の HLA 型が関連を示す場合と、民族により異なる HLA 型と関連する場合があることで、両者においてはその意義や要因が異なることを理解しておくことが望まれる。1. にある強直性脊椎炎は、世界的にどの民族であっても *HLA-B*27* と関連することがよく知られている。2. のナルコレプシーもどの民族であっても *DQB1*06:02* との関連を示すが、ヨーロッパ系民族やアジア民族では *DRB1*15:01* にも関連を示す。これは、ヨーロッパ系やアジア民族の *DQB1*06:02* が *DRB1*15:01* とほぼ完全な連鎖不平衡にあるためである。5. のヨーロッパ系民族では *DRB1*04:05* はほとんど存在せず、関節リウマチと関連する DR4 アレルは *DRB1*04:01* である。さらに予備知識として、3. に述べられている I 型糖尿病は、表 1 に示すように、日本人では *DRB1*04:05*, *DRB1*09:01* との関連がよく知られており、日本人に見いだされる疾患関連アレルが必ずしもすべての民族で共通しているわけではないことを示す例である。

3. 2020 年度認定制度試験 解説

2020 年度については前述の通り本試験のみ実施した。

その中でも正答率が低かった以下の問題について解説する。

問題 9. 連鎖不平衡に関して最も適切な記述を a～e のうちから一つ選べ。

- 物理的に極めて近距離にあるアレル間では、常に連鎖不平衡が成立する。
- 連鎖不平衡とは、異なる座位のアレル間でランダムな組合せの頻度が一定であることをいう。
- 異なる染色体上のアレル間でも連鎖不平衡が成立している。
- 連鎖不平衡の指標である D' や r^2 が小さいほど、連鎖不平衡はより強いと言える。
- 連鎖不平衡の成立は、アレルの出現時期と関係している。

正解：e (代表的な誤答：a)

【解説】：集団内の複数遺伝子座にあるアレルの組み合わせが特定のハプロタイプに偏っている状態を「連鎖不平衡」と呼ぶ。連鎖不平衡は HLA ハプロタイプの特徴の一つで例えば日本人集団では、 $A*24:02-B*52:01-C*12:02$ などがよく知られているが、HLA 以外の遺伝子領域においても同様に存在する。

正解の e. に示すように、連鎖不平衡の成立要因は、少人数から派生した集団、最近の移住や混血、最近生じた変異など、当該アレルの出現時期や集団の組成と関係している。したがって、a. で述べるような物理的に近距離に位置するアレル間においても、変異の発生時期が古い場合はもとより、遺伝子間に組み換えのホットスポットが存在する場合もあり、常に連鎖不平衡が成立するとは限らない。d. で連鎖不平衡指標として挙げられている D' は連鎖不平衡の偏りの強さを、また相関係数である r^2 はアレルの関連の強さを数値化して示しており、どちらも数値が小さいほど理論値（平衡状態）に近くなることを示す。

問題 48. ケース・コントロール解析に関して最も適切な記述の組合せを a～e のうちから一つ選べ。

- 疾患感受性の強さはオッズ比で示される。
- 統計学的有意差検定における補正では、調べたアレ

ル数を乗じる方法が一般的である。

- カイ二乗検定が最も信頼性が高い。
 - 統計学的有意水準を示す $p=0.05$ は 200 回の検定で 1 回の偽陽性が生じることを示す。
 - 統計学的有意差検定には一般的に t 検定が用いられる。
- a 1,2 b 1,3 c 2,3 d 3,4 e 4,5

正解：a (代表的な誤答：b)

【解説】昨年度にも出題したケース・コントロール解析(疾患・対照研究)問題の類似出題である。

1. のオッズ比 (odds ratio; OR) は、疾患感受性の強弱を示す尺度である (表 1 参照)。2. で統計学的有意差を示す値である p 値は、検定の回数が増加すると誤って優位と判断される確率が高くなることから、これを厳しく判断するために p 値に検定回数に乗じる補正が一般的に用いられている。HLA などの遺伝子解析の場合は、アレル数を検定回数とみなして乗じることが一般的である。3. のカイ二乗検定は有意性 (仮説) の検定に用いられるが、ケース・コントロール解析ではケースとコントロールの対象数が著しく異なる場合などには信頼性が低下する。4. は $1/200=0.005$ となるので間違い。

5. は、個々の検体から得られる数値データのグループ間比較を統計学的に有意差検定するには t 検定が用いられるが、HLA と疾患との関連を解析する場合には、観測値の対照群に対するズレを調べるために、カイ自乗検定もしくは Fisher の直接検定が用いられる。

2019 年度の問題 50 が本設問に相当する。2019 年度模擬試験での正答率は 11.8% と低調であったため再度 2020 年度試験に再出題したところ、正答率はやはり低調であった。ケース・コントロール解析を含め、統計関連の問題は例年正答率が芳しくないのが現状である。HLA 分野において統計は必須の知識であるので、統計解析に関する知識を今一度確認されたい。

4. 受験に向けてのポイント

毎年、筆記試験は広範囲から出題されるが、ポイントはやはり組織適合性に関する基礎知識の理解である。また、専門性のある試験であるから、当然ながら専門用語を理解済であることが前提となる。専門用語に関してよ

表2 国際組織適合性ワークショップの歴史 (http://hla.alleles.org/nomenclature/workshops.html より改変)

回数	開催年	大会長	開催国	主な概要
第1回	1964	DB Amos	アメリカ	“Hu-1”, “LA”, “Four” の3つの特異性を同定
第2回	1965	JJ van Rood	オランダ	混合リンパ球培養試験 (Mixed lymphocyte culture testing) による (後のクラスII 抗原) 反応性
第3回	1967	R Ceppellini	イタリア	ファミリースタディー、HLAと腎移植の関係
第4回	1970	PI Terasaki	アメリカ	HLA-A抗原の特異性27種の同定、HLA-B、-C 座の同定
第5回	1972	J Dausset	フランス	世界 49 民族集団のHLAハプロタイプ観察
第6回	1975	F Kissmeyer-Nielsen	デンマーク	Dw 特異性
第7回	1977	WF Bodmer	イギリス	DR1-7 の特異性同定、HTC (Homozygous Typing cells;HLA ホモ接合体細胞) の収集とタイピング
第8回	1980	PI Terasaki	アメリカ	MB (DQ) 座、MT (DR52/53)座の同定、HLA と移植、HLAと疾患感受性
第9回	1984	EA Albert/W Mayr	ドイツ/オーストリア	HLAクラスI およびクラスII 特異性、HLA クラスIIと腎移植成績
第10回	1987	B Dupont	アメリカ	RFLP (restriction fragment length polymorphism, T 細胞クローン、HTCパネル細胞収集
第11回	1991	T Sasazuki/K Tsuji/M Aizawa	日本	HLA クラスIIの DNA typing、人類遺伝学
第12回	1996	D Charron	フランス	HLA クラスIの DNA typing、人類遺伝学
第13回	2002	J Hansen	カナダ/アメリカ	SNP (single nucleotide polymorphism;1塩基多型) 解析、人類遺伝学、疾患関連解析、造血幹細胞移植
第14回	2005	J McCluskey	オーストラリア	MHCと人類遺伝学/疾患/感染/造血幹細胞移植/がん/サイトカイン遺伝子群
第15回	2008	M Gerbase de Lima/ME Moraes	ブラジル	人類遺伝学、造血幹細胞移植、インフォマティクス
第16回	2012	SGE Marsh/D Middleton	イギリス	NGS(next generation sequence;次世代シーケンス)、造血幹細胞移植
第17回	2017	M Fernandez-Viña	アメリカ	NGS(next generation sequence;次世代シーケンス)、造血幹細胞移植

く学習して正しい理解をしておく事は言うまでもない。HLA における難解な用語についてどのように学習して試験に備えるべきか、しばしば相談を受けるが、その際には、併せて組織適合性研究の歴史についても触れてみる事を強く薦めている。特に HLA の各名称については、研究初期の頃から現在までの道のりを学ぶ事で、抗原特異性や各遺伝子座、アレルの命名がどの様になされて来たかを知ることが可能である。抗原特異性や遺伝子型を示すアルファベット記号、数字等が、時にイレギュラーとも思える順序で記載されている事に疑問を覚えた方も少なくはないと思うが、研究の成り立ちや時系列的変遷を知ることで理解の一助となるであろう。その様な意味で、ここでは過去に開催されてきた国際組織適合性ワークショップについての一覧表を示すので、各回の主な概要を参照頂きたい (表2)。

また、本学会誌に掲載されている既報の総説「HLA の基礎知識」1～3⁴⁾⁶⁾ は、認定組織適合性認定技術者や検査実務者レベルでは必須の基礎知識をわかり易く解説しているのも、こちらも是非活用頂きたい。

参考文献

- 1) 木村彰方, 一戸辰夫, 大橋 順, 椎名 隆, 土屋尚之, 成瀬妙子, 中島文明, 西村泰治, 湯沢賢治: 令和元年度 認定 HLA 検査技術者認定制度試験問題に関する報告. MHC 26: 181-188, 2019.
- 2) http://kawamoto.frontier.kyoto-u.ac.jp/public/public_009.html
- 3) 木村彰方: HLA と疾患、移植・輸血検査学 (猪子英俊, 笹月健彦, 十時孟夫 監修, 大谷文雄, 木村彰方, 小林賢, 鈴木洋司, 徳永勝士 編), 講談社, p.163-181, 2004.
- 4) 小川公明: HLA の基礎知識 1. MHC 23: 115-122, 2016.
- 5) 小川公明: HLA の基礎知識 2. MHC 23: 185-192, 2016.
- 6) 小川公明: HLA の基礎知識 3. MHC 24: 38-45, 2017.

Comments in the JSHI certification paper test 2019 and 2020

Taeko K Naruse¹⁾

¹⁾Dept. of Protozoology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University

The HLA Technologist and Director Certification System for Histocompatibility Testing of the Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics (JSHI) offers various programs and training opportunities for the members to be certified as the expert. Here we will make comment on difficult questions in the paper test to help your study.

©2021 日本組織適合性学会

HLA DNA タイピング検査技術

東 史啓¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社 血液事業本部

HLA (Human Leukocyte Antigen = ヒト白血球抗原) はその豊富な多型性からヒトゲノム多様性の研究対象となるだけでなく、自己非自己認識の根幹としての機能から、免疫学的研究でも重要な位置を占める。さらにドナーと患者の適合性は移植や一部の血小板輸血において大きな影響を与えるため、適合度を評価するための HLA タイピングは臨床上も重要な技術である。かつてタイピングは血清学的手法で行われてきたが、分子生物学的理解が進んだ現在は HLA 遺伝子の塩基配列から遺伝子型 (アレル) を決定する「DNA タイピング」が主流となっている。現在までに多くの DNA タイピング法が開発、試薬キット化されて身近な技術となったが、非発現変異による血清学との乖離や、アレルを確定できない ambiguity の存在といった課題は完全には解消されていない。一方、HLA タイピングは移植や輸血だけでなく、免疫療法分野でのワクチン選択や薬剤副作用の予防といった目的でも用いられていることから、今後さらに重要性が増す技術であり、更なる発展が期待される。

キーワード: HLA 遺伝子, アレル, DNA タイピング

1. はじめに

HLA はヒトにおける MHC (主要組織適合性遺伝子複合体) およびその遺伝子産物分子であり、各種ペプチド抗原を提示する機能を持ち、免疫反応における自己・非自己の認識に重要な役割を果たしている。

HLA は 1960 年代にはその性質が理解され始めた。多型の蓄積が免疫多様性に繋がることから進化的にも多型に富んだ遺伝子であり、個々人で違いがあることからその発現分子は同種 (アロ) 抗原性を示す。また移植および一部の輸血時の適合性に影響を及ぼすことが明らかになっていたため、半世紀前には個人の HLA 型を決定 (タイピング) することが試みられていた。当初は経産婦から得られた反応性既知の抗血清と、被験者リンパ球との反応からタイピングを行っていたが、分子生物学的な知見ならびに技術発展により HLA 遺伝子配列から決定す

る「DNA タイピング」が可能となり、現在の主流となっている。

2. HLA 遺伝子と HLA 分子

HLA はヒトで最も多型に富む機能遺伝子の 1 つであり、うち最も多くの多型が確認されている HLA-B では、血清学的に区別可能な抗原型は 50 種類以上、アレルでは約 8,000 種類のタイプが確認されている (2021 年 4 月時点)。さらに HLA は進化の過程での遺伝子重複の結果から生じたと考えられる複数の遺伝子 (HLA-A, HLA-B, HLA-C など。それぞれ HLA 座 = locus と呼ばれる) がコードされており、またそれぞれの HLA 座について父母由来の一対ずつをもつため、個人が持つそれらの組み合わせの可能性は膨大なものになる。HLA 遺伝子は第 6 染色体の短腕上 (6p21.3) に位置し、関連する遺伝子群を含む領域は約 4 Mbp に及ぶ。ヒトゲノム

受付日: 2021 年 7 月 15 日, 受理日: 2021 年 7 月 15 日

代表者連絡先: 東 史啓 〒105-0011 東京都港区芝公園 1-2-1 日本赤十字社 血液事業本部 別館 PMO7 階
TEL: 03-3433-5317 E-mail: f-azuma@jrc.or.jp

中においても、最大級の遺伝子密度と多型性を示す領域である (図1)^{1,2)}。

HLA分子は構造と機能から ClassI と ClassII に分類され、前者は細胞内因性のペプチドを提示してT細胞による細胞性免疫を調節し、後者は細胞外因性のペプチドを提示してB細胞による液性免疫を調節する機能をもつ。ClassI分子のうち「古典的ClassI分子」と呼ばれるHLA-A, HLA-B, HLA-Cは、発現量の差は認められるもののほぼ全ての有核細胞と血小板上に発現している。一方で、ClassII分子のうち「古典的ClassII分子」と呼

ばれるHLA-DP, HLA-DQ, HLA-DRは樹状細胞やB細胞等、一部の免疫細胞に発現している。

HLA-A, HLA-B, HLA-Cの古典的ClassI分子は、各HLA遺伝子によってコードされた膜貫通型タンパクであるα鎖と、β2ミクログロブリンが会合して形成される(図2-a)。内在性ペプチド抗原の提示を行うα1およびα2ドメイン、細胞傷害性T細胞(CTL)のCD8と結合するα3ドメインの3つの細胞外ドメインがある。α1およびα2ドメインで形成される溝には9アミノ酸前後の内在性ペプチドが結合し、T細胞レセプター(TCR)

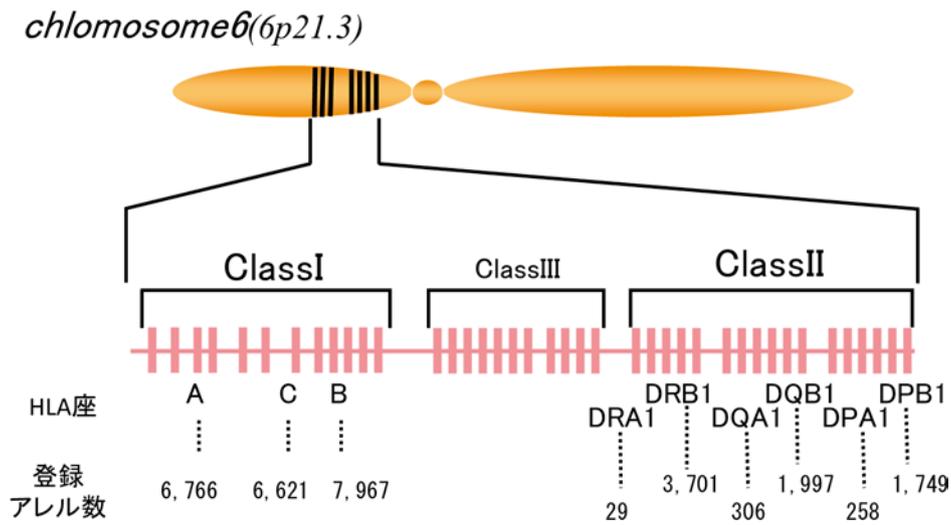
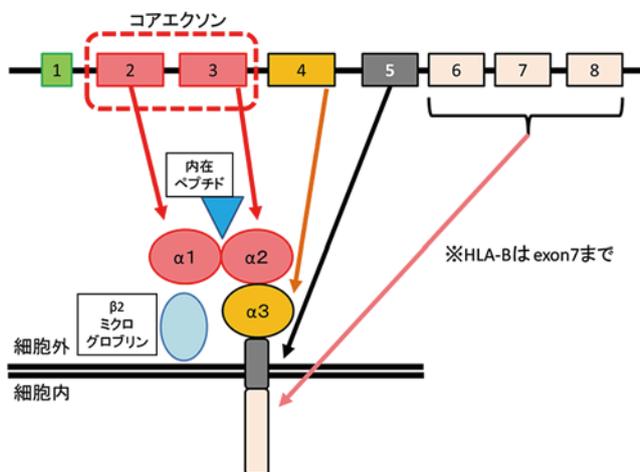


図1 HLA 遺伝子領域の遺伝子地図と登録アレル数 (2021年4月時点)

a. ClassI HLA 遺伝子とその産物分子



b. ClassII HLA 遺伝子とその産物分子

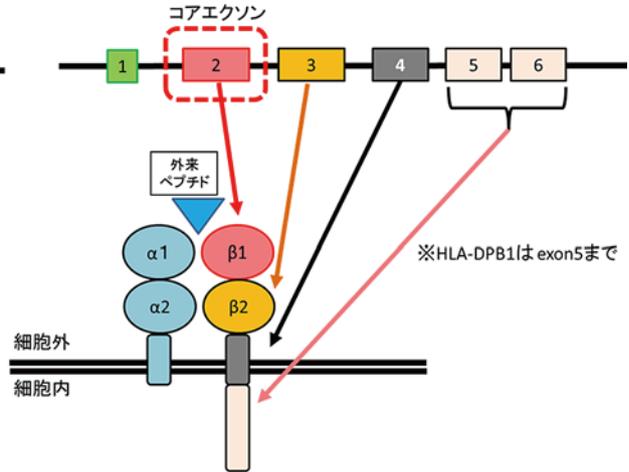


図2 HLA 遺伝子と HLA 分子の模式図

上段が HLA 遺伝子、下段が HLA 分子を示す。HLA 遺伝子上の箱はエクソンを、黒線はイントロンを示す。ClassI および ClassII のエクソン 1 は 5' -UTR およびシグナルペプチド、HLA-B のエクソン 8 と HLA-DPB1 のエクソン 6 は 3' -UTR であり、HLA 分子を構成しない。ClassII の A 遺伝子は図から省略している。

へ提示される。この $\alpha 1$ および $\alpha 2$ ドメインは HLA ClassI 遺伝子の中でも特に配列多型に富むエクソン 2 とエクソン 3 にコードされており、実際にアロ抗原性を示すエпитープが多数存在し、HLA 抗原型を規定している。ClassI の DNA タイピングでは主にこの 2 つのエクソンをコアエクソンと呼びタイピング必須領域としており、これに次いで多型のあるエクソン 4 を含めてタイピングする試薬もある。

HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR の古典的 ClassII 分子は、各 HLA の A 遺伝子から産生される α 鎖と、B 遺伝子から産生される β 鎖が会合して形成される膜貫通型タンパクである (図 2-b)。染色体上では各 ClassII 遺伝子の A および B 遺伝子は隣接して存在し、HLA-DR ではそれぞれ DRA 遺伝子、DRB 遺伝子と呼ばれる。これらの産物の α 鎖、 β 鎖ともに 2 つの細胞外ドメイン (それぞれ $\alpha 1 \cdot \alpha 2$ および $\beta 1 \cdot \beta 2$ ドメイン) からなり、 $\alpha 1$ と $\beta 1$ ドメインは ClassI と同様にその間の溝にペプチド抗原を提示するが、ClassI よりも大きい 15 アミノ酸前後の外来性ペプチドを TCR へ提示する。また $\beta 2$ ドメインにはヘルパー T 細胞の CD4 の認識部位がある。HLA ClassII 遺伝子では B 遺伝子のエクソン 2 が特に多型に富んでおり、それにコードされる $\beta 1$ ドメインが ClassII 分子の HLA 抗原の決定に重要なエпитープを多く持つことから、エクソン 2 をコアエクソンとしてタイピング必須領域とし、次いで多型のあるエクソン 3 までタイピングする試薬もある。

3. HLA のアレル命名規則³⁻⁵⁾

新たに発見、報告された HLA アレルは WHO 命名委員会 (WHO Nomenclature Committee For Factors of the HLA System) によって命名され、その配列情報は、EMBL-EBI の IMGT/HLA データベースに管理されている。アレル名は基本的にそれがコードする HLA 分子の抗原型を基にして命名されており、コロン (:) によって区切られた 4 つの区域と、必要があれば 1 文字のアルファベットを使って表記される (図 3)。第 1 区域は、血清学的に分類が可能な抗原型で決定され、第 2 区域はアミノ酸置換を伴う塩基配列を、第 3 区域はアミノ酸の置換を伴わない同義置換のアレルを区別する番号に使用される。第 4 区域は非翻訳領域の塩基置換をもつアレルで使用され、第 2 区域以降については登録順に番号が与えられている。最後のアルファベットは、そのアレルがコードする HLA 分子が、塩基置換等により何らかの発現異常を起こしている場合に使用される。特に末尾に “N” が付加されているアレルは null、すなわち HLA 分子が細胞上に発現しておらず、抗原が無いものとして扱う必要性があり、移植や輸血臨床上でも特に重要である。日本組織適合性学会では、DNA タイピングにより決定されたアレルから推定される血清型を「HLA 型」と呼び、血清学的な検査手法で決定された「抗原型」と区別している。

②
—
HLA-A*02:101:01:02N
—
① ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦

- ① HLA 遺伝子名
- ② 遺伝子型(アレル)標記であることを示すアスタリスク
- ③ 第1区域: 血清学的に分類可能な抗原型(HLA型)を判別
- ④ 第2区域: 同一の第1区域グループ内で、アミノ酸変異を伴うアレルを判別
- ⑤ 第3区域: アミノ酸変異を伴わない同義置換塩基変異を持つアレルを判別
- ⑥ 第4区域: HLA分子をコードするエキソン以外での塩基変異を持つアレルを判別
- ⑦ アルファベット: 塩基変異により何らかの発現異常を生じている場合に付記(L,N,Q,S等)

<http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html> から改変

図 3 HLA アレルの表記法

WHO 命名委員会で規定された表記方法。各区域 (Field) の間はコロン (:) で区切る。第 2 区域以降は登録された順番に数字が付与される。タイピング法によって区別ができない領域がある場合は、それ以降の領域の記載を省略する。(例として、イントロン配列をタイピングしていない場合は HLA-A*02:101:01)

4. HLA の遺伝様式と人種間差

HLA 遺伝子群は同一染色体上に近接して存在しているため、ハプロタイプと呼ばれる連鎖不平衡を示す組み合わせが見られる。親から子への遺伝ではこのハプロタイプを1セットずつ両親から受け継ぐため、組み換えが生じなければ親子間では A/B/C/DRB1 の 8 アレル中、少なくとも半分の 4 アレルは一致し、兄弟間では 1/4 の確率で全ての HLA が一致することから、血縁者間でのタイピングでは重要な参考情報となる。また、HLA アレルやハプロタイプ頻度は人種間で大きく差があり、例えばヨーロッパ系白人で高頻度に見られるアレルがアジア人では稀となる、あるいはその逆の現象が良く見られる⁶⁾。これらの HLA 情報は人種の推定に役立ち、また逆に人種情報から複数の候補 HLA アレルから蓋然性が高いアレルを推定することが可能である。タイピング試薬によっては付属する判定ソフトウェアで人種情報を加味し、最も頻度の高いアレルの組み合わせを結果表示してくれるものもあるが、その中に含まれている確定できていない候補アレルの存在、すなわち ambiguity には注意が必要である。

5. HLA タイピング法の概要

1) 血清学的タイピング

反応特異性が既知の抗血清あるいはモノクローナル抗体を多数組み合わせ、その補体依存性細胞傷害の有無により被験者リンパ球の HLA 型を判定する LCT (Lymphocyte Cytotoxicity Test) 法が用いられてきた。しかし、経産婦からスクリーニングして得てきたタイピング用抗血清の枯渇や、アレルレベルでの HLA 適合により移植成績が向上する報告⁷⁾などから、後述する DNA タイピングへ移行し、現在ではタイピング法としてはほとんど実施されておらず、クロスマッチ技術として利用されている。

① LCT 法の原理

- 1, 特異性既知の HLA 抗血清に被験者のリンパ球を反応させた後、ウサギ補体を添加する。
- 2, 抗血清とリンパ球表面の HLA 抗原が反応した場合には、補体作用でリンパ球細胞膜に孔が開き死細胞となる。抗血清とリンパ球が反応しない場合、細胞は生存する。

3, エオジン等の染色液を加えると、死細胞では細胞膜に開いた穴により染色される。一方、生細胞は染色されないで、染色された死細胞の割合を顕微鏡で観察して抗血清との反応性を判定する。

判定結果は用いるリンパ球の生存率という技術面での要因で左右される上に、検査に使用する抗血清の反応強度、交差反応性、HLA 抗原間の交差反応グループ (Cross Reactivity Groups: CREG) 等を理解しておく必要があり、正確な結果を得る為には検査担当者の熟練と経験、知識が必要とされる。

2) DNA タイピング

被験者の HLA 遺伝子中の塩基配列の特異性を検出して、アレルを推定・決定する。HLA 遺伝子は近似した配列を持つ複数の遺伝子が存在する上に、同一遺伝子でも個人間の多型が非常に多いため、かつては他の遺伝子に比べてタイピングが困難であったが、近年の技術向上により正確かつ簡便にタイピングを行えるキットが各社から販売されている。基本的には PCR 法により目的とする HLA 領域の特異的な増幅を行った後、種々の方法で塩基配列を検出する。かつては制限酵素の配列認識切断活性を用いた「PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 法」、配列特異的二次構造を判定する「PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) 法」なども用いられていたが、現在では PCR での特異的増幅を利用した「PCR-SSP (Sequence-Specific Primer) 法」、配列特異性と相補的な検出プローブによるハイブリダイゼーション法を用いた「PCR-SSO (Sequence-Specific Oligonucleotide probes) 法」、シークエンサーにより配列決定を行う「PCR-SBT (Sequence-Based Typing) 法」および次世代シークエンサーを利用した「NGS-SBT (Next Generation Sequencer-SBT) 法」が単独、あるいは併用して用いられている。以下、これらの方法の原理について概説する。

① PCR-SSP 法の原理

- 1, HLA 遺伝子上の多型・変異部位を認識する特異的プライマーセットを用いて PCR を行う。
- 2, プライマーセットごとに増幅の有無を電気泳動により確認し、アレルを判定する。

解像度は用いるプライマーセット数によって低～中解像度まで対応する。試薬に被験者 DNA を加えて PCR を行い、電気泳動で増幅の有無を確認するという簡便な操

作で、特別な機器は不要かつ迅速性も高い検査法であるため、小規模な HLA 検査室や、迅速性が求められる臓器移植分野では使用率が高い。注意点として、他の PCR を利用したタイピング試薬以上に、判定正確性が primer の特異性や増幅効率に依存しているため、PCR 装置のブロック温度管理、メンテナンスが重要である。また多種多様な変異／多型の組み合わせで膨大な種類をもつ HLA タイピングにおいては、臨床的に必要な解像度を得るために、HLA 座ごとに 1 検体あたり数十ウェルの PCR 反応が必要となるため、必要とする被験 DNA の量が他の検査法に比べて多く必要となること、検体数や調べる HLA 座が増えると PCR 装置や泳動装置も多く必要となるため、多数検体処理には向かないといった点が挙げられる。

② PCR-SSO 法の原理

PCR-SSO 法は、被験者 DNA 由来の PCR 産物をメンブレン等の担体に固相し、検出用プローブを後から反応させる Forward 法と、それとは逆に検出用プローブを固相して後から被験者 DNA 由来の PCR 産物を反応させる Reverse 法がある。ここでは HLA タイピングで主流となっている、各種担体に固相されたプローブに、PCR 増幅した被験者 DNA を反応させるリバース SSO (rSSO) 法について述べる。

- 1, HLA 遺伝子をビオチン等で修飾した primer を用いて PCR で増幅させたのち、一本鎖に変性させる。
- 2, メンブレンやマイクロウェルプレートにあらかじめ固相しておいた、配列特異的プローブと PCR 産物を反応させる。(ハイブリダイゼーション)
- 3, プローブと結合しなかった、あるいは非特異的に結合した PCR 産物を洗浄操作により除去したのち、プライマーに修飾しておいたビオチン等をターゲットに、発色・蛍光などの検出用物質を結合させる。PCR 産物+配列特異的プローブ+検出用物質の複合体が形成された場合のみ、固相担体上で発色や蛍光が検出される。
- 4, 特異的プローブの反応パターンから、HLA アレルを判定する。

解像度は用いるプローブセット数によって低～中解像度まで変化する。PCR 産物に対して複数種のプローブを反応させることができ、用いる被験 DNA は少量で良いが、PCR 産物の変性、ハイブリダイゼーション、洗浄、

検出用物質の結合といった工程が多く、先述の PCR-SSP 法に比べ時間がかかる。また高い解像度を得るためにはプローブセットが多数必要となるため、PCR-SSP 法同様に処理能力の限界がある。過去には固相担体にマイクロウェルプレートやメンブレンストリップを用いたキットが用いられていたが、2000 年代に入りこうした課題を解決した発展型 rSSO 法である「PCR-Luminex 法」が開発、試薬キット化され、現在では HLA タイピングの主流となっている⁸⁾。

PCR-Luminex 法では、プローブの固相担体に直径 5.6 μm のマイクロビーズを用いる。このマイクロビーズは 2 種類のビーズ識別用蛍光物質を各 10 段階の濃度階調で混合・着色することで、10 × 10 の計 100 種類（上位機種では 500 種類を使用可能）に色分けされており（図 4）、1 本のチューブ内に混合しても検出装置による区別が可能である。そのため 100 種のビーズそれぞれに異なる配列をもつ特異的プローブを結合させ、さらに混合した上で同時に PCR 産物と反応させることができる。次いでこの反応物に検出用蛍光物質（Phycoerythrin）を結合させたのち、フローサイトメトリーの原理で全種類のビーズを同時に測定、解析する（図 5）。この方法により、100 種類を超えるプローブへの反応性を 1 本のチューブで検出でき、臨床レベルで概ね必要なタイピング解像度を 1 ウェルの反応で得られるうえ、96 穴プレートフォーマットの利用で多数検体の処理も可能となっている。複数メーカーから、反応に必要な試薬類と判定ソフトウェアがセットになったキットが販売されており、簡便な操作と 3 時間程度（96 検体でも 4 時間以内）の工程で、DNA 試料から中解像度の HLA タイピング結果が得られる。

③ PCR-SBT 法の原理

- 1, HLA 遺伝子を PCR により増幅したのち、精製して未反応プライマーや dNTP を除く。
- 2, 精製した PCR 産物を鋳型として、HLA 遺伝子のエクソンごとに設定したシークエンプライマーでサイクルシークエンス反応を行う。
- 3, 反応後、産物を精製したのち、シークエンサーにより配列を決定する。

ClassI 遺伝子についてはエクソン 2, 3, 4 が、ClassII 遺伝子についてはエクソン 2, 3 が多型に富むため、それらを解析するのが一般的である。原理的には、シーク

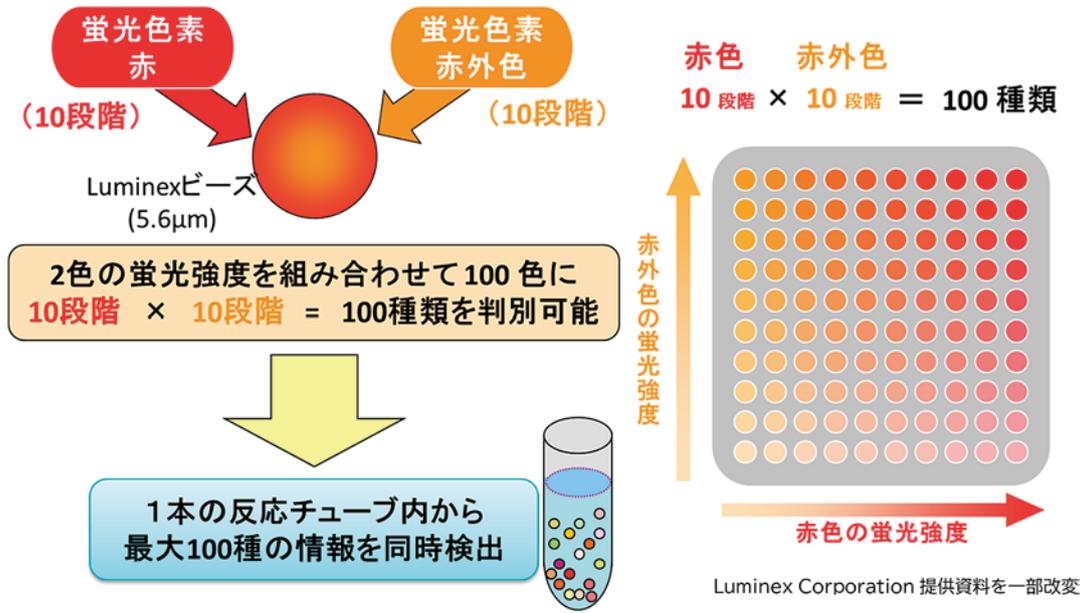


図4 Luminex ビーズのマルチプレックスシステム

直径 5.6 µm のマイクロビーズを、10 段階に濃度調整した 2 色の蛍光物質を組み合わせると、10 × 10 の合計 100 種類の異なる色調で着色することにより、個々のビーズの種類を判別可能としている。

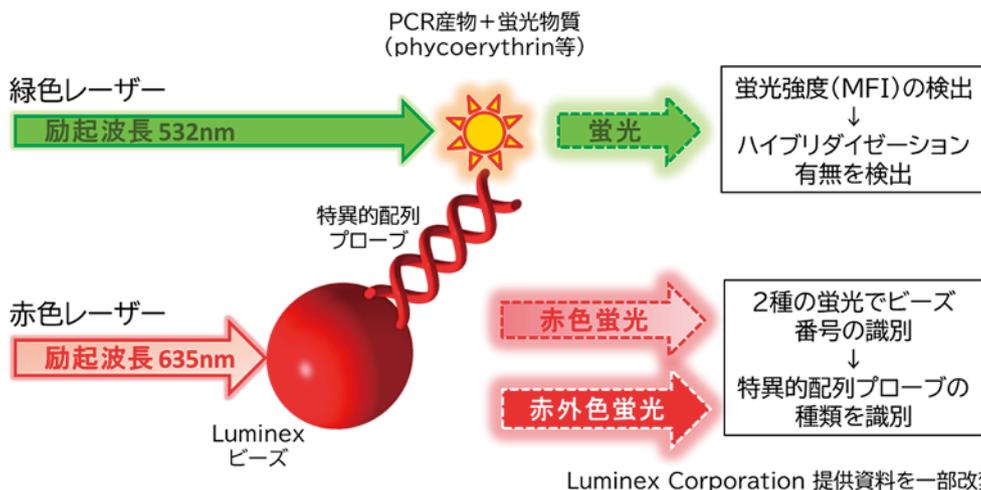


図5 Luminex による遺伝子多型の測定原理

100 種類のビーズにそれぞれ異なる特異的配列をもつプローブを結合させておく。次に PCR 産物をプローブとハイブリダイゼーションさせる。PCR 産物に蛍光ラベルしてビーズ+プローブ+PCR 産物+蛍光物質の複合体を形成させたのち、Luminex 装置により検出 (2 種類のレーザーによる励起と蛍光の検出) を行うと、複合体が形成されたビーズの番号と、その結合量が蛍光強度 (MFI) として検出される。特異的配列プローブと PCR 産物の配列が異なる場合はハイブリダイゼーションが起こらないため、結果的に複合体が形成されず蛍光強度は低くなる。

エンプライマーを設定した領域に含まれる全ての塩基配列を決定できるため、高い HLA アレル解像度が得られる。一方で、他法に比べて試薬および装置が高価なため検査コストが高くなること、ソフトウェアのサポートがあるとはいえシーケンズ波形の目視確認ポイントが多くなると判定に時間がかかることから、迅速性では

SSP 法が、多数検体処理能力では SSO 法が優れる。

④ NGS-SBT 法の原理

前述の「PCR-SBT 法」は第一世代と呼ばれるサンガー法シーケンサーを用いるが、第二世代以降の次世代シーケンサーを用いたタイピングを「NGS-SBT 法」と呼んでいる。シーケンサーによって配列検出原理は

異なるが、大まかに以下の流れとなる。

- 1, 解析対象となる HLA 遺伝子の PCR やゲノムキャプチャ等による濃縮。
- 2, 解析対象 DNA の断片化によるサイズ調整, 末端へのアダプタ結合などのライブラリー調製。
- 3, 次世代シーケンサーによるシーケンス。合成鎖の伸長反応での dNTP の取り込みや, ナノポア分子孔を DNA 分子が通過する際に発生する蛍光や電圧変化を検出して塩基配列を決定していく。
- 4, ソフトウェアによるシーケンス断片配列の結合復元やリファレンス配列との比較ののち, アレルを決定。現在, 検査現場で最も普及している次世代シーケンサーであるイルミナ社の原理を図 6 に示す。

いずれのシーケンサーでも, 一分子の鋳型 DNA に由来する配列の読取り反応をフローセルやチップ上の数百万個におよぶ微細ウェル内で同時並行的に行い, 大量のシーケンスデータを一度に得ることができるため, コアエクソンだけでなく, イントロンや 5'-3'-非翻訳

領域 (UTR) までも網羅的に配列を決定できる。第 2 世代シーケンサーでは, 1 ウェルのシーケンス反応で連続して得られる配列長 (read 長) が数百 bp であるためそれらを適切につなぎ合わせる処理が必要であり, Phase ambiguity 課題が残っているが, 最新世代のシーケンサーでは read 長が数十 kb 以上にも及び HLA 遺伝子全長を切れ目なく読むことも可能となっているため, その課題も解決される。現時点でキットが販売されている HLA タイピング試薬は基本的に第 2 世代シーケンサー仕様だが, それぞれの特徴を理解し適切な試薬を各工程で用いることで, 新しい世代のシーケンサーを用いることも可能である。NGS-SBT 法 HLA タイピング試薬がキット化して販売されたことで, 研究領域だけでなく臨床検査現場でも使用される機会が増えてきているが, 現時点では 1 ランのコストが高額であること, 結果取得まで 3 日程度を要するという点で小規模検査施設での運用課題はある。しかし, 複数の HLA 関連遺伝子の全長の配列を同時に得られることや, バーコードタグを

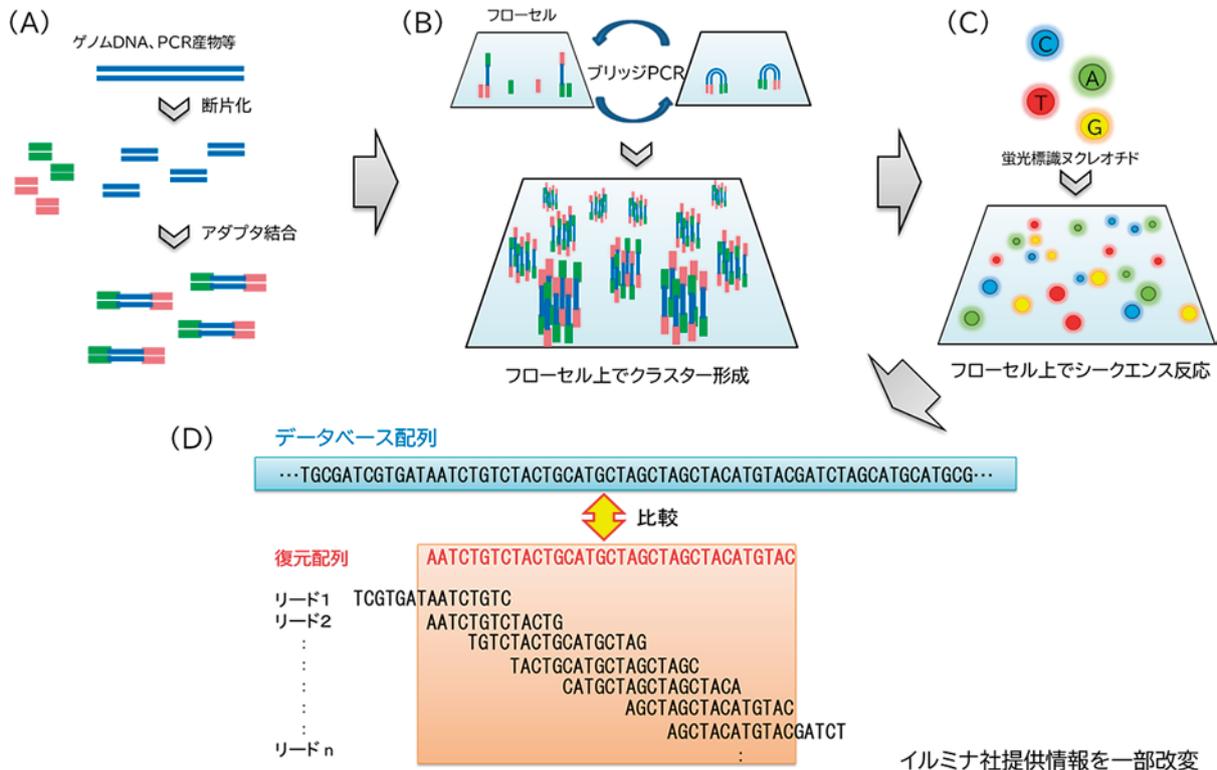


図 6 イルミナ社シーケンサーでの配列決定原理

HLA 遺伝子を PCR 増幅したのち断片化してアダプタ配列を結合 (A)。フローセル上にアダプタを介して結合し, ブリッジ PCR で 1 分子由来のクラスターを形成 (B)。クラスター上で片側の末端から伸長反応を行い, 取り込まれたヌクレオチドから蛍光を検出。これを繰り返して配列を得る。クラスターのもう片側の末端も同様に配列を決定可能 (C)。得られたシーケンス断片データを復元してデータベース上の配列と比較し, 最終的にアレルを決定 (D)。

用いて1ランで複数の被検試料を同時に解析するなどして、1試料1遺伝子あたりのコストを下げるのが可能なため、大規模検査施設ではNGS-SBT法のメリットが享受しやすくなっている。

6. DNA タイピングに用いる DNA 試料の品質

正確なタイピングのためには、その元となるDNAの量はもちろんのこと、品質も重要である。

必要以上に多いDNA量はPCR効率の低下だけでなく特異性を下げる場合もある。またO.D.260 nm/280 nm比はタンパク質等の混入を、260 nm/230 nm比は多糖類や抽出試薬中の塩類などの混入をそれぞれ示しており、これらの異常値は正確なDNA定量値の算出に影響するだけでなく、PCR反応などの阻害を起こす可能性を示す。キット化されている各タイピング試薬の使用においては取扱説明書等で推奨される濃度や精製度の記載を確認し、遵守することが大切である。NGS-SBT法においてはさらに正確な鋳型二本鎖DNA量の把握のためにPicoGreen等のインターカーレート試薬を用いた定量法が推奨されている場合がある。またHLA遺伝子の全領域をPCR増幅するLong-range系、およびread長が長い第3世代以降のシークエンサーでは鋳型となるDNAも高分子（長鎖長）であることが求められるため、分解や物理的せん断による断片化の有無のチェックも重要となる。

7. HLA DNA タイピングの課題

HLA DNA タイピングには前述のように、迅速性・処理能力・解像度・コスト等、それぞれに長所をもつ方法があり、移植・輸血臨床現場、ドナー登録、研究など用途に応じて使い分けられている。しかしながら、特にアレル決定力といえる解像度に関しては、現在キット化されている試薬の中で最高の性能を誇るNGS-SBT法でも完全ではないため、用いる方法の限界を正確に知り、「できること／できないこと」を把握しておくことが重要である。

1) Ambiguity の存在

HLAアレルは多数の多型・変異の組み合わせで決定されるが、HLA遺伝子ごとに数千種類ものアレルが報告されており、今後も増加していくとみられる。PCR-SSP法やPCR-rSSO法ではデータベース上に存在する

HLA遺伝子多型や変異の全てに対応するプライマーやプローブを設定することは現実的に不可能であり、また、PCR-SBT法でも解析対象としているエクソン以外の領域に多型・変異を示すアレルについての判別は不可能である。これらの理由でアレル、あるいはそのヘテロ組み合わせを特定できず、複数のアレル候補が判定結果に残存する状態をambiguityと呼ぶが、アレルレベルに留まらずHLA型レベルでも結果を絞り込めない場合がある。NGS-SBT法の登場でClass I HLA タイピングでのambiguityの多くは解消されたが、エクソン間を跨ぐようなPhase ambiguityが一部残っていること、またClass II HLA遺伝子では長大なイントロンが存在するため、試薬によってはエクソン1の多型を原因とするambiguityが残されている。

また、タイピング試薬に付随する判定ソフトウェアは、ambiguity候補の中から最も頻度が高いとみられるアレルの組み合わせを選択して表示する機能も実装されているが、人種ごとにアレル頻度が異なるため、そうした情報を加味した総合的な判断が実臨床では求められる。

2) Null アレルの存在

HLA遺伝子を持つが、一部の塩基配列の変異や欠失、挿入などで正常なタンパク分子が発現しないものをnullとよび、日本人集団でも低頻度ながら確認されている。血清学的手法により検出される実際の細胞表面でのHLA分子の発現の有無と、DNAタイピングの結果とが乖離する場合があります。臨床でも非常に重要な課題である。用いるタイピング試薬が解析対象としている遺伝子領域以外の変異が原因のnullについては見過ごされている可能性があるため注意が必要である。日本人を対象とした市販キットでは、アレル頻度情報をもとに一定頻度以上で検出されるnullアレルは判別できるような試薬設計をしている。

3) どこまで詳細にタイピングするか

HLAアレルを確定するためには、全エクソンおよびイントロンの配列を網羅的に解析することが理想である。また、移植の適合性ではHLA-A, B, C, DRB1の4座適合性が特に重要とされることに加え、その他のHLA座の適合性の影響も報告されており^{9,10)}、関連するHLA座を網羅的に解析できるNGS-SBT法への期待は大きい。しかし、輸血や移植の臨床では時間やコストとのバランスも考慮されるため、すべての検査をNGS-

表1 日本人でみられる、コアエクソン以外に多型を持つアレル

HLA	メジャー型 > レア型	多型領域	多型	Pコード	Gコード
A	A*02:07 > A*02:15N	Exon4	1塩基置換	— NullはPコード化されない	A*02:07:01G
B	B*15:01 > B*15:102	Exon4	1塩基置換	B*15:01P	B*15:01:01G
C	C*04:01 > C*04:82 C*08:01 > C*08:22	Exon5 Exon6	9塩基挿入 1塩基置換	C*04:01P C*08:01P	C*04:01:01G C*08:01:01G
DRB1	DRB1*12:01 > DRB1*12:10	Exon1	1塩基置換	DRB1*12:01P	DRB1*12:01:01G
DQB1	DQB1*02:01 > DQB1*02:02	Exon3	1塩基置換	DQB1*02:01P	DQB*02:01:01G
DPB1	DPB1*05:01 > DPB1*135:01	Exon4	1塩基置換	DPB1*05:01P	DPB1*05:01:01G

コアエクソン以外のタイピングにより日本人集団中で検出される主なアレルを示す。レア型アレル患者の場合、同じPもしくはGコードグループのドナーがアレル一致ドナーの次点候補と見做せる。Null アレルは発現しないためアミノ酸配列の同一性を示すPコード化はされないが、A*02:15Nのようにコアエクソン以外に原因変異がある場合、遺伝子配列の部分一致を示すGコード化では発現アレルであるA*02:07と同じグループに含まれることに注意が必要である。

SBT法で実施することは現時点では困難である。

血小板輸血不応への対応（HLA 適合血小板の供給）については、基本的には患者が持つHLA抗体にドナー血小板が反応するかどうかが焦点となるため、稀にアレルレベルの差異を認識する抗体が検出される場合があるものの、ドナーのClass I HLA型への読み替えができれば実質上ほぼ問題はない。また、C座については患者にドナーHLAへの反応性抗体が存在しても、血小板上のHLA分子の発現量の差により輸血効果には影響がない場合がある。

造血幹細胞移植においてはコアエクソンのアレル適合性が移植成績に影響することは報告されているが、完全に第4区域までアレル適合するドナーを検索することは非血縁間移植では難しくなるため、前述のコアエクソンのアミノ酸配列や遺伝子配列が一致していれば、前者はPコード、後者はGコードによる表記で同じグループとしてまとめ、適合に準ずると見做すこともある^{11,12)}。臨床現場でNGS-SBT法を用いて患者がレア型と判定され、アレルレベル適合ドナーを見出すことが困難である場合には、次点としてPコードあるいはGコードが一致す

るドナーを選択することで、グループ外のアレルよりもミスマッチの影響を低減できると期待できる。例えばC*08:22はC*08:01に対してエクソン6に多型を1か所のみもつアレルであるため同じグループであるC*08:01Pとなる一方、C*08:02やC*08:03に対してはコアエクソン内に多型があるため、区別するのが望ましい。日本人集団でコアエクソン以外を判定可能なタイピング試薬用いた際に検出されうるアレルと、そのP/Gコード化を表1に示す。

8. おわりに

NGS-SBT法の実用化により、HLA遺伝子の全エクソンに留まらず、イントロンや遺伝子両末端の非翻訳領域まで配列決定が可能となり、従来技術では解決が困難であったnullアレルによる血清学的結果との乖離や、ambiguityといった課題も解消されつつある。

さらにHLAタイピングは輸血・移植領域での適合性検査だけではなく、がんワクチン療法でのHLA拘束性に対応したペプチド選択のほか、スティープン・ジョンソン症候群(SJS)や中毒性表皮壊死融解症(TEN)といっ

た重症の薬剤副作用^{13,14)}の回避や、ウイルス等の感染防御といった分野の理解にもつながる技術であることから、今後もその重要性は高まると考えられる。今後、より迅速、簡便、正確、低コストなタイピング法の開発が期待される。

謝 辞

本稿作成にあたり、技術情報のご提供およびご助言をいただきましたルミネックス・ジャパン株式会社、ならびにイルミナ株式会社に感謝いたします。

参考文献

- 1) 大谷文雄, 木村彰方, 小林 賢, 他: 移植・輸血検査学 編集 講談社サイエンティフィック, 2004.
- 2) 椎名 隆: 次世代シーケンスに基づく HLA ゲノム・遺伝子解析. *MHC* 22(2): 84-94, 2015.
- 3) <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>, Nomenclature for Factors of the HLA System.
- 4) <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>
- 5) Robinson J, Barker DJ, Georgiou X, *et al.*: IPD-IMGT/HLA Database. *Nucleic Acids Res.* 48(D1): D948-D955, 2020.
- 6) <http://allelefreqencies.net/hla.asp>, Allele Frequency Net Database, HLA data sets.
- 7) Morishima Y, Sasazuki T, Inoko H, *et al.*: The clinical significance of human leukocyte antigen (HLA) allele compatibility in patients receiving a marrow transplant from serologically HLA-A, HLA-B, and HLA-DR matched unrelated donors. *Blood.* 99(11): 4200-6, 2002.
- 8) Itoh Y, Mizuki N, Shimada T, *et al.*: High-throughput DNA typing of HLA-A, -B, -C, and -DRB1 loci by a PCR-SSOP-Luminex method in the Japanese population. *Immunogenetics.* 57(10): 717-729, 2005.
- 9) Morishima Y, Kashiwase K, Matsuo K, *et al.*: Biological significance of HLA locus matching in unrelated donor bone marrow transplantation. *Blood.* 125(7): 1189-1197, 2015.
- 10) Yabe T, Azuma F, Kashiwase K, *et al.*; Japanese Cord Blood Transplantation Histocompatibility Research Group: HLA-DPB1 mismatch induces a graft-versus-leukemia effect without severe acute GVHD after single-unit umbilical cord blood transplantation. *Leukemia.* 32(1): 168-175, 2018.
- 11) http://hla.alleles.org/alleles/p_groups.html, P Codes For Reporting of Ambiguous Allele Typings.
- 12) http://hla.alleles.org/alleles/g_groups.html, G Codes For Reporting of Ambiguous Allele Typings.
- 13) Tangamornsuksan W, Chanprasert S, Nadee P, *et al.*: HLA genotypes and cold medicine-induced Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis with severe ocular complications: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 10(1): 10589, 2020.
- 14) Su SC, Hung SI, Fan WL, *et al.*: Severe Cutaneous Adverse Reactions: The Pharmacogenomics from Research to Clinical Implementation. *Int J Mol Sci.* 17(11): 1890, 2016.

Overview of HLA DNA typing technology

Fumihiko Azuma¹⁾

¹⁾Japanese Red Cross Society Blood Service Headquarters

HLA typing in donors and recipients is important because HLA compatibility has a significant impact on transplantation and platelet transfusion in HLA antibody-positive cases. In the past, serological tests were performed by the LCT method, but now DNA typing is mainstream. Currently, methods such as PCR-SSP, PCR-rSSO, PCR-SBT, and NGS-SBT are used in clinical laboratory and research fields. They have advantages and disadvantages in quickness, multi-sample processing capacity, resolution, cost, etc., and are selected according to the purpose. With the advent of commercially available DNA typing reagents, it has become easier to implement, but there are still issues in interpreting results, such as the divergence with serological results due to the null gene and ambiguity. HLA typing is a fundamental technology that is needed not only in transplantation and blood transfusion, but also in the fields of drug selection for cancer vaccines, disease association, drug adverse effects such as severe drug eruption, and infection protection, and is expected to become even more important in the future.

Key Words: HLA gene, HLA allele, DNA typing

臓器移植のための免疫プロファイリングと免疫モニタリング

大段 秀樹¹⁾¹⁾ 広島大学大学院医系科学研究科, 消化器・移植外科学

画一的な免疫抑制療法では拒絶や感染症の発症リスクが懸念される免疫学的高リスク症例を、免疫機能分子のゲノム情報を基盤として抽出し、免疫モニタリングによって重点的に個別化免疫抑制療法を適用することが現実的である。そこで、臓器移植成績に関連する免疫関連分子の候補遺伝子多型を包括的に解析した。その中で、レシピエントの FcγR 遺伝子 FCGR2A (rs 1801274) [131 H/R] と FCGR3A (rs396991) [158 F/V] の一塩基多型 (SNP) が、肝移植患者の敗血症及び腎移植患者の尿路感染症の発症と起因菌に有意に関連すること、そして、FOXP3 プロモーター領域 (rs3761547) [33499 A/G] の SNP が、肝移植レシピエントは、急性拒絶反応の治療として行われるステロイドパルス療法に感受性に関連することなどを報告して来た。危険因子を持つレシピエントに対し、必要最小限の免疫抑制療法を実践する目的で、carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) 細胞質染色とマルチパラメーターフローサイトメトリーを応用した mixed lymphocyte reaction assay を施行し、免疫モニタリングに基づく fine tuning により免疫抑制薬の投与量の最適化に努めている。

キーワード：臓器移植, 一塩基多型, 候補遺伝子アプローチ, ゲノムワイド相関研究, 免疫モニタリング, 免疫抑制療法

1. はじめに

優れた免疫抑制薬の開発とともに臓器移植の成績は改善して来た。しかし、服薬管理が十分になされていても、一定の確率で拒絶反応は発症する。また、非特異的な免疫抑制に起因する感染症や、長期的には悪性腫瘍の罹患の問題も解決されていない。これらの偶発症は、複数の遺伝因子や環境因子によって発症する多因子疾患であり、発症に関わる遺伝子を「疾患感受性遺伝子」という。疾患感受性遺伝子は、一般にそれぞれが微妙にリスクをあげる影響力を持ち、正常にも存在する一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) が代表的である。微妙であったはずの影響力が、臓器移植後の免疫抑制下などでは増長され、個人における合併症の発症リスクが規定される可能性があり、移植後合併症の感受性を高める

遺伝子多型の特定を目的にした研究が散見される。

疾患感受性遺伝子を同定するための研究法は、候補遺伝子アプローチ (candidate gene approach, CGA) とゲノムワイド相関研究 (genome-wide association study, GWAS) に大別される。CGA は、これまでの免疫学や生物学的な研究の情報から、拒絶や感染と関係しそうな遺伝子を取り上げ、その遺伝子内の多型を明らかにし、症例群と対照群で遺伝子多型の頻度の差があるかどうかを検定する手法である。既存の研究成果から病態を仮説して、特定遺伝子または狭い染色体領域に注目して解析する。意外性や新規性のある結果は期待できないが、臓器移植後の免疫や炎症に関連する偶発症など、臨床病態がある程度把握されている場合に対しては、実践的な情報を得ることができるというメリットがある (図 1)。一方、GWAS は、免疫学的、生物学的な情報を前提とせず、

受付日：2021 年 7 月 15 日, 受理日：2021 年 7 月 15 日

代表者連絡先：大段 秀樹 〒734-8551 広島市南区霞 1-2-3 広島大学 大学院医系科学研究科, 消化器・移植外科学
E-mail: hohdan@hiroshima-u.ac.jp

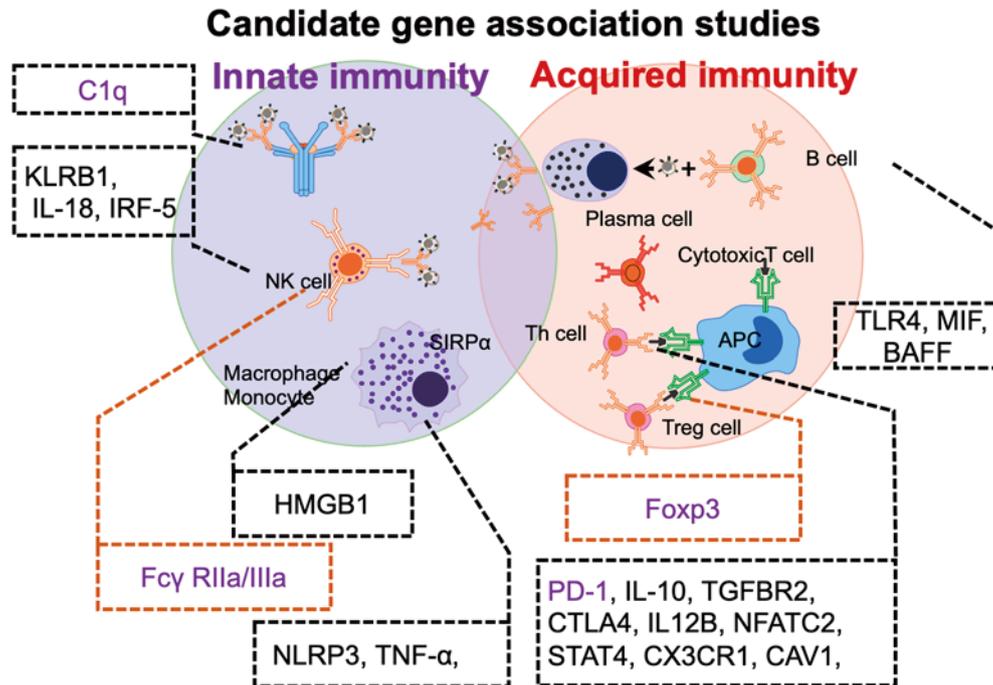


図1 臓器移植成績に関連するT細胞性、B細胞性、自然免疫の候補分子

それまでの病態の理解の範囲からは推定が不可能な、全く新しい機能をもった遺伝子の発見につながり、疾患の病態の理解に関して、画期的な進歩をもたらす可能性がある。しかし、必要とする症例数と同定に至るまでの労力とコストは、CGAよりはるかに膨大である。また、データの解析にあたっては、検定の多重性や集団の構造化という問題が懸念される。

CGAとGWASの何れにしても、臓器移植後の合併症に感受性のある遺伝子が特定されれば、画一的な免疫抑制療法では拒絶や感染症の発症リスクが懸念される免疫学的高リスク症例の抽出が可能となる。我々は、遺伝子解析で抽出した高リスク症例に対して、リンパ球混合試験を用いた免疫モニタリングにより重点的な個別化免疫抑制療法を適用することを提案している。

2. 臓器移植後の免疫反応

臓器移植は機能を失った臓器や組織を正常なもので置き換える治療であり、多くの末期臓器不全に対する最終的なかつ唯一の根治的治療法である。しかし臓器提供者（ドナー）と臓器移植を受ける者（レシピエント）は基本的に他人であり、同種間でも個体により異なる抗原が存在する。この抗原はアロ抗原（alloantigen）と呼ばれ、

レシピエントの免疫系に異物（非自己）と認識され拒絶反応を引き起こす¹⁾。拒絶反応の起こりやすさは、ドナーとレシピエントの免疫学的相性によって決定され、この相性を組織適合性と呼んでいる。組織適合性と拒絶反応のメカニズムを理解することは、臓器移植の適応・治療を理解する上で非常に重要である。主要組織適合性抗原複合体（MHC; Major Histocompatibility Antigen Complex）は、ヒトではヒト白血球抗原（Human Leukocyte Antigen, HLA）と呼ばれる。HLA遺伝子は第6番染色体上に存在し、体の全ての有核細胞表面に発現するHLAクラスI分子と、抗原提示細胞やB細胞などの一部でのみ発現するHLAクラスII分子の2種類がある。HLA分子は糖タンパク質で、クラスI分子はα鎖とβ2ミクログロブリンが、クラスII分子はα鎖とβ鎖がそれぞれ非共有的に結合したヘテロ二量体として細胞膜上に発現している。HLAの最大の特徴は、その多型性にある。クラスI抗原は主にHLA-A, B, C、クラスII抗原はHLA-DP, DQ, DRとそれぞれ複数存在し、さらにそれぞれ数百から数千の多型が存在する。またHLAは母親と父親からそれぞれ引き継がれ、共優性に発現するため、その組み合わせは膨大なものとなる。故にHLAは自己と非自己のマーカーとなり、移植においてはアロ抗原として拒

絶反応の主要な標的抗原となる。発見当時は拒絶反応に関わる遺伝子と考えられた HLA であるが、その後、最も重要な機能は細胞外の遠位ドメインの溝状構造に病原体などの外来抗原由来の非自己ペプチドを結合し、自己の T 細胞に提示する機構であることが明らかとなった。HLA の多型性は病原体抗原に対する結合および免疫反応に個体差をもたらすため、結果として種としての免疫学的多様性を保っていると考えられる。

HLA が異なった組み合わせの同種移植後に生じる拒絶反応は、細胞性拒絶反応と抗体（液）性拒絶反応に大別される。細胞性拒絶反応は、活性化した T 細胞により起こる。T 細胞の活性化経路は、抗原提示細胞の由来の違いにより直接認識経路と間接認識経路に分類される。直接認識経路では移植片内のドナー由来抗原提示細胞のドナー HLA（+ペプチド）を、レシピエント T 細胞が T 細胞受容体（TCR）を介して直接認識する。これは本来自己 HLA 拘束的に反応するレシピエント T 細胞が、一種の交差反応をおこすと理解されている。直接認識経路で活性化する T 細胞の割合は、通常の抗原特異的反応での割合と比べ非常に高く（100～1000 倍）反応も強い²⁾。間接認識経路ではアロ抗原がレシピエント由来抗原提示細胞に取り込まれ、分解後にレシピエント HLA クラス II 上に提示され、レシピエント CD4⁺T 細胞が TCR を介して認識し、活性化する。通常の外来抗原に対する反応と本質的に同じであり、反応する T 細胞は自己 HLA に拘束されている。また HLA クラス I は本来、内在性ペプチドを結合し CD8⁺T 細胞に提示するが、樹状細胞がアロ抗原を取り込んでクラス I に提示し、CD8⁺T 細胞を活性化する経路（クロスプレゼンテーション）³⁾、およびドナー HLA がそのままレシピエント抗原提示細胞へ移行し、T 細胞に抗原提示を行う semi-direct pathway という新しい経路も提唱されている⁴⁾。いずれの経路でも T 細胞活性化には、TCR 刺激以外に副刺激分子を介した補助刺激が必要となる。

抗体（液）性拒絶反応は一般的に間接認識経路で活性化された CD4⁺T 細胞のヘルプのもと、抗ドナー HLA 抗体が産生されることによって起こる。CD4⁺T 細胞は抗原提示細胞の HLA クラス II に提示されたアロ抗原を認識し、活性化する。一方で B 細胞も抗原提示細胞に提示されたアロ抗原を認識する。抗原提示細胞と T 細胞、B 細胞間での副刺激分子およびサイトカインを介したコ

ミュニケーションにより B 細胞は抗体産生細胞へ分化する。あるいは、アロ抗原を B 細胞受容体（BCR）を介して取り込み、HLA クラス II 上に提示した B 細胞と活性化 CD4⁺T 細胞とのコミュニケーションによっても抗体産生が促進される⁵⁾。

3. 薬物代謝酵素の遺伝的多型と個別免疫抑制療法

上述のアロ応答を制御するために免疫抑制療法の投薬量を決めるためには、薬の血中濃度測定を行い、その結果から計算によって求められた指標により次回の投与量を決める。これを、Therapeutic Drug Monitoring（TDM）あるいは Pharmacokinetic study（PK study）といい、「治療薬物モニタリング」と訳される。TDM により投与設計を行う必要がある薬剤としては、カルシニューリン阻害剤（CNI）やミコフェノール酸（MPA）モフェチルなどの代謝拮抗剤、エベロリムス（EVL）などの mammalian target of rapamycin（mTOR）阻害剤がある。多剤併用療法で行われる免疫抑制療法において、患者個々に対する最適な組み合わせや使用量の指標となる TDM の集学的なガイドラインの確立は今後の課題である。

薬物に対する生体応答には、著しい個体差が認められる。この薬物の反応性に影響を及ぼす因子のひとつとして薬物代謝酵素遺伝子の SNP が数多く報告されている。薬物投与前にこれらの遺伝子型を調べることによって、薬物の反応性、動態、副作用の発現が予測できれば、各個人に応じた安全で有効な薬物治療が可能になる。チトクロム P450（CYP）は、脂溶性が高い薬物を、胆汁中や尿中に排泄されやすい水溶性に変換する役割を担う酵素である。CYP3A4、CYP3A5、CYP2C19 の SNP が CNI の薬物代謝に影響することが報告されている。これらの遺伝的背景などを考慮して、個々に最適な治療法を設定する個別化医療の普及が期待される。

4. 臓器移植後の合併症に感受性のある遺伝子の特定

遺伝子領域には 100 万ヶ所の SNP があり、作られるタンパク質の時期や量、機能に違いを生み出すと考えられている。免疫機能の個人差に影響する SNP は、CYP 遺伝子の他にもいくつも存在し複雑に関連していると考えられる。それらを網羅的に調べ、その結果をもとにして、より効率的・効果的に免疫療法を行うゲノム医療の実現を目指した研究成果の充実が今後の課題である。ゲ

ノムビッグデータから免疫応答や薬剤感受性に関わる遺伝子異常の同定を図る研究成果に期待がかかる一方で、臓器移植の周術期における特殊な病態は、様々な要素が複雑に絡み合うため、ビッグデータの解析により関連遺伝子を同定し難いことも予測される。頻度が高く病態が解明された疾患において既に関連性が確認された遺伝子多型の情報に基づき、臓器移植後に遭遇する生体防御機構の異常に関わる遺伝子多型を理論的に予測し、詳細な解析が行われている。以下に、臓器移植成績に関連する免疫応答に影響する遺伝子の SNP を解析した我々の研究を紹介する。

臓器移植後の特殊な病態下では、通常では疾病とは関連性の低い遺伝子多型が合併症のリスクに影響する可能性がある。獲得免疫応答が抑制される免疫抑制剤の使用下では、自然免疫応答が重要な生体防御機構を司るものと考えられる。自然免疫を担う natural killer (NK) 細胞やマクロファージは、イムノグロブリンのレセプター (FcγRIII) を発現し、抗体依存性細胞傷害作用 (ADCC) の主要なエフェクター細胞として機能する。FcγRIIIa の遺伝子多型と肝移植及び腎移植後の感染発症の発症率に

ついて解析した。イムノグロブリンサブクラス IgG3 と低親和性を示すバリエーションの rs396991 F-carrier は高親和性バリエーション rs396991 V/V に比べ、肝移植後には菌血症の有意な高発症率を、腎移植後には尿路感染症の有意な高発症率を認めた^{6,7)}。FcγRIIIa 遺伝子 rs396991 F-carrier では、嚴重な細菌感染予防が望まれる。また、FcγRIIIa 遺伝子の SNP は、単に菌血症の発症率に関連することにとどまらず、菌血症の原因菌となる菌種にも影響することが判明した。すなわち、イムノグロブリンサブと低親和性を示す rs396991 F-carrier 患者における菌血症の主な原因菌は、グラム陽性球菌であり、高親和性バリエーション rs396991 V/V 患者の場合は、グラム陰性桿菌であった。FcγRIIIa 遺伝子 SNP と原因菌との関係は、各種細菌の特徴的な構造に起因する (図2)。細菌は、古典的経路、レクチン経路、および代替経路を含む補体活性化のすべての経路を活性化し、膜侵襲複合体 (MAC) の形成をもたらす。グラム陰性桿菌の細胞壁は、薄い (1-7 nm) ペプチドグリカン層で構成されており、MAC を介した溶菌の影響を受けやすい。対照的に、グラム陽性球菌の細胞壁は厚い (20-80 nm) ペプチドグリカン層に包ま

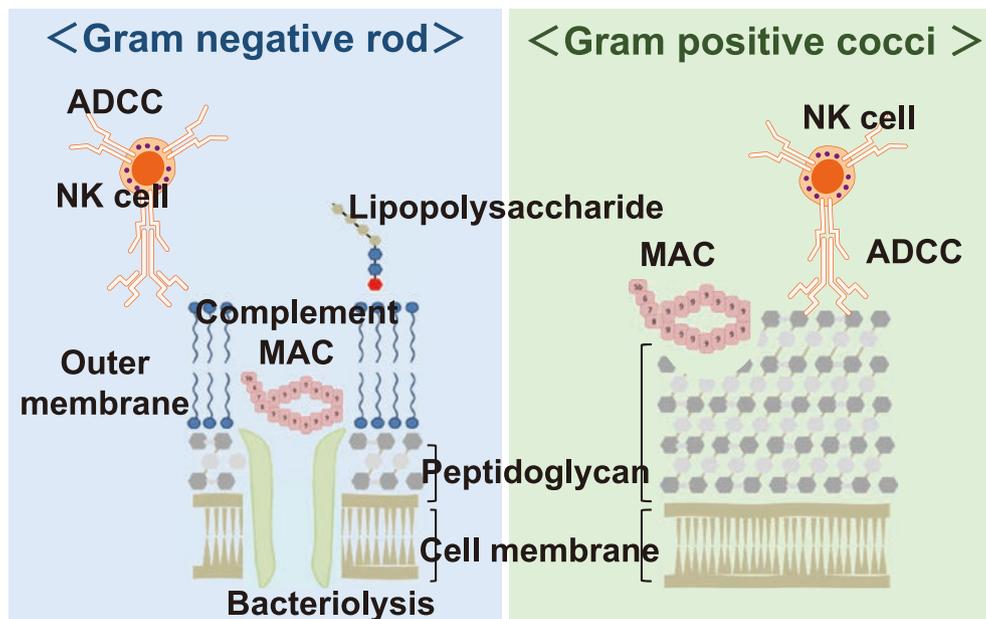


図2 菌血症の主な原因菌は、FCGR3A [158F/V または F/F] 患者ではグラム陽性球菌であった⁵⁾。その理由は、細菌の特徴的な構造によって説明される。グラム陰性桿菌の細胞壁は、薄い (1~7 nm) ペプチドグリカン層で構成されている。したがって、それらは膜侵襲複合体 (MAC) を介した溶菌の影響を受けやすい。対照的に、グラム陽性球菌の細胞壁は、膜を標的とする MAC の物理的障壁を形成する厚い (20~80 nm) ペプチドグリカン層に囲まれている。グラム陽性球菌の細胞壁のさまざまな構成成分は、ヒト血清中の自然抗体 IgG によって標的となり、古典的経路補体活性化に加えて、FcγR を介した ADCC が誘導される。したがって、グラム陽性球菌に対する生体防御機構は、FcγR を介したオプソニン作用に大きく依存している可能性がある。

れており、MAC を解した溶菌に抵抗性を示す。一方で、グラム陽性球菌の細胞壁は抗原性に富み、ヒト血清中の自然抗体 IgG の標的となって、古典的経路補体活性化に加えて FcγR を介した ADCC を介した細胞壁傷害をもたらす。したがって、グラム陽性球菌に対する生体防御活性は、FcγR を介したオプソニン作用に大きく依存している。そのため、イムノグロブリンと低親和性を示す FcγRIIIa 遺伝子 SNP バリエーション患者では、グラム陽性球菌に対し易感染性が生じるものと考えられる (図 1)。

獲得免疫関連では、制御性 T 細胞の機能を司る重要なマスター遺伝子である FOXP3 の遺伝子多型 (Rs3761548) が拒絶反応の程度と関連性が深い。FOXP3 の遺伝子 SNP のうち、rs3761548 CC major allele を持つ者は転写因子との結合が良好で効率よく FOXP3 タンパクが合成される。一方で、minor allele A-carrier は転写因子との結合が悪いことが報告されている。FOXP3 の遺伝子多型と拒絶反応の発症率および程度との関連を解析したところ、CC-homozygote と A-carrier 間で拒絶の発症率には差を認めなかった。しかし、A-carrier に発症した急性拒絶の治療に必要なステロイド量は、CC-homozygote に発症した拒絶治療に比べ有意に多かった。FOXP3 遺伝子 A-carrier に発症する急性拒絶は難治化する可能性が示めされた⁸⁾。FOXP3 の遺伝子 rs3761548SNP はステロイド抵抗性の拒絶反応を予測し得る因子であり、治療薬選択において重要な遺伝子情報である。このような免疫応答に関連するする遺伝子の SNP 情報を解

析し、移植医療の効率化と安全性の向上に役立てるには、現在検討が進められている生活習慣病に対する医療やがん診療などと同様に、「人工知能 Artificial Intelligence」の活用が不可欠になるものと見込まれる。

5. 免疫モニタリング

前述のごとき難治性拒絶反応や感染症のリスク因子を持つ臓器移植患者を管理するためには、信頼性のある免疫モニタリング法の確立が不可欠である。我々は、carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) 細胞質染色とマルチパラメーターフローサイトメトリーを応用した mixed lymphocyte reaction assay (CFSE-MLR) を臨床導入している (図 3)⁹⁻¹²⁾。

CFSE 色素は細胞傷害性なく細胞内蛋白を染色し、細胞分裂回数に比例して色素が半減化する性質を有し、反応性リンパ球の表面分子や活性化マーカーと同時にフローサイトメーターを用いて解析できるため、反応性 T 細胞の precursor frequency, mitotic index や stimulation index の算出、定量化が可能である。我々は、CFSE-MLR に基づく免疫抑制剤最適化アルゴリズムを作成し、腎臓および肝臓移植術後のレシピエントに対して必要最小限の免疫抑制療法を施行している。すなわち、抗ドナー、抗サードパーティ各々における CD4⁺, CD8⁺T 細胞の各 stimulation index および抗ドナー反応性 CD8⁺T 細胞の CD25 表出率を解析し、hypo-response, norm-response, hyper-response for CD4⁺ T cells, hyper-response for CD8⁺ T

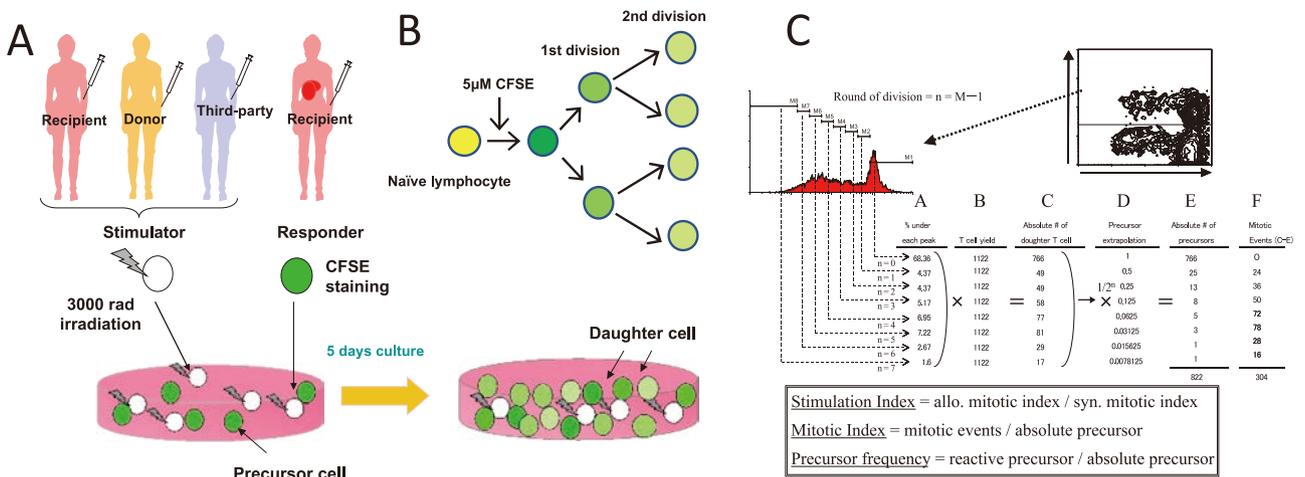


図 3 CFSE-MLR の実施。A. MLR のセットアップ。B. レスポンダーのレシピエント T 細胞は、細胞毒性を持たない CFSE 蛍光色素で細胞質染色する。色素は細胞分裂に伴い半減するため、FCM でリンパ球増殖が視覚化可能である。C. 培養後のリンパ球の CFSE 蛍光色素の減衰をフローサイトメトリーでフェノタイプ別に解析する。(文献 11 より改変)

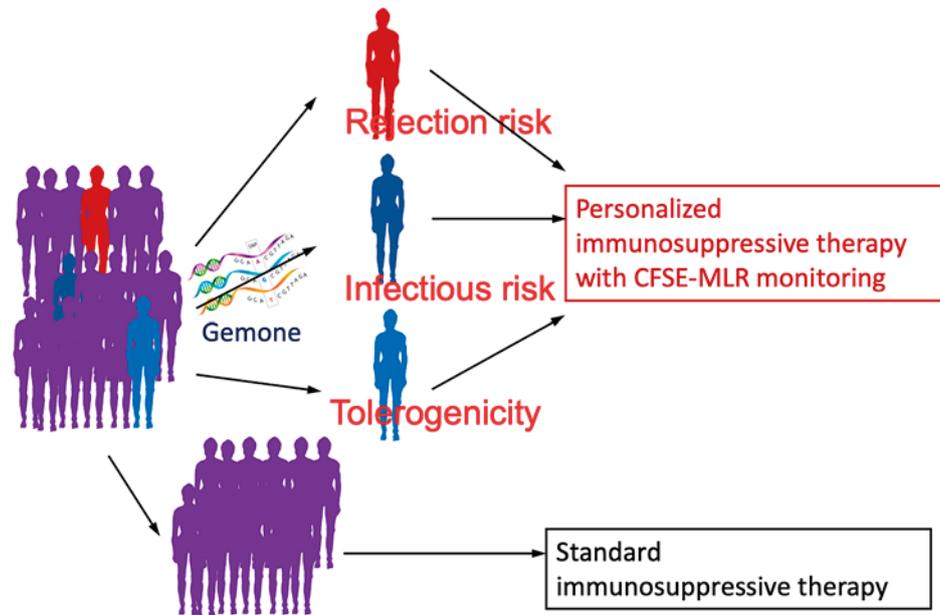


図4 CFSE-MLRは、細胞培養とフローサイトメトリーの技術を要するため、臓器移植の全症例にルーティン免疫モニタリングとして普及することは期待できない。そこで、免疫関連遺伝子多型の包括的解析により、画一的な免疫抑制療法では拒絶や感染症の発症リスクが懸念される免疫学的高リスク症例、あるいは寛容誘導の可能性のある症例を抽出し、CFSE-MLRによって重点的に個別化免疫抑制療法を適用することを考案した。

cellsの4つのカテゴリーに分類し、免疫抑制剤の投与量を調整している。B型肝炎罹患肝硬変患者に対する肝移植後に、CFSE-MLRで免疫抑制剤の最適化（最少化）を図り、抗ドナー hypo-response かつ抗サードパーティ norm-response の状態に誘導できた場合では、HBV ワクチン療法の受動免疫効果が良好であることが示され¹³⁾、合併症のハイリスク症例に加えて、受動免疫を期待する症例に対しても、免疫モニタリング下での免疫抑制療法は有益である（図4）。

6. おわりに

臓器移植後の免疫抑制療法プロトコールは、臨床経験に基づき確立されてきた。患者個々における免疫応答の客観的な指標に対応して調整されているわけではない。移植医療のさらなる発展には、正常な生体防御能を保ちつつ移植抗原に対する免疫応答のみを抑制しうるプロトコールの確立が重要である。そのためには、免疫学的ハイリスク症例を効果的に抽出して、信頼性のある免疫監視法のもとに管理する方策の確立が求められる。

参考文献

1) 尾上隆司, 大段秀樹: 外科修練医必修 新外科専門医到達

のための特別講義 免疫学 組織適合と拒絶反応. 臨床雑誌 外科 77(12): 1426-1430, 2015.

- 2) Afzali B, Lombardi G, Lechler RI: Pathways of major histocompatibility complex allorecognition. *Curr Opin Organ Transplant.* 13: 438-444, 2008.
- 3) Whitelegg A, Barber LD: The structural basis of T-cell allorecognition. *Tissue Antigens.* 63: 101-108, 2004.
- 4) Smyth LA, Herrera OB, Golshayan D, et al.: A novel pathway of antigen presentation by dendritic and endothelial cells: Implications for allorecognition and infectious diseases. *Transplantation* 82: S15-18, 2006.
- 5) Conlon TM, Saeb-Parsy K, Cole JL, et al.: Germinal center alloantibody responses are mediated exclusively by indirect-pathway CD4 T follicular helper cells. *J Immunol.* 188: 2643-2652, 2012.
- 6) Shimizu S, Tanaka Y, Tazawa H, et al.: Fc-Gamma Receptor Polymorphisms Predispose Patients to Infectious Complications After Liver Transplantation. *Am J Transplant.* 16(2): 625-633, 2016.
- 7) Das LK, Ide K, Tanaka A, et al.: Fc-gamma receptor 3A polymorphism predicts the incidence of urinary tract infection in kidney-transplant recipients. *Hum Immunol.* 78(4): 357-362, 2017.
- 8) Verma S, Tanaka Y, Shimizu S, et al.: Significant Association between FOXP3 Gene Polymorphism and Steroid-Resistant Acute Rejection in Living Donor Liver Transplantation. *Hepatology Communications* 1(5): 406-420, 2017.

- 9) Tanaka Y, Ohdan H, Onoe T, *et al.*: Multiparameter flow cytometric approach for simultaneous evaluation of proliferation and cytokine-secreting activity in T cells responding to allo-stimulation. *Immunol Invest.* 33: 309–324, 2004.
- 10) Tanaka Y, Ohdan H, Onoe T, *et al.*: Low incidence of acute rejection after living-donor liver transplantation: immunologic analyses by mixed lymphocyte reaction using a carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester labeling technique. *Transplantation* 79(9): 1262–1267, 2005.
- 11) Tanaka Y, Ohira M, Tashiro H, *et al.*: Impact of alloimmune T cell responses on hepatitis C virus replication in liver transplant recipients. *Hum Immunol.* 75(12): 1259–1267, 2014.
- 12) 大段秀樹, 浅原利正: 生体肝移植—最新の話 生体肝移植における免疫抑制療法. *臨床外科* 60(12): 1391–1398, 2005.
- 13) Tahara H, Tanaka Y, Ishiyama K, *et al.*: Successful hepatitis B vaccination in liver transplant recipients with donor-specific hyporesponsiveness. *Transpl Int.* 22(8): 805–813, 2009.

Immune profiling and immune monitoring for organ transplantation

Hideki Ohdan¹⁾

¹⁾Department of Gastroenterological and Transplant Surgery,
Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University

It is practicable to extract immunologically high-risk cases, which may be at risk of rejection or infection with uniform immunosuppressive therapy, on the basis of genomic information of immune function molecules, and to apply focused personalized immunosuppressive therapy by immune-monitoring. Therefore, we comprehensively analyzed the candidate gene polymorphisms of immune-related molecules associated with organ transplantation outcomes. Among them, we found that single nucleotide polymorphisms (SNPs) of FcγR genes FCGR2A (rs 1801274) [131 H/R] and FCGR3A (rs396991) [158 F/V] were significantly associated with the onset and causative organisms of sepsis in liver transplant recipients and urinary tract infection in kidney transplant recipients, and that SNP of FOXP 3 promoter region (rs3761547) [33499 A/G] was associated with sensitivity of liver transplant recipients to pulsed steroid therapy, which is used to treat acute rejection. We performed a mixed lymphocyte reaction assay using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) cytoplasmic staining and multiparameter flow cytometry to minimize immunosuppressive therapy in the recipients with risk factors to optimize the dosage of immunosuppressive drugs by fine tuning based on immune-monitoring.

Key Words: organ transplantation, single nucleotide polymorphism, candidate gene approach, genome-wide association study, immune-monitoring, immunosuppressive therapy

HLA-G 遺伝子の構造, 発現および多型性

鈴木 進悟¹⁾, 亀谷 美恵¹⁾, 椎名 隆¹⁾¹⁾ 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

HLA-G (Human leukocyte antigen G) 遺伝子は古典的 HLA 遺伝子と比較して多型性に乏しく, 局所的な細胞に発現を示すことから非古典的 HLA クラス I 遺伝子の一つに分類されている。この遺伝子より発現する HLA-G 分子は, 免疫寛容を誘導する免疫チェックポイント分子として, 妊娠免疫, 臓器移植の際の免疫応答の抑制, 腫瘍やウイルスの宿主免疫系からの逃避, 自己免疫疾患などに関与する。近年, *HLA-G* 遺伝子の 3'UTR (3' untranslated region) に位置する 14 bp (base pair) の挿入/欠失多型 (rs66554220) や SNP (Single nucleotide polymorphism) (rs1063320) が急性移植片対宿主病の発症リスクや移植後の生存期間と関連することが報告されているが, それらの多型部位は HLA アレルの公的データベースである IPD-IMGT/HLA (Immuno Polymorphism Database-International ImMunoGeneTics project/HLA) から公開されているアレル塩基配列の範囲に含まれていない。そこで筆者らは, それらの多型部位を含めた *HLA-G* 遺伝子の多型性を明確にするために, プロモーター領域から 3'UTR の多型部位までの遺伝子領域を含む *HLA-G* 全遺伝子領域をロングリードシーケンサーにより再解析し, 新たに 22 種類の *HLA-G* アレルを日本人集団で決定した。本稿では, *HLA-G* 遺伝子の構造, 発現および多型性を概説すると共に, 筆者らが決定した *HLA-G* アレル塩基配列の特徴について紹介した。

キーワード: ヒト白血球抗原; Human leukocyte antigen; HLA, HLA-G, 遺伝子構造, 遺伝子発現, 遺伝子多型

1. はじめに

HLA-G 分子は非古典的 HLA クラス I 分子の一つに分類されており, 他の古典的 HLA 分子と同様に $\beta 2$ ミクログロブリンおよび内在性ペプチドと結合する^{1,2)}。この分子の発見は古く, 1980 年代に胎盤の栄養芽層細胞 (トロフォブラスト) に発現する新規の HLA クラス I 様分子として同定された^{3,4)}。その後, 1990 年に HLA-G が妊娠初期のトロフォブラストに顕著に発現することが報告され, それ以降は胎児と母体との間の妊娠免疫など, HLA-G が関与する免疫抑制に関する数多くの研究に展開されている⁵⁾。

HLA-G 分子は, LILRB1 (Leukocyte Ig-like receptor B1) や LILRB2 (Leukocyte Ig-like receptor B2) などの抑制性受容体と結合し免疫抑制的な機能を担う。具体的に

は NK (Natural killer) 細胞の細胞障害活性阻害, アポトーシスの誘導, CD (Cluster of differentiation) 4 陽性 T 細胞の増殖阻害, 抗原提示細胞と B 細胞の分化抑制, 樹状細胞の誘導および制御性 T 細胞の誘導などである⁶⁻¹²⁾。そして, 免疫寛容を誘導する免疫チェックポイント分子として, 妊娠免疫の他にも臓器移植の際の免疫応答の抑制, 腫瘍やウイルスの宿主免疫系からの逃避, 自己免疫疾患などに関与する¹³⁻¹⁵⁾。

HLA-G をコードする *HLA-G* 遺伝子の塩基配列は 1987 年に決定され, 古典的 HLA クラス I 遺伝子である *HLA-A*, *HLA-B* および *HLA-C* とよく類似した遺伝子構造を有する¹⁶⁾。ところが, 非古典的 HLA クラス I 遺伝子特有の多型性の乏しさから日本人における *HLA-G* 遺伝子のアレル数やアレル頻度に関する知見は乏しい。そこで本稿では, *HLA-G* 遺伝子の構造, 発現および多型性に

受付日: 2020 年 5 月 1 日, 受理日: 2021 年 6 月 24 日

代表者連絡先: 鈴木 進悟 〒259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋 143 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学
TEL: 0463-93-1121 (内線 2582) FAX: 0463-94-8884 E-mail: ss079143@tsc.u-tokai.ac.jp

焦点を絞り, それらの特徴を筆者らが決定した日本人 HLA-G 遺伝子全長のアレル配列の特徴を交えながら概説したい。なお, HLA-G の構造や機能に関する知見は多岐にわたるため既報を参照されたい¹⁷⁻²¹⁾。

II. HLA-G 遺伝子の構造

(1) HLA-G 遺伝子の基本構造

HLA-G 遺伝子はヒト第 6 番染色体短腕 (6p22.1) 上の HLA-A 遺伝子の約 100 kb (kilo bases) テロメア側に座位する²²⁾。この遺伝子の基本構造は, 4,144 bp に 8 個のエクソンから構成され, コード配列は基本的に 6 個のエクソン (エクソン 2-7) に分かれて位置する (図 1A)。このコード配列から 338 個のポリペプチドが翻訳され, その後, N 末端側の 24 個のシグナルペプチドが除かれることにより最終的に 314 個のポリペプチドが α 鎖として発現される。

(2) HLA-G 遺伝子のスプライスバリエントを伴うアイソフォーム

HLA-G 分子の特徴の一つとして, 古典的 HLA クラス I 遺伝子には認められない多数のアイソフォームを生成することが挙げられる。具体的には, 第 II 項 (1) で概説した基本構造を含む計 7 種類の HLA-G のアイソフォームが選択的スプライシングを介して発現する。それらの内の 4 種類は膜結合性 HLA-G (HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 および HLA-G4) ならびに 3 種類は可溶性 HLA-G (HLA-G5, HLA-G6 および HLA-G7) である (図 1B)²³⁻²⁸⁾。膜結合性の HLA-G1 は, 前述の基本構造に相当し, 細胞外ドメインである $\alpha 1$, $\alpha 2$ および $\alpha 3$ ドメイン, 膜貫通ドメイン (TM) と細胞質ドメイン (CY) からなる HLA-G をコードする。HLA-G1 と比較し, HLA-G2 は $\alpha 2$ ドメイン, HLA-G3 は $\alpha 2$ および $\alpha 3$ ドメイン, HLA-G4 は $\alpha 3$ ドメインがそれぞれ欠落した分子として

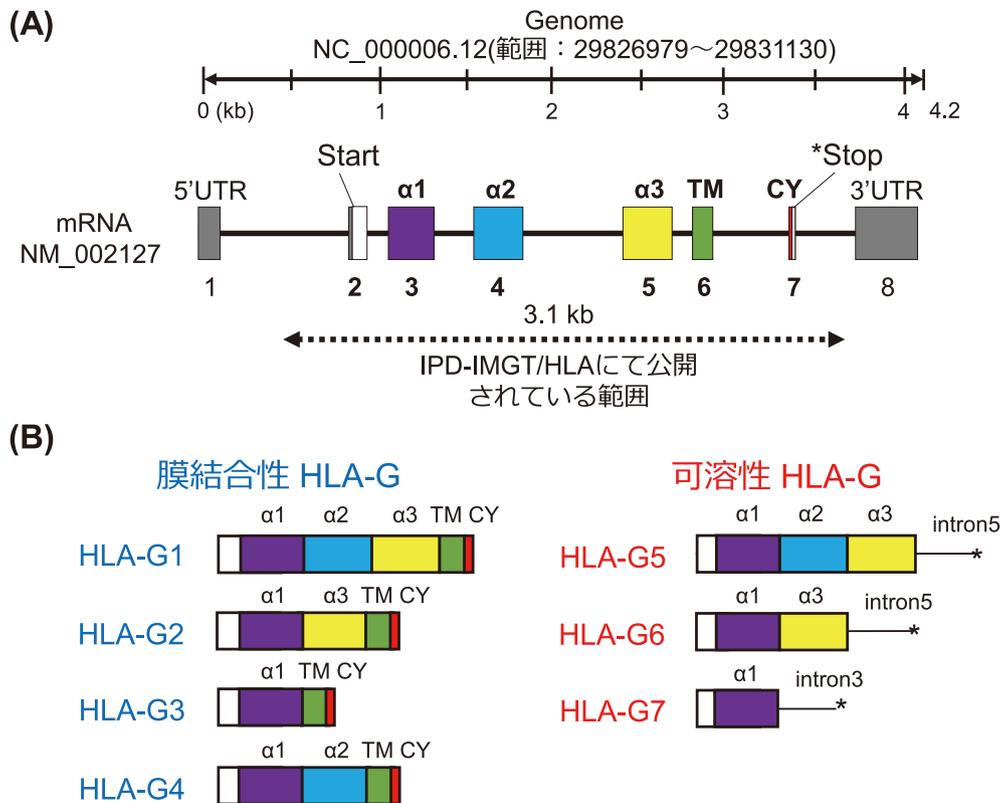


図 1 HLA-G 遺伝子の構造とスプライスバリエントの模式図

(A) ゲノム DNA 由来の塩基配列 (NC000006.12; 範囲 29826979 ~ 29831130) と mRNA 由来の塩基配列 (NM_002127) を用いたエクソンとイントロンの構造を示す。ボックスはエクソンを示し, ボックス下の数字はエクソン番号を示す。黒点線の矢印は, IPD-IMGT/HLA データベースにて公開されているアレル塩基配列の範囲を示す。「Start」および「*Stop」は, 開始コドンおよび終止コドンの位置をそれぞれ示す。また, 「 $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ 」, 「TM」および「CY」は, $\alpha 1 \sim \alpha 3$ ドメイン, 膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインをそれぞれ示す。(B) HLA-G 遺伝子における 7 種類のスプライスバリエントの構造を示す。可溶性 HLA-G の「*」は終止コドンの位置を示す。可溶性 HLA-G のイントロン番号は Tronik-Le Roux ら (2018) を参照とした²⁸⁾。

構成される。一方, 可溶性の HLA-G5 は TM および CY ドメイン, HLA-G6 は $\alpha 2$, TM および CY ドメイン, HLA-G7 は $\alpha 2$, $\alpha 3$, TM および CY ドメインがそれぞれ欠落した分子として構成される。7 種類のアイソフォームの内, 膜結合性 HLA-G1 および可溶性 HLA-G5 は, NK 細胞の細胞傷害性の抑制に働くことが知られている²⁹⁾。また HLA-G2 については, コラーゲン誘導関節炎モデルマウスへの HLA-G2 の投与実験により免疫抑制効果が確認されている³⁰⁾。さらに, HLA-G1 と HLA-G5 および HLA-G2 と HLA-G6 は, ジスルフィド結合を介したホモ二量体を生体内でそれぞれ形成すること, これらのホモ二量体は単量体よりも高い免疫抑制効果を示すことが報告されている^{21,31)}。その他のアイソフォームの機能については HLA-G の分子構造の複雑さから最終的な結論は得られていない。その理由の一つに HLA-G に対する抗体特異性の問題が挙げられ, これまで開発されてきた利用可能な抗体の特性を評価する試みもなされている³²⁾。

III. HLA-G 分子や遺伝子の発現

HLA-G が発現する細胞や組織については諸説あるが, トロフォブラストの他に胸腺上皮細胞, 赤芽球, 樹状細胞, M2 マクロファージ (抗炎症性マクロファージあるいはアレルギー型マクロファージ), 間葉系幹細胞にて HLA-G の発現が報告されている^{11,33-36)}。

一方, トランスクリプトーム解析から HLA-G 遺伝子の転写レベルを検出する試みも進められている (図 2)。Boegel ら (2018) は, 全転写産物の塩基配列を次世代シーケンサーにより解読した 4,323 種類の RNA-Seq (RNA Sequencing) データを公的データベースから収集し, 遺伝子発現を推し量る指標である RPKM (Reads per kilobase of exon per million mapped sequence reads) 値を 39 種類の組織間で比較解析した。その結果, 胎盤では RPKM 値が 19 と最高値を示し, ランゲルハンス島 (RPKM 値: 8.7), 脳下垂体 (RPKM 値: 2.5) および精巣 (RPKM 値: 1.0) においても比較的高い転写レベルを観察している³⁷⁾。特に, 脳下垂体およびランゲルハンス島における遺伝子発現は, 自己反応性リンパ球の抑制により自己免

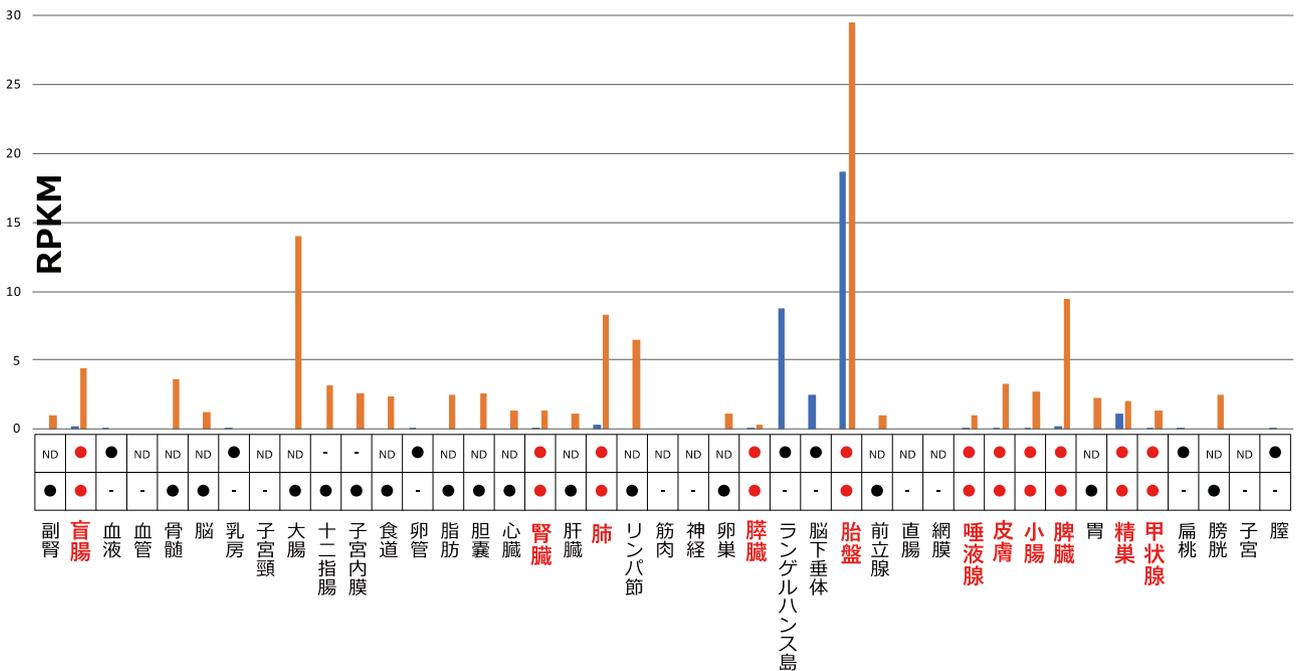


図 2 トランスクリプトーム解析による HLA-G 遺伝子の転写レベルの比較

Boegel ら (2018) により報告された計 39 種類の組織における RNA-Seq データ³⁷⁾ と NCBI から公開されている 27 種類の組織における RNA-Seq データ (HPA RNA-seq normal tissues: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3135>) に基いて作成した。横軸と縦軸は, 計 41 種類の組織および RPKM 値の中央値をそれぞれ示す。青色とオレンジ色の棒は Boegel らのデータおよび NCBI のデータをそれぞれ示す。棒グラフ下の表における「●」, 「-」および「ND」は, 転写産物が認められた組織, 解析しなかった組織および解析したが転写産物が認められなかった組織をそれぞれ示す。表の上段および下段に Boegel らのデータおよび NCBI のデータをそれぞれ示す。赤色の丸と組織名は, 両データにおいて転写産物が共通に観察された組織を示す。

疫疾患を防御している可能性を言及している。肺については161検体中、29検体に1以上のRPKM値が観察されたが、その理由として非がん性の呼吸器疾患に罹患していた可能性があるとしている。このBoegelらの報告とは別に、95人から得られた27種類の正常組織を用いたRNA-Seqのデータ(HPA: Human Protein Atlas RNA-seq normal tissues)がNCBI(National Center for Biotechnology Information)から公開されている(図2)。前述の解析結果と同様に、*HLA-G* 遺伝子の高い転写レベル(RPKM値:30)が胎盤に観察され、他にも大腸、肺、リンパ節および脾臓に比較的高い転写レベルが観察されている。以上の2つの解析結果をまとめると、*HLA-G* 遺伝子は、少なくとも11種類の器官/組織/細胞(盲腸、腎臓、肺、膵臓、胎盤、唾液腺、皮膚、小腸、脾臓、精巣および甲状腺)において転写されていると考えられる。

IV. HLA-G 発現と免疫応答や疾患との関連

HLA-Gは臓器移植の際の免疫応答の抑制、腫瘍やウイルスの宿主免疫系からの逃避、自己免疫疾患などにも関与する。以下にHLA-G発現と免疫応答ならびにウイルスの宿主免疫系からの逃避についての報告例を記す。HLA-G発現と免疫応答の抑制に関してCrispimら(2008)は、同種腎移植を受けた患者を3群(急性拒絶反応群、慢性移植腎症群および拒絶反応なし群)に分け、移植後の腎臓生検検体を用いたHLA-G発現を免疫組織染色により解析した。その結果、拒絶反応なし群のHLA-G発現は急性拒絶反応群や慢性移植腎症群に対して有意に高かったことを報告しており、拒絶反応なし群におけるHLA-G発現がNK細胞による細胞障害活性やCD4陽性T細胞の増殖の2つの作用を阻害したため、同種腎移植後の急性拒絶反応や慢性移植腎症の発症頻度が抑えられたと考察している³⁸⁾。Wastowskiら(2009)は、全身性強皮症患者の皮膚生検検体を用いてHLA-G発現を免疫組織染色により解析し、10年後の生存率を調査した。その結果、HLA-Gを発現する患者群の生存率は、発現の認められない患者群よりも有意に高かったことを報告しており、免疫機能を抑制的に制御するIL(Interleukin)-10濃度が予後良好患者の血清で高値を示したことから、IL-10によるHLA-G発現の促進とそれに伴う病原性CD4陽性T細胞の増殖抑制により合併症が抑えられたと考察している³⁹⁾。Murdacaら(2009)は、

HIV(Human immunodeficiency virus)感染患者群と健常者群の血漿に含まれる可溶性HLA-Gの濃度を酵素免疫測定法により解析した。その結果、HIV感染患者群の可溶性HLA-G濃度が健常者群よりも有意に高かったこと、病状の進行に伴い可溶性HLA-G濃度がさらに高まったことを報告しており⁴⁰⁾。この可溶性HLA-G濃度の上昇によりCD4陽性T細胞やCD8陽性T細胞の増殖が抑制され、宿主の抗ウイルス応答能が低下したことから病状が進行したと考察している。このようにウイルス感染症では、HLA-Gを発現させることによりウイルスが宿主免疫から逃避していると考えられている⁴¹⁾。つまりHLA-G分子の発現は、妊娠、移植、自己免疫疾患などでは免疫応答を抑制することで自己にとって有益である一方、ウイルス感染症等では、宿主免疫からの回避を可能にすることで、自己に不利な役割を果たす。

V. HLA-G と移植との関連

HLA-Gと移植との関連解析は、その母子間の免疫寛容に関連する機能から、ヒトの同種移植にもHLA-Gが関連するであろうとの仮説が立てられたことが発端である⁴²⁾。分子レベルでは、心移植非生着患者の血清中における可溶性HLA-Gの発現レベルが低いこと、腎移植生着患者の血清中には有意に高濃度な可溶性HLA-Gが存在することなどが報告されている^{38,43)}。一方、遺伝子レベルでは、*HLA-G* 遺伝子のエクソン8(3'UTR)に位置する14bpの挿入/欠失多型(rs66554220)が良く知られているが、この14bp挿入型*HLA-G*アレルの転写産物は、14bp欠損型の転写産物と比較するとスプライシング位置に変化が生じエクソン8が92bp短くなる。その結果、挿入型*HLA-G*アレルの転写産物はmRNAの分解に対する耐性が向上することが報告されている⁴⁴⁾。また、3'UTRにはrs66554220以外にも6箇所のSNPが位置しており、それらの一つであるrs1063320を含む部位には、複数のマイクロRNA(miR148a, miR148b, およびmiR152)が結合し*HLA-G*遺伝子のmRNAの転写量を制御することが知られている⁴⁵⁾。このrs66554220やrs1063320が移植成績と関連する多数の報告がある⁴⁶⁻⁴⁹⁾。例として、非血縁間骨髄移植後のサラセミア患者にてrs66554220の欠失アレルのホモ接合患者は、その挿入アレルのホモ接合患者よりも急性GVHD(Graft versus host disease)の発症リスクが15倍高いことが報告されてい

る⁴⁷⁾。その反面, 造血幹細胞移植後の患者にて rs66554220 の挿入アレルのホモ接合患者は, 欠失アレルのホモ接合ならびに挿入欠失のヘテロ接合の患者と比較して重度の急性 GVHD の発症リスクが 3.5 倍高いことが報告されている⁴⁸⁾。その他にも造血幹細胞移植後の転移性腎細胞がん患者にて挿入アレルのホモ接合患者は欠失アレルを有する患者よりも慢性 GVHD の発症リスクが 3.2 倍高くなる報告もある⁴⁹⁾。このように報告により様々な結果が得られており, rs66554220 の挿入/欠失多型と移植成績との関連性については最終的な結論が得られていない。この要因の一つに *HLA-G* 遺伝子のアレル情報や多型情報の不足が挙げられる。そこで筆者らは *HLA-G* 遺伝子のプロモーター・エンハンサー領域から 3'UTR までを含む遺伝子全長のアレル塩基配列を決定し, *HLA-G* 遺伝子の多型性を精査することが必要不可欠と判断した。

VI. *HLA-G* 遺伝子の多型性

(1) IPD-IMGT/HLA データベースにおける *HLA-G* 遺伝子の多型性

IPD-IMGT/HLA データベース (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>) の Release 3.41.0 (2020 年 7 月現在) における *HLA-A* 遺伝子のアレル塩基配列数が 6,192 種類であるのに対して, *HLA-G* 遺伝子のアレル塩基配列数はわずか 82 種類であることから, *HLA-G* 遺伝子は多型の乏しい HLA 遺伝子であるとの認識で正しいと考えられる。それらの内の 51 種類は, 全てのコード配列とイントロン領域の塩基配列が決定されているが, 残りの 29 種類はエクソン 2 と 3 など, 部分的な遺伝子領域の塩基配列のみが決定されている。さらに第 2 区域レベルのアレル数と null アレル数は, それぞれ 21 種類 (G*01:01, G*01:02, G*01:03, G*01:04, G*01:06, G*01:07, G*01:08, G*01:09, G*01:10, G*01:11, G*01:12, G*01:14, G*01:15, G*01:16, G*01:17, G*01:18, G*01:19, G*01:20, G*01:22, G*01:23 および G*01:24) および 4 種類 (G*01:05N, G*01:13N, G*01:21N および G*01:25N) である。ところが, IPD-IMGT/HLA データベースにおける *HLA-G* 遺伝子のアレル塩基配列は図 1A に示した 3.1 kb の範囲のみであり, 非翻訳領域のみで構成されるエクソン 1 (5'UTR) や rs66554220 や rs1063320 が位置するエクソン 8 (3'UTR)

の塩基配列情報は含まれていない (図 1A)。

(2) 日本人における *HLA-G* 遺伝子全長のアレル塩基配列の特徴

HLA-G 遺伝子は全長に渡って多型に乏しいことから, サンガー法や short-read の次世代シーケンシングでは遺伝子全長の塩基配列を決定することは極めて困難である。そこで筆者らは, *HLA-G* 遺伝子のプロモーター・エンハンサー領域から rs66554220 や rs1063320 が位置する 3'UTR までを含む遺伝子全長のアレル塩基配列を long-PCR 法⁵⁰⁾ および long-read の次世代シーケンサーの一種である PacBio RSII (Pacific Biosciences) を用いて決定した。その結果, 約 800 検体から 22 種類の *HLA-G* アレル塩基配列が同定され, コード配列に着目した場合, 6 種類の非同義置換を伴うアレル (G*01:01 (Nov1+Nov2+Nov3), G*01:03, G*01:04, G*01:04_NS1, G*01:04_NS2 および G*01:06) と 2 種類の null アレル (G*01:05N および G*01:21N⁵¹⁾) が見出された。(表 1)。それらの内, G*01:04_NS1 および G*01:04_NS2 は, いずれもエクソン 6 (膜貫通ドメイン) に非同義置換を有する新規アレルである。興味深いことに約 800 検体から検出した 2 種類の null アレルの頻度は計 0.24% となり, これは *HLA-A*, *HLA-B* および *HLA-C* の合計 null アレル頻度 (0.04%) よりも 6 倍高い値を示すことから *HLA-G* 遺伝子の null アレル頻度は比較的高いことが言える (日本組織適合性学会 HLA 推定アレル一覧表 2020 年度版参照)。G*01:05N はアフリカでは HIV の感染リスクを下げ一方, イタリアでは感染リスクを高めることが報告されており⁴¹⁾, 今後, 日本人で検出された null アレルと感染症との関連を精査する必要性が考えられた。

表 1 は, 第 2 区域レベルの *HLA-G* アレルに rs66554220 や rs1063320 の多型情報を加えたものを示す。rs66554220 と rs1063320 からなるハプロタイプは, 「欠失 -C ハプロタイプ」, 「挿入 -G ハプロタイプ」および「欠失 -G ハプロタイプ」の 3 種類が観察され, G*01:01 にはそれら 3 種類のハプロタイプとの連鎖が観察された (G*01:01_Nov1, G*01:01_Nov2, G*01:01_Nov3)。これに対して, その他の *HLA-G* アレルについては, 3 種類のハプロタイプのいずれかと連鎖した。さらに, G*01:01 (Nov1+Nov2+Nov3) および G*01:04 のアレル頻度は, それぞれ 40.6% および 57.9% であることから, それらは日本人で主要なアレルであると考えられる (表

表1 HLA-G アレルの種類, 非同義置換やエクソン 8 の多型の位置およびアレル頻度

HLA-G アレル	エクソン3 (a1)		エクソン4 (a2)		エクソン5 (a3)		エクソン6 (TM)		エクソン8 (3'UTR)		アレル頻度 (%)
	163	400	460	748	845	925	1006	14 bp挿入/欠失	rs1063320_C/G		
G*01:01_Nov1	A	C	C	C	C	A	A	欠失	C	21.43	
G*01:01_Nov2	挿入	G	17.55	
G*01:01_Nov3	欠失	G	1.60	
G*01:03	T	挿入	G	0.62	
G*01:04	.	A	欠失	G	57.88	
G*01:04_NS1	.	A	.	.	.	G	.	欠失	G	0.12	
G*01:04_NS2	.	A	.	.	.	G	.	欠失	G	0.49	
G*01:05N	.	.	Del*	挿入	G	0.18	
G*01:06	T	.	.	挿入	G	0.06	
G*01:21N	.	A	.	T*	.	.	.	欠失	G	0.06	

エクソン番号の括弧はエクソン対応するドメインを, またエクソン番号下の数字はコード配列における多型の位置を示す。「・」は, G*01:01 と同一の塩基であることを示す。灰色背景の「*」は, null アレル生成の原因となる欠落やナンセンス変異を示す。「Nov1, Nov 2 および Nov 3」は, 非同義置換は有さないが, エクソン 8 の多型が異なる 3 種類のアレルをそれぞれ示す。「NS1 および NS 2」は非同義置換を有するアレルをそれぞれ示す。

1)。これら 2 アレルの頻度の高さは, 既報においても示唆されている⁵²⁾。

VII. まとめ

HLA-G 遺伝子は, 少なくとも 11 種類の器官 / 組織 / 細胞 (盲腸, 腎臓, 肺, 膵臓, 胎盤, 唾液腺, 皮膚, 小腸, 脾臓, 精巣および甲状腺) において転写されており, また HLA-G 分子は免疫チェックポイント分子として免疫寛容の誘導等の特有な機能が期待されている。HLA-G 遺伝子は古典的 HLA 遺伝子と比較して多型に乏しい遺伝子であるが, HLA-G 遺伝子の 3'UTR には移植成績との関連が報告されている多型が存在する。しかし, 3'UTR の多型と移植成績との関連については最終的な結論が得られていない。筆者らは, その要因の一つとして HLA-G アレルの情報不足を考え, 3'UTR の多型を含む遺伝子全長の HLA-G アレル塩基配列を 22 種類決定し, その多型性を明らかにした。22 種類の HLA-G アレルから得られた情報は今後の HLA-G 多型と種々の疾患や移植成績との関連解析に必要な不可欠な情報となることを期待する。

VIII. 今後の展望

本稿では, HLA-G 遺伝子の構造, 発現および多型性, さらには日本人の HLA-G 遺伝子全長のアレル塩基配列

の特徴を中心に概説した。HLA-G 遺伝子は, 1980 年初頭に発見されてから 40 年近く経つ。しかし, 機能的および遺伝子的にも不明な点が未だ多く残されていることから, 今後は, HLA-G 多型と種々の疾患との関連解析はもちろんのこと, スプライスバリエーションの生成機序, エピジェネティックな発現制御についてもゲノムの観点から考察を加える必要がある。我々は HLA-G の多型が急性 GVHD の発症リスクと関連する可能性を見出し, 本稿にて示した遺伝子解析結果に基づく詳細な関連解析がより進展し, 診断または治療のツール / ターゲットとして臨床現場へ応用されることを期待したい。

利益相反事項の開示

開示すべき事項なし

引用文献

- 1) Lee N, Malacko AR, Ishitani A, *et al.*: The membrane-bound and soluble forms of HLA-G bind identical sets of endogenous peptides but differ with respect to TAP association. *Immunity* 3(5): 591–600, 1995.
- 2) Heinrichs H, Orr HT: HLA non-A, B, C class I genes: their structure and expression. *Immunol Res.* 9(4): 265–274, 1990.
- 3) Redman CW, McMichael AJ, Stirrat GM, *et al.*: Class I major histocompatibility complex antigens on human extra-villous trophoblast. *Immunology* 52(3): 457–468, 1984.

- 4) Ellis SA, Sargent IL, Redman CW, *et al.*: Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. *Immunology* 59(4): 595–601, 1986.
- 5) Kovats S, Main EK, Librach C, *et al.*: A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* 248(4952): 220–223, 1990.
- 6) Shiroishi M, Tsumoto K, Amano K, *et al.*: Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(15): 8856–8861, 2003.
- 7) Rouas-Freiss N, Marchal RE, Kirszenbaum M, *et al.*: The alpha 1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors? *Proc Natl Acad Sci USA* 94(10): 5249–5254, 1997.
- 8) Fournel S, Aguerre-Girr M, Huc X, *et al.*: Cutting edge: soluble HLA-G1 Triggers CD95/CD95 Ligand-mediated apoptosis in activated CD8+ Cells by Interacting with CD8. *J Immunol.* 164(12): 6100–6104, 2000.
- 9) Lila N, Rouas-Freiss N, Dausset J, *et al.*: Soluble HLA-G protein secreted by allo-specific CD4+ T cells suppresses the allo-proliferative response: a CD4+ T cell regulatory mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(21): 12150–12155, 2001.
- 10) LeMaout J, Caumartin J, Daouya M, *et al.*: Immune regulation by pretenders: cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells. *Blood* 109(5): 2040–2048, 2007.
- 11) Gregori S, Tomasoni D, Pacciani V, *et al.*: Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood* 116(6): 935–944, 2010.
- 12) Curigliano G, Criscitello C, Gelao L, *et al.*: Molecular Pathways: Human Leukocyte Antigen G (HLA-G). *Clin Cancer Res.* 19(20): 5564–5571, 2013.
- 13) Rizzo R, Bortolotti D, Bolzani S, *et al.*: HLA-G Molecules in autoimmune diseases and infections. *Front Immunol.* 18: 5: 592, 2014.
- 14) Carosella ED, Rouas-Freiss N, Tronik-Le Roux D, *et al.*: HLA-G: an immune checkpoint molecule. *Advances in Immunology* 127: 33–144, 2015.
- 15) Carosella ED, Moreau P, Lemaout J, *et al.*: HLA-G: From Biology to Clinical Benefits. *Trends Immunol.* 29(3): 125–132, 2008.
- 16) Geraghty DE, Koller BH, Orr HT: A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc Natl Acad Sci USA* 84(24): 9145–9149, 1987.
- 17) 石谷昭子: HLA-E,-F,-G の発現と機能 胎児・母体間免疫のブラックボックスは開きうるか. *Journal of Nara Medical Association* 53(2): 113–123, 2002.
- 18) 梶川瑞穂, 笠原正典: 非古典的 MHC クラス I 分子の構造と機能. *生化学* 81(3): 189–199, 2009.
- 19) 黒木喜美子, 前仲勝実: Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor (LILR) ファミリーの分子認識. *生化学* 83(8): 715–726, 2011.
- 20) 松下 祥: 妊娠と免疫. *アレルギー* 63(1): 1–5, 2014.
- 21) 黒木喜美子, 喜多俊介, 前仲勝実: HLA の立体構造と免疫制御受容体の分子認識機構. *Major Histocompatibility Complex* 23(2): 80–95, 2016.
- 22) Shiina T, Tamiya G, Oka A, *et al.*: Molecular dynamics of MHC genesis unraveled by sequencing analysis of the 1,796,938 bp HLA class I region. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13282–13287, 1999.
- 23) Paul P, Cabestre FA, Ibrahim EC, *et al.*: Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcripts in human transfected cells. *Human Immunol* 61(11): 1138–1149, 2000.
- 24) Fujii T, Ishitani A, Geraghty DE: A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4. *J Immunol.* 153(12): 5516–5524, 1994.
- 25) Ishitani A, Geraghty DE: Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(9): 3947–3951, 1992.
- 26) Kirszenbaum M, Moreau P, Gluckman E, *et al.*: An alternatively spliced form of HLA-G mRNA in human trophoblasts and evidence for the presence of HLA-G transcript in adult lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(10): 4209–4213, 1994.
- 27) Moreau P, Carosella E, Teyssier M, *et al.*: Soluble HLA-G molecule. An alternatively spliced HLA-G mRNA form candidate to encode it in peripheral blood mononuclear cells and human trophoblasts. *Hum Immunol.* 43(3): 231–236, 1995.
- 28) Tronik-Le Roux D, Renard J, Vérine J, *et al.*: Novel landscape of HLA-G isoforms expressed in clear cell renal cell carcinoma patients. *Mol Oncol.* 11(11): 1561–1578, 2017.
- 29) Zhang WQ, Xu DP, Liu D, *et al.*: HLA-G1 and HLA-G5 isoforms have an additive effect on NK cytotoxicity. *Hum Immunol.* 75(2): 182–189, 2014.
- 30) Takahashi A, Kuroki K, Okabe Y, *et al.*: The immunosuppressive effect of domain-deleted dimer of HLA-G2 isoform in collagen-induced arthritis mice. *Hum Immunol.* 77(9): 754–759, 2016.
- 31) Kuroki K, Maenaka K: Immune modulation of HLA-G dimer in maternal-fetal interface. *Eur J Immunol.* 37(7): 1727–1729, 2007.
- 32) Furukawa A, Meguro M, Yamazaki R, *et al.*: Evaluation of the Reactivity and Receptor Competition of HLA-G Isoforms toward Available Antibodies: Implications of Structural Characteristics of HLA-G Isoforms. *Int J Mol Sci.* 20(23): 5947, 2019.
- 33) Crisa L, McMaster MT, Ishii JK, *et al.*: Identification of a thymic epithelial cell subset sharing expression of the class Ib HLA-G molecule with fetal trophoblasts. *J Exp Med.* 186: 289–298, 1997.

- 34) Menier C, Rabreau M, Challier JC, *et al.*: Erythroblasts secrete the nonclassical HLA-G molecule from primitive to definitive hematopoiesis. *Blood* 104(10): 3153–3160, 2004.
- 35) Nuñez SY, Ziblat A, Secchiari F, *et al.*: Human M2 Macrophages Limit NK cell Effector Functions through secretion of TGF- β and engagement of CD85j. *J Immunol.* 200(3): 1008–1015, 2018.
- 36) Selmani Z, Naji A, Zidi I, *et al.*: Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem Cells* 26(1): 212–222, 2008.
- 37) Boegel S, Löwer M, Bukur T, *et al.*: HLA and proteasome expression body map. *BMC Med Genomics* 11(1): 36, 2018.
- 38) Crispim JC, Duarte RA, Soares CP, *et al.*: Human leukocyte antigen-G expression after kidney transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. *Transpl Immunol.* 18(4): 361–367, 2008.
- 39) Wastowski IJ, Sampaio-Barros PD, Amstalden EM, *et al.*: HLA-G expression in the skin of patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 36(6): 1230–1234, 2009.
- 40) Murdaca G, Contini P, Setti M, *et al.*: Behavior of non-classical soluble HLA class G antigens in human immunodeficiency virus 1-infected patients before and after HAART: Comparison with classical soluble HLA-A, -B, -C antigens and potential role in immune-reconstitution. *Clin Immunol.* 133(2): 238–244, 2009.
- 41) Amiot L, Vu N, Samson M: Immunomodulatory Properties of HLA-G in Infectious Diseases. *J Immunol Res.* 2014: 298569, 2014.
- 42) Rouas-Freiss N, LeMaoult J, Moreau P, *et al.*: HLA-G in transplantation: a relevant molecule for inhibition of graft rejection? *Am J Transplant.* 3(1): 11–16, 2003.
- 43) Lila N, Amrein C, Guillemain R, *et al.*: Human leukocyte antigen-G expression after heart transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. *Circulation* 105(16): 1949–1954, 2002.
- 44) Rousseau P, Le Discorde M, Mouillot G, *et al.*: The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3'UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Human Immunology* 64(11): 1005–1010, 2003.
- 45) Tan Z, Randall G, Fan J, *et al.*: Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. *Am J Hum Genet.* 82(1): 829–834, 2008.
- 46) Xue S, Yang J, Yao F, *et al.*: Recurrent spontaneous abortions patients have more – 14 bp/+14 bp heterozygotes in the 3'UT region of the HLA-G gene in a Chinese Han population. *Tissue Antigens.* 69 1: 153–155, 2007.
- 47) La Nasa G, Littera R, Locatelli F, *et al.*: The human leukocyte antigen-G 14-basepair polymorphism correlates with graft-versus-host disease in unrelated bone marrow transplantation for thalassaemia. *Br J Haematol.* 139(2): 284–288, 2007.
- 48) Boukouaci W, Busson M, Fortier C, *et al.*: Association of HLA-G low expressor genotype with severe acute graft-versus-host disease after sibling bone marrow transplantation. *Front Immunol.* 2: 74, 2011.
- 49) Crocchiolo R, Ringden O, Bay JO, *et al.*: Impact of HLA-G polymorphism on the outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for metastatic renal cell carcinoma. *Bone Marrow Transplant.* 53(2): 213–218, 2018.
- 50) Shiina T, Ota M, Shimizu S, *et al.*: Rapid evolution of MHC class I genes in primates generates new disease alleles in man via hitchhiking diversity. *Genetics* 173: 1555–1570, 2006.
- 51) Faucher MC, Louvanto K, Syrjänen S, *et al.*: Characterisation of the novel HLA-G null allele, HLA-G*01:21N, in Finnish individuals. *HLA* 91(2): 146–147, 2018.
- 52) Ishitani A, Kishida M, Sageshima N, *et al.*: Re-examination of HLA-G polymorphism in African Americans. *Immunogenetics* 49(9): 808–811, 1999.

Gene structure, expression and polymorphism of the *HLA-G* locus

Shingo Suzuki¹⁾, Yoshie Kametani¹⁾, Takashi Shiina¹⁾

¹⁾Department of Molecular Life Sciences, Division of Basic Medical Science and Molecular Medicine, Tokai University School of Medicine

The *HLA-G* gene is classified as one of the non-classical HLA class I genes because of its low level of polymorphism, and its expression restricted to particular cell types. Although classified as non-classical, the HLA-G protein appears to play a role as an immune checkpoint molecule in pregnancy immunity, suppressing immune responses during organ transplantation, immune escape of tumors and viruses, and developing autoimmune diseases. The gene is known to be not highly polymorphic, but it has been recently reported that 14 bp insertion/deletion polymorphism (rs66554220) and one SNP (rs1063320) located in the 3'UTR of the *HLA-G* gene are associated with the risk of acute graft versus host disease and overall survival. We report here the determination of 22 full-length *HLA-G* allele sequences in the Japanese population, including the regions such as 3'UTR that are absent from the allele sequences released from the IPD-IMGT/HLA database.

Key Words: human leucocyte antigen; HLA, HLA-G, gene structure, gene function, polymorphism

第4回 関東HLA研究会記録

会 期 : 2021年5月15日(土曜日)

開催方法 : Zoom Webinar で実施

世 話 人 : 石田 英樹

東京女子医科大学移植管理科

HLAの基礎講習-1 HLAの基礎知識

小川 公明

特定非営利活動法人 白血病研究基金を育てる会

HLAは、ヒトの主要組織適合性遺伝子複合体（MHC）として、1900年代中ごろに発見されました。MHCは免疫応答を制御する重要な要素でありヒトの遺伝子の中で最も多型に富むことが知られています。免疫は、自己、非自己を如何に認識し、非自己を排除していくのが基本になります。このような機能は、有顎類以降の脊椎動物が獲得した仕組みです。HLA発見の経緯も、このような免疫の研究の中にもありました。ヒトの場合、この自

己、非自己の主要なマーカーがHLAでした。このような生物学的背景により、HLAは幾つもの特徴を持っています。

今回は、この特徴をなるべく、一般の方々にも分かり易く解説することに致します。この特徴を理解することは、HLA検査の精度維持および、検査結果の臨床的意義の把握、臨床への説明に必要な能力と私は考えています。

HLAの基礎講習-2 HLAタイピングに必要な技術と知識

奥平 裕子

ジェノダイブファーマ株式会社

日本組織適合性学会 QCWS のテーマの一つである「正確なDNAタイピングが行えること」を達成するために、安定した技術と知識が最重要課題であることを、昨年のQCWSの総合解析でも述べた。ミスアサインとなる原因は、反応不良などの技術的な面と、それを補う知識の不足であるといっても過言ではない。そこで本講習ではDNAの濃度測定や、ネガティブコントロール・ポジティブコントロール測定の重要性、反応不良が発生する原因などを原理と合わせて考えることで一層明確にする

DNAの濃度測定はPCRを原理とする方法において大変重要なポイントとなる。また、ネガティブコントロール、ポジティブコントロールの測定はその反応の有無が

実験の成立を意味する。それぞれのコントロールの反応から、反応不良の原因を探ることも可能である。

HLAタイピングでは、安定した技術に加え、頻度やハプロタイプに代表されるような知識も判断材料となる。頻度やハプロタイプの推定により、ミスアサインを避けられたケースを紹介し、検査結果を知識で裏付けすることの重要性を示す。

日常検査では、安定した技術の習得と新しい知識の取得をし、より正確なHLAタイピングを行うことが臨まれる。本講習が少しでも皆様のお役に立てれば幸いです。

HLAの基礎講習-3 HLA抗体・エピトープ解析

○橋口 裕樹¹⁾, 金本 人美¹⁾, 本山健太郎¹⁾²⁾

¹⁾ 福岡赤十字病院 移植センター

²⁾ 福岡赤十字病院 移植外科

抗HLA抗体検査は、移植医療において抗体関連型拒絶を疑う時、その結果が治療方針に大きく関わることもある重要な検査である。この検査を日常的に実施できるようになった要因として、2018年に全ての臓器移植後において保険取載になったこと、2020年に移植前に実施した抗HLA抗体検査（移植が実施された場合に限る）が算定できるようになったことが大きい。これにより Preformed DSA, de novo DSA の評価が経時的に可能となり、検査数も増加した。

検査側に目を向けると、検査試薬は多くラインナップされ、どの試薬を採用するかは検査施設の裁量に委ねら

れる。また抗体検査が生化学検査のように、施設間差が小さければ問題ないが、抗体検査では少なからず施設間差を認める。また結果報告に使用される蛍光強度(nMFI)の数値の取り扱い、カットオフ値設定等、結果解釈に混乱を招きかねないこともあり、結果報告時には臨床との積極的な情報共有が重要となる。

近年では、抗HLA抗体のエピトープ解析も専用ソフトの登場で比較的簡便となった。ドナーとレシピエント間のエピトープレベルでのミスマッチ確認や、抗体特異性同定試験で検出された抗体をエピトープ解析することにより、より詳細な情報を得ることが期待される。

シンポジウム：臨床とHLA-1 心臓移植後管理における抗体存在の意義

布田 伸一

東京女子医科大学大学院 重症心不全制御学分野

心臓移植の待機期間が4年と長いわが国においては、95%の待機患者が補助人工心臓のサポート状態で待機しており、移植前に生じる様々な事象により preformed 抗体が産生されやすい環境にある。また、心臓移植後慢性期の子後を規定する移植心冠動脈病変 (Cardiac Allograft Vasculopathy: CAV) 進展には抗体関連の免疫機序による炎症が主体をなし、そこに非免疫機序（代謝、ドナー心由来、等）が加わって病態が形成される。CAVの診断は、冠動脈造影検査、血管内超音波法、冠動脈予備能検査、等で行われるが、その進行は非常に早

い場合もあり、preformed 抗体を持つ症例は移植直後から、De Novo 抗体出現例ではその後のCAVへの進展に注意が必要である。そこにはClass 1, Class 2-抗HLA抗体に補体結合か非結合か、またどのIgGサブクラスによるものが関与する可能性がある。抗体関連型拒絶 (AMR) の治療は、今世紀に入り、様々な薬物治療、等が行われるようになり、その子後効果に興味深い報告も散見される。non-HLA抗体によるAMRからCAVへの進展も含め、この領域へのさらなる検討が必要である。

シンポジウム：臨床と HLA-2 肝臓移植と抗体

江川 裕人

東京女子医科大学 外科学講座 肝胆脾外科分野

抗体関連拒絶は、まず、腎臓移植の領域で認識され、基礎的研究と臨床での実践が調和を保ち発達し、成績向上に貢献してきた。肝臓は1990年代初期に一部の医師達に注目されはしたが肝臓移植における抗体関連拒絶の存在そのものを否定する外科医が多かった。抗体関連拒絶が表立って議論されなかった理由として、腎臓に比べ臓器が大きく肝臓の再生機能もあり障害が目立たないこと、手術侵襲が大きく早期機能不全や感染症の修飾が大きく抗体関連拒絶を認識することが困難であったこと、最後に抗体関連拒絶の存在を信じていないために気が付かなかったことがあげられる。手術が確立され無輸血手術も日常となり免疫抑制と感染予防法が発達し、抗体の測定法が確立されるようになってようやく広く認識され

始めた。最近明らかになってきたこととして、腎臓と同じく、移植前感作症例で成績が低下すること、超早期抗体関連型拒絶は減感作療法で回避できる可能性があること、免疫抑制減量症例で de novo 抗体が生じやすいこと、クラス II 抗体は遷延し線維化などの臓器不全を合併しやすいこと、免疫抑制を強化することで改善することがあげられる。一方で、長期経過例で、シングルビーズ法で DSA を確認して CDC 陽性でも組織学的変化が現れない症例もある。腎臓で確認されてきた知見は肝臓でも確認されるが中には障害につながらない症例がある。肝臓には抗体関連型拒絶に対する耐性が存在する可能性がある。今後の魅力的な研究分野である。

シンポジウム：臨床と HLA-3 抗 HLA 抗体陽性患者に対する脱感作治療の実際

石田 英樹, 海上 耕平

東京女子医科大学 移植管理科

抗ドナー抗体が関与する拒絶反応は、急性細胞性拒絶反応とは異なり移植腎喪失という悲劇的な結末の可能性を伴うハイリスクな病態である。移植腎生検において傍毛細血管領域への微慢性の C4d の沈着、血管炎および糸球体炎などが観察され、患者の血清中には抗ドナー抗体が検出される。治療戦略としては、抗ドナー抗体の除去および抗体産生の抑制である。現時点での具体的な選択肢としては、血漿交換療法（血液吸着）、タクロリムス、ミコフェノール酸モフェティール、大量ガンマグロブリン療法、抗 CD20 抗体（リツキシマブ）および脾臓摘出などが報告されており、各施設間によってこれらの組み

合わせや投与量は異なるものの、クロスマッチ陽性患者を陰性化（脱感作）させ、移植し透析離脱に導くことに成功している。さらに近い将来、より B 細胞を選択的に抑制したり、選択的 T 細胞活性阻害剤も脱感作療法の新たな選択肢として臨床の場に登場するかもしれない。

このような高感作患者に対し脱感作目的に移植前にガンマグロブリンを大量投与することが2019年12月に保険収載された。この項では現在、術前に抗 HLA 抗体陽性患者に対して行われている抗体検出の方法の実際、および抗体を脱感作するための治療戦略のそれぞれについて

て概説し、最後に当科で行われているガンマグロブリンの大量投与を中心とした脱感作療法の実際についてお話したい。

ワークショップ-1 臓器移植における組織適合性検査のケーススタディー

石塚 敏

東京女子医科大学 中央検査部 移植関連検査室

臓器移植における生体防御反応には、Tリンパ球が主体となる細胞性免疫とBリンパ球が主体となる液性免疫があり、それぞれ臓器移植後の免疫学的拒絶反応に関与している。その免疫学的拒絶反応を回避する目的として組織適合性検査は重要である。

これまでの経験から、臓器提供ドナーの組織適合性抗原（主にHLA）に対する抗体（ドナー特異的抗HLA抗体）やドナーのABO血液型抗原に対する抗体（ドナー特異的抗血液型抗体）を産生する患者に臓器を移植すると、速やかに臓器の血流障害を生じ、移植機能廃絶や死亡につながる可能性がある（抗体関連型拒絶反応）。また、

HLAのDR適合度によっても細胞性拒絶反応の発症率が異なることが知られている。

本発表では、ケーススタディーとして本院における小児の腎臓移植症例を提示して移植後の抗体関連型拒絶反応に対する治療効果について腎臓組織診断とHLAの組織適合性からみたEpitope Matching、そして移植後に産生された抗体に対するEpitope Analysisについて解析する。特に抗体に関しては、Luminex法とflow cytometry法によるTotal-IgGと4種類のサブクラス（IgG1, IgG2, IgG3, IgG4）およびヒト補体C1qに反応するIgGについて報告したい。

ワークショップ-2 輸血・造血移植における組織適合性検査のケーススタディー

杉本 達哉

東海大学医学部付属病院 臨床検査技術科 輸血室

HLAに関連する組織適合性検査は輸血や造血細胞移植において重要な役割を担っている。血小板輸血不応ではHLA抗体の有無を確認することが大切になる。血小板表面に発現しているHLAクラスI抗原とHLA抗体の反応により、予期した血小板輸血効果が得られない状況が長期間続くと致命的な影響を引き起こす危険性がある。また、造血細胞移植では患者とドナー適合性確認のためのHLAタイピング検査は必要不可欠となっており、ハプロタイプを意識した結果の確認が必要である。さい

帯血移植では患者にドナーに対するHLA抗体（Donor Specific Antibody: DSA）が存在する場合、生着率が有意に低下することから、DSAを避ける移植が重要になってくる。これらのHLA関連検査の実施には専門的技術と知識をもって対応することが必要である。ただ、実際にHLA関連検査を実施している施設は血液検査や生化学検査項目のような一般的臨床検査の実施施設数と比較して少数であるのが現実である。そのため、HLA関連検査実施のための技術や知識情報はもちろん大切である

が、HLA 関連検査の結果解釈や課題等についての情報の方が多くの施設で求められていると推察される。そこで、本ワークショップでは「輸血・造血細胞移植におけ

る組織適合性検査のケーススタディー」と題して、当院の経験例等から HLA 関連検査に関する結果解釈や課題等について概説していく。

一般口演発表 -1

HLA-A*11:01:01:01, HLA*C*12:02:02:01-HLA-B*52:01:02:02, age and sex are associated with severity of Japanese COVID-19 with respiratory failure

Khor Seik-Soon¹⁾, Yosuke Omae¹⁾, Nao Nishida²⁾, Masaya Sugiyama²⁾, Noriko Kinoshita³⁾, Tetsuya Suzuki³⁾, Michiyo Suzuki³⁾, Satoshi Suzuki⁴⁾, Shinyu Izumi⁵⁾, Masayuki Hojo⁵⁾, Norio Ohmagari³⁾, Masashi Mizokami²⁾, Katsushi Tokunaga¹⁾

¹⁾ Genome Medical Science Project, National Center for Global Health and Medicine Hospital

²⁾ Genome Medical Sciences Project, National Center for Global Health and Medicine

³⁾ Disease Control and Prevention Center, National Center for Global Health and Medicine Hospital

⁴⁾ Biobank, National Center for Global Health and Medicine

⁵⁾ Department of Respiratory Medicine, National Center for Global Health and Medicine Hospital

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), the virus causing coronavirus disease 2019 (COVID-19) was announced as an outbreak by the World Health Organization (WHO) in January 2020 and as a pandemic in March 2020. The majority of infected individuals have experienced no or only mild symptoms, ranging from fully asymptomatic cases to mild pneumonic disease. However, a minority of infected individuals develop severe respiratory symptoms. The objective of this study was to identify susceptible HLA alleles and clinical markers that can be used in risk prediction model for the early identification of severe COVID-19 among hospitalized COVID-19 patients. A total of 137 patients with mild COVID-19 (mCOVID-19) and 53 patients with severe COVID-19 (sCOVID-19) were recruited from the Center Hospital of the National Center for Global Health and Medicine (NCGM), Tokyo, Japan for the period of February–August 2020. High-resolution sequencing-based typing for eight HLA genes was performed using next-generation sequencing. In

the HLA association studies, HLA-A*11:01:01:01 [$P_c=0.013$, OR=2.26 (1.27–3.91)] and HLA-C*12:02:02:01-HLA-B*52:01:01:02 [$P_c=0.020$, OR=2.25 (1.24–3.92)] were found to be significantly associated with the severity of COVID-19. After multivariate analysis controlling for other confounding factors and comorbidities, HLA-A*11:01:01:01 [$P=3.34E-03$, OR=3.41 (1.50–7.73)], age at diagnosis [$P=1.29E-02$, OR=1.04 (1.01–1.07)] and sex at birth [$P=8.88E-03$, OR=2.92 (1.31–6.54)] remained significant. The area under the curve of the risk prediction model utilizing HLA-A*11:01:01:01, age at diagnosis, and sex at birth was 0.772, with sensitivity of 0.715 and specificity of 0.717. To the best of our knowledge, this is the first article which describes associations of HLA alleles with COVID-19 at the 4-field (highest) resolution level. Early identification of potential sCOVID-19 could help clinicians prioritize medical utility and significantly decrease mortality from COVID-19.

一般口演発表-2

HLA クラス I 遺伝子の 3'- スプライス部位における異質な進化学的保存性

椎名 隆¹⁾, 水谷 晃子¹⁾²⁾, 清水まり恵³⁾, 高橋 大輔³⁾, 重成 敦子¹⁾, 田中 政之⁴⁾, 田中 正史¹⁾

¹⁾ 東海大学 医学部

²⁾ 帝京平成大学 健康メディカル学部

³⁾ 日本赤十字社 血液事業本部 中央血液研究所

⁴⁾ 東海大学 生命科学統合支援センター

【背景と目的】我々は、C*03:23N のエキソン 3 に位置する 1 個の SNP (G406A) が新たな 3' スプライス部位 (3' 部位) を生成し、その結果、コード配列にフレームシフトを引き起こすことにより正常な HLA 発現が抑制される分子機序を見出している (HLA. 2020. 95: 555 など)。興味深いことに、この新たに生成された 3' 部位の上流には、一般の遺伝子同様にピリミジンリッチな塩基配列 (Py リッチ配列) が位置するのに対して、本来のイントロン 2 の 3' 部位上流には、プリンリッチな塩基配列 (Pr リッチ配列) が位置する。そこで本報告では、この Pr リッチ配列の意義を理解する始発点として、HLA/MHC 遺伝子の 3' 部位上流における進化学的な特徴を見いだすことを目的とした。

【対象と方法】公的データベースから公開されている

HLA/MHC 遺伝子全長の塩基配列を対象とし、3' 部位の上流側に位置する 10 塩基について比較解析した。また、ヒトゲノム配列から約 19 万か所の 3' 部位上流の塩基配列を抽出し、Pr リッチ配列の割合を調査した。

【結果および考察】Pr リッチ配列 (>7 塩基/10 塩基) は HLA クラス I 遺伝子のイントロン 2 のみに観察され、HLA アレル間で高い保存性を示した。また、イントロン 2 の Pr リッチ配列は、カモノハシからヒトまでの哺乳類のみに観察された。さらに、ヒトゲノムにおける全 3' 部位上流に対する Pr リッチ配列 (>7 塩基/10 塩基) の割合はわずか 0.3% であったことから、極めて異質な Pr リッチ配列が HLA クラス I 遺伝子のイントロン領域に保存されていることが示唆された。

一般口演発表-3

日本人における心臓移植再登録症例での抗 HLA 抗体含めた臨床的特徴

服部 英敏¹⁾, 野本美智留¹⁾, 菊池 規子¹⁾, 市原 有起²⁾, 斎藤 聡²⁾, 新浪 博士²⁾, 萩原 誠久¹⁾, 布田 伸一³⁾

¹⁾ 東京女子医科大学 循環器内科

²⁾ 東京女子医科大学 心臓血管外科

³⁾ 東京女子医科大学大学院 重症心不全制御学分野

【背景】心臓移植後に移植心冠動脈病変 (CAV) が進行した場合、再移植が必要になる。日本において、再移植を必要とする患者の抗 HLA 抗体を含めた臨床的特徴の報告はない。

【方法】当院通院中の国内移植、海外渡航移植症例 84 例

を後ろ向きに検討した。

【結果】84 例中 5 例 (6%) が再移植登録を必要とした。再移植登録時平均年齢は 31 ± 15 歳、移植から再移植登録までの期間は平均 13 ± 7 年であった。いずれも CAV の進行により再移植登録を必要とした。抗 HLA 抗体検

査が可能となった以降に再移植登録された2例はいずれもドナー特異的抗体(DSA)が持続陽性であり、抗体関連型拒絶(AMR)を認めた。代表的症例を提示する。現在25歳男性で、拡張型心筋症により3歳時に心臓移植を施行、13歳時に心筋生検でC4d陽性、DSA陽性(HLA Class II DQ4, DQ8抗体陽性)を認め、AMRと診断、ステロイドパルス療法、血漿交換療法、リツキシマブ投与

を行った。また、冠動脈造影では4PD 75%, seg9-1 90%, seg12 90%, seg13 90%狭窄を認めた。その後もDSAは消失せず、CAVの進行、心不全の増悪を認め、移植後22年目に再移植登録を行った。

【結語】日本人においてもCAVは再移植登録の主因となり、DSAとの関連を認めた。

一般口演発表-4

De novo DSA 検出時に併存する non-DSA のエプレット解析

尾本 和也¹⁾²⁾, 海上 耕平³⁾, 神澤 太一²⁾, 古澤美由紀¹⁾, 石田 英樹²⁾³⁾, 田邊 一成²⁾

¹⁾医療法人社団 ときわ会余丁町クリニック

²⁾東京女子医科大学病院 泌尿器科

³⁾東京女子医科大学 病院移植管理科

【背景・目的】抗HLA抗体に関してDe novo DSA(dnDSA)は腎予後に大きく関与するが、同時に出現するNon-DSA(NDSA)の臨床的意義は不明な点が多い。今回その意義を明らかにする目的で両者に対するエプレット解析を行った。

【方法】LABScreen Single Antigen法で判明しているClass II dnDSA出現症例において、ドナー、レシピエント共にHLA-A, B, C, DPB1, DQB1, DRB1のallele解析が行われている13例を対象とし、HLA Fusion MatchMakerを用いてClass II NDSAのエプレット解析を行った。

【結果】dnDSA発症13例中12例(92%)が抗DQ抗体

であり、1例は抗DR抗体であった。全例においてNDSAの出現を認めたが、10例(77%)においてdnDSAと同様のエプレットを認識する抗HLA抗体を認め、10例中5例は検出されたNDSAの全てがdnDSAと同様のエプレットを認識する抗体であり、その80%が抗DQ抗体であった。一方でdnDSAに関連するエプレットが検出されていない症例が1例存在した。

【結語】今回の検討においては症例数が少ないものの、dnDSA出現時のNDSAは高率に同一のエプレットを認識することが判明した。しかしながらNDSAが腎予後に直接的に関与するかはさらなる検討が必要である。

一般口演発表-5

ABO血液型不適合肝臓移植における血液型IgG抗体のサブクラス解析

笹野 まゆ¹⁾, 石塚 敏¹⁾, 古屋 海¹⁾, 藤田 龍司¹⁾, 小林 悠梨¹⁾, 安尾美年子¹⁾,
三浦ひとみ¹⁾, 江川 裕人²⁾

¹⁾東京女子医科大学 中央検査部移植関連検査室

²⁾東京女子医科大学 大学消化器外科

【背景・目的】わが国では、生体ドナーからの移植が主であることから血液型が異なるドナーからの移植は肝臓、腎臓で20%強の割合を占めている。その中で約5%に抗体関連型拒絶反応が生じて移植臓器の機能廃絶や死亡につながっている。一方で、術後に一定量のDSAが維持されているにも関わらず臓器障害が生じない例（臨床的免疫寛容）も報告されている。我々は、この臨床的免疫寛容が生じる違いを解明するため血液型IgG抗体についてサブクラス解析法を考案し、それぞれの反応性の違いを移植症例の血液型別に解析したので報告する。

【対象および方法】対象は、東京女子医科大学においてABO血液型不適合肝臓移植を施行した19症例である。方法は、間接抗グロブリン法 Indirect anti-globulin test

(ID-AGT), flow cytometry 法による Total-IgG 抗体と4種類のサブクラス (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) およびヒト補体 C1q に反応する IgG 抗体の発現について測定した。

【結果】A型B型O型それぞれの血液型においてIgG2抗体を主として保有している症例が多く、IgG4抗体を保有している症例が少なかった。特にO型は、A型B型に比べ抗体価が高い傾向にあり、抗A抗B共にC1q (IgM 処理) 陽性症例が多かった。

【結語】本研究の結果から症例数は少ないものの、O型の移植症例はA型B型に比べてサブクラスの保有する割合が異なることから、今後、血液型別に移植予後との関連性について解析を進める。

一般口演発表-6

生体肝移植における術前より存在するドナー特異的抗HLA抗体の術後IgGサブクラスの変化について

平田 義弘¹⁾, 小寺 由人¹⁾, 石塚 敏²⁾, 根本 慧¹⁾, 加藤 隆章¹⁾, 江川 裕人¹⁾

¹⁾ 東京女子医科大学 消化器・一般外科

²⁾ 東京女子医科大学 中央検査部

【背景】肝移植においてドナー特異的抗HLA抗体(DSA)陽性の危険性および術前脱感作の重要性は認識されているが、脱感作の機序についてはいまだ明らかではない。我々は術前DSA陽性患者に対しリツキサンによる脱感作を行い安全に生体肝移植を施行しているが、術前DSA陽性かつCDC陽性患者3例において術前後のIgGサブクラスを解析したので報告する。

【対象と方法】術前DSAをLABScreenで測定し、MFIが10,000以上であった生体肝移植レシピエント6例に対しリツキサン375mg/m²による脱感作療法を施行した。リンパ球細胞傷害試験(CDC)陽性の3例を対象として、術前後でCDC, LABScreen single antigenによるDSA測定, C1qテスト, およびDSAのIgGサブクラスを測定した。

【結果】3例全例で長期生存を確認している。1例でDSAが長期陽性であったが他2例では速やかに陰性となった。DSA陽性が続いた1例では術後900日の時点でDSA class I, IIともにMFI 3000前後であった。CDCはT cellが術後3日で陰性となったが、B cellは術後900日に陰性化した。C1qは術後3日目に陰性となった。DSAのIgGサブクラスはDRでIgG1からIgG2に変化していた。残り2例においては、IgGサブクラスはIgG1優位のままであった。

【結論】Preformed DSAの細胞傷害性消失の機序として、抗体産生の低下やIgGサブクラスの変化による補体活性化能の低下が関与している可能性が示唆された。

第4回 東海北陸 HLA 研究会

日 時：2021年7月24日（土）13時00分～

会 場：ZoomによるWeb開催

当番世話人：西川 晃平（三重大学医学部 医学系研究科 腎泌尿器外科学）

研究会事務局：三重大学医学部 医学系研究科 腎泌尿器外科学 内

一般演題 1

O-1 従兄弟からの HLA 半合致末梢血幹細胞移植の一例

西村廣明¹、伊野和子¹、大石晃嗣²、俵功³

三重大学医学部附属病院 血液内科¹、三重大学医学部附属病院 輸血・細胞治療部²

三重大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学³

【症例】27歳男性。X-2年9月フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病と診断されA病院にて化学療法施行後、分子遺伝学的寛解(molecular CR; mCR)が得られた。その後維持療法継続予定であったが、転居に伴い通院が途絶え、X-1年11月再発したため、同年12月同種移植を含めた加療目的に当院紹介となった。実姉のHLAは完全不一致であり、骨髄バンクに登録。この間の化学療法により再度mCRを達成した。最終的に骨髄バンクドナーおよび十分な細胞数の臍帯血は検索されず、両親はドナー適格基準を満たさなかったため、HLA半合致の従兄弟から、血縁間HLA半合致移植施行となった。移植後GVHD予防として、シクロフォスファミド(Posttransplant CY; PT-CY)を用いた。移植翌日より高熱を認めていたが、day 3、4のPT-CY後に解熱し、day 17好中球生着、以後、重篤な感染症の合併なく経過した。現時点でGVHDや再発所見なく経過している。【まとめ】PT-CYを用いた血縁間HLA半合致移植は、近年多数例での解析が行われ、その安全性が示されている。従来困難であった多くの同種移植が施行され、重症GVHDの予防が可能となる一方で、移植後の再発が問題となっており、今後、至適な前処置およびPT-CYの検討が期待されている。

一般演題 1

O-2 臍帯血移植後の一次生着不全に対して HLA 半合致移植を実施し生着が得られた2例

武田健一郎、内藤知希、石際康平、土門洋祐、一木朝絵、川口裕佳、江口基紀、大引真理恵
後藤辰徳、森下喬允、小澤幸泰、西田徹也

名古屋第一赤十字病院 血液内科

一次生着不全は、同種造血幹細胞移植後に造血回復が得られない状態で、致命的合併症だが標準的な治療法は確立しておらず、可能な症例は再移植を目指すこととなる。一次生着不全の発症には様々な要因が関与しているが、臍帯血移植では他のグラフトより高率で一次生着不全を来しうる。臍帯血移植後に一次生着不全を発症し、HLA 半合致移植で生着が得られた 2 例を経験したため報告する。【症例1】59 歳男性。骨髄異形成症候群に対し、前処置: Fludarabine (Flu, 180 mg/m²) + Melphalan (Mel, 80 mg/m²) + Busulfan (BU, 12.8 mg/kg)、GvHD 予防: Tacrolimus (Tac) + 短期 Methotrexate (MTX) とし臍帯血移植を実施したが一次生着不全を来した。Flu (120 mg/m²) + Cyclophosphamide (CY, 60 mg/m²) + total body irradiation 2Gy を前処置として臍帯血移植を実施したが再び一次生着不全を来した。娘より Flu (30 mg/m²) を前処置、GvHD 予防に Tac + Mycophenolate mofetil (MMF) + Post CY を用いた HLA 半合致移植を実施し移植後 10 日目に生着を得た。急性 GvHD の発現は認めず、現在まで無病生存している。【症例2】26 歳男性。急性リンパ性白血病と診断され、化学療法にて寛解となったため HLA 一致の弟より骨髄移植を実施したが移植後早期再発(46 日目)した。再寛解導入療法を実施し寛解が得られたため、Flu (180 mg/m²) + Mel (80 mg/m²) + BU (12.8 mg/kg) を前処置に、GvHD 予防として Tac + 短期 MTX を用いて臍帯血移植を実施したが一次生着不全を来した。母より Flu (90 mg/m²) を前処置に、GvHD 予防に Tac + MMF + Post CY を用いた HLA 半合致移植を実施し 18 日目に生着を得た。急性 GvHD(皮膚 stage 2、grade I) は外用薬のみで改善し、現在まで無病生存している。

一般演題 1

O-3 ゲノム編集をもちいた FLT3-ITD 変異白血病の新規治療標的の探索

花村一朗¹、シバスダラン・カルナン²、太田明伸²、高杉壮一¹、中村文乃¹、高橋美裕希¹
内野かおり¹、村上五月¹、水野昌平¹、鈴木進³、上田龍三³、高見昭良¹

愛知医科大学 血液内科¹、愛知医科大学 生化学²、愛知医科大学 腫瘍免疫³

FMS 様チロシンキナーゼ 3 の内部タンDEM増幅(FLT3-ITD)変異白血病は、急性骨髄性白血病の25%で認められ、従来治療では5年生存10%前後と極めて予後不良である。近年開発されたFLT3キナーゼ阻害剤は、FLT3-ITD患者の予後を改善しつつあるが、耐性患者も多く、長期的効果は不十分である。今回、我々はFLT3-ITD 改変ヒト白血病細胞クローンを作製し、FLT3キナーゼ阻害剤以外の分子標的薬の探索を行い、新規の治療標的としてCD52を見いだしたので報告する。

FLT3-ITD 改変細胞では、CD52の発現亢進とともに、CD52抗体薬(アレムツズマブ)のADCCを介した高い抗腫瘍活性が認められた。遺伝子改変細胞では、従来手法による遺伝子導入細胞と異なり、対象遺伝子の過剰発現を来さず患者細胞をより正確に再現できるため、新規分子標的の同定が期待できる。今後は疾患モデル細胞におけるHLA発現変化なども検討していく予定である。

一般演題 1

O-4 術前 HLA 抗体検査で予測できなかった夫婦間生体腎移植後促進急性(抗体関連型)拒絶反応の一例

愛知医科大学 外科学講座 腎移植外科¹

愛知医科大学 腎疾患・移植免疫学寄附講座²

奥村真衣¹、安次嶺聡¹、石山宏平¹、三輪祐子²、岩崎研太²、小林孝彰^{1,2}

【症例】55 歳女性、身長 157cm、体重 55kg。IgA 腎症を原疾患とする慢性腎不全に対し、55 歳時に 56 歳夫をドナーとする血液型適合生体腎移植術(PEKT)を施行した。輸血歴はなし、妊娠歴あり。術前 HLA タイピングで 6 ミスマッチ、FCXM T(-)、B(-)、Flow PRA Screening test で class I(-)、class II(+)の結果であったため、HLA 抗体特異性検査(LABScreenSAB)を施行した。DSA は陰性であったため移植前の脱感作療法は行わなかった。手術は WIT4 分 55 秒、TIT1 時間 17 分、初尿 3 分 5 秒で術中トラブルなく終了。周術期の免疫抑制剤は TAC、MMF、PRD、Basiliximab を使用した。

【経過】術後 4 日目 Cre1.63mg/dl。術後 6 日目 Cre2.58mg/dl と上昇あり、腎臓超音波検査で拡張期血流速度の低下を認めた。抗体関連型拒絶反応を疑い DFPP(3 回)、ステロイドパルスとしてメチルプレドニゾロン 500mg/body(3 日間)、Rituximab で加療開始した。術後 6 日、14 日の検体で DSA(DRB1*14:54)が検出された。術後 15 日目に行った移植腎生検の結果で抗体関連型拒絶反応、CNI 毒性と診断されたため、術後 16 日目に IVIG(免疫グロブリン 0.5g/kg)を 4 日間投与、TAC の減量調整を行った。術後 21 日目に Cre1.32mg/dl と腎機能改善を認め、軽快退院となった。

【結語】腎移植後に抗体関連型拒絶反応を来した 1 例を経験した。術前検査と術後経過の詳細について報告する。

一般演題 1

O-5 In silico 解析を用いた移植前ドナー応答性既存記憶 CD4 陽性 T 細胞診断

友杉俊英¹、岩崎研太²、坂本慎太郎³、小笠大起¹、木下航平¹、大原希代美¹、寺下真帆¹
二村健太¹、岡田学¹、平光高久¹、後藤憲彦¹、鳴海俊治¹、渡井至彦¹、小林孝彰⁴

名古屋第二赤十字病院 移植内科・移植外科・内分泌外科¹、愛知医科大学 腎疾患・移植免疫学
寄附講座²、名古屋第二赤十字病院 医療技術部臨床検査科³、愛知医科大学 腎移植外科⁴

臓器移植においてはドナーが、レシピエントが過去に感作を受けた抗原と同一エピトープを有していた場合、迅速な抗ドナー免疫反応が生じ予後不良であることが知られている。免疫記憶のうち抗体記憶では、ドナーHLA がレシピエント既存抗体の標的とするエピトープ(B cell epitope)を有するか否かについては、抗体特異性検査や in silico 解析により術前診断が可能となった。一方でドナーHLA が既存記憶 T 細胞の標的とするエピトープ(T cell epitope: TE)を有するかを術前診断する方法は未だ確立されていない。本研究では、既存記憶 T 細胞のうち抗体産生に重要な役割を果たすと考えられている既存記憶 CD4 陽性 T 細胞の存在を、in silico 解析により試みた。当院で生体腎移植を施行した 578 例を対象に、後方視的に解析を行った。578 例中 69 例で、術前ドナー非特異的 HLA 抗体 (NDSA)を認め、その NDSA を基に HLA 感作歴を推定した。更にその感作歴から in silico 解析を用い既存記憶 CD4 陽性 T 細胞の標的とするエピトープを推定した。ドナーHLA 抗原が既存記憶 CD4T 細胞の標的とするエピトープを有した症例(Shared TE (+)群; n=40)と、有しなかった症例(Shared TE (-)群; n=29)に分類し、術後早期の抗ドナー特異的 HLA 抗体(dnDSA)産生の有無を比較した。Shared TE (+)群は、術前 HLA 抗体陰性群 (n=509)や Shared TE (-)群と比較して、有意に術後早期の dnDSA 産生が多かった(p=0.001)。TE の In silico 解析は既存記憶 CD4 陽性 T 細胞診断に有効であり、更には術後早期の dnDSA 産生予測に有効である可能性が示唆された。

一般演題 2

O-6 同種造血幹細胞移植後生着不全に対する HLA 不適合臍帯血移植の治療成績

小原史也、根岸修人、茂木健太、若林浩也、横田裕史、澤ひとみ、宮尾康太郎
稲垣裕一郎、澤正史

安城更生病院 血液・腫瘍内科

【背景】生着不全(GF)は移植に伴う致死的な合併症であり、臍帯血移植(CBT)では 8~20%ほどで認められる。再移植による予後改善を期待できるが、最適な再移植の前処置や移植ソースは明らかになっていない。

【目的】GF に対する CBT による再移植の成績と予後因子を検討する。

【対象と方法】2000年6月から2021年4月の間に初回移植を行った症例のうち、GFを認めCBTによる再移植を行った13症例を後方視的に解析した

【結果】年齢中央値は48歳[23-67]で初回移植の前処置は骨髄破壊的前処置8例、強度減弱前処置が5例であり、移植ソースはCBTが11例、血縁者間末梢血幹細胞移植が1例、非血縁者間骨髄移植が1例であった。Disease risk indexはlow及びintermediateが12例、very highは1例であった。GFの診断から再移植までは中央値19日[4-65]であった。再移植時の前処置はfludarabine(Flu)+melphalanもしくはFlu+cyclophosphamideを用いて行い、TBI 2~4Gyを11例に併用した。再移植を行いday28まで生存した11症例の全てで生着を確認することができた。再移植後の観察期間中央値は33か月であり、1年全生存率(OS)、1年再発率、1年非再発死亡(NRM)はそれぞれ69.2%、0%、31%であった。NRMの内訳は感染症が2例、血栓性微小血管症が1例、GVHDが1例、ドナー由来の白血病が1例であった。OSに関する多変量解析では有意な予後因子は検出されなかった。

【考察】生着率やOSは既報と比べ良好であった。Fluとアルキル化剤、TBIを用いた前処置によるCBTが生着不全に対する再移植に有用である可能性がある。

一般演題 2

O-7 一次生着不全に対して 1-day regimen による救援臍帯血移植が奏効した2例

鵜飼俊、沼田将弥、飯田しおり、伊藤真、河村優磨、後藤実世、福島庸晃、河野彰夫、尾関和貴

JA 愛知厚生連江南厚生病院 血液・腫瘍内科

一次性生着不全は好中球減少期間の長期化、短期間での大量化学療法の反復等によって、致命的な合併症を高率に発症する事が知られている。ドナーソースによって異なるが、数～20%程度で起こる事が報告されている。一次生着不全症の発症を診断した際には、早急に救援の再移植が必要となるが、その前処置については初回移植ほどの確立された知見は得られていない。これまで当院では436件の同種造血幹細胞移植が行われてきたが、6例が一次性生着不全症に陥り、4例はday50未満で早期死亡の経過を辿っていた。その一方で、近年2例の一次性生着不全症に対してフルダラビンとシクロフォスファミド、全身放射線療法を組み合わせた非骨髄破壊的前処置によって、救援臍帯血移植後に良好な経過を得たため報告する。

症例1 60歳女性 フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病の第1寛解期に対して前処置Flu+MEL 80+TBI 4Gyにて非血縁間臍帯血移植を行ったが、day29時点で一次性生着不全症の診断。Flu+CY+TBI 2Gyの前処置で、day39に救援臍帯血移植を施行。明らかな合併症を伴わず、day18に生着を確認し、1年半以上の分子遺伝学的寛解を維持している。

症例2 59歳男性 慢性骨髄性白血病の非寛解期に対して前処置Flu+MEL 80+TBI 4Gyにて非血縁間臍帯血移植を行ったが、day29時点で一次性生着不全症の診断。Flu+CY+TBI 2Gyの前処置で、day41に救援臍帯血移植を施行。真菌を疑う感染症を合併したものの、day22に生着を確認して感染症も軽快している。

一般演題 2

O-8 血漿交換、Rituximab、免疫グロブリン大量療法による脱感作を行った
フローサイトメトリッククロスマッチ陽性生体腎移植の4例

佐々木豪¹、加藤桃子¹、東真一郎¹、舛井覚¹、西川晃平¹、井上貴博¹
藤本美香²、小田圭子²、片山鑑²

三重大学医学部附属病院 腎泌尿器外科¹、三重大学医学部附属病院 腎臓内科²

【目的】近年、フローサイトメトリッククロスマッチ(FCXM)陽性腎移植に対する免疫グロブリン大量療法(IVIg)を用いた術前脱感作療法の有用性が報告され、2019年にはIVIgの適応症に「抗ドナー抗体陽性腎移植における術前脱感作」が追加された。そこで今回、当院にて施行したFCXM陽性腎移植の短期成績について検討した。【対象と方法】2013年から2020年に当院で施行したFCXM陽性腎移植の4例を対象とした。術前脱感作として手術30日前からTacrolimus, Meprednisolone, Mycophenolate mofetil, Methylprednisoloneを開始。Rituximabは手術30日前および前日にそれぞれ300mg、200mgを投与し、血漿交換はIVIg投与前に3回および術前日1回の計4回行った。IVIgは総量2g/kgを手術5日から2日前および術当日の計5回に分割し投与した。移植後の免疫抑制は通常の腎移植に準じて行った。【結果】レシピエントは全員妊娠歴のある女性で、夫婦間移植であった。年齢中央値は63.5歳(60-67)。輸血歴あり1例、移植歴あり0例。血液型適合2例、不適合2例。FCXM B cellのみ陽性2例、T cell・B cellともに陽性2例。DSAのnMFI中央値は4511(3607-5267)。術後1年でのCre中央値は0.88mg/dl(0.80-1.34)。術後1年でのプロトコール腎生検で抗体関連型拒絶反応は認めなかった。【結語】当院の脱感作プロトコールで長期予後が得られる可能性が示唆された。今後も腎機能、DSAの推移、定期的な腎生検でのフォローが重要であると考えられた。

一般演題 2

O-9 リンパ球クロスマッチにおけるプロナーゼ処理の検討

丸山美津子¹、坂倉立紀¹、西川晃平²、橋口裕樹³、松本剛史¹、大石晃嗣¹

三重大学医学部附属病院 輸血・細胞治療部¹

三重大学大学院医学系研究科 腎泌尿器外科学²、福岡赤十字病院 移植センター³

【はじめに】プロナーゼは細胞膜に取り込まれた免疫グロブリンやリンパ球細胞膜上の Fc レセプターを除去する蛋白分解酵素である。今回、リンパ球をプロナーゼ処理することにより、フローサイトメトリッククロスマッチ(FCXM)で生じる非特異反応を軽減できるのかを検討した。

【対象】2020年10月から2021年3月までに組織適合性評価を行った生体腎移植前の7症例を対象とした。プロナーゼ未処理と処理後のリンパ球を用いてFCXMを施行し、Sample/Negative(SN比)、ヒストグラムで両者の結果を比較検討した。

【結果】T cell では7例中6例で未処理と処理後ともに陰性であった。1例で未処理では二峰性のヒストグラムを示したが、処理後には正規分布を示し陰性となった。B cell は7例中4例で未処理と処理後ともに陰性であったが、3例で未処理では非特異反応が疑われた。そのうち1例は未処理では二峰性のヒストグラムを示したが、処理後には正規分布となった。また、1例で未処理のNegativeコントロールで右にシフトする現象が認められたが、処理後には消失した。残り1例は未処理では弱陽性(SN比2.00)を示したが、処理後には陰性(SN比1.54)となった。

【考察】プロナーゼ処理によって二峰化やシフト現象が消失したことから、非特異反応が解消されたと考えられる。ただしB cell においてプロナーゼ処理により弱陽性が陰性化した症例を経験したため、感度の変化に関しては更なる評価が必要と考えられた。

一般演題 2

O-10 腎移植後に抗 HLA 抗体が検出された患者の移植腎機能について

藤田高史、石田昇平、舟橋康人、松川宜久、加藤真史

名古屋大学医学部附属病院 泌尿器科

2018年4月1日から抗体スクリーニング検査および抗体特異性同定検査による抗 HLA 抗体の測定が保険収載された。当院では 2019 年から腎移植外来に通院している患者に対して、年に 1 回の抗体スクリーニング検査の実施を開始した。今回我々は Preformed DSA を有する症例を除く、112 例を対象に、抗体スクリーニング検査の結果と移植腎機能について検討した。112 例中 20 例(17.9%)で抗 HLA 抗体が検出された。すべて non-DSA であった。HLA 抗体スクリーニング検査時の血性クレアチニン値は抗 HLA 抗体陰性例では平均 1.27mg/dl、抗体陽性例では 1.48mg/dl で有意差を認めた($p=0.022$)。eGFR は抗体陰性例で 46.5ml/min/1.73 m²、抗体陽性例で 39.3ml/min/1.73 m²で有意差を認めた($p=0.015$)。検出された抗 HLA 抗体は 6 例で Class I、14 例で Class II であったが、二群間で移植腎機能に有意差を認めなかった。non-DSA のみが検出された場合では治療介入の必要性は明確ではないが、特に注意して経過観察する必要がある。

シンポジウム（抗 HLA 抗体の意義と治療戦略）

S-1（検査：臓器移植）

抗 HLA 抗体検査の現状と展望

坂本慎太郎¹、深見晴恵¹、後藤憲彦²、鳴海俊治³、渡井至彦³

名古屋第二赤十字病院 医療技術部臨床検査科¹

名古屋第二赤十字病院 腎臓病総合医療センター 移植内科²

名古屋第二赤十字病院 腎臓病総合医療センター 移植外科³

臓器移植後に新規に産生される HLA 抗体(de novo DSA)は、抗体関連型拒絶反応(antibody-mediated rejection: ABMR)の最大のリスク因子であると言える。ABMR の治療法として静脈内免疫グロブリン(IVIG)と血漿交換が標準治療として提唱されているが、効果的な治療法はない。したがって、de novo DSA をいかに高感度で効率的に検出するかが移植片の長期生着にとって重要なポイントであり、移植後の抗 HLA 抗体検査の実施が不可欠となっている。以前はコスト面等の理由から実施が困難であったが、2018 年 4 月の保険診療報酬改定により移植後の抗 HLA 抗体検査が保険収載されたことで、そのハードルは大きく下がったと言える。しかし、抗体検査試薬は国内外で様々な試薬が販売されており、それぞれに特徴がある。検査施設は、その中から検査の目的や予算にあった試薬を選択する必要がある。また、移植施設も、依頼する検査施設を選択する際には、検査費用だけでなくどのような試薬を使用しているかを考慮する必要がある。

当院は 2009 年より移植後患者の抗 HLA 抗体検査を年一回実施してきた。保険収載後は運用が煩雑となったが、年間約 1000 件の検査を実施している。そこで本講演では経験から得た知見や、将来展望も報告する。また、日本臓器移植ネットワークの特定移植検査センターとしての立場から、待機患者の抗体検査実施への課題も述べる。

シンポジウム (抗 HLA 抗体の意義と治療戦略)

S-2 (検査: 輸血・造血幹細胞移植)

東海北陸ブロック血液センターにおける組織適合性検査

(おもに PC-HLA 供給に係る抗 HLA 抗体および抗 HPA 抗体検査、臍帯血移植に係る抗 HLA 抗体検査)について

竹内 奈由美、金柁 麻衣、杉浦 良樹、高井 真一、毛利 啓子、NG JUNG YI、圓藤 ルリ子、竹尾 高明

日本赤十字社 東海北陸ブロック血液センター

[はじめに]東海北陸ブロック血液センターでは組織適合性検査として、HLA 適合血小板である濃厚血小板 HLA-LR「日赤」(以下 PC-HLA という。)の供給に係る検査と中部さい帯血バンクから依頼される臍帯血移植に係る検査を実施している。

PC-HLA は、ランダム血小板では輸血効果の得られない抗 HLA 抗体を産生した患者に適応される。当センターでは北陸 3 県(石川、富山、福井)および東海 4 県(愛知、岐阜、三重、静岡)における PC-HLA の供給を目的としてドナープールのための献血者の HLA と HPA 型検査、患者の抗 HLA 抗体と抗 HPA 抗体の依頼検査を実施している。

また、臍帯血移植に係る検査として臍帯血(登録時、移植前)の HLA 型検査、移植前患者の HLA 型検査および抗 HLA 抗体検査を実施している。

それぞれの検査の内容について紹介するとともに過去のデータについて集計したので報告する。

[方法]過去 3 年間(2018 年~2020 年)における PC-HLA 供給のための抗 HLA 抗体と抗 HPA 抗体の依頼検査数、陽性数について集計した。また、PC-HLA 供給前にドナーの白血球と患者の血清とクロスマッチを行う確認検査である PC-HLA 交差適合試験についても過去 3 年間分集計した。

さらに、臍帯血移植前患者の抗 HLA 抗体検査についても過去 3 年間分集計した。

[結果]過去 3 年間における PC-HLA 供給のための抗 HLA 抗体の依頼検査数は 719 件、陽性数は 266 件(37.0%)、抗 HPA 抗体の依頼検査数は 425 件、陽性数は 9 件(2.1%)であった。また、PC-HLA 交差適合試験の検査数は 5,793 件、うち 3 件(0.05%)が陽性であった。

また、臍帯血移植前患者の抗 HLA 抗体検査の依頼検査数は 354 件、陽性数はクラス I 47 件(13.3%)、クラス II 18 件(5.1%)、クラス I & II 14 件(4.0%)であった。

[まとめ]過去 3 年間における抗 HLA 抗体の依頼検査数は 2019 年に減少が見られたもののほぼ横ばいであったが、陽性率は年々増加していた。抗 HPA 抗体の依頼検査数も同様の傾向が見られたが陽性率は 2.1%と低かった。PC-HLA 交差適合試験の検査数も横ばいであり陽性率は 0.05%と低値であった。

臍帯血移植前患者の抗 HLA 抗体検査の依頼件数は年々増加しており、3 年間ともクラス I の陽性件数の方がクラス II の陽性件数より多かった。

シンポジウム (抗 HLA 抗体の意義と治療戦略)

S-3 (造血幹細胞移植)

造血幹細胞移植における HLA 抗体の臨床的意義

葉名尻 良

名古屋大学医学部附属病院 血液内科

造血幹細胞移植療法の進歩や支持療法の発達により、HLA 不適合移植の実施件数が増加し、それに伴い、移植前にレシピエントが有するドナー特異的 HLA 抗体(DSA)の存在が生着不全(移植片拒絶)の原因となることが明らかとなってきた。とくに臍帯血移植では、生着不全が 10-20%で認められることが大きな問題点であるが、その一因として、DSA の関与が報告されている。2010 年に、HLA ミスマッチ臍帯血移植において DSA 保有症例では、HLA 抗体陰性および DSA 陰性症例と比較し、好中球と血小板回復が有意に遅延し生着不全となるリスクが高いことが報告され、現在は DSA を含まない臍帯血ユニットが選択されている。

我々は、臍帯血移植における移植片拒絶の発症機構を、液性免疫および細胞性免疫の両者から明らかにするために、移植前に DSA を有する臍帯血移植片拒絶症例の臨床検体を用いて詳細な解析を行った。この症例は、移植前および拒絶時の血清よりドナー不適合 HLA である HLA-B*54:01 に対する DSA が検出され、生着不全に液性免疫が関与したことが考えられたが、驚くべきことに、拒絶時の患者末梢血より、HLA-B*54:01 を認識する CD8+ T 細胞クローンも限界希釈法により分離・同定することが可能であり、細胞性免疫の影響も示唆された。実際に、次世代シーケンサーを用いた T 細胞受容体の網羅的解析による同種反応性 T 細胞の動態解析をおこなった結果、移植前検体ではドナーHLA-B*54:01 反応性 T 細胞クローンが末梢血 T 細胞中わずか 0.007%の割合であったが、拒絶時には末梢血 T 細胞中 9.9%の割合にまで増大しており、生着不全に関与したと考えられた。さらに、HLA 抗体を有する複数症例で検討した結果、HLA 抗体が存在する場合には、同一 HLA に対する特異的 T 細胞も存在する可能性が考えられた。すなわち、免疫学的な生着不全では HLA 抗体だけではなく、同一 HLA 特異的 T 細胞も協働して関与していると考えられる。

近年、移植後シクロホスファミド(PTCy)を用いた HLA 半合致移植(ハプロ移植)の実施が増加しており、再度 HLA 抗体の意義について注目を集めている。PTCy での HLA 半合致移植において、どの程度の MFI までであれば許容されるかなど臨床的な意義は不明であり、今後さらなる検討が必要である。

シンポジウム (抗 HLA 抗体の意義と治療戦略)

S-4 (肝臓移植)

Rituximab 脱感作療法による既存抗ドナー抗体陽性肝移植の治療戦略

雫真人^{1,2}、吉川潤一¹、倉田信彦¹、城原幹太¹、小倉靖弘¹

名古屋大学医学部附属病院 移植外科¹

名古屋大学大学院医学系研究科 移植・内分泌外科学講座²

肝移植における既存抗ドナー抗体(DSA)の重要性が近年注目されている。肝移植領域においては、既存 DSA 陽性は、antibody-mediated rejection(AMR)や acute/chronic rejection のリスクを上昇させるとされている。graft survival や生存率に関しては、既存 DSA 陽性は生存率を悪化させた、あるいは影響なかったという報告の両方が散見される。線維化の進行についても関与が示唆されている。一方、既存 DSA 陽性患者に対しての rituximab 脱感作療法は、graft survival の改善や rejection の低下をもたらすと報告がある一方、rejection を減らさない、感染リスクを上昇させるといった報告もあり、さらなる情報の蓄積が必要である。また、既存 DSA 陽性であっても AMR を発症しない症例も多く、肝移植領域における既存 DSA 陽性の臨床的意義はまだ不明な点も多い。当科では 2012 年 11 月から術前 HLA 抗体スクリーニング検査を実施し、陽性の場合には同定検査を追加している。2014 年 10 月からは既存 DSA 陽性症例には rituximab 500mg/body 投与による脱感作療法プロトコルを導入している。今回、2014 年 10 月から 2020 年 5 月までに当院で施行した患者を対象に、術後の既存 DSA の推移と肝生検で AMR の有無の評価を行った。術後の免疫抑制は、FK506、ステロイド、MMF の 3 剤を基本とした。150 例中、22 例(14.7%)で既存 DSA が確認され、そのうち 17 例で rituximab 脱感作療法を移植術前 1-21 日目に行った。肝移植後に行った protocol 肝生検では全例とも AMR の発症は認めなかった。経時的な既存 DSA の変化を見ると、術後 class-I DSA は急速に消失するのに対して、class-II DSA は緩徐に減少した。一方、rituximab 脱感作療法を施行しなかった 5 例についても、周術期の rituximab の投与および血液浄化療法はなく、3 剤による術後免疫抑制療法で術後 3 ヶ月頃には DSA は消失し、AMR の発症も認めなかった。Rituximab 脱感作療法は、既存 DSA 陽性の肝移植に有効であったが、脱感作療法なしでも問題なく経過した症例もあり、さらなる検討が必要である。

シンポジウム (抗 HLA 抗体の意義と治療戦略)

S-5 (腎臓・膵臓移植)

当院における腎移植、膵移植症例の移植後抗 HLA 抗体および DSA 陽性率の比較

伊藤泰平、剣持敬、栗原啓、會田直弘

藤田医科大学 医学部 移植・再生医学

<背景>膵移植患者の多くは 1 型糖尿病に慢性腎不全を合併しており、膵腎同時移植と腎移植後膵移植が 95%以上を占める。したがって、免疫抑制療法など、腎移植と共通したプロトコールで実施されるが、一方で糖尿病罹患歴が長いなど、腎移植患者と異なる背景を持ち、移植後の経過が大きく異なることもある。当科で施行した膵移植と腎移植症例の免疫学的な臨床経過を比較検討した。

<方法>2008 年から藤田医科大学で膵移植、腎移植を受けた患者のうち、6 ヶ月以上が経過し、かつ術後の HLA 抗体スクリーニングを施行された膵移植 66 例(PTx 群)、腎移植(KTx群)109 例の患者背景、拒絶反応合併率、抗 HLA 抗体および DSA 陽性率を比較検討した。

<結果>移植時年齢の中央値は、KTx 群が 52 歳であるのに対し、PTx 群は 44 歳と有意に若かった。KTx 群の内、2 例(1.8%)のみが献腎移植であったのに対して、PTx 群の 65 例(98.5%)は脳死下移植であった。KTx 群の約 40%が透析導入前移植であったのに対して、PTx 群のほとんどが透析歴を有し、その中央値は 5.5 年であった。術前の CMV-IgG 陰性率は KTx 群が 12%に対して、PTx 群で 18%であり、また PTx 群の一部ではサイモグロブリンを導入療法に使用することもあり、移植後の CMV 抗原陽性率は KTx 群で 46%に対して、PTx 群で 79%と有意に高かった。このように膵移植後は CMV 感染を始めとした合併症も多く、MMF 減量を始めとした免疫抑制剤の調整を要することも多かった。そのため、移植後抗 HLA 抗体および DSA 陽性率は KTx 群でそれぞれ 20.5%、0%であったのに対して、PTx 群では 44.9%、20.4%と有意に高頻度であった。結果、PTx 群で DSA 陽性症例は陰性症例と比べ、膵グラフト生着率が有意に低かった。

<結語>膵移植後は移植後 DSA 陽性率が高く、膵グラフト生着に影響していた。膵移植では合併症も多く、免疫抑制剤調整を含めたより注意深い周術期管理が必要であると考えられた。

特別講演

抗 HLA 抗体陽性患者に対する脱感作治療の実際

石田 英樹（東京女子医科大学 移植管理科 泌尿器科 教授）

抗ドナー抗体が関与する拒絶反応は、急性細胞性拒絶反応とは異なり移植腎喪失という悲劇的な結末の可能性を伴うハイリスクな病態である。移植腎生検において傍毛細血管領域への微慢性の C4d の沈着、血管炎および糸球体炎などが観察され、患者の血清中には抗ドナー抗体が検出される。治療戦略としては、抗ドナー抗体の除去および抗体産生の抑制である。現時点での具体的な選択肢としては、血漿交換療法(血液吸着)、タクロリムス、ミコフェノール酸モフェティール、大量ガンマグロブリン療法、抗 CD20 抗体(リツキシマブ)および脾臓摘出などが報告されており、各施設間によってこれらの組み合わせや投与量は異なるものの、クロスマッチ陽性患者を陰性化(脱感作)させ、移植し透析離脱に導くことに成功している。さらに近い将来、より B 細胞を選択的に抑制したり、選択的 T 細胞活性阻害剤も脱感作療法の新たな選択肢として臨床の場に登場するかもしれない。

このような高感作患者に対し脱感作目的に移植前にガンマグロブリンを大量投与することが 2019 年 12 月に保険収載された。この項では現在、術前に抗 HLA 抗体陽性患者に対して行われている抗体検出の方法の実際、および抗体を脱感作するための治療戦略のそれぞれについて概説し、最後に当科で行われているガンマグロブリンの大量投与を中心とした脱感作療法の実際についてお話したい。

【日本組織適合性学会 MHC 投稿・執筆規定】 (2019年2月12日改訂)

I. 概要

内 容: MHC に関する基礎研究から臨床研究まで全てを対象にし、未発表の論文、他誌に投稿中（もしくは掲載予定）でないものに限る。

資 格: 筆頭著者および責任著者は本学会会員であり、その他の共著者も、原則として、本学会会員に限る。ただし、MHC 編集委員会が非会員に執筆を依頼した総説については、その限りでない。

倫 理: ヒトおよびヒトの試料を用いた臨床研究・基礎研究の場合、ヘルシンキ宣言（「ヒトを対象とする医学研究の倫理的原則」、1964年第18回世界医師会ヘルシンキ総会採択、2013年フォルタレザ総会修正）に基づき、文部科学省が定める関連倫理指針（「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」、「ヒト ES 細胞の分配及び使用に関する指針」、「ヒト iPS 細胞又はヒト組織幹細胞からの生殖細胞の作成を行う研究に関する指針」等）に従うと共に、所属施設等の倫理委員会の審査を経て、施設長による承認を得たものでなければならない。また、遺伝子組換え実験は「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（いわゆるカルタヘナ法）」、動物を用いた研究については動物愛護管理法に基づく「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」（2006年環境省告示）などを遵守し、それぞれ所属施設における関連委員会等にて所定の手続きによる審査・承認のもとに行われた研究でなければならない。

種 類: 原著、総説、シリーズ、短報（研究速報、技術速報などを含む）、症例報告などとし、日本語、英語を問わない。

利益相反の開示: MHC に原著論文もしくは総説を掲載する場合には、利益相反事項について開示しなければならない。

審 査: 投稿論文掲載の採否は当誌編集委員会において決定し、審査は複数の査読制で行う。審査の結果を踏まえ修正、削除、加筆などを求める場

合がある。

著作権: 本誌に掲載された論文などの著作権は日本組織適合性学会が有し、インターネットを通じて電子配信されることがある。とくに、原著、総説については、原則として科学技術振興機構（JST）が運営する電子ジャーナル配信サイト（J-STAGE）にて配信される。

掲載料: 掲載は無料であるが、カラー写真など特別印刷に関わる経費は著者の実費負担とする（カラー印刷を希望の場合には、投稿原稿にその旨を明記すること）。

別 刷: 別刷（抜き刷り）は有料とし、その経費は別冊部数やページ数による（別冊希望の場合には、著者校正の際にその旨を明記すること）。

※論文の構成や形式等について疑問や不安等がある場合には、MHC 編集委員会がアドバイス等に対処可能であるため、投稿規定の末尾にある連絡先まで連絡されたい。

II. 原著執筆書式

1. 執筆要項

12,000字（刷り上がり12頁程度）以内とする。ただし、図、表、写真は、1点につき概ね400字に該当するものとし、それぞれに表題を記載し、挿入箇所を本文に明記する。また、図説は本文の最後に記載する。本文は Microsoft Word で作成し、表は Microsoft Word もしくは Microsoft PowerPoint、図、写真は Microsoft PowerPoint を使用する。原稿は記憶媒体（CDR等）に保存もしくはEmail添付で、投稿レターを添えて編集長に送付する（送付先は投稿・執筆規定の末尾を参照）。

2. 第1頁目

表紙とし「原著」を明記し、日本語と英語でタイトル、著者全員の氏名と所属に加えて、責任著者（連絡責任者）の住所、氏名、電話番号、FAX

番号, E-mail アドレスを記載する。なお, タイトル, 著者名, 所属の記載は下記の形式に従う。

Susceptibility gene for non-obstructive azoospermia in the HLA class II region: correlations with Y chromosome microdeletion and spermatogenesis.

Tetsuya Takao¹⁾, Akira Tsujimura¹⁾, Masaharu Sada²⁾, Reiko Goto²⁾, Minoru Koga³⁾, Yasushi Miyagawa¹⁾, Kiyomi Matsumiya¹⁾, Kazuhiko Yamada²⁾, Shiro Takahara¹⁾

- 1) Department of Urology, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka, Japan
- 2) Department of Regenerative Medicine, National Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan
- 3) Department of Urology, Osaka Central Hospital, Osaka, Japan

心移植における FlowPRA 法を用いた HLA 抗体検出の意義

山本 賢¹⁾, 佐藤 清¹⁾, 佐田 正晴²⁾, 永谷 憲歳²⁾, 中谷 武嗣³⁾

- 1) 国立循環器病センター臨床検査部
- 2) 国立循環器病センター再生医療部
- 3) 国立循環器病センター臓器移植部

3. 本文一1：日本語での投稿

・2 頁目から, 和文要旨 (400 字以内) および 250 words 以内の英文要旨, キーワード (日本語および英語, それぞれ 5 語以内) を記載する。なお, 英文要旨について, 著者グループのみでは作成が難しい場合には, 編集委員会による対応も可能であるので, 投稿レターにその旨を明記すること。

・ページ替えて, 「はじめに」, 「材料と方法」, 「結果」, 「考察」, 「謝辞」, 「利益相反事項の開示」, 「引用文献」, 「図説」の順に記載する。

- ①専門用語以外は常用漢字, 新かな遣いに従い記述する。
- ②本文中の英単語は固有名詞を除き全て小文字で統一する。
- ③地名, 人名, 学名は原語のまま用い, 薬品名は

一般名を用い商品名は括弧内に記す。

- ④単位, 数量は国際単位 (cm, ml, g, Kg, pg, μ l, %, $^{\circ}$ C など) を, 数字はアラビア文字を用いる。単位と数字の間には半角スペースを入れる。
- ⑤遺伝子名 (シンボル) はイタリックで表記する。例えば, *HLA-DRB1* (タンパク名として用いる場合はイタリックにしない)

4. 本文一2：英語での投稿

・2 頁目に 250 words 以内の要旨, キーワード (5 語以内) を記載する。

・3 頁目より, 「Introduction」, 「Materials and Methods」, 「Results」, 「Discussion」, 「Acknowledgements」, 「Disclosures」, 「References」, 「Legend to Figures」の順に記載する。

- ①地名, 人名, 学名は原語のまま用い, 薬品名は一般名を用い商品名は括弧内に記す。
- ②単位, 数量は国際単位 (cm, ml, g, Kg, pg, μ l, %, $^{\circ}$ C など) を, 数字はアラビア文字を用いる。単位と数字の間には半角スペースを入れる。
- ③遺伝子名 (シンボル) はイタリックで表記する。例えば, *HLA-DRB1* (タンパク名として用いる場合はイタリックにしない)

5. 本文一3：略語一覧の作成【作成要項】

- ①略語はアルファベット順に並べる。
- ②略語の後に「:」を入れ, フルスペル (先頭のみ大文字とし, 他は小文字とする) を記載する。例) LCT : Lymphocyte cytotoxicity test
- ③商品名は略語一覧に入れない

6. 利益相反事項の開示 (日本語, 英語いずれの場合とも)

学会 HP にある取り扱い (<http://jshi.umin.ac.jp/coi/index.html>) に掲載されている「COI があるとして申告する範囲に関する規則 (JSHI_COI 規則)」を必ず参照し, 申告すべき利益相反事項がある場合には, COI 申告_様式 2 を用いて申告すること。また, 論文等では本文の末尾で引用文献の前に, 以下を明記すること。

*申告すべき利益相反事項がない場合
 (和文) 利益相反: 申告すべき事項なし
 (英文) Disclosures: none to declare

*申告すべき利益相反事項がある場合 (事項に応じて記載する。以下は例示)

(和文) 利益相反: 以下の利益相反事項があります。

本論文の内容に関連して、著者〇〇が△△社より受けた講演料 (□円)

本論文に記載した研究は、〇〇社から受けた研究費 (□円) による。

(英文) Disclosures:

〇〇(著者名) received a reward for lecture from (営利企業名)

This study was conducted by a research fund from (営利企業名)

7. 引用文献

引用文献は本文中の引用箇所の右肩に片カッコ付きで番号を付し、引用順に一括して、以下の例に従って、著者名、論文名、雑誌 (もしくは書名) (英文の場合はイタリック表記)、巻 (号)、最初と最後のページ、発表年を記載する。著者名、編集者名は筆頭者から3名まで列記し、4名以上は他または *et al.* とする。なお、引用論文の (号) については、原則として記載するものとするが、存在しないあるいは不明な場合には不記載を可とする。

1. Shi Y, Yoshihara F, Nakahama H, *et al.*: A novel immunosuppressant FTY720 ameliorates proteinuria and alterations of intrarenal adrenomedullin in rats with autoimmune glomerulonephritis. *Regulatory Peptides* 127(1-3): 233-238, 2005.
2. Tongio M, Abbal M, Bignon JD, *et al.*: ASH#18: HLA-DPB1. *Genetic diversity of HLA Functional and Medical Implication* (ed. Charron D), Medical and Scientific International Publisher, p. 134-136, 1997.
3. 難波行臣, 今尾哲也, 石黒 伸 他: 既存抗体陽性生体腎移植後に生じた抗体関連型拒絶反応に対して血漿交換および免疫グロブリン大量療法

(IVIG) が奏効した1例. 血管外科 17(1): 36-40, 2005.

4. 佐田正晴, 高原史郎: 腎移植一組織適合と拒絶反応. 新図説泌尿器科学講座6「腎疾患, 神経泌尿器科, 老年泌尿器科」(吉田修 監修), Medical View 社, p. 120-125, 2000.

III. 短報 (研究速報, 技術速報などを含む), 症例報告執筆書式

1. 執筆要項

6,000字 (刷り上がり6頁程度) 以内とする。ただし、図, 表, 写真は, 1点につき概ね400字に該当するものとし, それぞれに表題を記載し, 挿入箇所を本文に明記する。また、図説は本文の最後に記載する。本文は Microsoft Word で作成し、表は Microsoft Word もしくは Microsoft PowerPoint、図, 写真は Microsoft PowerPoint を使用する。原稿は記憶媒体 (CDR 等) に保存もしくは Email 添付で投稿レターを添えて編集長に送付する (送付先は投稿・執筆規定の末尾を参照)。

2. 第1頁目

表紙とし「短報」「症例報告」を明記し、日本語と英語でタイトル、著者全員の氏名と所属、連絡責任者の住所、氏名、電話番号、FAX番号、E-mail アドレスを記載する。タイトル、著者名、所属等の記載は「原著」の形式に従う。

3. 本文 (日本語および英語での投稿)

・2頁目に、英文要旨 (200 words 以内), キーワード (3語以内) を記載。

・3頁目以降は、原著執筆書式 3. の3頁目以降に準じる。

IV. 総説, シリーズその他

日本語、英語のいずれも可とする。概ね 6,000 ~ 12,000字 (刷り上がり6 ~ 8頁) 程度とし、利益相反事項の開示を含めて、上記の原著執筆書式に準じるが、本文構成の一部 (「材料と方法」, 「結果」, 「考察」等) については、適宜変更することも可とする。

V. 原稿送付先

〒 311-3193 茨城県東茨城郡茨城町桜の郷 280
 国立病院機構水戸医療センター
 臨床研究部 移植医療研究室 気付
 日本組織適合性学会 編集広報委員会
 委員長 湯沢賢治

Tel: 029-240-7711

Fax: 029-240-7788

E-mail: kyuzawa@aol.com

	総原稿枚数 (図表, 文献含む)	図表数	文献数	要旨	原稿タイトル 所属, 著者	キーワード 数	査読	著者 校正
原著	30 枚以内	5~10個 以内	20 個以内	英文原著 英文 250 words 以内 和文原著 英文 400 words 以内	和英併記	5 個	有り	1 回
短報, 症例報告	15 枚以内	5 個以内	10 個以内	和文、英文とも英文 200 words 以内	和英併記	3 個以内	有り	1 回
総説, その他	その都度指定	適宜	20 ~ 30 個前後	和文 400 字以内	和英併記	5 個	なし	1 回

Instructions to Authors (updated on Feb. 19, 2019)

Submission

MHC is the official journal of the Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics (JSHI). The aim of this journal is to serve as a forum for the scientific information in the form of original and high quality papers in the field of major histocompatibility complex (MHC) and immunogenetics. Manuscripts, from basic to clinical research relating to MHC or immunogenetics, are accepted with the understanding that they are original unpublished work and are not being submitted elsewhere. Manuscripts should be written in Japanese or English. First author and corresponding author must be members of JSHI, while it is preferable for the other co-authors also to be JSHI members.

Ethics: Clinical and basic studies using human subjects and specimens obtained from humans must adhere to the 1980 Helsinki Declaration (adapted by the 18th World Medical Assembly) and must be approved by the ethics review board of each participating institution. Furthermore, animal studies must adhere to such guidelines.

Conflict of interest: All the authors must clearly declare any conflicts of interest according to the guideline of JSHI (<http://jshi.umin.ac.jp/coi/index.html>). Further information is available upon request.

Types of papers published: Original articles, reviews, series, short communications (including research and technical bulletins) and case reports are acceptable.

Review: The editorial board is responsible for the acceptance of all submitted papers based on a review by multiple referees. Based on the outcome of the review, the board may request corrections, omissions, or additions for publication in MHC.

Copyright: Papers that are accepted for publication become copyright of JSHI and will be made available electronically via the J-Stage platform (<https://www.jstage.jst.go.jp/>).

Fees: There is no fee for publication. However, authors will be responsible for the costs incurred for color photographs and special prints (please specify at submission if color printing is required).

Reprints: Costs incurred for reprints will be charged based on the number of copies and pages (please specify the number of reprints at the time of proofing).

Manuscript (in English)

1. Original articles

Summary

Articles are limited to 4,000 words. Each figure, table, and photograph must be included on separate manuscript pages and must include a title. The location of tables and figures in the manuscript must be clearly stated in the main text. The main text must be submitted as a Microsoft Word file, tables as a Microsoft Word, Excel, or PowerPoint files, and figures and photographs as PowerPoint files. All files must be electronically sent as attached files via email to the editor-in-chief. If the authors would like to submit large size files (over 30 MB), the files should be saved on a CD-ROM, which is to be submitted by mail to the editor-in-chief with one printed copies of the manuscript. Alternatively, the large size files may be submitted via a high volume file transfer service. In that case, the authors must contact the editorial office (indicated on the last page of this instruction) before submission.

First page

The first page is the title page, which must clearly state that the submitted article is an "Original article" and include titles, and the name and affiliation of each author. Include the address, name, telephone number, fax number, and email address of corresponding author at the bottom of the title page. Follow the example shown below for the title, author names, and affiliations:

Susceptibility gene for non-obstructive azoospermia in the HLA class II region: correlations with Y chromosome microdeletion and spermatogenesis.

Tetsuya Takao¹⁾, Akira Tsujimura¹⁾, Masaharu Sada²⁾, Reiko Goto²⁾, Minoru Koga³⁾, Yasushi Miyagawa¹⁾, Kiyomi Matsumiya¹⁾, Kazuhiko Yamada²⁾, Shiro Takahara¹⁾

1) Department of Urology, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka, Japan

2) Department of Regenerative Medicine, National Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan

3) Department of Urology, Osaka Central Hospital, Osaka, Japan

Main text

- The second page must contain an "Abstract" no more than 250 words in length, followed by key words (no more than five).

- Starting on the third page, the main text begins with the "Introduction" and is followed by the "Materials and Methods", "Results", "Discussion", "Acknowledgments", "Conflict of Interest", and "References" sections, in this order.
- Geographic, human, and scientific names are listed in their original languages. Use generic names for drugs with commercial names in parentheses.
- Indicate units and quantities using Arabic numbers followed by international units (cm, ml, g, kg, pg, l, %, °C, etc.).

References

References should include names of authors (last names first); title of article; title of journal (abbreviate according to the style of *Index Medicus*) or book; volume number; location and name of publishing company (book only); first page, year of publication. For references with more than three authors, list the first three, followed by "et al.". See the examples below:

Journal.

Shi Y, Yoshihara F, Nakahama H, et al.: A novel immunosuppressant FTY720 ameliorates proteinuria and alterations of intrarenal adrenomedullin in rats with autoimmune glomerulonephritis. *Regulatory Peptides* 127: 233-238, 2005.

Book.

Katz DH: *Lymphocyte Differentiation, Recognition, and Regulation*. New York, Academic Press, 1997

Chapter in a book.

Tongio M, Abbal M, Bignon JD, et al. ASH#18 : HLA-DPB1.

Charron D (ed): *Genetic diversity of HLA Functional and Medical Implication*. Paris, EDK, 1997

2. Short communications (including research and technical bulletins) and Case reports

Summary

Short communications are limited to 1,500 words. For other information, please see "Summary" section of "Original articles" described before.

First page

The first page is the title page, which must clearly state that the submitted article is a "Short Communication" or "Case report" and include titles and the name and affiliation of each author. Include the address, name, telephone number, fax number, and e-mail address of the corresponding author at the bottom of the title page. Follow the example shown below for the title, author names, and affiliations:

Main text

- Short communications and case reports do not require an abstract.
- After the second page, follow the same guidelines for the third and subsequent pages of original articles as described.

3. Reviews, Series, and Others

As a general rule, reviews and series are written by invitation from the editorial board; however, submission by JSHI members is strongly encouraged. The editorial board determines the total number of pages, but in general a manuscript of no more than 3,000 words is preferable. As a general rule, reviews and series follow the format for original articles.

Editorial Office and Mailing Address

Manuscripts should be submitted to the Editor-in-Chief at the Editorial office:

Editor-in-Chief: Kenji Yuzawa, M.D., Ph.D.

Editorial office:

The Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics Journal, MHC

c/o Department of Transplantation Surgery

National Hospital Organization Mito Medical Center

280 Sakuranosato, Ibaraki-machi, Higashiibaraki-gun,

Ibaraki-ken, 311-3193 Japan

E-mail: 200-ishoku@mail.hosp.go.jp

Tel: +81-29-240-7711

Fax: +81-29-240-7788

編集後記

今秋は2年振りとなる学会大会である、第29回大会がWeb開催される。昨年は学会設立以来初の大会延期に見舞われ、大変残念に思われた方も多数おられたように思う。本年こそは、オリンピック・パラリンピック終了後の初秋に京都でお会いできることを楽しみにしていたが、春から状況が一変、これも仕方がない。さて、Webやオンデマンド開催の方式についてはまだ完全ではないため、賛否もあろうかと思う。しかし、これまで現地開催では全員の参加が難しかった職場でも同時に視聴参加が可能になったことや、遠くからでは見えづらいスライドも細部まで分かるようになったというメリットもある。歌舞伎に凶夢歌舞伎が誕生したように、これからはWeb学会やセミナーも一つのジャンルとして確立、進化してゆくのだと思う。この感染との闘いという試練を乗り越えた後、違う世界が見えたときに、私は私のやりたいことをやろうと密かに考えるのであった。

第29回大会長の田中秀則先生には初のWeb開催を頂き有難うございます。そして会員の皆様には、ご参加、ご発表の後には、是非本誌への積極的なご投稿をお待ちしております。

成瀬妙子

日本組織適合性学会ホームページ

学会活動に関する情報やHLA遺伝子の塩基配列情報が利用できます。

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

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

学会事務局からのお知らせ

法人化に伴い学会事務局を移転いたしました。入退会手続等の会員管理・名簿登録事項の変更・会費納入・学会の会計業務については、中西印刷株式会社を学会事務局として委託しております。その他の一般学会業務や認定制度関連業務については広島事務支局にお問い合わせください。詳しくは日本組織適合性学会のホームページ (<http://jshi.umin.ac.jp/>) を御参照ください。

事務所：

一般社団法人 日本組織適合性学会

〒113-0033 東京都文京区本郷二丁目27番地16
大学通信教育ビル5階

京都事務局：

(入退会・登録内容ご変更・年会費納入)

〒602-8048 京都市上京区下立売通小川東入ル
中西印刷株式会社内

FAX：075-415-3662 E-mail：jshi@nacocos.com

広島事務支局：

(認定制度関連、その他の本学会全体に関する事項)

〒734-8553 広島市南区霞一丁目2-3

広島大学原爆放射線医科学研究所 血液・腫瘍
内科研究分野内

FAX：082-256-7108 E-mail：jshi-hiroshima@
umin.ac.jp