

臨床応用のためのエピトープ解析

坂本 慎太郎¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社愛知医療センター名古屋第二病院 医療技術部 組織適合検査室

近年の組織適合性検査の進歩は、臓器移植の成績向上に寄与していると言えるだろう。HLA タイピング技術の進歩により、対立遺伝子(アレル)のほぼ完全な決定や HLA 抗原のアミノ酸配列に基づく 3 次元構造のイメージ化が可能となった。さらに、HLA 抗体検査は Luminex を用いた蛍光ビーズ法が主流となり、HLA アレルに対する特異性の検出が実現された。これらの進歩により、エピトープ解析という手法が生まれた。従来、臓器移植のリスク評価では HLA アレルミスマッチが使用されていたが、エピトープ解析を用いることでより詳細な評価が可能になったとの研究結果が国内外で多く報告されている。しかし、臨床現場ではまだエピトープ解析が日常的に行われていない状況がある。その理由として、エピトープに関する知識の不足、解析手法の複雑さ、手法の統一性の欠如などが挙げられる。ただし、解析手法について基礎知識を持っていることは、抗体検査結果の解釈に迷った場合に助けとなる可能性があると考えられる。本稿では、エピトープ解析の日常的な導入を促す内容となっている。そのため、専門的な内容は基礎的知識のみの解説に留め、症例解説を中心に概説する。

キーワード：エピトープ解析, HLA Matchmaker, エプレット, ドナー特異的抗体 (DSA)

1. はじめに

ドナー特異的 HLA 抗体 (DSA: donor specific HLA antibody) によって引き起こされる抗体拒絶反応 (ABMR) は、固形臓器移植における移植片不全の主な原因となるが、現在のところ ABMR の効果的な治療法は存在しない。そのため、DSA の早期検出や産生リスク予測は、長期的な移植結果にとって非常に重要となる。近年の組織適合性検査の進歩により、臓器移植時のリスク評価法としてエピトープ解析が注目されるようになった。この概念に基づくエピトープミスマッチの結果は、従来の HLA アレルミスマッチから得られたものよりも優れていると報告されている。

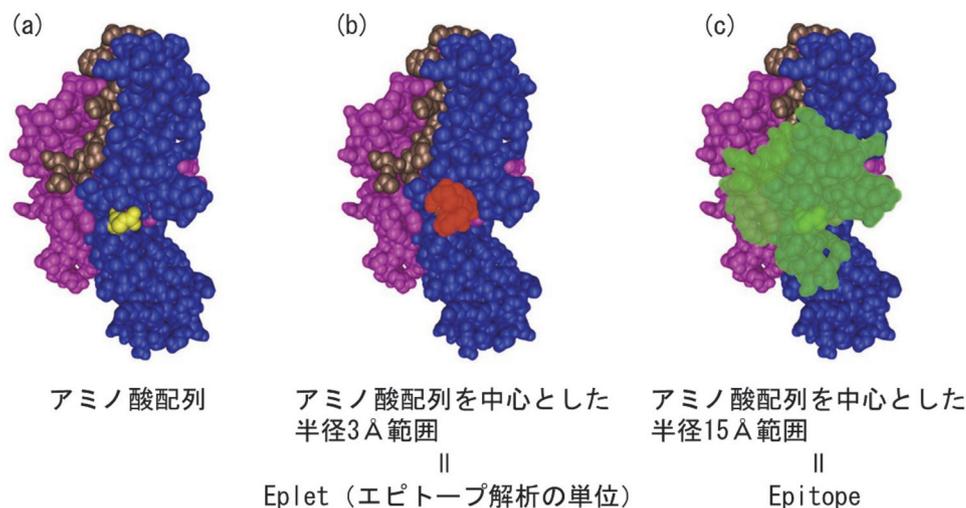
エピトープとは、アミノ酸配列から構成される抗原の決定基であり、抗体認識部位のことを示す。1つの

HLA 抗原には複数のエピトープが存在し、異なる HLA 抗原間で共有されている。特定のアミノ酸配列を中心に、半径 3Å (オングストローム) 程度の範囲内のアミノ酸を Eplet と呼ぶ (図 1)。抗体が抗原を認識する際の重要な要素となり、エピトープ解析の単位として用いられている。通常は、横並びの 3 アミノ酸がエピトープとなり、2~3 個のアミノ酸集団を Triplet と定義している。また、アミノ酸位置が離れていてもエピトープとなりうることもあり、この場合も Eplet と呼ばれる。また、半径 15Å 内で、定義される抗原上の抗体認識部位を Epitope と呼んでいる。本稿では統一してエピトープと表記する。

受付日：2023 年 6 月 29 日、受理日：2023 年 6 月 29 日

代表者連絡先：坂本 慎太郎 〒466-8650 愛知県名古屋市長区妙見町 2 番地の 9 日本赤十字社愛知医療センター名古屋第二病院 医療技術部 組織適合検査室

TEL: 052-832-1121 E-mail: sakashin@nagoya2.jrc.or.jp



* Am J Transplant. 2019;19:1708-1719. 改変

図1 HLA 抗原におけるエピトープ

2. エピトープ解析

エピトープ解析として最も知られている手法は、HLA Matchmaker アルゴリズムを用いた解析である。HLA Matchmaker は Duquesnoy によって開発されたソフトウェアであり、エピトープ (eplet) に基づいて分子構造を解析決定する。このソフトウェアはウェブサイト (<http://www.epitopes.net/index.html>) にて無料で公開されている。また、試薬メーカーが提供する解析ソフトウェアには HLA Matchmaker の機能が組み込まれているものもあり、タイピングデータや抗体検査結果を反映させることでより使いやすくなっている。

HLA エピトープの命名については HLA Eplet Registry (<http://www.epregistry.com.br>) に掲載されているものに従っており、「HLA 分子におけるアミノ酸の番号」(表1) と「アミノ酸の種類」を結合した形で表記される。HLA Eplet Registry は、2012年に開催された第16回国際 HLA・免疫遺伝学ワークショップ (IHIW: International HLA & Immunogenetics Workshop) の後援を受けて設立されたオンラインデータベースである。このデータベースは、広く使用されている HLA Matchmaker ソフトウェアに組み込まれたエピトープレパートリーを反映させることを目的としており、理論的に定義されたすべてのエピトープとその抗体検証状況を記録している。「検証済み」とされたエピトープは、実験的にそのエピトープに対する抗体の存在が証明されて

表1 アミノ酸略号

アミノ酸	略号	アミノ酸	略号
アラニン	A	ロイシン	L
アルギニン	R	リシン	K
アスパラギン	N	メチオニン	M
アスパラギン酸	D	フェニルアラニン	F
システイン	C	プロリン	P
グルタミン	Q	セリン	S
グルタミン酸	E	トレオニン	T
グリシン	G	トリプトファン	W
ヒスチジン	H	チロシン	Y
イソロイシン	I	バリン	V

いとされる。しかしその確証レベルは、ヒトモノクローナル抗体と単一 HLA 抗原発現細胞との反応を検証したものから、ヒト以外の血清を用いて検証したものまで、検証レベルが様々であり明確ではない。したがって、「検証済み」でないからといってそのエピトープの信頼性が低いとは言えず、解析から除外してしまうには注意が必要である。また、HLA Eplet Registry ではエピトープの情報が常に更新されているため、使用する HLA Matchmaker のバージョンにも注意を払う必要がある。

HLA Matchmaker では以下の2種類の解析手法がある。

1) エピトープミスマッチ

ドナーの HLA 抗原を構成するエピトープのうち、レシピエントの HLA 抗原に存在しないエピトープの数を表したものである。ミスマッチ数が多いほど抗体産生の

リスクが高まり、移植予後が悪化するとされている。

2) エピトープ解析

抗体がアレルに対してではなくエピトープに反応するという理論に基づき、HLA 抗体検査（特異性同定検査）の結果から、レシピエントが保有する抗体のエピトープレベルでの特異性を推定する手法である。エピトープは複数のアレルに共通して存在する場合が多いため、抗体の陽性反応を一つのグループとして捉えることができる。この手法により、以下のような情報が得られる。

① DSA 産生の原因となるエピトープ(免疫原性エピトープ) の特定：

エピトープ解析を行うことで、DSA がどのエピトープに対して産生されたものかを特定することができる。現時点では日常検査においてあまり意義がないかもしれないが、研究が進めば、移植予後に影響を与える可能性があるエピトープの存在が明らかになるかもしれない。その場合、エピトープの特定は日常的な検査でも重要になるであろう。

② MFI にとらわれず DSA を検出：

Luminex による蛍光ビーズ法が抗体検査の主流となつて以降、MFI (Mean Fluorescence Intensity) のカットオフ値の設定について長く議論されてきた。

しかし、MFI のみに基づいて一律にカットオフ値を設定すると、本来 DSA 陽性として判定すべきものを見逃すことがある。一つのエピトープに対する反応をグループとしてとらえることができれば、ドナータイプに対する MFI が低くても DSA として検出することができる。

③ 試薬に存在しないアレルへの抗体反応の推測：

抗体検査の結果から免疫原性エピトープを特定することができれば、そのエピトープを保有するアレルが推定できる。そのため、レアアレルに対する DSA 判定では非常に有用である。

3. Case Study

ここからはエピトープ解析の手順を説明するために、4 つの実例を紹介する。

1) Case 1 (図 2)

MFI が 20,000 近くの強陽性を呈する抗体が複数のアレルにまたがって検出されているのが特徴的な症例である。ドナータイプは DQB1*05:03 である。まずは強陽性の抗体に注目し、この反応が一つのエピトープによるものと推測する。この抗体の反応と、各アレルが保有するエピトープを照らし合わせると、「61FT」(DQA1) と

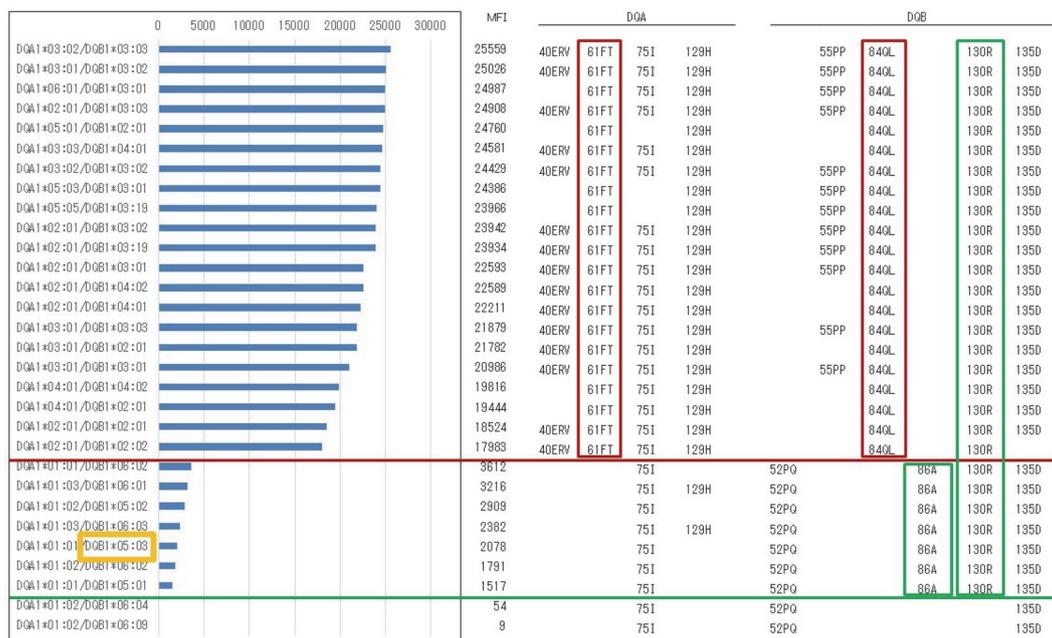


図 2 Case 1

MFI ≥ 10,000 の抗体を見ると (赤線), 「61FT」(DQA1) と 「84QL」(DQB1) の発現パターンと当てはまる (赤枠)。MFI ≥ 1,000 の抗体を見ると (緑線), 「86A」(DQB1) だけでなく 「130R」(DQB1) も候補となる (緑枠)。ドナータイプ (DQB1*05:03) (黄枠) に対する DSA は緑枠のどちらかのエピトープによるものと考えられる。

「84QL」(DQB1) が当てはまる。どちらのエピトープに反応する抗体か、またはどちらのエピトープにも反応する抗体なのかは現在の解析ソフトの機能からは区別することはできないが、これらのエピトープの影響で強陽性を呈していることが説明できる。

さらに、カットオフを MFI $\geq 1,000$ とすると、強陽性の抗体の影響が目立たないが、別の抗体が存在していることがわかる。この抗体に当てはまるエピトープを検索すると、MFI が 1,000 ~ 10,000 の間だけを見れば「86A」(DQB1) が候補となる。しかし全体を見ると「130R」(DQB1) も当てはまることが推測される。このように、強陽性の反応に隠れてしまうと抗体が存在しているかどうかはわからなくなる。この症例ではドナータイプ (DQB1*05:03) に存在するエピトープとして「86A」も「130R」も矛盾がないため、どちらかが原因エピトープであると考えられる。このように、一人の被検者が複数の抗体を持つ可能性があることも視野に入れておく必要がある。

2) Case 2 (図 3)

ドナータイプの DQA1*05:03 と DQB1*03:01 含む複数のアレルに対して陽性を示している。陽性と陰性がはっきりしており、陽性ピーズの MFI は全て 10,000 以上を呈している。この結果に基づいてエピトープ解析を行うと、陽性を示すアレルは全て「40GR」(DQA1) を保有していることが推測される。またこの結果からこの抗体が DQA1 のみに対する抗体であることも推定すること

ができる。したがって、DSA は DQA1*05:03 に対する抗体のみであり、DQB1*03:01 は否定することが可能となる。

しかし、同じエピトープに対する抗体であればどれも MFI は同程度になりそうなものであるが、このようにばらつきが出ることも多い。この現象は「Shared Epitope 現象」とよばれるものである。この現象は、特定のエピトープが複数種の蛍光ビーズに共有されている場合、このエピトープに反応する抗体が分散されてしまい、結果的に希釈された状態になる現象である。これにより実際よりも低い MFI を呈したり、各々のビーズとの結合に差が出てしまうことになる。このような現象があることを理解しておかないと、症例によっては本来陽性と判断すべきものを見落としてしまうことになりかねない。

3) Case 3 (図 4)

MFI が 1,000 前後の抗体がいくつか検出されている。ドナータイプである DQB1*05:02 は MFI が 1,000 未満であり、MFI 1,000 以上をカットオフとすると DSA は陰性と判定される。今回も陽性に当てはまるエピトープを探してみるが、いずれのエピトープも該当しない。そこで、反応パターンに着目すると、MFI が 369 から 47 と急に下がる箇所がある (シヨルダー)。このシヨルダーまでカットオフを下げると、陽性アレルを全てカバーするエピトープ、「52SK」(DQA1) と「52PQ」(DQB1) が見つかった。これは前述の「Shared Epitope 現象」

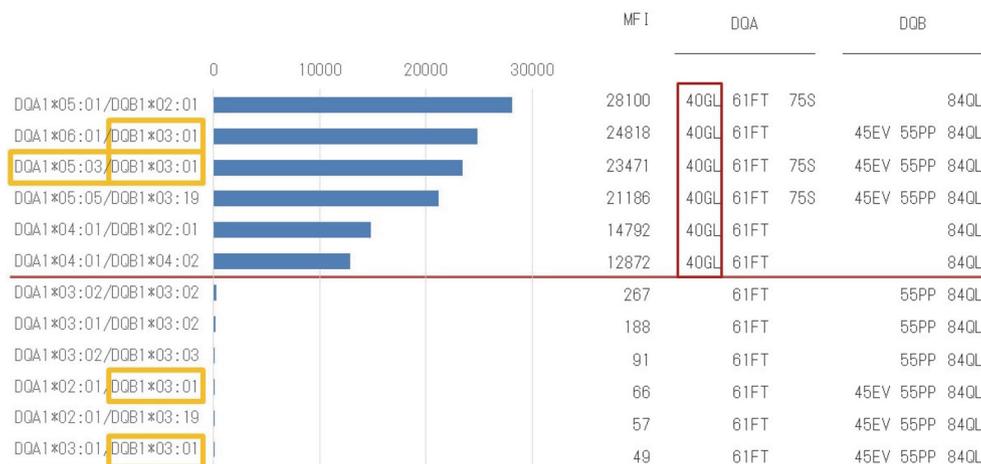


図 3 Case 2

複数のアレルに対して MFI $\geq 10,000$ の抗体が検出されている。解析を行うと、全て「40GL」(DQA1) を共有していることが推測される。ドナータイプ DQA1*05:03 と DQB1*03:01 に対するピーズが陽性を呈しているが、「40GL」は DQA にのみ保有されるため、DSA は DQA1*05:03 に対する抗体のみと推定される。

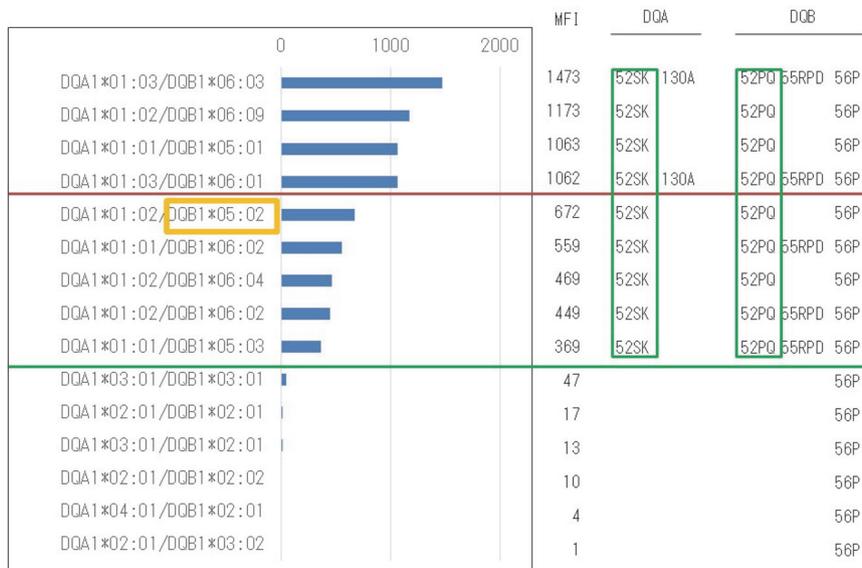


図4 Case 3

カットオフを MFI $\geq 1,000$ と設定しても抗体の反応と合うエピトープが存在しない (赤線)。グラフの形状 (ショルダー) に合わせてカットオフを設定すると (緑線), 反応に当てはまるエピトープが存在した (緑枠)。

により, 本来は MFI が高いにも関わらず, 複数のピーズに分散されてしまったため実際よりも低い MFI を呈していると考えられる。従って, これらのエピトープにはドナータイプ (DQB1*05:02) が含まれるため, この症例は DSA 陽性として考慮すべきと思われる。

このように, 画一的に MFI のみでカットオフ値を設定してしまうと, 本来 DSA 陽性として拾うべきものが拾えなくなることがある。しかし, 抗体をエピトープ単位で捉えることができれば MFI に捉われることなく DSA を検出することができる。

4) Case 4 (図5)

抗体が広範に, ならぬ反応を示している。ショルダーのような特徴的な形状を見つけることもできず, エピトープとしての塊が分かりにくい。図のように「71A」(DRB) は含まれていそうだが, その他の反応を裏付けるようなエピトープを特定できない。このような症例は, エピトープ解析に適していないといえる。DSA の判定も判断が分かれるところであるため, 臨床症状や経時の変化, 他の検査法の結果などから総合的に判断する必要がある。

4. 今後の課題

臓器移植においてエピトープ解析を日常的に活用して

いくためには様々な課題が存在する。一つ目の課題は, 高解析度の HLA タイピングが必要であることである。過去の症例ほどエピトープ解析を行う意義は高いと考えられるが, 血清学的レベルのタイピングしか実施されていない場合が多い。現状のタイピング検査法 (SSO 法) であっても, そこから得られる結果では ambiguity に問題がある。また, すべてのローカスに対するタイピングが実施されていないことも多い。解析対象が日本人であればハプロタイプからの推定も可能ではあるが, 信憑性は低い。これらの問題を解決するには, 欧米のように臓器移植領域においても NGS (次世代シーケンス) による HLA タイピングが一般的になることが望ましいが, 一般病院で導入するには費用・手技・時間などの障壁が高い。

二つ目の課題は, エピトープ解析としての手法が統一化されていないことである。特に原因エピトープの推定については, 明確な基準がないため解析者の知識と経験に依存することが多い。本稿での解説も筆者の独断によるものであるため, 他にも様々な解釈が存在する可能性がある。また, 症例ごとに個別に解析する必要があるため, 労力を要する。複数人で解析を分担する際には, 解析基準を統一しておく必要がある。さらに, エピトープの命名法についても国際的に標準化されているわけでは

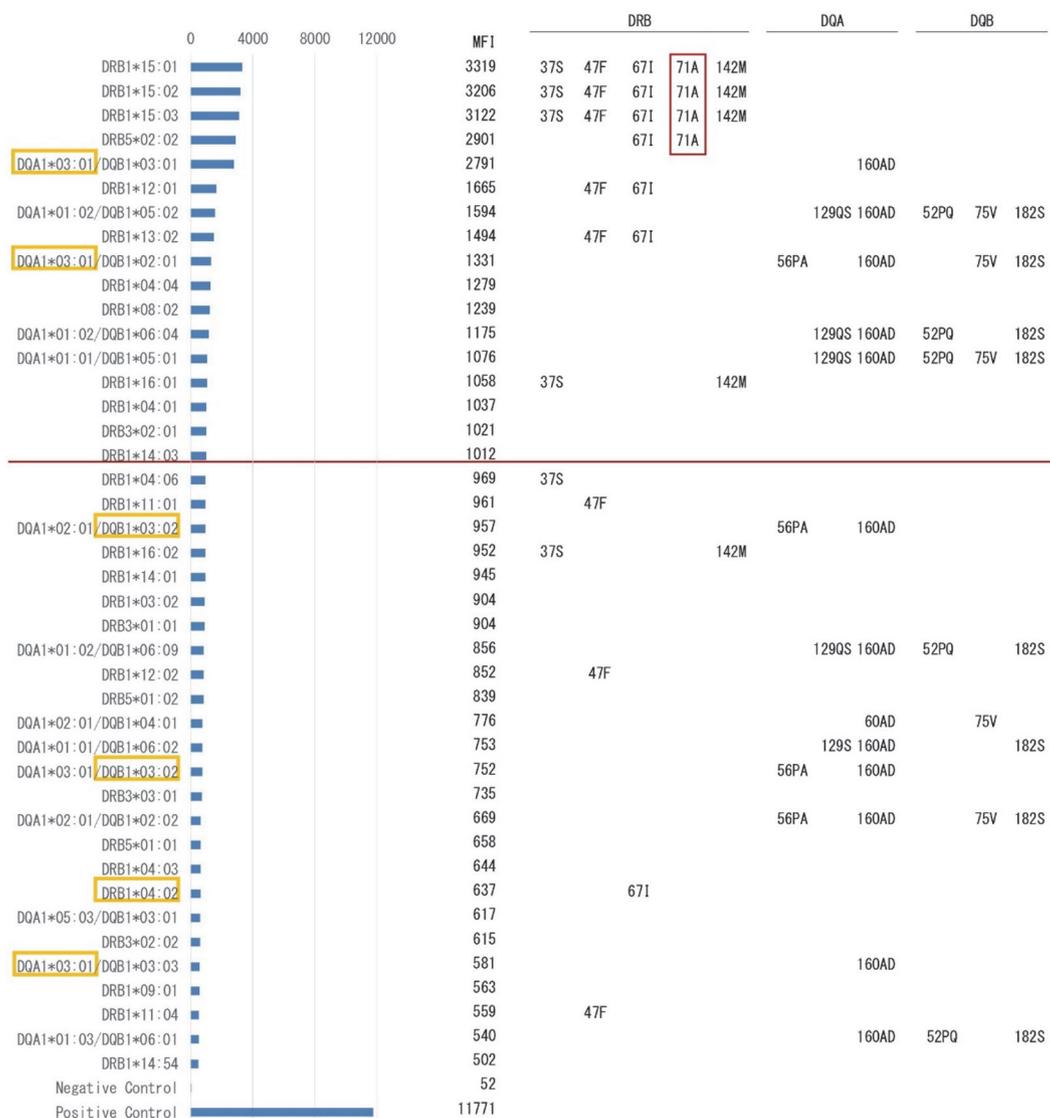


図 5 Case 4

カットオフを MFI ≥ 1,000 と設定しても抗体の反応と合うエピトープが存在しない (赤線)。グラフの形状もなだらかで特徴がないため新たなカットオフを設定することが困難である。「71A」(DRB) に対する抗体は存在していそうだが (赤枠), ドナータイプ (黄枠) を説明できるようなエピトープは特定できない。

ない。将来的に HLA アレルのようにワークショップによる標準化が行われる可能性はある。その際には、現在のエピトープの再命名が必要になる可能性もあるため、経年的な解析をするには注意が必要となる。

三つ目の課題は、エピトープ解析は全ての症例に適用できるわけではないことである。Case 4 に挙げたように判定が困難な症例や、論理的に説明がつかない症例もある。このような問題の原因としては、非特異的の反応や non HLA 抗体などの血清の問題、蛍光ビーズ上の精製抗原の変性による抗体の結合不良などの試薬の問題など

が考えられる。エピトープ解析に頼り切らず、臨床症状や経時的変化、他の検査法との整合性を確認するなど、包括的に評価することが重要である。

5. おわりに

エピトープ解析は、移植に関わる重要な情報を提供し、DSA の特定や抗体反応の評価に役立つ可能性がある。エピトープ解析を日常的に導入することは、確かにいくつかの課題を克服する必要があるが、経験の積み重ねによりその価値が実証されることが期待される。本稿がエ

ピトープ解析の導入において第一歩となり、将来的に判断の一助となれば幸いである。

参考文献

- 1) 田中秀則：臨床検査における抗ドナー抗体について 移植 Vol.51, No.6, 429-437, 2016.
- 2) 中島文明：HLA 抗体検査の判定基準と結果の解釈について 日本組織適合性学会誌 26:95-105, 2019.
- 3) Wiebe C : HLA-DR/DQ molecular mismatch: A prognostic biomarker for primary alloimmunity Am J Transplant. Jun;19(6):1708-1719, 2019.
- 4) GARCIA-SANCHEZ : The shared epitope phenomenon-A potential impediment to virtual crossmatch accuracy Clinical Transplantation. 34:e13906,2020.
- 5) HLA Matchmaker <http://www.epitopes.net/index.html>
- 6) HLA Eplet Registry <https://epregistry.com.br/>

Epitope analysis for clinical application

Shintaro Sakamoto¹⁾

¹⁾ Japanese Red Cross Aichi Medical Center Nagoya Daini Hospital HLA Laboratory

Recent advances in histocompatibility testing have contributed to improved organ transplantation outcomes: advances in HLA typing technology have enabled nearly complete determination of alleles and imaging of three-dimensional structures based on amino acid sequences of HLA antigens. Furthermore, the fluorescent bead method using Luminex has become the mainstream for HLA antibody testing, and detection of specificity for HLA alleles has been realized. These advances have given rise to the method of epitope analysis. Although HLA allele mismatch was conventionally used in the risk assessment of organ transplantation, many studies in Japan and overseas have reported that more detailed assessment is now possible using epitope analysis. However, epitope analysis is still not routinely performed in clinical practice. The reasons for this include a lack of knowledge about epitopes, the complexity of analysis methods, and a lack of uniformity in methods. However, having a basic knowledge of analysis methods may be of help when there is a doubt about the interpretation of antibody test results. The content of this paper is intended to encourage a routine introduction to epitope analysis. Therefore, the technical content will be limited to a description of only basic knowledge, and will be outlined mainly in the form of case descriptions.

Key Words: Epitope Analysis, HLA Matchmaker, Eplet, Donor Specific Antibody (DSA)