

遺伝学部門

Department of Genetics

遺伝学部門では、ヒトを対象として、その正常および異常な遺伝形質を分子レベルで解明することで医学の進展に寄与することを目的としている。このため免疫関連疾患、癌、遺伝子病を対象とした研究を展開している。

人事異動は次のとおりである。平成5年4月より白澤専二が助手に就任した。大学院生として、峯田 聖、田名 毅、竹下都多夫が研究に参加した。

特別研究学生として安永正剛が大分医大より研究に参加している。

また助手の福井宣規、白澤専二は、それぞれ平成5年4月より stanford 大学ハワードヒューズ医学研究所 (M.M.Davis 教授) および平成5年9月よりワシントン大学ハワードヒューズ医学研究所 (S.J.Korsmeyer 教授) へ留学した。

A. HLA による免疫応答、疾患感受性の遺伝的制御機構の解析

HLA 領域内遺伝子による免疫応答性および疾患感受性・抵抗性の個体差の発現機序に関する研究を進展させた。このため HLA 領域内遺伝子群の遺伝的多型性を DNA レベルで詳細に解析し、健常者集団と自己免疫疾患患者集団における各対立遺伝子頻度の比較から、疾患と強い相関を示す HLA 対立遺伝子群ないし HLA ハプロタイプを同定した。一方、従来の研究を進展し、溶連菌 M 蛋白への T 細胞免疫応答性をエピトープレベルで解析した。またヒト HLA クラス II 遺伝子を発現するトランスジェニックマウス (TGM) を用いて、免疫応答性発現における HLA 分子の意義を検討した。

a. HLA 領域遺伝子群の遺伝的多型性の解析 (木村彰方、安永晋一郎、伊達是志、笹月健彦)

HLA クラス II 遺伝子群の遺伝的多型性は第 2 エクソンを中心として解析されてきたが、その他のエクソンに関する解析は少ない。そこで HLA-DQA 1 および DQB1 遺伝子について、各々 13 種の対立遺伝子由来の全長 cDNA の塩基配列を決定した。その結果、これまでに報告された塩基配列の誤りを見出すとともに、新たな対立遺伝子を複数同定した。図 A. 1 にその概略を示すが、これまでに第 2 エクソンの解析から同一と考えられていた対立遺伝子が更に分類できることが明らかとなった。またこれらの対立遺伝子は DRB 対立遺伝子と特徴的なハプロタイプを形成することを見出した (図 A. 2)。

一方、HLA クラス I 遺伝子については、これまでに全ての対立遺伝子を同定できる手法がないため、疾患感受性との相関や骨髄移植における HLA 一致の意義が DNA レベルで論じら

れていなかった。そこで、HLA-A 遺伝子について、最も著明な遺伝的多型性を示す第 2 および第 3 エクソンを同時に PCR 法によって増幅し、多型性を示す領域に対応する 77 種の SSOP との反応性を検討することで、対立遺伝子型を決定する方法（DNA タイピング法）を開発した。この方法によって全 44 種の対立遺伝子が DNA レベルで同定できた（図 A. 3）。さらに研究の過程で新たな HLA-A 対立遺伝子を見出したため、その塩基配列を決定した（図 A. 4）。このため、HLA-A 遺伝子には少なくとも 48 種の対立遺伝子の存在することが明らかとなった。

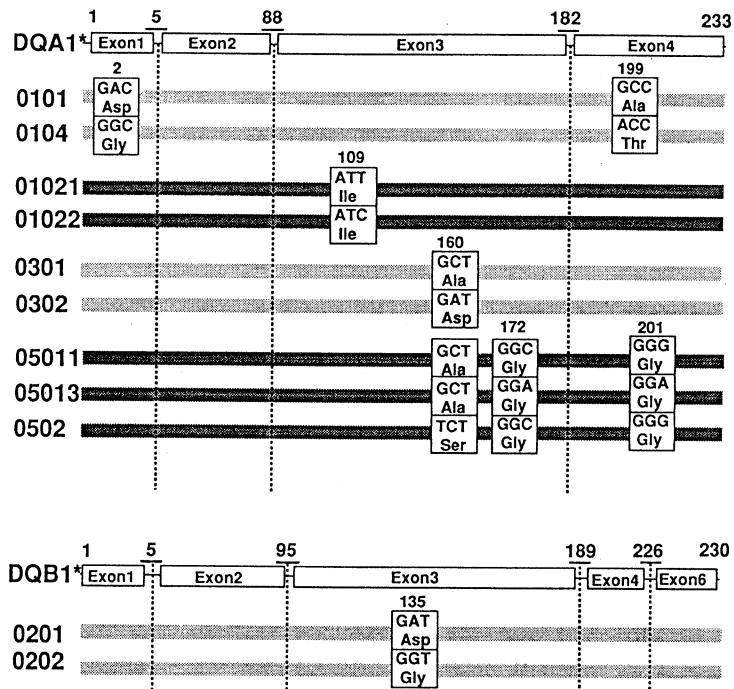


図 A. 1 HLA-DQ 遺伝子の多型性

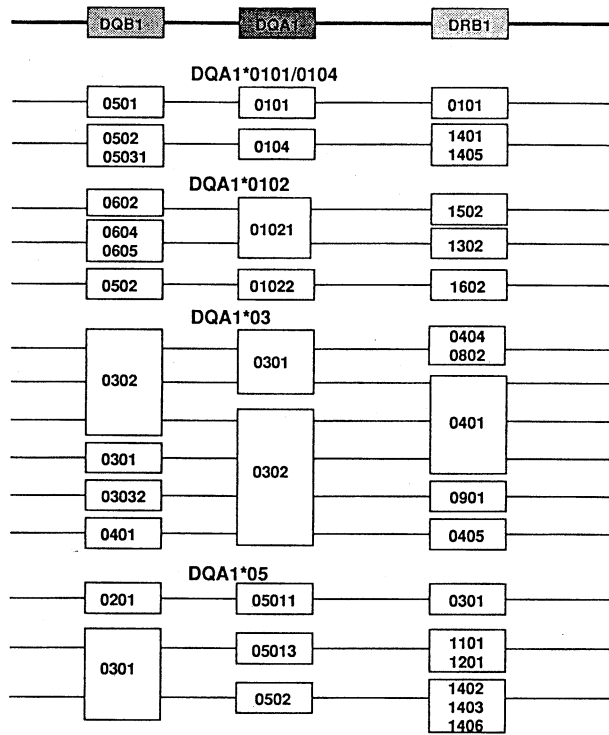


図 A. 2 DR-DQ ハプロタイプ

EC-A	HLA-A allele	AL-SSOP										
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
		667777	777	0006	000	00111	01111224	11122	6222222353333	5555666	3333344444566	4444765555
		890123	456	1235	456	89012	73456239	78901	7456789091234	3456012	5678901234234	5678760178
2.1	0201, 0209	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.2	0202	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.3	0203	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.4	0204	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.5	0205	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.6	0206	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.7	0207	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.8	0208	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.10	0210	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.11	0211	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.12	0212	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2New-1	?	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2New-2	?	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
68.11	68011	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
68.12	68012	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
68.2	6802	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
69	6901	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	2501	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26.1	2601	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26.2	2602	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26.3	2603	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26.4	2604	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26New	?	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
34.1	3401	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
34.2	3402	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
43	4301	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
66.1	6601	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
66.2	6602	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
29.1	2901	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
29.2	2902	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
31	3101	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32.1	3201	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33.1	3301	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33.2	3302	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
74	7401	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	2301	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24.2	2402	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24.3	2403	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24New	?	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1	0101	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3.1	0301	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3.2	0302	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11.1	1101	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11.2	1102	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30.1	3001	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30.2	3002	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30.3	3003	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
36	3601	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

図 A. 3 HLA-A 遺伝子の DNA タイピング

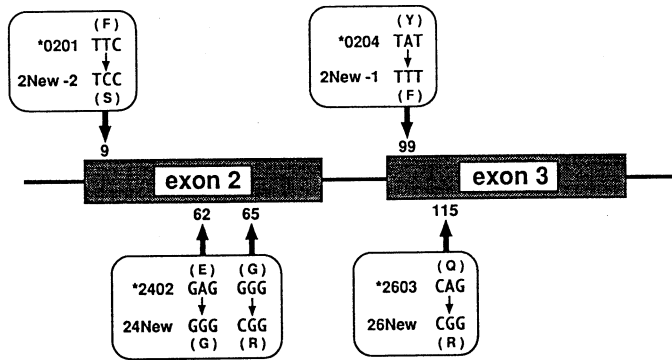


図 A. 4 新たな HLA-A 対立遺伝子

b. 疾患感受性および骨髄移植における HLA の意義の解析 (木村彰方, 安永晋一郎, 伊達是志, 小柳 毅, 西 宏文, 万 小林, 堀 俊雄, 笹月健彦)

前年度に引きつづき, 自己免疫疾患と HLA との相関を DNA レベルで解析した。

新たに明らかにした HLA-DQA1 遺伝子の多型性を用いて, 若年性糖尿病と HLA との相関を解析した。日本人集団およびノルウェー人集団を対象とした解析により, 特定の HLA-DQA1 対立遺伝子との相関を認めた (表 A. 1)。疾患感受性との相関は人種によって異なるが, 抵抗性との相関は同一であることが明らかになった。DRB1 および DQB1 遺伝子とのハプロタイプ解析を合わせて行なうことにより, 若年性糖尿病への感受性は HLA-DRB1 が, また抵抗性は HLA-DQB1 が規定していることが強く示唆された。

表 A. 1 HLA-DQA1 と若年性糖尿病の相関

HLA	Japanese				Norwegian			
	patient (n=44)	Control (n=188)	R.R.	P	Patient (n=100)	Control (n=100)	R.R.	P
DQA1*0101	13.6%	10.6%			9.0%	21.0%	0.38	<0.05
01021	25.0%	25.0%			10.0%	38.0%	0.19	<0.0001
01022	0%	1.1%			1.0%	0%		
0103	20.5%	38.3%	0.43	<0.05	3.0%	14.0%	0.21	<0.05
0104	0%	11.2%	0.09	<0.05	0%	8.0%	0.05	<0.05
0201	0%	0.5%			4.0%	22.0%	0.16	<0.001
0301	20.5%	10.1%			73.0%	19.0%	11.2	<0.0001
0302	84.1%	60.6%	3.25	<0.01	15.0%	18.0%		
0401	4.5%	2.1%			7.0%	8.0%		
05011	0%	1.1%			57.0%	25.0%	3.91	<0.0001
05013	2.3%	9.0%			3.0%	16.0%	0.18	<0.01
0502	0%	6.9%			0%	0%		
0601	0%	4.3%			0%	0%		

表 A. 2 自己免疫性甲状腺炎と HLA-A との相関

HLA-A allele	% control (n=250)	% Graves (n=87)	% Hashimoto (n=100)
A*0201	21.6	27.6	23.0
0206	14.8	32.2	16.0
0207	9.6	13.8	17.0
*0210	1.2	1.1	1.0
2601	11.2	19.5	15.0
2402	60.8	49.3	60.0
*3302	19.6	9.2	6.0

a : RR=2.73, p<0.0001, b : RR=1.94, p<0.05, c : RR=0.60, p<0.05

d : RR=0.44, p<0.05, e : RR=1.94, p<0.05, f : RR=0.28, p<0.01

表 A. 3 HLA-A 2サブタイプと自己免疫甲状腺疾患感受性のオッズ比

	Graves	Hashimoto	AA at		
			9	99	107
A*0201	2.1*	1.0	F	Y	W
*0206	3.5 ^b	1.0	Y	Y	W
0207	2.3	1.7	F	C	W
*0210	1.5	0.8	Y	Y	G

versus A2 or A33 negative population

a : p<0.05, b : p<0.001

一方 HLA-A 遺伝子の DNA タイピングを用いた解析の結果、甲状腺自己免疫疾患であり、いずれも HLA-A2 との相関を示すことが知られている Graves 病と橋本病は、それぞれ異なる HLA-A 対立遺伝子との相関を示した (表 A. 2)。特に HLA-A2 サブタイプ間で、両疾患への罹患危険率のオッズ比が異なることは、これらの疾患における HLA-A 遺伝子の寄与の分子機構が異なることを示す (表 A. 3)。また橋本病は HLA-A2 と DR53 の相互作用で発症することが示唆された。

さらにリウマチ性心臓病患者集団の HLA クラス II 遺伝子の解析から、本症は DRB1*1401 が疾患感受性を、また DQB1*0303 が疾患抵抗性を規定することが示唆された。全く同様の相関が拡張型心筋症においても観察されたが、このことは、リウマチ性心臓病の発症要因と考えられる溶連菌 M 蛋白、拡張型心筋症の発症要因と推定されるコクサッキーウイルスおよび心筋自己抗原であるミオシン重鎖のそれぞれに互いに相同なアミノ酸配列が存在することと合わせて興味深い。

一方、スギ花粉症患者集団の解析から、本症と DPBI*0501 との弱い相関を見出したが、DR、DQ 対立遺伝子との相関は認められなかった。

c. 甲状腺自己免疫疾患の発症機構の解析 (須藤 徹, 木村彰方, 伊達是志, 上川路信博, 笹月健彦)

Graves 病は HLA-A*0206 と DPB1*0501, 橋本病は HLA-A*0207 と DRB4*0101 によってその疾患感受性が規定されると考えられるため, これらの疾患患者の甲状腺組織より, 浸潤 T 細胞を抗 CD3 抗体を用いて活性化し株化した. 一方, HLA-A2 サブタイプごとに, 結合する自己抗原ペプチドモチーフが異なることを見出した. 今後甲状腺自己抗原と考えられる TSH レセプターおよびペルオキシダーゼ配列中の HLA-A2 結合モチーフを推定し, 合成ペプチドを用いた浸潤 T 細胞による自己細胞障害を検討する予定である.

B. ヒト免疫応答の遺伝的制御機構

これまでに明らかにしてきたヒト免疫応答の個体差と HLA との関連を細胞レベルで明らかにするため, 溶連菌 M 蛋白, HBs 抗原への免疫応答性を解析した. また HLA-B 分子に結合する自己抗原ペプチドのアミノ酸配列を質量分析法によって決定した.

a. HLA-DP9 拘束性 T 細胞エピトープの解析 (董 瑞平, 上川路信博, 問田 望, 木村彰方, 笹月健彦)

HLA-DP9 分子による T 細胞活性化機構を解析するために, 溶連菌 M 蛋白由来の合成ペプチドを用いて, HLA-DP9 分子と抗原ペプチドとの結合親和性および T 細胞活性化能を検討した. HLA-DP9 陽性者より樹立した M12 蛋白特異的 T 細胞株の解析から, M 蛋白には 5 ケ所に DP9 拘束性エピトープが存在することが明らかになった. これらのエピトープを含む合成ペプチドは, いずれも DP9 分子に高い結合親和性を有すること, また共通するアミノ酸配列を有していた (表 B. 1). さらにアミノ酸置換を導入した合成ペプチドを用いた実験により, DP9 結合モチーフには陽性荷電アミノ酸が必須であることが明らかとなった (表 B. 2). これまでに報告されている HLA-DR 結合モチーフでは最初の疎水性アミノ酸が重要であるが, DP9 結合モチーフは全く異なっていることから, HLA-DP と HLA-DR は全く異なるペプチドを抗原提示すると考えられた.

表 B. 1 DP9 拘束性 T 細胞活性化に必要な最小ペプチド

peptide	position	sequence	motif	binding competition	T cell proliferation
MP-10R11	118-128	GREVHAADL LR	1	+	+
MP-10D13	113-125	KDIQFGRE VHAAD	1	+	+
MP-35Q12	431-442	KLEAEAKA LKEQ	1	+	+
MP-35A18	421-438	TEKEKAELQA KLEAEAKA	2	+	-
MP-36L12	442-453	QLAKQAEELA KL	2	+	-
MP-36K12	441-452	EQLAKQAELA K	2	+	+

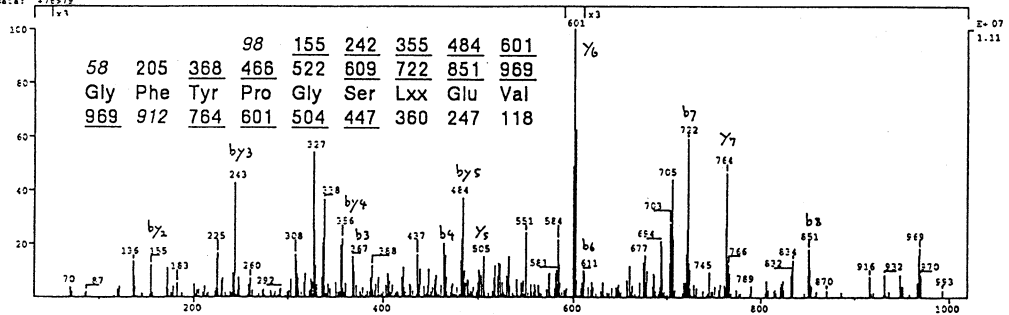
表 B. 2 アミノ酸置換による DP9結合モチーフの決定

peptide	sequence	binding inhibition	T cell proliferation
MR-10R13	116 128 Q F G R E V H A A D L L R	54%	1.00
	--- K -----	46	1.64
	--- Q -----	—	—
	--- E -----	—	—
	--- A -----	—	—
	--- F -----	—	—
MP-36L13	441 453 E Q L A K Q A E E L A K L	26	1.00
	--- A -----	—	—
	- K -----	38	0.69
	- T -----	26	1.06
	- E -----	15	0.27
	- A -----	15	0.87

b. HLA-B52分子に結合した自己抗原ペプチドの解析（上川路信博，須藤 徹，笹月健彦）

微量ペプチドのアミノ酸配列を決定できる質量分析装置を用いて，HLA-B52結合ペプチドの解析を行った． 5×10^9 個の EB-TOK 細胞株より HLA-B52分子を精製し，熱酸処理によって HLA-B52分子に結合したペプチドを抽出した．質量分析法によってこのペプチドを解析したところ，50以上のピークが認められ，7種のピークに関しては，そのアミノ酸配列を決定できた．図 B.1に解析例として， m/z 969ペプチドの衝突誘導解離のスペクトルデータと，スペクトルより推定されるアミノ酸配列を示す．表 B. 3に示すように，アミノ酸配列を同定できたペプチドは8～10アミノ酸より構成されており，このうち2種については，チロシンフォスファターゼおよび HLA-DRB 分子由来であった．表 6に示すペプチドのうち8および9アミノ酸からなるものは B52分子に特異的に結合しているものと考えられたが，これらのペプチドは第2番目にグルタミン，C末端に疎水性アミノ酸を共有しており，これが B52分子結合モチーフと考えられた．

SPEC: b62-2-31 31-JUL-93 DERIVED SPECTRUM 9
 Samp: b62 associated peptide lot 2 f223 Start: 11:59:34 104
 Comp: cid of free acid, 201,516/685/969
 Note: ESI -DAU 969.0 @ -14eV LOS Q18 UP LR
 Oper: rk Inlet: 11114223 Inlet: 50 x 1000
 Sess: 601.0 Inten: 127703370 Masses: 1153
 Norm: 1000.00 RIC: 127703370 *masses: 1153
 Peak: 1000.00 EMU
 Data: -16-29



Data base match; Gly Phe Tyr Pro Gly Ser Ile Glu Val; DR2b 121-129

図 B. 1 m/z 969分画の質量分析

表 B. 3 HLA-B52分子に結合したペプチドの配列

Fraction Number	(M+H) ⁺ (m/z)	Signal (X10 ⁶)	Sequence	Data base match	
				Sequence	Source Protein
14	1088	4.4	D V Q X Q D S D P A	-	
14	1112	2.5	D V Q X Q E D P P A	-	
18	928	16.8	G Q F K T Y A X	-	
20	1032	3.1	A Q Y K F X Y V	AQYKFIYV	Protein-Tyrosine Phosphatase
21	969	10.7	G F Y P G S X E V	GFYPGSIEV	HLA-DR β chain
23	954	1.9	V Q X X X R X	-	
24	910	4.0	N Q X P X X V X	-	

Leu and Ile are not distinguishable by tandem mass spectrometry, and are designated X.

c. HBs ワクチンに対する免疫応答性の解析 (峯田 聖, 田名 毅, 関 衛平, 上川路信博, 笹月健彦)

HBs ワクチンに対する免疫応答性と HLA との関連を検討する目的で, リコンビナント HBs ワクチン 3 回接種後の抗体価を RIA 法で測定した. またワクチン接種者の HLA クラス II 対立遺伝子型を PCR-SSOP 法によって決定した. HBs 抗体価のヒストグラムはほぼ正規分布を示した (図 B. 2) が, 高応答者には DRB1*0101 また低応答者には DRB1*0405 陽性者が有意に増加しており, DRB1 対立遺伝子型と抗体価との相関が認められた (表 B. 4). また in vitro における HBs 抗原特異的 T 細胞増殖反応は, in vivo における HBs 抗体価と相関した. 現在 in

in vitro における種々のサイトカイン産生性を解析している。

一方、HBs 抗原特異的 T 細胞反応性を T 細胞エピトープレベルで解析した。HBs ワクチン接種者 53 名より HBs 抗原特異的 T 細胞株を樹立したが、いずれも抗 DR 抗体で特異的増殖反応が抑制され、抗 DQ あるいは抗 DP 抗体に影響されないことから、HBs 抗原の拘束分子は主に HLA-DR であると考えられた。また HBs 抗原由来の合成ペプチドを用いた解析の結果、HLA-DRB1*0101 陽性者は HB-2 (16~31)、HB-8.5 (81~99) および HB-15 (148-169) に反応した。一方、HLA-DRB1*0405 陽性者は HB-2 にのみ反応した。このことは HLA-DRB1 に依存して異なる抗原ペプチドが認識されることを示すが、高応答者 (DRB1*0101) と低応答者 (DRB1*0405) とのいずれもが反応しうる抗原ペプチドの存在も明らかである。今後、同一の抗原ペプチドへの反応性の質的相違を明らかにすることで HBs 抗原への免疫応答性と HLA との関連の分子機構が解明できると考えられる。

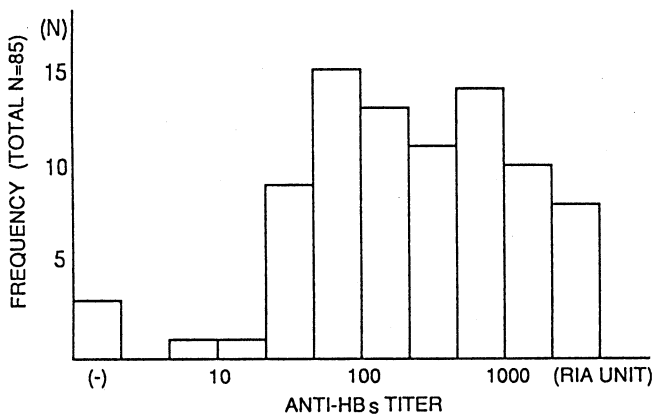


図 B. 2 HBs ワクチン接種後の抗体価

表 B. 4 DRB1 対立遺伝子と HBs 抗体価との関連

	ANTI HBs TITER (RIA UNIT)	PROLIFERATION ASSAY (CPM)
DRB1*0101 DONOR (N=18)	1103.4	52831.9
DRB1*0405 DONOR (N=19)	229.9	36495.5

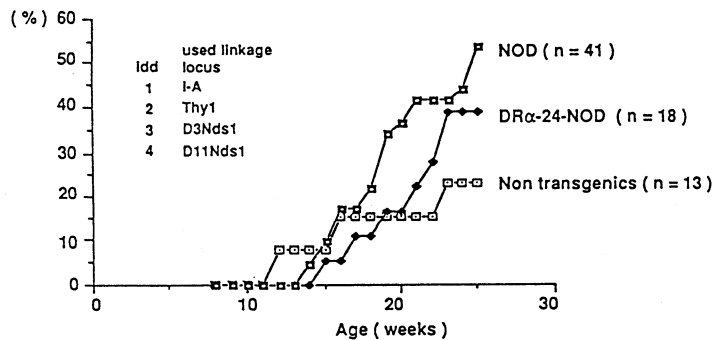
C. HLA トランスジェニックマウスを用いた免疫応答の遺伝的制御の解析

HLA による免疫応答および疾患感受性の遺伝的制御機構を解析する場合、ヒトを用いた実験には制約が多いため、HLA 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (TGM) を作製し、これを用いた個体レベルでの解析を行っている。

a. HLA-TGM を用いた可溶性 HLA 分子および HLA ペプチドによる免疫寛容の誘導 (竹下都多夫, 山本 健, 山根一聡, 上川路信博, 笹月健彦)

前年度までに HLA-DQ6-TGM において、DQ6 分子に依存した MLR の惹起、H-2D 分子による DQ6 ペプチドの提示を報告している。このようなアロ抗原の認識現象を利用して、特異的アロ抗原への免疫寛容を誘導する薬の開発を目的として、可溶性 DQ6 分子あるいは DQ6 由来ペプチドを修飾することで、*in vitro* における CD4 あるいは CD8 陽性細胞の反応抑制を試みている。

Cumulative frequencies of diabetes in DR α -24-NOD female mice hemizygous for DRA transgene



Cumulative frequencies of diabetes in DR α -30-NOD female mice

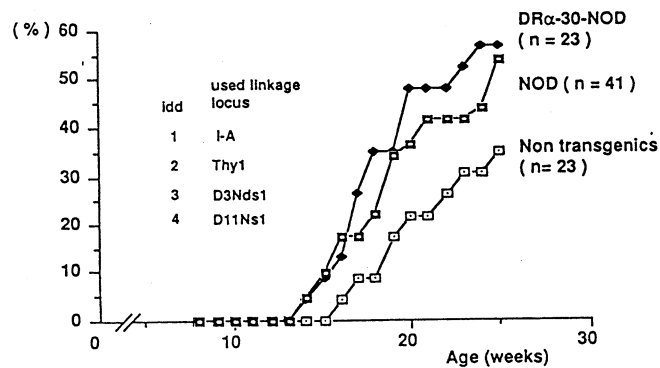


図 C. 1 DRA 遺伝子導入による NOD 糖尿病発症への影響

b. DRA 遺伝子導入による NOD マウスの糖尿病発症への影響の検討

(山根一聡, 山本健, 吉河康二, 竹下都多夫, 福井宣規, 木村彰方, 笹月健彦)

NOD マウスは自己免疫性糖尿病の動物モデルであるが, I-E α 遺伝子導入により, その膵島炎および糖尿病の発症が完全に抑制されることが知られている. 我々は, 前年度までに, DR A-TGM を用いて, HLA-DR α 遺伝子導入に伴って DR α E β 分子が発現し, E α E β 分子と同様に特定の V β レパトワを欠失させること, また蛾チトクローム C への免疫応答能を回復できること, すなわち I-E 分子と同様の機能を有することを明らかにしている. 従って DRA 遺伝子導入により NOD マウスの糖尿病発症が抑制できるか否かを検討した. 2 系統の DRA-TGM (DR α 24 および DR α 30) を NOD に戻し交配し, I-A^{NOD} を含む少なくとも 4 つの idd 座位を NOD タイプにして解析した. その結果, いずれの系統においても糖尿病発症は抑制されず, むしろ増強する傾向が認められた (図 C. 1). このことは NOD の糖尿病発症抑制には V β ₅, V β ₁₁ などの特定の T 細胞レパトワの欠失は影響しないことを示す.

c. CD4⁺CD8⁺ 胸腺細胞特異的に発現する分子の同定 (山本 健, 山根一聡, 竹下都多夫, 木村彰方, 笹月健彦)

胸腺細胞の CD4⁻CD8⁻ から CD4⁺CD8⁺ への分化に際して, TCR β 鎖を介した分化調節が存在すると思われる. 我々は前年度までに, DRA-TGM と TCR-TGM の交配実験から, TCR β 鎖と MHC 分子との相互作用により, CD4⁺CD8⁺ 細胞が成熟 T 細胞へ分化するために必須の未知の分子が誘導される可能性を示した. 本年度はこの分子を同定する目的で CD4⁺CD8⁺ T 細胞を特異的に認識するラット単クローン抗体を作製した. 現在この単クローン抗体により認識される分子を同定中である.

D. 大腸癌細胞株を用いた発癌機構の研究 (白澤専二, 古瀬正徳, 笹月健彦)

多段階発癌過程における活性化 K-ras 遺伝子の役割を解明するために, 大腸癌細胞株における正常 K-ras あるいは活性化 K-ras 遺伝子をそれぞれジーンターゲティング法により破壊した細胞株を得た. これらの娘細胞株を親株と比較すると, 活性化 K-ras の破壊により, ノードマウスにおける造腫瘍性の低下 (表 D. 1), c-myc 遺伝子発現の減少, PKC 活性の亢進, 血清刺激による c-jun 遺伝子の発現誘導の回復 (図 D. 1) を認めた. これらは, 活性化 K-ras によって腫瘍特性が規定されることを示唆するが, さらに直接的な証明を行うために, 造腫瘍性を消失した娘株に活性化 K-ras, 正常 K-ras, あるいは c-myc 遺伝子を導入したトランスフェクタントを作製し, 現在その腫瘍特性を検討中である.

表 D. 1 活性化 K-ras 遺伝子破壊による造腫瘍性の消失

Cell	Ki-ras disruption	tumorigenicity in nude mice
DLD-1	parent	5/5
DKs-5	NHR	5/5
DK0-1	HR-N	5/5
DK0-3	HR-M	0/7
DK0-4	HR-M	0/7
DKs-8	HR-M	0/7
HCT116	parent	5/5
HK2-10	NHR	3/3
HK2-8	HR-M	0/4
HKe-3	HR-M	0/7
HKh-2	HR-M	0/7

NHR, non-homologous clone

HR-M, activated Ki-ras disruption clone

HR-N, normal Ki-ras disruption clone

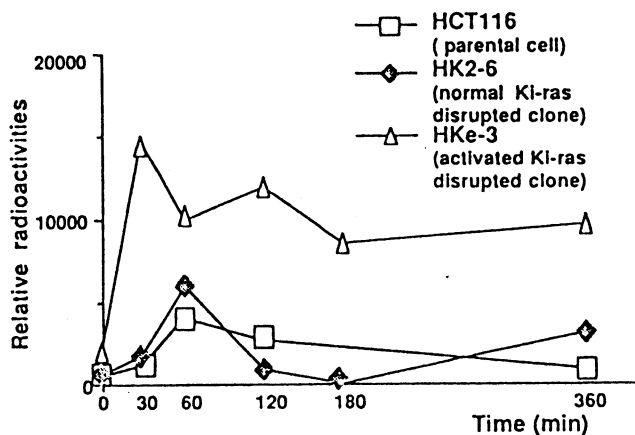


図 D. 1 血清刺激後の c-jun 遺伝子発現

E. 肥大型心筋症の原因遺伝子変異の同定に関する研究（木村彰方，原田晴仁，安永正剛，西 宏文，笹月健彦）

肥大型心筋症は原因不明の左室肥大を主徴とし，若年者の急死原因の多くを占める常染色体性優性遺伝性疾患である．我々は本症の原因を究明するための研究を行っている．

昨年度に引きつづき，全国レベルで肥大型心筋症症例を収集し，心筋βミオシン重鎖遺伝子変異をスクリーニングした．これまでの解析をまとめると，家族歴の明らかな本症患者108名中19名，家族歴の不明な孤発例73名中2名において，合計14種のミスセンス変異を同定した（表D. 2）．すなわち心筋βミオシン重鎖遺伝子変異に起因する本症は，日本人では約20%以下であることを明らかにした．

一方，本症多発46家系を対象として，心筋βミオシン重鎖遺伝子内のCAリピートマーカを用いた連鎖解析の結果，11家系で連鎖が否定された．このことは，少なくとも25%の家系では本症は心筋βミオシン重鎖変異に起因しないことを示し，本症の遺伝的不均一性が明らかとなった．なお，連鎖の否定できる家系とミオシン変異を有する家系間には，本症の臨床症状，重症度あるいは進展度には全く差がみられなかった．ついで，この11家系を対象として，第18染色体上の遺伝マーカーとの連鎖を検討したところ，本症は長腕上の遺伝マーカー（TTR）と連鎖することが示唆された（図D. 2）．

表D. 2 日本人肥大型心筋症患者に認められた心筋βミオシン重鎖遺伝子ミスセンス変異

コドン	変異	多発家系発端者	その他の患者		疾患の浸透率
			家族性	孤発性	
26	Ala to Val	0	0	1	1/1
59	Val to Ile	0	1	0	2/2
143	Arg to Gln	0	1	0	2/2
587	Asp to Val	0	1	0	1/1
602	Asn to Ser	1	0	0	3/3
615	Lys to Asn	0	1	0	2/2
731	Pro to Leu	0	1	0	1/1
736	Ile to Met	0	1	1	4/5
741	Gly to Trp	0	1	0	2/2
741	Gly to Arg	1	0	0	2/2
778	Asp to Gly	3	2	0	16/17
797	Ala to Pro	0	1	0	1/1
870	Arg to His	3	0	0	9/10
935	Glu to Lys	1	0	0	4/5
割合		9/46	10/62	2/73	50/54

本症に見出される心筋 β ミオシン重鎖変異は、アクチン、ミオシン軽鎖、あるいはトロポニンファミリーとの相互作用ドメインにのみ存在すること、ミオシン家系と非ミオシン家系間に本症の臨床像に相違が存在しないことから、非ミオシン家系の本症遺伝子は心筋に発現する収縮要素をコードする遺伝子群のいずれかであると推定される。このため、候補遺伝子アプローチとして、収縮要素遺伝子群の染色体マッピングならびにラットあるいはマウス cDNA をプローブとしたヒトゲノム遺伝子の単離と構造解析を行っている。これまでに第18染色体上にマップされる遺伝子として、ミオシン調節軽鎖遺伝子群 (RLCA および RLCB) を単離し、その発現と構造の解析を進行している。

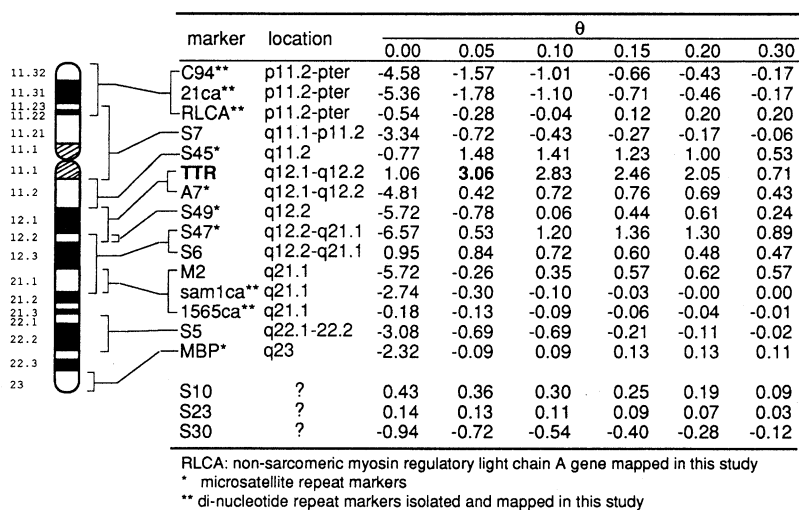


図 D. 2 日本人非ミオシン家系における第18染色体マーカーとの連鎖解析

原著論文

1. Honda, K., Kimura, A., Dong, R.P., Tamai, H., Nagata, H., Nishimura, Y. and Sasazuki, T. 1993. Immunogenetic analysis of silicosis in Japan. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 8, 106-111.
2. Fukui, Y., Yamamoto, K., Yokoyama, N., Iwanaga, T., Kurashima, C., Esaki, Y., Kimura, A., Akashi, T., Hirokawa, K. and Sasazuki, T. 1993.

Restricted expression of transgenic HLA-DRA gene in thymic epithelial cells and its role in acquisition of T cell tolerance to self-superantigens and processed DR α - derived peptide.

Eur. J. Immunol. 23, 1678-1686.

3. Harada,H., Kimura,A., Nishi,H., Sasazuki,T. and Toshima,H. 1993.
A missense mutation of cardiac β -myosin heavy chain gene linked to familial hypertrophic cardiomyopathy in affected Japanese families.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 194, 791-798.
4. Yoshizumi,H., Kamikawaji,N., Nishimura,Y. and Sasazuki,T. 1993.
Generation of novel CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte that requires soluble factor for lyse autologous antigen-presenting cells.
Eur. J. Immunol. 23, 3173-3180.
5. Shirasawa,S., Furuse,M., Yokoyama,N. and Sasazuki,T. 1993.
Altered growth of human colon cancer cell lines disrupted at activated Ki-ras.
Science 260, 85-88.
6. Yao,Z., Kimura,A., Hartung,K., Haas,P.J., Volgger,A., Brännler,G., Bönisch,J., Albert, E.D., and SLE study group members. 1993.
Polymorphism of the DQA1 promoter region (QAP) and DRB1, QAP, DQA1 DQB1 haplotypes in systemic lupus erythematosus.
Immunogenetics 38, 430-436.
7. de la Paz Bettinotti,M., Kolek,A., Brännler,G., Haas,P., Paul,C., Hochberger,H., Bartova,A., Kimura,A., Sasazuki,T. and Albert,E.D. 1993.
Polymorphism of the 5' flanking region of the HLA-DQA1 gene in Coeliac disease.
Eur. J. Immunogenet. 20, 399-407.
8. Yoshida,M., Kimura,A., Katsuragi,K., Numano,F. and Sasazuki,T. 1993.
DNA typing of HLA-B gene in Takayasu's arteritis.
Tissue Antigens 42, 87-90.
9. Haas, J. P., Kimura,A., Andreas,A., Hochberger,M., Keller,E., Brännler,G., Bettinotti, M.P., Yao,Z., Nevinny-Stickel,C., Sierp,G., Sasazuki,T. and Albert,E.D. 1994.
Polymorphism in the upstream regulatory regions of DQA1 gene and DRB1, QAP, DQA1, DQB1 haplotypes in the German population.
Hum. Immunol. 39, 31-40.
10. Tamai,H., Kimura,A., Dong,R.P., Matsubayashi,S., Kuma,K., Nagataki,S. and Sasazuki,T. 1994.

Resistance to autoimmune thyroid disease is associated with HLA-DQ.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 78, 94-97.

11. Shintaku,S., Fukuda,Y., Kimura,A., Hoshino,S., Tashiro,H., Sasazuki,T. and Dohi,K. 1994.

DNA conformation polymorphism (DCP) analysis of DR52 associated HLA-DR antigens by polymerase chain reaction (PCR) : a simple, economical, and rapid examination for HLA matching in transplantation.

Jpn. J. Med. Sci. Biol. 46, 165-181.

12. Esaki,Y., Fukui,Y., Sudo,T., Yamamoto,K., Inamitsu,T., Nishimura,Y., Hirokawa,K., Kimura,A. and Sasazuki,T. 1994.

Role of human major histocompatibility complex DQ molecules in superantigenicity of Streptococcus-derived protein.

Infect. Immun. 62, 1228-1235.

総 説

1. 木村彰方. 1993.

遺伝性疾患の原因遺伝子をさぐる.

Focus 循環器④分子生物学入門 pp33-41, 中山書店.

2. 木村彰方. 1993.

疾患の遺伝子異常をさぐる.

Cardiac Practice, 4, 385-392.

3. 木村彰方. 1993.

肥大型心筋症の遺伝子解析

心臓, 25, 1469-1478.

4. 木村彰方. 1994.

心疾患の遺伝子解析.

Annual Review 循環器1994, pp94-100.

5. 上川路信博. 1994.

リウマチの遺伝的背景.

Bio Clinica, 9, 95-98.

6. 山本 健, 笹月健彦. 1993.

HLAの構造と機能.

シンポジウム炎症と免疫, 2, 80-86.

7. 山本 健, 笹月健彦. 1993.

T細胞 selectionに関するトランスジェニックマウスからのメッセージ。
Medical Immunology, 26, 225-232.

著 書

1. Sasazuki, T., Kimura, A., Dong, R.P., Sudo, T., Honda, K., Shinagawa, H., Kuma, K., Morita, T., Matsubayashi, S. and Tamai, T. 1993.
Immunogenetics of Hashimoto's thyroiditis.
80 years of Hashimoto's Disease. (Nagataki S, Mori T, Torizuka K eds) pp13-18, Elsevier, Amsterdam.
2. Nishi, H., Kimura, A., Harada, H., Matsuyama, K., Koga, Y., Sasazuki, T. and Toshima, H.
Genetic analysis of HCM in Japan: A study on the cardiac β -myosin heavy chain gene.
Cardiomyopathy Update 6, (in press).
3. Kimura, A., Nishi, H., Harada, H., Noguchi, M., Ashizawa, N., Koga, Y., Yano, K., Yazaki, Y., Kitabatake, A., Toshima, H. and Sasazuki, T.
Genetic analysis of hypertrophic cardiomyopathy in Japan.
Proc. 4th International Congress of Cardiac Disease, Futura Press, (in press).

学会発表

1. 笹月健彦. (1993, 7/21-7/23)
HLAによる免疫制御—トランスジェニックマウスからのメッセージ (特別講演).
第2回日本組織適合性学会大会, 旭川.
2. 木村彰方. (1993, 7/21-7/23)
HLA抗原のDNAタイピング (イブニングレクチャー).
第2回日本組織適合性学会大会, 旭川.
3. 上川路信博. (1993, 7/21-7/23)
HLAクラスII分子と外来ペプチドとの結合 (シンポジウム).
第2回日本組織適合性学会大会, 旭川.
4. 木村彰方, 葛城肅典, 伊達是志, 吉田雅幸, 笹月健彦. (1993, 7/21-7/23)
HLAクラスI抗原のDNAタイピング.
第2回日本組織適合性学会大会, 旭川.
5. 白澤専二, 古瀬正徳, 笹月健彦. (1993, 10/5-10/7)
活性化Ki-ras遺伝子の破壊された大腸癌

- 細胞株における α -prothymosin 遺伝子の発現と増殖速度の相関性についての解析。
第52回日本癌学会総会，仙台。
6. 古瀬正徳，白澤専二，笹月健彦。(1993, 10/5-10/7)
活性化 Ki-ras 遺伝子の破壊された大腸癌
細胞株における immediate early genes の反応性の違いについての検討。
第52回日本癌学会総会，仙台。
7. 山本 健，福井宣規，笹月健彦。(1993, 10/14-10/16)
Positive selection of T-cell repertoire requires interaction with major histocompatibility complex on hematopoietic cells.
Kyoto T cell Conference, Kyoto.
8. 木村彰方，西 宏文，原田晴仁，古賀義則，戸嶋裕徳，笹月健彦。(1993, 10/21-10/23)
肥大型心筋症の解析。
日本人類遺伝学会第38回大会，東京。
9. 山本 健，福井宣規，江崎幸雄，山根一聡，竹下都多夫，木村彰方，笹月健彦。(1993, 10/21-10/23)
HLA-DR51トランスジェニックマウスにおける HLA-DR51分子の機能的発現。
日本人類遺伝学会第38回大会，東京。
10. 上川路線信博，須藤 徹，笹月健彦。(1993, 10/21-10/23)
HLA-B52結合ペプチドの構造解析。
日本人類遺伝学会第38回大会，東京。
11. 上川路宣博，須藤 徹，問田 望，董 瑞平，笹月健彦。(1993, 10/23-10/25)
抗原 epitope と class II (MHC) 講演構造-super antigen を含めて。
第43回日本アレルギー学会総会，横浜。
12. 木村彰方。(1993, 10/26-10/28)
Polymorphism in the promoter region of HLA class II genes and its relevance to allelic gene expression, German Histocompatibility Meeting, München, GERMANY.
13. 木村彰方。(1993, 11/15-11/18)
Genetic analysis of hypertrophic cardiomyopathy.
HGM93, Kobe.
14. 木村彰方，笹月健彦。(1993, 11/17-11/19)
HLA クラス II 遺伝子群の発現レベルにおける遺伝的多型性。
第23回日本免疫学会総会，仙台。
15. 山本 健，福井宣規，江崎幸雄，山根一聡，竹下都多夫，木村彰方，笹月健彦。(1993, 11/17-11/19)

- HLA-DR51トランスジェニックマウスにおける HLA-DR51分子の機能的発現。
第23回日本免疫学会総会，仙台。
16. 上川路信博，須藤 徹，笹月健彦。(1993, 11/17-11/19)
HLA-B52より溶出したペプチドの構造解析。
第23回免疫学会総会，東京。
17. 堇 瑞平，上川路信博，問田 望，藤田由香里，木村彰方，笹月健彦。(1993, 11/17-11/19)
HLA-DP9拘束性T細胞エピトープおよびDP9の結合モチーフの解析。
第23回免疫学会総会，東京。
18. 関 衛平，上川路信博，笹月健彦。(1993, 11/17-11/19)
HBs 抗原に対するT細胞エピトープの解析。
第23回免疫学会総会，東京。
19. 関 衛平，上川路信博，堇 瑞平，笹月健彦。(1993, 11/17-11/19)
B型肝炎ワクチン接種者免疫低応答群とHLAの相関およびHLA-DR拘束性T細胞の樹立。
日本人類遺伝学会38回大会，東京。
20. 木村彰方。(1993, 11/25-11/27)
Genetic analysis of hypertrophic cardiomyopathy in Japan.
The 4th International symposium on etiology and morphogenesis of congenital heart disease, Tokyo.