

遺伝学部門 Department of Genetics

遺伝学部門では、ヒトの正常および異常な遺伝形質を分子レベルで解明し、もって医学の進展に寄与することを目的としている。このため、免疫応答性の遺伝的制御、がんにおける遺伝子変異とそれにもとづく形質変化、HLAの多型性と免疫関連疾患等との関連、遺伝子病における変異の解析を中心とする研究を展開している。

本年度より新たに、大森真理子、富田秀司、吉武佐枝子、松添大助、新宅究典が研究に参加している。

A. 免疫応答性の遺伝的制御に関する研究

免疫応答性の遺伝的制御機構の解明のために、HBs ワクチンおよびスギ花粉症を対象とした解析を行った。

a. 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，木村彰方，笹月健彦）

i) HBs 抗体価と HLA との相関

ヒト免疫制御の分子機構を解明することを目的に HB ワクチンに対する免疫応答の遺伝子支配と細胞レベルでのメカニズムを検討した。九州大学医学部学生339名を対象にリコンビナント HBs 抗原を計画免疫し、PCR-SSO 法による HLA-DNA タイピングをおこない、RIA 法により HBs 抗体価の測定を、³Hチミジンの取り込みを指標に HBs 抗原特異的 T 細胞増殖反応の測定を、ELISA 法にて Cytokine の測定をおこなった。HBs 抗体価のヒストグラムは対数正規分布を示し（図A.1）、HBs 抗原特異的 T 細胞増殖反応は全体の82%以上が、10,000cpm 以上の高値を示した。HBs 抗体価と HBs 抗原特異的 T 細胞増殖反応との相関係数は0.36と弱く、T 細胞は増殖しているにも関わらず、HBs 抗体価が低い一群が存在することが判明した。Cytokine 産生では、IL-5が HBs 抗体価と高い相関を示し、HBs 抗体産生には Th 2 タイプの T 細胞が主に寄与していることが判明した。HBs 抗体価の HLA 抗原にたいする重回帰分析の結果、HLA 各遺伝子座ごとの重相関係数は、DRB 1 が0.34と有意に高く、HBs 抗体価は DR である程度説明できることがわかった（表1）。重相関係数は、DRB 1 に関して HBs 抗体価の予測に寄与する変数として採択された各アリルと HBs 抗体価との相関係数より高く、各個体が有する2つのアリルを考慮すると HBs 抗体価をよりよく説明できることが示唆された。一方、その他の遺伝子座の重相関係数を見ると class I, class II のどの座位もそれぞれが寄与しており、全遺伝子座（A, B, DR, DQ, DP）をまとめると重相関係数は0.51とさらに高くなることから、

HLA 多重遺伝子族のすべてが関わって HBs 抗原に対する免疫応答を制御している可能性が示唆された。

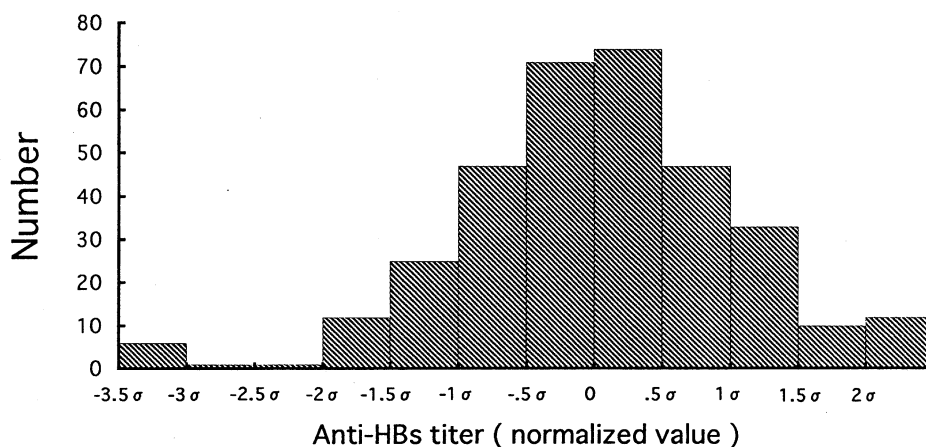


図 A. 1 Histogram of Anti-HBs titer n=339

表 A. 1 HLA 各遺伝子座の HBs 抗体価に対する重回帰分析

O X : HLA	Y : HBs 抗体価		X : HLA	Y : HBs 抗体価	
	重相関係数	偏相関係数		重相関係数	偏相関係数
A	0.23		DQA	0.26	
2602		-0.14	DQB	0.29	
1101		-0.08			
B	0.27		DPA	0.18	
DRB1	0.34		DPB	0.25	
08032		0.17			
0101		0.13			
0405		-0.13	AB DRB1	0.51	
0701		-0.11	DQA DQB		
0406		-0.10	DPA DPB		
0401		-0.12			
1101		-0.10			
0802		-0.09			
1403		0.08			

ii) HBs 抗原特異的に活性化される末梢血リンパ球の表面マーカーの解析

HBs ワクチン接種者の血清抗体価と末梢血リンパ球の HBs 抗原特異的増殖反応はおおむね相関するが、なかには HBs 抗体価が低いにもかかわらずリンパ球の増殖反応が高い一群もある。そこで増殖している細胞の特徴をみるべく、表面マーカーをフローサイトメトリーを用いて解析した。HBs 抗原の存在下で一週間培養後 CD 4, CD 8, CD25 (IL 2 R) の組み合わせで免疫染色を行ったところ、HBs 抗原特異的に増加したと考えられる IL 2 R 陽性細胞は 8 つのパターンに分けられた (図 A. 2)。抗体価をパターン別でみると CD 8 単独のパターンが優位に高い傾向がみられた。末梢血リンパ球の HBs 抗原特異的増殖反応が 5 万 cpm 以上ある接種者のなかで、抗体価150単位以下の16名と抗体価800単位以上の16名について比較すると CD 8 単独及び CD 8 & DN の両パターンが抗体価の高い群で多い傾向がみられた (図 A. 3)。現在これらの CD 8 T細胞, DN 細胞の抗体産生に及ぼす影響を In vitro antibody production system を用いて解析中である。

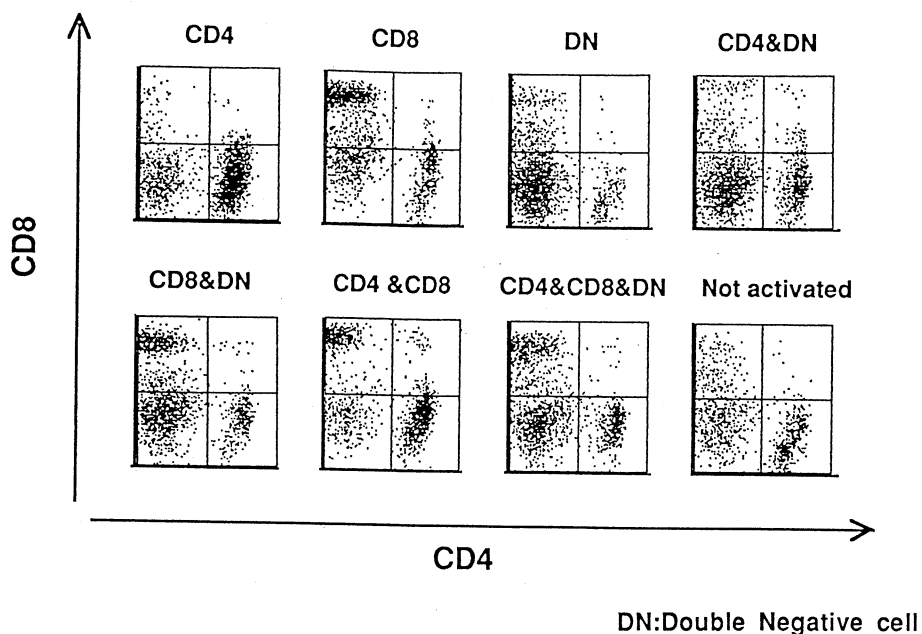


図 A. 2 CD4 & CD8 expression on CD25 positive cells activated by rHBsAg

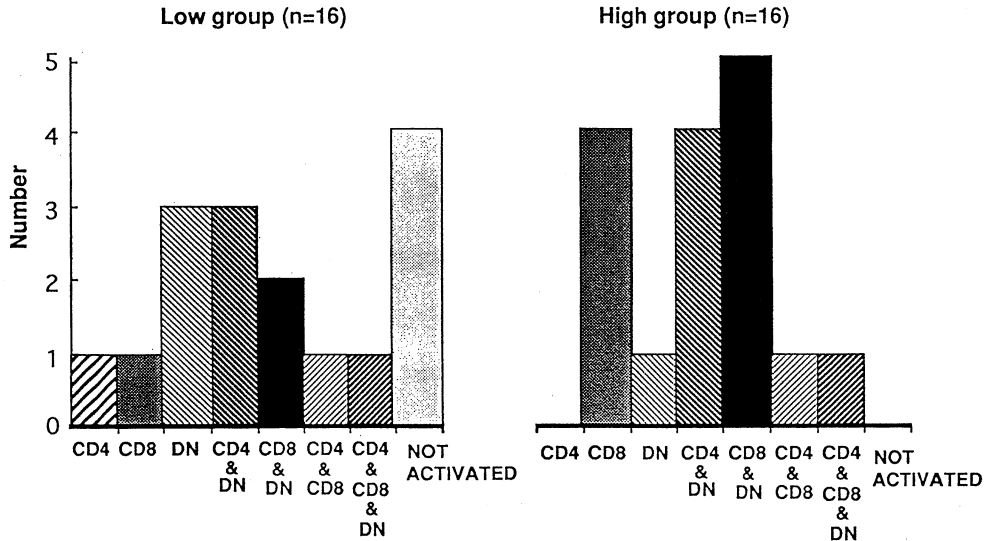


図 A. 3 FACS pattern of activated PBL from anti-HBs titer high & low groups

iii) HBs 抗原上の T 細胞エピートープの同定

HBs 抗原上に 2 つの T 細胞エピートープ (HBs16-31, HBs81-99) が同定された。High responder である DR 1, DR8.3 のホモ接合体由来の T 細胞株は両者のペプチドを認識したのに対し、Low responder である DR 4 ホモ接合体由来の T 細胞株は HBs81-99 のみを認識した。HBs81-99 に対する T 細胞増殖反応と血清抗体価の間に相関がみられたのに対し、HB16-31 に対する T 細胞増殖反応と血清抗体価の間には相関が認められなかった。従って、HBs81-99 に対する T 細胞応答が抗体産生に寄与すると考えられた。

b. スギ花粉に対する T 細胞免疫応答性の解析 (堀 俊雄, 上川路信博, 笹月健彦)

昨年度は、スギ花粉症患者集団と HLA-DPB 1 *0501 との相関を明らかにした。

本年度は、相関の分子機構を解明するために、HLA-DP 5 陽性者のスギ花粉抗原特異的 T 細胞株の認識する抗原ペプチド及び拘束分子を解析した。

DP 5 を含み日本人集団で最も高頻度に見られるハプロタイプである、DR 4-DR53-DQ 4-DP 5 のハプロタイプをもつ患者 4 名よりスギ花粉抗原特異的 T 細胞株を樹立した。

図に示すように、拘束分子は L-cell トランスフェクタントを APC として T 細胞増殖反応を行った結果、スギ花粉粗抗原 (DEAE Fr.) においては、DR 4, DR53, DP 5 であり、患者 T 細胞中にはスギ花粉症と相関を示す HLA-DP 5 拘束性の T 細胞が存在することが明らかとなった。更に、スギ花粉抗原は、cryj I および、cryj II という 2 つの主要蛋白から構成されているが、cryj I は主として DP 5 を拘束分子として、cryj II は主として DR 4, DR53 を拘束分子として T 細胞応答をおこしていることが明らかとなった (図 A. 4)。

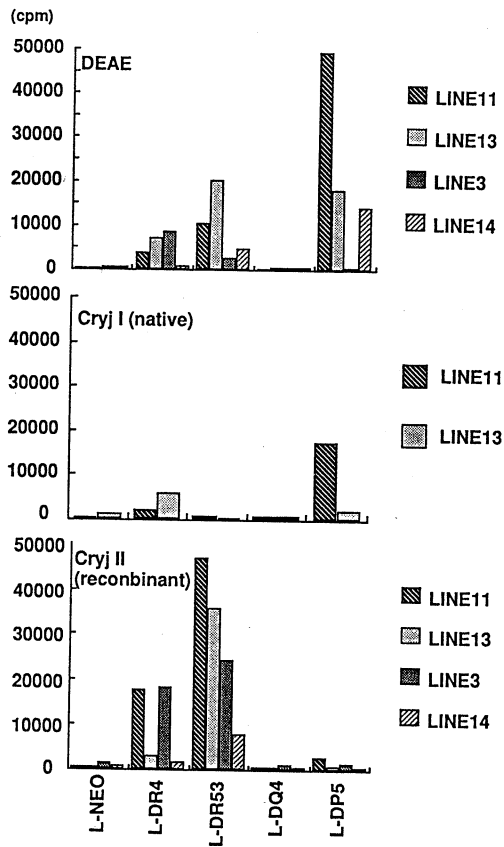


図 A. 4 T cell response to CP Ag

また、cryj IIの全アミノ酸についてN末端よりC末端まで11残基ずつオーバーラップした20残基よりなるペプチドを合成し、T細胞応答をみると、強いT細胞応答を示す部位は2ヶ所あり、いずれもDR53を拘束分子としてT細胞応答を引き起こしていることが確認された。現在、cryj Iのペプチドを合成し、T細胞エピトープを解析中であり、ペプチド-HLA複合体を認識し活性化するT細胞の機能について解析する予定である。

B. HLA クラス I 分子に結合する自己ペプチドの解析

HLA 分子は著明な遺伝的多型性を示すがその多型性は主に抗原ペプチドとの結合に関わる領域のアミノ酸置換に基く。そこで、HLA 分子の多型性に応じて、抗原ペプチドの結合モチーフが異なるか否かを直接検討した。

a. HLA-B51およびB52結合ペプチドの構造解析 (上川路信博, 須藤 徹, 笹月健彦)

HLA による免疫応答の制御機構を解明する目的で HLA-B51およびB52に結合しているペプ

チドの解析を行なった。HLA-B51ホモ接合体の健常人3名およびベーチェット病患者2名より樹立したB細胞株よりB51結合ペプチドを抗B5抗体を用いて抽出し、結合ペプチドをプロテインシーケンサーおよび質量分析計を用いて解析した。HLA-B51より溶出したペプチドプールをプロテインシーケンサーで解析したところ、1残基目がAsp, 2残基目がAla, 3残基目がTyr, Phe, Leu, 8/9残基目がIle, Valが高頻度に検出された。また、質量分析計を用いた解析で12個のペプチドの1次構造が明らかになった。昨年B52結合ペプチドについて解析し、2残基目Gln, 8/9残基目がIle, Valというモチーフを明かにしたが、B51結合ペプチドのモチーフはこれとは異なる事が示された(図B.1)。HLA-B51とB52は互いに2アミノ酸の差異しかないが異なるペプチドが結合することが明らかになり、これがB51とB52との疾患感受性の差異の分子機構であることが示唆された。さらに、質量分析計を用いることで、HLA-B51と強い相関を示すベーチェット病の患者および健常人のB51結合ペプチドに差異があるかを検討したが、量の多い方から上位34種のペプチドに関しては、患者、健常人いずれに同一のペプチドが観察されたことから、健常人、患者の間には、内因性蛋白からペプチドが切り出されHLAに結合するまでの過程には大きな個人差はなく健常人、患者いずれのB51も同様のペプチドを抗原提示する能力を有すると推定された。

Endogenous peptides eluted from HLA-B51

Fraction Number	(M+H) ⁺ (m/z)	Signal (x10 ⁶)	Sequence
18,19	820	10.0	D A P X V G H I
18,19,20	1054	23.3	D P Y K V Y R I
20	836	10.0	D A P X V A H I
21,22	934	6.8	D A F R V N V I
22	1033	1.4	A Q Y K F X Y V
22,23	903	11.6	D A A R F P L I
23,24	933	11.1	D A Y I P L Q I
19,20	1018	8.4	D A Y A L N H T I
25	1089	3.0	D P F A F X H K I
25	1001	4.8	D A L R V V L T I
23	1069	16.8	D P Y H L L V N X V
23	1245	13.3	D A F R Q A N X F Y

Endogenous peptides eluted from HLA-B52

Fraction Number	(M+H) ⁺ (m/z)	Signal (x10 ⁶)	Sequence
18	928	16.8	G Q F K T Y A I
20	1032	3.1	A Q Y K F X Y V
21	969	10.7	G F Y P G S I E V
23	954	1.9	V Q L L L L R I
24	910	4.0	N Q L P L L V I
24	942	2.0	V Q L L Q P L I
24	991	3.0	I Q F S L R L I
20	885	1.0	S Q I X V H A I

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

図B.1

b. HLA-A 2 サブタイプに結合するペプチドモチーフの決定 (須藤 徹, 上川路信博, 伊達是志, 木村彰方, 笹月健彦)

HLA クラス I である HLA-A 2 の中で日本人集団に多く見られる HLA-A *0201, A *0206, A *0207 の各サブタイプについて, 結合ペプチドのモチーフを, Mass spectrometry 及びアミノ酸配列分析器を用いて明らかにした (表 B. 1). これらモチーフは抗原エピトープの同定や, 癌や自己免疫疾患に対するペプチドワクチンへ道を開くものである. 本年度は, 自己免疫甲状腺疾患への適応を行う予定にしている. さらに, こうして確立された手法により, 種々のアリの結合ペプチドのモチーフを同定する予定である.

表 B. 1 Anchors of peptides eluted from HLA-A2 subtypes

Subtypes	Anchor*	Position									Amino acid change	Pocket
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		
A*0201	dominant anchor		L							V	-	
	strong anchor				E		L			L		
					P		V					
A*0206	dominant anchor		V	I ^f							9 F → 9 Y	B, C
	strong anchor		Q		E		L		V			
					P				L			
A*0207	dominant anchor		L	D						L	99 Y → 99 C	A, B, D
	strong anchor			P	E		I					
A*0204	dominant anchor		L							L	97 R → 97 M	C, E
	strong anchor				E		L					
					P		I					

*Anchor residues were defined by the criterion that showing more than 50% increase in absolute amount compared with the previous or pre-previous cycle and occupying over 40% and 20% of that cycle as dominant and strong, respectively.

^fAt position 3 of HLA-A*0206, the sum of a group of branched amino acid, Leu, Ile and Val occupied 58% of the total yields of that cycle, thus, these are considered dominant anchor.

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進行した。

a. HLA トランスジェニックマウスを用いた、可溶性 HLA 分子および HLA 由来ペプチド修飾による免疫寛容現象の誘導 (竹下都多夫, 山本 健, 山根一聡, 上川路信博, 木村彰方, 笹月健彦)

前年度までに HLA-DQ 6-TGM において、DQ 6 分子に依存した MLR の惹起、H-2 D 分子による DQ 6 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剤の開発を目的として、可溶性 DQ 6 分子あるいは DQ 6 由来ペプチドを修飾することで *in vitro* において CD 4・CD 8 陽性各 T 細胞の反応を抑制させることを試み、さらに *in vivo* において、DQ 6-TGM から B 6 への皮膚移植に与える効果を検討することにより、人為的な拒絶反応抑制の可能性を追求している。

b. DR α -NOD マウスにおける膵島炎及び糖尿病の解析 (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)

我々は前年度までに二系統の HLA-DR α トランスジェニック NOD (DR α -30-NOD, DR α -24-NOD) マウスが NOD マウスと同程度糖尿病を発症することを報告した。導入された DR α 遺伝子が予想に反して E α 遺伝子の導入とは異なった結果を導き出した理由に、導入された DR α 及び E α 遺伝子の発現レベルによる違いが影響している可能性がある。そこで我々は DR α -B 6, E α -B 6 及び B 6 マウス間において MLR 解析を行い、発現した DR α E β 分子は E α E β 分子と同様に T 細胞によって十分抗原として認識され、E α E β 分子と DR α E β 分子によって選択される T 細胞のレパトアは厳密には異なることを示した (図 C. 1)。更に我々は近年 diabetogenic な抗原の一つとして報告される glutamic acid decarboxylase (GAD) 65由来の約 20mer のペプチドを作製し、これらに対する T 細胞の 2 次免疫応答を解析した (図 C. 2)。ペプチド 524-543 に対する T cell response はいずれのマウスでも比較的高値を示したが、B 6 マウスにおいて反応性を示さず、このペプチドは I-A^{NOD} 分子に結合し T 細胞に反応性のシグナルを導入できるが、I-A^b 分子とではそれができないということが推定された。またペプチド 509-528 に対して DR α -30-, DR α -24-NOD 及び background NOD マウスはいずれも同程度の値を示し、E α -NOD マウスにおいてこのペプチドは他のマウスに比べかなり高値を誘導したが、同週令の B 6 及び E α -B 6 マウスへの免疫では T cell response を誘導できなかった。つまりこのペプチドは、I-A^{NOD} 分子に結合し T 細胞に反応性のシグナルを導入で

きるが I-A^b分子や I-E^b分子とではそれができず、更に I-A^{NOD}分子よりも E α E β ^{NOD}分子とからより強調性の高反応性シグナルを導入できるのではないかということ、また導入され発現した E α E β ^{NOD}分子が DR α 遺伝子を導入して発現された DR α E β ^{NOD}分子とは異なる抗原を T細胞に提示する可能性があることを示唆していると思われた。現在モノクローナル抗体を用いて更なる解析を進めている。

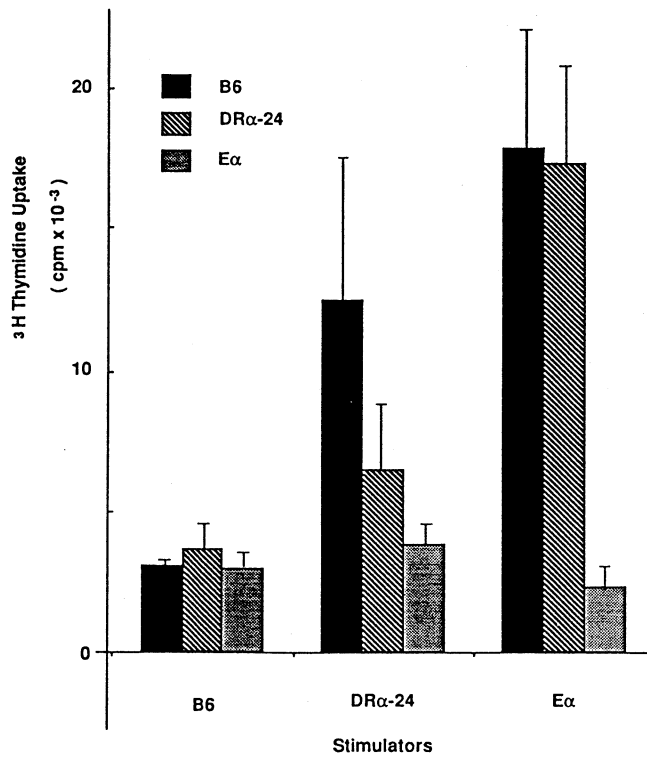
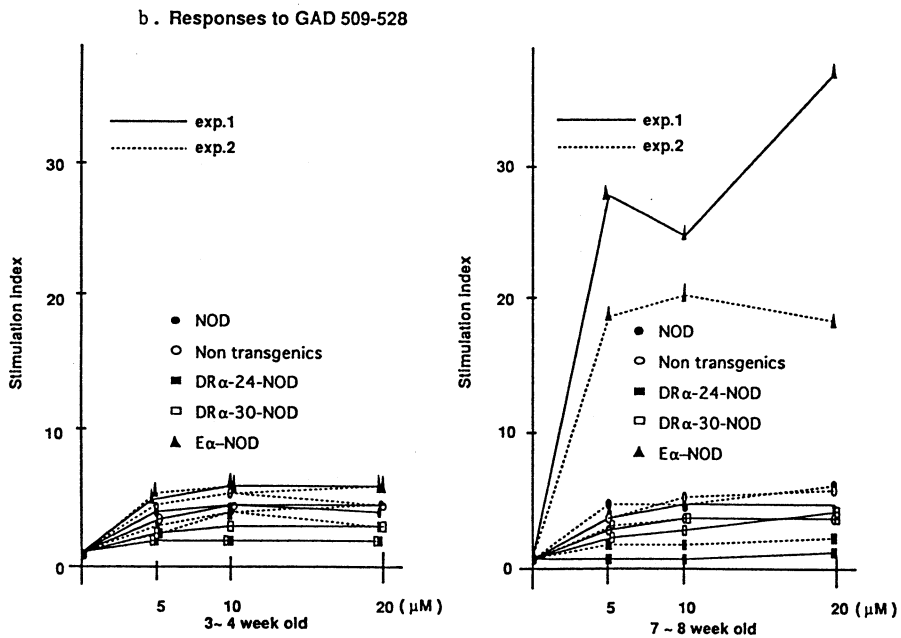
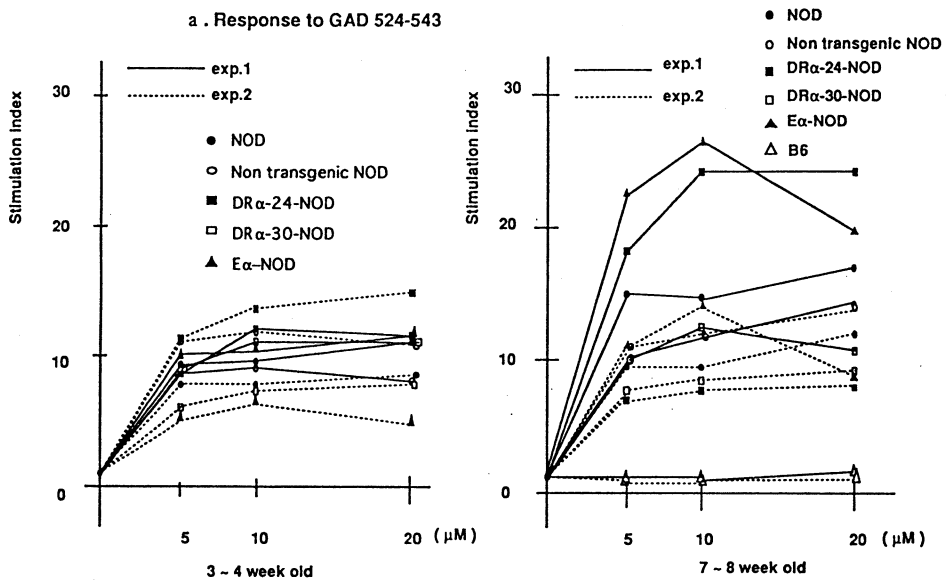


図 C. 1 MLR between DR α -24-B6 and E α -B6 transgenic mice.



☒ C. 2 Proliferative T cell responses to GAD 65-derived peptide in various transgenic mice

D. HLA と疾患との相関の解析（安永晋一郎，伊達是志，小柳 毅，吉武佐枝子，木村彰方，笹月健彦）

HLA と疾患感受性あるいは抵抗性との相関を解析する目的で，HLA 領域遺伝子群の多型性を DNA レベルで検討した。

a. 健常日本人集団における HLA の多型性の解析

本年度までに開発した DNA タイピング法を用いて，HLA-A，DRB 1，DRB 3，DRB 4，DRB 5，DQA 1，DQB 1，DPA 1 および DPB 1 遺伝子型を日本人健常者集団500名以上について決定した。その結果の一部を表 D. 1 から表 D. 4 に示すがこれらを以降の解析のコントロールとして用いた。

表 D. 1 Phenotype frequency of HLA-DRB1 alleles

		(n =525)
DR	DRB1 allele	freq%
1	0101	12.6
15	1501	12.4
15	1502	24.4
16	1602	1.0
3	0301	0.8
4	0401	3.2
4	0403	3.8
4	0404	0.4
4	0405	26.7
4	0406	6.7
4	0407	0.8
4	0409	0.2
4	0410	3.8
11	1101	4.4
12	1201	6.9
NJ28	1202	2.5
13	1301	0.8
13	1302	12.4
14	1401	3.8
HR5	1402	0.4
NJ25	1403	2.9
14	1405	3.4
HR5	1406	2.1
14	1407	0.2
7	0701	0.6
8	0802	7.2
8	08032	17.9
9	0901	29.9
10	1001	0.4

表 D. 2 Phenotype frequency of HLA-DQA1 and-DQB1 alleles

		(n =525)	
DRA1 allele	freq%	DRB1 allele	freq%
0101	12.8	0501	13.0
01021	23.2	0502	3.2
01022	1.0	05031	4.8
0103	40.4	0601	40.0
0104	7.2	0602	11.8
01new	0.4	0603	0.8
0201	0.6	0604	11.6
0301	15.2	0605	0.6
0302	56.8	0201	0.8
0401	3.6	0202	0.6
05011	0.8	0301	19.2
05013	10.3	0302	17.1
0503	5.5	03032	30.3
0601	2.9	0401	26.5
		0402	6.3

表 D. 4 Phenotype frequency of HLA-DPA1 and-DPB1 alleles

		(n =525)	
DPA1 allele	freq%	DPB1 allele	freq%
01	61.5	0201	39.8
0201	31.0	0202	5.3
02021	1.1	0301	7.8
02022	64.6	0401	11.4
0401	0.2	0402	16.4
		0501	60.6
		0601	1.5
		0801	0.4
		0901	20.6
		1001	0.2
		1301	3.2
		1401	3.8
		1601	0.8
		1701	0.2
		1901	1.1

表 D. 3 Phenotype frequency of HLA DR-DQ haplotypes

(n=525)

DR	DRB1	DRB3	DRB4	DRB5	DQA1	DQB1	freq%
1	0101				0101	0501	12.9
15	1501			0101	01021	0602	11.6
15	1501			0101	05013	0301	0.8
15	1502			0102	0103	0601	24.2
16	1602			02	01022	0502	0.8
3	0301	0202			05011	0201	0.8
4	0401		01		0302	0301	3.2
4	0403		01		0301	0302	3.8
4	0404		01		0301	0302	0.4
4	0405		01		0302	0401	26.5
4	0406		01		0301	0302	6.7
4	0407		01		0301	0302	0.8
4	0409		01		0302	0401	0.2
4	0410		01		0302	0402	3.8
11	1101	0202			05013	0301	3.2
11	1101	0202			05013	0302	0.4
12	1201	0101			05013	0301	5.3
12	1201	0101			0302	0301	0.4
12	1201	0101			0302	03032	0.6
12	1201	0101			0301	0302	0.4
12	1202	0301			0601	0301	2.5
13	1301	0101/0202			0103	0603	0.8
13	1302	0301			01021	0604	11.6
13	1302	0301			01021	0605	0.6
14	1401	0202			0104	0502	2.1
14	1401	0202			0104	05031	1.5
HR5	1402	0202			0503	0301	0.4
NJ25	1403	0101			0503	0301	2.7
14	1405	0202			0104	05031	3.2
HR5	1406	0202			0503	0301	1.9
14	1407	0202			0104	05031	0.2
7	0701		01		0201	0202	0.6
8	0802				0301	0302	3.2
8	0802				0401	0402	2.5
8	0802				0401	0302	1.3
8	08032				0103	0601	17.7
9	0901		01		0302	03032	29.5
10	1001				01new	0501	0.4

b. 炎症性腸疾患と HLA との相関

炎症性腸疾患（クローン病・潰瘍性大腸炎）と HLA との相関を DNA レベルで解析した結果、クローン病では DQB 1 *04 が疾患感受性を、DRB 1 *1502 が抵抗性を規定し、一方潰瘍性大腸炎においては DRB 1 *1502 が疾患感受性を、DQB 1 *0302 が抵抗性を規定していると示唆された。また DRB 1 *0405 ハプロタイプと DRB 1 *1502 ハプロタイプは、同じ腸という臓器をターゲットとし、免疫応答が関与すると考えられる炎症性腸疾患の両者において感受性、抵抗性でそれぞれ全く逆の相関を示したことが、大変興味深いと思われた。クローン病は全層性に炎症を認める組織像を、潰瘍性大腸炎は炎症が粘膜に限局する組織像を呈することを考えあわせると、これらの疾患の原因となる抗原の分布は異なっていると考えられ、このため HLA との相関が全く異なったものと示唆された（表 D. 5, 表 D. 6）

表 D. 5 クローン病と HLA Class II との相関

HLA	Control (n=525)	Patient (n=116)	R.R.#1)
DRB1 *0401	3.8%	11.2%	3.22
DQA1 *0401	3.6	10.3	3.11
DQB1 *0402	6.3	19.8	3.70
DRB1 *1502	24.4	10.3	0.37
DPB1 *0201	58.9	35.3	0.38

1) $P_c < 0.05$

表 D. 6 潰瘍性大腸炎と HLA Class II との相関

HLA	Control (n=525)	Patient (n=83)	R.R.#1)
DRB1 *1502	24.4%	60.2%	4.70
DQA1 *0103	40.4	72.3	3.85
DQB1 *0601	40.0	73.5	4.16
DPA1 *0201	31.1	60.2	3.36
DPB1 *0901	20.6	50.2	3.96
DQA1 *0302	56.8	30.1	0.33
DPA1 *01	61.5	44.6	0.50
DPB1 *0202	58.9	36.1	0.40

1) $P_c < 0.05$

c. リウマチ性心臓病とHLAとの相関

リウマチ性心臓病 (RHD) は後天性心臓弁膜症の原因の多くを占め、A群β溶連菌感染症であるリウマチ熱 (RF) の後遺症と考えられている。しかしRHDへと移行する症例はRF患者の一部であり、RHD発症には疾患感受性の個体差が関与すると考えられている。溶連菌を含めて外来抗原に対する免疫応答の個体差はHLAにより制御されている事は広く知られているため、HLAに連鎖した本症の疾患感受性および疾患抵抗性を明らかにすることを目的に、HLAを遺伝子レベルで解析した。協力を得られたリウマチ性心臓病患者のうち僧帽弁狭窄症患者 (MS) 61名を対象にHLA遺伝子群 (HLA-A, DR, DQ, およびDP) をDNAレベルで解析した。すなわち、末梢血顆粒球よりDNAを抽出した後、各遺伝子をPCR法を用いて増幅し、それぞれの対立遺伝子に対する合成オリゴヌクレオチドプローブを用いてDNAタイピングを行った。この結果得られたRHD患者における各アレルの頻度を、336名の健常対象群における各アレル頻度と比較検討した。今回の解析の結果、DRB 1*1405 (R.R.=3.29, $P<0.02$) およびDQB 1*0503 (R.R.=3.51, $P<0.003$) の頻度が増加していた。しかしながら、血清学的タイピングにより欧米人で正または負の相関が報告されている、DR 3, DR 4, DR 5, DR 7抗原との相関は認められなかった。一方、HLA-A遺伝子との相関も認めなかった。日本人の僧帽弁狭窄 (MS) を主徴とするRHD患者の疾患感受性に、HLAクラスII遺伝子群のうちDRB 1*1405, DQB 1*0503が関与すると考えられた。しかしながら、相関を示すHLA型は欧米人での報告とは異なっており、このことからRHD発症の分子機構は人種毎に異なる (原因菌サブタイプの相違など) ことが示唆された。

d. モヤモヤ病とHLAとの相関

モヤモヤ病の病因、発症機序に関し、血管炎あるいは自己免疫疾患という立場からHLA遺伝子群のDNAタイピングを行った。対象および方法本症患者38名を対象にHLAクラスII遺伝子群DR, DQおよびDPをDNAレベルで解析した。すなわち、末梢血顆粒球よりDNAを抽出した後、各遺伝子をPCR法を用いて増幅し、それぞれの対立遺伝子に対する合成オリゴヌクレオチドプローブを用いてDNAタイピングを行った。この結果得られたモヤモヤ病患者における各アレルの頻度を336名の健常対象群における各アレル頻度と比較検討した。10歳以下の若年発症群ではDPB 1*0301 (R.R.=2.96, $P<0.05$) およびDRB 1*1601 (R.R.=14.87, $P<0.025$) の頻度が増加していた。一方11歳以下の遅発群ではDPB 1*0201 (R.R.=9.16, $P<0.005$) の頻度が有意に増加していた。モヤモヤ病における抗DNA抗体陽性率が23%という報告があり、またHLAとの相関を調べた報告ではA24, B46, B54, A33, DR 8などとの相関を示す報告がある。今回のHLAクラスII遺伝子群の解析では年齢別にみると有意の相関がみられた。モヤモヤ病の発症にHLA分子の関与が示唆されたが相関するHLA遺伝子は若年発症群と遅発群で異なっていた。今後は症例数を増やしHLAクラスIを含めての調査

が必要と考えられた。

e. 若年性糖尿病とHLAとの相関

前年度に引きつづき、日本人およびノルウエー人患者のDNAタイピングを行った。HLA-DR/DQ領域のハプロタイプを推定し、各ハプロタイプ毎の疾患発症への危険率を比較すると表D. 7のようになる。すなわち、疾患への感受性は、いずれの人種においてもDRB1およびDQB1対立遺伝子の多型性のあり方に依存すると考えられた。従って本症への感受性にはDR分子とDQ分子の両者がともに関与することを明らかにした。

表D. 7 Association of HLA DRB1-DQA1-DQB1 haplotypes and IDDM in Japanese and Norwegian populations

HLA			Japanese			Norwegian		
DRB1*	-DQA1*	-DQB1*	Patient (n=139)	Control (n=525)	R.R.	Patient (n=100)	Control (n=100)	R.R.
0401	- 0302	- 0301	0.8*	3.2*	0.31	1.0*	11.0*	0.12 #2
0401	- 0302	- 0302	0	0		6.0	2.0	2.71
0401	- 0301	- 0302	0.8	0	11.4	46.0	13.0	5.53 #6
0404	- 0301	- 0302	0.8	0.4	2.27	16.0	5.0	3.39 #1
0403	- 0301	- 0302	2.9	3.8	0.82	1.0	2.0	0.59
0406	- 0301	- 0302	0.8	6.7	0.15 #1	0	0	
0802	- 0301	- 0302	13.0	3.2	4.42 #5	0	0	
0802	- 0401	- 0302	3.6	1.3	2.83	0	0	
0802	- 0401	- 0402	2.2	2.5	0.97	0	0	
0801	- 0401	- 0402	0	0		7.0	8.0	0.87
0410	- 0302	- 0402	0	3.8	0.09 #1	0	0	
0405	- 0302	- 0401	56.8	26.5	3.64 #6		0	
0901	- 0302	- 03032	36.0	29.5	1.34 #1	5.0	3.0	1.60
0301	- 05011	- 0201	1.4	0.8	3.81	57.0	25.0	39.1 #5

1 P<0.05 # 2 P<0.01 # 3 P<0.001 # 4 P<0.0001
 # 5 P<0.00001 # 6 P<0.000001 # 7 P<0.0000001 # 8 P<0.00000001

E. 大腸がんの発症機構の解析

がんが多段階で遺伝子変異を集積した結果と考えられる。発がんにおける遺伝子変異の相互作用の意義を解析する目的で、大腸がんを対象として、継世代変異および体細胞変異の検出を行った。

a. 家族性非ポリポーシス大腸がんにおける継世代変異の検索（木村彰方，原田晴仁，安永正剛，笹月健彦）

ミスマッチ修復に関与する hMSH 2 および hMLH 1 遺伝子について、そのゲノム遺伝子を単離し exon/intron junction の構造を決定した。この情報に基づき作製したプライマーを用いて、家族性大腸がんおよび一般大腸がんにおける継世代変異を検索した。その結果、8例の家族性大腸がん患者中1例に hMSH 2 遺伝子のナンセンス変異、19例の一般大腸がん患者中1例に hMSH 2 遺伝子のフレームシフト変異を検出した。いずれも継世代変異であり、各々に発生した大腸がんでは著明な修復エラーを認めることから、これらの変異は大腸がんの発生に密接に関与すると考えられた。

b. 大腸がんにおける修復異常およびがん関連遺伝子における体細胞変異の検索（木村彰方，安永正剛，原田晴仁，笹月健彦）

第18染色体特異的 CA リピートマーカートを単離し、その染色体マッピングを行った。ついで、これらを用いて、大腸がんにおける第18染色体上の修復エラーならびにヘテロ接合性の消失を検索した。図 E 1 に示すように、修復エラーは、家族性非ポリポーシス大腸がんの50% (5/10)、一般大腸がんの10% (2/20)、家族性大腸ポリポーシス由来大腸がんの12.5% (3/24) に認めた。一方全大腸がんの約40%で第18染色体のヘテロ接合性の消失を認めたが、その多くは染色体全欠失であった。また共通欠失領域は18q 21.1に存在することが確認されたが、それよりテロメア側も同時に高率に欠損することが示されており、新たながん抑制遺伝子の存在が示唆される。

一方、大腸がんにおける Ki-ras, P 53, APC それぞれの遺伝子における体細胞変異を検索した。特記すべきことは、修復エラーを伴う大腸がんでは P 53 および APC 遺伝子の体細胞変異の頻度が低いことであり、DNA 修復欠損が単純に体細胞変異を誘発しやすいためにがん化に関連するという考え方は必ずしも適当でないことが示された。

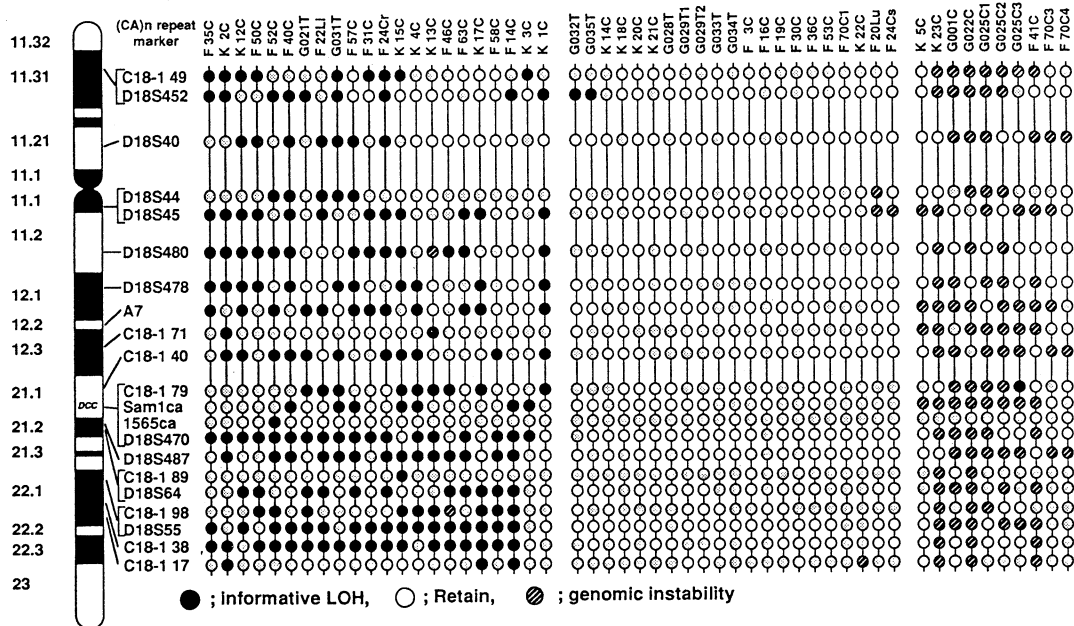


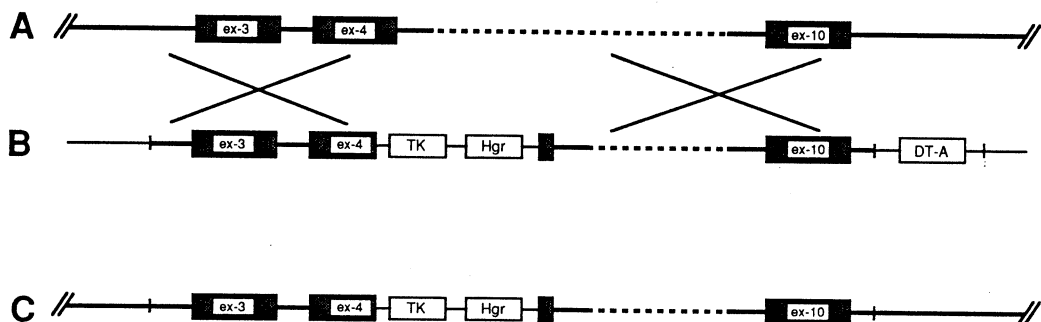
図 E. 1 Microsatellite instability and loss of heterozygosity on the chromosome 18 in colorectal cancers

c. 大腸がん細胞株を用いた発がん機構の研究 (古瀬正徳, 大森真理子, 富田秀司, 松添大助, 笹月健彦)

大腸癌細胞株における活性化 Ki-ras 遺伝子と immediate early gene の発現との関連を検討するため、Ki-ras 遺伝子ノックアウト細胞とその親株 (HCT116) を使い c-myc, c-fos, c-jun 遺伝子の血清応答性を比較検討した。40時間の血清枯渇状態の後、最終濃度が10%となるように血清を添加し、その前後の RNA を時間経過を追って抽出しノザンプロットを行ない immediate early genes の発現を検討した。活性化 Ki-ras をノックアウトし正常 Ki-ras の hemizygote となった細胞株 (HKe-3) では c-myc, c-fos, c-jun のいずれも血清によく応答した。一方、正常 Ki-ras をノックアウトし活性化 K-ras の hemizygote となった細胞株 (HK 2-6) では、c-myc, c-fos, c-jun のいずれも血清応答しなかった。さらに、活性化 Ki-ras と正常 Ki-ras の heterozygote である親株 (HCT116) では、c-myc のみに血清反応を認められた (表 E. 1)。これらの事から、正常の Ki-ras が c-myc, c-fos, c-jun の血清応答性を担っており、また、活性化 Ki-ras はそのうち c-fos, c-jun の血清応答性を優位に抑制していることが示唆された。現在、これらの細胞株について、さらに図 E. 1 に示すような方法で P53 遺伝子のターゲティングを行っている。

表 E. 1 Expression of c-myc, c-fos, c-jun in serum stimulated state.

		CT116	HK2-6	HKe-3
normal Ki-ras		+	-	+
activated Ki-ras		+	+	-
Serum response	c-myc	##	delayed±	##
	c-jun	±	±	##
	c-fos	±	±	##



A: Wild-type allele
 B: Targeting vector
 C: Targeted allele (p-53)

図 E. 2 Targeted Disruption of Human p-53

F. 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)

肥大型心筋症の原因遺伝子座はこれまでに4座報告されており, このうち3座では候補遺伝子アプローチによる変異の同定がなされている. 我々はこれまでに多くの日本人本症患者ならびに多発家系を収集しており, 前年度に引きつづき変異の検索を行った. その結果, 表F. 1に示すようにCMH 1座 (心筋βミオシン重鎖遺伝子), CMH 3座 (トロポミオシンα鎖遺伝子) に変異を有する日本人患者を固定できた. このことは, 日本人においても少なくとも20%は既知の原因遺伝子座の変異に起因することを示す.

一方, 本症多発47家系について, 既知の原因遺伝子座と本症との連鎖を検討した. 表F. 2に示すように, 11家系でCMH 1座との連鎖が否定された (非ミオシン家系). この非ミオシン家系においても, 他のCMH座との連鎖が否定されるものが存在し, 特に1家系は既知のCMH 1~4のいずれの原因遺伝子座とも連鎖しないことが示された. 従って, 本症の原因遺伝子座は少なくとも5座存在すること, すなわち疾患の遺伝的不均一性が極めて高度であることが明らかとなった. このため候補遺伝子アプローチによる新たな原因遺伝子の同定を行うべ

く、ヒト筋収縮関連要素遺伝子群ならびに心筋特異的に発現する遺伝子の単雑と染色体マッピングならびに構造と発現の組織特異性の検討を行っている。

表 F. 1 Frequency of mutations in the analyzed regions of known FHCM genes in Japanese patients with HCM

analyzed gene	Familial	Unknown
β -MHC (exon 3-25) CMH1, chr14q1	20/114 (17.5%)	2/73 (2.7%)
cTnT (exon 15) CMH2, chr1q3	0/48 (0%)	0/22 (0%)
α -TM (exon 2-9) CMH3, chr15q2	1/77* (1.3%)	0/48 (0%)

*; 1/60 (1.7%) in non-myosin familial cases

表 F. 2 Linkage study in Japanese non-CMH1-linked FHCM families*

locus	CMH1	CMH2	CMH3	CMH4	?	
chromosome	14q1	1q3	15q2	11p-q	18q1	
gene	c β MHC	cTnT	TM α	?	?	
marker	MYO- I /MYO- II	F13B	TMCA	S916/S987	TTR	
θ	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.05
FH07	-2.03	-0.22	-2.00	-2.99	0.58	0.50
FH08	-2.54	0.05	-0.51	-0.68	0.40	0.33
FH14	-2.34	0.30	0.20	-2.35	0.23	0.20
FH15	-2.62	-0.02	-0.35	-0.73	0.29	0.28
FH20	-2.27	-0.00	-0.00	-2.90	0.73	0.66
FH27	-2.37	0.00	-0.00	-0.18	0.82	0.74
FH32	-2.49	-2.20	0.10	-2.20	0.27	0.30
FH34	-2.14	-3.21	-4.09	-2.01	0.73	0.65
FH38	-2.01	0.31	-0.46	0.72	-2.19	-0.58
FH39	-2.57	-0.00	0.21	0.52	0.25	0.19
FH40	-2.33	-0.17	-0.13	-0.12	-0.14	-0.10
combined LOD	-25.71	-5.16	-7.01	-12.90	1.97	3.14

*; non-CMH1-linked families in Japanese FHCM : 11/46

原著論文

1. Hass, J.P., Kimura, A., Andreas, A., Hochberger, M., Keller, E., Brännler, G., Bettinotti, M.P., Yao, Z., Nevinsky-Stickel, C., Sierp, G., Sasazuki, T., and Albert, E.D. 1994.
Polymorphism in the upstream regulatory regions of DQA1 genes DRB1, QAP, DQA1, DQB1 haplotypes in the German population.
Hum. Immunol., 39, 31-40.
2. 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.
3. 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.
4. Nishi, H., Kimura, A., Harada, H., Adachi, K., Koga, Y., Sasazuki, T., and Toshima, T. 1994.
Possible gene dose effect of a mutant cardiac β -myosin heavy chain gene on the clinical expression of hypertrophic cardiomyopathy.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 200, 549-556.
5. Hashimoto, H., Nishimura, Y., Dong, R.P., Kimura, A., Sasazuki, T., Yamanaka, K., Takano, Y., Murashima, A., Kabasawa, K., and Hirose, S. 1994.
HLA antigens in Japanese patients with systemic lupus erythematosus.
Scand. J. Rheumatol., 23, 191-196.
6. Yamamoto, K., Fukui, Y., Esaki, Y., Inamitsu, T., Sudo, T., Yamane, K., Kamikawaji, N., Kimura, A., and Sasazuki, T. 1994.
Functional interaction between human histocompatibility leukocyte antigen (HLA) class II and mouse CD4 molecules in antigen recognition by T cells in HLA-DR and DQ transgenic mice.
J. Exp. Med., 180, 165-171.
7. Fukuda, Y., Kimura, A., Hoshino, S., Tashiro, H., Furukawa, M., Shintaku, S., Hori, H., Sasazuki, T., and Dohi, K. 1995.
Significance of the HLA-DQB1 matching in one-haplotype identical kidney transplant pairs and the matching analysis by the polymerase chain reaction (PCR)-heteroduplex-

polymorphism method.

Tissue Antigens, 45, 49-56.

8. Wan, X.L., Kimura, A., Dong, R.P., Honda, K., Tamai, H., and Sasazuki, T. 1995.
HLA-A and DRB4 genes in controlling the susceptibility to Hashimoto's thyroiditis.
Hum. Immunol., 42, 131-136.
9. Nishi, H., Kimura, A., Harada, H., Kaga, Y., Adachi, K., Matsuyama, K., Koyanagi, T., Imaizumi, T., Toshima, H., and Sasazuki, T. 1995.
A myosin missense mutation, but not a null allele, causes familial hypertrophic cardiomyopathy.
Circulation, in press
10. Dong, R.P., Kamikawaji, N., Toida, N., Fujita, Y., Kimura, A., Sasazuki, T. 1995.
Characterization of T cell epitopes restricted by HLA-DP9 in streptococcal M12 protein.
J. Immunol., 154, 4536-4545.

総 説

1. 木村彰方. 1994.
心筋症の遺伝子異常.
循環器 Now 6. 心筋症・心筋炎, 22-33.
2. 木村彰方. 1994.
肥大型心筋症.
実験医学 12, 185-189.
3. 木村彰方. 1994.
心疾患の遺伝子解析.
Annual Review 循環器, 94-100.
4. 木村彰方.
家族性肥大型心筋症.
nano GIGA, 印刷中.
5. 木村彰方.
インスリン依存型糖尿病と自己免疫性甲状腺疾患.
医学のあゆみ, 印刷中.
6. 上川路信博. 1994.
リウマチの遺伝的背景.
Bio Clinica, 93-98.
7. 上川路信博. 1994.

- クラス I 結合ペプチドの解析.
実験医学 1227-1230.
8. 上川路信博. 1994.
免疫応答の人為的制御.
実験医学 17, 251-254.
9. 上川路信博. 1994.
自己免疫疾患の病因と分子生物学-HLA
Modern Physician, 1442-1446.
10. 山根一聡, 笹月健彦. 1994.
抗原提示細胞の種類と T細胞の正と負の選択.
臨床免疫, 26, 951-960.
11. 峯田 聖, 笹月健彦. 1994.
B型慢性肝炎と HLA
医学のあゆみ, 171, 981-984.

学会発表

1. 上川路信博, 木村彰方, 笹月健彦 (1994, 5/14)
シンポジウム: 珪肺症および花粉症の遺伝要因-HLA を中心とした解析
第32回日本胸部疾患学会九州地方会, 北九州.
2. 木村彰方, 伊達是志, 笹月健彦 (1994, 7/20-22)
HLA-A DNA タイピング法の臨床解析への応用.
第3回日本組織適合性学会大会, 浜松.
3. 安永晋一郎, 木村彰方, 笹月健彦 (1994, 7/20-22)
HLA-DQ 遺伝子座の多型性とインスリン依存性糖尿病.
第3回日本組織適合性学会大会, 浜松.
4. 伊達是志, 木村彰方, 笹月健彦 (1994, 7/20-22)
HLA-A 遺伝子 DNA タイピング法の開発.
第3回日本組織適合性学会大会, 浜松.
5. 笹月健彦 (1994, 7/20-22)
シンポジウム: HLA の DNA タイピングと骨髄移植.
第3回日本組織適合性学会大会, 浜松.
6. 上川路信博, 須藤 徹, 笹月健彦 (1994, 9/20-22)
ワークショップ: HLA クラス I 結合ペプチドと疾患.
第22回日本臨床免疫学会総会, 東京.

7. 安永晋一郎, 木村彰方, 笹月健彦 (1994, 10/18-20)
HLA-DQA 1 および DQB 1 遺伝子の遺伝的多型性.
日本人類遺伝学会第39回大会, 千葉.
8. 木村彰方, 原田晴仁, 安永正剛, 古瀬正徳, 笹月健彦, 王生隆一 (1994, 10/18-20)
多発がん家系における hMSH 2 遺伝子変異.
日本人類遺伝学会第39回大会, 千葉.
9. 古瀬正徳, 大森真理子, 富田秀司, 松添大助, 白沢専二, 笹月健彦 (1994, 10/18-20)
活性化 Ki-ras 遺伝子を破壊した大腸癌細胞株における腫瘍特性および癌関連遺伝子の発現についての検討.
日本人類遺伝学会第39回大会, 千葉.
10. 上川路信博, 須藤 徹, 笹月健彦 (1994, 10/18-20)
HLA-B 51結合ペプチドの構造解析.
日本人類遺伝学会第39回大会, 千葉.
11. 須藤 徹, 上川路信博, 伊達是志, 木村彰方, 笹月健彦 (1994, 10/18-20)
HLA-A 2 サブタイプ分子に結合しているペプチドの検討.
日本人類遺伝学会第39回大会, 千葉.
12. 笹月健彦, 木村彰方 (1994, 10/19-21)
がん多発家系の遺伝子解析.
第53回日本癌学会総会, 名古屋.
13. 古瀬正徳, 白沢専二, 笹月健彦 (1994, 10/19-21)
正常 ki-ras 遺伝子を破壊した大腸癌細胞株における immediate early genes の反応性の消失.
第53回日本癌学会総会, 名古屋.
14. 星野修司, 福田康彦, 新宅究典, 田代裕尊, 古川雅博, 桜田 瞳, 土肥雪彦, 木村彰方, 伊達是志, 笹月健彦 (1994, 11/24-25)
ハプロタイプ適合腎移植症例における HLA-DNA タイピングの意義.
第30回日本移植学会総会, 広島.
15. 上川路信博, 須藤 徹, 笹月健彦 (1994, 11/29-12/1)
HLA-B 51分子より溶出したペプチドの解析.
第24回日本免疫学会総会・学術集会, 京都.
16. 須藤 徹, 上川路信博, 伊達是志, 木村彰方, 笹月健彦 (1994, 11/29-12/1)
HLA-A 2 サブタイプ分子間における結合ペプチドの比較.
第24回日本免疫学会総会・学術集会, 京都.
17. 峯田 聖, 上川路信博, 田名 毅, 笹月健彦 (1994, 11/29-12/1)

- HB ワクチンに対する免疫応答の制御機構解析。
第24回日本免疫学会総会・学術集会, 京都.
18. 田名 毅, 峯田 聖, 関 衛平, 上川路信博, 木村彰方, 笹月健彦 (1994, 11/29-12/1)
HBs 抗原特異的に活性化される末梢血リンパ球の表面マーカーの解析。
第24回日本免疫学会学術集会, 京都.
 19. 山根一聡, 山本 健, 竹下都多夫, 福井宣規, 吉河康二, 木村彰方, 笹月健彦 (1994, 11/29-12/1)
DR α -NOD トランスジェニックマウスにおける糖尿発症抑制効果の検討。
第24回日本免疫学会総会, 京都.
 20. 木村彰方, 伊達是志, 笹月健彦 (1994, 11/29-12/1)
HLA-A 遺伝子の DNA タイピングとその臨床応用。
第24回日本免疫学会総会, 京都.
 21. 安永晋一郎, 木村彰方, 笹月健彦 (1994, 11/29-12/1)
インスリン依存性糖尿病の疾患感受性・抵抗性と HLA クラス II 遺伝子群の多型性。
第24回日本免疫学会総会, 京都.
 22. 伊達是志, 木村彰方, 笹月健彦, 井上 治, 加藤裕久 (1994, 11/29-12/1)
若年性関節リウマチにおける HLA-DNA タイピング。
第24回日本免疫学会総会, 京都.
 23. 吉武佐枝子, 木村彰方, 岡田光男, 八尾恒良, 笹月健彦 (1994, 11/29-12/1)
炎症性腸疾患 (クローン病, 潰瘍性大腸炎) における HLA-DNA タイピング。
第24回日本免疫学会総会, 京都.
 24. Koyanagi, T., Nishi, H., Date, Y., Harada, H., Sasazuki, T., and Kimura, A. (1994, 12/1-3)
An HLA-linked susceptibility to rheumatic heart disease is mapped within the HLA-DR locus.
XIth Scientific Sessions of International Society for Heart Research Japanese Section, Tokyo.
 25. Yasunaga, S., Kimura, A., Harada, H., Nishi, H., Koga, Y., Toshima, H., and Sasazuki, T. (1994, 12/1-3)
Structural analysis of human atrial myosin light chain 2 gene.
XIth Scientific Sessions of International Society for Heart Research Japanese Section, Tokyo.
 26. Harada, H., Nishi, H., and Kimura, A. (1994, 12/1-3)
Fourteen missense mutations of cardiac beta MHC gene found in Japanese familial hypertrophic cardiomyopathy.

XIth Scientific Sessions of International Society for Heart Research Japanese Section, Tokyo.

27. Kimura,A., Harada,H., Yasunaga,S., Nishi,H., Koga,Y., Toshima,H., and Sasazuki,T.
(1994, 12/3)

Molecular genetic approaches to identification of an FHCM gene other than the myosin heavy chain gene.

International Symposium "Cardiac Development and Gene Regulation", Tokyo.

28. 木村彰方 (1994, 12/13-16)

HLA 抗原遺伝子群の遺伝的多型性.

第17回日本分子生物学会年会, 神戸.