

## 第25回ASHIミーティング

ASHI Meetingに参加しての印象記

湧永製菓(株)創薬研究所バイオ診断研究室

松下 正毅

昨年10月20日から24日までニューオーリンズで開催された第25回ASHI Meetingに東京大学人類遺伝の徳永先生に引率をしていただいで参加しました。はじめてのASHI Meetingというより、はじめてのアメリカ訪問という事のほうが私自身にとって重大なことでありました。このKAMONへの投稿は予想外の出来事であり、まったく準備をしておりませんでした。薄れゆく記憶をたどりながらはじめてのASHI Meetingとアメリカの印象について報告したいと思います。

## 日本脱出!?アメリカ初上陸

10月18日午後2時過ぎに東大を出発、上野から京成スカイライナーに乗って成田空港へと向かいました。成田空港へ到着した後は右も左もわからないまま、とにかく徳永先生の後をついて行きました。搭乗手続き、出国審査等をなんとかクリアして飛行機の座席につきました。座席の前を見ると、なんとすべての座席にモニターがついているではないですか(もちろんエコノミーです)。手元のリモコンで自由にチャンネル操作ができるようになっていました。出国経験の少ない私は「さすが国際線はちがうな!」と感動しました。ダラス空港に到着したのが18日の午後3時過ぎ。11時間くらい飛行機の中にいたのに3時間前に戻っているのが不思議な感じがしました。飛行機の中で言葉を一生懸命考えてからのぞんだ入国審査でしたが、審査官が日本語で聞いてくれたために難なくクリアしました。ニューオーリンズ行きの飛行機をまっていると、ハンドスピーカーを使って何かアナウンスが始まりました。どうやら座席数よりも多く予約をとってしまったためにこの便をキャンセルして次の便に変更してくれる人を捜しているようでした。しかも今キャンセルをしてくれたら100ドルを払うと言っていました。

午後8時頃ニューオーリンズヒルトンホテルに到着。空港シャトルバンに乗りホテルに向かいました。車窓からの眺め、走っている車、なによりも右側通行が私にとって非常に新鮮でした。無事ホテルに到着。部屋に入り窓から外を見るとミシシッピ河の眺めがとてもきれいでした。飛行機の中では寝ないようにがんばっていたの

で、ベッドに入るとすぐに眠ることができました。

## ASHI Meeting

10月20日、いよいよ学会の開幕です。緊張しながら受け付けを行い、抄録集などを受け取りました。うわさに聞いていたバインダーの分厚いプログラムは今回は無いようでした。部屋に戻りネームホルダーを胸につけてポスター会場へと行きました。入り口に体格のよいガードマンが立っていてネームホルダーの確認をしていました。ネームをつけていないと(当たり前ですが)会場へ入ることは出来ませんでした。ポスターの掲示を済ませてOpening Sessionの会場へと向かいました。各セッションの座長がプレビューをしているようでしたが、日本の学会で聞く日本人向けの英語の講演とは違った「生きた英語」を聞き取ることは私にとって非常に難しいことでした。それでもスライドの内容をメモしながら必死になって講演を聞きました。20日から23日まで会場に行っては必死にメモを取りながら講演を聞きました。あれほど必死にとったメモだったのですが、見直してみると何が書いてあるのか解読不可能なものが多いため、講演内容については省略させていただきたいと思います(印象記ということでお許し下さい)。

ここで簡単ではありますが学会の概要について少しふれたいと思います。会場はNew Orleans Hilton Riverside。その名の通りミシシッピ河の近くに位置しています。貿易センターやコンベンションセンターが近くにあるためビジネスマンの利用客が多い、らしいです(本に書いてありました)。会議などのイベントを行

うようなエリアには大小多くの部屋がありました。ASHI Meeting では展示会場を含めて5か7の会場が使われていました。ロビーの壁などにモニターが取り付けられており、その日に行われている会議や学会などの時間、場所が常に案内されていました。プログラムは plenary session として「The Role of the MHC in Immunological Disease」「MHC, Epitope Selection, and Rational Vaccine Development」「Host-Pathogen Interaction in Subversion of the Immune System」「Viruses in Organ Transplantation: What Can We Learn From Them?」の4セクションがあり、各セクションに4題の発表がありました。一般演題としては、Abstract presentation が10セクション（各6題の発表）とポスターの展示が223題ありました。Flow Cytometry、DNA typing などの技術的なことや「Advise and Consent Ensuring Patient Privacy and Informed Consent in Histocompatibility Laboratories」というような内容のワークショップが10セクションもありました。展示会場には各企業のブースがあり、DNA 抽出用の試薬や、HLA タイピング試薬が展示されていました。実際にカウントした訳ではないのですが参加人数は2000人くらいで（？）でしょうか、アメリカだけではなくアジアやヨーロッパからも参加しているようでした（アメリカの学会だから当然なのでしょうね）。徳永先生は「3年前に比べるとすこし活気が無くなっているなー。」とおっしゃっていましたが、とても熱気があり参加者のひとりひとりが Meeting を楽しんでいるように私には感じられました。

### ASHI Meeting 終了後

24日の午前6時ホテルを出発しニューオーリンズからダラス空港を経由してサンノゼ空港へと向かいました。ダラス空港でサンノゼ行きの飛行機を待っていると、またもやハンドスピーカーからのキャンセル大募集のアナウンス。最初100ドルであったのが機内への案内が始まった頃には500ドルまでになっていました。「二人で1000ドルか。しかし、サンノゼで約束があるからな」と思いながら飛行機に乗り込みました。みなさんならどうしましたか？

徳永先生の知り合いの方にサンフランシスコ、25日にはスタンフォード大学などを案内していただきました。スタンフォード大学はとにかく広い！！しかも緑が多くとても気持ちのよいところでした。26日には Palo Alto の高級住宅街やシリコンバレーなどを案内してもらった後にサンノゼ空港へと向かいました。搭乗手続きをするカウンターで出国審査が簡単に終わってしまった事も驚

きでした。飛行機は空席だらけで座席を使いたい放題、もちろん各座席にモニタ付き。快適な空の旅でした。予定通り成田に到着、はじめてのアメリカ訪問が無事に終了しました。

### 最後に

はじめてのアメリカ訪問、ASHI Meeting 参加、たくさんのお話を聞き、経験できたと思っています。本場ニューオーリンズジャズ、アメリカ南部最大の歓楽街バーボンストリート、ミシシッピー河、ケイジャン料理。次回ASHI Meeting はオーランドディズニーワールド。今回よりもっと積極的に Meeting に参加したいと思っています。最後になりましたが、今回のアメリカ訪問に際して大変お世話になりました徳永先生にこの場をお借りしましてお礼を述べさせていただきます。ありがとうございました。



写真1 日本から参加された皆さんと夕食



写真2 New Orleans Hilton Riverside の部屋から見たミシシッピー川

## 第25回ASHIミーティング

シオノギ製薬株式会社 診断医学事業部

森部 豊輝

第25回 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI) 学会が1999年10月20日から24日までの5日間、アメリカ南部の都市・ニューオーリンズで開催された。会場はヒルトン・ニューオーリンズ・リバーサイドで、これまで日本の学会では経験したことのない高級ホテルであったので参加申し込みの際にも凄い所でやるものだと思っていたが、学会に行ってから過去の会場も高級ホテルが多いことを知り、アメリカの学会とはこういうものなのだと考えることにした。何れにせよ、学会会場と宿泊施設が同じであったので会場までの移動がなく楽だったし、リバーサイドの名前の通りすぐ目の前に流れるミシシッピー川の雄大な景観を眺めながら昼食をとったりすることができたのも英語づけの頭を休めるには丁度良かった。実は、自分自身が学会で海外へ出かけるのもアメリカに行くのも初めてで、しかも幾つか課題もあるということで、期待よりもむしろ不安を抱えての学会参加であった。それでもどうにか学会についていくことができたし、それに加えて多くの参加者と話をすることができたことや日本に帰ってきてからも情報交換をすることができる人とのつながりができたことが自分にとって何よりの収穫であった。

さて、学会内容であるが、Plenary Session, Poster Session, Abstract Presentations, Lunch on own, Exhibition といったところは通常の学会と同じであるが、教育セミナーという形で色々なテーマのWorkshop (DNA タイピングやフローサイトメトリーの基礎・応用編, Sequenced based typing といった技術的なものだけでなく、精度管理システム、プライバシーとインフォームドコンセントなど多岐にわたっている) が設けられていることがこれまで経験してきた日本の学会とは大きく異なる点であった。以上のような内容の中から、いくつかの発表について紹介する。

### 1. マイクロアレイによる HLA-DNA タイピング 「Workshop10: STRs, SNPs and Microarray CHIPS: New Technology in MHC Typing」

3人の speaker によってマイクロアレイ技術による最新(次世代)のHLA-DNA タイピング法とMHC領域のSNPs やマイクロサテライト多型の新しいアプリケーションの可能性について紹介された。まず、最初に Mickelson (Fred Hutchinson Cancer Research Center) が造血幹細胞移植 (HCT) においてもゲノム学的研究を行う計画があることを述べ、その計画の具体的な項目についても挙げた。その中の一つが、移植患者 (今回は CML 患者) とその非血縁者ドナー間で全 HLA ローカスのアレルがマッチした移植ペアと mismatches がある移植ペアで MHC 領域内のマイクロサテライトと SNPs 多型を解析して移植後の GVHD と生存率に与えるものを同定しようというものである。今回のところは、予備実験として9種類のマイクロサテライト多型を解析して実

際に検出されたアレル数を示し (表1)、HLA-B アレルがマッチした場合と mismatches した場合とで B ローカスに隣接するマイクロサテライト (MIB) のアレルがどの程度マッチするのかわかるというデータ (表2) を紹介したにとどまったので、今後のさらなる研究成果に期待したい。続いて、3.8Mb に及ぶ MHC 領域の高密度 SNPs マップを作製し、それを利用した MHC-SNP タイピングを行うこととそのための High Throughput なタイピング技術の開発計画について述べた。具体的な目的としては 5000bp に1つの SNPs を同定することと MHC-SNP タイピングキットを開発することである。タイピング方法としては、異なる蛍光標識を持つアレル特異的プライマーを用いた Multiplexed SSP (それぞれ 400~600bp) とマイクロアレイのコンビネーションを考えているとのことであった。どちらの計画においても、より High Throughput に多型解析を行うことができる技術が必須であり、現実的にはやはりマイクロアレイ技術となる。

表1. ヒトMHC領域内におけるマイクロサテライト解析 (N=208)

ローカス	検出されたアリル数	全アリル数	Heterozygosity(%)
D6S276	15	16	79
MOGCA	10	15	77
D6S265	8	14	76
MIB	15	15	82
D6S273	9	8	78
G51152	10	11	81
TAP1CA	7	9	58
RING3CA	8	8	73
D6S291	7	7	72

表2. 非血縁者間骨髄移植 (CML) におけるマイクロサテライト解析 (N=104ペア)

		MIB	
		マッチ	ミスマッチ
HLA-B	マッチ	61	22 (27%)
	ミスマッチ	6	15 (71%)

それを受けて、Wade (The Toronto Hospital) と Balazs (Lifecodes Corporation) がマイクロアレイ技術による HLA-DNA タイピング法について述べる形になった。マイクロアレイといってもプローブとのハイブリダイゼーションによって多型解析を行うわけであり、マイクロアレイ技術を利用した HLA-DNA タイピングにおいても当然のことながら、スライドガラスにプローブを固定する方法と PCR 増幅産物を固定する方法との 2 通りがある。Wade は前者の方法であり、プローブをスライドガラスにスポットして蛍光標識プライマーをハイブリダイズさせて HLA-DRB1 タイピングを行った。マイクロアレイシステムは既に日本にも上陸している Genetic

MicroSystems 社のもので、1 枚のスライドガラスに 32 プローブを 3 重にスポットし、蛍光標識ラベル dUTP を取り込ませた PCR 増幅産物をハイブリダイズさせてタイピングを行った。HLA-DRB1 だけでプローブの数もさほど多くはなかったが、データはきれいで再現性も高かったのでクラス I へのアプリケーションに期待したい。これに対して Balazs は逆に、PCR 増幅産物をスポットして蛍光標識プローブをハイブリダイズさせる方法で HLA-A, -B, -DRB1 タイピングを行った。具体的には 1 枚のスライドガラスに 768 サンプルを 4 重にスポットし (合計 3072, 最大では 9216 まで可能)、それぞれのアリルに特異的な Cy3 標識されたプローブ (A : 34, B :

46, DRB1 : 45) と Cy5 標識されたコントロールプローブを混合してハイブリダイズさせた後にスキャナーでデータを読み取り、バックグラウンドを差し引いた後に Cy3/Cy5 ratio を算出し、さらに算出 ratio を未知のサンプルと既知のコントロールサンプル間で比較して全体的なイメージパターンとしてタイプを決定するもので、マイクロアレイシステムは Amersham 社のものであった。重要であるスキャナーの能力としては 2 レーザーで 4 蛍光色まで同時に検出可能であった。しかし、実際に Cy3/Cy5 ratio を見てみると陽性値の領域が広く (バラツキが大きい)、下の値が陰性値の領域と非常に接近しているために正確に陽性・陰性の判定をするのが難しい場合がある。

「Abstract Presentation 6 : Clinical HLA Typing」

演題名 : Rapid HLA Typing using Microarray  
Technology

Balazs のグループがマイクロアレイ技術による HLA タイピングについて発表した。その技法は Workshop とは異なり、リバースハイブリダイゼーションによるもので 164 種類のプローブを 1 枚のスライドガラスにスポットし、HLA-A, -B, -DRB1 タイピングを行ったものだった (プローブの内訳は分からなかった)。PCR 増幅をローカスごとで別々に行った後に 3 種類の増幅産物を混合してハイブリダイゼーションを行うのだが、この際、HLA-A と HLA-DRB1 は同じ蛍光ラベル (Cy5) を用いるが、HLA-B はシークエンスが HLA-A とよく似ているので別の蛍光ラベル (Cy3) を用いている。これによってクロスハイブリダイズしたものを見分けることができるのである。先に述べたように彼らを使用しているスキャナーは 4 蛍光色まで同時に検出可能であるのでよく似たシークエンスを持ったローカスあるいは遺伝子でも 4 つまで同時に処理することができる。しかも現時点で 1 枚のスライドガラスに最高で 2304 種類のプローブまでスポットすることができるので、例えば、HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1, -DQB1, -DPB1 を同時にタイピングすることもできるわけである。ただ、実際のデータ解析では、陽性・陰性の判定を行う前にコントロール (恐らくコントロールプローブに対する反応シグナル) によって全てのデータを normalize する必要があるということから raw データがあまりきれいではないことがうかがえる。

「Poster Session」

演題名 : DNA Microchips Technology for Human

Polymorphism

Ferrara のグループ (イタリア, National Cancer Institute) の発表であるが、彼らのタイピング法はマイクロアレイといっても一風変わっており、まず、多型に対応して 3'末端の 1 塩基だけが異なる 2~4 種類のプローブをスライドガラスに固相し、PCR 増幅産物とハイブリダイズさせた後にプローブを起点として DNA polymerase によって Cy3 標識 dUTP あるいは dCTP を取り込ませて伸長反応を行う。この時、3'末端の 1 塩基がマッチした場合にしか伸長反応が起こらない、すなわち取り込みが起こらないのでどの多型を持つのかを判別することができるというものであった。この方法を利用した場合、ハイブリダイゼーション時のセレクションの必要はないが、伸長反応というステップが増え、コストも高くなってしまふ。

2. Clinical HLA-C アリルタイピング

「Abstract Presentation 6 : Clinical HLA Typing」

演題名 : HLA-B-HLA-C Linkages in 2000+ Volunteer  
Bone Marrow Donors

Marsh のグループ (The Anthony Nolan Bone Marrow Trust) が骨髄移植における HLA-C アリルマッチングの効果について検討することを目的として、PCR-SSP 法 (Low resolution) によって 2153 人のドナーの HLA-C アリルタイピングを行い、既にタイピングされている HLA-B 抗原/アリルとのハプロタイプ解析を行った。その結果、99-100% という非常に強い association を示すハプロタイプがあることと一つの HLA-B 抗原/アリルが複数の HLA-C アリルとハプロタイプを形成するものがあることを報告した。前者の例としては、B49-Cw\*07, B8-Cw\*07 (これらの HLA-B 抗原は日本人集団では検出されない)、B\*0702-Cw\*0702 (日本人集団におけるハプロタイプと同じ) などが挙げられ、後者の例としては、B44-Cw\*0501, -Cw\*16, -Cw\*04, -Cw\*07, -Cw\*0202 などが挙げられた。また、この場合に B44 グループ内のアリルバリエーションが HLA-C のアリルバリエーションと結び付いているわけではないことも示した。

演題名 : Molecular Typing of HLA-A, B, C, DRB1  
Genes for Kidney Transplantation Donor-  
recipient Pairs of the United Network  
Organ Sharing (UNOS) Program by PCR-  
SSOP

ASHI-UNOS Collaborative Study として Fernandez-Vina (American Red Cross, Baltimore) を中心としたグループが、死体腎移植の成績に対する HLA 抗原あるいはアレルマッチングの重要性について検討するために PCR-SSOP 法によって 640 のドナールレシピエントペアの HLA-A, -B, -C, -DRB1 アレルタイピングを行い、アレルレベルでのミスマッチについて解析した。これらのペアは元々血清レベルでは HLA-A, -B, -DR が完全にマッチしたものであったが、アレルレベルで見ると、HLA-A, -B (252 ペア) ではまだ 60.3% がマッチしたが、HLA-A, -B, -DRB1 (191 ペア) では 40.3%、HLA-A, -B, -C (216 ペア) では 41.2% にとどまり、HLA-A, -B, -C, -DRB1 (181 ペア) では 28.7% しかマッチしなかった。また、HLA-A, -B, -C, -DRB1 ミスマッチのうちの 3 分の 2 (全体のほぼ半数) が 1/8 あるいは 2/8 ミスマッチであった。残りのペアのタイピングを終えた後に移植成績と合わせて解析する予定であるとした。

「Poster Session」

**演題名：High Resolution HLA Class I Matching in Bone Marrow Transplantation: Influence in Patients Surviving**

Ferrara のグループが非血縁者間骨髄移植において HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3/4/5, -DQA1, -DQB1 のアレルレベルでのマッチングと移植成績について検討した結果を発表した。アレルタイピングはダイレクトシークエンス法によるものであった。それぞれのアレルごとにマッチとミスマッチペア間で移植後の生存率を比較しているが、彼らのデータでは特に有意な差は認められていなかった。ただ、HLA-C アレルがマッチした方が生存率が高い傾向にあり、例数を増やせば有意差が出てくるとしていた。

### 3. non-PCR 法による HLA-DNA タイピング

「Poster Session」

**演題名：Rapid Detection of HLA-B\*2701-14**

**Nucleotide Polymorphisms without PCR**

**演題名：Problems and Potential of Rapid Detection of HLA Class II Single Nucleotide**

**Polymorphisms without PCR**

Bunce のグループ (Oxford Transplant Centre) が PCR 法を利用せずに HLA-DNA タイピングを行う試みとして Invader Technology (Third Wave Technologies, Inc.) によるタイピングについて 2 題にわたって発表し

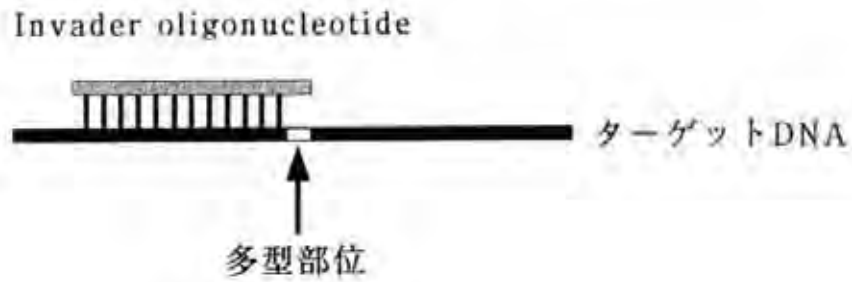
た。Invader Technology は 2 つのオリゴヌクレオチドが overlapping してハイブリダイズすることによって形成される 5'末端 Flap-like 構造を特異的に認識して切断するエンドヌクレアーゼ、Cleavase の性質を利用したもので、その基本原理 (図 1) は、①多型部位と 3'末端でミスマッチになっている Invader oligonucleotide をターゲット DNA にハイブリダイズさせる。②その中心に多型部位の配列、その下流には Quencher 修飾されたターゲット DNA に相補的な配列、上流には Fluorescence 修飾された非相補的な配列を持つプローブ (fluorescence resonance energy transfer (FRET) probe) をハイブリダイズさせる。これによって多型部位で 2 つのオリゴヌクレオチドが overlapping して Flap-like 構造が形成される。③Cleavase が overlapping によって形成された Flap-like 構造を特異的に認識して切断する。これによって FRET probe が切断されると同時に Quencher と Fluorescence が切り離されるために Quencher の抑制効果がなくなり Fluorescence が蛍光を発するようになる。多型部位の配列が異なる場合は overlapping による Flap-like 構造が形成されないために Cleavase によって切断されない。さらに、熱安定性 Cleavase を用いて 65℃ で反応を行うことによって、FRET probe のハイブリダイゼーションから Cleavase による切断までの一連の反応が連続的に起こり、シグナルが増幅される。

実際の発表では、バックグラウンドを低くするために 2 段階の Invader 反応を行っていた。すなわち、最初の反応では非修飾プローブを用い、Cleavase によって切り離されたプローブ上流部分を 2 段階目の反応の Invader oligonucleotide として利用し、人工的に合成したターゲット DNA にハイブリダイズさせた後に FRET probe をハイブリダイズさせている。この原理によって DR\*04 グループを用いたモデル実験と B\*27 グループのアレルタイピングを行った。反応はマイクロプレートで行い、全工程に 4 時間を要する。直接ゲノム DNA から変異を検出できるのでコンタミネーションの心配はないが、用いられるゲノム DNA の量が少ない場合や質が悪い場合にはうまく反応がいかないということだった。

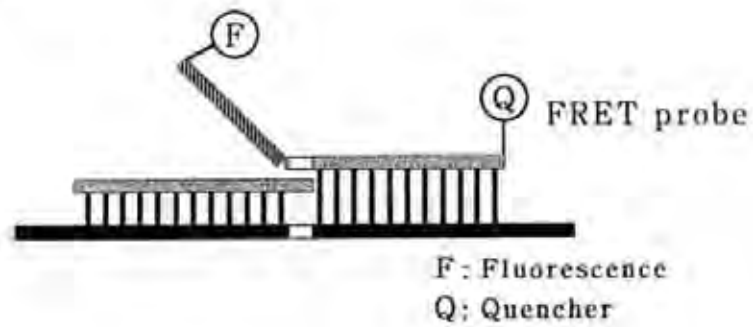
---

# 図1. Invader Technologyの原理

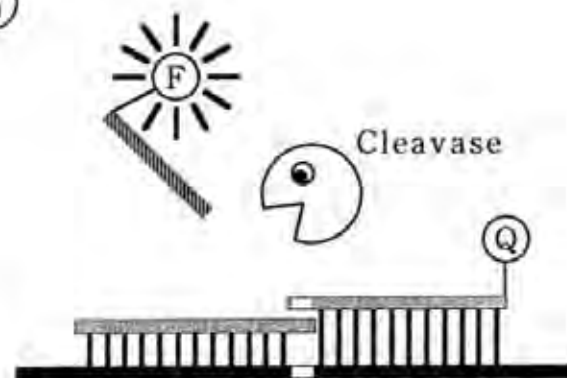
①



②



③



# がんと HLA

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・分子病態分野

木村 彰方

「癌と HLA」についてまとめて書くようにと佐治編集長よりのご指名を受けましたが、とても全てを網羅することは出来ません。そこで、我々が研究している大腸癌を例に引きながら HLA と癌との関連を述べますが、独断と偏見がありますことをあらかじめお詫びします。(読者の皆様、佐治編集長ゴメンナサイ)

## 1. 癌は体細胞変異の集積物である

癌は世界中の多くの国における死因の最も多くを占める疾患である。医療が発展するにしたがってヒトの平均寿命が飛躍的に伸びているが、それだけに癌が生命への脅威として大きくのしかかって来る。

癌を極めて単純化して定義すると、「体細胞変異によって細胞が正常な増殖制御から逸脱し、そのため宿主の生命を脅かす存在となったもの」と言える。つまり、癌には①体細胞変異の生成、②細胞の異常増殖、③生命への危機の3つの側面があるが、これらは互いに密接に関わるものである。

自然界に存在する変異原物質や宇宙線などにより体細胞変異自体は常に我々の体内で生じていると考えられるが、その変異が細胞の異常増殖(増殖の亢進)をもたらすか、あるいは正常な増殖抑制からの逸脱に深く関わる場合に癌細胞が生じる。前者を来す体細胞変異としては、例えば K-ras などの癌遺伝子の変異であり、また後者を来す体細胞変異の例としてあげられるのが、癌抑制遺伝子(p53やAPCなど)の変異と apoptosis 関連遺伝子(Bcl-2やBAXなど)の変異である。機能遺伝学的な言い方をすれば、前者の多くは片側の染色体上の遺伝子に生じた gain of function 変異であり、後者の多くは両側の染色体上の遺伝子に共に生じた loss of function 変異である。一般的に、単一の癌関連遺伝子の変異では癌は生じず、癌では複数の癌関連遺伝子群に同時に変異を有している。

これらの種々の遺伝子に生じた変異と同時に、癌細胞が臨床的な癌として成立するまでに増殖するには、宿主の免疫監視機構からの逸脱が必要となる。つまり、常に

生じていると考えられる遺伝子変異を有する細胞の多くは、宿主の免疫監視機構によって排除される限り、癌として成立し得ないことになる。

## 2. 癌細胞に対する免疫監視機構

癌細胞では多くの遺伝子に変異が生じており、それが本来存在していなかった異常蛋白(非自己蛋白)を生成する場合には、癌細胞は非自己細胞として免疫系に認識・排除される。つまり、遺伝子変異→癌特異抗原→免疫排除の図式が成り立つことこそが、生体を癌から守る自然界の摂理である。

ここで癌特異的抗原の免疫認識を考えてみると、ひとつは液性免疫(抗体)による認識であり、もうひとつは細胞性免疫による認識である。癌における体細胞変異の観点から言えば、この免疫認識において主体をなすのは後者であると考えられる。すなわち、癌特異的抗原としての非自己蛋白が生じた場合には、その分解産物(ペプチド)はHLA分子に結合して細胞表面に輸送されるため、T細胞によって認識されることになる。

それでは、なぜ非自己である癌細胞は生体内で増殖を続けるのだろうか? ひとつにはHLAが非自己抗原ペプチドを提示していても、T細胞側がそれを効率よく認識出来ない、あるいは認識しても効率よく活性化されないことが考えられる。例えば、癌細胞側に接着因子の変異(構造異常)や発現異常がある場合などである。

一方、HLA側にとってみると、①抗原ペプチドを産生出来ない(TAPやLMPの変異など)場合、②癌特異的な非自己ペプチドを効率よく提示するHLAアリルを本来持っていない場合、③提示可能なHLAアリルを持っていたが、癌における体細胞変異でHLAが欠損した場合、④癌



細胞の異常増殖に最も重要である体細胞変異が変異蛋白を生じない(ナンセンス変異や遺伝子の全欠損など)場合あどが考えられる。これらのうち、④の可能性は、癌が体細胞変異の集積物である以上、極めて低いと言わざるを得ない。事実、これまでに多くの癌に見い出されると報告されている癌に特異的な変異(例えば、K-ras 遺伝子や p53 遺伝子の変異など)の多くは、ミスセンス変異(単一アミノ酸置換)である。また、大腸癌を中心に多く報告される APC 遺伝子の大半はフレームシフト変異(変異点に続く蛋白の読み枠がずれて本来とは異なる蛋白ができる)である。同様に考えれば、多数の遺伝子に同時に変異が存在する以上、癌抗原のいずれもがその個体の持つどの HLA アリル(特に HLA-A, B, C などのクラス I 遺伝子のアリル)でも提示出来ないとは考え難いことになる。また、①の可能性はあり得るが、これまでに調べられた限り、癌における TAP や LMP 遺伝子変異は極めて希である。

### 3. 癌と HLA 型は相関するか?

以前より癌と HLA との相関が検討されており、特定の癌(例えば胃癌など)と特定の HLA 型との「有意な」相関が報告されている。しかしながら、これらの相関の多くは追試で確認されず、特定の HLA 型との相関に関してはむしろ否定的な意見が多い。すなわち、「有意である」と報告されていても、実際には p 値が補正されていなかったり、サンプル数が少ないことがほとんどである。従って、それらはサンプリングバイアスの結果である可能性が高い。

一方、前述のような考え方に立てば、特定の癌と特定の HLA 型との相関があるにしても、それが見い出されるのは、①その癌の多くに同一の遺伝子変異(変異蛋白)が存在し、かつ②その癌患者の持つ HLA 型ではその変異蛋白を効率よく提示出来ない場合に限られるであろう。つまり、HLA との相関があるにしても、それは対象とした癌において極めて限られた現象であると思われる。

特定の臓器の癌の多くが同一の遺伝子変異を有する状況は、遺伝子変異の観点からは可能性が極めて低いと考えられるが、実際これまでに知られている癌関連遺伝子の変異は癌細胞毎にかなり異なる。大腸癌における K-ras 遺伝子変異などは同一の変異が複数のサンプルに見い出される良い例であるが、その場合でも特定の 1 変異(12Asp など)に限ってみると、大腸癌全体のたかだか 3-4%を占めるに過ぎない。p53 遺伝子変異に至っては、大腸癌の 30-40%に存在するが、個々の癌における変異は全く別々のものであり、同一変異が認められるのはせい

ぜい 1%程度である。

それでは、特定の癌と HLA との相関は全く認められないのか?と言え、そうとは限らない可能性がある。例えば、MAGE や  $\alpha$ フェトプロテインのような癌抗原は、それ自体の遺伝子のコーディング領域に変異が存在するわけではなく(変異蛋白ではない)、もともと未分化な細胞では発現していた遺伝子(細胞の分化に伴って shut down されている)が、癌化に伴う「先祖返り」として再発現したものである。従って、これらの未分化抗原を効率よく提示出来ない HLA アリルを持つ者は感受性を示すことになる。しかしながら、この場合にも、MAGE や  $\alpha$ フェトプロテインなどの未分化抗原の全域に渡って、HLA で提示出来るエピトープ(抗原ペプチド)が全く存在しない状況は、HLA が多重遺伝子族であることと考えあわせると、やはり極めて希な現象と考えざるを得ないであろう。

### 4. 癌における HLA 変異

前述のように、生体内で癌が成立するひとつの条件としての免疫監視機構からの逸脱では、癌細胞における HLA の変異が重要であると考えられる。以前より癌組織においては HLA 分子(特にクラス I 分子)の発現減弱ないし消失や、HLA 分子(特にクラス II 分子)の異所性発現が報告されている。

HLA クラス II 分子の異所性発現機構については不明な点も多いが、大腸癌などの癌の一部では HLA-DR 分子の発現が観察され、また IFN  $\gamma$  などのサイトカインの存在化にその発現がさらに増強することがある。このような異所性発現の際に、HLA クラス II 遺伝子自体には発現制御領域を含めて変化が認められないため、「先祖返り」あるいは分化異常に伴って正常な大腸粘膜には存在しない転写関連因子が再発現して来たものか、あるいはヒストン構造の変化(アセチル化の変化など)を含めたクロマチン構造変化のため HLA クラス II 遺伝子が転写されるようになったものと考えられる。このような異所性クラス II 分子発現の機能的な意義は不明であるが、ひとつの可能性として、「不適切な細胞に発現した」HLA 分子は T 細胞の活性化を逆に抑制する(co-stimulatory 分子がないために不適切なシグナルが入り、このため T 細胞は apoptosis に陥る)ことが考えられる。

一方、癌における HLA クラス I 分子の発現減弱ないし消失は、癌細胞が癌として成立する上での有効な適応戦略であると言える。我々のデータでは大腸癌の 10-15%程度には、HLA-A, B, C 領域の LOH(loss of heterozygosity)変異が観察される。この LOH 型変異というのは、2本あ

る染色体上の遺伝子領域の片側一方だけが欠損した状態を示すが、個々の大腸癌についてHLA領域を見ると、HLA-BからHLA-Aまでの広範な領域に渡って欠損したと考えられるものや、HLA-BのみあるいはHLA-Aのみのような限局した欠損を示すものもある。つまり、HLA領域の欠損範囲は個々の癌毎に大きく異なる。

これとは別に、大腸癌の一部では $\beta$ 2ミクログロブリン遺伝子に変異が観察される。但し、我々がこれまでに解析した限り、 $\beta$ 2ミクログロブリン遺伝子の変異(全例がフレームシフト変異)は、片側アレルのみの変異(1例だけフレームシフト変異とミスセンス変異が両側アレルに生じた例があるが、ミスセンス変異によって機能欠損に至るかは不明)であり、また大腸癌のうちでも特殊なタイプ(ミスマッチ修復酵素欠損群)に限られる。

ここでミスマッチ修復と癌との関係について触れるが、癌の一部にはミスマッチ修復酵素(mismatch repair enzyme, MRE)の欠損が見つかる。MRE欠損はもとも遺伝性大腸癌(hereditary non-polyposis colon cancer, HNPCC)の原因として報告されたものである。つまり、HNPCC家系では片側の染色体上のMRE遺伝子に変異があり、残存する正常なMRE遺伝子に体細胞変異が生じると大腸癌や子宮体癌を発症する訳である。また、家族性ではない一般の大腸癌、子宮体癌、膵臓癌の一部にもMRE欠損が見いだされる。MREはhMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2, hMSH3, hMSH6などの遺伝子にコードされるサブユニットの複合体であり、DNA複製の際に生じたエラーを修復する機能を有する。このため上記のいずれのサブユニットに異常があっても、MRE欠損の表現型を示すことになる。つまり、複製エラーを修復出来ないために、いろんな遺伝子に変異が生じ、その結果癌になるとの考えである。このため、MRE欠損癌をRER(replication error)陽性癌と呼ぶこともある。また、このMRE欠損を簡単に検出する方法として、マイクロサテライトのリピート数が癌において変化すること(マイクロサテライト不安定性, microsatellite instability, MSI)が検討されているため、MRE欠損癌のことをMSI陽性癌と呼ぶ場合もある。

MRE欠損の大腸癌では、癌関連遺伝子群における変異分布が通常の大腸癌とは異なっている。通常の大腸癌ではp53遺伝子やAPC遺伝子に変異が高率(40%以上)に発見されるが、MRE欠損大腸癌ではp53やAPCの変異は少なく、その代わりにTGF $\beta$ レセプターII、 $\beta$ カテニン、BAXなどの遺伝子に変異が多い。特にTGF $\beta$ レセプターII遺伝子変異(全てがフレームシフト変異)はMRE欠損大腸癌の90%以上に認められるため大腸癌の癌化機構と

して注目されている。但し、MRE欠損子宮体癌ではTGF $\beta$ レセプターII遺伝子変異は希であるため、このことはMRE欠損癌全般に共通の現象ではないとされる。また、HLAクラスI領域のLOH型変異もMRE欠損大腸癌に比較的多く(MRE欠損癌では36%、それ以外の大腸癌では10%)認められる。

このように、大腸癌(特にMRE欠損癌)では、HLAクラスI領域のLOH型変異や $\beta$ 2ミクログロブリン変異(MRE欠損癌の45%)など、HLAクラスI分子の発現異常に至るような遺伝子変異が見られる。ここで興味深いことに、 $\beta$ 2ミクログロブリン変異が見いだされた大腸癌では、HLAクラスI領域のLOH型変異が認められていない。つまり、大腸癌の一部は、HLAのLOH型変異によって片側の染色体上のHLAアレル(またはアレル群)のみを特異的に欠損させるか、または $\beta$ 2ミクログロブリン変異によってHLA分子の発現を全般的に抑制していると考えられることになる。

T細胞による認識から逃れるためだけならHLA分子の発現を完全に欠損させることが最も有効であると考えられるが、そのような癌細胞は今度はNK細胞によって効率良く認識排除されることになる。HLAクラスI分子が残っていれば、NK細胞へのinhibitory signalを与えることが出来る。つまり、癌の適応戦略は「それ自身の生育に最も重要である遺伝子変異(変異蛋白ペプチド)をいかに残すか」にあるため、HLAのLOH型変異はこの適応戦略に合致するものと言える。

## 5. 癌の免疫療法とHLA

癌の免疫療法は、例えば皮膚癌などでは実際に臨床で用いられ始めている。担癌患者よりリンパ細胞を取り出し、その個体の癌を認識する特異的なT細胞をin vitroで増殖させ、これを患者に戻す方法である。皮膚癌の免疫療法で最も注目されているのはMAGE-1という未分化抗原であるが、これはHLA-AIで効率よく提示されるため、MAGE-1が高発現する皮膚癌で、かつHLA-AIを持つ患者には有用な治療法と言える。もちろん患者自身の癌をターゲットとして患者のT細胞をin vitroで増やすことが基本であるが、将来の応用としては、「癌抗原とHLA型」の2つが共通であれば、生体外で患者の癌特異的T細胞を増やすにあたって他人由来の癌細胞を使用出来ることになる。さらに言えば、HLA-identicalであれば、他人由来の癌特異的T細胞も治療に応用出来る可能性がある。

もうお分かりであろう。癌の免疫療法を考える上では、その個体の癌に「いかなる癌抗原が出ているか」と同時

に、「その癌に発現しているHLAアリルは何か(HLAにLOH型変異があるか否かも)」が分らなければならない。「癌抗原」のターゲットとしてより普遍的に考えられるのは前述のように未分化抗原であるが、そのような癌抗原が果たして癌細胞の発育にどれだけ重要な意義を有しているかも大事な検討項目である。つまり、その癌抗原を表現している癌細胞を除くことが、果たして癌の治療になるのかを充分吟味しなければならない。癌の生育に大切ではない癌抗原なら、それを失った癌細胞が再び出現して来ると考えられるためである。一方、HLA側から考えると、LOH型変異で消失したアリルはそもそもターゲットにはならないが、癌の免疫療法を続けて行くと、癌細胞側はさらにLOH型変異の領域を広げる可能性がある。そうするといちごっこが続くように思われるかも知れないが、最終的にHLAの全欠損に至ることはない(NK細胞に認識される)と考えられるため、残存アリルで提示出来る癌抗原がなくなるまでは攻められる。逆に言えば、残存アリルで提示出来る癌抗原がなくなるとそこで手立てを失う訳であるから、HLA側から癌を攻めるにしても限界はある。

とまで来たところで、それではどのようにすればいいのであろうか？ そう、最初の方で述べながら詳しく触れなかった点の追求である。「HLA発現自体に変化がない癌細胞は、いかにして免疫監視機構から逃れているのであろうか？」を明らかにしなければならない。接着因子の解析を含めてその機構を明らかにし、その知識を元に「不適切なT細胞の活性化」をいかにして「適切なT細胞の活性化」へと導くことを可能にするかが、今後の癌の免疫治療を担う重要な研究課題である。



知ってるつもり!?

血清学編 (続々編)

## HLA-B ローカスの血清学的タイプとアリールについて③

日本赤十字社 中央血液センター

田中 秀則

これまでアリール名と HLA 抗原型 (血清学的に検出されるタイプ) について紹介してきたが、今回は B-ローカス最大の難所である B15 グループについて紹介する。

現在アリールで B\*15 と称されているグループは、血清学的に B62、B63、B70 (B71、B72)、B75、B76、B77 抗原として区分されていたものを B\*15 として扱うようになり、血清学的な情報は、アリール名には全く反映されていない。このことが、B\*15 グループを理解することを困難にしている。しかし、B\*15 にコードされる抗原は、 $\alpha 1$  ドメインのアミノ酸配列において、血清学的に区分される抗原にほぼ対応する特徴的な配列を見出すことができる (図 1 参照)。B62 および B76 抗原は、24 番目のアラニン (A)、63 番目のグルタミン酸 (E)、67 番目のセリン (S) が、B75 および B77 抗原は 46 番目のアラニン (A)、63 番目のアスパラギン (N) が、B70 抗原は 12 番目のメチオニン (M)、24 番目のセリン (S)、74 番目のタイロシン (Y) が特徴的な配列である。

これらの特徴的な配列を見分ける抗血清に加え、 $\alpha 2$  ドメインの配列の違いを認識する抗血清により、公認されている抗原以上に B15 グループを細分化することが可能であることが分かってきた。

### 1、B62 関連抗原 (図 2 参照)

B15 関連抗原において B62 と B63 が最初に公認された。B62 は、一般的に見られる B15 抗原で、Bw6 に相関する抗原である。また、B63 は B62 抗原と比較して短い反応パターンを示す抗原で、Bw4 に相関する抗原である。

これまで B62 抗原をコードするアリールは数多く報告されているが、我々が行っている血清学的な検討において、B62+B75Vweak+B5603+B46 という特異性の抗血清で B62 を 2 つのグループに区分されることが分かった。現在、我々はこの血清に反応を示さない B62 抗原を B62V という名前で血清および抗原の解析を行っている。(通常のタイピングでは、区分不可能である。)

この区分により、従来言われている B62 抗原のほとんどが B\*1501 にコードされている抗原だけであり、B62V 抗原をコードしているアリールは、6 種類が確認されている。B62 と B62V との抗原間におけるアミノ酸の違いは全て  $\alpha 2$  ドメインに見られ、また B62+B75Vweak+B5603+B46 血清が反応する抗原間では、 $\alpha 2$  ドメインに共通のアミノ酸配列が見られた。(図 1 参照)

B62V 抗原に属する抗原で血清学的に区分可能な抗原として B1525 がある。この抗原は、 $\alpha 1$  ドメインのアミノ酸配列は B\*1501 と同じであるが、 $\alpha 2$  ドメインが異なることから B62V と同じ反応パターンを示し、更に B75+B77 の抗血清に反応を示すことから、B62V 抗原の中でも区分が可能な抗原である。B75+B77 血清については、B\*1502 または B\*1521 にコードされる B75 および B77 に反応を示すが、B\*1508 または B\*1511 にコードされる B75 抗原 (B75V として区分している) には反応を示さないことから、 $\alpha 2$  ドメインを認識していると思われる。

他の B62 抗原として、日本人で見出された B1528 がある。この抗原については、最初 B75 とタイプされたパネルについて DNA タイピング (PCR-SSCP 法) を実施したところ、日本人で一般的に見られる B75 抗原をコードするアリール (B\*1511) とは異なる泳動パターンを示した。そのため、このアリールについて塩基配列の解析を行ったところ、B\*1501 と比較し  $\alpha 1$  ドメイン 64 番目のアミノ酸に置換を起こす新たなアリールであった。その後の検討では、B\*1528 にコードされる抗原は、一部の B62 単一特異性の抗血清には反応を示さないものの、B75V+B46 の抗血清には反応を示すことが分かり、タイピングに使用する血清によっては、B62 と B75V が同時に検出される場合もある。

B\*1538 は韓国人で見出されたアリールで、血清学的なタイピングにおいて B62 抗血清以外に B52 抗血清にも反応を示したことから、塩基配列の解析により見出されたアリールである。B\*1501 と B\*1538 でコードされ

Figure 1. Amino Acid Sequences (B15 CRG group)

Con.	SYVAQAMERETQIVTNTDESNI	RGTLRYVYDYR	TVLEWY	Group	Type
B*1501	--M--A--S--Y--	--H--SS--EW--			B62
B*1528	--M--A--I--S--Y--	--H--SS--EW--			B1528
B*1504	--M--A--S--Y--	WT--H--SS--EW--			B62V
B*1505	--M--A--S--Y--	--H--SS--EW--			
B*1507	--M--A--S--Y--	--S--H--SS--EW--			
B*1530	--M--A--S--Y--	--HN--S--EW--			
B*1532	--M--A--S--Y--	--S--H--SS--EW--			
B*1535	--M--A--S--Y--	--T--H--SS--EW--			
B*1525	--M--A--S--Y--	II--SS--E		B62&76	B1525
B*1538	--M--A--S--Y--	--H--SS--EW--	H		B1538
B*1506	--M--A--S--Y--	--F--SS--E--			B62V?
B*1520	--M--A--S--Y--	II--IH--SS--			
B*1527	--M--A--S--Y--	--F--H--SS--EW--			
B*1533	--M--A--S--Y--	--H--S--KEW--			
B*1534	--M--A--S--Y--	--IH--SS--EW--			
B*1512	--M--A--S--Y--	--H--SS--EWDG			
B*1514	--M--A--S--Y--	--H--SS--EW--S			B76
B*1519	--M--A--S--Y--	--H--SS--EWDG			B75
B*1502	--M--A--N--S--Y--	II--SS--E			
B*1521	--M--A--N--C--Y--	II--SS--E			
B*1515	--M--A--N--S--Y--	--H--SS--EW--		B75&77	
B*1508	--M--A--N--F--Y--	--H--SS--EW--			
B*1511	--M--A--N--Y--Y--	--H--SS--EW--			
B*1513	--M--A--N--S--Y--NIALR	II--SS--E			B77
B*1522	--M--T--N--F--Y--	--H--SS--EW--		B35?	1522
B*1503	MS--E--N--C--Y--	--H--SS--E--			B72
B*1509	MS--E--N--C--Y--	--HN--S--E--			B70
B*1510	MS--E--N--C--Y--	--H--S--E--			
B*1518	MS--E--N--C--Y--	--H--SS--E--			
B*1529	MS--E--N--F--Y--	--H--SS--E--			
B*1537	MS--E--N--C--Y--	--H--S--E--H			
B*1523	MS--E--N--C--Y--NIALR	--H--SS--E--			
B*1516	F--M--A--RNMASAY--NIALR	W--IH--SS--E--		B63	B63
B*1517	--M--A--RNMASAY--NIALR	--HDS--E--			
B*5701	--M--AG--RNMASAY--NIALR	IV--H--SS--			B57
B*5801	--M--TG--RNMASAY--NIALR	II--IH--SS--			B58
B*3501	--M--TN--F--Y--	II--IH--SS--			B35
B*4601	--M--A--KYRQA--V--	--H--SS--EW--			B46
B*4901	--HMTLTK--S--Y--NIALR	W--I--NIS--E--			B49
B*5001	--HMTLTK--S--Y--	W--I--NIS--E--			B50
B*5101	--M--TN--F--Y--NIALR	WT--HN--S--E--H			B51
B*5102	--M--TN--F--Y--NIALR	WT--HN--S--E--			B5102
B*5103	--M--TN--F--Y--NIALR	WT--HN--S--E--GH			B5103
B*5104	--M--TN--F--Y--NIALR	II--HN--S--E--H			B5104
B*5106	--M--TN--F--Y--NIALR	--HN--S--E--H			B5106
B*5201	--M--T--S--Y--NIALR	WT--HN--S--E--H			B52
B*5301	--M--TN--F--Y--NIALR	II--IH--SS--			B53
B*5601	--M--E--N--YAQA--	WT--IHNI--S--			B56
B*5603	--M--E--N--YAQA--	--H--SS--EW--			B5603
B*5604	--M--E--N--YAQA--	--HNIS--			B5604
B*7801	--M--TN--F--Y--	WT--HN--S--E--H			B78

る抗原を比較すると、 $\alpha 2$  ドメインの 171 番目にアミノ酸置換 (Tyr $\rightarrow$ His) が見られる。我々は、通常のタイピングにおいて B75 とタイプされた検体について、血清学的な確認検査を行ったところ B75+B77+B1525 の抗血清には反応を示さなかったことから、B75 の変異型を疑った。そこで、直接塩基配列決定法によるタイピング結果を行ったところ、この抗原は B\*1538 でコードされていることが判明した。我々の血清学的なタイピングでは、B52 抗血清には反応を示さなかったが、B62+B62V+B76 血清にも反応を示さないことから、B62 と判定することは困難であり、B75 とタイプしてしまう可能性が高い。また、前記したように B62 関連抗原は、 $\alpha 1$  ドメインに共通のアミノ酸配列を有しており B62+B62V+B76 および B62+B62V 等の血清は、この共通のアミノ酸配列だけを認識する血清と推測していた。しかし、B\*1538 がこれらの血清に反応を示さないことから、 $\alpha 2$  ドメインのアミノ酸配列、特に 171 番目のアミノ酸置換がこれらの抗血清の反応性に大きく影響することが分かった。

## 2. B63 抗原 (図 2 参照)

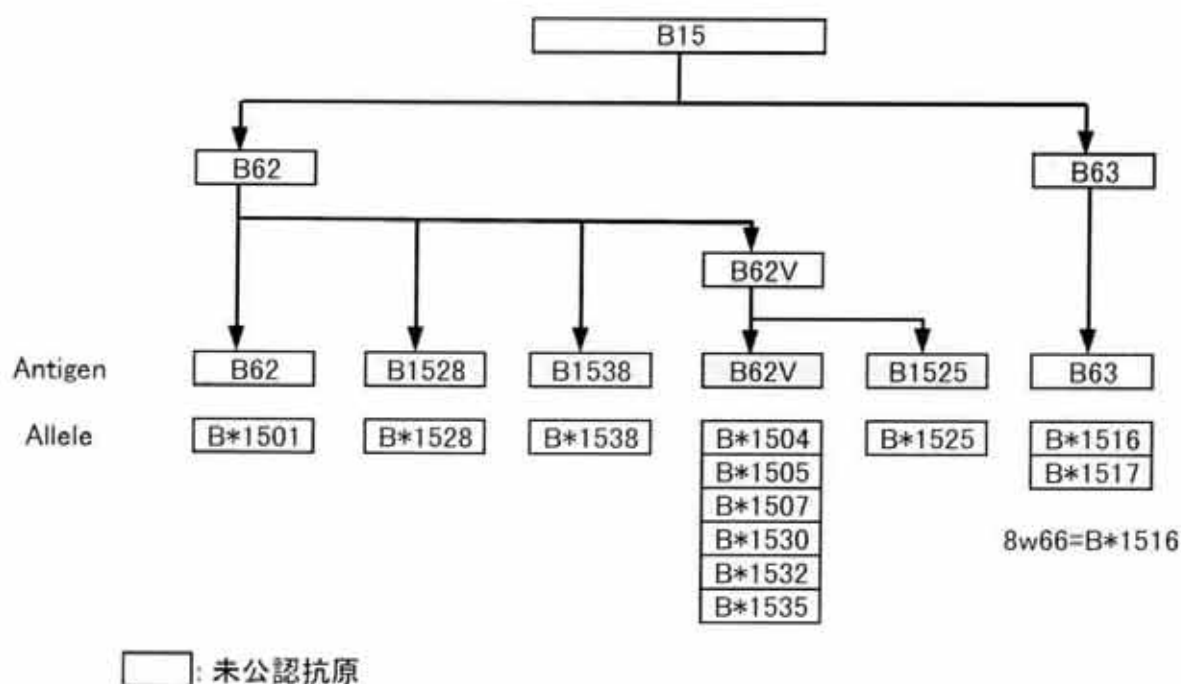
B63 抗原は B62 と比較して短い反応パターンを示し、Bw4 に相関する抗原である。Bw4 に相関することから、B57 および B5 関連抗血清に交差反応を示す抗原で

もある。B63 をコードするアレルは 2 例 (B\*1516、B\*1517) が報告されているが、これまでの検討ではそれぞれのアレルにコードされる抗原は血清学的に区分されていない。黒人で見られる B63 (B\*1516) 抗原は 8W66 として B51、B53 および B49 の抗血清に交差反応を示す抗原であるとされている。

## 3. B75 (図 3 参照)

B75 抗原は、日本人において白木らによって提唱された TS-1 と、東南アジアに見られた SH-7、B15shortTHAI が、ほぼ同様の反応パターンを示すことから第 10 回国際組織適合性ワークショップ後に公認抗原となった。両者とも、B62 抗原の反応パターンと比べ短い (反応する抗血清数が少ないこと) 反応を示す抗原で、ほぼ同様の反応パターンを示す抗原である。その後、中島 (神奈川県赤十字血液センター) らは、日本人に一般的な B75 抗原とは異なる B75 抗原を見出し B15N と呼んでいた。これら 2 種類の B75 について塩基配列の解析を行ったところ、前者が B\*1511 に、後者が B\*1502 にコードされる抗原であることが判明した。しかし、最初に塩基配列が決定された B75 抗原は、日本人において一般的ではない方の抗原であったことから、国際的に B75 抗原は B\*1502 にコードされていることになっており、日本人の B75 (B\*1511) は文献上では B75V と表現してい

図 2. Antigens in B15 CREG(1)



る。B75 と B75V 抗原は、B62 に関する内容でも紹介したように B75+B77+B1525 の抗血清に B75 は反応するが、B75V は反応しない。また、B46+B75 血清は B75V 抗原に反応を示すが、B75 には反応を示さない。B75+B77+B1525 血清に反応する抗原のアミノ酸配列を比較した場合、 $\alpha 2$  ドメインにおいて共通のアミノ酸配列が見られ、この部分が B75+B77+B1525 血清の反応性に影響を及ぼすと思われる。また、B46+B75V 血清に反応する抗原の共通のアミノ酸配列は、46 番目のアラニン (A) および 67 番目のタイロシン (Y) である。しかし、B46+B75V 血清は、B\*1508 または B\*1528 でコードされる抗原にも反応することから、他のアミノ酸も反応に影響する可能性が高い。

#### 4、B70 (B71, B72)、B76、B77 (図3 参照)

B15 関連抗原のひとつとして、黒人由来の SV 抗原と Oriental または Caucasoid に見られる BU 抗原が見出されて、共に似た反応パターンを示すことから B70 として公認された。しかし、反応性由来も若干異なることから B71 (BU) および B72 (SV) についても同時に公認抗原とされた。これまでの検討において、B72 抗原を

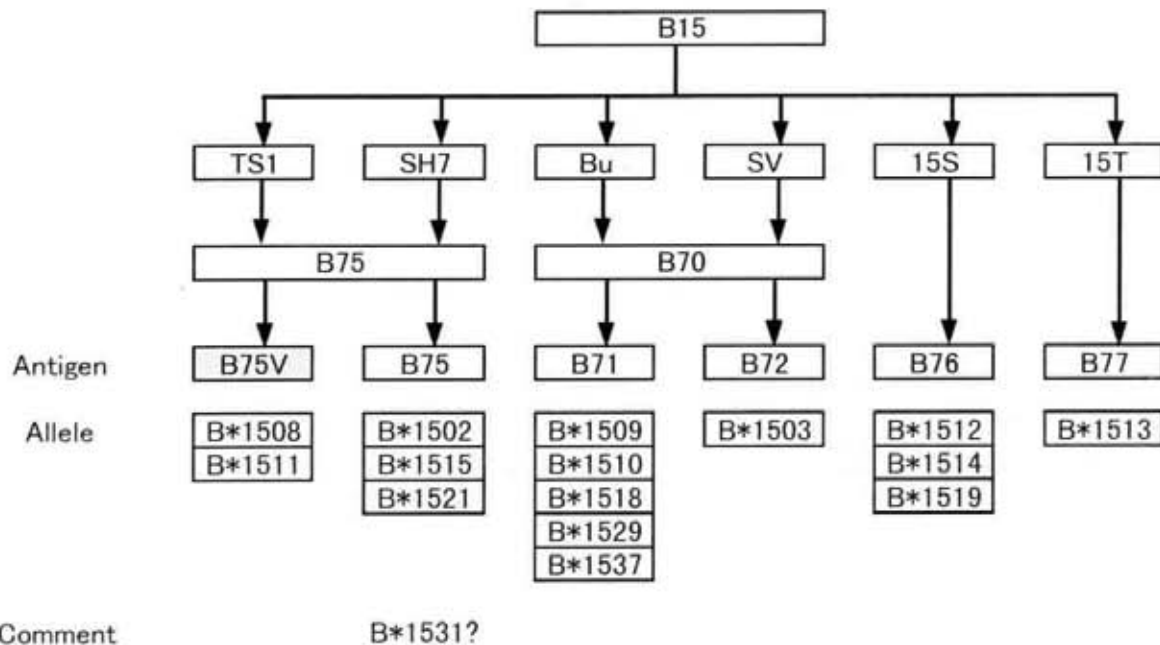
コードするアレルは B\*1503 だけであるが、B71 については、B\*1509、\*1510、\*1518、\*1529、\*1537 等アレルにコードされることが分かり、中でも B\*1529 については B\*1510 または B\*1518 でコードされる抗原とは、血清学的に異なる反応パターンを示す。日本人では、B\*1518 でコードされる B71 抗原が一般的な抗原である。

B76 抗原は、塩基配列の解析から B\*1501 でコードされる B62 抗原と比較して、 $\alpha 2$  ドメインにおいて 1~3 個のアミノ酸配列に違いが見られる抗原であり、これまでに 3 種類のアレルが報告されている (図 3 参照)。この抗原は、B62 とほぼ同様のアミノ酸配列を有していることから、B15 関連抗血清での反応性は、B62 と区分は出来ない場合が多い。しかし、B44+B45 血清に交差反応を示すことから、B62 とは明確に区分できる抗原である。

B77 抗原は Bw4 に相関する抗原で、B5+B35 または B5+B35+B15 関連の抗血清に反応を示し、B57+B58 の血清にも反応を示す場合もある。

★ このシリーズは今回をもって終了致します。  
田中先生ありがとうございました。(編集部)

図3、Antigens in B15 CREG(2)



□: 未公認抗原

## DNAの複製 -その2-

### DNA基礎講座

湧永製薬(株)創薬研究所バイオ診断研究室

川井 信太郎

前回、岡崎フラグメントやDNAポリメラーゼの働きで行われるDNAの複製について簡単に説明しました。今回と次回に渡り複製についてもう少し詳しく説明しようと思います。

前回説明したDNAポリメラーゼやDNAリガーゼだけでDNAの複製を行っているのではなく、DNAの複製には種々のタンパク質が関与しています。今回はそのタンパク質(知られていないものもあるのですが、すべてのタンパク質を説明することは出来ません)について説明します。

DNAの複製に主に関与していると思われるタンパク質を表-1に示します。これらのタンパク質についてその働きを説明します。前回リーディング鎖の複製には複製開始に働くプライマーがあれば良いと説明しました。DNAポリメラーゼが必要とするプライマーはプライマーゼ(primase)と呼ばれる酵素の働きで合成されます。この際、合成されるプライマーは、リボヌクレオチドからなるRNAプライマーです。このRNAプライマーをもとにしてDNAポリメラーゼがDNAを合成していくわけですが、ここで大きな障害にぶつかることになりま

す。それは何かと言いますと、DNAポリメラーゼがDNAを合成していく場合、デオキシリボヌクレオチド三リン酸が鋳型鎖と塩基対を形成するには複製フォーク(前回説明しました)より先に強固に対合したDNAの二本鎖がほどかれなければなりません。皆さんもご存知のようにDNAの二本鎖は、ある特定の条件(沸騰浴中やアルカリ溶液中)でなければほどくことができないほど非常に安定です。細胞の中でこのような状態になることはまずあり得ません。しかし、先程書きましたように大部分のDNAポリメラーゼの複製の際には鋳型鎖が予め一本鎖になっておく必要があるわけです。非常に安定な二本鎖を一本鎖にするために、生物には二本鎖の解離を行うタンパク質が存在します。その働きをしているのがDNAヘリカーゼ(DNA helicase)と一本鎖結合タンパク質(SSB:single strand binding protein)という2種類のタンパク質です。それらタンパク質がどのように働いているかを模式的に書いたのが図-1です。DNAヘリカーゼは、DNAの一本鎖に結合して二本鎖をこじ開けながらDNAに沿って移動します。DNAヘリカーゼによってこじ開けられた二本鎖は、このままだと元の二本鎖に戻ってしまいます。これを妨害するのがSSBです。SSB

表-1 DNA複製に関与するタンパク質

タンパク質	機能
DNAポリメラーゼ	DNA鎖を伸長する
DNAヘリカーゼ	二本鎖をほどく
DNAトポイソメラーゼ	DNA鎖をリラックスする
Single strand binding protein	一本鎖に結合する
Origin binding protein	複製起点に結合する
プライマーゼ	プライマーを合成する
リガーゼ	DNA鎖を連結する



は、その働きから、らせん不安定化タンパク質 (helix destabilizing protein) とも呼ばれます。SSB は、DNA のほどこけた鎖にどんどん結合しますが塩基部分は覆われないので、その DNA 鎖は鋳型としての機能は持っています。この SSB タンパク質は DNA を直接解離する機能は持っていませんが、ほどこけた一本鎖に結合することでその一本鎖構造を安定化させることにより DNA ヘリカーゼの働きを助けているわけです。さらにこのタンパク質は一本鎖 DNA に結合することによりラギング鎖の鋳型部分で形成されると思われる短いヘアピン構造の形成を妨げる働きもしています。ヘアピン構造があるとその場所で DNA ポリメラーゼによる DNA の伸長速度が極端に遅くなるので、結合することにより DNA ポリメラーゼによる DNA の合成反応をスムーズに進ませています。

さて、今まで説明したタンパク質は、あたかも独立して作用しているように書いていますが実際にはこれらタンパク質の大部分は、巨大な複合酵素系を作っています。そのタンパク質複合体が、ヌクレオシド三リン酸の加水分解をエネルギーとして DNA に沿って動いています。プライマーゼは DNA ヘリカーゼと直接結合して、ラギング鎖上にプライモソーム (primosome) と呼ばれる複合体を作っています。これが DNA ヘリカーゼの力を借りて複製フォークとともに動いて RNA プライマーを合成します。同じ様にラギング鎖上で DNA を合成する DNA ポリメラーゼは、他のタンパク質と協調して動いて新しい岡崎フラグメントを次々と合成していきます。

この DNA の複製は DNA のランダムな場所から始まるのではなくある特定の配列 (約 300 塩基からなる) を持つ決まった場所、複製開始点から始まります。前回は説明しましたがこの複製開始点は、約 50-300kb 間隔で存在しています。

ヒトでは複製起点についてはまだ良く解明されていません。よく研究が進んでいる細菌やウイルスでは、フォークの形成は、まず何分子ものタンパク質が複製起点の特定の場所に結合して巨大なタンパク質-DNA 複合体を形成します。次に、この複合体は DNA ヘリカーゼを結合して隣り合った露出した一本鎖 DNA を持っていきます。そこに、DNA プライマーゼも結合してプライモソームを形成してこれが複製起点から移動して RNA プライマーゼを作り最初の DNA 鎖の合成が始まります。すると、残りのタンパク質が結合して2つの複製複合体が形成され起点から両方向に動き出します。この複合体は各フォークの下流の複製が終了するまで DNA 合成を続けます。

DNA の複製の際に必要な現在までに知られているタンパク質がもう一つあります。DNA を平面的に書いてしまうとほご状になってしまいますが、しかし実際には複製フォークで 10 塩基対が複製されるたびに二重らせんは、軸を中心として1回転回ります。したがって複製フォークが移動するためにはフォークより先の染色体がすばやく回転する必要があるわけです。この DNA 中の自由回転を行っているのがもう一つのタンパク質である DNA トポイソメラーゼ (DNA topoisomerase) と呼ばれる酵素です。DNA トポイソメラーゼは、その機能を発揮するために、まず自分自身を DNA のリン酸基に共有結合でつなぎます。DNA トポイソメラーゼには、何種類かの存在が知られています。まず、DNA トポイソメラーゼの中で DNA にニック (一本鎖の切断) を生じさせる働きを持っているものは、DNA トポイソメラーゼ I と呼ばれます。トポイソメラーゼが作用することにより、二本鎖の一方にニックが入るとその両側の DNA は、自由に回転できるので二本鎖 DNA にあるひずみが解消します。こうして DNA の短い部分が回転すれば複製が可能となるわけです。また、DNA の転写中のよじれも同様にして解消されます。DNA トポイソメラーゼ I は、DNA の超らせん構造 (スーパーコイル DNA と呼ばれる二重らせん DNA がさらにねじれたらせん構造のこと) を緩和するその機能からスウィベラーゼ (swivel は、緩和する、という意味) とも呼ばれます。

また、別の DNA トポイソメラーゼ (DNA トポイソメラーゼ II) は、DNA の両方の鎖に同時に共有結合し一時的に2本とも切断します。この酵素は、染色体の2組の二重らせんが交差した結合があると活性化されます。この交差部位に結合すると、トポイソメラーゼは、①一方の二重らせんを可逆的に切断する、②別の2重らせんのこの切れ目を通り抜けさせる、③切れ目をつなぎ DNA から解離します。この様にして DNA トポイソメラーゼ II は、からみあった2つの DNA 環を効率良く分離させることができます。この反応を使えば、複製中の生じる DNA のからみを解消することができます。DNA トポイソメラーゼ II は、DNA ジャイレース (DNA gyrase) とも呼ばれます。この酵素は、ATP 存在下では正の超らせん DNA を負の超らせん DNA に変換し、ATP 非存在下では逆に負の超らせん DNA を緩和します。

このようなタンパク質の相互作用により染色体は、効率良く複製されます。しかし、DNA が複製されるのは細胞周期の S 期ですが、複製開始が S 期のどの時期 (S 期の初期、中期、終わり) かは、複製開始点によって異なります。しかし、最終的にはいろいろな場所の複製開始

点に形成された複製バブル (replication bubble) は、融合します。DNA の複製に要する時間は、ヒトの培養細胞では複製の完了までに約8時間です。

今回は細胞周期と DNA 複製、複製とその際の修復について説明しようと思います。

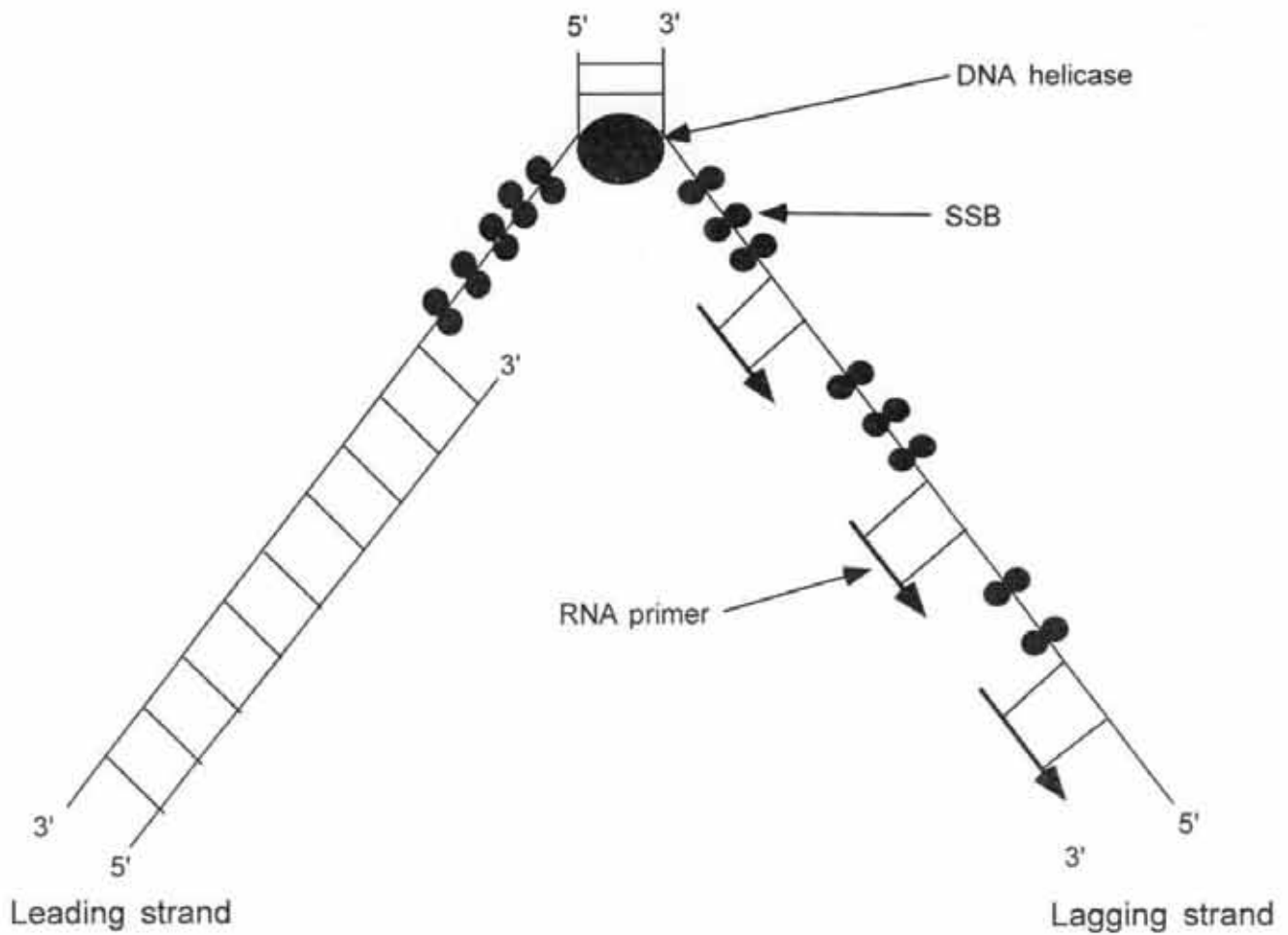


図-1 複製フォーク

# がんと HLA

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・分子病態分野

木村 彰方

「癌と HLA」についてまとめて書くようにと佐治編集長よりのご指名を受けましたが、とても全てを網羅することは出来ません。そこで、我々が研究している大腸癌を例に引きながら HLA と癌との関連を述べますが、独断と偏見がありますことをあらかじめお詫びします。(読者の皆様、佐治編集長ゴメンナサイ)

## 1. 癌は体細胞変異の集積物である

癌は世界中の多くの国における死因の最も多くを占める疾患である。医療が発展するにしたがってヒトの平均寿命が飛躍的に伸びているが、それだけに癌が生命への脅威として大きくのしかかって来る。

癌を極めて単純化して定義すると、「体細胞変異によって細胞が正常な増殖制御から逸脱し、そのため宿主の生命を脅かす存在となったもの」と言える。つまり、癌には①体細胞変異の生成、②細胞の異常増殖、③生命への危機の3つの側面があるが、これらは互いに密接に関わるものである。

自然界に存在する変異原物質や宇宙線などにより体細胞変異自体は常に我々の体内で生じていると考えられるが、その変異が細胞の異常増殖(増殖の亢進)をもたらすか、あるいは正常な増殖抑制からの逸脱に深く関わる場合に癌細胞が生じる。前者を来す体細胞変異としては、例えば K-ras などの癌遺伝子の変異であり、また後者を来す体細胞変異の例としてあげられるのが、癌抑制遺伝子(p53やAPCなど)の変異と apoptosis 関連遺伝子(Bcl-2やBAXなど)の変異である。機能遺伝学的な言い方をすれば、前者の多くは片側の染色体上の遺伝子に生じた gain of function 変異であり、後者の多くは両側の染色体上の遺伝子に共に生じた loss of function 変異である。一般的に、単一の癌関連遺伝子の変異では癌は生じず、癌では複数の癌関連遺伝子群に同時に変異を有している。

これらの種々の遺伝子に生じた変異と同時に、癌細胞が臨床的な癌として成立するまでに増殖するには、宿主の免疫監視機構からの逸脱が必要となる。つまり、常に

生じていると考えられる遺伝子変異を有する細胞の多くは、宿主の免疫監視機構によって排除される限り、癌として成立し得ないことになる。

## 2. 癌細胞に対する免疫監視機構

癌細胞では多くの遺伝子に変異が生じており、それが本来存在していなかった異常蛋白(非自己蛋白)を生成する場合には、癌細胞は非自己細胞として免疫系に認識・排除される。つまり、遺伝子変異→癌特異抗原→免疫排除の図式が成り立つことこそが、生体を癌から守る自然界の摂理である。

ここで癌特異的抗原の免疫認識を考えてみると、ひとつは液性免疫(抗体)による認識であり、もうひとつは細胞性免疫による認識である。癌における体細胞変異の観点から言えば、この免疫認識において主体をなすのは後者であると考えられる。すなわち、癌特異的抗原としての非自己蛋白が生じた場合には、その分解産物(ペプチド)はHLA分子に結合して細胞表面に輸送されるため、T細胞によって認識されることになる。

それでは、なぜ非自己である癌細胞は生体内で増殖を続けるのだろうか? ひとつにはHLAが非自己抗原ペプチドを提示していても、T細胞側がそれを効率よく認識出来ない、あるいは認識しても効率よく活性化されないことが考えられる。例えば、癌細胞側に接着因子の変異(構造異常)や発現異常がある場合などである。

一方、HLA側にとってみると、①抗原ペプチドを産生出来ない(TAPやLMPの変異など)場合、②癌特異的な非自己ペプチドを効率よく提示するHLAアリルを本来持っていない場合、③提示可能なHLAアリルを持っていたが、癌における体細胞変異でHLAが欠損した場合、④癌



昭和51年 真ん中の人はもしや…?

も尊敬する徳永栄一先生をはじめとするいろいろな人に出会いました。しばらくするうちにHLAをやるようになり、十字先生や徳永勝士先生と出会い、それが僕の人生を変えたと思いますね。僕が血液センターに入って初めてやった仕事では、血液バックの採用があります。これは昭和44年からやっていますね。その1年後には採用しています。バックキチガイと非難されました。その時も徳永栄一先生が僕をかばってくれました。「君がそう思うならやり給え」って。一部の人からは罵倒されたがね。でも僕は先を見る目がある方なんです。打率はいいですね。自慢じゃないけど。

僕がなぜHLAを始めたかという、法医学教室ではヒトの多型性を調べており、血液センターでは血液型をやっていたので、依頼されたものを検査するための抗血清は手に入りましたが、パネルが大阪センターにしかなく、検体を大阪に送らなければならないことになりました。でももともと僕のところで受けた検体なので大阪に送ることに抵抗を感じていまして、ちょうどその頃村上省三先生がHLA(当時白血球抗原と呼んでいた)をやっておられて、赤血球がダメなら、白血球でもやろうか、と単純に考えました。まだ白血球の研究をしていたのは数人しかいませんでしたから。ちょうど十字先生もHLAをやっていたらしいのですが、僕は何も知らなかったの、1から全部自分でやりました。ファルコンのトレーを買ってきて、高いものでしたから(当時でも1枚195円だった)、洗って使っていました。それから抗体スクリーニングもしました。そうしているうちに日赤で研究室ができました。そこに入ってまた1からやり始めました。いつ頃でしたっけねえ?昭和40年代ですわ。(実は1973年の事) 倒立顕微鏡もなくてねえ。6-7人の班でした。徳永和夫さんはそこにおりまして、その直前からのつき

あいになります。おもしろくてねえ、とりこになりました。その頃はまだ実務になっていなくて、研究で、勉強することばかりでした。病院に行って、胎盤を買ってきて、そこから血液をしぼりとして使いました。もちろん献血者からも行いました。胎盤からやった人はあまりいなかったでしょうね。ほとんどは分娩血が使われていたから。それで、日赤のHLAの基礎を築きました。研究班発足のメンバーは忘れちゃったね。ちょっとしてから第二世代と言われる人たちが入って来ました。とにかくおもしろかったです。やるのが全部新しく、血液センターの当時のメジャーなものは赤血球型、肝炎、血液の保存だったので、HLAなんかホントにマイナーだったんです。ところが徳永栄一先生と言う人は面白い人で、ずっとHLAを熱心にサポートされていましたよ。楽しいメンバーがいるからということで。その時の研究班のモットーは、自分達の仕事として血液事業に貢献したいということでした。ただ何もわからないでやって、でもその研究している内容を血液事業に生かしたい、どうしたら生かせるかを、徳永先生と考えました。結局役に立ちましたけどね。ただ僕は最後まで検査のクオリティにこだわりましたよ。1979年の第7回の日本HLAワークショップでクオリティNo.1になってますよ。その時にテラサキとの出会いがあったんです。一番始めは1977年でしたけどね。その時、Hidden Duplicateの相関係数が、僕は1だったのに対し、テラサキのところは0.99だったので、勝ったんですよ。それで一目置いて下さるようになったんです。その後、第3回アジアオセアニアHLA学会で、僕のところの丸屋さんが一番になったんですよ。第11回のインターナショナルワークショップで、また丸屋が一番になりました。一番は3人おりましたがね。精度を一番に考えてきたことが実際に評価され、それが一番嬉しかったですね。



昭和53年 初のプラズマフェーシス

「自分が研究者だと思ようになったのは、45 歳くらいからですかね。研究歴としては短いんですよ。」

その次の私のトピックスは、やはり中国問題でしょうか？僕が中国と関係を持ち始めたのは、結構古いんですよ。まず向こうの視察団を受け入れたのが 1979 年でして、中国紅十字の銭信忠会長が視察団を引き連れてやってきて、この先生は当時の厚生大臣で一人子政策の発案者だったんです。この方と意気投合しまして、その後も紅十字視察団は必ず京都へ寄るようになりました。で、今度は僕が向こうへ行くことになりましてね、その縁で若い研究者を引き連れていき、共同研究を開始しました。ひとつのテーマは、あちらの要望の中に HLA を組み込みました。中国に HLA を定着させるという、あちらの希望もあったので一生懸命やりました。で、今の思いは、残念ながら新しい分野であるがゆえに有能な人たちが一生懸命やろうと思ったのにもかかわらず、国が受け入れられる状態じゃなかったんですね。トレーひとつとっても、ディスプレイブルなんてとても採用できるような状態じゃなかったし、実務に応用したいと思ってもそれでもできる状況じゃなかったんです。経済的に豊かではなかったからですね。そうこうするうちに、僕らとお付き合いのあった HLA に関係する人たちはみんなアメリカへ行ってしまったんです。そしてアメリカから帰る人が少なかった。私たちが定着させた共同研究が中国で育たなかった、そんな思いがありますね。時期尚早だったんですね。でも中国で初めての HLA 学会が上海で開かれた時、僕と徳永勝土先生とレクチャーしています。いつだったか忘れましたがね。

それからしばらくは血小板の方へ浮気していました。血小板でも中国へ 3 回ほど行ってきます。昭和 61 年頃から十字先生が HLA 適合血小板の供給を始めましたね。ところがこれは血液センターとしての正式な HLA 適合血小板の提供なんですけど、実はもっと前からすでに我々は、患者周辺から HLA 適合血小板のドナーを探す仕事をやっていたんです。血液センターのドナーではなく、患者さんの周りの人たちからです。そのあとですね、僕が骨髓バンクの運動を始めたのは、NMDP が発足する前からその構想はありました、1986 年頃からです。その頃すでに患者を救う会の仕事をしていましたからね。1988 年にシンポジウムをやりましてね。1992 年に骨髓バンクが出来ました。骨髓バンク、臍帯血バンクにはこれからも関わっていきたいと思っています。

滋賀と京都の患者を救う会に一番深く関与しました。6 つあったんですけどね。で、骨髓バンクができたんだか

ら、もう患者を救う会なんてやめとけ、という声もありました。それは患者にとってとても負担になるからと。でも僕は違うと思ったんですね。なぜかというドナーリクルートのモチベーションは、原点はやっぱり患者さんなんだと。患者さんがプライバシーを捨てて、救う会を結成して、周りの人たちが協力して、そのパワーを骨髓バンクに利用しないとバンクは成り立っていかないと思うんです。ところがパブリックドナーを説く先生方がいらして、僕がやっているのはプライベートドナー、ある患者さんのためにというだけの人たちは骨髓バンクにはいらない、と言われたんですよ。それはカッコ良く聞こえますけど、でも今でも僕のやったことは正しかったと思っています。患者のイメージがどこの誰かわからないとそれはモチベーションにはなりません。自分の周りの人、それも人格を持った人であると判った時にモチベーションが上がると言うことは心理学的に証明されているんです。NMDP は初めからそれをやってまして、患者を救う会がドナーを集めて、それを NMDP に一気に登録するんです。今でもあるんですよ。日本はそれを拒否したから、だから今だに数が上がらないんです。もう一度患者さんは立ち上がらないとだめだ、と僕は今でも思っています。



平成 3 年  
若い！

「人の相談には親切に対応することをモットーにしているんです。」

現在はそういう社会的な運動をしたせいもあって、骨髓移植の臨床医の間で僕の名前が結構知れ渡って、それだけでなくボランティアを通じて患者さんの間でも知れ渡って、そういう人達が、5-6 年前から、時々相談してくるようになりました。Fax や手紙、E メールなどで相談があり、それに対してきっちりと答えてあげる、場合によっては 1 日かけて返事を書いたこともありました。

宣伝したことはありませんが、口コミで広がって、今では日本中から来るようになりました。ファンまでできてねえ。相談のほとんどが臨床の問題です。僕の周りは優秀な医者が多いですから、ほとんどの場合がセカンドオピニオンで片付く問題ですから、全部Eメールで彼らに振ります。もうひとつはHLAに関する相談が意外に多いですね。移植の適応になったが、兄弟でHLAが合わない、骨髄バンク登録したけど適合者がいない、どうしたらいいか、なんていうのが多いですね。夕べ来た相談は北海道の患者さんからなんですけど、母親とワンミスマッチなんです。HLA型、ハプロタイプがかなり珍しいケースだったんですけど、母親をドナーとして移植をした場合にこの適合性はどんなものか、っていうのでしたね。電話でHLAの型を聞いて、これならドナーになれるでしょう、だからあなたはお母さんから移植を受けられますから、バンクでドナー探するのは諦めなさい、探しても見つかりませんよと言いました。こういうのを言われてあげられる、相談を受けられる人を探してるんですけどね。だから僕は仕事を辞められない。こういう機能が骨髄バンクにあるといいんですけど、残念ながらスタッフが不足で無理なんです。私が3月で退職するので、去年くらいからその後継者を探してましたよ。何人か既に接触していますが、なかなか難しいですね。

今、日本の骨髄バンクもインターネットで検索できるようになりましたからね。自分で適合者を探せるんです。データベースの公開は重要ですよ、データは国民の財産ですからね。よく医療関係者の口から「公開すると患者が混乱するから」というようなことを聞きますが、実際混乱するのは医療従事者の方なんです。混乱

して実際に被害を被るのは医療従事者の方なんです。事実を患者さんに知らせてないから混乱するわけです。患者のプライバシーはもちろん守らないといけませんけどね。今、骨髄移植のデータも公開するよう要望しています。

**「それで私は退職後HLA研究所の立ち上げをすることになりました。HLA研究所のもうひとつの柱はコンサルテーションなんです。」**

それから、骨髄バンク、臍帯血バンクにおけるHLAが幸か不幸か日赤独占という形ができあがってしまって、それは日赤のキャパシティだけがドナーリクルートのキャパシティということになってしまふ。それがボランティアの間で批判されました。ボランティアだけでなく移植医やコーディネーターなどのプロ集団からも非難を受けかねない状況が生じてきました。そうこするうちに今度は厚生省がバンクをオープン化しようと言い出して、それにはアクセプトする受託できるラボが必要になるだろうということになった。ちょうどそこへ去年の4月にテラサキと会食して、彼が「日本を助けようか、自分はもう腎移植の世界で十分やってきたので、これからは造血幹細胞移植の方で貢献したい、特に日本で貢献したい。」と言われて、「それじゃ先生ラボを作りましょう」ということになりましていろいろな方面とコンタクトをとって、最終的には「アンタやりなさい」ということになりました。それが5月でしたかね。で、7月にこちらにレクチャーとして呼んだ時に綿密な相談をしました。

今、HLAのタイピングキットでは日赤価格が最低だと思えますが、それでも1ローカス当り4000円でそれもlow resolutionです。3ローカスだと12000円ですね。キットだけでその値段ですから、実際はその倍はかかっていると思うんです。24000円が最低価格じゃだめですよ。アメリカはあるラボが年間5万検体出すのなら、1件当り90ドルでやるって言うてるんですよ。骨髄移植推進財団へちゃんと書類が来てるんです。UCLAでも120ドルくらいだし、NMDPの目標が100ドルですからね。ヤバイんですよ、アメリカのコストの2倍以上ですからね。悪くすると日本のHLAのラボはアメリカに検体を取られて枯れるかもしれない。それから臍帯血は臍帯そのものを使ってタイピングしようと言っているんですがね、SOPってあるでしょ？あそこに検体は血液ってあるから、臍帯じゃだめだって言われたんですよ。検査のために5cc



第11回HLA国際ワークショップ

くらい使ってるでしょ。やっぱり、それはそのまま患者さんに入れてあげたいですよ。そのためにも骨髄バンクや臍帯血バンクをサポートするための HLA 研究所を作って、そこで骨髄バンクに貢献しながらマイナーの研究も続けて行きたい。終始一貫理屈は合ってるでしょ？

**「これからはマイナー抗原の研究を一生の仕事としてやりたいと思っています。」**

5 年前から、MHC は飽きたわけじゃないんですけど、研究者が非常に増えましたので。でも造血幹細胞に関わっている僕にとっては MHC だけではどうにもならない部分はどうしてもあったわけですね。HLA をびったり合わせても GVHD が起こったり、それがマイナー抗原の不適合であるということを知っていたわけです。それで出会ったのが 20 年来マイナーの研究をされている Dr. エル・グールミイ。いつでしたっけね、幕張の ISBT の時に食事に誘いました。今年の ASHI の時には彼女はローズベイン賞をもらいまして、その時のレクチャーが「Minor league to Major league」。だから現在はマイナーの探索にかけているわけですね。かといって HLA をやめたわけではなく、HLA の分子上に表現されているのがマイナーですから、やっぱり一生 HLA から逃れられないんですね。もう 5 年やってきましたから、これからますます磨きをかけたいと思っています。それをやるためには造血幹細胞移植という、あえて言えばヒトを使った実験なんですよ。そこから出てくるデータがすべてなんです。実験室の実験では絶対に出ないデータなんです。ヒトの反応が唯一のデータなんです。マイナー抗原をやるからには HLA の勉強をしなくてはならないし、骨髄移植から離れられない、造血幹細胞移植から離れられない。僕の将来ははっきり言って、HLA とマイナー抗原と造血幹細胞移植、ここから離れるに離れられない、生きる道だと思っています。

**「未来の HLA、それはオーダーメイドの医療のキーになります。」**

未来はもう、HLA がヒトの免疫の多様性の基本的な分子だという観点から言えば、医療だけでなく、ひとつのキーワードになるような、人間ひとりひとりの多様性に応じた医療、治療をしていこうと思うと、これはオーダ

ーメイドの医療と言われているんですけど、この発想は昔からあるんです。その最も基本的な分子になると思います。例えば、ある一定の年齢になったら、受診した人はみんな HLA を調べて、その人にだけ通じるような治療をするということです。だから将来の夢は、オーダーメイドの医療のキーワードになっていこう、最終的には予防検診ですべて HLA がタイプされていこう。それはもうひとつの構想である、ひとりひとりがデータベースを持った医療保証カードみたいなものを持って、その中にその人の身長とか体重とか生活習慣、身体的特徴、生化学データなどを包含している上に HLA 型も入力されているような時代。最終的には生まれた時の新生児検診の時に HLA を調べてしまう。それは昔は難しかったけど、今後は可能になると思う。しかもマイクロアレーを使えば、大量検体処理・コストダウンということが、でてくるであろう。僕はとりあえず世界の標準の数倍と言われている、日本のタイピングコストを下げるのが機運だと思っている。精度ばかり気にしてしまっているせいでしょね。精度も大事ですけどコストも大事です。精度を大事にしてきた私が言うのは変ですが、コストを下げようという努力をしてかないといけません。及ばずながらそれをしていこうと思っています。

(平成 12 年 1 月 17 日インタビュー)



相変わらず鋭い「佐治節」を聞かせて頂きました。お疲れ様でした、と言いたいところですが、まだまだこれからやって頂かなくてはならない事が沢山ありそうですね。これからもお元気で、「らしさ」をなくさないでいて頂きたいと思います。KAMON は続きますから…。

(KAMON 編集部)

## — 佐治さんとお付き合い —

福岡県北九州赤十字血液センター 徳永 和夫

佐治さんとの出会いは、私が血液センターに入って間も無い頃、多分東京に出張の帰りにふらーと京都センターを訪問したことから始まります。因みに1972(昭和47)年当時には、東京で1日会議があると福岡から東京までの往復寝台特急料金と日当が支給され、前後2日ずつの旅行日がありました。若さにまかせて夜行で移動して日中は結構のんびりと各地の血液センターを訪ねていました。

京都センターを訪ねると正面玄関の左側に研究(室)課があり、そこに佐治さん(当時研究課長)がいました。今は白髪が多い佐治さんですが、その当時は黒いふさふさの長髪(桃兎)でした。私が見ても変わった人でした。私もその頃は童顔でまだふっくらしていて、今ほど細く長くは無かったのですが、何故か馬が合い以後付き合いようになりました。

入社当初は減圧瓶採血(200ml)でしたが、佐治さんは既に血液バッグを採用していて、濃厚赤血球の製造に応用していました。ところが、血液バッグの製造認可か、血液バッグによる濃厚赤血球の製造認可かどちらか定かではありませんが、業務課からクレームがついたようですが、それをものともせず(今もそうでしょう。想像つくでしょう。)絶対自分が正しいと信じて行動したようです。

ここまで書いたところで思い出しましたが、有効期限の問題でした。当時は瓶製造で認可を取っていましたから、濃厚赤血球(当時は赤血球沈層でした!)と名前がつくと製造方法に関係無く有効期限は24時間でした。しかし、佐治さんは科学的に問題が無いとして全血と同じ21日の有効期限を採用していたのです。

濃厚赤血球を瓶で製造すると無菌性の問題で製造後24時間しか有効期限がありません。血小板もそうでした。特に血小板は内部をシリコン加工した空き瓶に多血小板血漿を移した後、瓶を強遠心すると空気導入用のガラスチューブがゴム栓から外れて壊れ、度々製品が不合格になりました。そんな訳で血液バッグの優位性は目に見え

ていたのですが、まだその当時は薬事法違反だったわけです。

会ってしばらくして京都で日赤(血液センター?)薬剤師会が有った時に、佐治さんからお前しゃべれと言われて与えられた課題が、「遠心の赤血球に与える影響」でした。つまり全血全盛時代から成分製剤へ移行する過程で遠心により赤血球に悪い影響が出るのではないかという基本的な疑問があったのです。私は人の前でしかも英文の論文を読んで報告するのは2回目(修士論文の時1回あり、大恥をかいた。)で、報告書がまとまらず前日に奈良の義理の姉の家に泊まり徹夜で原稿を作り、当日コピーして配布したことを覚えています。今もそうですが、佐治さんは色々気を配り人が育つように機会を与えてくれる人でした。

それ以来製剤業務、HLAの研究、業務標準、HLA適合血小板、骨髄バンクの設立、中国のHLA技術協力等々との27年間ほとんど一緒に仕事をさせてもらいました。また、会って数年後、佐治さんの計らいで当時の主だった血液センターの所長さん達の食事の席に同席の機会を与えられたことがあります。しかし、私は入所して2年目から数年組合の執行委員をやっていたので随分愚痴が多く、その場の雰囲気をおち壊し迷惑をかけたこともありました。

佐治さんは私と違って勉強好きで、勉強上手で、理解力があり、先へ先へと思考が回転している人だと思います。佐治さんの言動は常軌を逸している(としか我々常人には理解できない)ことが多かったのも、私と異なった見解を持つ人も多いようですが、私にとってはかけがえの無い良き友、良き先輩、良き師であります。

退職されても益々その見識に磨きをかけて仕事に励まれると思いますが、適当に身体も労わってこれからもご活躍ください。

最後になりましたが、血液センターでの長いお付き合いに心より感謝致します。

ではまた。

2000年1月2日 快晴のラオスにて



## —— 佐治博夫先生へ贈る言葉 ——

愛知県赤十字血液センター 倉知 透

## 1. 拾って頂いてありがとうございます

「医者がサジ投げたらヒロオの佐治博夫です。」

佐治さん(さん付けで呼ばせていただくことをお許し下さい)の自己紹介は決まってこのフレーズで、私が初めてお会いした時にもこうおっしゃったと記憶しています。私は佐治さんに負けず劣らず洒落が好きで、如何に佐治さんより洒落た話ができるかってことばかりを考えていた時期がありました。お会いしたときには自分の名前を洒落に出来るなんてなんてラッキーな人だと思いました。

佐治さんがご勇退ということでは何か書いてほしいと依頼を頂いてから、一昔いや二昔の事を思い出していると、まずはこの自己紹介のフレーズが浮かんできました。そして、そのうち「僕は佐治さんに拾ってもらって今日までこれたのではないかなあ」って思うようになりました。

なぜかと言いますと、血液センターでHLAの仕事をしていたので佐治さんとお会いできたのですが、昭和58年頃に実施された日中赤十字共同研究班のメンバーに推薦していただいたと聞いています。たまたまHLA共同研究員として予定されていた方が、痔で入院された(本当かどうかは定かでないが)ため佐治さんが私を推し、予定外のメンバーとして加わったらしいのです。また、その研究班にいたという経歴が日赤本社への配属の一因となったとも感じます。

中国での知見は、私の人生観を一変しましたし、日赤本社での3年間の経験も、私の財産となっています。極論かも知れませんが、これは全て佐治さんのおかげと思っています。佐治さんに拾っていただいてここまで来ることができました。ありがとうございます。ただ、私から被害を被っている方からは、「何であんなやつ拾ったんだ！」って非難があがるかも知れません。あしからず……。

## 2. 40の手習い、50の手習い……70の手習いはなんですか？

「わしは40になってから英語を始めたんだ、40の手習いだ。」

これも佐治さんの口癖だったと思います。20年前というと1970年代後半ということになりますが、そのころから英会話の勉強を始められたと聞いています。第7回日本HLAワークショップ(大阪)の頃でしょうか。

そのころの佐治さんは、お酒が入ると必ずこの言葉をおっしゃって、私たち若者に(当時は私も若かった)、これからは英会話が出来なくちゃだめだぞってアドバイスされていたのだと思います。しかし、当時の私は「そうか、英会話は40になってから始めればいいのか」って解釈していました(ハハハ、そのため今苦勞しています)。私の40の手習いはゴルフになってしまい、英会話はまだ手習いの対象になっていません。

第8回日本HLAワークショップの後、北海道血液センターで行われた日赤のワークショップでコンピュータ解析がなされた時に佐治さんはかなり感激されていました。その後自分でも操作する興味を持ち、先に述べた日中共同研究班の時にはもうハンドヘルドコンピュータを購入して中国へ持ち込んでいました。私は、その当時コンピュータを中国へ持ち込んでもいいのかなあって思ったり、上海センターで趙先生と討論をしている部屋に入ってくるなり、「白木君(旧姓)できたぞできたぞ相関係数の計算プログラムが！」なんてお構いなしだったので迷惑しました。佐治さんにとってコンピュータは50(いや45くらい)の手習いだったのでしょうか？

そして60前の手習いがインターネットでしょうか？とにかく新しいもの好きのご性格もあってか、佐治さんは常に勉強しようという姿勢がお会いするたびに感じられる人です。今後70の手習いは何でしょうか？80の手習いは何でしょうか？いつまでも新しい何かに挑戦して頂きたいと思います。私は佐治さんができるなら私もできるかなんて思っています。

## 3. これからも迷惑をかけますのでよろしくお願ひします。

私は、気配りの勧めなんて本に凝ったことがあります(福岡での日赤ワークショップの頃)。気遣いとか気配りとかはどのようなものか徳永和夫さんと議論したこと

がありました。そんなとき私は佐治さんに「お前の気配りは、努力しているんだけど相手には気配りになっていないときがある」って言われたことがあります。「そうですか」って答えながらも反論したそうにしている私を見て徳永さんが、「佐治さんが言うのはおかしいな」なんて言っていました（お酒の席での話です）。みなさんはどう思いますか？

ここでお話ししたいのは気配りの仕方ではなく、佐治さんと私の関係は、気配りしないでも良い間柄と私は思っているということです。さらにどんなに迷惑をかけてもかまわない人の一人ということです。私なりの表現の仕方でも不思議に思う方もいるかもしれませんが、こちらから迷惑をかけても良い人というのは、反対にその人からどんなに迷惑を被っても許せる人という意味で、佐治さんは私にとって気配りしないでいられる人なのです。このような人に出会えるなんてことは稀じゃないでしょうか。

HLA から離れて久しいですが、どこかでお会いしても気遣いせずにお話できる人、何をお話ししても構わない人、それが私にとっての佐治さんです。

ですからこれからもご迷惑をお掛けしますのでよろしくお付き合い下さい。

#### 4. 反省だけはしましょう

反省するだけならサルでもできるなんて言葉が流行った時期がありました。

佐治さんはお酒を飲むと良く物を忘れます。どれだけ丸屋さんがお世話をしているか皆さんはご存じでしょうか？

昔旭川で航空券の入った上着をなくしたとか、肩から下げる袋を飲み屋に置いたまま帰ろうしたり、上海から北京へ移動したらスーツケースは成田に着いたとか（アッこれは航空会社が悪かったですね）数えたらキリがないほど佐治さんは物忘れをします。

私もいつの頃からか、飲み会で佐治さんと一緒の時は帰りがけに佐治さんの荷物をチェックするようになってしまいました。

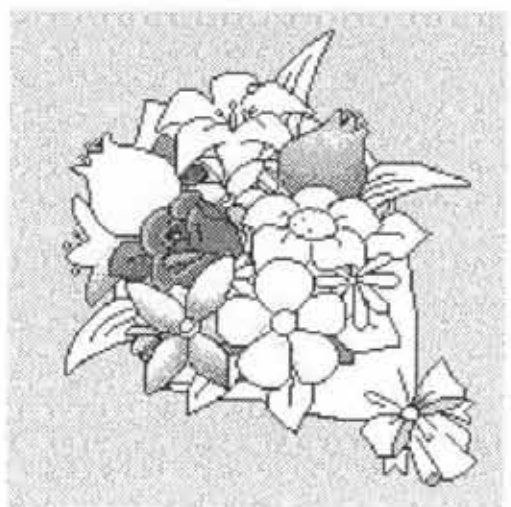
ただそうになってしまうのも、佐治さんは話中に夢中になってしまうからですね。血液事業を語る時も、昔話をする時も、Y談をする時も常に夢中ですね。だから忘れちゃうんですね。仕方がありませんね。でも反省だけはしましょう。

などと言っている私が本当は反省しなければならない立場ですね。大先輩に対して失礼な事を長々と書きまして申し訳ありません。反省だけはします。

取り留めのない文章になってしまいましたが、最後だけはまじめに締めたいと思います。先生の人生の一岐路にあたりましてこれまで先生からお受けしました恩情に感謝するとともに、これからも我々若い者に温情をかけるに必要な健康を保って頂きたいという気持ちを籠めまして次の言葉を送ります。

「ありがとうございました。そしてまた今度お願いしまーす。」

また反省しなくては・・・・・・・・



# 第17回近畿HLA研究会

日本赤十字社中央血液センター  
柏瀬 貢一

第17回近畿HLA研究会は奈良県立医大 法医学教室の石谷 昭子先生を世話人として2000年2月5日(土)の午後、奈良県新公会堂において開催された。一般演題が13題、HLA class I DNA typing についてのワークショップ、さらの特別講演2題と半日では足りないほど盛りだくさんの研究会であった。中学生の時修学旅行で訪れた思い出で深い奈良で(二十数年ぶり?)、ノスタルジーを感じつつ(本当は車中で飲んだビールのせい?)参加した研究会の報告をする。なお紙面の都合から概略にとどまる事を了承願いたい。

## 一般演題

一般演題は13題で、演題を大まかに分類すると non classical class I である HLA-E, -F, -G の発現について、マイナー抗原と骨髄移植の関係、HLA 検査測定法、疾患とHLAとの相関、癌とHLA、HLAの進化などであったが、その中で木村先生の特別講演と関連した演題について話をする。

肝細胞癌免疫回避機構とMHC class-I と題して奈良県立医大の第一外科 長尾 美津男 先生から報告があった。

宿主の免疫反応が起こっている慢性肝病変を発生母体としている肝細胞癌は、宿主の免疫反応から逃れることが、その発生や進展と関連することが推測される。これらの癌抗原が Class I 抗原と共に提示されなければ腫瘍免疫は誘導されない。そこで、肝細胞癌において class-I 抗原の発現を解析し、免疫回避機構が起こりうるのか検討を行なった。その結果、非癌部肝組織では全例(44例) class-I 抗原の発現が認められ、肝細胞癌では陽性細胞および発現強度とも様々であり、ほとんどの症例では50%以上の癌細胞が class-I 抗原を発現していた。また、class-I 陽性癌細胞が、50%未満のものを陰性とする44例中9例が陰性であった。陰性例、陽性例を比べた場合、陰性例は腫瘍径が有意に大きく、さらにAFP(αフェトプロテイン)が高く、門脈浸潤、肝内転移共

に高率であった。このことから肝細胞癌において class-I 抗原の発現の減弱は、免疫回避機構と関連し、肝細胞癌の進展に重要であることが示唆された。

TCR によって認識される HLA は抗原ペプチドを提示し、自己/非自己の認識に重要なマーカー分子であるが、本来非自己である癌細胞が排除されず生体内で増殖を続ける機構と class-I 抗原の発現の減弱との関連は興味深いものである。



## ワークショップ

「HLA class I DNA typing」について国立循環器病センターの佐田 正晴先生を座長として以下の報告がなされた。

1. SSP法によるHLAクラスI DNA タイピング  
東京医科歯科大学 木村 彰方 先生
2. Line Probe Assay 法によるHLAクラスI DNA タイピング  
日赤中央センター 柏瀬 貢一
3. PCR-MPH 法によるHLAクラスI DNA タイピング  
湧永製薬 川井 信一郎 先生
4. ダイナルRELI SSO HLA-A, Bキットの使用経験

福岡大学病院 小河原 先生

## 5. 自家製 HLA クラス I DNA タイピングキット (PCR-SSP 法) の臨床応用

兵庫県赤十字血液センター 秋田 真哉 先生

昨年行なわれた組織適合性学会総会のランチョンセミナーと重複する内容であったが、それぞれの方法の特徴をつかんで正しくタイピングする工夫が各演者から報告された。特に兵庫県赤十字血液センターの秋田先生の報告は自家製のタイピングキットであるためバリデーション、QC をどのように行なって行くのか注目したいところである。



### 特別講演

特別講演は2題で Fred Hutchinson Cancer Research Center の Dr. Daniel Geraghty と東京医科歯科大学 木村 彰方 先生からの特別講演が行なわれた。

Dr. Geraghty の講演は「NK レセプターのリガンドとしての HLA class Ib 分子」と題して行なわれた。骨髄移植の研究班により HLA-C 抗原の一致は、GVHD (移植片対宿主病) を指標とした場合は予後に良好な結果をもたらすが、生存を指標とした場合は予後にほとんど影響を与えないことが判っている。NK レセプターの一部が HLA-C 抗原を識別していることと関連し興味もたれる所だが、Dr. Geraghty の講演が English (もちろん!) で行なわれたため筆者が活字に残せるような理解が十分得られているか不安なので、紙面の都合とすることで割愛させていただく。

木村先生の講演は「癌と自己免疫と HLA・今後の HLA 研究は？」と題して行なわれた。遺伝性大腸癌の原因はミスマッチ修復酵素 (MRE) の欠損とされている。MRE

欠損癌における体細胞変異の解析を行なった結果、HLA クラス I 領域の LOH; loss of heterozygosity (片側アレルの欠損) が多く、また  $\beta 2$  ミクログロブリン遺伝子の変異が観察された (両者が同時に起きていることはない)。HLA 分子を片側のみを欠損するか (NK 細胞により排除機構が働くため HLA 分子の全欠損はない)、全体的に抑制することにより、T 細胞によって非自己と認識されることを防いでいると考えられている。さらに、発現されている片方の HLA アレルに非自己抗原を提示させた免疫療法の可能性が示唆された。

また、自己免疫疾患と HLA との関係 Graves 病と高安病を例に講演された。例えば高安病では HLA-B52 と B39 (特に B39.2) との相関が認められているが、患者の臨床像を比較すると、B52 陽性高安病では胸部大動脈、B39 陽性高安病では腹部大動脈が主に侵されている傾向があり、同一の疾患であっても相関する HLA 毎に病因や病態が異なることが示唆された。疾患自体の不均一性や治療への反応性における個人差があることを念頭におき、過去に行なった疾患と HLA の解析をこのような知見から見直すことも必要ではないだろうか。このことこそ、オーダーメイド医療をキーワードとした今後の予防医学に HLA が貢献できるのかもしれない。

初めての近畿 HLA 研究会の参加であり、とても有意義なこの会に招待して下さった大阪腎臓バンク、ワークショップの座長 佐田先生、世話人の石谷先生に紙面をお借りし感謝申し上げます。



## コラム 「夢と目標」

東京医科歯科大学 難治疾患研究所

木村 彰方

最近「優駿」(宮本輝)を読んだ。10数年前に吉川英治文学賞を受賞した作品であるので読まれた方も多いかと思うが、一頭のサラブレッドの誕生から日本ダービーまでの3年間にその馬に関わった人間達の行動や想いを通して、〈いのち〉の輝きを描いた作品である。腎移植や遺伝に関係するエピソードも織り込まれているし、競争原理の世界の中での人間の生き様や夢が描き込まれているが、底辺に流れるのは、厳しい状況を踏まえた上での生命に対するやさしさであると思う。翻ってみれば、我々自身も、各々の置かれた現実の厳しさの中にありながらも、生命へのやさしさや「夢」を持ちつつ、その実現に向けての「目標」設定とそれが達成出来ているかどうかの自己検証が必要であろう。日常の忙しさにまかされて、つい忘れそうになる「夢」と「目標」を、この小説は改めて私に思い出させてくれた。

KAMONの読者のほとんどは医療・医学のフィールドにいますので、生命の厳しさ(特に人の生と死)に直接的・間接的に触れる局面が多いと思う。もちろん生物学的な意味での生命の厳しさや、社会的な意味での生きる厳しさもあるが、こと医療・医学に関しては、それが人間の生死に関わるだけに、〈いのち〉の輝きを実感することが出来るのではないだろうか?つまり、人知を尽くしても生命を永らえることが出来ない局面に遭遇し、人の生命のはかなさと人知の無力さを知ることが出来るからこそ、我々は生命の尊厳や生きることの素晴らしさをより強く実感出来るのではないかと思う。

私自身もともと内科医を志した者であるが、当時の学部教育における医学では「患者さん」ではなく「病氣」を学んだと思う。私自身の感性の乏しさのなせる技であると自戒するが、そこには「人間の生命」が欠けていた。研修医として患者さんの主治医になり、実際にその死に直面したときに、私は初めて「人間の生命」を知り、それと同時に自分自身ひいては医学の無力さを思い知ったのである。

そのことこそが私が現在基礎医学の世界にいるそもそもの由縁であるが、大学院の志望動機は「なぜ、この患者さんが死に至る病氣にならなければならなかったのか?」を解明したいという事であった。当時は稚拙な表現しかできなかったが、入試の際、面接官に「病氣になることや治療の効果は患者さん毎に違うが、現代医療では治らない病氣が多くあるので、その原因を遺伝的に解明したい」と説明したことを覚えている。今になって思えば、それは「病氣の原因を解明することが、本質的な治療に結びつく」との考えであった。また、病氣になること自体は遺伝的(ある意味で運命論的)に決められていることを感じとっていたように思う。

それから既に20年以上の研究の日々が過ぎたが、「遺伝的な側面から見れば病氣になることは既に決められている(必要条件である)としても、たとえ遺伝病であっても、実際に発症するかしないかは遺伝的要因のみでは決められていない(十分条件ではない)のではないか?」と思っている。つまり、「ハイリスクグループであっても発症する人と発症しない人が存在し、逆にローリスクグループであっても発症する人がいるのは何故であろうか?」との疑問である。

ヒトゲノムの配列が完全に決定されるのも目前のこととなった。また、これからはゲノムの多様性(個体差)を解明する研究プロジェクトに一層の力が注がれる。医療・医学におけるこのようなゲノム研究の究極の目的は、「オーダーメイド医療」の確立はもちろんのこと、それからさらに進めて「病氣の予防」や「健康の維持」を目指すことにある。「そう。それが夢だったんだ」と最近改めて気がついた。その夢を実現するために、達成目標を設定しその方策を練っている。何年掛かるかはわからないが、私自身の夢を叶えるために、そして私に生命の厳しさを身をもって教えてくれた患者さん達の〈いのち〉に報いるために。