

(October 10-14, 2000, Lake Buena Vista, Florida)

東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学教室 土屋 尚之

ASHI report のご依頼をいただきました。もともとリウマチ医である筆者は、毎年秋には American College of Rheumatology (ACR) に演題を通して参加するのを一つの目標でもあり、楽しみともしてきたので、HLA やそれ以外の免疫系遺伝子の多型とリウマチ・膠原病の関連をこの数年の主な研究テーマとしながらも、ASHI に参加するのは今年が初めてです。そもそも、なぜ今年は ACR ではなく、ASHI に参加する事になったかという、大きく分けて、以下の4つの理由が存在します。

1. ACR と日本人類遺伝学会の日程が重なったため、ACR に参加することが不可能であった
2. 研究の対象が必ずしもリウマチ性疾患のみではなかったため、すべての演題を出す学会としては ASHI のほうがより適切であった
3. 樹状細胞や NK 細胞など、現在および今後の研究テーマとして重要な分野に関するシンポジウムなど魅力的なプログラムが組まれていた
4. その他

これらのうち、1～3は自明と思われるのですが、4につ

いては若干の背景説明が必要です。学会の開催地はタイトルに示しましたように Lake Buena Vista (LBV) であるわけですが、これは Orlando 近郊の町で、要するに、Walt Disney World (WDW) の場所、というよりは、WDW はそれのみで山手線よりも大きな面積を占めているので、LBV は WDW そのものと言えます。実際、今回の会場である Hilton (写真1) は、WDW 直営ホテルでこそありませんが、WDW の一角を占める WDW Resort という領域に位置し、楽しいお店が集まった Downtown Disney まで歩いて行かれるところです。筆者は University of Florida に留学していたことがあり、これは WDW まで2時間少しのドライブですので、当時から頻りに WDW を訪れていました。帰国後も学会、留学先研究室でのボス主催のシンポジウム、純粋な休暇、と言うそれぞれの理由で、3回ほど家族を連れて訪れており、おそらく総滞在日数としては、30日を下回らないと思われます。筆者自身が研究を始めて2年目に、研究室の先輩たちに(演題も出さないのに) Toronto で開かれた国際免疫学会に連れて行っていただき、国際学会



写真1. 会場となった Hilton in the Walt Disney World Resort の中庭にあるプール。休憩時にはプールサイドでくつろぐ参加者の姿がめだちました。

の楽しさを感じたことが、翌年すぐ留学を決意できた一つのきっかけになったと思うので、現在、一緒に研究してくれている若い研究者たちにもその楽しさを味わってもらいたい、そのための場所としては、これ以上の場所はないのではないか、と考えたのが、今回 ASHI にみんなで演題を出した一つの理由です。ただ、内因性の motivation に従って WDW についてこれ以上記述すると、もはや ASHI report ではなく WDW report になってしまいますので、本題に戻ることになります。

ともあれ、そのような成り行きで4つの演題を4名の学生たちが出し、出かけることになりました。全員が、海外での学会発表は初めてです。しっかりバック旅行で格安チケットを確保して一足先に WDW に乗り込んだたかな学生たちとの generation gap を再認識しつつ、家族ぬきの一人の WDW も悪くないなと（これは実際単なる強がりではなく、また別の楽しみ方ができましたが、詳細は割愛します）つぶやきつつ会場に現れてみると、なぜか plenary session で、space shuttle の話を、宇宙飛行士(Storey Musgrave, MD) が話しています。それもそのはずで、space shuttle が飛び立つ Kennedy Space Center はここから1時間前後の drive のところにあります。Space shuttle から撮影した美しい写真と、Brian Eno の音楽に酔いつつも、これはいったいどういう学会なのだろうか？と考えていると、休憩時間に学生たちが現れ、感心にももうポスターを貼ったとのことで、一安心(写真2)。この時点で、この学会は筆者が行き慣れた参加者数千人~1万人、演題数2000前後、というマンモス学会とは異なり、おそらく数百名の参加者で、会場にいさえすれば誰とでもすぐ会うことができる学会であることが実感されました。ちなみに、ポスターは全部で約200題強、初日から最終日まで貼りっぱなしですが、偶数番と奇数番に分かれ、それぞれ初日、二日目の夜に説明のためにポスター会場に立っていること、ということになっていました。

ユニークな plenary lecture はそれ一つで、あのシンポジウムは臨床免疫遺伝の最新の話が続きました。初日午前は樹状細胞(dendritic cell, DC)の session で、Ralph Steinman, Jacques Banchereau らにより DC の subset による機能の違いに続き、ヒトのメラノーマにおける臨床試験の成績が示されました。すなわち、患者の末梢血から分化させた DC にメラノーマの腫瘍抗原ペプチドを pulse し、患者に戻す、という方法ですが、これが現段階で有望な成績が得られているとのことです。

また、Michael Dustin は、動画を採り入れた美しい computer presentation により、新しい解析系を使った immunological synapse 形成過程の画像を示してくれました。

12時30分から14時まで、という長い昼休みには、学生たちと Downtown Disney に lunch に出かけ、Mac (computer ではないほう。WDW の Mac はふつうの Mac と違って、楽しい内装)で'quarter pounder'と'regular coke'の大きさにはしゃぎつつ過ごし、学会場に戻ると、今度は一般演題口演の session です。この日は HLA 関連演題で、基礎編、臨床編と分かれており、それぞれを聞く者、ポスターを見に行く者、と分かれて過ごしましたが、基礎編の部屋が狭すぎ、一度臨床編を聞きに出してしまうと再入場ができなかったのが困りました。あまり先を越されたような演題もなく、休憩時間に入り、次の「拒絶のメカニズム」という魅惑的なタイトルを持つシンポジウムを聞こうか、と思っていると、どうも学生たちの様子が変わります。

事情を聞いてみると、ポスターを見に行っていた K が、「S の poster にこんな紙が貼ってあったよ」と言いつつ持ってきた紙に、「このポスターの演者は、poster presentation の時間に座長が回ってきたら3分間の発表を行うこと」と書かれていた、ということです。発表時間までには2時間しかありません。唯一の男子学生である S は、もちろん英語の口頭発表の経験はなく、「このくらいのことがないと来た意味がない」などど言っているものの、その表情は硬く、リラックスしてフロリダを楽しんでいた1時間前の面影はありません。30分で読み上げ原稿を書き、2~3回試し読みした上で、アク



写真2. 自分のポスターの前で。右から、川崎綾、志田裕子、黒木喜美子。

セントにだけ気をつけるように言って時間を待ちました。その間、女子学生たちは、ひよっとして翌日の poster session で自分が同じ立場にならないだろうか、という一抹の不安を心に抱きつつも、とりあえずは今日を楽しもう、という正しい態度をとり、refreshment break で供された ice cream を味わっているように見うけられました。

Poster session の時には、中枢神経系の抑制性シグナルを抑制して discussion をより有益なものとするための配慮か、wine, beer が serve されていました。座長から最初に「今日は初めての試みとして、15 演題前後を select して、短い presentation をしてもらおう。明日もこうやるかどうかはわからない。明日の座長にまかせる。」という announcement があり、poster discussion が始まりました。アメリカの学会場とは思われないくらい狭いポスター会場で（ポスター・ボードのスペースも、筆者が慣れ親しんだ学会で使う 1 枚のボードを 2 人で分けて使う、と言う感じ）（写真 2）、座長に 10 名くらいの audience がついて回るので、正直言ってかなり見づらく、聞きづらい poster presentation でした。S の順番はかなり後の方で、座長は血中アルコール濃度に相関して徐々に活性化し、私とは言えば、若干 wine で priming しつつ、poster を見に来た人と、「この銀杏のマークはわれわれの大学の logo です」「あの Mickey Mouse の



写真 3. Speech を終え、プールサイドでサンドウィッチを前に微笑む櫻井大祐。

sticker を貼ってある poster はあなたのもでしたか」などと熱のこもった discussion をしながら待っていました。

いよいよ S の番が来ました。座長とともに雲霞のように現れた聴衆のために、筆者は自分の position を見失い、会場を一回りして何とか S の背後に回り込みました。S の発表内容は、ASHI としては異色の演題と思われる、慢性関節リウマチ(RA)の関節滑膜に発現する遺伝子を differential display で検出した、と言うものでしたが、緊張しつつも堂々とした発表を終え、質疑となりました。座長から、「この研究結果は診断の役に立つものなのか？」という、ある意味では非常に本質的、ある意味ではやややめはずれた質問が来て、サポート部隊である私としても、これはまじめに答えると長くなる、と、一瞬ひるんだところ、もう一人の座長から、この対照は健常者なのか？という非常に安易な質問が来たので救われました。大きな声で一所懸命に発表した S の姿は好印象を残したようで、座長は「nice work !」と言って肩をたたいてくれました(写真 3)。

この事件があまりにも印象的であったため、多くの紙数を費やしてしまいましたが、speech にならなかった他の 3 名も escape するようなことはなく、全員が話に来た外国人ときちんと discussion していました(図 4A, B)。例えば、2 日目には幸か不幸か同じ様な形式の poster discussion はなかったのですが、全身性エリテマトーデス(SLE)と CD19 多型の関連に関するポスターを出した K が、ジーンズのジャケットに黒緑めがねという出で立ちで、Texas 風の accent で話す渋い年輩の男性と真剣な discussion をしているのを見てみると、何と、RA や SLE の HLA の研究の草分けである Peter Stastny であることがわかりました。筆者にとっては名前でのみ知っていた偉大な研究者ですので、さっそく割り込んで二言三言お話しさせていただきました。

さて、二日目の午前中は、トレランスのシンポジウムです。Andrew Wells は、IL-2 が T 細胞の増殖を誘導する一方で、proapoptotic な作用を持ち、IL-2 knock out mice では T 細胞の activation induced cell death (AICD) 機構に欠陥が生じ、末梢性 T cell tolerance に障害が生ずること、免疫抑制剤である rapamycin は IL-2 による増殖シグナルを抑制するものの proapoptotic signal は抑制しないこと、これに対し、cyclosporin A は CD28, CD40 系路の blocking によって誘導される tolerance に対して拮抗的な作用を有すること、などを示しました。活性化 T 細胞の apoptosis の制御は、われわれが専門とする自己免疫においても注目の分野であり、今後の進歩に目が離せない領域です。

同様のことは、次の speaker であった Angus Thompson が論じた DC を用いた tolerance の誘導についても言えることです。恥ずかしながら、筆者は DC について深く勉強したことがなかったため、最強の抗原提示細胞、という認識しかなかったのですが、MHC を発現するものの costimulatory molecule を発現しない immature DC はむしろトレランス誘導的 (tolerogenic) に働くこと、さらにこの機能を強化するために、TGF $\beta$ , viral IL-10, CTLA4Ig などの免疫抑制効果を持つ分子や FasL, TRAIL など、抗原提示を受けた T 細胞にアポトーシスを誘導する分子を発現させるような genetic engineering が移植免疫や自己免疫の抑制を目指して試みられていることを知りました。

この日の一般演題は、HLA typing の technology と移植後の monitoring でした。この分野については、会場内でたびたびお会いした (傍点筆者) 湧永製薬やオリンパス、ベリタスの皆様の方が私などよりもはるかに的確に report していただけたと思います。Microarray を用いた HLA typing の予備的な成績が発表されていたのが印象に残りました。

午後は MHC の molecular genetics の session で、Henry Erlich の発表は途中入場になってしまい、スライドもはっきり見えなかったのですが、炎症性腸疾患において、DRB1\*0103-DQB1\*0301 という haplotype が、より common な DRB1\*0103-DQB1\*0501 よりも強い関連を示すことから、DR と DQ の何らかの相互作用が

示唆されるという結果を示していました。近傍の別の遺伝子、という可能性も否定できないのではないかな、と言う気もしましたが、限られた時間の発表でしたから、示さなかったデータからそのような可能性を否定したのかもしれませんが。また、Cullen らは、single sperm からの HLA 領域の各遺伝子座の typing を、一卵性双生児や HLA identical sib pair などを含む多くの donor から行い、各 locus 間での組換え率を求め、という、きわめて興味深く、おそらく相当の労力を要したであろう研究を発表していました。組換えの hot spot はほぼ従来から報告されている部位に一致している印象を受けましたが、筆者の聞き間違いでなければ、haplotype によって組換え率が違う可能性がある、という、きわめて刺激的な内容が示されていました。組換えにどのような分子機構が関与しているのか、筆者は不勉強にしてよく知らないのですが、組換えの hot spot にあたる部分のクロマチン構造が haplotype によって違うのでしょうか？今後 follow していきたい研究内容でした。

この session では、このほか、Martin らにより、家系調査による KIR 遺伝子座の Caucasian における haplotype が報告され、今後、疾患感受性、進化の観点からの HLA と KIR の関連など様々な解析の基礎データとなる重要な知見だと思われます。2日目の poster session は前述のように大きな事件なしに無事終了し、以前から行ってみたかった Downtown Disney の seafood restaurant に学生たちにつきあってもらいました。

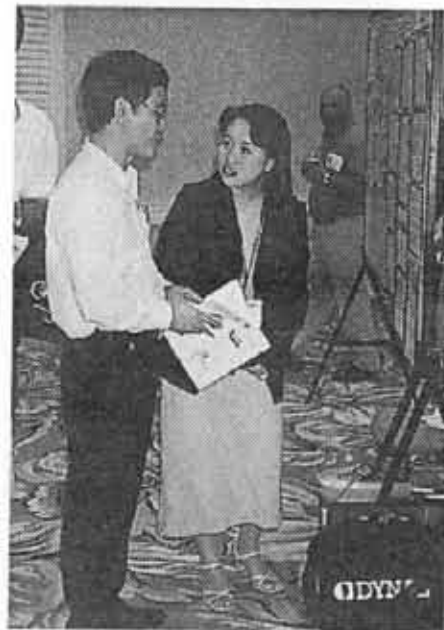


写真4. ポスターの説明に熱がこもる(A)黒木喜美子と(B)志田裕子。

第3日午前のシンポジウムは「抗原提示」です。ここでもまたDCの登場です。Edgar Engelmanが、ヒトのnon-Hodgkin lymphomaやmultiple myelomaに対する、DCを用いたidiotype特異的免疫誘導の臨床試験の成績を示しました。また、Flt3 ligandが末梢血へのDCの動員を顕著に誘導することから、これを用いた臨床試験についてもreviewされました。また、CD40-CD154 (CD40L)について話したRandy Noelleも、DCとT細胞の相互作用におけるCD40-CD40Lの重要性を強調し、この系からのシグナルはDC、T細胞の両方をアポトーシスから回避させ、生存を維持するために必要であることを示しました。彼はさらに、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)モデルにおいて、中枢神経系に存在するmicrogliaが発現するCD40が疾患発症に重要であることを示しました。

この日の昼は、"Pavillion"と呼ばれる、会場のホテルのプールサイドにある巨大なテントのなかで、lunchを食べながら、総会にあたるsessionが開かれました。会長(Alan Ting)講演、種々のawardの授賞式、次期会長(Dolly Tyan)講演と続くはずが、実際には会長は話さず、次期会長が長いspeechをしました。彼女は、ASHIが"H (histocompatibility)"の部分にこだわりすぎたために、多くのbasic scientistをそのメンバーから失ってしまったことを嘆きつつ、今後は、genome scienceの進歩を見据えつつ、"I (immunogenetics)"の部分を実践させていくことによって、学会としての発展を目指して行くべきであることを、強調していました。筆者がtissue typerではないためですが、一般演題については正直やや物足りなさを感じただけに、筆者自身も同感でした。

続いて、今年のRose Payne Awardを受賞したJohn Trowsdaleの受賞講演です。実は、nonmemberである筆者は、事前にプログラムを受け取っていなかったため、registrationするまでTrowsdaleが来ることを知らず、初めてその動く姿を見ることができると、ということで、最初から楽しみにしていました。しかも、実際にみると、おそらく年齢は50歳代と思われるのですが、一見punk musicianのような風貌で、若々しく、驚いてしまいました。実はこのテント会場は、当然のことながら暗くすることができず、演者自身が「自分でもスライドが見えない」と言ってしまうくらい、講演を聴く場所としては悪条件でしたが、その切れ味鋭く、説得力のある話しぶりには引き込まれました。内容は、MHC、KIR/ILT領域のゲノム解析、進化の話でした。

午後は一般演題口演です。この日の演題では、これまでのように、KIR遺伝子のある・なしの多型ではなく、

全員が持っているKIR2DLA遺伝子のなかでの多型を解析したChristiansenらの演題に興味が惹かれました。見出されたいくつかのアリルのうちの一つは、1塩基の欠失によるframe shiftのために、細胞質ドメインを持たない蛋白か、分泌型になることが予想され、機能的な差異、疾患との関連に今後興味を持たれます。このほか、KIR遺伝子ある・なしの多型と習慣性流産との関連研究、TGFβの産生量の高いgenotypeとGVHDの合併症との関連、インドにおける"malnutrition-modulated diabetes" (筆者はこのような糖尿病があること自体、初めて知りました)とMICAアリルとの関連(HLA-DR, DQとは独立)、などが発表されていました。

最終日午前中は骨髄移植のシンポジウムですが、13th International Workshop (2002年5月12~16日)とConference (同18~22日)の紹介以外は、NK受容体の話でした。Eric LongはNK細胞の抑制型受容体の総論をreviewしたのち、可溶性KIRを用いた、HLA-class Iとの結合の微細特異性に関する彼らの最近のデータ、ならびに、活性化型受容体の一つである2B4自体のリン酸化がKIRの共架橋によって抑制されること、すなわち、KIRによる抑制は、活性化シグナルのもっとも上流で起こりうることを示しました。また、Lewis Lanierは、NK細胞の活性化型受容体、特に、そのシグナル伝達分子と考えられるDAP10, DAP12についてreviewしました。

午後は、「21世紀に向けての新しいテクノロジー」と題されたシンポジウムで、遺伝子治療、tetramer、移植のための新たな生体材料、といった講演で、うち前2者を聞きました。遺伝子治療は、慢性関節リウマチの遺伝子治療を実験動物・ヒトの両方で行っているため、筆者も何度も講演を聞いているPaul Robbinsによるものでした。事実、allograftの拒絶を抑制するための遺伝子治療もリウマチの遺伝子治療も原理的には同じだから(確かにその通り)、と言いつつ、リウマチの動物モデル(ここでもDCにIL-4の遺伝子の導入する話がでてきました)の話に続き、マウスの心移植モデルにおいて、DCにNF-κBの結合配列を持つoligonucleotideを遺伝子導入してNF-κBの活性を抑制(NF-κB decoy)することにより、拒絶が抑制されること、脾臓細胞にIL-1 receptor antagonist protein (IRAP)を導入後に移植すると、graft生存期間の延長、炎症、アポトーシスの抑制が得られること、が報告されました。最後に、おそらく近年のHLA領域の最大の進歩(の一つ)である、MHC class I+抗原ペプチドのtetramerの話が、John Altmanからありました。この方法は、抗原特異的T細胞を検出

---

する目的で作製されたもので、そのみでも画期的なの  
ですが、その後の発展として、様々な機能解析への応用  
が可能であることが示されました。例えば、細胞内 IFN $\gamma$   
染色と tetramer による染色を two-color で行うことによ  
り、刺激を受けた CD8 陽性細胞は、IFN $\gamma$  産生とともに  
細胞表面の TCR の発現低下がおこること、tetramer によ  
って陽性染色を示す細胞における perforin 発現が CTL 活  
性のマーカーとして使えることなど、興味深い成績が報  
告されました。興味をお持ちの方は、

<http://www.niaid.nih.gov/reposit/tetramer/overview.html> をご  
覧下さい。

以上、本学会全般に対する筆者の個人的印象としては、  
これはひとえに筆者の研究領域が ASHI の focus と若干  
異なるためでしょうが、専門領域の最新のデータを示し  
つつ同業者と議論する、というよりは、教育的シンポジ  
ウムを主体とする学会という印象を受けました。そう言  
う意味で、招待講演者のリストはそうそうたるもので、  
初めて顔を見た、という演者もたくさんいました。学会  
としては、今年の話題は何といても樹状細胞、一般演  
題では、筆者には NK 受容体の演題がもっとも印象に残  
りました。

なお、本レポートは、筆者のメモと抄録をつきあわせ  
て作製したものですので、どこまでが speaker の original  
の仕事なのか、どのくらい最近の仕事なのかが不明の点  
も多く、さらに内容にも誤りがあるかもしれませんが、  
ご指摘下さいましたら幸いです。

謝辞 筆者が本学会に参加する機会を与えていただきま  
した、櫻井大祐、黒木喜美子、川崎綾（以上東大人類遺  
伝）、志田裕子（東大口腔外科）に謹んで謝意を表しま  
す。



湧永製薬株式会社 創薬研究所バイオ診断研究室 松見 達也

第26回 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI) が2000年10月9日~14日までの4日間の日程で、フロリダ州・オーランドのヒルトンホテル内で開催されました。広島を出発して、幾多の飛行機の乗り継ぐこと28時間、ヘトヘトになりながらオーランドに到着しました。学会会場はディズニーワールドをはじめ、ユニバーサルスタジオ・フロリダやケネディー宇宙センターなど数多くの観光スポットが隣接する好立地(?)であったため、学会開催中はこれらの誘惑と格闘する日々でした。

今年度の参加者は900人程(日本人参加者は20名前後)でしたが、215題のポスター発表、10項目のワークショップ、6項目のプレナリーセッションなどネタはてんこもりで、日本の組織適合性学会に比べてスケールの違いを感じました。また基礎的な講習会や講演などが充実していて、技術者に対する気配りが伺えました。今学会発表の中から、DNA タイピングを中心にいくつかご報告いたします。

### 1. フローサイトメトリーを用いたリバーシ SS0 法による HLA タイピング法

ライフコード社、ワンラムダ社がそれぞれポスターあるいはランチョンセミナーでこの手法を発表(正確には発売予定のもの)しました。両社ともルミネックス社が開発した LABMAP 技術を用いたもので、基本的な操作はほとんど同じです。この方法のミソは100種類までの異なる色調をもつルミネックスビーズ(ポリスチレン製微粒子)です。ビーズにはそれぞれ異なるオリゴヌクレオチドプローブを固定してあり、ビーズの色調によって各プローブを識別することができます。

ワンラムダ社が発表しました実際の操作手順は以下のステップからなります(図1)。

- ①ターゲット遺伝子(HLA遺伝子)をビオチン標識されたプライマーでPCRする。
- ②ビオチン標識されたPCR産物を、ビーズに結合しているプローブとハイブリダイゼーションさせる。
- ③非特異にハイブリダイゼーションしたものを洗浄により除く。

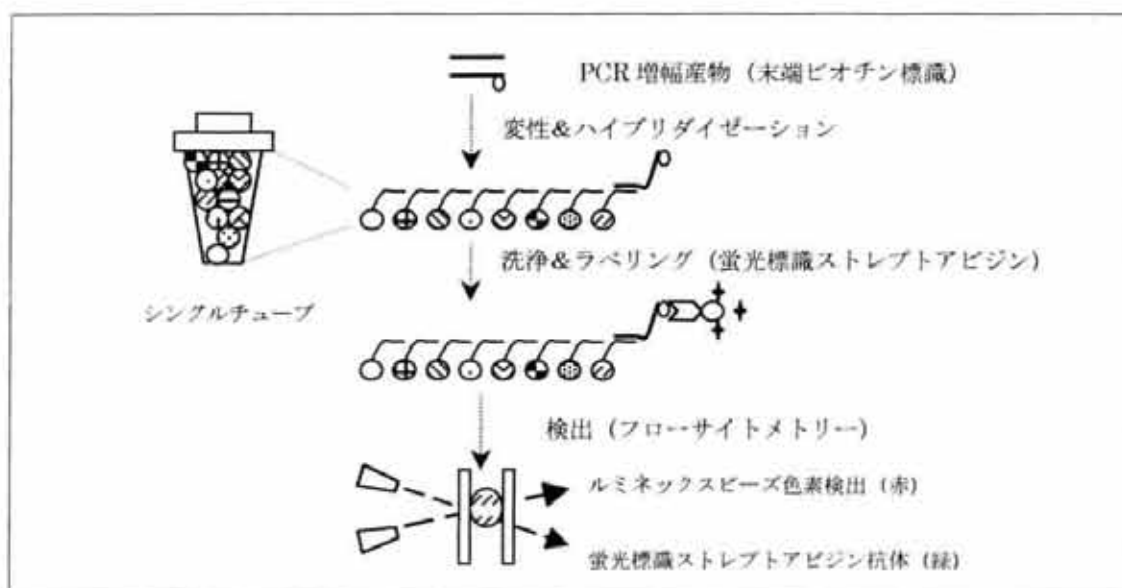


図1

④アビジン-蛍光標識抗体を反応させて、ハイブリダイゼーションしている PCR 産物に結合させる。

⑤フローサイトメトリーで各ビーズの色調(赤色レーザー)と、ハイブリダイゼーションしている蛍光標識(緑色レーザー)を検出する。

このアッセイの長所は1チューブで1サンプルの反応が行われ、操作のステップが少なく、サンプルの検出時間も短い(PCR 後、35 分で検出)ことです。現時点では一日に 96 検体程度の処理能力ですが、将来的にフルオートになれば、一日に 1000 検体の大量検体処理も可能となります。今学会では具体的なデータが発表されていませんでしたが、DNA マイクロアレイに十分対抗しうる画期的な方法です。

## 2. MS を用いた HLA タイピング法

<演題名: Automated Mass spectroscopic platform for high throughput DR beta typing >

MALDI-TOFMS (マトリックス支援レーザー脱離イオン化法-飛行時間型質量分析法) を利用したハイスループット HLA タイピング法について James Leushner ら (Sequenom Inc.) のポスター発表がありました。

MALDI-TOFMS の原理についての詳細は、東海大学・成瀬先生らの総説<sup>1)</sup>をご参照ください。この方法は、試料

を脱塩精製、乾燥後に質量分析器で測定するだけで、簡便で迅速に結果が得られるのが特徴です。

今回の発表は、PROBE (Primer Oligo Base Extension) 法と MALDI-TOFMS を組み合わせたもので、SNPs (1 遺伝略号の違い) の検出ですでに実用例があります。実際の操作手順は以下の通りです(図 2)。

- (1) ターゲット遺伝子を PCR 増幅する
- (2) SNP に隣接する領域のプライマーを用いて、プライマー伸長を行う。この際 4 つ塩基のうち 1 つをジデオキシヌクレオチドにする。これにより、ジデオキシヌクレオチドが取りこまれたものはプライマー伸長が止まる。
- (3) プライマー伸長が止まったものとそうでないものとで分子量の差が生じていることから、これを MALDI-TOFMS にて検出する。

DR タイピングをベースに発表されていましたが、一部のアリルは区別できないものがあるなど、実践的にはまだ改良が必要なアッセイ法ではあります。しかし将来的には SSP 法のような迅速タイピングが可能で、かつハイスループットな手法の一つとして期待されています。

総説<sup>1)</sup>; 成瀬妙子著; 実験医学, 18: 48-53, 2000

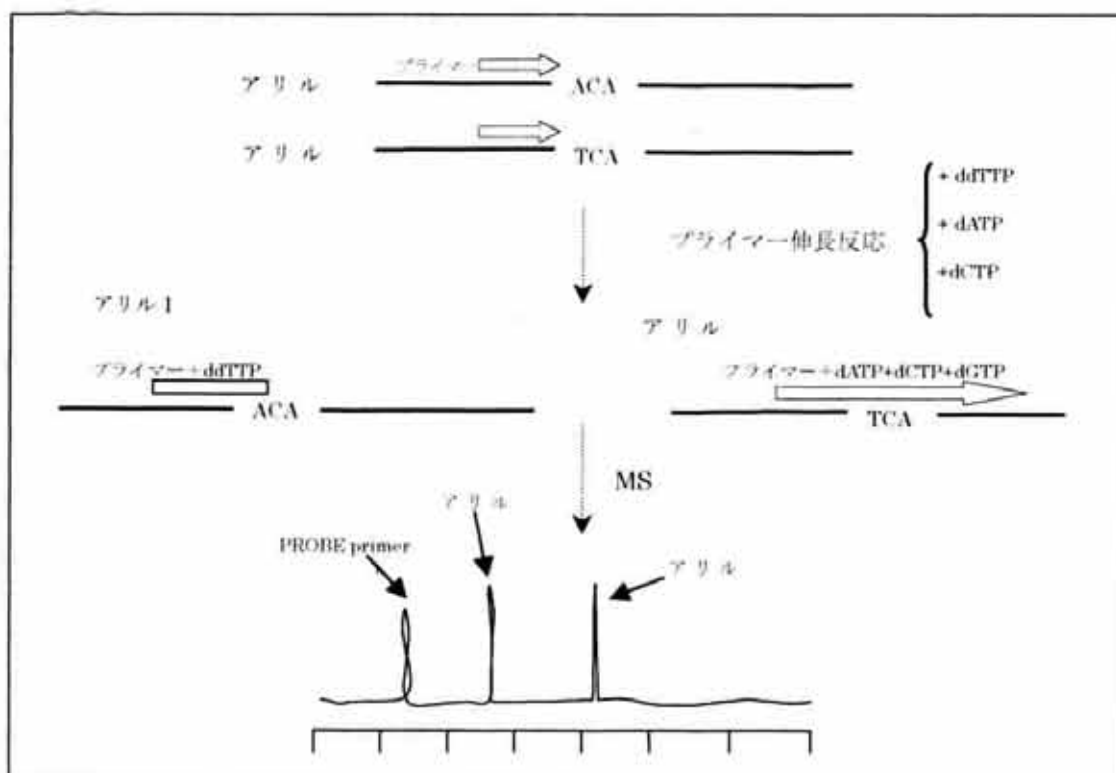


図 2



### 3. RSCA (Reference Strand-mediated Conformational Analysis) によるHLA タイピング法

昨年度 (1999 年度) ASHI にて The Anthony Nolan Research Institute が発表し、今年度は製品化したものをブースにて発表していました (製造元・発売はベルフリーズ社)。この方法は、ターゲット遺伝子を PCR 増幅後、標識した既知アレルの PCR 増幅産物 (リファレンス) と混合して熱変性します。次にアニーリングを行うと、もとの二本鎖 DNA に戻るものとリファレンスとヘテロ二本鎖を形成するものがあります。検出しようとするアレルはリファレンスとヘテロ二本鎖を形成した際に特有の立体構造を組むため、非変性ゲルで泳動するとアレル特異的な挙動を示します。これにより HLA アレルを決定する方法です (図 3)。

RSCA 長所としては、①正確、②解像度高い、③自動化が可能、④再現性高い、⑤新しいアレルの検出が可能、⑥全てのアレルに適用可能など多くがあげられます。逆に短所として、大量検体処理は現時点では難しく、各抗原のタイピングの際にリファレンス (標準品として使用する標識した PCR 増幅産物) の設定が難しいことです。

### 4. DNA マイクロチップ技術によるHLA タイピング法

<演題名: DNA microchips technology for HLA class I typing >

イタリアの Ferrara のグループ (National Cancer Institute) が DNA マイクロチップを用いた HLA タイピング方法について発表しました。昨年同グループが発表した方法は蛍光標識したヌクレオチドの取込みにより SNP を検出していましたが、今回は DNA リガーゼを用いています。操作ステップは次の通りです。

- ① 3'末端にミスマッチ (SNPs) を含むようなオリゴヌクレオチドを表面処理したガラススライドにスポッティングする。
- ② 変性した PCR 産物とハイブリダイゼーションを行う。
- ③ 末端を標識したコモンプローブとハイブリダイゼーションを行う。
- ④ T4 DNA ライゲースを用いてライゲーション反応を行う (プローブの 3'末端がマッチしているものだけがライゲーション反応によりコモンプローブとつながる)。
- ⑤ 蛍光をスキャンして検出する。ガラススライドへのスポッティングはドイツ社製のスポッターを使用しており、この機械は 400 spots / cm<sup>2</sup> の

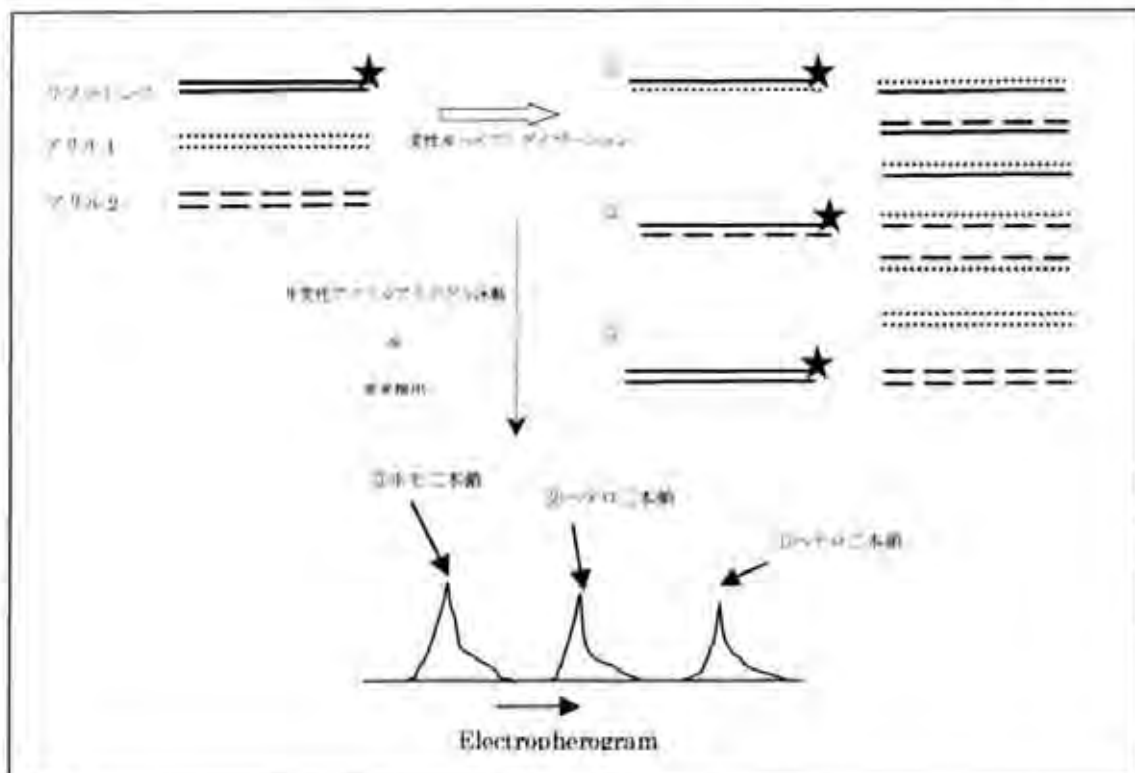


図 3

スポッティングが可能です。今大会での発表では具体的なデータが少なく、またコスト面などを考えると現時点では実践向きではないかもしれませんが、技術的には優れているので SNP s 解析には有効なツールになるかと思います。

#### 最後に

今回の ASHI では、飛行機の荷物が届かなかったり、道に迷ったり、部屋の暖房のスイッチを入れたら火災報知器が鳴ったりなどハプニングの連続でした。しかし今となってはどれもいい笑い話となっています。

この学会ではいろんな方とコンタクトがとれて私にとっては何もかもがいい経験になりました。ただ私どもも含めて日本からの学会発表が意外と少なかったことと、世界のタイピング技術の進歩に少々ショックを受けたのは事実でした。このことを素直に受けとめてさらに上をいく技術開発を目指し、よりよい試薬を皆様に供給できるよう努力しなければならないと決意あらたにした次第です。

以上

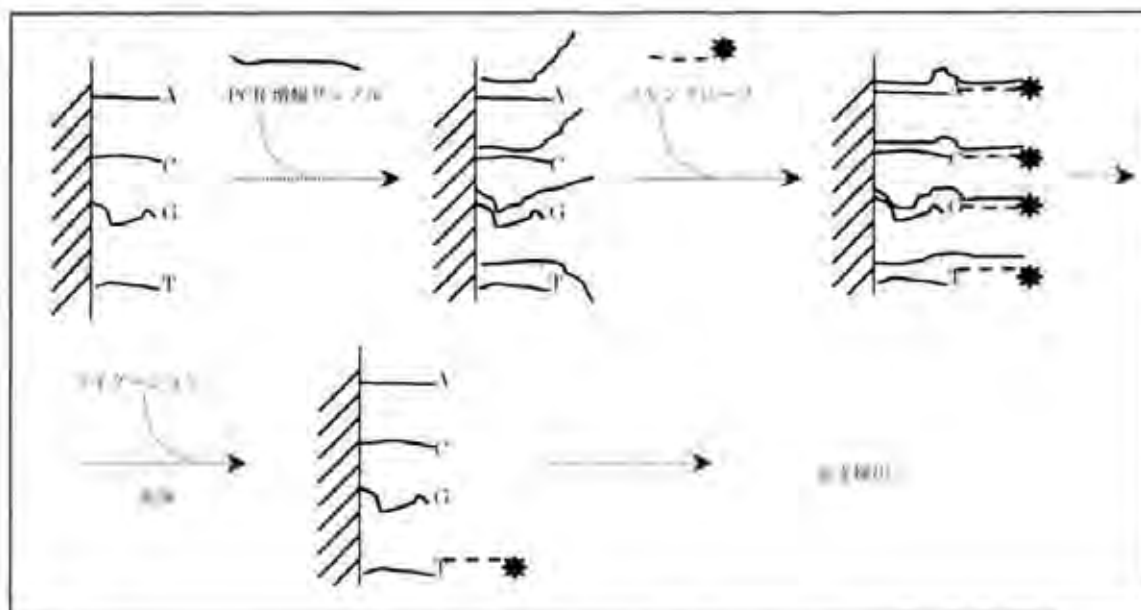


図 4

東海大学医学部分子生命科学系

成瀬 妙子

## 苦しい言い訳

苦、苦しい。何故かと言うと、頭がとんでるからです、ディズニーワールドに。いざレポートを書こうとすると、思い出すのはディズニーワールドのことばかり。でも、これは私の責任ではありません。ASHI をこんな所で開催するのが悪いんです。

## 前置き

第26回のASHI ミーティングが開かれたのは、2000年10月10日から14日の5日間で、会場はフロリダ州オランド(日本人はオーランドと発音しますが)、ウォルトディズニーワールドリゾート内のヒルトンホテルでした。プログラムをみてびっくり。なんと表紙にはディズニーワールドのシンボル、エプコットセンターの写真が! これまでいろいろと学会には参加させて頂きましたが、こんなにおもむろな観光とのジョイントは初めてです。しかしこれは序の口でした。どうやらウェルカムレセプションにはディズニーキャラクターが多数お越しになったようで、残念にも我々はその夜に到着したため、キャラクターとの御対面は翌日以降に持ち越しとなりました。さらに学会期間中限定のディズニーワールドディスカウントチケットも販売されていたそうです。おまけに周りにはお買得アウトレットショップの数々が! 何と至れり尽せりな学会でしょうか?

さて、私にとっては7年ぶり2回目のディズニーワールドです。会場のヒルトンホテルに泊まることにしていたのでチェックインに向かうと、ロビーでは日本人新婚さんカップルがあちらこちらでおくつろぎです。当ユニットは、我が教室の河田さん、ベリタス長尾さん、私という、あちらさんから見ればわけのわからん構成で、我々にとんでくる視線は、同じ日本人とは思えないほど冷たいものでした。そんな中、前方ホテルエントランスから何やら暖かい眼差しを感じました。ふと振りむけば、そこには両手一杯にアウトレットグッズを抱えたABI 浅井さんが...そしてその影にはレンタカーを借りたばかりに運転手を務めてしまったという湧永製薬 加藤さんの姿がありました。このユニットはそれから先、我々にとんできた視線を一手に引き受けてくれたのは言うまでもありません。

## ASHI ミーティング

我々が到着した10日には、Dr. JA Hansen を中心に、2002年に開催が延期された第13回の国際組織適合性ワークショップに関するプレミーティングが行われていました。我々は終了後に到着したため聞き逃しましたが、その後Dr. Hansen が11月に東京を訪れ、プレミーティングでの内容を反映した宣伝活動を行いました。内容に興味を持たれた方は、当方、中央日赤血液センター等にて情報の入手が可能と思われるのでお問い合わせ下さい。

翌11日からは張り切って会場に向かいました。取りあえず、参加したという証拠を残すため、まずは会場で記念撮影を行いました(写真1)。これで一応私の役割は終了したので、フロリダの青い空のもと、残された時間を数々のディズニーアトラクションと有意義に時間を過ごそうと、内容をよく吟味してプログラムの検討に入りました。

今回のプログラムは、6つのplenary session を中心に、ワークショップ、シンポジウム、一般口演、ポスター展示が行われていました。まずplenary session についてですが、骨髄移植のセッションを除けば、免疫寛容、拒絶メカニズム、樹状突起細胞の臨床適意義、遺伝子治療と免疫など、免疫に関する講演が目立ちました。ワークショップは主にTissue typer 向けに設けられており、基本的なDNA タイピング法の概説、フローサイトメトリ



写真1. 参加の証し。会場にてベリタス長尾さんと。

一、骨髄移植の臨床などでした。目を引いたのは Unet systems 講習会でした。これは UNOS (United network for organ sharing) が作成したネットワークプログラムで、ドナー、レシピエントの HLA タイピング結果、適合度、優先順位などの情報を各部署で入出力可能にしたもので、内容紹介と合わせて利用に関する簡単なトレーニングを行っていました。UNOS の講習会を学会のプログラムに組み込むとは、やはり日本の状況とは異なっています。

シンポジウム、一般口演では、一般演題より選ばれたものの中でも Scholar Awards 受賞者の発表が中心となっていました。私事ですが、今回の受賞者6名の中に、Dr. S Szmania の名前を見つけました。彼女には 1994 年にミルウォーキーで開かれた、初の SBT セミナーにて大変お世話になりました。その後彼女は上司と共に Columbia 大学に移ったのですが、最近はどうしているのかと思っていました。後で聞いた話ですが、上司の急な退職で、現在は遺伝子から細胞の分野に移動して頑張りたいようです。HLA を続けていたことを知って嬉しくなっていました。

疾患感受性では、インスリン依存性糖尿病、慢性関節性リウマチ、HIV、HCV に関する発表がありました。HCV については、我々が現在京都大学と共同研究を進めている HCV 抗体陽性心筋症との関連もあり、聞き逃してはいけないと、隣で行われていた HLA 遺伝子の会場から急いで抜け出して最後尾に立ちました。すると私の前に背の高いおじさんが現れたので、「何も見えへんやん」とつぶやいたとたん、そのおじさんは振り向いてウインクしてくれました。ん？ David Eckles さん、あなたは隣で Chairman やってるはずでしょう？彼も HCV を研究しているので気になったようでした。演題の内容は、HLA-C\*0401 が HCV の消失に関与しているというものでしたが、日本人には HLA-C\*0401 は少ないので、後で David に感想を聞いてみると、白人には、彼等の主張する B53-Cw\*0401 というハプロタイプは低頻度なので、コントロールの選び方に問題があるのでは？と首をかき上げていました。

HLA 遺伝子に関しては、データベースの構築、各種プログラムの開発といった発表がみられました。HLA 遺伝子データの編集でおなじみの Dr. SGE Marsh は、IMGT/HLA ワーキンググループで現在取り組んでいる、HLA-A 遺伝子イントロンの塩基配列情報の収集について報告を行いました。同一の対立遺伝子であっても、異なる個体ではイントロンの塩基配列が異なることが知られていますが、彼等はこれまであまり手をつけられていなかったようし

たイントロンの情報について、まず A 遺伝子から整理を始めたようです。こうした試みは、2003 年に軽井沢で開催される第 7 回アジアオセアニア組織適合性会議においても、B 遺伝子を中心にアジアに特徴的なハプロタイプの解析が行われる予定ですので、情報交換ができそうで楽しみです。

タイピングテクノロジーについては、新たに注目されている、マイクロアレイや蛍光プローブを用いた大量タイピング法が紹介されていましたが、特許との絡みもあってかほとんどが概要の説明のみで、実際に生のタイピングデータを出していたのはマイクロアレイでの DR の結果のみという、ちょっと期待外れなものでした。

ポスター展示は新対立遺伝子の報告、population study などが多かったのですが、今回非常に目立ったのは、企業とのタイアップ型でした。〇〇社製キットを用いて、数分で血液から DNA を抽出可能とか、xx 社の試薬で精製をおこなうと、識別出来なかったシークエンスが判読可能、などというものがかなりありました。そんな中で、クラス I シークエンスを行っている方に耳寄りな情報をゲットしました。GC クランプによるピークの乱れを押さえるには、最終濃度 2% の Tween 20 をシークエンス反応時に添加するとよいそうです（我々は試してません）。うまくいった方があればご連絡下さい。

今回の The Rose Payne distinguished scientist award には、猪子教授のおホモ、失礼お友達である Dr. J Trowsdale が受賞されました。受賞理由は、HLA クラス II 遺伝子領域のシークエンシング解析に貢献し、特に、この領域内に存在する HLA-DM, HLA-DQ, TAP1, TAP2, LMP2, LMP7 など、HLA 抗原提示に深くかかわる遺伝子の発見に寄与したことです。現在は Cambridge 大学の教授として活躍され、HLA 遺伝子から離れてしまったのは少し残念です。彼はとてもハンサムです。思えば 6 年前、彼のファンだった私は、夜の神戸でほっぺにチューされて大感激でした。それから暫くして、神戸は大地震に見舞われました。

この他我々は、忙しいレジャーの合間を縫って企業主催のセミナーや展示コーナーに走り、情報と食べ物の獲得に勤めました。私はその中のひとつ、Visible Genetics 社 (VGI) のユーザーミーティングに参加させて頂きました。VGI での SBT システムについて詳細な説明を受けたのですが、何せワイン飲み放題という寛大なミーティングだったので、途中からただの酒飲みに戻ってしまい、その後はホテルのバーで反省会をしました。

それにしても今回の ASHI ミーティングは、開催地が都市部ではなかったせいもあってか、参加者数が少なく

今一つ盛り上がり欠けていたように感じました。もちろん、米国以外にも、各国より多数の顔ぶれがみられましたが、その数は例年より寂しいものとなっていました。日本からも今回は参加者が少なく、会場で私がお会いした顔ぶれは、SRLの中條さん、奈良県立医大の石谷先生等、日本人はこじんまりしていた感じでした。

### ミーティングを終えて

少ない日本人メンバーではありましたが、せっかくオランダまで来たのでやはりみんなで交流をあたためる必要があると判断した我々は、取りあえず某かのテーマパークに行くことを決意しました。やはりディズニーワールドといえばエプコットセンター、ということで早朝からシャトルバスに乗り込んで見学に向かいました(写真2)。エプコットセンターは園内を地球に見立てた構成で、「ワールドショーケース」と呼ばれる世界各国のパビリオンと、文明や地球環境の過去、現在、未来に焦点を当てたアトラクションが点在する、なかなかお勉強になる施設です。園内のあちらこちらで、ASHI 特製Tシャツを来た方が観外学習しておられました。さて到着後、最初に済ませたのはセンター内にあるパビリオンレストランでのディナーの予約。そうです。これをやらねば夕食はまたファーストフードになる恐れがあるのです。何分にも米国ゆえ、食に対する覚悟は出来てはいましたが、

なんとか無事にイタメシレストランの席を確保し、その後はひとまずあちらこちらのアトラクションへ向かいましたが、そろそろお昼御飯か？という時に、その事件は起こりました。空腹で臨んだアトラクションで、乗り物酔いになる方が続出！このアトラクションは、我々がマイクロ戦士となり、座席に座りながらにしてスクリーン上に写し出された映像を見ながら、人体内の血管を旅す



写真2. エプコットセンターに向かう御一行さま。

るという非常に楽しいものだったのですが...次々に向かってくる赤血球をかわしながら、血小板と共に流されてゆくうちに、みんなへろへろになってしまいました。食欲をなくした一行は、やはりあっさりしたものが食べたいと日本パビリオンに向いました。何時見ても不思議な、赤鳥居の奥に建つ五重の塔のとなりで、私はみたらしだんごのたれが思いっきりかかった焼き鳥を頂きました。いつもながらに「君ら、どんな舌しとるんや？」と思ってしまうテイストでした。

ひとまずお腹を一杯にして、さらにノルウェー館の見学を続けていると、前の列にどこかで見た光景が...こんなに広い園内でまた会ってしまうなんて！浅井、湧永チームとは、その後夜までジョイントし、イタメシディナーで盛り上がりました。

楽しい時間はあっという間に過ぎ、翌日よりそれぞれ予定をこなすために旅立って行きました。浅井さんはフォスターシティーへ、加藤さんは昨年逝去された大野乾先生のお墓参りへ、そして河田さんと私も、新たなSBTシステムの情報を得るために、アトランタのVGI社、ミルウォーキーのDavid ラボへと向かい、ハンバーガー生活はさらに続きました。知識はなかなか身につかないのに栄養はどうしてすぐ身につくのか？

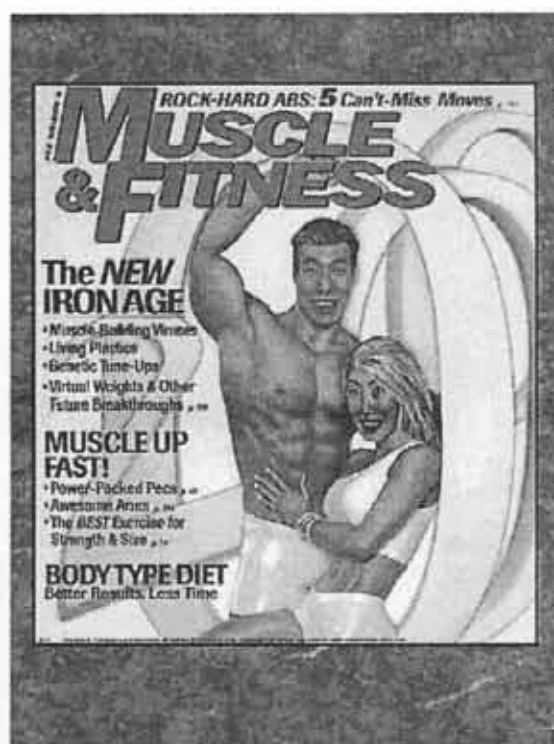


写真3. さて、この人はだれ？

# ブタ MHC 遺伝子解析の現状と意義

東海大学医学部分子生命科学教室 安藤 麻子

## はじめに

ヒトの臓器移植において、深刻なドナー不足などの理由から、繁殖能力が高く、臓器サイズもヒトに近いブタの臓器を標的とした異種移植が注目されつつある。ブタからヒトへの異種移植では、移植後問題となる超急性拒絶反応をヒト補体制御因子遺伝子の導入や糖転移酵素遺伝子の導入による糖鎖のリモデリングなどによって克服しても拒絶反応に強く関与し、きわめて多型性に富む主要組織適合抗原 (MHC) の適合度が異種移植の予後に影響を与えることが予測される。また、ブタの MHC (ブタの場合は SLA (Swine Leukocyte Antigen) と呼ばれる) 抗原型は合成ペプチドやワクチン接種による抗体産生能との関連性も報告されており、SLA 抗原型はブタの育種において重要である種々の疾患に対する抗病性を規定していると考えられている。さらに、ブタでは連鎖解析から背脂肪厚、椎骨数、と体長などの各種の経済形質が SLA 領域周辺にマップされるという特徴がある。このような背景から、異種移植のためのヒトの MHC 遺伝子を組み込んだブタの作成や、育種における抗病性品種の選抜、並びに SLA 抗原と連鎖する経済形質の解析を進める上で、SLA 遺伝子群がマップされる SLA 領域の構造解析と SLA 遺伝子の多型性解析は、きわめて重要であると考えられる。また、SLA-DNA タイピング法の開発は、SLA タイプがホモのブタは同種及び異種間の動物移植実験、種々の抗原や薬剤に対する免疫応答性の研究、ブタの育種における抗病性品種の選抜などに利用可能である。ここでは、ブタ MHC 遺伝子解析の現状と意義について最近の我々の成果をまじえて紹介する。

## 1. SLA 抗原

### 1). SLA クラス I 抗原

SLA クラス I 抗原は血清学的方法によってこれまでに 40 個以上の対立遺伝子の存在が知られている。さらに異なる 15 系統 (品種) のブタの 500 以上の家系の血清学的解析によって、ハプロタイプごとに少なくとも 3 個のクラス I 遺伝子座が存在すると考えられていた。最近、以下に述べるように SLA 領域の遺伝子構造解析の進展によりクラス I 遺伝子座の数や発現遺伝子数が明らかにな

りつつある。

SLA クラス I 抗原の発現は、リンパ球、血小板、顆粒球、肝細胞、腎細胞、精子で認められる他、脳でも高い発現が認められている。

また、SLA クラス I 抗原を認識するモノクローナル抗体は 20 種類余り作成されているが、そのほとんどが NIH ミニブタ (NIH で樹立された SLA 遺伝子を固定化した純系ミニブタ) の 4 種のハプロタイプいずれとも反応し、タイピングに有用な限られたハプロタイプに反応する抗体は数種しか得られていない。

### 2). SLA クラス II 抗原

SLA クラス II 抗原は、1973 年にリンパ球混合培養反応 (MLR) によってその存在が明らかになり、クラス II 抗原としては DR と DQ 抗原が発現しており DP 抗原の発現の報告はない。

SLA クラス II 抗原の発現は、B 細胞、マクロファージで認められる他、血中 T 細胞の 60~70% の分画や血管内皮細胞で発現が認められるという特徴がある。クラス II 抗原は、この他腎臓の実質の培養細胞でも検出されるが肝臓の実質細胞では検出されていない。このブタに特有のクラス II 抗原の発現分布の機能的意味は現在のところ未解明である。

また、SLA クラス II 抗原を認識するモノクローナル抗体も 20 種類余り作成されており、DR 抗原を認識する抗体、DQ 抗原を認識する抗体と SLA クラス II 抗原を共通して認識する抗体が作成されているが、そのほとんどが NIH ミニブタの 4 種のハプロタイプいずれとも反応し、タイピングに有用な DR、DQ 抗原の各対立遺伝子を識別する抗体は数種しか得られていない。

## 2. SLA 領域の遺伝子構成

ブタの MHC 領域であり、SLA 遺伝子群が位置する SLA 領域は、第 7 染色体の短腕から長腕にわたる 7p1.1-q1.1 の約 2.5 Mb の領域に位置する。すなわち第 7 染色体短腕のテロメア側から SLA クラス I 領域とクラス III 領域がマップされ、さらにセントロメアをはさんで長腕にクラス II 領域がマップされるという特徴がある (図 1)。

HLA 領域は、我々のグループを含む 3 グループによって 1998 年までにその 4Mb の全領域の塩基配列が決定されたのに対して、HLA 領域と類似した遺伝子構成を示すと考えられている SLA 領域はその解析が非常に遅れていたが、最近、フランスの Chardon グループが SLA クラス I 領域 (図 2) とクラス II 領域の BAC クローンによるコンティグを作製した。また、クラス III 領域についてもセントロメア領域を除く 1Mb の領域の BAC コンティグを作成している。さらに Chardon グループは、現在 SLA クラス I 領域は我々のグループと、クラス II 領域は Beattie グループ (米国) との共同研究を行っており、SLA 領域の大量シーケンシングによる遺伝子構造解析と物理地図の作成が進行中である。

1). SLA クラス I 領域の遺伝子構成とクラス I 遺伝子

SLA クラス I 領域は、YAC コンティグと上述の BAC コンティグによってクラス III 領域のテロメア側約 1 Mb の領域を占めていることが明らかになった。YAC と BAC クローンのコンティグマップと我々のデータを含めた合計 619 kb の領域の塩基配列解析から、SLA クラス I 領域には、8 個の古典的クラス I 遺伝子 (SLA-1, -2, -3, -4, -5, -9, -10, -11) と 3 個の非古典的あるいはクラス I 関連遺伝子 (SLA-6, -7, -8) がそれぞれクラスターを形成して存在することが明らかになった (図 2)。一方、NIH ミニブタのコスミドクローンの解析からこれまでに PDI, PD14, PD6, PD15, PD7, PD8, PD4 の合計 7 個の SLA クラス I 遺伝子座の存在が報告されている。これらコスミドクローンと cDNA クローンの塩基配列の比較や RT-PCR

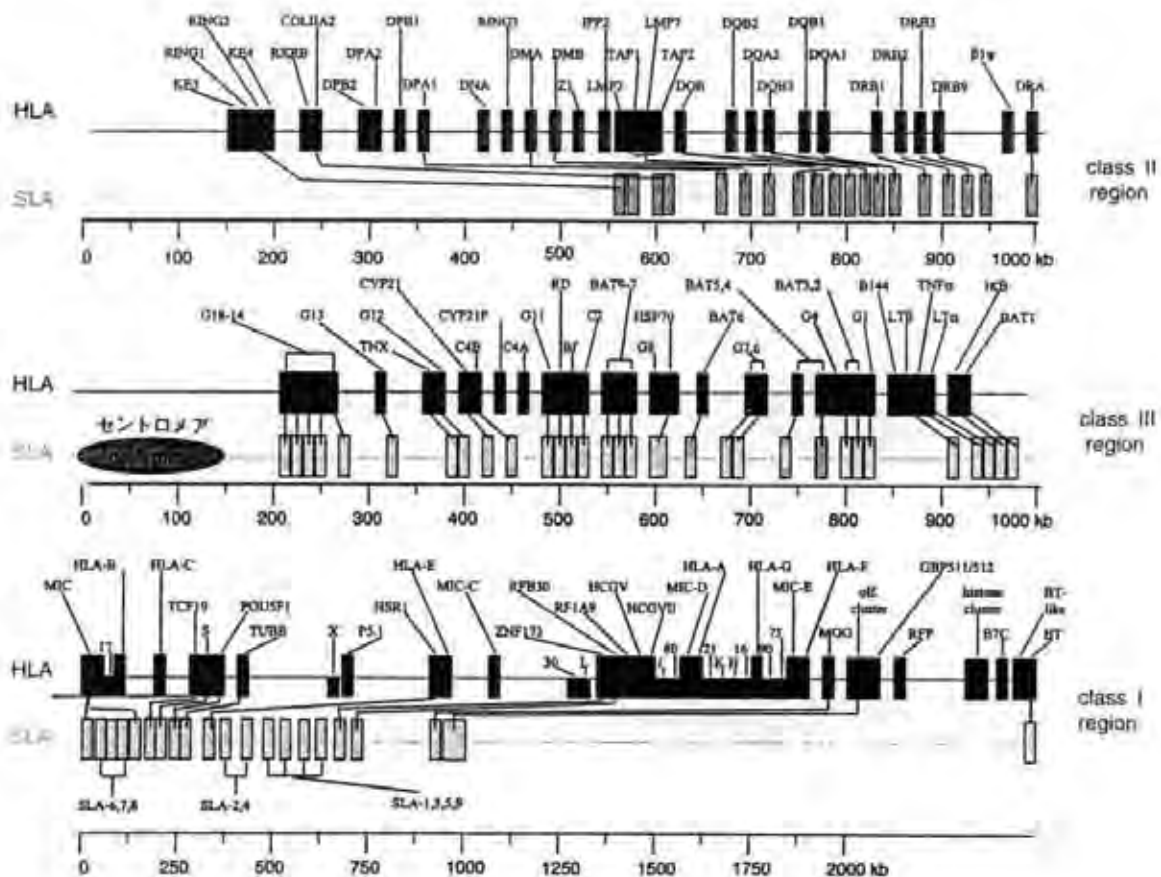


図 1. ヒトとブタのMHC領域の遺伝子構成の比較

Immunol. Reviews 167, 181, Fig. 1 (1999)より改変。

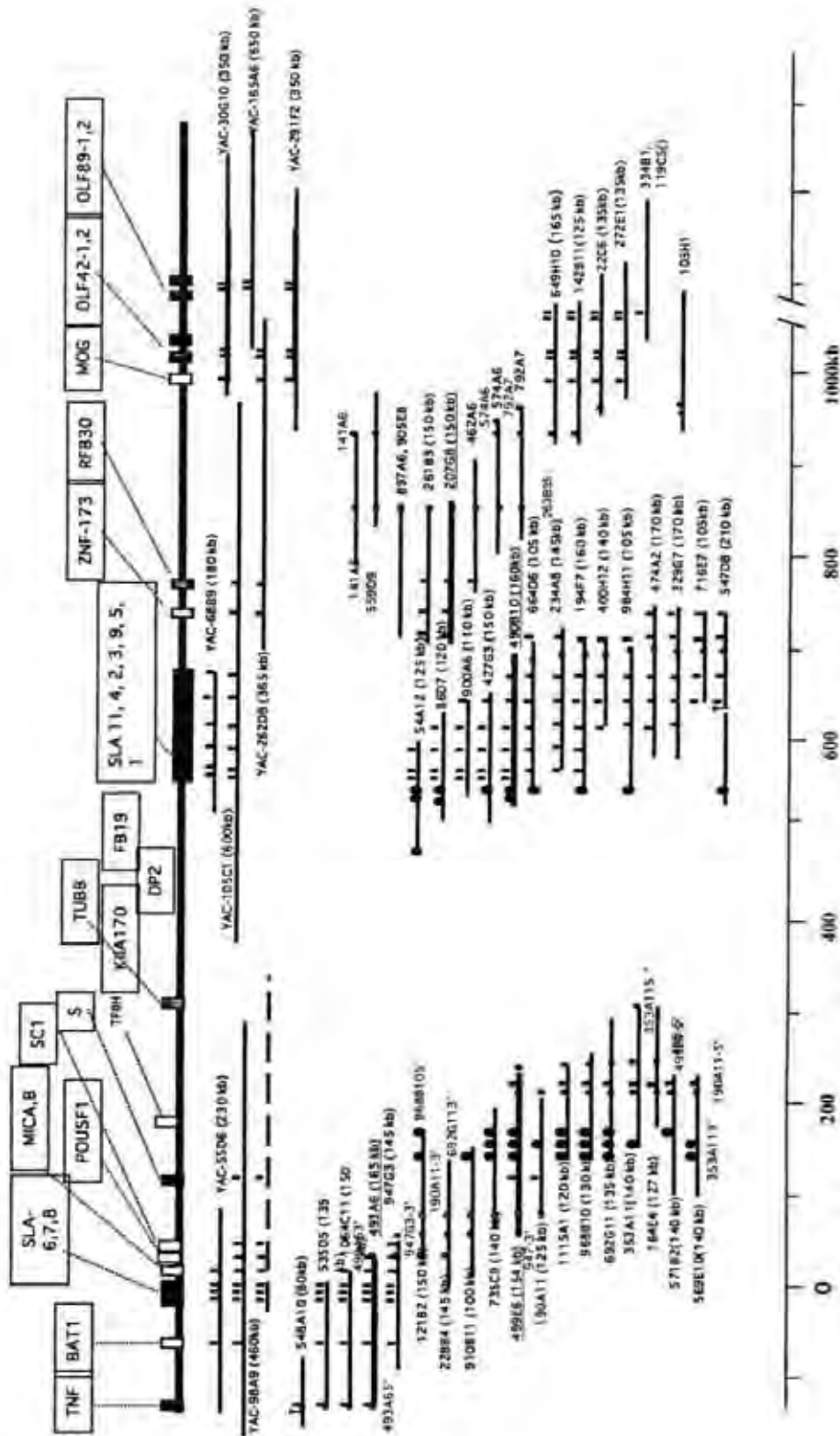


図2. SLAクラスI領域のBACとYACクローンのコンテイングマップ  
 Immunogenetics 49, 923, Fig. 1 (1999)より改変。下線を付けたBACクローンは塩基配列決定が完了している。



解析からこれらのクラス I 遺伝子のなかで、少なくとも 3 個の古典的クラス I 遺伝子 (SLA-1 (PD1), -2 (PD14), -3 (PD7)) と、2 個の非古典的クラス I 遺伝子あるいはクラス I 関連遺伝子 (SLA-6 (PD6), -7) が発現していると考えられている。PD6 遺伝子はリンパ節、脾臓、肝臓、末梢 T 細胞で比較的多く発現し、腎臓、心臓ではその発現は少なく、精巣ではほとんど発現が認められない。PD6 遺伝子はこれまで多型は見られず、その機能も不明である。SLA-7 遺伝子は線維芽細胞で発現が認められるがその他の組織の発現部位や機能は不明であり、これらのブタクラス I 様遺伝子の機能の解明は、今後の課題のひとつであろう。

また、SLA クラス I 領域には、MIC (MHC class I chain related) 相同遺伝子として MIC-1, MIC-2 の 2 遺伝子が SLA-6, -7, -8 遺伝子クラスターのテロメア側に位置している。これに対して、HLA クラス I 領域では 2 つの MIC 遺伝子 (MICA, MICB) は HLA クラス I 遺伝子 (HLA-B, -C) のセントロメア側に位置し、これら MIC 遺伝子周辺の TNF, BAT1, POU5F1 などの非 MHC 遺伝子の位置はヒト・ブタ間で保存されていることから、クラス I 領域内におけるクラス I 遺伝子やクラス I 様配列の重複と挿入によってこの領域が形成されたと考えられる。さらにヒトでは MICA, MICB 遺伝子は、ともに発現遺伝子であるが、ブタでは塩基配列解析から MIC-1 は偽遺伝子であり、MIC-2 遺伝子の発現の有無は確認されていない。

これらの MHC 関連遺伝子のほかに、SLA クラス I 領域には HLA クラス I 領域に存在する多くの非 MHC 遺伝子と相同性を示す遺伝子が多数存在し、この領域の多くの非 MHC 遺伝子がヒト・ブタ間で保存されていることが明らかになった。我々のグループは、最近このクラス I 領域のなかで、古典的クラス I 遺伝子群と非古典的クラス I 遺伝子群の両クラスター間 155 kb の領域の塩基配列を決定した。この領域はヒトでは S 遺伝子や尋常性乾癬の疾患原因遺伝子が位置する領域であり、現在ヒトとブタ間のこの領域の遺伝子構成の差異を明らかにするために塩基配列の比較と新遺伝子の探索を行っている。以上述べたように SLA クラス I 領域の塩基配列決定は現在約 60%程度が終了し、この領域の物理地図が明らかになりつつある。すなわちブタからヒトへの異種移植を進める上で重要なブタとヒトの MHC クラス I 領域の遺伝子構成の相違、ブタの疾患の発症に関与する新遺伝子や上述の背脂肪厚などの経済形質に関与する新遺伝子及び多型マーカーの探索、並びに発現 SLA クラス I 遺伝子の数や塩基配列などの多型性の解析に必要な基礎

的データが整いつつある。

2). SLA クラス II 領域の遺伝子構成とクラス II 遺伝子  
SLA クラス II 領域は、BAC コンティグによってクラス III 領域からセントロメアをはさんで長腕側の約 0.5 Mb の領域を占めていることが明らかになった (図 1)。SLA クラス II 領域は、ヒトクラス II 領域ときわめて類似した遺伝子構成を示すが、クラス II 領域全体の長さは HLA クラス II 領域の約 1/2 と短い。一方、ウサギやウシではハプロタイプによってクラス II 領域の長さが異なることが知られており、今回解析された H10 ハプロタイプ (ラージホワイト) 以外のハプロタイプを持つブタについてもクラス II 領域の長さの解析が必要であろう。

BAC コンティグのサザンハイブリダイゼーション解析からクラス II 遺伝子としては DRA 遺伝子は 1 個、DRB 遺伝子は 3 個の存在が認められた。cDNA クローンや PCR 産物の塩基配列解析からも DRB 遺伝子群は 1 個の発現遺伝子と 2 個の偽遺伝子から構成されていると考えられており、ブタの DRB 遺伝子はヒトの DRB 遺伝子のようにハプロタイプによって遺伝子数が異なるという報告はない。

DQ 遺伝子座は 1 個の DQA 遺伝子と おそらく 2 個の DQB 遺伝子が含まれると考えられている。ブタと同じ偶蹄類に属するウシでは 2 種類の DQ 分子の発現が認められているが、ブタにおいては cDNA クローンの解析から少なくとも 1 種類の DQ 分子の発現が明らかになっている。

DP 遺伝子座については、DPA 遺伝子は DMA 遺伝子のテロメア側にマップされるが DPB 遺伝子は Chardon グループが作成した BAC コンティグでは存在が確認されていない。ブタの DPA, DPB 遺伝子の cDNA クローンは同定されていないことや免疫化学的手法などによっても DP 抗原が検出されないことから、ブタでは DP 分子は発現されていないと推定されている。しかしながら、Chardon グループが BAC ライブラリーの作成に用いた系統とは異なる系統のブタを用いたコスミドクローンの解析では DPB または DPB 様遺伝子の存在を示唆する報告もあり、DPB 遺伝子の有無が系統によって異なるのかは今後の解析が必要であろう。また、DPA 遺伝子のテロメア側にはヒトと同様 COL ( $\alpha 2$  collagen) をはじめとする RXRB, KE4, KE6 の各遺伝子が位置している。

DO と DM 分子については、筆者のグループが DOA と DMA 遺伝子の cDNA クローンを分離しており、ブタにおいても両分子が発現している可能性が示唆されている。図 1

のマップでは DNA 遺伝子のプローブを用いた解析は行っていないことから、マップ上に DOA 遺伝子の記載はないが、DOB, DMA, DMB 遺伝子とその周辺の TAP や LMP 遺伝子のクラス II 領域上の位置はヒトとブタで保存されている。

### 3. SLA 遺伝子の多型性

#### 1). SLA クラス I 遺伝子の多型性

SLA クラス I 遺伝子の多型性は PD1 (SLA-1) 遺伝子は 4 種、PD14 (SLA-2) 遺伝子は 5 種、PD7 (SLA-3) 遺伝子は 4 種の対立遺伝子が報告されており、 $\alpha 1$  と  $\alpha 2$  ドメインに多型が集中している。 $\alpha 1$  ドメインはヒトクラス I 遺伝子と同様に抗原結合に重要な 9, 24, 66~74 番目付近のアミノ酸が主として多型を示し、 $\alpha 2$  ドメインは  $\beta$  シートのアミノ酸にも多型がみられるが、 $\alpha$  ヘリックスに特に多型が多く見られ、ブタのクラス I 分子上の多型性を示すアミノ酸の分布は、ヒトのそれと似ているが一部異なった多型パターンを示す。

また、異種移植の際、ブタのクラス I 分子がヒトの免疫系細胞でどのように認識されるかをヒトとブタのクラス I 遺伝子のアミノ酸配列比較から推定すると、ヒトの NK 細胞抑制レセプターに結合する MHC クラス I モチーフが SLA クラス I 分子には存在しないことから、SLA クラス I 分子はヒト NK 細胞による傷害を阻止できないことが示唆されている。一方、MHC クラス I 分子の  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  ドメインでヒト CD8 分子の結合に必要なアミノ酸は 2 アミノ酸残基を除いてブタ SLA クラス I 分子上でも保存されている。これらのことからヒト CD8 陽性 T 細胞は SLA クラス I 抗原を発現している細胞と反応しうると考えられる。

現在 SLA クラス I 遺伝子の多型性のデータはきわめて少なく、我々も種々の系統のブタにおける発現 SLA クラス I 遺伝子の種類と多型性を解析するために、各クラス I 遺伝子座特異的なプライマーを設計し、RT-PCR と塩基配列決定による多型解析を開始している。SLA クラス I 遺伝子の多型性の特徴を明らかにすることによって上述のような異種移植におけるブタのクラス I 分子のヒト生体内での認識に関する解析も進むものと考えられる。

#### 2). SLA クラス II 遺伝子の多型性

SLA クラス II 遺伝子の塩基配列レベルでの多型性の解析は、これまでに DRA, DRB, DQA, DQB, DMA 遺伝子について行われている。SLA 遺伝子の場合、WHO Nomenclature Committee によって対立遺伝子の名称が

統一されている HLA 遺伝子と異なり、個々の研究者が個別に対立遺伝子の名称を付けているため、同一の配列を複数の研究者がデータバンクに登録している場合もあり、系統名などの情報も十分ではないことが多い。

SLA-DRA 遺伝子は 7ヶ所の 1 塩基の多型が見いだされているが、これらはすべて同義置換である。一方、DQA 遺伝子はヒトと同様に第 2 エキソンに多型が集中しており、現在 3 種の対立遺伝子が報告されている。SLA-DRA 遺伝子は、SLA-DQA 遺伝子と 60% のアミノ酸相同性を示すのに対して、HLA-DRA 遺伝子と 83% の高いアミノ酸相同性を示し、ヒトとブタの DR $\alpha$  鎖はアミノ酸の長さも同一であることから、進化の過程でヒトとブタの分岐前にクラス II  $\alpha$  鎖の祖先遺伝子が DRA と DQA 遺伝子に分かれていたと推定される。

SLA-DRB1 と HLA-DRB1 遺伝子、SLA-DQB と HLA-DQB1 遺伝子はともに 80% 前後のアミノ酸相同性を示し、これら SLA  $\beta$  鎖遺伝子の第 2 エキソンは HLA-DRB1, -DQB1 遺伝子と同様に多型性に富んでいる。SLA-DRB 遺伝子の第 2 エキシソンの多型性解析では発現遺伝子である DRB1 は計 42 種の対立遺伝子が報告されている他、偽遺伝子である DRB2 は 9 種、DRB3 は 4 種の対立遺伝子が報告されている。

DQB 遺伝子の第 2 エキシソンの多型性解析では計 23 種の対立遺伝子が報告されている。DRB, DQB 遺伝子の第 2 エキシソンの対立遺伝子間で多型性を示す部位は、ヒトとブタで比較的類似している。ヒトの DRB1, DQB 遺伝子の抗原認識部位をブタの DRB1, DQB 遺伝子のアミノ酸配列に重ね合わせるとこれらの遺伝子の対立遺伝子間で多型性を示すアミノ酸残基に相当する場合が多く、報告されている SLA-DRB1 遺伝子の各対立遺伝子間では 16 個の抗原認識部位のなかで、15 個が非同義置換である。一方、HLA-DRB1 遺伝子ではほとんど多型が見られない第 2 エキシソンの後半、アミノ酸 115 番目周辺の領域に SLA-DRB1 遺伝子では比較的多くの多型が見られること、逆にこの領域は SLA-DQB 遺伝子ではほとんど多型が見られず HLA-DQB1 遺伝子では比較的多くの多型が見られるなどの特徴がある。

以上述べたように SLA クラス II 遺伝子の多型性はクラス I 遺伝子に比べると比較的多くの系統 (DRB1 遺伝子の第 2 エキシソンの場合で 10 数系統) について解析されている。現在飼育されているブタのほとんどの系統は系統間での交雑を繰り返しており、各系統特有のハプロタイプを見いだすことは困難であるといわれている。しかしながらクラス II 遺伝子の場合でも解析された各系統の頭数はほとんど数頭であり、さらに頭数を増やした

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	83
SLA-										
DRB*C	HFLHOLKFECHFNGTERRVLLORNCYNGEEYVRFDSVDGEYRAVTELGRPD	AKYRNSOKDLLEORRAAVDTYCRHNYR	ILDT							
DRB*D	L	E.QY	FL	DW	E					
DRB1*5	L	E.QY	FL	DW	E					
RH36-2 (Mexican hairless)	L	E.QY	FL	DW	E					
DRB1*7	YL	E.QY	FL	DW	E					
RJ43-6 (Clawn)	YL	E.QY	V	DW	E					
DRB*S02	FLG	0	E.QY	F	NY	E				
DRB1*4	FLG	0	E.QY	F	NY	E				TS..
RM33-1 (Meishan)	FLG	0	E.QY	F	NY	E				
DRB1*6	FLV.D	E.QY	H	W	I	K	E	V		
RY28-5 (Yorkshire)	FLV.D	E.QY	H	W	I	K	E	V		
DRB*S06	FLV.D	KOY	H	W	M					
RG1-3 (Göttingen)	FLV.D	KOY	H	W	M					
DRB*G15	FLV.D	KOY	H	W	M					TS..
RG0*C (Göttingen-cDNA)	FLV.D	KOY	H	W	M					TS..
RG0*G (Göttingen-cDNA)	FLV.D	KOY	H	W	M					TS.S
DRB1*8	FFME	D.HY	IL	E	DW	R	I	E		S..
RH37-5 (Mexican hairless)	FME	D.HY	IL	E	DW	R	I	E		
DRB1*03	FFMG.S	Y.LKYL	F	L	E	W		EK		GVS.S
DRB*S01	FFMG	Y.KYL	F	L	E	W	M	K	V	
DRB1*2	FLR.A	R	D.YF	D	F	E	C	W	L	F
DRB1*3	FLG.A	D.YF	D	F	E	F	S	W	FM	K
DRB1*1	LV.H	R	L	D	YF	F	W	I	DS	S
RY26-5 (Yorkshire)	LV.H	R	L	D	YF	F	W	I	DS	S
HLA-										
DRB1*0101	R	W	E	CI	O	S	E	W		GVGES
DRB1*15021	R	W	P	R	F	D	YF	O	S	E
DRB1*0405	R	E	V	H	F	D	YF	HO	S	E
DRB1*1302	R	E	Y	S	T	S	F	D	YF	H
DRB1*09012	R	K	D	Y	H	G	I	O	N	V

図3. SLA-DRBとHLA-DRB1遺伝子の第2エキソンのアミノ酸配列

\* はヒトのDRB1遺伝子で推定されている抗原認識部位。( ) は今回解析した系統名。下線はこれまで報告のない新対立遺伝子を示す。

---

解析が必要であろう。また、系統によってはそれぞれの飼育場で系統内の交雑が繰り返され、かなり限定されたタイプが見いだされるものもある。いずれにしてもクラス I, II 各遺伝子の DNA タイピングを種々の系統のブタについて数多く行い、SLA 遺伝子の多型性の特徴を明らかにしていく必要がある。

### おわりに

数年前から異種移植やブタとヒトの比較ゲノム解析などの興味から少しずつ SLA 遺伝子の解析を始めた。この頃は SLA 遺伝子の cDNA クローンやコスミドクローンがいくつか同定されていた程度であり、我々が 10 数年前に HLA 遺伝子の研究を開始したころの状況とよく似ていた。ブタゲノムはヒトゲノムと違って研究者数も研究費も少なく、SLA の研究グループも世界的に見ても数える程しかない状態である。事実、昨年 7 月にミネアポリスで行われた家畜に関連したゲノム解析の学会である国際動物遺伝学会でも、SLA 関連の演題は Chardon グループと我々のグループのみであった。しかしながら 10 数年前と比べて格段に進歩した分子生物学的な手法をはじめする様々な解析技術や豊富な情報を利用してなんとか早く HLA と同じレベルで SLA を語る状況にしたいと考えている。SLA 研究から得られる知見は初めに述べたように異種間移植における MHC の役割の解析や異種移植のためのヒト MHC 遺伝子を組み込んだブタの作成、SLA 遺伝子固定ミニブタを用いた種々の抗原や薬剤に対する免疫応答性の研究、MHC 遺伝子の進化過程の解析、畜産学領域における抗病性品種の選択などの様々な領域における発展性が期待できるであろう。

“Long-term feto-maternal microchimerism”:

造血細胞移植の新たな可能性を求めて

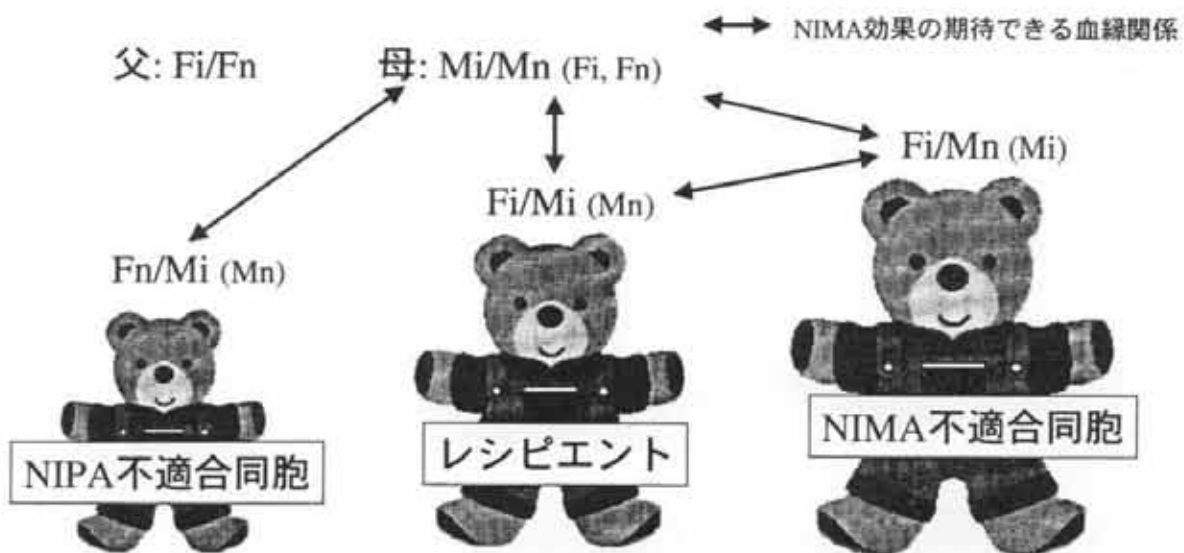
京都大学大学院医学研究科・血液病態学 一戸 辰夫

HLA 研究所 丸屋 悦子

はじめに

哺乳類は種の再生産を体内で営む唯一の脊椎動物であり、組織適合性を考えるものにとって、妊娠は最大の謎といってもよいほどの不思議な現象です。「母児間免疫寛容」として知られる妊婦と胎児の間の神秘的な共生のメカニズムは爆発的に生物学の発展した 20 世紀においても、ついで秘密のベールをめぐことはありませんでした。非自己 HLA に対する寛容がどのようなメカニズムで誘導されるのかというこの問題は、まさしく生物学の一大命題に違いありません。しかしさらに驚くべきことは、偉大な輸血学者のある発見をきっかけに、児は妊娠期間のみならず、成人となった後も全ての非自己 MHC の中で、母 MHC に対してだけは unresponsiveness を維持し続けるのでは、というまさに免疫学の根底に関わるような大

仮説（これを「Claas と van Rood の仮説」と呼びましょう）が提出され、最近この仮説を支持する様々な臨床的観察が蓄積されつつあるということです。彼らの提唱した非遺伝母組織適合性抗原に対する児の獲得寛容、というアイデアは、さらに母から見た場合の配偶者由来 HLA に対する獲得寛容の可能性も含めた母子同胞間長期免疫寛容というコンセプトに発展しつつあります（図 1）。本稿では、私たちがライフワークと考えている MHC 不適合造血細胞移植法に、この「Claas と van Rood の仮説」をどのように応用していける可能性があるかを、積極的に説法となることを承知でおしゃべりさせていただきたいと思ひます。



$F_i(n)$ =レシピエントから見た時の遺伝（非遺伝）父ハプロタイプ  
 $M_i(n)$ =レシピエントから見た時の遺伝（非遺伝）母ハプロタイプ  
 ( ) 内はマイクロキメリズムで検出可能な非遺伝ハプロタイプ

図1：母子間長期免疫寛容仮説に基づいた新しいドナーの選択方法

### 母児間免疫寛容は妊娠後も持続する？

妊娠中に母由来の抗原に接触すると、児はその抗原に対するトレランスを獲得するらしいということは、1950年代から知られていました。Rhesus D 抗原の不適合妊娠はよく知られた新生児黄疸の原因ですが、同じ Rh 陰性の妊婦が Rh 陽性の胎児を妊娠した場合でも、自分の母親が Rh 陽性であった者は、母親が Rh 陰性であった者に比べて、抗 Rh 抗体を作りにくいという現象が報告され、“Grandmother theory” と称されています。しかし、非自己 MHC に対しても同様のメカニズムが成立するというコンセプトの出現には Leiden 大学の鬼才 Claas と van Rood の出現を待たなければなりません。そこでまず、Claas らが母 HLA の移植免疫学における重要性をどのように明らかにしていったのか、その過程を簡単に振り返ってみたいと思います。

腎移植を待機中の慢性腎不全の患者さんにとって、頻回の輸血によって生じる抗 HLA 抗体の出現は大きな問題です。エリスロポエチンが使用可能となる以前にはこの問題は非常に深刻でしたので、1980 年代後半、Claas らは、患者さんと class I が一座だけ異なるリンパ球のパネルに患者さんの血清を反応させ、“permissible mismatch” を見つける方法を開発し、輸血量の多い患者さんに対しても腎臓ドナーを見い出すことを可能としました。ここで生まれる問いが、“permissible mismatch” はどのように決定されているのか、ということですが、彼らは全くユニークな視点からこの問題にアプローチを行い、“acceptable mismatch” を予測可能とさえ言える大胆な仮説を提出したのです<sup>1)</sup>。彼らは腎移植を待つ 26 人の患者さんを対象に、すべての class I を網羅するパネルで抗 HLA 抗体のスクリーニングを行うと同時に、患者さんの両親の HLA をタイピングすることにより、26 人中 15 人においては“permissible mismatch” の中に、患者さんに遺伝しなかった母親のハプロタイプ由来の HLA (non-inherited maternal HLA antigens; NIMA) が含まれていることを発見しました。一方、非遺伝父 HLA (non-inherited paternal HLA antigens; NIPA) が“permissible mismatch” に含まれていた患者さんは、わずかに 25 人中 2 名であり、「NIMA に対しては免疫反応が起こりにくい」ということが有意差を持って示されました。また興味深いことに NIMA や NIPA が“acceptable mismatch” となっていない患者さんでは、それらの抗原に対する同種抗体が産生されていることがわかりました。この結果から、彼らは次のような議論を展開します。すなわち、妊娠期間中に母児間では臍帯血を介して体細胞の交換が起こっており、妊娠早期に母の細胞が流入した

時には母抗原に対する unresponsiveness が誘導され、妊娠後期に流入した場合には母抗原による immunization が起こるのではないだろうか、そしてこのように誘導された母抗原に対する tolerance は、場合によっては生涯持続することもあるのではないだろうか、という仮説です。この仕事のインパクトは相当なものであったと推測されますが、不思議なことに、少なくとも造血細胞移植の業界ではつい最近まで、あまり話題にのぼることはなかったように思います。Claas 自身この論文の中で、“The guidelines for selecting organ or bone marrow donors should perhaps be reconsidered.” と述べているのですが・・・。

### 腎移植における NIMA 効果

さて、Claas はこの画期的な論文の中で、ひとつの予言を残しました。およそ 50% の割合いで、NIMA に対する寛容が持続している成人が存在しているのだから、NIMA が不一致の移植片を受けた患者さんの約半数では、HLA 一致ドナーから移植を受けた患者さんと同等の graft survival が得られるはずである、というものです。そして 10 年後の 1998 年、この予想を支持する報告が、Wisconsin 大学の Burlingham らによって発表されました<sup>2)</sup>。彼らは、1966 年から 1996 年までの 30 年間に Seattle, Madison, Leiden などの 9 施設で HLA haploidentical な同胞から腎移植を受けた 205 人の患者さんの移植片の生着期間に関して retrospective な検討を行いました。その結果、不適合ハプロタイプが父由来であるか母由来であるかによって、移植片拒絶のリスクが異なっていることが判明したのです。実際の生着率を見てもみると、NIMA 不適合同胞では 5 年後 86%、10 年後 77% であったのに対し、NIPA 不適合同胞から移植を受けた場合では 5 年後が 67%、10 年後が 49% (どちらも  $P=0.006$  で NIMA 不適合 > NIPA 不適合) と明らかに NIMA 不適合例で移植成績がすぐれているという結果になりました。しかも、Claas の予想通り (予想以上?)、NIMA 不適合 haploidentical 同胞から移植を受けた患者さんの graft survival を、同時期に同じ移植施設で HLA 一致同胞から移植を受けた患者さんと比較してみると、NIMA 不適合同胞 = HLA 一致同胞という結果になっていたのです。この報告は NIMA が“permissible mismatch” であるということを実際に行われた移植の結果として証明した素晴らしい仕事ですが、必ずしも全面的に受け容れられたわけではなかったようです。例えば移植免疫学の大家である Opelz は、1985 年から 1997 年までに 22 ヶ国 49 施設で行われた腎移植例を対象に同様の解析を行い、NIMA 不一致同胞からの移

植と NIPA 不一致同胞からの移植では移植腎の長期生着率に差を認めなかったと反論しています。これに対する Burlingham の解答は、自分たちのデータセットは“pre-cyclosporine era”のものを含んでいるが、サイクロスポリンが導入された後、NIMA 不適合と NIPA 不適合の間での拒絶率の差が小さくなる傾向が見られているので、1985 年以降のデータセットを用いたことが Opelz が差を検出できなかった原因であり、サンプルも不均一に収集されているため評価が難しい、というものでした。

結局この論争はその後、決着のつかぬままということになっているようですが、Eurotransplant のデータベースに登録されている非血縁者間腎移植の解析からは、不適合 HLA-A 座がレシピエントの NIMA と一致する場合には、HLA-A 座が<一致している>場合よりも graft survival がすぐれている（もちろん不適合 A 座が NIMA でない場合よりもすぐれている）、というきわめて示唆的な報告がされています<sup>3)</sup>。興味深いことにこの研究では HLA-B や HLA-DR の不適合では「NIMA 効果」が認められません。これは HLA-A と HLA-B や HLA-DR の alloreactive CTL に対する immunogenicity に差があり、HLA-A に対するトレランスが誘導されやすいことを意味しているのかもしれませんが、しかし、もっと魅力的な仮説として次のような解釈も可能ではないか、と彼らは言うのです。つまり NIMA 効果とは active な免疫抑制機構であり、NIMA の HLA-A に接触することにより、免疫反応を抑制するようなカスケードが始動するのではないだろうか。たとえば、NIMA 不一致同胞間腎移植では、donor-specific transfusion (DST) がさらに graft survival を向上させることが知られているが、これは DST による NIMA への exposure が免疫抑制カスケードへのブースト効果となっているのではなからうか、というわけです。そしてこのような現象の観察は、次に述べる造血細胞移植での組織適合性というものを考える時、非常に重要な問題を提起してくるのです。たとえば本邦における HLA 血清学的一致非血縁者間骨髄移植での予後の解析からは、HLA-A 座のアリル不一致が最も重要という結果が得られています。ではその不一致がドナーの NIMA であった場合とそうでない場合にわけてみれば・・・

#### 造血細胞移植に NIMA 効果は存在するか？

“Pre-cyclosporine era”の造血細胞移植では、原則として HLA が一致したドナーから移植を実施しない限り、重症の移植片対宿主病 (GVHD) が起こることが常識でした。したがって多くの造血細胞移植医にとって、“permissible mismatch”というアイデアの浮かぶ余地

がなかったことは想像に難くありません。Haploidentical ドナーからの造血細胞移植では GVHD を防ぐために T 細胞を除去して行うことが通例です。しかし、移植片から T 細胞を除去することは、免疫回復の遅延から移植後に重症の日和見感染症をしばしば招来するばかりではなく、特に腫瘍性疾患の患者さんに対しては、移植片対腫瘍効果 (GVT) を弱め再発率を高めることにもつながってしまいます。最近 Perugia のグループが、大量の純化 CD34 陽性細胞を用いた移植方法で、かなりよい成績をあげているようですが、一般の移植施設で行える治療ではありません。一方、サイクロスポリンよりも優れた GVHD 予防効果を持つとされる tacrolimus (FK506) を用いて HLA 二座不適合血縁者からの移植を積極的に試みている施設も存在しています。しかし、一般的には HLA 部分不適合血縁者間移植を実施する場合、血清学的一座不適合までが acceptable と考えられているのが現状であり、たくさんの人々の努力によって公的造血幹細胞バンクがこれだけ発展したにもかかわらず、いまだにドナーを見出せない患者さんが数多く存在しています。このような背景を考える時、造血細胞移植医も Claas や van Rood にならって、貴重な HLA 不適合移植の成績から human immunology を素心に見つめ直し、次の世代のために donor availability を向上させる努力を積み重ねていくことが今こそ強く求められていると感じます。

果たして造血細胞移植においても、“acceptable mismatch”が存在するのでしょうか。これまでこのような観点からの研究はほとんど行われてきませんでした。実は最近「Claas と van Rood の仮説」を支持するような現象が観察されています。1988 年に初めての成功例が得られた臍帯血移植では、HLA の不適合座が多くても GVHD が比較的軽いため、現在非血縁者間においても三座不一致までの移植が実施されています。Duke 大学の Kurtzberg は、血縁者間 haploidentical 臍帯血移植において興味深い報告をしています。すなわち彼女たちが経験した症例で急性 GVHD の発症頻度を検討したところ、不適合ハプロタイプが母由来であった (NIMA 不適合) 10 例では全員が I 度以下であったのに対し、父由来ハプロタイプの不一致例 (NIPA 不適合) 5 例では 4 例に II 度以上の急性 GVHD を認めたというのです。症例数も少なく、これからまだ結論を引き出すことはできませんが、この観察は Cairo らの総説でも指摘されており、すでに NY 臍帯血バンクでは母 HLA も同時に登録されているようですから、いずれ非血縁者間臍帯血移植でも同様の傾向が認められるかどうかということが明らかにされることと思

います。本邦でもすでに 300 例以上の臍帯血移植が実施されていると推定されますが、母親の HLA が調べられていることはほとんどなく、そのような検討を行えないのはまことに残念と言わざるを得ません。

私たちは、山田赤十字病院の玉木茂久先生の提案で、愛知県がんセンターの松尾恵太郎先生・浜島信之先生のお力添えを得て、日本造血細胞移植学会のデータベースをもとに NIMA 効果を検討するワーキンググループを結成することができました。玉木先生はすでに母子間の hetero-to-homo 移植を成功させていらっしゃった後で、父子間と比較した際の MLR の傾向などから母子間免疫寛容の造血細胞移植への応用に大変強い関心を寄せられていました。しかし造血細胞移植学会の現在の report form には、家族の HLA を記載する欄は存在しないため、同胞間の部分不適合移植を対象とした NIMA 不一致と NIPA 不一致例における移植成績の比較を行うことはできません。そこで、私たちは両親から移植を受けた患者さんを対象に、母がドナーの場合と父がドナーの場合で、生存率や GVHD の発症に差異が認められるかをテーマに解析を行うことにいたしました。すると急性 GVHD の発症頻度や原病の再発率には有意差を認めませんでした。母移植片を用いた群の方が、父から移植を受けた群よりも高い生存率を示しているという結果になりました(図 2)<sup>9)</sup>。また統計学的には有意ではありませんでしたが、この傾向は特に HLA 不一致例のみを対象とした場合に顕著であったことから(5 年生存率: HLA 不一致母 64% vs. HLA 不

一致父 25%,  $P=0.08$ )、やはりこの結果には母子間における何らかの免疫学的優位性が示唆されているものと考えました。私たちは移植後の生存率に関与する因子の多変量解析も行いましたが、何と両親の性が唯一の予後因子(母 vs. 父の補正ハザード比=0.50,  $P=0.03$ )という結果が得られました。

現在、IBMTR においても van Rood を中心に HLA 二座以内不適合血縁者から移植を受けた 269 例を対象として、同様の解析が行われています<sup>10)</sup>。彼らは、母、父、NIMA 不一致同胞、NIPA 不一致同胞をドナーとして比較していますが、NIMA 不一致同胞において最も GVHD の発生頻度が低いという結果が得られており、やはり「Claas と van Rood の仮説」、すなわち NIMA に対する何らかの獲得寛容機構を示唆するものとなっています。しかし、私たちの解析結果とは異なり、各群における生存率に差は認められていないようです。実は当初 Claas と van Rood も、腎移植の解析を行うに当たり生着率に関しては母ドナーが父ドナーより優れているであろうという予測をしていましたが、同胞間では NIMA 効果が認められたのにもかかわらず、両親からの移植の場合にはこの効果は認められないことが証明しました。彼らは造血細胞移植に関してもほぼ同様の結果を得たということになるわけですが、特に両親からの移植時における JSHCT での解析結果との差異に関しては、非血縁者間骨髄移植で生存率に関与するローカスが NMDP では class II, JMDP では class I と全く異なる結果が得られたように、ethnicity による HLA

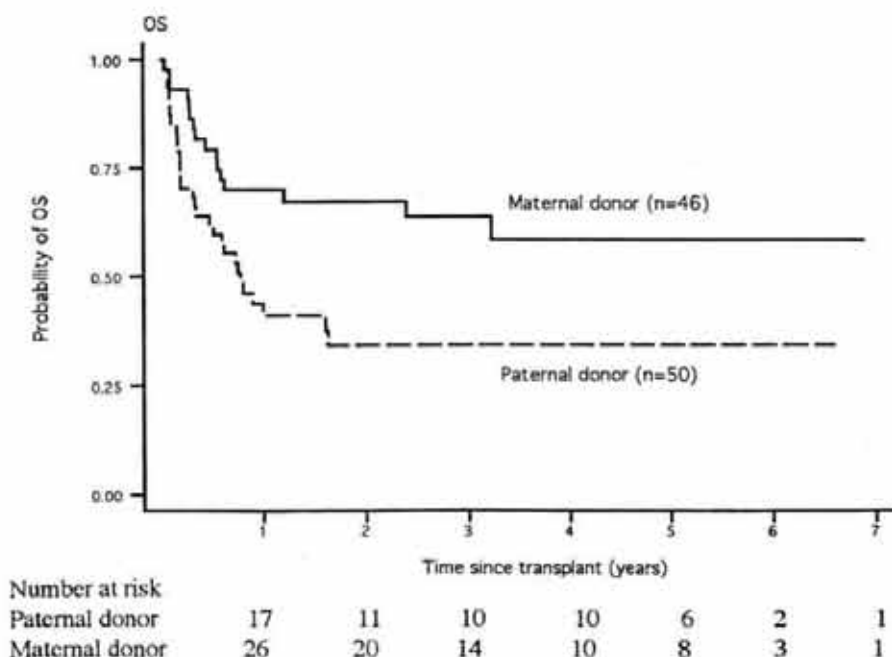


図2: 両親から実施された造血細胞移植における母子間と父子間での生存率の比較



アリル頻度の偏りも含めて慎重な解釈を与えていかなければならないと考えています。

### 母子間とNIMA不適合同胞間の免疫学的差異

私たちは、母子間とNIMA不適合同胞間は、いずれもHLA部分不適合造血細胞移植を行う場合には、他の血縁者間よりも免疫学的に優れたペアであると考えていますが、少なくとも腎移植の解析からは、母ドナーのNIPA不適合ドナー（父、NIPA不適合同胞）に対する優位性は示されていません。これに関しては、母は同胞と異なりレシビエントである配偶者由来組織適合性抗原に対してnaiveではないということが指摘されているわけですが、最近の総説の中で、Claasとvan Roodは、非遺伝ハプロタイプ（NIMA、NIPA）だけではなく、移植ドナーとレシビエントの間では、遺伝ハプロタイプ（inherited maternal/paternal antigens; IMA、IPA）も重要なのではないかと、という仮説を提出しています<sup>6</sup>。これは、NIMA効果と共有ハプロタイプ上のマイナー組織適合性抗原（mHA）によるプライミング効果を総合して組織適合性を考える必要があるかもしれないというものです。例えば、母と子の間では、母のNIMAと子のIPAの間にはトレランスが成立していますが、共有ハプロタイプであるIMAに提示されるmHAに対しては妊娠期間中にsensitizationが起こっているのかもしれない。このように考えると、母子間で移植を行った場合にはIMA上のmHAに対する免疫応答のプライミング効果によって、NIMAによる寛容誘導効果が相殺されてしまうのに対し、同胞間では共有ハプロタイプがIPAなので、そのような現象は起こらず、お互いのNIMAに対する寛容誘導効果のみが前面にあらわれる、というものです。この仮説の検証には膨大な数の移植症例を対象とした詳細なmHAの解析（まさに全世界的プロジェクトです）を行う必要がありますが、造血細胞移植にかぎって考えるとNIMA不適合血縁者からの移植では、IMA上に提示されるmHAがドナーとレシビエントでどの程度一致しているかということと、不一致mHAの発現の臓器特異性の解析が重要であるということになるでしょう。なお、マウスにおいて多くのmHAをコードすることが知られているミトコンドリアDNAは母系遺伝であり、母子間・同胞間では共有されているということもNIMA効果を考える上では、興味深い現象のひとつです。

### NIMA効果解明の手がかりを求めて

さて、現在私たちは、NIMA効果が成人においても持続していることの指標として、母子間長期マイクロキメリ

ズム（long-term feto-maternal microchimerism）という現象に注目しています。造血細胞のマイクロキメリズムは、Starzlらによって肝移植後の現象として広く知られるようになりましたが、古くは妊娠後のマウスの解析から見い出された現象で、すでに1970年代後半には、Liegeoisらにより、母マウス造血組織中には父由来の染色体マーカーを有した胎児由来の造血細胞が1/100以上の頻度で見い出され、拒絶もされずGVHDを起こすこともなく長期間存在し続けるということが知られていました。ヒトにおいても、妊娠中の母子間における造血細胞の双方向性の交通に関しては古くから関心が持たれ、1969年Walknowskaらが男児を妊娠中の母末梢血にはY染色体を有する細胞が存在するという報告を以来、様々な研究が行われてきました。当初、このような相互の造血細胞の流入は妊娠期間中においてのみ起こることと考えられていましたが、Schröderらは、間期核FISHを用いて、男児を出産後の女性では、1年後においても末梢血単核球の0.01~0.1%程度の頻度でY-bodyが陽性の細胞があることを見出すことにより、出産後においても児由来造血細胞が拒絶されずに残存する可能性を初めて明確に指摘しました。近年PCRによってさらに高い感度でこのようなマイクロキメリズムを検出しようという試みが行われるようになり、母子間においては、出産後も長期間お互いの造血細胞がマイクロキメリズムのレベル（1%以下）で存在し続けている場合があることが明らかになりつつあります。

SeattleのNelsonらのグループによって、このような母子間長期マイクロキメリズムと自己免疫疾患の発症との関連が指摘されていますが、私たちが行った検討からは全く異なった状況が浮かび上がりつつあります。私たちは非共有HLAアリルに特異的なプライマーを用いたnested PCR-SSP法によって造血細胞のマイクロキメリズムを検出する方法を開発し（図3）、自己免疫疾患を有さない25組の家系を対象に長期マイクロキメリズムの検出頻度に関する検討を行いました。その結果、驚くべきことに、母子間では約70%、NIMA不適合同胞間では約64%の頻度で長期マイクロキメリズムが成立していることが明らかとなりました。このことから、少なくとも日本人においては母子間長期マイクロキメリズムがかなり普遍的に起こっていることを意味するものと考えており、マイクロキメリズムは免疫異常というよりもやはり免疫寛容の指標として理解可能なのではないかと考えています。今後は、母子間長期マイクロキメリズムが「Claasとvan Roodの仮説」のpredictorになり得るかを検討するため、NIMA不一致血縁者間における造血細胞移植症

例でのマイクロキメリズムの存在と、GVHD の発生頻度や移植成績の関連を調べていく必要があると考えています。

### おわりに

以上、母子間免疫寛容の移植医療への応用の可能性について脇道にそれながらの私見を述べさせていただきました。非血縁者間移植を含めた alternative donor からの造血細胞移植は、GVHD の重症化を予測する指標が不十分であるため、医師にとっても患者さんにとっても、非常にストレスの大きな治療です。おこがましい考えであることは承知ですが、今後タイピストを含めた HLA 研究者・移植免疫学者と力を合わせるにより、ひとつでも多くの“acceptable mismatch”を見い出し、安全性の高いドナーの選択に寄与できるような知見を後世の人類に残していくことが、造血細胞移植に携わる全ての者の使命ではないでしょうか。最後になりますが、このような勝手なおしゃべりを原稿にさせていただく機会をお与えいただいた佐治博夫編集長に心より深く御礼を申し上げます。

### 文 献

- 1) Claas FHH, Gijbels Y, van der Velden-de Munck JJ, van Rood JJ: Induction of B cell unresponsiveness to noninherited maternal HLA antigens during fetal life. *Science* 241:1815, 1988.
- 2) Burlingham WJ, Grailler AP, Heisey DM et al.: The effect of tolerance to noninherited maternal HLA antigens on the survival of renal transplants from sibling donors. *New Engl. J. Med.* 339:1657, 1998.
- 3) Smits JMA et al.: Do noninherited maternal antigens (NIMA) enhance renal allograft survival? *Transplant. Int.* 11:82, 1998.
- 4) Ichinohe T, et al.: Superior outcome of blood and marrow stem-cell transplantations using maternal grafts over transplants using paternal grafts. *Blood* 96:208a, 2000.
- 5) van Rood JJ et al.: Effect of early exposure to non-inherited maternal antigens on outcome of haploidentical bone marrow transplants. *Blood* 96:840a, 2000.
- 6) van Rood JJ, Claas F: Both self and non-inherited maternal HLA antigens influence the immune response. *Immunol. Today* 21:269, 2000.

母 49 y.o. : A24-Cw1-B59-DRB1\*0405 / A24-Cblank-B61(B\*4006)-DRB1\*1201

娘 24y.o. : A24-Cw1-B59-DRB1\*0405 / A24-Cblank-B51-DRB1\*1201

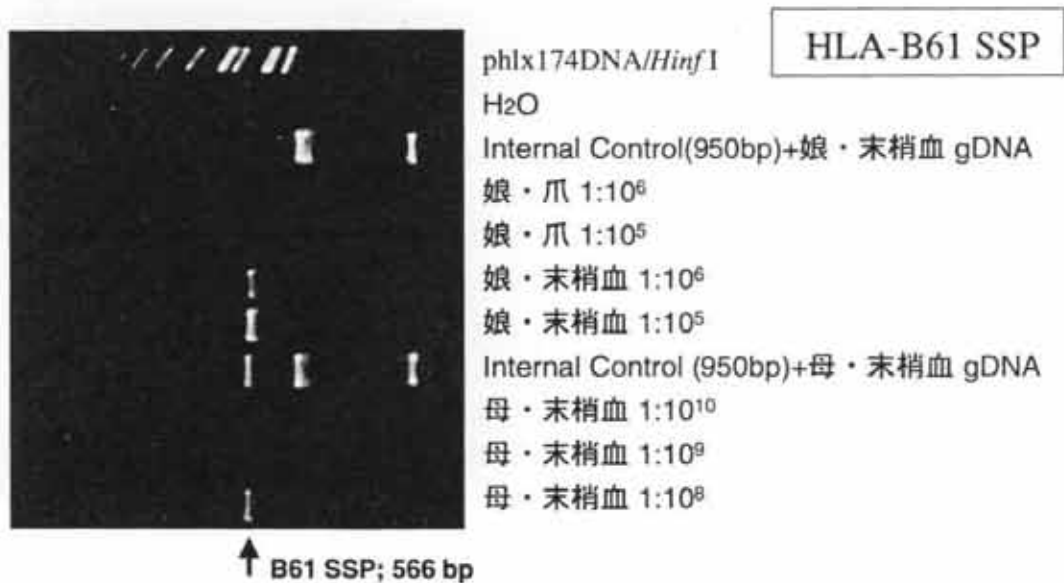


図3 : HLA特異的なnested PCR-SSPによるlong-term maternal microchimerismの検出

## MHC 遺伝子と進化

### —MHC 遺伝子からみた現生人類の起源と進化 (1)—

東京大学医学部人類遺伝学教室 大橋 順

前回までは MHC 遺伝子の進化について説明をしてきました。今回からは、MHC 遺伝子からみた現生人類の起源と進化について解説したいと思います。

現生人類の起源に関して、二つの対立する論争があります。「多地域進化説」と「アフリカ単一起源説」です。最古のヒトの化石はすべてアフリカ大陸から発見されていますので、人類の起源がアフリカにあることは間違いないと思われます。古生物学的な証拠から、ヒト属が最初にアフリカを出たのは 100 万年以上も前であることが分かっており、彼らはホモ・エレクトス (*Homo erectus*) と呼ばれています。ホモ・エレクトスは、アフリカを出た後に旧世界全体にまで拡散したと考えられています。多地域進化説では、旧世界に広がったホモ・エレクトスが、さらに現生人類であるホモ・サピエンス (*Homo sapiens*) へと、それぞれの地域でほぼ隔離された状態で独立に進化したと説明します。この説を主に支持するのは古生物学者です。現代人とその地域から収集されたホモ・エレクトスやホモ・サピエンスの化石の頭蓋骨や骨を比較すると、両者には類似点・共通点が多く観察されます。この事実から、現生人類への進化はそれぞれの地域で連続的に起こったと考えるわけです。

多地域進化説に対する強力な反証は、世界のさまざまな地域集団に属する 147 人の現代人のミトコンドリア DNA の解析からあがりました。ミトコンドリア DNA の RFLP データをもとに遺伝子系統樹を描いたところ、147 のミトコンドリア DNA は現代アフリカ人のミトコンドリア DNA から分岐をはじめ、全てのミトコンドリア DNA の共通祖先 DNA は、14 万年前から 29 万年前の間にアフリカに存在したと推定されたのです (図 1)。

年代は、ミトコンドリア DNA の分子時計から計算されました。この祖先 DNA がアフリカ起源と特定できたので、アフリカ単一起源説は、現生人類の直接の祖先であるホモ・サピエンスは比較的最近アフリカに出現し、その後世界中へと急速に拡散したと主張するわけです。この説が正しいとすると、ヒト属は 2 度の脱アフリカを経験していることとなります。

どの遺伝子にも必ず共通祖先遺伝子が存在しますので、ミトコンドリア DNA の共通祖先 DNA がアフリカに存在したこと自体は驚くことではありません。しかし、この結果をヒトの遺伝子全てを代表するかのように曲解して「現生人類はただ一人のアフリカ人女性から誕生した」とする間違っただけの解釈が生まれてしまいました。これを「ミトコンドリア・イブ仮説」といいますが、HLA のデータはこの仮説を完全に否定します。ミトコンドリア・イブ仮説では、HLA 遺伝子座で観察される多様性を説明することができないのです。

HLA 遺伝子は、機能を持つヒトの遺伝子としては最高度の多型性を示すことが知られています。「多型」とは、ある遺伝子座に関し、最も頻度の高い対立遺伝子の頻度が 99% 以下である状態と定義されます。一般的な遺伝子座では通常数個の対立遺伝子しか観察されませんが、HLA 遺伝子座には膨大な数の対立遺伝子が存在し、HLA-B 遺伝子座においては 300 種類以上、HLA-DRB1 遺伝子座においても 200 種類以上の対立遺伝子が報告されています (表 1)。もし、これほどの HLA 遺伝子の多様性が、ホモ・サピエンスの誕生後に生じたとすると、HLA 遺伝子座の突然変異率はかなり大きいはずですが、様々な分子進化学的解析から、HLA 遺伝子の塩基置換率はほかの遺伝子の塩基置換率と同程度 ( $1 \times 10^{-9}$  site/year) であることが分かってきました。

図 2 に、42 の HLA-DRB1 遺伝子の第 2 エクソンの塩基配列をもとに遺伝距離を計算し、UPGMA により描いた系統樹を示します。推定された塩基置換率  $0.97 \times 10^{-9}$  site/year を採用すると、計算された遺伝距離 0.01 はおよそ 1000 万年に相当し、HLA 遺伝子の多型性はおよそ 6000 万年以上も前から維持されてきたことが分かります。ヒト科の霊長類と旧世界ザルとが分岐したのが 3500 万年前ですから、6000 万年前から多型が維持されているのは驚きです。また、400~600 万年前と考えられるヒトとチンパンジーの分岐時に、およそ 18 のリネ

ージがヒトの系統に伝わったことが図2から想像できます。18のリネージがヒトの系統に受け継がれるためには、少なくとも9個体が必要です。このことは、チンパンジーからヒトに至るいかなる過程においても、アダムとイブは存在しなかったことを意味しています。

では、ヒトの先祖集団はどの程度の大きさだったの

でしょうか？チンパンジーと分かれた我々の先祖集団（創始者集団）は、少なくとも9個体からなるのは明白ですが、実際はかなりの大きさを持った集団であったと推測されます。なぜなら、運良く多数の対立遺伝子を受け継いだとしても、大集団でなければその後の遺伝的浮動の影響によりほとんどの対立遺伝子のリネージが集団中か

ら失われてしまうからです。合体理論を用いると、集団サイズの推定をすることができます。遺伝子は淘汰上中立であると仮定します。N個体からなる二倍体集団から(2N個の遺伝子から)、i個の遺伝子をサンプルしたとします。i個の遺伝子が、それらの共通祖先遺伝子に合体するまでに要する世代数は、平均  $T = 4N(1 - \frac{1}{i})$  世代と計算されます(ただし、Tの分散は大きい)。例えば、集団中から任意にサンプルされた2個の中立遺伝子は、平均2N世代遡ると共通祖先遺伝子に合体し、集団中の多数の遺伝子をサンプルしたとすると、平均約4N世代遡れば全ての遺伝子が合体します(1/i < 1より)。すなわち、100万個体からなる集団では、全ての遺伝子の共通祖先遺伝子に合体するまでには、400万世代必要になります。1世代が15年とする

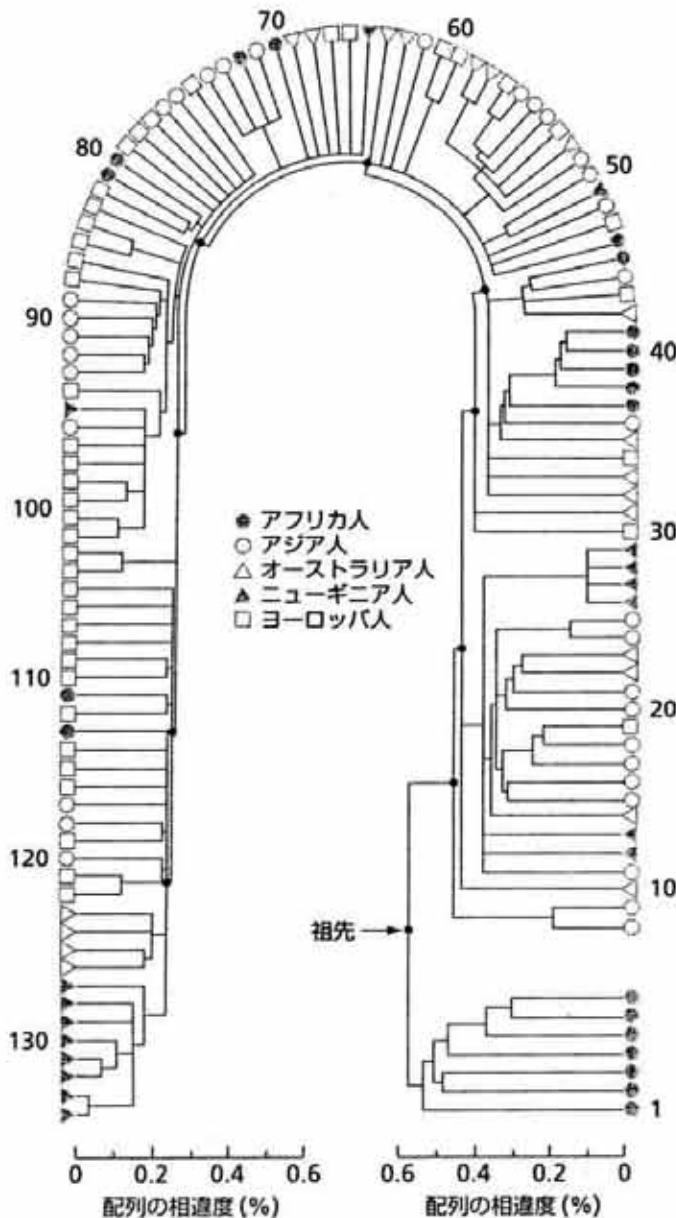


図1. 147人の現代人のミトコンドリアDNAのRFLPデータをもとに描かれた系統樹。

と、これは 6000 万年に相当します。このことから、HLA-DRB1 遺伝子が中立的な遺伝子であれば、ヒト集団は常時 100 万個体からなっていたと推定されます。

実際には、HLA 遺伝子座には超優性淘汰が働いています。超優性淘汰が働いていても、遺伝子系図の形状は中立な場合と変わらず、合体時間は  $T=Nf_s$  で推定できることが知られています。ここで、

$$f_s = \left( \frac{\sqrt{2Ns}}{2Nu} \right) \left[ \ln \left( \frac{Ns}{8\pi N^2 u^2} \right) \right]^{-\frac{3}{2}}$$

です。s は超優性淘汰

の淘汰係数であり、u は超優性遺伝子座での突然変異率です。s を 0.01~0.02 の範囲で、u を  $2.0 \times 10^{-6} \sim 4.5 \times 10^{-6}$  の範囲で変化させて、合体時間を 400 万世代(6000 万年) とすると、N は約 15 万から 30 万の範囲の値をとります。s や u の値は現実的ですので、ヒト集団の大きさは、過去 6000 万年の間、10 万のオーダーであったと推測できます。ミトコンドリア DNA の合体時間は

$T=N$  で計算されるので、約 1 万世代 (15 万年) が合体時間だとすると、集団サイズは 1 万個体と推定されます。HLA データからの推定値とミトコンドリア DNA から推定値の間には大きな差がありますが、合体時間の推定値は大きな分散をとまなうことがその原因かもしれません。いずれにせよ、祖先集団サイズを知るためには、さらに多くの遺伝子を調べる必要があるでしょう。

図 2 には、系統樹に描かれた対立遺伝子を 1%以上の頻度で保有する集団が含まれるグループが対立遺伝子名の右横に示してあります。調べた 37 集団は、アフリカ集団、ヨーロッパ集団、アジア集団、アメリカ先住民集団、オセアニア集団の 5 グループのいずれかに分類してあります。図 2 から、多くの対立遺伝子が世界中の集団で観察されていることが理解できると思います。もし、2 度目の脱アフリカを経験した集団が小集団であれば(厳しいボトルネックを経験したとしたら)、アフリカ集団以外からは限られた対立遺伝子しか見つからないでしょう。この事実から、「ほぼ孤立しながら生活していた複

数の小集団が、この時期に次々とアフリカを出たのではないか」と私は考えています。

遺伝子から得られるデータは、おおむねアフリカ単一起源説を支持するようです。しかし、我々の祖先が 2 度アフリカ大陸を出たとすると、それまでアジアやヨーロッパに住んでいたホモ・エレクトスはどこへ消えてしまったのでしょうか。彼らはホモ・サピエンスによって殺されてしまったのでしょうか、それともホモ・サピエンスがもたらした伝染病によって死滅してしまったのでしょうか。両者の間で混血は起きなかったのでしょうか。これは、未だに明らかにされていない大変興味深い問題です。この謎が解けたときにはじめて、現生人類の起源論争に完全決着がつくのではないのでしょうか。今回は、HLA 遺伝子からみた集団間の遺伝的近縁性について解説したいと思います。

表 1 WHO命名委員会で公認された対立遺伝子数 (2000年1月時点)

遺伝子座	対立遺伝子数
Class I	
A	168
B	344
C	90
E	5
G	14
Class II	
DRA	2
DRB1	241
DQA1	20
DQB1	45
DPA1	18
DPB1	88
DOA	8
DOB	3
DMA	4
DMB	6

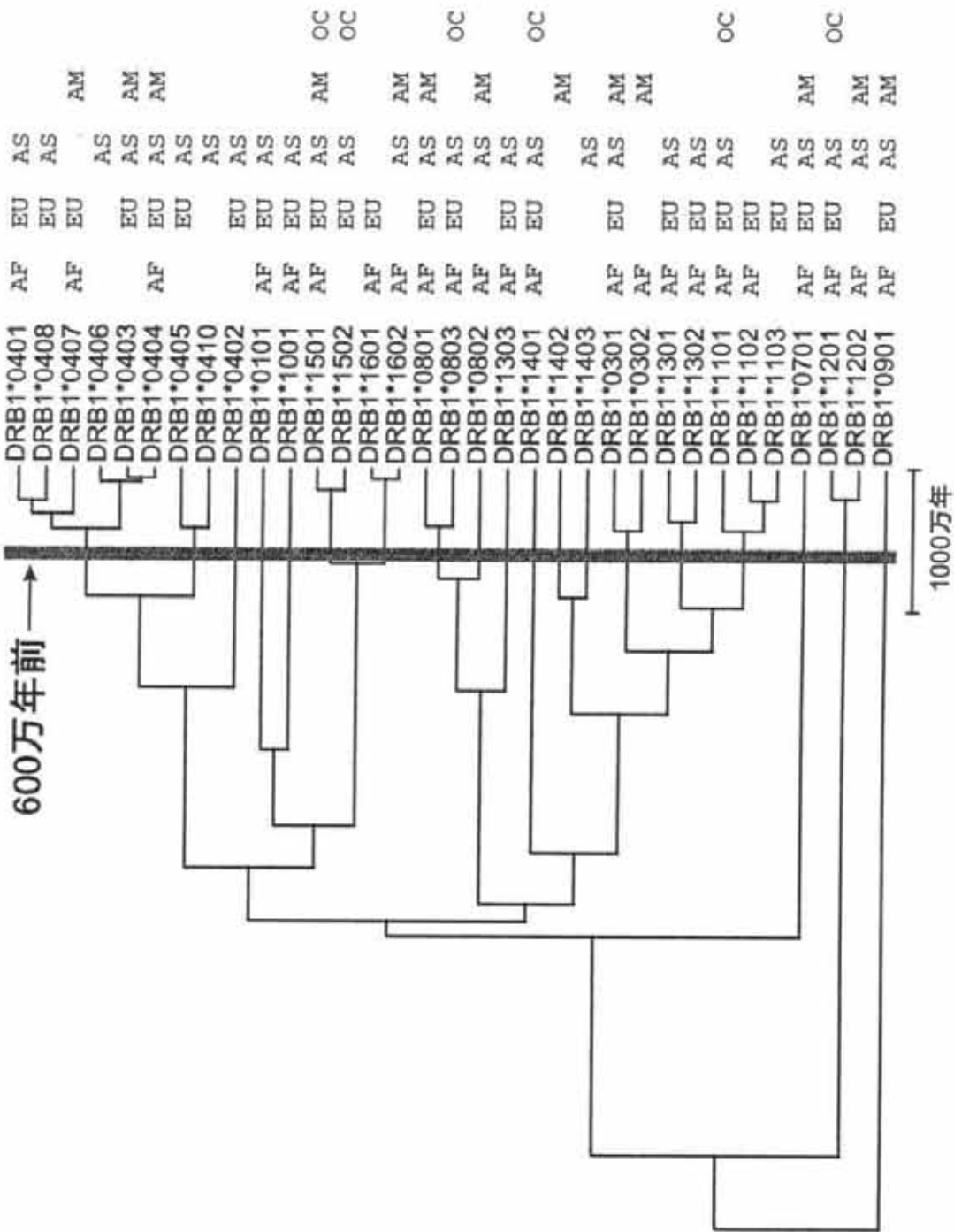


図2. HLA-DRB1対立遺伝子の第2エクソンの塩基配列をもとにUPGMAにより作成した系統樹とその対立遺伝子が観察される集団。世界の37集団を5つのグループに分け、各対立遺伝子について1%以上の頻度で観察される集団を含むグループを表示してある。AF: アフリカ集団(5) EU: ヨーロッパ集団(8) AS: アジア集団(16) AM: アメリカ先住民集団(6) OC: オセアニア集団(2)。( )内は集団数を表す。

前回、体細胞分裂と減数分裂について説明しました。その際、DNAの塩基配列が世代を通じてほとんど変わらずに受け継がれていく過程について説明しました。このような遺伝子の安定性は個体の生存にとっては重要ですが、変化する環境に適応できるようにする遺伝的変化の生成は、長期的に見た場合の生物の存続に重要だと思われれます。DNAを再編成できるという特質はこの意味で重要で、このおかげでゲノム中で、遺伝子の組み合わせを変えたり遺伝子の発現時期や発現レベルを変えることができるわけです。このDNAの再編成を可能にしているのは、遺伝的組換え (genetic recombination) という過程です。今回はこの遺伝的組換えについて説明しようと思います。この遺伝子の組換えとは、図-1の左のように、一对の染色体上に連鎖 (linkage) している遺伝子が、染色体の一部が入れ替わることによって、図-1の右のように遺伝子の組み合わせが変わる現象のことです。

遺伝的組換えには、普遍的組換え (general recombination) と部位特異的組換え (site-specific genetic recombination) の2種類に分けることができます。それぞれに分けてその意義と現象について説明します。

#### 【普遍的組換え】

普遍的組換えでは、遺伝的交換は相同な塩基配列の間

で起こります。減数分裂の際の相同染色体間の交換がこれにあたります。この交差 (crossing over) は、卵や精子の発生初期に、対合・密着した染色体の間で起こります。図-2に相同組換えの鎖間の遺伝子の交換を示します。また、普遍的組換えは、遺伝物質の分離の仕方によって相互的組換え (reciprocal recombination) と非相互的組換え (non-reciprocal recombination、或いは gene conversion) とに分類されます。

2つの二本鎖の間で一本鎖の交換が起こる反応は、普遍的組換えの反応の中でも遅く、進みにくい反応であると考えられています。この最初の交換が起こってしまえば並んだ2つの二本鎖の間での対合領域の拡大やもう一本の鎖の交換は迅速に起こりうるとされています。図-2にそって説明します。

①互いに巻きついてらせんを形成しているDNAの二本鎖の内の一方の鎖に、鎖が自由にほどこいたり巻ついたりするためにニックが入ります。

②こうすることにより別のDNA分子とヘテロ二重鎖が形成できるようになります。

③④最初に対を作った2つの相同なDNAが、4本の鎖の内の2本 (それぞれのDNAから一本ずつ) を互いに交換します。このクロスした状態のことを鎖間交換構造 (cross-strand exchange)、或いはホリデイ構造と呼びます。この構造は、塩基対をこわすことなく維持することができ、以下のような2つの重要な性質を持っています。

i) 2組の相同なDNA上の交換点 (図-2の2本の鎖が交わる場所) は、分岐点の移動によりDNAに沿って前後に迅速に移動できます。ii) 鎖間交換を行う構造は、2本の交差した鎖のペアと2本の交差していない鎖のペアからなりますが、この構造は一連の回転運動によって異性化するこ

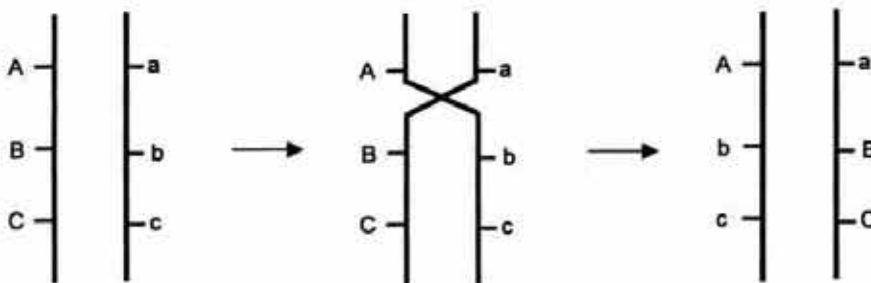


図-1 組換えとは

その逆も起こりうります。ホリデイ構造をとっている2つのDNAを再び分離して反応を終了させるには、2つの交差した鎖を切断する必要があります。交差している2本の鎖がホリデイ構造の異性化以前に切断されれば、元の2つのDNAはほとんど変化せず分離し、一本鎖DNAのごく短い部分が交換されただけの形になります。しかし、異性化反応以後に切断されると、元のDNAの半分同士がヘテロ二重鎖の継ぎ目を通してつながった形になり、2つのDNA間の交差が完了します。この切断再結合の過程は、とても正確であるのでヌクレオチドが増えたり失われることはありません。

この普遍的組換えに反応に伴っておきる非相互的組換え或いは、遺伝子交換 (gene conversion) について説明します。

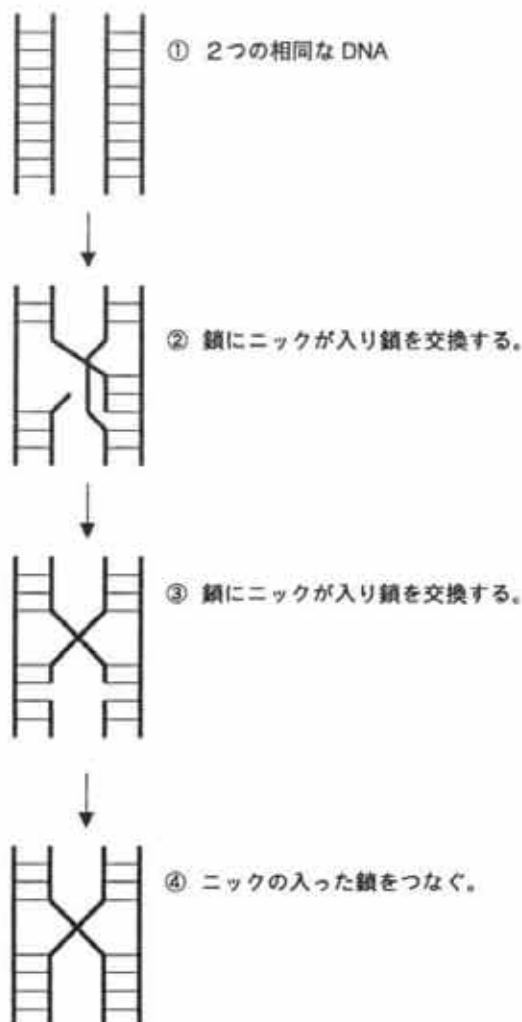


図-2 ホリデイ構造の形成

#### [遺伝子交換]

遺伝学の基本法則によれば、両親は子どもに対し遺伝的に同等の貢献をすることになっています。つまり、遺伝子の完全な1セットが父親から引き継がれ、別の1セットが母親から引き継がれます。従って、1個の二倍体細胞が減数分裂して4個の一倍体細胞を生じる時には、これら細胞の遺伝子のちょうど半分が母方、残りの半分が父方に由来します。例えば図-3bのように減数分裂で通常の普遍的組換えが起きた場合、父親と母親の対立遺伝子は同数存在します。しかし、図-3cのように母親の対立遺伝子 (B+) は3個生じますが、父親の対立遺伝子 (B) が1個しか生じない場合があります。つまり、父親の対立遺伝子2個の内の1個が母親の対立遺伝子に換わってしまったのです。この現象を遺伝子交換 (gene conversion) といいます。この gene conversion は、遺伝子の進化にとって重要であると考えられています。

では、どのような機構で起こるのでしょうか？

減数分裂の際には、母方と父方の相同染色体間の交差部位にヘテロ二重鎖の継ぎ目ができます。もし母方と父方の塩基配列がわずかに異なれば、ヘテロ二重鎖の継ぎ目は不適合塩基対をいくつかを含むこととなります。こうしてDNA中に生じた誤りはDNAの修復機構によって修復されます。この場合、父方の鎖のヌクレオチドが除かれて母方の鎖と対合する物に置き換えられる時も、その逆の時もときもあります。この不对合修復は結果として gene conversion となります。

前述したように、相補的な2つのDNA二重らせんの間でヘテロ二重鎖が形成されれば、普遍的組換えの引き金となります。つまり、二重鎖が形成されると組換えが起きるのであれば、脊椎動物細胞のゲノムにはよく似たDNA配列は何千とあるこの場所においても組換えが起こってしまうこととなります。しかし、実際には不完全に組み合わせられたDNA配列間での遺伝的組換え反応を防ぐような不对合構成系が働いて無差別の組換えを防いでいます。

次に部位特異的組換えについて説明します。

#### 【部位特異的組換え】

部位特異的組換えは普遍的組換えとは異なり、特異的な塩基配列を認識する組換え酵素によって起きます。組換えを起こすDNA分子間で塩基対形成を



する必要はありません。特定の部位で DNA の二本鎖を分離したりつないだりするこの組換えによって、いろいろな種類の動く DNA が染色体や染色体間を動き回ることができます。

この部位特異的組換えが最初に見つかったのは、入ファージと呼ばれる細菌に感染するウイルス（バクテリオファージといいます）が、大腸菌の染色体に出入りする現象でした。ウイルスが染色体に挿入された状態ではウイルスは細菌の染色体 DNA の一部として複製されます。ウイルスが細菌に感染すると、ウイルスにコードされている入インテグラーゼという酵素が合成され、組換え反応は複数のインテグラーゼがファージの環状染色体にある特異的な塩基配列のところに結合します。これにより

生じた DNA-インテグラーゼタンパク複合体は、次に細菌染色体の別の特異的塩基配列に結合し、細菌染色体とファージ染色体を引きつけます。インテグラーゼは、次に短い相同染色体領域を使って、連結部に小さなヘテロ二重鎖の継ぎ目を形成させ、DNA の切断・再結合反応を触媒します。インテグラーゼは DNA トポイソメラーゼ（以前に説明しました）に似ていて、DNA 鎖を切断する場所で DNA と可逆的な共有結合をつくります。入ファージはこの部位特異的組換えを機構を逆行させて、大腸菌染色体に挿入された状態から増殖サイクルに入ることができます。

また、入ファージと違って多くのウイルス（レトロウイルス等）や転位因子を含む動く DNA は、自身の DNA

を染色体に挿入するインテグラーゼをコードしていますが、染色体への組込みの機構は異なっています。入インテグラーゼ同様これら酵素も動く遺伝子の特異的塩基配列を識別し、組換えを触媒します。しかし、入ファージの酵素と違って、標的染色体に特異的な塩基配列を必要としないで、ヘテロ二重鎖の継ぎ目も作りません。その代わりにこれらの酵素は、動く遺伝子の線状 DNA の切れ込みを作り、次いでこの DNA 端が標的 DNA 分子を直接攻撃し、標的分子の中で近接して存在するホスホジエステル結合を切断します。このような切断過程のため、組換え DNA 分子には因子の両側に1か所ずつ、計2か所の短い一本鎖のギャップが残ります。これを DNA ポリメラーゼが埋めて組換え反応は終了します。

この様に、組換えといっても様々なタイプのものがあります。この様々なタイプの組換えが起こることにより染色体上の変異が生まれるわけです。

次回は、以前にも書いたかもしれませんが、インプリンティングとライオニゼーションについて少し詳しく説明します。

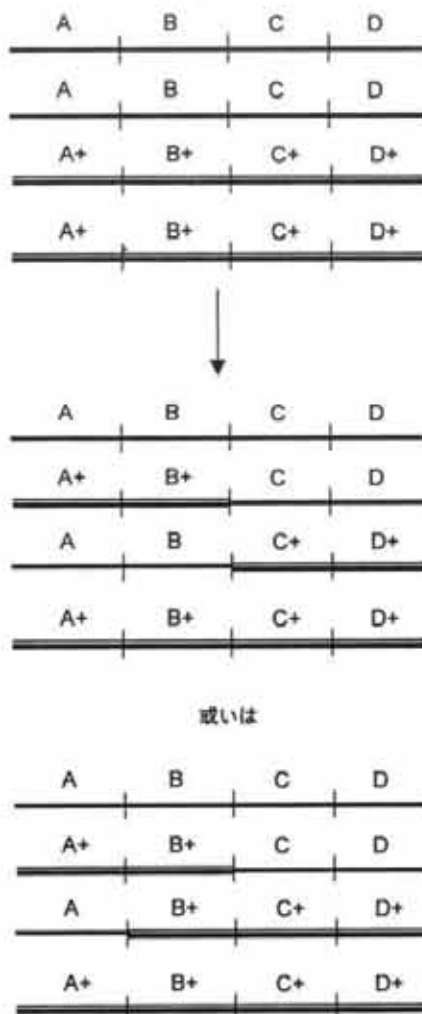


図-3 普遍的組換えと遺伝子交換

## — 異種移植：その環境と問題点 —

国立循環器病センター研究所 実験治療開発部・臓器移植研究室 佐田 正晴

### —異種移植の問題点—

提供されるドナー臓器数の限界から、同種移植のおかれている立場については前号で述べた。その限界と遺伝子工学のめざましい進歩ゆえに、21世紀の移植従事者は異種移植に大きな期待を寄せている。一口に異種移植と言っても臓器、組織、細胞移植に大別され異種ドナー動物の処理法も大きく異なっている。

同種移植と異なり異種移植には越えなければならない多くの障壁が立ちだかっている。最大の障壁はヒト血清中に既に存在している“異種抗体 (xeno-antibodies)”と MHC の違いによる“種のバリアー”であろう。異種抗体は IgM 抗体を主体とし無処理で異種移植を行った場合、超急性拒絶反応を引き起こし異種ドナー臓器機能を急速に低下するのみならず、形成された血栓によりレシビエントの生命すら失うことになる。

我々は10数年前から異種移植の実験を行っているが、体外循環装置を用いサル (ドナー) の心臓を無処理のヒトの血液 (レシビエント) で循環させると、循環開始 5分以内に出血性梗塞が起こり 15分以内に形成された血栓により心停止が起こってしまう。冠状動脈や毛細血管内腔は全て血栓で覆われ心臓全体が石のように堅くなり (ストンハート)、典型的な超急性拒絶反応の組織像を呈していた。

現在まで行われてきた異種移植の臨床や実験は、異種抗体を血漿交換 (plasmaphoresis) やドナー動物の臓器で交差灌流しヒト血清中から除去後、過剰な免疫抑制剤を投与し異種抗体の産生を抑制し速やかに移植を行ったり、免疫応答能の低い新生児に異種移植を行ったりする、いわゆる「受動的異種移植」が主流であった。しかし残念ながら、これら受け身の移植では移植後、数時間から数十日が限界で殆どのレシビエントは過剰な免疫抑制剤投与による感染症や形成された血栓による脳、心筋梗塞により死亡している。MHC の違いによる種のバリアーについても従来行われてきたヒト抗血清やモノクローナル抗体と動物のリンパ球を用いた細胞傷害試験では、一部の霊長類で HLA 抗原のクラスティングが可能のみで種のバリアーを越え、組織適合性抗原型を合わせることは不可能であった。

実験的な異種移植では、移植前処理としての全身 X 線照射 (Total body irradiation) や NK 細胞活性を抑制す

るための骨髄移植など、様々な処理を行い移植を行っているが臨床応用にはほど遠い。

### —異種移植をとりまく環境—

異種移植を行おうとするとき、最初に決定しなければならないのは「異種ドナー動物」の選定である。以前我々は、一部の霊長類の MHC 抗原が HLA 抗体やモノクローナル抗体でタイピングが可能で、HLA 抗原の一部を適合させ移植できることや免疫応答系がヒトに近いことから、チンパンジーをヒトのドナーと想定し異種移植の研究を行っていた。しかし当時、共同研究を行っていた京都大学霊長類研究所の人から「チンパンジーは飼育されているもの、自然界にいるものを含め地球上には1万頭しかいないが、人類は10数億もいるから人の心臓を逆にチンパンジーに欲しい位。現在霊長類の実験は動物愛護協会から厳しく監視されているからヒトのドナーには不適である」旨、指摘され霊長類をあきらめた。

異種ドナー動物の選定基準として、(1)臓器サイズ、(2)臓器供給数(繁殖力)、(3)個体数、(4)人畜共通感染症、(5)動物愛護問題、(6)倫理、社会的問題などが挙げられる。霊長類は(2)(3)(4)(5)(6)を、イヌや猫をはじめとするペット類は(1)(5)(6)の条件を満たさないため不適。残った動物として我々はミニブタをドナーに想定した。ミニブタは体重 20-50Kg でヒトの臓器サイズと一致し、一回産子数も多くまた性周期も約4ヶ月で繁殖力も強い。異種ドナー動物の選定で何時もつきまどっている(5)(6)の問題も、ブタが食用に供給されているためクリア出来ると考えられる。以上の観点から、現在、世界的にミニブタがヒトの異種ドナー動物の最右翼と目されている。

### —21世紀の異種移植は—

20世紀の異種移植は前述したように「受動的異種移植」が主流であった。しかし1993年、ケンブリッジ大学の D. J. G. White らがイミュトランス社との共同研究によりヒト遺伝子を導入したブタの作成に成功した。この「ヒトブタ」は“アストリド”と名づけられ、その後ヒト遺伝子を受け継いだブタは37頭誕生した。White らは、補体系の活性化を抑制する同種特異的膜上補体抑制因子であるヒト DAF (Decay accelerating factor) をマウスに導入しヒト DAF を発現したマウス細胞は異種抗体によ

---

る補体依存性細胞傷害に対し抵抗性を示す実験結果を踏まえ、将来ヒトに対する異種ドナー動物をブタに絞ってヒト DAF 遺伝子を導入したブタを作成した。この成功が引き金となり世界中でヒト遺伝子のブタ受精卵への導入が相次いで試みられるようになった。昨年には体細胞核移植によるクローンブタが誕生し、ブタの主要異種抗原である  $\alpha$ Gal 抗原のノックアウト化など、よりヒトに近いブタの作成が可能になりつつある。

21 世紀の異種移植は遺伝子工学的手法を駆使し「ヒトの仮面を被ったブタ」による「能動的異種移植」が主流となろう。日本では 3 系統のミニブタが飼育されている。我々のグループはブタの MHC である SLA 遺伝子の解析を行い、HLA と SLA を組み換え MHC の「種のバリエーション」による異種移植を計画している。現在、我々は HLA 遺伝子の導入をやりやすくするため SLA 遺伝子を固定し自由に SLA 遺伝子を制御するためのミニブタ家系の樹立と大量繁殖を始めるとともに、ミニブタの臍帯血細胞や骨髄細胞の遺伝子改変による再生医療のプロジェクトもスタートさせつつある。

オーダーメイド医療と再生医療が 20 世紀末のキーワードであったが、21 世紀はレシビエントの遺伝情報を組み込み、その人にあった移植医療を目指す「オーダーメイド移植」と「オーダーメイド再生医療」が主流となるだろう。

## 佐治博夫のまかせなさい！ HLA研究所 所長

saji@mbx.kyoto-inet.or.jp

hla@hla-labo.org

### 腫瘍免疫療法

多くの腫瘍細胞は変幻自在である。悠久の進化過程を極く短時間に行っているようなもので、次々に変異が蓄積される。一旦、宿主の免疫機構からエスケープした腫瘍は、人知をあざ笑うがごとく医療手段の裏をかく。固形腫瘍のアロ造血幹細胞移植をめざすある医師に書いた e-mail の一節をあげる。

「、、、腫瘍細胞の変幻自在さは人知の及ぶところではなく、pin pointの治療戦略は腫瘍の嘲りを生むだけでしょ。腫瘍は人が打つ手をつねに嘲笑するがごとく潜り抜け、勝ち誇ります。個々人が多様であり、腫瘍はさらに多様であり、もっと言えば腫瘍細胞の一個一個が多様です。この際、個々人の多様性を利用したSCTのGVL/GVT効果は戦略としてもっとも多角的に腫瘍の弱点を突くことができます。現存する戦略の中ではもっとも「総合的」といえるかもしれません」

説明を加える。腫瘍の治療は物理的切除の他に、化学療法と免疫療法がある。免疫療法は腫瘍抗原をターゲットにする樹状細胞療法がクローズアップされ、喧しく人口に膾炙しているが、現状ではアロ造血幹細胞移植が唯一の実際的手法である。造血幹細胞移植は大量化学療法・放射線療法のキュアとしての位置付けから、アロ免疫療法へ衣替えした。すなわち、ドナーT細胞の抗腫瘍作用が目的となりつつある。

ドナーCTLの標的分子は白血病(腫瘍)特異抗原か、それともアロ抗原であろうか、つまり GVL は抗腫瘍反応(抗変異自己抗原)か、あるいはアロ免疫反応であろうか。次のような経験と実験結果はGVL/GVT=アロ免疫の可能性を示している。

1. 同系骨髄移植(一卵性双生児間移植)ではGVLは起こりにくい。
2. GVHD発症例にGVL効果がより強く認められる。
3. 白血病動物にアロの白血病細胞を移植し、アロCTLを移入すると、CTLに対してアロ関係にある白血病細胞のみが排除される。

CTLの標的分子がアロ抗原であり、それが白血病細胞に表現されているときは、ほぼGVL/GVT効果が得られる。組織臓器への特異的発現はHLAクラスIになく、マイナー組織適合性抗原にある特徴である。腫瘍細胞に高密度で表現され、他組織上皮細胞には低密度で発

現または表現されないマイナー組織適合性抗原をターゲットにCTLが働くならば、GVHDのない理想的なGVL/GVT効果が期待できる。

問題は腫瘍細胞の宿主免疫監視機構、CTLやNKからのエスケープ戦略として、HLAクラスIの座位特異的欠失あるいはハプロイド欠失(ヘテロ接合性の消失: LOH; loss of heterozygosityと総称する)が考えられることである。つまり、HLAクラスIが完全に欠損すると、CTLからは逃れられるが、NKによって認識されるから、「部分的」HLA欠損・発現抑制によって、両作用細胞からエスケープして生き残るというシナリオである。LOHによって発現抑制されたHLAクラスI特異的に提示されるマイナー組織適合性抗原はアロ免疫の標的にはならない。造血幹細胞移植やドナーリンパ球輸血により確実にGVL/GVTを期待するには白血病細胞へのHLAの表現を確認し、LOHの有無、表現されているHLAを同定しておくことが大切になる。DLIはリスクを伴う方法であるが故に、腫瘍細胞のHLAクラスI遺伝子やその発現を確認する手段が必要になろう。

開発されつつある樹状細胞療法や腫瘍ワクチン療法はいわばピンポイントをつく治療法が多い。腫瘍の著しい変異能力はショットガン的である。ピンポイント治療はショットガンにピストルで対抗しているようなものである。ショットガンにはショットガンで対抗したい。造血幹細胞移植というショットガンを見直す時と思う。

### 母児免疫寛容を造血幹細胞移植へ応用する

輸血やHLA領域から発信された「母児免疫寛容」現象は、哺乳動物が発祥して以来、1億年の歳月をかけて進化的に獲得された現象と見てよい。もともと東洋医学は「内なる力を引き出す」方法論をとり、調和を目指す。「母児免疫寛容」は内なる力と見てよい。それを造血幹細胞移植に利用するのは「内在する力」の応用であり、東洋医学的発想である。提唱してすでに久しいが、一部の若手医師たちが同調してくれるようになった。本号\*に執筆願った一戸辰夫先生はわが同志である。詳しくは本文をお読み願いたい(さ)。

\*"Long-term feto-maternal microchimerism": 造血細胞移植の新たな可能性を求めて

京都大学大学院医学研究科 血液病態学 一戸辰夫

年明けから頻りに流されたCMのひとつに、スーパージェッター、サンダーバード、ウルトラマン、サイボーグ009の懐かしい場面（いずれも携帯小型機による通信の場面）に「子供の頃に夢みたことが現実になった」とのナレーションが入ったものがある。言うまでもなく某大手通信会社のCMであるが、ここ数年で爆発的に普及した携帯電話は、単に音声通信のみならず、文字や画像を含めた通信をも可能にしている。通信機器の小型化、高性能化のスピードには目をみはるものがあり、また広範な普及と機器の低価格化が良循環を形成し、一層の技術開発に拍車をかけている。ここで重要なことは、そのような高性能情報伝達手段がこの数年で一般の人々に普及したことにある。

子供の頃の夢が現実になりつつあるのは情報通信機器のみに限らず、昨年末に発表された人型二足歩行ロボットは、10年単位の近い将来に鉄腕アトムが登場するのではないかと、さらにはドラエモンの登場も今世紀中にならぬのではないかとの期待さえ抱かせる。ゴジラの登場はともかくとしても、ジュラシックパークにあったような絶滅生物の復活は、遺伝子操作技術や胚操作技術をもってすれば近い将来にかなうものであり、鉄腕アトムの登場よりも現実的であると思える。

ただ、一般の人々がこのような科学技術の進歩の恩恵を受けるためには、先端技術のコストダウンが必須であると言える。コストダウンのスピードが技術の汎用化を決める典型的な例が宇宙への進出であろう。アポロ11号が月面着陸してから既に30年になるが、スペースシャトルの採用によるコストの削減化がはかられているにしても、宇宙旅行への道はまだまだ遠い。もちろん、宇宙への進出には膨大なエネルギーを必要とするためコストダウンが困難なのであるが、エネルギー効率を大幅に改善するような技術革新がない限り、宇宙旅行は夢に止まる。その点が通信革命、二足歩行ロボット開発、生命操作などとの大きな違いである。

しかしながら、技術進歩のスピードに人間は果たして追い付いているのであろうか？ 殊に生命現象に関わる技術の進歩には驚嘆すべきものがあるが、その応用を一步間違ると、生命そのものの尊厳さえ失いかね

ない。ヒトを対象としたクローン実験がどこまで許されるのかの議論が進められているが、動物や植物を対象とした生命操作実験についても、その可能な範囲に関する議論が必要であろう。「人類のため」であることが、生命操作を行う免罪符となってよいのであろうか？ それを判断する上で生命に関する高い倫理感が必要となるが、そのためには生命に関する広範かつ深遠な知識が必要となる。ヒトとはなにか？ ヒトは他の動物とはどこがどのように違うのであろうか？ その疑問は、生命科学技術が一般の人々に普及する時代が迫っている今だからこそ、問うべきことではないだろうか？

一方、通信革命には恩恵があると同時に、それを利用する人間には情報倫理とも言うべき倫理感が求められなければならないと思うのだが、技術だけが先行してしまっている感がある。いかなる情報でも瞬時に一般の人々に流れてしまうが、その真偽を判断し、取捨選択するのは個人に任されている。その情報が個人に止まる間はともかくとして、社会全体に簡単に広がるのである。このような通信革命の時代は、ヒトが個人として生きているのではなく、集団として生きていることをより顕著に表わす。それでは、個々の倫理を統合した集団倫理というもの形成可能なのであろうか？ そのためには、個々人の記憶や思考が言語を介さず他人とも共有可能になる時代が来るまで待たなければならないのであろうか？ それとも、多様性を認めて、集団倫理を形成しないのであろうか？ その場合には、ヒト以外の生命についてはどうすれば良いのであろうか？ もし動物の意思が読みとれるようになったとしたら、どこに線を引けばよいのであろうか？ 現在の技術革新スピードの早さは、そんなことが現実の問いになることも決して夢の世界ではないことさえ想像させる。