

特集 2003年度 KAMON講演会

HLA の遺伝学—多型、連鎖不平衡・ハプロタイプから 人類集団の形成まで—

東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学

演者：徳永 勝士

ご紹介ありがとうございます。東大の徳永でございます。HLA 遺伝子の特徴の一つであります「多型」、そして、その多型に伴って生じてくる大きな特徴である「連鎖不平衡」とか、「ハプロタイプ」ということ
の概念を理解して頂くと同時に、現実のデータを紹介して、それがどのような生物現象を理解するの
に使えるかということについての基礎的なお話をさせていただきます。

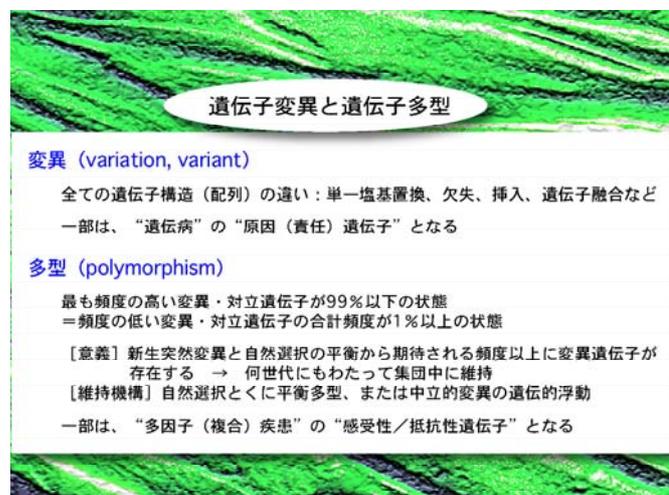
ヒトの遺伝子、ヒトゲノムの多様性について研究
することがどのようなことに役に立つのかというこ
とですが、ひとつは多因子疾患、遺伝要因と環境要
因が様々に総合されて発症する疾患に関わる遺伝子
を明らかにするための研究。それから、人類集団の
起源と形成を理解する、あるいは復元するという作
業にも役に立ちます。もう少し視野を広げると、環
境と遺伝子あるいはゲノム相互作用が、ヒトとい
う生物種を作り上げてきたわけで、その歴史を理
解する、あるいは、自然淘汰と適応という現象を理
解するために多様性の研究が必須になります。その中
でも HLA というのは、その研究の最先端に
いるということができるとは思いません。

「変異」と「多型」というものの定義を少し
ご紹介したいと思います(スライド1)。「変異」
というのは、variation, variant といいます。全
ての遺伝子構造、あるいは遺伝子配列の違い、単
一塩基置換だとか、欠失だとかという様々な遺
伝子の構造変化がありますが、そういう変化に
よって生じた違いを変異と言っています。その
中の一部は、遺伝子の機能を損なうことによ
って遺伝病の原因となっていて、原因遺伝子ある
いは責任遺伝子ということができます。

一方、「多型」というのは、polymorphism と表
現します。最も頻度の高い変異あるいは対立遺
伝子が 99%以下の状態、つまり言い換えますと
頻度の低い変異あるいは対立遺伝子の合計頻度

が 1%以上の状態、これを多型状態にあるとい
います。毎世代ある一定の確率で新しく突然変
異が生じます。また、これらに対して自然淘汰
がかかります。すなわち、新しく生じるものと
それに対して淘汰がかかる、その平衡状態と
して期待される一般的な頻度があります。そ
のような平衡頻度というもの、一般的に 10^{-4}
とか、 10^{-5} と計算されます。つまり、1%
というのはそういう頻度より明らかに高い。と
いうことは、そういう多型状態にある変異とい
うのは何世代にもわたってその集団中にある
程度の頻度で存在した、ということの意味して
います。何故そのようなことが起こるのかとい
う維持機構も一筋縄ではありません。自然選
択あるいは自然淘汰の中で、

スライド1



遺伝子変異と遺伝子多型

変異 (variation, variant)
全ての遺伝子構造(配列)の違い: 単一塩基置換、欠失、挿入、遺伝子融合など
一部は、「遺伝病」の「原因(責任)遺伝子」となる

多型 (polymorphism)
最も頻度の高い変異・対立遺伝子が99%以下の状態
= 頻度の低い変異・対立遺伝子の合計頻度が1%以上の状態

【意義】 新生突然変異と自然選択の平衡から期待される頻度以上に変異遺伝子が存在する → 何世代にもわたって集団中に維持
【維持機構】 自然選択とくに平衡多型、または中立的変異の遺伝的浮動
一部は、「多因子(複合)疾患」の「感受性/抵抗性遺伝子」となる

特に平衡多型というのがあります。つまり、ある何世代も前に生じた突然変異が自然淘汰上有利だということで少しずつ頻度が上がってきているという状態、あるいは、遺伝的浮動といいます。何世代か前に生じた有利でも不利でもない中立的な変異が偶然に子孫にかなりの頻度で伝わってきた、という状態のどちらかの場合と考えられます。ABO 血液型のようにいろいろなタイプの人実際に普通に見られるということです。そういった多型を示す変異の一部は、「多因子疾患」あるいは「複合疾患」の感受性に、または抵抗性に関わる遺伝子であろうと考えられるわけです。

遺伝子変異というのは、全ての個人間の違いをいっています。多型はその中の一部、1%以上というのが一応の基準です。1%というのは厳密な意味での定義はありません。便宜的に 1%を基準として使用しています。そういうものは変異全体の一部であります。その中の一部は、恐らく多因子疾患とか薬剤反応性に関わる遺伝子であろうと思われます。それから、遺伝子変異の一部は遺伝病の原因遺伝子です。ほとんどの場合、遺伝病の原因遺伝子は頻度が低いものですから、いわゆる遺伝子変異で、多型でないものです。ただし、ごく一部には多型的頻度に達する遺伝病の原因遺伝子がありうるわけです。

ゲノムや遺伝子の多型を示すような遺伝マーカー、あるいは遺伝子として、反復配列をもつ *Alu* ファミリー、*LINE* ファミリー、ミニサテライト、マイクロサテライトという多型マーカーがあります（スライド2）。ミニサテライトとマイクロサテライトの違いは、繰り返しの単位がある程度大きめの 15 から 100 bp という長さを単位とする場合をミニサテライト、10 bp 以下を単位とした場合をマイクロサテライト

スライド2

代表的なゲノム・遺伝子多型

多型マーカー

反復配列 (repetitive sequence)

Alu family、*LINE* family など

ミニサテライト・VNTR (variable number of tandem repeat) : 15-100bp x 20-50 repeats

マイクロサテライト・STR (microsatellite, short tandem repeat) : 1-10bp x 5-60 repeats、数十万ヶ所

SNP (single nucleotide polymorphism、単一塩基多型) 約1000万ヶ所

高度な多型を示すゲノム・遺伝子

ミトコンドリアDNA (mtDNA) : 5-10倍 : 母性遺伝

HLA (human leukocyte antigen、ヒト白血球抗原 : 6番染色体)

トと言っています。特に、東海大学の猪子先生たちのゲノム全域探索によって数万という非常に多くのマイクロサテライトが見つかってきています。恐らく、ゲノム全体を詳細に探せば数 10 万種類程度になるのではないかと思います。

一方、多型マーカーとして非常によく使用されるのが SNP (single nucleotide polymorphism、単一塩基多型) と呼ばれるもので、これは恐らくゲノム中で 1,000 万ヶ所ぐらいあると思われます。このような多型は色々な病気に関わる遺伝子を探すのに役立つと共に、その一部は、ある種多因子性疾患の感受性に直接関わる多型、変異であると思われます。

ゲノム、遺伝子として既によく知られているものの中で大変高度な多型を示すものとして代表的なのが 2 種類あります。よく聞かれると思いますが、ミトコンドリア DNA というのがその一つであります。ミトコンドリア DNA というのは、細胞質に存在することが知られている遺伝子です。ミトコンドリア DNA の突然変異率は、通常の核 DNA に比べて 5 から 10 倍であり、非常に早いスピードで変化しています。進化速度が速いので多型性に富みますし、標識になります。ただし、ミトコンドリア DNA は、母性遺伝、すなわち母親から子供に伝わるという特徴があります。一方、核内ゲノムで最もよく知られる多型遺伝子としては、HLA 遺伝子があります。

徐々に HLA を中心とした話をしていきますが、その他のゲノム領域も対象にして、少し基本的な考え方も紹介させていただきます。ここで割合に誤解されているといいますか、はっきりと意識されていない言葉といいますか、区別されていない言葉を 3 つ並べました（スライド3）。「連鎖」と「連鎖不

スライド3

連鎖 (linkage)

2つ以上の遺伝子が同一染色体上にあるため一緒に子孫に伝達されること。染色体上で両遺伝子座が接近するほど組み換え頻度が低い

関連 (association)

2つ以上の変数の間に従属性があること (集団においてある頻度でみられる2つの遺伝的な性質が同時に起こる頻度が、各々の頻度の積と異なること)

連鎖不均衡 (linkage disequilibrium)

連鎖する2つ以上の遺伝子間に関連が認められる場合に「連鎖不均衡にある (を示す)」という

衡)、それから「関連」という言葉です。

「連鎖」は、2 つ以上の遺伝子が同一染色体上にあるため一緒に子孫に伝達されること。つまり基本的には同じ染色体にのっているということです。そして、染色体上でその2つの遺伝子が接近すればするほど組換えの頻度が低くなります。しかし、同じ染色体上にのっているといいますが端と端のように離れてしまうと連鎖状態ではありません。

「関連」は、英語の association に対応しますが、2 つ以上の変数の間に従属性があることと定義できます。定義だとピンとこないかと思いますが、言い換えると、関連は集団においてある頻度で見られる2つの遺伝的な性質が同時に起こる頻度が、各々の頻度の積と異なることをいいます。遺伝的な性質というのは、必ずしも遺伝子の多型ということに限らず、ある病気の患者さんであるということでもいいのですが、掛け算でないということは、つまり何らかのつながりがあるということです。そういう状態を広く「関連」という言葉で表現することができます。

「連鎖不平衡」は、互いに連鎖する2つの遺伝子の間で関連が認められる場合にいいます。2 つ以上の遺伝子を想定して、同じ染色体にそれぞれがのっていて、そしてそれぞれが多型を示し、それぞれの多型の頻度の組み合わせについて掛け算でないという状態が連鎖不平衡にあるということになります。

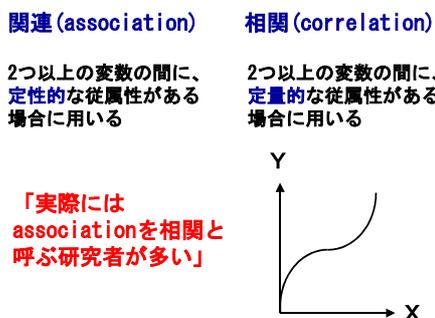
また、注意していただきたい言葉に「関連」と「相関」があります(スライド4)。全くごちゃ混ぜに使用されていますので紹介しておきます。「関連(association)」というのは、2 つ以上の変数の間に定性的な従属性がある場合に使われます。「相関」は、correlation という英語に対応するもので、2 つ以上の変数の間に定量的な従属性がある場合に用いられま

す。X 軸と Y 軸上に表される何かの数値の間に直線的でも何でもいいのですが、それらの数値と数値との間に関係があるという場合に相関があるといいますが、ですから、HLA と疾患との関連というのは本当の意味で言いますと相関ではありません。実際には関連を相関と言っている研究者が多く見受けられます。

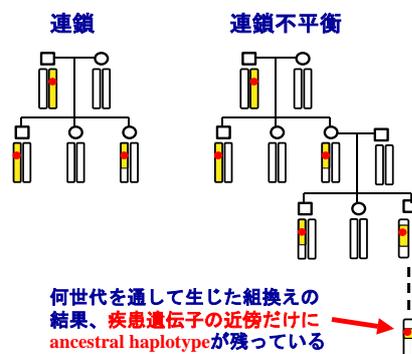
連鎖と連鎖不平衡を図に示したように表すともう少し具体的に分かると思います(スライド5)。連鎖というのは単純に黒丸で示した何かの遺伝子が染色体上にのっているということだけでいいわけですが。黒丸と別な何かの病気の原因遺伝子が一緒に染色体上に共にあるという状態が連鎖といえるわけです。ところが、連鎖不平衡については、何世代も経ているうちにどんどん組換えが起こってきます。その結果、黒丸で示した遺伝子のごく周辺だけが最終的におおもとの先祖型染色体の特徴を残しているということになります。その領域に残っているそれぞれの遺伝子多型の組み合わせが ancestral haplotype (先祖ハプロタイプ) ということになります。連鎖不平衡は、その ancestral haplotype に含まれている遺伝子多型の間に見られる関連を表します。

ある遺伝子座の特定の対立遺伝子が、同じ染色体上に位置する別な遺伝子座の特定の対立遺伝子とハプロタイプを形成する頻度が、ランダムな組み合わせ(つまり掛け算の組み合わせ)を連鎖平衡状態といいますが、そこから期待される値と異なる状態を連鎖不平衡といいますが(スライド6)。パラメーターとして、連鎖不平衡という現象を表す指標がいくつかありますが、理想的なものは未だにないのが現状です。よく使われているのは、D あるいはデルタ値とよばれるものです。それから、D'あるいは相対D

スライド4



スライド5



ルタ値というものです。HLA 領域ではあまり使われませんが、対立遺伝子がたった2種類の場合には、 r^2 というのが徐々に使われるようになってきています。D あるいはデルタ値と呼ばれるものは、AB のハプロタイプ頻度からそれぞれの対立遺伝子頻度を掛けた値を引いた値ということになります。一番単純な定義と言うことになります。D' あるいは相対デルタ値というのは、観察された D の値を D がとりうる最大の値で割った値をいいます。ただし、D 値が正の場合と負の場合で、最大にとりうる D の値が変わってまいります。正の場合は、この問題となります対立遺伝子頻度のどちらか頻度の低い方が最大のハプロタイプ値になります。つまり、完全に A と B がくっついてハプロタイプを形成している時に、当然どちらか頻度の低い方が最大値ということになります。その最大値からそれぞれの掛け算、つまり、連鎖平衡状態の期待値を引くことで正の場合の D 最大値になります。一方、負の時は、ハプロタイプ頻度が 0 というのがハプロタイプ値の頻度の最小値になりますので、連鎖平衡状態から期待される $P_A P_B$ という値を 0 から $0 - P_A P_B$ とすることで、これが絶対値としての最大値ということになります。対立遺伝子が2個の時には r^2 を使用します。これは、A の頻度と B の頻度が全く同じで、しかも、それが完全な連鎖不平衡になっている時だけ 1 という値をとります。二乗の項が入っているものですから相当厳しい定義といえますか、連鎖不平衡とみなす範囲を限定した定義になっています。

ハプロタイプは家族調査によって決定してカウントするということが本来なのですが、十分な規模の集団試料であれば、推定することができます（スラ

スライド6

連鎖不平衡 (linkage disequilibrium)

ある遺伝子座の特定の対立遺伝子が、同じ染色体上に位置する別の遺伝子座の特定の対立遺伝子とハプロタイプを形成する頻度が、ランダムな組み合わせ (連鎖平衡状態) から期待される値と異なる状態

2つの多型部位に各々2個の対立遺伝子

A, a および B, b が存在する場合の

連鎖不平衡のパラメーター:

$$D = P_{AB} - P_A P_B$$

(LD, デルタ値とも呼ぶ)

$$D' = D/D_{\max} \quad (-1 \leq D' \leq 1)$$

(RLD, 相対デルタ値とも呼ぶ)

ただし、 $D > 0$ のとき、 $D_{\max} = \min(P_A P_b) - P_A P_B$
 $D < 0$ のとき、 $D_{\max} = -P_A P_B$

$$r^2 = D^2 / (P_A P_B P_a P_b) \quad (0 \leq r^2 \leq 1)$$

イド7)。2座位ハプロタイプに関しては、簡単な手計算の計算式もあります。それから、有意性の検定は 2×2 の表をつくってカイ二乗検定をすることができます。さらに、特に HLA を対象とした多座位ハプロタイプの頻度推定のためのプログラムもできています。日本で国際ワークショップが行われた1991年に、今西先生が開発した多対立遺伝子に対応し、しかも、ブランクを想定したハプロタイプ頻度推定のためのプログラムがあります。一方、SNPのように2対立遺伝子を想定したものにEMアルゴリズムなど色々なものが開発されていて、インターネットにもフリーのソフトウェアが出されています。さらに最近では、市販のソフトウェアにも結構いいものが出てきたというのが現状です。十分な数というのはなかなかピンとこないかもしれませんが、例えば HLA でいいますと、200人以上であれば、1%以上のハプロタイプ頻度をかなり正確に推定できます。

集団データから頻度を推定した例として私どもの古い論文から3つほどご紹介いたします (スライド8)。これは、2座位間のハプロタイプ頻度です。例えば、一番上に書いてある A^*3303 と Cw^*1403 のハプロタイプ頻度は10.7%と推定されています。LD (デルタ値) が9.2%と、RLD (相対デルタ値) が91%と推定されます。 χ^2 が164.3とべらぼうな数値になっています。この非常に強い連鎖不平衡というのがHLAの特徴です。それからRLDも高いのがHLAシステムの特徴です。この表は、A座とC座のクラスター群で、 χ^2 が10以上のものを集めています。それからAとB、AとDRB1、CとB、BとDRB1、DRB1とDQB1、それとDQB1とDPB1についても並べて

スライド7

ハプロタイプ頻度の推定

本来、家族調査によってハプロタイプを直接決定する:
直接カウント法

十分な規模の集団試料であればハプロタイプ頻度を推定できる:

2座位ハプロタイプ

手計算も可能

有意性の検定: 2×2 表でカイ二乗検定

多座位ハプロタイプ

HLA向け: 多対立遺伝子に対応、'blank'を想定

(Imanishi T et al. *HLA 1991 vol. 1, pp 76-79*)

あります。ざっと見た時におわかりになると思いますが、CとB、DRB1とDQB1に有意度が高い連鎖不平衡を示す組み合わせが多いと思います。つまり、これは、物理距離としてC-B間、DRB1-DQB1間が非常に近いということで、それをよく反映した結果であるということがいえます。それから、先ほど200人以上の集団データがないとなかなか正確な推定ができないと申し上げましたが、私たちのこの時の論文は百十数名のデータなものですから、日本人の代表的な頻度になっていません。サンプリングが不十分だということで、かなり偏った頻度数値になっていますので、その点をご確認ください。

HLA遺伝子座間の連鎖不平衡の強さをプロット(x軸は遺伝子間距離、y軸は χ^2 値の総和を便宜上強さの指標として示しました)しますと、C-B間、DRB1-DQB1間のように物理間距離が近いものについては非常に強いということがおわかりになります(スライド9)。座位間全体の色々な組み合わせ全部を計算して、遺伝子と遺伝子間の全部の連鎖不平衡値を表現していると思います。それに比べて、遺伝子間の物理距離が遠くなってくると、かなり小

スライド8

日本人においてHLA2座位間で見出された有意な連鎖不平衡

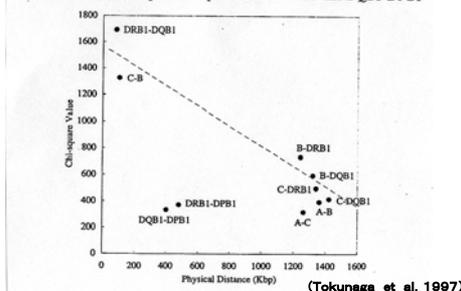
Table 2 Estimated frequencies of two-locus haplotypes in Japanese

Association	HF (%) ^a	LD ^b	RLD ^c	χ^2
A*3303-Cw*1403	10.7	9.2	0.91	164.3
A*2402-Cw*1202	10.7	7.2	1.00	54.8
A*1101-Cw*0401	3.6	3.0	0.62	39.1
A*0207-Cw*0102	2.7	2.1	0.83	24.2
A*2601-Cw*0801	2.5	1.8	0.35	11.6
A*3303-B*4403	11.6	10.0	0.92	182.5
A*2402-B*5201	10.7	7.2	1.00	54.8
A*2402-B*0702	4.0	2.4	0.73	12.5
A*3101-B*5101	3.1	2.5	0.45	29.0
A*0207-B*4601	2.7	2.5	0.84	76.2
A*1101-B*1501	2.7	2.0	0.39	17.2
A*3101-B*4002	2.6	2.0	0.36	18.3
A*3303-DRB1*1302	10.7	9.2	0.92	167.0
A*2402-DRB1*1502	9.6	6.2	0.91	43.0
A*0201-DRB1*0803	3.5	2.8	0.47	29.4
A*3101-DRB1*1403	2.2	1.9	0.68	32.7
A*1101-DRB1*0406	2.2	1.9	0.68	26.6
Cw*1403-B*4403	11.6	10.2	1.00	205.9
Cw*1202-B*5201	10.7	9.6	1.00	224.0
Cw*0102-B*5401	6.7	5.5	0.92	72.1
Cw*0102-B*4601	6.3	5.2	1.00	73.1
Cw*0303-B*3501	5.8	5.2	0.74	116.6
Cw*0304-B*4002	5.8	5.1	0.92	96.1
Cw*1402-B*5101	5.4	5.0	1.00	190.2
Cw*0702-B*0702	4.9	4.4	1.00	92.1
Cw*0801-B*4006	4.9	4.3	1.00	81.0
Cw*0401-B*1501	3.1	2.8	0.56	64.0
Cw*0702-B*3901	3.1	2.7	0.86	48.8
Cw*0304-B*4001	3.1	2.5	0.48	24.0
Cw*0102-B*5502	2.2	1.9	1.00	25.0
Cw*0801-B*4801	2.2	1.7	0.43	13.5

スライド9

HLA遺伝子座間の連鎖不平衡の強さ

Fig. 1 Relationship between two-locus associations and physical distances of HLA loci. Chi-square value was calculated as the sum of chi-square values of haplotypes with frequencies of over 2%. Dashed line shows linear regression line ($y = -0.826x + 1586$, $r = -0.953$) calculated from the all plots except for DRB1-DPB1 and DQB1-DPB1



さくなってきます。小さいといってもかなり強い連鎖不平衡といって間違いがありません。明らかに物理的距離によって連鎖不平衡の強さの程度は異なってきます。この直線関係から明らかに外れているのが、DRB1-DPB1とDQB1-DPB1間であり、これは、クラスIIのDR、DQからDPの間に組換えのホットスポットが存在することによると考えられます。

(Tokunaga et al. 1997)

B*4403-DRB1*1302	11.2	9.7	0.97	190.2
B*5201-DRB1*1502	8.4	7.3	0.81	138.4
B*5401-DRB1*0405	4.6	3.6	0.59	38.8
B*0702-DRB1*0101	4.5	4.2	1.00	202.7
B*4006-DRB1*0901	4.0	3.2	0.78	38.6
B*4601-DRB1*0803	3.0	2.6	0.44	41.7
B*1501-DRB1*0406	2.2	2.1	0.70	56.9
B*3501-DRB1*1501	2.2	1.7	0.33	17.2
DRB1*0901-DQB1*0303	15.2	12.5	0.97	188.4
DRB1*0405-DQB1*0401	12.9	11.2	1.01	217.7
DRB1*1302-DQB1*0604	11.6	10.3	1.02	230.3
DRB1*1502-DQB1*0601	10.3	8.7	1.01	140.0
DRB1*1501-DQB1*0602	5.8	5.5	1.03	234.3
DRB1*0803-DQB1*0601	5.8	4.8	0.85	62.4
DRB1*0101-DQB1*0501	4.5	4.3	1.00	210.2
DRB1*0406-DQB1*0302	3.1	2.8	1.00	63.8
DRB1*1403-DQB1*0301	3.1	2.8	1.00	60.2
DRB1*1405-DQB1*0503	2.2	2.2	0.83	153.8
DRB1*1401-DQB1*0502	2.2	2.1	0.83	100.6
DRB1*0403-DQB1*0302	2.2	1.9	0.72	31.6
DQB1*0604-DPB1*0401	7.6	6.6	0.83	117.0
DQB1*0601-DPB1*0901	7.5	6.1	0.82	79.1
DQB1*0501-DPB1*0402	2.6	2.2	0.50	39.6
DQB1*0601-DPB1*0202	2.5	1.9	0.55	15.2

^a Haplotype frequency; haplotypes with frequencies of over 2% and exhibiting significant associations ($P < 0.001$)

^b Linkage disequilibrium parameter

^c Relative linkage disequilibrium value

TAP 遺伝子のあたりに存在することが確かめられています。組換えのホットスポットがあるために、過去から現在にかけて組換えが他の領域に比べて高い確率で起こっているために連鎖不平衡の崩れの度合いが高いということをこのデータは支持しています。

今西先生の開発したプログラムを使用して推定した HLA の 5 座位のハプロタイプであります (スライド 10)。DPB1 は少しずつ増えてきますが、ほぼ HLA 全体にわたってお互いに非常に強い連鎖不平衡によって結ばれたハプロタイプが存在します。一番頻度の高いハプロタイプは、A*3303-Cw*1403-B*4403-DRB1*1302-DQB1*0604 となってしまうのですが、これは日本人の平均的な値ではありません。二番目に出ている A*2402-Cw*1202-B*5201-DRB1*1502-DQB1*0601 が一番頻度が高いのはご存じかと思います。これは、サンプル数の少なさによって偶然出てきたものです。

興味深いことに、A*3303-Cw*1403-B*4403-DRB1*1302-DQB1*0604 ハプロタイプをホモ接合で持ち、非血縁の二人のクラス I 領域をシーケンスして比較したら、全く同じでした。東海大の猪子、椎名先生が開発されたプライマーを用いて、クラス I 領域にある 50 種類の遺伝子を全部シーケンスしましたが、ひとつも塩基の違いがありませんでした。HLA 以外の遺伝子を含めて、このハプロタイプは HLA 領域内の保存性が確かに高いようです。しかし、ハプロタイプとハプロタイプとの間にはものすごく違います。5 種類のハプロタイプの間には何か所違いがあったかということ、二千数百ヶ所ということで、SNP

スライド10

日本人におけるおもなHLA5座位ハプロタイプ

Table 5 Estimated frequencies of five-locus haplotypes in Japanese

Association	HF (%) ^a	LD ^b
A*3303-Cw*1403-B*4403-DRB1*1302-DQB1*0604	9.8	9.8
A*2402-Cw*1202-B*5201-DRB1*1502-DQB1*0601	8.3	8.3
A*2402-Cw*0102-B*5401-DRB1*0405-DQB1*0401	3.6	3.6
A*2402-Cw*0702-B*0702-DRB1*0101-DQB1*0501	3.6	3.6
B*4403-Cw*1403-DRB1*1302-DQB1*0604-DPB1*0401	6.7	6.7
B*5201-Cw*1202-DRB1*1502-DQB1*0601-DPB1*0901	6.6	6.6
B*5401-Cw*0102-DRB1*0405-DQB1*0401-DPB1*0501	4.3	4.3
B*4403-Cw*1403-DRB1*1302-DQB1*0604-DPB1*0201	3.1	3.1
B*0702-Cw*0702-DRB1*0101-DQB1*0501-DPB1*0402	2.7	2.7
B*4006-Cw*0801-DRB1*0901-DQB1*0303-DPB1*0201	2.2	2.2

^a Haplotype frequency; haplotypes exhibiting frequencies higher than 2% are shown

^b Linkage disequilibrium parameter

(Tokunaga et al. 1997)

スライド11

HLA領域に見られる連鎖不平衡：まとめ

ほかのゲノム領域に比較して強く、広範囲に及ぶ連鎖不平衡

集団間の共通性と異質性

集団の近縁性とハプロタイプの共有性の対応
座間距離小さいB-C、DR-DQ間で共通性高い

物理/組み換え距離と連鎖不平衡の強さ

座間距離小さいほど連鎖不平衡強い傾向
ただし、TAP近傍に組み換えのホットスポットが存在し、DQ-DP間で連鎖不平衡弱い

が二千数百ヶ所この領域に少なくともあるということになります。比較するハプロタイプの数を増やせば、もっともっと増えるわけです。とにかく、ハプロタイプというのは実に興味深い特徴をもっていることは間違いのないと思います。

HLA 領域に見られた連鎖不平衡の概要をまとめてみますと、他のゲノム領域に比較して連鎖不平衡の程度が強く、広い範囲に及ぶというふうに思われます (スライド 11)。それから、集団間の共通性と異質性を考えますと、集団がお互いに近縁であればあるほど同じハプロタイプを共有します。遺伝子座の間の距離が小さければ小さいほど、連鎖不平衡を示す組み合わせに共通性があるということです。具体的に得られた値として、B-C 間、DR-DQ 間では、日本人、ヨーロッパ系の集団でも多くのものは共通にあるということで、連鎖不平衡を示す実際のアレルの組み合わせ自体に集団を超えた共通性が見られます。

それから、TAP 近傍に組換えのスポットが存在して、DQ-DP 間では他の HLA 領域に比べると連鎖不平衡が弱いのです。Extended haplotypes という、HLA-A から HLA-DRB1, DQB1 までに及ぶような非常に広範囲をカバーする特徴的なハプロタイプが存在します。

連鎖不平衡の有用性ですが、皆さんよくご存じのように HLA 検査、組織適合性検査によって、しばしば強い連鎖不平衡で結ばれたハプロタイプ情報が参考になります。一つひとつのハプロタイプに関していうと、その遺伝子構成は一定である、共通であるということは、恐らく単一の起源を持つものであると推定されます。それから、疾

患感受性遺伝子の探索に際しては、非常に有用なマーカーとなると同時に、お互いが強い連鎖不平衡で結ばれているものですから、逆に第一義的な遺伝子を決めることが難しくなるという悩ましいこともあります。人類学とか、進化あるいは集団遺伝学のためには、分集団構造や地域集団構造を推定するために役に立ちますし、集団の成立過程を推定するのにも役立つマーカーです。

連鎖不平衡の成立要因としては、突然変異の発生年代が新しければ新しいほど、連鎖不平衡は成立しやすいという特徴があります(スライド12)。それから、自然淘汰ももちろん連鎖不平衡の成立のために重要な要素でありますけれども、広い範囲で連鎖不平衡が成立するためには、2つの対立遺伝子の間に相互的な作用がないと連鎖不平衡の成立に至りません。時々聞かれる言葉かもしれませんが、ヒッチハイキング効果といって、実際に淘汰を受ける遺伝子の周辺領域に関しては副次的な効果でもって連鎖不平衡が成立するということが起こります。実際にそのようなことが HLA 領域にあるということの証拠がどんどん出てきています。それから、物理距離、組換え距離、組換え率あるいはホットスポット、それと集団の歴史や形成過程によってハプロタイプの、あるいは連鎖不平衡の様子が変わってくる、ということがあります。要するに、集団が地域集団的に分かれていると連鎖不平衡が起こりやすい、ということがあります。また、どこかの別な集団が最近移住してきたり、混血が一気に進まず徐々に進んでいると連鎖不平衡が起こりやすいということもあります。

疾患関連研究の例として、全身性エリテマトーデスを紹介したいと思います。SLEに関しては、よく

知られていることですが DRB1*1501 は白人でも、東アジアの諸集団でも、東南アジアの集団でも、共に SLE と関連します。明らかに日本人の SLE 患者でも頻度が高く、統計的にも有意な関連が知られています。ここで紹介したいのは、HLA の領域ではなく1番染色体の TNF レセプター2 (TNFR2) と呼ばれる遺伝子の多型です。TNFR2 というのは、1番染色体の 36.2 (1p36.2) という領域に存在するのですが、TNFR2 の多型のひとつが SLE と関連するのを見つけました。TNFR2 の多型が SLE の感受性遺伝子そのものであるかを知るため、周りの多くの SNP を調べてみて、そしてお互いの連鎖不平衡の関係を患者と健常人について調べます(スライド13)。九州大のグループによって、私達が最初に報告した関連が確認され、しかも、疾患と関連が認められた SNP には機能的な違いもあるということも分かっています。これに加え、スライドに見られるように TNFR2 遺伝子の中だけで連鎖不平衡の関係にあるものが完結していて、隣の遺伝子まで連鎖不平衡が及んでないということから、この疾患との関連が見つけれられた多型は第一義的な感受性遺伝子そのものであろうと理解されるわけです。連鎖不平衡の解析をすることによって最終的に第一義な遺伝子を決めることは、正に HLA の領域で私たちがこれまでに行ってきたことと同じだと思います。

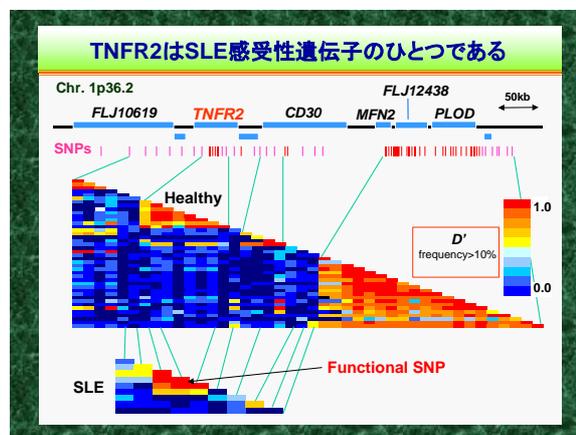
別な遺伝子で、今度は一番の長腕の遺伝子ですけれども、お互いによく似た遺伝子群があります。FCGR の遺伝子ですが、互いにホモロジーの高い遺伝子が隣り合って並んでおり、HLA によく似た状況です(スライド14)。日本人、タイ人、中国人という異なる集団を比較すると、共通に有意な関連を示す多型 3B と 2B があります。しかも、3つの集団で

スライド12

連鎖不平衡の成立要因

- 突然変異の発生年代
新しい多型に成立しやすい
- 自然淘汰
広範囲の成立には相互効果必要
- ヒッチハイキング効果
淘汰を受ける遺伝子の周辺領域
- 物理距離、組換え率、ホットスポット
距離、組換え率小さいほど成立しやすい
8JW家系調査では組み換え抑制の証拠なし
- 集団の歴史・形成過程
分集団・地域集団構造
最近の移住・混血

スライド13

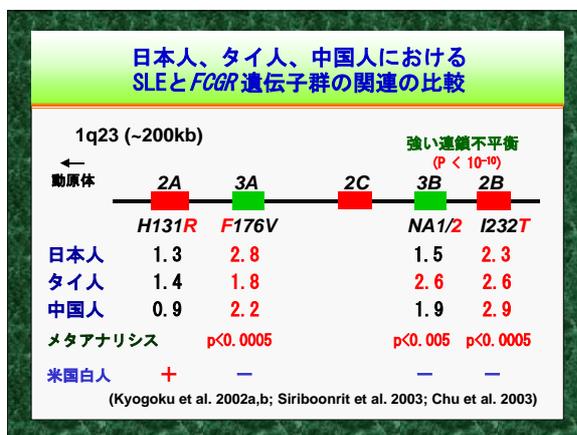


共通な傾向が見られますので、メタアナリシスを行いますと、有意の程度が高くなります。二次的に出てくる有意差があるのですが、これは3Bと2Bの間の強い連鎖不平衡でそのことを説明できます。むしろ3Bは二次的で、第一義的は2Bであろうというように理解されます。これも正に HLA から私たちが得たノウハウを使った解析でありまして、HLA と疾患の関連研究は、ゲノム全体の多因子疾患に関わる遺伝子の探索のためのフロントランナーとして我々に多くのことを教えてくれたということです。

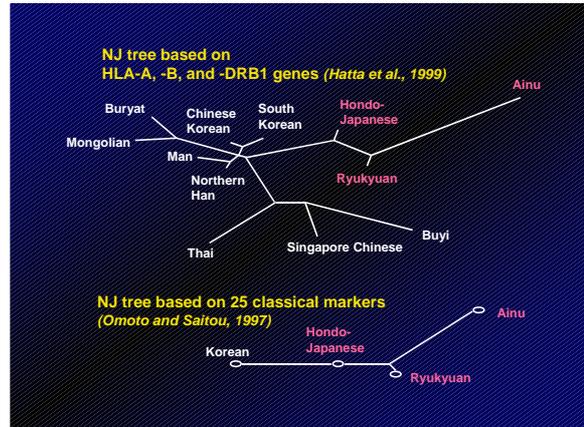
人類集団の類縁関係を調べるためにも、この HLA は極めて有用なマーカーであります。特徴的なハプロタイプは単一起源であるということが重要なポイントであります。もう一つは、それぞれの遺伝子が多型でありますので、非常にたくさんの対立遺伝子があって、頻度が集団間で多様であるということです。遺伝距離を計算して系統樹をつくる手法と、主成分分析あるいは対応分析といった多変量解析法の両方が使えます。HLA-A, B と DRB1 遺伝子の頻度を使って系統樹をつくると、本土の日本人は、韓国だとか、中国の北部の集団と近い関係にあります(スライド15)。沖縄の人々も本土の人々と近い関係にあります。アイヌの人々は、他のアジアの集団から離れた距離にあります。興味深いことにアイヌの人たちと沖縄の人たちは共通の枝から分かれているということが HLA から推定されるわけです。

HLA-A, B と DRB1 遺伝子を使って対応分析法でつくった類縁図を見ますと、本土の日本人、沖縄の人たち、それからサハリンの Nivkhi の集団は近い関係にあります(スライド16)。それからやや離れてアイヌの人たちということになります。東北ア

スライド14



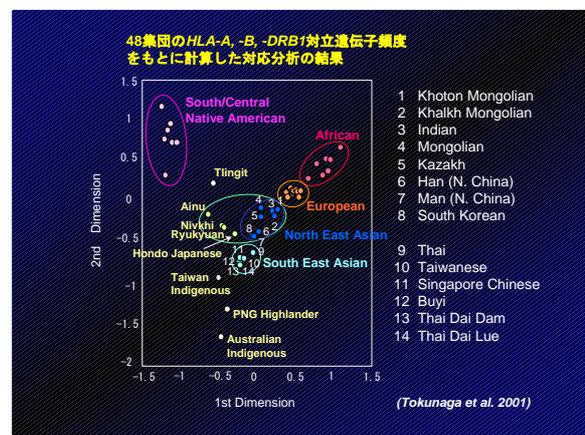
スライド15



シアの大陸に住んでいる中国人、韓国人と比べると、本土日本人は少し離れ、さらに少し離れて、沖縄の人たち、それから少し離れてアイヌの人たちがいます。その先にあるのは南米の先住民ということで、日本列島の人々は、あるいは太平洋側に住んでいる人々は、大陸の集団と比べると少しユニークな位置にあるということがわかんと思います。

東アジアにおける諸集団のハプロタイプ頻度のデータを集積しますと、日本人に限らず、東アジアの色々な先祖集団が過去数千年の間かなりダイナミックに移動したのではないかと推定させるハプロタイプの頻度分布になるわけです。そういうこともかみ合わせて、現時点で私たちが考えている日本列島の人々の成立に関する仮説を模式的に図示したのがスライド17です。東アジアに住んでいた後期旧石器時代の人々のある一派は、ベーリング海峡をはるばる越えてアメリカの先住民となり、その先祖となっています。別なグループは、日本列島

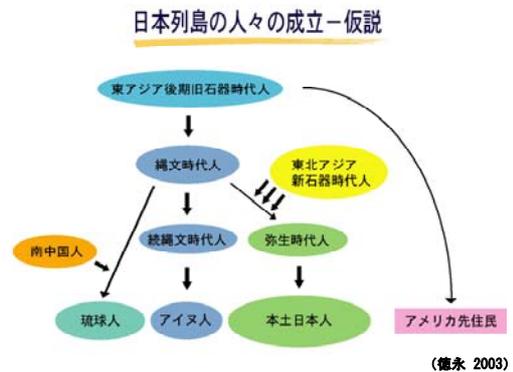
スライド16



に渡って縄文時代の人々になり、その子孫はあまり変化しなくて続縄文時代の人々となり、そして現在のアイヌの人々とつながっていると推定されます。一方、主として朝鮮半島を経由して東北アジアの新石器時代の人々が何派かにわたって日本列島にやってきました。そういった人たちの影響を強く受けて弥生時代の人々が成立し、そして現在の本土日本人につながっています。沖縄の人々に関しては、縄文時代の人々の遺伝的な特徴を残しながら、恐らく南中国のどこかのグループの影響を受けて今に至っていると推定しています。

今日の私のお話は、最初に申し上げましたように、基礎生物学的な視点を中心に、まず、多型、連鎖不平衡について解説し、連鎖不平衡は疾患感受性遺伝子の探索のためのマーカーとなるということ、人類学あるいは集団遺伝学の有用なマーカーともなるということをご紹介してまいりました。

スライド17



2003年 KAMON 講演会は、平成15年9月14日
東京医科歯科大学 臨床講堂で行われました。
特集記事は、防衛医科大学校検査部 小林賢先生
にまとめて頂きました。
ありがとうございました。 編集部



特集 2003年度 KAMON講演会

難治性感染症の細胞治療:移植医療への応用

東京医科歯科大学難治疾患研究所ウイルス感染学分野

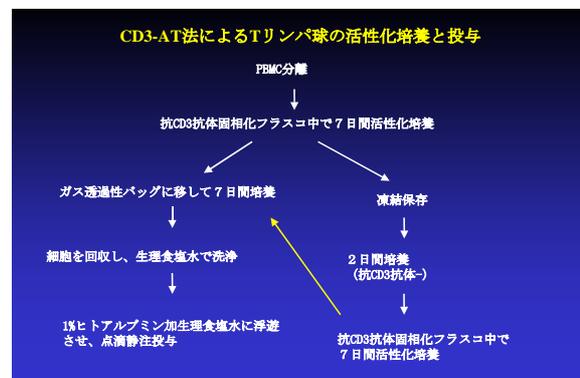
演者: 清水 則夫

ご紹介ありがとうございます。清水でございます。今日は細胞治療についてお話しさせていただきます。細胞治療というと、癌の治療をみなさんは連想されるかもしれませんが。リンパ球治療ということで、いま結構やられているところもあります。私たちはリンパ球治療を癌ではなく感染症の治療に用いるという取り組みをしています。ターゲットは主に免疫不全の患者さんです。今日はその辺のお話からさせていただいて、次に患者数が非常に多い移植患者さんの話をさせていただきます。移植患者さんは多くの場合移植後に様々な感染症が出て、それで命をなくされている方も結構いらっしゃるという現状があります。そのような移植患者さんの治療にリンパ球治療をどのように応用していくのかという取り組みに関してお話しさせていただきます。まず初めに、この治療法がどのような経緯で開発されたのかというところからお話しさせていただきます。

この治療法自体は非常に簡単で、患者さんから、あるいは移植ですとドナーさんからという場合もありますが、末梢血から単核球を分離し、抗CD3抗体を固相化したフラスコ中で活性化培養します。抗CD3抗体で細胞を刺激しますと、細胞がIL-2のレセプターを出して増殖因子によく反応するようになります。そして、培地中にIL-2というT細胞増殖因子を大量に入れます。刺激を受け取るレセプターを出させておいて、そこに増殖因子を入れるわけですから、細胞がすごい勢いで増えてきます。感染因子が侵入したら一刻も早く免疫担当細胞が増えなければ、感染症に負けてしまうわけで、実際に体の中ではそういうことが起きて、感染症に打ち勝っているのです。それを体外で全く同じようなことを行かせます。普通はT細胞レセプターに抗原が結合し、それが刺激になってCD3を介してその刺激が細胞の中に伝わり、IL-2レセプターを出してくるのですが、それを途中の段階から抗体を使って、同じようなシグナルを強制的に細胞の中に入れます。増えてくる細胞も、そういう抗原刺激によって体の中で増えてくる細胞を完全にmimic(模倣する)しておりますので、完全に同じように増えてまいります。このように活性化培養するのですが、現実には1リットルから2リットルの培地を使って培養します。フラスコですとなかなか大量培養は難しいので、ガス透過性のバッグに入れて、一バッグから数バッグ使用して合

計14日間培養し、それを洗って投与するというようなステップになります(スライド1)。ステップとしては非常に簡単で、末梢血中の全てのT細胞クローンが増えてくると思って間違いありません。そのあたりの研究はすでに行なわれていますが、T細胞のレパトアを調べましても、調べた限りにおいては、はじめに末梢血中に存在していたレパトアが全て増えてきます。一方、いわゆるCTL療法というような特異的なT細胞を増やして治療する方法があります。CTL療法も効果が認められている場合もありますけれども、我々が免疫不全の患者さんや移植後の患者さんを治療しますと、様々な感染症が出てくるという非常に大きな問題が起こります。それに対して、

スライド1



一つ一つそういう特異的な細胞を用意すると、時間もかかりますし、手間もかかりますし、間に合わないということになってしまいます。したがって、末梢血中の全てのT細胞を増やすというところがこの治療法のひとつのミソであり、しかも簡便に細胞を調製できるということが重要なのです。つまり、末梢血のT細胞は様々な病原体に対抗するT細胞の集まりですから、増幅したT細胞も特異性がないのではなく、ポリスペシフィックであると言うことができます。増やした細胞は、途中段階で凍結保存もできますし、それをさらに再培養して用いることもできます。そういう意味では、非常に簡単に汎用性のある方法だと思えます。

末梢血中を流れているTリンパ球というのはresting（静止）な状態にあり、いわば寝ているような細胞で、丸く小さい細胞です。それをフラスコ中でIL-2を加えて培養しますと、非常に大きな細胞になってきます。また、クラスターをつくったり、あるいは色々な形になったりして、すごい勢いで増えてまいります。トータルとして、だいたい2週間で1,000倍に、よく増える場合は数千倍に増幅します。培地もちょっと油断するとすぐに真っ黄色になって、細胞だらけになってしまいます。慣れない人がやりますと、何かコンタミしたのではないかと間違えるほどすごい勢いで増えてきます。これを集めて投与するという治療法です。

ザッと言ってしまうと非常に簡単なのですが、実際に臨床の現場でそれをやろうとすると、そう簡単にできるわけではありません。例えば、よく言われるのが、リンパ球を全部増やして、戻して、というところと何か副作用はないのか、むしろ自己免疫疾患を誘導してしまうのではないのかということがあります。つまり、考えるのは難しい事ではありませんが、実際に臨床に応用することは非常に難しいのです。では、我々は何故これができたのか、あるいは、こういう細胞を増やす方法をどうして確立できたのかといいますと、全て初期の仕事に依存しております。初期の仕事というのは、癌の治療から始まっています。やはり、癌の治療法ということだと、新しい治療法を導入しやすい環境にあります。最近ではどんどん新しい治療法が出てきていますが、少し前までは癌だともう終りだ、というような一般的な雰囲気がありました。そのような中で、新しい治療法を試すことがある程度許されたということです。この治療法の研究開発が始まったのは十数年前ですが、その初期の研究において副作用がほとんど起きない

という結果が示されたことが非常に重要でした。中には、数年間毎週投与していた患者さんもいたようですが、その患者さんには副作用は起きていません。また免疫治療の研究は動物実験とはちょっと馴染まない面もあります。よく新しい癌の治療法で動物実験では大きな癌が一夜にして全部きれいに消えるような良い治療法が開発された、あるいは、良い薬物が開発された、などという話を聞きますけれども、なかなかそれが臨床の場に出てこない、という側面もあります。人間とマウスでは免疫の状態が全然違う面もあるわけです。マウスの場合は純系のマウスを使って研究していますから、よく効くのかもかもしれませんが、これを人間にもってくると、なかなか同じことが見られないということが往々にして起こります。つまり、動物実験は限界があるのですが、どのようにして効果が出るのかを調べるには、ある程度動物実験に頼る必要もあります。この治療法は、動物実験を踏まえて出てきたわけではないので、宿命的に理論的基盤が少し弱いということもあります。当初は、臨床にまず投与ということから先行して始まり、段々と色々なことがついてきたという治療法です。

この一番初めに行われた仕事が論文になったのはつい最近です。LANCETのフルペーパーとして出たということで、そういう意味ではこの治療の臨床効果が証明されたことにもなっています(スライド2)。どういう仕事かと申しますと、肝臓がんを手術でほぼ100%完全に切除したと思っても、肝臓がんというのは非常に再発率が高い、といった問題点があります。ただ、手術で完全に切除していますから、普通は無治療で観察しています。そのような肝臓がん患者を無治療で経過観察している群と、積極的に細胞を投与した群でどのような差があったのか、無作

スライド2

活性化Tリンパ投与による肝臓癌の術後再発予防

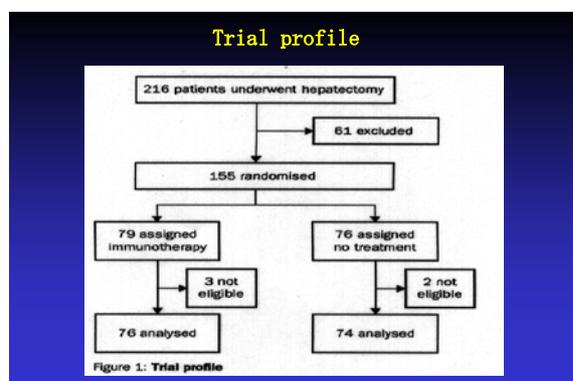
ARTICLES
Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma: a randomised trial

T. Takayama, T. Sekine et al.

THE LANCET, Vol. 356, 802-807,
(September 2) 2000

為抽出試験した結果をまとめたのがこの仕事です。この研究については、私は実際には関係していませんが、国立がんセンターで10年と少し前に始まった仕事です(スライド3)。まず、200人程度の肝臓がんの患者さんから、完全切除できた、などいくつかの条件に適合した方々を150人ほど集めて、これをくじ引きで2つの群に分けます。最終的に79名と76名に対して、片方を細胞投与群、もう片方を非投与群ということで、2群に分けて経過を観察したわけです。実際の細胞の投与は、1年以内に5回行ったそうです。後は経過を観察していたわけですが、実際に細胞を投与している時期で比較すると、顕著な差が出ます。肝臓の癌というのは、ほとんどウイルス関連癌で、再発でなく、再発生ということが多いため、何もしないで放っておくと再発生してきます。したがって、投与を終わった後は平衡状態になっています。しかし、5年後の無再発生率に有意差があったということで論文になっているわけです。実際にリンパ球を活性化して投与する研究から分かったことは、活性化したリンパ球には力があるということです。大きな病変というのはなかなか直らないかもしれないけれども、少なくとも、残存病変を十分に叩く力があるということです。ここでもう一つ重要なことは、副作用がほとんどなかった、ということです。現実には、発熱がほんの少しありましたが、全くない人も多く、重篤な副作用は、ただの一例もなかったそうです。細胞数が多い患者さんですと、1回に 10^{10} 個ぐらい入れています。5回トータルで、 $1\sim 5\times 10^{10}$ ぐらいになります。このような大量の活性化T細胞数を入れているにもかかわらず、初回に少し発熱がある程度で、しかも熱は、2回目から出ないのが普通です。少なくとも、健康な人に投与した場合には、ほとんど副作用が出ないと

スライド3



いって間違いはない、ということがこの臨床研究、あるいは、これに付随したさまざまな癌に対するパイロットスタディーから分かってきました。そういう意味では、安全性の高い治療法であるということが既に確立されていると考えています。

我々は、ここで確立された活性化T細胞による癌治療法を免疫不全状態で発生する感染症の治療に用いることを考えました。

はじめに、先天性免疫不全症の患者さんの治療に関してご紹介したいと思います。まず、この治療法が開発された国立がんセンターに、レジデントとして来られていた旭川医大の先生が今から7、8年前に治療を行なった第一例目の感染症の症例をご紹介致します。患者さんは、Wiskott-Aldrich 症候群という先天性免疫不全の患者さんです(スライド4)。出血傾向、易感染性、湿疹と、この疾患の3徴候全てが揃った患者さんでした。この病気の原因遺伝子は、X染色体に乗っていますから、患者さんのほとんどが男児です。ただ、遺伝子異常ですので、遺伝子の異常の部位によって非常に重症な場合と、比較的進行が弱い場合とがあります。普通、重症例では早い時期に骨髄移植をしないとすぐに亡くなってしまいますが、この患者さんの場合は、11歳ぐらいまでがんばっていました。ただ、易感染性ですから、ヘルペスウイルスなどの色々な感染症に罹患した経歴があります。アシクロビル(ヘルペス群ウイルス感染細胞内に入ると、ウイルス誘導のチミジンキナーゼによりリン酸化され、活性型のアシクロビル三リン酸になる。活性型のアシクロビル三リン酸は、ウイルスDNAポリメラーゼの阻害物質および基質として作用し、ウイルスDNA合成を阻害する)というヘルペスウイルス感染症によく効く薬があります

スライド4

Wiskott-Aldrich syndrome (WAS)

血小板減少症による出血傾向、原発性免疫不全症による易感染傾向、アトピー性皮膚炎様の湿疹を3主徴とする症候群

伴性劣性遺伝する免疫不全症候群

X染色体短腕(Xp11.22)に存在するWASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) 遺伝子の異常によるWASP異常症

症例: 11歳男児 単純ヘルペスウイルス、EBウイルス持続感染

単純ヘルペスウイルスはアシクロビル持続投与に依り耐性化し、コントロール不能になったため活性化自己T細胞輸注を行なった

ので、その薬剤により治療していたのですが、その後ウイルスがアシクロビルに完全に耐性化してしまい、全くコントロール不能となってしまいました。活性化T細胞療法は、癌治療の経験から安全性は高いと考えられていましたが、このような免疫不全の患者さんには投与したことがなかったので、挑戦だったと思います。ただ、他の方法では全くコントロールできないということで、この患者さんが第一例目として選ばれたわけです。ヘルペスウイルス感染症は非常にポピュラーで、風邪をひいた時に免疫が低下して、口の辺りにポツポツと出る人も多いと思います。この患者さんは免疫が低下しているため、1型ヘルペスウイルス (HSV-1) が全身に広がって、目に病変ができる角膜ヘルペスになり、また顔もパンパンに腫れてしまいました。しかも、薬剤耐性のため全く病状をコントロールできない、ということで細胞治療の適用となったわけです。この疾患は、T細胞に異常があります。T細胞が活性化して体の中でうまく働けないこの患者さんを選んだということは、今から考えてみればまず初めに非常に良い症例だったと思います。患者さんのT細胞を体外で活性化培養して、また体内に戻すことにより速やかに良くなるということが確かめられ、この治療法は感染症にも効果があるということがすぐに分かったわけです。また、この治療は、HSV-1 特異的なT細胞を分離して治療するわけではないので、この患者さんが同時に罹っていたEBウイルスとか他の色々なウイルス感染症にも効果が出ました。顕著な病変に対して効果がありましたが、副作用はほとんどありませんでした。そういうことから、免疫不全の患者さんにも十分適用できる治療法であることが分かったわけです。

私は、6年程前に東京医科歯科大学に赴任したの

ですが、それ以前からEBウイルスやヘルペスウイルスに関する研究をしていました。EBウイルスは、皆さんもご存じのように主にB細胞に感染することが分かっていたのですが、最近EBウイルスがT細胞とかNK細胞あるいは $\gamma\delta$ T細胞に感染し、それで命を落とされる方もいるということが段々と分かってきています。あるいは、胃がんの一割近くの症例でこのウイルスががん細胞に潜んでいるということも分かっています。そういう意味では怖いウイルスです。EBウイルスの研究は、主にB細胞との相互作用の研究が行われていたので、こちらに赴任するに当たって私はあまり研究が進んでいないT細胞とEBウイルスの研究をしようと思いました。そして、T細胞を増やす名人が国立がんセンターにいるということを聞いて、T細胞の増やし方を当時国立がんセンター研究所室長だった関根先生の所へ習いに行きました。そこでEBウイルスの仕事の重要だけれども、このような治療に関する研究もおもしろいから一緒にやらないかと誘われました。基礎研究もそれはそれでおもしろいのですが、そのような臨床的な研究もやってみたくて思いました。そこで、現難治疾患研究所所長の山本教授に相談したところ、賛成していただき、難治性ウイルス感染症の治療研究という課題で研究を始めました。その後、多数の臨床の先生方と共同研究をさせていただいていますが、学内では、次にお話になれる小児科の水谷先生の教室の臨床医の先生方と共同研究をさせていただいています。

東京医科歯科大学の症例です。この症例は免疫不全の原因が特定されていない症例なのですが、重い感染症があり、また湿疹も問題でした(スライド5)。色々な症状がありました。これは肺の写真ですが、サイトメガロウイルス肺炎に罹患しており、またカ

スライド5

現病歴

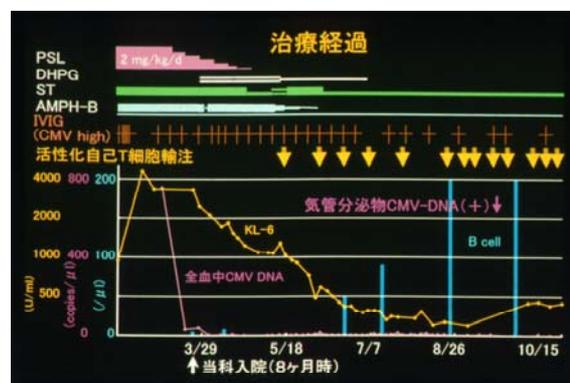
5ヶ月時に発熱、咳嗽、喘鳴。
 抗菌薬、キサンチン製剤、 β 刺激薬およびステロイド剤を使用した
 が、改善は一時にとどまり、ステロイド剤の持続投与を要した。
 6ヶ月時にステロイド剤を中止した際、ARDS、間質性肺炎に陥り、
 11日間人工呼吸管理を要した。以降酸素投与を必要とする
 間質性肺炎が持続した。

6ヶ月時血液中カンジダ抗原(+)
 7ヶ月時気管内分泌物および
 血液中CMV-DNA(+)

免疫不全の疑いにて当科に転院



スライド6



ンジダ抗原が陽性になっています。しだいに間質性肺炎が重篤な状態になり、人工呼吸管理しなければいけない状況になってきました。ということで、活性化 T 細胞療法を行いました。この患者さんでは、間質性肺炎のマーカーである KL-6 が高くなっています (スライド6)。色々な治療をすると下がるのですが、また上がってくる。これでは治療に限界があるということで、5月中旬頃から自己の T 細胞を活性化培養して投与しました。この患者さんは、B 細胞が投与前にほとんどいませんでした。そのいなかった B 細胞が投与すると同時に急速に増えてきました。もう一つは、間質性肺炎のマーカーが下がって来ました。そういうことで効果があったと考えています。B 細胞が増えてきましたが、では抗体産生はどうかと申しますと、IgG は治療目的で投与していましたから評価できませんが、IgA と IgM は上昇しています (スライド7)。T 細胞を入れているにもかかわらず、B 細胞の数や抗体産生にも効果があったということです。もう一つは NK 活性が上がってきたということで、体内のさまざまな免疫システムが賦活されて、このような臨床効果として現れたのではないかと思います。

当大学の小児科の症例です。免疫不全があり、関節炎とサイトメガロウイルス感染症による網膜炎が問題となっていた症例です。サイトメガロウイルスには DHPG (ガンシクロビル: サイトメガロウイルス網膜炎の治療に認可されているヌクレオシド誘導体の抗ウイルス剤) という薬があるのですが、これを最大限に使ってやっと悪化をくい止められるという状態です。この薬は、骨髄抑制などの副作用があります。最大限に使っているということはかなり危険な状況です。また、目ですから悪化すると失明してしまうという危険性もあり、活性化 T 細胞療法を

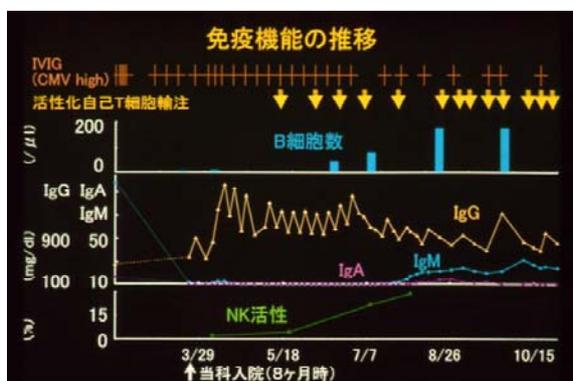
実施しました。そうしますと、関節炎が非常に良くなりまして、ステロイドの投与量を減らせたということと、DHPG の投与をやめても、網膜炎を認めなくなったということで、顕著な効果があったと考えています。ただ、細胞を持続的に投与していないといけないということが問題です。しかし、持続期間の問題はあるにしても、免疫不全の患者さんの治療には確かに効果があるという事が、多数の症例の治療を行った経験からの結論です。

別の症例で、CMCC というカンジダ菌に対する免疫不全症で、口の中がカンジダで真っ白になって、痛くて食事ができないといった症例です。この患者さんに活性化 T 細胞を投与いたしますと、かなり良くなって物も食べられるようになり、体重も増えてきました。

このように色々な感染症に効くというところがこの治療法の良いところです (スライド8)。これは特異的免疫治療では不可能なことです。ただ、先天性免疫不全患者さんの治療に際して問題となるのは、持続的に投与していかななくてはいけないということです。したがって、この治療法だけではダメで、根治治療法として造血幹細胞移植が必要となります。しかし、こういう患者さんは感染している微生物量が多すぎて移植を行えない、あるいは、移植してもその後に感染症が増悪して亡くなってしまうことも多くあります。ですから、造血幹細胞移植の前後に併用して移植の成功率を上げるのに貢献する療法ということで現在行っています。

これまでに分かったことは、先天性免疫不全の患者さんに十分効くということです。しかも、かなり安全に使えるということも分かりました。そして次に、先天性に有効なら、では後天性はどうかという

スライド7



スライド8

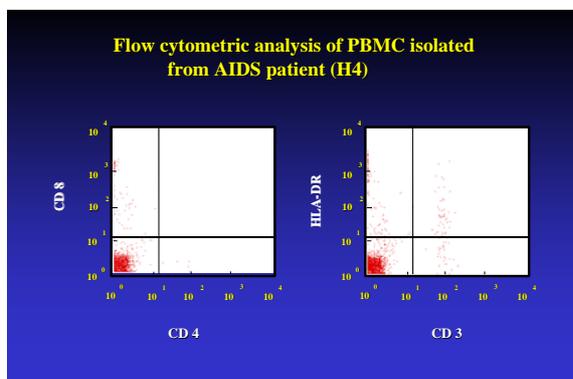
疾患	合併感染症	治療効果
Combined ID	CMV retinitis	DHPG中止可に
	P. carinii pneumonia recurrent infection	改善
HIM	Cryptosporidium infection P. carinii pneumonia	無効, SIRS BMTへ
	WAS	CMV positive in PCR Monoclonal IgG-emia post BMT
SCID post BMT	CMV pneumonia	改善? SIRS
CMCC	Oral Candida infection	無効
	Oral Candida infection	口腔内所見改善

ことで、HIV 感染症の患者さんに対する治療研究を行いました。

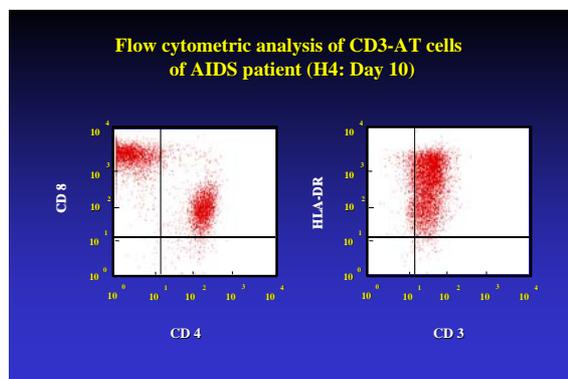
T 細胞を培養しますと、健康な人では 2 週間で 1,000 倍ぐらいに増幅します。増え方に個人差はありますが、増えないという人はほとんどいません。末期のエイズ患者さんの末梢血中には、通常の B 細胞や T 細胞マーカーでは染まらない細胞はいますが、リンパ球はほとんどいません。そういう患者さんのリンパ球を培養しますと、はじめはなかなか増えてこないのですが、増えだすと急速に増えてきます。末期エイズの患者さんの T 細胞でも増幅できることが分かりました。その後多数の患者さんの末梢血 T 細胞の培養を行いました、細胞を増やすこと自体には問題ないということが明らかになりました。フローサイトメーターの解析パターンですが、ドットは CD4 と CD8 T 細胞を表します (スライド 9)。末期のエイズ患者さんですと CD4 と CD8 共に陰性となる細胞が多数出てまいります (スライド左)。この患者さんでは CD4 陽性の細胞が 4 個しか検出されません。T リンパ球がほとんど無くなった状態です。CD8 は少しありますが、やはり非常に少なくなっています。CD3 で T 細胞の全体を見ても、ほんの少ししか検出できません (スライド右)。このような患者さんでも我々の方法で培養を行いますと T 細胞が増幅してまいります。活性化した T 細胞のマーカーとして HLA-DR を使用して増幅した T 細胞を解析しますと、CD8 陽性 T 細胞と CD4 陽性 T 細胞の両方が活性化し増えてきていることが分かります (スライド 10)。この方法で培養することにより HIV に感染しているはずの CD4 細胞も十分に増やすことができるということが分かると思います。次に問題になるのはウイルス増殖です。HIV というのは、T 細胞に感染しますが、潜伏感染状態ではウイルス産生

が起こらずじっとしているわけです。そして一旦ウイルス産生が始まると急速にウイルスが増えてきます。活性化刺激をかけると、それが刺激になってウイルスが一気に増えてくるということが十分予想されますが、実験的にもそのような現象が報告されています。我々の培養法で末期 AIDS 患者さんの末梢血 T 細胞も増幅できるというところまでは分かったのですが、ではウイルスの動態はどうかということで、ウイルス抗原の p24 を指標にして ELISA 法によりウイルス産生を検討しました。実験では、スタートの細胞として末梢血単核球、あるいは純化した CD4 陽性細胞、および CD8 陽性細胞を使用しましたが、いずれの細胞でも全くウイルスは増えて来ませんでした。ただ、これは HAART 療法 (強力な抗ウイルス剤の多剤併用療法 (highly active anti-retroviral therapy; HAART)) あるいはカクテル療法と呼ばれる抗エイズ薬治療を行っている患者さんの末梢血を使用した実験です。こういう患者さんでなくて、HAART 療法の効果がない、あるいは色々な事情で HAART 療法ができない患者さんの末梢血を用いて実験してみる必要がありますが、少なくとも HAART 療法がうまくいっている患者さんでは T 細胞を増幅することに何も問題ないということが示されました。次に末梢血中のウイルス量が極めて多い人の末梢血 T 細胞を増やした時の p24 の測定結果です (スライド 11)。末梢単核球のところを見ていただきたいのですが、一過性のウイルス増殖が認められますが、すぐに減少してきます。したがって、すでにウイルスに感染している T 細胞ではウイルス増殖が始まり産生されたウイルスが細胞外に出てくるけれども、培養中にウイルスの感染増殖サイクルが回っていないということが予想されます。同じ患者さんの末梢血 T 細胞を PHA という T 細胞のマイトジェンで増

スライド9



スライド10

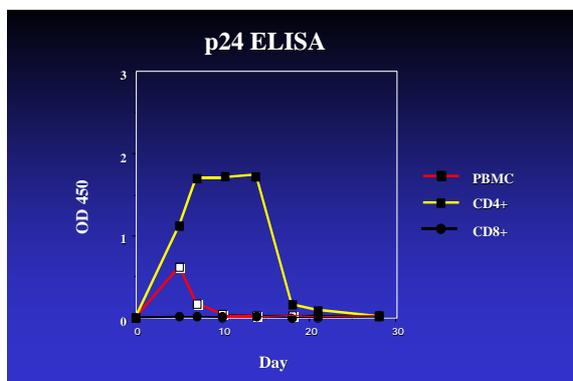


やす実験も行ないました。10日目に p24 を測定しようとして検体に測定試薬をまぜると、試薬を入れた途端に色が変わり、ウイルスが大量に増殖していることが分かります。この場合、培養液を 10,000 倍に薄めても測定限界を超えてしまうような大量の HIV が培養液中に出てきていました。私もさすがに、それをやっていると怖くなった経験があります。ただし、細胞は非常によく増えてきていました。細胞がよく増えていたのでウイルスはそんなにいないだろうと思ったら、このような状態でした。それは多分、培養過程でウイルスの感染増殖サイクルが回っていたのだと思います。しかし、患者さんの末梢血を抗 CD3 抗体で刺激して、さらに IL-2 を含む培地中で培養すると T 細胞は増殖しますが、ウイルスは一過性にしか増えてこないということが分かりました。多数の末梢血中にウイルスが大量にいる患者さんたちの末梢血を用いて研究を行った結果をまとめてみました (スライド 12)。CD4 陽性 T 細胞は健常人では 1 μ l 中に 1,000 個以上いるわけですがけれども、実験に使用した末期のエイズ患者さんの末梢血ですと 7 とか、13、多い人で 105 個という、そういう患者さんの末梢血を用いて研究を行った結果です。細胞は 1 か月の培養により、だいたい 3 乗ですから 1,000 倍ぐらいに増え、CD4 陽性細胞も、CD8 陽性細胞も増えてきます。ウイルスも、はじめ一過性に増えてきますが、結局は検出限界以下になっています。これなら治療に用いられるのではないかと言うことになり、倫理委員会の許可を得て東大医科研の患者さんに対して治療することになりました。進行性多巣性白質脳症 (PML: パポバウイルスのなかの JC ウイルスによる日和見感染症で、亜急性の中枢神経系の脱髄疾患である。主に Hodgkin 病などの網内系疾患、白血病、サルコイドーシスなどの疾患に伴って生ず

る細胞性免疫の低下した患者あるいは免疫抑制薬投与患者に発症する。従来は非常にまれな疾患であったが、最近の AIDS の流行により、よくみられる合併症の一つとされるようになった。) を発症した患者さんですが、確立された治療法がありません。これは脳の病気です。JC ウイルスというのは多くの人が持っていますので、このウイルスが感染していること自体では病気とはいえません。日和見感染症の一種です。この患者さんは、臨床症状、MRI 画像から JC ウイルスによる PML と推定されていました。この後 JC ウイルスが検出され PML と確定診断されています。患者さんは、この病気によって段々と言葉がしゃべれなくなり、また麻痺が強くなって、最後は抗 HIV 剤の投与もできなくなり、他に治療法がないということで、活性化 T 細胞投与を行なったわけです。患者さんに細胞を投与しますと、一時的な臨床症状と MRI 画像による病変部の改善が認められましたが、最終的には病気が進行してお亡くなりになりました。1 例の結果ですからはっきりした事は申し上げられませんが、病気の初期段階から細胞治療を行なえばもう少しハッキリとした効果が得られるかもしれないという期待を抱かせる症例でした。

エイズの患者さんというのは、先程のような HAART 療法などといわれるような抗 HIV 剤の治療により、かなり皆さん良くなっています。あまり入院患者さんがいらっしやらなくなりましたので、今現在、我々のところで患者さんの治療は行っていません。ただ、行う体制は整えています。HAART 療法だけでは、完全に治ることはないということが研究的に明らかになっています (スライド 13)。また、HAART 療法を行っても免疫能の回復が不十分であったり、薬剤耐性ウイルスが出現して治療に反応しない、あるいは非常に副作用が強いということで長

スライド11



スライド12

Patient	CD4 count (cells/mm ³)	CD8 count (cells/mm ³)	HIV-RNA (copies/ml)	Cell proliferation (%)	CD4 cells (%)	CD8 cells (%)	Peak p24 Conc. (pg/ml)	Final p24 Conc. (pg/ml)
1	64	220	4.1 x 10 ⁴	3.0	32	67	75	< 8
2	13	---	7.5 x 10 ⁴	2.7	22	76	42	< 8
3	7	112	1.8 x 10 ⁵	2.9	17	83	10	< 8
4	105	510	1.3 x 10 ⁵	3.7	24	76	24	< 8
5	16	328	1.0 x 10 ⁵	2.8	15	85	15	< 8

く治療できないなどの欠点があります。ということで、T細胞活性化療法は、HAART療法との併用を考慮にいれば、今後の一つの有効な治療法ではないかというふうに我々は考えています。

この治療法のもう一つ良いところは、活性化してT細胞を凍結保存できることです。したがって、感染初期のT細胞がまだ十分ある時に末梢血リンパ球をとっておけばいいのではないかと考えております。先程示したような患者さんというのは、リンパ球がほとんど無くなって、特異性の多様性も失われていると考えられます。感染初期の多様性がまだ十分に残っている時期にリンパ球を凍結保存しておけば、治療がもっとうまくいく可能性もあるのではないかと考えて、こういう取り組みも今後の課題として考えています。

これまでの結果から、日和見感染症には非常によく効くし、また、重症の免疫不全症患者さんに投与しても副作用らしい副作用はほとんど起こらず、癌の患者さんの治療結果と併せて考えると、非常に安全な治療法であるということがだいぶ分かってきました。ただ、こういう先天性免疫不全症の患者さんに活性化T細胞治療を行っても完全に治すことができないということです。完全に治すにはどうしたらいいかといえば、結局は造血幹細胞移植により免疫系を取り替えてやるしかないわけです。次に、造血幹細胞移植と組み合わせる治療した例がありますので、ご紹介したいと思います。

皆さんはもう既にご承知のことなので改めて申すこともないと思うのですが、ドナーさんがいなくて移植ができないことが問題で、ドナーさんが見つかり、めでたしめでたしという感じで、骨髄バンクの重要性がテレビなどでも宣伝されています。しか

し、皆さんも携わっていてよく分かると思いますが、実はそんな簡単なものではなくて、もちろんドナーさんがいなければだめなのですが、ドナーさんがいたとしても、うまく生着しない、あるいは拒絶されてしまう、また、免疫抑制により拒絶を抑えようとしますと感染症が出てくる。そして抗ウイルス剤を投与しますと、初めは効いていても薬剤耐性ウイルスが出現する場合がありますし、またそういう抗ウイルス剤自体に骨髄抑制作用がありますから、免疫抑制による生着促進と相反してしまうということで、二進も三進もいなくなってしまうというようなことが起こってきます(スライド14)。プラスして、移植により白血病の治療を行っても、再発という厄介な問題もあります。再発したらどうするのか。ここに書いてあるDLI(donor lymphocyte infusion; ドナーリンパ球輸注)という治療法が再発にとってはいい治療法なのですが、たださまざまな理由でDLIをできない症例があり、またDLIができたとしてもドナーさんからリンパ球を採取するためにアフターケアをやらなければならないので、かなりドナー負担が大きいという問題があります。あるいはGVHDも当然問題になってきます。DLIというのは、ドナーさんのリンパ球を戻してやるという治療法ですが、問題なのはドナーさんからリンパ球を大量に貰わなければならないので、血縁者ならばまだしも、非血縁者のバンクドナーだとなかなかできない。あるいは、臍帯血だとドナーがまだ新生児ということで、リンパ球を大量にいただく事自体不可能です。ということで、少しでもT細胞があれば、それを増幅培養すればDLIに用いられるのではないかと発想がまず起こってきました。そうすれば、血縁ドナーの場合でも、少量の末梢血から治療用のT細胞を調製できるわけで、ドナー負担が非常に軽いとい

スライド13

HAART 療法の問題点

- 現在のHAART 療法ではHIVを完全に駆逐できない
- HIVを検出限界以下に保っても免疫能の回復は不十分で日和見感染症が持続するケースもある
- 薬剤耐性ウイルスの出現
- 副作用により、HAARTを10年以上続けるのは困難 : SIT (Structural Intermittent Therapy)

スライド14

造血幹細胞移植による白血病治療の問題点

- 生着不全(拒絶)
: 免疫抑制剤による拒絶反応の抑制 — 日和見感染症
- 移植後の免疫抑制下で発生する日和見感染症
: 抗ウイルス剤投与 — 抗ウイルス剤がないウイルス
薬剤耐性ウイルス
副作用、特に骨髄抑制
- 白血病再発
: DLI — ドナーT細胞が得られないケースがある
ドナー負担が大きい

うことになります。もう一つは、この DLI をやりますと、致死的な GVHD がかなりの頻度で起こってまいります。GVHD は DLI を行なった半分以上の患者さんに出てきます。致死的な GVHD も、ある報告によると 7% ぐらい出てきますから、一割弱の方がこの治療法によって亡くなられてしまうということを覚悟の上で、最後の手段みたいな形でやる治療法です。ただ、最後の手段でもできれば良いのですが、臍帯血移植のように最後の手段もできない患者さんもいるわけです。また、DLI を行える症例でも、何とかして GVHD を軽減ないし回避できないのかという課題もあります。そこで我々が考えたのは、CD4 陽性 T 細胞だけを投与して DLI を行う手法です。先程申したように、T 細胞には CD4 と CD8 があって、実際に GVHD に関係しているのは CD8 が主体になりますから、その CD8 を除いた CD4T 細胞だけを投与して治療したらどうかというような取り組みを現在行っています。臍帯血幹細胞移植というのは、GVHD の危険性は少ないと言われていています。ですから、ある意味でやり易く、皆さんご存じのように一座、二座のミスマッチ移植でもできるというような大きな利点がありますし、ドナー負担が全くない。今まで廃物だったものを利用するという点で非常にいい治療法であるのですが、欠点として、白血病細胞を殺す GVL 効果が弱く再発率が高いというような報告もあります。あるいは、生着まで時間がかかるため感染症のリスクが高いことが問題になっています。感染症治療目的でも DLI は行われていますから、再発や感染症の治療法として DLI をやりたい場面が多くなります。つまり、DLI の必要性が高いのですけれども、先程からお話ししているように、現状では全くできないということです。それを克服するため、我々の治療法が臍帯血移植後の DLI に適

用できるのかどうかということを調べて見ました。まず、臍帯血 T 細胞の培養を試みました。臍帯血 T 細胞は、簡単に増やせることが分かりました。大人の末梢血 T 細胞とほとんど遜色なく良く増えてまいります。ですから増やすこと自体には特に問題はありません。また、フローサイトメーターにより色々な細胞表面マーカーを見ますと、増幅臍帯血 T 細胞は増幅末梢血 T 細胞と基本的には同じです。増幅に技術的な問題はないということが分かりましたので、実際に治療を行った成績をご覧いただきたいと思えます。

千葉大の患者さんで Wiskott Aldrich 症候群の患者さんです(スライド 15)。この疾患の根治治療法として造血幹細胞移植を選択し、臍帯血移植を行った症例です。血便から病気が発見され、その後 WAS と診断され、生後 9 ヶ月時に移植は問題なく行われたのですが、24 日頃から下痢が出現し、ウイルス感染症による下痢症と診断されました。その後非常に重篤となり、血便がどんどんひどくなり、また蛋白漏出性胃腸症による低蛋白血症になってしまいました。最終的には色々な治療を行っても良ならず、重体になってしまった症例です。実はこの患者さんは、移植後の免疫不全状態で致死率の高い EB ウイルスの LPD (リンパ増殖性疾患)になるかもしれないというようなことで、移植前に細胞の用意を頼まれていました。幸いなことに EB ウイルスによる LPD は出てこなかったのですが、コクサッキーウイルスという別なウイルスによる重症胃腸症になってしまったため、用意してあった T 細胞で治療することになったわけです。主治医の先生が、それ以外に助かる道はないであろうということで治療に踏み切った症例です(スライド 16)。移植後に下痢が出て、色々な治療により少しは良くなったりします。しかし、

スライド15

臍帯血移植後のウイルス性重症腸炎患者の治療

(症例) 12ヶ月男児 Wiskott Aldrich Syndrome (千葉大)

(現病歴) 生後4日に血便で発症、精査の結果WASと診断。9ヶ月時に臍帯血幹細胞移植を行った。移植後24日目より下痢が出現し、コクサッキーウイルスB群3型が検出された。その後、血便・蛋白漏出性胃腸症が続き、低蛋白血症が原因と考えられる乏尿・腹水貯留をおこした。絶食療法、サンディムン、ソルメドール、デノシンの投与では軽快せず、70日目に鮮血便が多量に認められ、急激に貧血が進行し、その後きわめて重篤な状態となった。

スライド16



次第にうまくコントロールできなくなり、最終的にはコントロール不能になってしまいました。このような状態の時に事前に用意してあったT細胞を投与するというを決断されたわけです。この患者さんには活性化T細胞を2回投与しました。細胞は移植などで使うCP-1という凍結保護剤を入れ、 5×10^5 /チューブで数本凍結保存しておきました。それを一本ずつ解かして、直ぐに投与するという治療を2回行ないました。そうすると、すみやかに症状が改善して来ているのが良く分かると思います。この患者さんは、そのまま回復されて退院され、現在もお元気だそうです。むしろ、治療前の状態を考えると非常にあっけなく治り、これは非常に有望な治療法だろうと考えられました。

次は熊本大学の患者さんです。白血病の治療目的で臍帯血移植を行った症例ですが、この患者さんの場合には、サイトメガロウイルス感染症が問題となり、ガンシクロビル（CMV網膜炎の治療に認可されているヌクレオシド誘導体の抗ウイルス剤）とフォスカルネット（CMV網膜炎の治療として認可された抗ウイルス剤。これはヘルペスウイルスとHIVに対し活性がある）の2つの薬剤の併用でもうまく治療できませんでした。後で東京医科歯科大学の森尾先生が調べましたところ、ウイルスゲノムに変異が入っていて薬剤が聞かなかったのだと確認できています。そのような状態で、骨髄抑制も急速に進行して免疫不全状態が進み、その後敗血症になってしまいました。治療法としては、免疫抑制剤を減量したり、あるいは様々な抗菌剤や抗ウイルス剤を投与したりと色々な治療を行いました。なかなか上手くいかなかったわけです。その患者さんの血便には、腸管の粘膜層が脱落して排泄されるほどひどい腸炎だったわけです。この場合にも治療には凍結状態で用意

しておいた細胞を用いました。この患者さんには、 1×10^7 /チューブの細胞を合計8回投与しました。この症例でも、細胞を投与すると速やかに改善してきています。その後しばらくして、再燃したのですが、細胞を追加で3回投与するとまた良くなりました。この患者さんは、このまま良くなって退院されたということです。

先程の先天性免疫不全の患者さんだと、継続的に治療しなくてはいけないというのが難点でしたが、移植と組み合わせると完治することが期待できます。つまり、移植後のある危機的な状況を乗り切れば、移植した造血幹細胞からどんどん免疫細胞が立ち上がってくるので治療が期待できる、ウイルスが持続感染していても、あまりひどい病気にはならないわけです。ですから、免疫が不完全で感染症に罹患する急場を何とか凌いであげれば、その後免疫系が正常化するにしたがい何とかなるのではないかと思います。現実には、一回だけ打って良くなったという例もあります。そういう意味でも、現在のところ、移植と組み合わせる治療としては、非常に優れていると思っています。感染症などで手こずると、治療費もかさみます。そういう意味でも、医療経済学的にも良い治療法になると思います。

感染症に関しては、これまでの治療経験では、だいたい投与すれば何らかの効果が得られています。なかには、お示したように劇的な効果が得られた症例もあるわけです。このように色々なウイルスに対して効果がありました（スライド17）。今日、お話しできませんでしたが、アデノウイルスによる出血性膀胱炎で困っているドクターが非常に多いということですが、これに関してもうまくいった例がいくつかあります。あともう一つ重要なことは、薬剤

スライド17

活性化CD4-DLIが著効したウイルス疾患

薬剤耐性サイトメガロウイルスによる腸炎、肺炎

コクサッキーウイルスによる腸炎

アデノウイルスによる出血性膀胱炎

EBウイルスによるホジキンリンパ腫

スライド18

骨髄移植後の白血病再発に対する 活性化CD4-DLI投与

症例：15歳 男性

診断：急性骨髄性白血病

骨髄移植：平成12年1月13日ドナーは母親

経過：急性及び慢性GVHD (-)、特記すべき合併症なし

移植後194日目に骨髄再発

DLI：母親より末梢血リンパ球を採取し、3回にわたって投与
DLI施行後も芽球は増加。発熱を繰返し、頻回の輸血が必要となった

活性化CD4-DLI：母親末梢血50mlより分離培養
移植後293日目に 0.94×10^7 /kg
の細胞を投与

耐性があっても関係ない、ということです。これが免疫療法の優れたところ。もう一つは、先程からお話ししている CTL 療法と比べて優れている点は、どのような感染症に対しても効果が期待できることです。免疫というのは何でもござれというのがいいところなのです。それをうまく利用しているのが我々の治療法の特徴であります。

白血病の再発の治療を行った症例を一例だけお示します(スライド18)。白血病の治療目的でお母さまから骨髄移植をしたのですが、その後白血病が再発してしまったという症例です。肉親のお母さまから移植したということで、ドナーから3回にわたってアフェレーシスを行って大量にリンパ球を採取し、DLIを行いました。それでも再発白血病が抑えられなかったということで、活性化 CD4T 細胞投与を行ないました。本人は男性なので染色体が XY ですが、お母さまの造血幹細胞を移植したということで XX 型に変化しています(スライド19)。しかし、その後ドナー由来の XX が段々と減り、本人の XY つまり白血病細胞が増えてきて、完全に再発してしまいました。再発後通常の DLI を3回行ってもコントロールできなかったために、ここで活性化 CD4-DLI として凍結細胞 5×10^5 個を一回投与したわけですが、その後見事に完全寛解状態となりました。しかもこの症例では GVHD が全く出ませんでした。これまでの研究結果では、CD4 陽性細胞だけを投与して致死的 GVHD が起きた例はありません。また、GVHD が出たとしてもかなり軽く、しかも、この症例のように通常の DLI が効かなかった患者さんでもうまく効く例があるということです。今後、研究を進めていけば、既存の DLI に取って代わるような治療法になるのではないかと、というふうに考えています。

スライド19

投与後の経過

移植後日数	活性化リンパ球 輸注後日数	キメラズム(%)		骨髄中の芽球 (%)
		XX	XY	
194		89.8	10.1	9
214		78.9	21.1	4
235		21.8	78.2	78
293	0			
316	23	90.1	9.1	10
341	50	98.1	1.9	0
356	64	95.1	4.0	0

現況：完全寛解状態を維持、退院し経過観察中

また、これまでの研究結果から、移植した造血幹細胞に対する生着促進効果もかなりありそうということも分かっています。先程免疫不全の患者さんを治療するとそれまでほとんどなかった B 細胞が出てきたというお話しをしましたが、千葉大の Winskott Aldrich 症候群の患者さんは、移植後に B 細胞がなかなか出てこなかったのですが、T 細胞を入れた途端に B 細胞が急激に増加し、それも正常な B 細胞だったということで、どうも B 細胞の生着に関してかなりポジティブだということでした。造血幹細胞移植では、ドナー不足が問題となっており、いま色々取り組みが行なわれています。例えば、臍帯血移植が注目されている訳ですが、もし活性化 CD4T 細胞による生着促進が上手くいけば、臍帯血移植を体重の重い大人に適用する道も開ける可能性があると思います。またドナー確保の別の取り組みとして、HLA 二座、三座ミスマッチの血縁ドナーからの骨髄移植の研究もされています。その場合、HLA ミスマッチですから、GVHD 予防として免疫抑制を強くかけなければいけないわけです。そうすると、感染症が重大な問題となります。具体的には、大阪大学の小川先生らがやられていますけれども、移植は非常にうまくいっているのですけれども、感染症でかなり苦労されています。そのような取り組みと我々の治療法を組み合わせたら非常にいいのではないかと考えられます。また、今後はミニ移植による固形がんの治療も増えてくると思います。ミニ移植でしたら 60 歳、70 歳という高齢の患者さんにも適用でき、また治療効果も高いということで注目されていますが、ミスマッチ移植と同じように強く免疫抑制をかけないと移植した造血幹細胞が拒絶されてしまうわけです。骨髄破壊しないわけですから。そうするとやはり感染症が大きな問題と

スライド20

- 移植医療への応用：今後の展望
- ・ 拒絶、生着不全に対する生着促進 (B細胞の増加)
 - ・ ミニ移植との併用による ALL、固形癌の治療 (DLI)
 - ・ 非移植患者に対する DLI による感染症と癌の治療

なります。したがって、これからの新しい造血幹細胞移植の取り組みと我々の取り組みを合体させることにより、移植による免疫不全症やがん治療の成功率を高めることに貢献できると考えています（スライド20）（スライド21）。

2003年 KAMON 講演会は、平成15年9月14日
東京医科歯科大学 臨床講堂で行われました。
特集記事は、防衛医科大学校検査部 小林賢先生
にまとめて頂きました。
ありがとうございました。 編集部

スライド21

活性化T細胞療法に関する今後の研究計画

1. 日和見ウイルス感染症治療の高度先進医療化（申請中）
2. 厚生労働科学研究小寺班：移植後の活性化CD4-DLIの臨床試験
3. 厚生労働科学研究中畑班：臍帯血移植後の活性化CD4-DLIの臨床試験
(神戸医療産業都市：先端医療振興財団との共同研究)
4. 多剤耐性結核患者の治療：国立国際医療センター、東京病院との共同研究
(Pilot study：副作用は観察されず、排菌の陰性化と陰影縮小)
5. ウイルスの網羅的迅速検出系の開発（製品保証と一般検査）
6. 免疫不全（NOD）マウスを使用した基礎研究



特集 2003年度 KAMON講演会

小児白血病の成因—最近の考え方

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発達病態小児科学

演者：水谷 修紀

ご紹介にあずかりました医科歯科大学の水谷と申します。私たちは、小児の白血病について研究しております。この数年間、小児白血病というのは治療成績が非常に良くなってまいりました。今は7割から8割ぐらいの患者さんが治るようになってきています。残りの2割がまだ治らないということで、そういう難治性のものをどうしたらいいかというレベルの仕事が重要となってきています。また、治ったとしても、治り方の問題があります。色々な意味で後遺症を残しては困るので、そういう意味から、治療成績が良くなったからといって研究がいらぬのではなく、今度は予防のための研究が必要な時代になっています。そのようなことも含めて、最近の考え方についてお話しをさせて頂きたいと思っております。

子供のがんの中で白血病がどういう位置を占めるかということをご説明するために、まず、小児がんについて少し説明させて頂きたいと思っております。小児がんは子供の死亡順位からいうと、年齢に応じて異なり、0才代ですと死亡順位の9位です。もう少し大きくなってくると、その順位が上がってまいります。0才代の死亡順位1位は先天奇形で、1才代以降に関しては不慮の事故が一番多くなります。そういう意味では、不慮の事故というのは重要な課題ですが、こういう死亡順位の中で見ても子供のがんというのは、死亡順位の大きな位置を占めているということに御注目下さい。

がん全体の中で子供の白血病というのは、どういう位置を占めているかということ、日本でも米国でもだいたい全小児がんの3割から4割ぐらいを占めています。つまり、がんの中では白血病が一番多いということになります(スライド1)。

子供のがんというのは、色々な特徴があります。子供といいましても、年齢的には非常に多様なものです。年齢的に区分をして、がんの発生頻度というものを見てみますと、だいたい2才未満に多いもの、3才から6才に多いもの、学童期に増えるもの、年齢と共に増加するもの、という区分がなされており、例えば、後でお話ししますが、網膜芽細胞腫という目の網膜にできるがんがあります。これは、だいたい5ヶ月ぐらいまでに多いと言われております。神経芽細胞腫は集団検診での早期発見とい

うようなことは、あまり意味がないので、検診はやめた方がいいと今話題になっていますが、その神経芽細胞腫も、2才未満に多いものと言われております。白血病には骨髄性白血病とリンパ性白血病がありますが、子供の場合は慢性白血病というのはほとんどありません。特に慢性リンパ性白血病は皆無と言われております。急性白血病が多いのですけれども、急性の白血病の中でも急性リンパ性が多いのが一つの特徴です。

この十数年の間に白血病の研究は非常に進歩しました。その一つに染色体の異常に伴ってどういうことが起こっているかが分かってきたということがあります。この染色体の異常というのは、基本的には

小児がんの発生頻度(1995)

	日本	米国
白血病	392(328%)	30%
悪性リンパ腫	73(6.1%)	13%
脳腫瘍	65(5.4%)	19%
神経芽細胞腫	268(225%)	8%
網膜芽細胞腫	85(7.1%)	3%
泌尿器系 (Wilms 腫瘍)	45(3.8%)	6%
消化器 (肝芽腫など)	46(3.8%)	1%
骨腫瘍	15(1.3%)	5%
軟部腫瘍	33(2.8%)	7%
奇形腫+その他	163(136%)	8%

スライド1

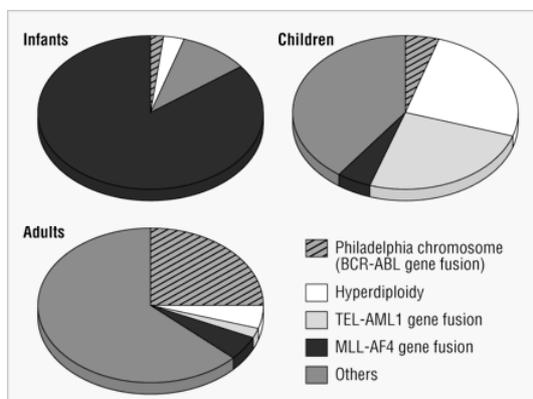
染色体の転座で起こるのですが、そういう染色体の転座を専門的に詳しく解析している人たちが非常に立派なお仕事をされたわけです。infants といまして、だいたい1才未満の子供さんの白血病においては、MLL 遺伝子と AF4 遺伝子の fusion (融合) が起こることが分かっています (スライド2)。これは、11番の染色体と4番の染色体の相互転座の結果起こる遺伝子の融合です。そういうものが非常に多いということが分かってきました。それよりもう少し大きい、いわゆる子供、3才から6才ぐらいまでの間に多い子供の白血病で一番頻度の高いものは、hyperdiploidy を除きますと、TEL-AML1 の遺伝子異常、つまり12と21番の染色体の相互転座によって起こる異常が多いということが分かっています。また、成人になりますと、今度はいわゆるフィラデルフィア染色体陽性のリンパ性白血病というのが増えてくるということで、年齢に応じて白血病の種類が異なってくるのが一つの特徴だと分かっています。

こういう染色体の転座は、fluorescent in situ hybridization という方法で可視化できる時代になってきています (スライド3)。こういう染色体の相互転座の結果、今まで眠っていた遺伝子が呼び覚まされる、例えば BCL2 という細胞死を抑制するような遺伝子が活性化される。それによって細胞ががん化する場合と、あと遺伝子融合、例えば Bcr-Abl なんかその典型ですけれども、融合タンパクができる、つまり今まで存在しなかったタンパクができるわけです。その結果、Abl タンパクが異常な活性化を起こして、がん化が引き起こされる場合があるということが分かってきました。遺伝子融合ということ、いわゆる PCR というテクニックを使って、患者さんの中に微量に存在している白血病細胞を非

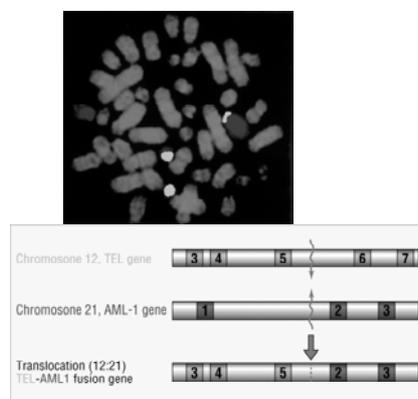
常に感度よく検出することができるようになりました。昔ですと、骨髓穿刺をして100個に1個、白血病細胞があったとしても、いくら経験を積んだ血液学者でも、白血病細胞なのか正常な細胞なのかということ識別することはできませんでした。この PCR のテクニックを使うと、それが明らかに異常な細胞であるか、正常な細胞であるかを客観的に証明できます。実際に PCR を使いますと、例えば、 10^3 個に1個、 10^4 個に1個というレベルで、そのがん細胞の存在を明らかにできるので、患者さんの状態を非常に正しくモニターできます。正しくモニターできるから、正しく治療ができるわけです。実際に人が白血病になりますと、体の中に 10^{12} 個ぐらいの白血病細胞を持っているだろうと言われていました。骨髓の全体の細胞数が変わらないとすると、1%の状態というのは、まだ 10^{10} 個の白血病細胞を持っている、0.1%でも 10^9 個の白血病細胞を持っているということになります。パーセントにすると、非常に少ないように見えますけれども、白血病の細胞数としては、まだ巨大な細胞数を抱えている状態だということが分かります。

臨床への応用を目指した研究と、臨床の先生たちの化学療法によって少しでも患者さんを救いたいという熱意をベースにして化学療法や骨髓移植という治療法が実を結んで、2~30年前は20%以下の生存率だったのですが、今は70%ぐらいの患者さんは救われるようになってきました。ただ、それでもやはり後遺症の問題が残っておりますので、これから、一見、白血病は治ったけれども、いろんな意味での障害を持った患者さんというのが増えてくるのではないかとこの心配を臨床の現場ではしております。

先程申し上げたような分子遺伝学的な異常という



スライド2

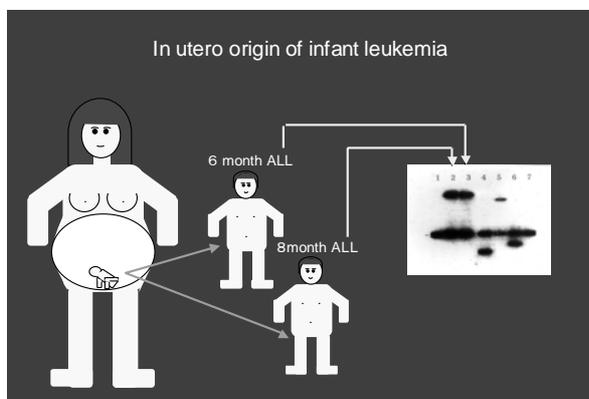


スライド3

のは、白血病の原因と言っているのかどうかという問題が一つあります。確かに、こういう異常があることによって細胞が無限に増殖する能力を獲得する、というレベルからいうと、これは確かに白血病の原因になるわけです。では何故、こういった染色体の転座が起こったり、遺伝子の異常が起こったりするのかというところまで明らかにしていけないと、本当の意味で白血病の原因を明らかにしたことはならないと考えられます。そういう立場から多くの研究者が今新たな研究を開始している時代だと思っています。こういった染色体異常が明らかに悪いことをしているのは事実なので、そういう染色体の異常を一つの手掛かりにして、ではこの染色体の異常がいつ起こるのか。そして、どのようにしてその異常が起こるのかということについて最近少しずつ研究が進められていますので、その辺の話をご紹介しますと思います。

まず初めに、染色体の異常がいつ起こるのかということ。この子供の白血病は、頻度が多いのは3才から6才というお話しをしました。極まれですが、年にだいたい日本ですと30人から40人ぐらいの新生児、1才未満の乳児の患者さんが乳児白血病という白血病に罹っています。まず、その乳児白血病は、さっきも申しましたが MLL-AF4 の染色体異常が起こり易いのですが、この乳児白血病がいったいその患者さんのどの時期に始まっているのかという研究がされております。

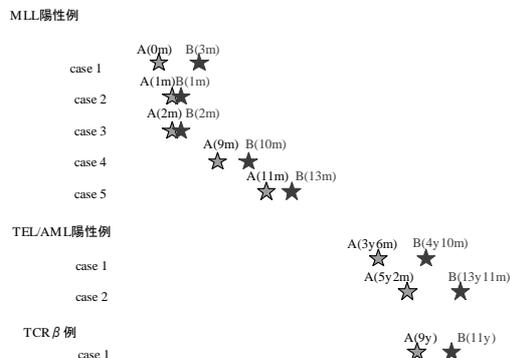
一つは乳児白血病といえども、生まれ落ちてから白血病が始まるという生後説です。生まれてから白血病化という現象を起こすという考え方と、もう一つは、そうではなくて、白血病になる取っ掛かりの現象は、胎児の時期に起こっているのだという考え方があります。



スライド4

そのどちらが正しいのかについて非常にユニークなことが明らかになってきました。乳児白血病の患者さんは、昔から1才未満の一卵性双生児の片方が白血病になると、もう片方も白血病になる率が非常に高いということが言われていました。その理由は、どこにあるのかと、それは遺伝的には全く同じような形質を持って生まれてきていますから、同じ環境の中でそれぞれが独立して白血病になり易い体質を持っていて、別々な白血病になるのだという考え方と、そうではなくて、実は、お腹でどちらかが白血病にまずなって、胎盤を共有していますから血液を共有しています。その白血病細胞も共有されて、二人共に白血病になっているのだという考え方があったわけです。そのどちらの説が正しいのかを証明することは、非常に重要なことなのであります。そのために世界中で、一卵性双生児で二人とも白血病になったケースをとにかく集めて研究したいという呼びかけがイギリスのグループからなされて、全世界でそれに協力したわけです。その結果、最終的にこの二人の白血病は同じ白血病であると、独立して白血病になったのではなくて、同じ白血病に罹ったということが明らかになったわけです（スライド4）。これは、一人が6ヶ月の時に乳児白血病に罹っています。その2ヶ月後にもう一人の子供さんが白血病になりました。この白血病細胞のDNAを採ってきて、それで先程 MLL-AF4 遺伝子異常が起こるというのがこの乳児白血病の特徴だということをお話ししましたけれども、この MLL 遺伝子のブレーク・ポイントを解析したのです。そうすると、この二人で起こっている白血病は全く同じところで染色体が切れているということが明らかになりました。これは、このサザンプロットの解析だけではなくて、実際に塩基配列を決定することで全く同じところで

一卵性双生児における同一クローン白血病2例目の発症とその時期



スライド5

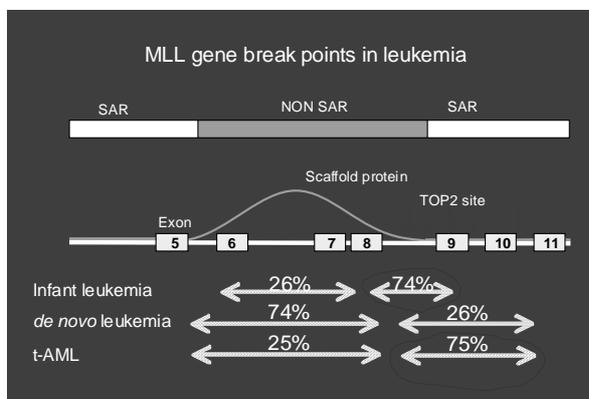
切れているということが分かっていますので、この二人が持っている白血病細胞はクローン的には全く同じだということが証明されたわけです。

これが最初の取掛かりで、もう少したくさん症例をやろうというので、全世界が協力して、たくさんといってもたかが知れているのですが、集められました(スライド5)。乳児白血病のケースについて、これはケース1から5までどれも一卵性双生児の片一方の兄弟が白血病になった時期です。もう一方の白血病になった患者さん、これを比べてみると、ケースごとに全く同じ白血病細胞に由来しているということが分かりました。つまり、乳児白血病では、おそらくことごとく胎児期に白血病が始まっているだろうということの証明が得られたわけです。では、もう少し大きな患者さんではどうか。実際には、一卵性双生児で1才以上に両方が白血病になるというケースが極まれにありました。そのうちの二つの典型例をお見せします。ケース1は、一卵性双生児の一方が3才6ヶ月で白血病になっています。ケース2では、5才2ヶ月で白血病になっています。そのケース1について、一卵性双生児のもう一方が白血病になりました。4才10ヶ月の時です。ケース2においてはもう一方が13才と11ヶ月、つまりほとんど14才の時です。この白血病になった患者さん、これを調べてみるとやはり、ケース1の兄弟間のクローンが全く同じだということが明らかになりました。ケース2の兄弟も同じクローンでした。これらのことからやはり白血病の始まりは胎児期にさかのぼることができたということになりました。今後は、このような一卵性双生児で、もう少し年齢が大きくなった患者さんでどこまで行けるか、大人の白血病まで下っていけるかが問題だと思います。大人の白血病でも、こういうようなことが証明できれば、大人

の白血病も実はその始まりは胎児期にあったというように成りかねないわけです。そうすると、白血病というものの成金の考え方がガラッと変わってくるということにもなります。そういうインパクトを与えた仕事でした。小児白血病は、おそらく胎児期に始まっているのだろうという考え方が大勢を占め始めています。

では、そういった異常がどうして起こるのかということ。全ての病気は、いくつかの遺伝的なものを除いて、環境と遺伝の関係の中でたぶん起こっているのだろうと考えられます。小児白血病の環境因子についても色々最近研究が進められています。

最新のトピックスとしてお話しできるのは、先程申し上げた1才未満で起こる乳児白血病の染色体の転座で、11番のq23という領域にあるMLL遺伝子です(スライド6)。乳児白血病で色々詳しく解析してみますと、このMLL遺伝子の中でも、いわゆるトポイソメラーゼ2(TOPO2)の認識サイトというのがあるのですが、この領域で切れているケースが非常に多いということが詳しい解析の結果分かってまいりました。その一方で、最近、白血病の治療に色々な抗がん剤を使うことがあります。その抗がん剤を使って数年後に別な白血病になる患者さんが最近増えてきています。それをいわゆる二次性白血病と呼んでおります。そういう二次性白血病の患者さんも実は、11q23のMLL遺伝子の領域で染色体の切断が起こっているケースが非常に多いということが分かりました。その二つを比べてみれば、何か乳児白血病の成因にヒントがつかめるであろうということになるわけです。いわゆる治療に伴う二次性白血病の患者さんについてもMLL遺伝子の切断点詳しく解析されました。その結果、この二つには



スライド6

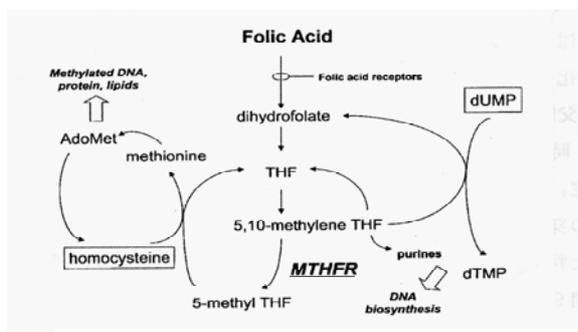
乳児白血病国際疫学研究

1. Case-Control Study
2. 参加国
日本、中国、イタリア、ギリシャ、エジプト、ブラジル、イギリス
3. 136例の乳児白血病とコントロール266例
4. 母親への聞き取り調査
5. 結果
Pesticide against mosquito, cockroaches, fleas et al.
Baygon (Topo II阻害剤としての作用が疑われる)
NSAID
Dipyron (Mexican aspirin, Topo II阻害剤として作用する)

スライド7

非常に大きな共通点があるということが分かってまいりました。それは、何れも TOPO2 サイトで切れているということでありました。ということは、お腹の中で白血病が始まったとして、おそらく母体に TOPO2 阻害剤、いわゆる抗がん剤として使われる TOPO2 阻害剤の影響が考えられるのではないかとということが言われるようになりました。実際に TOPO2 阻害剤そのものを使われる母体というのはほとんどないので、そうすると TOPO2 阻害剤様の物質が環境の中にあるのではないかとということになります。そこで、乳児白血病を中心とした国際疫学研究というのが組織されまして、色々な国が参加して、私たちも参加し、最終的に 136 例の乳児白血病と 266 例のケースコントロールの母親に聞き取り調査をすることができました(スライド7)。その結果、ある種の殺虫剤 (Baygon)、あるいは非ステロイド性の抗炎症剤 (Dipyron) を服用している母体に患者さんが統計学的に少し多いということがいえました。これは、最終的な結果ではなくて、さらにもう少しこれに引き続く次のスタディーが今デザインされているところです。とりあえず、第一次調査としてはこのような結果が出たということで、この方向に向けて研究をもう少し進めていこうという話になっています。

実際問題として小児白血病に関しては、電磁波説であるとか、放射線だとかいうようなことが言われておりますが、電磁波については欧米でかなり研究がなされて、かなり否定的な見解が多いと思いますけれども、日本では少し統計的に有意差があるというような話になりつつあるようです。もう少しこの辺は慎重な解析が必要だろうと思います。それに加えて、環境中の化学物質にも我々は注意を注がなければいけない時代になってきたということです。

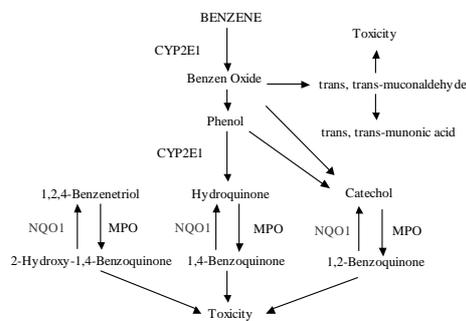


スライド8

次に遺伝的な要因についてはどうかをお話ししたいと思います。先程の例でお話ししますと、TOPO2 阻害剤様の物質がもし犯人だったとして、これが母体に作用して乳児に白血病を引き起こす原因になっていると仮定すると、同じような環境に曝されながら、白血病になる子供とならない子供がいます。そういう場合は、おそらく胎児の TOPO2 阻害剤の感受性、あるいはそういう物質の代謝機構だとか、それを無毒化する能力だとか、あるいは同じ毒性物質に曝されても DNA が不安定になっているために傷が付きやすいということがあり得ます。

一つは解毒代謝機構の障害ということが注目されています。最近のトピックスとして言われているのが、葉酸の代謝経路の酵素の遺伝的多型が白血病のなりにくさを規定しているという話です(スライド8)。これは、MTHFR といひまして、Methylene tetrahydrofolate reductase という酵素なのですが、この酵素活性が高いと、ヌクレオチドの量が減って、DNA の修復に障害が起これると考えられています。ですから、この場合は、この MTHFR の酵素活性の低い人の方が白血病になりにくいのだというようなストーリーになります。これは、一番最近の "Blood" にもたぶん出ていると思います (Blood, Oct 2003; 102: 2321 - 2333)。

もう一つはベンゼンです(スライド9)。中国でベンゼンの中毒が発生して白血病患者さんが増えたのを契機にして、ベンゼンの代謝機構の問題というのが注目されています。ベンゼンは、色々な代謝経路を経て最終的にベンゾキノンというものになるので、このベンゾキノンというのは細胞毒性があるのですが、そのベンゾキノンに我々の細胞の中でヒドロキノンに無毒化する酵素として NQO1



スライド9

という酵素があります。NQO1 という酵素にやはり遺伝的多型があって、その遺伝的多型の中でも酵素活性を失うような多型と白血病のなりやすさとの関係があるのだという論文が欧米でかなりたくさん出されています。ただ、我々日本で同じようなスタディーをやりましたけれども、日本ではその有意な相関が見えませんでした。ですから、こういったものは色々な要素が絡んできておりますので、これだけで説明することはかなり難しいのかもしれないと考えています。

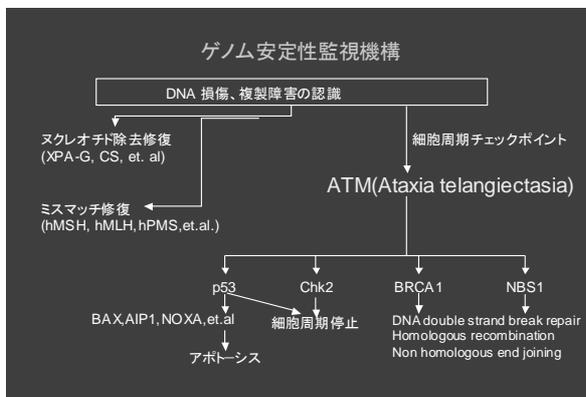
最後にご紹介したいのは、ゲノムの安定性の遺伝的障害ということです。これは比較的新しい概念で、色々な新しい概念が出てきてそれをもとに作られた新しい大きな概念だと考えられると思います。こういった色々な遺伝的バックグラウンドを考えていく上で非常に参考になるのは、いわゆる遺伝性が非常にはっきりしている病気で、しかもその遺伝病になるとがんになる頻度が高い優性遺伝的な遺伝をする遺伝性腫瘍といわれる病気、例えば、先程の子供のがんでいいますと、網膜の悪性腫瘍であります網膜芽細胞腫であるとか、あるいは Li-Fraumeni 症候群というような遺伝性の腫瘍などがあります。その他、大人のがんですと、HNPCC (hereditary non polyposis colorectal cancer ; 遺伝性非腺腫症性大腸癌) と呼ばれるような病気、こういったものはそれぞれ原因遺伝子が見つかっていまして、その遺伝子の片一方のアレルに異常があるとその患者さんは非常に高頻度でがんになるという、そういう家系です。

それともう一つは、がんになりやすいというのを特徴とした高発がん性遺伝病と呼ばれるもので、これは主に劣性遺伝すると言われていています。その代表が色素性乾皮症と呼ばれる病気や、後で少しお話し

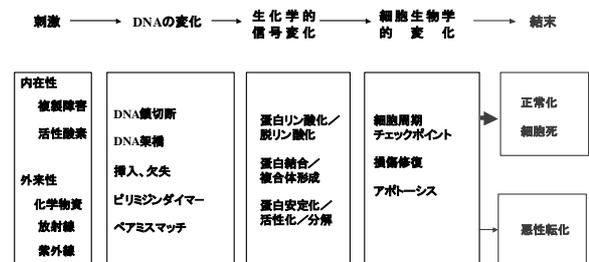
ますが、Ataxia telangiectasia (毛細血管拡張性小脳運動失調症) という病気です。あと、Nijmegen 症候群というような、これは日本ではあまり知られていない病気です。ヨーロッパで多い病気と言われていいます。それから、ファンコニ貧血、こういったものは劣性遺伝病でありまして、白血病以外の色々な病像を呈するのですけれども、非常に白血病になりやすい病気だということが分かってきています。それぞれ原因遺伝子がもう明らかにされてきています。こういった病気というのは一言で説明すると、ゲノムの安定性の障害だと考えられています (スライド10)。我々の体の中には、ゲノムを安定化させようという機構が働いています。

一つはヌクレオチド除去修復といいまして、これは色素性乾皮症の時に見られる障害なのですけれども、例えば、紫外線に照射されますと、チミンのダイマーができます。そのチミンのダイマーができますと、それを認識してその両端を切って、それを取り除いて穴埋めをするという一連の作業が必要で、それぞれの作業に必要な酵素が分離されたわけです。そのどれかの酵素に異常があると色素性乾皮症という紫外線によって皮膚がんを起しやす、神経の病気も伴うのですけれども、そういう病気になるということが分かってきています。そういうヌクレオチド除去修復というのが、一つはゲノムの安定化に非常に重要な役割を果たしているということが分かってきています。

もう一つは、ミスマッチ修復機構、例えば、核酸配列でいくと GGG という 3 つの配列のところに DNA 複製の段階で一つ塩基が追加され、GGGG になった状態で複製が繰り返されると遺伝子産物としてはそこでフレームシフトが起こって異常なタンパク質ができてしまいます。そういう余分な配列が入



スライド10



スライド11

ったり、抜けたりしないように監視をし、制御している酵素群があるのですが、その酵素群の異常によってこのミスマッチ修復の障害が起こる、これがいわゆる HNPCC と呼ばれるような病気などのバックグラウンドになっています。

もう一つ最近注目されているのが細胞周期のチェックポイントという考え方です。これは基本的には、例えば、信号が赤になるとそこで車は止まれという指令が細胞の中で働いています。それはどういうことかということ、DNA にダメージが起こるとそのことを認識して信号が赤になる。そのダメージを修復しないまま複製を起こすと誤った DNA を次から次へと複製していくということが考えられます。そこで、細胞周期は一回そこで止まりなさい、止まった上で修復しなさい。修復が完了してから細胞周期を回しなさい。そういうメカニズムが働いているわけです。それを司っているのがこの ATM タンパク質だと言われています。この ATM タンパク質というのは、実は毛細血管拡張性小脳運動失調症という病気からみつかった遺伝子です。ATM タンパク質というのは、我々の細胞の中の環境を監視し、異常があれば赤信号を発して修復が完了するまで細胞が増殖しないようにコントロールしている。そういう重要なタンパク質ということが分かってきています。

こういった色々な細胞監視機構に係わるタンパク質がどのような役割を果たしているのかをおおざっぱに説明します(スライド11)。細胞に何らかの刺激が加わります。それは内在性の刺激であったり、あるいは外から来る刺激であったり、例えば、放射線なんか当たりますと DNA は二重鎖の切断というのが起こりますし、紫外線ですと先程のように一本鎖の DNA の障害ということが起こりますが、こういう刺激が加わると、DNA に変化が起こります。

DNA の変化を察知すると、それが細胞の中で生化学的な信号変化として伝えられます。それはタンパク質のリン酸化であったり、脱リン酸化であったり、あるいはタンパク質とタンパク質の結合であったり、あるいはタンパク質の安定化であるとか分解の促進であるとか、そういうような生化学的な信号になって変換されて、それが細胞生物学的な変化として表現されます。先程申し上げましたように、細胞周期を止めるというのも一つの細胞生物学的な変化です。その止めている間に DNA の修復をしなさいということ。もう一つは、アポトーシスといまして、細胞に死になさいと、これ以上修復することはできないから、もうこの細胞は死になさいという指令を発する。そういうことが細胞生物学的な変化として適応されます。その結果、ほとんどの場合、細胞はどうしようもなければ死んでしまうか、損傷を修復するかして、正常化しているのですが、やはり稀に、その機構を通り抜けて悪性転化ということが起こるだろうと考えられています。

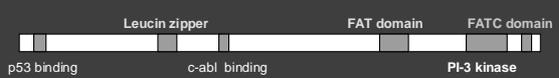
そこで先程のチェックポイント機構の代表選手として ATM タンパク質があるというお話しをしましたが、この AT、Ataxia telangiectasia と呼ばれる病気はどういう病気かということについて少しお話しをしたいと思います(スライド12)。Ataxia というのは小脳失調症です。ですから、小脳失調が起こります。Telangiectasia、毛細血管の拡張、これは眼球結膜が拡張しています。これは、皮膚にも起こり得ると言われています。その他に免疫不全症を特徴としておりまして、白血病とか悪性リンパ腫の頻度が通常に比べて 100 倍ぐらい高いと言われています。これは、常染色体の劣性遺伝によるものです。今から 8 年ほど前になりますがいשראלのグループがこの責任遺伝子のクローニングに成功しました。

毛細血管拡張性小脳失調症 (AT)

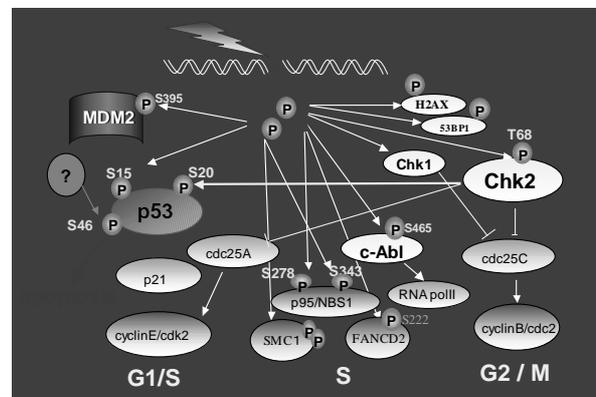
AT : 毛細血管拡張、小脳失調、免疫不全を特徴とする常染色体劣性遺伝病。白血病、悪性リンパ腫の頻度が100倍高い。



責任遺伝子 ATM はcDNAのサイズが 13 kb。ATM蛋白は 350 kD の巨大な核蛋白で PI-3 kinase活性をもつ。DNA損傷に対して損傷修復、細胞周期調節、細胞死など多彩な機能を調節する。 Savitsky K, et al.: Science 268:1749-53, 1995, Shihoh, Y.: Curr Opin Genet Dev 11, 71-77. (2001).



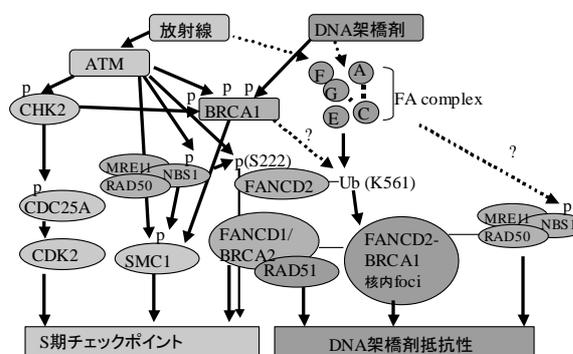
スライド12



スライド13

その結果、非常に大きなタンパク質だということが分かりました。cDNA で 10 kb ぐらいのサイズになると思います。さらに、この ATM タンパク質の機能について研究が非常に盛んに行われています。この ATM タンパク質は色々なことをやっていることが最近分かってきています (スライド 13)。ATM タンパク質は、我々の細胞核の中でダイマーを形成していると言われていました。それで DNA にダメージが加わりますと、例えば放射線が当たりますと、DNA が切れて二重鎖の切断が起こります。そうすると、ATM タンパク質が自己リン酸化ということを引き起こしてモノマーになると言われています。このモノマーが色々なタンパク質のリン酸化を引き起こします。例えば、Li-Fraumeni 症候群の時に原因になっていることが分かっている癌抑制遺伝子としても非常に有名な p53 という遺伝子です。これをリン酸化してタンパク質の安定化であるとか、活性化を引き起こすと言われていました。その他に Chk2 といわれるようなタンパク質、これは細胞周期を止めているタンパク質なわけですが、そのタンパク質の活性化にも重要な役割を果たしていると言われていました。こういった色々なタンパク質のリン酸化を介して、さらに、そのリン酸化されたタンパク質がまた次のターゲットをリン酸化したり、活性化したりして、最終的に細胞周期を G₁ 期、S 期、G₂ 期で止めるという役割と、それとどうしようもなければ、細胞に死になさいという指令を出す役割を果たしているということが分かってきています。

また、最近のトピックスとしては、ファンconi貧血の中の FANCD2 というタイプの病気の原因遺伝子産物と、この ATM タンパク質のクロストークがあるということが分かってきています (スライド 14)。



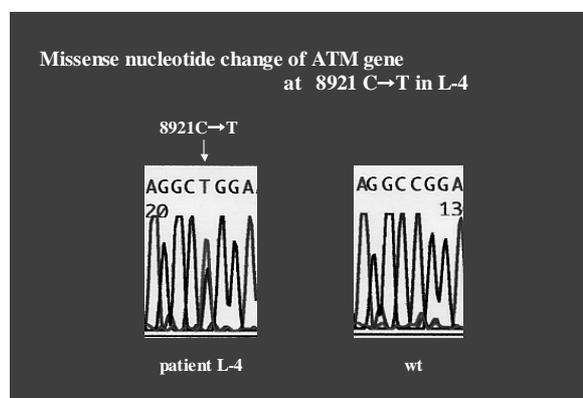
スライド14

我々の研究のお話を少しさせて頂きます。AT のキャリアーの頻度が欧米でだいたい 100 人に 1 人ぐらいいるであろうと言われてましたので、この ATM の異常が色々な小児がんのなりやすさを決めている可能性があるのではないかとということで、少しプレリミナリーですけども研究を進めたわけです。

一つの仮説としては、例えば、キャリアーの状態でも ATM に異常があつてゲノムの監視機構に何らかの障害があると仮定して、そこでその異常と TOPO2 阻害剤の感受性の亢進が何らかの関係をしたと仮定して、そこに TOPO2 阻害剤が加わると、白血病クローンが発生する可能性というのがあるのではないかと考えたわけです。

これは突拍子もない考えで思い付いたのではなく、それなりに文献的な裏付けがありまして、Ataxia telangiectasia の患者さんというのは、TOPO2 阻害剤に対する感受性が非常に高いと言われていました。また、キャリアーの細胞も感受性が高いと言われていました。また、乳児白血病では TOPO2 阻害剤で起こる MLL 遺伝子のところの異常が非常に頻度が高いということもあわせて考えたわけです。

がんの研究をやる時には、がん細胞そのものを研究する立場と、がん患者さんの正常細胞を採ってきて研究するという立場とがたぶんあるだろうと思います。がん細胞を研究する場合は、これは私の独断的な考え方なのですが、がんの成因を明らかにしていくということは非常に難しいだろうと思っています。それは、何故かといいますと、がん細胞として生物学的な形質を獲得した時には色々な遺伝子異常が加わっていますので、どういうプロセスで細胞ががん化しているのかということにはなかなか明らかにしにくいだろうと思います。その代わり、それを明らかにすれば、何らかの遺伝子診断法が見つ



スライド15

かったり、あるいは抗がん剤の発見などに結びつく可能性はあると思います。その一方で、がんになった患者さんの正常体細胞を研究するという事は、その患者さんが遺伝的にどういう個性を持っているかということをはっきりとすることができて、将来的には疾患の予防に役立つ可能性があるのではないかと思います。私たちは、後者の立場に立って、こういった患者さんの正常のリンパ球を採ってきて色々解析を進めているわけです。

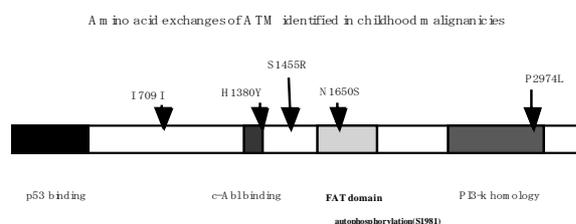
ここで我々が研究したのは乳児白血病患者さんで、7例の患者さんについて、いわゆる血液学的には寛解の状態、白血病細胞が消えた状態の時に正常のリンパ球をいただいて、それを EB ウイルスでトランスフォームして、それを使って色々研究を進めています。こういう患者さんは、遺伝的な不安定性があるのではないかと考えたわけです。その遺伝的な安定性を規定しているものに ATM タンパク質が非常に重要だということで、遺伝子の解析を進めると、一例の患者さんでこの 8921 番目の C が T に置換されているケースがありました (スライド 15)。この変位のある場所というのは何処かというと、この ATM タンパク質が色々な基質をリン酸化するという話をしましたけれども、その基質をリン酸化するためのカイネースドメインにあたるわけです (スライド 16)。これは何か関係があるのではないかとということで、その変位のアレルをサブクローニングしまして、実はサブクローニングといっても、一口で 10 kb のものをサブクローニングすることはなかなか難しく、色々な苦労をした結果、ようやくできたのですけれども、その遺伝子の置換の見られた ATM の cDNA を色々な細胞に入れまして、その活性を見たわけです。AT の患者さんからえられた線維芽細胞に正常の ATM とこの変異し

た ATM の遺伝子を入れて、リン酸化活性を比較してみますと、だいぶ落ちてきているということが分かりました。また、細胞生物学的に cologenic アッセイというアッセイがあるのですが、それをやってもやはり正常ではないということが分かりました。また、いわゆる正常の細胞の中にその異常のタンパク質を入れた時に、その正常タンパク質の機能を抑制する能力があるかどうか、つまり、ドミナント・ネガティブな効果を持っているかどうかということについて解析してみると、やはりドミナント・ネガティブな効果を持っているというようなことが少し分かってきました。

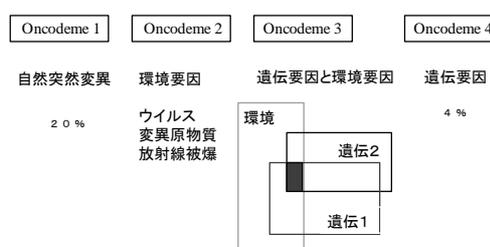
その次に、比較的家族集積性が多いといわれている病気の中にホジキン病がありましたので、ホジキン病についても少し研究を進めていくことを考えました。というのは、AT の患者さんというのは、ホジキン病に非常になりやすいというのが一つの特徴と言われていましたので、やはり ATM 遺伝子異常のヘテロの患者さんがホジキン病になっている可能性があるのではないかと考えて、12例のホジキン病患者さんについて色々調べてみました。ここで6例の患者さんで何かしらの障害が見つかってきました。実際に、そういう患者さんから樹立したリンパ球の細胞を使って ATM のリン酸化活性がどうかというのを見ますと、正常に比べてやはり落ちてきているということから、この一塩基置換は、機能障害を伴っているのではないかと今考えています。Cologenic 活性の結果もそれをサポートするような結果でした。

こうやって見ますと、結構な頻度で ATM のミスセンス変異というものが子供の白血病、あるいはリンパ腫に係わっている可能性が考えられるので、もう少しこの研究を進めていかなければならないだろうと思っています。

発がん機構におけるOncogene説—by Prof. Knudson



スライド16



スライド17

先程申し上げました網膜芽細胞腫の原因遺伝子というものが存在することを予言して、数年後にそれを見つけることに成功した Knudson さんという方が、発癌機構というものをいくつかに分けることができるのではないかと提唱されております(スライド17)。それを彼は、Oncodeme 説と呼んでいますが、Oncodeme 1 というのは突然変異で起こるもので、避けがたいものというふうに彼は説明しています。Oncodeme 4 というのは明らかに遺伝的な要因、例えば、Li-Fraumeni 症候群だとか、網膜芽細胞腫であるとか、HNPPC であるとか、そういったものです。この Oncodeme 4 は全がんの4%くらいを占めるであろうと、彼は考えています。Oncodeme 2 というのはウイルスだとか、変異原物質とか、放射線被曝によって明らかに環境要因で起こるものです。Oncodeme 3 というのは Oncodeme 2 と Oncodeme 4 の複合的に関与するものとして彼は位置付けているのです。私たちは、自分たちの経験の中でやはり小児がんというのは、この Oncodeme 3 の中に多くのものが入って、いくつかの遺伝的な要因と特殊な環境要因が作用する、その重なり合う中に小児がん、特に小児白血病とか、リンパ腫の一部などは発生しているのではないかと考えている段階です。

最初に少し申し上げたかもしれませんが、大人のがんというのはだいたい生活習慣病と言われてます。やはり生活習慣というのは非常に重要な役割を果たしていますが、中にはやはり遺伝的なものもあるのですが、子供の場合にはそれほど悪い生活習慣を持っていなくてもがんになる。やはり環境的な要因を100%除去することができないと思いますが、遺伝的なバックグラウンドというものが大人にくらべてより深く関係していると考えています。

これをまとめますと、小児白血病は、基本的に胎児期に始まるのではないかと説がいま有力になりつつあるということです。それと、小児白血病／がんの成因として環境要因と遺伝的要因というのが少しずつ明らかになりつつあるということだと思います。最後に、成因の理解と予防に向けて、子供の遺伝的な個性の理解、それと母体環境を含めた成育環境の整備ということが重要な課題になってくるであろうというふうに考えています(スライド18)。

先程申し上げた ATM タンパク質というのは、一つのファミリーをつくっているということが分かっています。そのファミリーは、ATM だとか、DNA-PK とか、ATR、ATX、mTOR と呼ばれるようなタンパク質のアミノ酸配列の特徴から一つのファミリーとして言われているのですが、こういうタンパク質類は DNA の損傷を監視したり、メッセンジャーRNA の損傷を監視したり、細胞の中のアミノ酸レベルの障害を監視したりして、細胞内環境の自己統御を進めているシステムであると考えられています(スライド19)。生物学的にもおもしろいし、色々な意味で生物学以外の領域から見ても非常におもしろい役割をしているタンパク質ではないかと私自身は考えておりました、注目しているものです。

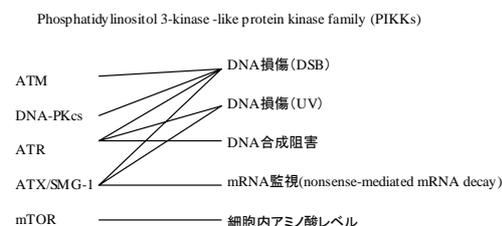
最後に一つお示ししたいのは、先程15才ぐらいまでの白血病は子供の胎児期に始まっているらしいと今考えられているのですが、それをもう少し先ののばしていったらどうなのかということです。これを明らかにしていくと、成人のがんの原因を色々な意味で説明していくのに胎児の時期にまでさかのぼらないといけないうろと、というようなこととなります。最近"Nature"という雑誌に成人のがんは既に胎

まとめ1:小児白血病は胎児期に始まる

まとめ2:小児白血病／がんの成因—環境要因と遺伝的要因—

まとめ3:
成因の理解と予防に向けて
こどもの遺伝的個性と成育環境(母体環境を含む)の理解

細胞環境の自己統御システム



細胞内の種々のストレスを感知し、蛋白質リン酸化を通して細胞内環境を統御

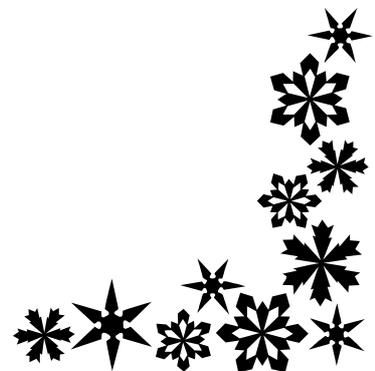
スライド18

スライド19

児／子供の発達期に変異を起こした幹細胞が分布したところから発生するというような説を提唱しているひとがいて、これは我々にとっても非常にencouraging（勇気づける）な説でしたので少し紹介させていただいたわけです。成人のがんも既に胎児期あるいは子供の時期に何らかの異常が始まっているのではないかということをサポートする考え方だと思います。そういう意味で胎児とか、子供の環境を調えるということ、あるいは遺伝的な個性を理解するということも含めて、もちろんプライバシーの問題がありますから何処までやるかという問題は色々と考えなくてはいけない問題ですが、子供の問題というのは非常に重要な問題であるということを強調したいと思います。

ご静聴ありがとうございました。

2003年 KAMON 講演会は、平成15年9月14日
東京医科歯科大学 臨床講堂で行われました。
特集記事は、防衛医科大学校検査部 小林賢先生
にまとめて頂きました。
ありがとうございました。 編集部



集団遺伝学の基礎講座(5)

-同義置換・非同義置換数の推定-

東京大学医学部人類遺伝学教室 大橋 順

前回は、生物進化のプロセスにおいて、塩基配列が変化の様子を統計モデルを利用して解析する方法について解説しました。今回は、コーディング領域内の塩基置換でアミノ酸の変化を伴わない同義置換と、アミノ酸の変化を伴う非同義置換の塩基置換数の推定方法について解説したいと思います。

遺伝子コーディング領域には3種類の点突然変異があります。図1を見てください。(a)はValの第三塩基ポジションがCからAに変化した突然変異です。突然変異後のコドンGTAは同じValをコードしていますので、この突然変異によってアミノ酸が変化することはありません。このような突然変異を、同義突然変異(サイレント突然変異)といいます。(b)はValの第一塩基ポジションがGからTに変化した突然変異です。突然変異後のコドンTTCはPheをコードしていますので、この突然変異によってアミノ酸が変化することになります。このような突然変異を、非同義突然変異といいます。(c)はLysの第一塩基ポジションがAからTに変化した突然変異です。突然変異後のコドンTAGは終止コドンです。したがって、その後のコドンはアミノ酸に翻訳されないことになります。このような突然変異を、ナンセンス

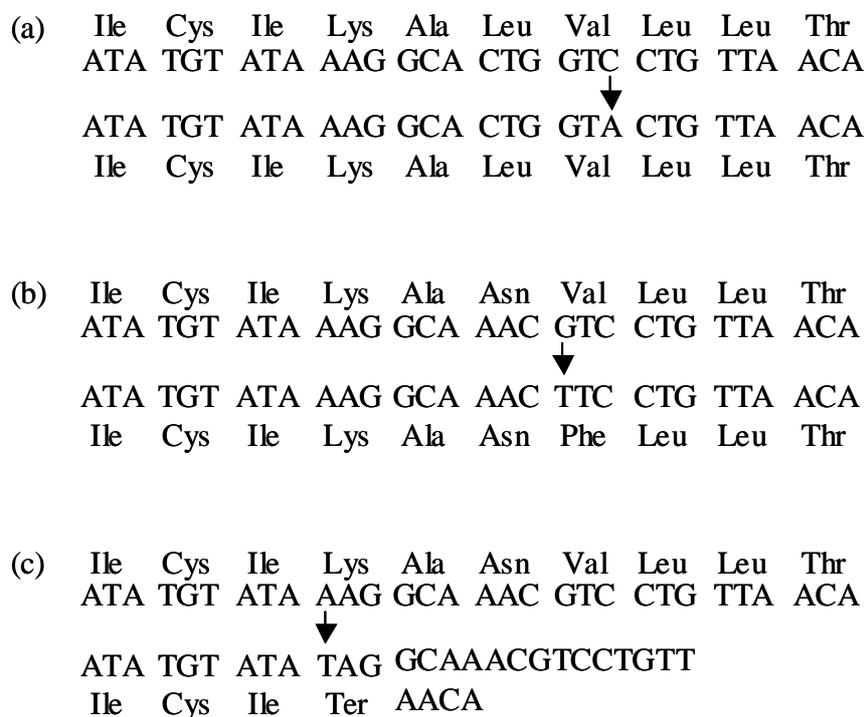


図1 コーディング領域内における点突然変異のタイプ：(a)同義、(b)非同義、(c)ナンセンス

From Li and Graur (1991)

ンス突然変異といいます。ナンセンス突然変異が起きたとしても、そのような変異が集団中に拡がり、遂には固定までしてしまうことはほとんどありません。しかし、同義および非同義突然変異の固定はしばしば起こり、それらは同義置換および非同義置換とよばれます。一般的には、アミノ酸変化が起こるとそのタンパクの構造や機能が阻害されることになるため、非同義置換は同義置換よりも起こりにくいといえます(詳しくは、集団遺伝学の基礎講座(3)において、分子進化の中立説として解説してあります)。

コドン表を眺めていただくと分かりますが、コドンの第一、第二、第三ポジションに点突然変異が起きた場合に、それが同義となるか非同義となるかには確率的に大きな差があります。興味深いのは、第2ポジションの置換は全て非同義置換となることです。表1をご覧ください。これは、ウサギの α グロビン遺伝子とマウスの β^{maj} グロビン遺伝子間の、サイトあたりの塩基置換数の推定値(d)を示しています。表1から明らかなように、コーディング領域の塩基置換の起こりやすさは全てのサイトで等しくはありません。第三、第一、第二ポジションの順で塩基置換がより多く起こっています。これは、一般的な観察結果であり、他の遺伝子間であっても、他の生物種間であっても、ほぼ同様です。その理由は、第三、第一、第二ポジションの順で同義置換が起こる確率が高くなるからです。

そこで、同義置換と非同義置換を区別してそれぞれの置換数を推定することが望まれます。もし、比較する相同なコドン対間にたかだか1カ所の塩基差異しかない場合は、同義置換と非同義置換は容易に区別でき、全て数え上げることで配列間の同義置換割合と非同義置換割合を求めることができます。しかし、ひとつのコドン対間に2カ所以上の塩基差異が存在する場合には、同義置換と非同義置換を区別することはもはや容易ではなく、置換割合の計算には特別な工夫が必要になります。これまでに複数の方法が提案されていますが、ここでは、比較的簡単なLiら(1985)の方法を紹介したいと思います。

この方法では、開始コドンと終止コドンはめったに変化しませんので、これらは計算の対象から除外します。コドンの各塩基は非縮退、二重縮退、三重縮退、四重縮退に分けることができます。非縮退とは、そのサイトの塩基置換は全て非同義置換となるサイトをいいます。二重縮退とは、3つの塩基置換のうちの1つの塩基置換が同義置換となるサイトをいいます。三重縮退とは、3つの塩基置換のうちの2つの塩基置換が同義置換となるサイトをいいます。四重縮退とは、そのサイトの塩基置換は全て同義置換となるサイトをいいます。例えば、コドンTTT(Phe)の第一および第二ポジションは非縮退、第三ポジションは二重縮退となっています。また、Ileの第三ポジションのみが三重縮退サイトになります。計

表1 コドンの第一、第二、第三塩基ポジションにおけるウサギの α グロビン遺伝子とマウスの β^{maj} グロビン遺伝子間の、サイトあたりの塩基置換数の推定値(d)

コドンの塩基 ポジション	Jukes-Cantor	Kimura two-parameter
第一ポジション	0.64±0.10	0.64±0.10
第二ポジション	0.42±0.07	0.42±0.07
第三ポジション	0.88±0.14	0.92±0.16

算を簡略化するため、Li らの方法ではこのサイト (Ile の第三ポジション) は二重縮退サイトとして扱います。二つの配列を比較する前に、それぞれの配列上で、非縮退、二重縮退 (含三重縮退)、四重縮退の数を数え上げます。そして、二つの配列間の平均数を非縮退(L_0)、二重縮退(L_2)、四重縮退(L_4)とします。ここで、 $L_0 + L_2 + L_4$ は比較する総塩基数となります。

次に、二つの配列間で相同なコドン対を一つずつ比較していきます。前述のようにコドン間で塩基差異が一つしかない場合には、ただちにその差異が同義的か非同義的かを決定することができます。もし塩基差異が二つ以上ある場合には、そのコドンで起きたであろう全ての可能最小進化経路を考えることにします。例えば、ATT(Asn)と ACG(Thr)の比較について考えてみましょう。この場合には、二つの可能な経路が存在します。

経路 I: AAT(Asn) ↔ ACT(Thr) ↔ ACG(Thr)

経路 II: AAT(Asn) ↔ AAG(Lys) ↔ ACG(Thr)

経路 I では、一回の同義置換と一回の非同義置換が起きたと考えます。経路 II では、二回の非同義置換が起きたと考えます。同義置換が非同義置換より起こりやすいことが分かっていますので、経路 I は経路 II よりも起こった可能性が高いと想像されます。経路 I の起こる確率を w 、経路 II の起こる確率を $1-w$ とすると (それ以外の経路は考慮しません)、これによって重み付けを行い、同義置換の期待数は $1 \times w + 0 \times (1-w) = w$ 、非同義置換の期待数は $1 \times w + 2 \times (1-w) = 2-w$ となります。実際には w の値を知ることはできませんが、多数の遺伝子に対する相同なコドン対間の比較から、全てのコドン間の組み合わせで w の値が推定されています。もし、重み付けを行わない場合は、 w には 0.5 を代入します。

二つのコドン間に 3 個の塩基差異が存在する場合は、それを説明するには 6 つの可能最小進化経路を考える必要があります。この場合も 2 個の塩基差異が存在する場合と同様に、同義および非同義塩基置換割合を推定することができます。なお、経路中に終止コドンが出現する場合には、その経路は計算からは除外します。

非縮退、二重縮退 (含三重縮退)、四重縮退サイトにおける塩基差異は、さらにそれをトランジション型(S_i)とトランスバージョン型(V_i)に分けることができます($i = 0, 2, 4$)。トランジション型塩基置換はトランスバージョン型塩基置換よりも起こりやすいことが分かっていますので、このようにさらに分けて考えることは妥当でしょう。 i 重縮退サイトにおけるトランジション型およびトランスバージョン型置換の割合を $P_i = S_i / L_i$ および $Q_i = V_i / L_i$ であらわします。Kimura の two-parameter モデルを適用すると、 i 重縮退サイトにおけるトランジション型平均塩基置換(A_i)とトランスバージョン型平均塩基置換数(B_i)は

$$A_i = \left(\frac{1}{2}\right) \ln(a_i) - \left(\frac{1}{4}\right) \ln(b_i) \quad (5.1)$$

$$B_i = \left(\frac{1}{2}\right) \ln(b_i) \quad (5.2)$$

のように、それらの分散は、

$$V(A_i) = [a_i^2 P_i + c_i^2 Q_i - (a_i P_i + c_i Q_i)^2] / L_i \quad (5.3)$$

$$V(B_i) = b_i^2 Q_i (1 - Q_i) / L_i \quad (5.4)$$

のように、あらわすことができます。ここで、 $a_i = 1/(1 - 2P_i - Q_i)$ 、 $b_i = 1/(1 - 2Q_i)$ 、 $c_i = (a_i - b_i)/2$ です。
i 重縮退サイトにおける総塩基置換(K_i)は、

$$K_i = A_i + B_i \quad (5.5)$$

となります。

同義サイトあたりの塩基置換数(K_S)は次のように計算することができます。二重縮退サイトにおける総同義塩基置換数は $L_2 A_2$ 、四重縮退サイトにおける総同義塩基置換数は $L_4 A_4$ と推定されます。2 重縮退サイトの約 1/3 が同義置換で約 2/3 が非同義置換と考えると、総同義置換サイト数は $L_2/3 + L_4$ となります。以上より、

$$K_S = (L_2 A_2 + L_4 A_4) / (L_2/3 + L_4) \quad (5.6)$$

$$V(K_S) = 9 [L_2^2 V(A_2) + L_4^2 V(A_4)] / (L_2 + 3L_4)^2 \quad (5.7)$$

と推定することができます。同様に、非同義サイトあたりの塩基置換数(K_A)とその分散は

$$K_A = (L_2 B_2 + L_0 K_0) / (2L_2/3 + L_0) \quad (5.8)$$

$$V(K_A) = 9 [L_2^2 V(B_2) + L_0^2 V(K_0)] / (L_2 + 3L_0)^2 \quad (5.9)$$

と推定されます。

表 2 は、哺乳類の様々な機能的遺伝子における塩基置換速度の推定値を示しています。同義置換と非同義置換とを比較した場合に、非同義置換の置換速度の方が遺伝子によるバラツキが大きいことが理解できると思います。これは、遺伝子ごとにその機能的制約が異なるためと考えられ、アミノ酸の変化に伴って機能が低下する遺伝子ほど、非同義置換は起こりにくいと思われます。ヒストン遺伝子などは、同義置換は他の遺伝子と同程度に起こっているにも関わらず (つまりこの遺伝子における突然変異率は決して低くはない)、非同義置換は全く起こっていないことから、極めて重要でよく保存されている遺伝子といえます。同義置換速度と非同義置換速度の比較から、正の自然選択 (アミノ酸変化がより好まれる選択) を検出することができます。非同義置換速度が同義置換速度よりも統計学上有意に大きい場合には、その遺伝子には正の自然選択が働いてきたと結論することができます。今回は、分子時計および相対置換速度の比較法について解説したいと思います。

表 2 哺乳類の遺伝子における同義および非同義置換速度^a

遺伝子	L ^b	非同義置換速度	同義置換速度
Histons			
Histon 4	102	0.00±0.00	3.94±0.81
Histon 3	135	0.00±0.00	4.52±0.87
Ribosomal proteins			
S17	134	0.06±0.04	2.69±0.53
S14	150	0.02±0.02	2.16±0.42
Contractile system proteins			
Actin α	376	0.01±0.01	2.92±0.34
Myosin β heavy chain	1933	0.10±0.01	2.15±0.13
Hormones and other active peptide			
Somatostatin-28	28	0.00±0.00	3.10±1.98
Insulin	51	0.20±0.10	3.03±1.02
Insulin C-peptide	31	1.07±0.37	4.78±2.14
Insulin-like growth factor II			
Erythropoietin	179	0.57±0.11	2.01±0.37
Parathyroid hormone	191	0.77±0.12	3.56±0.53
Luteinizing hormone	90	1.00±0.20	3.47±0.87
Growth hormone	140	1.05±0.17	2.90±0.54
Urokinase-plasminogen activator	189	1.34±0.17	3.79±0.63
Interleukin-1	430	1.34±0.11	3.11±0.35
Relaxin	265	1.50±0.15	3.27±0.46
Relaxin	53	2.59±0.51	6.39±3.75
Hemoglobins and myoglobin			
α-globin	141	0.56±0.11	4.38±0.77
β-globin	146	0.78±0.14	2.58±0.49
Myoglobin	153	0.57±0.11	4.10±0.85
Apolipoproteins			
β (partial)	273	1.32±0.14	3.64±0.50
E	291	1.10±0.12	3.72±0.51
A-I	235	1.64±0.17	3.97±0.63
Average ^c		0.76	3.49

^a 哺乳類の様々な遺伝子の塩基置換速度（ヒトとげっ歯類の遺伝子の比較から計算）。ヒトとげっ歯類との分岐は8,000万年前と仮定してある。塩基置換率は10⁹年あたり。

^b L: 比較したコドン数

^c 算術平均。Histon 3とHiston 4は多重遺伝子族であり、ヒトとげっ歯類の遺伝子が直系遺伝子であるか不明のため計算から除外してある。Li (1997)を一部改変

「HLAコンサルタントの日々」

特定非営利活動 (NPO) 法人 HLA 研究所 佐治 博夫 saji1@mbox.kyoto-inet.or.jp
hla@hla-labo.org

日々多くの方々に HLA マッチング・コンサルテーションをなさっている佐治先生の症例の中から、今回は『肝炎後の重症再生不良性貧血患者へのドナー選択』をご紹介します。“HLA ハプロタイプの推定”のくだりに、推理小説好きの佐治先生の眼光が……。 (編集部)

主治医の先生からの e-mail によるご相談です。(公開の了承を得ました)

○●■□先生、e-mail ありがとうございます。
ご質問は単純で、回答はやや複雑です。式のとおり HLA マッチング・コンサルテーションをしますのでお付き合いください。非常に難しい推論をしなければなりません。

Q:
34 歳女性で肝炎後の重症再生不良性貧血です。ATG、CyA、G-CSF による 3 者併用療法を行い、6 ヶ月立ちますが、輸血依存の状態が続いています。また入院時に染色体異常はなかったのですが、ここ数回、46,X,i(X)(p10)といった異常が 3-4/20 で陽性であり、移植が必要ではないかと考えています。ATG の再投与は白血病移行の risk も考え考慮していません。患者さんと弟が、血清型で DR1 座不一致でしたが、A2, B39 を含んでいたために DNA タイピングを行いました。

患者(血清型) A2 B39(16) B59 DR9 DR4
同胞(血清型) A2 B39(16) B59 DR9
患者(DNA)
A02011 B3904 B5901 DRB10403 DRB109012
同胞(DNA)
A0206 A02011 B3901 B5901 DRB109012
血清型 1 座不一致ですが、DNA レベルでは 3 座不一致ということが判明しました。

A:
確かに 3 座ミスマッチのように見えますが、正確には、アレル型で
・GVHD 方向 B,DR 座 2 ミスマッチ
・HVG 方向 A,B 座 2 ミスマッチ
です。

問題は B*3901(ドナー)対 B*3904(患者さん)の不適合が臨床的に意義ありやなしや、というところがキーポイントのようです(後述)。

1、HLA-A,B,DR(再掲、整理)

患者さん:
A*0201,-, B***3904**,*5901, DRB1***0403**, *0901
弟さん:
A*0201, ***0206**, B***3901**,*5901, DRB1*0901,-,

2、HLA ハプロタイプの推定と解説

父母(仮定)を a/b、c/d、患者を a/c とし、弟さんを a/d とするとき、

▼ハプロタイプ a: A2-B59-DR9; 非常にまれです(0.03%)。B59 ハプロタイプは普通は A24-B59-DR4 であり、日本人に独特(1%)と思われ、他国にはほとんどありません。

▲ハプロタイプ c: A2-B39-DR4; 日本人に 0.28%。ただし、多くは B*3901 です。B*3904 は少数派でしょう。B*3904-DRB1*0403 は連鎖します。

△ハプロタイプ d: A2-B39-DR9; 意外にまれです(0.13%)。祖先ハプロタイプは A2-B39-DR15 と思われ、日本人に 0.49%。東北アジア由来でしょう。このハプロタイプは通常 A*0206-B*3901-DRB1*1501 です。

重要: 患者さんと弟さんはハプロタイプを共有(haploidentical)し、ハプロタイプ c 対ハプロタイプ d 非共有(ミスマッチ)です。

ハプロタイプ a が父由来(IPA)であるとき、弟さんは「NIMA ミスマッチ同胞(NIMA 相補同胞)」であり、患者と弟さんは相互のミスマッチ HLA に対して、寛容の成立が期待されます。

ハプロタイプ a が母由来であるときは NIPA ミスマッチ同胞であり、寛容の成立は期待できません。父母の HLA-A,B,DR を検査してご確認ください。

用語~~~~~
IPA; inherited paternal antigens,
NIPA; non-inherited paternal antigens

B*3901 と B*3904 は血清学的に区別できます。では GVHD/HVG に関与する T 細胞(CTL)はその差異を認識できるでしょうか。

B*3901 の 11 番アミノ酸がセリン→アラニン、12 番がバリン→メチオニンに置換したものが、B*3904 です。Ser 11 Ala、Val 12 Met と表記します。

HLA-B 分子の 11 番と 12 番は、T 細胞が認識する抗原ペプチドの受容部位(α ヘリクスと β スtrand で形成された溝)の外側に位置します。すなわち、抗体はその差異を認識できるようですが(血清学的に区別できる)、T 細胞の認識に供される抗原ペプチドのモチーフへの影響はそれほどない位置です(図1)。

結論: B*3901 と B*3904 は GVHD/HVG への影響は寡少と考えます。

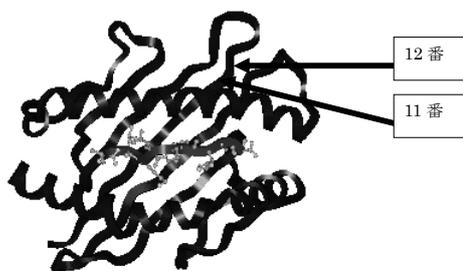


図1

6、患者さん 対 弟さんの適合性

患者さん:

A*0201,-, B*3904, *5901, DRB1*0403,*0901

弟さん:

A*0201,*0206, B*3901,*5901, DRB1*0901,-,

すなわち、B*3904 と B*3901 のミスマッチを無視できるとすると、GVHD 方向 DR 座 1 ミスマッチ、HVG 方向 A 座 1 ミスマッチです。

7、結論

造血幹細胞移植が必須として、非血縁ドナー(臍帯血含む)検索が困難であるから、「実際上の」1 ミスマッチハプロアイデンティカル同胞をドナーに選択することは妥当な選択と思われます。

もし、NIMA 相補同胞間移植であれば下記へご連絡ください。

~~~~~

FK506 を GVHD 予防に用いた NIMA 相補的血縁間造血幹細胞移植に関する臨床試験

== 厚生科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業「造血細胞の自己修復能力、再生能力を利用した治療法の開発と普及に関する研究」(小寺班)

研究責任者: 一戸辰夫先生@京大第一内科

[nohe@kuhp.kyoto-u.ac.jp](mailto:nohe@kuhp.kyoto-u.ac.jp)

~~~~~

また、NIPA ミスマッチ同胞であるときは、神田善伸先生@東京大学医学部血液腫瘍内科の Campath-I 治験の可能性をご相談ください。

ycanda-ky@umin.ac.jp

~~~~~

#### 8、臨床コンサルト(小児科ですが、、、)

再生不良性貧血(ファンコーニを含む)への血縁間ミスマッチ移植の経験が深い先生は矢部晋正先生@東海大学医学部 小児科です。独自のプロトコールをお持ちのようです。

[yabeh@is.icc.u-tokai.ac.jp](mailto:yabeh@is.icc.u-tokai.ac.jp)

◆非血縁間フルマッチと血縁 1 ミスマッチの比較臨床検討については下記の論文をご参照ください。

Kanda Y, et al. : Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from family members other than HLA-identical siblings over the last decade (1991-2000). Blood. 2003 Aug 15;102(4):1541-7.

Q:

また患者の兄は、弟とすべて血清型が合致しています。この方も DNA タイピングをする価値はありますか? (この方はあまりドナーになりたくないようなので DNA は検査していません)

A:

不要と考えます。多分、弟さんと HLA identical sibling でしょう。

付記: 再生不良性貧血などの免疫抑制療法に感受性 HLA アリル型である DRB1\*1501 や DRB1\*1502 を、患者さんはもっておられません。そして患者さんの DRB1\*0403 および DRB1\*0901 に連鎖する遺伝子「DRB4(DRw53)」は免疫療法抵抗性因子といわれています。免疫抑制療法の継続をしない、という先生の方針は妥当と存じます。

# コラム「改革の行方は？」

東京医科歯科大学難治疾患研究所 木村 彰方

行政改革、構造改革、教育改革、大学改革と改革ばかりである。確かに、利権につながる旧弊もあるだろう。それを打破することがわが国の今後の発展に必要であることは言うまでもないが、何でもかんでも改革という標語の下に飲み込まれ、どさくさまぎれの切り捨ては行なわれていないだろうか？年金改革ばかり、財政改革ばかりで、医療や福祉の切捨てが行なわれつつあることに危惧を抱く。

改革には道理と大義が必要であり、それなくしては頓挫することが眼に見えている。歳出削減一兆円を目標とするために、教育予算や厚生予算をそれぞれ 3,000～3,500 億円削減するなど、最初に枠ありきで予算削減を強いることに道理はあるだろうか？目標額が設定されなければ無駄を切り詰められないとの論理は、長い目で見ると自分の首を絞めることになりかねない。無駄を切り詰めて得られた経費で何を行なうか、限られた資源をどう有効に使うかの議論がなければ人は動かない。不平・不満を増し、ついには諦めをもたらすだけであろう。

話は飛躍するが、イラク情勢が混迷を極めているのも、そもそもは今回のイラク戦争の大義が明らかでなかったからではないだろうか？我が国の外交官に犠牲が出たが、その尊い犠牲を払わなければならない道義を明らかにしなければならぬと思う。行動を起こすには状況を見極めることが必要であるが、大義は状況によって変化しない。今すぐにも説明が可能なはずである。それこそがまさに国家としての説明責任であろう。

我々を取り巻く環境は日に日に変革している。医学、生物学に関する教育に関連して言えば、必要とされる知識量が膨大となり、現状の教育期間では十分な教育が追いつかなくなりつつある。例えば、看護学や検査学教育が 3 年制から 4 年制に移行しており、また薬学部教育も 4 年制から 6 年制への移行を目指していることは、教育期間が不足していることの現れであろう。医学教育では、

研修医制度必修化との名目で、臨床医療に携わるには、6 年制から 8 年制への実質的な教育期間の延長が行なわれている。社会的に求められる職業上の知識と技量が多くなってきたために、一人前になるのが大変な世の中になったものだと思う。

教育改革とも関連するが、司法改革の一環として、司法大学院の設置が進められている。最近話題になったばかりであるが、約 70 校の司法大学院が来年 4 月には開校する。これで今後毎年約 6,000 人余りの司法大学院卒業生が誕生することになる。米国のロースクールではその卒業生のほとんどが司法資格免許を得ることが可能な教育が行なわれているが、日本の司法大学院では卒業生の約半数程度が司法資格免許を得ることが可能なレベルの教育を目指しているとのことである。年間 9,000 人余りの医学生が卒業し、そのうち 8,000 人余りが卒業後直ぐの試験で医師資格免許を得られる医学教育に比較すると、教育期間が短かすぎるのか、あるいは司法試験が難しすぎるのではなかろうか？司法改革の目玉のひとつである司法大学院の設立は、より多くの弁護士を誕生させることにある。粗製乱造では困るが、市場原理に従った選択が必ず働くはずである。司法教育期間の延長、教育レベルの向上、司法試験の簡素化などで司法資格免許を取りやすくし、その上で研修制度の充実をはかるのもひとつの手であろう。数年後には膨大な司法資格免許所有者が誕生する。その研修教育体制の整備は大丈夫なのであるか？先の先まで手を打っておかなければ、すぐに次の改革という名目の切捨てが必要となる。

