

綜 説

## PCRを用いたHLAタイピングによる 疾患感受性の解析

太 田 正 穂

信州大学医学部法医学教室

### The Study of Disease Susceptibility by HLA-DNA Typing Using PCR Analysis

Masao OTA

*Department of Legal Medicine, Shinshu University School of Medicine*

---

**Key words:** PCR-RFLP, PCR-SSO, disease susceptibility, allele, HLA-genes  
疾患感受性, 対立遺伝子, HLA 遺伝子

---

#### I はじめに

ヒトの主要組織適合性抗原複合体 (MHC: major histocompatibility complex) である HLA (human leukocyte antigen) 抗原は, 自己-非自己を識別する遺伝標識マーカーであり, その機能にふさわしく遺伝子は現在知られている構造遺伝子の中では, 最も遺伝的多型性に富んでいる。HLA の遺伝的多型性の探索は, 臓器移植や骨髄移植時のドナーとレシピエント間のマッチング, 疾患感受性の有無, 外来抗原に対する免疫応答の遺伝的制御, 人類学における民族のルーツの研究, 法医学業務での個人識別や親子鑑定で重要な役割を果たしている。

1964年以來抗血清を用いた検査の主流である細胞傷害試験 (LCT: lymphocyte cytotoxic test)<sup>1)</sup>は, クラス I 抗原 (HLA-A, B, C) やクラス II 抗原 (HLA-DR, DQ) 判定に日常検査として行われている。また, HLA-D 抗原は MLC (mixed lymphocyte culture) 検査<sup>2)</sup>, HLA-DP 抗原は PLT (primed lymphocyte typing) 検査<sup>3)</sup>による細胞学的検査でタイピングされてきた。しかし, これらの検査法ではタイピングに必要な抗血清の不足, HLA 抗原ホモ接合体の細胞の維

持や供給, T細胞クローンの供給など問題点も多く新しい検査法の開発が期待されてきた。

10年程前より HLA 遺伝子のクローニングが行われ始めてから, HLA 抗原の多型性 (polymorphism) を遺伝子の塩基配列レベルでの多型性として調べる DNA タイピング<sup>4)-7)</sup>が用いられてきた。はじめは, ゲノム DNA を制限酵素で切断後の RFLP (restriction fragment length polymorphism) をサザンハイブリダイゼーションを行い, 生じたバンドパターンでタイピングを行っていた<sup>8)</sup>。しかし, この方法による遺伝的多型性を示す制限酵素切断部位は, 多くの場合 HLA 抗原特異性を決定しているエピトープ部分をコードするエクソンではなく, イントロンあるいは遺伝子外領域であるため, エピトープと連鎖している遺伝的多型性から間接的に抗原特異性を推測している。このためサザンハイブリダイゼーションを用いた RFLP-DNA タイピングは HLA 抗原との相関が完全ではない上に操作が煩雑であり, 出現するバンド解析の複雑さなどから HLA-DNA タイピングの実用性としては不完全であった。

1985年分子生物学における研究の発想を大きく変えた“分子ゼロックス”と呼ばれる PCR (polymerase

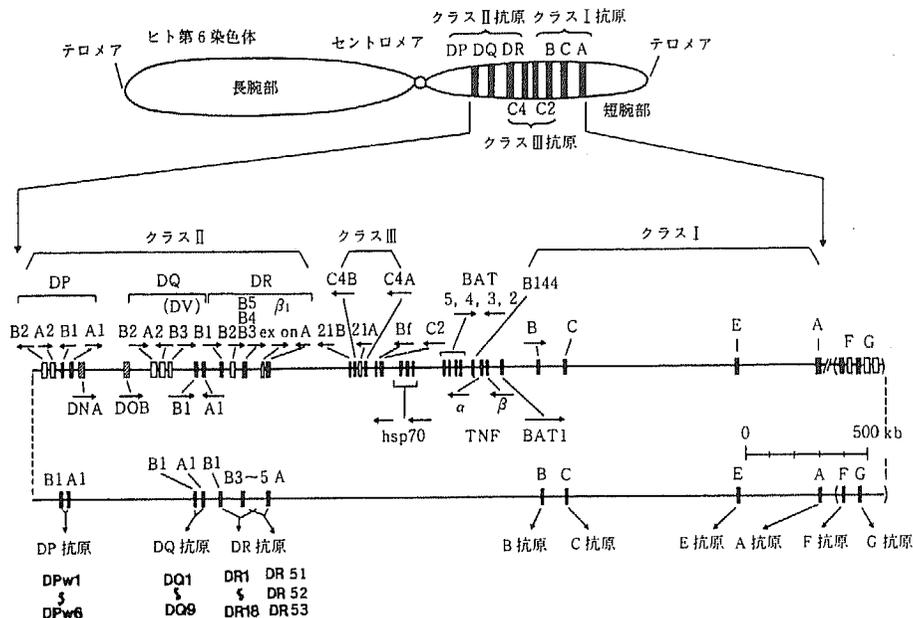


図1 HLA 遺伝子複合体

■ は機能的遺伝子, □ は偽遺伝子, ▨ は発現の確認されていない遺伝子を示す。矢印は遺伝子の方向を示す。

chain reaction) 法<sup>10)</sup>は、目的とする遺伝子領域を100万倍以上に増幅可能な方法であり、1986年に Erlich のグループはこの PCR 法を用いて DQ $\alpha$  遺伝子の DNA タイピングを試みた<sup>11)</sup>。この時以来現在までに PCR を用いた様々な DNA タイピングが紹介されてきている。本稿では PCR を用いた HLA-DNA タイピング法とこの手法によって多大な情報が得られた疾患感受性の機構について、著者らの知見を踏まえて概説したい。

## II HLA 抗原遺伝子構造とその機能

HLA 遺伝子クローンの分離<sup>12)</sup>、パルスフィールド勾配電気泳動による解析<sup>13)14)</sup>で HLA 領域の遺伝子構造の概要が明らかにされてきた<sup>15)</sup>。図1に示すように、HLA 遺伝子群は第6染色体上にはほぼ3,500kbにわたる長大な領域を占めている。このうちテロメア側約1,500kbはクラスI抗原遺伝子領域であり、残りのセントロメア側領域は補体などのクラスIII抗原遺伝子領域とクラスII抗原領域である。

### A クラスI遺伝子領域

クラスI抗原遺伝子領域には各抗原H鎖遺伝子がセントロメア側からテロメアに向かいB-C-E-A-F-Gの順に位置しており、H、J遺伝子を含み総計

11個の偽遺伝子が存在している。

### B クラスII遺伝子領域

クラスII抗原遺伝子領域は、約1,100kbからなり、セントロメア側からDP-DQ-DRの亜領域に分けられる。クラスII領域に存在する遺伝子でクラスII抗原分子をコードしているものは、DP分子としてDPB1とDPA1、DQB分子としてDQB1とDQA1である。DR抗原分子はHLAタイプにより産生される種類が異なり複数の遺伝子により構成されている。図1に示すように血清学的に検出されているDR抗原はDRA遺伝子とDRB1遺伝子によりコードされるHLA-DR(DR1~10)分子、DRAとDRB3にコードされるDR52分子、DRAとDRB4にコードされるDR53分子であり、HLA-DR2(DR51グループ)ハプロタイプではDRAとDRB5によりコードされるHLA-DR分子がもう1つ存在する。他のDPB2、DPA2、DQB2、DQA2、DQB3、DRB2各遺伝子は偽遺伝子またはmRNAレベルでの発現が認められていない遺伝子である。HLA-DNA、DOB遺伝子は転写されているが、両遺伝子産物が細胞膜上に抗原分子として発現しているかは未同定である。

### C クラスIII遺伝子領域

クラスIII遺伝子領域にはC2、C4、Bfの補体系の各

表1 HLA抗原の分類, 発現, 機能

HLA 抗原	発現部位	機能	提示される抗原	Ii 鎖の関与
クラス I 抗原	A B C (除: 赤血球, 精子, トロホプラスト)	ほとんどの有核細胞  キラーT細胞の誘導	内在性抗原	なし
	E	ほとんどの有核細胞 ?		
	F	休止期のT細胞, 皮膚など ?		
	G	トロホプラスト ?		
	DR DQ DP	マクロファージ, B細胞 胸腺上皮細胞, ランゲルハンス細胞など ヘルパーT細胞の誘導 (DQ抗原: サプレッサーT細胞の誘導)		

因子の遺伝子の他に, 21-ヒドロキシラーゼ遺伝子が存在する。先天性副腎皮質過形成症はこの遺伝子欠損により発症することが判明<sup>6)</sup>し, HLA-B抗原との相関が報告されている。この領域には補体系を司る遺伝子の他に, TNF $\alpha$ と $\beta$ , HSP70 (heat shock protein 70)をはじめ機能不明の遺伝子 (BAT, B144)を含め23個の遺伝子が同定されており, 3個の遺伝子はクラスIII抗原遺伝子領域内に, 残る20個はクラスIIIからHLA-B遺伝子領域内に存在する。

#### D HLA 抗原の機能

HLA 抗原は抗原提示作用と呼ばれる免疫反応における中心的な役割を果たしている。外界から侵入した外来抗原はマクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞と呼ばれる細胞に取り込まれペプチド断片に分解され自己のHLA抗原と結合し, T細胞上のT細胞レセプターに抗原提示される。T細胞レセプターは外来抗原のみならず, 自己のHLA分子を同時に認識する。これが“T細胞の抗原認識におけるMHC拘束または遺伝的拘束”と呼ばれているものであり, HLA-ペプチド複合体であるaltered selfを認識することにより, T細胞は活性化され, 誘導される。クラスI抗原はウイルスや化学物質により修飾をうけた細胞や腫瘍化細胞を攻撃するキラーT細胞(CD8<sup>+</sup>T細胞)の分化誘導に, クラスII抗原はマクロファージなどの抗原提示細胞(antigen presenting cell, APC)とヘルパー細胞(CD4<sup>+</sup>T細胞)などの免疫担当細胞間の相互作用を通じて, ヘルパーT細胞の分化誘導に重要な機能を担っている。表1に示すようにクラスI抗原分子とクラスII抗原分子はT細胞レセプターへの抗原提示様式が異なる。クラスI分子は, APC細胞内のペプチドとともにCD8<sup>+</sup>のキラーT細胞に抗原提示をする<sup>17)18)</sup>の

に対し, クラスII分子は細胞外抗原が, エンドサイトーシスにて細胞内に取り込まれエンドゾーム(外来抗原が細胞に取り込まれたとき生ずる小胞)で部分消化を受けたペプチドと結合しCD4<sup>+</sup>のヘルパーT細胞に抗原提示をする<sup>19)</sup>。これらの違いは細胞内でクラスII抗原とのみ強く結合しているIi (invariant)鎖の働きによるものと考えられている<sup>20)</sup>。小胞体に多量に存在するIi鎖がクラスII抗原分子ができると直ちに $\alpha$ 鎖,  $\beta$ 鎖の各鎖, および $\beta$ 鎖の $\beta$ -1ドメインと結合するため, ゴルジ体での内因子性外来ペプチドとの結合を抑制する<sup>21)</sup>。Ii鎖はクラスII分子が小胞体からゴルジ体を通り成熟した形になるまで, クラスII分子と結合しているためペプチド結合部分をカバーし, 外来性ペプチドが豊富なエンドゾームにきて分解されはじめてクラスII分子と離れる<sup>22)</sup>。この時になって外来性ペプチドはクラスII分子と結合すると考えられている。

#### III PCRを用いたHLA-DNAタイピング

血清学的, 細胞学的方法でタイピングされるHLAアロ抗原特異性は, 遺伝子レベルでも塩基配列の多型性として反映されている。HLA遺伝子の塩基配列データがここ数年の間に蓄積されたことより, 各HLA型の塩基配列の違いを直接検出するDNAタイピングが急速に進歩した。特にDQ, DR, DP遺伝子型については解析が進み, 日本人や欧米人については, ほとんどまれな遺伝子型を除いてほぼ全ての対立遺伝子型の塩基配列が決定されたと思われる。血清学的, 細胞学的にタイピングされるエピトープはクラスI抗原では $\alpha$ 1ドメインと $\alpha$ 2ドメインに, クラスII抗原では $\alpha$ 1ドメイン(DQ $\alpha$ 鎖のみ多型性がある)と $\beta$ 1ドメイン(DR $\beta$ , DQ $\beta$ , DP $\beta$ 鎖)に見いだされる。図2



に DR 対立遺伝子型について、塩基配列から予測されるアミノ酸配列を示す。この図に示すように遺伝的多型性を示す部位が特定の領域に集中しており、これらの領域は抗原ペプチドとの結合か T 細胞レセプターの認識などのプロセスに重要な働きをしている。HLA クラス I 抗原遺伝子については、異なる遺伝子座間における塩基配列のホモロジーが高すぎることや、各遺伝子座の対立遺伝子数が多すぎるなどなどの理由により、完全な DNA タイピングは確立されていない。これらに加えクラス II 抗原の内、細胞学的検査で調べられていた DP 抗原や D 抗原は検査が非常に煩雑なうえに刺激細胞として T 細胞クローンや HTC (homo typing cell: ホモ接合体細胞) を準備しなければならないことなどから DNA タイピングはクラス II 遺伝子タイピング法の考案に的が絞られてきた。

HLA クラス II 遺伝子の PCR を用いた遺伝子型判定法は、各遺伝子の  $\beta 1$  ドメインまたは  $\alpha 1$  ドメイン (いずれも第 2 エキソン部) 領域を特異的に Taq ポリメラーゼにより増幅する。現在、増幅した遺伝子をタイピングする方法は、大きく 2 法に分かれる。ひとつは対立遺伝子特異的な人工的オリゴヌクレチド (SSO: sequence specific oligonucleotide) プローブを用いたハイブリダイゼーションによる PCR-SSO 法やプローブを用いない著者らが開発した PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) などである (表 2)。

**A ハイブリダイゼーションを用いる方法 (PCR-SSO<sup>23)-25)</sup>**  
SSO プローブとハイブリダイゼーションによる方

法には、増幅 DNA をナイロン膜に固定し、SSO 溶液とハイブリダイズする方法 (regular dot blot) と、SSO をナイロン膜に固定し、増幅 DNA 溶液とハイブリダイズする (reverse dot blot) 法<sup>26)</sup>がある。Regular dot 法は 1 種類の SSO に対して多くの DNA 試料が検査できるが、HLA の allele のように 100 種類以上のものをタイプするには、それ以上の SSO プローブの調製とそれぞれについて標識をする必要がある。

Reverse dot 法は、1 枚のナイロン膜に必要数だけ SSO を固定しておけば、1 つの DNA 試料に対し 1 種類のハイブリダイゼーションでタイピングが可能であり、タイピングに要する時間を短縮でき、煩雑さが少なく済む。

**B ハイブリダイゼーションを用いない方法 (PCR-RFLP<sup>27)-29), PCR-SSCP<sup>30)31)</sup></sup>**

多種類の SSO プローブのハイブリダイゼーションや各プローブへの標識という煩わしい操作を行わず、allele 特異的な配列を認識し切断する制限酵素を用いて、増幅 DNA が切断されるか、否かを電気泳動により検出する PCR-RFLP 法を著者らは考案した。現在までに HLA 抗原 allele 間の塩基配列の相違を認識することが可能なほどきわめて多くの制限酵素が見つかっており、クラス II 抗原 allele についてはこれらの制限酵素により知られているほとんどすべてについて識別可能である。この方法では表 3 に示したプライマー、増幅条件により DQA1, DQB1, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DPA1 および DPB1 遺伝子型の判定が可能である。また、本法は非常に簡便で、1 塩基のミスマッチであっても制限酵素が識別する部位であ

表 2 PCR 法を用いた HLA-クラス II DNA タイピング

ハイブリダイゼーションを用いる方法	固 定	標 識 法	検 出 法
PCR-SSO	増幅 DNA をナイロン膜に固定 (regular dot blot)	<sup>32</sup> P-SSO HRP-SSO DIG-SSO	オートラジオグラフィ 発色・化学発光 発色
	SSO をナイロン膜に固定 (reverse dot blot)	HRP-プライマー ビオチン-プライマー	発色・化学発光 発色・化学発光
	SSO をプラスチックプレートに固定	ビオチン-増幅 DNA	発色・化学発光
ハイブリダイゼーションを用いない方法	検出するもの	検 出 法	
PCR-RFLP	制限酵素切断断片	アクリルアミド電気泳動 (エチジウムブロマイド染色)	
PCR-SSCP	1 本鎖 DNA の高次構造	アクリルアミド電気泳動, アガロース電気泳動 (エチジウムブロマイド染色/銀染色)	

表3 PCR-RFLP法で用いるプライマー

Gene	Primers	Sequence (5' to 3')	Den.	Ann.	Ext.
DQA1	5'primer 3'primer	GH26 GH27			
		GTGCTGCAGGTGTAACCTTGTAACAG CACGGATCCGGTAGCAGCGGTAGAGTTG	94°C	62°C	72°C
DQB1	5'primer 3'primer	GH28NL QB202			
		GCATGTGCTACTTCACCAACG CACCTGCAGATCCCGCGGTACGCCACCTC	94°C	55°C	72°C
	5'primer 3'primer	GH28NL QB204			
		GCATGTGCTACTTCACCAACG CACCTGCAGTGGGAGCTCCAACCTGGTA	94°C	55°C	72°C
	5'primer 3'primer	5'R2 5'R4			
		TTCTGTGGCAGCCTAAGAGG GTTTCTTGAGCAGGTTAAAC	94°C	60°C	72°C
	5'primer 3'primer	5'R9 5'R10			
		GGACGGAGCGGGTGCAGTATC CCGTAGTTGTGCTGCACACGG	94°C	63°C	72°C
DRB1	5'primer 3'primer	5'R1 5'R7			
		GGTTGCTGGAAGATGCATCT AGTTCCTGGAAGACTCTTCT	94°C	55°C	72°C
	5'primer 3'primer	5'R10 5'R3568			
		GGTTGCTGGAAGACCGCTCC ACGTTTCTTGAGTACTCTACG	94°C	60°C	72°C
DRB3	3'R (common for DRB1)	CCGCTGCAGTGTGAAGCTCT			
	5'primer 3'primer	DRBAMP-52 3'R			
		CCCAGCACGTTTCTTGGAGCT CCGCTGCAGTGTGAAGCTCT	94°C	60°C	72°C
DRB5	5'primer 3'primer	5'DRB5 3'R			
		CCTTGACGAGGATAAGTAT CCGCTGCAGTGTGAAGCTCT	94°C	60°C	72°C
DPA1	5'primer 3'primer	PL PR			
		GGAAGCTTGATCCCCCTGAGGTGACCG GGGGATCCCCAGTGTGAGGAGCGGC	92°C	58°C	72°C
DPB1	5'primer 3'primer	PLTM PRTM			
		GGAAGCTTGAGGCCCAAGAGCCAAATCCA GGGGATCCGCCAGAACCGAGACTT	94°C	62°C	72°C
	5'primer 3'primer	DPB101N DPB201			
		GTTGAAGCTTCCCCGCAGAGAATTAC CACCTGCAGTCACTACCTGGGGCTG	94°C	62°C	72°C

Den.: Denature, Ann.: Annealing, Ext.: Extension

表4 HLA クラス I 抗原と相関を示す日本人の疾患

疾 患	相 関 する 抗原特異性	相 対 危 険 度
*天疱瘡	A10	3.8
*MCTD	B7	3.5
特発性心筋症	B15	1.2
強直性脊椎炎	B27	350.6
亜急性甲状腺炎	B35	12.6
SLE	B40	3.2
住血吸虫性肝硬変	B44	3.6
21-ヒドロキシラーゼ 欠損症 (先天性副腎皮 質過形成症)	B47	15.4
ベーチェット病	B51	4.8
特発性門脈圧亢進症	B51	6.4
*高安病	B52	6.1
*潰瘍性大腸炎	B52	2.8
川崎病	B54	2.7
尋常性乾癬	Cw6	10.7

\* は同時に2つの HLA 抗原アロ特異性と相関を示す疾患であることを示す。

表5 HLA クラス II 抗原と相関を示す日本人の疾患

疾 患	相 関 する 抗原特異性	相 対 危 険 度
*MCTD	Dw1	6.1
急性糸球体腎炎	Dw18	9.0
ナルコレプシー	DR2	436.0
*高安病	DR2	1.4
特発性膜性腎症	DR2	6.3
*潰瘍性大腸炎	DR2	4.2
らい病 (L型)	DR2	3.5
らい病 (T型)	DR2	3.9
*橋本病	DR2	0.31
若年性糖尿病	DR4	4.5
慢性関節リウマチ	DR4	2.8
自己免疫性肝炎	DR4	12.7
IgA 腎症	DR4	2.7
*SLE	DR9	3.8
*天疱瘡	DR12	6.0
リポイドネフローゼ	DRw53	12.0
Crohn 病	DRw53	6.5
Sjogren 病	DRw53	5.0
*重症筋無力症	DRw53	2.0
*高安病	DQ1	12.6
バージャー病	DQ1	19.0
*らい病 (T型)	DQ1	18.6
*重症筋無力症	DQ3	6.0
*橋本病	DQ3	6.8
*SLE	DQ3	5.2
スギ花粉症	DQ3	3.3
原田氏病	DQ4	25.2

\* は同時に2つの HLA 抗原アロ特異性と相関を示す疾患であることを示す。

ば結果の判定が PCR-SSO 法よりも容易で再現性に優れている。

I 鎖 DNA は、その塩基配列により、高次構造に違いを生じ、その違いが電気泳動における移動度の差として検出される DNA 高次構造多型性をみる PCR-SSCP 法 (single strand conformation polymorphism) は、HLA-クラス II 遺伝子の塩基配列の差異を検出するのに利用されている。この方法は、数多くの allele を持つ HLA 遺伝子型をすべて同定する事は困難であるが、移植時の臓器提供者と受容者が同一であるかを調べるには有効である。

#### IV PCR 法を用いた HLA と疾患感受性の解析

HLA 抗原と疾患との相関 (表 4, 5) により、HLA 抗原が自己免疫性疾患を中心とした疾患発症に遺伝的素因として直接関与していることが、HLA 抗原の高次構造の解明<sup>32)33)</sup>と PCR 法を用いた DNA タイピングにより明らかになってきた。

HLA 抗原と疾患感受性との相関に関する分子機構

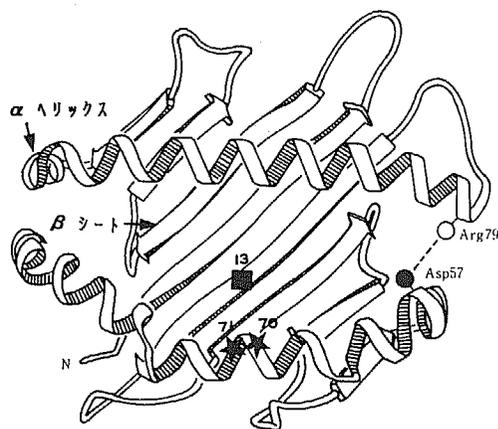


図3 HLA クラス II 分子の高次立体構造

クラス II 分子の抗原ペプチド結合部位を上方から見た構造。βシートとαヘリックスで囲まれた溝に、外来抗原ペプチドが挟み込まれ結合して、T細胞に抗原提示する。白人の I 型糖尿病に対する抵抗性は DQβ 鎖の57番目のアミノ酸 (Asp: ●) と相関する。自己免疫性肝炎に対する感受性は DRβ 鎖の13番目の塩基性アミノ酸 (DR4; His, DR2; Arg: ■) である。原田氏病の疾患感受性は DQβ 鎖70番目のアミノ酸 (Glu: ★) と71番目のアミノ酸 (Asp: ★) であり、慢性関節リウマチでは、DRβ 鎖の70番目のアミノ酸 (Gln: ★) と71番目のアミノ酸 (Arg: ★) である。

としては2つのモデルが提唱されており、近年の研究ではこのモデルで説明しようとする動向にある。1つはHLA抗原は単なる遺伝子マーカーであって、HLA遺伝子と連鎖不平衡にあるHLAとは関係のない遺伝子の欠損により疾患が発症すると考えられる。これは、先天性副腎皮質過形成症でHLA領域内のクラスIII抗原遺伝子領域に位置する21-ヒドロキシラーゼ遺伝子の欠損とHLA-B47抗原との相関で説明される<sup>19)</sup>。もう1つはHLA抗原が免疫応答に直接機能するモデルである。これは、HLA抗原の高次立体構造(図3)がX線解析によりなされたことより、自己と非自己の分子的基盤が説明可能になった。すなわち2つの $\alpha$ ヘリックスと底部 $\beta$ シートで囲まれた溝に外来抗原ペプチドが入り込み、T細胞レセプターにより非自己と識別される複合体を形成する。複合体形成の効率、T細胞レセプターによる認識度合いは、HLA抗原すなわちalleleの違いにより異なることが推察される。したがってあるalleleは過剰あるいは低い免疫応答を誘導することから、あるHLA抗原を持つ人は特定の疾患を発症しやすいと考えられる。このようなモデルを用いて多くの自己免疫性疾患について解析が行われている。

#### A 若年性糖尿病 (IDDM)

インスリン依存性糖尿病 (IDDM) の発症は遺伝的素因として、HLA抗原と相関があることが言われていた。白人ではDR3 (DQ2), DR4 (DQ8)<sup>34)35)</sup>、日本人ではDR4 (DQ4), DR9 (DQ9)<sup>36)37)</sup>との相関が報告されている。1987年Toddら<sup>38)</sup>はPCR法によりIDDM患者をふくめ、DR, DQ抗原の遺伝子配列を調べ比較したところ、IDDM患者に特有な遺伝子配列は見いだせなかったが、IDDMと正の相関を示すハプロタイプと中性あるいは負の相関を示すハプロタイプとにDQ抗原の $\beta$ 鎖アミノ酸配列の違いを見つけた。すなわち、DQ抗原 $\beta$ 鎖の57番目のアミノ酸が正の相関(感受性)を示すものはアスパラギン酸以外のアミノ酸(非Asp)であり、負の相関(抵抗性)を示すものはアスパラギン酸(Asp)であった。また、IDDMモデル動物であるNODマウスにおいてもヒトのDQ抗原に相当するI-A抗原 $\beta$ 鎖57番目のアミノ酸は非Aspであり、他のマウスはAspでありヒトと一致していた。

しかし、これらの説は、一部の抗原を持つ欧米人<sup>39)</sup>や日本人<sup>39)40)</sup>を対象にすると当てはまらなかった。DR7-DQ2ハプロタイプを持つ白人と黒人のDQ $\beta$ 鎖

のalleleはともにDQB1\*0201(57番目は非Asp)でありながら、疾患感受性は異なっていた。白人患者群ではこのハプロタイプの出現が低いのに、黒人では高率であった。これは特定のDQ $\alpha$ 鎖の遺伝子(DQA1)との組合せにあると考えられた(黒人はDQA1\*0301, 白人はDQA1\*0201)。すなわちDQ抗原の $\beta$ 鎖の57番目のアミノ酸は、 $\alpha$ 鎖の $\alpha$ ヘリックスの79番目のアミノ酸と向かい合い(図3)、この両者のアミノ酸の組合せによりクレフト部分の立体構造が変化し、抗原ペプチドの結合性およびT細胞への抗原提示能が左右され、疾患感受性の違いが生じると考えられる。日本人のIDDM患者に相関するHLAハプロタイプはDR4-DQ4, DR9-DQ9でDQ $\beta$ 鎖の57番目は何れもアスパラギン酸であり、非-Asp説にあてはまらない。そこで、Toddら<sup>41)</sup>は日本人のIDDM患者の93%がDQA1\*0301遺伝子を保有していることより、DQA1\*0301遺伝子がIDDM感受性を決定する最も重要な因子であると提唱した。確かに、日本人のDQ4とDQ9ハプロタイプの $\alpha$ 鎖は、いずれもDQA1\*0301遺伝子にコードされているが、白人のDR4-DQ7ハプロタイプのDQA遺伝子はDQA1\*0301にもかかわらず発症とは相関がない。日本人に関してもDQA1\*0301遺伝子のみでは説明ができない。そこで、日本人のIDDM患者にはDQ $\alpha$ 鎖とDR $\beta$ 鎖の混合アイソタイプクラスII分子が発現しており、発症に関与するとの仮説も考えられている。

#### B 自己免疫性肝炎 (AIH)

日本人における自己免疫性肝炎は血清学的な検査でDR4抗原と有意な相関<sup>42)</sup>があり、患者の90%がこの抗原を保有していた(表6)。さらに、興味あることにDR4を保有していない患者はDR2を全員保有していた。DR4抗原は、Dw特異性と関連して塩基配列のレベルでは11種類(DRB1\*0401~DRB1\*0411)にDR2抗原は4種類(DRB1\*1501~1602)のサブタイプに細分される(図2参照)。そこで著者らはPCR-RFLP法を用いて患者のクラスII抗原遺伝子についてDNAタイピングで解析したところ、患者群と健康者群との間にDQA1, DQB1, DPB1 allele間で有意差<sup>43)</sup>はなく、またDR4, DR2抗原のサブタイプ遺伝子についても有意差はなかった。これは、疾患発症に関するalleleはDR4, DR2の中のある特定のサブタイプに集中しているのではなく、それぞれのサブタイプに共通したアミノ酸配列が発症に関与していると考えられた。これらの結果から著者らは、DR $\beta$ 鎖のアミノ酸

表6 自己免疫性肝炎患者と健康人のHLA-Bw54, DR, DQ抗原頻度

HLA antigens	Autoimmune hepatitis (%) n = 51	Healthy subjects (%) n = 472	RR	Corrected p value
Bw54	21(41.2)	66(14.0)	4.3	p<0.00001
DR1	3(5.9)	58(12.3)	0.4	
DR2	18(35.3)	162(34.3)	1.0	
DR4	46(90.2)	197(41.7)	12.8	p<0.000001
DR5 (w11, w12)	9(17.6)	88(18.6)	0.9	
DR6 (w13, w14)	5(9.8)	76(16.1)	0.6	
DRw8	6(11.8)	117(24.8)	0.4	
DR9	3(5.9)	123(26.1)	0.2	
DRw10	1(2.0)	4(0.8)	2.3	
DRw52	20(39.2)	247(52.3)	0.5	
DRw53	46(90.2)	306(64.8)	5.0	p<0.001
DQw1	31(60.8)	304(64.4)	0.9	
DQw3	39(76.5)	258(54.7)	2.7	
DQw4	15(29.4)	48(10.2)	3.7	p<0.0005

配列を検討し、DR4に共通のアミノ酸配列は9番から13番目のGlu(E)-Gln(Q)-Val(V)-Lys(K)-His(H)であり、DR2に共通のアミノ酸配列も9番目から13番目のTrp(W)-Gln(Q)-Pro(P)-Lys(K)-Arg(R)であることに注目し、さらに13番目のアミノ酸はDR4グループもDR2グループも塩基性のアミノ酸(HisとArg)であることから、この13番目のアミノ酸が疾患発症に関与する重要なアミノ酸であると考えた<sup>44)</sup>。また、13番目のアミノ酸が塩基性であるのはDR alleleのうちDR2とDR4のみであることより、血清学的検査結果とよく一致していた。13番目のアミノ酸はクラスII抗原の底部のβシート領域に位置し、抗原ペプチドとの結合に重要な機能を担っていると考えられているので、このアミノ酸が塩基性であることは自己免疫性肝炎の発症に必須であると考えられる。

### C 慢性関節リウマチ (RA)

慢性関節リウマチは、血清学的検査では人種をこえDR4との相関が報告されている。PCRを用いたDNA解析<sup>45)</sup>では、DRB1\*0401, 0404, 0405, 0101, 1001, DRB4\*0101が患者群で有意に増加していた。これらのβ鎖遺伝子のアミノ酸配列を比較すると70番目付近のアミノ酸の関与が指摘された<sup>46)</sup>。70番目のアミノ酸はすべて非酸性アミノ酸(ArgやGln)であり、71番目のアミノ酸は塩基性アミノ酸(LysやArg)であり、これらが疾患発症に関わっていると考えられた。

### D 原田氏病

メラノサイト特異的自己免疫性疾患であり、視力低下を主症状とする原田氏病では、血清学的検査でDR4と相関があり、患者の95%以上がこの抗原を保有している。PCR-RFLPを用いた解析では、DR4サブタイプのDRB1\*0405遺伝子をほぼ患者全員が持っていた。このことからDRB1\*0405遺伝子に特異的なアミノ酸配列を調べると57番目のアミノ酸Ser(S)であるが、このアミノ酸は、DRB1\*1303, 0801, 0803の遺伝子の57番目にも見られる。患者群では0405遺伝子以外の遺伝子の増加は見られず、DRβ鎖57番目アミノ酸Serが発症に関与するという仮説は否定され、DRB1\*0405と相関するDQ4抗原のDQβ遺伝子(DQB1\*0401と0402)が第一義的に関与していると考えられ、PCR-RFLP法によりDQB1 alleleのDNAタイピングを行ったところ患者全員がDQB1\*0401か0402遺伝子を持っていた。このことからDQβ鎖のアミノ酸配列よりDQB1\*0401と0402に共通した特異的なアミノ酸配列を調べると70番目アミノ酸Glu(E)と71番目アミノ酸Asp(D)が疾患発症に関与していると考えられた。これらのアミノ酸も抗原ペプチドとの結合やT細胞レセプター認識に重要な領域である。

### E HLA-DP 遺伝子が関与する疾患

HLA-DP抗原は従来細胞学的検査PLTで行われていた。この検査法は、各種DP抗原を持つT細胞ク

ローンをそろえること、判定結果が得られるのに2週間もかかること、操作が煩雑であることなどから一般検査では行われていなかった。したがってHLA-DPと相関する疾患の報告は少なかった。しかし、PCRを用いてDP抗原の多型性を示すDPB1遺伝子のタイピングが行われることにより、幾つかの疾患と相関する遺伝子が報告されている。

Coeliac diseaseは小麦に含まれるグルテンに対する消化吸収不良症候群であり、日本人ではほとんどまれであるが、白人に多い。この病気はDR3, DR7との相関が報告されていたが、Bugawanら<sup>47)</sup>はPCR-SSO法によりDPB1\*0402(患者保有率52%, 相対危険率RR(relative risk)=6.3)またはDPB1\*0301(患者保有率35%, RR=3.9)遺伝子との相関を報告している。また、DQA1\*0401とDQB1\*0201遺伝子の組合せのときに最も高い相対危険率(RR=9.9)を示すことから、DPβ1遺伝子とDQα鎖とDQβ鎖のヘテロダイマーが発症に関与していると考えられている。

大動脈炎症候群(高安病)は、アジアおよび南アメリカ<sup>48)</sup>に比較的多くみられる動脈の中膜、外膜の炎症を主体とし、女子に多い疾患である。日本人ではPCR-SSOP法を用いた解析<sup>49)</sup>では、HLA-Bw52-DRB1\*1502-DRB5\*0102-DQA1\*0103-DQB1\*0601-DPA1\*02-DPB1\*0901が本疾患感受性のハプロタイプ遺伝子であり、HLA-Bw54-DRB1\*0405-DRB4\*0101-DQA1\*0301-DQB1\*0401が疾患抵抗性のハプロタイプ遺伝子であると報告されている。

若年性関節リウマチは、学童期の女子を中心に発症する成人の慢性関節リウマチとは異なる経過をとる疾患である。このうちpauciarticular typeでは、PCR-SSO法による解析<sup>50)</sup>で、DPB1\*0201遺伝子が増加し

ており、DPB1\*0402遺伝子が減少していた。この2つのalleleのアミノ酸配列の違いは、69番目のアミノ酸の違いだけであることから(DPB1\*0201はGlu, DPB1\*0402はLys)このアミノ酸が若年性関節リウマチの発症に重要な役割を果していると考えられた。

著者らも、PCR-RFLP法を用いてパセドウ病および日本人原発胆汁肝硬変(PBC)について解析を行ったところ、いずれもDPB1 alleleと第一義的な相関を示した。パセドウ病では20歳以下の発症患者群にDPB1\*0501遺伝子が増加していた(89.7%:患者vs 55.3%:健康人)。またPBCではDPB1\*0501遺伝子の増加を認め(85.1%:患者vs 55.3%:健康人)、DPB1\*0402遺伝子の減少を認めた(2.2%:患者vs 23.3%:健康人)。

## V おわりに

HLAの解析に分子生物学的手法(特にPCR)が導入されて以来、今まで疾患との関係が相関で表されていたのが、Toddらの提唱したエピトープ説により自己免疫性疾患についてはHLA分子の機能から説明可能となった。しかし、まだこのエピトープ説だけでは自己免疫性疾患発症の機構を説明するには十分ではない。今後HLA抗原分子と結合した抗原ペプチド複合体を認識するT細胞レセプターの解析、さらにはT細胞レパートリー形成機構を解析することによりその全貌が解き明かされていくと考えられる。

本稿で引用した著者の研究は、信州大学医学部法医学教室福島弘文、第2内科学教室関健、清沢研道、第2外科学教室小沼博、菅谷昭、東海大学医学部分子生命科学猪子英俊先生らとの共同研究であり、ここに深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Terasaki, P. I., Bernoco, D., Park, M. S., Ozturk, G. and Iwaki, Y.: Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C, and -D antigens. *Am J Clin Pathol*, 69: 103-120, 1978
- 2) Bach, F. H. and Voynow, N. K.: Oneway stimulation in mixed leukocyte cultures. *Science*, 153: 545-547, 1966
- 3) Bach, F. H., Inouye, H., Hank, J. A. and Alter, B. J.: Human T lymphocyte clones reactive in primed lymphocyte typing and cytotoxicity. *Nature*, 281: 307-309, 1979
- 4) Shaw, S., Johnson, A. H. and Shearer, G. M.: Evidence for a new segregant series of B cell antigens that are encoded in the HLA-D region and that stimulate secondary allogeneic proliferative and cytotoxic responses. *J Exp Med*, 152: 565-580, 1979
- 5) Wake, C., Long, E. O. and Mach, B.: Allelic polymorphism and complexity of the genes for HLA-

- DR $\beta$ chains—direct analysis by DNA-DNA hybridization. *Nature*, 300 : 372-374, 1982
- 6) Andersson, M., Bohme, J., Andersson, G., Moller, E., Thorsby, E., Rask, L. and Peterson, P. A. : Genomic hybridization with class II transplantation antigen cDNA probes as a complementary technique in tissue typing. *Hum Immunol*, 11 : 57-67, 1984
  - 7) Böhme, J., Andersson, M., Andersson, G., Moller, E., Peterson, P. A. and Rask, L. : HLA-DR $\beta$  genes vary in number between different DR specificities, whereas the number of the DQ $\beta$  genes is constant. *J Immunol*, 135 : 2149-2155, 1985
  - 8) Maeda, M., Inoko, H., Ando, A., Uryu, N., Nagata, Y. and Tsuji, K. : HLA-DP typing by analysis of DNA restriction fragment length polymorphisms in the HLA-DP $\beta$  subregion. *Hum Immunol*, 21 : 239-248, 1988
  - 9) Maeda, M., Inoko, H., Ando, A., Uryu, N. and Tsuji, K. : HLA-D typing of heterozygotes using restriction fragment length polymorphism (RFLP) in the HLA-DQ gene region on the basis of standard band patterns derived from HLA homozygotes. *Hum Immunol*, 25 : 195-205, 1989
  - 10) Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N. : Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230 : 1350-1354, 1985
  - 11) Saiki, R. K., Bugawan, T. L., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. : Analysis of enzymatically amplified  $\beta$ -globin and HLA-DQ $\alpha$  DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*, 324 : 163-166, 1986
  - 12) Guillemot, F., Auffray, C., Orr, H. T. and Strominger, J. L. : MHC antigen genes. In : Hames, B. D. and Glover, D. M. (eds.), *Molecular Immunology*, pp. 81-143, IRL Press, Oxford, 1988
  - 13) Hardy, D. A., Bell, J. I., Long, E. D., Lindsten, T. and McDevitt, H. O. : Mapping of the class II region of the human major histocompatibility complex by pulsed-field gel electrophoresis. *Nature*, 323 : 453-455, 1986
  - 14) Lawrance, S. K., Smith, C. L., Srivastava, R., Cantor, C. R. and Weissman, S. M. : Megabase-scale mapping of the HLA gene complex by pulsed field gel electrophoresis. *Science*, 235 : 1387-1390, 1987
  - 15) Trowsdale, J., Ragoussis, J. and Campbell, R. D. : Map of the human MHC. *Immunol Today*, 138 : 443-446, 1991
  - 16) White, P. C., New, M. I. and Dupont, B. : HLA-linked congenital adrenal hyperplasia results from a defective gene encoding a cytochrome P-450 specific for steroid 21-hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81 : 7505-7509, 1984
  - 17) Twonsend, A., Öhlén, C., Bastin, J., Ljunggren, H. G., Foster, L. and Kärre, K. : Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature*, 340 : 443-448, 1989
  - 18) Schmacher, T. N. M., Heemels, M. T., Neefjes, J. J., Kast, W. M., Melief, C. J. M. and Ploegh, H. L. : Direct binding of peptide to empty MHC class I molecules on intact cells and in vitro. *Cell*, 62 : 563-567, 1990
  - 19) Yewdell, J. W. and Bennink, J. R. : The binary logic of antigen processing and presentation to T cells. *Cell*, 62 : 203-207, 1990
  - 20) Teyton, L., O'Sullivan, D., Dickson, P. W., Lotteau, V., Sette, A., Fink, P. and Peterson, P. A. : Invariant chain distinguishes between the exogenous and endogenous antigen presentation pathways. *Nature*, 348 : 39-44, 1990
  - 21) Roche, P. A. and Cresswell, P. : Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature*, 345 : 615-618, 1990
  - 22) Peters, P. J., Neefjes, J. J., Oorschot, V., Ploegh, H. L. and Geuze, H. J. : Segregation of MHC class II

- molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature*, 349: 669-676, 1991
- 23) Vaugham, R. W., Lanchburg, J. S. S., Marsh, S. G. E., Hall, M. A., Bodmer, J. G. and Welsh, K. I.: The application of oligonucleotide probes to HLA class II typing of the DRB subregion. *Tissue Antigens*, 36: 149-155, 1990
  - 24) March, B. and Tiercy, J. M.: Genotypic typing of HLA class II: from the bench to the bedside. *Hum Immunol*, 30: 278-284, 1991
  - 25) Scharf, S. J., Griffith, R. L. and Erlich, H. A.: Rapid typing of DNA sequence polymorphism at the HLA -DRB1 locus using the polymerase chain reaction and nonradioactive oligonucleotide probes. *Hum Immunol*, 30: 190-201, 1991
  - 26) Saiki, R., Walsh, P. S., Levenson, C. H. and Erlich, H. A.: Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 6230-6234, 1989
  - 27) Nomura, N., Ota, M., Tsuji, K. and Inoko, H.: HLA-DQB1 genotyping by a modified PCR-RFLP method combined with group-specific primers. *Tissue Antigens*, 38: 53-59, 1991
  - 28) Ota, M., Seki, T., Nomura, N., Sugimura, K., Mizuki, N., Fukushima, H., Tsuji, K. and Inoko, H.: Modified PCR-RFLP method for HLA-DPB1 and -DQA1 genotyping. *Tissue Antigens*, 38: 60-71, 1991
  - 29) Ota, M., Seki, T., Fukushima, H., Tsuji, K. and Inoko, H.: HLA-DRB1 genotyping by modified PCR-RFLP method combined with group-specific primers. *Tissue Antigens*, 39: 187-202, 1992
  - 30) Orita, M., Iwahara, H., Kanazawa, H., Hayashi, K. and Sekiya, T.: Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 2766-2770, 1989
  - 31) Hoshino, S., Kimura, K., Fukuda, Y., Dohi, K. and Sasazuki, T.: Polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis of polymorphism in DPA1 and DPB1 genes: A simple, economical, and rapid method for histocompatibility testing. *Hum Immunol*, 33: 98-107, 1992
  - 32) Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L. and Wiley, D. C.: Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*, 329: 506-512, 1987
  - 33) Brown, J. H., Jardetzky, T., Saper, M. A., Samraoui, B., Bjorkman, P. J. and Wiley, D. C.: A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature*, 332: 845-850, 1988
  - 34) Thomson, G., Robinson, W. P., Kuhner, M. K., Joe, S., McDonald, M. J., Gottschall, J. L., Barbosa, J., Rich, S. S., Bertram, J., Baur, M. P., Partanen, J., Tait, B. D., Scober, E., Mayer, W. R., Ludvigsson, J., Lindblom, J., Frid, N. R. and Deschamps, T. C.: Genetic heterogeneity, mode of inheritance, and risk estimated for a joint study of Caucasians with insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Hum Genet*, 43: 799-816, 1988
  - 35) Nepom, B. S., Palmer, J., Kim, S. J., Hansen, J. A., Holbeck, S. L. and Nepom, G. T.: Specific genomic markers for the HLA-DQ subregion discriminate between DR4+ insulin-dependent diabetes mellitus and DR4+ seropositive juvenile rheumatoid arthritis. *J Exp Med*, 164: 345-350, 1986
  - 36) Aparico, J. M., Wakisaka, A., Takada, A., Matsuura, N. and Aizawa, M.: HLA-DQ system and insulin-dependent diabetes mellitus in Japanese: does it contribute to the development of IDDM as it does in Caucasians? *Immunogenetics*, 28: 240-246, 1988
  - 37) Kida, K., Miura, G., Kobayashi, T., Nakamura, K., Sonoda, S., Inoue, H. and Tsuji, K.: Immunogenetic heterogeneity in type I (insulin-dependent) diabetes among Japanese—HLA antigens and organ-specific autoantibodies. *Diabetologia*, 32: 34-39, 1989
  - 38) Todd, J. A., Bell J. I. and McDevitt, H. O.: HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resis-

- tance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*, 329: 599-604, 1987
- 39) Todd, J. A., Mijovic, C., Fletcher, J., Jenkins, D., Bradwell, A. R. and Barnett, A. H.: Identification of susceptibility loci for insulin dependent diabetes mellitus by trans-racial gene mapping. *Nature*, 338: 587-589, 1989
  - 40) Awata, T., Kuzuya, T., Matsuda, A., Iwamoto, Y., Kanazawa, Y., Okuyama, M. and Juji, T.: High frequency of aspartic acid at position 57 of HLA-DQ beta-chain in Japanese IDDM patients and nondiabetic subjects. *Diabetes*, 39: 266-269, 1990
  - 41) Todd, J. A., Fukui, Y., Kitagawa, T. and Sasazuki, T.: The A3 allele of the HLA-DQA1 locus is associated with susceptibility to type I diabetes in Japanese. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 1094-1098, 1989
  - 42) Seki, T., Kiyosawa, K., Inoko, H. and Ota, M.: Association of autoimmune hepatitis with HLA-Bw54 and DR4 in Japanese patients. *Hepatology*, 12:1300-1304, 1990
  - 43) Seki, T., Ota, M., Furuta, S., Fukushima, H., Kondo, T., Hino, K., Mizuki, N., Ando, A., Tsuji, K., Inoko, H. and Kiyosawa, K.: HLA class II molecules and autoimmune hepatitis susceptibility in Japanese patients. *Gastroenterology*, 1992 (in press)
  - 44) Ota, M., Seki, T., Kiyosawa, K., Furuta, S., Hino, K., Kondo, T., Fukushima, H., Tsuji, K. and Inoko, H.: A possible association between basic amino acids of position 13 of DRB1 chains and autoimmune hepatitis. *Immunogenetics*, 36: 49-55, 1992
  - 45) Todd, J. A., Acha-Orbea, H., Bell, J. I., Chao, N., Fronck, Z., Jacob, C. O., McDermott, M., Sinha, A. A., Timmerman, L., Steinman, L. and McDevitt, H. O.: A molecular basis for MHC class II associated autoimmunity. *Science*, 240: 1003-1009, 1988
  - 46) Wordsworth, B. P., Lanchbury, J. S. S., Sakkas, L. I., Welsh, K. I., Panayi, G. S. and Bell, J. I.: HLA-DR4 subtype frequencies in rheumatoid arthritis indicate that DRB1 is the major susceptibility locus within the HLA class II region. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 10049-10053, 1989
  - 47) Bugawan, T. L., Angelini, G., Larrick, J., Auricchio, S., Ferrara, G. B. and Erlich, H. A.: A combination of a particular HLA-DP $\beta$  allele and a HLA-DQ heterodimer confer susceptibility to coeliac disease. *Nature*, 339: 470-473, 1989
  - 48) Ishikawa, K.: Natural history and classification of occlusive thromboaropathy (Takayasu's disease). *Circulation*, 57: 27-35, 1978
  - 49) Dong, R. P., Kimura, A., Numano, F., Yajima, M., Hashimoto, Y., Kishi, Y., Nishimura, Y. and Sasazuki, T.: HLA-DP antigen and Takayasu arteritis. *Tissue Antigens*, 39: 106-110, 1992
  - 50) Begovich, A. B., Bugawan, T. L., Nepom, B. S., Klitz, W., Nepom, G. T. and Erlich, H. A.: A specific HLA-DP $\beta$  allele is associated with pauciarticular juvenile rheumatoid arthritis but not adult rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 9489-9493, 1989

(4. 8. 11 受稿)