

HLA-DR及び-DP様抗原分子構成鎖の
分析によるHLA-D領域遺伝子群の解析

(課題番号：56480140)

昭和57年度科学研究費補助金(一般研究B)研究成果報告書

昭和58年3月

研究代表者 片 桐 一
(旭川医科大学医学部)

は し が き

昭和56年度から文部省科学研究費補助金（一般研究B）の助成のもとに行なわれた「HLA-D R及びD R様抗原分子構成鎖の分析によるHLA-D領域遺伝子群の解析」は2年間の研究期間を終了し、ここに研究成果報告書をまとめることになった。研究計画の全てが達成されたわけではないが、いくつかの新しい重要な知見が得られたと考えられる。報告書をまとめるにあたって、各分野の専門家の方々から率直な御批判を願うものである。

研究組織

研究代表者：片 桐 一
(旭川医科大学医学部・教授)

研究分担者：

昭和56年度

池 田 久 実
(旭川医科大学医学部・助教授)

佐 藤 英 俊
(旭川医科大学医学部・講師)

比 嘉 敏 夫
(旭川医科大学医学部・助手)

昭和57年度

池 田 久 実
(旭川医科大学医学部・助教授)

比 嘉 敏 夫
(旭川医科大学医学部・助手)

研究経費

昭和56年度	5,200千円
昭和57年度	2,000千円
計	7,200千円

研究発表

1. 学会誌等

- 1) 片桐一：D R 及び D R 様抗原分子の抗原構造、*Immunohematology*, 3 (4), 1981
- 2) 池田久実：ヒトリンパ球表面抗原に特異的な単クローン抗体について、*臨床病理*, 31 (3), 1983
- 3) Masataka Tanno, Hisami Ikeda, Genshu Tate, Naoyuki Miyokawa & Makato Katagiri : A new polypeptide associated with human Ia-like molecules, in preparation.

2. 口頭発表

- 1) 片桐一：H L A—D R 及び—D R 様抗原分子とそれらを支配する遺伝子群、第9回日本臨床免疫学会、1981年10月31日
- 2) 片桐一、池田久実、比嘉敏夫、丹野正隆、東寛、三代川齊之、楯玄秀、平田哲、古井秀典、林朋子、佐藤英俊：単クローン性抗体による H L A—D R 及び D R 様抗原分子の解析、第11回日本免疫学会、1981年12月1日
- 3) 三代川齊之、池田久実、丹野正隆、楯玄秀、林朋子、片桐一：H L A—D R 及び—D R 様抗原分子の構成鎖レベルでの解析、第12回日本免疫学会、1982年11月18日
- 4) 東寛、長谷川浩、池田久実、片桐一：ヒトIa様抗原の機能の解析—ConAによるリンパ球増殖反応におけるヒトIa様抗原の役割について—、第72回日本病理学会、1983年4月5日

3. 出版物

- 1) 片桐一、池田久実、比嘉敏夫：ハイブリドーマ法とモノクローナル抗体（渡辺武監修）、R & D プラレニング、1981年

研究 成 果

H L A—D 領域には免疫応答を制御する遺伝子群、疾患感受性を規定する遺伝子群等が密集して存在すると考えられている。我々は、この遺伝子領域の遺伝子産物であるヒトIa様抗原を分離精製し、ヒトアロ血清を用いて免疫化学的及び免疫遺伝学的検索を行なった。その結果、世界的に公認されたDR抗原係以外に、少なくとも2種類の抗原系（Hon 5 及びHon 7）が存在することが明らかとなった（別添1に概説）。

ヒトのIa様抗原分子はマウスの場合と同様2つのポリペプチド鎖から構成されているから、少なくとも6個のポリペプチドをコードする6個の遺伝子がこの遺伝子領域に存在する可能性がある。H L A—D 領域はマウスのI領域と同様、これらの構成鎖をコードする遺伝子を単位として細分化されることが予想される。この観点から、ヒトIa様抗原の各構成鎖の免疫化学的特性を解析し、各構成鎖に特異的なマーカーを明らかにする必要がある。

我々は、ヒトIa様抗原を構成する α 鎖及び β 鎖を抗原性を保ったまま分離し、ヒトIa様抗原と特異的に反応するアロ血清及び単クローン抗体とIa様抗原の各構成鎖との反応を検討した。さらに、ヒトIa様抗原に特異的な単クローン抗体のなかにはアロ血清では従来検出しえなかった特徴ある抗原分子を検出するものがあることに着目し、この抗原分子の免疫化学的解析を行なった。その結果、以下の諸点が明らかとなった。

(1) ヒト培養B細胞EBV—Wa（DR 4 / DR 4、DY T / DY T）から界面活性剤Brij 58を用いて可溶化し、部分精製した標識抗原材料¹²⁵I—Brij—Waは、3種類の単クローン抗体（マウス抗ヒト）7B 6、12A 5及び9C 4と反応する。これらの抗体で検出される抗原分子相互の関係、及びすでに明らかにされているヒトアロ血清で検出されるIa様抗原分子（DR、Hon 5、Hon 7）との関係をsequential co-precipitation法により解析した。9C 4抗体及び12A 5抗体の検出する抗原分子は互いに異なっており、しかもアロ血清（抗DR、抗Hon 5、抗Hon 7）の検出する既知のIa様抗原分子と

も異なっている。しかしながら、これらの抗体の反応する抗原決定基はヒトIa様抗原分子に共通な抗原決定基を検出する7B6抗体と分子を共有していることから、これら2種類の抗原分子は既知のIa様抗原と密接な関連を有する新しい抗原分子であると推定される。9C4及び7B6抗体で検出される抗原は、検討した培養細胞のうち全てのB細胞に発現されるが、T細胞には検出されない。12A5抗体で検出される抗原は全てのB細胞及び一部のT細胞に発現されている(第11回日本免疫学会、昭和56年12月で発表し、その記録を別添2とした)。

(2) これらの単クローン抗体と¹²⁵I-Bij-Waとの特異的免疫反応沈降物をSDS-PAGEにより解析した。7B6及び12A5抗体と反応する抗原分子は、35Kダルトンの α 鎖と27Kダルトンの β 鎖より構成されるが、9C4抗体は α 鎖及び β 鎖のほかに、還元状態で β 鎖より分子サイズの大きい第3の構成鎖を有する抗原分子を検出する(別添3)。

(3) これらの単クローン抗体及びアロ血清で検出される抗原決定基がいずれの構成鎖に存在するかを検討した。そのため、抗原性を失わずに各構成鎖を分離することを試み、抗原活性を保ったまま β 鎖を分離することに成功した。パパインを用いて可溶化した標識可溶化抗原¹²⁵I-pap-Waを6M尿素存在下で高速液体クロマトグラフィー(G3000SWカラム使用)で分画し、分子サイズが30Kダルトン以上の分画Iと30Kダルトン以下の分画IIを得た。分画IIは β 鎖そのものであり、分画Iは α 鎖及び α - β 鎖結合物を含む分画であることが判明した(別添2)。

(4) 高速液体クロマトグラフィーにより分画された各分画との反応パターンから、アロ血清及び単クローン抗体は、 \textcircled{A} 分画Iすなわち α 鎖又は α - β 鎖結合物と反応するもの、及び \textcircled{B} 両方の分画に反応するものすなわち β 鎖に反応するもの、の2群に大別された。A群にはヒトアロ血清及び単クローン抗体9C4、8B3及び6B3が含まれ、B群には7B6抗体が含まれる(別添2及び第12回日本免疫学会昭和57年11月で発表、その記録を別添4とした)。

(5) A群に属する単クローン抗体9C4及び8B3と α 鎖及び β 鎖を含む

分画 I との反応物を SDS-PAGE で解析すると、8B3 抗体との反応物は 32 K ダルトンの α 鎖フラグメントと 22 K ダルトンの β 鎖フラグメントから構成されていたのに対し、9C4 抗体との反応物は、25K ダルトンのフラグメントのみが認められ、 α 鎖及び β 鎖フラグメントは検出されなかった (別添 4)。

(6) 9C4 抗体を結合した Sepharose 4B を用いた抗原吸着法により、パパイン可溶化抗原材料中からこの 25 K ダルトンフラグメント (9C4 構成鎖) を分離した。この 25 K ダルトンフラグメントは、9C4 抗体のほかに単クローン抗体 7B6、6B3 と反応した。これらの抗体と ^{125}I -pap-Wa との反応物は、SDS-PAGE による解析では α 鎖と β 鎖以外に 25K ダルトンのバンドを有していた。又、 ^{125}I -pap-Wa から 9C4 構成鎖を除去した材料とこれらの単クローン抗体との反応では、25 K ダルトンのバンドは消失し、 α 鎖と β 鎖のみが検出された。したがって、これらの単クローン抗体は、 α 鎖、 β 鎖及び 9C4 構成鎖に共通の抗原決定基に反応し、9C4 抗体は 25 K ダルトンの 9C4 構成鎖とのみ反応すると考えられる。

(7) パパイン可溶化抗原材料で sequential co-precipitation を行なった。6B3 抗体及び 7B6 抗体は 9C4 抗体と反応する抗原分子を共沈させるが、9C4 抗体はこれらの単クローン抗体と反応する抗原分子を共沈させない。また、この 25 K ダルトンの 9C4 構成鎖は、高速液体クロマトグラフィー分画の分子サイズの大きい分画にのみ存在し、かつパパイン可溶化抗原材料中には 25 K ダルトンの homodimer は存在しない。従って、パパイン可溶化抗原材料中においては、9C4 構成鎖は 9C4 抗体と結合することによって容易に α - β 構成鎖から解離すると考えられる (別添 4)。

Brij58 可溶化抗原材料を用いた sequential co-precipitation でも、パパイン可溶化抗原材料を用いた時と全く同様な結果が得られた。9C4 抗体との結合による 9C4 構成鎖と α - β 構成鎖との解離が、Brij 58 可溶化抗原材料においても多少とも発生しているかどうかは現在検討中である。

(8) 9C4 構成鎖を 2 次元電気泳動によって解析した。一次元目非還元状態・二次元目還元状態で SDS-PAGE を行くと、9C4 構成鎖は、S-S 結合によ

るheterodimer又はhomodimerとしては存在しないことが判明した。一次元目等電点電気泳動、二次元目SDS-PAGEを行なうと、9C4構成鎖はpI 5.2~5.4の酸性ペプチドであることが判明した(別添4)。以上の結果は、9C4構成鎖がIi分子やアクチン等の既知のIa抗原結合物質とは異なっていることを示している。現在この9C4構成鎖の遺伝的支配、生合成過程及び生物活性について検討中である。

(9) 我々は、最近、DR超特異抗原であるHon5抗原分子を検出する単クローン抗体を得た。この単クローン抗体の検出する抗原分子の免疫化学的特性、遺伝子支配及び生物活性について現在検討中である。

- 別添 1 片桐一：D R 及び D R 様抗原分子の抗原構造、Immunohemacology 3(4)1981
- 別添 2 片桐一ほか：単クローン性抗体による H L A—D R 及び—D R 様抗原分子の解析、第11回日本免疫学会総会記録、1981
- 別添 3 片桐一ほか：単クローン性抗体による H L A—D R 及び—D R 様抗原の免疫化学的解析、ハイブリドーマ法とモノクロナール抗体（渡辺武監修）1981
- 別添 4 三代川齊之ほか：H L A—D R 及び—D R 様抗原分子の構成鎖レベルでの解析、第12回日本免疫学会総会記録、1982