

疾患発症に内因として関与するHLAクラスⅡ遺伝子 とその発症への役割の解析

(課題番号 02454165)

平成 3 年度科学研究費補助金 (一般研究(B)) 研究成果報告書

平成 4 年 3 月

研究代表者 片 桐 一

(旭川医科大学・医学部・教授)

は し が き

平成2年度から文部省科学研究補助金（一般研究（B））の助成のもとに行われた「疾患発症に内因として関与するHLAクラスⅡ遺伝子とその発症への役割の解析」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。

研究計画のすべてが達成された訳ではないが、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の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：
平成2年度

三 代 川 齊 之
（旭川医科大学医学部・講師）
楯 玄 秀
（旭川医科大学医学部・助手）
河 端 薫 雄
（旭川医科大学医学部・助手）

平成3年度

三 代 川 齊 之
（旭川医科大学医学部・講師）
河 端 薫 雄
（旭川医科大学医学部・助手）
柴 田 敏 也
（旭川医科大学医学部・助手）

研究経費

平成2年度	4,900千円
平成3年度	1,400千円
計	5,300千円

研究発表

1. 学会誌等

- 1) 高橋英俊, 片桐 一 : 日本人 I D D M と 相 関 す る H L A - D Q B 遺 伝 子 の D N A 塩 基 配 列 に つ い て の 検 討.
北海道医学雑誌, 65 巻, 1990 年 7 月
- 2) 久保孝市, 片桐 一 : I L - 4 に よ る H L A ク ラ ス II 抗 原 お よ び C D 2 3 抗 原 の 発 現 増 強 の 解 析. 移 植, 25 巻,
1990 年 10 月
- 3) Ashida, T., Kubo, K., Kawabata, I., Katagiri, M., Ogimoto, M.
and Yakura, H. : Signal Transduction Mechanisms of Ia
Induction in B cells by Interleukin 4 and Immuno-
globulin Receptors. Cellular Immunol., 126, 1990
- 4) Kumai, M., Miyokawa, N., Adachi, T., Katagiri, M. and Unnno, T.
: Association between HLA Antigens and Birch Pollen
Allergy in Japanese Subjects. Am. J. Rhinology, 4, 1990
- 5) 山崎泰宏, 三代川齊之, 片桐 一 : I 型糖尿病と H L A
ク ラ ス II 抗 原. 臨 床 科 学, 27 巻, 1991 年 9 月
- 6) 安達俊秀, 熊井恵美, 三代川齊之 : シラカバ花粉症発症
に 関 与 す る H L A ク ラ ス II 抗 原 の 解 析. 日 本 耳 鼻 咽 喉 科 学 会
会 報, 95 巻, 1992 年 7 月 掲 載 予 定
- 7) 柴田敏也, 河端薫雄, 片桐 一 : Forskolin に よ る H L A
ク ラ ス II 分 子 の 発 現 機 構 の 解 析. 北 海 道 医 学 雑 誌, 67 巻,
1992 年 5 月 掲 載 予 定
- 8) 石沢 貢, 河端薫雄, 片桐 一 : H L A - D R 9 ト ラ ン ス
ジ ェ ニ ッ ク マ ウ ス の 作 製 と I L - 4 に よ る H L A - D R 9 抗 原
の 発 現 誘 導. 移 植, 発 表 予 定

2. 口頭発表

- 1) 三代川 齊之, 安達俊秀, 山崎泰宏, 片桐 一 : 日本人
I D D M 患者の H L A クラス II 遺伝子の解析. 第 7 9 回日本
病理学会総会, 1 9 9 0 年 3 月 3 0 日
- 2) 池田和代, 久保孝市, 河端薫雄, 片桐 一 : I L - 4 によ
る H L A クラス II 抗原および C D 2 3 抗原の発現誘導.
第 7 9 回日本病理学会総会, 1 9 9 0 年 3 月 3 1 日
- 3) 安達俊秀, 植原元晴, 石沢 貢, 河端薫雄, 三代川 齊之,
片桐 一 : シラカバ花粉症発症と相関する H L A クラス
II 抗原の解析. 第 2 0 回日本免疫学会総会, 1 9 9 0 年
1 1 月 2 9 日
- 4) 三代川 齊之, 安達俊秀, 植原元晴, 片桐 一 : シラカバ
花粉症発症に関与する H L A クラス II 抗原の機能的解析.
第 8 0 回日本病理学会総会, 1 9 9 1 年 4 月 3 日
- 5) 河端薫雄, 柴田敏也, 片桐 一 : Forskolin による H L A
- D Q 遺伝子の発現制御. 第 2 1 回日本免疫学会総会,
1 9 9 1 年 1 1 月 2 7 日
- 6) 石沢 貢, 柴田敏也, 奥山光彦, 河端薫雄, 片桐 一 :
I L - 4 により導入遺伝子の発現がみられる H L A - D R 9
トランスジェニックマウス. 第 8 1 回日本病理学会総会,
1 9 9 2 年 5 月 1 4 日, 発表予定

研究成果

種々の疾患の発症に果たす内因の解明がクローズアップされている。内因の一つとして著名な多型性を示すH L A遺伝子群が注目され、諸種疾患とH L Aとの相関が明らかにされてきた。我々はインシュリン依存性糖尿病（I D D M）、Vogt-小柳-原田病（原田氏病）の発症が特定のH L AクラスII抗原と相関することを明らかにしてきた。又、北海道地方に多い白樺花粉症の発症に、特定のH L AクラスII抗原が関与する可能性を明らかにしている。今回我々は、I D D M発症に関与するH L AクラスII遺伝子と白樺花粉症発症に関与するH L AクラスII分子の役割について解析し、加えてH L AクラスII遺伝子導入細胞とトランスジェニックマウスを作製し、そしてH L AクラスII分子の発現増強機構を解析した。

1. 日本人のI D D M発症に関与するH L AクラスII遺伝子及びアミノ酸配列の解析

日本人のI D D M発症は、H L AハプロタイプD R 4 -D Q w 4及びD R 9 -D Q w 9と相関する。これは白人のI D D M発症に相関するH L AハプロタイプD R 3 -D Q w 2及びD R 4 -D Q w 8とは異なっている。白人で明らかにされた「I D D M発症にH L A-D Q抗原β鎖の57番目アミノ酸が非アスパラギン酸の時感受性が増す」との説明が、日本人にもあてはまるか否かを患者のH L AクラスII遺伝子を分離して検討した。

日本人I D D M患者（D R 9 -D Q w 9 / D R 1 -D Q w 1）及び患者と同じH L Aハプロタイプを有する健常同胞のD Q w 9に対応するゲノム遺伝子を分離し、その全エクソンの塩基配列を決定した。

その結果、患者と健常同胞の D Q w 9 抗原 β 鎖に対応する遺伝子 D Q B 1 ※ 0303 の全塩基配列に差異は認められなかった。又、日本人の I D D M と強い相関を有する D R 4 - D Q w 4 ハプロタイプについても、ホモ接合体 B 細胞から D Q w 4 抗原 β 鎖に対応するゲノム遺伝子 D Q B 1 ※ 0401 を分離し、その全エクソンの塩基配列を決定した。これらの D Q B 1 ※ 0303 及び D Q B 1 ※ 0401 の塩基配列から推定される D Q 抗原 β 鎖の 57 番目のアミノ酸はアスパラギン酸であった。

次いで、I D D M 患者 11 名の遺伝子 D N A を鋳型にして、P C R 法により D Q A 1, D Q B 1 及び D R B 1 遺伝子の第 2 エクソン部分を増幅し、分離し、そしてその塩基配列を決定した(表 1)。

これらの患者の少なくとも 1 つのハプロタイプには、常に D Q B 1 ※ 0401 又は D Q B 1 ※ 0303 遺伝子が存在し、それらの塩基配列から推定される D Q 抗原 β 鎖の 57 番目のアミノ酸はアスパラギン酸であった。従って白人の I D D M で明らかにされた D Q 抗原 β 鎖の 57 番目アミノ酸が非アスパラギン酸の時、I D D M 発症感受性であるとの説明は、日本人には当てはまらないことが明らかになった。

H L A クラス II 抗原 β 鎖の 57 番目のアミノ酸は、T 細胞を活性化する抗原ペプチドが H L A クラス II 分子に結合する溝の形成に関わる重要なアミノ酸と推測されている。この 57 番目のアミノ酸に注目して、D R B 1 遺伝子の第 2 エクソンについて解析した。我々が決定した 11 名の I D D M 患者の D R B 1 遺伝子の塩基配列から推定される D R 抗原 β 鎖の 57 番目のアミノ酸は、常に 1 つのハプロタイプに非アスパラギン酸が認められた。クラス II 抗原の立体構造モデルでの 57 番目のアミノ酸の重要性を考慮すると、日本人では D R 抗原の β 鎖が I D D M 発症に関与していると推定される。

又、検討した 11 名の I D D M 患者の D Q A 1 対立遺伝子には、少なくとも 1 つのハプロタイプとして D Q A 1 ※ 0301 を有していた。I D D M 発症にこの D Q A 1 ※ 0301 遺伝子が関与する可能性が指摘

表 1

今回の11例の患者において同定されたDRB1, DQA1, DQB1の各遺伝子とそれぞれの塩基配列から推定されるDRβ鎖, DQβ鎖各々57番目のアミノ酸.

Patient Number	DNA allele			Amino acid at 57	
	HLA-DRB1*	HLA-DQA1*	HLA-DQB1*	DRβ	DQβ
DM1	0405	0301	0401	Ser	Asp
	0901	0301	0303	Val	Asp
DM2	0405	0301	0401	Ser	Asp
	1302	0102	0604	Asp	Val
DM3	0402	0301	0302	Asp	Ala
	0405	0301	0401	Ser	Asp
DM4	0405	0301	0401	Ser	Asp
	0901	0301	0303	Val	Asp
DM5	0405	0301	0401	Ser	Asp
	0901	0301	0303	Val	Asp
DM6	0405	0301	0401	Ser	Asp
	0802	0301	0302	Asp	Ala
DM7	0802	0401	0402	Asp	Asp
	0901	0301	0303	Val	Asp
DM8	1601<注>	0102	0602	Asp	Asp
	0405	0301	0401	Ser	Asp
DM9	0101	0101	0501	Asp	Val
	0405	0301	0401	Ser	Asp
DM10	1201	0501	0301	Val	Asp
	0901	0301	0303	Val	Asp
DM11	0802	0401	0402	Asp	Asp
	0901	0301	0303	Val	Asp

<注>はアミノ酸配列57番でGAT→GACの塩基の置換が認められたが、アミノ酸レベルではともにAspで変異を認めなかった。

は非アスパラギン酸アミノ酸。

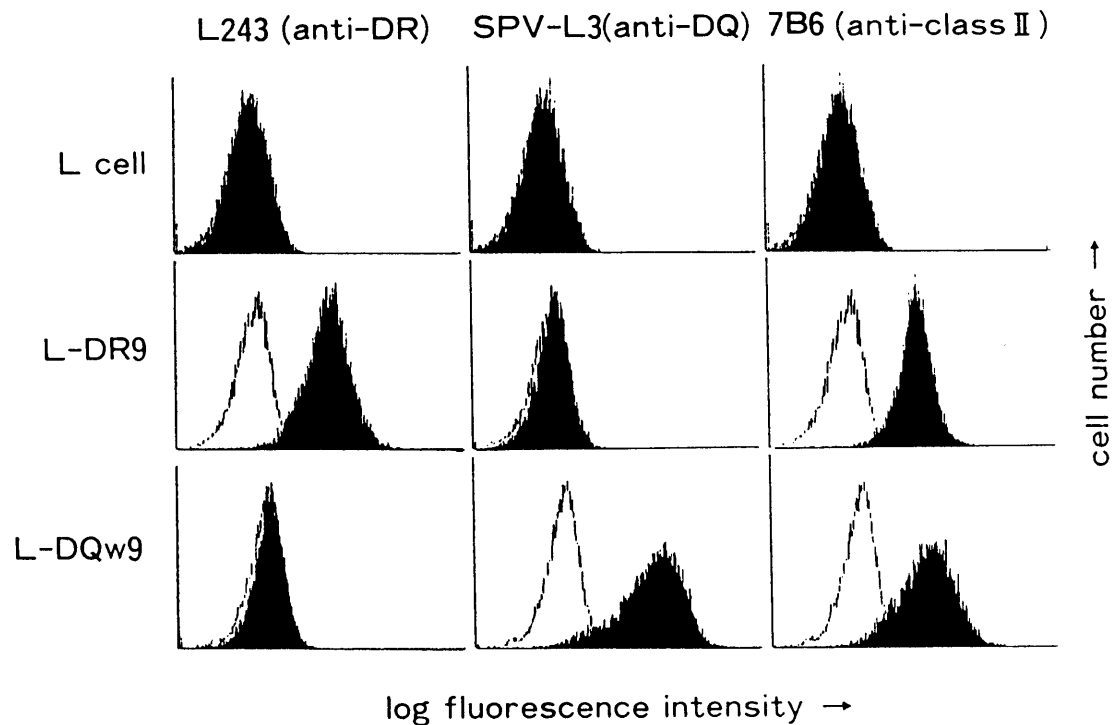
されており、この遺伝子産物とDR抗原β鎖のアイソタイプ非適合分子が日本人のIDD M発症に関与している可能性が推定された。

2. H L A クラス II トランスジェニックマウスの作製と H L A クラス II 分子発現増強機構の解析

H L A と強い相関を示す疾患について、これらの疾患の発症に関わる H L A 分子の役割を解明する上で、H L A クラス II 遺伝子を導入した細胞及びトランスジェニックマウスを利用した解析が重要である。我々は H L A -D R 9 分子及び H L A -D Q w 9 分子に対応するゲノム遺伝子を分離し、これらをリン酸カルシウム沈澱法によりマウス線維芽細胞 L 細胞に導入した。クローニング後、D R 9 分子または D Q w 9 分子を安定して発現している L-D R 9 及び L-D Q w 9 細胞を作製した。図 1 はこれらの細胞の H L A クラス II 分子の発現をフローサイトメーターで検討したものである。これらの細胞は、3 で述べてある白樺花粉症の発症に関わる H L A -D R 9 分子の解析に用いた。

L 細胞で発現が確認されたこれらの D R A 1 及び D R B 1 遺伝子、D Q A 1 及び D Q B 1 遺伝子を B 6 マウスの受精卵に導入してトランスジェニックマウスの作製を試みた。現在まで、D R A 1 及び D R B 1 遺伝子が 10 コピー以上導入されたトランスジェニックマウス B 6-D R 9 が得られている。この B 6-D R 9 マウスでは、無処置状態では D R 9 分子が発現されていない。これ迄に行ってきた H L A クラス II 分子の発現増強の解析では、B 細胞を用いた場合、I L-4 により H L A クラス II 分子の発現が増強し、そして細胞内 C a イオンの移動がその発現機構に関与していることを明らかにした。又、ミエローマ細胞を用いた場合、細胞内 c A M P 濃度を増強させるフォルスコリンが H L A クラス II 分子の発現を増強させた。これらの知見を基にして、B 6-D R 9 マウスの脾細胞を I L-4 を添加して培養すると、D R A 1 及び D R B 1 遺伝子の m R N A が検出され、そして D R 9 分子が発現されることが明らかになった。

図1 L cell transfectantのHLA-class II 抗原の発現



DR9遺伝子を導入したL-DR9細胞およびDQw9遺伝子を導入したL-DQw9細胞と、単クローン抗体(L243, SPV-L3, 7B6)との反応をflow cytometryで解析した。

次いで疾患感受性の研究に利用するために、各種薬剤を用いて効率
良いDR分子の発現を検討している。

3. 白樺花粉症の発症に関わるH L AクラスII分子の解析

白樺花粉症は北海道において高頻度に認められる。我々は白樺花粉症の発症が特定のH L A抗原と相関することを明らかにし、そしてこの疾患と相関するH L AクラスII分子の役割を解析した。

白樺花粉症患者13名のH L AクラスI及びクラスII抗原を検討した。192名の健常人のH L A抗原の頻度と比べると、患者群ではD R 9及びD Q w 9抗原が有意に高頻度に認められた。これらのH L AクラスII分子のいずれが発症に関与しているかを、白樺花粉抗原に対する患者のリンパ球増殖反応により解析した。市販されている白樺花粉抗原は欧米産の白樺 *Birch White-Betula Pendula* から得られた抗原であるため、先ず日本の白樺 *Birch White-Betula Platyula var. Japonica* の花粉から抗原を抽出した。患者リンパ球は、健常者のリンパ球に比べて、*Betula Pendula* 抗原と *Betula Platyula var. Japonica* 抗原に同様の高い反応性を有していた。この患者リンパ球の増殖反応にいずれのH L AクラスII分子が関与しているかを、反応系に抗H L AクラスII抗体を加えて検討した。*Betula Pendula* 抗原に対するリンパ球増殖反応に抗H L AクラスIIフレームワ抗体7 B 6及び抗H L A-D R抗体L 2 4 3を加えると、検討したすべての患者(10人)で増殖反応が抑制された。その一部について図2に示した。これに対し、3種類の抗H L A-D Q抗体(D 1 2, D w 7, S P V-L 3)によっては、検討したすべての例で抑制は認められなく、その一部について図3に示した。さらに *Betula Platyula var. Japonica* 抗原に対するリンパ球増殖反応についても同様の検討を行うと、抗H L A-D R抗体による抑制が認められ、そして抗H L A-D Q抗体による抑制は認められなかった。次にH L AクラスII遺伝子のトランスフェクタントを抗原提示細胞として用い、*Betula Pendula* 抗原に対する患者末梢血T細胞の増殖反応

図2 抗HLAクラスII抗体によるリンパ球増殖反応の抑制

抗原: Betula Pendula

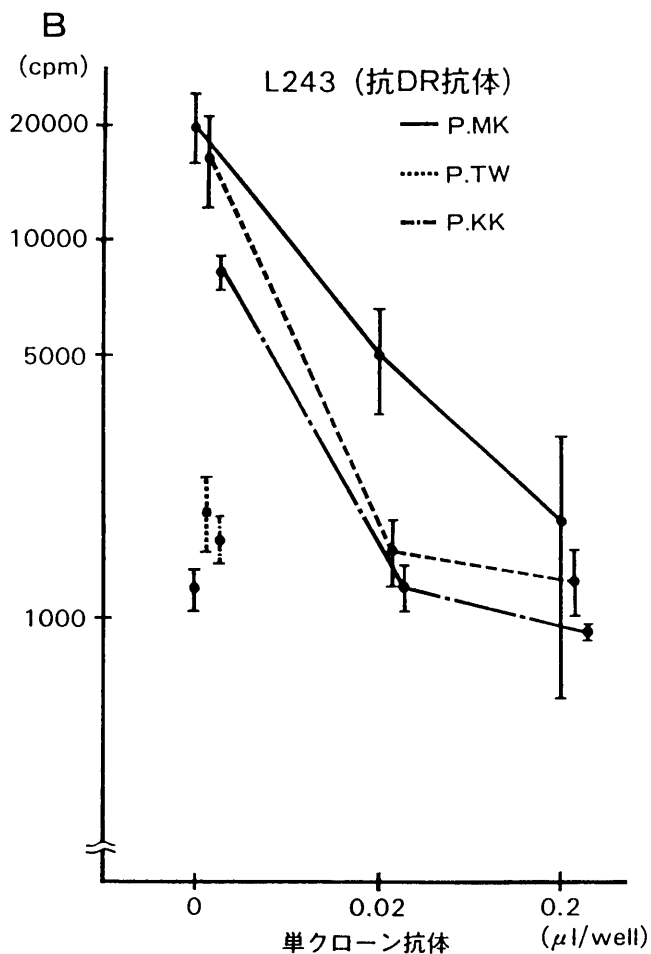
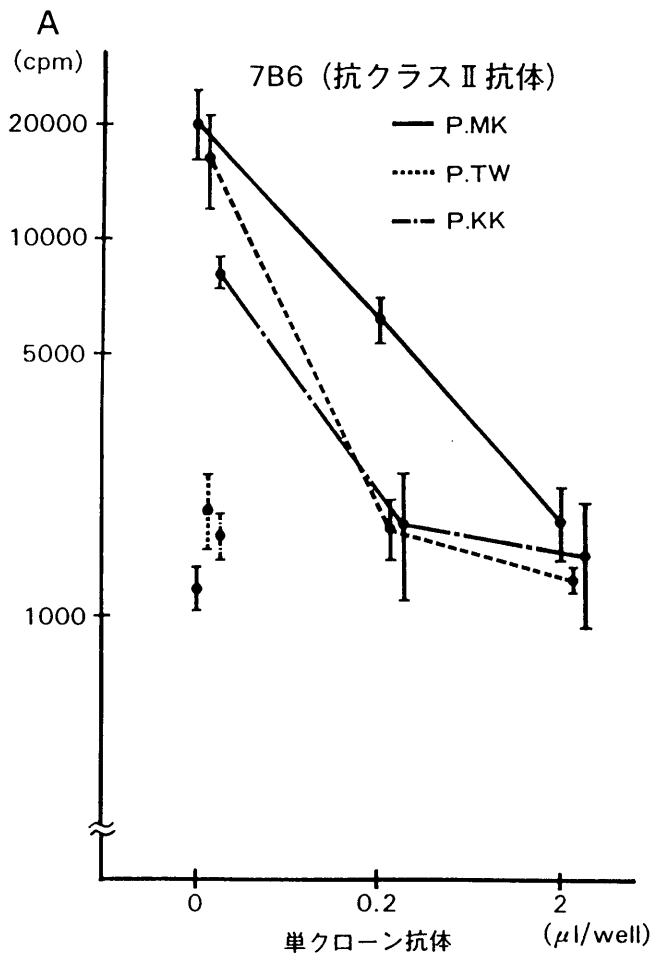
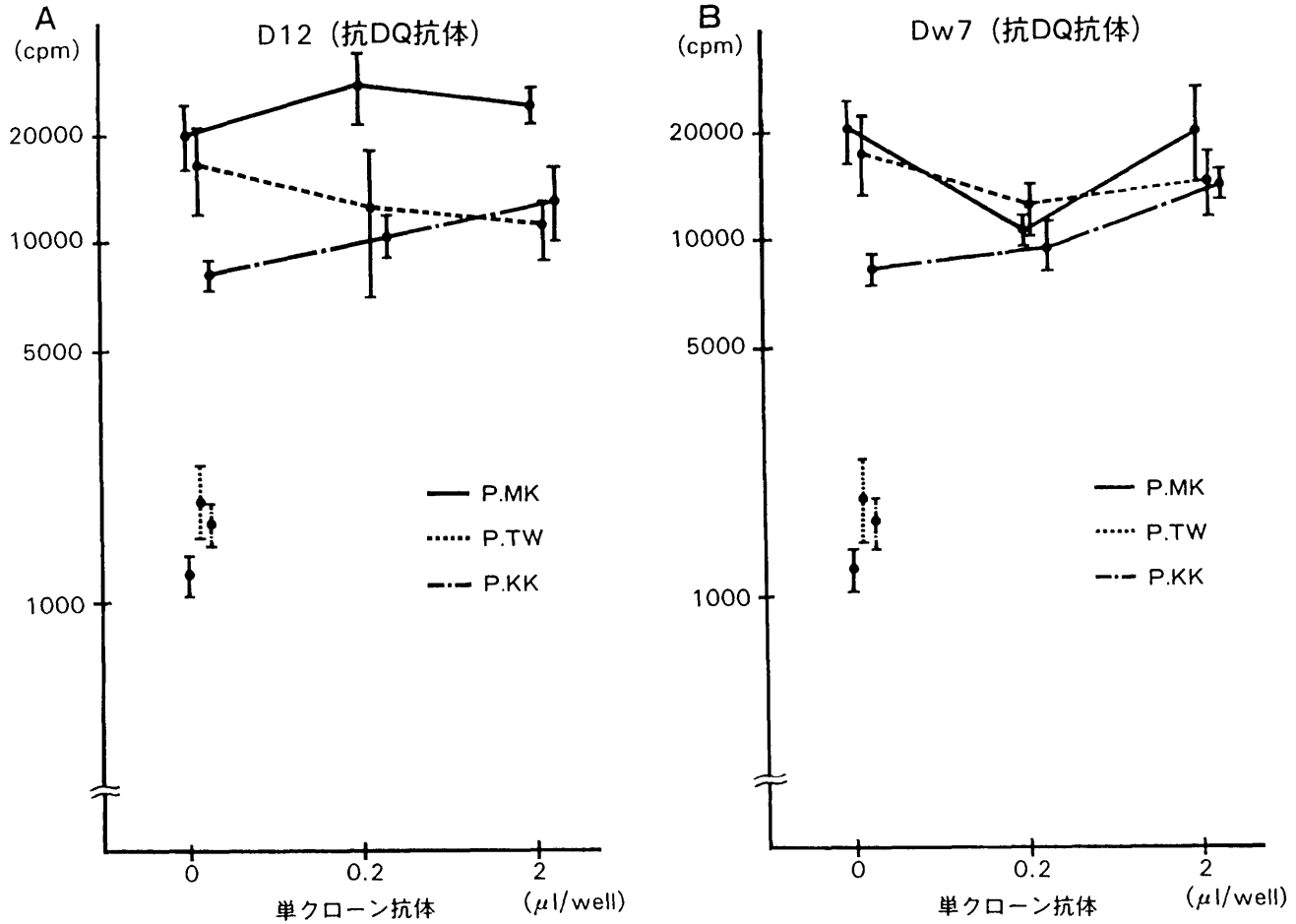


図3 抗HLA-DQ抗体のリンパ球増殖反応に及ぼす影響

抗原：Betula Pendula



を検討した。その結果 H L A - D R 9 分子に対応する遺伝子を導入した L 細胞 (L - D R 9) を用いたときに増殖反応が認められ、 H L A - D Q w 9 分子に対応する遺伝子を導入した L 細胞 (L - D Q w 9) では増殖反応が認められなかった。

以上の成績から、白樺花粉症の発症に H L A - D R 9 分子が関与しており、そして H L A - D R 9 分子が T 細胞活性化過程における白樺抗原の抗原提示に重要な役割を担うことが明らかになった。

別添 1

高橋英俊ほか : 日本人 I D D M と相関する H L A - D Q B
遺伝子の D N A 塩基配列についての検討.

北海道医学雑誌, 65, 412 ~ 418, 1990

別添 2

Kumai, M. et al : Association between HLA Antigens and
Birch Pollen Allergy in Japanese Subjects.

Am. J. Rhinology, 4, 19 ~ 23, 1990

別添 3

山崎泰宏ほか : I 型糖尿病と H L A クラス II 抗原.

臨床科学, 27, 1096 ~ 1105, 1991