



Analyses of HLA class II antigens by one-dimensional isoelectric focusing gel electrophoresis

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 石塚, 了士 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/980

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 127号	学位授与年月日	平成 4年 3月26日
氏 名	石 塚 了 士		
論文題目	Analyses of HLA class II antigens by one-dimensional isoelectric focusing gel electrophoresis (一次元等電点ゲル電気泳動法による HLA クラス II 抗原の解析)		

医学博士 石塚了士
論文題目

Analyses of HLA class II antigens by onedimensional isoelectric focusing gel electrophoresis

(一次元等電点ゲル電気泳動法によるHLAクラスII抗原の解析)

論文の内容の要旨

〔目的〕 ヒト主要組織適合遺伝子複合体 major histocompatibility complex(MHC)産物である HLA は T 細胞の抗原認識に関与し、臨床的には移植の拒絶反応やある種の自己免疫疾患の感受性等に強く関与している。この MHC はクラス I、II、III に分けられており、特にクラス I と II は多型性に富むため、多種類のハプロタイプが存在し、人種差の存在も指摘されている。HLA の研究は従来血清学的タイピングの方法が主流であったが最近では生化学的解析、更に DNA タイピングの方法により詳細に検討されつつある。蛋白質については一次元等電点ゲル電気泳動 (1D-IEF) 法と二次元電気泳動法 (2D-GES) により多型性の解析が行われている。我々はこの 1D-IEF 法に改良を加え、HLA クラス II の DR 抗原を中心に生化学的解析を行った。更に DR 4 ホモ接合体 B 細胞株の 1D-IEF 法による分類と D タイプ及び DNA タイピングの結果を比較した。次に HLA-DR 4 及び DR 9 抗原は日本人に多いタイプであり、かつ疾患感受性が高いため、これらのホモ及びヘテロ接合体 B 細胞株を用いてこの縦型 1D-IEF 法で解析を行った。得られた結果を血清学的タイピングの結果と対比させ、この縦型 1D-IEF 法の有用性について検討した。

〔材料と方法〕 (1)第11回国際組織適合性ワークショップ (1991) のパネル細胞61種類と微生物学教室で継代培養している DR 4 ホモ接合体 B 細胞株 6 種類と末梢血より作製した B 細胞株を含め日本人のホモ及びヘテロ接合体 B 細胞株 15 種類を使用した。モノクローナル抗 DR 抗体には NC-1 を使用した。(2)1D-IEF 法による生化学的解析は EB ウイルスで形質転換したヒト B 細胞株 (1×10^7) を ^{35}S -メチオニンで内部標識後トリトン X-100 で可溶化し、モノクローナル抗体/rabbit anti-mouse IgG 結合 Protein A-Sepharose で DR 抗原を免疫沈降させた。ノイラミニダーゼ処理のあと縦型 1D-IEF 法で電気泳動し、フルオログラフィーを行った。(3)PCR/ドットプロットハイブリダイゼーション:ヒト B 細胞株より DNA を抽出後 polymerase chain reaction(PCR)法で DRB 遺伝子の第 2 エクソンを増幅した。この DNA をナイロンメンブランへドットプロットし、 ^{32}P 標識プローブでハイブリダイズした。プローブは第11回国際組織適合性ワークショップの DRB のプローブを使用した。(4)サザンプロットハイブリダイゼーション:ヒト B 細胞株より高分子 DNA を抽出後、制限酵素で切断し、この DNA をアガロースゲルに電気泳動した。泳動したゲルをナイロンメンブランへ転写後 ^{32}P 標識プローブでハイブリダイズした。(5)二次元電気泳動法 (2D-GES):(2)と同様に 1D-IEF 法で電気泳動を行ったゲルを SDS-polyacrylamide gel electrophoresis のゲルの上端にのせ、再び電気泳動を行いフルオログラフィーを行った。

〔結果〕 (1)DR 4 の homozygous typing cell(HTC)は 4.1、4.2、4.3、4.4 の 4 種類のサブタイプに分類された。DR 8、DR 11、DRw14 の HTC は各々 2 つのサブタイプに分類された。DR 1、DR 7、DR 9、DRw12、DRw13 の HTC は各々 1 つの pI を示した。又、DR 2 のスプリット抗原である DRw15 と DRw16、DR 3 のスプリット抗原である DRw17 と DRw18 の抗原をもつ HTC は各々同じ pI の位置に DRB 1 遺伝子産物のバンドを認めた。(2)1D-IEF 法による DR 4.1 の抗原をもつ細胞の D タイプは Dw 4 と Dw14 に、DR 4.2 は DwKT 2 と Dw13 に、DR 4.3 は Dw10 に、そして DR 4.4 は Dw15 と対応し、各々 1 本のバンドを示した。(3)1D-IEF 法で DR 4.1 から DR 4.4 の抗原をもつ細胞の各々の DNA 分析では DR 4.1 の DRB 1 は 0401 と 0404 に、DR 4.2 は 0406 と 0407 に、DR 4.3 は 0402 に、そして DR 4.4 は 0405 と対応した。(4)DR 4 あるいは DR 9 抗原をもつ日本人由来のヘテロ接合体 B 細胞株も縦型 1D-IEF 法で同様に解析ができた。(5)84 種類の B 細胞をこの縦型 1D-IEF 法で生化学的解析し、2 種類の細胞でエキストラバンドを認めた。このバンドの分子量を 2D-GES 法で調べたところ、DR 抗原の α 鎖とも β 鎖とも分子量の異なる蛋白質であることが判明した。

〔考察〕 1D-IEF 法は多型性の検出感度に関し、血清学的タイピングより優れているが、DNA タイピングや D タイピングよりは劣る。しかしながら PCR/ドットプロットハイブリダイゼーション法は第 2 エクソンのみを検出するため他の部位の多型性は検出できない欠点がある。又、D タイピングの方法は再現性に問題がある。我々の改良した縦型 1D-IEF 法による HLA-DR 抗原の生化学的解析は 2D-GES 法による解析の結果と一致していた上に、2D-GES 法よりも技術的に簡単で再現性もよく、多くのサンプルを同時に泳動できるためバンドの比較が容易であるなどの多くの利点がある。以上よりこの 1D-IEF 法による生化学的タイピングは有力な HLA タイピング法の 1 つであり、自己免疫疾患の感受性の検索や、移植、法医学、人類学の分野にも有用であると考えらる。

論文審査の結果の要旨

ヒト主要組織適合性遺伝子複合体(MHC)は第 6 染色体短腕に存在する。その産物であるヒト白血球関連抗原(HLA)は大別してクラス I、II、に分けられ、これまでは血清学的手法で、詳細なタイピングがなされていた。とくに、クラス I、II は多型性に富み、多種類のハプロタイプが存在し、人種差、疾患との関連性が解析されている。さらに、最近ではこれまでの血清学的手法に、新たに電気泳動分析を用いた解析 DNA 分析を利用した解析が加えられより一層詳細なタイピングがなされるようになってきている。なかでもクラス II の多型性の解析には、生化学的解析手法として電気泳動分析が利用され、一次元等電点ゲル電気泳動法(1D-IEF)、二次元ゲル電気泳動法(2D-GES)が用いられている。申請者は、この生化学的手法を用い試料処理に改良を加えると同時に、1D-IEF にも改良を加え、多検体処理の可能な縦型電気泳動装置を用い、簡便で、かつスクリーニングにも用いられる確実な等電点分析の方法を開発した。さらに、その手法を用いて、従来の方法との対応性が十分取れることを確認すると同時に、いままで観察できなかったいくつかの多型性の解析を可能とした。

試料は、第 11 回国際組織適合性ワークショップ(1991)のパネル細胞 61 種類と、浜松医科大学微生物教室で継代培養している DR 4 ホモ接合体 B 細胞株 6 種類、末梢血より作成した日本人ホモおよびヘテロ接合体 B 細胞株 15 種類である。

方法の概略は、対象とする細胞を EB ウィルスで形質転換し、その蛋白を ^{35}S で標識し、破碎後可溶性分画を得る。可溶性の分画は、rabbit anti-mouse-IgG 結合-Protein A-Sepharose で処理し、さらにクラス II 抗原特異的なモノクローナル抗体(NC-1 など)で処理し、クラス II 抗原を分別しノイラミニダーゼで糖鎖の荷電の影響を除いたのちに等電点電気泳動の試料として分析した。また、1D-IEF の確実性の確認のため 2D-GES を実施した。一方、DNA 分析の方法との対応も検討するためドットプロットハイブリダイゼーションなどを実施した。DNA 分析では、対象の細胞より DNA を抽出後、クラス II の DR B 遺伝子の exon 2 を含む領域を PCR 法にて増幅し、ドットハイブリダイゼーションをおこなった。また、抽出した DNA を数種の制限酵素で切断し RFLP で多型性を確認した。

申請者の確立した 1D-IEF を用いて、血清学的手法で単一の DR 4 は 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 の 4 種類サブタイプに分類された。さらに、DR 8、DR12、DR14 もそれぞれ 2 種のサブタイプに分離された。これらのサブタイプは 2D-GES を用いた方法に比べより簡便に確実に分離された。また、その他の DR 抗原に対しては 2D-GES で得られている結果と同じ PI に対応するバンドを認めた。しかし、D タイピングでの Dw 4 と Dw14 が DR4.1 に、Dw'KT 2' と Dw13 が DR4.2 と対応するなどの問題点も確認された。また、DNA 分析でも、DR4.1 ホモ接合体の DRB 1 の exon 2 領域は 0401 と 0404、DR4.2 では 0406 と 0407 と解析され、D タイピングと同様に等電点電気泳動の解析では分離することは困難であった。しかし、申請者の開発した 1D-IEF は、臨床的应用にも実用性の高い方法として評価された。

さらに、申請者はこの 1D-IEF を用いて 84 種類の B 細胞を解析し、2 種類の細胞で等電点的な DR 領域にエキストラバンドを認めた。しかし、この蛋白は DR 抗原の α 鎖、 β 鎖とも分子量的に異なる蛋白であり、今後の解析が必要である。

この報告に対して、審査委員は本論文が博士(医学)論文として十分の内容を備えているものと評価した。さらに、この発表に対して審査委員から以下のような質疑がなされた。

- 1) 従来の 1D-IEF に対する改良点
- 2) 生化学的解析法と血清学的解析法の差と、その優劣
- 3) 生化学的解析法と DNA 解析法の差
- 4) PCR で exon 2 の領域を用いた理由
- 5) 等電点分析で近傍にきたバンドの確認

これらの質疑に対して申請者の回答は適切であり、残された課題も明確にされ今後検討を進める旨の解答をえた。

以上の審議の結果、本審査委員会は本論文が博士（医学）の学位を授与するにふさわしい内容を備えているものと全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 菅 野 剛 史

副査 教授 浅 野 稔

副査 助教授 鈴 木 和 雄

副査 教授 五十嵐 良 雄

副査 講師 中 辻 理 子