

protection by Tat-expressing Sendai viral vector-booster in a macaque AIDS model. AIDS, AIDS 17:1392-1394, 2003.

- (6) Takeda, A., Nakamura, H., and Matano, T. Evaluation of simian immunodeficiency virus-specific immune responses induced by a defective proviral DNA vaccine in macaques. Jpn. J. Infect. Dis. 56:172-173, 2003.
- (7) Takeda, A., Igarashi, H., Nakamura, H., Kano, M., Iida, A., Hirata, T., Hasegawa, M., Nagai, Y., and Matano, T. Protective efficacy of an AIDS vaccine, a single DNA-prime followed by a single booster with a recombinant replication-defective Sendai virus vector, in a macaque AIDS model. J. Virol. 77:9710-9715, 2003.

2 学会発表

- (1) Kano M, Matano T, Kato A, Nakamura H, Takeda A, Suzuki Y, Ami Y, Nagai Y: Primary antigen-expression and cellular immune responses in macaques immunized intranasally with a recombinant Sendai viral vector. 第2回熊本エイズセミナー2001年9月20日.
- (2) Matano, T., Kano, M., Lun, W. H., Nakamura, H., Takeda, A., Ami, Y., Nomura, N., Furuta, Y., Shioda, T., and Nagai, Y. Comparison of protective efficacies between Gag- and Tat-boosters in a DNA-prime/ Sendai viral vector-boost vaccine system against AIDS. The XIVth International AIDS conference, Barcelona, Spain, 7/9/2002.
- (3) Matano, T., Lun, W. H., Kano, M., Takeda, A., Nakamura, H., Mori, K., Sata, T., and Nagai, Y. Loss of viremia control without losing specific CD8+ T cells in vaccinated macaques after showing CTL-based partial protection against SIV infection. The XIIth International Congress of Virology, Paris, France, 7/29/2002.
- (4) Lun, W. H., Kano, M., Takeda, A., Nakamura, H., Mori, K., Sata, T., Nagai, Y., and Matano, T. Loss of AIDS vaccine-based viremia-control without loss of virus-specific CD8+ T cells in macaque preclinical trials. 第50回日本ウイルス学会学術集会、札幌、10/16/2002.
- (5) 狩野宗英、中村浩美、武田明子、加藤篤、須崎百合子、網康至、永井美之、俣野哲朗. 組換えセンダイウイルスベクターワクチンのマカクサルエイズモデルによる安全性および有効性の検討. 第50回日本ウイルス学会学術集会、札幌、10/16/2002.
- (6) 倫文輝、狩野宗英、中村浩美、武田明子、俣野哲朗. サルエイズモデルにおける細胞性免疫破壊機構の解析. 第16回日本エイズ学会学術集会、名古屋、11/30/2002.
- (7) Matano, T., Lun, W., Kano, M., Takeda, A., H. Nakamura, H., Mori, K., Sata, T., and Nagai, Y. Longitudinal analysis of vaccinated macaques after partial control of primary SIVmac239 infections. The 10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Chicago, USA, 2/13/2003.
- (8) 俣野哲朗. HIV ワクチンの展望. 第26回日本医学会総会、福岡、4/5/2003.
- (9) Matano, T. Cytotoxic T lymphocyte-based pressure against immunodeficiency virus infections in a macaque AIDS model. 第76回日本生化学会大会、横浜、10/16/2003.
- (10) 小林政博、五十嵐博子、武田明子、野本明男、俣野哲朗. SIV Gag におけるCTLエピトープの同定. 第51回日本ウイルス学会学術集会、京都、10/28/2003.
- (11) 俣野哲朗、五十嵐博子、武田明子、小林政博、飯田章博、永井美之. Gag 特異的 CTL 誘導ワクチンによる SIV 複製抑制効果. 第51回日本ウイルス学会学術集会、京都、10/29/2003.
- (12) 俣野哲朗. 慢性エイズモデルにおける Gag 特異的 CTL 誘導ワクチンの効果. 第17回日本エイズ学会学術集会、神戸、11/28/2003.
- (13) Matano, T., Kobayashi, M., Igarashi, H., Takeda, A., Sugiura, W., Mori, K., Kano, M., Iida, A., Hasegawa, M., Miyazawa, M., Yasunami, M., Kimura, A., O'Connor, D., Watkins, D., and Nagai, Y. Containment of simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques by vaccine-induced cytotoxic T lymphocytes. The 11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, San Francisco, USA, 2/11/2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願:DNA ワクチン、出願番号2000-291792、
公開番号2001-169784.

表1 本研究に使用した R90-120 子孫アカゲサル

ID	ハプロタイプ ^a	DNA/SeV-Gag ワクチン接種	SIV チャレンジ	Gag207-216 特異的 CTL ^b	チャレンジ後 ウイルス量 ^c
(R90-120 の子)					
R02-007	a	(-)	(+)	ND	高レベル
R02-012	a	(+)	(+)	(+)	低レベル
R00-018	a	(+)	(-)	(+)	ND
R02-005	b	(+)	(+)	(-)	高レベル
R00-024	b	(+)	(-)	(-)	ND
(R94-027 の子 ^d)					
R02-003	a	(+)	(+)	(+)	低レベル
R01-007	a	(+)	(+)	(+)	低レベル
R01-006	a	(+)	(-)	(+)	ND
R01-011	c	(-)	(+)	ND	高レベル
R01-010	c	(+)	(+)	(-)	高レベル
R01-008	c	(+)	(+)	(-)	低レベル

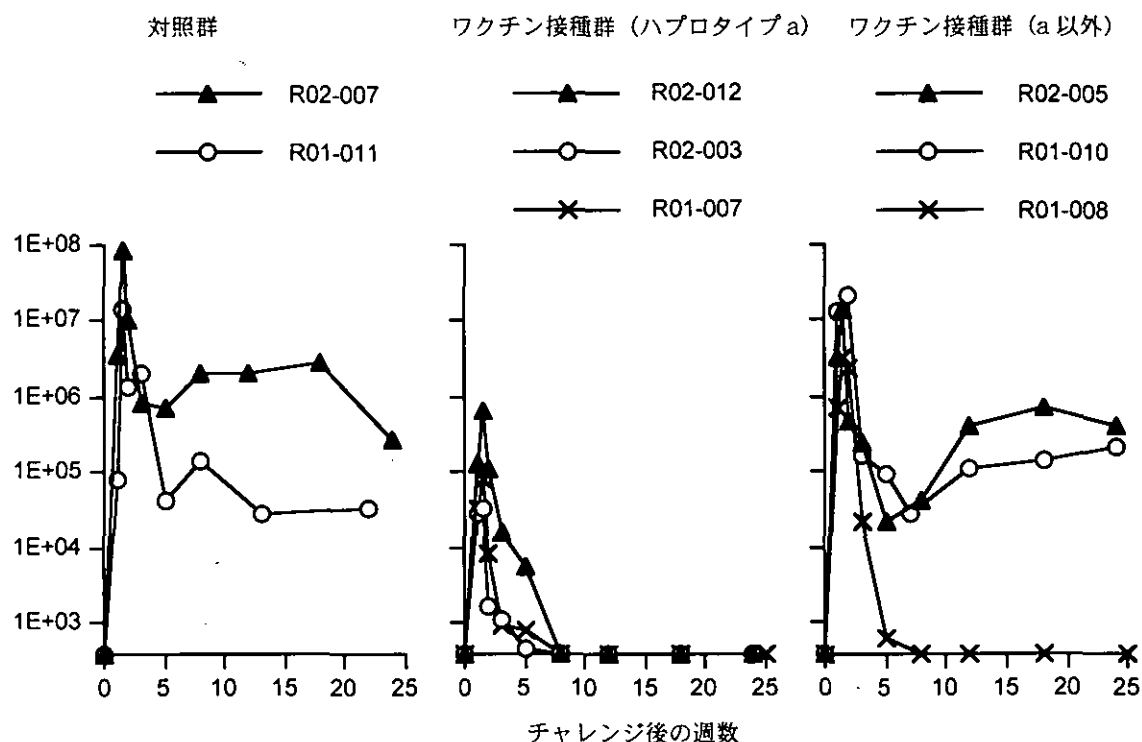
^a MHC ハプロタイプに関する情報は、分担研究者の木村・宮澤によって得られたものである。90-120-Ia ハプロタイプ (MHC-I)・90-120-IIa ハプロタイプ(MHC-II)を有するものをハプロタイプ a、90-120-Ib ハプロタイプ(MHC-I)・90-120-IIb ハプロタイプ(MHC-II)を有するものをハプロタイプ b、R94-027 の R90-120 由来でない方のハプロタイプを有するものをハプロタイプ c とした。各ハプロタイプの構成アレルについての記載は省略する。

^b ワクチン接種後に、Gag207-216 特異的 CTL の誘導が認められたものを(+)とした。ND = not determined.

^c SIV チャレンジ後 setpoint 期の血漿中 SIV 量が検出限界レベル以下となったもの (つまり SIV 複製制御が認められたもの) を、低レベルとした。ND = not determined.

^d R94-027 は、R90-120 の子である。

図1 SIVmac239 チャレンジ後の血漿中 SIV RNA コピー数(/ml)の推移



CD4 陽性 T 細胞ワクチンを用いた SIV 感染予防と治療実験 の ためのサル MHC class II 遺伝子の同定

分担研究者 宮澤 正顯 (近畿大学医学部 教授)
共同研究者 湯浅 貴恵 ((財)ヒューマンサイエンス振興財団 流動研究員)

研究要旨 わが国で交配・維持され、サル免疫不全症候群ウイルス (SIV) の感染実験などに用いられているアカゲザル個体について、その MHC class II 遺伝子型を網羅的に決定し、ハプロタイプ構成を解明した。即ち、交配に用いられた親個体由来の B リンパ芽球株で発現する MHC class II DRB 遺伝子座の対立遺伝子について、その cDNA 全長をクローニングして全塩基配列を決定すると共に、最も多型性に富む exon 2 について、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法により個体毎の遺伝子発現多重性を解析した。この結果を、子孫個体の DGGE 解析結果、および DGGE ゲルより単離した DNA バンドのクローニングによる塩基配列決定結果と比較対照することにより、DRB 遺伝子座のハプロタイプ構成を推測した。これにより、これまでに報告されていない複数の DRB 対立遺伝子および DRB ハプロタイプを見出し、データベースに登録した。更に、DQA および DQB 遺伝子座についても、同様の方法論で解析を行い、class II ハプロタイプの構成について情報を得た。

A. 研究目的

HIV 感染の予防や免疫学的治療のモデルとして、アカゲザルの SIV 感染系は極めて有用である。しかしながら、免疫学的研究対象としてのアカゲザルには、その MHC タイピングが十分になされていないという問題点がある。ウイルス抗原に対する宿主 T リンパ球の応答能は MHC 遺伝子群によって厳密な制御を受けており、細胞傷害性 T リンパ球活性化やウイルス中和抗体産生誘導の鍵を握る CD4 陽性ヘルパー T 細胞による抗原認識は、MHC class II 遺伝子産物の構造に完全に依存している。従って、ワクチンを用いた感染防御実験を行う際、対象個体群の MHC 遺伝子型が決定されていることは、採り上げようとするウイルス抗原に対するリンパ球反応性を保証するという点で最低条件となる。また、HIV 感染ヒト集団の遺伝疫学的解析により、MHC 遺伝子型、特にそのヘテロ接合性とエイズ発症遅延との相関が指摘されている。アカゲザルの MHC class II 遺伝子座が多重性に富み、同一染色体上に発現可能な複数の遺伝子が存在して多様なハプロタイプを構成しているこ

とは周知の事実であり、アカゲザル SIV 感染系でも、MHC class II 発現の多重性と感染抵抗性とが相関する可能性がある。そこで本研究では、我が国で感染実験に用いられているアカゲザル個体群の MHC class II 遺伝子型とそのハプロタイプ構成を、網羅的に解析することを目標とした。

B. 研究方法

国立感染症研究所エイズ研究センター及び筑波医学実験用霊長類センターで SIV 感染実験に用いられ、感染抵抗性の有無や免疫応答能が既にある程度解析されているアカゲザル個体と、それらの親個体、および今後実験に用いられる予定の個体群を解析対象とした。これら複数の個体から樹立された B リンパ芽球株 (BLCL) より総 RNA を抽出後、オリゴ dT プライマーを用いて高忠実度の逆転写反応を行い、cDNA を得た。次いで各細胞株由来 cDNA をテンプレートとし、既知のアカゲザル MHC class II 対立遺伝子の塩基配列情報を参考にして設計した DQA, DQB, および DRB 対立遺伝子群に特異的

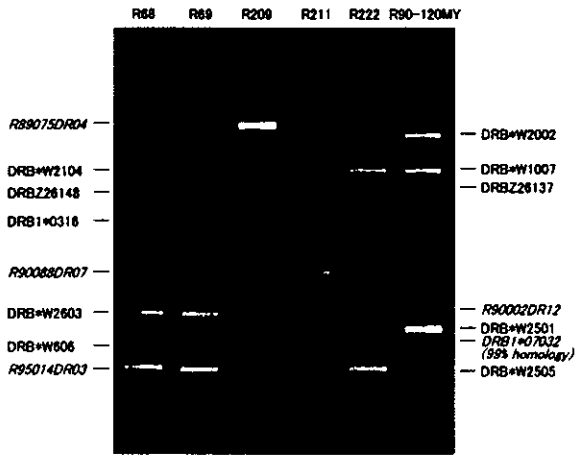


図 1. アカゲザル DRB cDNA 多重性の、DGGE 法による解析。R94-027F₁ を共通の親に持つ個体群を例として示す。ゲルパターンの両側に記したのは、各バンドの切り出しとクローニングにより決定された遺伝子型。斜体は遺伝子型未報告の対立遺伝子で、対応するクローナプライマーペアを用いて、各 class II cDNA 断片の増幅を行った。この際、DRB 遺伝子については、その cDNA 全長を増幅した。得られた

PCR 産物はアガロースゲル電気泳動でそのサイズを確認するとともに、プライマー中に設置した制限酵素部位を用いて pUC19 プラスミドへのクローニングを行い、各クローンの塩基配列を決定した。

DRB については、同一染色体上に複数の遺伝子座が存在し、ハプロタイプを形成していることが知られている。そこで、各個体で発現する DRB 対立遺伝子の数を明らかにし、同時に親子関係の明確な個体間での DRB 対立遺伝子共有の状況を明らかにするため、exon 2 の増幅産物について変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (Denaturing gradient gel electrophoresis: DGGE) による解析を行った。この目的のために 3'側に GC クランプを付加した DRB exon 2 特異的なプライマーペアを設計し、PCR 反応および電気泳動の条件を検討して、多数固体の検体を同時解析できる実験方法を確立した。さらに、DGGE ゲルから各バンドを切り出して TOPO-TA プラスミドベクターにクローニングし、バンド毎の塩基配列の決定を行った。

(倫理面への配慮)

本研究はアカゲザルの遺伝子解析に関するものであり、動物からの採血は、疼痛の防止に配慮し、動物愛護の精神に則り行った。

C. 研究結果

昨年度までに確立した DQA, DQB, DRB cDNA の増幅とクローニング法、および DGGE 法とゲルバンドのクローニング法を駆使し、これまでに別頁表 3 および表 4 の通り、ミャンマー系の親個体 6 頭とその子孫 4 9 頭、および非ミャンマー (ラオス) 系親個体 6 頭とその子孫 1 4 頭で発現する DRB および DQA 対立遺伝子型を、ほぼ網羅的に同定した。親子関係の明確な個体群について、DRB 遺伝子のハプロタイプ構成を解析した DGGE ゲルパターンを例を図 1 に示す。R209 と R222 には共通のバンドが 2 本見えるが、これらは祖父である R90-120 に由来するハプロタイプ DRB1*1007-DRBZ26137 に対応するものである。一方、R211, R68, R69 には別の共通バンドが見られるが、これらは祖父である R90-10 に由来するハプロタイプ DRB1*0316-R95014DR03 に対応する。また、このゲルパターンから明らかな通り、R68 と R69

は MHC class II 遺伝子型がほぼ同一な 2 個体である。

今年度までに行った解析で、表 1 に示すように、従来未報告のアカゲザル MHC class II 対立遺伝子 1 6 アリルを新たに発見し、DDBJ 遺伝子データベースに登録した。これら 1 6 アリルのうち表に示した 4 つのアリル (DRB1*0321, DRB1*0323, DRB*w502, DRB*w2507) については、我々がデータベースに登録した後に、オランダ Biomedical Primate Research Center の R. E. Bontrop らが、既にアリル名登録済みの対立遺伝子塩基配列として論文発表およびデータベース登録を行った。

親子・兄妹関係が明確な個体間で共有されていると考えられる染色体上に、複数のクラス II 対立遺伝子の組がセットとして繰り返し検出され、共有されていない染色体上の対立遺伝子の組と明確に区別できる場合、同一染色体上の複数の対立遺伝子がハプロタイプを構成していると推測出来る。このようにして今年度までの解析データから推測されたクラス II ハプロタイプの一覧を表 2 に示す。

D. 考察

表 1. 新規に見出したアカゲザル MHC class II 対立遺伝子

DDBJ 登録情報		最も近似の allele 情報			新しい allele name	
Access. No.	Clone No.	Allele designation	Access. NO.	Homology	Allele designation	Access. No.
AB112035	R00205DR09	DRB1	Z26148	94%		
AB112036	R90030DR01	DRB1	Z26141	95%	DRB1*0323	AJ534303
AB112037	R00209DR06	DRB1*0313	AF031261	97%	DRB1*0321	AJ534301
AB112038	R89002DR01	DRB	Z26166	97%		
AB112039	R89075DR01	DRB1	Z26152	90%		
AB112040	R89002DR08	DRB3	Z26157	99%		
AB112041	R90088DR07	DRB	Z26175	98%	DRB*w502	AJ534300
AB112043	R91010DR02	DRB1	Z26138	99%		
AB112044	R95014DR03	DRB*w2505	AF163285	97%	DRB*w2507	AJ534298
AB112045	R97002DR06	DRB1*0407	AF163271	94%		
AB112046	R97002DR12	DRB4*0103	AF163276	99%		
AB112047	R89075DR04	DRB1	Z26152	90%		
AB112048	R90030DR18	DRB1*0313	AF031261	97%		
AB112049	R96063DR07	DRB	Z26177	95%		
AB124813	R97002DR13	DRB1*07032	AF213018	99%		
AB124814	R9710QA01	DQA1*11	M76229	98%		

我が国で SIV 感染実験などに用いられているアカゲザル約 75 頭の MHC class II 遺伝子型とその発現多重性を網羅的に解析し、これまで未報告の対立遺伝子多数を記載・登録すると共にハプロタイプ構成を明らかにした。ミャンマー系のアカゲザルでは、一染色体あたり最大 3 つの DRB 対立遺伝子発現が観察された。また、少数のオス親が交配に用いられているため、同一のクラス II ハプロタイプを共有する個体の数も多く、免疫学的解析に適した個体群を比較的容易に選択できると考えられた。これに対して、ラオス系の個体群では、一染色体あたり最大で 6 つの対立遺伝子が発現する複雑なハプロタイプ構成が見られ、未登録の対立遺伝子型も頻繁に見出された。

遺伝的資源という観点からは、これまで欧米の研究グループにより報告されてきたものとは全く異なるクラス II ハプロタイプや対立遺伝子の集積が見られるラオス系のサル家系は貴重であり、この遺伝子資源の積極的な保護と免疫学的特徴の解析が望まれる。この観点からは、特に R89-002 個体や R89-075 個体の子孫を、出来るだけミャンマー系個体との交雑を避けて維持

することが重要と考えられ、既にミャンマー系個体に特徴的なクラス II ハプロタイプが混入してしまった 9926, 265 個体などの存在は、遺伝的多様性保護の観点から危惧を抱かせる。

なお、今回遺伝子型を解析した個体群のうち、R94-027F1 の子孫については、この親に由来すると推定可能なクラス II ハプロタイプが 4 種類存在した。これは説明困難な事実であり、親子関係の確認と R94-027F1 個体自体の遺伝子型確認が望まれる。

E. 結論

我が国で SIV 感染実験に用いられているアカゲザル個体、およびそれらの親個体と今後実験に利用予定の個体群が発現する MHC class II 対立遺伝子を網羅的に同定し、親子関係から予想されるハプロタイプ構成を明らかにした。これにより、今後特定のクラス II ハプロタイプと SIV 感染抵抗性、或いは感染防御ワクチンの有効性の関係が、より容易に解析可能になると期待される。遺伝的資源保護の観点から、ラオス系アカゲザルの MHC class II 遺伝子は貴重な存在であり、今後ミャンマー系との交雑を避けつつ、

表 2. 親子関係から予想される同一染色体上のクラス II 遺伝子ハプロタイプ

由来	予想されるクラス II ハプロタイプ構成						
MY	DRB*w2002	DRB*w2501				DQA1*0502	
	DRB1*1007	DRB1Z26137				DQA1*03	
	DRB*w2104	DRB*w2603				DQA1*0502	
	DRB1*0316	DRB*w2507				DQA1*01	
	DRB1Z26148	DRB*w502				DQA1*03	
	DRB1*0306	R96063DR07 (AB112049)				DQA1*03	
	DRB*w606	DRB110323	DRB1*0321				DQA1*05
	DRB*w2505	R97002DR12 (AB112046)	R97002DR13 (AB124813)				R9710QA01 (AB124814)
	DRBZ26165	R89075DR01 (AB112039)	R91010DR02 (AB112043)				DQA1*0108
	DRB1*0306	DRB*w2603	R97002DR13 (AB124813)				DQA1*0105
LA	DRB1*07032	R89002DR01 (AB112038)	R97002DR13 (AB124813)	R97002DR12 (AB112046)	R97002DR06 (AB112045)	DRB*w307 (99%)	DQA1*02
	DRB5Z26163 (99%)	DRB3Z26157 (97%)					
	DRBZ26165	R89075DR01 (AB112039)	R89075DR08 (AB112040)				DQA1*0108
	R91010DR02 (AB112043)	R89075DR04 (AB112047)					
	DRB*w2603	R00205DR09 (AB112035)					DQA1*02
DRB*w2505 (99%)	DRB3Z26159 (99%)						

慎重に維持して行くことが求められる。

F. 健康危険情報

該当するもの無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sugahara, D., S. Tsuji-Kawahara, and M. Miyazawa. Identification of a protective CD4⁺ T-cell epitope in the p15^{gag} of Friend murine leukemia virus and the role of the MA protein targeting to the plasma membrane for its immunogenicity. *J. Virol. in revision*, 2004.
- 2) Matano, T., M. Kobayashi, H. Igarashi, A. Takeda, H. Nakamura, M. Kano, C. Sugimoto, K. Mori, A. Iida, T. Hirata, M. Hasegawa, T. Yuasa, M. Miyazawa, Y. Takahashi, M. Yasunami, A. Kimura, D. H. O'Connor, D. I. Watkins, and Y. Nagai. Cytotoxic T lymphocyte-based containment of simian immunodeficiency virus replication in a preclinical AIDS vaccine trial. *submitted for publication*, 2003.
- 3) Kanari, Y., M. Clerici, H. Abe, H. Kawabata, D. Trabottoni, S. Locaputo, F. Mazzotta, H. Fijisawa, A. Niwa, C. Ishihara, Y. A. Takei, and M. Miyazawa. Genotypes at chromosome 22q are associated with HIV-exposed but uninfected status in Italians. *submitted for publication*, 2003.
- 4) Taharaa, H., N. Iwanami, N. Tabatab, H. Matsumura, T. Matsuura, T. Kurita, and M. Miyazawa. Both T and non-T cells with proliferating potentials are effective in inducing suppression of allograft responses by alloantigen-specific intravenous presensitization combined with suboptimal doses of 15-deoxyspergualin. *submitted for publication*, 2003.

2. 学会発表

- 1) Miyazawa, M. Genetic basis for resistance against retroviral infections: mouse models to gene chips. Thai NIH, Lampang Hospital, Milano University, Kinki University Joint Meeting on Resistance to HIV Infection and Disease Progression. Nonthaburi, Thailand. October 13-14, 2003.
- 2) 小川達也、湯浅貴恵、松村治雄、宮澤正顯. マウスレトロウイルス感染初期における NK 細胞の活性化機構. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会 (福岡). 2003 年 12 月 8-10 日. 日本免疫学会総会・学術集会記録 33:145, 2003.
- 3) 河俣浩之、河原 (辻) 佐智代、宮澤正顯. マウスレトロウイルスの持続感染を制御する宿主因子. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会 (福岡). 2003 年 12 月 8-10 日. 日本免疫学会総会・学術集会記録 33:298, 2003.
- 4) 菅原大輔、河原 (辻) 佐智代、宮澤正顯. マウスレトロウイルス Gag 蛋白上の感染防御エピトープの同定. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会 (福岡). 2003 年 12 月 8-10 日. 日本免疫学会総会・学術集会記録 33:298, 2003.

H. 知的所有権の出願・登録状況

Miyazawa, M. and M. Clerici, inventors. Marker Genes (HIV 曝露非感染状態と相関する遺伝的マーカーとその応用). 国際特許出願 PCT/GB2003/004493.

表3 ミャンマー系個体の MHC class II 遺伝子型

ID	father ID	mother ID	DRB alleles			DQA alleles
R90-120-MY			DRB1*1007 DRB*w2002	DRB1Z26137 DRB*w2501	DQA1*03 DQA1*0502	
R95-014-F1	R90-120	R90-158-MY	DRB1*1007 DRB1*0316	DRB1Z26137 DRB*w2507	DQA1*03 DQA1*01	
R90-088-MY			DRB1Z26148	DRB*w502	DQA1*03	
R90-010-MY			DRB*w2104 DRB1*0316	DRB*w2603 DRB*w2507	DQA1*0502 DQA1*01	
R90-030-MY			DRB*w2104 DRB*w606	DRB*w2603 DRB*0321	DQA1*0502 DQA1*05	
R96-063-F2	R90-010	R91-015F1	DRB*w2104 DRB1*0306	DRB*w2603 R96063DR07 (AB112049)	DQA1*0502 DQA1*03	
9426	R90-120	R90-122	DRB1*1007 DRB*w2104	DRB1Z26137 DRB*w2603	DQA1*03 DQA1*0502	
9427	R90-120	R90-155	DRB*w2002 DRB*w2702	DRB*w2501 DRB*w402	R89075DR08 (AB112040) DQA1*03	
9429	R90-120	R90-175	DRB*w2002 DRB*w402	DRB*w2501 R89075DR08 (AB112040)	DQA1*0502	
9701	R90-120	R90-148			DQA1*03	
9703	R90-120	R90-148	DRB*w2002 DRB*w2505 (99%)	DRB*w2501 DRB3Z26159 (99%)		
9705	R90-120	R90-155	DRB1*1007 DRB*w2603	DRB1Z26137 DRB*w606	DQA1*03 DQA1*0105	
9711	R90-120	R90-168	DRB*w2002 DRB1Z26144 (97%)	DRB*w2501 DRB*w102 (99%)	DRB*w2504 (96%) DQA1*03 DQA1*0105	
0009	R90-120	R91-027F1	DRB*w2002 DRB1Z26148	DRB*w2501 DRB*w502	DQA1*0502 DQA1*03	
0010	R90-120	R93-006F1	DRB1Z26137 DRB1*0306	DRB*w2603	R97002DR13 (AB124813) DQA1*03 DQA1*0105	
0202	R90-120	R93-006F1	DRB1Z26137 DRB1*0306	DRB*w2603	R97002DR13 (AB124813) DQA1*03 DQA1*0105	
209	R90-120	R93-049F1	DRB1*1007 R91010DR02 (AB112043)	DRB1Z26137 R89075DR04 (AB112047)	DQA1*03	
178	R90-120	R91-032F1	DRB*w2002 DRB1Z26148	DRB*w2501 DRB*w502	DQA1*0502 DQA1*03	
225	R90-120	R95-021F2	DRB*w2002 DRB1Z26148	DRB*w2501 DRB*w502	DQA1*0502 DQA1*03	
227	R90-120	R90-069	DRB1*1007 DRB1*0306	DRB1Z26137 DRB1Z26153	DQA1*03 DQA1*06	
232	R90-120	R91-032F1	DRB1*1007 DRB1Z26148	DRB1Z26137 DRB*w502	DQA1*03 DQA1*03	
165	R94-027F1	R91-038F1	DRB*w2505 DRB3Z26159 (99%)	R97002DR12 (AB112046) DRB*w2505 (99%)	R97002DR13 (AB124813) DQA1*03	
209	R94-027F1	R93-021F1	DRB1*1007 R89075DR04 (AB112047)	DRB1Z26137	DQA1*03	
211	R94-027F1	R90-148	DRB1*0316 DRB1Z26148	DRB*w2507 DRB*w502	DQA1*01 DQA1*03	
222	R94-027F1	R91-023F1	DRB1*1007 DRB*w2505	DRB1Z26137 R97002DR12 (AB112046)	R97002DR13 (AB124813) DQA1*03 R9710QA01 (AB124814)	
68	R94-027F1	R95-034F1	DRB1*0316 DRB*w2104	DRB*w2507 DRB*w2603	DRB*w606 DQA1*01 DQA1*0502	
69	R94-027F1	R90-122	DRB*w2104 DRB*w2507	DRB*w2603	DQA1*0502 DQA1*01	

9710	R90-010		DRB*W2104	DRB*W2603		DQA1*0502
		R90-014	DRB*W2505	R97002DR12 (AB112046)	R97002DR13 (AB124813)	R9710QA01 (AB124814)
9715	R90-010		DRB1*0316	DRB*w2507		
		R90-050				
0001	R90-010		DRB*W2104	DRB*W2603		DQA1*06
		R90-29	R95014DR03 (AB112044)			DQA1*01
0002	R90-010		DRB1*0316	DRB*w2507		DQA1*01
		R90-045	DRB1*0306	R96063DR07 (AB112049)		DQA1*03
0011	R90-010		DRB1*0316	DRB*w2507		
		R90-048	DRB1Z26148	DRBZ26181		
0012	R90-010		DRB1*0316	DRB*w2507		DQA1*01
		R90-170	DRB*w2002	DRB*w2501		DQA1*0502
181	R90-010					
		R90-036				DQA1*02
186	R90-010	R91-019F1	DRB*W2104	DRB*W2603		DQA1*06
			DRB1*0316	DRB*w2507		DQA1*01
192	R90-010		DRB*W2104	DRB*W2603		DQA1*0502
		R94-046F1				
67	R90-010		DRB*W2104	DRB*W2603		DQA1*0502
		R90-050	DRB1*0316	DRB*w2507		DQA1*09
70	R90-010		DRB*w2104	DRB*w2603?		DQA1*0502
		R93-047F1	DRB*W606	DRB*0321	DRB*0323	DQA1*05
9921	R90-010		DRB*W2104	DRB*W2603		
		R93-047F1	DRB*W606	DRB*0321	DRB*0323	
9931	R90-010		DRB1*0316	DRB*w2507		
		R90-048	DRBZ26178	DRBZ26179	DRB1*0318	
9708	R90-030	R90-29	DRB*W2104	DRB*w2603		
0007	R90-030		DRB*W2104	DRB*w2603		DQA1*0502
		R94-009F1	DRBZ26165	R89075DR01 (AB112039)	R91010DR02 (AB112043)	DQA1*0108
9712N	R90-030		DRB*0321	DRB*0323		DQA1*05
		R90-049	DRB1*1007 (93%)	DRB1*0313 (94%)		DQA1*0504 (96%)
0210	R90-030		DRB*0323			DQA1*05
		R94-009F1	DRBZ26165	R89075DR01 (AB112039)	R91010DR02 (AB112043)	
175	R90-030		DRB*W2104	DRB*W2603		DQA1*0502
		R90-131	DRB1Z26146 (98%)	DRB1*1007 (95%)	DRB3Z26155 (94%)	DQA1*03
177	R90-030					DQA1*05
		R90-134				R9710QA01 (AB124814)
9932	R90-030		DRB*0321	DRB*0323		DQA1*05
		R92-045F1	DRB1*0306	DRB*W2603	DRB1*07032 (99%)	DQA1*0105
220	R90-088		DRB1Z26148	DRB*w502		DQA1*03
		R90-014	DRB*W2505	R97002DR12 (AB112046)	R97002DR13 (AB124813)	R9710QA01 (AB124814)
74	R90-088		DRB1Z26148	DRB*w502		DQA1*03
		R90-014	DRB*W2505	R97002DR12 (AB112046)	R97002DR13 (AB124813)	R9710QA01 (AB124814)
9704	R90-088		DRB1Z26148	DRB*w502		
		R90-068	DRB1*0306	DRB1Z26153		
9702	R90-088		DRB1Z26148	R90088DR07 (AB112041)		DQA1*03
		R90-082	R97002DR06 (AB112045)	DRB*w403 (98%)		DQA1*0105 (99%)
226	R90-088		DRB1Z26148	DRB*w502		
		R91-011F1	DRB*W2104	DRB*W2603		
223	R90-088					DQA1*03
		R91-046F1				DQA1*0502
R100			DRB1Z26148	DRB*w502		DQA1*03
			DRB*w2603	DRB*w402		DQA1*0502
R154	R90-088		DRB1Z26148	DRB*w502		DQA1*03
		R90-022	DRB*w2002	DRB*w2501		DQA1*0502

表 4. ラオス系個体の MHC class II 遺伝子型

ID	father ID	mother ID	DRB alleles						DQA alleles
R89-002-LA			DRB1*07032	R89002DR01 (AB112038)	R97002DR13 (AB124813)	R97002DR12 (AB112046)	R97002DR06 (AB112045)	DRB*W307 (99%)	DQA1*02 DQA1*2404
R97-002-F1	R89-002		DRB1*07032	R89002DR01 (AB112038)	R97002DR13 (AB124813)	R97002DR12 (AB112046)	R97002DR06 (AB112045)	DRB*W307 (99%)	DQA1*02
			DRB5Z26163 (99%)	DRB3Z26157 (97%)					
R89-075-LA			DRBZ26165	R89075DR01 (AB112039)	R89075DR08 (AB112040)			DQA1*0108	
			R91010DR02 (AB112043)	R89075DR04 (AB112047)					
R91-010-F1	R89-075		DRBZ26165	R89075DR01 (AB112039)	R89075DR08 (AB112040)			DQA1*0108	
			R91010DR02 (AB112043)	R89075DR04 (AB112047)					
R00-205-SU			DRB*w2603	R00205DR09 (AB112035)				DQA1*02	
			DRBZ26171	R89075DR08 (AB112040)				DQA1*07	
R00-209-SU			DRB*w2603	R00205DR09 (AB112035)				DQA1*02	
			R00209DR06 (AB112037)	R90030DR01 (AB112036)				DQA1*05	
9926	R90-099	R90-014	DRB*W2104	DRB*W2603					
			DRB*W2505 (99%)	DRB3Z26159 (99%)					
9920	R90-099	R91-025	DRB*W2505	R97002DR13 (AB124813)				DQA1*2404	
			DRB*W2505 (99%)	DRB3Z26159 (99%)				R97010QA01 (AB124814)	
9928	R90-099	R90-158						DQA1*0105 DQA1*03	
170	R89-002	R90-001-F1	DRB5Z26163 (99%)	DRB3Z26157 (97%)				DQA1*2404	
0004	R89-002	R90-005-F1	DRB1*0306	DRB1Z26153					
			DRB1*1007	DRB1Z26137					
9707	R89-003		DRB1*07032	R89002DR01 (AB112038)					
		R88-009	DRB5Z26163 (99%)					DQA1*0108	
9714	R89-003	R89-001	DRB1*0306	DRB*W2603				DQA1*0105	
			DRB1*07032	R89002DR01 (AB112038)				DQA1*02 (98%)	
9725	R89-003		DRB1*0306	DRB*W2603				DQA1*0105	
		R89-007	DRB1*0323 (96%)	DRB1*07032 (99%)	DRB3*0409 (99%)				
0003N	R89-075	R92-004-F1	DRB*W2702	DRB*W403	DRBZ26165			DQA1*01 (99%)	
			R89075DR01 (AB112039)	R89075DR08 (AB112040)				DQA1*0108	
9709	R90-063	R90-070	DRB1*0306	DRB1Z26153				DQA1*03	
			DRB*W502	DRB1Z26148				DQA1*06	
256	R91-010-F1	R89-071-LA	DRBZ26165	R89075DR01 (AB112039)	R89075DR08 (AB112040)				
			DRBZ26175 (97%)	DRB*W2104 (95%)					
258	R91-010-F1	R94-030-F1	DRBZ26165	R89075DR01 (AB112039)	R89075DR08 (AB112040)				
			R97002DR06 (AB112045)	DRB*W307 (97%)	DRB*W307 (98%)				
265	R91-010-F1	R95-041-F1	DRB*W2104	DRB*W2603					
			R90030DR01 (AB112036)	R00209DR06 (AB112037)					
275	R91-010-F1	R89-018-LA	DRB*w609	DRBZ26177	DRBZ26165	DRB1Z26144			
			R91010DR02 (AB112043)	R89075DR04 (AB112047)					

厚生労働省科学研究費補助金(創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書

サル MHC クラス I 抗原の解析と応用

分担研究者 木村 彰方 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 教授

研究要旨

RSCA 法を用いて、アカゲザル MHC クラス I 遺伝子(Mamu-A 及び Mamu-B)群の多型解析及びハプロタイプ構造解析を行うとともに、高精度タイピング法を開発した。これを用いて約 100 個体のアカゲザルについて、B リンパ芽球様細胞株より抽出した mRNA に由来する cDNA を用いて Mamu-A 及び Mamu-B 遺伝子群を解析したところ、ヒトとは異なり、ハプロタイプあたり HLA-A 遺伝子は 1-3 個、HLA-B 遺伝子は 1-5 個程度存在することが判明した。また、SIV ワクチン実験動物の解析から、SIV 感染防御の成立、変異 SIV ウイルスの出現、特定の SIV 抗原への免疫応答性が、特定の MHC ハプロタイプと蜜に関連すること、さらには特定の SIV 抗原エピトープ (SIVgag207-216)に対する CTL 免疫高応答と Mamu-A アリルとの対応が明らかとなった。一方、RSCA 法を用いた MIC 遺伝子群の解析で、アカゲザルには 3 種の MIC 遺伝子が存在すること、それぞれが多型を示すことが判明した。また、ヒト HLA 領域内にマップされたマイクロサテライトマーカーを組み合わせて用いることで、サル MHC ハプロタイプ識別が可能となった。さらに、RSCA 法により NK 細胞レセプター (KIR) ファミリーを解析し、アカゲザル KIR がヒトと同様に多重遺伝子族を構成し、著明な多型を示すことが判明した。

A. 研究目的

微生物などの外来抗原への免疫応答の大小には宿主の個体差が存在するが、このことはまた感染症の重症化や合併症の多寡などの疾患感受性の個体差とも関連する。このような免疫応答性における個体差は、MHC を含む免疫関連遺伝子群における個体差 (ゲノム多様性、遺伝子多型) によって規定されると考えられる。さらに、このような免疫関連遺伝子群のゲノム多様性は、ワクチン接種等による有効な感染防御成立上の個体差にも深く関わる。したがって、AIDS 発症機構を含む HIV ウイルスに対する感染防御機構の研究やワクチン開発においては、免疫関連遺伝子群、特に MHC 領域の遺伝子群のゲノム多様性のあり方を理解し、その知見に基づいて、より有効な感染制御系を開発することが必要であ

る。しかしながら、HIV ワクチン開発の目的で用いられているアカゲザル等の実験動物については、このような免疫関連遺伝子群の多様性に不明な点が多い。そこで本研究では、特に MHC クラス I 領域の遺伝子群を中心とする種々の免疫関連遺伝子群について、実験動物として用いているアカゲザル集団における多様性を、ヒト集団における多様性と比較検討しつつ、免疫応答性の個体差との関連を解明することを目的とする。また、HIV 感染制御とヒト免疫関連遺伝子群の多様性との対応について、特に MHC (HLA) 領域遺伝子群との関連を解析する。

B. 研究方法

1) アカゲザル MHC クラス I 抗原遺伝子群の解析: これまでにワクチン接種実験に用いられた

アカゲザル及びその血縁アカゲザル由来の B リンパ芽球様細胞あるいは末梢血顆粒球より、total RNA 及びゲノム DNA を抽出した。抽出した total RNA からランダムプライマー(6 mer)を用いて cDNA を作製し、これをテンプレートとして、アカゲザル MHC クラス I 遺伝子である Mamu-A 及び Mamu-B を、それぞれに特異的なプライマーを用いて RT-PCR 法によって増幅した。ついで、クローン化した Mamu 遺伝子をレファレンスとした RSCA 法を用いて、アカゲザル個体の MHC クラス I 遺伝子ハプロタイプを解析した。さらに、特定の雄ザル (R90-120) の子孫ザルで SIVgag で免疫された個体について、MHC ハプロタイプと SIVgag207-216 抗原ペプチドに対する免疫応答性の関連を検討した。一方、ゲノム DNA を用いて、アカゲザル MIC 遺伝子を増幅し、ヒト MICA 遺伝子をリファレンスとした RSCA 解析を行うことで、アカゲザル MIC 遺伝子群の多型を検討した。さらに、ヒト HLA 領域にマップされているマイクロサテライトマーカーを用いて、アカゲザルの個体識別及び MHC ハプロタイプ構造解析が可能か否かを検討した。

2) ヒト KIR 領域ゲノム多様性の検討: MHC クラス I 遺伝子は T 細胞への抗原提示分子であると同時に、NK 細胞レセプターの一環である抑制性あるいは活性化 KIR ファミリーのリガンドともなる。例えば、HLA-C は抑制性 KIR のリガンドとなり、HLA-Bw 4 は活性化 KIR のリガンドとなる。また、上記の MIC 遺伝子群は NK 細胞活性化レセプターである NKG2D のリガンドとなることが知られている。このことは MHC 領域遺伝子群が NK 細胞レセプター遺伝子群と機能的に密接な関連を有することを示し、さらには MHC による免疫制御機構においても NK 細胞が関与することを強く示唆する。そこで、ヒト KIR ファミリーのハプロタイプ構成を RSCA 法によって解析する手法の開発を試みた。具体的には、KIR ファミリー間で相関性の高い D2 ドメインを

特異的に増幅するプライマーをデザインした。ついで、ランダムに選択した日本人集団及び CEPH ファミリーより得られたゲノム DNA から増幅した D2 ドメインファミリーとリファレンスとの RSCA パターンを検討した。

(倫理面への配慮)

本研究に関連したヒト遺伝子解析研究は、ヒトゲノム遺伝子解析に関する倫理指針を遵守することとし、東京医科歯科大学難治疾患研究所倫理審査委員会の承認を受けている。[研究課題「HIV ウイルス感染防御機構の究明に関わる研究」(平成 13 年 8 月 28 日付)]

C. 研究結果

- 1) Mamu-A 及び Mamu-B 遺伝子 cDNA をアカゲザル個体より増幅し、第 2 及び第 3 エクソン多型の RSCA パターンを解析し、個体毎に異なる遺伝子数を有することが判明した。1 ハプロタイプあたり、Mamu-A 遺伝子は 1~3 個、Mamu-B 遺伝子は 1~5 個発現すると推定される。また、ある個体(R90-120)に着目した RSCA パターン解析を行った。R90-120 は、その子孫の RSCA パターンを比較することで、a ハプロタイプ(Mamu-A 遺伝子が 3 個、Mamu-B 遺伝子が 4 個)と b ハプロタイプ(Mamu-A 遺伝子が 2 個、Mamu-B 遺伝子が 5 個)を有していると推定された(図 1)。
- 2) R90-120 の子孫で SIVgag207-216 ペプチドへの免疫応答が既知の個体の RSCA パターンを解析すると、免疫応答を示した個体はいずれも a ハプロタイプを有するのに対し、免疫応答を示さなかった個体は b ハプロタイプを有していた(図 2)。そこで、R90-120 およびその子孫個体の Mamu-A および Mamu-B 遺伝子の full-length cDNA をクローニングし、得られたクローンについて RSCA

パターンを検討した。

ついで、R90-120 が本来有している Mamu-A あるいは Mamu-B の RSCA パターンと一致したクローンの配列を決定した。その結果、a ハプロタイプでは3種の Mamu-A と3種の Mamu-B、b ハプロタイプでは2種の Mamu-A と4種の Mamu-B の配列が判明した。a、b ハプロタイプとも各1種の Mamu-B アリルの配列が決定できなかったが、それらは RSCA パターンから発現量が低いと予想されるものであった。配列が決定できた Mamu アリルについて、抗原ペプチド結合に関わる B ポケット、F ポケット構造をヒト HLA 分子の構造を参考に推定した (図3)。R90-120 の子孫で SIVgag ワクチン接種後に SIVmac239 の感染実験で感染防御が成立した個体では、(1) 残存する SIV ウイルスには SIVgag の 216 番目に Leu→Ser 変異が生じていること、(2) SIVgag207-216 (INEEAADWD^L) 抗原ペプチドに対する CTL 反応を示すこと、(3) 1 アミノ酸変異 SIVgag207-216 (INEEAADWD^S) に対する CTL 反応が生じないとされた。これらのことから、SIVgag207-216 の 216 位が抗原ペプチドの 9 番位 (P9) に対応すると考えられる。一般に MHC 分子への結合では 2 番位 (P2) のアミノ酸残基が重要であるが、SIVgag207-216 について言えば、P2 は酸性アミノ酸残基である Glu (INEEAADWDL) となっている。一方、P2 に対応する MHC 側は B ポケットであるが、配列が決定された Mamu アリルで a ハプロタイプに属し、かつ B ポケットの 45 位に塩基性アミノ酸 Lys(K) が存在するのは Mamu-A (120-a-1) のみであるため、このアリルが SIVgag207-216 への免疫応答性を規定するものと推定された (図3)。

さらに、感染防御が成立した別の 1 頭では、前記とは異なる SIVmac 変異体 (377 位

の Ile→Thr) が出現し、SIVgag367-381 抗原ペプチドにへの CTL 反応を認めたが、この個体では R90-120 に由来しない f ハプロタイプを有していた (図2)。このことは、感染防御の成立、出現する SIV ウイルス変異体、ペプチドエピトープへの CTL 反応の三者がいずれも MHC ハプロタイプと直接的に関連することを示す。

- 3) アカゲザル MIC 遺伝子の第 2 及び第 3 エクソンを含む領域を PCR し、ヒト MICA 遺伝子をリファレンスとして RSCA パターンを解析した。その結果、個体間で多型パターンの違いを認めた。さらにいくつかの個体から MIC 遺伝子をクローニングして塩基配列を決定したところ、アカゲザルには 3 群 (MIC1、MIC2、MIC3) の MIC 遺伝子が存在することが判明した。また、RSCA パターンより、MIC1~MIC3 のいずれもが多型を有すると考えられた。調べた限りいずれのサル個体とも MIC-2 を有していたが、MIC-1 あるいは MIC-3 については、これを有さない個体が一部に存在することが示唆された (図4)。
- 4) ヒト HLA 領域内にマップされる 21 種のマイクロサテライトマーカーを用いて、アカゲザル個体における PCR 増幅性と多型パターンを解析した。その結果、14 種のマーカーでヒトプライマーを用いての PCR 増幅が可能であることが判明し、さらに MHC クラス I 領域内あるいは近傍の 3 種 (C2_4_4、C1_2_A、TNF-a) とクラス II 領域内の 3 種 (D6S1701、D6S1560、D6S291) は MHC ハプロタイプ構成の推定とともに個体識別に使用可能と考えられる特徴的な多型パターンを示した。一方、一部のマイクロサテライトマーカーはクラス I 領域内の重複を反映したものと考えられる複雑な多数のバンドパターンを示した (図5)

5) ヒト KIR レセプターファミリーは HLA クラス I 分子をリガンドとする抑制性ファミリーと、それと細胞外ドメインの構造が酷似した活性化ファミリーとで構成される。これらの全ファミリーの遺伝子は、遺伝子重複で生じたものであるため、互いに構造が類似している。そこでファミリー内で最も良く保存される D2 ドメインに対応するエクソンを特異的に増幅し、RSCA パターンを比較した結果、個体ごとにバンドの数ならびに泳動位置が異なるパターンが観察された。さらに CEPH 家系を用いた解析の結果、これらの多型パターンは家系内での遺伝性が確認され、ハプロタイプごとに 3-4 個の多型性を示すバンドと 2 種の固定バンドとで構成されていることが判明した (図 6)。

また同様の解析をアカゲザル個体についても行ったが、ヒト同様に多重遺伝子族を構成し、かつ多型性を示すものであった (図 7)。

6) ヒト HIV 感染における MHC および KIR の多様性を検討した。タイコホートにおける長期未発症者(n=16)では HLA-Bw4-Ile80 アリル群 (B*5701, B*5801, B*5101, B*5102, B*5201 など) を有する者が 43.8%であり、調査数が小さいため有意差には至らなかったが、未感染者(n=14)の 14.3%あるいは HIV 感染者(n=13)の 23.1%と比較して多かった。なお、HLA-Bw4-Thr80 アリル群を加えた Bw4 群全体の頻度は、長期未発症者 50.0%,未感染者 42.9%,感染者 64.7%であり、集団間の差はなかった。一方、KIR-3DS1 陽性頻度はこれらの集団間に差はなかった。

D. 考察

1) アカゲザル MHC クラス I 領域の構造解析: Mamu-A、Mamu-B、MIC のそれぞれが多重遺伝子族を構成しており、特に Mamu-A、

Mamu-B では遺伝子数に個体差があること、MIC は 3 個の遺伝子が存在することが判明した。ヒトでは HLA-A、B、C はそれぞれ 1 個、MIC は 2 個の遺伝子が存在するため、アカゲサルとヒトとは異なる進化過程による遺伝子重複を重ねたことが示された。MHC クラス I 領域遺伝子の座位で個体毎に遺伝子数が違うことは、カニクイザルにも共通して観察されるため、旧世界猿に特徴的な進化過程であると考えられる。

アカゲザルでは個体ごとに遺伝子数が異なるため、免疫応答性の解析が複雑化することが推定されたが、俣野らによる SIVgag 免疫実験と SIVmac 感染実験の結果と我々の MHC ハプロタイプ解析結果を総合すると、SIV のエスケープ変異体の出現ならびに特定の SIVgag エピトープへの免疫応答性は特定の MHC ハプロタイプと共分離することが示された (図 2)。また、少なくとも SIVgag207-216 に対する R90-120 由来の高応答性ハプロタイプ (Mamu-A が 3 種、Mamu-B が 4 種) と低応答性ハプロタイプ (Mamu-A が 2 種、Mamu-B が 5 種) には遺伝子数の大きな違いはないことから、このエピトープへの反応は遺伝子数ではなく、特定のハプロタイプ上の特定の MHC クラス I 分子によって担われることが強く示唆される。RSCA パターンによる個体識別は、このエピトープに対する反応性を示すハプロタイプを有する個体を簡便に選択可能とする方法であると考えられる。

今回のクローニング実験と MHC ポケット構造の推定から、SIVgag207-216 への免疫応答性は特定の Mamu-A アリルによって担われると推定される。今後、トランスフェクタントの作製を行い、このアリルが MHC 拘束性を決定することを直接検証することが可能である。一方、マイクロサテライトマ

ーカーを併用することで、MHC 内での組み換え体の検出など、MHC ハプロタイプ構成をより詳細に検討することが可能となった。

- 2) アカゲザル KIR ファミリーの構造解析：ヒト、アカゲザルとも KIR ファミリーが多重遺伝子族で構成されること、RSCA 法を用いることで構造多型が解析可能であった。MHC の場合と同様に KIR も多重遺伝子族で構成され、RSCA 多型パターンはかなり複雑であったが、今後 RSCA 解析に用いるリファレンスを複数とすることで、高精度タイピングが可能となると考えられた。
- 3) HIV 感染と HLA-B および KIR-3DS1 多様性の関連解析：ヒト HIV 感染後の長期未発症者には HLA-Bw4 に属する HLA-B アリルの頻度が高いとする報告があるが、タイコホートでは Bw4 群全体の頻度はコントロール群とほぼ同程度であった。しかしながら、Bw4 のうち Ile80 を有するアリル群に限ると長期未発症者に多い傾向にあった。一方、KIR-3DS1 の頻度は集団間に差がなく、また、HLA-Bw4-Ile80 アリルと KIR-3DS1 の両者を有する頻度も集団間で差がなかった。今後より多数の集団を対象とした解析を行うことが必要であるが、これらのデータは HLA-Bw4-Ile80 アリルによる HIV ウイルス感染抵抗性において、KIR-3DS1 との相互作用以外のメカニズムが存在することを示唆する。

E. 結論

アカゲザルの MHC クラス I 領域遺伝子群のハプロタイプ構成を簡便に検出する個体識別法として、RSCA 解析に基づくクラス I 高精度タイピング、MIC タイピング及びマイクロサテライトタイピングシステムを開発した。また、このシステムを用いることで、SIV ワクチンが成立した個体に出現する SIVmac のエスケープ変異体や特定の SIVgag エピトープへの免疫応答性が、MHC

ハプロタイプによって規定されることが証明された。また、RSCA 法によって KIR ファミリーの多型性が解析可能であることを示した。さらに、ヒト HIV 感染後長期未発症者には HLA-Bw4-Ile80 アリル群を有する者が多かったが、HLA-Bw4 の頻度、KIR-3DS1 の頻度はコントロールとほぼ同様であった。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamashita T, Hamaguchi K, Kusuda Y, Kimura A, Sakata T, Yoshimatsu H: IKBL promoter polymorphism is strongly associated with resistance to type 1 diabetes in Japanese. *Tissue Antigens*, in press.
- 2) Kimura A, Takahashi M, Shibata H, Kobayashi Y, Obuchi N, Ota M, Inoko H, Numano F, Yasunami M: Identification of HLA-linked susceptibility genes for Takayasu arteritis. *HLA2002 Immunobiology of the Human MHC vol. 1* (Hansen HA, Dupont B, eds.), IHWG Press, Seattle, in press
- 3) Yasunami M, Shibata H, Shao WS, Takahashi M, Hamaguchi K, Sakata T, Ota M, Inoko H, Kimura A: Mapping of three different IDDM-susceptibility loci within the HLA region. *HLA2002 Immunobiology of the Human MHC vol. 1* (Hansen HA, Dupont B, eds.), IHWG Press, Seattle, in press
- 4) Takahashi M, Yasunami M, Tamai H, Kimura A: HLA-A and DPB1 control the susceptibility and production of thyroid stimulatory antibodies, respectively, in Graves' disease. *HLA2002 Immunobiology of the Human MHC vol. 1* (Hansen HA, Dupont B, eds.), IHWG Press,

Seattle, in press

- 5) Sakaguchi M, Nakayama T, Kaku H, Taniguchi K, Saito S, Kimura A, Inoue S: Analysis of HLA in children with gelatin allergy. *Tissue Antigens* 2002; 59: 412-416.
- 6) Hori H, Hattori S, Inouye S, Kimura A, Irie S, Miyazawa H, Sakaguchi M: Analysis of the major epitope of the alpha 2 chain of bovine type I collagen in children with bovine gelatin allergy. *J. Clin. Allergy Clin Immunol.* 2002; 110: 652-658.
- 7) Okamoto K, Makino S, Yoshikawa Y, Takaki A, Nagatsuka Y, Ota M, Tamiya G, Kimura A, Bahram S, Inoko H: Identification of IkBL as the second MHC-linked susceptibility locus for Rheumatoid Arthritis. *Am. J. Hum. Genet.* 2003; 72: 303-312
- 8) Shao W, Yasunami M, Takahashi M, Shibata H, Hamaguchi K, Sakata T, Ota M, Katsuyama Y, Inoko H, Kimura A: Analysis of HLA-B polymorphism in insulin dependent diabetes mellitus in Japanese. *MHC.* 2003; 9: 163-169
- 9) Obuchi N, Takahashi M, Nouchi T, Satoh M, Arimura T, Ueda K, Akai J, Ota M, Naruse T, Inoko H, Numano F, Kimura A: Identification of MICA alleles with a long Leu-repeat in the transmembrane region and no cytoplasmic tail due to a frameshift deletion in exon 4. *Tissue Antigens* 57: 520-535, 2001.
- 10) Kikuchi M, Looareesuwan S, Ubalee R, Tasanor O, Suzuki F, Wattanagoon Y, Na-Bangchang K, Kimura A, Aikawa M, Hirayama K: Association of adhesion molecule PECAM-1/CD31 polymorphism with susceptibility to cerebral malaria in Thais. *Parasitol. Int.* 50: 235-239, 2001.
- 1) Yumiko Tanaka, Michio Yasunami, Akinori Kimura: Analysis of polymorphisms in the MHC class I genes from rhesus macaques. 第12回日本組織適合性学会大会、軽井沢、平成15年9月
- 2) Michio Yasunami, Hiroki Shibata, Megumi Takahashi, Masao Ota, Yoshihiko Katsuyama, Hidetoshi Inoko, Akinori Kimura: Linkage disequilibrium of genes in the HLA region. 第12回日本組織適合性学会大会、軽井沢、平成15年9月
- 3) Hiroki Shibata, Michio Yasunami, Akinori Kimura: Functional analysis of the NFKBIL1 gene product, I kappa B-like (IKBL) protein. 第12回日本組織適合性学会大会、軽井沢、平成15年9月
- 4) 安波 道郎、田中 弓子、本多 光男、森 一泰、俣野 哲朗、木村 彰方: アカゲザルクラス I 座位 Mamu-A および Mamu-B の解析. 第11回日本組織適合性学会大会、川越、平成14年9月
- 5) 安波道郎、高橋めぐみ、柴田宏樹、邵文碩、太田正徳、勝山善彦、猪子英俊、浜口和之、坂田利家、木村彰方: HLA に連鎖したインスリン依存型糖尿病疾患感受性遺伝子座のマッピング。第46回日本人類遺伝学会大会、大宮、平成13年10月
- 6) 高橋めぐみ、安波道郎、柴田宏樹、大淵信久、木村彰方、太田正徳、勝山善彦、猪子英俊、小林靖、沼野藤夫: 高安動脈炎感受性遺伝子と関連する HLA 領域のマッピング。第46回日本人類遺伝学会大会、大宮、平成13年10月
- 7) 安波道郎、野内達人、壬生隆一、木村彰方: RSCA 法による大腸癌腫瘍組織における HLA クラス I 遺伝子の LOH 変異の検出。第10回日本組織適合性学会、福岡、平成12年11月

2. 学会発表

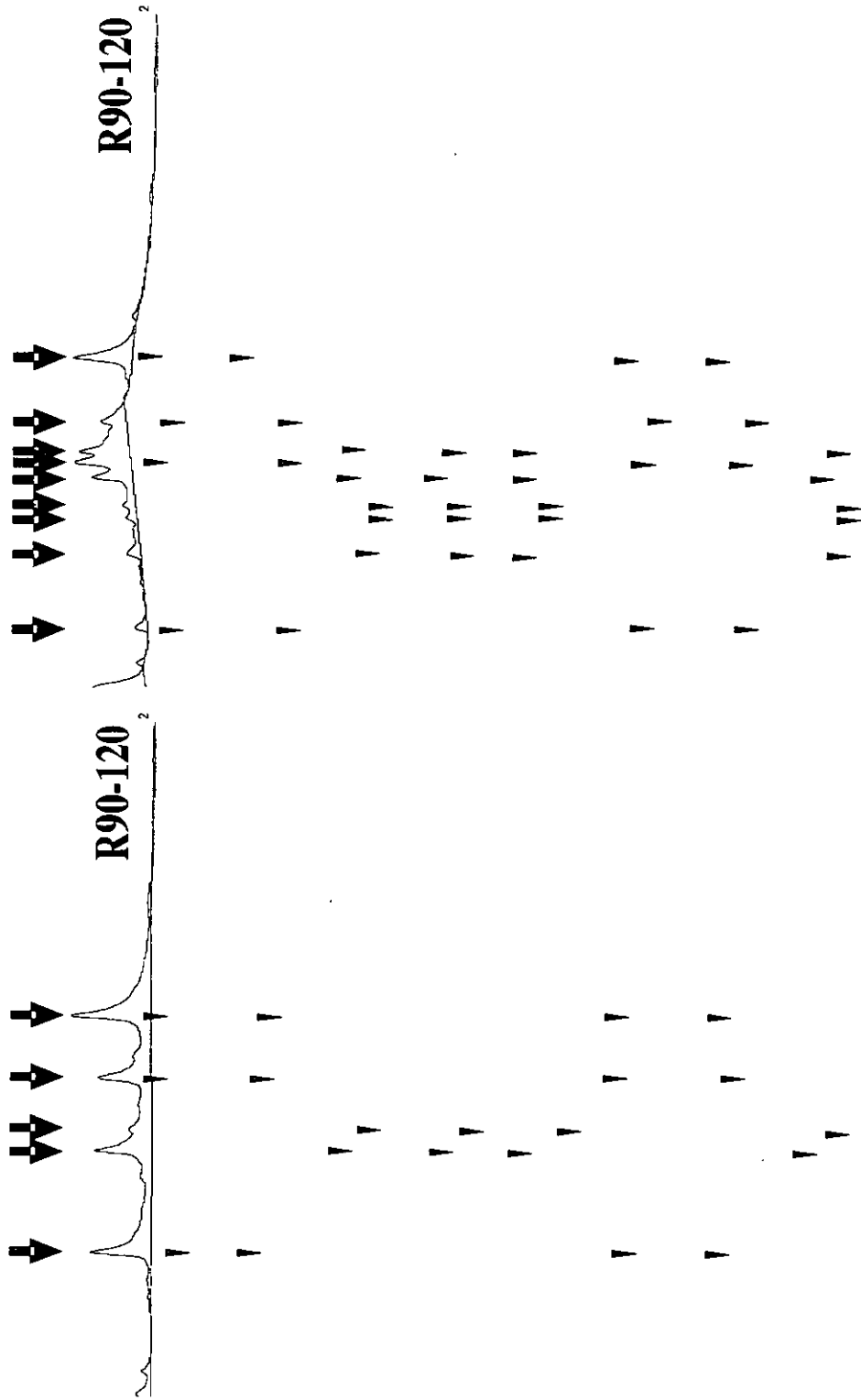
- 8) 邵文碩、安波道郎、高橋めぐみ、柴田宏樹、
太田正穂、勝山善彦、猪子英俊、浜口和之、
坂田利家、木村彰方：I 型糖尿病(IDDM)の
易罹患性に寄与する HLA 領域遺伝子の解析。
第 10 回日本組織適合性学会、福岡、平成 12
年 11 月

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

← a-haplotype
 ← b-haplotype

Mamu-A

Mamu-B



800.0 850.0 900.0 950.0 1000.0 1050.0 1100.0 1150.0 1200.0 1250.0 1300.0 1350.0 1400.0 1450.0 Bases

図1 R90-120 および子孫サルの Mamu 遺伝子 RSCA 解析

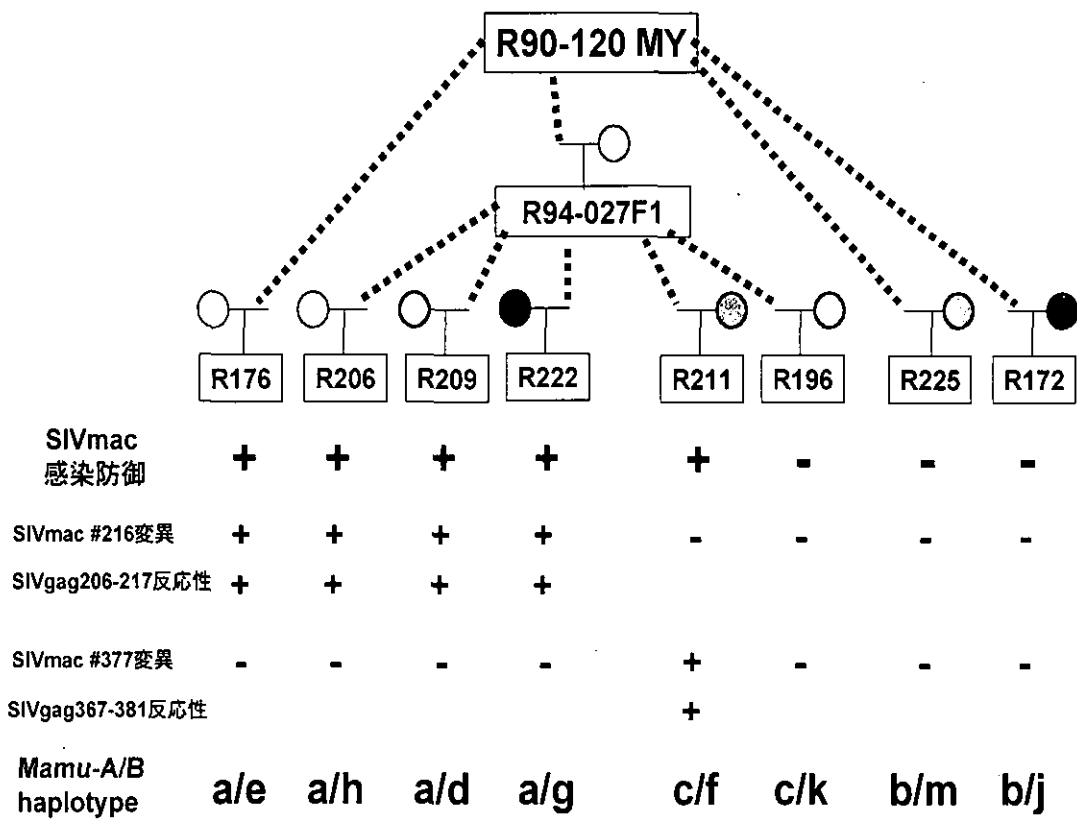
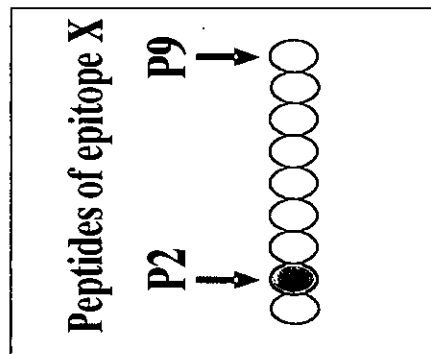


図2 ワクチン後の感染制御と MHC ハプロタイプの関連



allels	B pocket residues					F pocket residues				
	9	45	63	66	67	70	77	80	81	116
a-haplotype										
Mamu-A120-a-1	H	K	E	I	A	H	N	I	L	S
Mamu-A120-a-4	Y	M	N	I	M	A	A	N	L	Y
Mamu-A120-a-5	Y	M	E	K	A	T	N	T	A	S
Mamu-B120-a-1	G	M	V	I	A	Q	D	T	L	D
Mamu-B120-a-6	S	M	E	N	A	N	N	T	L	Q
Mamu-B120-a-8			ND					ND		
Mamu-B120-a-9	H	M	N	I	S	H	N	T	L	H
b-haplotype										
Mamu-A120-b-2	Y	M	E	I	S	N	N	T	L	Y
Mamu-A120-b-3	Y	E	N	I	C	D	N	T	L	S
Mamu-B120-b-2	-	E	H	I	A	N	S	N	L	H
Mamu-B120-b-3	G	T	E	R	A	R	D	T	L	S
Mamu-B120-b-4			ND					ND		
Mamu-B120-b-5	Y	M	E	N	M	A	D	T	L	F
Mamu-B120-b-7	S	E	Q	N	T	H	C	T	V	F

図3 Mamu アリルの B ポケット および F ポケット 配列