

C. 研究結果

研究対象とする感受性遺伝子領域の選抜を行った結果、以下の合計35領域を厳選し、SNPを選択した。

1. *TNFRSF1B*(tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B precursor): SNP数→11、解像度→1SNP/3.5kb
2. *PADI4*(peptidyl arginine deiminase, type IV): SNP数→14、解像度→1SNP/3.8kb
3. *IL23R*(interleukin 23 receptor precursor): SNP数→17、解像度→1SNP/5.5kb
4. *PTPN22*(protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22): SNP数→8、解像度→1SNP/6.1kb
5. *FCRL3*(Fc receptor-like 3 precursor): SNP数→8、解像度→1SNP/8.8kb
6. *STAT4*(signal transducer and activator of transcription 4): SNP数→38、解像度→1SNP/3.5kb
7. *SLC22A4*(solute carrier family 22 member 4): SNP数→8、解像度→1SNP/4.3kb
8. *IL3*(interleukin 3 precursor): SNP数→2、解像度→1SNP/0.4kb
9. *HLA class II and, III*: SNP数→327、解像度→1SNP/5.3kb
10. *ITPR3*(inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3): SNP数→43、解像度→1SNP/1.9kb
11. *TNFAIP3 and OLIG3* (tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3, oligodendrocyte transcription factor 3): SNP数→126、解像度→1SNP/3.4kb
12. *SUMO4*(SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 4): SNP数→4、解像度→1SNP/0.1kb
13. *EXOC4*(exocyst complex component 4): SNP数→44、解像度→1SNP/19.8kb
14. *CUL1*(cullin 1): SNP数→11、解像度→1SNP/9.2kb
15. *TRAF1 and C5*(TNF receptor-associated factor 1, complement component 5 preproprotein): SNP数→126、解像度→9SNP/23.1kb
16. *CCDC3*(coiled-coil domain containing 3): SNP数→65、解像度→1SNP/3.5kb
17. *CASP7*(caspase 7 isoform delta): SNP数→12、解像度→1SNP/4.4kb
18. *FGFR2*(fibroblast growth factor receptor 2 isoform 2): SNP数→16、解像度→1SNP/7.0kb
19. *MRPL48*(mitochondrial ribosomal protein L48): SNP数→59、解像度→1SNP/10.3kb
20. *IL18*(interleukin 18 proprotein): SNP数→2、解像度→1SNP/1.8kb
21. *CLEC4A*(C-type lectin domain family 4, member A isoform): SNP数→3、解像度→1SNP/3.8kb
22. *RANKL*(receptor activator of nuclear factor kappa B ligand): SNP数→5、解像度→1SNP/4.6kb
23. *RTN1*(reticulon-1): SNP数→26、解像度→1SNP/22.5kb
24. *PRKCH*(Protein kinase C eta type): SNP数→87、解像度→1SNP/2.9kb
25. *CIITA*(class II transactivator): SNP数→17、解像度→1SNP/2.8kb
26. *IL4R*(interleukin 4 receptor alpha chain isoform a): SNP数→8、解像度→1SNP/5.6kb
27. *FTO*(fat mass and obesity associated): SNP数→102、解像度→1SNP/4.4kb
28. *RUNX1*(runt-related transcription factor 1 isoform): SNP数→42、解像度→1SNP/6.3kb
29. *TNFRSF13C, CENPM and SEPT3* (Tumor necrosis factor receptor superfamily member 13C, centromere protein M isoform a, septin 3 isoform B): SNP数→9、解像度→1SNP/8.3kb
30. *CTLA4*(cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4): SNP数→4、解像度→1SNP/2.4kb
31. *CD244*(CD244 natural killer cell receptor 2B4): SNP数→12、解像度→1SNP/2.6kb
32. *CD40*(CD40 antigen isoform 1 precursor): SNP数→2、解像度→1SNP/1.1kb
33. *CCL21*(small inducible cytokine A21

precursor): SNP数→2、解像度→1SNP/0.1kb

34. *MMEL1* and *TNFRSF14*(membrane metallo-endopeptidase-like 1, Tumor necrosis factor receptor superfamily member 14 precursor): SNP数→5、解像度→9SNP/11.6kb
35. *CDK6*(cyclin-dependent kinase 6): SNP数→4、解像度→1SNP/33.7kb

最終的に、対象領域合計6,888kb、総SNP数1,144個、平均解像度6.0kb(SD:6.33)となった。また、これらのSNPの日本人集団におけるMAFは(HapMap projectのデータより)、平均0.283(SD:0.124)、最大0.5、最小0.1であり、遺伝統計学的な解析に耐えるものと考えられた。また、関節リウマチとの遺伝学的な関連に加え、さらにその発症などに極めて重要な遺伝子がこれら領域に網羅的に含まれており、今後の進展が十分に期待されるものである。

D. 考察

リウマチ患者ならびに健常者のサンプル収集はそれぞれ1,000検体、合計2,000検体を目指している。本研究で用いる遺伝子型タイピングにはillumina社のBeadsExpressによるgoldengate-Assayを採用するが、SNPが1,144個、サンプル2,000検体であれば、約5週間程度ですべての実験を終えることができる。実際には、95検体単位で実験を行うので、検体を収集しつつ遺伝子型タイピングを実施するため、サンプルが目標値に達成した段階で、データが揃うこととなり、迅速にプロジェクトを進めることが可能である。

さらに、この実験にかかる機器および試薬などはすでに導入済みで、予備的な実験も完了しているため、現在、順次遺伝子型タイピングを行っているところである。また、実験エラーなどにより解析不能なSNPなどに関しては、TaqMan Assayなどを併用することにより柔軟に対応できるプラットフォームも完備できている。

E. 結論

関節リウマチの感受性遺伝子領域、ならびにSNPの選抜を終え、本研究課題の基盤

となる情報源獲得への準備が完了した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tomiyama R, Meguro A, Ota M, Katsuyama Y, Nishide T, Uemoto R, Iijima Y, Ohno S, Inoko H, Mizuki N. Investigation of the association between Toll-like receptor 2 gene polymorphisms and Behçet's disease in Japanese patients. *Hum Immunol.* 2009 Jan;70(1):41-4.
- 2) Kulski JK, Shigenari A, Shiina T, Ota M, Hosomichi K, James I, Inoko H. Human endogenous retrovirus (HERVK9) structural polymorphism with haplotypic HLA-A allelic associations. *Genetics.* 2008 Sep;180(1):445-57.
- 3) Akiyama M, Yatsu K, Ota M, Katsuyama Y, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Kawase K, Yamamoto T, Nakamura M, Negi A, Sagara T, Kumagai N, Nishida T, Inatani M, Tanihara H, Ohno S, Inoko H, Mizuki N. Microsatellite analysis of the GLC1B locus on chromosome 2 points to NCK2 as a new candidate gene for normal tension glaucoma. *Br J Ophthalmol.* 2008 Sep;92(9):1293-6.
- 4) Takemoto Y, Naruse T, Namba K, Kitaichi N, Ota M, Shindo Y, Mizuki N, Gul A, Madanat W, Chams H, Davatchi F, Inoko H, Ohno S, Kimura A. Re-evaluation of heterogeneity in HLA-B*510101 associated with Behçet's disease. *Tissue Antigens.* 2008 Oct;72(4):347-53.
- 5) Nishizaki R, Ota M, Inoko H, Meguro A, Shiota T, Okada E, Mok J, Oka A, Ohno S, Mizuki N. New susceptibility locus for high myopia is linked to the uromodulin-like 1 (UMODL1) gene region on chromosome 21q22.3. *Eye.* 2009 Jan;23(1):222-9.
- 6) Kimura T, Kobayashi T, Munkhbat B, Oyungerel G, Bilegtsaikhan T, Anar D, Jambaldorj J, Munkhsaikhan S, Munkhtuvshin N, Hayashi H, Oka A, Inoue I, Inoko H. Genome-wide association analysis with selective genotyping identifies candidate loci for adult height at 8q21.13 and 15q22.33-q23 in Mongolians. *Hum Genet.* 2008 Jul;123(6):655-60.

- 7) Hui J, Oka A, James A, Palmer LJ, Musk AW, Beilby J, Inoko H. A genome-wide association scan for asthma in a general Australian population. Hum Genet. 2008 Apr;123(3):297-306.

2.学会発表

- 1) 猪子英俊、マイクロサテライトを用いたゲノムワイドな相関解析による尋常性乾癬の感受性の同定、第71回日本皮膚科学会東京支部学術大会特別講演、2008.

- 2) 猪子英俊、ヒト疾患遺伝子のゲノム解析から、創薬、予防・健康医学の臨床応用の時代へ、第80回臨床HLA研究会、2008

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

関節リウマチと HLA-DRB1 の関連分析

分担研究者	光永 滋樹	東海大学医学部基礎医学系分子生命科学	教授
協力者	奥平 裕子	東海大学医学部基礎医学系分子生命科学	
協力者	吉川 枝里	財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団	
研究協力者	鈴木 康夫	東海大学医学部内科学系リウマチ内科学	教授
協力者	中川美弥子	東海大学医学部内科学系リウマチ内科学	
協力者	伊藤とも美	東海大学医学部内科学系リウマチ内科学	
研究協力者	本間 康彦	東海大学医学部内科学系 循環器内科学・検診センター	教授
研究代表者	猪子 英俊	東海大学医学部 医学部長 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学	教授

研究要旨

本研究課題で新規に収集した症例の中で、HLA-DRB1 のタイピングが終了した関節リウマチ患者 145 例、健康人検体 203 例を用いて、関節リウマチとの関連を分析した。日本人集団でよく知られているように、DRB1*0405 との強い関連が確認された：P < 0.0001, Odds ratio (OR) = 2.48, 95% 信頼区間 (95% CI): 1.59-3.87。一方、DRB1*0802 と DRB1*1302 では protective な関連が認められた。DRB1*0802; P = 0.0037, OR = 0.15, 95% CI: 0.034-0.67, DRB1*1302; P = 0.0082, OR = 0.34, 95% CI: 0.15-0.76。DRB1 ポリペプチド鎖 70~74 番目のアミノ酸配列による Shared Epitope に基づく分類でも、同様に S_{3P} 群で有意な関連が認められ、X 群では protective な関連が認められた。DRB1*0901 アリルは関節リウマチとの関連は認められなかったが (P = 0.4954, OR = 1.18, 95% CI: 0.75 - 1.84)、genotype としては DRB1*0405 + DRB1*0901 のヘテロだけが有意な相関を示した (P = 0.0034, OR = 3.00, 95% CI: 1.44-6.25)。日本人集団で DRB1*0901 は抗 CCP 抗体陰性の RA と関連しているとの報告もあり、今後症例数を増やし、診療情報も含め DRB1*0901 との関連の詳細な検討が必要であると考えられた。

A. 研究目的

関節リウマチ（以下 RA）は多因子疾患であり、その発症には多数の遺伝的要因と環境因子、生活習慣が関連しているとされる。現在までに数十の RA 感受性遺伝子・領域が報告されているが (1)、複数の研究グループにより replication できたものは少ない。また集団による差があることも報告されており、例えば *PTPN22* の 1858C/T の多型は、欧米人集団では複数の replication study により RA 感受性遺伝子として確からしいと考えられているが

(2)、日本人集団ではその多型が少ないこともあり RA 発症との関連は否定されている (3)。一方、RA 発症と特定のヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen, HLA) との関連は古くから報告されてきており (4)、遺伝要因の中でも最もその影響が大きいと考えられている (5)。日本人集団では HLA-DRB1*0405 (6) との強い関連が知られ、欧米人では DRB1*0401 (7) との強い関連が報告されている。我々は厚生労働科学研究費補助金による「関節リウマチをモデルとした病型・病態進行予測ツールお

よび遺伝子検査システムの開発に関する研究」を行っているところであるが、その中で新たに RA 患者および健康人検体の収集を行い、RA 患者 145 例、健康人 203 例の HLA タイピングが終了したので RA との関連分析を行った。

B. 研究方法

文書によるインフォームドコンセントを得た後、関節リウマチ患者群と健康人（検診センター受診者）から末梢血を取得した。DNA は抽出キット GENOMIX (SRL) により抽出・精製した。HLA のタイピングは蛍光ビーズを用いた SSO 法 (Luminex 法) (LABType SSO, ベリタス) により行った。

DRB1 の shared epitope (8) は、du Montcel ST et al. の報告 (9) に従い分類し、解析を行った。

統計解析は Fisher's Exact Test により行い、Woolf の方法により 95% 信頼区間 (以下 95% CI) を求めた (GraphPad InStat)。

C. 結果

DRB1 のアレル頻度を関節リウマチ患者群と健康人群で比較したものを図 1 に示した。これらの健康人群のアレル頻度は報告されている日本人集団のアレル頻度とほぼ同じであった。主要な DRB1 のアレルと関節リウマチとの関連解析の結果を表 1 に示した。有意差があったものは DRB1*0405 ($P < 0.0001$, OR = 2.48, 95% CI: 1.59-3.87)、DRB1*0802 ($P = 0.0037$, OR = 0.15, 95% CI: 0.03-0.67)、DRB1*1302 ($P = 0.0082$, OR = 0.34, 95% CI: 0.15-0.76) の 3 アレルであり、DRB1*0802、DRB1*1302 は protective であった。

du Montcel らに従った shared epitope の分類を表 2 に示し、関連分析の結果を表 3 に示した。RA 発症との関連がみられたものは DRB1*0405 を含む S_{3P} のグループ ($P < 0.0001$, OR = 2.68, 95% CI: 1.71-4.21) であり、protective なものは DRB1*0802 を含む X のグループであった。一方、DRB1*1302 を含む S₁ のグループでは有意な関連は認められなかった ($P = 0.1668$)。しかし、S₁ のグループについて

は Non-Caucasoids でも有意差が報告 (10) されているので、これは症例数が少ないことによる可能性があるかもしれない。

Shared Epitope の genotype との関連分析の結果の主要なもの (少なくとも一方の頻度が 5% 以上のもの) を表 4 に示した。表に示されたように、有意差は検出されなかった。一方、HLA-DRB1 の genotype との関連分析の結果をみると (表 5)、DRB1*0405 + DRB1*0901 のヘテロ接合体が RA 発症と強い関連を示した ($P = 0.0034$, OR = 3.00, 95% CI: 1.44-6.25)。その他のもので有意差を示すものは無かった。

D. 考察

HLA-DRB1 のタイピングは現在最もよく使われている方法で行い、得られた健康人 control のアレル頻度は今までの報告と良く一致していた。これまでの報告と同様に、日本人集団における DRB1*0405 と関節リウマチ発症には強い関連がみられた ($P < 0.0001$, OR = 2.48, 95% CI: 1.59-3.87)。DRB1*0405 と同じ shared epitope のアミノ酸配列 QRRAA (70-74 番のアミノ酸) をもつ DRB1*0101, DRB1*0404, DRB1*0405, DRB1*0410, DRB1*1402, DRB1*1406 をひとつのグループとして関連を調べたところ、 $P < 0.0001$, OR = 2.81, 95% CI: 1.78-4.44、となり、やはり強い関連が認められた。

同様に、DRB1*0802 ($P = 0.0037$, OR = 0.15, 95% CI: 0.03-0.67) と同じアミノ酸配列 DRRAL をもつ DRB1*0802, DRB1*0803, DRB1*1403 をまとめると、 $P = 0.0171$, OR = 0.51, 95% CI: 0.29-0.88 であった。また、DRB1*1302 ($P = 0.0082$, OR = 0.34, 95% CI: 0.15-0.76) と同じアミノ酸配列 DERRA をもつ DRB1*1301, DRB1*1302 をまとめると、 $P = 0.0029$, OR = 0.33, 95% CI: 0.15-0.71 となり同様な結果が得られた。これらの結果は日本人集団においても shared epitope が RA 発症に深く関連していることを支持する。

しかし、shared epitope allele の genotype との関連を調べた場合は、Caucasoid で報告されている有意な関連は確認できなかった。さらに、HLA-DRB1 の genotype では

DRB1*0405+DRB1*0901 だけが強い関連を示した ($P = 0.0034$, $OR = 3.00$, $95\% CI: 1.44-6.25$)。なお、DRB1*0901 単独では RA との関連は検出できていない。この結果は韓国人集団での報告 (12) と一致している。欧米人集団でも DRB1*0901 と RA との関連は報告されていないが日本人集団では、ヘテロ接合体の場合関連性はないが、ホモ接合体の場合関節リウマチとの関連が報告されている (11)。また、DRB1*0901 は日本人集団で抗 CCP 抗体陰性の RA で有意に増大していることも報告されている (13)。マレーシア人集団でも DRB1*0901 が RA と関連しているとの

報告もある (14)。以上のように、shared epitope は RA 感受性の HLA-DRB1 アリルをよく説明するが、アジア人集団においては一部当てはまらない面もあると考えられる。これは集団差によるものか RA の病型等の他の要因によるものか不明である。今後、症例数を増やすとともに、現在測定中の抗 CCP 抗体を含む診療情報を併せ、詳細な検討を行いたい。

E. 文献

- Wellcome Trust Case Control Consortium.: Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007; 447: 661-78.
- Begovich AB *et al.*: A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet*. 2004; 75: 330-7.
- Mori M, Yamada R, Kobayashi K, Kawaida R, Yamamoto K.: Ethnic differences in allele frequency of autoimmune-disease-associated SNPs. *J Hum Genet*. 2005; 50: 264-6.
- Toyoda K, Saito S, Naito S, Konomi K, Yamamoto H.: HLA antigens in classical and malignant rheumatoid arthritis in Japanese population. *Tissue Antigens*. 1977; 10: 56-9.
- Feitsma AL, van der Helm-van Mil AH, Huizinga TW, de Vries RR, Toes RE.: Protection against rheumatoid arthritis by HLA: nature and nurture. *Ann Rheum Dis*. 2008; 67: iii61-3.
- Okubo H, Itou K, Tanaka S, Watanabe N, Kashiwagi N, Obata F.: Analysis of the HLA-DR gene frequencies in Japanese cases of juveniles rheumatoid arthritis and rheumatoid arthritis by oligonucleotide DNA typing. *Rheumatol Int*. 1993; 13: 65-9.
- Rønningen KS, Spurkland A, Egeland T, Iwe T, Munthe E, Vartdal F, Thorsby E.: Rheumatoid arthritis may be primarily associated with HLA-DR4 molecules sharing a particular sequence at residues 67-74. *Tissue Antigens* 1990; 36: 235-40
- Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1987 Nov;30(11):1205-13.
- du Montcel ST, Michou L, Petit-Teixeira E, Osorio J, Lemaire I, Lasbleiz S, Pierlot C, Quillet P, Bardin T, Prum B, Cornelis F, Clerget-Darpoux F.: New classification of HLA-DRB1 alleles supports the shared epitope hypothesis of rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis Rheum*. 2005 Apr;52(4):1063-8.
- Barnette T, Constantin A, Cantagrel A, Cambon-Thomsen A, Gourraud PA.: New classification of HLA-DRB1 alleles in rheumatoid arthritis susceptibility: a combined analysis of worldwide samples. *Arthritis Res Ther*. 2008; 10: R26.
- Wakitani S, Imoto K, Murata N, Toda Y, Ogawa R, Ochi T.: The homozygote of HLA-DRB1*0901, not its heterozygote, is associated with rheumatoid arthritis in Japanese.

- Scand J Rheumatol.* 1998; 27: 381-2.
12. Lee HS, Lee KW, Song GG, Kim HA, Kim SY, Bae SC.: susceptibility to rheumatoid arthritis in Koreans heterozygous for HLA-DRB1*0405 and *0901. *Arthritis Rheum.* 2004 Nov;50(11):3468-75.
 13. Furuya T, Hakoda M, Ichikawa N, Higami K, Nanke Y, Yago T, Kobashigawa T, Tokunaga K, Tsuchiya N, Kamatani N, Kotake S.: Differential association of HLA-DRB1 alleles in Japanese patients with early rheumatoid arthritis in relationship to autoantibodies to cyclic citrullinated peptide. *Clin Exp Rheumatol.* 2007 Mar-Apr;25(2):219-24.
 14. Kong KF, Yeap SS, Chow SK, Phipps ME.: HLA-DRB1 genes and susceptibility to rheumatoid arthritis in three ethnic groups from Malaysia. *Autoimmunity.* 2002 Jul;35(4):235-9.

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 清水佐良子, 光永滋樹, 吉川枝里, 岡 晃, 猪子英俊: Loop-mediated Isothermal Amplification 法による ambiguity 解決の可能性. 第17回日本組織適合性学会大会 (大阪), 2008.

- 2) 光永滋樹, 清水佐良子, 奥平裕子, 岡 晃, 猪子英俊: 等温増幅法を用いた HLA の新規 DNA タイピング法. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 BMB 2008 (神戸), 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 HLA-DRB1 アリルと関節リウマチとの関連

DRB1 allele	RA cases n (%)*	Controls n (%)*	P value	OR	95% CI
DRB1*0405	74 (51.0%)	60 (29.6%)	< 0.0001	2.48	1.59-3.87
DRB1*0101	22 (15.2%)	18 (8.9%)	0.0877	1.84	0.95-3.67
DRB1*0401	8 (5.5%)	7(3.4%)	0.4250	1.64	0.58-4.62
DRB1*0901	54 (37.2%)	68 (33.5%)	0.4954	1.18	0.75-1.84
DRB1*0802	2 (1.4%)	17 (8.4%)	0.0037	0.15	0.03-0.67
DRB1*1302	8 (5.5%)	30 (14.8%)	0.0082	0.34	0.15-0.76
DRB1*1405	4 (2.8%)	13 (6.4%)	0.1373	0.41	0.13-1.30
DRB1*1201	7 (4.8%)	16 (7.9%)	0.2832	0.59	0.24-1.48

*n (%) は症例 (RA 患者 145、健常人 Control 203) の中で各 allele を持つ症例数とその割合を示す。

表2 HLA-DRB1 の67-80のアミノ酸配列と shared epitope の classification*

DRB1															classification†
Alleles	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	
DRB1*0101	L	L	E	Q	R	R	A	A	V	D	T	Y	C	R	S _{3P}
DRB1*0301	-	-	-	-	K	-	G	R	-	-	N	-	-	-	X
DRB1*0401	-	-	-	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S ₂
DRB1*0403	-	-	-	-	-	-	-	E	-	-	-	-	-	-	X
DRB1*0404	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S _{3P}
DRB1*0405	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S _{3P}
DRB1*0406	-	-	-	-	-	-	-	E	-	-	-	-	-	-	X
DRB1*0407	-	-	-	-	-	-	-	E	-	-	-	-	-	-	X
DRB1*0410	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S _{3P}
DRB1*0701	-	I	-	D	-	-	G	Q	-	-	-	V	-	-	X
DRB1*0802	-	F	-	D	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	X
DRB1*0803	-	F	-	D	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	X
DRB1*0901	-	F	-	R	-	-	-	E	-	-	-	V	-	-	X
DRB1*1001	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S _{3P}
DRB1*1101	-	F	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S _{3D}
DRB1*1201	-	I	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S _{3D}
DRB1*1202	-	I	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S _{3D}
DRB1*1301	-	I	-	D	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S ₁
DRB1*1302	-	I	-	D	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S ₁
DRB1*1401	-	-	-	R	-	-	-	E	-	-	-	-	-	-	X
DRB1*1402	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S _{3P}
DRB1*1403	-	-	-	D	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	X
DRB1*1405	-	-	-	R	-	-	-	E	-	-	-	-	-	-	X
DRB1*1406	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S _{3P}
DRB1*1501	I	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S ₁
DRB1*1502	I	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S ₁
DRB1*1602	-	F	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S _{3D}

*dash (-) は HLA-DRB1*0101 と同じアミノ酸であることを示す。

†Classification は文献9に従った。

表3 Shared Epitope と関節リウマチとの関連

Shared Epitope group	RA cases n (%) [*]	Controls n (%) [*]	P value	OR	95% CI
S ₁ alleles	50 (34.5%)	85 (41.9%)	0.1812	0.73	0.47-1.14
S ₂ alleles	8 (5.6%)	7 (3.4%)	0.4250	1.64	0.58-4.62
S _{3D} alleles	21 (14.5%)	37 (18.2%)	0.3843	0.76	0.42-1.36
S _{3P} alleles	103 (71.0%)	97 (47.8%)	< 0.0001	2.68	1.71-4.21
X alleles	95 (65.5%)	167 (82.3%)	0.0004	0.41	0.25-0.67

^{*}n (%) は症例 (RA 患者 145、健常人 Control 203) の中で各 allele を持つ症例数とその割合を示す。

表4 Shared Epitope Genotype と関節リウマチとの関連

Genotype	RA cases n (%)	Controls n (%)	P value	OR	95% CI
S1/S1	3 (2.1%)	11 (5.4%)	0.1668	0.37	0.10-1.35
S1/S2	3 (2.1%)	4 (2.0%)			
S1/S3d	4 (2.8%)	8 (3.9%)			
S1/S3p	24 (16.6%)	20 (9.9%)	0.0727	1.82	0.96-3.43
S1/X	14 (9.7%)	35 (17.2%)	0.0599	0.51	0.26-0.99
S2/S2	0 (0%)	0 (0%)			
S2/S3d	0 (0%)	1 (0.5%)			
S2/S3p	4 (2.8%)	1 (0.5%)			
S2/X	1 (0.7%)	1 (0.5%)			
S3d/S3d	0 (0%)	2 (1.0%)			
S3d/S3p	14 (9.7%)	10 (4.9%)	0.0913	2.06	0.89-4.79
S3d/X	6 (4.1%)	15 (7.4%)	0.2573	0.54	0.20-1.43
S3p/S3p	6 (4.1%)	9 (4.4%)			
S3p/X	51 (35.2%)	52 (25.6%)	0.0577	1.58	0.99-2.51
X/X	15 (10.3%)	34 (16.7%)	0.1175	0.57	0.30-1.10

表5 HLA-DRB1 Genotype と関節リウマチとの関連

Genotype	RA cases n (%)	Controls n (%)	P value	OR	95% CI
DRB1*0405/DRB1*0901	23 (15.9%)	12 (5.9%)	0.0034	3.00	1.44-6.25
DRB1*0401/DRB1*0405	3 (2.1%)	1 (0.5%)	0.3120	4.27	0.44-41.47
DRB1*0403/DRB1*0405	4 (2.8%)	2 (1.0%)	0.2393	2.85	0.51-15.79
DRB1*0405/DRB1*0405	4 (2.8%)	4 (2.0%)	0.7235	1.41	0.35-5.74
DRB1*0803/DRB1*0901	2 (1.4%)	8 (3.9%)	0.2036	0.34	0.07-1.63

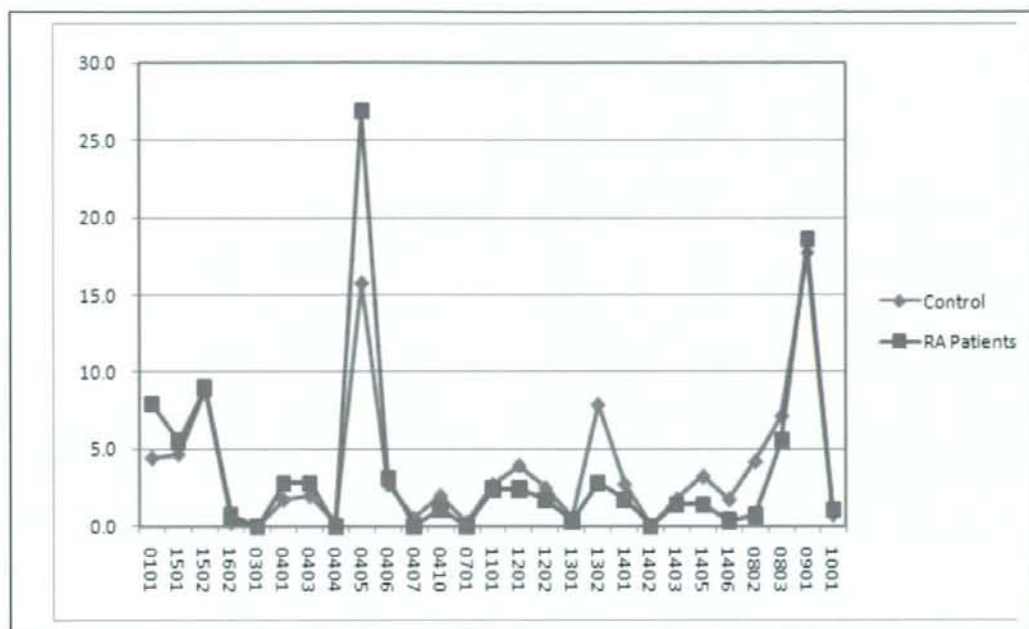


図1 HLA-DRB1のアリル頻度。縦軸はアリル頻度(%)、横軸はDRB1のアリル名を示す。

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

等温増幅法による新規 HLA タイピング法の開発に関する研究

分担研究者	光永 滋樹	東海大学医学部基礎医学系分子生命科学	教授
協力者	奥平 裕子	東海大学医学部基礎医学系分子生命科学	
協力者	吉川 枝里	財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団	
研究協力者	太田 正穂	信州大学医学部法医学	講師
分担研究者	木下 健司	武庫川女子大学薬学部ゲノム機能解析学	教授
研究代表者	猪子 英俊	東海大学医学部 医学部長	
		東海大学医学部基礎医学系分子生命科学	教授

研究要旨

等温増幅法の一つである Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) の反応液組成を検討し、Human Leukocyte antigens (HLA) の genotyping のための最適化を行った。その過程で外側の primer F3 と B3 は用いなくても増幅効率は実用的には問題がないことが分かり、本研究では、系の複雑さを減少させるために、F3 と B3 を用いないで LAMP を行った。今年度はこの系を用いて、① HLA の genotyping を行う場合に問題となる ambiguity 解決の検討、② HLA のアリルタイピングの実行可能性、③ HLA-DRB1 の low resolution タイピング、④ プラスチック基板上で等温増幅反応と発色反応を行うことによる HLA-DRB1 の low resolution タイピングの肉眼による判定、について検討を行い、それらが可能であることを示した。

A. 研究目的

本研究班の研究課題は「関節リウマチをモデルとした病型・病態進行予測ツールおよび遺伝子検査システムの開発に関する研究」であり、我々は病型・病態進行予測ツールを実用化していく上で必要となる遺伝子検査システムの開発を目的としている。関節リウマチ（以下 RA）発症には、HLA の特定のアリルあるいは特定のエピトープを共通に持つアリル群との強い関連がよく知られている (shared epitope)。また、全ゲノム関連分析あるいは候補遺伝子を用いた関連分析により、多数の遺伝子の SNP が RA の危険因子として報告されている。よって、予測ツールを実用化していくうえで必要な遺伝子検査システムでは、HLA のタイピングと SNP のタイピングが必要となる。今年度は HLA のタイピングシステムの開発を中心に検討を行った。

個別化医療においては、個人差すなわち多型を調べる molecular diagnostics（以下 MDx）が重要である。このための迅速・簡便・安価な方法の開発がヒトゲノムテレー

メード医療にもつながると考えられる。そして MDx の一つの方向性は、“decentralization” である。検査センターではなく、できるだけ患者に近い場所で迅速・簡便・安価な方法で MDx が可能となれば個別化医療の実現・活性化につながるとも考えられる。そのため、我々は特殊な機器を必要としない等温増幅法と可視化による HLA の genotyping と SNP typing の開発を目的としている。なお、HLA は RA のみならず種々の疾患の感受性遺伝子であり、また重篤な医薬品副作用とも関連している。米国 FDA や台湾 FDA は carbamazepine (1) や abacavir (2) の添付文書を改訂し、それぞれの副作用である Stevens-Johnson Syndrome、hypersensitivity に関連した HLA-B*1502 や HLA-B*5701 の検査を勧告している。このように HLA の genotyping は個別化医療に直接的に関係している。

通常の HLA genotyping 法ではアリルの組み合わせによっては区別できない ambiguity の存在が知られている (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/ambig.htm>)

1). 例えば、HLA-DRB1*0405 + DRB1*1501 のヘテロと HLA-DRB1*0410 + DRB1*1502 のヘテロは、通常の SSO 法 (sequence specific oligo-nucleotide) や、SBT (sequence based typing) 法では区別できない (図 1)。これは、HLA がヒト遺伝子の中で最も多型性を示す遺伝子座であり、各遺伝子座にはいくつかの多型領域が存在し、各アレルはそれらの多型領域のモザイクとして存在するからである。すなわち、各多型領域にプローブを設定し、それらの反応性の総和として genotyping を行う場合、HLA-DRB1*0405 + DRB1*1501 のヘテロと HLA-DRB1*0410 + DRB1*1502 のヘテロでは、反応するプローブは同じとなる。あるいは PCR で HLA-DRB1 遺伝子を増幅し、direct sequencing 法により塩基配列を解析しても、多型領域の波形の重なりは両ヘテロで同じとなる。なお、DRB1*0405 は日本人集団において RA と最も強い関連を示す HLA アレルであり、その正確な genotyping は関節リウマチの病型・病態進行予測ツールには不可欠である。我々は等温増幅法として Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) を選択した。これは通常の LAMP 法が 6 種類のプライマーを使用し、各プライマーの 3'末端あるいは 5'末端に多型領域を設定することにより同時に複数の多型領域を認識可能であり、HLA genotyping における ambiguity の解決につながるからである。

LAMP 法による HLA genotyping の有用性を検証するために、抗血小板薬チクロピジン投与による肝障害に関連している HLA-A*3303, B*4403, Cw1402, DRB1*1302, DQB1*0604 のタイピング法を検討し、個別アレルのタイピングが可能であることを示した。さらに、DRB1 の low resolution typing を検討し、包括的 genotyping が可能であること、またそれらをプラスチック基板上で行うことにより、可視化することが可能であることを示した。

B. 研究方法

1) DNA 検体

文書によるインフォームドコンセントを取得した関節リウマチ患者または健康人から得た末梢血から QIAamp DNA Blood

Mini Kit (QIAGEN, Tokyo, Japan) あるいは Quick-Gene 610L と QuickGene DNA whole blood kit L (FUJIFILM, Tokyo, Japan) を用いて DNA を抽出し、以後の研究に用いた。あるいは同様に文書によるインフォームドコンセントを取得した健康人から得た末梢血白血球を EBV で不死化した B-LCL から QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Tokyo, Japan) により DNA を抽出した。

2) HLA の genotyping

PCR-SSOP-Luminex 法 (LABTyping 101, VERITAS, Tokyo, Japan, またはジェノサーチ HLA-DRB1 Ver.2, MBL, Nagoya, Japan) あるいは Sequence based typing (SBT) 法 (AlleleSEQR HLA, Abbott Japan) を用いて行った。

3) プライマーおよびプローブデザイン

プライマーおよびプローブは Nearest neighbor method (3) により T_m を計算し、等温増幅反応の温度である 65°C 付近になるようにした。また、プライマー (図 2) の F2 および F3 の 3'末端近傍、F1 の 5'末端近傍に多型領域がくるようにプライマーを設計した。プローブは 5'末端を C6 アミノ化してプラスチック基板に固定した。

4) 等温増幅反応 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP 反応)

20 ng の DNA を含む全量 20 μ L の反応液で LAMP (4) を行った。プラスチック基板上での LAMP の場合以外は、SYBR Green I 存在下で ABI 社の PRISM7000 または PRISM7500 を使用し、増幅した二本鎖 DNA に SYBR Green I がインターカレートして増大する蛍光強度をモニターすることにより増幅の有無を判定した。

5) プラスチック基板上での等温増幅反応

アミノ修飾オリゴ DNA 用固定化基板キット (住友ベークライト) を使い、96 well プレート の各 well に 5'末端を C6 アミノ化したプローブをプラスチック基板上に固定化した。その後 biotin-dUTP 存在下、各 well 中で LAMP 反応を行った。プラスチック基板上のプローブから LAMP 反応により伸長

した DNA、すなわち陽性プローブ、の検出はストレプトアビジン-AP (バイオ・ラッド) を反応させ、BCIP/NBT 溶液 (パーキンエーラー) により発色させた。

6) 倫理的配慮

本研究は東海大学医学部の「医の倫理委員会」および「臨床研究委員会」の承認を受け、3 省合同の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を初めとする関連ガイドラインに従い実施した。

C. 結果

LAMP の反応液組成を検討し、増幅効率と特異性の観点から原法 (4) を表 1 に示したように変更した。以下の実験には基本的にはこの反応液組成を用いた。さらに、検討の結果 outer primer の F3 と B3 (図 2) は反応に用いなくてもほぼ同様な増幅効率と特異性を保てること分かった (表 2、図 3 a-c)。それで、反応系の複雑さを低減するために以下の実験では F3、B3 を用いないで行った。

HLA genotyping の ambiguity のモデルとして HLA-DRB1*0405 + DRB1*1501 のヘテロと HLA-DRB1*0410 + DRB1*1502 のヘテロの組み合わせを選んだとき、図 4 に示すように、DRB1*0405, DRB1*1501, HLA-DRB1*0410, DRB1*1502 をそれぞれアレル特異的に増幅することが可能であった。このとき PCR-SSP 法と蛍光プローブ法を組み合わせた方法 (5) でタイピングした HLA-DRB1*0405 + DRB1*1501 も特異的に増幅することができた。さらにこれらのアレルレベルでのタイピングは outer primer F3, B3 を用いなくても可能であった。

アレルタイピングが HLA-DRB1 だけでなく、他の遺伝子座でも可能であることを検証するために、抗血小板薬チクロピジン服用者の一部で発生する肝機能障害に関連した HLA ハプロタイプ (6) のタイピングを検討した。このハプロタイプは HLA-A*3303, HLA-B*4403, HLA-Cw*1403, HLA-DRB1*1302, HLA-DQB1*0604 であり、日本人集団で 2 番目に多いハプロタイプである。HLA クラス I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) は exon 2 と exon 3 が多型に富んでおり、例えば HLA-A*3303 の exon 3 は

A*3301 と同じ塩基配列であるので、HLA クラス I は exon 2 と exon 3 の両方でアレルまたはグループ特異的増幅を行い、両方の増幅結果から HLA-A*3303, HLA-B*4403, HLA-Cw*1403 を同定する方法をとった。図 5 に示したように、各アレル (グループ) を特異的に増幅することが可能で、outer primer F3, B3 を用いない LAMP 法で、HLA クラス I、HLA クラス II ともに、アレルタイピングが可能であることが分かった。

次に“包括的”genotyping が可能であることを示すために、HLA-DRB1 の Low resolution typing (血清学的レベルでのタイピング) について検討した。図 6 に示したように、日本人集団で 0.1% 以上のアレル頻度を示す 32 種類の DRB1 アレルを 11 グループに分け、グループ特異的増幅を行うことにより、Low resolution での genotyping を行う方法をとった。グループ特異的増幅の結果を図 7 に示した。各グループの特異的増幅が可能で、この方法で HLA-DRB1 の Low resolution typing が可能であることが分かった。さらに、等温増幅後に各 well に SYBR Green I を加える (7) ことにより増幅と非増幅の well を容易に見分けることが可能であった (図 8)。

HLA の high resolution typing (アレルレベルでのタイピング) は、Low resolution typing、すなわちグループ特異的増幅を行い、増幅したグループに含まれるアレルを、アレル特異的増幅を行うことにより可能である。また、SNP についても各 well でアレル特異的増幅を行うことによりタイピングが可能である。このような方法は検体数が少ない場合や、調べるアレルあるいは SNP が少ない場合は有効である。しかし、検体数や調べたいアレル、SNP の数が多い場合は multiplex 化が必要となる。本研究課題である「関節リウマチをモデルとした病型・病態進行予測ツール・・・」においても、予測ツールに必要な情報を得るための HLA、SNP は少なくとも 10 以上になるだろうと予測している。そのため multiplex 化を可能とするために、プラスチック基板上での等温増幅 LAMP の開発を検討した。これは 96 well プレート の各 well 底面に複数のプローブを

固定し、well 中で multiplex の増幅反応を行い、増幅してきたアリルあるいはアリルグループをプローブで捕捉、発色させることにより multiplex 化を行おうとするものである。今年度は上述の Low resolution typing をプラスチック基板上で行うことを検討した。すなわち、96 well プレート の各 well 底面に複数のグループ特異的のプローブを固定し、各 well ではグループ特異的増幅反応を行った。増幅に用いた *Bst* polymerase の strand displacement 活性によりプローブからの伸張反応が起こったもの、すなわち陽性のプローブは、伸張反応時に取り込ませた biotin-dUTP と Avidin-AP を利用した発色反応 (8) により検出した。その結果を図 9 に示した。一部複数のグループと反応しているプローブもあるが、ほぼグループ特異的増幅を検出できた。

D. 考察

HLA は関節リウマチ (9) 以外の様々な疾患でも感受性遺伝子として報告されている (10-12)。さらに重篤な薬剤副作用との関連も報告されている (1,2,6,13)。よってヒトゲノムテラーメード医療、個別化医療の実用化においては重要な遺伝要因であり、簡便、迅速、安価な genotyping の方法が必要とされる。現在最もよく使われている HLA genotyping 法は本研究でも用いた所謂 Luminex 法である。これは PCR による増幅、増幅産物の蛍光標識、フローサイトメトリによる蛍光ピーズの検出・分析という手順を踏むので時間を要する。また、特殊な機器も必要とする。Golden standard ともいわれる直接塩基配列決定法 (sequence-based typing, SBT 法) でも PCR 後に塩基配列の解析を行うので、同様な問題がある。我々は反応条件を検討、変更するとともに、使用するプライマーの数を減らし複雑さを低減させた等温増幅法 LAMP により HLA の genotyping が可能であることを示した。本方法は等温増幅 60 分、SYBR Green I による発色による可視化に 10 分、または BCIP/NBT によるプラスチック基板上 (96 well プレート) での発色に 30 分、で genotyping が可能である。基本的には恒温槽があればよいので特殊な機器も必要としない。さらに、HLA の genotyping で問題

となる ambiguity が本法により解決可能であることを示した。日本人集団における関節リウマチ感受性遺伝子である DRB1*0405 含まれる ambiguity も解決可能であった。

ヒトゲノムテラーメード医療、個別化医療において実際に使っていくためには multiplex 化が必要であるが、96 well プレートの底面に複数のプローブを固定化することにより可能であると考えている。現在、上述の HLA-DRB1 の 11 グループ特異的なプローブ、あるいは多型領域特異的なプローブを 96 well プレート底面に固定し、各 well 中で全ての DRB1 アリルを増幅するプライマーを用いた等温増幅反応を行うことによる genotyping を検討中である。少なくとも一部の多型領域は同定可能であるとの結果を得ている。今後 HLA だけでなく SNP のタイピングに関しても multiplex 化を検討していく予定である。

E. 文献

1. Hung SI, Chung WH, Jee SH, Chen WC, Chang YT, Lee WR, Hu SL, Wu MT, Chen GS, Wong TW, Hsiao PF, Chen WH, Shih HY, Fang WH, Wei CY, Lou YH, Huang YL, Lin JJ, Chen YT. Genetic susceptibility to carbamazepine-induced cutaneous adverse drug reactions. *Pharmacogenet Genomics*. 2006; 16(4):297-306.
2. Mallal S, Nolan D, Witt C, Masel G, Martin AM, Moore C, Sayer D, Castley A, Mamotte C, Maxwell D, James I, Christiansen FT. Association between presence of HLA-B*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet* 2002; 359: 727-32.
3. SantaLucia J Jr: A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95:1460-5.
4. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: E63.

5. Itoh Y, Mizuki N, Shimada T, Azuma F, Itakura M, Kashiwase K, Kikkawa E, Kulski JK, Satake M, Inoko H. High-throughput DNA typing of HLA-A, -B, -C, and -DRB1 loci by a PCR-SSOP-Luminex method in the Japanese population. *Immunogenetics*. 2005; **57**: 717-29.
 6. Hirata K, Takagi H, Yamamoto M, Matsumoto T, Nishiya T, Mori K, Shimizu S, Masumoto H, Okutani Y. Ticlopidine-induced hepatotoxicity is associated with specific human leukocyte antigen genomic subtypes in Japanese patients: a preliminary case-control study. *Pharmacogenomics J*. 2008; **8**: 29-33.
 7. Soliman H, El-Matbouli M. An inexpensive and rapid diagnostic method of Koi Herpesvirus (KHV) infection by loop-mediated isothermal amplification. *Virology* 2005; **2**: 83.
 8. Michikawa Y, Fujimoto K, Kinoshita K, Kawai S, Sugahara K, Suga T, Otsuka Y, Fujiwara K, Iwakawa M, Imai T. Reliable and fast allele-specific extension of 3'-LNA modified oligonucleotides covalently immobilized on a plastic base, combined with biotin-dUTP mediated optical detection. *Anal Sci*. 2006; **22**: 1537-45.
 9. Tamiya G et al. Whole genome association study of rheumatoid arthritis using 27 039 microsatellites. *Hum Mol Genet*. 2005; **14**: 2305-21.
 10. Goldberg MA, Arnett FC, Bias WB, Shulman LE. Histocompatibility antigens in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1976; **19**: 129-32.
 11. Drachman DA, Davison WC, Mittal KK. Histocompatibility (HLA) factors in familial multiple sclerosis. Is multiple sclerosis susceptibility inherited via the HLA-A chromosome? *Arch Neurol*. 1976; **33**: 406-13.
 12. Strosberg JM, Harris ED Jr. Letter: HLA-A genotypes and diabetes. *Lancet*. 1974; **2**: 1212.
 13. Hung SI, Chung WH, Liou LB, Chu CC, Lin M, Huang HP, Lin YL, Lan JL, Yang LC, Hong HS, Chen MJ, Lai PC, Wu MS, Chu CY, Wang KH, Chen CH, Fann CS, Wu JY, Chen YT. HLA-B*5801 allele as a genetic marker for severe cutaneous adverse reactions caused by allopurinol. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 4134-9.
- F. 研究発表**
1. 論文発表
なし
 2. 学会発表
 - 1) 清水佐良子、光永滋樹、吉川枝里、岡 晃、猪子英俊: Loop-mediated Isothermal Amplification 法による ambiguity 解決の可能性. 第 17 回日本組織適合性学会大会 (大阪), 2008.
 - 2) 光永滋樹、清水佐良子、奥平裕子、岡 晃、猪子英俊: 等温増幅法を用いた HLA の新規 DNA タイピング法. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 BMB 2008 (神戸), 2008.
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
なし

表1 LAMP 反応液組成

Reagent	Amount	Final Concentration
DNA (10 ng/ μ L)	2.0 μ L	
10 x Thermo Pol II buffer (NEB)	2.0	
100 mM MgSO ₄	1.6	8 mM
5 M Betain	2.0	0.5 M
FIP (64 pmol/ μ L)	0.5	1.6 μ M
BIP (64 pmol/ μ L)	0.5	
LF (32 pmol/ μ L)	0.5	0.8 μ M
LB (32 pmol/ μ L)	0.5	
F3 (8 pmol/ μ L)	0.5	0.2 μ M
B3 (8 pmol/ μ L)	0.5	
dNTP (25 mM x 4)	1.0	1.25 mM each
Salmon Sperm DNA (1 μ g/ μ L)	0.2	
10 x SYBR Green I	0.6	
Bst DNA polymerase (8 u/ μ L)	0.8	total 6.4 u
H ₂ O	6.8	

Total Volume	20.0 μ L	

表2 プライマーの塩基配列

Target allele	Oligonucleotide	Sequence
DRB1*04	FIP_04	GCTAGGCCGCCCTGGACAGATACTTCTATCACCAA
	LF_04	CGGTACTCCCCACGT
	LB_04	GGACACCTACTGCAGACACAA
	F3_04	ACATGAGTGTCATTTCTTCAAC
	B3_04	TCACAGGGACTCAGGCC
DRB1*0405	BIP_0405	AGCGCCGAGTACTGGATGCACTGTGAAGCTCTGAC
DRB1*0410	BIP_0410	AGCGCCGAGTACTGGAACGCACTGTGAAGCTCTGCA

DRB1*15	FIP_15	TGTCCTTCTGGCTGTTCCGATGTGGGGGAGTT
	LF_15	AGCTCCGTCACCGC
	LB_15	GACACCTACTGCAGACACAA,
DRB1*1501	BIP_1501	ATCCTGGAGCAGGCGACTGTGAAGCTCTGCA
DRB1*1502	BIP_1502	ATCCTGGAGCAGGTGGCACTGTGAAGCTCTGAC

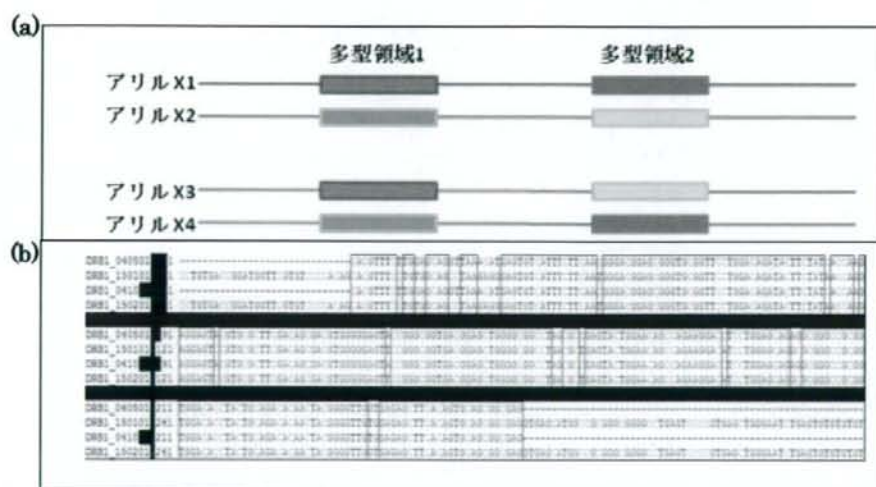


図1 HLA genotyping における ambiguity。

- (a) 多型領域1と多型領域2にそれぞれ2種類のプローブを設定しても、アリルX1+アリルX2のヘテロとアリルX3+アリルX4のヘテロは、それぞれすべてのプローブに反応するので区別できない。
- (b) DRB1*0405+DRB1*1501のヘテロとDRB1*0410+DRB1*1502のヘテロでは(a)の場合と同じで、通常の方法では区別できない。

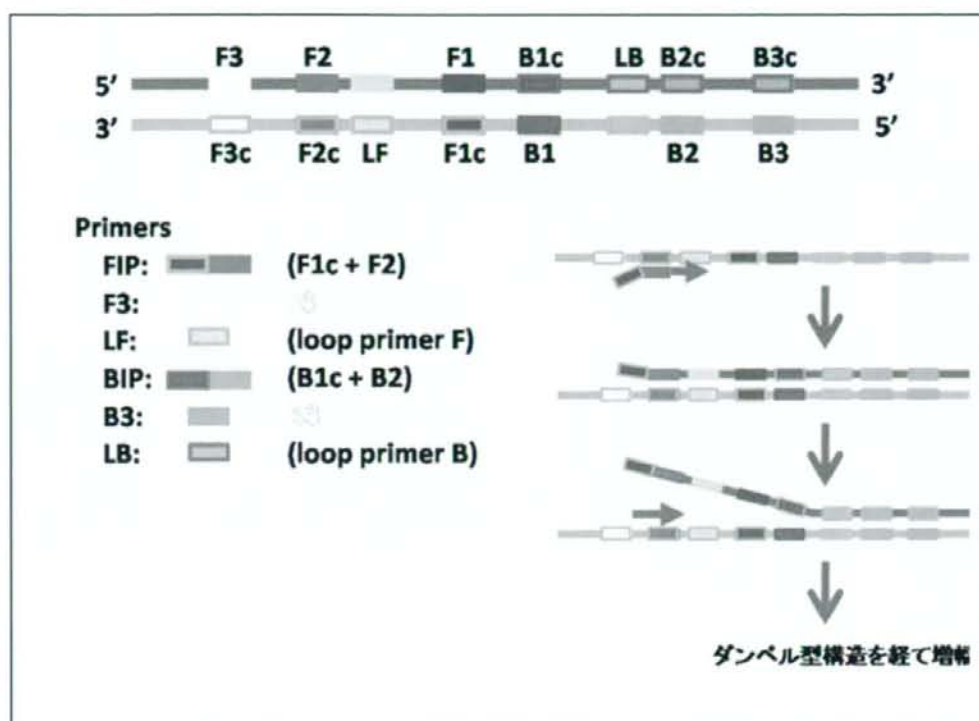


図2 LAMP用プライマーとLAMP反応。LAMPではF2とF1cを結合したFIP、B2とB1cを結合したBIP、Loop primer（増幅中に形成されるloop部分に結合するプライマー）LFとLB、最も外側に位置するouter primerのF3とB3の6種類のプライマーが通常の場合使われる。

