

## 論文の内容の要旨

氏名：宮前 二郎

博士の専門分野の名称：博士（獣医学）

論文題名：イヌの他家移植実現に向けた基礎的知見の収集

主要組織適合性複合体 (Major Histocompatibility Complex: MHC) 分子は有顎脊椎動物において獲得免疫を発動するために必須の機能を担っている。MHC 分子はクラス I およびクラス II 分子に大別され、それぞれの MHC 分子を発現する細胞や機能が異なっている。MHC クラス I 分子はほぼ全ての細胞に発現しており、細胞傷害性 T 細胞や NK 細胞などに自己または非自己の抗原ペプチドを提示することで免疫反応を開始させる。一方、MHC クラス II 分子は主に抗原提示細胞に発現し、抗原ペプチドをヘルパー T 細胞に提示することで種々の免疫応答を開始させる役割を担っている。また、これらの MHC 分子をコードする MHC 遺伝子は非常に高度な多型性を示すことが知られている。最も解析の進んでいるヒト MHC (human leukocyte antigen: HLA) においては多型に富む古典的クラス I 遺伝子である *HLA-A, B* および *C* においてそれぞれ 4,340、5,212 および 3,930 種類の対立遺伝子 (アレル) が報告されている。この MHC 遺伝子の高度な多型性に起因して、個体レベルで MHC 分子の表現型が異なることで提示される抗原ペプチドも変化し、結果として個々の免疫応答に差異が生じる。例えば、他家移植による移植医療においては、ドナーとレシピエント間の MHC 遺伝子型の違いにより移植片の拒絶反応が生じる。そのため、移植片を生着させるためには、ドナーとレシピエント間の MHC 遺伝子型を一致させることが必須である。

近年の獣医療の発展によりイヌは長寿となり、ヒトと同様な様々な難治性疾患や加齢性疾患を発症するようになってきた。それらの疾患の新規治療法として、現在、獣医療において幹細胞移植による再生医療の実現が期待されている。イヌは古くから移植のモデルとして汎用されてきたにも関わらず、イヌ MHC (dog leukocyte antigen: DLA) 遺伝子の多型情報、特に DLA クラス I 遺伝子における多型情報については非常に乏しく、DLA 多型の全貌は不明である。DLA 遺伝子の正確なタイピング法も確立しておらず、DLA 遺伝子型を考慮した移植研究は極めて少ないのが現状である。

本研究では、DLA 遺伝子の多型性の解明および実際に移植を行う際の安全評価法の確立を行い、イヌにおける移植医療の実現に向けた基礎的な移植免疫学的知見を収集すること試みた。

### 1. DLA 遺伝子の多型性の解明

DLA 遺伝子領域には、DLA クラス I 遺伝子として、*DLA-88*、*DLA-12*、*DLA-64* および *DLA-79* の 4 遺伝座が、DLA クラス II 遺伝子として *DLA-DRA1*、*DLA-DRB1*、*DLA-DQA1* および *DLA-DQB1* の 4 遺伝座が位置している。DLA クラス II 遺伝子に関しては、これまでに約 180 犬種 2000 頭を用いた大規模な解析が行われている。しかし、DLA クラス I 遺伝子に関しては *DLA-79* のみ 400 頭を用いた多型解析が行われ、多型性が低いことが報告されているが、その他の遺伝座に関してはわずかに数十頭を用いた解析が行われているのみであり、その多型性は不明であった。そこで、本研究ではまず DLA 遺伝子の多型性を解明するため、DLA クラス I 遺伝子のうち *DLA-88*、*DLA-12* および *DLA-64* の 3 遺伝座と DLA クラス II 遺伝子で最も多型に富む *DLA-DRB1* の多型解析を行った。

血縁関係のある 4 家系 38 頭のビーグルおよび非血縁個体の 49 犬種 404 頭のイヌの全血由来 cDNA を

鋳型として、各遺伝座特異的なプライマーを用いて PCR 増幅を行い、ダイレクトシーケンシング法またはサブクロニング法により塩基配列を決定した。決定した塩基配列を既知の DLA アレルをリファレンス配列とし比較することで、アレルの決定を行なった。

作成したプライマーの特異性を確認するため、初めにビーグル 4 家系 38 頭の DLA タイピングを行い、得られたアレル情報からハプロタイプ（同一染色体上に位置する遺伝子のセット）を推定した。推定されたハプロタイプは親子間で矛盾はなく、作成したプライマーは各遺伝座特異的であることが確認された。次に、これらのプライマーを用いて非血縁個体 404 頭の DLA タイピングを行なった。その結果、*DLA-88*、*DLA-12*、*DLA-64* および *DLA-DRB1* において 76、21、7 および 47 アレルが検出され、これらのうち、それぞれ 44、20、7 および 6 アレルはこれまで報告のない新規アレルであった。この多型解析の結果から、DLA クラス I 遺伝子においては *DLA-88* 遺伝子は多型性が高く、*DLA-12* および *DLA-64* 遺伝子は多型性が低いことが確認された。

DLA 遺伝子の多型解析を進める過程で、104 頭のイヌにおいて *DLA-88* 遺伝子が 3 アレル以上検出され、これらの多型情報からハプロタイプを推定したところ、*DLA-88* 遺伝子が重複しているハプロタイプ (*DLA-88-DLA-88*) が推定された。この結果から、*DLA-88-DLA-12-DLA-64* の 3 遺伝座から構成される既知のゲノム構造とは異なる新規の構造多型が存在することが示唆された。この構造多型を詳細に解析するため、*DLA-88-DLA-88* ハプロタイプおよび *DLA-88-DLA-12* ハプロタイプのホモ接合個体各 2 頭ずつからゲノム DNA を抽出し、それらを鋳型として、*DLA-88*、*DLA-12* および *DLA-64* の 3 遺伝座を含む約 95 kb のゲノム領域を long-range PCR および次世代シーケンサー (Ion S5) を用いて決定した。その結果、*DLA-12* 遺伝子が *DLA-88* 遺伝子に類似した *DLA-88-like* (*DLA-88L*) 遺伝子に置換されている新規の構造多型を同定し、DLA クラス I 遺伝子領域には *DLA-88-DLA-12-DLA-64* および *DLA-88-DLA-88L-DLA-64* の 2 種類の構造多型が存在することが明らかとなった。さらに、この 2 種類の構造多型の存在により、これまで *DLA-88* 遺伝子に分類されていたアレルのうち、*DLA-88-DLA-88* ハプロタイプを構成するアレルのいずれかが *DLA-88L* 遺伝子由来である可能性が考えられた。そのため、ゲノム DNA を鋳型とした、*DLA-88L* 遺伝子由来のアレルを正確に検出する新規タイピング法を開発した。この新規タイピング法を用いることで、*DLA-88* 遺伝子に分類されていたアレルのうち 10 アレルが *DLA-88L* 遺伝子由来であることが明らかとなった。

近年、ヒトの移植において、MHC 遺伝子の発現量の違いが移植片拒絶反応の発症リスクを増加させることが報告されている。しかし、イヌにおいては DLA 遺伝子発現量に関する知見は皆無であり、移植拒絶反応との関連も不明である。そこで、まず各 DLA クラス I 遺伝子発現量の差異を確認するため、本研究で同定した *DLA-88-DLA-12-DLA-64* または *DLA-88-DLA-88L-DLA-64* のゲノム構造を保有するホモ接合個体 10 頭または 12 頭由来の cDNA をそれぞれ用いて、リアルタイム PCR による遺伝子発現量の定量を行なった。その結果、いずれのゲノム構造においても *DLA-88* 遺伝子は発現量が最も高く、*DLA-64* 遺伝子は発現量が非常に低かった。しかし、*DLA-12* 遺伝子は *DLA-88* 遺伝子と比較すると発現量が有意に低かったのに対し、*DLA-88L* 遺伝子は *DLA-88* 遺伝子の発現量と有意差は確認されなかった。この結果より、*DLA-88-DLA-88L-DLA-64* ハプロタイプを保有している個体では、発現量の高い DLA クラス I 遺伝子を多く保有するため、*DLA-88-DLA-12-DLA-64* ハプロタイプのみを保有する個体と比較して、移植拒絶反応などの免疫応答が異なる可能性が考えられた。

最後に、これらのアレル情報および構造多型の情報を基に *DLA-88-DLA-12/88L-DLA-64-DLA-DRB1* の 4 遺伝座におけるハプロタイプを推定したところ、合計 143 種類のハプロタイプが推定された。これらのハプロタイプは各犬種において、その種類や頻度が異なっており、犬種により保有している

ハプロタイプに偏りが検出された。また、幹細胞他家移植を行う際に最適なドナーとなる DLA 遺伝子ホモ接合個体は 87 頭 (21.5%、37 ハプロタイプ) 検出された。ヒトにおいてホモ接合個体が得られる割合 (0.7%) と比較すると、イヌではその頻度が圧倒的に高いことが確認された。さらに、これらの DLA ホモ接合個体をドナーとした場合、DLA 型が一致した移植は 404 頭中 313 頭 (77.5%) に可能であることが確認された。

## 2. 混合リンパ球反応を用いた移植時の安全性評価法の確立

DLA 遺伝子の多型性が解明されてきた一方で、DLA 型の違いと T 細胞のアロ反応性を実際に評価した報告はこれまでに無い。アロ個体間においてアロ抗原に反応した細胞の増殖を評価する方法として混合リンパ球反応 (mixed leukocyte reaction: MLR) が知られている。MLR はドナーおよびレシピエントとなる個体から、それぞれ末梢血単核球を単離し、その細胞を *in vitro* で混合培養することで、リンパ球のアロ反応性細胞増殖を定量する方法である。増殖細胞の定量は、刺激係数 (stimulation index: SI) を算出することにより評価される。この方法は移植時の免疫反応を *in vitro* で再現可能な唯一の方法であり、ヒトの移植医療においては、移植前の急性拒絶反応の診断・評価が可能な方法として用いられている。獣医療においても、移植医療を実現するためには、ドナーとレシピエント間のアロ反応性を確認できる安全性評価法が必要であると考えられる。

従来、MLR における細胞増殖の定量は放射線同位体である  $[^3\text{H}]$ thymidine を用いて評価されてきた。これは細胞周期の S 期 (DNA 合成期) において細胞に取り込まれた  $[^3\text{H}]$ thymidine を検出することで、細胞増殖定量を行うものであり、客観的な評価法として非常に優れた方法である。しかし、この方法では実際に増殖している細胞がどのような細胞なのか (マクロファージ、T 細胞および B 細胞など) という定性評価を行うことができない問題点があった。この問題の解決法として、ヒト医療においては蛍光色素である CFSE を用いたフローサイトメトリーによる定量法が開発され、移植前診断のみならず、免疫抑制剤の評価や患者の免疫状態のモニタリングなど幅広く応用されている。

そこで、本研究ではまずイヌにおけるフローサイトメーターを用いた MLR 法の開発を行なった。そして、確立した方法により、DLA 遺伝子型を決定したビーグル 13 頭を用いて、DLA 型一致・不一致の組み合わせにて MLR を行い、T 細胞のアロ反応性を評価した。

その結果、DLA 型完全一致の組み合わせ ( $\text{SI} = 1.22 \pm 0.60$  (N=14)) では DLA 型完全不一致の組み合わせ ( $\text{SI} = 3.84 \pm 2.02$  (N=34)) と比較し SI が有意に低値を示した ( $p < 0.001$ )。また MLR 後の細胞塗抹像を確認したところ、DLA 型完全不一致の組み合わせにおいて、明らかな細胞増殖像が観察された。さらに、DLA 型ホモ接合個体をドナーとし、この DLA 型ホモ接合個体と同じハプロタイプを保有している DLA 型ヘテロ接合個体をレシピエントとした MLR を実施したところ  $\text{SI} = 1.02 \pm 0.31$  (N=9) と DLA 型完全一致の組み合わせと同様に低い SI を示した。これらの結果より、イヌにおいてもドナーとレシピエント間で DLA 型を一致させることでアロ反応性 T 細胞増殖を抑制でき、さらに DLA 型ホモ接合個体は、より多くの個体に DLA 遺伝子型が一致した移植を行うことができる有用なドナーとなることが確認された。

本研究により、DLA クラス I 遺伝子の多型解析法および移植時の安全性評価法が確立された。本方法を用いることで、イヌにおいては幹細胞他家移植において最適なドナーとなる DLA ホモ接合個体の頻度が非常に高頻度であることから、ドナーの選択が容易であり、移植医療を導入しやすいと考えられた。さらに、DLA 型を考慮したアロ反応性 T 細胞増殖を実際に定量することで、ドナーとレシピエント間で DLA 遺伝子型を一致することが T 細胞のアロ反応性を回避することに重要であり、また DLA 型ホモ接合体ドナー

の安全性も確認された。本研究成果は非常に基礎的なイヌの移植免疫学的知見であり、今後の獣医療における移植医療の発展に大きく貢献すると考えられる。

また、DLA の多型情報は、移植医療のみならず、様々な疾患関連解析からウイルス疾病に対するワクチンおよび腫瘍に対するペプチドワクチンなどの免疫療法の開発に至るまで、非常に多岐にわたる分野において重要な情報である。よって、本研究にて DLA 遺伝子の多型性が解明されたことは、今後の獣医療全体の発展に大きく貢献できる成果である。