

## 論文審査の結果の要旨

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

審査員：（主査） 教授 森友 忠昭

（副査） 教授 中山 智宏

教授 加野 浩一郎

准教授 坂井 学

主要組織適合性複合体（MHC）は、抗原情報（抗原ペプチド）をT細胞に提示することで獲得免疫を発動させる分子である。このMHCをコードする遺伝子は極めて多型性が高く、そのため、個体ごとに対立遺伝子（アレル）が異なる場合が多い。このアレルの違いは、MHCと特定の抗原ペプチドとの親和性の違いを生じさせ、“感染症”・“アレルギー”・“自己免疫疾患”等の発症リスクと個体毎のMHC遺伝子型との間で関連が生じる。また、非自己MHC分子はT細胞により異物と見なされるため、他家細胞移植による再生医療において、ドナーとレシピエント間のMHC型の一致は必須となる。このようにMHC情報は、様々な疾患の病態解明や再生医療などを行う上で非常に重要な基盤的知見となっている。

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。こ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性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ー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。

作製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、作製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、*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わかった。

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、これら 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

上記の様に、本研究により DLA 遺伝子の多型性が解明された。しかし、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。アロ抗原に反応する T 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。

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。

DLA 型完全一致の組み合わせの MLR では  $SI = 1.22 \pm 0.60$  (N=14) であったが、一方、DLA 型完全不一致の組み合わせでは  $SI = 3.84 \pm 2.02$  (N=34) となり、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  $SI = 1.02 \pm 0.31$  (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、他家移植医療に必須の DLA 遺伝子の解析法が確立され、イヌでは他家移植に最適なドナーとなる DLA ホモ接合個体の頻度が非常に高いことがわかった。さらに、混合リンパ球反応を行い、DLA 型を考慮した他家移植医療の安全性評価法も確立した。このように本研究は、伴侶動物の移植医療に道を開く、新たな成果であるが、同時に、MHC 情報は自己免疫疾患やアレルギーなど様々な病態解明を行う上でも重要であるため、今後の獣医療の発展に大きく貢献すると考えられる。

よって本論文は、博士 (獣医学) の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成 31 年 2 月 21 日