

イヌの他家移植実現に向けた
基礎的知見の収集

日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻
博士課程

宮前 二郎

2018

目次

第 1 章 緒論	5
第 2 章 DLA 遺伝子の多型性の解明	10
DLA クラス I 遺伝子領域における新規構造多型の同定	
2.1. 序論	11
2.2. 材料および方法	14
2.2.1. 供試サンプル	
2.2.2. RNA およびゲノム DNA の抽出	
2.2.3. DLA タイピングに用いたプライマー設計	
2.2.4. 逆転写反応および RT-PCR 増幅	
2.2.5. サンガー法およびサブクローニング法による塩基配列の決定	
2.2.6. DLA アレルタイピング	
2.2.7. DLA クラス I 遺伝子領域のゲノムシーケンシング	
2.2.8. Dot-matrix 解析	
2.2.9. <i>DLA-88L</i> 遺伝子の命名	18
2.3. 結果	
2.3.1. ビーグルの家系サンプルを用いた DLA タイピング法の評価	
2.3.2. 非血縁個体 49 犬種 404 頭を用いた多型解析	
2.3.3. DLA クラス I 遺伝子領域における新規構造多型の同定	
2.3.4. <i>DLA-88L</i> 遺伝子に由来するアレルの決定	

2.3.5. 各 DLA クラス I 遺伝子のアレル塩基配列を用いた分子系統解析	
2.3.6. <i>DLA-88</i> , <i>DLA-88L</i> および <i>DLA-12</i> 遺伝子の全長配列における類似性比較	
2.3.7. 末梢血単核球における各 DLA クラス I 遺伝子の発現解析	
2.3.8. 各 DLA 遺伝子のアミノ酸配列の比較	
2.3.9. <i>DLA-88 – DLA-12/88L – DLA-64 – DLA-DRB1</i> ハプロタイプの推定	23
2.4. 考察	
第 3 章 DLA 遺伝子の多型性の解明	42
<i>DLA-88L</i> アレルの検出、各 DLA クラス I アレルの比較解析 および DLA ハプロタイプの推定	
3.1. 序論	43
3.2. 材料および方法	
3.2.1. 供試サンプル	
3.2.2. <i>DLA-88L</i> 遺伝子のタイピング	
3.2.3. サンガー法による塩基配列の決定	
3.2.4. 塩基類似性の解析	
3.2.5. DLA クラス I 遺伝子における分子系統解析	
3.2.6. DLA クラス I 遺伝子における遺伝子発現量解析	
3.2.7. DLA クラス I 遺伝子における推定アミノ酸配列の比較	

3.2.8. DLA ハプロタイプの推定	
3.3. 結果	48
3.3.1. <i>DLA-88L</i> 遺伝子に由来するアレルの決定	
3.3.2. 各 DLA クラス I 遺伝子のアレル塩基配列を用いた分子系統解析	
3.3.3. <i>DLA-88</i> , <i>DLA-88L</i> および <i>DLA-12</i> の全長配列における塩基類似性の比較	
3.3.4. 末梢血単核球における各 DLA クラス I 遺伝子の発現解析	
3.3.5. 各 DLA クラス I 遺伝子のアミノ酸配列の比較	
3.3.6. <i>DLA-88 – DLA-12/88L – DLA-64 – DLA-DRB1</i> ハプロタイプの推定	
3.4. 考察	55
第 4 章 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	79
4.1. 序論	80
4.2. 材料および方法	83
4.2.1. 供試サンプル	
4.2.2. RNA 抽出	
4.2.3. DLA タイピングに用いたプライマー設計	
4.2.4. 逆転写反応および RT-PCR 増幅	
4.2.5. サンガーシーケンシングによるアレル塩基配列の決定	
4.2.6. DLA アレルタイピング	
4.2.7. DLA ハプロタイプの推定	
4.2.8. 末梢血単核球の単離	

4.2.9. MLR	
4.2.10 [³ H]thymidine-MLR による細胞増殖の定量	
4.2.11 CytoTell-MLR による細胞増殖の定量	
4.2.12 統計解析	
4.3. 結果	90
4.3.1 DLA アレルの決定およびハプロタイプ推定	
4.3.2 MLR の培養日数の検討	
4.3.3 [³ H]thymidine-MLR および Cytotell-MLR における定量性の比較	
4.3.4 DLA ハプロタイプホモ接合体ドナーの有用性および安全性の検討	
4.3.5 CD4 および CD8 陽性 T 細胞における増殖定量	
4.4. 考察	95
第5章 総括	109
謝辞	114
参考文献	115

第 1 章

緒論

主要組織適合性複合体 (Major histocompatibility complex: MHC) 分子は、細胞表面に発現する糖タンパク質であり、T 細胞に抗原ペプチドを提示することで自己・非自己を識別させる役割を担っている。MHC 分子は機能的にクラス I 分子とクラス II 分子に大別され、その発現細胞や機能が大きく異なることが知られている。MHC クラス I 分子は、ほとんど全ての有核細胞および血小板の細胞表面に発現しており、細胞の内在性抗原を提示する。そして、この抗原ペプチドは主に細胞傷害性 T 細胞 (CD8 陽性 T 細胞) の T 細胞レセプター (T cell receptor: TCR) により認識される。正常細胞では、自己の細胞内タンパク質由来のペプチドが提示されており、これは T 細胞に自己として認識されるため免疫応答は生じない。しかし、ウイルス感染細胞や腫瘍細胞においては、正常とは異なる抗原ペプチドが提示されており、細胞傷害性 T 細胞はこれらを非自己と認識することで活性化し、異常な細胞を破壊する。一方、MHC クラス II 分子は主に抗原提示細胞や B 細胞に発現しており、これら細胞が細菌や寄生虫など非自己由来の外来性抗原を貪食し、細胞内のプロテアソームで処理したのち、抗原ペプチドとして提示する。MHC クラス II 分子により提示された抗原ペプチドは、ヘルパー T 細胞 (CD4 陽性 T 細胞) の TCR で認識される。細菌や寄生虫由来の外来性抗原が抗原ペプチドとして提示されている場合は、ヘルパー T 細胞はこれらを非自己と認識することで活性化し、サイトカインの産生などを介して T 細胞の増殖や B 細胞の活性化などを誘導することで、細菌や寄生虫の排除を行う。このように、MHC 分子は主に獲得免疫を発動する中心的な役割を担っている。

様々な免疫応答の要となる MHC 分子ではあるが、移植医療においては最も主要な同種異型 (アロ) 抗原となることが知られている。移植拒絶反応が生じるメカニズムとし

では直接経路と間接経路の大きく 2 つが知られている。MHC 分子は非常に多型性に富んでおり、多くの場合、個体ごとに保有している MHC 型が異なっている。MHC 型の異なるドナーとレシピエント間で移植を行なった場合、直接経路ではドナー細胞上に発現している MHC 分子がレシピエントの T 細胞に直接認識されることで、非自己と識別され、移植片は排除（拒絶）される。この経路では、細胞傷害性およびヘルパー T 細胞のどちらも活性化されることで、急性の強い拒絶反応が誘導される。一方、間接経路では、細菌や寄生虫感染時と同様の免疫応答が、ドナー細胞由来の抗原（主にドナーの MHC 分子）に対して発動される。つまり、レシピエントの抗原提示細胞に貪食された非自己であるドナー細胞由来の抗原ペプチドが、レシピエントの MHC 分子上に抗原ペプチドとして提示され、それをレシピエントの T 細胞が認識することで免疫応答が誘導される。この経路では、主にヘルパー T 細胞が活性化され、活性化されたヘルパー T 細胞が B 細胞を活性化することで、移植片に対する抗体が産生される。この抗体は移植片の慢性拒絶に関与すると考えられている。

以上のように、移植医療を行うためにはドナーとレシピエント間の MHC 抗原型を一致させることが非常に重要であるが、この MHC 抗原型は個々のヒトで多様性が非常に高く、一致させることが難しいのが現状である。

MHC の多様性については、ヒト MHC（Human Leukocyte Antigen: HLA）において最もよく解析が進んでいる。HLA 遺伝子領域は第 6 染色体上に位置しており、この遺伝子領域は HLA クラス I およびクラス II 領域と HLA 遺伝子は位置していないが補体や腫瘍壊死因子（tumor necrosis factor: TNF）など様々な免疫に関連する遺伝子が位置している HLA クラス III 領域の大きく 3 つの領域に分かれる。ヒトにおいては、HLA クラ

ス I 分子を規定する HLA クラス I 遺伝子は合計 6 座存在している。さらにこれらの遺伝子は、組織特異的な発現パターンを示し、比較的多型性が低い非古典的遺伝子 (*HLA-E*, *HLA-F* および *HLA-G*) および、ほとんど全ての細胞に発現し、その発現量および多型性が非常に高い古典的遺伝子 (*HLA-A*, *HLA-B* および *HLA-C*) に大別される。一方、HLA クラス II 分子を規定する HLA クラス II 遺伝子は HLA-DR, -DQ および -DP 分子を構成する遺伝座が存在する。各 HLA クラス I およびクラス II 遺伝子にはそれぞれ数百～数千の対立遺伝子 (アレル) が存在しており、その結果、HLA クラス I 遺伝子では計 14,800 種類、HLA クラス II 遺伝子では計 5,288 種類の対立遺伝子が現在までに報告されている (IMGT/HLA データベース(<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>))。この膨大なアレル数に加え、父親および母親由来の 2 セットの MHC ハプロタイプ (同一染色体上に位置する MHC 遺伝子のセット) を受け継ぐことで、HLA 遺伝子型は個体レベルで非常に多様に富んでいる。よって移植医療においてドナーとレシピエント間の HLA 遺伝子型を一致させるためには、まず、その多型性を把握することが必須である。

イヌは古くからヒトの移植モデルとして汎用されているにも関わらず、イヌ MHC であるイヌ白血球抗原 (Dog Leukocyte Antigen: DLA) 遺伝子の多型性に関しては未だに不明な点が多い。特に DLA クラス I 遺伝子に関する多型性の報告は少なく、そのタイピング法も確立されていないのが現状である。そのため、これまでのイヌを用いた移植研究では、ドナーとレシピエント間で DLA 型を正確に考慮した報告は極めて少ない。

近年の獣医療の発展により、イヌは長寿になり、ヒトと同様な様々な難治性疾患や加齢性疾患を自然発症することが報告されている。それらの疾患に対する新規治療法として、獣医療域においてもヒト医療と同様に幹細胞を用いた再生医療が期待されている。

自己の幹細胞を用いた自家移植は拒絶反応を考慮することなく実施することが可能であるが、患者から幹細胞を取得する必要があるため患者への負担が大きく、また、移植細胞の準備に時間がかかること、そして費用も高額となることが問題としてあげられる。一方で、他個体由来の幹細胞を用いる他家移植では拒絶反応を考慮する必要があるが、移植細胞をあらかじめ準備しておくことが可能であるため、より安価にそしてより迅速に移植を実施することが可能である。

我々のグループではイヌにおいて、他家移植による再生医療を実現するため研究を進めている。他家移植を成功させるためには、イヌにおいてもドナーとレシピエント間の MHC 型を一致させることが重要であると考えられる。そこで、本研究では、イヌにおいて MHC 型を一致させた移植医療を実現するため、まず DLA 遺伝子のタイピング法を確立し、DLA 遺伝子の多型性の全貌を把握することを試みた。さらに実際に移植を行う際の安全性評価法として、イヌにおける混合リンパ球反応法を確立し、DLA 型の一致・不一致個体間における T 細胞のアロ反応性を評価することで、イヌにおける基礎的な移植免疫学的知見を収集することを試みた。

第 2 章

DLA 遺伝子の多型性の解明

DLA クラス I 領域における新規構造多型の同定

2.1. 序論

イヌは、ヒトの骨髄、心臓、肺、肝臓および腎臓などの移植モデルとして生物医学研究に重要な実験動物であると共に獣医療における主要な伴侶動物でもある。近年の獣医療技術の進歩により、伴侶動物としてのイヌの寿命は急速に伸びた一方で、ヒトと同様に生活習慣病、腫瘍および自己免疫疾患などの難治性疾患や加齢性疾患の発症例が多数報告されている (Cotman and Head 2008; Khanna et al. 2006)。また、人気犬種の形質維持・生産のために非常に閉鎖的な集団で交配を行うことにより、犬種特異的な遺伝性疾患も多数報告されている (Tsai et al. 2007)。最近、それらの疾患に対する新規治療法として幹細胞移植による再生医療が獣医療域でも期待されている。特に、非血縁個体間の他家移植を成功させ、その機能や安全性を担保するためには、ドナーとレシピエント間の MHC 型を一致させることが重要な要素の一つであり、そのためにはイヌ MHC である DLA 遺伝子の多型情報が不可欠である。

MHC 遺伝子領域のゲノム構造や多型性は動物種ごとに異なることが知られている。ヒトでは第 6 染色体上に全ての HLA 遺伝子が位置しているのに対して、イヌでは第 12 および第 18 染色体上に別れて DLA 遺伝子が位置している。これらのうち、第 12 染色体上には *DLA-88*, *DLA-12* および *DLA-64* の 3 遺伝座 (Burnett et al. 1997; Sarmiento and Storb 1990a; Wagner et al. 2005) および DLA クラス II 遺伝子である *DLA-DRA*, *DLA-DRB1*, *DLA-DQA1* および *DLA-DQB1* の 4 遺伝座が位置している (Debenham et al. 2005; Sarmiento et al. 1992; Sarmiento et al. 1993; Sarmiento and Storb 1990b) (Lindblad-Toh et al. 2005)。一方、第 18 染色体上には DLA クラス I 遺伝

子の一つである *DLA-79* が位置していることが知られている (Burnett and Geraghty 1995) (Figure 1)。

DLA クラス II 遺伝子に関しては、既に約 180 犬種 2000 頭を用いた大規模な多型解析が行われている。(Kennedy et al. 2007)。その結果、動物 MHC のデータベースである IPD/MHC データベース (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/>) において、現在 *DLA-DRB1*、*DLA-DQA1* および *DLA-DQB1* のアレルが、それぞれ 114 種類、23 種類および 58 種類公開されている。一方、DLA クラス I 遺伝子に関しては、*DLA-79* においては 407 頭を用いた多型解析の結果、6 アレルしか報告されておらず、多型性が非常に低いことから、非古典的遺伝子であると考えられている (Venkataraman et al. 2013)。*DLA-88* に関しては約 100 頭において多型解析が行われ、48 アレルが報告されており、多型性が高い古典的なクラス I 遺伝子であると考えられているが、これらの解析は主にビーグルを中心とした報告であるため、*DLA-88* における多型の全貌は不明である (Graumann et al. 1998; Ross et al. 2012)。また、*DLA-12* および *DLA-64* に関する多型解析は全く行われていない状況である。そのため、IPD/MHC および NCBI データベースにおいて、*DLA-88* は 48 種類のアレルが公開されているが、*DLA-12* および *DLA-64* のアレルに関しては共に 1 種類のアレルが公開されているのみである。

本研究では、獣医療における移植医療実現に向けて、まず、DLA クラス I 遺伝子の多型解析法を開発し、確立した多型解析法を用いて、これまで多型性が不明であった DLA クラス I 遺伝子 3 座 (*DLA-88*, *DLA-12* および *DLA-64*) の多型解析を行なった。さらに、DLA クラス II 遺伝子で最も多型性に富む *DLA-DRB1* の多型解析も並行して行い、DLA クラス I およびクラス II 遺伝子を含めた DLA 多型の全貌を解明することを試みた。

2.1. 材料および方法

2.1.1 供試サンプル

オリエンタル酵母工業から購入した血縁関係の明瞭な実験動物犬のビーグル4家系38頭と、マーブル動物医療センターおよび日本大学生物資源科学部動物病院から提供して頂いた49犬種404頭のイヌの全血をサンプルとして使用した (Table 1)。全血はEDTA-2Kにより抗凝固処理を施したものを使用した。

2.1.2 RNA およびゲノム DNA の抽出

TRIzol LS Reagent (Invitrogen/Life Technologies/Thermo Fisher Scientific) を用いて、合計442頭の全血から total RNA の抽出を製品添付のプロトコルに従い実施した。また RNA 抽出後のサンプルを用いて、フェノール/クロロホルム抽出法により、ゲノム DNA の抽出も実施した。

2.1.3 DLA 遺伝子のアレルタイピングに用いたプライマー設計

DLA-88 を特異的に増幅するプライマー (88/64-F および 88/12-R) は既報の論文で使用されているプライマーを用いた (Ross et al. 2012)。*DLA-12* または *DLA-64* をそれぞれ特異的に増幅させるプライマー (12-F および 88/12-R または 88/64-F および 64-R) は NCBI データベース (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) に公開されている *DLA-12* (Accession num.: NM_001014379.1) および *DLA-64* (Accession num.: NM_001014378.1) の cDNA 全長配列をリファレンスとして、DLA クラス I 遺伝子に

において多型性の最も集中しているエクソン 2-3 を含むようにエクソン 1 およびエクソン 4 に設計した。プライマーの特異性（他の DLA 遺伝子と交叉性が無いこと）は既知の *DLA-88*（Accession num.:NM_001014767.1）および *DLA-79*（Accession num.:NM_001020810.1）をリファレンスとして確認した。*DLA-DRB1* の多型解析には、公開されている mRNA 全長配列（Accession num.: NM_001014768.1）をリファレンスとしてアミノ酸翻訳配列（coding sequence: CDS）全領域を含むように、5' 非翻訳領域（un-translated region: UTR）および 3' UTR に設計した（DRB1_F1 および DRB1_R1）。プライマーの詳細な情報およびプライマー結合領域は Table 2A および Figure 2 に示した。

2.1.4 逆転写反応および RT-PCR 増幅

全血から抽出した RNA を DNase（Invitrogen/Life Technologies/Thermo Fisher Scientific）で処理した後、RevaTra Ace（TOYOBO）を用いて cDNA 合成を行なった。DNase 処理および cDNA 合成はいずれも添付のプロトコルに従い実施した。合成された cDNA を鋳型として、KOD FX（TOYOBO）と各遺伝座特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行なった。PCR 増幅はクラス I 遺伝子 3 座（*DLA-88*、*DLA-12* および *DLA-64*）については、最初に 94°C、2 分間の熱変性を行なった後、98°C/10 秒、63°C/30 秒、68°C/45 秒の 3 工程を 1 サイクルとし、合計 33 サイクルの反応を行なった。また *DLA-DRB1* 遺伝子に関しては、最初に 94°C、2 分間の熱変性を行なった後、98°C/10 秒、60°C/30 秒、68°C/50 秒の 3 工程を 1 サイクルとし、合計 33 サイクルの反応を行なった。

2.1.5 サンガー法およびサブクローニング法による塩基配列の決定

得られた RT-PCR 増幅産物を精製するため、増幅産物 1 ul に対して ExoSap-IT (Thermo Fisher Scientific) 1 ul および滅菌蒸留水 5 ul を添加し、37°C/15 分、80°C/15 分の計 30 分間のインキュベーションを行なった。精製後、増幅産物の塩基配列は Big Dye terminator 法を用いてサンガーシーケンサー ABI3130 (Applied Biosystems/Life Technologies/Thermo Fisher Scientific) により決定した。塩基配列決定が困難な場合や、新規アレルの存在が考えられる場合には、サブクローニング法により配列決定を行った。サブクローニングは Target clone (TOYOBO) を用いて、添付のプロトコルにしたがって実施した。PCR 増幅やシーケンス反応によるエラーを回避するため、1 個体につき 8~32 個のクローンを解析した。塩基配列の解析には Sequencher Ver. 5.0.1 (Gene Code Co.) を用いた。

2.1.6 DLA アレルタイピング

公開されている *DLA-88*、*DLA-12*、*DLA-64* および *DLA-DRB1* の既知アレル配列をリファレンスとして、得られた塩基配列との比較を行うことにより、各サンプルが保有している DLA アレルを判定した。アレルの判定は、Assign ATF ver. 1.0.2.45 (Conexio) および Sequencher Ver. 5.0.1 を用いて行った。

2.1.7 DLA クラス I 遺伝子領域のゲノムシーケンシング

DLA-88 から *DLA-64* 遺伝座を含む約 95 kb の DLA クラス I 遺伝子のゲノム領域の

塩基配列を決定するため、この領域を網羅するように設計した 10 ペアのプライマーセットを用いて long-range PCR (それぞれ約 10 kb) を行った。PCR 増幅は PrimeSTAR GXL DNA polymerase (TaKaRa Bio) を用いて、最初に 94°C、2 分間の熱変性を行なった後、98°C/10 秒、68°C/10 分の 2 工程を 1 サイクルとし、合計 30 サイクルの反応を行なった。PCR 増幅産物は AMPure XP (Beckman Coulter) を用いて精製した後、PicoGreen (Invitrogen/Life Technologies/Thermo Fisher Scientific) および Fluoroskan Ascent micro-plate fluorometer (Invitrogen/Life Technologies/Thermo Fisher Scientific) を用いて定量を行なった。定量後、次世代シーケンサーである Ion S5 (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific) でシーケンシングを行うため、各増幅産物を 100 ng ずつ混合し、Ion Xpress Plus Fragment Library Kit (Invitrogen/Life Technologies/Thermo Fisher Scientific) を用いて DNA ライブラリーを作成した。これらのライブラリーを鋳型として、Ion 520 & 530 Kit-OT2 および Ion OneTouch 2 automated system (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific) を用いてエマルジョン PCR を行なった。エマルジョン PCR 後、エマルジョン内のビーズを回収しこれらを精製した後、Ion 530 Chip (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific) および Ion S5 を用いてシーケンシングを実施した。得られたリード配列の情報処理、トリミングおよびベースコールは Torrent Suite 4.2.1 software (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific) によって行われた。これらのリード配列を PRINSEQ プログラムを用いてさらにトリミングを行い、quality value (QV) が 20 以下のリード配列を削除した。CLC Genomics Workbench 8.5.1 software (QIAGEN) を用いて、公開されているイヌゲノム配列 (Accession num.: NC_006594) をリファレンスとして、トリミング後のリード配

列のマッピングを行った。マッピングは mismatch cost 3, insertion cost 3, deletion cost 3, length fraction 0.9 および similarity fraction parameters 0.9 として実施した。マッピングにより決定できなかった配列および gap に関しては、適切なプライマーを設計しダイレクトシーケンシングを行うことで、配列決定を行った。

long-range PCR および 配列決定に用いた詳細なプライマー情報を Table 2B1 および Figure 4A に示した。

2.1.8 Dot-matrix 解析

Genomic similarity search tool (YASS) (Noe and Kucherov 2005) を用いて、既知のイヌゲノム配列 (Accession num.: NC_006594) と新規に決定した上記の約 95 kb の DLA クラスIゲノム領域の配列の Dot-matrix 解析を行った。解析はデフォルトのパラメーターにより実施した。

2.3. 結果

2.3.1 ビーグルの家系サンプルを用いた DLA タイピング法の評価

本研究で新たに設計した各 DLA 遺伝子タイピングプライマーの特異性および PCR 条件を評価するため、38 頭の血縁関係が明らかなビーグル 4 家系のサンプルを用いて DLA 遺伝子の多型解析およびハプロタイプ推定を行った。多型解析の結果、*DLA-88*、*DLA-12*、*DLA-64* および *DLA-DRB1* 遺伝子において、それぞれ 7 種類、3 種類、1 種類および 5 種類のアレルが検出されたが、うち 6 種類 (*DLA-88*nov2*, *DLA-88*nov9*, *DLA-88*nov19*, *DLA-12*nov1-2*, *DLA-12*nov1-3* および *DLA-64*nov2*) はデータベースに登録されていない新規アレルであった (なお、新規アレルについては遺伝子名の後に nov を付記してある)。またハプロタイプを推定したところ、合計で 6 種類推定された。これらのうち 5 種類ハプロタイプについては、親子間で矛盾なく遺伝されていることが確認されたが、1 種類 (図中黄色) は Family 2 の 1 個体から 1 ハプロタイプしか検出されなかったため、*DLA-12* および *DLA-64* のアレルを保有しているかどうか明確にできなかった。(Figure 3)。これらの結果より、本研究で開発した多型解析法は各遺伝子座特異的なアレルを増幅でき既知アレルのみならず新規アレルも検出可能な方法であることが確認された。興味深い結果として、Family 2 において、*DLA-12* および *DLA-64* アレルを推定できなかったハプロタイプでは *DLA-88* アレルが 2 種類検出され (*DLA-88*nov2* および *DLA-88*nov19*) これらが一つのハプロタイプを形成していることが推定された。

2.3.2 非血縁個体 49 犬種 404 頭を用いた多型解析

ビーグルの家系サンプルで特異性および妥当性が確認された多型解析法を用いて、非血縁個体 49 犬種 404 頭の多型解析を行った。その結果 *DLA-88*、*DLA-12*、*DLA-64* および *DLA-DRB1* の各遺伝座においてそれぞれ 76 種類、21 種類、7 種類および 47 種類のアレルが検出された。これらのうち、それぞれ 44 種類、20 種類、7 種類および 6 種類は新規アレルであった (Table 3)。また、各遺伝座において、最も保有頭数の多かったアレルは *DLA-88*006:01* (85/404 頭, 20.8%)、*DLA-12*1*(275/404 頭, 68.1%)、*DLA-64*nov2* (380/404 頭, 94.1%) および *DLA-DRB1*015:01* (104/404 頭, 25.7%) であった。本研究で検出された全アレルを Table 4 に示した。

2.3.3 *DLA* クラス I 遺伝子領域における新規構造多型の同定

既知の *DLA-88* 遺伝子の多型解析において、1 個体から 3 種類の *DLA-88* アレルが検出され、ハプロタイプ推定により *DLA-88*028:03* および *DLA-88*029:01* の *DLA-88* アレルが 1 つのハプロタイプを構成している可能性 (*DLA-88-DLA-88* ハプロタイプ) が示唆されていた (Ross et al. 2012)。本研究においても、多型解析の結果、ビーグル家系の 1 頭および非血縁個体の 102 頭のイヌから *DLA-88* アレルが 3 アレル以上検出され、さらに非血縁個体において、異なる *DLA-88* アレルが 4 アレル検出される個体が 2 頭確認された。これらの個体における多型情報から *DLA-88-DLA-88* ハプロタイプを推定したところ、合計で 17 種類の *DLA-88-DLA-88* ハプロタイプが推定された (Table 5)。また、これら 17 種類の *DLA-88-DLA-88* ハプロタイプのいずれかを保有するホモ接合個体が 404 頭中 25 頭検出された。さらに、これらの 25 頭のホモ接合個体

および異なる *DLA-88* アレルを 4 アレル保有していた 2 個体の合計 27 個体において、*DLA-12* アレルを検出することができなかった。これらの結果から、我々は DLA クラス I 遺伝子領域において、*DLA-88* と *DLA-12* 間で遺伝子組換えが生じた結果、*DLA-88* – *DLA-12* および *DLA-88* – *DLA-88* の 2 種類のハプロタイプが存在しているのではないかという仮説を立てた。

そこで、この仮説を証明するため、我々は *DLA-88*028:03* – *DLA-88*029:01* ハプロタイプのホモ接合個体のゲノム DNA を用いて、約 10 kb ずつの long-range PCR および 次世代シーケンサー Ion S5 を用いて、*DLA-88* から *DLA-64* 遺伝座を含む計 95 kb の DLA クラス I 領域のゲノムシーケンスを行った (Figure 4A)。シーケンスの結果、QV が 20 以上のリード配列が 1,794,204 本得られ、リード配列の平均長および最大長はそれぞれ 304 bp および 416 bp であった。これらのリード配列を用いた既知のイヌゲノム配列をリファレンス配列としたマッピングを行い、さらに gap が生じた箇所においてダイレクトシーケンスを行うことで、新たに 94,960 bp の DLA クラス I 領域のゲノム配列を決定した (accession num.; LC271133)。

次に、ゲノム配列の差異を確認するため、新規に決定したゲノム配列と既知のリファレンス配列 (96,115 bp, accession num.; NC_006594) を Dot-matrix 解析により比較した (Figure 4B)。その結果、2 種類のゲノム構造は非常に高い類似性を示し、さらに DLA 遺伝子間領域に存在する反復配列の一種である Long interspersed element (LINE) 配列の位置も非常によく保存されていることが確認された。しかし、既知のゲノム配列は *DLA-88* – *DLA-12* – *DLA-64* という遺伝子構成であるのに対し、*DLA-88* – *DLA-88* ハプロタイプを構成するアレルのうち *DLA-88*029:01* が既知ゲノム配列の *DLA-12*

(*DLA-12*nov6*)と完全に同一の領域に位置することが確認された。この結果より、我々は、*DLA-88*029:01* は *DLA-88* 遺伝子特異的プライマーで増幅可能であるにも関わらず、ゲノム配列上では *DLA-12* 遺伝子領域に位置していることから、*DLA-88* 遺伝子に非常に類似した構造をもつ別の遺伝子であると考え、本研究において、*DLA-88-like* (*DLA-88L*) 遺伝子と呼称することとした。以上より、DLA クラス I ゲノム領域には *DLA-88-DLA-12-DLA-64* または *DLA-88-DLA-88L-DLA-64* の2種類の構造多型が存在していることが明らかとなった。

2.4. 考察

近年のイヌ科動物における詳細なゲノム解析により、イヌは約 1 万 5000 年前にヨーロッパとアジアではほぼ同時期に家畜化された可能性が高いことが報告され (Frantz et al. 2016)、さらに、アジアのイヌはヨーロッパのイヌと比較して、*DLA-DRB1* の多型性が高いことも報告されていた (Niskanen et al. 2013)。これらのことから、DLA 遺伝子の多型性を正確に評価するためにはアジアを起源とする犬種も含め、より多くの犬種で解析を行う必要があると考えられた。しかしながら、既報の DLA 遺伝子における多型解析は、実験動物であるビーグルやヨーロッパを起源とする大型犬 (ボクサー、ドベルマンおよびニューファンドランドなど) を中心とした解析が行われていたため (Graumann et al. 1998; Kennedy et al. 2007)、本研究ではまず、これまで解析頭数の少なかった小型犬 (チワワ、ミニチュアダックスフントおよびトイプードルなど) やアジアを起源とする犬種 (柴、日本スピッツおよびシーズーなど) を中心とした多型解析を行った (Table 1)。その結果、*DLA-88*, *DLA-12*, *DLA-64* および *DLA-DRB1* においてそれぞれ 44 種類、20 種類、7 種類および 6 種類が新規アレルとして検出された。これらは本研究で検出されたアレルの 51.0% を占めており、この結果から、今後まだ多型解析を行っていない犬種を対象に解析を進めることで、さらなる新規アレルが検出されることが考えられた。*DLA-12* および *DLA-64* に関しては既報のビーグルを中心とした多型解析において、多型性がほとんど無い遺伝座であると考えられていたが (Graumann et al. 1998; Wagner et al. 2005)、本研究において初めて複数のアレルが確認され、特に *DLA-12* 遺伝子に関しては計 21 種類のアレルが検出されたことから、比

較的多型性が高いことが明らかになった。

また、*DLA-88* アレルが 1 個体から 3 種類検出されることから、DLA クラス I 遺伝子領域において構造多型が存在することが、これまでの研究において示唆されていた (Ross et al. 2012)。本研究では、DLA クラス I 遺伝子領域における詳細なゲノムシーケンシングを行うことで、*DLA-88 – DLA-12* および *DLA-88 – DLA-88L* の 2 種類の構造多型が存在していることを世界で初めて証明することに成功した。この結果より、*DLA-88 – DLA-88* ハプロタイプを構成するアレルのどちらかは、*DLA-88*029:01* のように *DLA-88L* 遺伝子由来のアレルである可能性が考えられた。本研究において作製した *DLA-88* 遺伝子特異的プライマーは、実際には *DLA-88* および *DLA-88L* のいずれも増幅するプライマーであり、DLA クラス I 遺伝子の多型解析を正確に行うためには *DLA-88* もしくは *DLA-88L* 遺伝子由来のアレルを適切に分類可能な DLA タイピング法の開発が必要である。

Table 1. Sample information of unrelated dogs used for this study

Breed	Animal Num.	Breed	Animal Num.
Akita	1		
Basenji	1	Miniature Pinscher	4
Beagle	6	Miniature Schnauzer	6
Bernese Mountain Dog	1	Papillon	9
Bichon Frize	2	Pomeranian	7
Brussel Griffon	1	Poodle: Standard	1
Bulldog	1	Poodle: Toy	42
Bull Terrier: Miniature	1	Pug	5
Bull Terrier: Staffordshire	1	Rottweiler	1
Chihuahua	36	Saluki	1
Chihuahua: Longcoat	3	Shetland Sheepdog	18
Chin	2	Shiba	37
Chinese Crested Dog	1	Shih Tzu	12
Collie	4	Shikoku	1
Dachshund: Kaninchen	3	Spaniel: American Cocker	3
Dachshund: Miniature	48	Spaniel: Cavalier King Charles	3
Dalmatian	2	Terrier: Boston	3
French Bulldog	12	Terrier: Jack Russell	6
Golden Retriever	3	Terrier: Lakeland	1
German Shepherd	1	Terrier: Norfolk	2
Husky	4	Terrier: Toy Manchester	1
Irish Setter	1	Terrier: Yorkshire	41
Japanese Spitz	3	Welsh Corgi	8
Kooikerhondje	3	Whippet	1
Labrador Retriever	12	Mongrel	29
Maltese	9	49 breeds and mongrel	404

Table 2. Primers used for this study

Locus or allele	Primer name	Primer sequence (5' to 3')	Locus or allele specificity	Primer location	Annealing temperature	Product size	Reference
A. Primer list for genotyping analysis							
<i>DLA-88</i>	88/64-F	CGGAGATGGAGGTGGTGA	<i>DLA-88, DLA-64</i>	exon 1	63°C	654-657 bp	(1)
	88/12-R	GGTGGCGGGTCACACG	<i>DLA-88, DLA-12</i>	exon 4			
<i>DLA-12</i>	12-F	CGACCTAAAGGTCTGGGCTA	<i>DLA-12</i>	exon 1	63°C	660 bp	(1), this study
	88/12-R	GGTGGCGGGTCACACG	<i>DLA-88, DLA-12</i>	exon 4			
<i>DLA-64</i>	88/64-F	CGGAGATGGAGGTGGTGA	<i>DLA-64</i>	exon 1	63°C	653 bp	(1), this study
	64-R	GGGTGGCGGGTCAGTAG	<i>DLA-88, DLA-64</i>	exon 4			
<i>DLA-DRB1</i>	DRB1_F1	GCACCTGTCCTTTCTG	<i>DLA-DRB1</i>	5' UTR	60°C	845 bp	This study
	DRB1_F2	TCACCATCTCCACTCTCAG	<i>DLA-DRB1</i>	3' UTR			
B. Primer list for genomic analyses							
Long-range primers for <i>DLA-88-88L/12-64</i> genomic segment							
	DLA88-12-64_F1	AGGGGACAATGGGACAGGAACTTGGGA		Intergenic	68°C	8.4 kb	This study
	DLA88-12-64_R1	GTCCACAGGAGGGAACCAACAGAAAG		Intergenic			
	DLA88-12-64_F2	GTACCCGGCTGCTTCCCAAACCTGT		Intergenic	68°C	10.1 kb	This study
	DLA88-12-64_R2	GCTCTATGCTGATCCTTTCCCAAGT		Intergenic			
	DLA88-12-64_F3-4	GTGCCAGGGAGCATCAGACCTAAGACAG		Intergenic	68°C	11.0 kb	This study
	DLA88-12-64_R3-4	GAAGTCCCATAAACCTGAAGACCAGAGAACC		Intergenic			
	DLA88-12-64_F4-4	GACCAACATCTATCTCCCTACTACGAAAACG		Intergenic	68°C	11.4 kb	This study
	DLA88-12-64_R4-4	TGGTCTACCCCTGGCCTCCTCCTCACT		Intergenic			
	DLA88-12-64_F5	GAGGGCTGCTAAAGAAGAGACGGGTAG		Intergenic	68°C	10.6 kb	This study
	DLA88-12-64_R5	CCCAGAGAAGTAAAGGAGGAGGTTTCC		Intergenic			
	DLA88-12-64_F6-5	TCCTAAATGGCATCTTACCTTATCCCTT		Intergenic	68°C	11.3 kb	This study
	DLA88-12-64_R6-7	GTGTCTTTGGGTCTAAAATGAGTGTCTTGG		Intergenic			
	DLA88-12-64_F7-2	CACATTGGGCTCCCTGCATGATTCCTCT		Intergenic	68°C	10.2 kb	This study
	DLA88-12-64_R7-2	TGGGATTTAGTGCACAGACCCCTTGCTT		Intergenic			
	DLA88-12-64_F8	AGCCTGTTTCTCCTCCCTTTCCTATGT		Intergenic	68°C	11.1 kb	This study
	DLA88-12-64_R8-2	CCATCTCTGAACCCTGAGACTGCCATTG		Intergenic			
	DLA88-12-64_F9	CGGTTCCCTTTCTGTGCTGCTCACTG		Intergenic	68°C	10.8 kb	This study
	DLA88-12-64_R9	AACCATTCAAACCTCCATCCCTGTACAA		Intergenic			
	DLA88-12-64_F10	GAAGGGGAGGTACAAATGATGTGGAA		Intergenic	68°C	11.4 kb	This study
	DLA88-12-64_R10	CTCGATCCAGGTCCCAGGATCACACC		Intergenic			

(1): (Ross et al. 2012)

Table 3. Summary of identified *DLA* alleles in each *DLA* gene

<i>DLA</i> gene	Total nucleotide sequences	of Previously published sequences	Newly identified sequences	Total of amino acid sequences
<i>DLA-88</i>	76	32	44	74
<i>DLA-12</i>	21	1	20	16
<i>DLA-64</i>	7	0	7	4
<i>DLA-DRB1</i>	47	41	6	47
Total	151	74	77	141

Table 4. Information for all alleles detected in this study.

Allele name	GenBank accession number	Number of observed breeds	Number of observed dogs
<i>(A) DLA-88 alleles</i>			
<i>DLA-88*001:03</i>	KR818710	3 breeds and mongrel	11
<i>DLA-88*002:01</i>	AF100568, AF101487	9 breeds and mongrel	19
<i>DLA-88*003:02</i>	KF911090	13 breeds	49
<i>DLA-88*004:02</i>	AF100578, AF101497	9 breeds and mongrel	54
<i>DLA-88*005:01</i>	AF100571, AF101490	8 breeds and mongrel	18
<i>DLA-88*006:01</i>	AF100572, AF101491	15 breeds and mongrel	85
<i>DLA-88*010:01</i>	AF100576, AF101495	2 breeds	4
<i>DLA-88*011:01</i>	DQ469801	1 breed	1
<i>DLA-88*012:01</i>	EF055179	9 breeds and mongrel	29
<i>DLA-88*012:02</i>	HQ340115	1 breed and mongrel	2
<i>DLA-88*016:03</i>	KF939645	2 breeds	5
<i>DLA-88*017:01</i>	AF100583, AF101502	13 breeds	49
<i>DLA-88*021:01</i>	HQ340114	1 breed	1
<i>DLA-88*022:01</i>	AF100588, AF101507	1 breed	1
<i>DLA-88*025:01</i>	AF100591, AF101510	2 breeds	5
<i>DLA-88*028:01</i>	AF100594, AF101513	6 breeds and mongrel	28
<i>DLA-88*028:03</i>	HQ340113	3 breeds	6
<i>DLA-88*029:01</i>	HQ340112	13 breeds and mongrel	48
<i>DLA-88*032:01</i>	HQ340116	4 breeds	9
<i>DLA-88*034:01</i>	AF100600, AF101519	4 breeds and mongrel	15
<i>DLA-88*035:01</i>	AF100601, AF101520	1 breed	4
<i>DLA-88*036:01</i>	KF911094	2 breeds	2
<i>DLA-88*039:01</i>	AF100605, AF101524	2 breeds	6
<i>DLA-88*040:01</i>	KR818708	1 breed	1
<i>DLA-88*041:01</i>	AF100607, AF101526	3 breeds and mongrel	12
<i>DLA-88*045:01</i>	KR364870	4 breeds	13
<i>DLA-88*049:01</i>	KF911093	2 breeds	2
<i>DLA-88*051:01</i>	HQ340121	4 breeds and mongrel	9

Table 4. continued

<i>DLA-88*501:01</i>	AF100577, AF101496	18 breeds and mongrel	66
<i>DLA-88*502:01</i>	AF100599, AF101518	2 breeds and mongrel	8
<i>DLA-88*508:01</i>	AF100587, AF101506	14 breeds and mongrel	46
<i>DLA-88L</i>	HQ340122	3 breeds	9
<i>DLA-88*nov1</i>	LC130509	1 breeds and mongrel	6
<i>DLA-88*nov2</i>	LC130504	3 breeds and mongrel	9
<i>DLA-88*nov3</i>	LC130510	2 breeds and mongrel	12
<i>DLA-88*nov4</i>	LC130516	2 breeds	6
<i>DLA-88*nov5</i>	LC130522	1 breed	3
<i>DLA-88*nov6</i>	LC130523	1 breed	1
<i>DLA-88*nov7</i>	LC130527	2 breeds	6
<i>DLA-88*nov8</i>	LC130519	3 breeds	11
<i>DLA-88*nov9</i>	LC130502	2 breeds and mongrel	7
<i>DLA-88*nov10</i>	LC130505	3 breeds	8
<i>DLA-88*nov11</i>	LC130521	2 breeds and mongrel	8
<i>DLA-88*nov12</i>	LC130508	1 breed	2
<i>DLA-88*nov13</i>	LC130517	3 breeds	5
<i>DLA-88*nov14</i>	LC130506	2 breeds and mongrel	8
<i>DLA-88*nov15</i>	LC130515	4 breeds	13
<i>DLA-88*nov17</i>	LC130513	4 breeds and mongrel	18
<i>DLA-88*nov18</i>	LC130525	1 breed and mongrel	12
<i>DLA-88*nov19</i>	LC130503	4 breeds and mongrel	10
<i>DLA-88*nov20</i>	LC130520	1 breed	1
<i>DLA-88*nov21</i>	LC130511	1 breed and mongrel	10
<i>DLA-88*nov22</i>	LC130524	mongrel	1
<i>DLA-88*nov23</i>	LC130507	1 breed	2
<i>DLA-88*nov24</i>	LC130514	4 breeds and mongrel	15
<i>DLA-88*nov25</i>	LC130518	4 breeds and mongrel	22
<i>DLA-88*nov26</i>	LC171419	1 breed and mongrel	3
<i>DLA-88*nov27</i>	LC130526	1 breed and mongrel	1
<i>DLA-88*nov28</i>	LC171420	1 breed	1

Table 4. continued

<i>DLA-88*nov29</i>	LC171421	1 breed	1
<i>DLA-88*nov30</i>	LC171422	1 breed	1
<i>DLA-88*nov31</i>	LC171423	1 breed	1
<i>DLA-88*nov32</i>	LC171424	3 breeds	2
<i>DLA-88*nov33</i>	LC171425	1 breed	1
<i>DLA-88*nov34</i>	LC171426	1 breed	1
<i>DLA-88*nov35</i>	LC171427	1 breed	1
<i>DLA-88*nov36</i>	LC171428	1 breed	1
<i>DLA-88*nov37</i>	LC171429	1 breed	2
<i>DLA-88*nov38</i>	LC171430	1 breed	1
<i>DLA-88*nov39</i>	LC171431	1 breed	2
<i>DLA-88*nov40</i>	LC171432	1 breed	1
<i>DLA-88*nov41</i>	LC171433	1 breed	1
<i>DLA-88*nov42</i>	LC171434	1 breed	1
<i>DLA-88*nov43</i>	LC171435	1 breed	1
<i>DLA-88*nov44</i>	LC171436	1 breed	1
<i>DLA-88*nov45</i>	LC171437	1 breed	1
(B) <i>DLA-12</i> alleles			
<i>DLA-12*1</i>	U55026	40 breeds and mongrel	275
<i>DLA-12*nov1-2</i>	LC130528	2 breeds and mongrel	4
<i>DLA-12*nov1-3</i>	LC130529	15 breeds and mongrel	48
<i>DLA-12*nov1-4</i>	LC130530	5 breeds and mongrel	14
<i>DLA-12*nov2</i>	LC130531	4 breeds and mongrel	10
<i>DLA-12*nov3</i>	LC130532	2 breeds and mongrel	16
<i>DLA-12*nov3-2</i>	LC130533	2 breeds	6
<i>DLA-12*nov4</i>	LC130534	5 breeds and mongrel	32
<i>DLA-12*nov4-2</i>	LC130535	1 breed	1
<i>DLA-12*nov5</i>	LC130536	3 breeds	11
<i>DLA-12*nov6</i>	LC130537	10 breeds and mongrel	44
<i>DLA-12*nov7</i>	LC130538	1 breed	6
<i>DLA-12*nov8</i>	LC130539	4 breeds and mongrel	19

Table 4. continued

<i>DLA-12*nov9</i>	LC130540	2 breeds and mongrel	14
<i>DLA-12*nov10</i>	LC130541	1 breed	6
<i>DLA-12*nov11</i>	LC130542	3 breeds	9
<i>DLA-12*nov12</i>	LC130543	1 breed	1
<i>DLA-12*nov13</i>	LC130544	mongrel	1
<i>DLA-12*nov14</i>	LC130545	3 breeds	3
<i>DLA-12*nov15</i>	LC130546	1 breed	1
<i>DLA-12*nov16</i>	LC130547	1 breed	1
(C) <i>DLA-64</i> alleles			
<i>DLA-64*nov2</i>	LC171439	48 breeds and mongrel	380
<i>DLA-64*nov2-2</i>	LC171440	5 breeds	18
<i>DLA-64*nov2-3</i>	LC171441	1 breed	8
<i>DLA-64*nov2_e1</i>	LC171442	18 breeds and mongrel	73
<i>DLA-64*nov2-2_e1</i>	LC171443	4 breeds	14
<i>DLA-64*nov3</i>	LC171444	3 breeds	5
<i>DLA-64*nov4</i>	LC171445	1 breed	1
(D) <i>DLA-DRB1</i> alleles			
<i>DRB1*001:01</i>	M57529	21 breeds and mongrel	68
<i>DRB1*001:02</i>	M57528, S76138	3 breeds and mongrel	10
<i>DRB1*002:01</i>	M57537	10 breeds and mongrel	38
<i>DRB1*002:03</i>	AM076472	2 breeds	18
<i>DRB1*003:02</i>	JN558742	4 breeds	7
<i>DRB1*004:01</i>	M57532	1 breed	1
<i>DRB1*005:01</i>	AJ003017, AF098496	2 breeds	2
<i>DRB1*006:01</i>	M57534	15 breeds and mongrel	65
<i>DRB1*008:02</i>	AJ012456	3 breeds	6
<i>DRB1*009:01</i>	M57531	13 breeds and mongrel	64
<i>DRB1*010:011</i>	AF016910	1 breed	2
<i>DRB1*011:01</i>	X93573	3 breeds and mongrel	7
<i>DRB1*011:03</i>	EU528635	1 breed and mongrel	10
<i>DRB1*012:01</i>	AJ003015	10 breeds and mongrel	34

Table 4. continued

<i>DRB1*013:01</i>	U44778	5 breeds and mongrel	20
<i>DRB1*015:01</i>	M57536, AF016912	21 breeds and mongrel	104
<i>DRB1*015:02</i>	AJ003013	15 breeds and mongrel	59
<i>DRB1*015:03</i>	AJ003014	2 breeds	7
<i>DRB1*015:04</i>	AJ311091	1 breed and mongrel	2
<i>DRB1*015:05</i>	JQ904810	1 breed	2
<i>DRB1*016:01</i>	AJ012454	1 breed	1
<i>DRB1*017:01</i>	U44780	2 breeds	3
<i>DRB1*017:02</i>	AJ311092	2 breeds	4
<i>DRB1*018:01</i>	U44781	5 breeds	7
<i>DRB1*020:01</i>	U58684	7 breeds and mongrel	19
<i>DRB1*023:01</i>	AJ003016	4 breeds and mongrel	14
<i>DRB1*025:01</i>	AJ003019	3 breeds	11
<i>DRB1*028:01</i>	AF061038	1 breed	2
<i>DRB1*033:01</i>	AF343737	1 breed	6
<i>DRB1*040:01</i>	AF343741	1 breed	1
<i>DRB1*046:01</i>	AF343747	1 breed and mongrel	8
<i>DRB1*048:01</i>	AJ311093	2 breeds	3
<i>DRB1*052:01</i>	AJ311096	1 breed and mongrel	6
<i>DRB1*056:01</i>	AY126656	1 breeds and mongrel	32
<i>DRB1*058:01</i>	AY220508	1 breed	3
<i>DRB1*073:01</i>	AM076477	3 breeds and mongrel	9
<i>DRB1*075:01</i>	AM076479	1 breed	2
<i>DRB1*092:01</i>	AM408904	2 breeds and mongrel	17
<i>DRB1*094:01</i>	FM246838	1 breed	5
<i>DRB1*095:01</i>	FM246833	1 breed	1
<i>DRB1*098:01</i>	DQ056279	1 breed	1
<i>DRB1*novA</i>	LC130497	1 breed	1
<i>DRB1*novB</i>	LC130499	1 breed	1
<i>DRB1*novC</i>	LC130496	mongrel	3
<i>DRB1*novD</i>	LC130501	1 breed	1

Table 4. continued

<i>DRB1*<i>novE</i></i>	LC130498	1 breed	2
<i>DRB1*<i>novF</i></i>	LC130500	1 breed	2

Bold letters indicate newly identified *DLA* allele sequences.

Table 5. 17 *DLA-88* - *DLA-88* allelic haplotypes based on *DLA-class I* cDNA analysis

	<i>DLA-88</i>	<i>DLA-88</i>
1	*003:02	*017:01
2	*005:01	*nov13
3	*021:01	*016:04
4	*025:01	*016:03
5	*028:01	*029:01
6	*028:03	*029:01
7	*nov2	*nov19
8	*nov10	*016:04
9	*nov15	*029:01
10	*nov15	*nov36
11	*nov23	*nov12
12	*nov28	*nov13
13	*nov29	*nov30
14	*nov32	*029:01
15	*nov34	*nov19
16	*nov42 -	*029:01
17	*nov44 -	*nov45

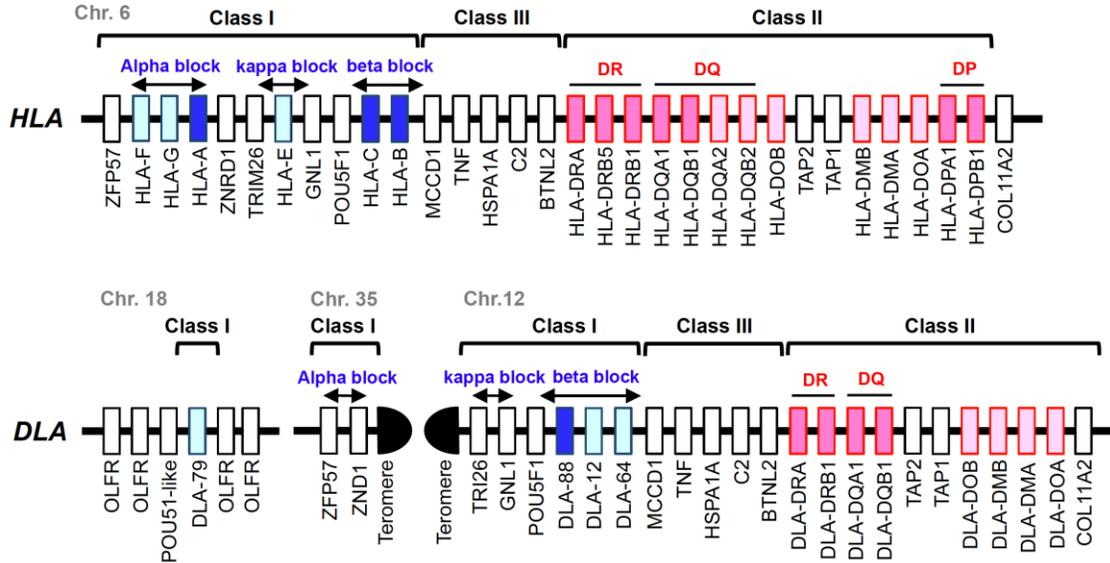


Figure 1. Comparative map of the *HLA* and *DLA* genomic regions. The genetic maps are based on the genomic information of the NCBI map viewer. The regions are divided into three sub-regions, class I, class III and class II. The class I region is separated into three blocks, the alpha, beta and kappa blocks (Kulski et al. 2002; Kumanovics et al. 2003; Shiina et al. 2017) as indicated by blue letters and horizontal arrows. Dark and light blue boxes indicate classical and non-classical MHC class I genes, respectively, dark and light pink boxes indicate classical and non-classical MHC class II genes, respectively, and white boxes indicate the non-MHC genes that are the landmarks for defining the comparative MHC sub-regions and blocks between the *HLA* and *DLA* regions.

5'UTR

DLA-88 1 AGCCAATCAGCGGCACCGGGTCCCGGGCTCTAAAGCCTCCGCCGCCCTCCGCCCCCA 60
DLA-12 1 AGCCAATCAGCGGCACCGGGTCCCGGGCTCTGAAG--TCCACACCAGAA----CCGCCA 53
DLA-64 1 AGCCAATCAGCGGCACCGGGTCCCGGGCTCGAAAGCCTCCGCCGCCCTCCGCCCCCA 60

SP (exon 1)
Primers for RT-PCR and genomic analyses

88/64-F
DLA-88 61 GTCCAGCGGCGACGGCCAGTGTCCCCGGAGCC CGGAG | ATGGAGGTGGTGA TGCCGCGAGC 120
DLA-12 54 G----GACGCAGCTGC----TCCAC CGACCTAAAG | GTCTGGGCTATGGTGCCCGGAAC 104
DLA-64 61 GTCCGCGGCGACGGCCAGTGTCCCCGGAGCC CGGAG | ATGGAGGTGGTGA TGCCGCGAGC 120

alpha 1 domain (exon 2)

DLA-88 121 CCTCCTCGTGTGCTGTCGGCGGCCCTGGCCGTGACCCTGACCCGGGCGG | GCTCCCACTC 180
DLA-12 105 CCTAGCCCTGCTGCTGTCGGGGCCCTGGCCGTGACCCTGACCCGGGCGG | GCTCCCACTC 164
DLA-64 121 CCTCCTCGTGTGCTGTCGGCGGCCCTGGCCGTGACCCTGACCCGGGCGG | GCTCCCACTC 180

DLA-88 181 CCTGAGGTATTTCTACACCTCCGTGTCCCGGCCCGGCCGGGGACCCCGCTTCATCGC 240
DLA-12 165 CCTGAGGTATTTCTACACCTCCGTGTCCCGGCCCGGCCGGGGACCCCGCTTCATCGC 224
DLA-64 181 CCTGAGGTATTTCTACACCTCCGTGTCCCGGCCCGGCCGGGGACCCCGCTTCATCGC 240

DLA-88 241 CGTCGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACGCGGCCACTGGGAG 300
DLA-12 225 CGTCGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACGCGGCCACTGGGAG 284
DLA-64 241 TGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCCTGCGGTTCAACAGCGACGCGCGAGTCCGAA 300

DLA-88 301 GATGGAGCCGCGGGCGCCGTGGATGGAGCAGGAGGGCCGGAGTATTTGGGACCCGGAGAC 360
DLA-12 285 GATGGAGCCGCGGGCGCCGTGGTGGAGCAGGAGGGCCGGAGTATTTGGGACCCGCAGAC 344
DLA-64 301 GGTGGAGCCGCGGGCGCCGTGGATGGAGCAGGAGGGCCGGAGTATTTGGGAGGAGCAGAC 360

DLA-88 361 GCGGACCGTCAAGGAGACCGCACAGAGGTACCGAGTGGACCTGGACACCCCTGCGCGGCTA 420
DLA-12 345 GCGGACCATCAAGGAGACCGCACGGACTTTCCGAGTGGACCTGGACACCCCTGCGCGGCTA 404
DLA-64 361 GGAGATCGCCAAGGTGCACGCCAGACCTCCCGATCAACCTGCAGACGCCCTCGGCTA 420

alpha 2 domain (exon 3)

DLA-88 421 CTACAACCAGAGCGAGGCCG | GGTCTCACACCCGCCAGACCATGTACGGCTGTGACCTGGG 480
DLA-12 405 CTACAACCAGAGCGAGGCCG | GGTCTCACACCTTCCAGTGGATGTTTGGCTGTGACCTGGG 464
DLA-64 421 CTACAACCAGAGCGAGGCCG | GGTCTCACACCTTCCAGTGGACTTCGGGCTGCGACGTGGG 480

DLA-88 481 GCCCGCGGGCGCCCTCCTCCGCGGGTACAGTCAGGACGCCTACGACGGCGCCGATTACAT 540
DLA-12 465 GCCCGCGGGCGCCCTCCTCCGCGGGTACAGTCAGGACGCCTACGACGGCGCCGATTACAT 524
DLA-64 481 GCCCGAGCGGGCGCCCTCCTCCGCGGGTATGAGCAGTTCGCGTACGACGGCGCCGATTACCT 540

DLA-88 541 CGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCGGCAGACGCGCGCGCAGATCACCCG 600
DLA-12 525 CGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCGGCAGACGCGCGCGCAGATCACCCG 584
DLA-64 541 GGCCCTGGACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCGGCAGACGCGCGCGCAGATCACCCG 600

DLA-88 601 GCGCAAGTGGGAGGCGGCAGGTACTGCAGAGCACGAT---AGGAACTACCTGGAGACGACGTG 660
DLA-12 585 GCGCAAGAGGAGGCGGCAGGTGATGCAGGGCACCTG---AGGAACTACCTGGAGACGACGTG 644
DLA-64 601 GCGCAAGTGGGAGGCGGCAGGTACTGCAGAGCACGAT---CGGATATACCTGCAGGGGAGTG 660

alpha 3 domain (exon 4)

DLA-88 661 CGTGGAGTGGCTGCGGAGGTACCTGGAGATGGGGAAGGAGACGCTGCTGCGCGCAG | AACCC 720
DLA-12 645 CGTGGAGTGGCTGCGGAGGTACCTGGAGATGGGGAAGGAGACGCTGCTGCGCGCAG | AACCC 704
DLA-64 661 CGTGCAGTTCCTTAAGTACCTGGAGAGAGGGAAGGAGACCCCTGCAGCTCACAG | ATCC 720

Primers for RT-PCR, genomic and quantitative PCR analyses

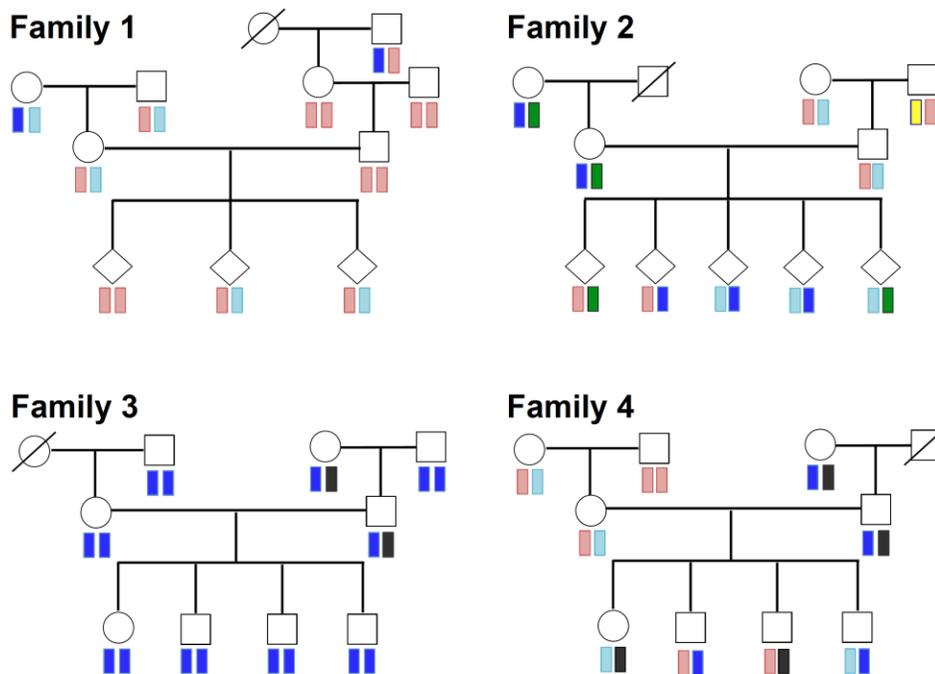
88/12-R
DLA-88 721 CCCCAGCACACGTGTGACCCGCCACC CCATCTCTGACCATGAGGTACCCCTGAGGTGCTG 780
DLA-12 705 CCCCAGCACACGTGTGACCCGCCACC CCGTCTCTGACCATGAGGTACCCCTGAGGTGCTG 764
DLA-64 721 TCCAAAAATCTACCTGACCCGCCACC CATCTCTGACCATGAGGTACCCCTGAGGTGCTG 780

DLA-88	781	GGCGCTGGGCTTCTACCTGCGGAGATCACCTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGACCA	840
DLA-12	765	GGCGCTGGGCTTCTACCTGCGGAGATCACCTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGACCA	824
DLA-64	781	GGCGCTGGGCTTCTACCTGCGGAGATCACCTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGACCA	840

DLA-88	841	GACCCAGGACACAGAGGTTGTGGACACAAGCCTGCAGGAGATGGGACCTTCCAGAAGTG	900
DLA-12	825	GACCCAGGACACAGAGGTTGTGGACACAAGCCTGCAGGAGATGGGACCTTCCAGAAGTG	884
DLA-64	841	GACCCAGGACACAGAGGTTGTGGACACAAGCCTGCAGGAGATGGGACCTTCCAGAAGTG	900

DLA-88	901	GGCGGCCGTGGTGGTGCCCTCTGGACAGGAGCAGAGATACACGTGCCACGTGCAGCATGA	960
DLA-12	885	GGCGGCCGTGGTGGTGCCCTCTGGACAGGAGCAGAGATACACGTGCCACGTGCAGCATGA	944
DLA-64	901	GGCAGCTGTGGTGGTGCCCTCTGGACAGGAGCAGAGATACACGTGCCACGTGCAGCATGA	960
		.*.***	
		TM (exon 5)	
DLA-88	961	GGGGCTGGCGGAGCCTGTACGCGGAGATGGG AGCCTTCCCCTCTGTCCACCATTGTCAT	1020
DLA-12	945	GGGGCTGGTGGAGCCTGTACGCGGAGATGGG AGCCTTCCCCTCTGTCCACCATTGTCAT	1004
DLA-64	961	GGGGCTGGCGGAGCCTGTACGCGGAGATGGG AGCCTTCCCCTCTGTCCACCATTGTCAT	1020
		*****.*****	
DLA-88	1021	CGTCAGCATTGCTGCTCTGGTTCTCCTCGTGGTCTCTGGGGTGATTGGAGCTGTGATCTG	1080
DLA-12	1005	CGTCAGCATTGCTGCTCTGGTTCTCCTCGTGGTCTCTGGGGTGATTGGAGCTGTGATCTG	1064
DLA-64	1021	CGTCAGCATTGCTGCTCTGGTTCTCCTCGTGGTCTCTGGGGTGATTGGAGCTGTGATCTG	1080
		*****.*****	
		CY (exon 6)	CY (exon 7)
DLA-88	1081	GAGGAAGCAGCGCTCGG GAGGAAAAGGACCAGGCTACTCTCATGCTGCAC GTGATGACAG	1140
DLA-12	1065	GAGGAAGCAGCGCTCGG GAGGAAAAGGACCAGGCTACTCTCATGCTGCAC GCGATGACAG	1124
DLA-64	1081	GAGGAAGCAGCGCTCGG GAGGAAAAGGACCAGGCTACTCTCATGCTGCAC GTGATGACAG	1140
		*****.* *****	

Figure 2. Nucleotide alignment for *DLA-class I* cDNA sequences and primer locations. The nucleotide alignment of *DLA-class I* genes was constructed using *DLA-88* (NM_001014767.1), *DLA-12* (NM_001014379.1) and *DLA-64* (NM_001014378.1) cDNA sequences. The *DLA-79* cDNA sequence was not included in the alignment due to too many nucleotide differences. 5'UTR, SP, TM and CY indicate 5' untranslated region, signal peptide region, transmembrane region and cytoplasmic region, respectively. Hyphen indicates insertion or deletion site, and asterisk and period indicate matched and mismatched site among three sequences, respectively. Yellow background (around positions 100 bp) indicates sense primers for RT-PCR and genomic analyses and green background (around positions 730 bp) indicates anti-sense primers for RT-PCR. These primer information indicated Table 2A.



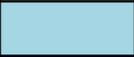
Coloured label	<i>DLA-88</i>	<i>DLA-88</i>	<i>DLA-12</i>	<i>DLA-64</i>	<i>DLA-DRB1</i>	Number of dogs
	<i>012:01</i>	-	1	<i>nov2</i>	<i>015:01</i>	19
	<i>501:01</i>	-	1	<i>nov2</i>	<i>006:01</i>	14
	<i>502:01</i>	-	1	<i>nov2</i>	<i>001:02</i>	20
	<i>508:01</i>	-	<i>nov1-3</i>	<i>nov2</i>	<i>002:01</i>	6
	<i>nov2</i>	<i>nov19</i>	1 or none	<i>nov2 or none</i>	<i>001:01</i>	1
	<i>nov9</i>	-	<i>nov1-2</i>	<i>nov2</i>	<i>015:01</i>	4

Figure 3. Inheritance of *DLA-class I* haplotypes based on *DLA-class I* cDNA analysis in four beagle families. A total of 38 beagles from four families were used for this study. Colored bars show the *DLA* haplotypes that are indicated in the table below the four pedigree charts. ○ and □ in the family trees represent female and male, respectively. The *DLA-12* and *DLA-64* alleles for haplotype with yellow color could not estimate.

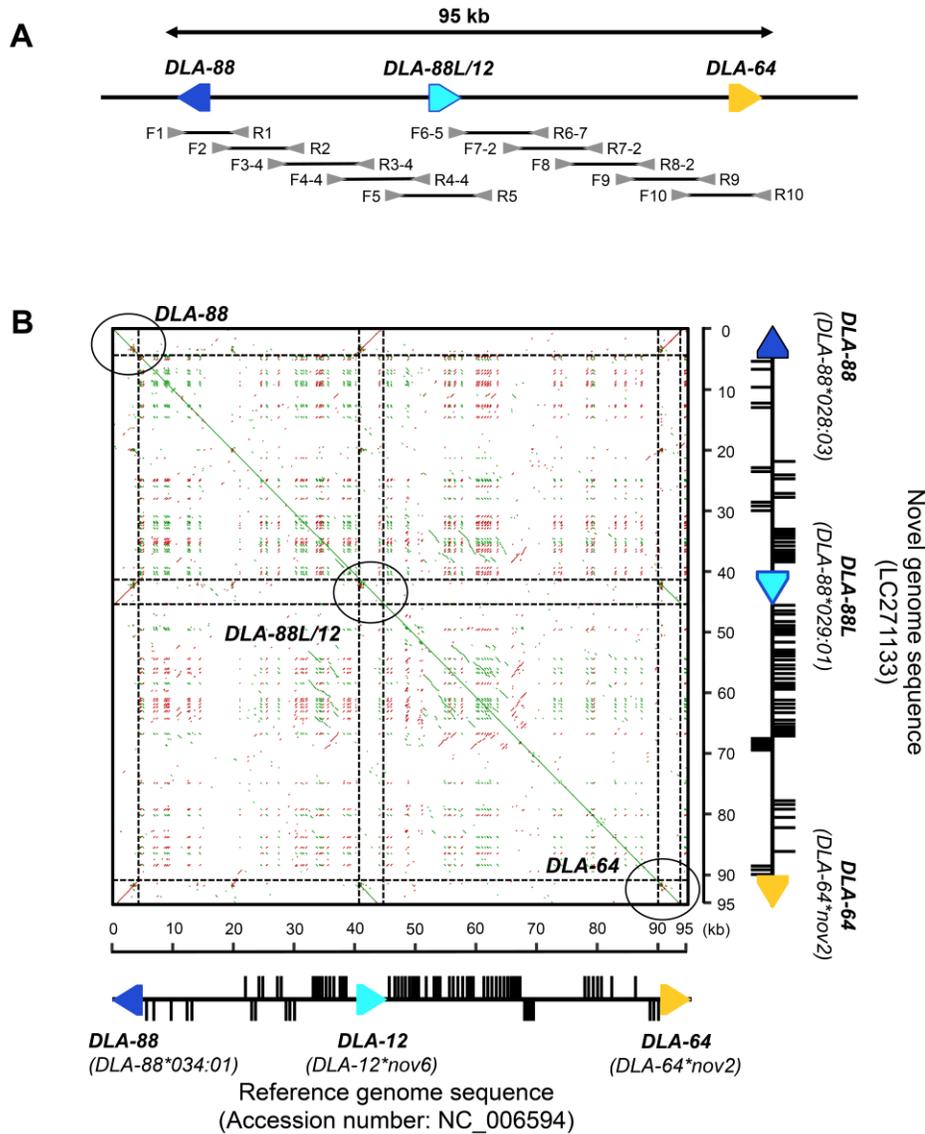


Figure 4. Genomic comparison of *DLA-class I* segments by dot-matrix analysis. (A) Sequence-ready map of the 95-kb genomic segment, ranging from *DLA-88* to *DLA-64*, for the genomic comparison between the *DLA-88 - DLA-12 - DLA-64* and the *DLA-88 - DLA-88L - DLA-64* segments. The exact primer names and primer sequences are shown in **Table 2B**. (B) Dot-matrix of the 95-kb gene segments between *DLA-88 - DLA-12 - DLA-64* and the *DLA-88 - DLA-88L - DLA-64* segments. Horizontal and vertical axes show the reference *DLA-88 - DLA-12* genome sequence (accession number: NC_006594) and the novel *DLA-88 - DLA-88L* genome

sequence (LC271133). Green dots represent alignments of forward reads and red dots correspond to alignments between the reverse complement of one sequence and the forward read of the other. Dark blue, light blue and orange triangles indicate positions of *DLA-88*, *DLA-88L/12* and *DLA-64* loci, respectively, and the black vertical bars between these triangles (*DLA-class I* genes) indicate the position of LINE interspersed sequences. Parenthesis indicates *DLA-class I* allele name. The three large circles in the dot-matrix indicate the location of the orthologous *DLA-class I* genes in the two genomic sequences.

第3章

DLA 遺伝子の多型性の解明

DLA-88L アレルの検出、各 DLA クラス I アレルの比較解析

および DLA ハプロタイプの推定

3.1. 緒論

第2章で行った、*DLA-88*の多型解析およびクラスI領域のゲノム解析の結果から *DLA* クラス I 遺伝子において、*DLA-88* は非常に多型性に富んでおり、また *DLA-12* も比較的多様性が高いことが明らかとなった。一方で、*DLA-64* は非常に多型性に乏しいことが分かった。さらに、*DLA-88* が重複している *DLA-88-DLA-88* ハプロタイプでは、*DLA-12* が *DLA-88* に完全に置き換わっていることが明らかとなり、今回この新規遺伝座を *DLA-88L* と命名した。その結果、*DLA* クラス I 遺伝子領域において、*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していることが確認された。第2章で用いた *DLA-88* 特異的プライマーは、実際には *DLA-88* と *DLA-88L* のどちらも増幅してしまうため、これまでの多型解析法では、検出された *DLA-88* アレルが *DLA-88* または *DLA-88L* 遺伝座のどちらに由来するのか正確な分類が行えないことが問題であった。さらに *DLA-88* アレルを3アレル以上保有する個体においては、*DLA-88* 特異的プライマーを用いたダイレクトシーケンス法によりアレル塩基配列を完全に決定することは非常に難しく、多くの場合サブクローニングを行う必要があるためタイピングに時間がかかることも問題であった。

そこで、これらの課題を解決するため、本研究ではまず *DLA-88L* 遺伝座由来のアレルを *DLA-88* および *DLA-12* 遺伝座由来のアレルと分類可能であり、且つより簡便な多型解析法の確立を試みた。さらに、*DLA* クラス I 遺伝子の系統学的および機能的な違いを明らかにするため、*DLA-88*, *DLA-12*, *DLA-88L* および *DLA-64* の各アレルをそれぞれ用いて、分子系統解析、各遺伝子における発現量の定量および推定アミノ酸配列の比較

を行なった。そして、*DLA-88 - DLA-12/88L - DLA-64 - DLA-DRB1* の4座におけるハプロタイプ推定を行い、イヌ全体および各犬種における DLA 遺伝子の多型性を解明することを試みた。

3.1. 材料および方法

3.1.1 供試サンプル

第2章で使用した、ビーグル4家系38頭および非血縁個体49犬種404頭のイヌ全血由来のcDNAおよびゲノムDNAを用いた。

3.1.2 *DLA-88L* 遺伝子のタイピング

DLA-88 アレルを3つ以上保有する105頭のゲノムDNAを鋳型として *DLA-12/88L* 遺伝子領域 (約 5.6 kb) を特異的に増幅可能なプライマー (12/88L-seg-F および 12/88L-seg-R) を用いて PCR を行った。PCR 増幅は KOD FX を用いて、最初に 94°C、2 分間の熱変性を行なった後、98°C/10 秒、58°C/30 秒、68°C/5 分の 3 工程を 1 サイクルとし、合計 33 サイクルの反応を行なった。その後、得られた増幅産物を精製するため、増幅産物 1 ul に対して ExoSap-IT (Thermo Fisher Scientific) 1 ul および滅菌蒸留水 5 ul を添加し、37°C/15 分、80°C/15 分の計 30 分間のインキュベーションを行なった。精製後、*DLA-88* 遺伝子特異的なプライマー (88/64-F および 88-/12-R) および *DLA-12* 遺伝子特異的なプライマー (12-F および 88/12-R) を用いて、Nested PCR を行った。PCR は KOD FX を用いて、最初に 94°C、2 分間の熱変性を行なった後、98°C/10 秒、63°C/30 秒、68°C/1 分 30 秒の 3 工程を 1 サイクルとし、合計 33 サイクルの反応を行なった。その後、ダイレクトシーケンシング法により塩基配列決定とアレルの判定を行った。

DLA-12/88L 遺伝子領域 (約 5.6 kb) を特異的に増幅可能なプライマーおよびこの領

域を決定するために用いたシーケンスプライマー情報を Table 1B1, Table 1B2 および Figure 1A に示した。

3.1.3 サンガー法による塩基配列の決定

得られた RT-PCR 増幅産物を精製するため、増幅産物 1 ul に対して ExoSap-IT (Thermo Fisher Scientific) 1 ul および滅菌蒸留水 5 ul を添加し、37°C/15 分、80°C/15 分の計 30 分間のインキュベーションを行なった。精製後、増幅産物の塩基配列は Big Dye terminator 法を用いてサンガーシーケンサー ABI3130 (Applied Biosystems/Life Technologies/Thermo Fisher Scientific) により決定した。塩基配列の解析には Sequencher Ver. 5.0.1 (Gene Code Co.) を用いた。

3.1.4 塩基類似性の解析

アレル塩基配列間の類似性の比較を行うため、MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) を用いて clustalw プログラムによるアライメントを行い、配列間の Identity score を得た。

3.1.5 DLA クラス I 遺伝子における分子系統解析

本研究で検出された DLA クラス I 遺伝子のアレルのうち、既に IPD/MHC もしくは NCBI データベースに登録されているアレルおよび 3 個体以上で検出された頻度の高い新規アレルを含む 73 アレル (45 種類の *DLA-88* アレル、7 種類の *DLA-88L* アレル、15 種類の *DLA-12* アレルおよび 6 種類の *DLA-64* アレル) および公開されている 6

種類の *DLA-79* アレルのエキソン 1-3 の塩基配列を用いて Molecular Evolution Genetics Analysis software 6 (MEGA6) (Tamura et al. 2013) による分子系統解析を行った。分子系統樹は進化のポジティブセレクションによる影響を除くため、Neighbor-joining 法 (NJ 法) を用いて、同義置換のみを考慮することで作成した。アウトグループとしてマウス MHC クラス I 遺伝子である *H2-D1* (accession num. : NM_010380) および *H2-K1* (accession num. : NM_001001892) の塩基配列を使用した。

3.1.6 DLA クラス I 遺伝子における遺伝子発現量解析

DLA-88 - DLA-12 - DLA-64 ハプロタイプまたは *DLA-88 - DLA-88L - DLA-64* ハプロタイプのホモ接合個体 10 頭または 12 頭の cDNA を鋳型として、Thermal Cycler Dice Real Time System II (TaKaRa Bio) および SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa Bio, Shiga, Japan) を用いて、リアルタイム PCR を行った。プライマーは 9 アレルに特異的なプライマーを新たに設計し、プライマーの特性はダイレクトシークエンシングにより確認した。PCR 反応は最初に 94°C、1 分間の熱変性を行なった後、95°C/10 秒、60°C/20 秒の 2 工程を 1 サイクルとし、合計 40 サイクルの反応を行なった。融解曲線分析により、プライマーダイマーなど、目的とする産物以外の PCR 増幅が無いことも確認した。本解析によって得られたデータ (Ct 値) は $\Delta\Delta Ct$ 法によって下記の通り計算した。各遺伝子発現量は $2^{-\Delta Ct}$ の計算式により、内部標準遺伝子である *GAPDH* の発現量を基準として標準化し、その後コントロールの発現量を 1 とした時の相対発現量として算出するために、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ の計算式に基づき処理を行った。なお、 ΔCt および $\Delta\Delta Ct$ の値は下記の

通りに算出している。

$$\Delta Ct = Ct_{\text{対象遺伝子}} - Ct_{ef1\alpha}$$

$$\Delta\Delta Ct = Ct_{\text{対象サンプル}} - Ct_{\text{コントロールサンプル}}$$

統計解析は、統計解析ソフト R を用いて実施した。

3.1.7 DLA クラス I 遺伝子における推定アミノ酸配列の比較

本研究で検出された DLA クラス I 遺伝子のアレルのうち、既に IPD/MHC もしくは NCBI データベースに登録されているアレルおよび 3 個体以上で検出された頻度の高い新規アレルを含む 73 アレル (45 種類の *DLA-88* アレル、7 種類の *DLA-88L* アレル、15 種類の *DLA-12* アレルおよび 6 種類の *DLA-64* アレル) および公開されている 6 種類の *DLA-79* アレルのエキソン 2-3 の塩基配列から推定アミノ酸配列を取得した。シーケンスロゴは Weblogo 3 (<http://weblogo.threepiusone.com/create.cgi>) (Crooks et al. 2004) を用いて作成した。

3.1.8 DLA ハプロタイプの推定

DLA-88, *DLA-12/88L*, *DLA-64* および *DLA-DRB1* の 4 遺伝座における多型情報を基に、各犬種においてハプロタイプ推定を行った。ハプロタイプ推定は、DLA 遺伝子ホモ接合体を基準としたマニュアルによる推定および PHASE プログラム (Stephens et al. 2001) を使用することにより行った。

3.3. 結果

3.3.1 *DLA-88L* 遺伝子に由来するアレルの決定

DLA-12 もしくは *DLA-88L* を含む 5.6 kb のゲノム領域を増幅可能なプライマーを用いて、第 2 章において検出された *DLA-88 – DLA-12* ハプロタイプのホモ接合個体 (88-12 ホモ)、*DLA-88 – DLA-88* ハプロタイプのホモ接合個体 (88-88 ホモ) および *DLA-88 – DLA-12* と *DLA-88 – DLA-88* のヘテロ接合個体 (88-12/88-88L ヘテロ) のゲノム DNA を鋳型とし PCR 増幅を行った (Figure 1A)。その結果、いずれのサンプルにおいても 5.6 kb 付近に単一のバンドが確認された。(Figure 1B)。そこで、次に 5.6 kb の PCR 増幅産物を鋳型として、*DLA-88* 遺伝子特異的プライマーを用いて PCR 増幅を行ったところ、88-12 ホモでは、バンドが検出できなかったが、88-88 ホモおよび、88-12/88-88L ヘテロでは 1.6 kb 付近に単一のバンドが検出された。一方、*DLA-12* 遺伝子特異的プライマーを用いて PCR 増幅を行ったところ、88-88 ホモではバンドが検出されなかったが、88-12 および 88-12/88-88L ヘテロでは 1.6 kb 付近に単一のバンドが検出された (Figure 5C)。この結果より、まず、*DLA-12* もしくは *DLA-88L* 遺伝子を含む 5.6 kb の領域を PCR 増幅し、その後、この PCR 増幅産物を鋳型とし、*DLA-88* 遺伝子特異的プライマーを用いて Nested PCR 反応を行うことで、*DLA-88L* 遺伝子由来のアレルが検出可能であることが確認された。

そこで、本研究において *DLA-88* アレルが 3 つ以上検出された 105 頭のゲノム DNA を用いて、*DLA-88L* 遺伝子由来のアレルの検出を行ったところ、76 種類の *DLA-88* アレルのうち、10 種類が *DLA-88L* 遺伝子由来であることが確認された (Table 2)。この

結果、これら 105 頭の多型情報より合計 17 種類の *DLA-88* – *DLA-88L* ハプロタイプが推定された (Table 3)。17 種類のハプロタイプのうち、*DLA-88*003:02* – *DLA-88*017:01* は最も頻度が高く 404 頭中 50 頭 (12.4%, 11 犬種) に検出された。また、既報の論文にてハプロタイプを形成する可能性があると考えられていた *DLA-028:03* – *DLA-88*029:01* ハプロタイプも 404 頭中 6 頭で確認された (Ross et al. 2012)。

3.3.2 各 DLA クラス I 遺伝子のアレル塩基配列を用いた分子系統解析

本研究で検出されたアレルのうち、既に IPD/MHC もしくは NCBI データベースに登録されていたアレルおよび本研究で 3 頭以上から検出された頻度の高い新規アレルの合計 73 アレル (*DLA-88*, *DLA-88L*, *DLA-12* および *DLA-64* アレルがそれぞれ 45 種類、7 種類、15 種類および 6 種類) のエキソン 1-3 およびデータベースに登録されている 6 種類の *DLA-79* アレルのエキソン 1-3 の塩基配列を使用し分子系統解析を行った。その結果、各 DLA アレル配列は *DLA-88*, *DLA-12*, *DLA-64* および *DLA-79* 遺伝子の系統に分類された。*DLA-88L* および *DLA-88* 由来のアレル配列はどちらも *DLA-88* の系統に分類された (Figure 2)。

3.3.3 *DLA-88*, *DLA-88L* および *DLA-12* の全長配列における塩基類似性の比較

第 2 章において、*DLA-88L* はゲノム上では *DLA-12* と完全に同じ領域に位置しているにも関わらず、分子系統学的には *DLA-88* と非常に類似していることが示された。そこで、*DLA-88*, *DLA-88L* および *DLA-12* の塩基配列の違いを明確にするため、各

遺伝子のタンパク質翻訳領域全長を含む塩基配列の類似性を比較した。配列の比較には、既に公開されている *DLA-88* (*DLA-88*034:01*, 5,726 bp, NC_006534, position: 891280-897005)、*DLA-12* (*DLA-12*nov6*, 5,649 bp, NC_006534, position: 932034-937682) および本研究にて新たに同定した *DLA-88L* (*DLA-88*017:01*, 5,585 bp, LC189199) の 3 配列を使用した。その結果、約 5.6kb の全長配列における配列類似性は、*DLA-12* と *DLA-88L* 間では 93.5%と非常に高かったのに対し、*DLA-88* と *DLA-12* 間および *DLA-88* と *DLA-88L* 間ではそれぞれ 69.3%および 71.0%と低かった。しかしながら、イントロン配列を含む約 1.1 kb のエキソン 1-3 の塩基配列を比較したところ、*DLA-88* および *DLA-12* 間および *DLA-12* と *DLA-88L* 間では 82.7% および 83.4%であったのに対し、*DLA-88* および *DLA-88L* 間では 95.1%と高かった。このことから、*DLA-88L* のエキソン 1-3 の塩基配列は *DLA-88* 遺伝子と類似性が高い一方で、エキソン 1 の上流およびエキソン 3 の下流の塩基配列は *DLA-12* 遺伝子と類似性が高いことが確認された (Table 4)。

3.3.4 末梢血単核球における各 DLA クラス I 遺伝子の発現解析

末梢血単核球における *DLA-88*, *DLA-88L*, *DLA-12* および *DLA-64* 遺伝子の発現量を定量するため、新たに設計したアレル特異的なプライマーを用いて、定量 PCR による発現解析を行った (Figure 3 and Table 2)。*DLA-88* – *DLA-12* – *DLA-64* または *DLA-88* – *DLA-88L* – *DLA-64* のハプロタイプのホモ接合体それぞれ 10 頭および 12 頭の末梢血単核球由来の cDNA を用いて定量 PCR を行った結果、いずれのハプロタイプにおいても *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

いことが確認わかった。一方、*DLA-12* 遺伝子に関しては *DLA-88* 遺伝子と比較すると有意に発現量が低値を示したのに対し、*DLA-88L* 遺伝子は *DLA-88* 遺伝子と比較しても発現量に有意な差は観察されなかった (Figure 3 および Figure 4)。この結果より、*DLA-88L* 遺伝子を保有している個体では *DLA-12* 遺伝子を保有している個体と比較し、発現量の高い DLA クラス I 遺伝子を多く保有することが明らかとなった。

3.3.5 各 DLA クラス I 遺伝子のアミノ酸配列の比較

MHC クラス I 遺伝子のエクソン 2-3 の配列は抗原ペプチド結合領域 (peptide binding region: PBR) および T 細胞認識領域 (T cell recognition site: TRS) を構成しており、MHC 分子において機能的に非常に重要な配列である。分子系統解析と同様に、本研究で検出されたアレルのうち、*DLA-88*, *DLA-88L*, *DLA-12* および *DLA-64* においてそれぞれ、45 種類、7 種類、15 種類および 6 種類のアレルおよび既報の *DLA-79* 遺伝子の 6 アレルのエクソン 2-3 の塩基配列から、推定アミノ酸配列を取得した。*DLA-88* アレルに関しては、155 番目にロイシン (L) が 1 残基挿入されているアレルが 8 アレル (*DLA-88*501:01*, *DLA-88*502:01*, *DLA-88*503:01*, *DLA-88*504:01*, *DLA-88*505:01*, *DLA-88*506:01*, *DLA-88*507:01* および *DLA-88*508:01*) 報告されていた (Kennedy et al. 2001)、本研究においても、5 つの新規アレル (*DLA-88*nov25*, *DLA-88*nov26*, *DLA-88*nov27*, *DLA-88*nov37* および *DLA-88*nov41*) において、既報の 8 アレルと全く同じ箇所にロイシンの挿入が確認され、これらの 13 のアレルを *DLA-88*50X* グループとした。

HLA クラス I 分子および *DLA-88*508:01* 分子の立体構造解析に基づき、これらの推

定アミノ酸配列において、PBR もしくは TRS を構成すると予測されているアミノ酸配列を抽出し (Bjorkman et al. 1987; Parham et al. 1988; Xiao et al. 2016)、それらのアミノ酸配列を用いてシーケンスロゴを作成した (Figure 5)。TRS のアミノ酸配列に関しては (Figure 5A) 各遺伝座において比較的よく保存されており、DLA-79 から DLA-88 においては 1~6 箇所においてアミノ酸の違いが観察された。これらのうち、3 箇所 (62 番目、72 番目および 169 もしくは 170 番目) におけるアミノ酸の変異は DLA-88, DLA-88L および DLA-12 のアミノ酸配列に共通で確認された。一方、PBR のアミノ酸配列に関しては (Figure 5B)、DLA-88 および DLA-88L 遺伝子においては、それぞれ 19 および 9 箇所のアミノ酸変異が確認され、多型性が高かったのに対し、DLA-12 遺伝子においては 6 箇所であり、比較的よく DLA-88 および DLA-88L 遺伝子と比較して、よく保存されていた。また、DLA-64 および DLA-79 遺伝子に関してはアミノ酸変異が確認されたのはそれぞれ 1 および 4 箇所のみであり、保存性が高かった。

3.3.6 *DLA-88 – DLA-12/88L – DLA-64 – DLA-DRB1* ハプロタイプの推定

犬種ごとにハプロタイプ推定を行った結果、合計で 143 種類のハプロタイプが推定された (Table 5)。これらのうち、*DLA-88 – DLA-12 – DLA-64 – DLA-DRB1* および *DLA-88 – DLA-88L – DLA-64 – DLA-DRB1* の 2 種類の構造多型のハプロタイプはそれぞれ 117 種類および 26 種類確認され、その頻度はそれぞれ、80.7% および 19.3% であった。*DLA-88 – DLA-12 – DLA-64 – DLA-DRB1* ハプロタイプのうち、ハプロタイプ 10 (Hp.010), Hp.029 および Hp.060 はそれぞれ 33 頭、31 頭および 30 頭から検出され、頻度が高いハプロタイプであった。また、Hp.29 を保有しているのは柴犬の 1 犬

種のみであったのに対し、Hp.010 および Hp.060 はそれぞれ 4 犬種および 8 犬種から検出され、犬種間で広く保有されていた。一方、*DLA-88 - DLA-88L - DLA-64 - DLA-DRB1* ハプロタイプにおいては、Hp.121 および Hp.128 はいずれも 6 犬種 28 頭から検出され、これらのハプロタイプも頻度が高く犬種間で広く保有されているハプロタイプであると考えられた。

続いて、解析頭数の多かった代表的な 5 犬種（ミニチュアダックフント（48 頭）、トイプードル（42 頭）、ヨークシャーテリア（41 頭）、柴犬（37 頭）およびチワワ（36 頭））に関してハプロタイプの比較を行った。各犬種から検出されたハプロタイプの種類はトイプードルが 24 種類と最も多かったのに対し、柴犬では 11 種類と少なく、犬種により保有するハプロタイプ数に差異が確認された。さらに、各犬種において最も頻度の高いハプロタイプはミニチュアダックスフント、トイプードル、ヨークシャーテリア、柴犬およびチワワにおいてそれぞれ、Hp.060、Hp.028、Hp.10、Hp.29 および Hp.75 であり異なることが確認された（Table 6）。また、これら 5 犬種において検出された計 74 種類のハプロタイプのうちわずか 6 種類（Hp.28、Hp.40、Hp.67、Hp.72 Hp.121 および Hp.134）のみが 2 犬種以上で共有されているハプロタイプであり、柴犬においては他の 4 犬種と共有しているハプロタイプは検出されなかった（Table 6）。

また、404 頭中 87 頭から合計 37 種類の DLA ハプロタイプホモ接合体が検出された。これら 37 種類中 15 種類は 1 犬種もしくは雑種のみから検出され、犬種特異的なハプロタイプである可能性が考えられたが、残りの 22 種類に関しては 2~8 犬種間で共通に保有されているハプロタイプであった。また、頻度が高く、犬種間で広く保有されている Hp.10 および Hp.60 のホモ接合体も検出された。

これらの37種類のハプロタイプのいずれかを保有しているDLAヘテロ接合個体は合計で226頭（55.9%、37犬種）検出された（Table 7）。

3.4. 考察

本研究では、第2章で得られた DLA クラス I 領域のゲノム情報を基に、*DLA-88* と *DLA-88L* 遺伝座由来のアレルを分類可能な新規タイピング法を確立した。実際に本方法を用いることで、本来 *DLA-12/88L* 由来である 10 アレルが *DLA-88* 由来のアレルとして誤分類されていたことが明らかとなった。この結果より、このタイピング方法は、*DLA-88L* を *DLA-88* および *DLA-12* と明確に区別できるため、DLA クラス I 遺伝子の多型解析法として非常に有用であると考えられる。また、この方法は、既知のゲノム配列および本研究で決定したゲノム配列を参照配列として、*DLA-88* のゲノム全長を特異的に増幅するプライマーを設計することで、*DLA-88* のタイピングにも応用可能であると考えられる。今後、これらのタイピング法を用いて、新規 *DLA-88*–*DLA-88L* ハプロタイプを検出し、各犬種におけるハプロタイプ頻度を解明することは、DLA クラス I 遺伝子の多型性の全貌を把握するために重要な課題である。

これまでに、ブタ、ウマ、ウシ、アカゲザルおよびカニクイザルなど様々な動物種における MHC 遺伝子の多型解析が行われており、MHC 領域に位置する MHC 遺伝座の数やそのゲノム構造は動物種により大きく異なることが明らかとなっている (Codner et al. 2012; Lunney et al. 2009; Otting et al. 2007; Otting et al. 2005; Shiina et al. 2015; Tallmadge et al. 2010)。これは進化の過程において MHC 遺伝子は自然選択の影響を受けやすく、遺伝子変換や染色体の乗換えによる遺伝子組換えによる MHC 遺伝子の重複、生成および欠失などが生じやすいことが原因であると考えられている (Nei et al. 1997)。また、遺伝子組換えにより MHC 遺伝子の多型性が増加することが報告され

ており、例えばニワトリにおいては MHC 領域における遺伝子組換えにより新規のハプロタイプ構造が生成されていることが報告されている (Hosomichi et al. 2008)。本研究において同定された *DLA-88 - DLA-12 - DLA64* および *DLA-88 - DLA-88L - DLA-64* の 2 種類の構造多型は、*DLA-12* および *DLA-88L* はゲノム上で全く同一の領域に位置しているにもかかわらず、*DLA-88*、*DLA-12* および *DLA-88L* 遺伝子全長配列の比較から、*DLA-88L* はエクソン 1-3 の配列において、*DLA-88* と類似性が高い一方で、エクソン 1 の上流およびエクソン 3 の下流の塩基配列においては *DLA-12* 遺伝子と類似性が高いことが明らかとなった。この結果より、*DLA-88L* は *DLA-88* および *DLA-12* 遺伝子間における遺伝子組換えにより生成された可能性が示唆された。このような染色体の乗換えが生じた場合、*DLA-12 - DLA-12 - DLA-64* というハプロタイプも生成される可能性があるが、このハプロタイプ構造は既報および本研究においても検出されていない。アミノ酸配列を比較すると、*DLA-12* はペプチド結合領域および T 細胞認識領域の多型性が *DLA-88* および *DLA-88L* と比較して低く、感染時抵抗性には寄与しないため、*DLA-12* が 2 つ存在するハプロタイプは進化の過程で自然選択により淘汰された可能性が考えられる。また、遺伝子組換えのメカニズムとして、染色体の乗換えを起こさない組換えも存在することが明らかとなっており (Hartlerode and Scully 2009)、このメカニズムにより *DLA-12* と *DLA-88* 遺伝子間で遺伝子組換えが生じた場合、*DLA-12 - DLA-12 - DLA-64* ハプロタイプは生成されないと考えられる。本研究ではこれら構造多型生成の詳細な分子メカニズムの解明には至らなかったが、異なる MHC 遺伝座間における遺伝子組換えが新規遺伝座を生成し、MHC 遺伝子の多型性を増加させていることを支持する重要な知見となった。また、他のイヌ科動物においてもこ

これらの構造多型を保有しているのかという点は非常に興味深く、イヌ科動物の進化を知る上でも重要な指標になると考えられる。イヌにおけるこの2種類の構造多型における進化的な意義を解明するためには、より多くの犬種および他のイヌ科動物を対象とした、さらなるゲノム解析が必要である。

近年ヒトにおいて、MHC 遺伝子発現量と疾患との関連を示す研究が数多く報告されている。例えば、*HLA-C*014:02* は発現量が高く、このアレルを保有することで、HIV ウイルス感染後のエイズの発症や進行を有意に遅延させることが明らかになっている (Apps et al. 2013)。また、移植医療において 発現量の高い *HLA-C*14:02* や *HLA-DP5* のアレルがドナーとレシピエント間で異なる場合、移植片対宿主病 (graft versus host disease: GVHD) の発症および再発率が有意に高くなることも報告されている (Petersdorf et al. 2014; Petersdorf et al. 2015)。イヌにおいては、*DLA-88* と比較すると、*DLA-12* と *DLA-88L* では末梢血単核球における遺伝子発現量が有意に異なることが、本研究により明らかになった。この結果、*DLA-88L* を保有する個体では *DLA-12* を保有する個体と比較してより発現量が高く、より多型性に富む DLA クラス I 遺伝子を多く保有することになり、この違いにより、ジステンパーウイルスやパルボウイルスなど、イヌにおいて重要なウイルス性疾患の感受性や抵抗性 (Laurenson et al. 1998) および移植を実施した際の拒絶反応の発症などに差異が生じる可能性が考えられた。

DLA クラス I 遺伝子のうち、*DLA-64* に関しては多型性および末梢血単核球における遺伝子発現量が非常に低いことから、非古典的クラス I 遺伝子である可能性が高いと考えられた。HLA クラス I 遺伝子においては、非古典的遺伝子の特徴の一つとして、組織特異的に発現していることが知られている。例えば、非古典的遺伝子の一つである

HLA-G では胎盤で非常に発現が高いことが知られている。DLA クラス I 遺伝子に関しては唯一 *DLA-79* において、筋肉で発現が高いことが報告されているが (Burnett and Geraghty 1995)、その他の *DLA-88*、*DLA-12* および *DLA-64* に関しては各組織における発現量は不明である。各 DLA クラス I 遺伝子の発現量の違いを把握することは、その機能を理解するためにも非常に重要であるため、今後イヌの各臓器、組織および細胞レベルにおける発現量の解析を行う必要があると考えられる。

また、*HLA-G* 分子は胎盤において高発現することで、母親の NK 細胞に抑制性のシグナルを伝え、母体が胎児に対して免疫応答を起こさないように、免疫抑制を誘導することが知られている (Kovats et al. 1990; Rouas-Freiss et al. 1997)。また、*HLA-E* 分子やマウスの非古典的遺伝子として知られる *Qa-1^b* 分子も NK 細胞に認識されることで、NK 細胞の細胞傷害活性を抑制することが明らかになっている (Braud et al. 1998; Vance et al. 1998)。NK 細胞上に発現し、MHC 分子を認識する抑制性レセプターとして、ヒトでは Killer immunoglobulin receptors (KIRs) が、一方、マウスにおいては Ly49 receptor が最も重要であり、これらのレセプターを規定する遺伝子は重複や組換えにより多型性に富んでいることが知られている (Anfossi et al. 2006; Rahim and Makrigiannis 2015)。しかし、驚くべきことに、イヌにおいては、KIRs レセプターはゲノム上から欠損しており、LY49 遺伝子も 1 座しか存在していないことが報告されている (Gagnier et al. 2003; Hammond et al. 2009)。そのため、イヌではヒトやマウスとは異なる NK 細胞制御のメカニズムが存在している可能性が考えられる。これらの点から、非古典的 MHC 遺伝子であると考えられる *DLA-64* や *DLA-79* 分子における機能および NK 細胞との関連を明らかにすることは、イヌにおける免疫応答を理解する上

でも重要であると考えられる。

代表的な 5 犬種におけるハプロタイプの比較を行うことで、犬種により保有するハプロタイプの種類が大きく異なり、種特異的なハプロタイプが存在することが確認された。また、柴犬では、推定された 12 種類のうち、わずか 3 種類のハプロタイプ (Hp.29, Hp.99 および Hp.106) が 87.9% を占めていたことから、犬種により DLA 遺伝子の多型性に遺伝的な偏りが存在することが確認された。近年、英国において、ブルドックの遺伝的多様性が非常に低下していることが報告され、これは外見的に優れた形質を保有する極少数の個体を用いた閉鎖的なブリーディングや近親交配の背景を反映した結果であると考えられている (Pedersen et al. 2016)。遺伝的多様性の消失は、様々な遺伝性疾患の増加や感染症に対する抵抗性の減少に繋がり、その犬種の存続に多大な影響を及ぼすことが考えられる。しかし一方で、このような遺伝的多様性の消失は、ドナーとレシピエント間の MHC 型の一致を容易にするため、獣医療における幹細胞他家移植による再生医療実現の可能性が高まると考えられる。また、理論上、MHC 型ホモ接合体をドナーとすることで、このホモ接合体と同じ MHC 型を片方保有しているヘテロ接合体をレシピエントとした場合、MHC 型が完全に一致した移植を実施することが可能であるため、MHC 型ホモ接合体は最適な移植ドナー候補となりうる。我々日本人集団においては、頻度の高い上位 10 番目までのハプロタイプからホモ接合体が得られる割合は計算上およそ 0.72% (<http://hla.or.jp/>) である一方で、本研究において、イヌでは 21.5% (87/404 頭) がホモ接合体であり、非常に高い数値であることが確認された。さらに、今回検出された 37 種類の DLA 型ホモ接合体ハプロタイプのいずれかを保有するヘテロ接合体が 226 頭検出されたことから、もし本研究で検出された 37 種類の DLA ホモ接合体由来

の iPS 細胞や DFAT 細胞などの多能性幹細胞を作出できれば、ホモ接合体 87 頭とヘテロ接合体 226 頭を合わせた合計 313 頭 (77.5%) に DLA 型が一致した移植が可能であることが確認された (Matsumoto et al. 2008; Yamanaka 2009)。

本研究では、非常に多くの新規 DLA クラス I 遺伝子のアレルを同定し、さらに DLA クラス I 遺伝子領域に位置する新規構造多型の存在も明らかにした。そして、これらの多型情報を基に、DLA クラス I およびクラス II 遺伝子を含むハプロタイプ推定を行うことで、これまで不明であった DLA 遺伝子の多型性の解明に成功した。DLA の多型情報は移植医療のみならず、感染症、免疫介在性疾患および腫瘍など様々な病態と関連するため、本研究の成果は獣医療の発展に大きく貢献できる成果であると考えられる。また、本研究にて開発された多型解析法や新規アレル情報を用いることで、より正確で迅速な DLA タイピングが可能になる。本方法を用いて、まだ解析が行われていない犬種や解析頭数の少ない犬種において、さらなる多型解析を行うことで、DLA 多型の全体像を把握できると考えられる。

Table 1. Primers used for this study

Locus or allele	Primer name	Primer sequence (5' to 3')	Locus or allele specificity	Primer location	Annealing temperature	Product size	Reference
A. Primer list for genotyping analysis							
<i>DLA-88</i> and <i>DLA-88L</i>	88/64-F 88/12-R	CGGAGATGGAGGTGGTGA GGTGGCGGGTCACACG	<i>DLA-88, DLA-88L, DLA-64</i> <i>DLA-88, DLA-88L, DLA-12</i>	exon 1 exon 4	63°C	654-657 bp	(1)
<i>DLA-12</i>	12-F 88/12-R	CGACCCATAAGGTCTGGGCTA GGTGGCGGGTCACACG	<i>DLA-12</i> <i>DLA-88, DLA-88L, DLA-12</i>	exon 1 exon 4	63°C	660 bp	(1), this study
B. Primer list for genomic analyses							
1. Long-range primers for <i>DLA-88L</i> and <i>DLA-12</i> genes							
<i>DLA-88L</i> and <i>DLA-12</i>	12/88L-seg-F 12/88L-seg-R	CATTCTGTGGGATATGTGGTAA CATCAAGGGATAAGGTGAAAGA	<i>DLA-88L, DLA-12</i>	5' side of exon 1 3' side of exon 8	58°C	5.6 kb	This study
2. Sequencing primer							
<i>DLA-88L</i>	2F 3F 4F 2R 3R 4R	AGAGAAAGAGTGTGGCAGGGA CGGAGATGGAGGTGGTGA CTCTTTGGACTGATTGGCGG GCCCATATACTCTCTCTTCCC CATCGCTCAGTCCCACAG CCAACAGGACAGAAAACACAGA		5' side of exon 1 exon 1 intron 2 3' side of exon 8 exon 8 intron 5	50°C 50°C 50°C 50°C 50°C		This study This study This study This study This study This study
C. Primer list for quantitative PCR analysis							
<i>DLA-88*501:01</i>	DLA-88*501:01_F 88/88L/12-R	AGCAGAGCTACAATGGAGGAAC GGTGGCGGGTCACACG	<i>DLA-88*501:01</i> <i>DLA-88, DLA-88L, DLA-12</i>	exon 3 exon 4	60°C	124 bp	(1), this study
<i>DLA-88*003:02/*028:01/*028:03</i>	DLA-88*003:02/028:01/028:03/12_F 88/88L/12-R	GTGATGCAGGGCACCTGA GGTGGCGGGTCACACG	<i>DLA-88*003:02, *028:01, *028:03, DLA-12</i> <i>DLA-88, DLA-88L, DLA-12</i>	exon 3 exon 4	60°C	126 bp	(1), this study
<i>DLA-88*006:01/*012:01</i>	DLA-88*006:01/012:01_F 88/88L/12-R	TACTGCAGAGCAGATAGG GGTGGCGGGTCACACG	<i>DLA-88*006:01, *012:01</i> <i>DLA-88, DLA-88L, DLA-12</i>	exon 3 exon 4	60°C	125 bp	(1), this study
<i>DLA-88*nov10</i>	DLA-88*nov10_F 88/88L/12-R	GGTGTAGCAGACGATAGG GGTGGCGGGTCACACG	<i>DLA-88*nov10</i> <i>DLA-88, DLA-88L, DLA-12</i>	exon 3 exon 4	60°C	126 bp	(1), this study
<i>DLA-88*017:01</i>	DLA-88*017:01_F 88/88L/12-R	GTGATGCAGACGAAAAGG GGTGGCGGGTCACACG	<i>DLA-88*017:01</i> <i>DLA-88, DLA-88L, DLA-12</i>	exon 3 exon 4	60°C	125 bp	(1), this study
<i>DLA-88*029:01</i>	DLA-88*029:01_F 88/88L/12-R	TACTGCAGAGCAGATAGG GGTGGCGGGTCACACG	<i>DLA-88*029:01</i> <i>DLA-88, DLA-88L, DLA-12</i>	exon 3 exon 4	60°C	125 bp	(1), this study
<i>DLA-88*L</i>	DLA-88*L_F 88/88L/12-R	GGTACTGCAGACGAAAAG GGTGGCGGGTCACACG	<i>DLA-88*L</i> <i>DLA-88, DLA-88L, DLA-12</i>	exon 3 exon 4	60°C	126 bp	(1), this study
<i>DLA-12</i>	DLA-88*003:02/028:01/028:03/12_F 88/88L/12-R	GTGATGCAGGGCACCTGA GGTGGCGGGTCACACG	<i>DLA-88*003:02, *028:01, *028:03, DLA-12</i> <i>DLA-88, DLA-88L, DLA-12</i>	exon 3 exon 4	60°C	126 bp	(1), this study
<i>DLA-64</i>	DLA-64_F2 64-R	GGGCGGCCAGTACTA GGGTGGCGGGTCAGGTAG	<i>DLA-64</i> <i>DLA-64</i>	exon 3 exon 4	60°C	131 bp	(1), this study
<i>GAPDH</i>	GAPDH_F GAPDH_R	GAGAAGGCTGGGGCTCACTTG GGTGTGCAGGAGGCATTG		exon 4 - exon 5 exon 6	60°C	147 bp	This study

(1) (Ross et al. 2012)

Table 2. 10 *DLA-88L* alleles identified by *DLA-class I* cDNA and genomic analyses

*DLA-88*016:03*

*DLA-88*016:04*

*DLA-88*017:01*

*DLA-88*029:01*

*DLA-88*nov12*

*DLA-88*nov13*

*DLA-88*nov19*

*DLA-88*nov30*

*DLA-88*nov36*

*DLA-88*nov44*

Table 3. 16 *DLA-88* - *DLA-88L* allelic haplotypes based on *DLA-class I* cDNA and genomic analyses

<i>DLA-88</i>	<i>DLA-88L</i>	Count of haplotypes	Number of dogs	Breed
*003:02	*017:01	60	50	Chihuahua, Collie, Dalmatian, Irish Setter, Maltese, Pomeranian, Toy Poodle, Shetland Sheepdog, Jack Russell Terrier, Yorkshire Terrier, Welsh Corgi
*005:01	*nov13	4	4	Toy Poodle, Boston Terrier
*021:01	*016:04	1	1	Golden Retriever
*025:01	*016:03	5	5	Beagle, Chihuahua
*028:01	*029:01	33	28	French Bulldog, Pomeranian, Toy Poodle, Pug, Yorkshire Terrier, Mongrel
*028:03	*029:01	9	6	Brussel Griffon, Collie, Jack Russell Terrier
*nov2	*nov19	9	9	Beagle, Miniature Dachshund, Husky, Mongrel
*nov10	*016:04	11	8	Husky, Shih Tzu
*nov15	*029:01	12	12	Boston Terrier, Miniature Dachshund, Yorkshire Terrier
*nov15	*nov36	1	1	Toy Poodle
*nov23	*nov12	4	2	Pug
*nov28	*nov13	1	1	Miniature Schnauzer
*nov29	*nov30	1	1	Toy Poodle
*nov32	*029:01	2	2	Jack Russell Terrier, Lakeland Terrier
*nov34	*nov19	1	1	Shiba
*nov42	*029:01	1	1	Welsh Corgi
*nov45	*nov44	1	1	Pomeranian

Table 4. Nucleotide similarity of the 5.6 kb genomic segments between *DLA-88*, *DLA-88L* and *DLA-12*

Pairwise aligned genomic region	Similarity (%)			
	Extended genomic region (5.6 kb)	Outside of <i>DLA class I</i> gene region (2.2 kb-2.3 kb)	<i>DLA class I</i> gene region	
			UTR + ORF (3.3 kb-3.4 kb)	exon 1 - exon 3 (1.1 kb)
<i>12</i> vs <i>88L</i>	93.5	94.6	92.2	83.4
<i>88</i> vs <i>88L</i>	71.0	44.3	93.8	95.1
<i>88</i> vs <i>12</i>	69.3	45.3	88.7	82.7

UTR and ORF indicate untranslated region and open reading frame, respectively.

Table 6. DLA allelic haplotype frequencies identified in representative five dog breeds

Haplotype ID	DLA-88	DLA-88L	DLA-12	DLA-64	DLA-DRB1	Miniature Dachshund (N=48)	Toy Poodle (N=42)	Yorkshire Terrier (N=41)	Shiba (N=37)	Chihuahua (N=36)
Hp. 060	DLA-88*501:01	-	DLA-12*1	DLA-64*nov2	DRB1*001:01	0.22				
Hp. 025	DLA-88*006:01	-	DLA-12*1	DLA-64*nov2	DRB1*002:03	0.19				
Hp. 072	DLA-88*508:01	-	DLA-12*nov1-3	DLA-64*nov2	DRB1*002:01	0.10	0.02			
Hp. 054	DLA-88*045:01	-	DLA-12*1	DLA-64*nov2	e1 DRB1*012:01	0.07				
Hp. 092	DLA-88*nov11	-	DLA-12*1	DLA-64*nov2	DRB1*073:01	0.07				
Hp. 082	DLA-88*012:01	-	DLA-12*1	DLA-64*nov2	DRB1*015:01	0.06				
Hp. 131	DLA-88*nov3	-	DLA-12*nov7	DLA-64*nov2	DRB1*001:01	0.06				
Hp. 035	DLA-88*nov2	DLA-88*nov19	-	DLA-64*nov2	DRB1*001:01	0.06				
Hp. 047	DLA-88*nov4	-	DLA-12*nov1-4	DLA-64*nov2	DRB1*094:01	0.05				
Hp. 084	DLA-88*039:01	-	DLA-12*1	DLA-64*nov2	DRB1*009:01	0.04				
Hp. 134	DLA-88*nov15	DLA-88*029:01	-	DLA-64*nov2	e1 DRB1*015:02	0.02		0.11		
Hp. 028	DLA-88*006:01	-	DLA-12*1	DLA-64*nov2	DRB1*015:01		0.15			0.04
Hp. 096	DLA-88*nov18	-	DLA-12*nov6	DLA-64*nov2	DRB1*015:01		0.12			
Hp. 050	DLA-88*041:01	-	DLA-12*nov6	DLA-64*nov2-3	DRB1*013:01		0.11			
Hp. 121	DLA-88*003:02	DLA-88*017:01	-	DLA-64*nov2	DRB1*009:01		0.08	0.06		0.13
Hp. 101	DLA-88*nov24	-	DLA-12*1	DLA-64*nov2	e1 DRB1*015:03		0.07			
Hp. 034	DLA88*012:01	-	DLA-12*1	DLA-64*nov2	DRB1*013:01		0.06			
Hp. 081	DLA-88*nov3	-	DLA-12*1	DLA-64*nov2	DRB1*001:01		0.05			
Hp. 033	DLA88*012:01	-	DLA-12*1	DLA-64*nov2	DRB1*009:01		0.05			
Hp. 103	DLA-88*nov24	-	DLA-12*nov11	DLA-64*nov2	e1 DRB1*003:02		0.04			
Hp. 123	DLA-88*005:01	DLA-88*nov13	-	DLA-64*nov2	e1 DRB1*008:02		0.04			
Hp. 040	DLA-88*032:01	-	DLA-12*1	DLA-64*nov2	DRB1*015:01		0.02			0.03
Hp. 090	DLA-88*nov9	-	DLA-12*nov1-2	DLA-64*nov2	DRB1*015:01		0.02			
Hp. 030	DLA-88*010:01	-	DLA-12*1	DLA-64*nov2	DRB1*015:01		0.02			
Hp. 079	DLA-88*508:01	-	DLA-12*nov1-3	DLA-64*nov2	DRB1*novF		0.02			
Hp. 128	DLA-88*028:01	DLA-88*029:01	-	DLA-64*nov2	e1 DRB1*015:02		0.02	0.13		
Hp. 010	DLA-88*004:02	-	DLA-12*1	DLA-64*nov2	DRB1*006:01			0.30		
Hp. 012	DLA-88*004:02	-	DLA-12*nov4	DLA-64*nov2	DRB1*006:01			0.15		
Hp. 064	DLA-88*501:01	-	DLA-12*1	DLA-64*nov2	DRB1*015:01			0.09		
Hp. 067	DLA-88*501:01	-	DLA-12*nov4	DLA-64*nov2	DRB1*006:01			0.06		0.04
Hp. 008	DLA-88*002:01	-	DLA-12*1	DLA-64*nov3	DRB1*015:02			0.02		
Hp. 114	DLA-88*nov39	-	DLA-12*2	DLA-64*nov2	DRB1*075:01			0.02		
Hp. 044	DLA-88*034:01	-	DLA-12*nov6	DLA-64*nov2	DRB1*023:01			0.02		
Hp. 029	DLA-88*006:01	-	DLA-12*1	DLA-64*nov2	DRB1*056:01				0.53	
Hp. 106	DLA-88*nov25	-	DLA-12*nov3	DLA-64*nov2	DRB1*092:01				0.19	
Hp. 099	DLA-88*nov21	-	DLA-12*nov4	DLA-64*nov2	DRB1*011:03				0.16	
Hp. 107	DLA-88*nov26	-	DLA-12*nov6	DLA-64*nov2	DRB1*056:01				0.03	
Hp. 075	DLA-88*508:01	-	DLA-12*nov1-3	DLA-64*nov2	DRB1*015:01					0.15
Hp. 094	DLA-88*nov17	-	DLA-12*nov8	DLA-64*nov2	DRB1*009:01					0.14
Hp. 063	DLA-88*501:01	-	DLA-12*1	DLA-64*nov2	DRB1*012:01					0.08
Hp. 004	DLA-88*002:01	-	DLA-12*1	DLA-64*nov2	DRB1*002:01					0.06
Hp. 104	DLA-88*nov24	-	DLA-12*nov11	DLA-64*nov2	e1 DRB1*015:01					0.06
Hp. 093	DLA-88*nov14	-	DLA-12*nov9	DLA-64*nov2-2	DRB1*015:01					0.06
Hp. 041	DLA-88*032:01	-	DLA-12*1	DLA-64*nov2	DRB1*018:01					0.04
Hp. 021	DLA-88*005:01	-	DLA-12*8	DLA-64*nov2	DRB1*020:01					0.04
Hp. 049	DLA-88*041:01	-	DLA-12*nov6	DLA-64*nov2	DRB1*013:01					0.03
Hp. 125	DLA-88*025:01	DLA-88*016:03	-	DLA-64*nov2	DRB1*017:02					0.03
Number of other single haplotypes*						4	8	2	7	6
Number of haplotypes per breed						15	24	12	11	20

Red, orange and blue background indicate 1st, 2nd and 3rd frequent haplotypes, respectively.

Table 7. Numbers of homozygous and heterozygous dogs for each DLA-88 - DLA-12 /88L - DLA-64 - DLA-DRB1 haplotypes

Haplotype ID	Number of homozygous dog by breed	Num. of homo-dogs	Num. of breeds (heterozygous)	Num. of hetero-dogs
Hp. 001	Papillon (2)	2	1+mongrel	6
Hp. 002	French Bulldog (1)	1	2	2
Hp. 004	Chihuahua (1)	1	1	2
Hp. 005	Spaniel: Cavalier King Charles (1)	1	3+mongrel	6
Hp. 010	Pomeranian (1) and Yorkshire Terrier (Lindblad-Toh et al.)	4	4+mongrel	30
Hp. 014	Japanese Spitz (1), Labrador Retriever (1), Miniature Pinscher (1) and Papillon (1)	4	6+mongrel	6
Hp. 018	Terrier: Norfolk (2)	2	1+mongrel	1
Hp. 025	Dachshund: Miniature (1)	1	2	17
Hp. 026	Spaniel: American Cocker (2)	2	4	5
Hp. 028	Poodle: Toy (1)	1	3+mongrel	16
Hp. 029	Shiba (10)	10	1+mongrel	21
Hp. 032	Basenji (1)	1	1	0
Hp. 035	Dachshund: Miniature (1), Maltese (1), and Welsh Corgi (1)	3	6+mongrel	15
Hp. 044	Shetland Sheepdog (Lindblad-Toh et al.)	3	3+mongrel	10
Hp. 050	Poodle: Toy (1)	1	1	7
Hp. 057	Golden Retriever (1)	1	2	2
Hp. 060	Beagle (1), Dachshund: Miniature (2) and mongrel (1)	4	8+mongrel	26
Hp. 061	Rottweiler (1)	1	4	5
Hp. 064	Terrier: Yorkshire (1)	1	3	7
Hp. 069	Beagle (1)	1	1+mongrel	6
Hp. 074	Golden Retriever (1) and Labrador	3	3+mongrel	4

Table 7. continued.

Hp. 075	Chihuahua (1)	1	2	10
Hp. 080	Maltese (1)	1	1+mongrel	5
Hp. 087	Saluki (1)	1	1	0
Hp. 089	Chin (2) and Shih Tzu (2)	4	3	7
Hp. 095	French Bulldog (1) and Welsh Corgi (1)	2	2+mongrel	6
Hp. 096	Poodle: Toy (2)	2	1+mongrel	7
Hp. 099	Shiba (Lindblad-Toh et al.)	3	1+mongrel	9
HP. 100	mongrel (1)	1	mongrel	0
Hp. 105	Labrador Retriever (1)	1	2	5
Hp. 106	Shiba (1)	1	2+mongrel	15
Hp. 118	Shetland Sheepdog (Lindblad-Toh et al.)	10	3	7
Hp. 128	French Bulldog (4) and Pug (1)	5	6+mongrel	23
Hp. 130	Brussel Griffon (1) and Collie (2)	3	2	1
Hp. 132	Shih Tzu (2)	2	1	4
Hp. 133	Husky (1)	1	1	1
Hp. 137	Pug (1)	1	1	1

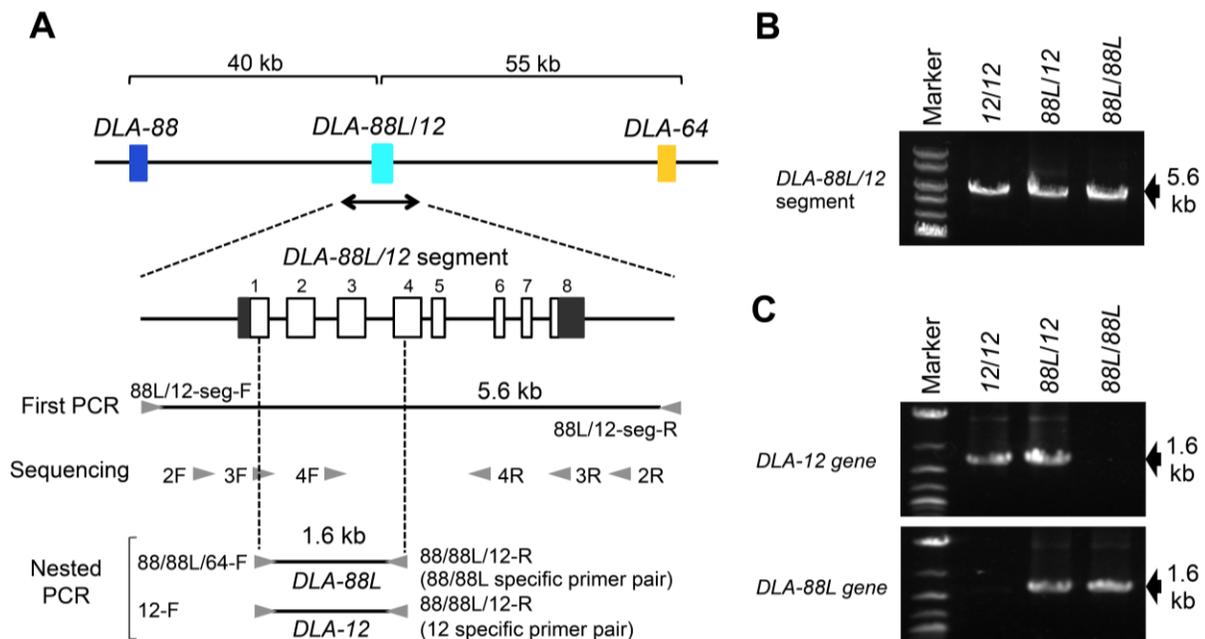


Figure 1. Development of a PCR nested method for detection of polymorphism at *DLA-12* and *DLA-88L* using genomic DNA samples. (A) Schematic diagram shows the location of the *DLA-88L/12* gene, the exon/intron structure of *DLA-88L/12*, and the primer sites and operational map for the genomic analysis of the haplotype structural segments. Numbers around the gene structure indicate exon numbers. White and black boxes show the coding exons and the 5' and 3' un-translated regions, respectively. Primer sequences (sequencing primers 2F, 3F, 4F, 2R, 3R and 4R, 88L/12-seg-F and 88L/12-seg-R, 12-F, 88/88L/12-R, and 88/88L/64-F) are shown in **Table 1A**, **1B1** and **1B2**. (B) and (C) Electrophoresis images of the PCR products that were amplified using the 88L/12-seg-F and 88L/12-seg-R primer pair (5.6 kb) and the *DLA-12* or *DLA-88L* specific primer pairs (1.6 kb), respectively. Two types of DNA ladder markers, Quick-Load 1 Kb DNA Ladder (New England BioLabs) and Quick-Load 2-Log DNA Ladder (New England

BioLabs), were used as DNA size markers for the image B and image C, respectively.

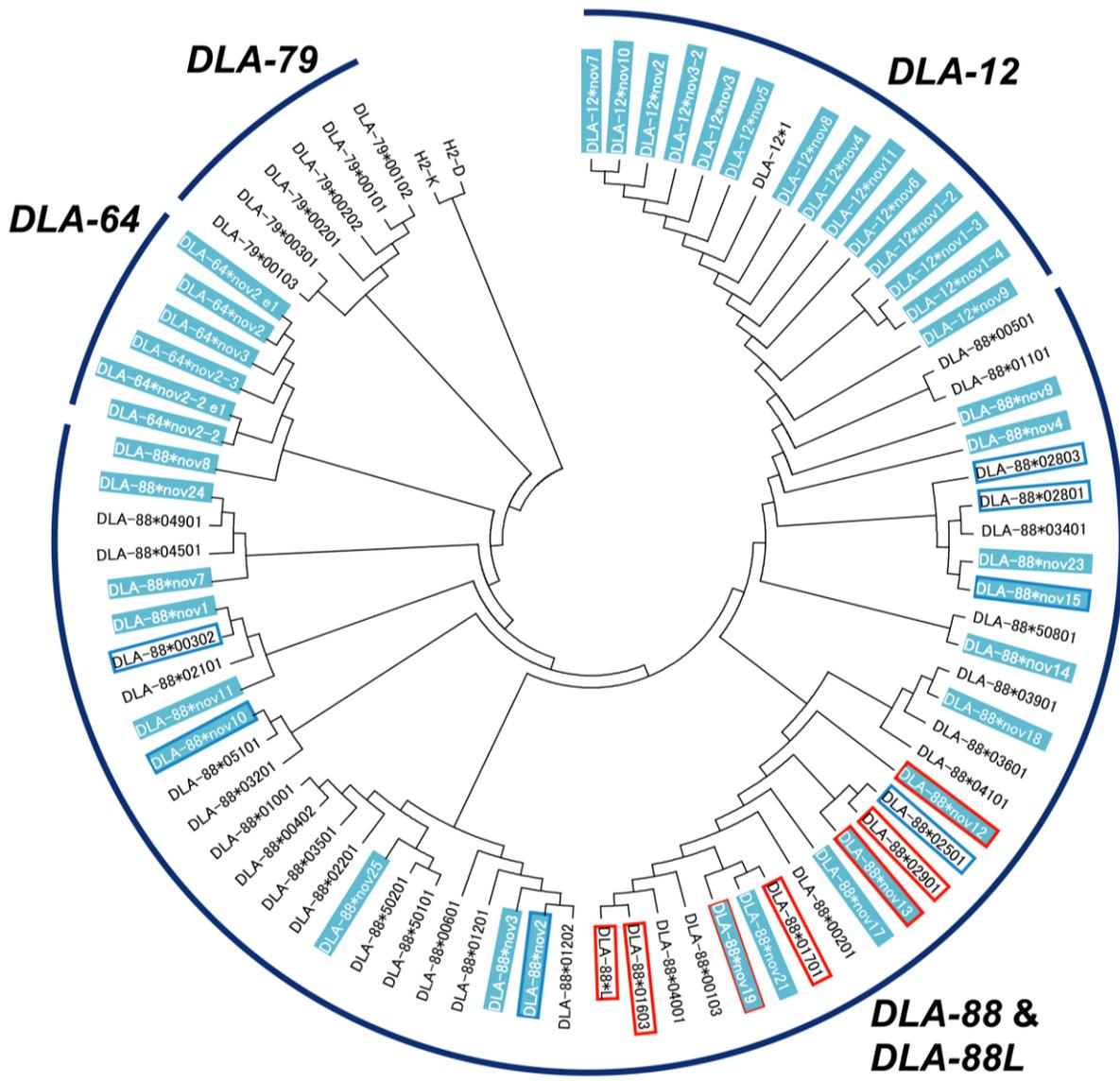


Figure 2. Nucleotide sequence-based phylogenetic tree of *DLA-class I* alleles constructed by the Neighbor joining method. 66 major and seven minor official *DLA-class I* cDNA sequences that were identified in this study and eight released sequences (six *DLA-79* and two mouse *H-2D* and *H-2K*) were used for constructing the tree. Light blue background and white letters indicate the newly identified *DLA-class I* alleles. Of the *DLA-class I* alleles that are composed of *DLA-88*

- *DLA-88L* haplotypes detected in this study, the *DLA-88* and *DLA-88L* allele names are framed by dark blue and red rectangular lines, respectively. *DLA-64*nov2* is identical with *DLA-64* sequence of the dog genome reference sequence (NC_006594). *DLA-88L* alleles are shown in **Table 2**.

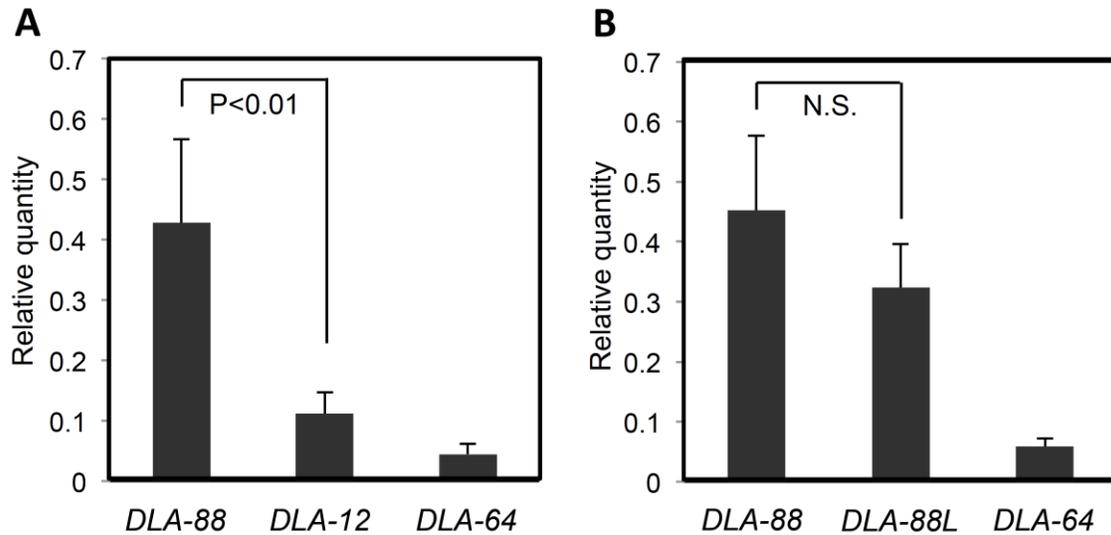


Figure 3. Relative gene expression levels of *DLA-class I* genes. (A) and (B) represent summary of the mean differences between the relative gene expression levels of *DLA-88*, *DLA-88L/12* and *DLA-64* genes of *DLA-88 - DLA-12 - DLA-64* and *DLA-88 - DLA-88L - DLA-64* haplotypes using ten and 12 dogs for each haplotype, respectively. Vertical axis shows the relative quantitative values by the real-time PCR method. Primer sequences and specificity are shown in **Table 2C**. Thin bars show standard errors, and *P* values indicate statistical significant difference between *DLA-88* and *DLA-12* and *DLA-88* and *DLA-88L* genes. The detail relative gene expression levels of each *DLA* haplotype are shown in **Figure 4**.

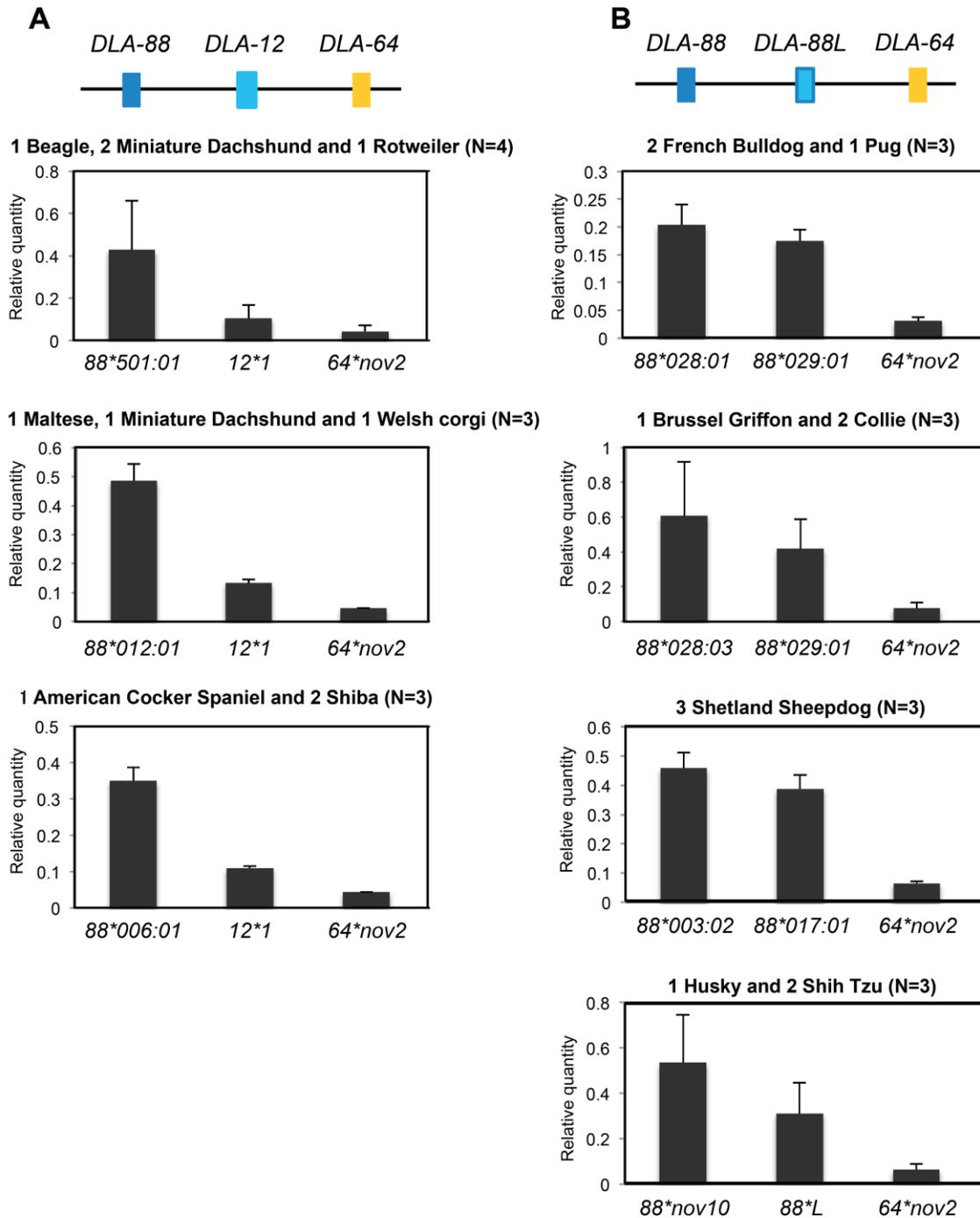


Figure 4. Relative gene expression levels of *DLA-class I* genes in each haplotype. (A) Relative gene expression levels of the *DLA-88*, *DLA-12* and *DLA-64* genes of the *DLA-88* - *DLA-12* - *DLA-64* haplotypes using ten dogs. The *DLA-88*501:01* - *DLA-12*1* - *DLA-64*nov2*

(N=4), *DLA-88*006:01 - DLA-12*1 - DLA-64*nov2* (N=3) and *DLA-88*012:01 - DLA-12*1 - DLA-64*nov2* (N=3) were analyzed. (B) Relative gene expression levels of the *DLA-88*, *DLA-88L* and *DLA-64* genes of *DLA-88 - DLA-88L - DLA-64* haplotypes using 12 dogs. The *DLA-88*028:01 - DLA-88*029:01 - DLA-64*nov2* (N=3), *DLA-88*028:03 - DLA-88*029:01 - DLA-64*nov2* (N=3), *DLA-88*003:02 - DLA-88*017:01 - DLA-64*nov2* (N=3) and *DLA-88*nov10 - DLA-88L - DLA-64*nov2* (N=3) were analyzed. Vertical axis shows the relative quantitative values by the real-time PCR method. Thin bars show standard errors. The vertical bars represent the mean of the relative quantitative values.

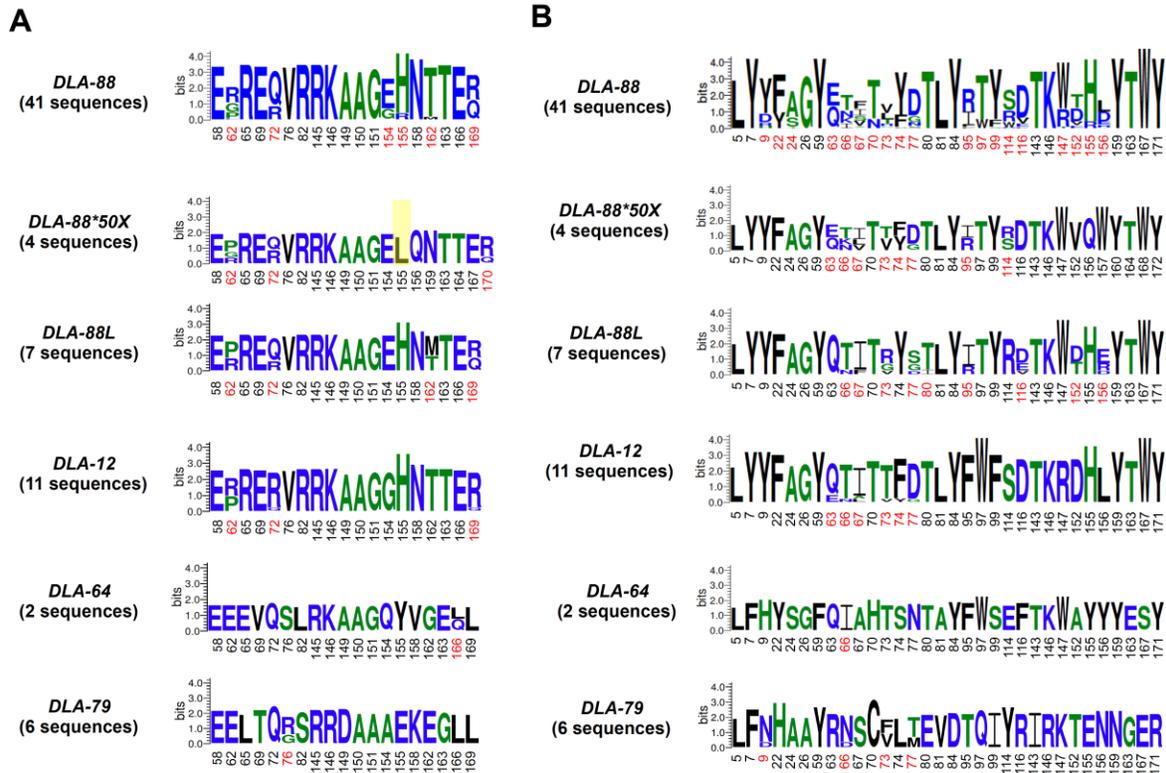


Figure 5. Logos of amino acid consensus sequences of T cell recognition sites (TRSs) and peptide binding regions (PBRs) of translated *DLA-class I* genes. The logos plots were analyzed using 65 allele sequences (58 major and seven minor official alleles) with 45 *DLA-88* (41 *DLA-88* + four *DLA-88*50X*), seven *DLA-88L*, 11 *DLA-12* and two *DLA-64* and six released *DLA-79* sequences. (A) and (B) show logos for TRSs and PBRs, respectively. The overall height of each stack indicates the amino acid conservation at that position and the height of the letters within each stack indicated the relative frequency of the conforming amino acid at that position (Crooks et al. 2004). The overall height of *DLA-64* is underestimated due to the low number of alleles. Yellow box shows an extra residue (leucine, L) in the *DLA-88*50X* allele group at position 155, which was attributed as part of the TRSs in a recent study (Xiao et al. 2016). Blue, black and green letters indicate hydrophilic, hydrophobic and green neutral amino acid residues, respectively.

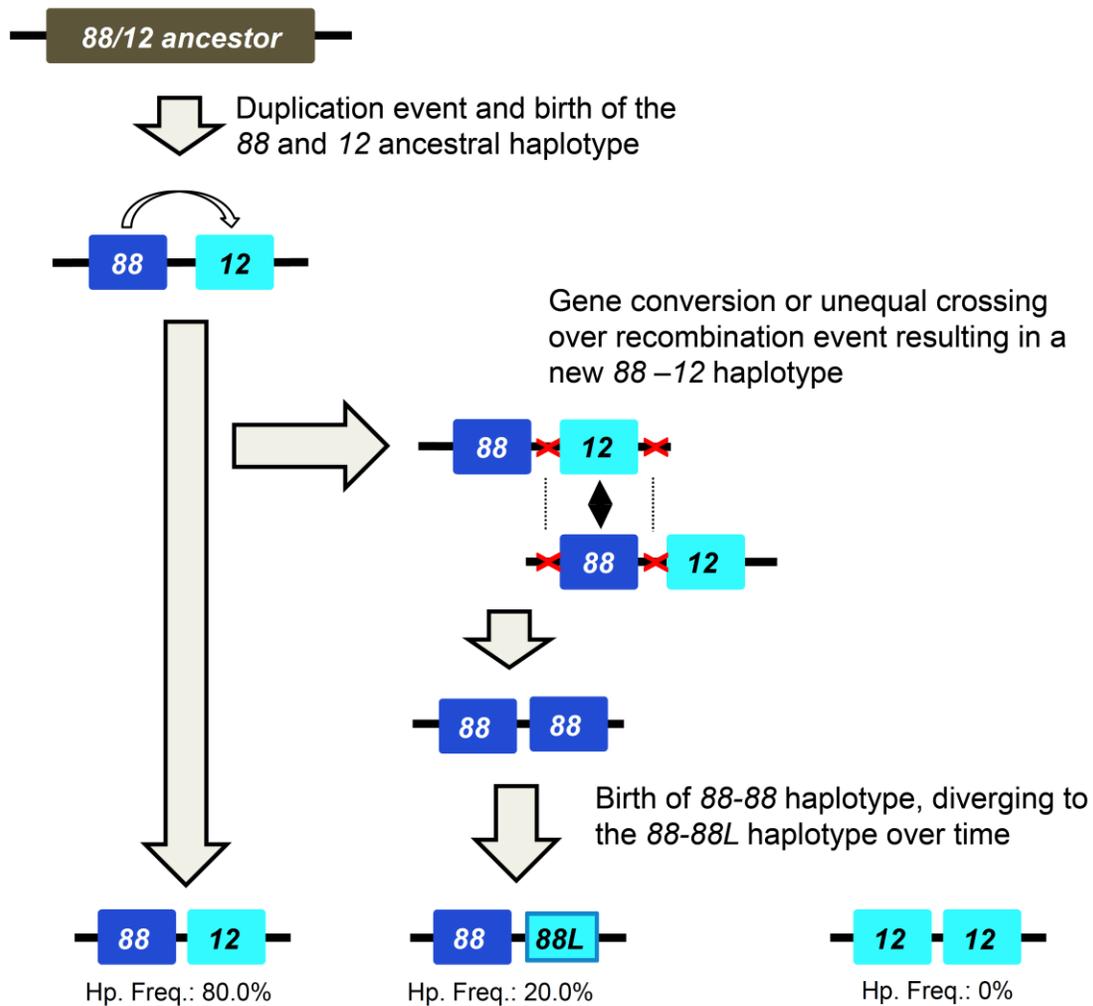


Figure 6. Inferred evolutionary model for the genomic structures of *DLA-88* - *DLA-12* and *DLA-88* - *DLA-88L* haplotypes. Dark and light blue boxes show the *DLA-88* and *DLA-12* genes, respectively, and the light blue box with a dark blue rectangular line shows *DLA-88L*. “Hp. Freq.” indicates the haplotype frequency. Because the *DLA-88* gene in a gene conversion or crossing over event replaced the *DLA-12* locus, we have unofficially named the replacement gene *DLA-88L* despite its location.

第4章

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

4.1 序論

第2章において DLA クラス I 遺伝子の多型性が解明された。また、既報における DLA クラス II 遺伝子の多型情報に加えると、DLA 遺伝子全体の多型情報が揃ってきた (Miyamae et al. 2018)。一方で、実際の移植医療において拒絶反応を予測できる、DLA 型の一致・不一致の個体間における、実際の T 細胞の反応性の違いに関する研究報告はほとんど無い。

同種異型 (アロ) 個体間において、MHC 分子などのアロ抗原に反応した 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。この方法は移植時の免疫反応を *in vitro* で再現可能な方法であり、移植を行うドナーとレシピエントの末梢血単核球を混合培養し、アロ抗原に反応したレシピエントの細胞増殖を定量することでアロ反応性を評価することができる。従来、MLR における細胞増殖は放射性同位体である [³H]thymidine の取り込みにより評価されてきた。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 [³H]thymidine を測定ことにより、最終的な細胞増殖を定量する方法であり、感度も高く客観的な評価法として非常に優れた方法である。しかし、この方法は放射線同位体を使用可能な安全性が確保された設備が必要であり、また、シンチレータを検出可能な特殊な機器も必要であるため、実施可能な施設が限られてしまう。また、培養後の細胞増殖を単純に評価しているため、実際に増殖した細胞は何回分裂しているのか、また単核球の中でマクロファージ、T 細胞および B 細胞などの内、どの細胞が増殖しているのかという増殖細胞の定性評価を行えないことが問題であった。これらの問題を解決する方法として、ヒト、マ

ウスおよびブタにおいては蛍光色素である CFSE (5- (and -6)-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) を用いたフローサイトメーターによる評価法 (CFSE-MLR) が開発されている (Angulo and Fulcher 1998; Oku et al. 2008; Tanaka et al. 2004)。CFSE は脂溶性が高いため細胞膜を容易に透過可能であり、細胞内タンパク質と結合し細胞内に固定されることで、生細胞を長時間染色可能である。細胞が分裂した際には、細胞内の CFSE が娘細胞に均等に分配されることで、1 細胞における蛍光強度も同様に半減していく。この特徴を利用することで、フローサイトメーターのヒストグラムから細胞の分裂回数および分裂した細胞数を得ることができ、さらに抗 CD3、抗 CD4、抗 CD8 および抗 CD19 抗体などを併用することでサブタイプ別で細胞増殖の評価が可能となる。実際に、ヒトの移植医療においては、生体肝移植後に肝機能低下が生じた場合や、腎移植後の拒絶反応を予測する場合に、患者 (レシピエント) の免疫状態のモニタリングを行う方法として、CFSE-MLR は有用性が高いことが報告されている (Kreijveld et al. 2008; Tanaka et al. 2005)。また、CFSE-MLR を用いて、アロ反応性 T 細胞のレパトア解析も可能であり、これは移植拒絶反応の有無を予測する上で重要なバイオマーカーとなることが報告されている (Morris et al. 2015)。このように、CFSE-MLR は移植医療において、移植前および移植後のレシピエントの免疫状態のモニタリングを行う上で非常に有用な方法である。

イヌは古くからヒト移植モデルとして汎用されており、イヌにおける MLR も古くから行われていたが、これまでのイヌにおける MLR はあくまでドナーとレシピエント間の DLA タイピング法の一つとして用いられていた (Raff et al. 1985; Wagner et al. 2002)。そのため細胞増殖の定量は ^3H thymidine を用いた方法 (^3H thymidine-MLR)

のみであり、CFSEのような蛍光色素を用いた、細胞分裂数、増殖細胞数および増殖細胞の定性を同時に解析可能な方法は存在していなかった。獣医療において移植医療を導入するためには、ヒト同様に、移植の安全性評価および移植前後の免疫状態のモニタリングが可能な方法を開発する必要があると考えられる。そこで、本研究ではCFSEに類似した蛍光色素であるCytoTellを用いた、イヌにおける新規MLR法(CytoTell-MLR)の開発を試みた。そして、開発した定量法を用いて、DLA型一致・不一致個体間におけるT細胞のアロ反応性の評価を実施した。

4.2 材料および方法

4.2.1 供試サンプル

オリエンタル酵母工業より購入し、日本大学の実験動物施設にて飼育しているビーグルから採血した全血およびテルモ株式会社より提供して頂いたビーグルの全血、合計 13 頭分を用いて実験を行った。全血は DLA タイピングを行うサンプルに関しては EDTA-2K を、また、MLR を行うサンプルに関してはヘパリンナトリウムにより抗凝固処理を施した。

4.2.2 RNA 抽出

TRIzol LS Reagent (Invitrogen/Life Technologies/Thermo Fisher Scientific) を用いて、全 13 頭のビーグルの全血から total RNA の抽出を添付のプロトコルに従い実施した。

4.2.3 DLA タイピングに用いたプライマー設計

DLA-88 および *DLA-88L* 遺伝子をどちらも増幅するプライマーまたは *DLA-12* および *DLA-DRB1* 遺伝子をそれぞれ特異的に増幅するプライマーは第 2 章と同じプライマーを使用した。また、その他に多型が報告されている DLA クラス II 遺伝子である *DLA-DQA1* および *DLA-DQB1* 遺伝子をそれぞれ特異的に増幅するプライマーは、公開されている mRNA およびゲノム全長配列 (*DLA-DQA1*, accession num.: NM_001011726 および *DLA-DQB1*, accession num.: AH006318) をリファレンスとし

て CDS 全領域を含むように、5' UTR および 3' UTR に設計した。プライマーの詳細な情報は Table 1 に示した。

4.2.4 逆転写反応および RT-PCR 増幅

抽出した RNA を DNase (Invitrogen/Life Technologies/Thermo Fisher Scientific) で処理した後、RevaTra Ace TOYOBO) を用いて cDNA 合成を行なった。DNase 処理および cDNA 合成はいずれも添付のプロトコルに従い実施した。合成された cDNA を鋳型として、KOD FX (TOYOBO) と各遺伝座特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行なった。PCR 増幅はクラス I 遺伝子 2 座 (*DLA-88* および *DLA-12/88L* 遺伝子) については、最初に 94°C、2 分間の熱変性を行なった後、98°C/10 秒、63°C/30 秒、68°C/45 秒の 3 工程を 1 サイクルとし、合計 33 サイクルの反応を行なった。また DLA クラス II 遺伝子 3 座 (*DLA-DRB1*, *DLA-DQA1* および *DLA-DQB1* 遺伝子) に関しては、最初に 94°C、2 分間の熱変性を行なった後、98°C/10 秒、60°C/30 秒、68°C/50 秒の 3 工程を 1 サイクルとし、合計 33 サイクルの反応を行なった。

4.2.5 サンガーシーケンシングによるアレル塩基配列の決定

得られた RT-PCR 増幅産物の塩基配列は Big Dye terminator 法を用いてサンガーシーケンサー ABI3130 (Applied Biosystems/Life Technologies/Thermo Fisher Scientific) により決定した。塩基配列の解析には Sequencher Ver. 5.0.1 (Gene Code Co.) を用いた。

4.2.6 DLA アレルタイピング

公開されている *DLA-88*、*DLA-12/88L*、*DLA-DRB1*、*DLA-DQA1* および *DLA-DQB1* のアレルをリファレンスとして、得られた塩基配列との比較を行うことにより、各サンプルが保有している DLA アレルを判定した。アレルの判定は、Assign ATF ver. 1.0.2.45 (Conexio) および Sequencher Ver. 5.0.1 を用いて行った。

4.2.7 DLA ハプロタイプの推定

DLA-88 – *DLA-12/88L* – *DLA-DRB1* – *DLA-DQA1* – *DLA-DQB1* の 5 遺伝座における多型情報を基に、ハプロタイプ推定を行った。ハプロタイプ推定は、DLA 遺伝子ホモ接合体を基準としたマニュアルによる推定および PHASE プログラム (Stephens et al. 2001) を使用することにより行った。

4.2.8 末梢血単核球の単離

イヌ末梢血単核球の分離は Optiprep (Axis-Shields Diagnostics Ltd.) を用いた密度勾配遠心分離法 (比重 1.077 g/mL) により行なった。好中球の混入をできるだけ回避するため、Optiprep の Application sheet C43 に従い、浸透圧を 242 mOsm に調整した (Bøyum et al. 1991)。具体的には、10mM Tricine 加 0.85% 生理食塩水と滅菌水を 5 : 1 の割合で混合 (溶液 A) した後、Optiprep 原液と溶液 A を 2.7 : 9.3 の割合で混合することにより調整した。

ヘパリンにて抗凝固処理を施したビーグルの全血を等量の 10mM Tricine 加 0.85% 生理食塩水で希釈した後、調整した Optiprep 3mL の上層に希釈血液 6mL を静かに重層

し、遠心分離（室温、700 ×g、20 分）を行なった。その後、末梢血単核球を含む中間層を回収したのち、塩化アンモニウム溶血剤（155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 1mM EDTA-2Na および 0.85%生理食塩水）により溶血処理を行った。その後、PBS により 1 回洗浄（4℃、350 ×g、5 分）を行った。

4.2.9 MLR

ドナーから単離した末梢血単核球を phosphate buffered salts (PBS) に浮遊させたのち細胞増殖抑制のため 40 ug/ml になるようにマイトマイシン C 溶液 (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation) を加え 37℃で 30 分間処理した。その後、PBS にて 5 回洗浄（4℃、350 ×g、5 分）した後、以下の MLR 培養液に 5×10⁶ 個 / mL になるように再浮遊させた (MLR 培養液 : 5uM 2-mercaptoethanol (Thermo Fisher Scientific)、100 unit/mL ペニシリンおよび 100 mg/mL ストレプトマイシン(Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation)、10 mM HEPES (Dojindo) および 10 % 牛胎児血清(fetal bovine serum: FBS) を添加した RPMI1640 (Sigma-Aldrich) 培養液を用いて、ドナーおよびレシピエントの末梢血単核球をそれぞれ 5×10⁶ 個 / mL に調整した。その後、それぞれ 100 uL ずつを 96 well プレートの同じ well に播種し、37℃、5% CO₂ 下で混合培養を行った。

4.2.10 [³H]thymidine-MLR による細胞増殖の定量

MLR を行っている各 well に対して、³H]thymidine (PerkinElmer) を 18.5 kBq ずつ投与した。その後 37℃、5% CO₂ 下で 18 時間培養したのち、細胞を回収し PBS で 3

回洗浄（37°C、350 ×g、5分）を行った。洗浄後、Soluene-350 (PerkinElmer) を400 uL 添加し細胞を溶解したのち、20 mL のガラスバイアルに細胞溶解液を移した。そのバイアルに、液体シンチレーションカクテル Hionic-Fluor (PerkinElmer) を7mL ずつ添加し、遮光、室温にて30分間静置して均質化を行った。その後、Tri-Carb 4810 (PerkinElmer) を用いて1サンプルにつき1分間シンチレーションの測定を行なった。

細胞増殖の指標となる刺激係数 (Stimulation index: SI) は以下の式により算出した。

$$SI = \frac{\text{アロ個体間 (ドナー} \times \text{レシピエント) における MLR の CPM}}{\text{自己 (レシピエント} \times \text{レシピエント) における MLR の CPM}}$$

アロ個体間および自己における MLR はいずれも3well ずつ行い、その平均の CPM を用いて SI を算出した。

4.2.11 CytoTell-MLR による細胞増殖の定量

フローサイトメーターを用いてアロ抗原に反応したレシピエントの T 細胞増殖を定量するため、MLR を行う前にレシピエントの末梢血単核球を CytoTell により染色した。具体的には、PBS にて 1×10^6 個 / mL に調整したレシピエントの末梢血単核球に、添付のプロトコルに従い調整した。CytoTell UltraGreen (AAT Bioquest) を 1×10^6 個 / mL あたり 0.2 uL 添加し、37°C、5% CO₂ 下で遮光し20分間静置した。その後、2~10% FBS を添加した培養液を等量加え遠心（4°C、350 ×g、5分間）し、MLR 培養液にて 5×10^6 個 / mL に調整した。その後96well プレートを用いて MLR を行った。

MLR 後、細胞を回収し、2% FBS および 0.5% アジ化ナトリウム加 PBS にて1回洗浄し（4°C、350 ×g、5分）、抗イヌ CD3 (CA17.2A12, Bio-Rad Laboratories)、抗 CD4 (YKIX302.9, Bio-Rad Laboratories) もしくは抗 CD8 抗体 (YCATE55.9, Bio-Rad

Laboratories) を用いて 40 分間免疫染色を行なった。染色後、2% FBS および 0.5% アジ化ナトリウム加 PBS にて 1 回洗浄し (4°C、350 ×g、5 分)、Propidium iodide (Thermo Fisher Scientific) を用いて死細胞染色を行い、BD FACSCanto II (BD biosciences) にて解析をおこなった。SI を算出するため、汎 T 細胞マーカーである CD3 陽性細胞分画における CytoTell の蛍光強度を測定した。さらに CD3 陽性 T 細胞分画の中で CD4 陽性 T 細胞分画または CD8 陽性 T 細胞分画における CytoTell の蛍光強度を測定した。SI の算出は既報のマウスを用いた論文と同様の方法で算出した (Figure 1) (Tanaka et al. 2004)。具体的には、CytoTell は CFSE と同様に細胞分裂に伴い娘細胞に均等に分配され、その蛍光強度が半減していく特徴を有している。そこで、蛍光強度を示す横軸の目盛りを指標に、最も高い蛍光強度を示す集団 (分裂・増殖していない細胞集団) から、蛍光強度が半減していくようにヒストグラム上にゲートを作成した。その後、分裂回数および各ゲートにおける細胞数から、Precursor 細胞数 (Npre) を算出したのち、各ゲートの細胞数から Precursor 細胞数を減算することで、proliferation event 数 (Npro) を算出した。そして、Precursor 細胞数の合計 (Tpre) および proliferation event 数の合計 (Tpro) を用いて増殖係数 (Proliferation index: PI) を以下の式で算出する (Figure 1)。

$$PI = \frac{T_{pro}}{T_{pre}}$$

最終的に細胞増殖を評価する指標である SI を以下の式で算出した。

$$SI = \frac{\text{アロ個体間 (ドナー × レシピエント) における MLR の PI}}{\text{自己 (レシピエント × レシピエント) における MLR の MLR における PI}}$$

アロ個体間および自己における MLR はいずれも 3 well ずつ行い、その平均の PI を用いて SI を算出した。

従来の定量法である $[^3\text{H}]$ thymidine-MLR との定量性を比較するため、同じドナーとレシピエントを用いて、両定量法で細胞増殖を行なった。その後、CytoTell-MLR に関しては、その定量性を確認するため、さらにドナーとレシピエントのペア数を追加して細胞増殖の定量を行った。

4.2.12 統計解析

正規性の検定 (Shapiro-Wilk 検定)、F 検定、T 検定および相関分析 (Pearson's product moment correlation coefficient) は、すべて統計解析ソフト R を用いて実施した。

4.3 結果

4.3.1 DLA アレルの決定およびハプロタイプ推定

第二章の結果より、DLA クラス I 遺伝子のうち、*DLA-64* 遺伝子は多型性が非常に低いことが明らかとなったため、*DLA-64* 遺伝子を除く *DLA-88*、*DLA-88L* および *DLA-12* 遺伝子の 3 座と、DLA クラス II 遺伝子で多型性に富む *DLA-DRB1*、*DLA-DQA1* および *DLA-DQB1* 遺伝子 3 座の合計 6 座の DLA タイピングを実施した (Table 2)。その結果、*DLA-88*、*DLA-12*、*DLA-DRB1*、*DLA-DQA1* および *DLA-DQB1* において、それぞれ 7 種類、3 種類、11 種類、6 種類および 8 種類のアレルが検出され、*DLA-88L* 遺伝子は検出されなかった。また、Dog 9 および Dog 10 において *DLA-DQB1* アレルが 3 種類 (*DLA-DQB1*007:01*、*DLA-DQB1*013:03* および *DLA-DQB1*017:01*) 検出された。既報の DLA クラス II 遺伝子の多型解析においても *DLA-DQB1* アレルを 3 種類保有している個体が検出され、ハプロタイプ推定の結果 *DLA-DQB1*013:03* – *DLA-DQB1*017:01* という *DLA-DQB1* 遺伝子が重複しているハプロタイプ構造が存在していることが報告されている (Kennedy et al. 2007)。よって、本研究においても Dog 9 および Dog10 においては、*DLA-DQB1*013:03* および *DLA-DQB*017:01* は一つのハプロタイプを構成していると考えられた。

各 DLA 遺伝子の多型情報から *DLA-88*、*DLA-12*、*DLA-DRB1*、*DLA-DQA1* および *DLA-DQB1* 遺伝子 5 座におけるハプロタイプ (Hp) を推定したところ、合計 11 ハプロタイプが推定された (Table 2)。Dog 1 は Hp.1 の DLA ハプロタイプホモ接合体であり、その他の 12 頭はいずれも DLA ハプロタイプヘテロ接合体であることが確認された。

また、Dog 2 と Dog 3、Dog 5 と Dog 6 および Dog 9 と Dog 10 の 3 ペアに関しては DLA ハプロタイプが完全一致していることが確認された。

4.3.2 MLR の培養日数の検討

本研究にて開発した MLR 法における最適な培養日数の検討を行うため、DLA ハプロタイプ完全不一致のペアである Dog 7 と Dog 11 の間で MLR を行った。MLR 後 4, 5, 6 および 7 日目にそれぞれ細胞を回収し、細胞増殖の定量は従来法である [³H]thymidine-MLR および今回用いた CytoTell-MLR の 2 種類の方法で行った (Figure 2)。その結果、CytoTell-MLR においては、培養日数の経過に伴い SI の上昇が確認され、培養 7 日目には Dog 7 または Dog 11 をドナーとした場合において、それぞれ SI は 4.79 ± 0.14 または 4.11 ± 0.25 を示した。一方、[³H]thymidine-MLR においては Dog 7 をドナーとした場合、培養 6 日目において SI は 3.64 ± 0.41 と最大の値を示し、培養 7 日目は SI が低下した (2.93 ± 0.12)。一方 Dog 11 をドナーとした場合は培養 6 日目および 7 日目でほぼ同じ SI (3.86 ± 0.55 および 3.87 ± 0.98) を示した。よって、[³H]thymidine-MLR においては培養 6 日目もしくは 7 日目で SI が最大となり、CytoTell-MLR では培養 7 日目で SI が最大となることが確認された。

4.3.3 [³H]thymidine-MLR および Cytotell-MLR における定量性の比較

従来法である [³H]thymidine-MLR および新規に開発した Cytotell-MLR を用いた細胞増殖の定量性を比較するため、推定ハプロタイプ情報をもとに DLA 型完全一致、半一致、および完全不一致の 3 グループに分け、それぞれのグループで MLR を行った (Table

3)。その後、2種類の方法を用いて培養7日目における細胞増殖の定量を実施した。両定量方法によって得られたSIの相関係数は $r = 0.709$ ($p < 0.001$)と高い相関を示した。DLAハプロタイプ完全一致ペア（青丸）およびDLA半一致ペア（緑丸）においては、SIはいずれも低値を示し、一方、DLAハプロタイプ完全不一致ペアにおいてはSIが高値を示す傾向が見られた（Figure 3）。そこで、DLAハプロタイプ一致・不一致個体間におけるアロ反応性をより正確に評価するため、さらにペア数を追加してCytoTell-MLRを実施した（Table 3）。その結果、DLAハプロタイプ完全一致ペアにおけるSI（ 1.21 ± 0.16 ）が半一致（ $SI = 2.44 \pm 0.30$ ）および完全不一致（ $SI = 3.61 \pm 0.29$ ）と比較して有意に低値を示すことが確認された（Figure 4）。

4.3.4 DLAハプロタイプホモ接合体ドナーの有用性および安全性の検討

第2章においてイヌでは移植時の最適なドナー候補となるDLAハプロタイプホモ接合体が非常に多く、ドナーの選択が容易であることが示された。そこで、これらホモ接合体ドナーの有用性および安全性を評価するため、DLAハプロタイプホモ接合体ドナーであるDog 1をドナーとし、Dog 1と同じハプロタイプを片方保有しているDog 2, 3および4をレシピエントとしたCytoTell-MLRを実施した。また、陽性対照としてDLA型完全不一致であるDog 7をレシピエントとしたCytoTell-MLRを実施した。いずれのMLRにおいても、7日間培養した後、細胞増殖の定量を行った（Figure 5）。

その結果、DLA型ホモ接合体と同一ハプロタイプを保有しているヘテロ接合体をレシピエントとした場合、SI（ $0.76 \pm 0.01 \sim 1.38 \pm 0.04$ ）を示し、これはCytoTell-MLRにおいてDLA型完全一致ペアにおけるSI（ 1.21 ± 0.16 ）と同様な低値であることが確

認められた。一方、DLA 型ホモ接合個体と DLA 型完全不一致の個体をレシピエントとした場合の SI (1.88 ± 0.14) は、DLA 型ホモ接合個体と同じハプロタイプを保有しているヘテロ接合体をレシピエントとした場合の SI と比較して有意に高値を示した。

4.3.5 CD4 および CD8 陽性 T 細胞における増殖定量

CytoTell-MLR を用いて、CD4 または CD8 陽性 T 細胞などサブタイプ別での細胞増殖を確認するため、DLA ハプロタイプ完全不一致の組み合わせである Dog 7 と Dog 9 間および Dog 7 と Dog 11 間で MLR を実施し、7 日間培養した後、フローサイトメーターを用いて CD3、CD4 または CD8 陽性 T 細胞の細胞増殖を定量した (Figure 6)。その結果、まず、いずれの組み合わせにおいても CD3 陽性 T 細胞の SI は DLA ハプロタイプ完全一致の組み合わせにおける SI の平均値 ($SI = 1.21$, Figure 3) と比較して高い値を示し、アロ反応性 T 細胞増殖が確認された (Figure 6A および 6B)。これらと同様同様の組み合わせにおいて、CD4 および CD8 陽性 T 細胞の SI を算出したところ、Dog 7 をレシピエントとした場合は CD8 陽性 T 細胞と比較して CD4 陽性 T 細胞の SI が有意に高値を示したが、一方で、Dog 7 をドナーとした場合は CD8 陽性 T 細胞の SI が高値を示すことが確認された (Figure 6D および 6E)。さらに *DLA-DRB1* 遺伝子が 1 アレルのみ異なる組み合わせである Dog 11 と Dog 12 間で MLR を行ったところ、Dog 11 をレシピエントとした場合において CD4 陽性 T 細胞の SI が CD8 陽性 T 細胞と比較し、有意に増加することが確認された (Figure 6F)。これらの結果から、新規に開発したフローサイトメーターを用いた定量法を用いることで、細胞のサブタイプ別での増殖定量を行うことが可能であることが確認された。

4.4 考察

本研究では、獣医療における移植医療を実現するため、移植時の安全性評価および移植前後のレシピエントの免疫状態をモニタリング可能な方法の開発を試みた。その結果、蛍光色素である CytoTell を用いて、フローサイトメーターによる細胞増殖定量が可能な新規 MLR 法 (CytoTell-MLR) の開発に成功した。Cytotell-MLR と従来法である $[^3\text{H}]$ thymidine-MLR を比較した結果、得られた両者の SI は非常に高い相関を示した。この結果より、2 種類の方法において、最終的に得られる細胞増殖の定量性は、ほぼ同等であると考えられ、Cytotell-MLR においても十分に細胞増殖定量が可能であることが確認された。しかし、培養日数の検討の結果、2 種類の方法において、SI が最大となる培養日数が異なっていた。これは、それぞれの方法で検出可能な T 細胞の活性化の段階が異なることが原因であると考えられる。つまり、CytoTell-MLR は、(1) アロ抗原に反応した細胞が活性化し、分裂することによる蛍光強度の減弱を測定しているため、分裂して初めて活性化が評価可能、また、(2) 培養中に増殖した細胞の蓄積を検出可能である。一方で、 $[^3\text{H}]$ thymidine-MLR は、(1) 細胞内に $[^3\text{H}]$ thymidine が取り込まれた時点で活性化が評価可能、(2) $[^3\text{H}]$ thymidine 添加後 18 時間における細胞の活性状態を検出可能である点が異なっている。これらを考慮すると、CytoTell-MLR は $[^3\text{H}]$ thymidine-MLR と比較して、SI の増加が遅れるが、その最大値は高くなる傾向があると考えられた。実際に培養 4、5、6 日目においては $[^3\text{H}]$ thymidine-MLR による SI は CytoTell-MLR よりも高値を示すが、7 日目では $[^3\text{H}]$ thymidine-MLR による SI は CytoTell-MLR よりも低値を示した。 $[^3\text{H}]$ thymidine-MLR は培養 6 日目で最大の SI が

検出されたことから、アロ抗原に反応した細胞の活性は6日で最大となることが示唆された。そして、培養6日目から7日目にこれらの活性化した細胞が分裂することで、CytoTell-MLRにおけるSIは7日目においても増加したと考えられた。そのため、 ^3H thymidine-MLRおよびCytoTell-MLRにおいてSIが最大となる培養日数に違いが生じたと考えられる。

本研究において、DLAハプロタイプ完全一致ペアでは半一致および完全不一致ペアと比較してSIが有意に低値を示したことから、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がT細胞のアロ免疫応答性を減弱させ、移植拒絶反応を回避するために重要であることが考えられた。しかしながら、DLA型完全不一致ペアにおいても、SIがDLA型完全一致ペアと同等の低値を示すペアも存在していることが観察された。T細胞前駆細胞は胸腺で分化・成熟する過程で、T細胞レセプター (T cell receptor: TCR) と胸腺内の抗原提示細胞のMHC分子に提示された自己抗原ペプチドとの結合力の強さにより、負または正の選択を受ける (Kisielow et al. 1988)。そのため、個体によって、保有するMHC型が異なることで、保有するT細胞のレパトアも大きく異なることが考えられる。DLA型完全不一致ペアにおいてもアロMHC分子および提示されているアロ抗原ペプチドを異物と認識しうるT細胞が存在しない場合、MLRにおいてアロ免疫応答を示さない場合があると考えられる。本研究においては、Dog 13をレシピエントとしDog 2, Dog 3, Dog 5またはDog 6をドナーとした場合においてのみ、DLA型完全不一致にも関わらず、SIはそれぞれ1.34、1.18、1.52または1.49と低値を示した。さらにDog 5をレシピエントとし再度MLRを行った場合においてもSI = 0.99と低値を示した。しかし、興味深いことに、Dog 2とDog 3またはDog 5とDog 6

はそれぞれ Hp.1 / Hp.2 または Hp.2 / Hp.4 を保有しており、さらに、Hp.1 と Hp.4 においては *DLA-DRB1* が 1 アレル異なっている(*DLA-DRB1*001:01* もしくは *DLA-DRB1*001:02*) のみであり、これらのアレルの exon 2 のアミノ酸配列を比較すると、1 残基の変異しか認められなかった。よって、Dog 2, Dog 3, Dog 5 および Dog 6 は非常に類似した DLA 型を保有しており、Dog 13 はそれらの DLA 型に対してアロ反応性を示さない T 細胞のレパトアを保有していた可能性が高いと考えられた。

上述のように、DLA 型完全不一致ペアにおいても MLR においてアロ免疫応答性が非常に低値となる場合があることが確認された。しかし、MLR は基本的には T 細胞が関与する拒絶反応を評価する方法であり、その他の移植拒絶反応のメカニズムとして、ヒトにおいては MHC 型の違いにより、移植臓器や細胞に対するドナー特異的抗体 (Donor specific antibody: DSA) が産生され慢性拒絶反応に関与することや NK 細胞が関与する拒絶反応が存在することが明らかになっている (Davies et al. 2002; Ruggeri et al. 1999; Wiebe et al. 2012)。イヌにおいては、このような DSA による慢性拒絶反応や NK 細胞関連の拒絶反応に関する知見は皆無であるが、MHC 型が異なるドナーとレシピエント間で移植を行うことは、移植拒絶反応の発症リスク上昇に繋がることが容易に予想される。本研究において最も重要な点は、DLA ハプロタイプ完全一致ペアでは半一致および完全不一致ペアと比較して有意に SI が低値となった点である。この結果より、少なくともドナーとレシピエント間で DLA 型を一致させることで、T 細胞のアロ反応性を減弱させることが可能であることが確認された。さらに、DLA ハプロタイプホモ接合体をドナーとして用いることで、このホモ接合体と同じハプロタイプを保有しているヘテロ接合体における SI が DLA ハプロタイプ完全一致の場合と同等に低値を示すことが

確認された。よって、DLA ハプロタイプホモ接合体は、より多くの個体に DLA 型が一致した移植を行うことが可能な非常に有用なドナーであることが、実際の T 細胞のアロ反応性からも証明された。

新規に開発した CytoTell-MLR により細胞増殖定量を行うことで、CD4 および CD8 陽性 T 細胞など細胞のサブタイプ別での増殖定量も可能であることが確認された。Dog 7 と Dog 9 ペア、Dog 7 と Dog11 ペアおよび Dog 11 と Dog 12 ペアのいずれのペアにおいてもドナーとレシピエントを入れ替えることで、CD4 および CD8 陽性 T 細胞の増殖が変化することが確認された。マウスを用いた先行研究においても、ドナーとレシピエントを入れ替えることで、CD4 および CD8 陽性 T 細胞の増殖が異なることが報告されており、これらのことから個々のもつ T 細胞のレパトアが異なることで、アロ反応性に差異が生じていることが示唆される (Tanaka et al. 2004)。CytoTell-MLR を用いることで、細胞のサブタイプ別での定量を行うことが可能であることから、本方法は移植前のドナーとレシピエントの安全性評価ならびに、移植後のレシピエントにおける免疫状態のモニタリングにも有用であると考えられる。

また、移植医療を成功させるためには適切な免疫抑制剤を選択することも非常に重要な要素である。ヒトにおいては CFSE-MLR を用いることで、シクロスポリン A、ラパマイシン、タクロリムスおよびミコフェノール酸モフェチルなど様々な免疫抑制剤において、ヘルパー T 細胞、細胞傷害性 T 細胞、制御性 T 細胞および NK 細胞などサブタイプの異なる細胞に対する免疫抑制効果の違いが明らかにされている (Coenen et al. 2006; Gao et al. 2007; Ohata et al. 2011; Page et al. 2012; Raimondi et al. 2010)。イヌにおいても多くの免疫抑制剤が臨床現場で使用されているが、それらはヒト医療を参

考とし獣医療に導入されたものであり、実際にイヌの細胞を用いた免疫抑制剤の効果を検討した報告はほとんど無い。イヌにおいても、移植医療を実現するためには適切な免疫抑制剤の選択を行うことは重要であり、それらの免疫抑制効果を評価する上で CytoTell-MLR は非常に有用な方法であると考えられる。

本研究ではイヌの臨床現場のみならず移植研究分野においても非常に有用な手法となる CytoTell-MLR 法の開発に成功した。また、本方法を用いることで、イヌにおいても MHC 型を一致させることがアロ免疫応答を回避するために重要であり、さらに DLA ホモ接合体は有用で安全性の高いドナーとなることが確認された。これらの成果は今後のイヌにおける移植研究の発展に大きく貢献できると考えられる。

Table 1. Primers used for this study

DLA locus	Primer sequence (5' to 3')	Primer location	Annealing temperature	Product size
<i>DLA-88(88L)</i>	CGGAGATGGAGGTGGTGA GGTGGCGGGTCACACG	exon 1 exon 4	63°C	654-657 bp
<i>DLA-12</i>	CGACCCTAAAGGTCTGGGCTA GGTGGCGGGTCACACG	exon 1 exon 4	63°C	660 bp
<i>DLA-DRB1</i>	GCACCCTGTCCTTTCTG TCACCATCTCCACTTCAG	5' UTR 3' UTR	60°C	841 bp
<i>DLA-DQA1</i>	AGTTCTGATTCTGGGGAC TCTGGGAGGTGGGCAT	5' UTR 3' UTR	60°C	797 bp
<i>DLA-DQB1</i>	CAGGTAGGAGCTGTGTTGAC CGGTATCCTCAGGCATC	5' UTR 3' UTR	60°C	872 bp

Table 2. Identified DLA alleles and haplotype information in 13 Beagles

Dog No.	Haplotype ID	DLA locus				
		<i>DLA-88</i>	<i>DLA-12</i>	<i>DLA-DRB1</i>	<i>DLA-DQA1</i>	<i>DLA-DQB1</i>
Dog 1	Hp.1	<i>*502:01</i>	<i>*1</i>	<i>*001:02</i>	<i>*001:01</i>	<i>*002:01</i>
	Hp.1	<i>*502:01</i>	<i>*1</i>	<i>*001:02</i>	<i>*001:01</i>	<i>*002:01</i>
Dog 2	Hp.1	<i>*502:01</i>	<i>*1</i>	<i>*001:02</i>	<i>*001:01</i>	<i>*002:01</i>
	Hp.2	<i>*012:01</i>	<i>*1</i>	<i>*015:01</i>	<i>*009:01</i>	<i>*001:01</i>
Dog 3	Hp.1	<i>*502:01</i>	<i>*1</i>	<i>*001:02</i>	<i>*001:01</i>	<i>*002:01</i>
	Hp.2	<i>*012:01</i>	<i>*1</i>	<i>*015:01</i>	<i>*009:01</i>	<i>*001:01</i>
Dog 4	Hp.1	<i>*502:01</i>	<i>*1</i>	<i>*001:02</i>	<i>*001:01</i>	<i>*002:01</i>
	Hp.3	<i>*50201</i>	<i>*1</i>	<i>*008:01</i>	<i>*004:01</i>	<i>*003:01</i>
Dog 5	Hp.2	<i>*012:01</i>	<i>*1</i>	<i>*015:01</i>	<i>*009:01</i>	<i>*001:01</i>
	Hp.4	<i>*502:01</i>	<i>*1</i>	<i>*001:01</i>	<i>*001:01</i>	<i>*002:01</i>
Dog 6	Hp.2	<i>*012:01</i>	<i>*1</i>	<i>*015:01</i>	<i>*009:01</i>	<i>*001:01</i>
	Hp.4	<i>*502:01</i>	<i>*1</i>	<i>*001:01</i>	<i>*001:01</i>	<i>*002:01</i>
Dog 7	Hp.2	<i>*012:01</i>	<i>*1</i>	<i>*015:01</i>	<i>*009:01</i>	<i>*001:01</i>
	Hp.5	<i>*005:01</i>	<i>*nov2</i>	<i>*020:01</i>	<i>*004:01</i>	<i>*013:01</i>
Dog 8	Hp.4	<i>*502:01</i>	<i>*1</i>	<i>*001:01</i>	<i>*001:01</i>	<i>*002:01</i>
	Hp.6	<i>*501:01</i>	<i>*1</i>	<i>*006:01</i>	<i>*005:011</i>	<i>*007:01</i>
Dog 9	Hp.6	<i>*501:01</i>	<i>*1</i>	<i>*006:01</i>	<i>*005:011</i>	<i>*007:01</i>
	Hp.7	<i>*045:01</i>	<i>*1</i>	<i>*019:01</i>	<i>*004:01</i>	<i>*013:03-<i>*017:01</i></i>
Dog 10	Hp.6	<i>*501:01</i>	<i>*1</i>	<i>*006:01</i>	<i>*005:011</i>	<i>*007:01</i>
	Hp.7	<i>*045:01</i>	<i>*1</i>	<i>*019:01</i>	<i>*004:01</i>	<i>*013:03-<i>*017:01</i></i>
Dog 11	Hp.6	<i>*501:01</i>	<i>*1</i>	<i>*006:01</i>	<i>*005:011</i>	<i>*007:01</i>
	Hp.8	<i>*041:01</i>	<i>*1</i>	<i>*013:01</i>	<i>*003:01</i>	<i>*005:01</i>
Dog 12	Hp.6	<i>*501:01</i>	<i>*1</i>	<i>*006:01</i>	<i>*005:011</i>	<i>*007:01</i>
	Hp.9	<i>*041:01</i>	<i>*1</i>	<i>*101:01</i>	<i>*003:01</i>	<i>*005:01</i>
Dog 13	Hp.10	<i>*508:01</i>	<i>*nov1-3</i>	<i>*002:01</i>	<i>*009:01</i>	<i>*001:01</i>
	Hp.11	<i>*508:01</i>	<i>*nov1-3</i>	<i>*011:01</i>	<i>*002:01</i>	<i>*013:03</i>

Table 3. Information about the pair of dogs and DLA type using MLR

Recipient	Donor	DLA type (Haplotype)	Number of attempts	
			[³ H]Thymidine assay	CytoTell assay
Dog 2	Dog 3	Full match	2	2
Dog 3	Dog 2	Full match	2	2
Dog 5	Dog 6	Full match	1	2
Dog 6	Dog 5	Full match	2	2
Dog 9	Dog 10	Full match	1	3
Dog 10	Dog 9	Full match	1	3
Dog 2	Dog 5	Haplo match	1	1
Dog 2	Dog 6	Haplo match	1	1
Dog 3	Dog 5	Haplo match	1	1
Dog 3	Dog 6	Haplo match	1	1
Dog 5	Dog 2	Haplo match	1	1
Dog 5	Dog 3	Haplo match	1	1
Dog 5	Dog 8	Haplo match	1	1
Dog 6	Dog 2	Haplo match	-	1
Dog 6	Dog 3	Haplo match	-	1
Dog 6	Dog 8	Haplo match	1	1
Dog 8	Dog 5	Haplo match	2	2
Dog 9	Dog 11	Haplo match	1	1
Dog 11	Dog 9	Haplo match	1	1
Dog 11	Dog 12	Haplo match	-	3
Dog 12	Dog 11	Haplo match	-	3
Dog 1	Dog 9	Full miss match	1	1
Dog 2	Dog 8	Full miss match	1	1
Dog 2	Dog 13	Full miss match	1	1
Dog 3	Dog 8	Full miss match	1	1
Dog 3	Dog 13	Full miss match	1	1

Table 3. continued

Dog 5	Dog 13	Full miss match	2	2
Dog 6	Dog 13	Full miss match	1	1
Dog 7	Dog 9	Full miss match	2	4
Dog 7	Dog 11	Full miss match	2	4
Dog 8	Dog 2	Full miss match	1	1
Dog 8	Dog 3	Full miss match	1	1
Dog 8	Dog 13	Full miss match	1	1
Dog 9	Dog 1	Full miss match	1	1
Dog 9	Dog 7	Full miss match	2	4
Dog 11	Dog 7	Full miss match	2	4
Dog 13	Dog 2	Full miss match	1	1
Dog 13	Dog 3	Full miss match	1	1
Dog 13	Dog 5	Full miss match	2	2
Dog 13	Dog 6	Full miss match	2	2
Dog 13	Dog 8	Full miss match	1	1

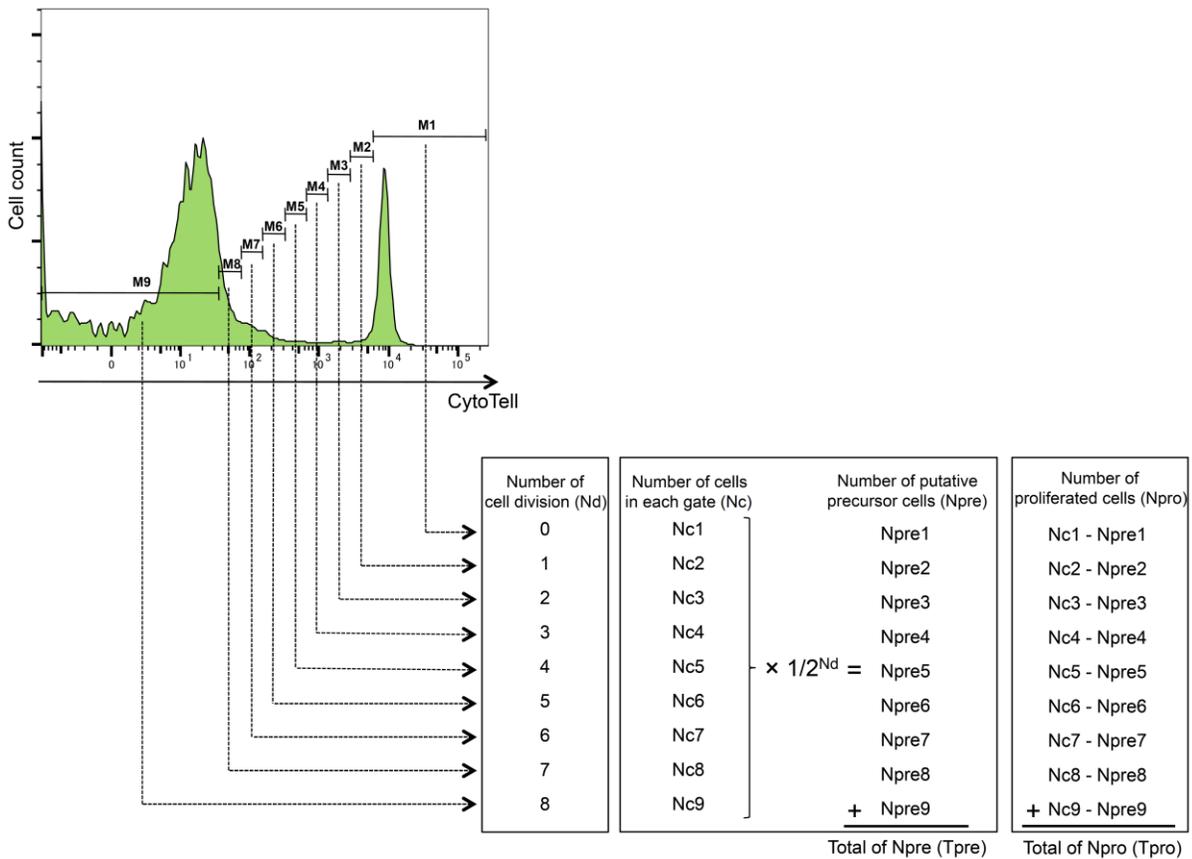


Figure 1. Method for quantification and calculation of proliferation in allo-reactive CD3 positive T cells with Cytotell-MLR.

CytoTell fluorescent histogram indicate the history for the proliferation of allo-reactive CD3 positive T cells of recipient. Nine gates (M1 to M9) were described in accordance with the diminution of CytoTell fluorescent intensity by half and each gate represent the number of cell division (0 to 8). The limitation for detection of cell divisions is eight because Cytotell fluorescent intensity approaches auto-fluorescent levels. Therefore, the cell division cycle over eight are not able to distinguish in this method. The detailed method for calculating a number of precursor cells, proliferation index and stimulation index is described at Material and Method.

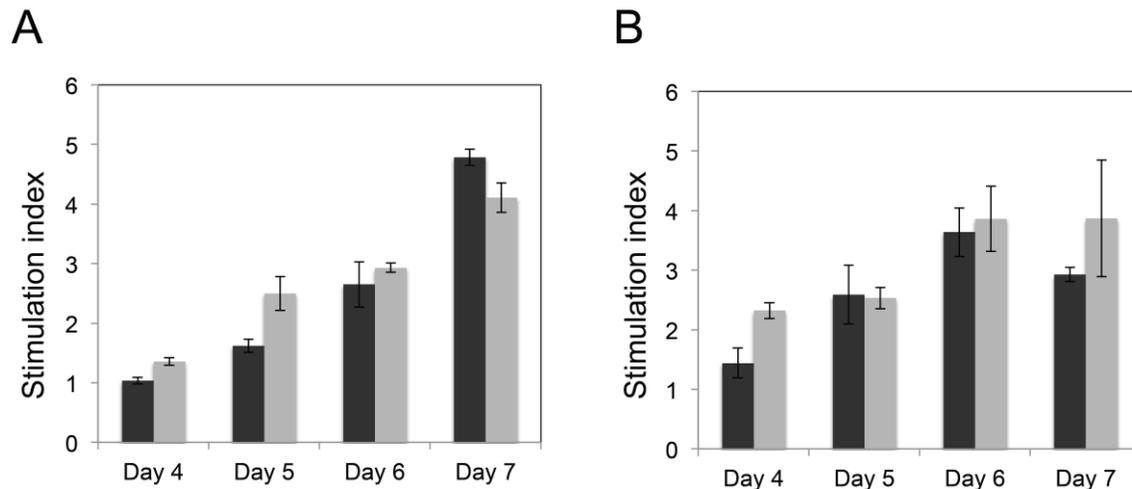


Figure 2. Kinetics for allo-immune reactivity quantified with incubation time by both CytoTcell-MLR and [³H]thymidine-MLR assay.

Stimulation index obtained by (A) Cytotell-based MLR and (B) [³H]thymidine-based MLR from day four to seven were shown. Black bar represents the stimulation index using Dog 11 as a recipient, while gray bar represents the outcome using Dog 11 as a recipient.

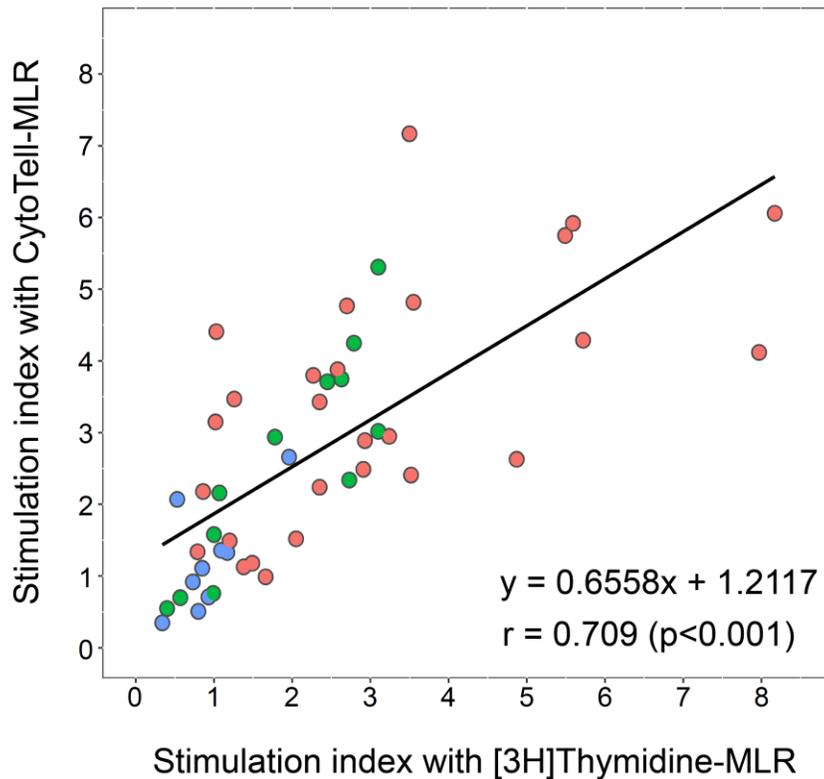


Figure 3. Comparisons for Stimulation index obtained from both CytoTell-based and [3H]thymidine-based assay.

Blue, green and red circles represent the SI for DLA full-match, DLA haplo-match (one to five alleles mismatch) and DLA full miss-match pairs with [3H]thymidine-based and CytoTell-based assay, respectively. The solid line represent regression line. Regression equation and correlation coefficient by Pearson's product-moment correlation (r) were shown.

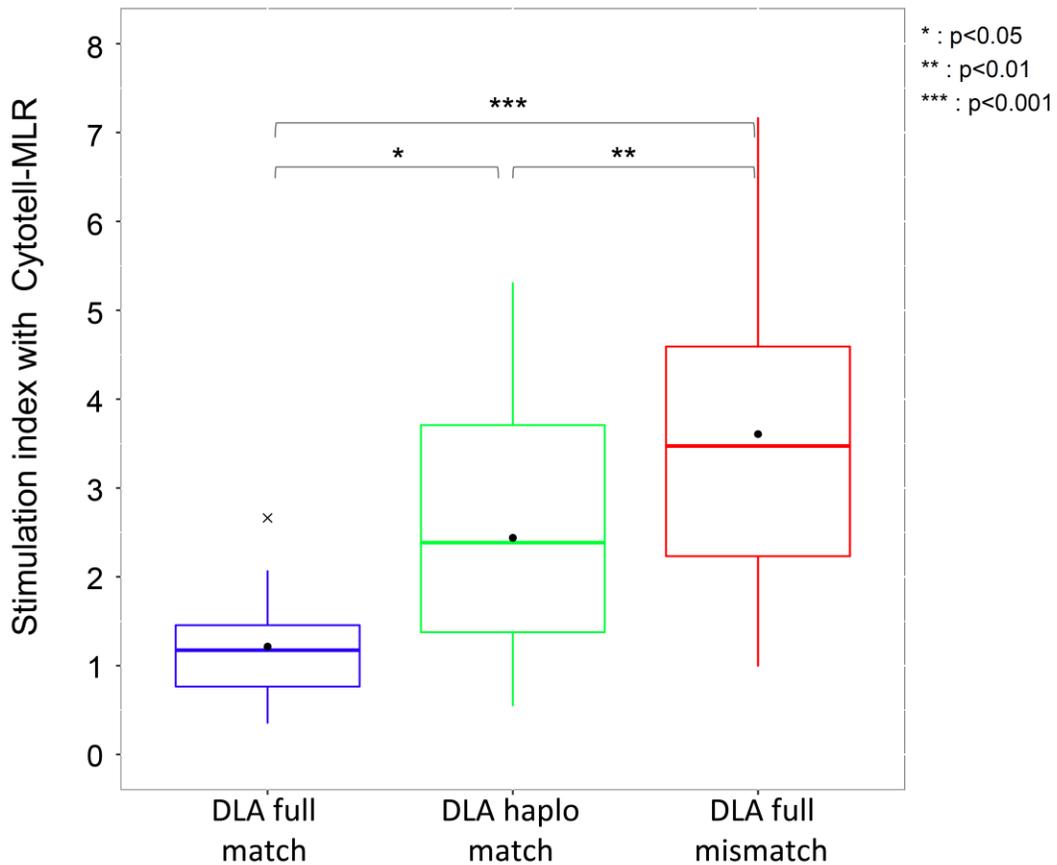


Figure 4. Quantification for allo-immune response with CytoTell –based MLR assay between each dog pair.

Blue, green and red boxplot represent the SI between dog pairs with DLA full match, DLA haplo match and DLA full mismatch, respectively. “ · ” within each boxplot and “×” above the boxplot for DLA full match indicate means of SI and an outlier, respectively.

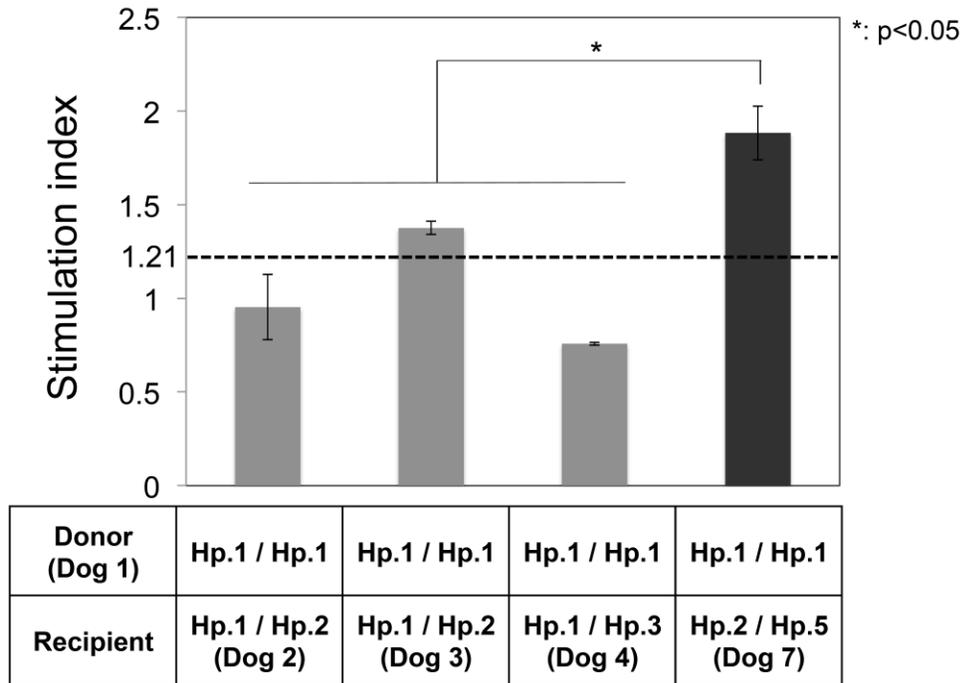


Figure 5. Quantification of allo-immune response using DLA homozygous dog as a donor with CytoTell-MLR.

Gray and black bar represent the stimulation index using dog with identical haplotype to DLA homozygous dog and with full mismatch haplotype to DLA homozygous dog, respectively. The table below the graph show the combination of dogs for MLR and haplotypes in each dog. The horizontal dotted line indicate the mean of SI for DLA full match pair (Figure 3). Detailed haplotype information were shown in Table 2.

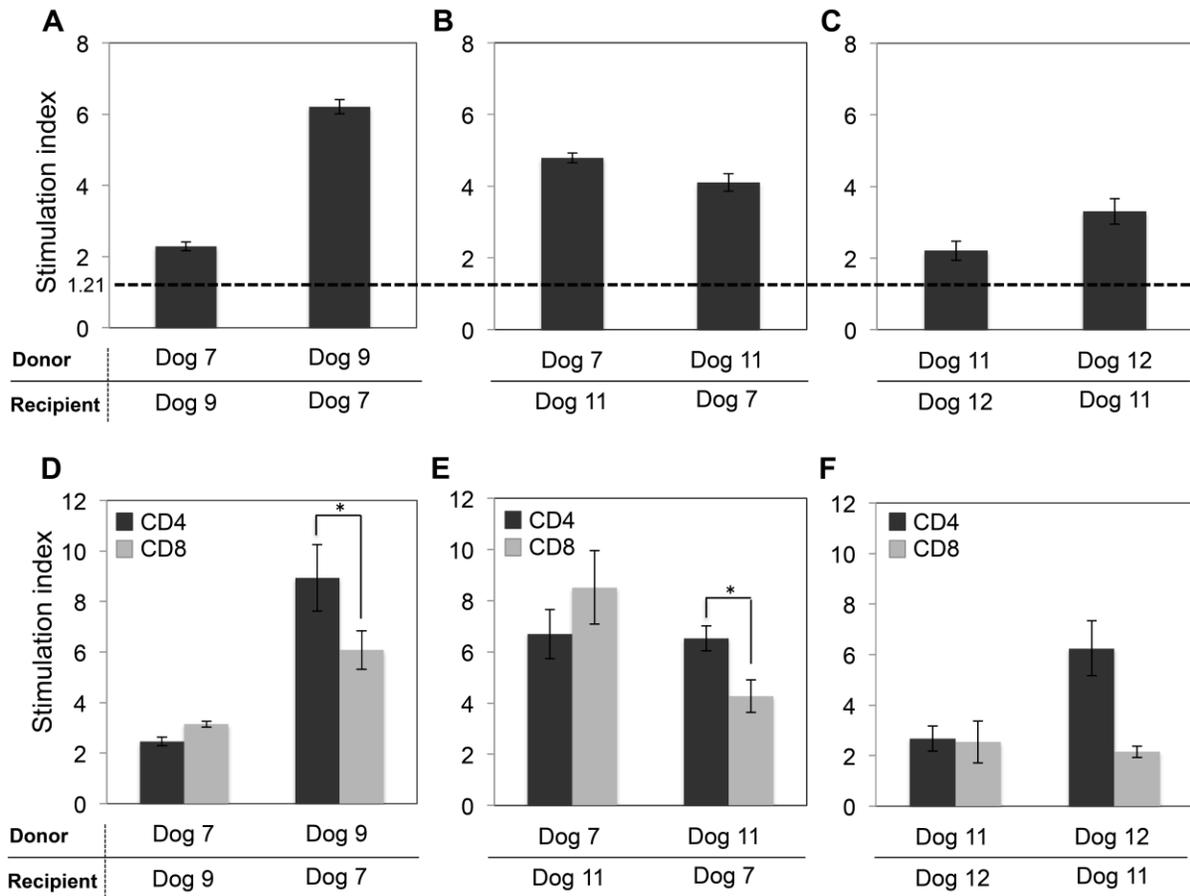


Figure 6. Quantification for CD4 and CD8 T cell proliferation with CytoTell-based MLR.

(A) - (C) and (D) – (F) represent quantification for CD3 T cell and CD4 or CD8 T cell proliferation between Dog 7-Dog 9, Dog 7-Dog 11 and Dog 11-Dog 12 pair, respectively. Black and grey bar indicate SI calculated in CD4 and CD8 T population after MLR, respectively. The combination of dogs for MLR are shown below the each graph. Detailed haplotype information is shown in Table 2. The horizontal dotted line indicate the mean of SI for DLA full match pair (Figure 3).

第 5 章

総括

本研究では、イヌにおける他家移植による再生医療を実現するため、移植拒絶反応において最も主要な抗原となる DLA 分子を規定している DLA 遺伝子の多型性を解明し、さらに DLA 型一致・不一致個体間における T 細胞のアロ反応性の評価を行なった。その結果、これまで不明であった DLA 遺伝子の多型性が解明され、さらにドナーとレシピエント間で DLA 型を一致させることで、T 細胞のアロ反応性を低減させることが可能であることを確認した。

DLA 遺伝子の多型性の解明

MHC 遺伝子は T 細胞に抗原ペプチドを提示することで獲得免疫を発動させ、免疫学的に非常に重要な機能を担っている分子である。また MHC 分子を規定する MHC 遺伝子は比類なき多型性を示し、その多型は感染症、自己免疫疾患、腫瘍および移植拒絶反応など様々な表現型と関連する。移植医療を成功させるためには、ドナーとレシピエント間で MHC 型を一致させることが非常に重要であり、そのためにはまず MHC 遺伝子の多型性の全貌を正確に把握する必要がある。

第 2 章では、まず、多型性が不明であった DLA クラス I 遺伝子 3 座 (*DLA-88*, *DLA-12* および *DLA-64* 遺伝座) を中心とした多型解析を 49 犬種 442 頭を用いて行い、各遺伝座における多型性を明らかにした。さらに、ゲノム DNA を用いた解析から、DLA クラス I 遺伝子領域に新規の構造多型が存在していることが明らかとなり、以上の結果から、DLA クラス I 遺伝子の多型性を詳細に解明することができた。これらの塩基配列の多型情報に加えて、末梢血単核球における遺伝子発現量および抗原ペプチド結合領域や T 細胞認識領域のアミノ酸配列が、各 DLA クラス I 遺伝子において異なっていることが明

らかとなり、これらの差異は各 DLA クラス I 遺伝子における機能的な違いを生ずることが考えられた。

さらに、これらの多型情報を基に、本研究において世界で初めて DLA クラス I 遺伝子 3 座および DLA クラス II (*DLA-DRB1*) 遺伝子を含むハプロタイプ推定を行い、犬種ごとに保有している DLA ハプロタイプの種類や頻度などが異なることを明らかにした。この結果より、犬種ごとに免疫応答性に差異があることが示唆された。また、移植医療において最適なドナーとなる DLA ハプロタイプホモ接合体の割合が非常に高いことが明らかとなり、イヌでは移植医療におけるドナーの選択が容易であることが考えられた。

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

第 2 章において、DLA 遺伝子のタイピング法が確立され、その多型解析法を用いることで、DLA 遺伝子の多型性を解明した。その結果、イヌでは移植医療において最適なドナーとなる DLA ハプロタイプホモ接合体の割合が非常に高いことも確認された。しかし、DLA の多型性が解明された一方で、ドナーとレシピエント間の DLA 型を考慮した実際の T 細胞におけるアロ反応性を評価した研究報告は皆無であった。また、ヒトにおいては、移植前の安全性評価および移植後のレシピエントの免疫状態のモニタリング法としてフローサイトメーターによる CFSE-MLR が開発され、臨床でも用いられているが、イヌにおいてはそのような評価法は存在していなかった。そこで、第 3 章では、まず、イヌにおけるフローサイトメーターを用いた移植時の安全性評価法を開発し、開発した方法を用いて DLA 型の違いによるアロ反応性の評価を試みた。その結果、CFSE

に類似した蛍光色素を用いた CytoTell-MLR の開発に成功した。この方法を用いることで、CD4 および CD8 陽性 T 細胞など細胞のサブタイプ別でのアロ反応性を評価可能であり、本方法は移植前後の安全性評価や免疫状態のモニタリングにも有用な方法であると考えられる。さらに、ドナーとレシピエント間で DLA 型が完全一致している場合、有意にアロ反応性を抑制でき、イヌにおいても MHC 型を一致させることが移植医療を成功させる重要な要素であることが示された。また、DLA ホモ接合体ドナーの安全性および有用性も確認された。

本研究により、DLA 遺伝子の多型性が解明され、また、移植医療を実施する際に必要な安全性評価法の確立に成功した。その結果、イヌにおいては移植医療において最適なドナーとなる DLA 型ホモ接合体の頻度がヒトと比較して圧倒的に高く、さらに、これらのホモ接合体をドナーとして用いることで、T 細胞のアロ反応性を有意に抑制できることが確認された。これらの DLA ホモ接合体から間葉系幹細胞、iPS 細胞または DFAT 細胞などを取得・作製し、それらの細胞をストックすることができれば、DLA 型が一致した幹細胞他家移植をより安価にそしてより迅速に実施することが可能である。イヌにおいては、このような幹細胞他家移植の体系を構築しやすいと考えられる。また、イヌは近年の獣医療の発展により寿命が伸び、ヒトと類似した様々な難治性疾患や加齢性疾患を自然発症することが報告されている。これらの疾患を対象とした幹細胞移植による再生医療をヒトに先んじて、イヌにおいて実施することで、ヒトの再生医療モデルとしても非常に有用であることが考えられる。本研究の成果は、イヌにおける移植医療実現の基盤となる重要な知見であり、今後のイヌの移植医療の発展に大きく貢献しうるもの

である。

また、DLA 遺伝子の多型性は移植拒絶反応のみならず感染症、自己免疫疾患および主要など非常に多くの疾患と関連することから、本研究により確立された多型解析法および解明された DLA 遺伝子の多型情報は、獣医療および獣医学全体の発展において多大なる貢献をもたらすことが期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究室への受け入れを許可して頂き、さらには終始御指導、御鞭撻を賜った東海大学医学部基礎医学系分子生命化学の椎名隆 教授に心より感謝申し上げます。

また、直接のご指導を賜りました東海大学医学部基礎医学系分子生命化学の鈴木進悟 助教には心より厚く御礼申し上げます。さらには、研究材料の提供にご協力頂いた、日本大学生物資源科学部獣医学科の亘敏広 教授、中山智宏 教授、枝村一弥 准教授、坂井学 准教授、伊藤大介 専任講師および関真美子 専任講師ならびにマーブル動物医療センターの難波信一 院長に深く感謝いたします。さらには、実験の補助をしてくださった魚病/比較免疫学研究室の諸氏並びに日本大学動物医科学研究センターの大学院生の皆様には深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、共同研究をさせて頂き、御助言および研究材料を提供して頂いたテルモ株式会社の坂田清 氏、平原一郎 氏および佐藤秀樹 氏には心より御礼申し上げます。

最後に、大学院博士課程への進学を応援いただき、終始温かく見守り、支え続けてくれた家族に心から感謝致します。

参考文献

- Anfossi N, Andre P, Guia S, Falk CS, Roetynck S, Stewart CA, Bresó V, Frassati C, Reviron D, Middleton D, Romagne F, Ugolini S, Vivier E (2006) Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 25:331-42
- Angulo R, Fulcher D (1998) Measurement of *Candida* - specific blastogenesis: Comparison of carboxyfluorescein succinimidyl ester labelling of T cells, thymidine incorporation, and CD69 expression. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology* 34:143-151
- Apps R, Qi Y, Carlson JM, Chen H, Gao X, Thomas R, Yuki Y, Del Prete GQ, Goulder P, Brumme ZL (2013) Influence of HLA-C expression level on HIV control. *Science* 340:87-91
- Bjorkman P, Saper M, Samraoui B, Bennett W, Strominger J, Wiley D (1987) The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329:512
- Bøyum A, Løvhaug D, Tresland L, Nordlie E (1991) Separation of leucocytes: improved cell purity by fine adjustments of gradient medium density and osmolality. *Scandinavian journal of immunology* 34:697-712
- Braud VM, Allan DS, O'callaghan CA, Söderström K, D'andrea A, Ogg GS, Lazetic S, Young NT, Bell JI, Phillips JH (1998) HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391:795
- Burnett R, DeRose S, Wagner J, Store R (1997) Molecular analysis of six dog leukocyte antigen class I sequences including three complete genes, two truncated genes and one full - length processed gene. *Tissue Antigens* 49:484-495
- Burnett RC, Geraghty DE (1995) Structure and expression of a divergent canine class I gene. *The Journal of Immunology* 155:4278-4285
- Codner GF, Birch J, Hammond JA, Ellis SA (2012) Constraints on haplotype structure and variable gene frequencies suggest a functional hierarchy within cattle MHC class I. *Immunogenetics* 64:435-445
- Coenen JJ, Koenen HJ, van Rijssen E, Hilbrands LB, Joosten I (2006) Rapamycin,

- and not cyclosporin A, preserves the highly suppressive CD27+ subset of human CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Blood* 107:1018-1023
- Cotman CW, Head E (2008) The canine (dog) model of human aging and disease: dietary, environmental and immunotherapy approaches. *Journal of Alzheimer's Disease* 15:685-707
- Crooks GE, Hon G, Chandonia J-M, Brenner SE (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome research* 14:1188-1190
- Davies SM, Ruggieri L, DeFor T, Wagner JE, Weisdorf DJ, Miller JS, Velardi A, Blazar BR (2002) Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. *Blood* 100:3825-3827
- Debenham SL, Hart EA, Ashurst JL, Howe KL, Quail MA, Ollier WE, Binns MM (2005) Genomic sequence of the class II region of the canine MHC: comparison with the MHC of other mammalian species. *Genomics* 85:48-59
- Frantz LA, Mullin VE, Pionnier-Capitan M, Lebrasseur O, Ollivier M, Perri A, Linderholm A, Mattiangeli V, Teasdale MD, Dimopoulos EA (2016) Genomic and archaeological evidence suggest a dual origin of domestic dogs. *Science* 352:1228-1231
- Gagnier L, Wilhelm BT, Mager DL (2003) Ly49 genes in non-rodent mammals. *Immunogenetics* 55:109-115
- Gao W, Lu Y, El Essawy B, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB (2007) Contrasting effects of cyclosporine and rapamycin in de novo generation of alloantigen-specific regulatory T cells. *Am J Transplant* 7:1722-32
- Graumann M, DeRose S, Ostrander E, Storb R (1998) Polymorphism analysis of four canine MHC class I genes. *Tissue Antigens* 51:374-381
- Hammond JA, Guethlein LA, Abi-Rached L, Moesta AK, Parham P (2009) Evolution and survival of marine carnivores did not require a diversity of killer cell Ig-like receptors or Ly49 NK cell receptors. *J Immunol* 182:3618-27
- Hartlerode AJ, Scully R (2009) Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *Biochem J* 423:157-68
- Hosomichi K, Miller MM, Goto RM, Wang Y, Suzuki S, Kulski JK, Nishibori M, Inoko H, Hanzawa K, Shiina T (2008) Contribution of mutation, recombination, and gene conversion to chicken MHC-B haplotype diversity.

- The Journal of Immunology 181:3393-3399
- Kennedy LJ, Angles J, Barnes A, Carter S, Francino O, Gerlach J, Happ G, Ollier W, Thomson W, Wagner J (2001) Nomenclature for factors of the dog major histocompatibility system (DLA), 2000: second report of the ISAG DLA Nomenclature Committee. *Tissue Antigens* 58:55-70
- Kennedy LJ, Barnes A, Short A, Brown JJ, Lester S, Seddon J, Fleeman L, Francino O, Brkljacic M, Knyazev S, Happ GM, Ollier WE (2007) Canine DLA diversity: 1. New alleles and haplotypes. *Tissue Antigens* 69 Suppl 1:272-88
- Khanna C, Lindblad-Toh K, Vail D, London C, Bergman P, Barber L, Breen M, Kitchell B, McNeil E, Modiano JF (2006) The dog as a cancer model. *Nature biotechnology* 24:1065
- Kisielow P, Teh HS, Blüthmann H, von Boehmer H (1988) Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature* 335:730
- Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, DeMars R (1990) A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* 248:220-223
- Kreijveld E, Koenen HJ, van Cranenbroek B, van Rijssen E, Joosten I, Hilbrands LB (2008) Immunological monitoring of renal transplant recipients to predict acute allograft rejection following the discontinuation of tacrolimus. *PLoS One* 3:e2711
- Kulski JK, Shiina T, Anzai T, Kohara S, Inoko H (2002) Comparative genomic analysis of the MHC: the evolution of class I duplication blocks, diversity and complexity from shark to man. *Immunological reviews* 190:95-122
- Kumanovics A, Takada T, Lindahl KF (2003) Genomic organization of the mammalian MHC. *Annu Rev Immunol* 21:629-57
- Laurenson K, Sillero-Zubiri C, Thompson H, Shiferaw F, Thirgood S, Malcolm J (1998) Disease as a threat to endangered species: Ethiopian wolves, domestic dogs and canine pathogens. *Animal Conservation forum*. Cambridge University Press
- Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, Karlsson EK, Jaffe DB, Kamal M, Clamp M, Chang JL, Kulbokas EJ, 3rd, Zody MC, Mauceli E, Xie X, Breen M, Wayne RK, Ostrander EA, Ponting CP, Galibert F, Smith DR, DeJong PJ, Kirkness E,

- Alvarez P, Biagi T, Brockman W, Butler J, Chin CW, Cook A, Cuff J, Daly MJ, DeCaprio D, Gnerre S, Grabherr M, Kellis M, Kleber M, Bardeleben C, Goodstadt L, Heger A, Hitte C, Kim L, Koepfli KP, Parker HG, Pollinger JP, Searle SM, Sutter NB, Thomas R, Webber C, Baldwin J, Abebe A, Abouelleil A, Aftuck L, Ait-Zahra M, Aldredge T, Allen N, An P, Anderson S, Antoine C, Arachchi H, Aslam A, Ayotte L, Bachantsang P, Barry A, Bayul T, Benamara M, Berlin A, Bessette D, Blitshteyn B, Bloom T, Blye J, Boguslavskiy L, Bonnet C, Boukhgalter B, Brown A, Cahill P, Calixte N, Camarata J, Cheshatsang Y, Chu J, Citroen M, Collymore A, Cooke P, Dawoe T, Daza R, Decktor K, DeGray S, Dhargay N, Dooley K, Dooley K, Dorje P, Dorjee K, Dorris L, Duffey N, Dupes A, Egbiremolen O, Elong R, Falk J, Farina A, Faro S, Ferguson D, Ferreira P, Fisher S, FitzGerald M, et al. (2005) Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438:803-19
- Lunney JK, Ho CS, Wysocki M, Smith DM (2009) Molecular genetics of the swine major histocompatibility complex, the SLA complex. *Dev Comp Immunol* 33:362-74
- Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, Tanaka N, Matsubara Y, Sakuma T, Satomi A, Otaki M, Ryu J, Mugishima H (2008) Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 215:210-22
- Miyamae J, Suzuki S, Katakura F, Uno S, Tanaka M, Okano M, Matsumoto T, Kulski JK, Moritomo T, Shiina T (2018) Identification of novel polymorphisms and two distinct haplotype structures in dog leukocyte antigen class I genes: DLA-88, DLA-12 and DLA-64. *Immunogenetics* 70:237-255
- Morris H, DeWolf S, Robins H, Sprangers B, LoCascio SA, Shonts BA, Kawai T, Wong W, Yang S, Zuber J (2015) Tracking donor-reactive T cells: evidence for clonal deletion in tolerant kidney transplant patients. *Science translational medicine* 7:272ra10-272ra10
- Nei M, Gu X, Sitnikova T (1997) Evolution by the birth-and-death process in multigene families of the vertebrate immune system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94:7799-7806

- Niskanen AK, Hagstrom E, Lohi H, Ruokonen M, Esparza-Salas R, Aspi J, Savolainen P (2013) MHC variability supports dog domestication from a large number of wolves: high diversity in Asia. *Heredity (Edinb)* 110:80-5
- Noe L, Kucherov G (2005) YASS: enhancing the sensitivity of DNA similarity search. *Nucleic Acids Res* 33:W540-3
- Ohata K, Espinoza JL, Lu X, Kondo Y, Nakao S (2011) Mycophenolic acid inhibits natural killer cell proliferation and cytotoxic function: a possible disadvantage of including mycophenolate mofetil in the graft-versus-host disease prophylaxis regimen. *Biol Blood Marrow Transplant* 17:205-13
- Oku M, Okumi M, Sahara H, Hirakata A, Onoe T, Griesemer AD, Yamada K (2008) Porcine CFSE mixed lymphocyte reaction and PKH-26 cell-mediated lympholysis assays. *Transpl Immunol* 20:78-82
- Otting N, de Vos-Rouweler AJ, Heijmans CM, de Groot NG, Doxiadis GG, Bontrop RE (2007) MHC class IA region diversity and polymorphism in macaque species. *Immunogenetics* 59:367-375
- Otting N, Heijmans CM, Noort RC, de Groot NG, Doxiadis GG, van Rood JJ, Watkins DI, Bontrop RE (2005) Unparalleled complexity of the MHC class I region in rhesus macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1626-31
- Page A, Srinivasan S, Singh K, Russell M, Hamby K, Deane T, Sen S, Stempora L, Leopardi F, Price AA, Strobert E, Reimann KA, Kirk AD, Larsen CP, Kean LS (2012) CD40 blockade combines with CTLA4Ig and sirolimus to produce mixed chimerism in an MHC-defined rhesus macaque transplant model. *Am J Transplant* 12:115-25
- Parham P, Lomen C, Lawlor D, Ways J, Holmes N, Coppin H, Salter R, Wan A, Ennis P (1988) Nature of polymorphism in HLA-A, -B, and -C molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85:4005-4009
- Pedersen NC, Pooch AS, Liu H (2016) A genetic assessment of the English bulldog. *Canine Genet Epidemiol* 3:6
- Petersdorf EW, Gooley TA, Malkki M, Bacigalupo AP, Cesbron A, Du Toit E, Ehninger G, Egeland T, Fischer GF, Gervais T, Haagenson MD, Horowitz MM, Hsu K, Jindra P, Madrigal A, Oudshoorn M, Ringden O, Schroeder ML, Spellman SR, Tiercy JM, Velardi A, Witt CS, O'Huigin C, Apps R, Carrington

- M, International Histocompatibility Working Group in Hematopoietic Cell T (2014) HLA-C expression levels define permissible mismatches in hematopoietic cell transplantation. *Blood* 124:3996-4003
- Petersdorf EW, Malkki M, O'HUigin C, Carrington M, Gooley T, Haagenson MD, Horowitz MM, Spellman SR, Wang T, Stevenson P (2015) High HLA-DP Expression and Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med* 373:599-609
- Raff RF, Storb R, Ladiges WC, Deeg HJ (1985) Recognition of target cell determinants associated with DLA-D-locus-encoded antigens by canine cytotoxic lymphocytes. *Transplantation* 40:323-328
- Rahim MMA, Makrigiannis AP (2015) Ly49 receptors: evolution, genetic diversity, and impact on immunity. *Immunological reviews* 267:137-147
- Raimondi G, Sumpter TL, Matta BM, Pillai M, Corbitt N, Vodovotz Y, Wang Z, Thomson AW (2010) Mammalian target of rapamycin inhibition and alloantigen-specific regulatory T cells synergize to promote long-term graft survival in immunocompetent recipients. *J Immunol* 184:624-36
- Ross P, Buntzman AS, Vincent BG, Grover EN, Gojanovich GS, Collins EJ, Frelinger JA, Hess PR (2012) Allelic diversity at the DLA-88 locus in Golden Retriever and Boxer breeds is limited. *Tissue Antigens* 80:175-83
- Rouas-Freiss N, Goncalves RM-B, Menier C, Dausset J, Carosella ED (1997) Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94:11520-11525
- Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K, Urbani E, Negrin RS, Martelli MF, Velardi A (1999) Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 94:333-339
- Sarmiento UM, DeRose S, Sarmiento JI, Storb R (1992) Allelic variation in the DQ subregion of the canine major histocompatibility complex: I. DQA. *Immunogenetics* 35:416-420
- Sarmiento UM, DeRose S, Sarmiento JI, Storb R (1993) Allelic variation in the DQ subregion of the canine major histocompatibility complex: II. DQB. *Immunogenetics* 37:148-152
- Sarmiento UM, Storb R (1990a) Nucleotide sequence of a dog class I cDNA clone.

- Immunogenetics 31:400-404
- Sarmiento UM, Storb R (1990b) Nucleotide sequence of a dog DRB cDNA clone. Immunogenetics 31:396-399
- Shiina T, Blancher A, Inoko H, Kulski JK (2017) Comparative genomics of the human, macaque and mouse major histocompatibility complex. Immunology 150:127-138
- Shiina T, Yamada Y, Aarnink A, Suzuki S, Masuya A, Ito S, Ido D, Yamanaka H, Iwatani C, Tsuchiya H (2015) Discovery of novel MHC-class I alleles and haplotypes in Filipino cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) by pyrosequencing and Sanger sequencing. Immunogenetics 67:563-578
- Stephens M, Smith NJ, Donnelly P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. Am J Hum Genet 68:978-89
- Tallmadge RL, Campbell JA, Miller DC, Antczak DF (2010) Analysis of MHC class I genes across horse MHC haplotypes. Immunogenetics 62:159-172
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol 30:2725-9
- Tanaka Y, Ohdan H, Onoe T, Asahara T (2004) Multiparameter flow cytometric approach for simultaneous evaluation of proliferation and cytokine - secreting activity in T cells responding to allo - stimulation. Immunological investigations 33:309-324
- Tanaka Y, Ohdan H, Onoe T, Mitsuta H, Tashiro H, Itamoto T, Asahara T (2005) Low Incidence of Acute Rejection after Living-Donor Liver Transplantation: Immunologic Analyses by Mixed Lymphocyte Reaction using a Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester Labeling Technique. Transplantation 79:1262-1267
- Tsai KL, Clark LA, Murphy KE (2007) Understanding hereditary diseases using the dog and human as companion model systems. Mammalian Genome 18:444-451
- Vance RE, Kraft JR, Altman JD, Jensen PE, Raulet DH (1998) Mouse CD94/NKG2A is a natural killer cell receptor for the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule Qa-1b. Journal of Experimental Medicine 188:1841-1848

- Venkataraman GM, Geraghty D, Fox J, Graves SS, Zellmer E, Storer BE, Torok-Storb BJ, Storb R (2013) Canine DLA-79 gene: an improved typing method, identification of new alleles and its role in graft rejection and graft-versus-host disease. *Tissue Antigens* 81:204-11
- Wagner J, Sarmiento U, Storb R (2002) Cellular, serological, and molecular polymorphism of the class I and class II loci of the canine major histocompatibility complex. *Tissue antigens* 59:205-210
- Wagner JL, Palti Y, DiDario D, Faraco J (2005) Sequence of the canine major histocompatibility complex region containing non-classical class I genes. *Tissue Antigens* 65:549-55
- Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, Karpinski M, Ho J, Storsley LJ, Goldberg A, Birk PE, Rush DN, Nickerson PW (2012) Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am J Transplant* 12:1157-67
- Xiao J, Xiang W, Chai Y, Haywood J, Qi J, Ba L, Qi P, Wang M, Liu J, Gao GF (2016) Diversified Anchoring Features the Peptide Presentation of DLA-88*50801: First Structural Insight into Domestic Dog MHC Class I. *J Immunol* 197:2306-15
- Yamanaka S (2009) A fresh look at iPS cells. *Cell* 137:13-7