

## 論文の内容の要旨

氏名：岡野 雅春

博士の選考分野の名称：博士（獣医学）

論文題目名：ネコ MHC 遺伝子の多型性に関する研究

主要組織適合性複合体 (Major Histocompatibility Complex, MHC) は、進化の過程で有顎脊椎動物以降に保存された分子であり、獲得免疫の発動に重要な役割を担っている。ヒトの MHC である HLA (Human Leukocyte Antigen) は、HLA クラス I (HLA-I) と HLA クラス II (HLA-II) に大別されるが、どちらも細胞膜の外側に溝を持つ構造を有し、非自己ペプチド等を挟み込み T 細胞へ提示することで獲得免疫を発動させる。HLA と非自己ペプチドとの結合性は、HLA の溝を形づくる領域のアミノ酸配列の違いによって決められているが、この部分の DNA 配列は、ヒトゲノムにおいて最も多型に富むことが知られている。具体的には、HLA-I 遺伝子である *HLA-A*, *HLA-B* および *HLA-C* においては、それぞれ 3855, 4739 および 3612 種類の対立遺伝子 (アレル) が、また、HLA-II 遺伝子である *HLA-DRB1*, *HLA-DQB1* および *HLA-DPBI* においては、それぞれ 1934, 1232 および 1037 種類のアレルが報告されている。そのため、同一染色体上の各座位におけるアレルの並びであるハプロタイプは、膨大な数の組み合わせが生み出される。このような比類なき遺伝的多型性を有する HLA は、感染症や自己免疫疾患の発症や重症化といった免疫反応の個人差に深く関わっている。また、臓器移植の際にドナーの HLA がレシピエントの T 細胞に非自己と認識され免疫拒絶が引き起こされることが知られている。

獣医学分野では家畜を中心に MHC 遺伝子解析が進められており、ウシではレトロウイルス感染症における血中プロウイルス量と特定のアレルとの関連性が報告され、疾病対策に応用されている。また、伴侶動物であるイヌについても MHC 遺伝子の多型解析法が開発され、多型情報が収集されてきた。現在イヌにおいて、MHC 多型情報が活用され、感染症や自己免疫疾患の発症および重症化との関連性や移植の際の組織適合性などの解析が精力的に行われている。これらの研究成果は、疾患感受性因子を避けたブリーディングや再生医療における組織適合性検査など、イヌ獣医療への応用展開が期待されている。

上述のように、MHC 多型情報は獣医療の発展のために極めて重要である。しかしながら、ネコはイヌと同じ食肉目に属するが MHC 遺伝子構成に顕著な違いがあるため、その解析法が開発されておらず、多型情報は極めて乏しい。そこで本学位論文では、新たに開発したネコ MHC (Feline Leukocyte Antigen, FLA) 遺伝子の多型解析法を用いて、FLA 多型の特徴を明らかにした。

### 1 RNA 発現する FLA クラス I 遺伝子の同定

先行研究において、ネコの FLA クラス I 領域のゲノム配列が明らかになっており、19 個の FLA クラス I (FLA-I) 遺伝子 (*FLA-A*~*FLA-S*) の存在が推定されている。我々は、個々の遺伝子の詳細な解析によって、これら 19 個のうち 8 個 (*FLA-A*, *-E*, *-H*, *-J*, *-K*, *-L*, *-M* および *-O*) が機能的な遺伝子構造、すなわち RNA 発現が期待できることをつきとめ、これら 8 個の FLA-I 遺伝子の RNA 発現を検討した。

日本大学付属動物病院 (ANMEC) より供試されたネコ 5 個体の末梢血からスピнкаラム法を用いて RNA を抽出した後、cDNA 合成および PCR 増幅を行った。PCR に用いたプライマーは、8 個すべての FLA-I 遺伝子が増幅可能であり、かつ、これらの 8 個の遺伝子毎に配列の保存性が高い領域 (エキソン 4) を含む位置に設計した。PCR 増幅産物を次世代シーケンサー (Ion S5) を用いたアンプリコンシーケンシングに供しリード配列を得た。リード配列の *de novo* アッセンブリー解析並びにマッピング解析により配列を決定した。決定された配列は、8 個の FLA-I 遺伝子との相同性解析によって分類された。

5 個体から計 18 種類の FLA-I 遺伝子の配列が同定され、これらの配列は、*FLA-M*を除く 7 個の遺伝子 (*FLA-A*, *-E*, *-H*, *-J*, *-K*, *-L* および *-O*) へ分類された。その結果、*FLA-E*, *-J*, *-K*, *-L* および *-O* に分類された配列は、5 個体全てに認められたが、*FLA-A* または *FLA-H* は、4 個体または 3 個体のみに同定された。さらに、*FLA-A*, *-J*, *-L* および *-O* は、1 個体あたり、多いもので 2 種類の配列が同定された。その一方で、*FLA-E*, *-H* および *-K* は、1 個体あたり、最大 3 種類が認められた。3 種類同定されたことが意味するところは、1 個体を構成する 2 種類のハプロタイプのうち、どちらか一方のハプロタイプに同一遺伝子の重複が起きた結果と推測できる。

以上の結果より、7 個の FLA-I 遺伝子 (*FLA-A*, *-E*, *-H*, *-J*, *-K*, *-L* および *-O*) が MHC クラス I として機能することが証明された。また、ハプロタイプ毎に FLA-I 遺伝子組成が異なる構造多型が示唆された。

## 2 家系を用いた FLA クラス I 遺伝子の多型解析およびハプロタイプ推定

前述のように、機能的な FLA-I 遺伝子が同定されたことから、これらアレルの多型解析法の開発を試みた。本研究では、血縁関係の明確な個体群を用い、FLA-I アレルの同定およびハプロタイプの推定を行なった。

実験動物生産販売施設 (北山ラベス) から供された血縁関係の明確な 2 家系 20 個体のネコ (雑種) の末梢血 RNA から cDNA を合成した後、PCR 増幅および次世代シーケンサーにより解析した。PCR に用いたプライマーは、前述の 7 個すべての FLA-I 遺伝子に共通で、かつ、多型が集中する領域 (エキソン 2 とエキソン 3) を含む位置に設計した。また、同定された FLA-I アレルから血縁関係に基づきハプロタイプを推定した。

2 家系 20 個体から同定された FLA-I 配列は計 32 種類であった。ハプロタイプ推定の結果、7 種類の FLA-I ハプロタイプが血縁関係に矛盾なく推定された。推定されたハプロタイプはそれぞれ 4~8 種類の FLA-I アレルから構成されていた。この結果より、FLA-I 多型解析法が開発された。

## 3 家系を用いた FLA クラス II 遺伝子の多型解析およびハプロタイプ推定

HLA-II は、3 種類 (HLA-DR, HLA-DQ および HLA-DP) に分類され、それぞれをコードする遺伝子領域は、ヒトゲノムの HLA-II 領域に同定されている。一方、ネコゲノムの FLA-II 領域は、HLA-DQ および DP 領域に相当する領域が欠失しており、DR 領域のみから構成されている。この FLA-DR 領域には、2 種類の FLA-II 領域のゲノム配列が同定されているが、FLA-DRA 遺伝子はどちらも 3 個存在する一方で、FLA-DRB 遺伝子は 3 個 (*FLA-DRB1*, *-DRB3* および *-DRB4*) または 4 個 (*FLA-DRB1*, *-DRB3*, *-DRB4* および *-DRB5*) 同定されている。このように、FLA-DRB 遺伝子組成にゲノム配列による違いが認められたことから、FLA-II における構造多型が明らかにされている。さらに、FLA-II 多型情報は、4 個の FLA-DRB 遺伝子において、69 種類の FLA-DRB アレルが報告されている。このことから、FLA-DRB 遺伝子は FLA-DRA と比較して、多型に富むと考えられている。しかしながら、FLA-II 遺伝子の多型解析法は確立されていない。そこで本研究では、FLA-I 同様に次世代シーケンサーを用いた FLA-DRB 遺伝子の多型解析法の開発を試みた。

実験には、前述の 2 家系 20 個体の cDNA を用い PCR 増幅後、次世代シーケンサーにより解析した。プライマーは、4 個すべての FLA-DRB 遺伝子に共通で、かつ、多型が集中する領域 (エキソン 2) が増幅される位置に設計した。また、同定された FLA-DRB 配列から血縁関係に基づきハプロタイプを推定した。

2 家系 20 個体から同定された FLA-II 配列は計 16 種類であった。ハプロタイプ推定の結果、8 種類の FLA-II ハプロタイプが血縁関係に矛盾なく推定された。また、推定されたハプロタイプは、2~3 種類の FLA-DRB アレルから構成されていた。以上のことから、FLA-II 遺伝子においても、その多型解析法が開発された。

## 4 FLA クラス II 遺伝子ハプロタイプとネコの品種との関連性

前述のように、FLA-II 遺伝子の多型情報の収集が可能となった。そこで我々は、FLA-II 遺伝子において、雑種、日本猫および洋品種ネコ計 150 個体を対象にした多型解析を行い、FLA-II 多型とネコの品種との関連性を解析した。

ANMEC およびマーブル動物医療センターに来院した計 150 個体のうち、雑種および日本猫 87 個体は雑種・日本猫群、洋品種（11 品種）63 個体は洋品種群の二つの品種群へ分類された。これらのネコの末梢血由来の cDNA を鋳型とし、前述の FLA-II 多型解析法による FLA-DRB 配列の同定および FLA-DRB ハプロタイプの推定を行った。

150 個体から計 43 種類の FLA-DRB 配列が同定された。推定された FLA-DRB ハプロタイプは計 45 種類であり、いずれも 2~4 種類の FLA-DRB アレルから構成されていた。さらに、推定された 45 種類のハプロタイプのうち、13 種類は雑種・日本猫群に、9 種類は洋品種群に特異的であったものに加え、21 種類は両群が共有するハプロタイプへ分類された。

本研究によって開発された多型解析法は、ネコの MHC クラス I およびクラス II 遺伝子を網羅した初の方法である。本解析法によって、ネコの MHC 遺伝子の特徴として、各 MHC 遺伝子におけるアレルの多型に加え、構造多型を有している点で、ヒトやイヌと大きく異なることが明らかになった。また、様々な品種のネコにおいても、本解析法によってハプロタイプ推定が可能であった。その結果として、ネコの品種特異的なハプロタイプの存在も示唆された。以上の結果より、集団遺伝学的解析、感染症および自己免疫疾患に関する疾患関連解析および移植の際の組織適合性検査など、先進獣医療の基礎となる MHC 多型情報の収集が、ネコにおいても可能となった。