

遺伝学部門

Department of Genetics

当部門では、ヒトを対象として、その正常および異常な遺伝形質を分子レベルで解明し、医学の進展に寄与することを目的とする。このため、免疫遺伝学、癌、原因不明の遺伝子病の各分野において研究を行った。

人事異動は次のとおりである。西村泰治は、平成4年4月より、熊本大学大学院免疫識別講座に赴任した。平成4年4月より、木村彰方が助教授に、福井宣規が助手に、それぞれ就任した。大学院生として、安永晋一郎、関衛平、万小林、山根一聡、堀俊雄が、また研究生としてクリス・J・サボイ、葛城肅典、伊達是志が研究に参加している。また久大3内科の西宏文、原田晴仁が当部門において共同研究を行った。なお、助手上川路信博は平成3年9月より平成4年2月まで、Virginia大学化学部門(R. Hunt教授)にて、共同研究を行った。

A. HLAによる免疫応答、疾患感受性の遺伝的制御機構の解析

HLAあるいはこれと密に連鎖した遺伝子による免疫応答性ないし疾病感受性・抵抗性の個体差の発現機序に関する研究を進展させた。このためHLA領域内遺伝子群の遺伝的多型性の詳細な解析と健常日本人ならびに種々の自己免疫疾患患者集団における各対立遺伝子頻度の推定を行い、疾患と最も強く相関するHLA対立遺伝子(群)を同定した。一方、従来の研究によりHLAと連鎖した免疫応答性の遺伝的制御が明らかとなっている溶連菌細胞壁抗原(SCW)に特異的なヒト末梢血T細胞増殖反応を中心に研究を進展させた。また特定のHLA-DRないしDQ対立遺伝子を発現したトランスジェニックマウス(TGM)を複数系統樹立し、これらのマウスにおけるT細胞レパートリと免疫応答性の変化を解析することで、*in vivo*におけるHLAによる免疫応答調節機構を解明するための動物モデルを確立した。

A. a. HLA領域の遺伝子構造と各遺伝子における遺伝的多型性の解析(木村彰方, 千住 覚, 安永晋一郎, 葛城肅典, 伊達是志, 笹月健彦)

前年度までにHLAクラスII遺伝子群(HLA-DR, -DQ, -DPそれぞれの α 鎖, β 鎖遺伝子群)ならびにHLA-B遺伝子の遺伝的多型性をPCR-SSOP法によって解析し、HLA型をDNAレベルで決定するDNAタイピング法を確立した。本年度は、最近DP-DQ座位間に発見され、HLAクラスI分子の提示する自己抗原分子ペプチドを細胞内でトランスゴルジ複合体へ輸送する、TAP遺伝子群(TAP-1, TAP-2)の遺伝的多型性をPCR-SSOP法によって解析し、HLAクラスI, クラスII対立遺伝子との連鎖不平衡を解析した。その結果、表A. 1に示すように、TAP-1, TAP-2遺伝子にはそれぞれ3種の対立遺伝子が存在し、日本人集団における対立遺伝子

型を明らかにするとともに、表 A. 2 に示すように TAP-2 対立遺伝子は、HLA-B, DR, DQ, DP 各座位の対立遺伝子と連鎖不平衡にあり、日本人に特徴的な HLA ハプロタイプを形成することが明らかとなった。特に注目すべきことは、TAP 2 *C 対立遺伝子は HLA-B51, B61 と連鎖不平衡にあるが、HLA-DR, DQ, DP 座位の対立遺伝子とは有意の連鎖不平衡を示さなかったことにある。このことは、以下に述べる疾患感受性解析を行う上での重要な知見となるが、また、HLA クラス I - TAP 遺伝子間の機能的連関による連鎖不平衡維持・成立における選択機構の存在を示唆した。

一方、HLA-A および B 遺伝子についての DNA タイピング法の開発を進行しており、次項に示すように疾患感受性の解析に応用している。また HLA-DQ の機能を明らかにするための基礎となる HLA-DQA1 および DQB1 対立遺伝子群の全塩基配列の決定、遺伝的多型性の解析、DQ トランスフェクタントの作製を進行している。

表A. 1 TAP 1 および TAP 2 遺伝子型頻度

Genotype	TAP 1 (n=115)	TAP 2 (n=193)
AA	68.7%	28.0%
AB	27.8	34.2
AC	0	16.1
BB	3.5	14.0
BC	0	6.2
CC	0	2.1

表 A. 2 日本人集団における TAP 2 と HLA 遺伝子座の連鎖不平衡

HLA-B	DRB1	DQA1	DQB1	TAP2	DPB1
B52	1502	0103	0601	A	0901
B 7	0101	0101	0501	B	0402
B54	0405	03	0401	B	
	1302	0102	0604	A	0401
	1501	0102	0602	A	
	0803	0103	0601	B	
	0901	03	0303	A	
B51				C	
B61				C	

A. b. HLA と自己免疫疾患感受性・抵抗性との相関（木村彰方，土屋邦喜，董 瑞平，千住 覚，川原田富朗，万小林，葛城肅典，福井宣規，笹月健彦）

前年度までに、種々の自己免疫疾患患者の HLA 領域遺伝子群の多型性解析を行って来たが、本年度は、TAP 遺伝子群，HLA-B 遺伝子の多型性解析を加え、疾患感受性を規定する遺伝子（群）のマッピングを進展した。

TAP 2 遺伝子と疾患との相関を表 A. 3 に示すが、いずれの疾患とも強い相関を示す対立遺伝子は見出されなかった。以下に述べるように、これらの自己免疫疾患はいずれも特定の DR /DQ あるいは DP 対立遺伝子と強い相関を示すが、DQ-DP 間の TAP 2 対立遺伝子との相関が認められないことは、疾患と相関を示すクラス II 対立遺伝子そのものあるいは複数の遺伝子の相互作用が疾患への感受性を規定することを強く示唆する。

SCW への免疫応答性の細胞レベルでの解析から、免疫応答の制御には HLA クラス I，クラス II の両者が関与すると推定される。従って、自己免疫疾患への感受性についても、クラス II 対立遺伝子に加えて、特定のクラス I 対立遺伝子の存在下に相対危険率が高まる可能性を追求した。その結果、表 A. 4 に示すように、いずれの自己免疫疾患においても、特定のクラス I，クラス II 対立遺伝子の両者を有する場合に、疾患罹患の危険率が高まることが明らかになった。特に慢性関節リウマチにおける HLA-A 2 と DPB 1 *0201 のように、単独では疾患と相関しないが、両者を有する場合にのみ相関を示す組み合わせが存在した。このことより、HLA による疾患感受性の遺伝的制御には、HLA クラス I，クラス II 抗原の両者が関与する、いかえれば、CD 8⁺T 細胞，CD 4⁺T 細胞の両者が疾患発症に関与することを示唆する。このことは、自己免疫疾患モデル動物における疾患発症には CD 4⁺T 細胞のみならず CD 8⁺T 細胞の存在が必須であるという知見とよく合致する。

表 A. 3 日本人における自己免疫疾患と TAP 2 との相関

TAP2 allele	Control (n=193)	RA (n=43)	IDDM (n=35)	Graves (n=83)	Hashimoto (n=49)	Behcet (n=50)	SLE (n=58)
A	77.7%	65.1%	62.9%	72.3%	73.5%	78.0%	75.9%
B	54.5	65.1	60.0	53.0	63.3	40.0	67.2
C	24.3	18.6	42.9*	18.1	30.6	36.0	27.6

*RR=2.33, p < 0.05

表A. 4 日本人集団における自己免疫疾患と HLA との相関

Disease	HLAclass I	HLA class II
RA	A11	DRB1*0405- DQB1*0401
	A 2	DPB1*0201
IDDM	B54	DRB1*0405- DQB1*0401
	B61	DRB1*0901- DQB1*0303
Graves	A 2- (B46)	DPB1*0501
Hashimoto	A 2	DRB4*0101
Takayasu	B52, B39.2	DRB1*1502- DRB5*0102- DPB1*0901
Behcet	B51	DPB1*0201
	B61	DRB1*0802- DQB1*0401, DPB1*0201
SLE	B39	DRB1*1501- DRB5*0101- DRB1*0602

A. c. 抗 HLA 血清のスクリーニング (徳安智子, 笹月健彦)

血清学的 HLA タイピングを行なうために、分娩血を対象とした抗 HLA 血清のスクリーニングを実施している。九大医学部産婦人科分娩部の協力により、初産・経産を問わず、本年度は約160検体のスクリーニングを行なった。

HLA 既知の正常人集団 (約50名) のリンパ球パネルを用いて、Microdroplet cytotoxicity test により、抗 HLA 抗体の有無と抗体の特異性を判定した。また、よりクオリティの高い HLA タイピングを行なうために、抗血清の抗体価の調整あるいは複数の特異性を有する抗体血清を吸収処理することにより monospecific な抗血清とした。

さらに、DNA タイピングによりタイプが決定しているパネルを使用し、これまでに、スクリーニングで検出された抗血清について、DNA 遺伝子レベルでの細分化を目的としたスクリーニングを行った。今後、Serology レベルのタイピングを DNA レベルに近づけるために抗血清のレベルアップを検討する。

B. ヒト免疫応答の遺伝的制御機構

これまでに明らかにして来たヒト免疫応答と HLA との連鎖を細胞レベルで明らかにするため、抗原ペプチドと HLA 分子との結合親和性と T 細胞免疫応答性の関連を解析した。このため、SCW 抗原中の主要蛋白である M 蛋白遺伝子のクローニング、塩基配列の決定、リコンビナント M 蛋白の精製とこれを用いた血中抗体価の測定ならびに T 細胞増殖反応性の検討を行った。また溶連菌体中のスーパー抗原の精製とヒト免疫応答との関連性を検討した。さらに免疫低応

答者より樹立した自己傷害性 CD 8⁺T細胞の細胞傷害活性発現機構の検討と活性発現に必須の可溶性因子の精製を行った。

B. a. HLA クラス II 分子と溶連菌M蛋白ペプチドの相互作用と T細胞応答性の解析 (上川路信博, 董 瑞平, 問田 望, 藤田由香里, 笹月健彦)

これまでに、溶連菌壁細胞壁抗原 (SCW) に対する免疫応答の遺伝子支配について報告し、SCW の主成分である溶連菌M蛋白上に DQ, DP を拘束分子とする T細胞エピトープの存在を明らかにした。本年度は、溶連菌M12蛋白の塩基配列に基づいて合成したペプチドを用いて、これらのペプチドと各 HLA 分子の結合性およびこれらのペプチドに対する免疫応答性を解析し、免疫応答の個人差の分子機構について検討した。

溶連菌M12株 (SS95/12) のM蛋白の塩基配列より推測されるアミノ酸配列に基づいて34種のペプチドを合成し、そのN末端をビオチン化した。HLA 分子とペプチドの結合性は、HLA 分子を遺伝子導入した形質転換細胞とビオチン化ペプチドをインキュベートした後、蛍光色素をラベルしたアビジンと反応させ FACS により蛍光強度を定量した。

B. a. 1 HLA-DQ 6 と溶連菌M12蛋白に対する免疫応答

これまでに、SCW 特異的で DQ 6 に拘束された T細胞は認められるが、DQ 4 に拘束された T細胞は認められないこと、さらに、DQ 6 に拘束された T細胞株は、すべて M12 (347-367) に SCW 同様反応し、この部位が HLA-DQ 6 と親和性のある T細胞エピトープであることを明らかにした。今回、HLA-DQ 4 および DQ 6 と M12蛋白由来の合成ペプチドとの結合性を検討したところ、M12由来の34個のペプチドの中で DQ 6 分子と結合するペプチドは、M12 (15-36), M12 (37-59) および M12 (347-367) の 3種類であり他のペプチドと DQ 6 分子とは結合しなかった。これに対し、DQ 4 分子に結合するペプチドは、16種類あり、DQ 4 に拘束された SCW 特異的 T細胞が観察されなかったのは、単に DQ 4 と M12との親和性がないためではないと考えられた (図 B. 1)。

B. a. 2. HLA-DP 9 と溶連菌M12蛋白に対する免疫応答

HLA-DP 9 と結合するペプチドは、34個の M12由来ペプチド中で17個であった。この17個のペプチドの中で、DP-9 に拘束された M蛋白特異的 T細胞株との反応性が認められたのは、M12 (112-136), M12 (152-175) M12 (165-187), M12 (400-420) M12 (421-440), M12 (431-451), M12 (441-460) の 7種のペプチドであった、(図 B. 2), DP 9 と結合するが T細胞応答がみられなかった10個のペプチドの中で1種のペプチドは cold competition がかからなかったが、他の 9種のペプチドについては cold competition がかかり、HLA-DP と結合するが T細胞を誘導できないペプチドが存在することが示唆された。

B. a. 3. DR 4 サブタイプ間の M12ペプチドに対する結合性の差異

血清学的に HLA-DR 4 と判定される HLA クラス II 分子には、1-5 残基のアミノ酸の異なる

13種のサブタイプが存在する。その中の6種 (DRB1*0401, DRB1*0402, DRB1*0403, DRB1*0404, DRB1*0405, DRB1*0406) のDR 4分子とM12由来ペプチドとの結合性の差異を検討し、どのアミノ酸がこれらのペプチドとHLA分子との結合性に重要であるかを解析した。その結果、従来報告されている86V→Gの変化による結合性の差異よりも、74番目のアミノ酸がアラニンからグルタミン酸に変化することでM12由来ペプチドに対する結合性が全般的に増大することが明らかになり、この部位がHLA-DR 4分子とM12ペプチドとの結合に重要な役割をはたしていることが示唆された。(図B. 3)

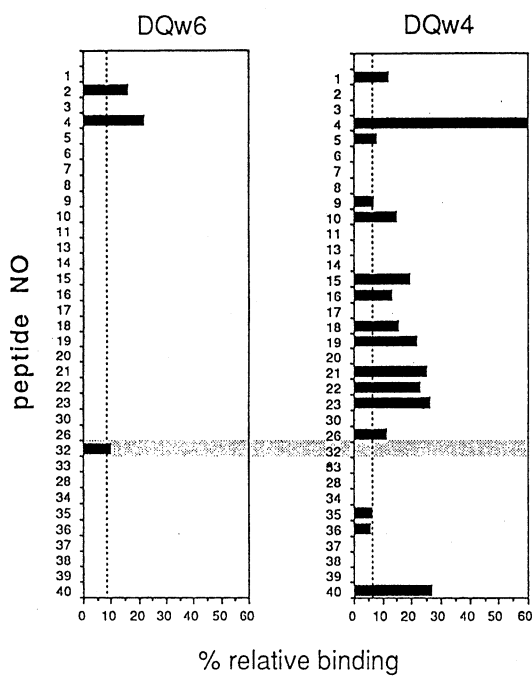


図 B. 1 Binding of HLA-DQ to the peptides derived from M12 protein

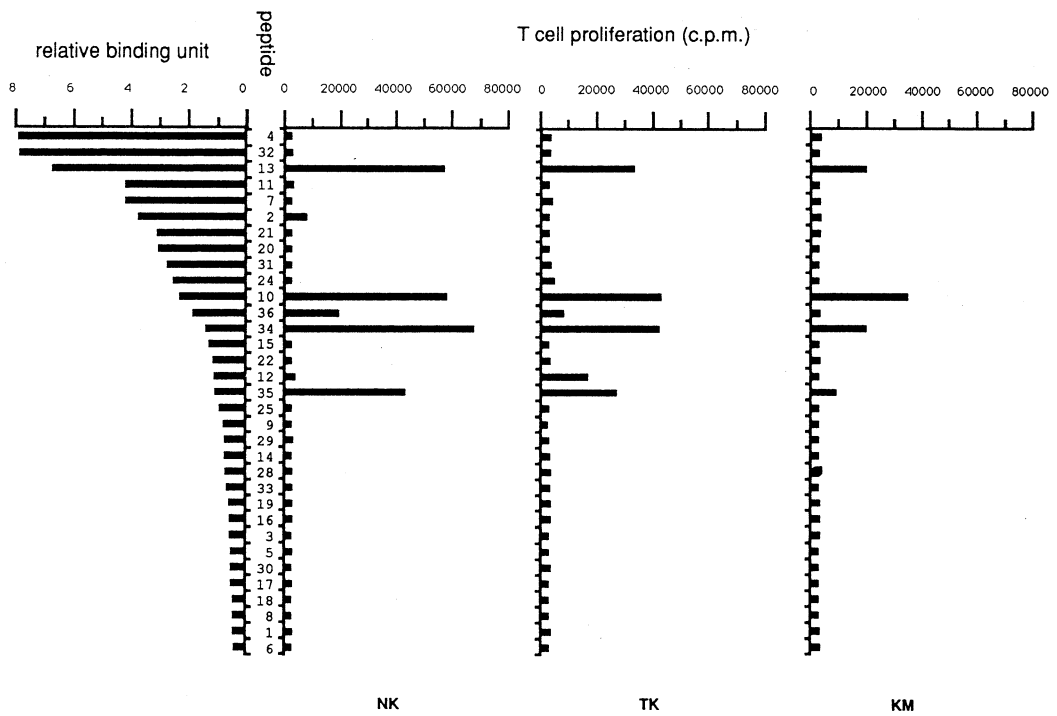


図 B. 2 Relationship between M protein specific T cell proliferation and M12 peptide binding to DP9 molecule

		High Binding Group		Low Binding Group			
DR4 subtype	DRB1*	0406	0403	0404	0401	0405	0402
Percentage of high binding peptide %		29.4	26.4	11.8	8.8	5.9	2.9
Amino acid position	37	S	Y	Y	Y	Y	Y
	57	D	D	D	S	D	D
	67	L	L	L	L	I	L
	70	Q	Q	Q	Q	D	Q
	71	R	R	K	R	E	R
	74	E	E	A	A	A	A
	86	V	V	G	G	V	V

図 B. 3 DR 4 サブタイプ間におけるアミノ残基の多形と外来抗原M12タンパク由来のペプチドと HLA 分子との結合性の差異

B. b. 溶連菌感染後糸球体腎炎患者の溶連菌M蛋白に対する免疫応答性の解析（上川路信博，森 一博，堀 俊雄，木村彰方，笹月健彦）

溶連菌感染後糸球体腎炎（Poststreptococcal glomerulonephritis, AGN）は，免疫複合体が糸球体への沈着することが原因であると考えられており，原因抗原として溶連菌M蛋白をはじめとするいくつかの蛋白が候補にあげられている．本年度は，AGN患者に高頻度に検出される12型溶連菌のM蛋白に関し，リコンビナント蛋白および合成ペプチドを作成し，AGN患者の溶連菌M蛋白に対する抗体価および，M蛋白のどの部分が抗体の認識するエピトープとなっているかを明かにし，溶連菌M蛋白の腎炎における意義について検討した．

溶連菌M蛋白は，溶連菌細胞壁に存在する分子量5万前後の蛋白で，現在までに80種以上のタイプが知られており，M1，M5，M6，M12およびM24についてはその塩基配列も明らかにされている．この蛋白の遠位側300残基程度は，AB領域と呼ばれ各タイプ固有の領域であ

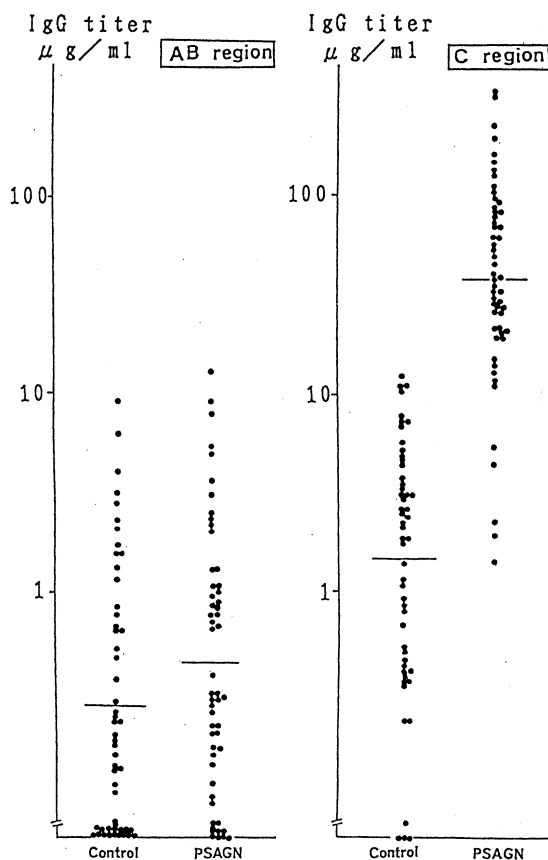
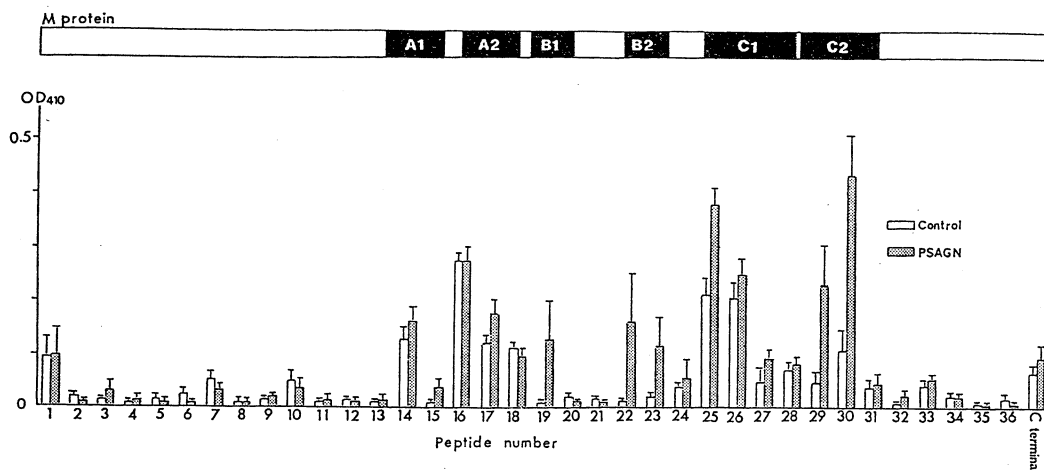


図 B. 4 溶連菌M蛋白に対する血中抗体価の測定

るのに対し、近位側200残基程度はC領域と呼ばれ、いずれのタイプにおいてもほぼ同様の構造をとっている。今回は、AB領域およびC領域に分けてリコンビナントM蛋白を作成し、AGN患者血清中のこれらの抗原に対する抗体価をELISA法で測定した。その結果、正常児童、合併症を伴わない溶連菌感染症の患児に比べ、AGN患者ではC領域に対する抗体価が異常に高値であることが明らかになった(図B. 4)。

次に、合成ペプチドを用いたELISA法で抗体の認識するエピトープについて検索した。図B. 5に示すように繰り返し配列の部位に対し抗体価が高い傾向がみられたが、AGN患者で高値を示したC領域に関し腎炎患者に特異的エピトープは認められなかった。これまでに、M蛋白と糸球体抗原との間の交差反応の報告もあり、腎炎発症に関与するエピトープを示唆する報告もあったが、今回のデータからは、腎炎患者特異的エピトープの存在は明らかにできなかった。また、腎炎患者においてM蛋白のC領域に対する抗体価が特異的に上昇することが明らかになったが、その意義としては、溶連菌の種々の蛋白に対して強い免疫応答をしていることの反映である可能性と、腎炎発症に関与している可能性とがあり、今後の検討課題である。



図B. 5 溶連菌M蛋白ペプチドに対する血中抗体価の測定

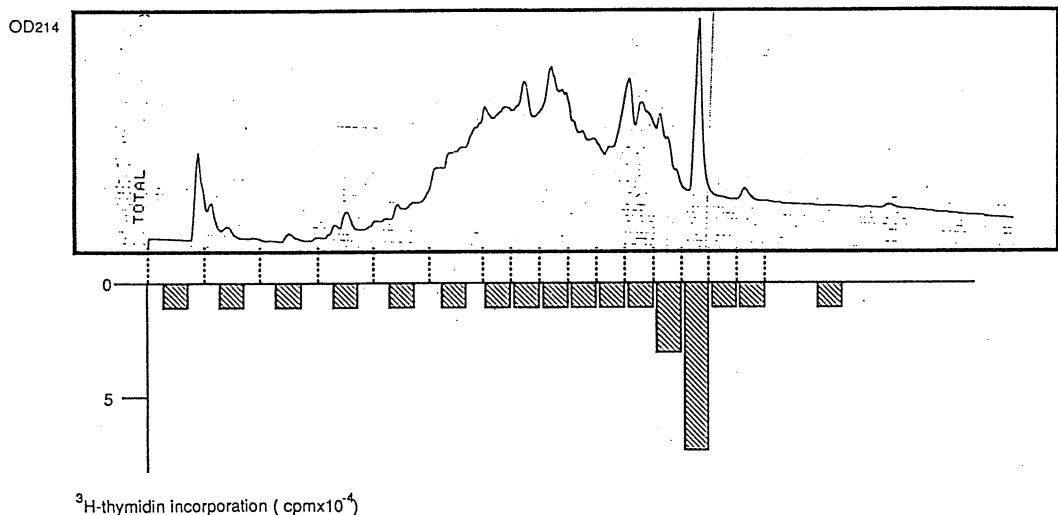
B. c. 慢性扁桃炎患者のHLAクラスII遺伝子の解析（堀 俊雄，上川路信博，木村 彰方，笹月健彦）

扁桃摘出術を施行された慢性扁桃炎患者50名についてHLAクラスII領域のHLA-DRB1, DAQ1, DQB1, DPA1, 及びDPB1対立遺伝子のPCR-SSO法によるHLA-DNAタイピングを行った。その結果、患者と健常人336名との比較にて、DRB1*0405, DQB1*0401が有意に減少し、DRB1*1101が有意に増加していた。（DRB1*0405：14% vs 28%, R.R.=0.42, $\chi^2=4.40$, $P<0.05$, DQB1*0401：14% vs 28.3%, R.R.=0.41, $\chi^2=4.56$, $P<0.05$, DRB1*1101：10% vs 3%, R.R.=3.62, $\chi^2=4.02$, $P<0.05$ ）

即ち、Dw15-DRB1*0405-DQA1*0301-DQB1*0401ハプロタイプが減少し、これが疾患抵抗性を、また、DRB1*1101対立遺伝子が疾患感受性をコントロールすると考えられた。

B. d. A溶連菌のペプシン限定分解抽出抗原中に含まれるスーパー抗原の単離・同定（須藤 徹，上川路信博，笹月健彦）

我々は昨年度年報にて、溶連菌のペプシン限定分解抽出抗原が、スーパー抗原性を有することを報告した。今回、その粗抽出抗原より、スーパー抗原性を有する蛋白を単離、同定した。精製は、粗抽出抗原を、硫酸アンモニウムで塩析し、DEAEセファデックスでのイオン交換クロマトグラフィ後にゲル濾過を行った。さらに逆相C4カラムを用い0.1%TFA-アセトニトリル系にて活性ピークを分取し（図B. 6）、リシルエンドペプチダーゼにて切断後、同様の逆相C4カラムを用いたHPLCにてピークを分取し、エドマン分解法によりアミノ酸配列を決定した



図B. 6 RPC C4-HPLC profile of partially purified Streptococcal superantigen (fraction Q1G3) derived from pep M12, and proliferative response of unprimed DQ6-B6

(図 B. 7). 同定されたアミノ酸配列は、溶連菌外毒素 (SPE) A, B, C, 及び、細胞壁 M12 蛋白と異なっており、溶連菌由来の新しいスーパー抗原であることが明らかとなった。

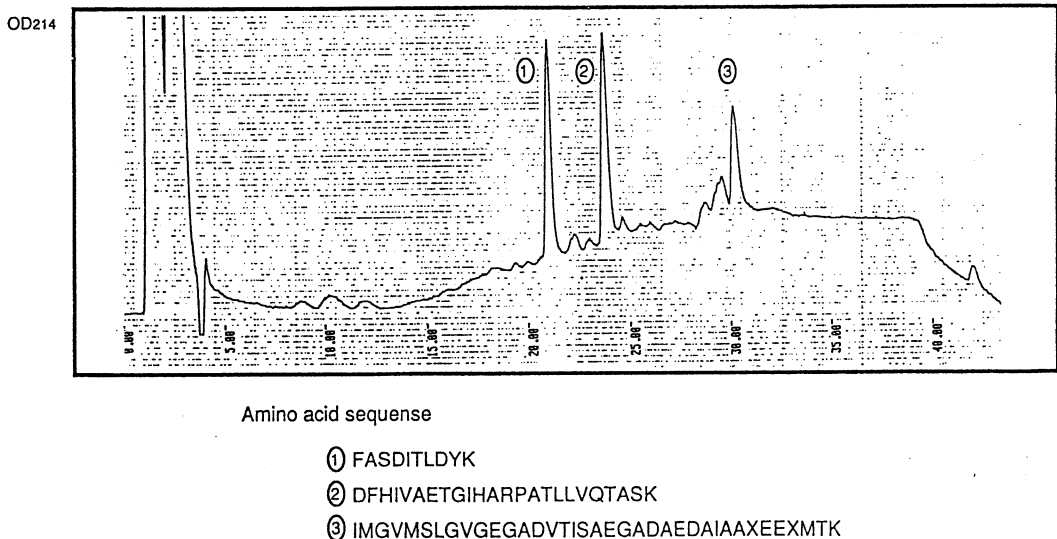


図 B. 7 RPC C4-HPLC profile of active peak digested with lysil endpeptidase, and amino acid sequence of each fraction

B. e. SCW 低応答者より得られた自己反応性細胞傷害 CD 8⁺T 細胞 (HYCD 8) の解析 (吉住秀之, 上川路信博, 笹月健彦)

前年度までに HYCD 8 はリンパ球培養上清中の液性因子 (Soluble Factor for Cytotoxic Activity) 存在下にも、HLA-B52 または B54 分子を発現する標的細胞 (B 細胞および単核球) を傷害することを明らかにした。HYCD 8 の細胞障害活性を誘導するリンパ球培養上清中の因子は、活性炭に吸着し、高速液体クロマトグラフィーにより精製した分画の一つに認められた。この分画の解析から SFCA は塩酸加水分解に耐性の分子量 1000 以下の低分子量の化合物であることが明らかとなった。また SFCA の産生はおもに B 細胞分画のリンパ球に認められた。

C. HLA トランスジェニックマウスを用いた免疫応答の遺伝的制御の解析

HLA による免疫応答および疾患感受性の遺伝的制御を解析する上で、ヒトを用いる場合には制約が多いため、実験系を確立するために HLA 遺伝子群を導入したトランスジェニックマウス (TGM) を作製している。昨年度に引きつづき、樹立した TGM における T 細胞レポーターと免疫応答性の変化を解析し、導入した HLA 遺伝子によるマウス免疫応答の遺伝的制御機構を検討した。

C. a. HLA-DRA トランスジェニックマウスの解析 (福井宣規, 山本 健, 山根一聡, 江崎幸雄, 木村彰方, 笹月健彦)

昨年度までに3系統のDRA・TGMを樹立し, 導入したHLA-DRAの発現の組織特異性がそれぞれ異なることを明らかにした. すなわち系統24では, 胸腺マクロファージ以外の全てのI-A陽性細胞においてDRA遺伝子が発現した(DR α E β 分子の発現)のに対し, 系統60では, I-A陽性細胞の一部にのみDRA遺伝子が発現した. 一方, 系統30では, 胸腺上皮細胞のみにDRA遺伝子の発現を認め, その他のI-A陽性細胞には発現しなかった. これらの組織特異性の異なるDRA・TGMを利用することによって, MHC分子(DR α E β 分子)を認識するT細胞の負ならびに正の選択機構の解析を行った.

表C. 1に示すように, V β 5およびV β 11を有するT細胞レパートリーは, 系統24, 系統30のいずれにおいても, 同程度に欠失した. このことは, DR α E β 分子と結合する自己スーパー抗原によるT細胞の負の選択(欠失)は, 胸腺上皮細胞上の発現によって担われること, すなわち骨髄由来細胞上のMHC分子は必須でないことを示す.

ついで, DR α 由来ペプチド(DR α 56-73)をI-A^b分子の複合体を認識するT細胞レパートリーを検討した(表C. 2). 前述の自己スーパー抗原を認識するT細胞レパートリーと同様に, 自己抗原(DR α の鎖)を認識するT細胞レパートリーも系統30では系統24と同程度に欠失していることが明らかとなった. B 6より得られたDR α 56-73/I-A^b複合体を認識するT細胞は, V β 5-V β 11を発現せず, 約半数がV β 6を発現することから, この自己反応性T細胞レパートリーの欠失は自己スーパー抗原による欠失に付随したものではないことを認識した.

以上より, T細胞の負の選択は胸腺上皮細胞上のMHC分子によって担われることが示された.

一方, DR α E β 分子を拘束分子とするMCC特異的T細胞レセプター(TCR)を導入したTGMと交配することにより, DRA/TCR α /TCR β の3者を発現するTGMを作製した. 系統24と系統30においてそれぞれの胸腺T細胞のCD 4⁺CD 8⁺からCD 4⁺CD 8⁻への分化を検討したところ, 系統24ではTCR α β のCD 4⁺CD 8⁻への分化が観察されるのに対し, 系統30ではB 6と同程度の分化しか認められなかった(表C. 3). このことは特定のTCR α β を発現するT細胞レパートリーの分化には, 胸腺上皮上の拘束分子の発現のみでは不十分であることを示す. すなわちT細胞の正の選択には, 骨髄由来細胞が必須であることを示唆する. 一方, TCR β のみを導入した場合には, B 6に比較して, 系統30, 系統24とも効率よいT細胞の分化が認められること(表C. 3)から, 胸腺上皮細胞によるT細胞の正の選択に際して, TCR α 鎖の再編成が起こっていない方が有効な選択が行なわれると考えられた.

表 C. 1 Expression of TcR V β 5 and V β 11 on LN T cells and mature thymocytes from *HLA-DRA* transgenic mice

strain	sex ^{a)}	number	% TcR V β 5-and V β 11-bearing cell ^{b)}	
			LN T cell	
B 6	M	8	7.8 \pm 0.4	5.5 \pm 0.3
B 6	F	6	7.2 \pm 0.7	5.6 \pm 0.2
E α -B 6	M	1	2.2	3.1
E α -B 6	F	6	1.7 \pm 0.2	2.3 \pm 0.3
DR α -24	M	8	2.1 \pm 0.2	3.4 \pm 0.4
DR α -24	F ^{d)}	8	1.6 \pm 0.3	3.0 \pm 0.3
DR α -30	M	6	2.6 \pm 0.4	3.6 \pm 0.1
DR α -30	F	6	2.1 \pm 0.3	3.3 \pm 0.3
DR α -60	F	3	2.2 \pm 0.3	3.5 \pm 0.1
			mature thymocytes ^{c)}	
			TcR V β 5	TcR V β 11
B 6	M, F	5	6.4 \pm 0.8	4.9 \pm 0.4
DR α -24	F ^{d)}	3	0.9 \pm 0.4	1.9 \pm 0.6
DR α -30	M, F	3	0.9 \pm 0.2	2.1 \pm 0.3
DR α -60	M, F	4	0.7 \pm 0.2	1.8 \pm 0.1

a) M and F represent male and female, respectively.

b) Percentages of TcR V β 5 or V β 11 cells were calculated by dividing the number of Thy-1.2⁺ V β 5⁺ cells or Thy-1.2⁺V β 11⁺ cells by the total number of Thy -1.2⁺ cells. All the mice were analyzed 8-10 weeks old.

c) The expression of TcR V β 5 and TcR V β 11 on J11d-negative thymocytes were analyzed.

d) DR α -24 mice homozygous for the *DRA* gene.

表 C. 2 Immune response to DR α 56-73/I - A^b complex in *HLA-DRA* transgenic mice

Exp.	responder ^{a)}	IL-2 (20U/ml)	mAb	APC with or without DR α 56-73 ^{b)}				
				B 6		24		
				DR α 56-73 (-)	(+)	(-)	(+)	
				cpm $\times 10^{-3c)}$				
1	B 6	-	-	2.6	30.4	19.8	ND	
		+	-	6.4	34.7	29.3	ND	
	B 6	-	-	3.3	33.6	23.2	ND	
		+	-	9.5	43.7	37.0	ND	
	DR α -24	-	-	2.7	9.3	2.9	ND	
		+	-	7.8	15.3	8.3	ND	
	DR α -24	-	-	2.2	7.2	2.3	ND	
		+	-	7.4	15.1	7.1	ND	
	DR α -30	-	-	2.4	9.2	2.7	ND	
		+	-	5.6	13.3	7.4	ND	
	-DR α -30	-	-	2.4	5.8	1.9	ND	
		+	-	4.6	8.2	5.0	ND	
	2	B 6	-	-	3.9	43.5	38.2	74.2
			-	anti I - A ^b	ND	ND	5.5	ND
-			17-3-3	ND	ND	24.2	ND	
+			-	9.1	50.6	58.0	87.9	
B 6		-	-	7.1	ND	27.3	ND	
		-	L 243	ND	ND	18.7	ND	
DR α -24		-	-	3.3	11.7	3.3	9.2	
		+	-	10.2	23.1	15.4	41.4	
DR α -30		-	-	1.9	12.8	2.3	15.3	
		+	-	7.4	24.4	14.4	36.8	

a) Cells were prepared from the draining LN of mice immunized with DR α 56-73 and 4×10^5 CD 4⁺ T cells were used as responders.

b) Spleen cells from DR α -24 or B6 (8×10^5) were used as stimulators with or without synthetic DR α 56-73.

c) Results are shown as mean cpm of triplicate cultures and the standard deviation of the triplicate was less than 10% of the mean cpm.

表 C. 3 Summary of transition of CD4⁺CD8⁺ thymocytes to CD4⁺CD8⁻ thymocytes in TCR $\alpha\beta$ /HLA-DRA transgenic mice

strain	CD4 ⁺ CD8 ⁺ →CD4 ⁺ CD8 ⁻ (%)		
	TCR α	TCR β	TCR $\alpha\beta$
B 6	72.3 →3.7	83.8 →11.2	72.8 →1.8
24	70.3 →4.7	72.3 →25.3	72.2 →12.3
30	79.1 →2.9	74.0 →20.3	76.6 →2.2

C. b. MHC クラス II トランスジェニックマウスを用いた溶連菌スーパー抗原の解析 (江崎幸雄, 福井宣規, 須藤 徹, 山本 健, 木村彰方, 笹月健彦)

昨年度までに, A 群12型 β 溶連菌をペプシンによって限定分解することにより得られる抗原 (pepM12) が, マウス MHC クラス II (I-A^b) に比べて HLA-DQ 4 及び DQ 6 に対し非常に強い親和性を有するスーパー抗原であることを明らかにした. 今回, さらに種々の MHC クラス II トランスジェニックマウスを用いて pepM12 のスーパー抗原性を検討した. pepM12 は, 抗原提示細胞 (APC) が HLA-DQ 4 及び DQ 6 トランスジェニックマウス (DQ 4 $\alpha\beta$ -B 6, DQ 6 $\alpha\beta$ -B 6) 由来である場合にマウス T 細胞を強く活性化したが, APC が DR α トランスジェニックマウス (DR α -B 6), DR51 トランスジェニックマウス (DR51 $\alpha\beta$ -B 6) E α トランスジェニックマウス (E α -B 6) 由来の場合には T 細胞の活性化は認められなかった (図 C. 1). この結果より, pepM12 は HLA-DQ 分子を介して強いスーパー抗原性を発揮するが, HLA-DR, I-A, IE 分子を介する場合はそのスーパー抗原性が弱いと考えられた. さらに, B 6 の T 細胞と DQ 4 $\alpha\beta$ -B 6 の APC を pepM12 存在下に 3 日間培養後, 活性化 T 細胞の TCRV β を FACScan にて解析した. V β 11⁺ T 細胞のわずかな増加を認めたが, 他の V β はすべて著明に減少していた (表 C. 4). この結果より, 表に示す V β 以外の V β レパートアーが活性化されていることが示唆された. そこで, pepM12 により活性化された T 細胞から RNA を抽出し, 各 V β と C β をプライマーとした RT-PCR を行い, V β 15⁺ T 細胞が著明に増加していることを確認した. これらの結果は, pepM12 が HLA-DQ 4 分子の存在下でマウス V β 11⁺ 及び V β 15⁺ T 細胞を活性化することを示すものである.

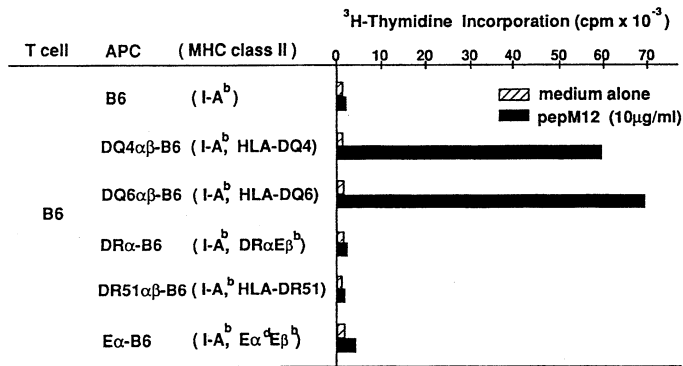


图 C. 1 Proliferative response of unprimed murine T cells to pepM12

表 C. 4 Flow Cytometric Analysis of The TCR V β Usage of pepM12-Stimulated T Cells

V β	non-stimulate	pepM12	SEA	Com A
V β2	5.4	0.8	0.3	5.1
V β3	3.7	0.4	36.0	4.2
V β4	5.9	1.0	0.5	4.9
V β5(5.1, 5.2)	9.7	2.6	1.9	10.4
V β6	7.2	1.7	1.9	6.9
V β7	4.1	0.6	0.6	4.8
V β8(8.1, 8.2, 8.3)	22.5	4.5	3.1	23.0
V β9	2.0	0.5	0.9	2.2
V β10b	4.4	0.8	8.4	3.9
V β11	4.6	6.7	23.0	5.3
V β13	0.2	0.0	0.1	0.1

Analysis was performed gating on the large blasted cells. Percentage of each V β-positive cells divided by Thy1.2-positive cells is indicated. The percentages of TCR α β-positive T cells divided by Thy 1.2-positive cells in non-stimulated, pepM12-stimulated, SEA-stimulated, and Con A-stimulated T cells were 99.2%, 98.9%, 99.3%, and 99.0%, respectively, by flow cytometry analysis with mAb H57-597.

C. c. HLA-DR 分子はマウスにおいて種のバリアーを越え、MHC クラス II として機能し得る (山本 健, 福井宣規, 江崎幸雄, 山根一聡, 木村彰方, 笹月健彦)

HLA-DRA 及び DR51B 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (TGM), DRA-B 6, DR51B-B 6 を樹立した. これらの TGM を交配することより得られた DR51-B 6 において, DR51 分子を, 細胞表面分子としてマクロファージ B 細胞, 樹伏細胞などの免疫担当細胞に認めた. DR51-B 6 はインフルエンザ由来合成ペプチド (HA307) に対し免疫応答を獲得し (図 C 2), DR51-B 6 より得られた HA307 特異的 CD 4 陽性 T 細胞株は, 抗原提示細胞として, L-cell トランスフェクタントを用いた場合にも DR51 拘束性の増殖反応を示した (図 C 3). これらは, DR51 分子により正に選択されたマウス T 細胞が, DR51 分子/抗原ペプチドを認識し, かつマウス CD 4 が DR 分子と種のバリアーを越え結合し得ることを示唆すると同時に, HLA-DR が Ir 遺伝子であることを直接証明するものである.

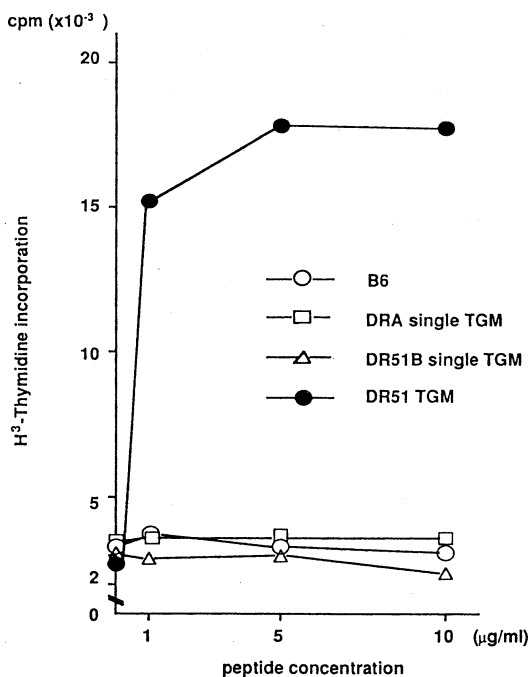


図 C. 2 Acquisition of immune responsiveness to synthetic influenza hemagglutinin peptide 307-319 in HLA-DR51 transgenic mice

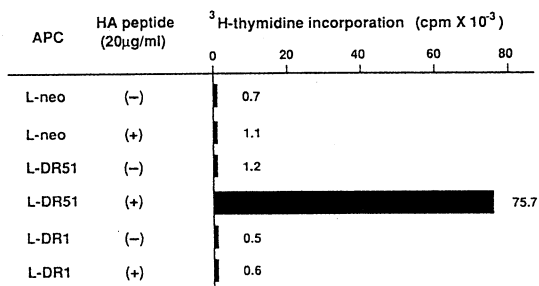


図 C. 3 Recognition of HA peptide in the context of the DR51 molecule expressed on the murine L cell transfectant by T cell line established from the HLA-DR51 TGM

C. d. 発現の異なる二系統の HLA-DRA トランスジェニックマウスを用いた E α -NOD マウスにおける糖尿病発症抑制の機序に関する研究 (山根一聡, 福井宣規, 山本 健, 江崎幸雄, 木村彰方, 笹月健彦)

NOD マウスは IDDM のモデル動物として良く知られている。近年マウス E α 遺伝子を NOD マウスに導入することで、糖尿病の発症が抑制されることが報告された。しかしながらその機序は明らかでなく、抑制のメカニズムを解明することは疾患の治療に役立つものと考えられる。我々は既に異なる組織発現を示す二系統の HLA-DRA トランスジェニックマウス (DR α -24, DR α -30) を樹立し、このマウスにおいて DRA 遺伝子が DR α E β として I-E 分子と同等に機能することを報告した。今回この DR α -24 及び DR α -30 マウスを NOD マウスに戻し交配させ、5 つの Idd を NOD タイプにした progeny を解析することで、疾患の抑制が胸腺における DR α E β を介した T 細胞の正もしくは負の選択に起因するのか、あるいは末梢リンパ系臓器における DR α E β 分子の発現に起因するのかを明確にできると考えられる。

D. 大腸癌細胞株を用いた発癌機構の研究 (白澤専二, 古瀬正徳, 横山信彦, 笹月健彦)

D. a. Ki-ras 遺伝子ターゲティング

大腸癌において Ki-ras 遺伝子の変異は高頻度であることから、その発癌に寄与する意義は大きいと考えられる。我々は、活性化 Ki-ras 遺伝子を有する大腸癌で、この遺伝子を破壊し、その腫瘍特性に与える影響を検討した。その結果、活性化 Ki-ras 遺伝子の破壊された大腸癌細胞株では、ヌードマウスにおける造腫瘍性の消失、細胞増殖速度の低下、軟寒天培地における腫瘍形成能の低下を認めた。

D. b. 癌および癌関連遺伝子の発現

ras 遺伝子の活性化により、細胞内情報伝達にかかわる細胞内物質が、質的、量的に変化すると知られている。この細胞内環境の変化が、c-myc などの癌遺伝子の発現に影響を与えて

いる可能性が考えられる。そこで、活性化 Ki-ras 遺伝子を有する大腸癌細胞株とその活性化 Ki-ras 遺伝子の破壊された娘細胞株を比較することで、癌関連遺伝子の発現を検討した。20種類の癌関連遺伝子についてその発現を調べた結果（表 D. 1）、*c-myc* 遺伝子の発現が、娘細胞株で著明に減少していることが分かった（図 D. 1）。次いで、この *c-myc* 遺伝子の発現を誘発し、両細胞株間での違いを比較した（図 D. 2）。*c-fos*, *c-jun* 遺伝子の発現についても同様に検討した（図 D. 3, 図 D. 4）結果、活性化 Ki-ras を破壊した娘細胞株では、*c-myc*, *c-fos*, *c-jun* 遺伝子の速やかな反応を認めた。一方、親細胞株では、*c-fos*, *c-jun* 遺伝子の反応性は娘細胞株に比べて低下しており、*c-myc* の発現は遅延、遷延していた。（図 D. 3）。活性化 Ki-ras を有する親株では、血清→*c-myc*, *c-fos*, *c-jun* 経路が修飾を受けていることが推察でき、このことが、発癌に寄与していると思われる。

表 D. 1 DNA Probes for Northern blot analysis

Probe	Origin	Probe	Origin
v-Ki-ras	pHiHi3*	myn	§
c-Ha-ras	pT22-H-ras*	v-fos	pfos-1*
v-src	pPvulle*	c-jun	+
GAP	§	ets-2	§
NF-1	§	prothymosin α	§
PKC β 1	§	p53	§
v-raf	3611E-H*	APC	+
c-mos	pHM2A*	DCC	+
c-myb	p-c-mybE2.6*	HLA-B7	pDP001*
c-myc	pHSR1#	G3PDH	¢

§ : generated by RT-PCR

+ : generated by PCR

* : obtained from JCRB

¢ : purchased from TOYOBO

: purchased from Oncor

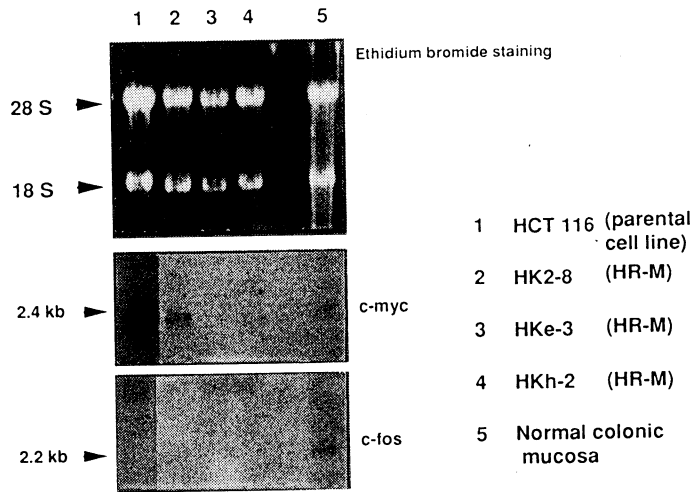


图 D. 1 Northern blot analysis of c-myc, c-fos gene expression in HCT 116 and activated Ki-ras disrupted progeny cells.

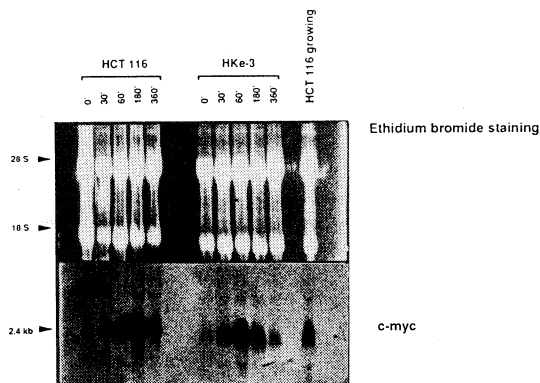


图 D. 2 Time course of c-myc gene expression in HCT 116 and HKe-3 by serum stimulation.

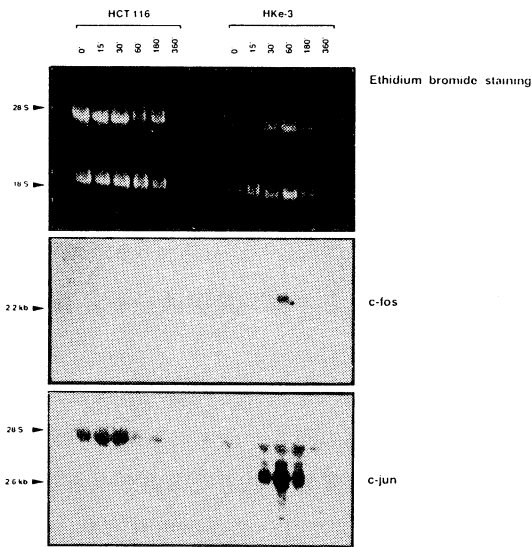
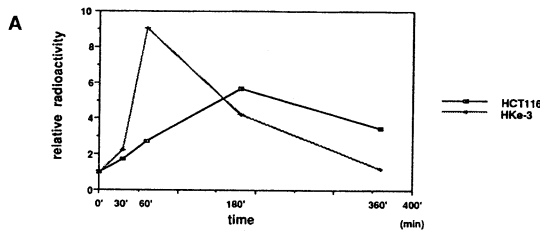
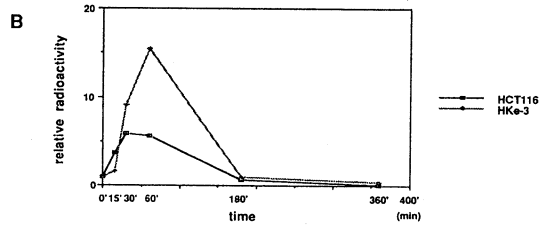


图 D. 3 Time course of *c-fos* and *c-jun* gene expression in HCT 116 and HKe-3 by serum stimulation.

Time course of *c-myc* gene expression in HCT 116 and HKe-3.



Time course of *c-fos* gene expression in HCT 116 and HKe-3.



Time course of *c-jun* gene expression in HCT 116 and HKe-3.

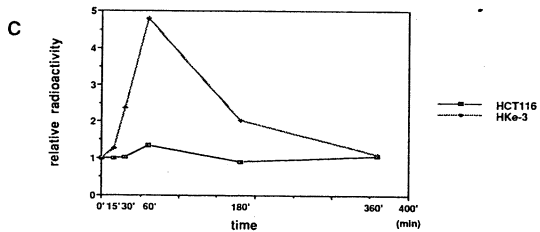


图 D. 4 Time course of *c-myc* gene expression in HCT 116 and HKe-3.

E. 遺伝子病の原因遺伝子の同定

原因不明の遺伝子病の原因遺伝子を同定し、その変異を明らかにし、もって発症前診断法の確立と原因変異の理解に立脚した新たな原因治療法の開発を最終目的として、遺伝子病の遺伝解析を行っている。昨年度に引きつづき、原因不明の左室肥大をきたし、若年者の急死原因の多くを占める肥大型心筋症を対象とした。

E. a. 肥大型心筋症における心筋βミオシン重鎖遺伝子変異の同定（木村彰方，原田晴仁，西 宏文，笹月健彦）

昨年度に引き続き、久留米大学医学部第3内科（戸嶋裕徳教授）を中心とした全国医療施設より収集した肥大型心筋症症例（家族性の明らかなもの61例，不明のもの59例）について、心筋βミオシン重鎖遺伝子のうち機能的に重要であると考えられる第3～第25エクソンのそれぞれについて、PCR-DCP法を用いた変異のスクリーニングを行った。また異なるPCR-DCPパターンが得られたものについては、その塩基配列を決定した。その結果、表E. 1に示すように、9個のエクソンについて、14種の塩基配列変化を認めた。このうち8種は健常人に認められないミスセンス変異であり、またそれぞれの発端者の家系内で疾患と連鎖することから本症の原因変異であることが推定された。これらのミスセンス変異は、欧米人本症患者に見出されたものとは異なっており、日本人本症に特徴的な変異であった（図E. 1）。一方、これらのミスセンス変異は本症患者中、明らかな家族歴を有するものうち約20%（13/61）に見出されるが、家族歴の明らかでない場合には変異が少ない（2/59）ことが明らかとなった。すなわち、同様の病像を示す本症が遺伝的に均一でないことを示唆する。また発端者の家系解析から、ミスセンス変異を有する者のほとんど（39/43）が明らかな左室肥大を呈しており、ミオシン変異に基づく本症の浸透率はきわめて高いことを証明した。

表E. 1 Polymorphism of the cardiac β-MHC gene found in the Japanese population

exon	codon	polymorphism	association with FHCM (disease/substitution)
3	26	GCG(Ala) to GTG(Val)	yes (1/1)
3	54	CGA(Arg) to TGA(ter)	? (1/2)*
3	59	GTC(Val) to ATC(Ile)	yes (2/2)
3	63	ACC(Thr) vs ACT(Thr)	no
8	220	ATC(Ile) vs ATT(Ile)	no
8	244	TTT(Phe) vs TTC(Phe)	no
16	615	AAG(Lys) to AAC(Asn)	yes (2/2)
19	715	TAC(Tyr) vs TAT(Tyr)	? (2/2)**
20	736	ATT(Ile) to ATG(Met)	yes (4/5)
20	741	GGG(Gly) to AGG(Arg)	yes (2/2)
21	778	GAC(Asp) to GGC(Gly)	yes (16/17)
22	870	CGC(Arg) to CAC(His)	yes (9/10)
23	935	GAG(Glu) to AAG(Lys)	yes (4/5)
24	989	ATT(Ile) vs ATC(Ile)	no

* ; polymorphism found in a healthy relative from a FHCM family

** ; polymorphism found in two patients from a FHCM family

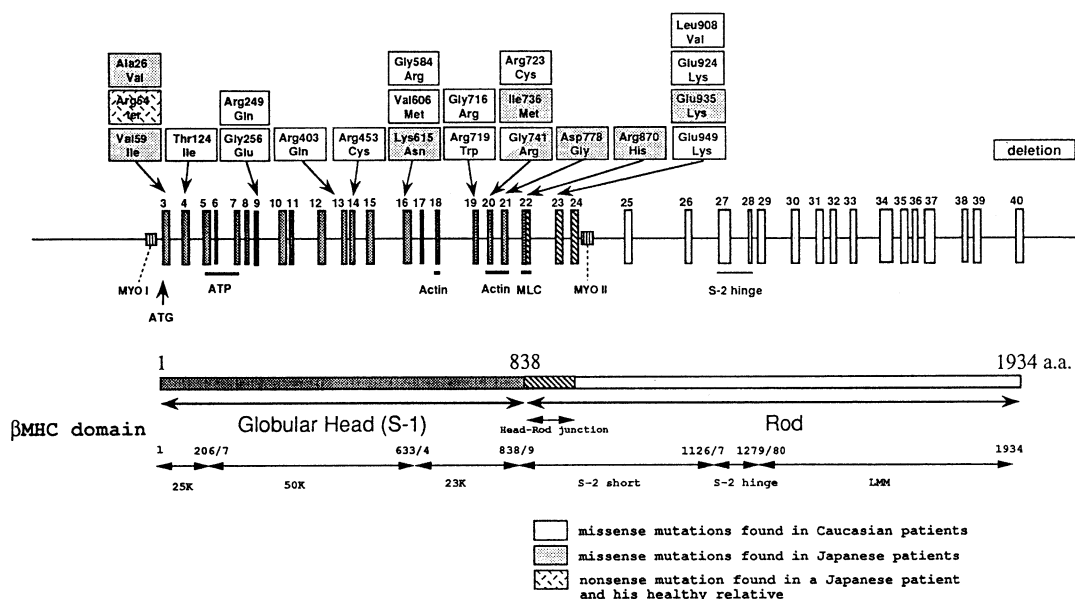


図 E. 1 Mutant cardiac β -MHC genes found in familial HCM

表 E. 2 Linkage study of FHCM in the Japanese population

a. HCM families associated with mutant cardiac β -MHC gene

Locus	MYHC(chr.14)		ACT(chr.15)		PALB(chr.18)			
	marker	mutation	MYHCA*		ACTCA		PALBINT	
θ			0.00	0.05	0.00	0.05	0.00	0.05
Family 01	778	Gly	0.90	0.79	-0.32	-0.19	-0.16	-0.13
06	870	His	-0.47	-0.34	0.22	0.19	0.22	0.19
10	935	Lys	0.12	0.10	0.05	0.04	0.05	0.03
17	870	His	1.50	1.35	-2.10	-0.74	0.31	0.26
24	778	Gly	0.96	0.85	-1.11	-0.64	0.11	0.09
25	778	Gly	1.67	1.50	-2.15	-0.62	0.51	0.42
26	870	His	0.44	0.39	-0.25	-0.19	0.44	0.39
33	741	Arg	0.89	0.77	-0.00	-0.01	0.10	0.09
Total			6.02	5.41	-5.64	-2.17	1.58	1.34

* : mutant allele frequency=0.0001 (penetrance at 80%)

表 E. 3 Linkage study of FHCM in the Japanese population
b. HCM families showing no linkage with MYHC locus

Locus marker	MYHC(chr.14)		ACT(chr.15)		PALB(chr.18)	
	MYHCA		ACTCA		PALBINT	
θ	0.001	0.05	0.00	0.05	0.00	0.05
Family07	-2.03	-0.53	0.03	0.02	0.18	0.15
0.8	-2.54	-0.89	0.18	0.16	0.25	0.21
14	-2.34	-0.72	0.20	0.17	0.11	0.09
15	-2.62	-0.91	0.25	0.22	0.35	0.30
20	-2.27	-0.68	0.44	0.40	0.28	0.26
27	-2.37	-0.72	0.00	0.00	0.52	0.46
32	-2.49	-1.41	-1.95	-0.46	0.90	0.81
34	-2.14	-0.47	-3.39	-1.30	0.50	0.43
Total	-18.82	-6.33	-4.25	-0.79	3.10	2.72

(penetrance at 80%)

表 E. 4 Linkage of FHCM and DNA markers on the chromosome 18 in *MYHC*-non-linked Japanese multiplex families

marker	location	θ					
		0.00	0.05	0.10	0.15	0.20	0.30
S6	pter-p11	0.95	0.84	0.72	0.60	0.48	0.24
S21*	p11.2-p11.3	5.36	-1.78	-1.10	-0.71	-0.46	-0.17
S7	q11.1-p11.2	3.34	-0.72	-0.43	-0.27	-0.17	-0.06
PALB	q11.2-p12.1	3.10	2.72	2.33	1.95	1.57	0.86
M2	q21.3	1.99	0.75	0.99	1.00	0.90	0.56
SAM1*	q21.3	2.74	-0.30	-0.10	-0.03	-0.00	0.00
15-65*	q21-q22	0.18	-0.13	-0.09	-0.06	-0.04	-0.01
MBP*	q22	2.32	-0.09	0.09	0.13	0.13	0.11
S5	q21.3-qter	3.08	-0.69	-0.69	-0.21	-0.11	-0.02
S10	?	0.43	0.36	0.30	0.25	0.19	0.09
S23	?	0.14	0.13	0.11	0.09	0.07	0.03
S30	?	0.94	-0.72	-0.54	-0.40	-0.28	-0.12
C94*	?	4.97	-1.90	-1.27	-0.87	-0.59	-0.25

* microsatellite markers

E. b. 肥大型心筋症における連鎖解析 (木村彰方, 西 宏文, 原田晴仁, 笹月健彦)

昨年度に引きつづき, 本症多発家系を対象とした連鎖解析を進展した。これまでに収集した日本人本症多発家系 (36家系) 中には, 前述のミスセンス変異のうち4種が8家系において見出されたが, ミオシン重鎖遺伝子内の2ヶ所のCAリピートマーカの多型性を合わせて解析することにより, これらの家系では, 変異ミオシン遺伝子と本症の連鎖が認められた (表 E. 2)。しかしながら, 別の8家系においては, 本症とミオシン重鎖遺伝子が連鎖しないことが確認され (表 E. 3), このことより, 本症の遺伝的不均一性が明らかとなった。一方, ミオシン遺伝子と連鎖しない家系については, 第18番染色体上のPALBとの連鎖が示唆された (表 E. 3)。そこで, 第18番染色体上の新たな遺伝マーカの単離を行ない, 本症との連鎖検定を行った (表 E. 4) が, 現在のところ, PALB以外に本症との連鎖が確認された遺伝マーカはなかった。現在PALBを含むYACクローンを5種単離し, 新たな遺伝マーカの検索を行っている。今後, 第18番染色体マッピングを進行する予定である。

業績目録

原著論文

1. Dong,R.P., Kimura,A., Numano,F., Yajima,M., Hashimoto,Y., Kishi,Y., Nishimura,Y., and Sasazuki,T. 1992.
HLA-DP antigen and Takayasu arteritis.
Tissue Antigens, 39, 106-110.
2. Dong,R.P., Kimura,A., Sasazuki,T. 1992.
Sequence analysis of three novel DRw 14-DRB1 alleles.
Immunogenetics, 36, 130-133.
3. Hoshino,S., Kimura,A., Fukuda,Y., Dohi,K., and Sasazuki,T. 1992.
Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism analysis of polymorphisms in DPA1 and DPB1 genes : a simple, economical and rapid method for histocompatibility testing.
Hum.Immunol., 33, 98-107.
4. Hatae,K., Kimura,A., Ohkubo,R., Watanabe,H., Erlich,H.A., Ueda,K., Nishimura,Y., and Sasazuki,T. 1992.
Genetic control of non-responsiveness to hepatitisB virus vaccine by an extended HLA haplotype.
Eur.J.Immunol., 22, 1899-1905.
5. Senju,S., Kimura,A., Yasunami,M., Kamikawaji,N., Yoshizumi,H., Nishimura,Y., and

- Sasazuki, T. 1992.
Allele-specific expression of the cytoplasmic exon of HLA-DQB1 gene.
Immunogenetics, 36, 319-325.
6. Kimura, A., Dong, R.P., Harada, H., and Sasazuki, T. 1992.
DNA typing of HLA class II genes in B-lymphoblastoid cell lines homozygous for HLA.
Tissue Antigens, 40, 5-12.
 7. Nishi, H., Kimura, A., Harada, H., Hayashi, Y., Nakamura, M., and Sasazuki, T. 1992.
Novel variant transthyretin gene (ser⁵⁰ to Ile) in familial cardiac amyloidosis.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 187, 460-466.
 8. Dong, R.P., Kimura, A., Numano, F., Nishimura, Y., and Sasazuki, T. 1992.
HLA-linked susceptibility and resistance to Takayasu arteritis.
Heart and vessels, suppl. 7, 73-80.
 9. Nishi, H., Kimura, A., Fukuda, S., Kusukawa, R., Kawamura, K., Nimura, Y., Nagano, M., Yasuda, H., Kawai, C., Sugimoto, T., Okada, R., Yazaki, Y., Tanaka, H., Harumi, K., Koga, Y., Sasazuki, T., and Toshima, H. 1992.
Genetic analysis of dilated cardiomyopathy : HLA and immunoglobulin genes may confer susceptibility.
Jpn. Circ.J., 56, 1054-1061.
 10. Yoshida, M., Kimura, A., Numano, F., and Sasazuki, T. 1992.
Polymerase chain reaction based analysis of polymorphism in the HLA-B gene.
Hum. Immunol., 34, 257-266.
 11. Odum N, Yoshizumi, H., Okamoto, Y., Kamikawaji, N., Kimura, A., Nishimura, Y., and Sasazuki, T. 1992.
Signal transduction by HLA class II molecules in human T cells : induction of LFA-1-dependent and independent adhesion.
Hum. Immunol., 35, 71-84.
 12. Nishi, H., Kimura, A., Harada, H., Toshima, H., and Sasazuki, T., 1992.
Novel missense mutation in cardiac β -myosin heavy chain gene found in a Japanese patient with hypertrophic cardiomyopathy.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 188, 379-387.
 13. Dong, R.P., Kimura, A., Ohkubo, R., Shinagawa, H., Tamai, H., Nishimura, Y., and Sasazuki, T. 1992.
HLA-A and DPB1 loci confer susceptibility to Graves disease.
Hum. Immunol., 35, 165-172.

14. Harada,H., Kimura,A., Dong,R.P., Xu,X.P., Bhatia,K., and Sasazuki,T. 1992.
Sequencing and population analysis of four novel HLA-DPA1 alleles.
Hum.Immunol., 35, 173-178.
15. Fukui,Y., Esaki,Y., Kimura,A., Hirokawa,K., Nishimura,Y., and Sasazuki,T. 1993.
T cell repertoire in a strain of transgenic C57BL/6 mice with the HLA-DRA gene on
the X chromosome.
Immunogenetics, 37, 204-211.
16. Dong,R.P., Kimura,A., Hashimoto,H., Akizuki,M., Nishimura,Y., and Sasazuki,T. 1993.
Difference in HLA-linked genetic background between mixed connective tissue disease
and systemic lupus erythematosus.
Tissue Antigens, 41, 20-25.
17. Hoshino,S., Kimura,A., Fukuda,Y., Hori,H., Satoh,Y., Ojima,Y., Shintaku,T., Sasazuki,
T., and Dohi,K. 1992.
A practical HLA-DRB and-DQB matching test in kidney transplantation.
Transpl. Proc., 25, 191-193.
18. Kimura,A., Fukuda,Y., Hori,H., Hoshino,S., Sasazuki,T., and Dohi,K. 1992.
PCR-SSCP analysis of HLA-DP genes and its application to matching study in
transplantation.
Transpl. Proc., 25, 199-202.
19. Honda,K., Kimura,A., Dong,R.P., Tamai,H., Nagato,H., Nishimura,Y., and Sasazuki,T.
1993.
Immunogenetic analysis of silicosis in Japan.
Am.J.Respir. Cell Mol. Biol., 8, 106-111.
20. Shirasawa,S., Furuse M., Yokoyama,N., and Sasazuki,T. 1993.
Altered growth of human colon cancer cell lines disrupted at activated Ki-ras.
Science, 260, 85-88.
21. Fukui,Y., Yamamoto,K., Yokoyama,N., Iwanaga,T., Kurashima,C., Esaki,YI., Kimura,
A., Akashi,T., Hirokawa,K., and Sasazuki,T.
Restricted expression of transgenic HLA-DRA gene in thymic epithelial cells and its
role in acquisition of T-cell tolerance to self-superantigens and processed DR α -derived
peptide.
Eur.J.Immunol. in press.
22. Yoshida,M., Kimura,A., Katsuragi,K., Numano,F., and Sasazuki,T. 199 DNA typing
of HLA-B gene in Takayasu's arteritis.

Tissue Antigens, in press.

総 説

1. 木村彰方, 1992.
疾患発症における HLA の関与
Annual Review 免疫1992, 237-244.
2. 木村彰方, 笹月健彦, 1992.
ステロイドホルモン代謝異常症の遺伝子診断.
医学のあゆみ, 162, 623-629.
3. 木村彰方, 1992.
MHC 遺伝子座
免疫・Immunology Frontier, 2, 341-354.
4. 木村彰方, 1992.
肥大型心筋症における遺伝子異常.
治療学, 26, 1451-1456.
5. 木村彰方, 笹月健彦, 1993.
肥大型心筋症の遺伝解析.
蛋白質核酸酵素, 38, 374-382.
6. 須藤 徹, 上川路信博, 1993.
溶連菌はスーパー抗原か.
臨床免疫, 25, 199-204.
7. 江崎幸雄, 笹月健彦, 1992.
トランスジェニックマウスを使用したヒト免疫応答遺伝子の解析.
免疫薬理, 10, 27-32.
8. 江崎幸雄, 西村泰治, 1992.
HLA-B27遺伝子導入動物.
Chronic Disease, 3, 404-408.
9. 董 端平, 西村泰治, 1992.
膠原病の遺伝要因.
Modern physician, 12, 470-473.
10. 古瀬正徳, 白澤専二, 笹月健彦, 1992.
原因遺伝子へのアプローチ.
臨床科学, 28, 1316-1321.
11. 西 宏文, 原田晴仁, 木村彰方, 1992.

心筋炎と遺伝.

Cardiac practice, 3, 19-22.

12. 西 宏文, 原田晴仁, 木村彰方, 1992.

肥大型心筋症の遺伝子解析.

Cardiac practice, 3, 255-258.

著 書

1. Kimura,A., and Sasazuki,T. 1992.

HLA-DQA gene is differently regulated from other HLA class II genes.

Molecular Approaches to the Study and Treatment of Human Diseases (Yoshida,T.O., Wilson,J.M.eds.) pp97-104, Elsevier,Amsterdam.

2. Nishimura,Y., Kamikawaji,N., Fujisawa,K., Yoshizumi,H., Yasunami,M., Kimura,A., and Sasazuki,T. 1992.

Contribution of the HLA-DQ gene in controlling immune response and disease susceptibility.

Molecular Approaches to the Study and Treatment of Human Diseases (Yoshida,T.O., Wilson,J.M. eds.) pp159-169, Elsevier, Amsterdam.

3. Kawaharada,T., Kimura,A., Dong,R.P., Kamikawaji,N., Nishimura,Y., Inomata,H., and Sasazuki,T. 1992.

HLA class II alleles associated with Behcet's disease detected by DNA typing.

Current Aspects in Ophthalmology (Shimizu,K.ed.) pp1184-1187, Elsevier Science Publishers, Tokyo.

4. Kimura,A., and Sasazuki,T. 1992.

Organization and design of the DNA component.

HLA 1991 vol I (Tsuji,K., Aizawa,M., Sasazuki,T. eds.) pp395-396, Oxford University Press, Oxford.

5. Kimura,A., and Sasazuki,T. 1992.

Eleventh International Histocompatibility Workshop reference protocol for the HLA-DNA typing technique.

HLA 1991 vol.I (Tsuji,K., Aizawa,M., Sasazuki,T. eds) pp397-419.

Oxford University Press, Oxford.

6. Kimura,A., Dong,R.P., Harada,H., and Sasazuki,T. 1992.

DNA typing of HLA class II genes in B-lymphoblastoid cell lines homozygous for HLA.

- HLA 1991 vol. I (Tsuji,K., Aizawa,M., Sasazuki,T. eds) pp419-425.
Oxford University Press, Oxford.
7. Kimura,A., and Sasazuki,T. 1992.
The pre-workshop of the DNA component.
HLA 1991 vol. I (Tsuji,K., Aizawa,M., Sasazuki,T. eds) pp426-48.
Oxford University Press, Oxford.
8. Kimura,A., Kamikawaji,N., and Sasazuki,T. 1992.
HLA DNA typing: data collection, processing and analysis.
HLA 1991 vol. I (Tsuji,K., Aizawa,M., Sasazuki,T. eds.) pp431-453.
Oxford University Press, Oxford.
9. Kimura,A., Erlich,H.A., and Sasazuki,T. 1992.
DNA typing technical workshop.
HLA 1991 vol. I (Tsuji,K., Aizawa,M., Sasazuki,T. eds.) pp496-498, Oxford University Press, Oxford.
10. Kimura,A., Dong, R.P., Tsuchiya,K., Kawaharada,T., and Sasazuki,T. 1992.
Summary of the eleventh workshop oligotyping method. HLA 1991 vol. I (Tsuji,K., Aizawa,M., Sasazuki,T. eds) p499, Oxford University Press, Oxford.
11. Kimura,A., Hoshino,S., Yoshida,M., Harada,H., and Sasazuki,T. 1992.
Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) analysis of HLA genes: a practical HLA-matching system.
HLA 1991 vol. I (Tsuji,K., Aizawa,M., Sasazuki,T. eds.) pp511-514.
Oxford University Press, Oxford.
12. Kimura,A., and Sasazuki,T. 1992.
Epitope analysis of workshop panels: combined study of oligotyping and serological typing.
HLA 1991 vol. I (Tsuji,K., Aizawa,M., Sasazuki,T. eds.) pp530-538, Oxford University Press, Oxford.
13. Juji,T., Akaza,T., Tokunaga,K., Miyoshi,H., Kashiwase,A Kimura,A., and Sasazuki,T. 1992.
Correlation between serology and DNA typing.
HLA 1991 vol. I (Tsuji,K., Aizawa,M., Sasazuki,T. eds.) pp565-602, Oxford University Press, Oxford.
14. Imanishi,T., Akaza,T., Kimura,A., Tokunaga,K., and Gojobori,T. 1992.
Reference tables: allele frequencies and haplotype frequencies for HLA and complement

- loci in various ethnic groups.
HLA 1991 vol I (Tsuji,K., Aizawa,M., Sasazuki,T. eds.) pp1065-1220, Oxford University Press, Oxford.
15. Nishimura,Y., Thorsby,E., Ronningen,K.S., Nelson,L.T., Hansen,J.A., Bias,W.B., Fauchet,R., Dawkins,R.L., Tiilikainen,A., Salvaneshi,L., Martinetti,M., Cuccia,M., Vaughan,R.W., Hall,D.G., Svejgaard,A., Thomsen,A.C., and Sasazuki,T. 1992.
General organization and overview of the disease component. HLA 1991 vol.I (Tsuji,K., Aizawa,M., Sasatuki,T. eds.) pp693-700, Oxford University Press, Oxford.
 16. Yoshida,M., Kimura,A., Numano,F., and Sasazuki,T. 1992.
Analysis of polymorphism in exon 2 of the HLA-B gene.
HLA 1991 vol. II (Tsuji,K., Aizawa,M., Sasazuki,T. eds) pp215-218 Oxford University Press, Oxford.
 17. Ogahara,S., Kimura,A., Michinaga,I., Naito,S., Sasazuki,T., and Arakawa,K. 1992.
Nucleotide sequences of the DRB6 pseudogene linked to HLA-DR15 haplotype.
HLA 1991 vol. II (Tsuji,K., Aizawa,M., Sasazuki,T. eds.) pp264-265,
Oxford University Press, Oxford.
 18. Hoshino,S., Kimura,A., Fukuda,Y., Dohi,K., and Sasazuki,T. 1992.
Polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis of polymorphism in DPA1 and DPB1 genes: a practical and rapid method to test histocompatibility.
HLA 1991 vol. II (Tsuji,K., Aizawa,M., Sasazuki,T. eds.) pp335-338, Oxford University Press, Oxford.
 19. Kimura,A., and Sasazuki,T. 1992.
Polymorphism in the 5' flanking region of DQA1 gene and its relation to DR-DQ haplotype.
HLA 1991 vol. II (Tsuji,K., Aizawa,M., Sasazuki,T. eds.) pp382-385, Oxford University Press, Oxford.
 20. Hamaguchi,K., Kimura,A., Dong,R.P., Noda,N., Okeda,T., Chikuba,N., Nunoi,K., Fujisawa,M., Nagataki,S., Takaki,R., and Sasazuki,T. 1992.
Specific combination of HLA-DRB and -DQB alleles confer susceptibility while DQB gene determines resistance to insulin-dependent diabetes mellitus in Japanese.
HLA 1991 vol. II (Tsuji,K., Aizawa,M., Sasazuki,T. eds.) pp 488-492, Oxford University Press, Oxford.
 21. Tsuchiya,K., Kondo,M., Kimura,A., Nishimura,Y., and Sasazuki,T. 1992.

- The HLA-DRB1 and/or the DQB1 locus control susceptibility and the DRB1 locus controls resistance to rheumatoid arthritis in the Japanese.
HLA 1991 vol II (Tsuji,K., Aizawa,M., Sasazuki,T. eds.) pp509-512, Oxford University Press, Oxford.
22. Kamikawaji,N., Yoshizumi,H., Mori,K., Fujita,Y., Kimura.A., Nishimura,Y., and Sasazuki,T. 1992.
Identification of T-cell epitopes in M protein from type 12 streptococcus.
HLA 1991 vol. II (Tsuji.K., Aizawa,M., Sasazuki,T. eds.) pp604-606, Oxford University Press, Oxford.
23. Yoshizumi,H., Kamikawaji,N., Okumura,K., Nishimura,Y., and Sasazuki,T. 1992.
Down regulation of immune response by CD8⁺ cytotoxic T cells specific to autologous antigen presenting cells.
HLA 1991 vol. II (Tsuji,K., Aizawa,M., Sasazuki,T. eds.) pp619-621, Oxford University Press, Oxford.
24. Fukui, Y., Esaki,Y., Yasunami,M., Kimura,A., Hirokawa,K., Nishimura,Y., and Sasazuki,T. 1992.
T-cell repertoire and self-tolerance in transgenic mice with the HLA-DRA gene on the X chromosome.
HLA 1991 vol. II (Tsuji,K., Aizawa,M., Sasazuki,T. eds.) pp648-650, Oxford University Press, Oxford.
25. Esaki,Y., Fukui,Y., Yasunami,M., Kimura,A., Hirokawa,K., and Sasazuki,T. 1992.
Functional expression of HLA-DQ4 genes in a line of transgenic C57 BL/6 mouse.
HLA 1991 vol. II (Tsuji,K., Aizawa,M., Sasazuki,T. eds.) pp651-653, Oxford University Press, Oxford.
26. Nishimura,Y., Dong,R.P., Hashimoto,H., Akizuki,M., Kimura,A., and Sasazuki,T. 1993.
HLA-linked disease susceptibility to systemic lupus erythematosus and mixed connective tissue disease in the Japanese population.
Intractable vasculitis syndrome (Tanabe, T-ed) pp221-228, Hokkaido University Press, Sapporo.
27. 上川路信博, 1993.
自己免疫疾患とHLA.
自己免疫とトレランス (山本一彦編) pp212-219, 中外医学社, 東京.
28. 西村泰治, 董端平, 木村彰方. 1992.
SLE患者におけるHLA class II遺伝子の分子生物学的解析.
リウマチ'92 (橋木博史, 新名正由編) pp92-98, メディカルレビュー社, 東京.

学会発表

1. Sasazuki, T., Yoshizumi, H., Kamikawaji, N., Okumura, K., and Nishimura, Y. (1992, 8/24-8/28).
Down regulation of immune response by autoreactive CD8⁺ cytotoxic T cells specific to HLA-B on antigen presenting cells.
8th International Congress of Immunology, Budapest.
2. Kamikawaji, N., Mori, K., Yoshizumi, H., Fujita, Y., Kimura, A., Nishimura, Y., Sasazuki, T. (1992, 8/24-8/28).
Identification of T cell epitopes in the type 12 streptococcal M protein.
8th International Congress of Immunology, Budapest.
3. Fukui, Y., Esaki, Y., Yasunami, M., Kimura, A., Hirokawa, K., Nishimura, Y., Sasazuki, T. (1992, 8/24-8/28).
Varied deletion of T cell repertoires in the transgenic mice with HLA-DRA on X chromosome.
8th International Congress of Immunology, Budapest.
4. Hoshino, S., Kimura, A., Fukuda, Y., Hori, H., Satoh, Y., Ojima, Y., Shintaku, T., Sasazuki, T., Dohi, K. (1992, 8/15-8/22).
A simple and practical test of HLA-DRB and -DQB matching in transplantation.
14th International Congress of the Transplantation Society, Paris.
5. Kimura, A., Fukuda, Y., Hori, H., Hoshino, S., Sasazuki, T., Dohi, K. (1992, 8/15-8/22).
Polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis of HLA-DP genes and its application in transplantation.
14th International Congress of the Transplantation Society, Paris.
6. Nishi, H., Kimura, A., Harada, H., Koga, Y., Sasazuki, T., Toshima, H. (1992, 10/5-10/7).
Genetic analysis of hypertrophic cardiomyopathy.
3rd International Symposium on cardiomyopathy and myocarditis, 松本.
7. Harada, H., Kimura, A., Nishi, H., Koga, Y., Sasazuki, T., Toshima, H. (1992, 11/16-11/19).
Genetic analysis of hypertrophic cardiomyopathy.
64th American Heart Association Society Session, New Orleans.
8. 木村彰方, 吉田雅幸, 葛城肅典, 須藤 徹, 笹月健彦 (1992, 11/25-11/27).
HLA-B抗原のDNAタイピング法の開発と疾患関連性解析への応用.
第22回日本免疫学会総会, 名古屋.
9. 千住 覚, 木村彰方, 董 端平, 土井邦喜, 福井宣規, 笹月健彦 (1992, 11/25-11-27).

自己免疫疾患における TAP 遺伝子の解析.

第22回日本免疫学会総会, 名古屋.

10. 森 一博, 上川路信博, 木村彰方, 笹月健彦 (1992, 10/29-10/31).
溶連菌感染後急性糸球体腎炎における免疫応答.
日本人類遺伝学会第37回大会, 筑波.
11. 上川路信博, 藤田由香里, 董 端平, 問田 望, 森 一博, 須藤 徹, 笹月健彦 (1992, 10/29-10/31).
溶連菌M蛋白ペプチドの HLA 分子との結合性及び T 細胞刺激活性の解析
日本人類遺伝学会第37回大会, 筑波.
12. 上川路信博, 藤田由香里, 問田 望, 須藤 徹, 森 一博, 笹月健彦 (1992, 11/25-11/27).
HAL-クラス II 分子ペプチド相互作用と T 細胞応答の解析.
第22回日本免疫学会総会, 名古屋.
13. 森 一博, 上川路信博, 藤田由香里, 笹月健彦 (1992, 11/25-11/27)
溶連菌感染後急性糸球体腎炎 (AGN) における溶連菌M蛋白上の B cell epitope の同定.
第22回日本免疫学会総会, 名古屋.
14. 岡本安弘, 上川路信博, 吉住秀之, 浜島 廣, 木村彰方, 西村泰治, 笹月健彦 (1992, 11/25-11/27).
ヒト T 細胞レセプター V β 22 遺伝子産物を認識する単クローン抗体の樹立, 及びそれを用いた末梢血 T 細胞レパトアの解析.
第22回日本免疫学会総会, 名古屋.
15. 問田 望, 上川路信博, 董 端平, 藤田由香里, 笹月健彦 (1992, 11/25-11/27).
HLA-DR 4 サブタイプ間における M12 ペプチドとの結合性の差異.
第22回日本免疫学会総会, 名古屋.
16. 問田 望, 上川路信博, 董 端平, 藤田由香里, 笹月健彦 (1992, 10/29-10/31).
HLA-DR 4 サブタイプ間における M12 ペプチドとの結合性の差異.
日本人類遺伝学会第37回大会, 筑波.
17. 吉住秀之, 上川路信博, 笹月健彦 (1992, 10/29-10/31).
溶連菌細菌壁抗原に対する低応答性を誘導するリンパ球培養上清中の液性因子の精製.
第37回日本人類遺伝学会, 筑波
18. 吉住秀之, 上川路信博, 笹月健彦 (1992, 11/25-11/27).
自己反応性 CD 8 陽性 T 細胞の細胞障害活性を誘導するリンパ球培養上清中の液性因子の精製.
第22回日本免疫学会総会. 名古屋.

19. 須藤 徹, 上川路信博, 森 一博, 西村泰治, 笹月健彦 (1992, 11/25-11/27).
A 群溶連菌のペプシン限定分解抽出抗原中に含まれるスーパー抗原の単離・同定.
第22回日本免疫学会総会. 名古屋.
20. 須藤 徹, 木村彰方, 玉井 一, 隅 寛二, 大久保亮子, 西村泰治, 笹月健彦 (1992, 10/29-10/31).
亜急性甲状腺炎と HLA-B67の相関及びその臨床像の検討.
日本人類遺伝学会第37回大会, 筑波.
21. 董 端平, 木村彰方, 橋本博史, 秋月正史, 西村泰治, 笹月健彦 (1992, 10/29-10/31).
MCTD および SLE 患者における HLA クラス II 遺伝子の解析.
第37回日本人類遺伝学会, 筑波.
22. 董 端平, 上川路信博, 問田 望, 藤田由香里, 吉住秀之, 笹月健彦 (1992, 11/25-11/27).
M12由来ペプチドと HLA-DP の結合性および HLA-DP 拘束性 T 細胞増殖反応の解析.
第22回日本免疫学会総会. 名古屋.
23. 福井宣規, 江崎幸雄, 山本 健, 木村彰方, 広川勝昱, 西村泰治, 笹月健彦, (1992, 10/29-10/31).
HLA-DRA 遺伝子の発現を異にする 3 系統のトランスジェニックマウスにおける免疫制御機構の解析.
第37回日本人類遺伝学会, 筑波.
24. 山本 健, 福井宣規, 江崎幸雄, 山根一聡, 広川勝昱, 木村彰方, 笹月健彦, (1992, 10/29-10/31).
3 系統の HLA-DRA トランスジェニックマウスにおける DR α E β 分子及び DR α ペプチド / I - A^b 複合体の発現.
第37回日本人類遺伝学会, 筑波.
25. 山根一聡, 山本 健, 福井宣規, 江崎幸雄, 木村彰方, 笹月健彦, (1992, 10/29-10/31).
H-2q ホモ接合体マウスにおける DR α A β 分子の機能的発現.
第37回日本人類遺伝学会, 筑波.
26. 福井宣規, 山本 健, 明石 功, 倉島知恵理, 江崎幸雄, 広川勝昱, 笹月健彦 (1992, 11/24-11/27).
T 細胞レパトワ選択における胸腺上皮細胞の機能.
第22回日本免疫学会総会. 名古屋.
27. 山本 健, 福井宣規, 江崎幸雄, 明石 功, 倉島知恵理, 広川勝昱, 笹月健彦 (1992, 11/24-11/27).
3 系統の HLA-DRA トランスジェニックマウスにおける DR α E β 分子及び DR α ペプチド

- ド/I-A^b複合体の発現。
第22回日本免疫学会総会。名古屋。
28. 江崎幸雄, 福井宣規, 山本 健, 木村彰方, 笹月健彦 (1992, 11/24-11/27).
DQA 遺伝子により規定された DQ 分子の発現及び機能-transgenic mice による解析—
第22回日本免疫学会総会。名古屋。
29. 川原田富朗, 木村彰方, 千住 覚, 上川路信博, 董 端平, 池田英子, 讃井浩喜, 望月
学, 猪俣 孟, 笹月健彦 (1992, 11/24-11/27).
難治性ベーチェット病における疾患感受性遺伝子の解析。
第22回日本免疫学会総会。名古屋。
30. 白澤専二, 古瀬正徳, 笹月健彦 (1992, 9/29-10/1).
Gene-targeting 法を用いた大腸癌細胞株における活性化 Ki-ras 遺伝子の破壊。
第51回日本癌学会総会。大阪。
31. 古瀬正徳, 白澤専二, 笹月健彦 (1992, 9/29-10/1).
活性化 Ki-ras 遺伝子の破壊された大腸癌, 細胞株における腫瘍特性の変化。
第51回日本癌学会総会。大阪。
32. 利谷幸治, 白澤専二, 笹月健彦 (1992, 9/29-10/1).
家族性大腸腺腫症の腫瘍における遺伝子の変異。
第51回日本癌学会総会。大阪。
33. 西 宏文, 原田晴仁, 古賀義則, 戸嶋裕徳, 木村彰方, 笹月健彦 (1992, 3/25-3/27).
家族性肥大型心筋症 (HCM) における心筋ミオシン重鎖 (MHC) 遺伝子の解析 (第2報).
第56回日本循環器学会総会, 幕張。
34. 原田晴仁, 西 宏文, 古賀義則, 戸嶋裕徳, 木村彰方, 笹月健彦 (1992, 6/6).
心筋 β ミオシン重鎖遺伝子エクソン20にミスセンス変異を認めた家族性肥大型心筋症の 1
例。
第72回日本循環器学会九州地方会, 熊本。
35. 西 宏文, 木村彰方, 原田晴仁, 古賀義則, 戸嶋裕徳, 笹月健彦 (1992, 10/29-10/31).
拡張型心筋症における HLA クラス II 遺伝子の解析。
第37回日本人類遺伝学会, 筑波。
36. 木村彰方, 西 宏文, 原田晴仁, 古賀義則, 戸嶋裕徳, 笹月健彦 (1992, 10/29-10/31).
肥大型心筋症の遺伝子解析。
第37回日本人類遺伝学会, 筑波。
37. 原田晴仁, 木村彰方, 西 宏文, 林 靖生, 中村正臣, 笹月健彦 (1992, 10/29-10/31).
原発性心臓アミロイドーシス患者にみられたトランスサイレチン遺伝子変異。
第37回日本人類遺伝学会, 筑波。

38. 西 宏文, 原田晴仁, 戸嶋裕徳, 木村彰方, 笹月健彦 (1992, 11/27-11/28).
肥大型心筋症原因遺伝子への分子遺伝学的アプローチ.
第14回心筋生検研究会, 東京.