

報 告

日本人における Gov 血小板同種抗原の遺伝子頻度

井上 進<sup>1)</sup> 森田 庄治<sup>1)</sup> 二上 由紀<sup>1)</sup> 花垣 澄雄<sup>1)</sup>  
半戸 啓一<sup>1)</sup> 石島あや子<sup>1)</sup> 湯浅 晋治<sup>1)</sup> 柴田 洋一<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>埼玉県赤十字血液センター

<sup>2)</sup>東大病院輸血部

(平成 15 年 3 月 14 日受付)

(平成 15 年 8 月 20 日受理)

GENE FREQUENCIES OF GOV PLATELET ALLOANTIGENS IN JAPANESE

Susumu Inoue<sup>1)</sup>, Shoji Morita<sup>1)</sup>, Yuki Futakami<sup>1)</sup>, Sumio Hanagaki<sup>1)</sup>,  
Keiichi Hando<sup>1)</sup>, Ayako Ishijima<sup>1)</sup>, Shinji Yuasa<sup>1)</sup> and Yoichi Shibata<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Saitama Red Cross Blood Center

<sup>2)</sup>Department of Transfusion Medicine, the University of Tokyo

The Gov alloantigen system is carried by the platelet membrane protein CD109. The Gov antigen has a polymorphism, Tyr/Ser, at the position of residue 703, caused by an A-C nucleotide substitution at position 2108 of the coding region. We examined the genotype frequencies for this polymorphism among Japanese using the PCR-SSP method. The genotypic frequencies were Gov<sup>a/a</sup>, 23.5% ; Gov<sup>a/b</sup>, 52.1% and Gov<sup>b/b</sup>, 24.4%. Allele frequencies were 0.495 and 0.505 for Gov<sup>a</sup> and Gov<sup>b</sup>, respectively (n = 217). Gov alloantibodies are the cause of neonatal alloimmune thrombocytopenic purpura (NAITP) and post-transfusion purpura, and are implicated in platelet transfusion refractoriness (PTR). On the basis of the Gov genotyping described here, Gov antigen panels can be prepared for the detection of anti-Gov antibodies in the sera of patients affected by NAITP and PTR.

**Key words** : Gov platelet alloantigen, HPA, Gene frequency, NAITP, PTR

はじめに

血小板特異抗原 (HPA : Human platelet antigens) に対する同種抗体は血小板輸血不応答 (PTR : Platelet transfusion refractoriness) や輸血後紫斑病 (PTP : Post-transfusion purpura), 新生児血小板減少性紫斑病 (NAITP : Neonatal alloimmune thrombocytopenic purpura) の原因となることが知られている<sup>1)</sup>。したがって, HPA タイピングはこれらの病態の診断や輸血用血液のドナータイピングに重要である。HPA は主に血小板膜糖蛋白 (GP : Glycoprotein) 上に存在し, 現在までに HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5,

HPA-6w (Ca<sup>a</sup>/Tu<sup>a</sup>), HPA-7w (Mo), HPA-8w (Sr<sup>a</sup>), HPA-9w (Max<sup>a</sup>), HPA-10w (La<sup>a</sup>), HPA-11w (Gro<sup>a</sup>) など 20 種類以上の抗原系が認められている<sup>2)</sup>。主な HPA 抗原系はそれぞれ a 型と b 型の優劣のない対立抗原を認め, 1 つのアミノ酸変異によって対立抗原が存在する。この抗原性を決定するアミノ酸変異は, それをコードする遺伝子の 1 塩基置換で生じていることが知られている。

これらの抗原のうち Gov 抗原は血小板膜蛋白 CD109 に存在している同種抗原系である<sup>3)4)</sup>。CD 109 蛋白の 703 番目のアミノ酸がチロシン又はセリンに変異することで, それぞれ Gov<sup>a</sup> 型と Gov<sup>b</sup>

型となり、これをコードする遺伝子の2108番目の1塩基置換(アデニン及びシトシン)により多型性が決定されている<sup>5)</sup>。Gov抗原型の判定方法には分子生物学的な方法と血清学的な方法が用いられており、両者の判定結果はほぼ一致しているものの、一部では不一致となる症例も存在している<sup>4)</sup>。Andreら<sup>5)</sup>はこの不一致の原因として、血小板におけるCD109の発現量が血清学的な検出方法の検出限界以下であったためと推定し、PCRを用いた分子生物学的な判定方法がより確実であるとしている。Gov抗原に対する同種抗体によるPTRやNAITPの報告<sup>3,8,9)</sup>もあり、Gov抗原型のタイピングは既知のHPAと同様、臨床上重要であると考えられる。これまで日本人におけるGov抗原頻度は不明であったが、我々は日本人献血者におけるGov遺伝子型を分子生物学的方法(PCR-SSP法)で測定し、遺伝子頻度を求めたので報告する。

### 対 象

無作為に選んだ献血者血液217例(男性:112名,女性:105名)を対象とした。

### 方 法

①ゲノムDNAの抽出:抗凝固剤としてCPD又はEDTAを加えた血液検体500 $\mu$ Lを赤血球溶血液(0.32M Sucrose, 1vol% TritonX-100 5mM MgCl<sub>2</sub>, 12mM Tris-HCl(pH7.5))で溶血処理後、スマイテストEX R&D(ゲノムサイエンス社)を用いてゲノムDNAを抽出した。得られたゲノムDNAは滅菌水100 $\mu$ Lで溶解し、約100 $\mu$ g/mLに調製後、測定まで4℃で保存した。

②PCR:Andreらが報告<sup>5)</sup>したPCR-SSP法用の3種類のプライマー(Gov<sup>a</sup>及びGov<sup>b</sup>特異的アンチセンスプライマー、Gov<sup>a,b</sup>共通センスプライマー)を作製した。PCR-SSP法は1検体につき2本(Gov<sup>a</sup>判定用及びGov<sup>b</sup>判定用)のPCRチューブを用いた。各PCRチューブあたりに滅菌水13.16 $\mu$ L, 10 $\times$  PCR Buffer 2 $\mu$ L (MgCl<sub>2</sub> 終濃度 1.5 mM: PERKIN ELMER社), dNTP MIX 2mM each (PERKIN ELMER社) 0.5 $\mu$ L, 5U/ $\mu$ L AmpliTaq DNA Polymerase (PERKIN ELMER社) 0.28 $\mu$ L, 100 $\mu$ M Gov<sup>a</sup>又はGov<sup>b</sup>特異的アンチセンスプライマー 0.1 $\mu$ L(終濃度 0.5 $\mu$ M), 100 $\mu$ M セン

スプライマー 0.1 $\mu$ L(終濃度 0.5 $\mu$ M), 100 $\mu$ g/mL ゲノム DNA 4.0 $\mu$ Lを加える。GeneAmp PCR System 9600 (PERKIN ELMER社)で、96 60秒, 96 25秒 70 45秒 72 30秒 $\times$ 5サイクル, 96 25秒 65 45秒 72 30秒 $\times$ 20サイクル, 96 25秒 51 45秒 72 30秒 $\times$ 8サイクル, 72 5分間増幅を行った。

③検出:増幅産物を2%アガロースゲルで電気泳動後、0.5 $\mu$ g/mLエチジウムブロマイドで染色した。UV照射下でバンド(225 base pair)の有無を観察し、判定を行った。なお、測定毎にGov型既知の対照(Gov<sup>a,a</sup>, Gov<sup>a,b</sup>, Gov<sup>b,b</sup>)を同時に判定し、対照の結果が適正でない場合は判定を無効とした。

### 結 果

Fig. 1にGov<sup>a,a</sup>, Gov<sup>a,b</sup>, Gov<sup>b,b</sup>型を用いた電気泳動のバンドを示した。検体1(Gov<sup>a,a</sup>型)はGov<sup>a</sup>特異的プライマーにのみバンドを認め、Gov<sup>b</sup>特異的プライマーにはバンドを認めない。検体2(Gov<sup>a,b</sup>型)はGov<sup>a</sup>特異的プライマー及びGov<sup>b</sup>特異的プライマーの両者にバンドを認めた。検体3(Gov<sup>b,b</sup>型)はGov<sup>b</sup>特異的プライマーにのみバンドを認め、Gov<sup>a</sup>特異的プライマーにはバンドを認めない。この電気泳動のバンドの有無により、Gov遺伝子型検査を実施したところ、Gov<sup>a,a</sup>51例(23.5%), Gov<sup>a,b</sup>113例(52.1%), Gov<sup>b,b</sup>53例(24.4%)であった(Table 1)。Gov遺伝子型頻度から算出したGov<sup>a</sup>とGov<sup>b</sup>遺伝子頻度は0.495及び0.505であった。

### 考 察

Gov抗原は血小板膜蛋白CD109に存在している同種抗原系である<sup>3,8)</sup>。これまで、日本人におけるGov抗原(遺伝子型)頻度の報告はない。そこで我々はPCR-SSP法を用いてGov遺伝子型頻度を求めたところ、Gov<sup>a</sup>とGov<sup>b</sup>遺伝子頻度はそれぞれ0.495, 0.505とほぼ同頻度で、偏りは認められなかった。Keltonらが報告<sup>3)</sup>したカナダ人献血者33名から算出した遺伝子頻度は0.532, 0.468であり、我々の求めた遺伝子頻度と有意な差は認められなかった。

Tanakaら<sup>8)</sup>は日本人のHPA-6aw(Ca/Tu<sup>b</sup>)につ

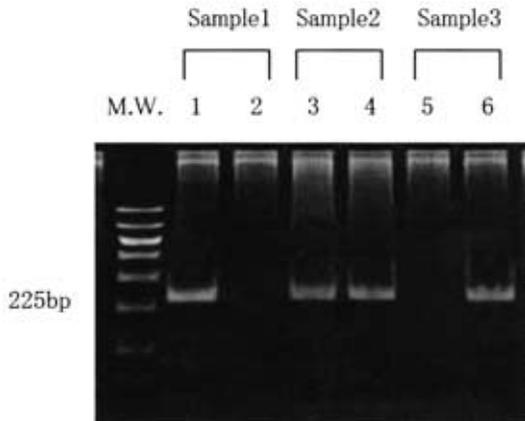


Fig. 1 Gov genotyping by PCR-SSP method.

Reactions in lanes 1, 3 and 5 contained Gov<sup>a</sup>-specific primer, while those in lanes 2, 4 and 6 contained Gov<sup>b</sup>-specific primer. These primers specifically amplified a 225bp product. On the basis of the banding at 225bp, sample 1 was typed as Gov<sup>a/a</sup>, sample 2 as Gov<sup>a/b</sup> and sample 3 as Gov<sup>b/b</sup>.

Table 1 Genotype frequencies of Gov antigen

Gov genotype	Male		Female		Total	
	n	%	n	%	n	%
a/a	29	25.9	22	21.0	51	23.5
a/b	56	50.0	57	54.3	113	52.1
b/b	27	24.1	26	24.8	53	24.4
total	112	100.0	105	100.0	217	100.0

いて、抗原性を決定している GPIIIa の 489 番目のアルギニンをコードする 2 つのコドン (CGG, CGA) が存在することを報告している。Gov 抗原の多型性を決定している CD109 蛋白 703 番目のアミノ酸、チロシン及びセリンに対応するコドンとして、TAC 及び TCC が報告<sup>5)</sup>されているが、これら以外にチロシン及びセリンをコードするコドンが存在するかは今後の検討が待たれる。

我々は血清学的に Mo, Sr<sup>a</sup>, Va<sup>a</sup> 抗原について抗原検査を行ったところ、Mo 抗原陽性者は 1,000 人中 2 人 (0.2%) に認められたが、Sr<sup>a</sup>, Va<sup>a</sup> 抗原では陽性者を認めず<sup>9)</sup>、これらの抗原による不適合の発生頻度は極めて低いのに対し、Gov 抗原系

は Gov<sup>a</sup> 抗原と Gov<sup>b</sup> 抗原が各々高頻度で分布しているため、妊娠や血小板輸血による HPA 不適合の発生頻度が高いことが判明した。このため、NAITP 症例における母児間等、HPA 不適合が問題となる場合では、Gov 遺伝子型判定は有効であると考えられた。

Gov 同種抗体は PTR と関連し、NAITP や PTP の原因となることが報告<sup>3,6,7)</sup>されているが、本邦での報告例はなく、日本人における遺伝子頻度も不明であった。Gov 同種抗原系が存在している CD 109 の血小板における発現量は非常に少なく<sup>10)</sup>、また個人差も大きい<sup>5)</sup>ことから、本邦での血小板抗体検出の標準的な方法である MPHA 法で検出されるか否かは興味深いところである。谷上<sup>11)</sup>は NAIT 症例の約半数に HLA 又は HPA 抗体が存在していたが、残りの半数には抗体を認めていないとしている。このように臨床的に抗原感作が強く示唆されるが、抗体が検出されない NAITP 症例において、Gov 抗原抗体系が関与している可能性があるかと推察する。我々が開発した磁性粒子を応用した MPHA 法 (M-MPHA 法)<sup>2,13)</sup>は、従来の MPHA 法の感度と同等、あるいはそれ以上であることから、Gov 抗原のような発現量の少ない抗原系の検出に有効と考えられる。現在 M-MPHA 法を用いた Gov 抗体の検出を検討しているところである。

我々は血清学的な型判定に使用できる Gov 抗体を入手できず、Gov 同種抗原の多型性頻度については検討できなかった。しかし、今回報告した PCR-SSP 法を用いた Gov 遺伝子型判定による Gov 抗原パネルの確立が、Gov 抗体の特異性同定や血清学的な型判定に必要な抗血清の収集に有用であると考えられた。

文 献

- 1) von. dem. Borne, AEGK., et al. : Immunology of platelet disorders. Baillieres Clin Haematol, 2 : 749 781, 1989.
- 2) von. dem. Borne, AEGK., Decay, F. : ICSH/ISBT working party on platelet serology : Nomenclature of platelet-specific antigens. Vox Sang., 58 : 176, 1990.

- 3) Kelton, J.G., et al. : Gov<sup>a/b</sup> alloantigen system on human platelets. *Blood*, 75 : 2172-2176, 1990.
  - 4) Smith, J.W., et al. : Characterization and localization of the Gov<sup>a/b</sup> alloantigens to the glycosylphosphatidylinositol-anchored protein CDw 109 on human platelets. *Blood*, 86 : 2807-2814, 1995.
  - 5) Andre C. Schuh, et al. : A tyrosine703serine polymorphism of CD109 defines the Gov platelet alloantigens. *Blood*, 99 : 1692-1698, 2002.
  - 6) Berry, J.E., et al. : Detection of Gov system antibodies by MAIPA reveals an immunogenicity similar to the HPA-5 alloantigens. *Br. J. Haematol*, 110 : 735-742, 2000.
  - 7) Bordin, J.O., et al. : Maternal immunization to Gov system alloantigens on human platelets. *Transfusion*, 37 : 823-828, 1997.
  - 8) Tanaka, S., et al. : Genotype frequencies of the human platelet antigen, Ca/Tu, in Japanese, determined by a PCR-RFLP method. *Vox Sang.*, 70 : 40-44, 1996.
  - 9) 森田庄治, 柴田洋一 : 抗血小板抗体検査, 編者 大久保昭行, 他, 輸血検査実践マニュアル, 医学書院, 東京, 1997, 164-168.
  - 10) Yeo, E.L., et al. : Further characterization of platelet 8A3, and activation-specific and T-cell antigen and its identification in endothelial cells. *Blood*, 80 : 56a, 1992.
  - 11) 谷上純子 : 母児不適合妊娠 ( 新生児血小板減少症 ). *MHC*, 9 : 136-137, 2002.
  - 12) 森田庄治 : 血小板輸血患者における抗血小板抗体の関与. *日輸血会誌*, 47 : 555-559, 2001.
  - 13) 森田庄治, 他 : 磁性粒子を応用した迅速な血小板抗体検出の試み. *血液事業*, 25 : 33-40, 2002.
-