

論文記事

## 日本人先天性胆道閉鎖症患者における HLA 型に関する研究 生体肝移植レシピエント 392 症例の解析

辻 博昭<sup>1)</sup> 湯浅 健<sup>1,7)</sup> 木村 晋也<sup>1)</sup> 丹羽 紀実<sup>1,2)</sup>  
万木紀美子<sup>1)</sup> 江川 裕人<sup>4)</sup> 田中 紘一<sup>4)</sup> 丸屋 悦子<sup>5)</sup>  
佐治 博夫<sup>5)</sup> 浅野 弘明<sup>6)</sup> 前川 平<sup>1,3)</sup>

<sup>1)</sup>京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部

<sup>2)</sup>検査部

<sup>3)</sup>分子細胞治療センター

<sup>4)</sup>移植外科

<sup>5)</sup>NPO 法人 HLA 研究所

<sup>6)</sup>京都府立医科大学医学部看護学科

<sup>7)</sup>秋田大学医学部泌尿器科 (現所属)

(平成 17 年 7 月 26 日受付)

(平成 17 年 9 月 5 日受理)

### HLA IN JAPANESE PATIENTS WITH BILIARY ATRESIA RETROSPECTIVE ANALYSIS OF PATIENTS WHO UNDERWENT LIVING DONOR LIVER TRANSPLANTATION

Hiroaki Tsuji<sup>1)</sup>, Takeshi Yuasa<sup>1,7)</sup>, Shinya Kimura<sup>1)</sup>, Norimi Niwa<sup>1,2)</sup>  
Kimiko Yurugi<sup>1)</sup>, Hiroto Egawa<sup>4)</sup>, Koichi Tanaka<sup>4)</sup>, Etsuko Maruya<sup>5)</sup>  
Hiro-o Saji<sup>5)</sup>, Hiroaki Asano<sup>6)</sup> and Taira Maekawa<sup>1,3)</sup>

From the <sup>1)</sup>Department of Transfusion Medicine and Cell Therapy, <sup>2)</sup>Laboratory Medicine, <sup>4)</sup>Transplantation and Immunology, and <sup>3)</sup>Center for Cell and Molecular Therapy, Kyoto University Hospital, <sup>5)</sup>HLA Laboratory, and <sup>6)</sup>School of Nursing, Kyoto Prefectural University of Medicine, <sup>7)</sup>Department of Urology, Akita University School of Medicine

#### はじめに

先天性胆道閉鎖症 (biliary atresia : BA) は新生児期に肝外胆管が繊維性閉塞することによっておこる胆管の閉塞性疾患である<sup>1)</sup>。Kasai 法などの矯正外科手術の進歩にもかかわらず治療成績は未だ満足するものとはいえず、BA は小児における肝臓移植の主たる適応疾患となっている。実際、京都大学医学部附属病院 (以下、京大病院) で生体肝臓移植 (living donor liver transplantation :

LDLT) 患者の約 50% (405/837 = 48.5%) は BA を原疾患とする。BA は胎生期に完成し心奇形や内臓逆位を伴う embryonic タイプと、新生児期に進行し発症する合併奇型を認めない perinatal タイプに分類されるが、両方のタイプとも、肝外胆管の硬化性線維性閉塞により胆汁流出が障害された結果進展する。15% から 30% の患者を占める embryonic タイプでは、出生時に胆道閉鎖症を発症し、心房および心室中隔欠損や動脈管開存症、

さらに腹部の内臓逆位や腸の malrotation などの肝外の奇形を合併する<sup>2)</sup>。Perinatal タイプでは、これらの合併奇形を認めず生後 2 週間以内に黄疸および白色便の特徴を伴って発症し、BA の 70% から 85% を占める。

BA の病因については明らかにされていない。最近、*inversin* 遺伝子の transgenic mouse では進行性の胆汁うっ滞、内臓逆位や嚢胞腎がみられ、原因遺伝子として注目された<sup>3)</sup>。しかし、その後 7 人の BA 患者の *inversin* 遺伝子を調べたところ変異はみられず major な要因ではなさそうだ、というのが現在の見解である<sup>4)</sup>。

このように両タイプとも病因はあきらかにされていないが、BA 患者の胆道では、組織適合抗原 (human leukocyte antigen: HLA) の異常発現や CD4 陽性細胞の浸潤を認める報告もあり<sup>5,6)</sup>、何らかの免疫学的機序が重要な役割を果たしているようである。Jurado や Donaldson らは BA 患者の HLA type を調べ、特定の HLA type との相関は認めなかったとしている<sup>7,8)</sup>。最近、18 人のエジプト人の BA 患者を調べた研究で HLA-B8 と DR3 が対照群と比較して有意に多いと報告された<sup>9)</sup>。

このように、BA 患者と HLA type との相関性には明確な見解が得られていないが、各報告ごとの患者数が少ないことも理由の 1 つと思われる。今回われわれは、京大病院で生体肝移植を行った 392 例の合併奇形を認めない perinatal タイプと正常対照群との HLA type を比較検討した。

#### 対象と方法

京大病院で 1990 年 6 月から 2002 年 11 月までの生体肝移植を行った BA 患者 405 人を解析した。405 人の患者のうち 13 人は先天性合併症を認め (内臓逆位は 3 人、動脈管開存症 7 人、ファローの四徴は 2 人、心室中隔欠損 1 人)、残りの 392 人には先天的異常は認めなかった。さらに 828 人の健康人ボランティアを正常対照群とした。患者対照間に地域性の違いは認めない。ドナー解析時の両親の HLA 型を用いてハプロタイプ解析をおこなった。この研究はヘルシンキ宣言に則ったインフォームド・コンセントを施行し、京都大学医学部医の倫理委員会で承認された。

#### HLA 検査

HLA タイピングは 1990 年 6 月から 2000 年 3 月までの患者は抗原・抗体法で行い<sup>10)</sup>、2000 年 4 月から 2002 年 11 月までは Micro SSP HLA DNA typing trays (One Lambda, Conoga Park, CA) を使用して HLA タイピングを施行した。A ローカス 17 抗原、B ローカス 19 抗原、DR ローカス 16 抗原の HLA 解析をおこなった。

#### 統計解析

BA 患者と対照群において、検査したすべての HLA ローカスについて抗原頻度を解析した。患者と対照間の頻度の相違は  $\chi^2$  乗検定で判定した。補正  $P$  値は各ローカスにおける対立遺伝子数 (A ローカス  $n=9$ 、B ローカス  $n=22$ 、DR ローカス  $n=11$ ) をかけたものであり、Bonferroni の補正をおこなって probability values とした。 $\chi^2$  乗検定に Yates の補正をおこない補正前および補正後の  $P < 0.05$  を統計学的有意差とした。Two-locus analyses は Svejgaard と Ryder 法により行った<sup>11)</sup>。

#### 結 果

Perinatal タイプの BA 患者と対照群の HLA-A、-B-DR 抗原の頻度を Table 1 に示す。対照群の HLA 抗原の頻度は日本人頻度の以前の報告と差がなかった。HLA-DR2 は BA 患者群に多く認め有意差を示した (患者群 39.0% vs 対照群 30.4% odds ratio (OR) = 1.46,  $P_u = 0.003$ ,  $P_c = 0.029$ )。HLA-A2 は (患者群 39.3% vs 対照群 45.7% OR = 0.77,  $P_u = 0.036$ ,  $P_c = 0.32$ ) と HLA-B61 (患者群 19.6% vs 対照群 26.2% OR = 0.683,  $P_u = 0.015$ ,  $P_c = 0.27$ ) は BA 患者群に少ないが、補正後の  $P$  値では有意差を認めなかった。

HLA-A24-B52-DR2 は日本人におけるハプロタイプ頻度がもっとも高いものである。統計的有意差は BA と HLA-DR2 の間でのみ認められたが、これらの OR はそれぞれ比較的高値 (1.26, 1.28, 1.43) であった。そこで HLA-A24、B52 および -DR2 と BA との関連の有無を調べるため、two-locus 解析によって BA とこれらの対立遺伝子の OR を比較検討した (Table 2)。HLA-A24 と B52、A24 と DR2 および B52 と DR2 の間で高い相関

Table 1 Frequencies of HLA antigen ( A, B, DRB 1 ) in BA and controls

HLA	Patients n = 392 ( % )		Controls n=828 ( % )		OR	Pu Value	Pc Value
A							
A1	5	( 1.3 )	8	( 1.0 )			
A2	154	( 39.3 )	378	( 45.7 )	0.77	0.036	NS
A3	4	( 1.0 )	4	( 0.5 )			
A11	74	( 18.9 )	147	( 17.8 )			
A24	245	( 62.5 )	472	( 57.0 )	1.26	0.069	NS
A26	82	( 20.9 )	183	( 22.1 )			
A30	2	( 0.5 )	7	( 0.8 )			
A31	60	( 15.3 )	123	( 14.9 )			
A33	58	( 14.8 )	143	( 17.3 )			
B							
B7	50	( 12.8 )	84	( 10.1 )			
B13	14	( 3.6 )	27	( 3.3 )			
B35	58	( 14.8 )	146	( 17.6 )			
B37	5	( 1.3 )	7	( 0.8 )			
B38	0	0.0	7	( 0.8 )			
B39	28	( 7.1 )	58	( 7.0 )			
B44	57	( 14.5 )	130	( 15.7 )			
B46	34	( 8.7 )	83	( 10.0 )			
B48	21	( 5.4 )	43	( 5.2 )			
B51	65	( 16.6 )	134	( 16.2 )			
B52	91	( 23.2 )	158	( 19.1 )	1.28	0.094	NS
B54	63	( 16.1 )	125	( 15.1 )			
B55	13	( 3.3 )	47	( 5.7 )			
B56	6	( 1.5 )	19	( 2.3 )			
B58	4	( 1.0 )	14	( 1.7 )			
B59	16	( 4.1 )	39	( 4.7 )			
B60	50	( 12.8 )	77	( 9.3 )			
B61	77	( 19.6 )	217	( 26.2 )	0.68	0.012	NS
B62	64	( 16.3 )	117	( 14.1 )			
B67	11	( 2.8 )	14	( 1.7 )			
B71	10	( 2.6 )	27	( 3.3 )			
B75	6	( 1.5 )	17	( 2.1 )			
DRB1							
DR1	53	( 13.5 )	93	( 11.2 )			
DR2	153	( 39.0 )	252	( 30.4 )	1.46	0.0029	0.032
DR4	152	( 38.8 )	345	( 41.7 )			
DR7	3	( 0.8 )	9	( 1.1 )			
DR8	89	( 22.7 )	185	( 22.3 )			
DR9	94	( 24.0 )	235	( 28.4 )			
DR10	4	( 1.0 )	6	( 0.7 )			
DR11	17	( 4.3 )	49	( 5.9 )			
DR12	44	( 11.2 )	87	( 10.5 )			
DR13	59	( 15.1 )	123	( 14.9 )			
DR14	53	( 13.5 )	147	( 17.8 )			

Abbreviations : OR = odds ratio ; Pu = uncorrected P values ; Pc = corrected P values ; NS = not significant.

性が観察された。したがって、BA との相関は単独には DR2 のみに認められたが、DR2 は独立して BA に関係しているのではなく、A24 と B52 および DR2 のすべてとの高い相関性が示唆された。

最後にわれわれは、BA 患者の HLA-A24-B52-DR2 のハプロタイプ分析をおこなった。生体肝移植を行った患者 392 の患者の中でハプロタイプ解析は 235 人に実施可能であった。日本人のハプロタイプ HLA-A24-B52-DR2 の頻度は、Nakajima らの報告では 516 人中 38 人が陽性であったが<sup>12)</sup>、BA 患者では 235 人中 35 人に認め、有意に多いことがわかった (OR = 2.20,  $P = 0.00124$ )。これらの結果は、BA の感受性遺伝子の 1 つが HLA-A24-B52-DR2 ハプロタイプと高い連鎖不均衡にあることを示すものである。

上記のように、BA では 2 つのタイプが最近分類されているが、われわれは BA の 13 人の患者が先天的な肝臓外の奇形を伴っている embryonic タイプ患者として分類した。症例が少ないこともあり、BA のタイプ間での HLA 抗原頻度に有意差はみられなかった。

### 考 察

BA の病因については embryonic タイプおよび perinatal タイプともに未だ特定されておらず、遺伝的要因、ウイルス感染、免疫的要因などが病因の候補としてあげられている。今回の研究で、われわれは perinatal タイプの BA と HLA-A24-B52-DR2 の間の有意な相関性を認めた。本研究は BA と HLA との関連を最大の症例数 ( $n = 392$ ) で調べたものである。われわれは、HLA と BA との関連性として以下の 3 つの病因説を想定する。すなわち、①HLA 座に近い感受性遺伝子が、新生児の胆管のウイルス性あるいは非ウイルス性の免疫反応を規定する、②この遺伝子が新生児の胆管のウイルス感染の感受性を規定する、③胆管表面の HLA-DR2 はサイトカインや T 細胞に司られた免疫応答を通して直接 BA の病因に関係している、などである。しかし、患者の親は患者と同じ HLA ハプロタイプを有するものの BA を発症していない。このことから遺伝的要因と同時に環境的要因、すなわちウイルス感染や、それ以外の外界からの

刺激も関連すると推測される。第 6 染色体短腕にある主要組織複合体 (Major Histocompatibility Complex: MHC) の 4.5Mb の中には 200 以上の遺伝子が存在し、これらの多くの遺伝子は T 細胞分化の構成、成熟、発達など、さまざまな免疫の過程において重要である。このようにわれわれが想定する感受性遺伝子は、周産期の胆管においてさまざまな抗原に対する免疫反応を規制している可能性が考えられる。

レオウイルス・タイプ 3 のマウス感染モデルでは、ヒトの BA 病変によく似た線維化病変を引き起こす。BA 患者の胆管からは他の胆道疾患患者と比較して有意に多くレオウイルス・タイプ 3 の RNA が検出されたとの報告もある<sup>14)</sup>。このようにレオウイルス・タイプ 3 は BA の病因として重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。HLA 座近傍のある遺伝子の多型性によってウイルス感染の感受性の違いが引き起こされる例は多数ある<sup>15)</sup>。たとえば HLA class II 遺伝子 DRB1\*301 あるいは DRB1\*11 を有する白人では、self-limiting な HCV 感染との強い関連が示唆されている<sup>16)</sup>。またヒト免疫不全ウイルスタイプ 1 感染症においては、HLA-B\*35, Cw\*04 を有する個体では後天性免疫不全症候群に対して最も強い感受性を示すとされている<sup>17)</sup>。Schreiber らは BA 発症の病因はウイルス感染などの環境要因と、それに対する免疫応答との 2 ヒット仮説を唱えている<sup>18)</sup>。HLA 座近傍にある感受性遺伝子は、新生児期の胆管へのウイルス感染への感受性を規定している可能性が考えられる。

一方、BA の病因におけるホスト側の免疫的要因を検討した報告例も多い。BA 患者の門脈系においては、CD4 陽性 T 細胞の数の増加に加え、HLA-DR 抗原の発現の増加が見られると報告されている<sup>19)</sup>。BA 患者の肝細胞における HLA-DR の過剰発現、および浸潤したマクロファージの CD68 抗原の過剰発現が予後不良と相関したとも報告されている<sup>20)</sup>。ある特定の HLA 抗原が胆管上皮に効率的に発現し、免疫反応を引き起こすことによって胆管の閉塞を促進している可能性や、あるいは HLA 抗原の発現がサイトカインの分泌

Table 2 Frequencies of patients according to the HLA-A24, B52, and DR2 alleles, and two by two comparisons

A24		B52		DR2		Patients ( n = 392 )		Control ( n = 828 )	
+		+				83		144	
+		-				162		325	
-		+				8		14	
-		-				139		345	
	+			+		107		184	
	+			-		138		285	
	-			+		46		73	
	-			-		99		286	
		+		+		83		136	
		+		-		8		22	
		-		+		70		121	
		-		-		231		549	

  

Comparison		Individual association		Independent A association		Independent B association		Difference between A and B association	Combined association
Factor A	Factor B	[ 1 ]A	[ 2 ]B	[ 3 ]+ + vs - +	[ 4 ]+ - vs - -	[ 5 ]+ + vs + -	[ 6 ]- + vs - -	[ 7 ]+ - vs - +	[ 8 ]+ + vs - -
A24	B52	1.26	1.28	1.01	1.24	1.16	1.42	0.87	1.43
A24	DR2	1.26	1.43	0.92	1.40	1.20	1.82	0.76	1.68
B52	DR2	1.28	1.43	1.05	0.87	1.68	1.37	0.62	1.45

Entries in the lower panel are odds ratio ( OR ) values obtained by chi-square analysis. OR values in bold indicate the corresponding *P* values are significant ( *P* < 0.05 ) after correction.

を規定している可能性も考えられる。HLA-DR2 は TNF- $\alpha$  の分泌の低下や IFN- $\gamma$  放出の増加と関連するとも言われている<sup>21)</sup>。

日本の BA の発生率は人口 10 万人あたり 10.4 とされている<sup>22)</sup>。Chardot らによればこの発生率は、ポリネシア人の 10 万人あたり 32<sup>23)</sup>、およびハワイ人 10 万人あたり 10.6<sup>24)</sup>に続いて世界で 3 番めに高い<sup>25)</sup>。BA のすべての患者が登録されるとは限らないことから、以前に報告された 13,000 中に 1 よりも実際の発生率は高いのであろうと推定される<sup>26)</sup>。今回の研究で BA との相関が見られた HLA-A24-B52-DR2 は日本人で最も頻繁なハプロタイプである<sup>27)</sup>。日本では BA の包括的な発生率調査が行われていないが、われわれの研究結果は日本人における BA の高い発生率報告と一致すると考えられる。

今回のわれわれの研究では、HLA-DR2 単独としてだけでなくハプロタイプ HLA-A24-B52-DR2 が *perinatal* タイプの BA 患者に有意に多く見られた。HLA 近傍にある遺伝子が BA の病因に重要な役割をしているか、あるいは胆管上皮に発現する HLA-DR2 抗原が直接 BA の病因に関連していることが推測された。

本論文内容は、Elsevier 社および American Society for Histocompatibility and Immunogenetics の許可のもと *Human Immunology* 第 66 巻 第 3 号 295 頁 300 頁、2005 年に最初に掲載された論文に基づき作成したものである (Yuasa T, Tsuji H, Kimura S, Niwa N, Yurugi K, Egawa H, Tanaka K, Maruya E, Saji HO, Asano H, Maekawa T: Human leukocyte antigens in Japanese patients with biliary atresia: retrospective analysis of patients who underwent living donor liver transplantation. *Hum Immunol.* 66 (3): 295-300, 2005)

第 52 回日本輸血学会総会推薦論文

## 文 献

- 1) Sokol RJ, Mack C, Narkewicz MR, et al: Pathogenesis and outcome of biliary atresia: current concepts. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 37: 4-21, 2003.
- 2) Inomata Y, Oike F, Okamoto S, et al: Impact of the development of a liver transplant program on the treatment of biliary atresia in an institution in Japan. *J Pediatr Surg*, 32: 1201-1205, 1997.
- 3) Mazziotti MV, Willis LK, Heuckeroth RO, et al: Anomalous development of the hepatobiliary system in the Inv mouse. *Hepatology*, 30: 372-378, 1999.
- 4) Schon P, Tsuchiya K, Lenoir D, et al: Identification, genomic organization, chromosomal mapping and mutation analysis of the human INV gene, the ortholog of a murine gene implicated in left-right axis development and biliary atresia. *Hum Genet*, 110: 157-165, 2002.
- 5) Dillon P, Belchis D, Tracy T, et al: Increased expression of intracellular adhesion molecules in biliary atresia. *J Pathol*, 145: 263-267, 1994.
- 6) Broome U, Nemeth A, Hultcrantz R, et al: Different expression of HLA-DR and ICAM-1 in livers from patients with biliary atresia and Byler's disease. *J Hepatol*, 26: 857-862, 1997.
- 7) Jurado A, Jara P, Camarena C, et al: Is extrahepatic biliary atresia an HLA-associated disease? *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 25: 557-558, 1997.
- 8) Donaldson PT, Clare M, Constantini PK, et al: HLA and cytokine gene polymorphisms in biliary atresia. *Liver*, 22: 213-219, 2002.
- 9) A-Kader HH, El-Ayyouti M, Hawas S, et al: HLA in Egyptian children with biliary atresia. *J Pediatr*, 141: 432-433, 2002.
- 10) Ito K, Yoshida H, Yanagibashi K, et al: Change of HLA phenotype in postoperative erythroderma. *Lancet*, 322: 413-414, 1988.
- 11) Svejgaard A, Ryder LP: HLA and disease associations: detecting the strongest association. *Tissue Antigens*, 43: 18-27, 1994.
- 12) 中島文明, 中村淳子, 横田敏和: 日本人の 4 桁レベルの HLA ハプロタイプ分布. *MHC (日本組織適合学会誌)*, 8: 1-32, 2001.
- 13) Garcia-Lora A, Algarra I, Garrido F: MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J Cell Physiol*, 195: 346-355, 2003.
- 14) Tyler KL, Sokol RJ, Oberhaus SM, et al: Detection of reovirus RNA in hepatobiliary tissues from patients with extrahepatic biliary atresia and choledochal cysts. *Hepatology*, 27: 1475-1482, 1998.
- 15) Cooke GS, Hill AV: Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nat Rev Genet*, 2: 967-977, 2001.
- 16) Thursz M, Yallop R, Goldin R, et al: Influence of MHC class II genotype on outcome of infection with hepatitis C virus. The HENCORE group. *Hepatitis C European Network for Cooperative*

- Research. *Lancet*, 354 : 2119-2124, 1999.
- 17) Carrington M, Nelson GW, Martin MP, et al : HLA and HIV-1 : heterozygote advantage and B\*35-Cw\*04 disadvantage. *Science*, 283 : 1748-1752, 1999.
- 18) Schreiber RA, Kleinman RE : Genetics, immunology and biliary atresia : an opening or a diversion? *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 16 : 111-113, 1993.
- 19) Kobayashi H, Puri P, O'Brien DS, et al : Hepatic overexpression of MHC class II antigens and macrophage associated antigens ( CD68 ) in patients with biliary atresia of poor prognosis. *J Pediatr Surg*, 32 : 590-593, 1997.
- 20) Schreiber RA, Kleinman RE, Barksdale EM Jr, et al : Rejection of murine congenic bile ducts : a model for immune-mediated bile duct disease. *Gastroenterology*, 102 : 924-930, 1992.
- 21) Stickler M, Valdes AM, Gebel W, et al : The HLA-DR2 haplotype is associated with an increased proliferative response to the immunodominant CD4 ( + ) T-cell epitope in human interferon-beta. *Genes Immun*, 5 : 1-7, 2004.
- 22) Nio M, Ohi R, Miyano T, et al : Japanese Biliary Atresia Registry : Five- and 10-year survival rates after surgery for biliary atresia : a report from the Japanese Biliary Atresia Registry. *J Pediatr Surg*, 38 : 997-1000, 2003.
- 23) Karrer FM, Lilly JR, Stewart BA, et al : Biliary atresia registry, 1976 to 1989. *J Pediatr Surg*, 25 : 1076-1080, 1990.
- 24) McKiernan PJ, Baker AJ, Kelly DA : The frequency and outcome of biliary atresia in the UK and Ireland. *Lancet*, 355 : 25-29, 2000.
- 25) Chardot C, Carton M, Spire-Bendelac N, et al : Epidemiology of biliary atresia in France : A national study 1986-96. *J Hepatol*, 31 : 1006-1013, 1999.
- 26) Ibrahim M, Miyano T, Ohi R, et al : Japanese Biliary Atresia Registry, 1989 to 1994. *Tohoku J Exp Med*, 181 : 85-95, 1997.
- 27) Haplotype frequencies( [http://square.umin.ac.jp/JSHI/hla\\_data/freq/hpl\\_abdr.txt](http://square.umin.ac.jp/JSHI/hla_data/freq/hpl_abdr.txt) ) 日本組織適合性学会ホームページ <http://square.umin.ac.jp/JSHI/frame.html> )
-