

二方法（PCR-Luminex 法と PCR-SBT 法）間でのタイピング結果の不一致を契機に発見された HLA-B ローカスの新アリル

菊地 正美 小野 智 菅原亜紀子 安田 広康 Kenneth E. Nollet
大戸 齊

PCR-Luminex 法と PCR-SBT 法(sequence based typing)で HLA-B の結果が不一致となった症例を経験し、そのアリルの遺伝子配列から HLA-B の新規アリル (HLA-B*4002new) であることがわかった。

当初、患者の HLA-B アリルの 1 つは PCR-Luminex 法で HLA-B*4006 と判定したが、PCR-SBT 法を用いた骨髓バンクからの報告は HLA-B*4002 関連アリルの塩基が置換したアリルであることが示唆された。そこで、患者 HLA-B の塩基配列を調べ、HLA-B*400201 と比較した結果、exon 3 領域にある塩基 369 が C→T に置換していることが判明した。また、母親由来の HLA-B*4002new は患者の妹にも遺伝されていることが、家系調査の結果から明らかとなった。

本研究によって明らかになった HLA-B*4002 関連アリルは、変異部位を含む 99 番目コドンが TAT であったため、アミノ酸は HLA-B*400201 の TAC と同様にチロシンに翻訳され(同義置換)、HLA-B*400201 と同一の HLA-A*2601-B*4002new-DRB1*0901 とハプロタイプを形成していた。また、日本人においては、HLA-B*4002 関連アリルのうち、HLA-B*400201 がほとんどを占めていることから、今回見出されたアリルは HLA-B*400201 から点突然変異によって形成されたものと推測される。抗原分子としては、HLA-B*4002 アリルによってコードされる HLA-B61 抗原と血清学的に同等な特異性を示すと考えられる。

キーワード：HLA-B, 新アリル, 同義置換, 家系調査

HLA 遺伝子タイピングは、造血幹細胞や臓器の同種移植分野でドナーとレシピエントの組織適合性を判断する上で最も重要な検査の一つである¹⁾。遺伝子タイピング方法は様々あるが、現在 PCR-rSSO 法 (reverse sequence specific oligonucleotide) が最も普及している。PCR-rSSO 法による PCR-Luminex 法は、ゲノム DNA からの PCR 増幅産物を種々の蛍光ビーズに固相化したオリゴヌクレオチドプローブにハイブリダイズさせ、蛍光ビーズをフローサイトメトリーで検出し、HLA アリルを判定する方法である²⁾。また、患者が骨髓移植推進財団 (骨髓バンク) ヘレシピエントを登録する際には、アリルの塩基配列からタイピングする PCR-SBT 法 (sequence based typing) が行なわれている。

今回、当大学の PCR-Luminex 法と骨髓バンクの PCR-SBT 法による HLA-B のタイピング結果が不一致となった症例について DNA 塩基配列を解析したところ、患者は HLA-B ローカスに新アリルを保有していることがわかった。

対象及び方法

患者は血液疾患の 20 歳代女性。非血縁者間骨髓移植を希望し、当大学で HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 アリルを PCR-Luminex 法で検査した。

患者の HLA-B は PCR-Luminex 法では HLA-B*5901, HLA-B*4006 と判定されたが、骨髓バンクからの報告で HLA-B*5901 と HLA-B*4002 関連アリルの変異型が示唆されたため、患者 HLA-B の塩基配列を当大学で PCR-SBT 法により解析した。さらに、父親、母親、妹についても HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 アリルを検討した。

ゲノム DNA は患者と家族から同意を得て、それぞれの末梢血から抽出した。なお、本研究は当院の倫理委員会の承認と遺伝子組み換えに関する安全委員会の承諾を得て実施した。

1. 末梢血からのゲノム DNA の抽出

末梢血からのゲノム DNA 抽出は、自家製のタンパク質変性試薬 (4 M チオシアン酸グアニジン：和光純薬、0.5% N-ラウロイルサルコシナトリウム：ナカライテスク) を用いてタンパク質を変性させ、ゲノム DNA

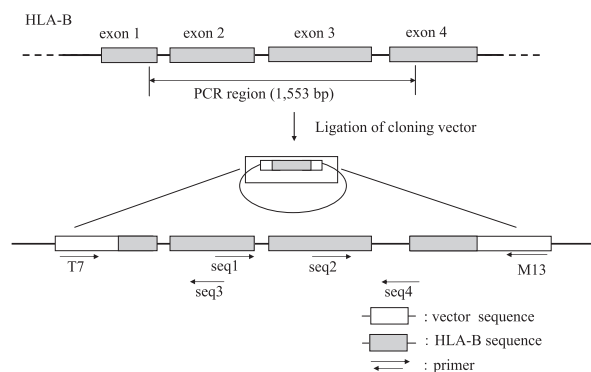


Fig. 1 PCR region and location of sequencing primers

をエタノール（和光純薬）で沈殿させる方法で行なった。

2. PCR-Luminex 法による HLA 遺伝子タイピング

HLA 遺伝子タイピングには、DNA プローブを HLA-A が 46, HLA-B が 63, HLA-DRB1 が 49 種類それぞれ含むジェノサーチ (MBL 社) をタイピングキットに用いた。操作手順は添付文書に従い、10~50ng/μl の濃度に調製したゲノム DNA を、ビオチン化プライマーを含むマスターミックスと Taq DNA polymerase (共にジェノサーチキット添付試薬: MBL 社) の混合液へ添加し、サーマルサイクラー (96-Well GeneAmp® PCR system 9700: Applied Biosystems 社) を用いて PCR [93°C 30 秒→65°C 30 秒→72°C 30 秒] × 40 サイクルを行なった。

ビオチン化された PCR 増幅産物は、ハイブリダイゼーション反応液中で蛍光ビーズ上に付加された種々のオリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズ (95°C 5 分→52°C 60 分) した。次に、その PCR 増幅産物をストレプトアビジン-フィコエリスリン (SA-PE) で特異的に標識し、Luminex 100 (日立ソフト) を用いて PE および各種ビーズの蛍光を測定した。自動解析ソフト DNASIS® Call (日立ソフト) を用いて測定結果から HLA アリルを判定した³⁾。

3. DNA クローニング

HLA-B 遺伝子の exon 2 と exon 3 を含む exon 1 と exon 4 に primer を設計した (Fig. 1)。HLA クラス I 遺伝子の exon 2 と exon 3 には多型性を示す領域があり⁴⁾、PCR-Luminex 法でもこの領域を検査対象としている。PCR には TaKaRa LA Taq® with GC Buffer (タカラバイオ社) を用い、添付文書に従い反応液 (TaKaRa LA Taq™ 0.2μl, 2×GC Buffer 25μl, 25mM dNTPs 0.4μl, 10ng/μl template DNA 1μl, 100μM primer F 0.3μl, 100μM primer R 0.3μl, H₂O up to 50μl) を作製し、PCR [95°C 5 分→(95°C 30 秒→64°C 30 秒→72°C 60 秒) × 35 サイクル] を行った。

PCR 増幅産物は QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN 社) で精製後、クローニングキット (pGEM®-

T Easy Vector Systems: Promega 社) を用いて添付文書に従い、PCR 増幅産物を TA クローニング用ベクター (pGEM®-T Easy Vector) に挿入し、42°C 1 分間のヒートショックを加えて大腸菌 (DH5α Competent Cells: Promega 社) に導入してクローニングを行った。

4. PCR-SBT 法による HLA-B 遺伝子タイピング

得られたクローン DNA (plasmid DNA) は plasmid 自動抽出機 (PI-24: クラボウ) で精製し、6 種類のシーケンス用 primer を用いて塩基配列を解析した (Table 1)。シーケンシングキットには BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 社) を用い、添付文書に従いシーケンス反応を実施した。また、クローン DNA の塩基配列の解析には ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) を使用した。

HLA-B の塩基配列はアリルデータベース (<http://www.ebi.ac.uk/imagth.hla> 2009 年 7 月現在) を利用して検索した。また、日本人の遺伝子頻度やハプロタイプ頻度の検索には中央骨髄データセンター (<http://www.bmdc.jrc.or.jp/index.html> 2009 年 7 月現在) の統計資料を参考にした。

結 果

患者の HLA-B アリルは、PCR-Luminex 法では HLA-B*5901, HLA-B*4006 と判定された。しかし、骨髄バンクからの報告 (PCR-SBT 法) では HLA-B*5901 と HLA-B*4002 関連アリルの変異型が示唆された。

PCR-SBT 法による我々の検討では、HLA-B*4002 関連変異型アリルの塩基配列は HLA-B*400201 と比較し、exon 3 領域にある塩基 369 がシトシン (C) からチミン (T) に置換していたため、99 番目のコドンが TAC から TAT に変化していることが明らかとなった (Fig. 2)。なお、この点変異以外の塩基配列は HLA-B*400201 と完全に一致していた。

アリルデータベース (<http://www.ebi.ac.uk/imagth.hla>) による調査で、今回発見された HLA-B 遺伝子の塩基配列と完全に一致するアリルはなく、HLA-B*4002 関連アリルの新規アリルであることが判明したため、HLA-B*4002new と仮称した。我々は HLA-B*4002new の塩基配列を DDBJ (DNA Data Bank of Japan) に登録した (アクセッション番号 AB513426)。

家系調査の結果より、母親の HLA-B アリルには患者の塩基配列と全く同じ HLA-B*4002new が確認され、妹にも遺伝していた (Fig. 3)。本アリルはメンデルの分離の法則に従って遺伝することが明らかとなった。

考 察

今回の研究によって明らかとなった新規アリルは、

Table 1 Primers for PCR and sequencing

Primer	Location	Sequence
F	exon 1 (57-74)	5'-GACCGAGACCTGGGCTGG-3'
R	exon 4 (1588-1609)	5'-TGGTCAGAGATGGGGTGGTGGG-3'
seq1	exon 2 (450-468)	5'-ACTACAACCAGAGCGAGG-3'
seq2	exon 3 (851-868)	5'-GCGGACACGGCGGCTCAG-3'
seq3	exon 2 (808-825)	5'-TTCAGGGCGATGTAATCC-3'
seq4	intron 3 (1174-1191)	5'-CCGCAGGCTCTCTCGGTC-3'
T7	Vector	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
M13	Vector	5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'

	Codon No.	95	100
	Positions	350	360
	Sequence	CAC ACC CTC CAG AGC ATG TAC GGC	
B*400201	Amino acid	His Thr Leu Gln Ser Met Tyr Gly	
	Sequence	- - - - -	- - T - -
B*4002new	Amino acid	- - - - -	Tyr -
	Sequence	- - - - T TGG - - - C - - -	- - T - -
B*4006	Amino acid	- Thr Leu - - -	Tyr -

Fig. 2 Comparison of exon 3 nucleotide sequences for HLA-B*400201, -B*4002new and -B*4006. Dashes indicate identity with HLA-B*400201. The C to T change is indicated in bold, and expresses the same amino acid, tyrosine.

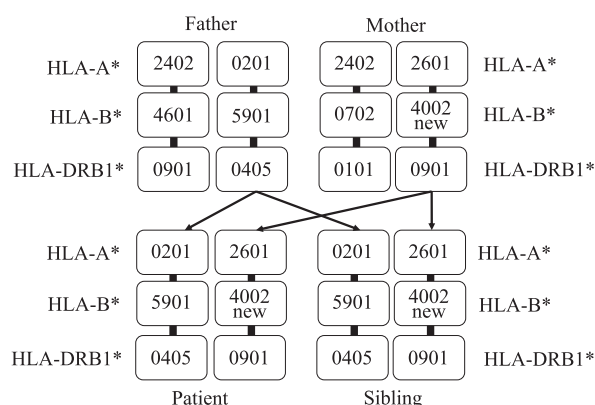


Fig. 3 Inheritance of a haplotype carrying a new allele of HLA-B*4002, of maternal origin.

HLA-B*4002 の塩基 369 の C が T に塩基置換したアリルであった。偶然にも、一方のアリルに HLA-B*5901 を保有していたため、PCR-Luminex 法では HLA-B*4006 とタイプされたと考えた。HLA-B*4002 と HLA-B*4006 の鑑別には、一般的に、351~372 番目の塩基配列が用いられる。その際ハイブリダイゼーションは PCR 増幅産物とオリゴヌクレオチドプローブの配列が完全に一致したときのみ起こるが、一致しない場合は起こらない。PCR-Luminex 法では HLA-B*4002 と HLA-B*4006 の鑑別のため Probe B29 と Probe B33 のプローブを用いていた (Fig. 4)。HLA-B*4002 の塩基配列は Probe

B29 と 5 塩基相違があるのでハイブリダイズせず、Probe B33 と完全に一致するのでハイブリダイズする [Probe B29 (-), Probe B33 (+)]。逆に HLA-B*4006 は Probe B29 と一致し、Probe B33 とは 1 塩基異なる [Probe B29 (+), Probe B33 (-)]。今回の発見された HLA-B*4002new は Probe B33 の塩基 15 が C から T に点変異したことで、PCR 増幅産物と Probe B33 とのハイブリダイゼーションが起こらなかったと考える [Probe B29 (-), Probe B33 (-)]⁹⁾。しかし、患者は一方に HLA-B*5901 を持つため、Probe B29 とハイブリダイズし、反応パターンが [Probe B29 (+), Probe B33 (-)] となったことから、PCR-Luminex 法では HLA-B の判定が HLA-B*4006 と判定され、結果が不一致となったと考える。

本症例で明らかとなった HLA-B*4002new は、HLA-B*4002 の塩基 369 の C が T に同義置換したことにより形成されたものである。

現在、HLA-B*4002 に関する同義置換を示すアリルは HLA-B*400201, HLA-B*400202, HLA-B*400203, HLA-B*400204, HLA-B*400205 が報告されている (<http://www.ebi.ac.uk/imagth.hla> 2009 年 7 月現在)。HLA-B*400202 と HLA-B*400201 の塩基配列を比較すると、HLA-B*400202 は塩基 159 に C と T の違いがある。また、HLA-B*400203, HLA-B*400204, HLA-B*400205 も同様に HLA-B*400201 と比較すると、HLA-B*400203 は塩基 273 が C と G (グアニン)、HLA-B*400204 は塩基 165 が G と C、また HLA-B*400205 は塩基 195 が G と A (アデニン) という違いが知られている。しかし、これらのアリルの塩基置換はいずれもアミノ酸変異を伴わない同義置換によって形成されたもので、翻訳されるタンパク質分子の構造は同一なものと考えられている。本症例で発見された新規アリルもこれらと同様の同義置換によって形成されたものでアミノ酸の変化を伴わないことから、翻訳によって合成されるタンパク質分子の構造は上記のアリルと同一なものであることが推測される。このため、血清学的にも HLA-B61 特異性を示すものと考えられる。

Positions	350	360	370	Hybridization
B*400201	CAC ACC CTC CAG AGC ATG TAC GGC			
probe B29	- - - - T TGG - - - - C - - - -			(-)
probe B33	- - - - - - - - - - - - - - -			(+)
B*4002new	CAC ACC CTC CAG AGC ATG TAT GGC			
probe B29	- - - - T TGG - - - - C - - - -			(-)
probe B33	- - - - - - - - - - - C - - - -			(-)
B*4006	CAC ACT TGG CAG ACC ATG TAT GGC			
probe B29	- - - - - - - - - - - - - - -			(+)
probe B33	- - - - - - - - - - - C - - - -			(-)
B*5901	CAC ACT TGG CAG ACC ATG TAT GGC			
probe B29	- - - - - - - - - - - - - - -			(+)
probe B33	- - - - - - - - - - - C - - - -			(-)

Fig. 4 Comparison of HLA-B nucleotide sequences (HLA-B*400201, -B*4002new, -B*4006, -B*5901) and oligo nucleotide probes, distinguished from HLA-B*4002 and HLA-B*4006 by PCR-Luminex method.

Dashes indicate identity with the HLA-B sequence mentioned above. The patient carrying alleles of HLA-B*4002new and HLA-B*5901 had a hybridization reaction pattern indistinguishable from HLA-B*4006 and HLA-B*5901. [Probe B29 (+), Probe B33 (-)].

HLA-B*4002new アリルは患者以外にも母親と妹に確認されており, HLA-A*2601-B*4002new-DRB1*0901 のハプロタイプを有していた. HLA-B*4002 に分類される同義置換アリルのうち, 日本人においては HLA-B*400201 がほとんどを占め, その他のアリルはほとんど存在しないことが報告されている. また, そのハプロタイプは HLA-A*2601-B*400201-DRB1*0901 であることが多く, 時に HLA-A*240201 や HLA-DRB1*080201 になることがある (<http://www.bmdc.jrc.or.jp/index.html> 2009 年 7 月現在). 今回見出されたアリルは日本人の HLA-B*4002 の頻度やハプロタイプ頻度から, HLA-B

*400201 から点突然変異によって形成されたものと推測される.

結 語

PCR-Luminex 法と PCR-SBT 法による検査結果の不一致を契機に, 患者 DNA の HLA-B 領域をクローニングし, PCR-SBT 法にて塩基配列を解析して, HLA-B*400201 の塩基 396 が C→T となった新 HLA-B アリル, HLA-B*4002new を発見した. HLA-B*4002new と同じ塩基配列のアリルが母親と妹にも認められ, 本アリルが HLA-A*2601-B*4002new-DRB1*0901 のハプロタイプを形成して遺伝することが示唆された.

文 献

- 1) 秋田真也, 皆森久美子: HLA 型と抗白血球抗体検査. Medical Technology 臨時増刊号輸血検査のすべて, 31: 1592—1534, 2003.
- 2) 齋藤勝治, 小野 智, 菅原亜紀子, 他: PCR-Luminex 法による HLA 遺伝子タイピングの有用性. 医学検査, 55: 655—659, 2006.
- 3) Itoh Y, Mizuki N, Shimada T, et al: High-throughput DNA typing of HLA-A, -B, -C and -DRB1 loci by a PCR-SSOP-Luminex method in the Japanese population. Immunogenetics, 57: 717—729, 2005.
- 4) 荒木信夫, 河村久美子, 秋田真哉: 概論: HLA 抗原検査—抗原の種類, 検体の採取条件, 検査の適応とその臨床的意義—. 日本臨床, 63 増刊号: 731—737, 2005.
- 5) 柏瀬貢一: DNA マイクロアレイによる HLA のタイピング法の開発. 臨床検査, 49: 530—538, 2005.

DISCOVERY OF A NEW HLA-B LOCUS ALLELE, SUGGESTED BY DISCORDANCE OF GENOTYPE RESULTS FROM PCR-LUMINEX AND PCR-SBT

Masami Kikuchi, Satoshi Ono, Akiko Sugawara, Hiroyasu Yasuda, Kenneth E. Nollet and Hitoshi Ohto

Division of Blood Transfusion and Transplantation Immunology, Fukushima Medical University Hospital

Abstract:

HLA genotyping is conducted using various methods. Our hospital uses PCR-Luminex (Luminex Corporation, Austin, Texas), based on reverse sequence-specific oligonucleotide (PCR-rSSO) technology. In contrast, the Japan Marrow Donor Program uses even more sensitive PCR-SBT (sequence-based typing) technology for patient registration.

Here, we describe a patient with discordant PCR-Luminex and PCR-SBT typing results. As this discrepancy was thought to arise from a mutation of HLA-B*4002, DNA sequencing of the HLA-B gene was performed. A family study was also conducted to investigate heritability. DNA sequencing results for the patient confirmed a TAC to TAT mutation in the base sequence of codon 99 in exon 3, distinguishing the new allele from HLA-B*400201. The family study confirmed that the patient's mother and younger sister also shared the new allele, suggesting heritability.

TAT, in the allele we designate as HLA-B*4002new, and TAC, in HLA-B*400201, represent synonymous substitutions in codon 99; as both are translated as tyrosine, they are serologically indistinguishable variations of HLA-B61.

Keywords:

HLA-B, new allele, synonymous substitution, family study