

TRALI 関連症例から見いだされた抗 Nak^a 陽性献血者の CD36 遺伝子解析

安藤 萌 中島 文明 鎌田 裕美 中村 淳子 清水まり恵
永井 正 佐竹 正博 田所 憲治

抗 Nak^a は CD36 欠損により産生される抗体であり、重篤な輸血副作用に関与する。CD36 欠損の遺伝的要因として、日本人では exon 4 の 268C>T が最も高頻度である。過去の TRALI 関連輸血副作用調査では 2,497 例の原因製剤中から 3 例の高力価抗 Nak^a 保有者を見いだしたが、欠損要因は不明であった。本検討では CD36 欠損の遺伝的要因と抗体産生に何らかの関連性が見いだせるか、抗 Nak^a 陽性献血者と無作為抽出した献血者を対象に CD36 欠損となる要因の調査を行った。

今回調べた抗 Nak^a 陽性献血者は 268C>T ではなく 329_330delAC または 949insA が欠損要因であった。無作為抽出の献血者からは 108 例の CD36 欠損者が見つかり、欠損要因として 268C>T が最も高頻度であったが、抗体は検出されなかった。TRALI 関連抗 Nak^a 陽性献血者に健常男性が含まれることから、抗 Nak^a 産生の要因は輸血や妊娠だけではないと考えられ、現状では血液製剤原料から抗体陽性血液を排除する輸血副作用対策は困難である。欠損要因から抗 Nak^a 保有者を特定するには 268C>T 以外の変異にも着目する必要がある。

キーワード：抗 Nak^a, TRALI, CD36 欠損

はじめに

CD36(GPIV, GPIIb)は、血小板、単球、脂肪細胞、一部の上皮細胞等に発現する膜糖タンパク質である。抗 Nak^a は CD36 に対する抗体であり、HLA 適合血小板輸血不応例の解析から検出され¹⁾、後に CD36 欠損により産生されるイソ抗体であることが明らかとなった。CD36 欠損は、アジア人種およびアフリカ人種に特徴的な事象であり、血小板と単球ともに発現のないタイプ I 欠損(日本人の頻度 0.56~1.0%)と、血小板のみに発現を認めないタイプ II 欠損(同 3~10%)に分類される^{2)~4)}。CD36 欠損の遺伝的要因として、コード領域の SNP や exon skipping など複数の変異の関与が報告されている。日本人では exon 4 に存在する 268 番目の C が T に置換される変異(268C>T)が最も高頻度である⁴⁾⁵⁾。

日本赤十字社では、副作用報告を受けた血液製剤を対象として輸血関連急性肺障害(transfusion-related acute lung injury; TRALI)をはじめとした副作用について HLA 抗体、HPA 抗体および HNA 抗体の関与を調べており、TRALI に関連した 2,497 例の原因製剤中から 3 例の高力価抗 Nak^a 保有者(フローサイトメトリーでそれぞれ 8,192 倍、4,096 倍、2,048 倍)を見いだした⁶⁾。発端となった 20 代女性献血者は HLA 抗体および HNA 抗体を保有せず、その血液を輸血された 2 症例で TRALI

を発症した⁷⁾。他の 2 例はいずれも 40 代男性であり、過去に複数回の献血をしている。遡及調査で 1 例は TRALI を 1 回発症し、別の 1 例は TRALI 確定診断に至らないが極めてそれに近い症状を呈した。268C>T を検出する市販試薬を用いたタイピングでは、これらの 3 例から 268C>T は検出されなかった。また、神奈川県赤十字センターでは 1988 年から 15 年にわたって主婦と 25 歳以上の女性献血者を対象とした約 79 万例の抗体スクリーニングが行われた⁸⁾。これによると、延べ 65 例の抗 Nak^a 保有者が見いだされ、その頻度は 1/12,168 (0.0082%)と、同調査にて検出された HLA 抗体保有例の頻度(2.83%)と比較して極めて低かった。また、副作用記録のない 6 例の経産婦由来血清の抗体価をフローサイトメトリーで調べたところ、1 例(2,048 倍)を除いて 32 倍から 512 倍と、TRALI 関連献血者と比較して高くはなかった⁹⁾。

以上のように、抗 Nak^a は重篤な輸血副作用に関与するが、その検出頻度は非常に低い。そのため、これまでに CD36 欠損の遺伝的要因として 268C>T をはじめとする種々の変異が見つかっているが、それらの変異と抗体産生のリスクとの関連性についてはほとんど報告がない。本研究では、抗 Nak^a 陽性献血者と無作為に抽出した関東甲信越地区の献血者を対象として CD36

Table 1 Primers used for polymerase chain reaction

	Exon	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	
(a)	3	GAGGAAGCCACTTTGGTGAA	AAGACAGCAATGGAGTCATGTT	
	4	GGTCCTTTTATTCTGGCTGACTCAAGGCTGC	TAAGTACATTTCAATACAATGAC	
	5	TGCTAGAGACCCCTGGCTGAT	AAATGACCATGGCTCCATTC	
	6	AAGCTCAATATTAGCATTTAATCC	GTCTCCAGATCAGCAATAAG	
	7	TCAAGTCATTTGAGTAACCAG	CAGCAGCTATGCACCTGGTGT	
	8	AATGGCATCAGGTACATTGC	CCCATCACATTGAACAGACCT	
	9	CCTGGCCGGTTATTTCTTTT	GGAAGATGCAGAAGAACATTTTG	
	10	GTTCATGCTTGGCTATTGAGTT	GCCACCATTCTTTCTTCTGC	
	11	GACATATTACTGCCTGAAAGC	GGAAGAAATCGACCTAAGTTTCAG	
	12	GACATTCGATTGGGCAAATA	AAATTCCTCGGGAACTGAAA	
	13	CCCCGAGAATTTATTGAAAGG	CCTTGTCAGGCAATAGAAGACA	
	14	TGGAGCAAATGAAACTGTTG	AATTGAGAAATGAACCAGTC	
	(b)	3-4	AATAAAACATCTGTTACCATAC	TAAGTACATTTCAATACAATGAC
		4-7	TTGGGTTAAAACAGGCACAGA	TCCATCTGCAGTATTGTTGTACTGA
5-10		CAAGGAAAATGTAACCCAGGA	TGGGTTTCAACTGGAGAGG	
8-14		TTGGGAAAGTCACTGCGACA	AATTGAGAAATGAACCAGTC	

欠損の遺伝的要因について解析し、抗 Nak^a 産生との関連性について検討した。

対象と方法

本研究は、日本赤十字社血液事業研究倫理審査委員会の承認を得て実施した。

1. 抗 Nak^a 陽性献血者

TRALI 関連輸血副作用調査で見つかった高力価抗 Nak^a 陽性献血者 3 例と、献血時期が 1990 年前後であるため副作用記録が残っていない抗 Nak^a 陽性献血者 3 例を対象とした。

血漿から抽出したゲノム DNA を用い、CD36 遺伝子のコード領域である exon 3~14 の各 exon を増幅した。シーケンス反応には BigDye[®] Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) を使用した。PCR 増幅およびシーケンス反応に使用したプライマーを Table 1 (a) に示す。ABI 3130xl (Applied Biosystems) にて配列を決定し、取得した配列を NCBI Reference Sequences (RefSeq) の CD36 配列 (ID number NM_000072.3) と比較した。

2. 無作為に抽出した献血者

関東甲信越ブロック血液センターより供与された血液型検査残余検体のうち任意の 1,649 検体から血小板および単球を分離し、FITC 標識抗ヒト CD36 モノクローナル抗体 (FA6.152; Beckman Coulter 社) を用いて染色した。陰性コントロールとして FITC 標識マウス IgG1 (679.1Mc7; Beckman Coulter 社) を使用し、フローサイトメーター (Cytomics FC 500; Beckman Coulter 社) で平均蛍光強度を測定した。

CD36 陰性と判定した検体について、血漿のトロンビン処理を行い血清化した。anti-PLT・MPHA・スクリーンおよび anti-PLT・MPHA・パネル (Beckman Coul-

ter 社) を用いた MPHA 法により血清中の抗 Nak^a の有無を調べた。

遺伝子解析には単核球層から抽出したゲノム DNA を用いた。CD36 遺伝子の exon 3 内の開始コドンから exon 14 内の終止コドンまでを含む領域を 8~10kb 程度の 4 つの断片に分割し、Table 1 (b) に示したプライマーを用いてそれぞれを増幅した。シーケンス反応以降は抗 Nak^a 陽性献血者と同様の手順で遺伝子解析を行った。

3. CD36 遺伝子変異の番号付けについて

CD36 遺伝子変異の番号付けは文献によって異なるが、本稿では CD36 遺伝子の開始コドンの A を 1 番目として表記する。日本人において最も高頻度に検出された変異を報告した既報⁴⁾⁵⁾ の 478C>T は本稿の 268C>T に相当する。

結 果

1. 抗 Nak^a 陽性献血者の遺伝子解析

TRALI 関連抗 Nak^a 陽性献血者 3 例は、いずれも exon 5 の 329_330delAC ホモ接合体であった。副作用報告のない抗 Nak^a 陽性献血者は、2 例が 329_330delAC ホモ、1 例が exon 10 の 949insA ホモであった (Table 2)。いずれもフレームシフトにより premature termination codon が出現する。

2. 無作為に抽出した献血者の遺伝子解析および抗体の検出

関東甲信越地区の献血者 1,649 件から、タイプ I 9 例 (0.55%)、タイプ II 99 例 (6.0%) が見つかった。これらの CD36 欠損者から検出された変異を Table 3 に示した。抗 Nak^a 陽性献血者から検出された 329_330delAC と 949insA に加え、223insG (exon 4)、268C>T (exon 4)、275C>T (exon 4)、760T>C (exon 9)、1204_1246dup43 (exon 13)、1228_1239del12 (exon 13) の計 8

Table 2 Mutations found in coding regions of the CD36 gene in anti-Nak^a antibody-positive donors

Donor	Adverse reactions	Titer (FCM)	Mutations
1	TRALI (2)	× 8,192	329_330delAC/329_330delAC
2	TRALI (1)	× 4,096	329_330delAC/329_330delAC
3	Not TRALI	× 2,048	329_330delAC/329_330delAC
4	–	× 512	329_330delAC/329_330delAC
5	–	× 64	949insA/949insA
6	–	× 32	329_330delAC/329_330delAC

Donor 1, 2, and 3 were identified by investigating TRALI-associated blood products; as for donor 4, 5, and 6, association between blood products and adverse reactions was not investigated.

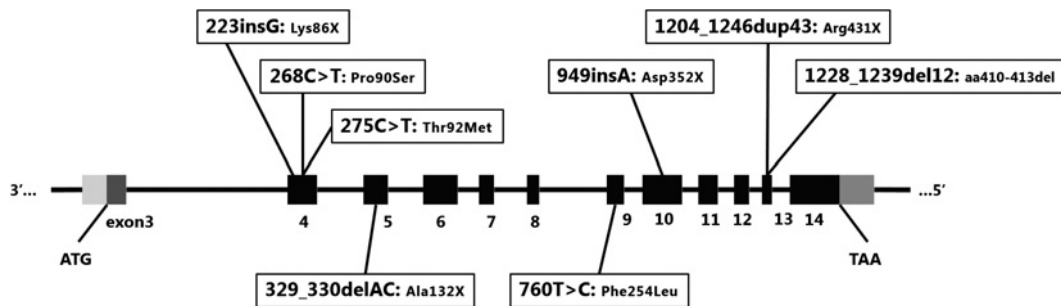


Fig. 1 CD36 mutations found in CD36-deficient donors

Table 3 Summary of mutations found in coding regions of the CD36 gene in 108 CD36-deficient donors

	Mutations	n
Type I (n = 9)	268C>T/268C>T	3
	268C>T/223insG	1
	268C>T/275C>T	1
	268C>T/329_330delAC	1
	268C>T/949insA	1
	329_330delAC/949insA	1
	760T>C/949insA	1
Type II (n = 99)	268C>T/WT	37
	275C>T/WT	1
	329_330delAC/WT	3
	760T>C/WT	1
	949insA/WT	5
	1204_1246dup43/WT	1
	1228_1239del12/WT	2
WT	49	

種類が見つかった (Table 3, Fig. 1). タイプ I はいずれもコード領域の変異のホモ接合体または複合ヘテロ接合体であった。タイプ II では 268C>T が 99 例中 37 例と最も高頻度であった。約半数の 49 例は、コード領域に変異が見つからなかった。また、CD36 欠損者 108 例について MPHA 法により抗体の検出を試みたが、抗 Nak^a は検出されなかった。

考 察

抗 Nak^a 保有者の遺伝子解析を行った過去の報告^{9)~11)}では、日本人で最も高頻度にみられる 268C>T は認められていない。今回検討した抗 Nak^a 陽性献血者においても、6 例中 5 例が 329_330delAC ホモ接合体、1 例が 949insA ホモ接合体であり、268C>T は認めなかった。一方、無作為に抽出した献血者集団から見いだされた 108 例の CD36 欠損者では 268C>T が最も多く、329_330delAC や 949insA のホモ接合体は認めなかった。また、これら 108 例から抗 Nak^a は検出されなかった。

CD36 分子は前駆体が糖鎖修飾を受けて成熟体へ移行するが、268C>T 置換により前駆体から成熟体への移行に障害が生じ、細胞表面にほとんど発現されなくなる¹²⁾。268C>T をもつタイプ I 欠損者が抗体を保有しない理由について柏木らは、268C>T を保有する場合 CD36 発現量は顕著に低下するものの、わずかに発現しているために抗体を産生しないのではないかと推察している⁵⁾¹²⁾。268C>T が CD36 分子の構造や安定性にどの程度影響するのかわからないが、268C>T 以外にも CD36 発現量の低下を導く抗体を産生しない変異が存在する可能性がある。また CD36 陽性者においても 268C>T、329_330delAC、949insA 等の変異がヘテロで検出されたという報告⁴⁾¹³⁾もあり、CD36 遺伝子発現制御機構の複雑さを示している。未解明なイントロンやプロモーター領域の異常、エピジェネティックな制御等が

関与することが推察される。一方、中国人では 268C>T よりも 329_330delAC や 1228_1239del12 が高頻度に検出されており¹⁴⁾、アジア人種のなかでも抗体産生のリスクに差がある可能性がある。

抗 Nak^a が関与したとされる症例は、輸血副作用以外にも新生児血小板減少症や胎児水腫などが報告されており^{9)~11)}、抗 Nak^a 保有者は 975T>G (exon 10) ホモ接合体や 1156C>T (exon 12) と 1228_1239del12 の複合ヘテロ接合体、exon 1 から 3 までの skipping のホモ接合体など多様であった。抗 Nak^a により惹起される症状の違いと欠損要因の違いに関連があるのかは不明である。しかしながら、今回調べた TRALI 関連抗 Nak^a 陽性献血者はすべて 329_330delAC ホモ接合体であったことから、329_330delAC ホモ接合体による抗 Nak^a 産生が TRALI 発症に深く関与している可能性は否定できない。

今回対象とした TRALI 関連抗 Nak^a 陽性献血者 3 例中 2 例は健常男性であることから、抗 Nak^a 産生の要因は輸血や妊娠だけではないと考えられ、輸血副作用対策として男性由来血漿製剤を使用するという手段も奏功しない。健常男性が抗体を産生した要因は不明だが、ひとつの可能性として、胎児期に母親由来の抗原に感作されたことが考えられる。母親と胎児は胎盤を介して細胞の交流があり、通常は母子間で免疫寛容が成立するため、胎児側へ侵入してきた母親由来の細胞は排除されない。しかし、乳児において母親に対する HLA 抗体が検出された例¹⁵⁾が報告されており、母親の細胞が胎児側へ侵入することで抗体産生が惹起されることが示唆されている。

輸血医療において、高力価の抗 Nak^a は TRALI やアナフィラキシーショックなど重篤な副作用を引き起こすことが判明している¹⁶⁾。CD36 は高頻度抗原であるため、血液製剤中に高力価抗体が存在するとその危険性は非常に高い。一方、今回検討した TRALI と関連のない抗 Nak^a 陽性献血者 3 例については、抗体価は 32 倍から 512 倍でそれほど高力価ではなかった (Table 2)。献血時期が 1990 年前後であるため詳細な記録は残っていないが、副作用に関与する可能性は低いと考えられる。このように、抗 Nak^a に関しては血液製剤中に抗体が存在しても必ずしも副作用発症に至らないことに加え、HLA 抗体と比較すると抗体検出率が極めて低いこともあり、的確な対応がとりにくいという問題がある。市販のタイピング試薬は 268C>T のみ検出するため、適合ドナーの選択には有効であるが、CD36 欠損の半数は検出できない。少なくとも、欠損要因から抗 Nak^a を産生する可能性のある献血者を見いだすには 268C>T 以外の変異にも着目する必要があると考えられる。

著者の COI 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

本論文の内容の一部は、第 63 回日本輸血・細胞治療学会総会 (2015, 東京) において発表した。

文 献

- 1) Ikeda H, Mitani T, Ohnuma M, et al: A new platelet-specific antigen, Nak^a, involved in the refractoriness of HLA-matched platelet transfusion. *Vox Sang*, 57: 213—217, 1989.
- 2) Yamamoto N, Akamatsu N, Sakuraba H, et al: Platelet glycoprotein IV (CD36) deficiency is associated with the absence (type I) or the presence (type II) of glycoprotein IV on monocytes. *Blood*, 83: 392—397, 1994.
- 3) Curtis BR, Aster RH: Incidence of the Nak^a-negative platelet phenotype in African Americans is similar to that of Asians. *Transfusion*, 36: 331—334, 1996.
- 4) Yanai H, Chiba H, Fujiwara H, et al: Phenotype-genotype correlation in CD36 deficiency types I and II. *Thromb Haemost*, 84: 436—441, 2000.
- 5) Kashiwagi H, Tomiyama Y, Nozaki S, et al: Analyses of genetic abnormalities in type I CD36 deficiency in Japan: identification and cell biological characterization of two novel mutations that cause CD36 deficiency in man. *Hum Genet*, 108: 459—466, 2001.
- 6) 中島文明：TRALI 関連症例から検出した高力価 CD36 抗体、編者 高本 滋、輸血用血液の安全確保・安定供給 (第 23 回北海道輸血シンポジウム抄録集)、日本赤十字社北海道ブロック血液センター、札幌、2012, 143—150.
- 7) Nakajima F, Nishimura M, Hashimoto S, et al: Role of anti-Nak^a antibody, monocytes and platelets in the development of transfusion-related acute lung injury. *Vox Sang*, 95: 318—323, 2008.
- 8) 古川洋子：献血者の抗体スクリーニング。監修者 高橋孝喜、十字猛夫、柴田洋一、他、血小板/顆粒球抗原・抗体検査標準マニュアル、医歯薬出版、東京、2009, 75—77.
- 9) Curtis BR, Ali S, Glazier AM, et al: Isoimmunization against CD36 (glycoprotein IV): description of four cases of neonatal isoimmune thrombocytopenia and brief review of the literature. *Transfusion*, 42: 1173—1179, 2002.
- 10) Okajima S, Cho K, Chiba H, et al: Two sibling cases of hydrops fetalis due to alloimmune anti-CD36 (Nak^a) antibody. *Thromb Haemost*, 95: 267—271, 2006.
- 11) Taketani T, Ito K, Mishima S, et al: Neonatal isoimmune thrombocytopenia caused by type I CD36 deficiency having novel splicing isoforms of the CD36 gene. *Eur J Haematol*, 81: 70—74, 2008.

- 12) Kashiwagi H, Tomiyama Y, Honda S, et al: Molecular basis of CD36 deficiency. Evidence that a 478C->T substitution (proline90->serine) in *CD36* cDNA accounts for CD36 deficiency. *J Clin Invest*, 95: 1040—1046, 1995.
- 13) Masuda Y, Tamura S, Matsuno K, et al: Diverse CD36 expression among Japanese population: defective *CD36* mutations cause platelet and monocyte CD36 reductions in not only deficient but also normal phenotype subjects. *Thromb Res*, 135: 951—957, 2015.
- 14) Xu X, Liu Y, Hong X, et al: Variants of *CD36* gene and their association with CD36 protein expression in platelets. *Blood Transfus*, 12: 557—564, 2014.
- 15) 万木紀美子, 菱田理恵, 吉澤 淳, 他: 母親に対する HLA 抗体が検出された生体肝臓移植の乳児 2 症例. *日本組織適合性学会誌*, 22 : 115, 2015.
- 16) Morishita K, Wakamoto S, Miyazaki T, et al: Life-threatening adverse reaction followed by thrombocytopenia after passive transfusion of fresh frozen plasma containing anti-CD36 (Nak^a) isoantibody. *Transfusion*, 45: 803—806, 2005.

DEFECTIVE *CD36* MUTATIONS IN ANTI-Nak^a ANTIBODY-POSITIVE SUBJECTS ASSOCIATED WITH TRANSFUSION-RELATED ACUTE LUNG INJURY (TRALI)

Moe Ando, Fumiaki Nakajima, Hiromi Kamada, Junko Nakamura, Marie Shimizu, Tadashi Nagai, Masahiro Satake and Kenji Tadokoro

Japanese Red Cross Society, Blood Service Headquarters, Central Blood Institute

Abstract:

Isoantibody against CD36 (anti-Nak^a) can cause platelet transfusion refractoriness and serious adverse reactions, including transfusion-related acute lung injury (TRALI). CD36-deficient individuals may produce anti-Nak^a after immunizing events. Indeed, we previously identified three anti-Nak^a-positive donors when we examined 2,497 TRALI-inducing blood products. Although the 268C>T mutation in exon 4 of the *CD36* gene is frequently found in Japanese individuals with CD36 deficiency, the correlation between mutations of the *CD36* gene and anti-Nak^a production remains unclear. In this study, to clarify whether specific mutations of the *CD36* gene are involved in the production of anti-Nak^a, we performed a sequence analysis of the gene in six anti-Nak^a-positive donors, including the three donors described above. We also analyzed 108 anti-Nak^a-negative donors with CD36 deficiency as controls. All anti-Nak^a-positive donors were homozygous for 329_330delAC and 949insA, whereas 268C>T was not found. In contrast, 268C>T was frequently found in the anti-Nak^a-negative control donors. Some of the healthy male donors in this study were also positive for anti-Nak^a, indicating that anti-Nak^a production is not limited to cases involving transfusion or pregnancy. As such, it may be important to focus on mutations other than 268C>T to identify donors who may potentially produce anti-Nak^a.

Keywords:

anti-Nak^a, TRALI, CD36 deficiency