

日本人献血者における JK*A の c.130G>A 変異頻度および Jk^a 抗原量の解析

常山 初江¹⁾ 長部 隆広¹⁾ 大河内直子¹⁾ 永沼 真一¹⁾ 小野寺孝行¹⁾
 伊佐 和美²⁾ 東 史啓¹⁾ 大村 和代¹⁾ 津野 寛和¹⁾ 中島 一格¹⁾
 小笠原健一²⁾ 内川 誠¹⁾

抗 Jk^a, 抗 Jk^b は遅発性溶血性副作用の原因となるが, クロスマッチでは検出困難である場合が多く問題となっている。最近, JK*A 遺伝子 (または JK*01) の一塩基置換 c.130G>A (アレル名 JK*01W.01) に伴うアミノ酸置換 (p.Glu44Lys) による Jk^a および Jk3 抗原の減少が報告された。本研究では日本人献血者における JK 遺伝子 c.130A の頻度, さらに Jk^a と Jk3 抗原の発現への影響を検討した。日本人献血者 2,017 名での JK 遺伝子 c.130A の頻度は 38.5% であったが, JK*01W.01 が JK*A の 82.6% を占めていた。これに対し, JK*B の c.130A はわずか 0.1% であった。JK*01W.01 の赤血球では Jk^a および Jk3 抗原の発現減少がみられた。日本人の Jk (a+b+) の頻度は約 50% であり, そのうち約 80% は Jk^a 抗原の発現が低下していることになる。患者が保有する抗 Jk^a が微弱な場合, クロスマッチで適合となる恐れがあるため, 十分な抗体価の抗 Jk^a 血清で Jk^a 抗原陰性を確認するなどの対策が必要である。

キーワード: Kidd 血液型, JK 遺伝子, 抗 Jk^a, 遅発性溶血性副作用

はじめに

Jk^a 抗原は 1951 年に新生児溶血性疾患の症例で発見され, 抗 Jk^a を認めた母親 (Mrs Kidd) の第 6 子のイニシャル (John Kidd, JK) をとって Jk と命名された¹⁾。続いて 1953 年に Jk^b 抗原が同定された²⁾。Kidd 血液型は Jk^a, Jk^b, Jk3 の 3 抗原で構成され, 389 個のアミノ酸からなる複数回膜貫通型の Kidd 糖蛋白上に存在する。Kidd 糖蛋白を規定するのは 18 番染色体 (18q12) 上に存在する JK 遺伝子 (別名 SLC14A1, HUT11A = human erythrocyte urea transporter, UT-B) で, 1994 年にヒト骨髄の cDNA library からクローニングされた³⁾。当初, Kidd 糖蛋白は, ウサギの Urea Transporter 2 (UT2) をプローブとしてヒト骨髄からクローニングされ, human erythrocyte urea transporter (HUT11) と命名された³⁾。翌年の 1995 年に HUT11 が Kidd 血液型をコードする遺伝子であることが明らかとなった⁴⁾。その後, ヒト赤芽球の cDNA ライブラリーから HUT11 とわずかに配列の異なる HUT11A が同定された⁵⁾。HUT11 は 391 個のアミノ酸からなり, p.Pro227 のあとに 3 個の Val-Gly 繰り返し配列をもつ。一方, HUT11A は 389 個のアミノ酸からなり, p.Pro227 のあとに 2 個の Val-Gly 繰り返し配列をもつ。この HUT11A がヒ

ト赤芽球で発現している Urea Transporter であることが確認され, Kidd 糖蛋白の正しい配列として決定された。エキソン 9 に Single Nucleotide Polymorphism (SNP) があり (c.838G>A, Asp280Asn), 280 番目のアミノ酸がアスパラギン酸 (Asp) であれば Jk^a, アスパラギン (Asn) であれば Jk^b となる (図 1)。

抗 Jk^a, 抗 Jk^b はクロスマッチで検出しにくい抗体として知られており, 遅発性溶血性輸血副作用の原因となる^{6)~8)}。2011 年, JK*A 遺伝子エキソン 4 の一塩基置換 c.130G>A (JK*01W.01) に伴うアミノ酸変異 (p.Glu44Lys) が Jk^a および Jk3 抗原の発現減少に関与していることがスウェーデンのグループから報告された⁹⁾。本研究では, 日本人献血者における c.130A 変異の頻度と Jk^a, Jk3 抗原の発現量に及ぼす影響を検討した。

材料と方法

サンプル

日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センターに集められた献血者検体からランダムに抽出した 2,017 検体を解析対象とした。本研究の検体の使用については献血者への説明と同意を得ており, 日本赤十字社の倫理審査の承認を得て実施した (承認番号 2009-008)。

1) 日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター

2) 日本赤十字社中央血液研究所

〔受付日: 2017 年 9 月 15 日, 受理日: 2017 年 11 月 1 日〕

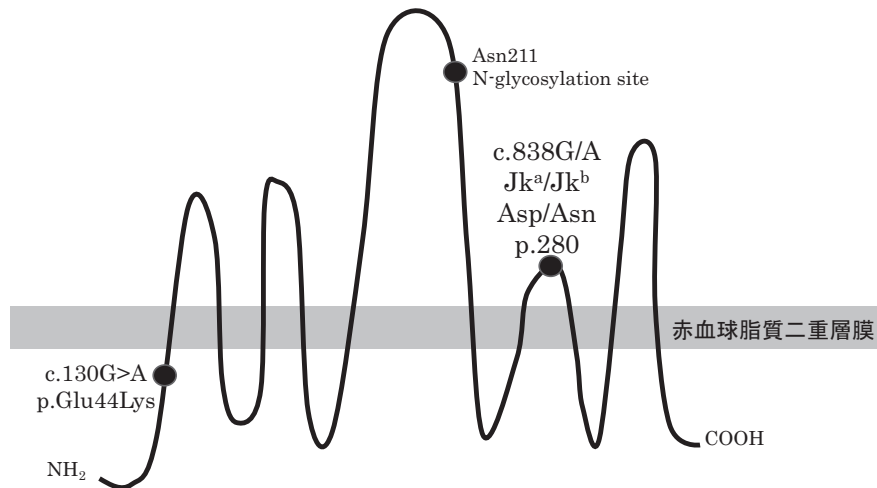


図1 Kidd 糖蛋白質の模式図

血清学的検査

抗 Jk^a (バイオクロン抗 Jk^a, オーソクリニカルダイアグノスティクス社, USA), 抗 Jk^b (バイオクロン抗 Jk^b, オーソクリニカルダイアグノスティクス社, USA) を用いて試験管法にて Kidd 血液型を判定した. 抗 Jk^a (ポリクローナル抗 Jk^a, オーソダイアグノスティクス社, USA) を原液から 256 倍まで 2 倍連続希釈し, Jk^a 抗原の被凝集価 (スコア値) を LISS 抗グロブリン法にて測定した.

フローサイトメトリー

フローサイトメトリーには一次抗体としてポリクローナル抗 Jk^a (ポリクローナル抗 Jk^a, オーソダイアグノスティクス社, USA) および自家製モノクローナル抗 Jk3 (HIRO-294)¹⁰ を使用し, 二次抗体は PE 標識抗ヒト IgG (R-Phycoerythrin conjugated goat Fab' fragments anti-human IgG, gamma chain specific, Cat.No 1071, Protos Immunoresearch CA, USA) を用いて行った. 2% 赤血球浮遊液 50μl と 1 次抗体 (抗 Jk^a あるいは抗 Jk3) 50μl を混合して 37°C で 90 分インキュベートした. 0.2% BSA 添加 PBS で 3 回洗浄した後, PBS で 20 倍希釈した二次抗体を 50μl 加えて室温で 60 分インキュベートした. 0.2% BSA 添加 PBS で 2 回洗浄した後, PBS3ml で懸濁し, フローサイトメーター (Galios, Beckman Coulter, USA) を用いて赤血球層にゲートして 10,000 events を測定した. 解析には解析ソフト (Kaluza, Beckman Coulter, USA) を用いた.

PCR-SSP

ゲノム DNA は白血球層から DNA 抽出キット (DNA Isolation: DNeasy Blood & Tissue Kit — QIAGEN, Tokyo, Japan) を用いて抽出し, 25~45ng/μl の濃度になるように TE buffer で希釈した. c.130G>A の検出のために c.130G および c.130A に特異的な primer をデザインし (ユーロフィンジェノミクス, Japan), ゲノ

ム DNA を用いて PCR-SSP 法にて判定した (図 2A, B). DNA 1μl (25~45ng/μl), 0.2mmol/l dNTPs, primer mix 0.4μl (25pmol/ml), 0.4U recombinant Taq DNA polymerase (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を MgCl₂ 入り PCR buffer に total 10μl で混和し, GeneAmp PCR system 9700 あるいは Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Japan) を用いて PCR-SSP を実施した. Primer 配列を表 1 に, PCR 条件を表 2 に示す. 各バンドサイズは 388bp (internal control), 226bp (c.130A), 205bp (c.130G) となる (図 2B). 838 番塩基のグアニンとアデニンで JK^{*A} と JK^{*B} を遺伝型で判別するために c.838G および c.838A に特異的な primer をデザインし (ユーロフィンジェノミクス, Japan), ゲノム DNA を用いて PCR-SSP 法にて判定した (図 2A, C). 試薬は c.130G>A の PCR-SSP 法と同様とし, Primer 配列を表 1 に, PCR 条件は表 2 に示す. 各バンドサイズは 70bp (c.838G, JK^{*A}), 54bp (c.838A, JK^{*B}) となる (図 2C). 塩基配列のリファレンスには NM_015865 を使用した.

結 果

日本人献血者における c.130G>A 変異頻度は高い

献血者 2,017 例中, 血清学的検査での表現型は Jk(a+b-) が 422 例 (20.9%), Jk(a+b+) が 997 例 (49.4%), Jk(a-b+) が 598 例 (29.7%) であった (表 3). PCR-SSP による遺伝型判定も血清学的検査結果と 100% 一致した. c.130 の遺伝型は, c.130A/A; 288 例, c.130G/A; 976 例, c.130G/G; 753 例であった (表 3). c.130A のアリル頻度は 38.5% であり, HapMap-JPT (ss44094733, rs2298720) のアリル頻度データ 33.7% とほぼ同等であった. 表現型別にみると, Jk(a+b-) 422 例では, c.130A/A; 284 例, c.130A/G; 129 例, c.130G/G; 9 例であり, JK^{*01W.01} のアリル頻度は JK^{*A}

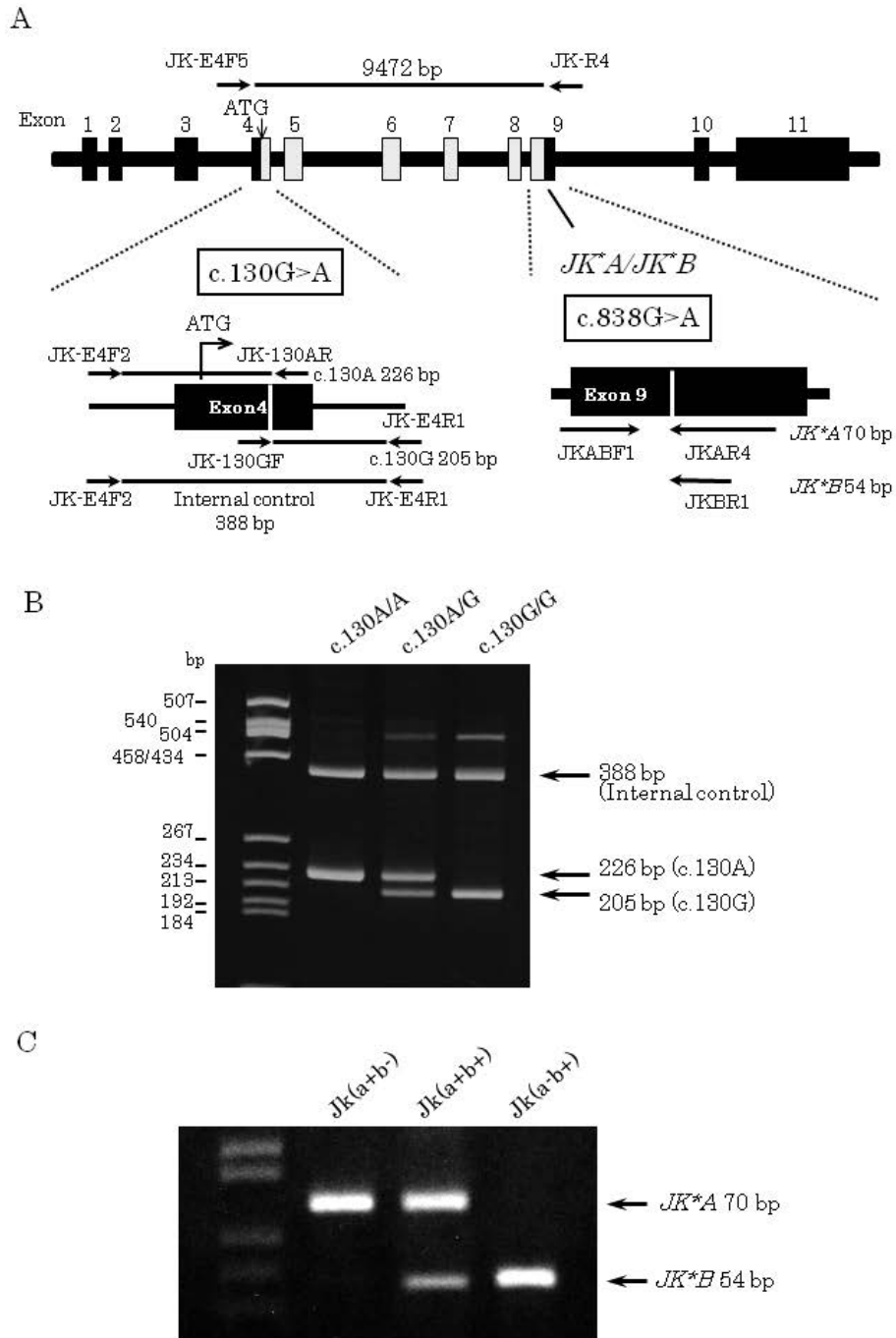


図2 A) JK 遺伝子の構造と primer の位置 B) PCR-SSP : c.130G および c.130A の泳動パターン
C) PCR-SSP : c.838G (JK^*A) および c.838A (JK^*B) の泳動パターン

表1 PCR-SSP に用いた Primer 配列

SSP	Primer		Sequence (5'-3')	ratio
JK c.130G/A	JK-E4F2	sense	TAATCTGGAGGGCTCTGCCT	1
	JK-E4R1	antisense	ATGGAGAGGTTTGCAGGTTA	1
	JK-130GF	sense	TATGTCACCGGTGACATGAAAG	4
	JK-130AR	antisense	CTTTAAGCTGGTTGGCAAGTTT	2
JK c.838G/A	JKAB-F1	sense	CTTAACAGGACTCAGTCTTTCA	3
	JK-A-R4	antisense	AGAGCTGTTGAAACCCAGAGTCCAAAGTGGATGCC	1
	JK-B-R1	antisense	CAGAGTCCAAAGTAGATGTT	12

表2 PCR-SSP 条件

SNP	1 cycle		35 cycles		1 cycle	
	94°C 3min	94°C 15sec	64°C 1min	72°C 5min	94°C 3min	94°C 15sec
c.130G/A	94°C 3min	94°C 15sec	64°C 1min	72°C 5min	94°C 3min	94°C 15sec
c.838G/A	94°C 3min	94°C 15sec	60°C 1min	72°C 5min	94°C 3min	94°C 15sec

表3 日本人献血者における c.130A の遺伝子頻度

表現型	総数	遺伝子型						allele 頻度	
		c.130A/A		c.130A/G		c.130G/G		c.130A	c.130G
		n	%	n	%	n	%	%	%
Jk (a+b-)	422	284	67.3	129	30.6	9	2.1	82.6	17.4
Jk (a+b+)	997	4	0.4	846	84.9	147	14.7	42.8	57.2
Jk (a-b+)	598	0	0.0	1	0.2	597	99.8	0.1	99.9
合計 (日本)	2,017	288	14.3	976	48.4	753	37.3	38.5	61.5
スウェーデン*1	300	1	0.3	23	7.7	276	92	4.2	95.8

*1 文献 9 より引用

の 82.6% にのぼる。一方, Jk(a-b+)598 例では, c.130G/G; 597 例, c.130A/G; 1 例で, JK*B の c.130A/A は一例も検出されず, c.130A アリル頻度はわずか 0.1% であった。

c.130A の赤血球 Jk^a 抗原量は減少している

Jk^a 抗原量をフローサイトメトリーを用いて測定し, 遺伝型別に比較した。Jk (a+b-) 血球では平均蛍光強度の平均値が, c.130A/A (5 例); 7.25, c.130A/G (5 例); 12.19, c.130G/G (3 例); 13.65 で, c.130A/A ホモ型血球は c.130G/G ホモ型血球よりも有意に低い値を示した (図 3A, B)。Jk3 抗原量も同様に, c.130A/A (5 例); 14.22, c.130A/G (5 例); 21.93, c.130G/G (3 例); 26.26 で, c.130A/A ホモ型が c.130G/G ホモ型よりも有意に低い値を示した (図 3C, D)。

抗 Jk^a を用いて Jk (a+b-) 血球の被凝集価 (スコア値) を測定した。フローサイトメトリーでの結果と一致して, c.130A/A の Jk (a+b-) 血球が c.130G/G の Jk (a+b-) 血球よりもスコア値で 10 以上低い値を示した (表 4)。また, Jk (a+b+) ヘテロ血球における比較でも, c.130A/G の血球が c.130G/G の血球よりもスコア値で 10 低い値を示し, 有意な差が見られた。注意すべき点として, c.130A/A をもつ Jk (a+b-) ホモ血球のスコア値が 57 に対して, c.130G/G をもつ Jk (a+b+) ヘテロ血球のスコア値は 71 と高い値を示し, 通常ホモヘテロの関係性とは逆の現象を示した。

考 察

Kidd 糖蛋白は赤血球のほか腎臓での発現も認め, 腎移植の際には minor histocompatibility antigen として働き, 拒絶反応に関与する可能性が指摘されている¹¹⁾。もうひとつの urea transporter である HUT2 (別名 SLC

14A2, UT-A) は腎臓のみで発現を認めるが, HUT11 (UT-B) と同じ 18 番染色体 (18q12) 上にあり, UT-A と UT-B は進化の過程で duplication によってできたと考えられている。Kidd 糖蛋白が欠損している Jk (a-b-) 血球では, 尿素が赤血球膜を通過する速度が正常赤血球より遅く, 2M 尿素による溶血作用に耐性を示すことが知られている⁹⁾¹²⁾¹³⁾。結果には示さなかったが, 我々の検討でも, 正常赤血球は 2M 尿素下で 5 分後にはほぼ 100% 溶血するが, Jk (a-b-) 血球は 0.5% 程度しか溶血しない。しかし, Jk (a-b-) 血球を持つヒトに臨床的な異常は認めない。Urea transporter が必須の腎臓では他の Urea Transporter が補填しており, また赤血球では Urea Transporter がなくても赤血球としての機能に影響しないためと考えられる。

一方, 輸血の臨床では, Kidd 抗原に対する抗 Jk^a, 抗 Jk^b は遅発性溶血性輸血副作用の原因となる^{6)~8)}, クロスマッチでの検出が困難なことが問題である。そこで本研究では, Jk^a の発現減少を起こす c.130A 変異について, 日本人献血者における頻度と Jk^a, Jk3 抗原の発現量に及ぼす影響を検討した。

日本人献血者全体 (2,017 例) の c.130A のアリル頻度は 38.5% であった。スウェーデン人では 4.2%⁹⁾ であることから欧米系に比べてアジア系では高頻度であることが推測される (表 3)。表現型別に見ると, Jk (a+b-) での c.130A のアリル頻度は 82.6% を占めたが, Jk (a-b+) では 0.1% であり, JK*B はほとんどこの変異を持っていないことが判明した。すなわち Jk (a+b+) において c.130A をもつのは主に JK*A だと考えられる。遺伝子頻度や抗原発現との関連性については今後さらにデータの蓄積を行っていくことが重要である。

フローサイトメトリーおよび被凝集価の結果から,

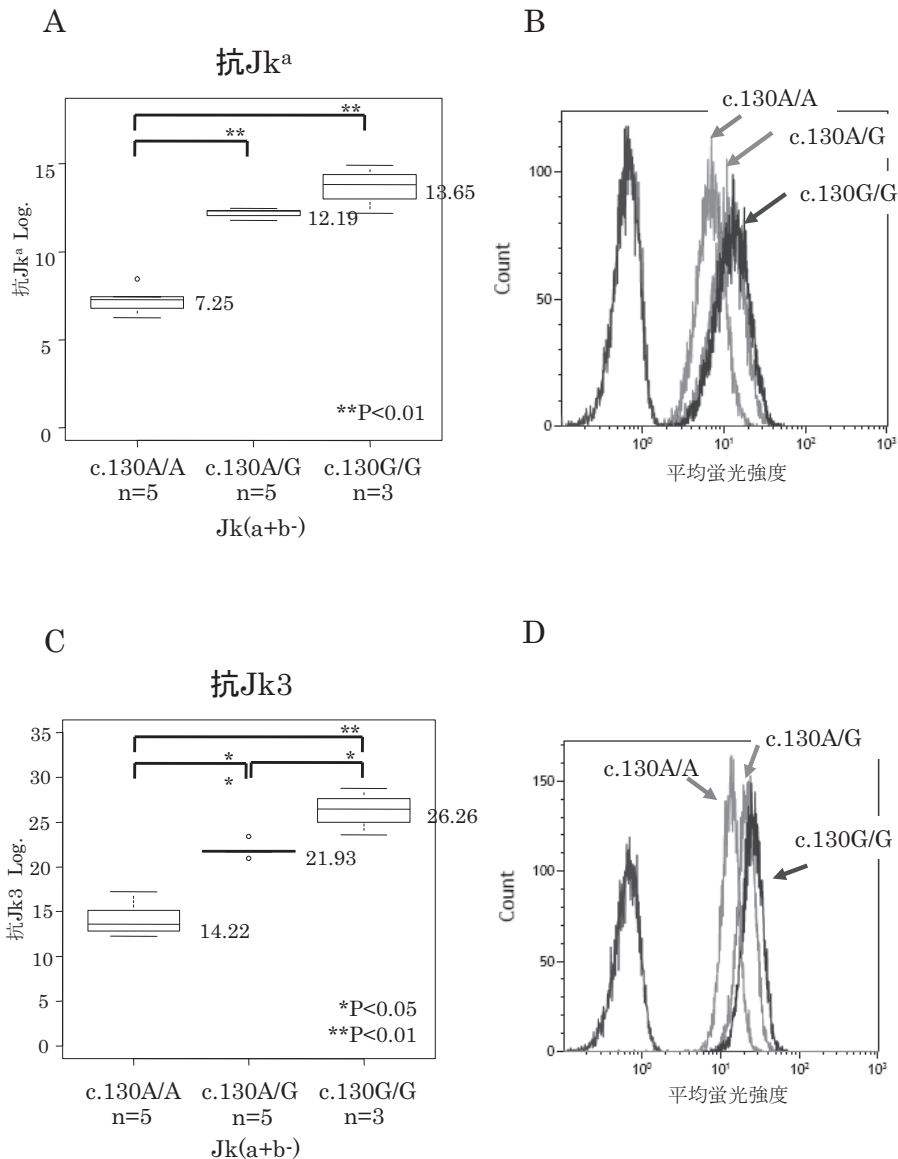


図3 フローサイトメトリーによる Jk (a+b-) 血球における抗原量の解析. A, B) 抗 Jk^a (ポリクローナル抗 Jk^a, オートダイアグノスティクス社) による Jk^a 抗原量. C, D) 抗 Jk³ (HIRO-294) による Kidd 抗原量. 図中の数値は中央値を示す.

表4 抗 Jk^a による被凝集価 (score 値)

表現型	遺伝子型		
	c.130A/A	c.130A/G	c.130G/G
Jk (a+b-)	57	67	74
Jk (a+b+)	—	61	71

Jk (a+b-) : A/A n=5, A/G n=5, G/G n=3,
 Jk (a+b+) : A/G n=2, G/G n=2

JK*01W.01 の血球では Jk^a 抗原の発現減少がみられた。JK*01W.01 の Jk (a+b+) 血球では、Jk^a 抗原がヘテロ量の上にさらに c.130A によって発現低下するため、患者血清中に存在する弱い抗 Jk^a を検出しにくい可能性がある。アジアにおける Kidd 血液型の表現型頻度は、Jk

(a+b-) 23.2%, Jk (a-b+) 26.8%, Jk (a+b+) 49.1% である¹⁴⁾¹⁵⁾。本研究対象となった日本人献血者の比率も同様で、日本人献血者の Jk (a+b+) の割合は 49.4% であり、Jk^a 発現量の少ない血球が約半数を占めていることになる。このことは、クロスマッチで陽性と判定されず、弱い抗 Jk^a を持つ患者に Jk^a 陽性血球が輸血されてしまうリスクがあることを示唆している。市販のスクリーニング血球に JK*01W.01 の血球が含まれる場合、やはり弱い抗 Jk^a が検出されず、Jk^a 抗原陽性血球が輸血されてしまうリスクがクロスマッチと同様にある。また、被凝集価 (表4) のデータから、抗 Jk^a との凝集反応の強さは c.130A/A をもつ JK (a+b-) ホモ血球のスコア値が 57 に対して、c.130G/G をもつ JK (a+b

+)ヘテロ血球のスコア値が71と高く、これは通常のホモ・ヘテロ血球の関係性とは逆であるため、輸血検査上の注意点として、抗Jk^a同定(消去法等)時には量的効果に従わないこともありうることを知っておくことが必要である。パネル血球の遺伝子調査はDNA抽出が不可能なため実施していないが、欧米人のc.130A頻度は低いことから、欧米由来の市販の抗体スクリーニング血球にJK*01W.01の血球が含まれる可能性は低いと推定される。

結 論

献血者のKidd血液型JK遺伝子の解析結果より、日本人ではc.130G>A変異をもつJK*A遺伝子(JK*01W.01)の頻度が高いため、Jk^a抗原の発現減少によるクロスマッチ偽陰性に注意が必要である。弱い抗Jk^aを持つ患者に輸血する場合、クロスマッチでは適合という結果になる可能性があるため、十分な抗体価を持つ抗Jk^a血清を用いてJk^a抗原の有無を確認することが肝要である。

著者のCOI開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

文 献

- Allen FH, Diamond LK, Niedziela B: A new blood-group antigen. *Nature*, 167: 482, 1951.
- Plaut G, Ikin EW, Mourant AE, et al: A new blood-group antibody, anti-Jk^b. *Nature*, 171: 431, 1953.
- Olives B, Neau P, Bailly P, et al: Cloning and functional expression of a urea transporter from human bone marrow cells. *J Biol Chem*, 269: 31649—31652, 1994.
- Olivès B, Mattei MG, Huet M, et al: Kidd blood group and urea transport function of human erythrocytes are carried by the same protein. *J Biol Chem*, 270: 15607—15610, 1995.
- Sidoux-Walter F, Lucien N, Olivès B, et al: At physiological expression levels the Kidd blood group/urea transporter protein is not a water channel. *J Biol Chem*, 274: 30228—30235, 1999.
- Klein HG, Anstee DJ: *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine*, 12th edition, Wiley-Blackwell, 2014, 221—222.
- Stainsby D, Jones H, Asher D, et al: Serious hazard of Transfusion: a decade of haemovigilance in the UK. *Transfusion Med Rev*, 20: 273—282, 2006.
- Serious Hazards of Transfusion. Annual Report 2015. p110—111. Available at: www.shotuk.org
- Wester ES, Storry JR, Olsson ML: Characterization of Jk (a+(weak)): a new blood group phenotype associated with an altered JK*01 allele. *Transfusion*, 51: 380—392, 2011.
- Toyoda C, Suzuki Y, Tsuneyama H, et al: Production of human monoclonal anti-Jk3, recognizing an epitope including the Jk (a)/Jk (b) polymorphic site of the Kidd glycoprotein. *Transfus Med*, 24: 286—291, 2014.
- Lerut E, Van Damme B, Noizat-Pirenne F, et al: Duffy and Kidd blood group antigens: minor histocompatibility antigens involved in renal allograft rejection? *Transfusion*, 47: 28—40, 2007.
- Edwards-Moulds J, Kasschau MR: The effect of 2 molar urea on Jk (a-b-) red cells. *Vox Sang*, 55: 181—185, 1988.
- Onodera T, Sasaki K, Tsuneyama H, et al: JK null alleles identified from Japanese individuals with Jk (a-b-) phenotype. *Vox Sang*, 106: 382—384, 2014.
- Reid ME, Lomas-Francis C, Olsson ML: *The blood group antigen. Facts book*, 3rd edition, Academic Press, London, 2012, 373—381.
- Okubo Y, Yamaguchi H, Nagao N, et al: Heterogeneity of the phenotype Jk (a-b-) found in Japanese. *Transfusion*, 26: 237—239, 1986.

THE PREVALENCE OF *JK*^a* with c.130A SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM IN THE JAPANESE BLOOD DONORS AND EXPRESSION ANALYSIS OF *Jk^a* AND *Jk3* ANTIGENS ON THEIR RED BLOOD CELLS

Hatsue Tsuneyama¹⁾, Takahiro Osabe¹⁾, Naoko Watanabe-Okochi¹⁾, Shinichi Naganuma¹⁾, Takayuki Onodera¹⁾, Kazumi Isa²⁾, Fumihiko Azuma¹⁾, Kazuyo Omura¹⁾, Nelson H. Tsuno¹⁾, Kazunori Nakajima¹⁾, Kenichi Ogasawara²⁾ and Makoto Uchikawa¹⁾

¹⁾Japanese Red Cross Kanto-Koshinetsu Block Blood Center

²⁾Japanese Red Cross Central Blood Institute

Abstract:

Anti-*Jk^a* and anti-*Jk^b* against the Kidd antigen cause delayed hemolytic transfusion reactions. Detection of the antibodies by crossmatching is difficult and represents a clinical problem. A *JK*^a* allele (*JK*01W.01*) with c.130G>A in exon 4 of the *JK* gene encoding an amino acid substitution (p.Glu44Lys) was reported in 2011. This single nucleotide polymorphism (SNP) reduces the expression level of *Jk^a* and *Jk3* antigens. In this study, we examined the prevalence of the c.130A polymorphism and its effect on the expression of *Jk^a* and *Jk3* in Japanese blood donors. The prevalence of c.130A was 38.5% in 2,017 Japanese donors, accounting for 82.6% of *JK*01W.01* in *JK*^a*. On the other hand, the prevalence of c.130A in *JK*^b* was only 0.1%. The red blood cells (RBCs) of the individuals with c.130A showed low expression of *Jk^a* and *Jk3* antigens by flow cytometry. As the prevalence of the *Jk* (a + b +) phenotype is approximately 50% in the Japanese population, more than 80% of *Jk* (a + b +) donors are expected to have weak expression of the *Jk^a* antigen on their RBCs. Therefore, it is important to note that weak expression of *Jk^a* antigen causes false negative crossmatching. If the patient has anti-*Jk^a*, blood for crossmatching must be confirmed *Jk* (a -) using an anti-*Jk^a* reagent with high potency.

Keywords:

Kidd blood group system, *JK* gene, anti-*Jk^a*, delayed hemolytic transfusion reaction

©2018 The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy

Journal Web Site: <http://yuketsu.jstmct.or.jp/>