

論文の内容の要旨

赤血球 Rh 抗原の variant とその遺伝子解析

指導教官 武谷 雄二 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

兵藤 博信

赤血球型にはABOをはじめとする23種類が知られている。Rhは非常に多くの抗原からなる最も複雑な赤血球型であり、45種類の抗原が確認されている。そのなかでも主要な抗原が、D, C, c, E, eである。一般的に“Rh +”と言われるのはD抗原陽性のことであり、免疫原性が非常に強く、ABOと同様、輸血などの際には必ずスクリーニングされる最も重要なRh抗原である。C/cやE/eは、Dと比べると免疫原性は20～100分の1だが、輸血や妊娠により感作され、不規則抗体検査で時折見受けられる。

Rh抗原の蛋白は2つの異なる遺伝子でコードされる。D抗原の蛋白は*RHD*遺伝子が、C/cやE/e抗原の蛋白は*RHCE*遺伝子が主にコードしている。*RHD*遺伝子と*RHCE*遺伝子は非常に相同性が高く、90%以上共通の塩基配列を持っている。共に10個のexonで構成され、1251塩基から成る。コードされる蛋白はともに417アミノ酸からなる蛋白で、N末端、C末端とも細胞質内にあり、細胞質を12回通過して細胞外に6つのドメインを持っていると考えられている。

通常、“Rh +/-”、すなわちDの陽性陰性は*RHD*遺伝子の有無で決まる。*RHD*遺伝子には対立遺伝子は存在せず、少なくとも1本の*RHD*遺伝子があればD抗原を発現する。*RHCE*遺伝子には4種類の対立遺伝子があり、Ce, cE, ce, CEの4

[別紙 1]

種類の genotype の組み合わせにより phenotype は CCee (C+c-E-e+; Ce-Ce) や CcEe (C+c+E+e+; Ce-cE or ce-CE) などとなる。

さて、RhD 抗原があるにもかかわらず抗D抗体を持つような個体から、一部の RhD 抗原のエピトープ(epD)を欠く partial D (D variant) が発見された。欠けているエピトープと、反応する抗D抗体の種類から、8つのカテゴリーに分けられたが、その後、モノクローナル抗体の技術の発達により、100以上の抗D抗体により10以上のカテゴリーに細分化されている。同様に、Cやc、Eやeのvariantも発見されている。これらのvariantは通常のタイピングでは「陽性」と判定されるため、予期せぬ不適合を起こす可能性がある。

これらのvariantは、現在数多くのモノクローナル抗体を用いた血清学的手法によりタイピングされているが、熟練した技術が要求され、なおかつ、判定条件が一定しにくいなどの欠点がある。簡便で判定の下しやすいDNAタイピングを可能にし、さらに抗原決定部位を同定するために、Rh variantのRH遺伝子の塩基配列を解析した。

いくつかの Rh variant の遺伝子配列解析の結果、新しい配列や、新しい variant が見つかった。D variant のカテゴリー Va は、epD1 と 5 を欠くもので、これまでに 2 種類の塩基配列が報告されていたが、同じ血清学的反応でありながら異なる塩基配列のものが 2 種類見つかった。さらに Va とよく似ているものの、epD1 と 5 だけでなく 2 および 6/7 の一部も欠けている新たな variant、DYO が見つかった。Va や DYO は、変異がすべて RHD 遺伝子の exon 5 で起きており、Va は一部あるいは全部が RHCE 遺伝子の相同部分と置き換わるような変異が、DYO は 1 ヶ所だけユニークな変異があった。4 種類の Va すべてに共通しているアミノ酸配列の特徴は、233 番のグルタミン酸がグルタミンに換わっていることである。他の、223 番、238 番、245 番などは換わっていてもいなくても血清学的に差は出ない、ということがわかった。また、DYO では、233 番でグルタミン酸がリジンに換わっていた。つまり、233 番のグルタミンがないと、epD1 と 5 が欠けてしまい、そして DYO のように、換わったものがグルタミンでなくリジン

[別紙 1]

であればさらに epD2 や 6/7 の一部まで欠けてしまうと考えられた。これら、Va や DYO を PCR using Sequence Specific primer (PCR-SSP)で判別する方法を開発した。

D variantのカテゴリ-IVbは、これまでにRHD遺伝子のexon 7の途中から9までRHCE遺伝子の相同部分と置き換わっているという報告があったが、我々が調べたIVb(J)は、血清学的反応はIVbと同じであるが、RHD遺伝子のexon 7の先頭からexon 9までRHCE遺伝子の相同部分と置き換わっており、IVbとは少し異なっていた。さらにIVb(J)のRHD遺伝子のintron 6を調べると、361 baseまではRHD遺伝子で、967 base以降はRHCE遺伝子であった。この間は、DとCEの配列は同じであり、この部分でgene conversionが起きていると考えられた。IVbとIVb(J)の遺伝子配列が異なる部分、すなわちexon 7の前半は、RHD蛋白の細胞膜内に位置する部分にあたると思われる。

E variantのEKKについても遺伝子解析を行った。EKKはcEのタイプのRHCE遺伝子のexon 1~3がRHD遺伝子に置き換わっていた。さらに注目すべきことに、EKKの他のRH遺伝子を調べたところ、RHD遺伝子の1本はexon 1~3がcEのタイプのRHCE遺伝子と置き換わるvariantであった。Family studyを行ったところこの2本のvariant遺伝子は1本の染色体上にあると考えられ、1個体内での1度のgene conversion eventにより生じたものと考えられた。

Rh variant は、赤血球膜の外側に位置すると予想されるアミノ酸に1つ以上変異がみつかり、これが血清学的反応性の変化を生じていると考えられる。RHD と RHCE 遺伝子との間の遺伝子変換(short segment gene conversion-like event)により生じたものと、点突然変異(point mutation)により生じたものがあると考えられる。今回解析を行ったものでは、前者が D^{Va}、D^{IVb}そして EKK、後者が DYO である。また、EKK の解析により、RH 遺伝子の組み替え、さらには HLA などの他の Homology の高い遺伝子集合体における多型形成機構の解明にもつながる可能性がある。

Rh variant は頻度としては稀であるが、それぞれの variant に対する DNA タイ

[別紙1]

ピングが可能となり、血清学的手法を補完する判定手段として非常に有用である。