

再生不良性貧血患者における疾患感受性遺伝子の検討：
熱ショック蛋白質70遺伝子および腫瘍壊死因子 α 遺伝子の多型性と免疫抑制療法に対する反応性

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9395

再生不良性貧血患者における疾患感受性遺伝子の検討： 熱ショック蛋白質70遺伝子および腫瘍壊死因子 α 遺伝子の 多型性と免疫抑制療法に対する反応性

金沢大学医学部医学科内科学第三講座（主任：松田 保教授）

山 崎 宏 人

再生不良性貧血は、ほとんどの患者が免疫抑制療法に反応して改善することから、最近では、骨髄という臓器に特異的な自己免疫疾患の一つと考えられている。多くの自己免疫疾患では、ヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 遺伝子や熱ショック蛋白質遺伝子などのいくつかの遺伝子が疾患のかかりやすさ (疾患感受性) を決定していることが示されている。再生不良性貧血では、HLA-DR2抗原の保有率が高いこと以外、疾患感受性遺伝子について十分には検討されていない。そこで本研究では、再生不良性貧血における疾患感受性遺伝子を明らかにするため、再生不良性貧血の病態への関与が知られている熱ショック蛋白質 (heat shock protein, HSP) 70遺伝子のHSP70-2及びHSP70-Homと、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF) α 遺伝子の対立遺伝子 (アリル, allele) 型を、再生不良性貧血患者80名について決定した。再生不良性貧血患者群におけるHSP70-2アリルの構成は、8.5kbホモ接合体が29%、8.5kbと9.0kbのヘテロ接合体が54%、9.0kbホモ接合体が17%であり、これらは健常人群の構成と同様であった。HSP70-HomについてはHom-1ホモ接合体が再生不良性貧血患者群の85%を占めていたが、やはり健常人群の構成と同様であった。一方、再生不良性貧血患者群では、TNF1ホモ接合体の割合が健常人群より有意に低く、逆にTNF1とTNF2のヘテロ接合体の割合が有意に高かった。免疫抑制剤のシクロスポリンが奏効した再生不良性貧血患者では、無効に終わった患者に比べて、9.0kbのアリルを持つ頻度が有意に高かった ($p<0.0003$)。一方、HSP70-HomやTNF α 遺伝子については、免疫抑制療法に対する反応性とアリルとの間に明らかな関係は見られなかった。また、シクロスポリン高反応性のマーカーであるHLA-DRB1*1501が陽性の再生不良性貧血例の中でも、9.0kbのアリルを持たない例では、シクロスポリンの有効率が低かった。したがってこのHSP70-2のアリルは、免疫学的機序による再生不良性貧血の病態に関与していることが示唆された。また、再生不良性貧血の家系内発症の4家系について、各家系の患者同士が共有するアリルを検索したところ、3家系6症例がHLA-DRB1*1501またはHSP70-2の9.0kbアリルを共有していた。以上の結果から、HLA-DRB1*1501とは別に、HSP 70-2の9.0kbアリルは免疫学的機序による再生不良性貧血の疾患感受性に関与していることが示唆された。

Key words aplastic anemia, heat shock protein 70-2, tumor necrosis factor α gene, polymorphism, cyclosporine

慢性関節リウマチやインスリン依存性糖尿病などの自己免疫疾患では、主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex) であるヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 遺伝子の多型性がその疾患のかかりやすさを決定している¹⁾。再生不良性貧血は汎血球減少と骨髄低形成を主徴とする原因不明の症候群であるが、その大部分が免疫抑制療法に反応して改善することから、最近では自己免疫疾患の一つととらえられている²⁾。このため、再生不良性貧血においても疾患感受性とHLAとの関係が検索されてきた。その結果、再生不良性貧血患者ではHLA-DR2の保有率が高いことや³⁴⁾、HLA-DR2の対立遺伝子 (アリル, allele) の一つであるHLA-DRB1*1501が、

シクロスポリン療法に対する高反応性と関係することなどが示されてきた⁵⁾。しかし、その他の遺伝子については十分な検討は行われていない。

熱ショック蛋白質 (heat shock protein, HSP) 70遺伝子や腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF) α 遺伝子はHLAの遺伝子領域の近傍に位置している⁶⁷⁾ (図1)。このため、HLA遺伝子と同様に、これらの遺伝子の多型性が自己免疫疾患のかかりやすさに影響を及ぼしている可能性がある。実際に全身性エリテマトーデス⁸⁹⁾やインスリン依存性糖尿病¹⁰⁻¹³⁾、強直性脊椎炎¹⁴⁾などにおいて、これらの遺伝子の特定のアリルが疾患感受性に関与していることが示されている。

平成10年11月26日受付、平成11年1月6日受理

Abbreviations : ATG, antithymocyte globulin; CyA, cyclosporine A; HLA, human leukocyte antigen; hetero, heterozygotes; homo, homozygotes; HSP, heat shock protein; RFLP, restriction fragment length polymorphism; TNF, tumor necrosis factor

HSP70はHSP70-1, 70-2, 70-Homの3種類の遺伝子によりコードされている¹⁵⁾. HSP70-1とHSP70-2は, 熱ストレスにより強く誘導されるHSP70 (HSP72) を主にコードしている. 一方, HSP70-Homは, 定常状態においてもわずかに発現しているHSP70 (HSP73) をコードしている. HSPは, 熱ショックのみならず, 低酸素状態, 低グルコース状態, 重金属イオン, アルコール, ウイルス感染など, 生命に危険を及ぼすさまざまなストレスによって細胞内に誘導される蛋白質の一群である¹⁶⁾. ストレス下では変性した蛋白質に, また生理的状态では成熟過程の不完全な蛋白質に一過性に結合し, それらの再生や成熟を助けている¹⁷⁾¹⁸⁾. このような, 細胞内の恒常性を維持する分子シャペロンとしての機能を通して, HSPは細胞内における外来抗原の処理・輸送・提示などに関与することから, 免疫系においても重要な役割を担っていると考えられている¹⁹⁾. さらにHSPについては, 自己免疫疾患における標的抗原としての役割も報告されている²⁰⁾.

最近Corzoら²¹⁾は, 向精神薬のクロザピンによって起こる無顆粒球症の疾患感受性が, HSP70-2の多型性と関係があることを報告した. 一方Takamiら²²⁾は, シクロスポリンが有効な再生不良性貧血患者では, 熱ショックを与えた末梢血Tリンパ球中のHSP72の発現が亢進していることを明らかにした. HSP70-2の多型性は, HSP72の発現に影響を及ぼす可能性も指摘されている¹³⁾. したがって, HSP70-2の多型性は, 再生不良性貧血のような自己免疫性の造血障害の発症に影響を及ぼして

いる可能性がある. そこで本研究では, 免疫抑制療法を受けた再生不良性貧血患者についてHSP70遺伝子とTNF α 遺伝子のアリル型を決定し, これらのアリルの種類が再生不良性貧血のかかりやすさと関係があるか否か, また, シクロスポリンのような免疫抑制剤に対する反応性に影響を及ぼすか否かを検討した. また, これらのアリルの疾患感受性遺伝子としての意義を明らかにするため, 家系内発症を認めた再生不良性貧血例について, 各家系が共有するアリルの有無を検索した.

対象および方法

1. 対象

金沢大学医学部附属病院第三内科および厚生省特定疾患特発性造血障害調査研究班の参加施設で診断された再生不良性貧血患者80例を対象とした. 重症度分類はCamittaら²³⁾の基準にしたがった. 対象患者の特徴を表1に示す. このうち, 発症後2年以内にシクロスポリン 3~6mg/kg/日を3ヶ月間以上投与された再生不良性貧血患者で, 治療効果の判定が下されている55例をシクロスポリン投与群とした. また, 発症後2年以内に抗胸腺細胞グロブリン (antithymocyte globulin, ATG) 15mg/kgを連続5日間投与された再生不良性貧血患者で, 治療効果の有無が明らかな24例をATG群とした. シクロスポリンとATGを同時に投与された症例 (2例) はATG群に分類した. シクロスポリンが無効であった症例のうち, その後ATGを投与された症例 (5例) はそれぞれの治療群に含めて解析した. 治療後に輸血が不要となり, かつ治療前と比較してヘモグロビン値が2g/dl以上上昇した例を反応良好と判定した.

2. DNAの抽出

患者から同意を得たのち, EDTA加末梢血2mlを採取し, スマイテストDNA抽出キット (住友金属工業, 東京) を用いてDNAを抽出した. 吸光度計を用いてDNA回収量を測定し, 濃度を0.1 μ g/ μ lに調整した.

3. PCR

1. HSP70-2

HSP70-2は1267番目の塩基がアデニンかゲアニンであり, グ

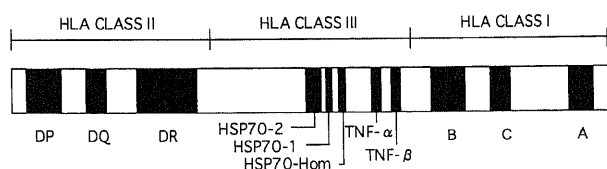


Fig. 1. Location of three genes encoding HSP70 (HSP70-1, HSP70-2 and HSP70-Hom) and the TNF genes (TNF α and TNF β) in the HLA class III region.

Table 1. Characteristics of patients with aplastic anemia

Characteristics	CyA-treated patients	ATG-treated patients	Others
No. of patients	55	24	6
M : F	25 : 30	17 : 7	3 : 3
Age (median) (years)	7 ~ 78 (48)	1 ~ 72 (29)	13 ~ 72 (52)
Severity			
Severe	31	16	2
Moderate	24	8	4
Disease duration (months)			
less than 6	38	16	6
from 6 to 12	11	6	0
from 12 to 24	6	2	0
Response to therapy			
Response	32	16	NE
No response	23	8	NE

Five patients that were sequentially treated both with CyA and ATG were included in each patient group. CyA, cyclosporine A; ATG, antithymocyte globulin; NE, not evaluable; M, Male; F, female.

アニンの場合、制限酵素 *Pst* I に認識される塩基配列となる。このため HSP70-2 は、*Pst* I による認識部位の有無により、*Pst* I で消化される 8.5kb と、消化されない 9.0kb の 2 種類のアリルに分けられる。図 2A において、*Pst* I 消化により 1139bp と 936bp の 2 本のバンドに分かれるものが 8.5kb アリル、消化されずに 2075bp のバンドが残るものが 9.0kb アリルを示している。その結果、全ての個体は 8.5kb アリルのホモ接合体、8.5kb と 9.0kb アリルのヘテロ接合体、9.0kb アリルのホモ接合体のいずれかに分けられる²⁴⁾ (図 2A)。

HSP70-2 の *Pst* I 認識部位を含む DNA 断片を増幅するために、HSP70-2 に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを作成した²⁴⁾ (表 2)。なお、結果の再現性を確認するため、表 2 のように異なる 2 組のプライマー (a), (b) を作成した。

0.1 μ g の被験 DNA を 10 倍濃度の PCR 反応緩衝液 (100mM Tris-HCl pH8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂) (宝酒造, 東京) 2 μ l, 各 2.5mM の 4 種類のデオキシヌクレオチド三リン酸混合液 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (宝酒造) 1.6 μ l, 1 μ M の各プライマー 1 μ l ずつ, 1 単位の Taq DNA ポリメラーゼ (宝酒造) と混

合し、さらに純水 (和光純薬, 大阪) を加え、総量を 20 μ l とした。これを、0.5ml のチューブ (Treff AG, Bern, Switzerland) に入れ、蒸発を防ぐためにミネラルオイル (Sigma, St. Louis, USA) を一滴重層したのち、サーマルサイクラー (Cetus/Perkin-Elmer, Norwalk, USA) を用いて PCR を行った。DNA 変性、アニーリング、プライマー伸張のためのそれぞれの反応温度と反応時間については、表 3 のように各遺伝子ごとに至適条件を設定した。

2. HSP70-Hom

HSP70-Hom は 2437 番目の塩基がシトシンかチミンであり、チミンの場合、制限酵素 *Nco* I に認識される塩基配列となる。このため、HSP70-Hom は、*Nco* I による認識部位の有無により、*Nco* I で消化される Hom-1 と、消化されない Hom-2 の 2 種類のアリルに分けられる。図 2B において、*Nco* I 消化により 324bp と 302bp の 2 本のバンドに分かれるものが Hom-1 アリル、消化されずに 626bp のバンドが残るものが Hom-2 アリルを示している。その結果、全ての個体は Hom-1 アリルのホモ接合体、Hom-1 と Hom-2 アリルのヘテロ接合体、Hom-2 アリルのホモ接

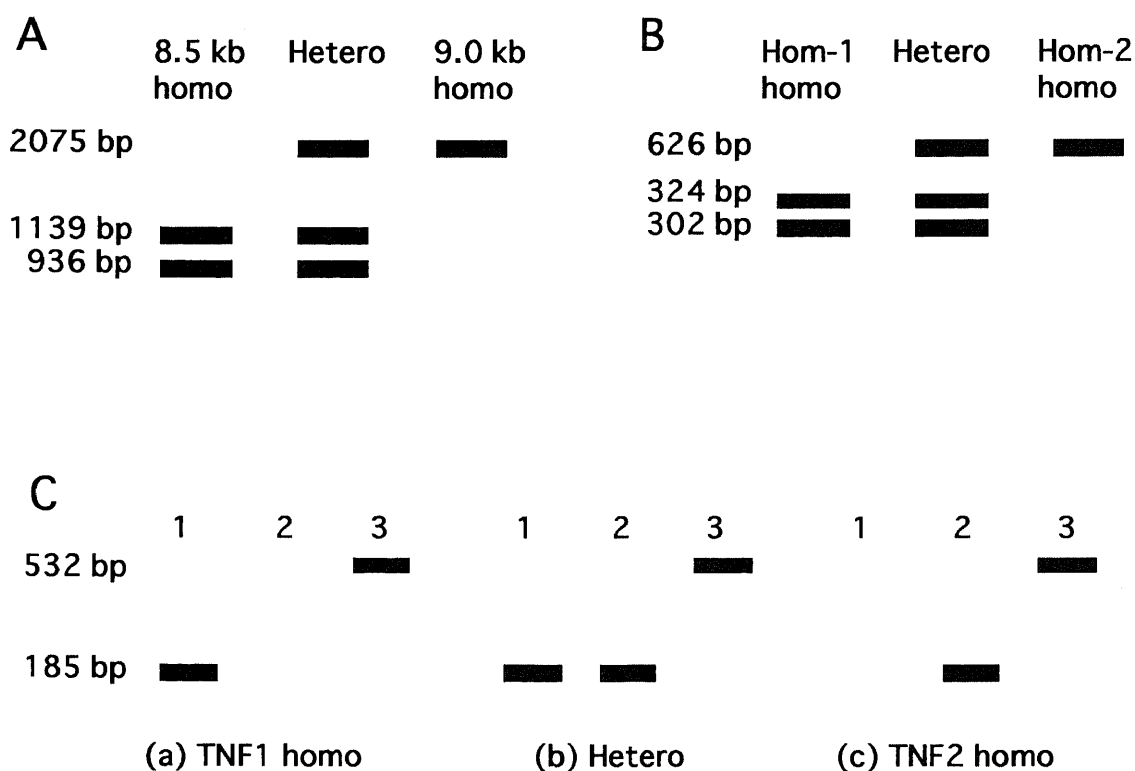


Fig. 2. Scheme for the determination of alleles in the HSP70-2, HSP70-Hom and TNF α genes. (A) Allelic patterns of HSP70-2. The HSP70-2 PCR products were digested with *Pst* I. The cleaved products showing 1139 bp and 936 bp fragments after digestion correspond to the 8.5 kb allele, while the 2075 bp products after digestion correspond to the 9.0 kb allele. 8.5 kb homo, 8.5 kb homozygotes; hetero, 8.5 kb/9.0 kb heterozygotes; 9.0 kb homo, 9.0 kb homozygotes. (B) Allelic patterns of HSP70-Hom. The HSP70-Hom PCR products were digested with *Nco* I. The cleaved products showing 324 bp and 302 bp fragments correspond to the Hom-1 allele, while the 626 bp products after digestion correspond to the Hom-2 allele. Hom-1 homo, Hom-1 homozygotes; hetero, Hom-1/Hom-2 heterozygotes; Hom-2 homo, Hom-2 homozygotes. (C) Allelic patterns of the TNF α gene. Genotypes were identified as TNF1 or TNF2 homozygotes, if the single 185 bp fragment appeared exclusively in the C1-C2 or C1-C3 primer sets' reactions. Genotypes were identified as TNF1/TNF2 heterozygotes, if the 185 bp fragment appeared in both C1-C2 and C1-C3 primer sets' reactions. The 532 bp fragment, amplified with C1-C4 primers, served as an internal control. TNF1 homo, TNF1 homozygotes; hetero, TNF1/TNF2 heterozygotes; TNF2 homo, TNF2 homozygotes; lane 1, amplified product of TNF1 allele; lane 2, amplified product of TNF2 allele; lane 3, internal control.

Table 2. Nucleotide primers used for PCR, and RFLP analysis of the amplified DNA fragments

Gene	Primers	Sequence	Size of amplified fragments (bp)	RFLP		
				Enzyme	Restriction site	Length the digested fragments (bp)
HSP70-2 (a)	(S)	5'-TCC GAA GGA CTG AGC TCT TG-3'	2075	<i>Pst</i> I	1267	1139, 936
	(A)	5'-CAG CAA AGT CCT TGA GTC CC-3'				
HSP70-2 (b)	(S)	5'-TTT GAG GGC ATC GAC TTC TAC ACG-3'	1098	<i>Pst</i> I	1267	191, 907
	(A)	5'-CTC AAA GAC AAA CAT ACT AAA GAA-3'				
HSP70-Hom	(S)	5'-GGA CAA GTC TGA GAA GGT ACA G-3'	626	<i>Nco</i> I	2437	324, 302
	(A)	5'-CAT CTT TCT CTG CCA GTT G-3'				
TNF α	(C1)	5'-TCT CGG TTT CTT CTC CAT CG-3'	532			
	(C2)	5'-ATA GGT TTT GAG GGG CAT GG-3'				
	(C3)	5'-ATA GGT TTT GAG GGG CAT GA-3'				
	(C4)	5'-GAG TCT CCG GGT CAG AAT GA-3'				

RFLP, restriction fragment length polymorphism; HSP, heat shock protein; TNF, tumor necrosis factor; S, sense primer; A, antisense primer; C1, 3'-primer; C2, 5'-primer, complementary to the TNF1 allele; C3, 5'-primer, complementary to the TNF2 allele; C4, internal control primer; bp, base pair.

Table 3. Conditions for PCR

Gene	Denaturation	Annealing	Extension	Cycles
	[Temperature (°C) / Duration (sec)]	[Temperature (°C) / Duration (sec)]	[Temperature (°C) / Duration (sec)]	
HSP70-2 (a)	94/60	59/60	72/180	35
HSP70-2 (b)	94/60	57/60	72/180	35
HSP70-Hom	94/60	55/60	72/180	30
TNF α	95/90	60/150	72/60	31

HSP, heat shock protein; TNF, tumor necrosis factor; sec, second.

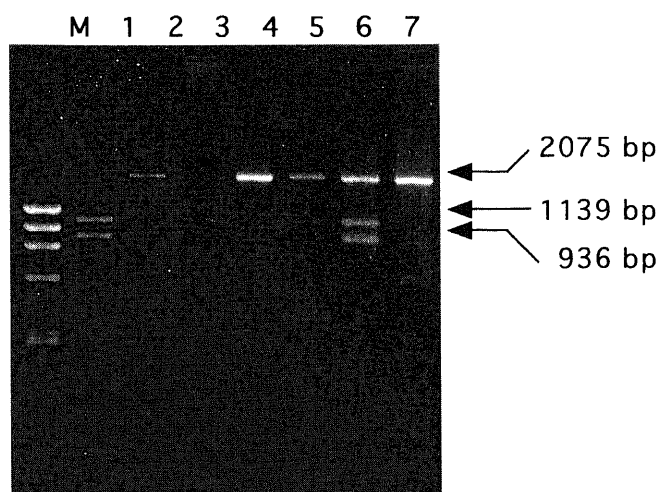


Fig. 3. Allelic patterns of HSP70-2 in patients with aplastic anemia. M, molecular weight marker; lanes 1 to 7, patients No.31 to 37, respectively. Lanes 1 and 3, 8.5 kb homozygotes; lanes 2, 5 and 6, 8.5 kb/9.0 kb heterozygotes; lanes 4 and 7, 9.0 kb homozygotes.

合体のいずれかに分けられる²⁴⁾(図2B).

HSP70-Homについても, HSP70-2と同様に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを作成し²⁴⁾(表2), *Nco* I 認識部位を含むDNAを増幅した.

3. TNF α 遺伝子

TNF α 遺伝子は308番目の塩基がグアニンかアデニンかによってTNF1, TNF2の2種類のアリルに分けられる. このため全ての個体は, TNF1アリルのホモ接合体, TNF1とTNF2アリルのヘテロ接合体, TNF2アリルのホモ接合体のいずれかとなる²⁵⁾(図2C).

これらのアリルを増幅するため, TNF1, TNF2に共通する3'側のプライマー (C1) と, TNF1またはTNF2に特異的な5'側のプライマー (C2, C3), さらに内部対照としてのプライマー (C4) を作成し, C1とC2, C3, C4とを組み合わせPCRを行った²⁵⁾. TNF1およびTNF2アリルはどちらも185bpのバンドとして示され, 内部対照は532bpのバンドとして示される (図2C).

IV. 制限酵素によるPCR増幅産物の消化

HSP70-2の制限酵素切断片長多型 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) を検出するため, 0.5mlのエッペンドルフチューブ (Treff AG, Bern, Switzerland) に増幅産物8 μ lを取り, 制限酵素*Pst* I (東洋紡績, 東京) 1 μ l, 10倍濃度の反応液 (500mM Tris-HCl pH7.5, 100mM MgCl₂, 1000mM NaCl, 10mM

Table 4. Polymorphism analysis and response to immunosuppressive therapy

Patient No.	Age/Sex	Severity	HLA-DRB1*1501	Polymorphism			Response	
				HSP70-2	HSP70-Hom	TNF α	CyA	ATG
1	60/F	MAA	ND	Hetero	Hom-1 homo	Hetero	×	NE
2	66/F	SAA	-	8.5 kb homo	Hom-1 homo	Hetero	×	NE
3	65/M	MAA	-	Hetero	Hom-1 homo	Hetero	○	NE
4	78/F	SAA	-	Hetero	ND	Hetero	○	NE
5	60/F	MAA	-	8.5 kb homo	Hom-1 homo	Hetero	×	NE
6	20/M	SAA	ND	9.0 kb homo	Hom-1 homo	Hetero	○	NE
7	54/M	MAA	ND	8.5 kb homo	Hom-1 homo	Hetero	×	NE
8	28/M	MAA	ND	Hetero	Hom-1 homo	TNF1 homo	×	NE
9	57/M	SAA	ND	9.0 kb homo	Hom-1 homo	Hetero	○	NE
10	28/M	MAA	+	Hetero	Hom-1 homo	Hetero	○	NE
11	70/M	SAA	ND	Hetero	ND	TNF1 homo	NE	NE
12	53/M	MAA	-	Hetero	Hom-1 homo	TNF2 homo	○	NE
13	19/M	MAA	+	Hetero	Hetero	Hetero	○	NE
14	39/F	MAA	+	Hetero	Hom-1 homo	Hetero	○	NE
15	54/F	SAA	-	Hetero	Hom-1 homo	Hetero	×	×
16	54/M	SAA	ND	8.5 kb homo	Hom-1 homo	Hetero	×	○
17	24/M	SAA	+	9.0 kb homo	Hom-1 homo	Hetero	○	NE
18	34/F	MAA	ND	8.5 kb homo	Hom-1 homo	Hetero	○	NE
19	44/F	MAA	+	8.5 kb homo	ND	Hetero	×	NE
20	41/F	MAA	ND	8.5 kb homo	ND	TNF1 homo	×	NE
21	69/M	SAA	ND	Hetero	Hom-1 homo	ND	○	NE
22	53/F	MAA	-	Hetero	Hom-1 homo	Hetero	×	○
23	44/M	SAA	ND	8.5 kb homo	Hom-1 homo	Hetero	×	NE
24	54/F	SAA	+	Hetero	Hetero	Hetero	○	NE
25	44/F	SAA	-	Hetero	Hom-1 homo	TNF1 homo	○	NE
26	63/M	MAA	+	Hetero	Hom-1 homo	Hetero	○	NE
27	24/F	MAA	+	8.5 kb homo	Hetero	TNF1 homo	×	NE
28	32/M	MAA	+	9.0 kb homo	ND	TNF1 homo	NE	○
29	17/M	SAA	-	8.5 kb homo	Hom-1 homo	Hetero	×	○
30	55/M	SAA	+	8.5 kb homo	ND	ND	NE	○
31	59/F	SAA	+	8.5 kb homo	ND	ND	○	NE
32	72/F	SAA	ND	Hetero	ND	ND	NE	NE
33	69/M	MAA	ND	8.5 kb homo	ND	ND	×	NE
34	52/F	MAA	ND	9.0 kb homo	ND	Hetero	NE	NE
35	40/F	MAA	-	Hetero	Hom-1 homo	Hetero	×	NE
36	48/F	SAA	ND	Hetero	Hom-1 homo	Hetero	×	NE
37	68/M	SAA	-	9.0 kb homo	Hom-1 homo	Hetero	○	NE
38	70/M	MAA	+	8.5 kb homo	ND	TNF1 homo	NE	○
39	20/M	MAA	-	Hetero	ND	Hetero	NE	×
40	19/M	SAA	-	Hetero	ND	Hetero	NE	×
41	56/F	SAA	-	Hetero	ND	TNF1 homo	NE	×
42	52/F	SAA	-	9.0 kb homo	ND	Hetero	NE	○
43	25/M	MAA	-	Hetero	ND	Hetero	NE	○
44	64/M	MAA	-	9.0 kb homo	ND	TNF1 homo	NE	○
45	20/M	SAA	-	Hetero	ND	Hetero	NE	×
46	46/M	SAA	-	Hetero	ND	Hetero	NE	○
47	55/M	SAA	-	Hetero	Hetero	Hetero	×	NE
48	38/M	MAA	+	8.5 kb homo	Hom-1 homo	Hetero	×	NE
49	52/F	SAA	-	Hetero	Hom-1 homo	Hetero	○	NE
50	70/F	SAA	+	8.5 kb homo	Hom-1 homo	TNF1 homo	○	NE
51	1/M	SAA	-	Hetero	ND	Hetero	NE	○
52	12/M	SAA	+	8.5 kb homo	ND	Hetero	NE	○
53	72/F	SAA	+	Hetero	ND	Hetero	NE	○
54	24/M	SAA	-	9.0 kb homo	ND	Hetero	NE	○
55	50/F	SAA	-	9.0 kb homo	Hom-1 homo	Hetero	○	NE
56	60/F	MAA	-	Hetero	Hom-1 homo	Hetero	○	NE
57	18/F	SAA	+	Hetero	Hom-1 homo	Hetero	○	NE
58	56/F	SAA	-	Hetero	Hom-1 homo	Hetero	○	NE
59	4/M	MAA	+	9.0 kb homo	ND	Hetero	×	×
60	3/M	MAA	+	Hetero	ND	Hetero	×	×
61	7/M	SAA	+	8.5 kb homo	Hom-1 homo	TNF1 homo	○	NE
62	44/F	MAA	-	8.5 kb homo	Hom-1 homo	TNF2 homo	NE	NE
63	9/F	SAA	+	Hetero	Hom-1 homo	TNF1 homo	○	NE
64	47/F	SAA	+	Hetero	Hom-1 homo	Hetero	○	NE
65	69/M	MAA	+	Hetero	Hom-1 homo	Hetero	○	NE
66	24/F	MAA	-	Hetero	Hetero	Hetero	○	NE
67	17/F	SAA	+	Hetero	Hetero	TNF1 homo	NE	○
68	13/F	SAA	+	Hetero	Hetero	TNF1 homo	NE	○
69	30/F	SAA	ND	9.0 kb homo	ND	ND	×	NE
70	26/F	SAA	ND	9.0 kb homo	ND	ND	○	NE
71	26/F	MAA	ND	Hetero	ND	ND	○	NE
72	48/M	MAA	ND	8.5 kb homo	ND	ND	×	NE
73	68/M	SAA	ND	Hetero	Hom-1 homo	Hetero	○	NE
74	64/F	SAA	+	9.0 kb homo	Hetero	Hetero	○	NE
75	32/M	SAA	ND	8.5 kb homo	Hom-1 homo	Hetero	×	×
76	52/M	MAA	ND	8.5 kb homo	ND	TNF1 homo	NE	NE
77	13/M	MAA	-	Hetero	Hom-1 homo	Hetero	NE	NE
78	8/M	SAA	-	Hetero	Hom-1 homo	Hetero	×	NE
79	19/M	SAA	+	8.5 kb homo	Hom-1 homo	TNF1 homo	×	NE
80	13/F	MAA	+	Hetero	Hetero	TNF1 homo	○	NE

M, male; F, female; SAA, severe aplastic anemia; MAA, moderate aplastic anemia; HLA, human leucocyte antigen; HSP, heat shock protein; TNF, tumor necrosis factor; hetero, heterozygotes; ND, not determined; CyA, cyclosporine A; ATG, antithymocyte globulin; NE, not evaluable. Criteria of response (○) include a resolution of all transfusion requirements and a rise in the hemoglobin level of 2 g/dl or more without transfusions.

ジチオトレイトール) (東洋紡績) 1 μ lを加え, 37℃の恒温槽で2時間保温した. HSP70-Homの増幅産物に対しては制限酵素 *Nco* I (東洋紡績) を用いて同様の処理を行った.

V. 電気泳動による RFLP の検出

PCRによる増幅産物および制限酵素による消化産物を, 電気泳動装置 (ミニゲルスラブ電気泳動装置, 日本エイドー, 東京) と1.5%アガロースゲルを用いて, 100V定電圧下で40分間電気泳動した. エチジウムブロマイドで染色後トランスイルミネーター (UVP, フナコシ, 東京) 上で写真撮影した. 分子量マーカーとして ϕ X174 2本鎖DNAの *Hae* III消化物 (マーカー4, ニッポンジーン, 東京) を用いた.

VI. 一本鎖DNA高次構造多型 (single strand conformation polymorphism) による PCR 増幅産物の解析

一本鎖のDNAはその塩基配列にしたがって独自の立体構造をとる. このため, 一塩基でも異なるものがあれば, たとえ同じ長さのDNA断片であっても, 非変性ゲルで電気泳動を行うと異なる泳動度を示す²⁶⁾. この原理を利用して既知のRFLP以外に, HSP70-2に多型性があるかどうかを検討した.

5 μ lのPCR増幅産物に95%ホルムアミド, 10mM EDTA, 0.1%プロモフェノールブルー, 0.1%キシレンを含む溶液5 μ lを加えて, 95℃で2分間保温した. 氷上で急速に冷却した検体を5%ポリアクリルアミドゲルを用いて, 13V/cmで2時間電気泳動した. 泳動終了後のゲルをサイバーグリーン (FMC BioProducts, Rockland, USA) で染色後トランスイルミネーター上で写真撮影した.

VII. 統計学的解析

2群間の比較はフィッシャー法 (Fisher's exact probability test) および χ^2 独立性の検定を用いて行った.

成 績

表4に全症例のHSP70-2, HSP70-HomおよびTNF α 遺伝子の多型性の解析結果を示す.

I. HSP70-2の多型性

HSP70-2の多型性を解析したアガロースゲル電気泳動像の一部を図3に示す.

1. 再生不良性貧血患者における HSP70-2 アリルの頻度

各症例のHSP70-2アリルの組み合わせを決定したところ, 8.5kbホモ接合体は23例 (29%), 8.5kbと9.0kbのヘテロ接合体は43例 (54%), 9.0kbホモ接合体は14例 (17%) であった. それぞれの割合を健常人31例についての報告¹²⁾と比較したところ, 有意な差は認められなかった (表5).

2. HSP70-2の多型性とシクロスポリン療法に対する反応性

HSP70-2のアリルとシクロスポリンに対する反応性との関係を検討した. シクロスポリンを投与した患者55名のうち, 8.5kbホモ接合体は18例, 8.5kbと9.0kbのヘテロ接合体は29例, 9.0kbホモ接合体は8例で, シクロスポリンの奏効率はそれぞれ22%, 72%, 88%であり, 8.5kbホモ接合体は他の群に比べて有意に奏効率が低かった ($p<0.0006$, フィッシャー法) (図4A). 全ての患者を9.0kbアリルを持つ群 (9.0kbホモ接合体および8.5kbと9.0kbのヘテロ接合体, 37例) と9.0kbアリルを持たない群 (8.0kbホモ接合体, 18例) とに分けて比較したところ, 前者におけるシクロスポリンの奏効率は後者に比べて有意に高かった (それぞれ76%と22%, $p<0.0003$, フィッシャー法) (図4B). また, シクロスポリン有効群における9.0kbのアリル頻度

(55%) は, シクロスポリン無効群における9.0kbのアリル頻度 (22%) に比べて有意に高かった ($p<0.0006$, χ^2 独立性の検定).

HLA-DRB1*1501陽性の再生不良性貧血症例は, シクロスポリン療法に反応して改善しやすいことが知られているが, 全ての症例が高反応性を示すわけではない⁵⁾. このためHLA-DRB1*1501陽性の再生不良性貧血の中には, 免疫抑制療法に対する反応性を規定する他の因子について異種性 (heterogeneity) があることが予想された. そこでHLA-DRB1*1501陽性の再生不良性貧血患者を対象として, HSP70-2のアリルの組み合わせによる, シクロスポリン療法の効果の違いを検討した. 図5Aに示すように, 9.0kbホモ接合体および8.5kbと9.0kbのヘテロ接合体は全例シクロスポリンに反応して改善したが, 8.5kbホモ接合体では7例中4例が反応せず無

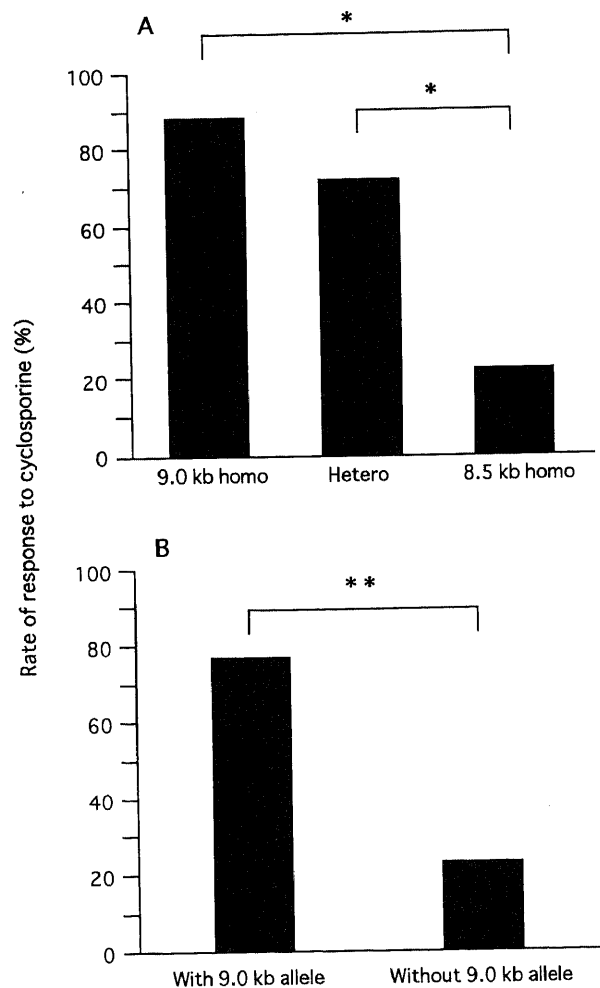


Fig. 4. Rate of response to cyclosporine therapy in aplastic anemia patients. (A) All patients were divided into three groups according to the allelic combination, 8.5 kb homozygotes (8.5 kb homo, n=18), 8.5 kb/9.0 kb heterozygotes (hetero, n=29) and 9.0 kb homozygotes (9.0 kb homo, n=8) with regard to HSP70-2, and the rate of response to cyclosporine therapy was compared. * $p<0.0006$ by Fisher's exact probability test. (B) All patients were divided into two groups, the patients possessing the 9.0 kb allele (n=37) of HSP70-2 and those not possessing the allele (8.5 kb homozygotes, n=18), and the rate of response to cyclosporine therapy was compared. ** $p<0.0003$ by the chi square test.

効と判定された。逆に、HLA-DRB1*1501陰性の再生不良性貧血患者を対象としてシクロスポリンに対する反応性の違いを比較したところ、8.5kb ホモ接合体例の全例でシクロスポリンが無効であった (図5B)。

HLA-DRB1*1501 ホモ接合体の健常人および患者を対象としてHSP70-2のアリルを決定したところ、9.0kb アリルの頻度は62%、8.5kb アリルの頻度は38%であった。したがって、HLA-DRB1*1501 とHSP70-2の9.0kb アリルとの間には、明らかな連鎖不平衡はないと考えられた。

9.0kb アリルを有するシクロスポリン反応例および不反応例について、*Pst* I 認識部位以外の多型性がないか否かをSSCP法を用いて解析したところ、すべてが同じ泳動パターンを示した (図6)。したがって、HSP70-2の9.0kb 陽性例におけるシクロスポリン療法の効果の差は、*Pst* I 認識部位以外の多型性によるものではないと考えられた。

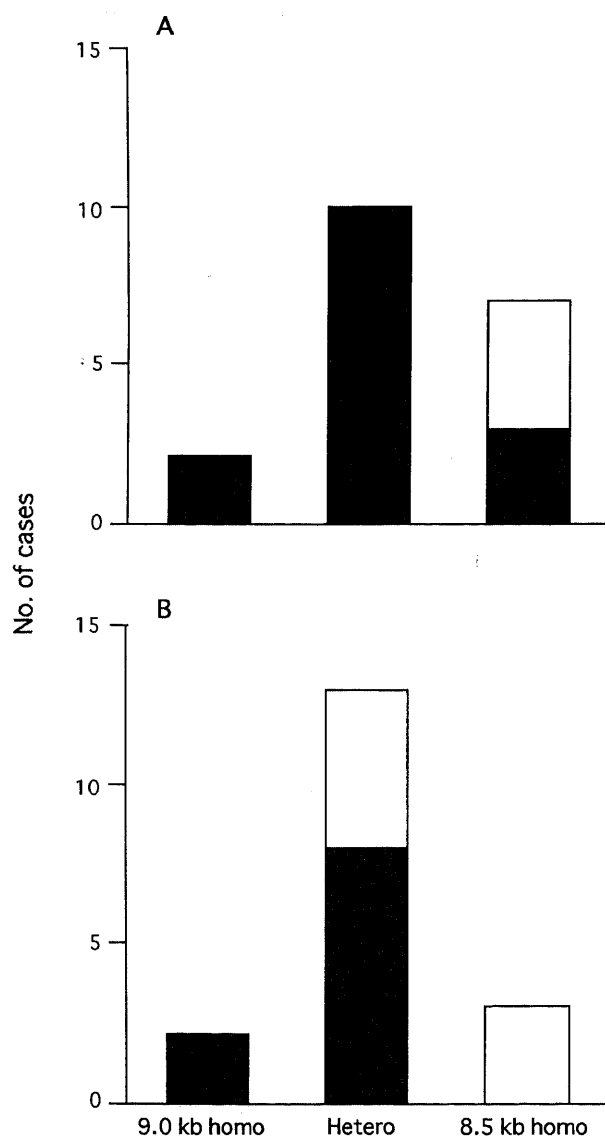


Fig. 5. Response to cyclosporine therapy in patients possessing HLA-DRB1*1501 (A) and in those not possessing the DRB1 allele (B). ■, responsive to cyclosporine; □, refractory to cyclosporine. 9.0 kb homo, 9.0 kb homozygotes; hetero, 8.5 kb/9.0 kb heterozygotes; 8.5 kb homo, 8.5 kb homozygotes.

3. HSP70-2の多型性とATG療法に対する反応性

ATGを投与した患者24名のうち、8.5kb ホモ接合体例は6例、8.5kb と9.0kb のヘテロ接合体例は13例、9.0kb ホモ接合体例は5例であった。HSP70-2のアリルとATGに対する反応性の関係を検討したところ、各群におけるATGの奏効率はそれぞれ83%、58%、75%であり、各群間で有意差はみられなかった (図7A)。全ての患者を9.0kb アリルを持つ群 (9.0kb ホモ接合体および8.5kb と9.0kb のヘテロ接合体, 18例) と9.0kb アリルを持たない群 (8.5kb ホモ接合体, 6例) とに分けた場合も、各群のATGの有効率は61%、83%であり、有意差はみられなかった (図7B)。また、8.5kb アリルを持つ群 (8.5kb ホモ接合体および8.5kb と9.0kb のヘテロ接合体, 19例) と8.5kb アリルを持たない群 (9.0kb ホモ接合体, 5例) とに分けた場合でも、同様に有意差はみられなかった。

4. 末梢血単核細胞におけるHSP72の誘導性と多型性の検討

フローサイトメトリーにより、末梢血単核細胞内のHSP72の発現について報告²²⁾されている28例の再生不良性貧血患者について、HSP70-2アリル型との関係を調べたところ、HSP72の発現が亢進している割合は、9.0kb ホモ接合体が50% (2/4)、8.5kb と9.0kb のヘテロ接合体が53% (9/17)、8.5kb ホモ接合体が57% (4/7) であった。したがって、今回検索した範囲では、アリル型の違いはHSP72の発現に影響を及ぼさないと考えられた。

II. HSP70-Homの多型性

HSP70-Homの多型性を解析したアガロースゲル電気泳動像

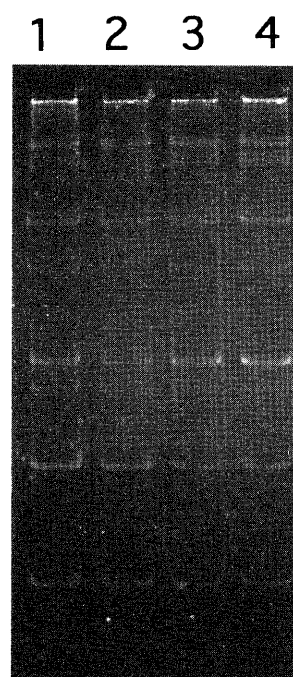


Fig. 6. SSCP analysis of the amplified products of HSP70-2 after *Pst* I digestion. All samples are derived from AA patients possessing 9.0 kb allele. Lanes 1 and 2, aplastic anemia patients responsive to cyclosporine; lanes 3 and 4, aplastic anemia patients refractory to cyclosporine.

の一部を図8に示す。

シクロスポリンを投与された症例のうち46例について、各症例のHSP70-Homアレルの組み合わせを決定したところ、Hom-1ホモ接合体が39例(85%)、Hom-1とHom-2のヘテロ接合体が7例(15%)で、Hom-2ホモ接合体は検出されなかった。健康人50例におけるHSP70-Homのアレル型は、Hom-1ホモ接合体が93%、Hom-1とHom-2のヘテロ接合体が7%、Hom-2ホモ接合体が0%であり²⁷⁾、今回の再生不良性貧血症例の分布と同様であった。また、シクロスポリンに対する反応の有無によらず患者の大部分がHom-1接合体であったことから、HSP70-Homの多型性はシクロスポリンに対する反応性とは無関係と考えられた。

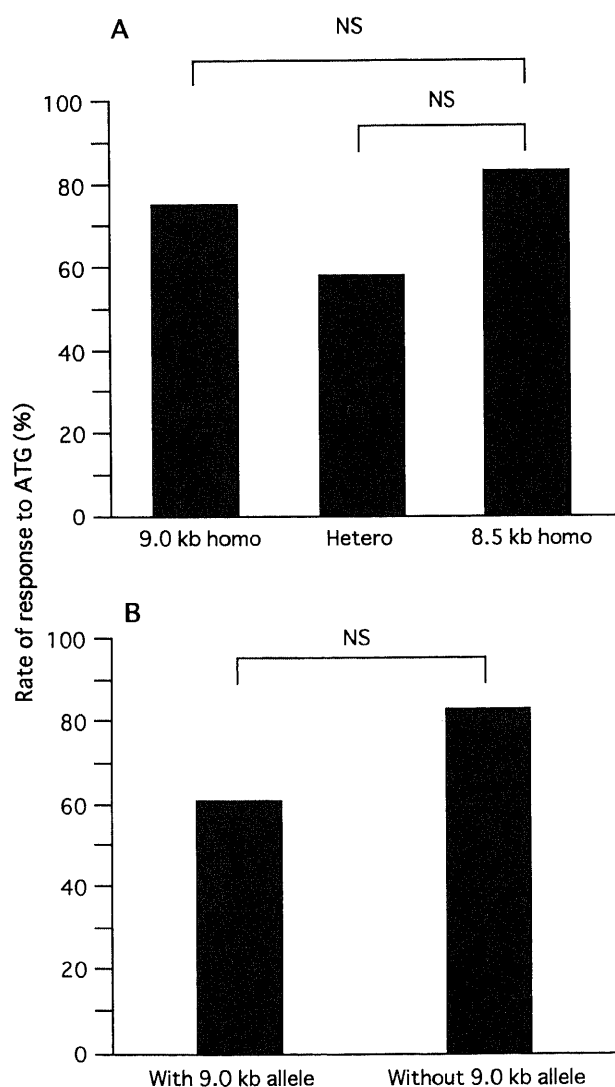


Fig. 7. Rate of response to ATG therapy in aplastic anemia patients. (A) All patients were divided into three groups according to the allelic combination, 8.5 kb homozygotes (8.5 kb homo, n=6), 8.5 kb/9.0 kb heterozygotes (hetero, n=13) and 9.0 kb homozygotes (9.0 kb homo, n=5) with regard to HSP70-2, and the rate of response to ATG therapy was compared. (B) All patients were divided into two groups, the patients possessing the 9.0 kb allele of HSP70-2 and those not possessing the allele (8.5 kb/8.5 kb homozygotes), and the rate of response to ATG therapy was compared. NS, not significant.

Ⅲ. TNF α 遺伝子の多型性

TNF α 遺伝子の多型性を解析したアガロースゲル電気泳動像の一部を図9に示す。

1. 再生不良性貧血患者におけるアレル頻度

80例のうち、71例でTNF α 遺伝子のアレルの組み合わせを決定した。TNF1ホモ接合体は17例、TNF1とTNF2のヘテロ接合体は52例、TNF2ホモ接合体は2例であった(表5)。健康人についての報告²⁸⁾と比べて、TNF1ホモ接合体の頻度は有意に低く($p<0.0001$, χ^2 独立性の検定)、また、TNF1とTNF2のヘテロ接合体の頻度は有意に高かった($p<0.0001$, χ^2 独立性の検定)。

2. TNF α 遺伝子の多型性と免疫抑制療法に対する反応性

TNF α 遺伝子のアレル型による、シクロスポリン療法の奏効率の差を検討したところ、シクロスポリンを投与された患者48例のうち、TNF1ホモ接合体例は9例、TNF1とTNF2のヘテロ接合体例は38例、TNF2ホモ接合体例は1例であった。シクロスポリンに対する反応率はそれぞれ56% (5/9)、58% (22/38)、100% (1/1)で、これらの間に有意差はみられなかった。一方、ATGを投与された患者23例のうち、TNF1ホモ接合体例は6例、

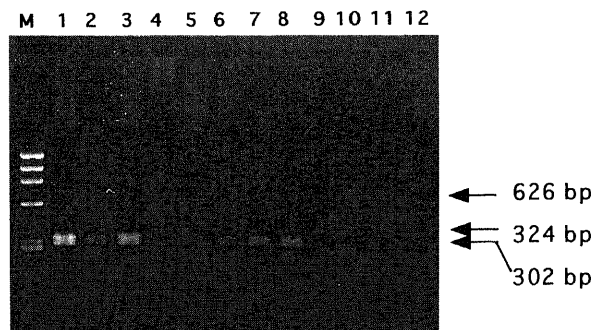


Fig. 8. Allelic patterns of HSP70-Hom in patients with aplastic anemia. DNA of patients No.19 and 20 (lanes 4 and 5) could not be amplified. M, molecular weight marker; lanes 1 to 12, patients No.16 to 27, respectively. Lanes 1, 2, 3, 6, 7, 8, 10 and 11, Hom-1 homozygotes; lanes 9 and 12, Hom-1/Hom-2 heterozygotes.

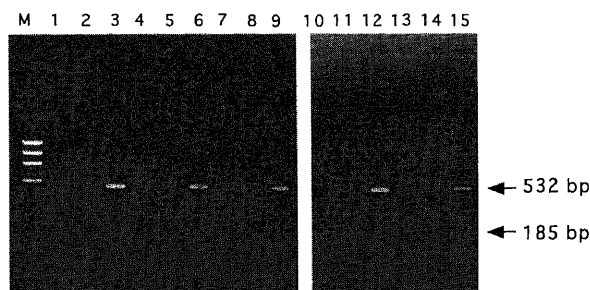


Fig. 9. Allelic patterns of the TNF α gene in patients with aplastic anemia. Lanes 1 to 3, patient No.1; lanes 4 to 6, patient No.2; lanes 7 to 9, patient No.12; lanes 10 to 12, patient No.37; lanes 13 to 15, patient No.38. Patients No.1, 2 and 37, TNF1/TNF2 heterozygotes; patient No.12, TNF2 homozygotes; patient No.38, TNF1 homozygotes.

Table 5. Frequencies of HSP70-2, HSP70-Hom and TNF α alleles in aplastic anemia patients and the control subjects

Genotype	Frequencies		P value
	Controls	Patients	
HSP70-2	(N=31)*	(N=80)	
8.5 kb/8.5 kb	0.13	0.29	NS
8.5 kb/9.0 kb	0.52	0.54	NS
9.0 kb/9.0 kb	0.35	0.17	NS
HSP70-Hom	(N=50)**	(N=46)	
Hom-1/Hom-1	0.93	0.85	NS
Hom-1/Hom-2	0.07	0.15	NS
Hom-2/Hom-2	0	0	NS
TNF α	(N=139)***	(N=71)	
TNF1/TNF1	0.71	0.24	p<0.0001
TNF1/TNF2	0.27	0.73	p<0.0001
TNF2/TNF2	0.02	0.03	NS

HSP, heat shock protein; TNF, tumor necrosis factor; NS, not significant.

*Kawaguchi et al. ¹²⁾; **Ishihara et al. ²⁷⁾; ***Kubota et al. ²⁸⁾.Table 6. Polymorphism analysis on HLA-DRB1, HSP70-2, HSP70-Hom and the TNF α gene of 4 pairs of patients with aplastic anemia in 4 different families

Family No.	Relationship	Allele (s) shared by each patient pair			
		HLA-DRB1	HSP70-2	HSP70-Hom	TNF α
1	Mother/Son	1501	8.5 kb/8.5 kb	Hom-1/Hom-1	Absent
2	Mother/Daughter	1501	8.5 kb/9.0 kb	Hom-1/Hom-1	TNF1
3	Sisters	1501/0101	8.5 kb/9.0 kb	Hom-1/Hom-2	TNF1/TNF1
4	Brothers	1403/1502	8.5 kb/9.0 kb	Hom-1/Hom-1	TNF1/TNF2

HLA, human leucocyte antigen; HSP, heat shock protein; TNF, tumor necrosis factor.

TNF1とTNF2のヘテロ接合体例は17例で、TNF2ホモ接合体例はなかった。ATGに対する反応率はそれぞれ83% (5/6), 53% (9/17) で、これらにも有意差はなかった。

Ⅳ. 家系内発症例における解析

今回解析した80例の中に、家系内発症を認めた例が4家系8症例含まれていた。各家系の患者同士が共有するアリルは、疾患感受性遺伝子として働いている可能性が高い。そこで、HLA-DRB1を含めたHLA領域の遺伝子のうち、各家系が共有するアリルを比較した (表6)。その結果、TNF α 遺伝子は家系1の患者間で共有しているアリルがないことから、疾患感受性との関係は否定的であった。HSP70-HomのHom-1アリルについては、4家系すべてが共有していたが、Hom-1アリルの保有率は健常人でも93%と高率であるため、疾患感受性遺伝子としての意義は不明であった。HSP70-2の9.0kbアリルは4家系中3家系が共有していた。これまで述べたように、9.0kbアリルは再生不良性貧血患者の免疫学的発症機序に関与している可能性があることから、これらの家系内発症例においても、造血障害の成立に影響している可能性がある。しかし、9.0kbアリルを保有する頻度は健常人でも80%以上であるため、家系内発症例

における疾患感受性遺伝子としての意義はやはり不明であった。一方、HLA-DRB1*1501については、4家系中3家系 (75%) の患者が共有していた。本邦の健常人におけるこのHLA-DRB1遺伝子の保有率は高々10%であることから、再生不良性貧血の家系内発症例における疾患感受性遺伝子としては、HLA-DRB1*1501がもっとも重要と考えられた。

考 察

再生不良性貧血患者では、HLA-DR2を保有する割合が健常人に比べて有意に高いことが過去の研究により示されている³⁴⁾。また、HLA-DR2を決定する遺伝子のうちHLA-DRB1*1501を持つ患者ではシクロスポリン療法の奏効率が高く、また、造血能の維持にシクロスポリンを必要とする例が多い⁵⁾。このため、HLA-DRB1*1501は、自己免疫性の再生不良性貧血の疾患感受性遺伝子として重要と考えられている。しかし、HLA-DRB1*1501を持つ再生不良性貧血患者は全体の2割に過ぎず、HLA-DRB1*1501を保有していてもシクロスポリンに全く反応しない症例もある。また、逆にこの遺伝子を持たない患者の中にもシクロスポリン療法が奏効する例は多い。したがって、免

疫学的機序による再生不良性貧血の疾患感受性は、HLA-DRB1*1501以外の、別の遺伝子の影響も受けている可能性がある。

Yunisら²⁹⁾は、向精神病薬のクロザピンによって発症する無顆粒球症の疾患感受性がHLA-B38, DR4, DQ3やHLA-DR2, DQ1などの特定のHLA型の影響を受けることを見いだした。一方、この疾患感受性を規定するHLAアレルのタイプは民族によって異なっていた。このため、実際に疾患感受性と関連があるのは、HLA遺伝子に連鎖した別の遺伝子である可能性が考えられた。そこで、彼らがHSP70-2のアレルを調べたところ、無顆粒球症を起こした患者では、HSP70-2の9.0kbアレルが人種を問わず高率に検出された²¹⁾。したがって、クロザピンによる無顆粒球症の疾患感受性を実際に規定しているのはHSP70-2の9.0kbアレルと考えられた。

HSP70-2の多型性がHSP72の発現に影響を与えるか否かについてはまだよく分かっていない。このため9.0kbアレルが無顆粒球症の疾患感受性を決める機序については推論の域を出ないが、Corzoら²¹⁾は、クロザピンによって造血細胞に誘導されたHSP70が、骨髄中の顆粒球前駆細胞の増殖抑制³⁰⁾、リンパ球のアポトーシスの誘導³¹⁾、顆粒球の産生やアポトーシスからの保護に重要なサイトカインである顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) やインターロイキン2 (interleukin 2) の産生抑制^{32)~34)}、などを介して顆粒球系造血を抑制する可能性を指摘した。一方、8.5kbホモ接合体の個体では、9.0kbホモ接合体の個体よりHSP72の発現が弱いとする報告もあることから¹³⁾、9.0kbアレルを持つ患者は、このアレルを持たない患者よりHSPを強く発現し、その結果、無顆粒球症を引き起こしている可能性がある。したがって、HSP70-2のアレルは、このような薬剤起因性の無顆粒球症だけでなく、特発性の造血幹細胞の障害、すなわち再生不良性貧血の発症にも影響を及ぼすのではないかと考えられた。そこで、再生不良性貧血患者全体についてHSP70-2のアレルの頻度を決定したところ、正常コントロールと比べてアレルのパターンに有意な差はみられなかった。しかしシクロスポリン療法を受けた患者についてアレル頻度をみたところ、9.0kbアレルをもつ例は、このアレルを持たない8.5kbホモ接合体の患者に比べてシクロスポリンに有意に反応しやすいことが明らかになった。したがって当初予想したように、HSP70-2の9.0kbアレルは、免疫学的機序による再生不良性貧血の発症に関与している可能性があると思われた。一方、ATG療法を受けた患者では、HSP70-2アレルの違いによる有意な奏効率の差は認められなかった。シクロスポリンとATGは、ともにT細胞を選択的に抑制する薬剤であるが、ATGの場合、免疫抑制作用とは別に、直接または間接的に造血を刺激する作用のあることが知られている³⁵⁾。このため、ある再生不良性貧血症例がATG療法に反応した場合、必ずしも免疫学的機序が関与していたとはいえない。再生不良性貧血のATGに対する反応性が、9.0kbアレルの影響を受けないのは、このようなATGの造血刺激作用のためかもしれない。

これまでにさまざまな自己免疫疾患において、HSP70-2の多型性とその疾患のかかりやすさとの関係について検討が行われてきた。その結果、一部の疾患では特定のアレルとの関係が示されたが、実際には、それはHLA遺伝子との連鎖不平衡によるものであった^{10)~14)}。したがって、HSP70-2の9.0kbアレルが

再生不良性貧血の免疫学的な発症機序に関与するメカニズムとして、このHSP70-2アレルと、自己免疫性再生不良性貧血の疾患感受性遺伝子であるHLA-DRB1*1501との間に連鎖不平衡があることが考えられた。日本人においては、これらのアレル間に連鎖不平衡があるかどうかについてはほとんど調べられていない。今回、HLA-DRB1*1501のホモ接合体4症例についてHSP70-2のアレルを決定したところ、8.5kbアレルが4例中3例に検出された。したがって、HLA-DRB1*1501と9.0kbアレルの間に明らかな連鎖不平衡はないと考えられた。シクロスポリン反応例の中でHLA-DRB1*1501を持たない例は全例9.0kbアレルを有しており、8.5kbホモ接合体例は一例もなかった。したがって、再生不良性貧血患者における9.0kbアレルは免疫学的機序の存在を示唆する、HLA-DRB1*1501とは独立したマーカーの可能性はある。

HSP70-2の9.0kbアレルはHSP72の高発現を介して、再生不良性貧血の免疫抑制療法に対する高反応性に影響を及ぼしている可能性がある。Pociotら¹³⁾は、HSP70-2の9.0kbホモ接合体の個体は8.0kbアレルを持つものよりHSP72の発現が高いことを報告している。HSP70は細胞をストレスから守る働きを担っているが、T細胞においては、特異的な抗原刺激を受けた際にアポトーシスを促進することが知られている³⁶⁾。Takamiら²²⁾は、シクロスポリン有効群ではHSP72を発現しているTリンパ球の割合が、無効群に比べて有意に高いことを明らかにした。したがって、このようなHSP70-2高発現のT細胞は、免疫抑制剤の存在下ではさらにアポトーシスを受けやすくなり、その結果T細胞による造血の抑制が解除される可能性がある。またHSP70は、シクロスポリンの細胞内レセプターとして機能することが知られている³⁷⁾。したがって、HSP70-2の9.0kbアレルを持つ再生不良性貧血例にシクロスポリンが投与された場合にはT細胞へのシクロスポリンの移行量が多くなり、これによって造血を抑制するT細胞にアポトーシスが誘導され、その結果造血回復が起こる可能性が考えられる。

TNF α は造血幹細胞の増殖・分化を抑制する働きがあり、再生不良性貧血患者ではその産生が亢進している例が多い^{38) 39)}。このためTNF α 遺伝子も再生不良性貧血の病態に関与している可能性がある。さまざまな自己免疫疾患において、TNF α 遺伝子の多型性とその疾患感受性との関係が調べられているが、ほとんどは否定的なものであった^{40)~42)}。今回の検討では、再生不良性貧血におけるTNF1とTNF2のヘテロ接合体の割合は、報告されている健常者群の割合²⁸⁾より有意に高かった。TNF2のアレルを持つ個体はTNF1ホモ接合体の個体より、同種骨髄移植後に急性移植片対宿主病を起こしやすいことが報告されている⁴³⁾。今回の結果からTNF2アレルはTNF α を介した造血の抑制に関与している可能性が考えられる。しかし、TNF α 遺伝子のアレルは免疫抑制療法に対する反応性には影響を及ぼさなかった。したがって、再生不良性貧血の免疫学的機序との関連性は否定的と思われる。

何らかの遺伝子が疾患の感受性に関係しているか否かを調べる上で、もっとも都合の良い対象は家系内発症例である。多型性に富む遺伝子の中で、家系内発症の患者同士が共有するアレルがあれば、それが疾患感受性遺伝子である可能性が高い。さらに、そのような共通のアレルが、異なる家族間で一致していれば、疾患との関連性が強いことが予想される。今回検討した4家系8症例の中でもっとも特徴的な所見は、共有するアレル

の中でHLA-DRB1*1501の頻度が健常者群と比べて著しく高いことであった。したがって、現在のところ再生不良性貧血の疾患感受性を決める遺伝子の中でもっとも重要なものはHLA-DRB1*1501と考えられた。しかし、HSP70-2の9.0kbアリルも4家系中3家系が共有していたことから、このアリルも、再生不良性貧血の家系内発症に関与している可能性がある。これを明らかにするためには、さらに多数の家系内発症例について、HSP70-2のアリル頻度を調べる必要がある。

再生不良性貧血は多種多様の病態を示す症候群であるため、疾患の原因を明らかにし、より良い治療法を開発するためには、共通の特徴を持つ亜群を明らかにする必要がある。今回行ったような疾患感受性遺伝子の検索は、再生不良性貧血の治療法の選択に役立つ可能性がある。再生不良性貧血患者の治療法を選択するには、HLA-DRB1やHSP70-2のタイピングを行い、DRB1*1501や9.0kbアリルが検出された場合には、シクロスポリン療法を行なうべきであろう。このように、病態が多様な再生不良性貧血を遺伝的に亜分類することは、再生不良性貧血の免疫学的な病態を明らかにしていく上でも重要と考えられた。

結 論

再生不良性貧血患者のHSP70遺伝子、TNF α 遺伝子の多型性を解析し、以下の結果を得た。

1. 再生不良性貧血患者に特に頻度が高いHSP70-2のアリルは存在しなかった。
2. HSP70-2の9.0kbアリルを持つ再生不良性貧血患者は、このアリルを持たない8.5kbホモ接合体の患者に比べて有意にシクロスポリンに反応しやすい。
3. HSP70-2のアリルの組み合わせの違いは、ATG療法に対する反応性には影響を与えなかった。
4. 再生不良性貧血患者の中でTNF1とTNF2のヘテロ接合体の占める割合は、健常者群より有意に高かったが、免疫抑制療法に対する反応性とTNF α 遺伝子のアリル型とは無関係であった。
5. HSP70-2の9.0kbアリルは、HLA-DRB1*1501とは別に、再生不良性貧血の免疫学的機序に関与している可能性が示唆された。
6. 再生不良性貧血の家系内発症例の解析から、本疾患の疾患感受性遺伝子としてはHLA-DRB1*1501が最も重要であるが、HSP70-2 9.0kbアリルも関与している可能性が示唆された。
7. 再生不良性貧血患者のHSP70アリルやHLA-DRB1アリルを決定することは、治療法を選択する上で有用と考えられた。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師松田 保教授に深甚なる謝意を表します。また終始、御指導と御助言をいただきました金沢大学医学部附属病院第三内科中尾真二講師に厚く御礼申し上げますとともに、本研究の遂行に際し多大な御協力をいただきました金沢大学医学部第三内科免疫グループの各位に感謝の意を表します。

なお、本論文の一部は、第39回日本臨床血液学会総会(1997, 東京)、第39回アメリカ血液学会(1997, サンディエゴ)、第60回日本血液学会総会(1998, 大阪)において発表した。

文 献

- 1) Nishimura Y, Thorsby E, Ronningen KS, Nelson LJ, Hansen JA, Bias WB, Fauchet R, Dawkins RL, Tiilikainen A,

Salvaneschi L, Martinetti M, Cuccia M, Vaughan RW, Hall M, Boehm BO, Juji T, Ohno S, Farid NR, Bodmer JG, Skamene E, Marsh DG, Svejgaard A, Thomsen AC, Sasazuki T: General organization and overview of the disease component. *In* K Tsuji, M Aizawa, T Sasazuki (eds), HLA 1991 Proceedings of the 11th International Histocompatibility Workshop, p693-700, Oxford University Press, London, 1992

2) Nakao S. Immune mechanism of aplastic anemia. *Int J Hematol* 66: 127-134, 1997

3) Chapuis B, Von Flidner VE, Jeannet M, Merica H, Vuagnat P, Gratwohl A, Nissen C, Speck B. Increased frequency of DR2 in patients with aplastic anemia and increased DR sharing in their parents. *Br J Haematol* 63: 51-57, 1986.

4) Nimer SD, Ireland P, Meshkinpour A, Frane M. An increased HLA DR2 frequency is seen in aplastic anemia patients. *Blood* 84: 923-927, 1994

5) Nakao S, Takamatsu H, Chuhjo T, Ueda M, Shiobara S, Matsuda T, Kaneshige T, Mizoguchi H. Identification of a specific HLA class II haplotype strongly associated with susceptibility to cyclosporine-dependent aplastic anemia. *Blood* 84: 4257-4261, 1994

6) Sargent CA, Dunham I, Trowsdale J, Campbell RD. Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP70. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1968-1972, 1989

7) Spies T, Morton CC, Nedospasov SA, Fiers W, Pious D, Strominger JL. Genes for the tumor necrosis factor α and β are linked to the human major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 8699-8702, 1986

8) Pablos JL, Carreira PE, Martin-Villa JM, Montalvo G, Arnaiz-Villena A, Gomez-Reino JJ. Polymorphism of the heat-shock protein gene HSP70-2 in systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 34: 721-723, 1995

9) Jarjour W, Reed AM, Gauthier J, Hunt S, Winfield JB. The 8.5-kb *Pst* I allele of the stress protein gene, HSP70-2. An independent risk factor for systemic lupus erythematosus in African Americans? *Hum Immunol* 45: 59-63, 1996

10) Caplen NJ, Patel A, Millward A, Campbell RD, Ratanachaiyavong S, Wong FS, Demaine AG. Complement C4 and heat shock protein 70 (HSP70) genotypes and type I diabetes mellitus. *Immunogenetics* 32: 427-430, 1990

11) Pugliese A, Awdeh ZL, Galluzzo A, Yunis EJ, Alper CA, Eisenbarth GS. No independent association between HSP70 gene polymorphism and IDDM. *Diabetes* 41: 788-791, 1992

12) Kawaguchi Y, Ikegami H, Fukuda M, Fujioka Y, Shima K, Ogihara T. Polymorphism of HSP70 gene is not associated with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in Japanese. *Diabetes Res Clin Pract* 21: 103-107, 1993

13) Pociot F, Ronningen KS, Nerup J. Polymorphic analysis of the human MHC-linked heat shock protein 70 (HSP70-2) and HSP70-Hom genes in insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Scand J Immunol* 38: 491-495, 1993

14) Fraile A, Nieto A, Mataran L, Martin J. HSP70 gene polymorphisms in ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* 51:

382-385, 1998

- 15) Milner CM, Campbell RD. Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics* 32: 242-251, 1990
- 16) Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22: 631-677, 1988
- 17) Hightower LE. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell* 66: 191-197, 1991
- 18) Ang D, Liberek K, Skowrya D, Zylicz M, Georgopoulos C. Biological role and regulation of the universally conserved heat shock proteins. *J Biol Chem* 266: 24233-24236, 1991
- 19) Suto R, Srivastava PK. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science* 269: 1585-1588, 1995
- 20) Young RA, Elliott TJ. Stress proteins, infection and immune surveillance. *Cell* 59: 5-8, 1989
- 21) Corzo D, Yunis JJ, Salazar M, Lieberman JA, Howard A, Awdeh Z, Alper CA, Yunis EJ. The major histocompatibility complex region marked by HSP70-1 and HSP70-2 variants is associated with clozapine-induced agranulocytosis in two different ethnic groups. *Blood* 86: 3835-3840, 1995
- 22) Takami A, Nakao S, Zeng WH, Sugimori N, Yamazaki H, Shiobara S, Matsuda T. Heat shock protein 70 (HSP70) is inducible in peripheral blood lymphocytes of aplastic anemia patients responsive to cyclosporine therapy. *Blood* 88: 436a, 1996
- 23) Camitta BM, Thomas ED, Nathan DG, Gale RP, Kopecky KJ, Rapoport JM, Santos G, Gordon-Smith EC, Storb R. A prospective study of androgens and bone marrow transplantation for treatment of severe aplastic anemia. *Blood* 53: 504-514, 1979
- 24) Milner CM, Campbell RD. Polymorphic analysis of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics* 36: 357-362, 1992
- 25) Chouchane L, Ahmed SB, Baccouche S, Remadi S. Polymorphism in the tumor necrosis factor- α promotor region and in the heat shock protein 70 genes associated with malignant tumors. *Cancer* 80: 1489-1496, 1997
- 26) Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2766-2770, 1989
- 27) Ishihara M, Ohno S, Ishida T, Mizuki N, Ando H, Naruse T, Ishihara H, Inoko H. Genetic polymorphisms of the TNFB and HSP70 genes located in the human major histocompatibility complex in sarcoidosis. *Tissue Antigens* 46: 59-62, 1995
- 28) Kubota T, McNamara DM, Wang JJ, Trost M, McTiernan CF, Mann DL, Feldman AM. Effects of tumor necrosis factor gene polymorphisms on patients with congestive heart failure. *Circulation* 97: 2499-2501, 1998
- 29) Yunis JJ, Corzo D, Salazar M, Lieberman JA, Howard A, Yunis EJ. HLA associations in clozapine-induced agranulocytosis. *Blood* 86: 1177-1183, 1995
- 30) Spector NL, Ryan C, Samson W, Levine H, Nadler LM, Arrigo AP. Heat shock protein is a unique marker of growth arrest during macrophage differentiation of HL-60 cells. *J Cell Physiol* 156: 619-625, 1993
- 31) Filippovich I, Sorokina N, Khanna KK, Lavin MF. Butyrate-induced apoptosis in lymphoid cells preceded by transient overexpression of HSP70 mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 198: 257-265, 1994
- 32) Brach MA, deVos S, Gruss HJ, Herrmann F. Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death. *Blood* 80: 2920-2924, 1992
- 33) Whetton AD, Dexter TM. Influence of growth factors and substrates on differentiation of haemopoietic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 5: 1044-1049, 1993
- 34) Pericle F, Liu JH, Diaz JI, Blanchard DK, Wei S, Forni G, Djeu JY. Interleukin-2 prevention of apoptosis in human neutrophils. *Eur J Immunol* 24: 440-444, 1994
- 35) Kawano Y, Nissen C, Gratwohl A, Speck B. Immunostimulatory effects of different antilymphocyte globulin preparations. *Br J Haematol* 68: 115-119, 1988
- 36) Liossis SN, Ding XZ, Kiang JG, Tsokos GC. Overexpression of the heat shock protein 70 enhances the TCR/CD3- and Fas/Apo-1/CD95- mediated apoptotic cell death in Jurkat T cells. *J Immunol* 158: 5668-5675, 1997
- 37) Moss ML, Palmer RE, Kuzmic P, Dunlap BE, Henzel W, Kofron JL, Mellon WS, Royer CA, Rich DH. Identification of actin and HSP70 as cyclosporin A binding proteins by photoaffinity labeling and fluorescence displacement assays. *J Biol Chem* 267: 22054-22059, 1992
- 38) Shinohara K, Ayame H, Tanaka M, Matsuda M, Ando S, Tajiri M. Increased production of tumor necrosis factor alpha by peripheral blood mononuclear cells in the patients with aplastic anemia. *Am J Hematol* 37: 75-79, 1991
- 39) Hinterberger W, Adolf G, Aichinger G, Dudczak R, Geissler K, Hocker P, Huber C, Kalhs P, Knapp W, Koller U, Lechner K, Volc-Platzner B. Further evidence for lymphokine overproduction in severe aplastic anemia. *Blood* 72: 266-272, 1988
- 40) Vinasco J, Beraun Y, Nieto A, Fraile A, Mataran L, Pareja E, Martin J. Polymorphism at the TNF loci in rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 49: 74-78, 1997
- 41) Fraile A, Nieto A, Beraun Y, Vinasco J, Mataran L, Martin J. Tumor necrosis factor gene polymorphisms in ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* 51: 386-390, 1998
- 42) Chen CJ, Yen JH, Tsai WC, Wu CS, Chiang W, Tsai JJ, Liu HW. The TNF2 allele dose not contribute towards susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Immunol Lett* 55: 1-3, 1997
- 43) Goral J, Mathews HL, Clancy JJ. Expression of 70-kDa heat-shock protein during acute graft-versus-host disease. *Clin Immunol Immunopathol* 86: 252-258, 1998

Genetic Susceptibility to Acquired Aplastic Anemia : Roles of Polymorphisms of the Heat Shock Protein 70 Genes and the Tumor Necrosis Factor α Genes in the Immune Mechanism of Aplastic Anemia. Hirohito Yamazaki, Department of Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **108**, 24 — 36 (1999)

Key words aplastic anemia, heat shock protein 70-2, tumor necrosis factor α gene, polymorphism, cyclosporine

Abstract

Acquired aplastic anemia has been considered to be an organ-specific autoimmune disease localized in the bone marrow, mainly based on high rate of response to immunosuppressive therapy in patients. Certain alleles of several polymorphic genes, such as the human leukocyte antigen (HLA) genes, heat shock protein (HSP) 70 genes and tumor necrosis factor (TNF) α genes, are associated with the susceptibility to various autoimmune diseases. Although an increased frequency of HLA-DRB1*1501 has been demonstrated in aplastic anemia patients, it is unclear whether genes other than HLA-DRB1*1501 are associated with susceptibility to aplastic anemia. To identify genes that could potentially determine susceptibility to aplastic anemia, we examined 80 aplastic anemia patients for polymorphism of the HSP70 gene and TNF α gene, both of which are known to be involved in the pathophysiology of aplastic anemia. When a comparison of the allelic frequency of one of the HSP70 genes, HSP70-2, was made between aplastic anemia patients and normal individuals, there was no significant difference in the frequencies of two different alleles, the 9.0 kb allele and 8.5 kb allele of HSP70-2. Of note, the frequency of the 9.0 kb allele was significantly higher in aplastic anemia patients responsive to cyclosporine therapy (55%) than in aplastic anemia patients who did not respond to the immunosuppressant (22%). The 9.0 kb allele was not possessed by 4 aplastic anemia patients who did not improve with cyclosporine despite the presentation of HLA-DRB1*1501, which is usually thought to be a reliable marker for favorable response to cyclosporine therapy. Although the frequency of individuals possessing the allelic combination of TNF1/TNF2 was significantly higher in aplastic anemia patients than in the normal control, differences in the allele combination of the TNF α gene did not affect the likelihood of responding to cyclosporine therapy. When 4 pairs of aplastic anemia patients from 4 different families were studied for the alleles of 4 potential susceptibility genes shared by each patient pair, three of the 4 pairs shared HLA-DRB1*1501 and the 9.0 kb allele of HSP70-2. These results suggest that as well as HLA-DRB1*1501, the 9.0 kb allele of HSP70-2 is also associated with susceptibility to immune-mediated aplastic anemia.