

第4回 関東HLA研究会記録

会 期 : 2021年5月15日(土曜日)

開催方法 : Zoom Webinar で実施

世 話 人 : 石田 英樹

東京女子医科大学移植管理科

HLAの基礎講習-1 HLAの基礎知識

小川 公明

特定非営利活動法人 白血病研究基金を育てる会

HLAは、ヒトの主要組織適合性遺伝子複合体（MHC）として、1900年代中ごろに発見されました。MHCは免疫応答を制御する重要な要素でありヒトの遺伝子の中で最も多型に富むことが知られています。免疫は、自己、非自己を如何に認識し、非自己を排除していくのが基本になります。このような機能は、有顎類以降の脊椎動物が獲得した仕組みです。HLA発見の経緯も、このような免疫の研究の中にもありました。ヒトの場合、この自

己、非自己の主要なマーカーがHLAでした。このような生物学的背景により、HLAは幾つもの特徴を持っています。

今回は、この特徴をなるべく、一般の方々にも分かり易く解説することに致します。この特徴を理解することは、HLA検査の精度維持および、検査結果の臨床的意義の把握、臨床への説明に必要な能力と私は考えています。

HLAの基礎講習-2 HLAタイピングに必要な技術と知識

奥平 裕子

ジェノダイブファーマ株式会社

日本組織適合性学会 QCWS のテーマの一つである「正確なDNAタイピングが行えること」を達成するために、安定した技術と知識が最重要課題であることを、昨年のQCWSの総合解析でも述べた。ミスアサインとなる原因は、反応不良などの技術的な面と、それを補う知識の不足であるといっても過言ではない。そこで本講習ではDNAの濃度測定や、ネガティブコントロール・ポジティブコントロール測定の重要性、反応不良が発生する原因などを原理と合わせて考えることで一層明確にする

DNAの濃度測定はPCRを原理とする方法において大変重要なポイントとなる。また、ネガティブコントロール、ポジティブコントロールの測定はその反応の有無が

実験の成立を意味する。それぞれのコントロールの反応から、反応不良の原因を探ることも可能である。

HLAタイピングでは、安定した技術に加え、頻度やハプロタイプに代表されるような知識も判断材料となる。頻度やハプロタイプの推定により、ミスアサインを避けられたケースを紹介し、検査結果を知識で裏付けすることの重要性を示す。

日常検査では、安定した技術の習得と新しい知識の取得をし、より正確なHLAタイピングを行うことが臨まれる。本講習が少しでも皆様のお役に立てれば幸いです。

HLAの基礎講習-3 HLA抗体・エピトープ解析

○橋口 裕樹¹⁾, 金本 人美¹⁾, 本山健太郎¹⁾²⁾

¹⁾ 福岡赤十字病院 移植センター

²⁾ 福岡赤十字病院 移植外科

抗HLA抗体検査は、移植医療において抗体関連型拒絶を疑う時、その結果が治療方針に大きく関わることもある重要な検査である。この検査を日常的に実施できるようになった要因として、2018年に全ての臓器移植後において保険取載になったこと、2020年に移植前に実施した抗HLA抗体検査（移植が実施された場合に限る）が算定できるようになったことが大きい。これにより Preformed DSA, de novo DSA の評価が経時的に可能となり、検査数も増加した。

検査側に目を向けると、検査試薬は多くラインナップされ、どの試薬を採用するかは検査施設の裁量に委ねら

れる。また抗体検査が生化学検査のように、施設間差が小さければ問題ないが、抗体検査では少なからず施設間差を認める。また結果報告に使用される蛍光強度(nMFI)の数値の取り扱い、カットオフ値設定等、結果解釈に混乱を招きかねないこともあり、結果報告時には臨床との積極的な情報共有が重要となる。

近年では、抗HLA抗体のエピトープ解析も専用ソフトの登場で比較的簡便となった。ドナーとレシピエント間のエピトープレベルでのミスマッチ確認や、抗体特異性同定試験で検出された抗体をエピトープ解析することにより、より詳細な情報を得ることが期待される。

シンポジウム：臨床とHLA-1 心臓移植後管理における抗体存在の意義

布田 伸一

東京女子医科大学大学院 重症心不全制御学分野

心臓移植の待機期間が4年と長いわが国においては、95%の待機患者が補助人工心臓のサポート状態で待機しており、移植前に生じる様々な事象により preformed 抗体が産生されやすい環境にある。また、心臓移植後慢性期の子後を規定する移植心冠動脈病変 (Cardiac Allograft Vasculopathy: CAV) 進展には抗体関連の免疫機序による炎症が主体をなし、そこに非免疫機序 (代謝, ドナー心由来, 等) が加わって病態が形成される。CAVの診断は、冠動脈造影検査, 血管内超音波法, 冠動脈予備能検査, 等で行われるが、その進行は非常に早

い場合もあり、preformed 抗体を持つ症例は移植直後から、De Novo 抗体出現例ではその後のCAVへの進展に注意が必要である。そこにはClass 1, Class 2-抗HLA抗体に補体結合か非結合か、またどのIgGサブクラスによるものが関与する可能性がある。抗体関連型拒絶 (AMR) の治療は、今世紀に入り、様々な薬物治療, 等が行われるようになり、その子後効果に興味深い報告も散見される。non-HLA抗体によるAMRからCAVへの進展も含め、この領域へのさらなる検討が必要である。

シンポジウム：臨床と HLA-2 肝臓移植と抗体

江川 裕人

東京女子医科大学 外科学講座 肝胆脾外科分野

抗体関連拒絶は、まず、腎臓移植の領域で認識され、基礎的研究と臨床での実践が調和を保ち発達し、成績向上に貢献してきた。肝臓は1990年代初期に一部の医師達に注目されはしたが肝臓移植における抗体関連拒絶の存在そのものを否定する外科医が多かった。抗体関連拒絶が表立って議論されなかった理由として、腎臓に比べ臓器が大きく肝臓の再生機能もあり障害が目立たないこと、手術侵襲が大きく早期機能不全や感染症の修飾が大きく抗体関連拒絶を認識することが困難であったこと、最後に抗体関連拒絶の存在を信じていないために気が付かなかったことがあげられる。手術が確立され無輸血手術も日常となり免疫抑制と感染予防法が発達し、抗体の測定法が確立されるようになってようやく広く認識され

始めた。最近明らかになってきたこととして、腎臓と同じく、移植前感作症例で成績が低下すること、超早期抗体関連型拒絶は減感作療法で回避できる可能性があること、免疫抑制減量症例で de novo 抗体が生じやすいこと、クラス II 抗体は遷延し線維化などの臓器不全を合併しやすいこと、免疫抑制を強化することで改善することがあげられる。一方で、長期経過例で、シングルビーズ法で DSA を確認して CDC 陽性でも組織学的変化が現れない症例もある。腎臓で確認されてきた知見は肝臓でも確認されるが中には障害につながらない症例がある。肝臓には抗体関連型拒絶に対する耐性が存在する可能性がある。今後の魅力的な研究分野である。

シンポジウム：臨床と HLA-3 抗 HLA 抗体陽性患者に対する脱感作治療の実際

石田 英樹, 海上 耕平

東京女子医科大学 移植管理科

抗ドナー抗体が関与する拒絶反応は、急性細胞性拒絶反応とは異なり移植腎喪失という悲劇的な結末の可能性を伴うハイリスクな病態である。移植腎生検において傍毛細血管領域への微慢性の C4d の沈着、血管炎および糸球体炎などが観察され、患者の血清中には抗ドナー抗体が検出される。治療戦略としては、抗ドナー抗体の除去および抗体産生の抑制である。現時点での具体的な選択肢としては、血漿交換療法（血液吸着）、タクロリムス、ミコフェノール酸モフェティール、大量ガンマグロブリン療法、抗 CD20 抗体（リツキシマブ）および脾臓摘出などが報告されており、各施設間によってこれらの組み

合わせや投与量は異なるものの、クロスマッチ陽性患者を陰性化（脱感作）させ、移植し透析離脱に導くことに成功している。さらに近い将来、より B 細胞を選択的に抑制したり、選択的 T 細胞活性阻害剤も脱感作療法の新たな選択肢として臨床の場に登場するかもしれない。

このような高感作患者に対し脱感作目的に移植前にガンマグロブリンを大量投与することが2019年12月に保険収載された。この項では現在、術前に抗 HLA 抗体陽性患者に対して行われている抗体検出の方法の実際、および抗体を脱感作するための治療戦略のそれぞれについて

て概説し、最後に当科で行われているガンマグロブリンの大量投与を中心とした脱感作療法の実際についてお話したい。

ワークショップ-1 臓器移植における組織適合性検査のケーススタディー

石塚 敏

東京女子医科大学 中央検査部 移植関連検査室

臓器移植における生体防御反応には、Tリンパ球が主体となる細胞性免疫とBリンパ球が主体となる液性免疫があり、それぞれ臓器移植後の免疫学的拒絶反応に関与している。その免疫学的拒絶反応を回避する目的として組織適合性検査は重要である。

これまでの経験から、臓器提供ドナーの組織適合性抗原（主にHLA）に対する抗体（ドナー特異的抗HLA抗体）やドナーのABO血液型抗原に対する抗体（ドナー特異的抗血液型抗体）を産生する患者に臓器を移植すると、速やかに臓器の血流障害を生じ、移植機能廃絶や死亡につながる可能性がある（抗体関連型拒絶反応）。また、

HLAのDR適合度によっても細胞性拒絶反応の発症率が異なることが知られている。

本発表では、ケーススタディーとして本院における小児の腎臓移植症例を提示して移植後の抗体関連型拒絶反応に対する治療効果について腎臓組織診断とHLAの組織適合性からみたEpitope Matching、そして移植後に産生された抗体に対するEpitope Analysisについて解析する。特に抗体に関しては、Luminex法とflow cytometry法によるTotal-IgGと4種類のサブクラス（IgG1, IgG2, IgG3, IgG4）およびヒト補体C1qに反応するIgGについて報告したい。

ワークショップ-2 輸血・造血移植における組織適合性検査のケーススタディー

杉本 達哉

東海大学医学部付属病院 臨床検査技術科 輸血室

HLAに関連する組織適合性検査は輸血や造血細胞移植において重要な役割を担っている。血小板輸血不応ではHLA抗体の有無を確認することが大切になる。血小板表面に発現しているHLAクラスI抗原とHLA抗体の反応により、予期した血小板輸血効果が得られない状況が長期間続くと致命的な影響を引き起こす危険性がある。また、造血細胞移植では患者とドナー適合性確認のためのHLAタイピング検査は必要不可欠となっており、ハプロタイプを意識した結果の確認が必要である。さい

帯血移植では患者にドナーに対するHLA抗体（Donor Specific Antibody: DSA）が存在する場合、生着率が有意に低下することから、DSAを避ける移植が重要になってくる。これらのHLA関連検査の実施には専門的技術と知識をもって対応することが必要である。ただ、実際にHLA関連検査を実施している施設は血液検査や生化学検査項目のような一般的臨床検査の実施施設数と比較して少数であるのが現実である。そのため、HLA関連検査実施のための技術や知識情報はもちろん大切である

が、HLA 関連検査の結果解釈や課題等についての情報の方が多くの施設で求められていると推察される。そこで、本ワークショップでは「輸血・造血細胞移植におけ

る組織適合性検査のケーススタディー」と題して、当院の経験例等から HLA 関連検査に関する結果解釈や課題等について概説していく。

一般口演発表 -1

HLA-A*11:01:01:01, HLA*C*12:02:02:01-HLA-B*52:01:02:02, age and sex are associated with severity of Japanese COVID-19 with respiratory failure

Khor Seik-Soon¹⁾, Yosuke Omae¹⁾, Nao Nishida²⁾, Masaya Sugiyama²⁾, Noriko Kinoshita³⁾, Tetsuya Suzuki³⁾, Michiyo Suzuki³⁾, Satoshi Suzuki⁴⁾, Shinyu Izumi⁵⁾, Masayuki Hojo⁵⁾, Norio Ohmagari³⁾, Masashi Mizokami²⁾, Katsushi Tokunaga¹⁾

¹⁾ Genome Medical Science Project, National Center for Global Health and Medicine Hospital

²⁾ Genome Medical Sciences Project, National Center for Global Health and Medicine

³⁾ Disease Control and Prevention Center, National Center for Global Health and Medicine Hospital

⁴⁾ Biobank, National Center for Global Health and Medicine

⁵⁾ Department of Respiratory Medicine, National Center for Global Health and Medicine Hospital

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), the virus causing coronavirus disease 2019 (COVID-19) was announced as an outbreak by the World Health Organization (WHO) in January 2020 and as a pandemic in March 2020. The majority of infected individuals have experienced no or only mild symptoms, ranging from fully asymptomatic cases to mild pneumonic disease. However, a minority of infected individuals develop severe respiratory symptoms. The objective of this study was to identify susceptible HLA alleles and clinical markers that can be used in risk prediction model for the early identification of severe COVID-19 among hospitalized COVID-19 patients. A total of 137 patients with mild COVID-19 (mCOVID-19) and 53 patients with severe COVID-19 (sCOVID-19) were recruited from the Center Hospital of the National Center for Global Health and Medicine (NCGM), Tokyo, Japan for the period of February–August 2020. High-resolution sequencing-based typing for eight HLA genes was performed using next-generation sequencing. In

the HLA association studies, HLA-A*11:01:01:01 [$P_c=0.013$, OR=2.26 (1.27–3.91)] and HLA-C*12:02:02:01-HLA-B*52:01:01:02 [$P_c=0.020$, OR=2.25 (1.24–3.92)] were found to be significantly associated with the severity of COVID-19. After multivariate analysis controlling for other confounding factors and comorbidities, HLA-A*11:01:01:01 [$P=3.34E-03$, OR=3.41 (1.50–7.73)], age at diagnosis [$P=1.29E-02$, OR=1.04 (1.01–1.07)] and sex at birth [$P=8.88E-03$, OR=2.92 (1.31–6.54)] remained significant. The area under the curve of the risk prediction model utilizing HLA-A*11:01:01:01, age at diagnosis, and sex at birth was 0.772, with sensitivity of 0.715 and specificity of 0.717. To the best of our knowledge, this is the first article which describes associations of HLA alleles with COVID-19 at the 4-field (highest) resolution level. Early identification of potential sCOVID-19 could help clinicians prioritize medical utility and significantly decrease mortality from COVID-19.

一般口演発表-2

HLA クラス I 遺伝子の 3'- スプライス部位における異質な進化学的保存性

椎名 隆¹⁾, 水谷 晃子¹⁾²⁾, 清水まり恵³⁾, 高橋 大輔³⁾, 重成 敦子¹⁾, 田中 政之⁴⁾, 田中 正史¹⁾

¹⁾ 東海大学 医学部

²⁾ 帝京平成大学 健康メディカル学部

³⁾ 日本赤十字社 血液事業本部 中央血液研究所

⁴⁾ 東海大学 生命科学統合支援センター

【背景と目的】我々は、C*03:23N のエキソン 3 に位置する 1 個の SNP (G406A) が新たな 3' スプライス部位 (3' 部位) を生成し、その結果、コード配列にフレームシフトを引き起こすことにより正常な HLA 発現が抑制される分子機序を見出している (HLA. 2020. 95: 555 など)。興味深いことに、この新たに生成された 3' 部位の上流には、一般の遺伝子同様にピリミジンリッチな塩基配列 (Py リッチ配列) が位置するのに対して、本来のイントロン 2 の 3' 部位上流には、プリンリッチな塩基配列 (Pr リッチ配列) が位置する。そこで本報告では、この Pr リッチ配列の意義を理解する始発点として、HLA/MHC 遺伝子の 3' 部位上流における進化学的な特徴を見いだすことを目的とした。

【対象と方法】公的データベースから公開されている

HLA/MHC 遺伝子全長の塩基配列を対象とし、3' 部位の上流側に位置する 10 塩基について比較解析した。また、ヒトゲノム配列から約 19 万か所の 3' 部位上流の塩基配列を抽出し、Pr リッチ配列の割合を調査した。

【結果および考察】Pr リッチ配列 (>7 塩基/10 塩基) は HLA クラス I 遺伝子のイントロン 2 のみに観察され、HLA アレル間で高い保存性を示した。また、イントロン 2 の Pr リッチ配列は、カモノハシからヒトまでの哺乳類のみに観察された。さらに、ヒトゲノムにおける全 3' 部位上流に対する Pr リッチ配列 (>7 塩基/10 塩基) の割合はわずか 0.3% であったことから、極めて異質な Pr リッチ配列が HLA クラス I 遺伝子のイントロン領域に保存されていることが示唆された。

一般口演発表-3

日本人における心臓移植再登録症例での抗 HLA 抗体含めた臨床的特徴

服部 英敏¹⁾, 野本美智留¹⁾, 菊池 規子¹⁾, 市原 有起²⁾, 斎藤 聡²⁾, 新浪 博士²⁾, 萩原 誠久¹⁾, 布田 伸一³⁾

¹⁾ 東京女子医科大学 循環器内科

²⁾ 東京女子医科大学 心臓血管外科

³⁾ 東京女子医科大学大学院 重症心不全制御学分野

【背景】心臓移植後に移植心冠動脈病変 (CAV) が進行した場合、再移植が必要になる。日本において、再移植を必要とする患者の抗 HLA 抗体を含めた臨床的特徴の報告はない。

【方法】当院通院中の国内移植、海外渡航移植症例 84 例

を後ろ向きに検討した。

【結果】84 例中 5 例 (6%) が再移植登録を必要とした。再移植登録時平均年齢は 31 ± 15 歳、移植から再移植登録までの期間は平均 13 ± 7 年であった。いずれも CAV の進行により再移植登録を必要とした。抗 HLA 抗体検

査が可能となった以降に再移植登録された2例はいずれもドナー特異的抗体(DSA)が持続陽性であり、抗体関連型拒絶(AMR)を認めた。代表的症例を提示する。現在25歳男性で、拡張型心筋症により3歳時に心臓移植を施行、13歳時に心筋生検でC4d陽性、DSA陽性(HLA Class II DQ4, DQ8抗体陽性)を認め、AMRと診断、ステロイドパルス療法、血漿交換療法、リツキシマブ投与

を行った。また、冠動脈造影では4PD 75%, seg9-1 90%, seg12 90%, seg13 90%狭窄を認めた。その後もDSAは消失せず、CAVの進行、心不全の増悪を認め、移植後22年目に再移植登録を行った。

【結語】日本人においてもCAVは再移植登録の主因となり、DSAとの関連を認めた。

一般口演発表-4

De novo DSA 検出時に併存する non-DSA のエプレット解析

尾本 和也¹⁾²⁾, 海上 耕平³⁾, 神澤 太一²⁾, 古澤美由紀¹⁾, 石田 英樹²⁾³⁾, 田邊 一成²⁾

¹⁾医療法人社団 ときわ会余丁町クリニック

²⁾東京女子医科大学病院 泌尿器科

³⁾東京女子医科大学 病院移植管理科

【背景・目的】抗HLA抗体に関してDe novo DSA(dnDSA)は腎予後に大きく関与するが、同時に出現するNon-DSA(NDSA)の臨床的意義は不明な点が多い。今回その意義を明らかにする目的で両者に対するエプレット解析を行った。

【方法】LABScreen Single Antigen法で判明しているClass II dnDSA出現症例において、ドナー、レシピエント共にHLA-A, B, C, DPB1, DQB1, DRB1のallele解析が行われている13例を対象とし、HLA Fusion MatchMakerを用いてClass II NDSAのエプレット解析を行った。

【結果】dnDSA発症13例中12例(92%)が抗DQ抗体

であり、1例は抗DR抗体であった。全例においてNDSAの出現を認めたが、10例(77%)においてdnDSAと同様のエプレットを認識する抗HLA抗体を認め、10例中5例は検出されたNDSAの全てがdnDSAと同様のエプレットを認識する抗体であり、その80%が抗DQ抗体であった。一方でdnDSAに関連するエプレットが検出されていない症例が1例存在した。

【結語】今回の検討においては症例数が少ないものの、dnDSA出現時のNDSAは高率に同一のエプレットを認識することが判明した。しかしながらNDSAが腎予後に直接的に関与するかはさらなる検討が必要である。

一般口演発表-5

ABO血液型不適合肝臓移植における血液型IgG抗体のサブクラス解析

笹野 まゆ¹⁾, 石塚 敏¹⁾, 古屋 海¹⁾, 藤田 龍司¹⁾, 小林 悠梨¹⁾, 安尾美年子¹⁾,
三浦ひとみ¹⁾, 江川 裕人²⁾

¹⁾東京女子医科大学 中央検査部移植関連検査室

²⁾東京女子医科大学 大学消化器外科

【背景・目的】わが国では、生体ドナーからの移植が主であることから血液型が異なるドナーからの移植は肝臓、腎臓で20%強の割合を占めている。その中で約5%に抗体関連型拒絶反応が生じて移植臓器の機能廃絶や死亡につながっている。一方で、術後に一定量のDSAが維持されているにも関わらず臓器障害が生じない例（臨床的免疫寛容）も報告されている。我々は、この臨床的免疫寛容が生じる違いを解明するため血液型IgG抗体についてサブクラス解析法を考案し、それぞれの反応性の違いを移植症例の血液型別に解析したので報告する。

【対象および方法】対象は、東京女子医科大学においてABO血液型不適合肝臓移植を施行した19症例である。方法は、間接抗グロブリン法 Indirect anti-globulin test

(ID-AGT), flow cytometry 法による Total-IgG 抗体と4種類のサブクラス (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) およびヒト補体 C1q に反応する IgG 抗体の発現について測定した。

【結果】A型B型O型それぞれの血液型においてIgG2抗体を主として保有している症例が多く、IgG4抗体を保有している症例が少なかった。特にO型は、A型B型に比べ抗体価が高い傾向にあり、抗A抗B共にC1q (IgM 処理) 陽性症例が多かった。

【結語】本研究の結果から症例数は少ないものの、O型の移植症例はA型B型に比べてサブクラスの保有する割合が異なることから、今後、血液型別に移植予後との関連性について解析を進める。

一般口演発表-6

生体肝移植における術前より存在するドナー特異的抗HLA抗体の術後IgGサブクラスの変化について

平田 義弘¹⁾, 小寺 由人¹⁾, 石塚 敏²⁾, 根本 慧¹⁾, 加藤 隆章¹⁾, 江川 裕人¹⁾

¹⁾東京女子医科大学 消化器・一般外科

²⁾東京女子医科大学 中央検査部

【背景】肝移植においてドナー特異的抗HLA抗体(DSA)陽性の危険性および術前脱感作の重要性は認識されているが、脱感作の機序についてはいまだ明らかではない。我々は術前DSA陽性患者に対しリツキサンによる脱感作を行い安全に生体肝移植を施行しているが、術前DSA陽性かつCDC陽性患者3例において術前後のIgGサブクラスを解析したので報告する。

【対象と方法】術前DSAをLABScreenで測定し、MFIが10,000以上であった生体肝移植レシピエント6例に対しリツキサン375mg/m²による脱感作療法を施行した。リンパ球細胞傷害試験(CDC)陽性の3例を対象として、術前後でCDC, LABScreen single antigenによるDSA測定, C1qテスト, およびDSAのIgGサブクラスを測定した。

【結果】3例全例で長期生存を確認している。1例でDSAが長期陽性であったが他2例では速やかに陰性となった。DSA陽性が続いた1例では術後900日の時点でDSA class I, IIともにMFI 3000前後であった。CDCはT cellが術後3日で陰性となったが、B cellは術後900日に陰性化した。C1qは術後3日目に陰性となった。DSAのIgGサブクラスはDRでIgG1からIgG2に変化していた。残り2例においては、IgGサブクラスはIgG1優位のままであった。

【結論】Preformed DSAの細胞傷害性消失の機序として、抗体産生の低下やIgGサブクラスの変化による補体活性化能の低下が関与している可能性が示唆された。