

氏名	酒井 愛子		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 8263 号		
学位授与年月	平成 29年 3月 24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Identification of amino acids in antigen-binding site of class II HLA proteins independently associated with hepatitis B vaccine response (B型肝炎ワクチン反応性と関連する Class II HLA の抗原結合領域のアミノ酸の同定)		
主査	筑波大学教授	医学博士	正田 純一
副査	筑波大学准教授	博士（工学）	五所 正彦
副査	筑波大学助教	博士（理学）	齋藤 祥子
副査	筑波大学助教	博士（医学）	川崎 綾

論文の内容の要旨

酒井愛子氏の博士学位論文は、B型肝炎ワクチン反応性と関連する Class II HLA の抗原結合領域のアミノ酸の同定に関して検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

（目的）

B型肝炎（HB）ワクチンはB型肝炎ウイルスの感染を防止し、日本では母子感染予防や医療従事者等感染ハイリスク者に広く用いられている。しかしHBワクチンには5～10%のワクチン無反応者が存在し、その対策は未解決である。これまでの遺伝学的研究から、HBワクチン反応性と *Class II HLA* 領域の遺伝子多型の関連が報告されているが、その詳細な機序は明らかではない。著者は本研究では、日本人においてHBワクチン反応性を規定する *Class II HLA* アリルおよび抗原結合領域のアミノ酸を同定し、反応性の個人差と関連する分子機序について検討している。

（方法）

著者は、B型肝炎に未感染で、HBワクチン初回接種を受けた医療系学生574名に、研究の意義と個人情報遵守の方針を説明の上、本人の同意を得て研究を行っている。ヘルシンキ宣言およびヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（文科省）に則ってプロトコールを作成し、倫理委員会の承認を得た。

HBワクチン3回接種終了1～2か月後に採血し、HBs抗体価測定（CLIA法）およびDNA抽出を行い、*HLA-DPB1*、*HLA-DQB1*、*HLA-DRB1*のアリルをPCR-SSOP法を用いて決定して、ワクチン反応性との関連を検討した。次にIPD-IMGT/HLA Databaseから各アリルのアミノ酸配列データを取得し、ワクチン反応性と関連の強い抗原結合領域（exon2）のアミノ酸部位について、Conditional logistic regressionを用いて解析した。さらに、有意差の認められたアミノ酸多型により蛋白構造にどのような違いが生じるかについて、日本蛋白質構造データバンク（PDB Japan）から取得したHLAの構造解析データと蛋白質立体構造解析ソフト（MOE）を用いて解析している。

(結果)

1. ワクチン無反応者 (HBs 抗体価 10mIU/mL 未満) は 27 名 (4.7%)、低反応者 (10 以上 100mIU/mL 未満) は 129 名 (22.5%)、ワクチン反応者 (100mIU/mL 以上) は 418 名 (72.8%) であった。無・低反応群 (不良群) とワクチン反応群 (良好群) において解析を行うと、*HLA-DPB1*04:02*、*HLA-DQB1*05:01*、*HLA-DRB1*01:01*、*HLA-DRB1*08:03* は良好群に有意に多く、*HLA-DPB1*05:01* は不良群に有意に多かったとしている。
2. Conditional logistic regression により連鎖不平衡を考慮した解析を行うと、HLA-DRβ1 の 26 番目および HLA-DPβ1 の 84~87 番目のアミノ酸が独立して、ワクチン反応性と有意な関連を示した。これらの部位のアミノ酸多型と HB ワクチン反応性との関連解析では、良好群は HLA-DRβ1 の 26 番目がロイシン、HLA-DPβ1 の 84~87 番目がグリシン-グリシン-プロリン-メチオニンというアミノ酸配列と有意な関連が認められた。逆に不良群では HLA-DPβ1 の 84~87 番目のアスパラギン酸-グルタミン酸-アラニン-バリンというアミノ酸配列と有意な関連を認めている。
3. 蛋白立体構造解析では、これらのアミノ酸多型は、Class II HLA 分子と抗原エпитープの結合において極めて重要なポケットと呼ばれる構造の底部に位置することが判明した。すなわち、HLA-DRβ1 の 26 番目のアミノ酸は HLA-DR 分子のポケット 4 に、HLA-DPβ1 の 84 番目のアミノ酸は HLA-DP 分子のポケット 1 に、それぞれ位置していた。また、蛋白質の分子静電ポテンシャル解析では、HLA-DPβ1 の 84 番目のアミノ酸がアスパラギン酸の場合ポケット 1 は強い負の荷電を帯びるのに対して、グリシンの場合は、疎水性で荷電を帯びないことが明らかになったとされている。

(考察)

これらの結果について、著者は以下のように考察している。既報では *HLA-DPB1*、*HLA-DQB1*、*HLA-DRB1* の各アレルとワクチン反応性の関連が示されており、今回同定されたアレルはこれらの結果と矛盾しない結果であった。*Class II HLA* の全アレルを同時に解析した論文は少ないが、本研究では同一集団で全てを検討し、Conditional logistic regression を用いることで、HLA-DRβ1 と HLA-DPβ1 領域のアミノ酸がそれぞれ独立してワクチン反応性に寄与していることを明らかにした。本研究で初めて HLA-DRβ1 のアミノ酸と B 型肝炎ワクチン反応性の関連性が見出されたが、この HLA-DRβ1 のアミノ酸部位は他の抗原との反応性に大きく影響することが報告されており、また、この部位のアミノ酸変異により T 細胞の抗原認識が変化するという報告がある。一方、HLA-DPβ1 の 84~87 番目のアミノ酸多型と B 型肝炎ワクチン反応性が関連することが報告されているが、その意義は明らかでなかった。本研究では蛋白構造解析から、このアミノ酸多型により HLA 分子の抗原エピトープの結合に重要な部位の特性が異なることが明らかになった。*Class II HLA* 蛋白とワクチン中の HBs 抗原との結合性が異なることにより、CD4 陽性 T 細胞へのシグナル伝達の違いが生じ、HBs 抗体産生に影響して HB ワクチンの反応性の個体差に繋がるものと推測された。

審査の結果の要旨

(批評)

著者は本論文の意義として、著者は B 型肝炎ワクチン反応性と強く関連する *Class II HLA* アレルとアミノ酸多型を同定した。すなわち、HLA-DRβ1 の 26 番目のアミノ酸および HLA-DPβ1 の 84~87 番目のアミノ酸が、独立して B 型肝炎ワクチン接種後の HBs 抗体産生と関係することを見出した。これらの *Class II HLA* 分子のポケットに位置するアミノ酸の相違は、HLA 蛋白の構造および特性に大きく影響し、HBs 抗原ペプチドとの結合性や抗原提示能に影響し、ワクチン反応性の個人差に寄与すると推測している。B 型肝炎ウイルスによる慢性肝疾患は、最近の新規の抗ウイルス薬をもってしても殆どのケースにおいて完全治癒が期待できない現状がある。また、我が国において、慢性肝疾患における B 型肝炎ウイルスのゲノタイプにも変遷が認められ、感染経路にはこれまでの垂直感染に加え、水平感染様式の増加も生じている。このような背景より、2016 年 10 月から全出生児を対象に乳児の定期接種が開始された。本論文に記されている「HLA 蛋白と HBs 抗原の結合」に関する今後の著者の研究成果の発展を期待し、さらに B 型肝炎ワクチンによる感染予防の効率化の実現を希望する。

平成 28 年 12 月 26 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。