

論文内容の要旨

申請者氏名 瀬川 秀伸

第6染色体短腕 (p21.3) 上に存在する HLA 遺伝子領域は、ヒトの遺伝子の中で最も多型に富み、現在までに 10,000 種類を超える HLA タイプ (ハプロタイプ) が明らかにされている。HLA タイピングとは、父親と母親由来の 2 アレルそれぞれの HLA タイプを決定することを言う。HLA タイプの異なる個体間での移植では強い免疫応答が生じ移植成績を左右することになるため、臓器移植分野等では HLA タイピングは必須の事項である。HLA タイプが多型性に富むことから、臓器移植の適合者を得ることは容易ではなく、HLA タイプが決定されたドナーを数多く登録することに加えて、より正確でより簡便な HLA タイピング法の開発が望まれている。現在標準とされる HLA タイピングは、サンガー法 (DNA 配列決定法) に根ざした SBT (Sequence Based Typing) 法であるが、HLA タイプの相決定のためには、クローニングの過程を含むため時間と労力の消費が大きい。一方で、近年開発された次世代シーケンサーを利用する方法では、1 分子の DNA 断片由来の配列情報を大量に得ることができ、SBT 法よりも簡便で、かつ解析効率が良いが、精度の点でまだゴールドスタンダードとなりうるまでには至っていない。そこで、本研究では塩基の読み取りエラーを除去し、正確な相決定が行える次世代シーケンサーによる HLA タイピングシステムの開発を行った。

12 人のテストサンプルを用いて、シーケンスライブラリー調製法、HLA タイピングプログラムによる解析手法をそれぞれ確立させ、1 回の配列解析により最大 16 人の HLA 遺伝子座 (A、B、C、DRB1、DRB3/4/5、DQB1、DQA1、DPB1) のハプロタイプを cDNA から決定することが可能なシステムを開発した。まず、既知 HLA タイプの大部分を解析できるように、各タイプで保存されている配列領域に PCR プライマーを設計し、高精度な解析を可能とするシーケンスライブラリー調製法の条件検討を重ねた。次に、HLA タイピングプログラムで、塩基の読み取りエラーを除いて構成したハプロタイプ配列とそれらに付加した信頼性を示すスコアを基に既知 HLA タイプを参照しタイプを決定する方法とした。これを用いて、テストサンプルを解析したところ、サンガー法によって決定した 212 アレルのうち、211 アレルを決定することができ、正解率は 99.5%であった。検証セット (30 サンプル) を用いた場合でも、正解率が 97.0% (516/532 アレル) となり、高い性能であることを確認した。

検証セットを解析する途中で、上記 HLA タイピングプログラムでは決定できないタイプが存在することが判明したため、この欠点を補完するシステムの開発も行った。この補完 HLA タイピングシステムでは、ライブラリー調整時に分子バーコード配列を DNA 断片に付加し、分子バーコード配列を持つ短い配列データの解析から解析領域全体のハプロタイプを決定する方法とした。これにより本システムの性能を更に向上させることができた。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 瀬川 秀伸

第6番染色体上に位置する HLA 遺伝子領域は、ヒト遺伝子の中でも最も多型に富んでおり、公共の HLA データベースには、10,000 種類を超える HLA タイプが登録されている。異なる HLA タイプを持つ個体間での移植では強い拒絶反応が生じ、移植成績を左右することなどから、HLA タイプの同定、即ち、HLA タイピングは移植医療の分野では必須の事項である。HLA タイピングには、HLA タイプの多型性と医療における重要性から、簡便性と正確性が求められるが、現行の標準法はサンガー法を使った SBT (Sequence Based Typing) 法で、HLA タイプの決定には、多くの時間と労力が必要とされる。現在、近年開発された次世代 (超並列) シーケンサーを HLA タイピングに導入することで、簡便かつ解析効率の良い方法の開発が精力的に試みられているが、残念ながら、ゴールドスタンダードとなるような精度を示すものはまだ存在しない。これらの背景を踏まえて、申請者は超並列シーケンサーを用いた高精度の HLA タイピングシステムの開発を行った。

本研究では、HLA 遺伝子のエキソン間でのシス、トランス多型情報が得易い cDNA から HLA タイプを解析するために、既知タイプで保存されている配列領域に PCR プライマーを設計した。これは現データベースの既知タイプの 96%以上、アレル頻度が 0.1%以上のものに限ると、98%以上に対応していた。高精度な解析を可能とするシーケンスライブラリー調製法の条件検討を重ねて、4つのモジュールから成る超並列シーケンサーからの HLA シーケンスデータの解析プログラムが開発された。各モジュールでは、独自に考案したアルゴリズムにより、塩基の読み取りエラーの処理、信頼性を示すスコアを保持した候補ハプロタイプ配列の構成、既知 HLA データベースの検索、HLA タイプの決定が行われていた。開発したシステムの性能は、サンガー法によって決定した HLA タイプとの一致具合を見て評価しており、システム構築に用いた 12人のテストサンプルでの正解率は 99.5%、システムの検証セット (30人) を用いた場合では 97.0%であった。他の既存の開発研究と比較しても、解析対象とした 11 遺伝子座全てにおいてバランス良く高い精度でタイピングが行われていた。

以上のように、本論文は、多型性に富んでいるためタイピングが困難な HLA 遺伝子座について、簡便で効率良く高精度にハプロタイプを決定するシステムを開発したもので、人類遺伝学や医療分野などの、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。