

## 精巣腫瘍における HLA 抗原の疾患感受性の検討

大阪警察病院泌尿器科 (部長: 藤岡秀樹)

西村 健作, 三浦 秀信, 安永 豊\*

高寺 博史, 藤岡 秀樹

大阪大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 奥山明彦教授)

高 原 史 郎

国立循環器病センター研究所実験治療開発部 (部長: 佐田正晴)

辻 隆之, 佐田 正晴

## HLA ANTIGENS IN PATIENTS WITH TESTICULAR GERM CELL TUMORS

Kensaku NISHIMURA, Hidenobu MIURA, Yutaka YASUNAGA,  
Hiroshi TAKATERA and Hideki FUJIOKA*From the Department of Urology, Osaka Police Hospital*

Shiro TAKAHARA

*From the Department of Urology, Osaka University Hospital*

Takayuki TSUJI and Masaharu SADA

*From the Department of Surgical Research, National Cardiovascular Center Research Institute*

The role of HLA antigens in the etiology of testicular germ cell tumor has been suggested previously. Several attempts have been made to establish associations of HLA antigens in patients with testicular cancers, but have yielded inconsistent results. We studied the frequencies of HLA antigens by serological typing and DNA typing and examined the association between testicular germ cell tumors and HLA antigens. The serological expression of HLA-A, -B, -C, -DR and -DQ antigens was analyzed in 23 patients with germ cell cancers of the testis. The findings indicated a trend towards an increase in the antigen DQ4 ( $p < 0.05$ ). The 13 patients were typed for HLA DRB1 and DQB1 allele by PCR-RFLP analysis. The findings revealed an increased frequency of DRB1 0405 ( $p < 0.01$ ) and DQB1 0401 ( $p < 0.01$ ).

(Acta Urol. Jpn. 42 : 95-99, 1996)

**Key words:** Testicular tumor, HLA antigens

## 緒 言

HLA 抗原は高度の遺伝的多型性を示し、免疫応答に重要な役割を担っていることから、疾患感受性について多くの検討がなされてきた。ナルコレプシー<sup>1,2)</sup>、強直性脊椎炎<sup>3)</sup>などは強い関連性を示すことが知られており、臨床的にもその診断価値は高い。悪性腫瘍に関しても多くの報告があるが、いずれも関連性は弱く、臨床応用に至っていないのが現状である。精巣腫瘍は人種差、家族内集積などが認められ、その見地から免疫遺伝学的背景を検索するべく HLA 抗原の疾患感受性について、血清学的タイピング DNA タイピングを用い検討した。

## 対象および方法

血清学的タイピング: 1981年以降に大阪警察病院にて診断、治療をうけた胚細胞性精巣腫瘍患者23例を対象とした。年齢は19歳から66歳、平均39.5歳で、患側は左14例、右8例、両側1例であった。病理組織診断は精上皮腫17例、胎児性癌2例、奇形腫1例、混合型3例であった。コントロール群は県立西宮病院腎移植センターに登録された京阪神地区在住の健常人916例とした。

Terasaki-NIH-Standard 法<sup>4)</sup>を用いたリンパ球細胞障害試験により HLA-A, B, C, DR, DQ 抗原の血清学的タイピングを行った。

HLA-A, B, C 抗原の判定はつぎのごとく行った。患者末梢血よりリンパ球を分離 洗浄後、トロンピン

\* 現: 大阪大学医学部病理病態学教室

一滴を加え、多核白血球を除去し、 $4 \times 10^6$  個/ml に調整した。つぎに各抗血清にリンパ球を分注し、 $22^\circ\text{C}$  30分インキュベーションし、さらに補体を分注し、 $22^\circ\text{C}$  60分インキュベーションした。5%エオジンを加え、10%ホルマリンで固定した後、染色された細胞質を有する死細胞の割合で判定した。HLA-DR, DQ 抗原の判定は、リンパ球を分離 洗浄後 B cell を  $2 \times 10^6$  個/ml に調整し、各抗血清に分注し、 $25^\circ\text{C}$  60分インキュベートし、さらに補体に蛍光色素を加え、 $25^\circ\text{C}$  60分インキュベートした後フェノールレッドを分注し、同様に判定した。

DNA タイピング：血清学的タイピングを行った胚細胞性精巣腫瘍23例中13例を対象とした。病理組織診断は精上皮腫8例、胎児性癌1例、奇形腫1例、混合型3例であった。コントロールは第11回日本 HLA ワークショップで報告された日本人1,216例の分類遺伝頻度を用いた<sup>5)</sup> PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 法<sup>6,7)</sup>を用いた DNA タイピングにより、DRB1, DQB1 allele について検討した。

患者末梢血より白血球を分離した後、proteinase K により除蛋白し、RNase A と RNase T1 を加え、エタノール沈殿にて genomic DNA を回収した。1  $\mu\text{g}$  の DNA に 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.01% geratin, 200  $\mu\text{mol}$  dNTP, 2.5 units/ $\mu\text{l}$  TaqDNA ポリメラーゼ, 1  $\mu\text{M}$  プライマーを加え、PCR により class II 遺伝子 second exon の増幅を行った。増幅した遺伝子を5種類の特異的制限酵素 (FokI, HhaI, HinfI, SacII, HphI) により切断し、12%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った後、Ethidium bromide 染色し、バンドを検索し判定した。また6種類の制限酵素 (KpnI, ScaI, RsaI, MnlI, AvaII, EcoRII) により詳細な DNA タイピングを行った。

以上より対象数Nと遺伝頻度 gene frequency (以下 GF と略す。) ならびに allele 頻度 allele frequency (以下 AF と略す。) を算出した。二群間の出現頻度についての有意差を対象数nを用いた chi-square test で検討し、期待値が5以下の場合には Fisher の直接確率計算による p 値で検討した。

## 結 果

HLA-A 抗原では日本人に高頻度に出現する A24 を 23例中18例 (GF 53.4) と高率に認めしたが、コントロール群との統計学的有意差は認めなかった (Table 1)。

HLA-B 抗原, HLA-C 抗原では B54 を 7例 (GF 16.6), B61 を 7例 (GF 16.6), C1 を 12例 (GF 30.8), C3 を 10例 (GF 24.8) に認めしたが、いずれも日本人に高頻度に見られる抗原であり、有意差は認め

られなかった。

HLA-DR 抗原では DR4 が14例 (GF 37.5), DR9 が9例 (GF 22.0) とコントロール群に比べやや高率に認めしたが、統計学的有意差は認めなかった (Table 2)。

HLA-DQ 抗原では DQ4 を 12例 (GF 30.8) に認め、コントロール群との有意差を認めた ( $p < 0.05$ )

Table 1. HLA-A antigen in patients with testicular germ cell tumors and in controls

	Testicular tumor (N=23)		Control (N=916)	
	n	GF	n	GF
A 1	1	2.2	8	0.4
A 2	6	14.0	380	23.5
A 3	0		10	0.5
A11	1	2.2	153	8.5
A24	18	53.4	551	36.9
A26	5	11.5	204	11.3
A30	0		3	0.2
A31	6	14.0	174	10.0
A32	0		3	0.2
A33	2	4.5	117	6.6

GF: Gene frequency

Table 2. HLA-DR antigen in patients with testicular germ cell tumors and in controls

	Testicular tumor (N=23)		Control (N=916)	
	n	GF	n	GF
DR 1	2	4.6	85	4.8
DR 2	7	16.6	250	14.7
DR 3	0		4	0.2
DR 4	14	37.5	424	26.7
DR 6	6	14.0	238	14.0
DR 7	0		15	0.8
DR 8	4	9.1	219	12.8
DR 9	9	22.0	213	12.4
DR10	1	2.2	10	0.5
DR11	0		51	2.8
DR12	2	4.6	121	6.8

GF: Gene frequency

Table 3. HLA-DQ antigen in patients with testicular germ cell tumors and in controls

	Testicular tumor (N=23)		Control (N=916)	
	n	GF	n	GF
DQ1	12	30.8	638	44.9
DQ2	0		19	1.0
DQ3	14	37.4	570	38.5
DQ4	12*	30.8	295	17.7

GF: gene frequency, \* Significantly different from control group by chi-square test at  $p < 0.05$

Table 4. Frequencies of DRB1 allele in patients with testicular germ cell tumors and in controls

	Testicular tumor (N=13)		Control (N=1,216)	
	n	AF	n	AF
0101	2	8.0	137	5.8
0401	3	12.3	15	0.6
0405	8*	38.0	301	13.3
0406	1	3.9	73	3.0
0802	1	3.9	99	4.2
0901	4	16.8	318	14.1
1201	1	3.9	87	3.7
1401	2	8.0	80	3.4
1501	1	3.9	167	7.1
1502	3	12.3	234	10.1

AF: allele frequency, \* Significantly different from control group by chi-square test at  $p < 0.01$

Table 5. Frequencies of DQB1 allele in patients with testicular germ cell tumors and in controls

	Testicular tumor (N=13)		Control (N=1,216)	
	n	AF	n	AF
0301	3	12.3	266	11.6
0302	3	12.3	216	9.3
0303	3	12.3	335	14.9
0401	8*	38.0	296	13.0
0501	2	8.0	154	6.5
0503	2	8.0	96	4.1
0601	5	21.6	400	18.1

AF: allele frequency, \* Significantly different from control group by chi-square test at  $p < 0.01$

(Table 3).

DNA タイピングによる DRB1 の検討 (Table 4) では, DRB1 0401 を 3 例 (AF 12.3) に認め, コントロール群に比して, 遺伝頻度は高率であったが, 統計学的有意差は認めなかった. また DRB1 0405 が 8 例 (AF 38.0) で, 有意差を認めた ( $p < 0.01$ ).

DQB1 では DQB1 0401 が 8 例 (AF 30.8) で, 両群間に有意差を認めた ( $p < 0.01$ ) (Table 5).

## 考 察

主要組織適合抗原複合体 (Major Histocompatible Complex) である HLA 抗原は第 6 染色体短腕上に約 4,000 Kb にわたって存在する. HLA 遺伝子領域にはクラス I 抗原 (HLA-A, B, C, E, F, G), クラス II 抗原 (HLA-DR, DQ, DP) と両領域間に存在するクラス III 抗原によりおもに構成されている. このクラス III 領域には 21 水酸化酵素遺伝子, 補体系の C2 C4 成分, 腫瘍壊死因子などが存在する.

HLA 抗原は高度の遺伝的多型性を有し, 免疫応答

に関与し, その中心的役割を演じていると考えられる. 抗原呈示細胞上の HLA 抗原は抗原ペプチドを T 細胞レセプターに呈示し, T 細胞を活性化させる機能を有する. おもにクラス I 抗原は CD8 陽性 T 細胞の, クラス II 抗原は CD4 陽性細胞の分化・誘導に関与していると考えられている. このことから非自己に対する免疫応答機能を持ち, さらに多型性を有する HLA 抗原が疾患の成立過程に関与している可能性があり, その疾患感受性について多くの研究がなされてきた.

HLA 抗原と疾患発症のメカニズムについてはいくつかの可能性が示唆されている.

第一には HLA 抗原が細菌 ウイルスなど病因となる物質と類似した構造をもつことより発症するという考えである. たとえば, 強直性脊髄炎と HLA B27 が強い関連性を示すのは, その病因と考えられるクレブシエラ菌の構成成分と HLA 抗原との類似性が強い免疫反応を惹起するためと考えられている<sup>3)</sup>

第二には HLA 抗原と連鎖不均衡の関係にある他の遺伝子領域に異常欠損が存在し, 発症する可能性である. HLA B47 と相関性を示す先天性副腎皮質過形成はクラス III 抗原領域にある 21 水酸化酵素遺伝子欠損により生じるとされている<sup>8)</sup>

しかし, これらの発症機構は特殊であり, すべての疾患に適応できるものではなく, そのメカニズムとして HLA 抗原のもつ免疫制御機構そのものが疾患発症に関与するという考え方が一般的である. つまり免疫応答の過剰反応あるいは抑制が発症に関与する可能性である.

腫瘍は宿主のもつ免疫防御機構を逃れ, 増殖すると考えられる. ある種の腫瘍細胞上で, class I 抗原 class II 抗原の発現が認められており, MHC 拘束性 T 細胞や NK 細胞が腫瘍の監視機構として重要な働きをもつものと考えられている. 精巣腫瘍においても, 腫瘍局所の宿主反応の強弱が発生・増殖段階において関与している可能性がある.

精巣腫瘍は民族間の発生頻度に差があること, 家系内発症の報告があることより遺伝的因子の関与が示唆されている. その免疫遺伝学的背景を検討する見地より, 血清学的タイピングによる HLA 抗原の疾患感受性の研究が多くなされてきた.

HLA-A 抗原において Carr<sup>9)</sup> は奇形癌 20 例中 5 例に A24 を認め, 全例が転移症例であったことより, その関連性を指摘している. A24 は Reinberg<sup>10)</sup>, Hayakawa<sup>11)</sup> が同時発生異種組織の両側例に, 安永<sup>12)</sup> が同種組織の両側例において確認している. また Pollack<sup>13)</sup> は seminoma に A33 を, 胎児性癌に A3 を, 卵黄嚢腫瘍に A31 を高頻度に認めたとしている.

HLA-B 抗原では seminoma において B5<sup>13)</sup>, B41<sup>14)</sup>

に, non-seminoma において B7<sup>13)</sup>, B13<sup>15)</sup>, B37<sup>14)</sup> に関連性を認めたとの報告がある。

HLA-D 抗原では De Wolf<sup>6)</sup> が奇形癌26例において Dw7 を高頻度に認めたと報告したのをはじめ, Aiginger<sup>17)</sup> は seminoma と DR1, DR5 との関連を指摘しており, DR5 に関してはその疾患感受性を支持する報告が他にもみられる<sup>13,15,18)</sup> その他には seminoma における DR6<sup>13)</sup>, non-seminoma における DR7<sup>14)</sup> の関連性についての報告がある。

また, 家系内発症例や両側例における HLA 抗原の検討もなされており, Pollack<sup>13)</sup> は家系内発症の3家系のうち2家系に A3 を認めたとし, 両側例では Kratzik<sup>19)</sup> が B14, DR5, DR7 に関連を報告している。

前述のごとく, 血清学的タイピングによる検討では, 疾患感受性をもつ HLA 抗原は多岐にわたり, 強い相関性もえられていないのが現状である。また, HLA 抗原の遺伝頻度には人種差があることが知られており, 日本人では A24, B5, B22, B40, DR4, DR9 などが高頻度に認められる。疾患感受性を持つとされる HLA 抗原について検討すると, 日本人における A24 の遺伝頻度は白人の約3倍, 黒人に約5倍と高率であり, 一方, A3, B41, DR7 は低頻度である。つまり, 関連性を示した HLA 抗原を日本人の疾患感受性に適合させることには疑問の余地があり, 民族差をもつこれらの抗原と精巣腫瘍の発生頻度の人種差に関連性を見出すことは現時点では困難と思われる。

1985年, 特定の遺伝子領域を選択的に増幅させる PCR 法が考案され, HLA 抗原の塩基配列を同定することが可能となる, 加えて, 増幅領域の塩基配列を各種制限酵素により切断し, 識別する RFLP 法が開発され, HLA の研究は飛躍的に発展をとげた。

Todd<sup>20)</sup> は DR3, DR4 と相関を示す白人のインシュリン依存性糖尿病について DR $\beta$ , DQ $\alpha$ , DQ $\beta$  鎖のアミノ酸配列を解析し, DQ $\beta$  鎖の57位のアスパラギン酸の存在が疾患に対する抵抗性に関与していると結論している。これは血清学的タイピングにとどまらず, 塩基配列のレベルで疾患感受性を検討し, 結論づけた点で画期的で, HLA 抗原の疾患感受性を検討するうえで DNA タイピングの有用性を強く印象づけるものであった。

われわれの検討でも DNA タイピングを用いることにより従来の血清学的手法では識別が困難であった抗原のより詳細な分類が可能となり, 血清学的タイピングで DR4 と一律に識別されていた抗原のうち DRB1 0405 に疾患感受性を認めたことは興味深い。

現時点で, HLA タイピング自体が疾患成立をどの程度支配し, 腫瘍に対する免疫防御機構の強弱に関与

しているかは明らかではない。しかしながら, HLA 抗原の疾患感受性を通じ, 臨床的立場より免疫遺伝学的背景を検討する意義は大きく, さらなる検討を重ねることにより, 疾患成立における腫瘍免疫機構の解決の糸口につながることを期待している。

## 結 語

精巣腫瘍における HLA 抗原の疾患感受性について, 血清学的タイピング・DNA タイピングを用い検討した。DNA タイピングにおいて DRB1 0405, DQB1 0401 に疾患感受性を認めた。

本論文の要旨は, 第32回日本癌治療学会総会において発表した。

## 文 献

- 1) Langdon N, Dam V, Welsh KJ, et al.: Genetic markers in narcolepsy. *Lancet* **24**: 1178-1180, 1984
- 2) Juji T, Satake M, Honda Y, et al.: HLA antigens in Japanese patients with narcolepsy. *Tissue Antigens* **24**: 316-319, 1984
- 3) Geczy AF, Alexander K, Bashir HV, et al.: HLA B-27, Klebsiella and ankylosing spondylitis: biological and chemical studies. *Immunol Rev* **70**: 23-50, 1983
- 4) Terasaki PI, Bernoco D, Park MS, et al.: Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C, and -D antigens. *Am J Clin Pathol* **69**: 103-120, 1978
- 5) 赤座達也, 今西 規, 藤原孝記, ほか: 日本人集団における HLA の遺伝子頻度とハプロタイプ頻度. *今日の移植* **7**: 87-99, 1994
- 6) Uryu N, Maeda M, Ota M, et al.: A simple and rapid method for HLA-DRB and -DQB typing by digestion of PCR-amplified DNA with allele specific restriction endonucleases. *Tissue Antigens* **35**: 20-31, 1990
- 7) Ota M, Seki T, Fukunishi H, et al.: HLA-DRB1 genotyping by modified PCR-RFLP method combined with group-specific primers. *Tissue Antigens* **39**: 187-202, 1992
- 8) White PC, New PI and Dupont P: HLA-linked congenital adrenal Hyperplasia results from a defective gene encoding a cytochrome P-450 specific for steroid 21-hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 7505-7509, 1985
- 9) Carr BI and Bach FH: Possible association between HLA-AW24 and metastatic testicular germ-cell tumors. *Lancet* **23**: 1346-1347, 1979
- 10) Reinberg Y, Manivel JC, Zhang G, et al.: Synchronous bilateral testicular germ cell tumors of different histologic type. *Cancer* **68**: 1082-1085, 1991
- 11) Hayakawa M, Mukai K, Nagakura K, et al.: A case of simultaneous bilateral germ cell tumors arising

- from cryptorchid testes. *J Urol* **136**: 470-472, 1986
- 12) 安永 豊, 岸本知己, 高寺博史, ほか: 異時性両側精巣セミノーマの1例. 遺伝的要因特に HLA 抗原との関連について. *日泌尿会誌* **84**: 559-562, 1993
- 13) Pollack MS, Vugrin D, Hennesy W, et al.: HLA antigens in patients with germ cell cancer of the testis. *Cancer Res* **42**: 2470-2473, 1982
- 14) Dieckmann KP, Klan R and Bunte S: HLA antigens, Lewis antigens, and blood groups in patients with testicular germ-cell tumors. *Oncology* **50**: 252-258, 1993
- 15) Kratzik C, Aiginger P, Kuzmits R, et al.: HLA-antigen distribution in seminoma, HCG-positive seminoma and non-seminomatous tumors of the testis. *Urol Res* **17**: 377-380, 1989
- 16) DeWolf WC, Lange PH, Einarson ME, et al.: HLA and testicular cancer. *Nature* **277**: 216-217, 1979
- 17) Aiginger P, Kuzmits R, Kratzik C, et al.: HLA antigens and germ-cell tumors. *Lancet* **1**: 276-277, 1987
- 18) Oliver RTD, Stephenson CA, Parkinson MC, et al.: Germ cell tumors of testicle as a model of MHC influence on human malignancy. *Lancet* **1**: 1506, 1986
- 19) Kratzik C, Aiginger P, Kuber W, et al.: Risk factors for bilateral testicular germ cell tumors. Does heredity play a role? *Cancer* **68**: 916-921, 1991
- 20) Todd JA: HLA-DQ $\beta$  gene contributes susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* **329**: 599, 1987

(Received on April 27, 1995)  
(Accepted on October 23, 1995)