

Human Leukocyte Antigen (HLA) -G に関する  
分子生物学的研究

山下 隆博

①

Human Leukocyte Antigen (HLA) -G に関する  
分子生物学的研究

山 下 隆 博

## <序論>

移植免疫学的にみた場合、胎児は父系抗原をもつ半同種移植片であり、母体の免疫反応により拒絶される運命にあると思われるが、実際には妊娠期間中約9カ月もの間母体内に生着し続ける。したがって、そこには従来の移植免疫学では説明できない妊娠維持機構が存在していると考えられる。その機構が破綻すると胎児は拒絶され、流産となり、それを繰り返すと習慣流産となると考えられている。妊娠維持機構の解明は生殖免疫学の進歩のみならず、移植免疫学の進歩にもつながると期待される。

妊娠維持機構に関しては、胎盤における免疫調節の破綻が妊娠中毒症をはじめとする種々の妊娠合併症の発生に関与していることを示唆する事実が報告されている。例えば、tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  の血清・羊水中の濃度が重症妊娠中毒症患者では上昇していること (Kupfermine et al. 1994)、また、血清 interleukin (IL)-2 濃度が妊娠中毒症患者では上昇しており、従って妊娠中毒症での免疫状態の亢進を示唆していること (Sunder-Plassmann et al. 1989)、などの事実である。我々も妊娠中毒症患者の脱胎膜組織中に IL-2 が存在することを示し (Hara et al. 1995)、妊娠中毒症患者は胎盤局所において免疫状態が亢進している可能性を示唆している。

ところで、胎児組織の中で母体と直接接しているのは胎盤の絨毛組織であることから、絨毛組織が妊娠維持機構において重要な役割を演じていると予想できるが、近年、絨毛組織が HLA の面から注目すべき特徴をもつことがわかってきた。絨毛細胞は通常すべての有核細胞に発現している古典的 HLA クラス I 抗原 (HLA-A, B, C) を発現しておらず、一方非古典的 HLA クラス I 抗原の一つである HLA-G のみを発現していること、またこの HLA-G は絨毛細胞だけに発現していて、他の細胞には一切発現されていないこと (Kovats et al. 1993; Yelavarthi et al. 1991; Lata et al. 1992; Chumbley et al. 1993; McMaster et al. 1995)、などが明らかとなってきたのである。このような特徴から、HLA-G は妊娠維持免疫において何らかの重要な役割を演じていると考えられている。

HLA-G 抗原は非古典的クラス I 抗原の一つであり、1987 年 Geraghty らによりクローニングされ、報告された。一般に HLA は極めて多型性に富むという特徴を持つが HLA-G は多型性に乏しいと報告されていた (Alizadeh et al. 1993; Morales et al. 1993)。実際 WHO HLA Nomenclature Committee に公式に登録されている HLA-G 対立遺伝子は G\*01011, G\*01012, G\*01013, G\*0102, G\*0103 だけであった (Bodmer et al. 1995)。G\*01011 は Geraghty らが初めての HLA-G 遺伝子として報告したものであり (Geraghty et al. 1987)、G\*01012 は Ellis らが cell line "BeWo" の HLA-G 遺伝子として (Ellis et al. 1990) 報告したものである。G\*01013 は Castro らが (Castro et al. 1996) ,

G\*0102 は Pook らが (Pook et al. 1991)、G\*0103 は Morales らが報告した (Morales et al. 1993) ものである。また本邦においては Tamaki らが日本人の胎盤から HLA-G の genomic clone である 7.0E を報告している (Tamaki et al. 1993)。

HLA-G の乏しい多型性は HLA-G の有する際だった特徴であり、ゆえにこの多型性の乏しさが母児間の妊娠維持免疫において本質的に重要であると考えられていた。しかしながらアフリカ系アメリカ人の HLA-G 遺伝子は古典的クラス I 遺伝子同様非常に多型性に富むとの報告がなされた (van der Ven and Ober 1994)。そこでアフリカ系アメリカ人以外の民族の HLA-G は多型性に富むの否が非常に興味深い問題となった。そこで今回我々はこれまで系統的な解析がなされていない日本人の HLA-G の多型性を初めて検討した。また、G\*01012 の homozygous であると報告されていた BeWo の HLA-G を解析した。さらに、HLA-G には細胞膜結合型と分泌型が存在するが、分泌型を産生する際、intron 4 の前半部を 21 番目の stop codon まで一部転写、翻訳している (Fujii et al. 1994)。従ってこの部位の変異は分泌型 HLA-G の産生に大きな影響を与えると予想される。そこで今回 intron 4 部位の解析も行なった。方法は PCR-SSCP 法 (Orita et al. 1989; Bannai et al. 1994)、PCR-SSO 法、DNA direct sequencing 法、および cloning/sequencing 法を用いた。

#### <方法>

##### 対象

54 人の健康日本人 (男 27 人、女 27 人) から genomic DNA を抽出した。それらの血清タイピングを NIH 標準リンパ球傷害テストで行った。また、日本人に典型的な 7 種類の HLA ハプロタイプを有する DNA 検体 (Tokunaga et al. 1985) 計 8 検体も用いた。HLA-G genomic clone 7.0E (Tamaki et al. 1992) は Riken Gene Bank (No. 1246) から購入した (Ibaraki, Japan)。cell line "BeWo" はヒューマンサイエンス研究資源バンク (JCRB9111) から購入した (Osaka, Japan)。

##### Polymerase chain reaction (PCR)

HLA-G の exon 2、3、4、intron 4 のそれぞれを特異的に増幅するように 4 組の primer を設計した (Table 1、これらの primer の DNA 結合部位については Figure 1 参照)。その際、あらかじめ多数の primer を合成し、また PCR の条件を他種類設定し、HLA-A、-B、-C など他の HLA を増幅しないこと、HLA-G のみを効率的に増幅させること、を満たす primer を選択した。

PCR の条件は、94℃ 4 分間の変性ステップの後、以下の増幅サイクルを exon



2、3、4 については 30 サイクル、intron 4 については 35 サイクル行い、最後に 72℃ 5 分間の伸長ステップを行った。増幅サイクルは、94℃ 30 秒間の変性ステップの後、62℃ (exon 2)、65℃ (exon 3)、55℃ (exon 4)、58℃ (intron 4) 30 秒間の結合ステップを行い、72℃ 1 分間の伸長ステップを行った (Table 1)。

#### Single-strand conformation polymorphism (SSCP)

PCR に続いて SSCP 解析を行った (Orita et al. 1989; Bannai et al. 1994)。その際、グリセロールの濃度、アクリルアミドとビスアクリルアミドの比、泳動温度、泳動電圧等の条件を多種類設定し、最良の結果が得られる組合せを決定した。

条件は以下の通りである。PCR で増幅された DNA を、exon 2 および 4 については 10% グリセロール添加 12.5% ポリアクリルアミドゲル (アクリルアミド: ビスアクリルアミド = 99:1)、intron 4 についてはグリセロール非添加 12.5% ポリアクリルアミドゲル (同 49:1) で電気泳動を行った。電気泳動はミニゲル電気泳動装置と恒温槽 (AE-6370; Atto, Tokyo, Japan) を用い、120V で 2.5 時間泳動した。泳動温度は、38℃ (exon 2)、30℃ (exon 4)、25℃ (intron 4) とした。ゲル中で分離された DNA 断片は銀染色で検出した (Daichi Pure Chemicals, Tokyo, Japan)。

exon 3 についてはそのままではバンドの分離が不良であったので、制限酵素 Eco NI (New England Biolabs, Beverly, MA) でまず 2 つの断片に切断し、phenol/chloroform 法 (Sambrook et al. 1989) で精製したのちに SSCP 反応を行った (Eco NI の切断部位については Figure 1 参照)。グリセロール非添加 12.5% ポリアクリルアミドゲル (同 49:1) を用い、25℃、120V で 4 時間電気泳動を行った。

#### 塩基配列決定

SSCP 法で現れた各バンドに相当する PCR 増幅産物の塩基配列を Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing キットと 373A DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて決定した。BeWo については cloning/sequencing 法で塩基配列を決定した。

#### Sequence-specific oligonucleotide (SSO)

exon 3 における塩基配列の相違部位の確認のために SSO 法を用いた。Table 2 に示す 6 種類の probe を設計した (これらの probe の DNA 結合部位については Figure 1 参照)。exon 3 の増幅産物を digoxigenin-ddUTP でラベルした

probe とハイブリダイズした(Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)。42℃40 分間でハイブリダイズしたあと Table 2 で示した温度で洗浄した。そのうち chemiluminescent system と DIG Luminescent Detection Kit (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) で検出した。

#### 統計解析

HLA-G 対立遺伝子の頻度の男女差、HLA-G 対立遺伝子と他の HLA 対立遺伝子の間の関連の有意差の有無はカイ二乗検定、および必要に応じ Fisher の直接確率計算法で検定した。

#### <結果>

##### PCR-SSCP 法による分類

exon 2 については 3 種類、exon 3 については 4 種類、exon 4 については 1 種類、intron 4 については 2 種類のバンドパターンが観察された (Figs. 2, 3, 4, 5)。exon 2 のバンドパターンは G2-a, -b, -c, exon 3 のバンドパターンは G3-a, -b, -c, -d, intron 4 のバンドパターンは I4-a, -b ととりあえず命名した。

日本人に典型的な 7 種類の HLA ハプロタイプを有する DNA 検体それぞれもこれらのバンドパターンの組合せを示した。7.0E は G2-a, G3-d, I4-a の組合せを示した。BeWo は heterozygous で G2-a/-c, G3-c/-d, I4-a の組合せを示した。

##### 各対立遺伝子の塩基配列決定

exon 2, 3, 4, intron 4 の組合せから 4 種類の対立遺伝子が存在することが分かり、仮りに GJ1, GJ2, GJ3, GJ4 と名付けた (Fig. 1)。各対立遺伝子のバンドパターンは Table 3 に示した。GJ1 の塩基配列は G\*01011 と、GJ2 の塩基配列は 7.0E と一致した。GJ3 の塩基配列はこれまでに報告された対立遺伝子に一致するものがなく、今回公式に G\*0104 と命名された (Bodmer et al. 1995, Yamashita et al. 1996)。G\*0104 は G\*01011 と比較して exon 3 に 1 塩基の非同義置換を有していた (codon110 の第一塩基がロイシンからイソロイシンに置換されていた)。G\*01013 についてはこれまで exon 2 と exon 3 の一部が報告されているに過ぎなかった (Morales et al. 1993) が、GJ4 の exon 2, 3 はそれに一致した。

##### PCR-SSO 法による確認

exon 3 には今回初めて 1 塩基の非同義置換が見つかったため SSO 法にてさ

らに確認した (Fig. 6)。その結果 SSO 法にても 4 種類の対立遺伝子が明瞭に区別された。

#### BeWo の塩基配列決定

SSCP 法の結果、BeWo の HLA-G の exon 2 と exon 3 は G\*01013 と 7.0E の heterozygous なパターンを示した (Fig. 7a, 7b)。exon 2 からの PCR 増幅断片をクローニングした後、6 個のクローンについて塩基配列を決定した。その結果、SSCP 法による予想に一致して、G\*01013 の配列をもつクローンと 7.0E の配列をもつクローンの両者が得られた。もともと G\*01012 は BeWo の HLA-G として報告されたもので、7.0E とは exon 2 内に 1 ヶ所 (position 1010) 塩基の相違が存在するだけだった。そこで我々は、BeWo はこれまでの報告のように G\*01012 の homozygous ではなく、7.0E と G\*01013 の heterozygous であること、G\*01012 の position 1010 の T は誤りであり C に修正されるべきこと、と結論した (Yamashita et al. 1997)。この修正は今回、WHO HLA Nomenclature Committee により認められた (Bodmer et al. 1995)。

#### 対立遺伝子頻度の解析

各対立遺伝子の頻度は以下の通りであった。GJ1 (G\*01011):0.33、GJ2 (7.0E, corrected G\*01012):0.16、GJ3 (G\*0104):0.45、GJ4 (G\*01013):0.06。各対立遺伝子型の頻度分布は Hardy-Weinberg の法則に従っていた。いずれの対立遺伝子も男女間に頻度差は認めなかった。

#### HLA-G と他の HLA との連鎖不平衡

HLA-G の各対立遺伝子と HLA-A、-B、DRB1 の対立遺伝子の間の連鎖不平衡は Table 4 に示した。G\*01011 と A2、あるいは G\*0104 と A24 のように、HLA-G は HLA-A との間に最も強い連鎖不平衡を示した。HLA-G は HLA-B、-DRB1 との間にも連鎖不平衡を示したが、HLA-A に比較すると弱かった。HLA-G は第 6 染色体短腕上に存在し、セントロメア側から HLA-DP、-DQ、-DR、-B、-C、-E、-A、-G、-F の順に並んでいる。従って染色体上 HLA-G は HLA-A と最も距離的に近く、HLA-G と HLA-A の連鎖不平衡が最も強いのは合理的と思われた。

日本人に典型的な 7 種類の HLA ハプロタイプを有する DNA 検体はそれぞれ HLA-G の 4 種類の対立遺伝子のうちの 1 つを有していたが、興味深いことに日本人に最も頻度の高い上位 4 種類のハプロタイプはすべて今回初めて報告された G\*0104 を有していた。実際上述のように G\*0104 の対立遺伝子頻度は 0.45

と、4種類の対立遺伝子の中で最多であった。これらの結果と、54人の健常日本人の結果を総合して、日本人に典型的な7種類のHLAハプロタイプはTable 5に示すようなHLA-G対立遺伝子を有すると考えられた。

#### <考察>

母体にとって半同種移植片である胎児が拒絶されないで子宮内で発育する現象は従来の移植免疫学では説明できず、何らかの特殊な免疫学的妊娠維持機構の存在が示唆される。この機構として、現在2つの機序が考えられている。1つは、母体の胎児に対する移植免疫反応が低下しているとする考え方で、母体免疫反応抑制説と呼ばれる。もう1つは母体の免疫細胞が胎児や胎盤を認識して積極的に反応し、種々のサイトカインを分泌してそのネットワークを形成し、胎盤絨毛の発育をコントロールしているとする考え方でイムノトロピズム説と呼ばれる。

母体免疫反応抑制説については、胎盤絨毛の父系抗原に結合して母体細胞傷害性Tリンパ球が認識できないようにする遮断抗体や、母体リンパ球の受容体に結合してそのリンパ球の活性を抑制する抗イデオタイプ抗体、母体の抑制性細胞が細胞傷害性Tリンパ球やNK細胞を抑制する細胞性免疫などの説があるが、遮断抗体や抗イデオタイプ抗体が必ずしもすべての妊婦血中に存在するわけではないことから、この母体免疫反応抑制説だけでは免疫学的妊娠維持機構すべてを説明できなくなっている。

一方イムノトロピズム説であるが、胎盤局所のリンパ球を調べてみると抑制状態ではなくむしろ活性化状態にあり、胎盤において多くのサイトカインが合成、分泌されていることがわかっている。妊娠初期の胎盤脱着膜中の母体リンパ球の大半を占める、大顆粒リンパ球が絨毛細胞を認識すると活性化し、IL-1やTNF- $\alpha$ 、interferon (IFN)- $\gamma$ などのサイトカインを分泌する。これらサイトカインは脱着膜中の間質細胞やマクロファージに働き、これら細胞からのmacrophage colony stimulating factor (M-CSF)、granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)、IL-3などのサイトカイン分泌を促す。これらのサイトカインは絨毛細胞の成長や発達を促進し、胎盤の形成を促進する。さらに、IL-1やM-CSF、GM-CSFは絨毛細胞からのhuman chorionic gonadotropin (hCG)の分泌を促進し、hCGが卵巣からのestrogenやprogesteroneの分泌を促し、これらのホルモンがキラー細胞抑制作用や脱着膜間質細胞刺激作用を介して妊娠の維持に内分泌学的にも関与している。このような、サイトカイン・ホルモンネットワークを介する胎盤局所の反応をイムノトロピズムと呼んでいる。



子宮外妊娠は、妊娠が子宮内だけでなく卵管や卵巣、腹膜表面でも成立する事実を示している。このことから、妊娠維持免疫反応を誘発する最初の信号は子宮ではなく胎児胎盤側が出していると予想される。胎児側組織である絨毛細胞が古典的 HLA クラス I 抗原を発現しておらず HLA-G のみを発現していることから、HLA-G がその最初の信号ではないかと注目されてきた。HLA-G の妊娠免疫における役割を検討するため、我々はまず妊娠合併症の 1 つである妊娠中毒症と HLA-G との関連を検討したところ、HLA-G 抗原が妊娠中毒症患者の胎盤絨毛組織では局在的に発現していないことが示された (Hara et al. 1996)。したがって HLA-G の発現の減少が妊娠中毒症の発症に関与している可能性が示唆され、正常の妊娠維持に HLA-G が必要であると考えられた。さらに我々は、HLA-G が末梢血単核球のサイトカイン分泌に与える影響を検討した結果、HLA-G を発現している細胞と末梢血単核球を共培養すると、末梢血単核球が分泌する IL-1 と IL-1 $\beta$  は増加するのに対し、TNF- $\alpha$  は減少することを示した (Maejima et al. 1997)。このように HLA-G は末梢血単核球のサイトカイン分泌能に影響を与えていることが判明したが、胎盤局所においても同様に母体免疫細胞に影響を与え、妊娠に有利となるようサイトカイン環境を調節している可能性が考えられる。これらの点から、HLA-G が妊娠維持免疫において重要な役割を演じている可能性が高いと考えられる。

母体組織に侵入してゆく胎児組織 = 絨毛細胞が多型性に富む古典的 HLA クラス I 抗原を発現していないということは、母体 T リンパ球に同種移植片拒絶反応を起こさせないための必要条件であるが、一方クラス I 抗原を発現していない細胞は Natural Killer (NK) 細胞から“非自己”として攻撃を受ける筈である。しかしここに多型性に極めて乏しい HLA-G が存在することにより NK 細胞からの攻撃をも逃れ、母体内に生着できると考えられる。実際、HLA クラス I 抗原を発現していない細胞に HLA-G 遺伝子を導入すると NK 細胞に対する抵抗性が増すという報告がある (Chumbley et al. 1994)。この際、HLA-G の多型性の乏しさが NK 細胞からの攻撃を抑制するのに重要であり、妊娠維持免疫反応にとってこのような HLA-G の特徴が本質的に重要であると考えられている。

Geraghty らによる最初の HLA-G の報告 (Geraghty et al. 1987) 以来、いくつかの HLA-G 対立遺伝子の報告がなされてきた。コーカソイドにおいては Morales らが 4 種類の対立遺伝子を報告したが (Morales et al. 1993)、そのうちの 1 つ、G\*0103 だけが非同義置換を有していた。しかしこの G\*0103 は極めて稀な対立遺伝子であった。また 7.0E (corrected G\*01012) は G\*01011 と比較していくつかの塩基置換を有していたが、アミノ酸配列については G\*01011 と一致していた (Tamaki et al. 1993)。すなわちこれまで HLA-G に

はタンパクレベルの多型性がほとんどまったく存在しないとされてきたことになる。しかし、アフリカ系アメリカ人の HLA-G については古典的クラス I 遺伝子同様多型性に富むとの報告がなされ (van der Ven and Ober 1994)、このことはこれまでの HLA-G に関する概念を覆すばかりでなく、NK 細胞との関係など妊娠維持免疫反応への HLA-G の関与の機序に関する基本的認識の変更を迫るものであった。

そこで今回我々はこれまで系統的な解析のなされていない日本人における HLA-G の多型性を解析した。その結果、健常日本人には G\*01011、7.0E (corrected G\*01012)、G\*01013、G\*0104 の 4 種類の対立遺伝子が存在することが示された。その中の G\*0104 は exon 3 にアミノ酸置換を有する、今回初めて報告された対立遺伝子であり、しかも G\*0103 のように稀ではなく日本人において頻度が 0.45 と最も高頻度で存在した。これは、HLA-G の事実上の初めてのアミノ酸多型の報告となった。

intron 4 についてはこれまでの報告と一致する 1 塩基置換以外の新しい変異は存在せず、またこの塩基置換は stop codon の下流に存在した。従って分泌型 HLA-G の産生に影響を及ぼす可能性のある変異は今回発見されなかった。

以上から、日本人の HLA-G はコーカソイド系集団での報告と同様に多型性に乏しいと結論した。アフリカ系アメリカ人との差については追試が必要と考えられるが、それが事実であればレトロウイルスの差など居住環境の違いによる selective pressure の相違が原因かもしれないが不明である。

HLA-G が妊娠免疫においてどのような役割を演じているのか、特に HLA-G の多型性の乏しさが妊娠免疫において重要であるか否かの検討のためには、今後妊娠免疫の破綻が原因の一つと考えられている疾患である習慣流産、妊娠中毒症、子宮内胎児発育遅延、不妊症などの患者の HLA-G を解析することが必要である。

## references

- Alizadeh M, Legras C, Semana G, Le Bouteiller P, Genetet B, and Fauchet R. Evidence for a polymorphism of HLA-G gene. *Hum Immunol* 38: 206-212, 1993
- Bannai M, Tokunaga K, Lin L, Kuwata S, Mazda T, Amaki I, Fujisawa K, and Fuji T. Discrimination of human HLA-DRB1 alleles by PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism) method. *Eur J Immunogenetics* 21: 1-9, 1994
- Bodmer J G, Marsh SGE, Albert ED, Bontrop RE, Charron D, Bodmer WF, Dupont B, Erlich HA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Sasazuki T, Schreuder GMTh, Strominger J, Svejgaard A, and Terasaki PI. Nomenclature for factors of the HLA system, 1995. *Tissue Antigens* 46: 1-18, 1995
- Castro MJ, Morales P, Fernandez-soria V, Suarez B, Recio MJ, Alvarez M, Martin-Villa M, and Arnaiz-Villena A. Allelic diversity at the primate Mhc-G locus: exon 3 bears stop codons in all Cercophitecinae sequences. *Immunogenetics* 43: 327-336, 1996
- Chumbley G, King A, Holmes N, and Loke YW. In situ hybridization and northern blot demonstration of HLA-G mRNA in human trophoblast populations by locus-specific oligonucleotide. *Hum Immunol* 37: 17-22, 1993
- Chumbley G, King A, Robertson K, Holmes N, and Loke YW. Resistance of HLA-G and HLA-A2 transfectants to lysis by decidual NK cells. *Cell Immunol* 155: 312-322, 1994
- Ellis SA, Palmer MS, and McMichael AJ. Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA class I molecule. *J Immunol* 144: 731-735, 1990
- Fujii T, Ishitani A, Geraghty DE. A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4. *J Immunol*

153: 5516-5524, 1994

Geraghty DE, Koller BH, and Orr HT. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 9145-9149, 1987

Hara N, Fujii T, Okai T, and Taketani Y. Histochemical demonstration of interleukin-2 in decidua cells of patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 34: 44-51, 1995

Hara N, Fujii T, Yamashita T, Kozuma S, Okai T, and Taketani Y. Altered expression of Human Leukocyte Antigen G (HLA-G) on extravillous trophoblasts in preeclampsia: Immunohistological demonstration with anti-HLA-G specific antibody "87G" and anti-cytokeratin antibody "CAM5.2". *Am J Reprod Immunol* 36: 349-358, 1996

Kupferminc MJ, Peaceman AM, Wigton TR, Rehnberg KA, Socol ML. Tumor necrosis factor- $\alpha$  is elevated in plasma and amniotic fluid of patients with severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 170: 1752-1759, 1994

Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, and DeMars R. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* 248: 220-223, 1990

Lata JA, Tuan RS, Shepley KJ, Mulligan MM, Jackson LG, and Smith JB. Localization of major histocompatibility complex class I and II mRNA in human first-trimester chorionic villi by in situ hybridization. *J Exp Med* 175: 1027-1032, 1992

Maejima M, Fujii T, Kozuma S, Okai T, Shibata Y, and Taketani Y. Presence of HLA-G-expressing cells modulates the ability of peripheral blood mononuclear cells to release cytokines. *Am J Reprod Immunol* 38: 79-82, 1997

McMaster MT, Librach CL, Zhou Y, Lim KH, Janatpour MJ, DeMars R,



Kovats S, Damsky C, and Fisher SJ. Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts. *J Immunol* 154: 3771-3778, 1995

Morales P, Corell A, Martinez-Laso J, Martin-Villa JM, Varela P, Paz-Artal E, Allende LM, and Arnaiz-Villena A. Three new HLA-G alleles and their linkage disequilibria with HLA-A. *Immunogenetics* 38: 323-331, 1993

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, and 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

Pook MA, Woodcock V, Tassabehji M, Campbell RD, Summers CW, Taylor M, and Strachan T. Characterization of an expressible nonclassical class I HLA gene. *Hum Immunol* 32: 102-109, 1991

Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989

Sunder-Plassmann G, Derfler K, Wagner L, Stockenhuber F, Endler M, Nowotny C, and Balcke P. Increased serum activity of interleukin-2 in decidua cells of patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2: 203-205, 1989

Tamaki J. [Analysis of polymorphism at the human class I MHC locus, HLA-G]. [in Japanese]. *J Med Sci Hokkaido* 67: 583-594, 1992

Tamaki J, Arimura Y, Koda T, Fujimoto S, Fujino T, Wakisaka A, and Kakinuma M. Heterogeneity of HLA-G genes identified by polymerase chain reaction/single strand conformational polymorphism (PCR/SSCP). *Microbiol Immunol* 37: 633-640, 1993

Tokunaga K, Omoto K, Akaza T, Akiyama N, Amemiya H, Naito S, Sasazuki T, Satoh H, and Juji T. Haplotype study on C4 polymorphism in Japanese. Associations with MHC alleles, complotypes, and HLA-

complement haplotypes. *Immunogenetics* 22: 359-365, 1985

van der Ven K and Ober C. HLA-G polymorphisms in African Americans. *J Immunol* 153: 5628-5633, 1994

Yamashita T, Fujii T, Tokunaga K, Tadokoro K, Juji T, and Taketani Y. Correction of the HLA-G\*01012 genomic sequence *Tissue Antigens* 49: 673-674, 1997

Yamashita T, Fujii T, Watanabe Y, Tokunaga K, Tadokoro K, Juji T, and Taketani Y. HLA-G gene polymorphism in a Japanese population. *Immunogenetics* 44: 186-191, 1996

Yelavarthi KK, Fishback JL, and Hunt JS. Analysis of HLA-G mRNA in human placental and extraplacental membrane cells by in situ hybridization. *J Immunol* 146: 2847-2854, 1991

**Table 1** Primer sequences, sizes of amplified DNAs, and annealing temperatures for amplification of exons 2, 3, 4, and intron 4 of the HLA-G gene.

amplified region	Primer	Primer sequence	Size of amplified DNA (bp)	Annealing temperature (°C)
exon 2	GE2U	5'-GGGTCTGGGCGGGTCTCAA-3'	361	62
	GE2D	5'-TCCGTGGGGCATGGAGGT-3'		
exon 3	GE3U	5'-GGGGCTGACCGAGGGGT-3'	361	65
	GE3D	5'-GCTAGGCCAGGCTG(A/G)GAGG-3'		
exon 4	GE4U	5'-CCATGAGAGATGCAAAAGTGCT-3'	364	55
	GE4D	5'-TGCTTTCCTTAACAGACATGAT-3'		
intron 4	GI4U	5'-TGCCGGAGCCCCCTCATG-3'	166	58
	GI4D	5'-AACCAG(G/A)CCAGCAACGATA-3'		

Slash indicates that the primer contains equal amounts of two oligonucleotides.

Table 2 Probe sequences for SSO analysis of exon 3.

Probe	Oligonucleotide sequence	Orientation	Washing temperature (°C)
G-Ex3-8C	5'-AGGTTCTCACACCCCTCCAG-3'	sense	62
G-Ex3-8T	5'-CTGGAGGGTATGAGAACCT-3'	antisense	56
G-Ex3-50A	5'-GTCCGACGGACGCCCTC(C/A)TC-3'	sense	62
G-Ex3-50T	5'-GTCCGACGGTCGCCCTCCTC-3'	sense	62
G-Ex3-57C	5'-GG(A/T)CGCCTCCTCCGCGGGT-3'	sense	58
G-Ex3-57A	5'-ACCCGCGGATGAGCGGTCC-3'	antisense	58

Slash indicates that the probe contains equal amounts of two oligonucleotides.



**Table 3** Four HLA-G alleles and their SSCP banding patterns

Allele	SSCP banding pattern		Frequency	Identity to reported allele
	Exon 2	Exon 3		
GJ1	G2-b	G3-b	0.33	G*01011
GJ2	G2-a	G3-d	0.16	G*01012
GJ3	G2-a	G3-a	0.45	G*0104
GJ4	G2-c	G3-c	0.06	G*01013

**Table 4** Associations between HLA-G and other HLA alleles in Japanese

HLA-G	HLA	Haplotype Frequency	p
G*01011	A2	0.26	$< 1 \times 10^{-8}$
G*01013	A11	0.056	$< 1 \times 10^{-4}$
G*0104	A24	0.30	$< 1 \times 10^{-7}$
G*0104	A33	0.15	$< 1 \times 10^{-3}$
G*01012	A26	0.065	$< 1 \times 10^{-4}$
G*01012	A31	0.083	$< 1 \times 10^{-5}$
G*01013	B62	0.056	$< 1 \times 10^{-5}$
G*0104	B44	0.14	$< 0.005$
G*0104	B52	0.15	$< 0.005$
G*01013	DRB1*0406	0.046	$< 1 \times 10^{-4}$
G*0104	DRB1*1302	0.13	$< 0.005$

Table 5 HLA-G alleles carried by common HLA haplotypes in Japanese

HLA-A	HLA-B	HLA-DRB1	Haplotype frequency * (%)	HLA-G	Number of tested cases	
					homozygous	heterozygous
24	52	1502	8.63	G*0104	2	10
33	44	1302	4.78	G*0104	1	11
24	7	0101	3.97	G*0104	1	0
24	54	0405	3.09	G*0104	1	3
2	46	0803	2.16	G*01011	1	5
26	61	0901	1.88	G*01012	1	1
11	62	0406	1.19	G*01013	1	5

\* According to Tokunaga and co-workers (1985)

## Figure legends

Fig. 1. HLA-G exon2, 3, 4, intron4 の塩基配列。Nucleotide position number は Geraghty らによる (1987)。太文字は exon 内、小文字は intron 内の塩基であることを示す。ダッシュは G\*01011 との一致、アスタリスクは欠落、下線は PCR primer の結合部位、細い矢印は制限酵素 Eco NI の切断部位、太い矢印は G\*01012 の修正塩基、exon3 内のボックスは 6 個の SSO probe の結合部位、intron4 内のボックスは stop codon を意味する。

Fig. 2. HLA-G exon2 の SSCP。3 種類のバンドパターンとその組合せを認めた。バンドパターンはそれぞれ以下のように命名した。Lane 1: G2-a, Lane 2: G2-b, Lane 3: G2-c, Lane 4: G2-a/-b, Lane 5: G2-a/-c, Lane 6: G2-b/-c。

Fig. 3. HLA-G exon3 の SSCP。4 種類のバンドパターンとその組合せを認めた。バンドパターンはそれぞれ以下のように命名した。Lane 1: G3-a, Lane 2: G3-b, Lane 3: G3-c, Lane 4: G3-d, Lane 5: G3-a/-b, Lane 6: G3-a/-c, Lane 7: G3-a/-d, Lane 8: G3-b/-c, Lane 9: G3-b/-d, Lane 10: G3-c/-d。

Fig. 4. HLA-G exon4 の SSCP。1 種類のバンドパターンしか認めなかった。

Fig. 5. HLA-G intron4 の SSCP。2 種類のバンドパターンとその組合せを認めた。バンドパターンはそれぞれ以下のように命名した。Lane 1: G\*01011; Lane 2: G\*01012; Lane 3: G\*01013; Lane 4: G\*0104。

Fig. 6. HLA-G exon3 の SSO。Sample no.1 : G\*01011 を有することが DNA 直接塩基配列決定法で確認された検体を G-Ex3-8C、-50A、-57C の陽性コントロールとして、また G-Ex3-8T、-50T、-57A の陰性コントロールとして用いた。no.2 : 7.0E を G-Ex3-8T、-50T、-57A の陽性コントロールとして、また G-Ex3-8C、-50A、-57C の陰性コントロールとして用いた。no.3~12 : SSCP の各バンドパターンを示した検体 (no.3: G3-a; no.4: G3-b; no.5: G3-c; no.6: G3-d; no.7: G3-a/-b; no.8: G3-a/-c; no.9: G3-a/-d; no.10: G3-b/-c; no.11: G3-b/-d; no.12: G3-c/-d)。



Fig. 7-1. BeWo の HLA-G exon2 の SSCP。 G\*01013 と corrected G\*01012 (7.0E) の heterozygous なバンドパターンを示した。  
Lane 1: G\*01013; Lane 2: BeWo; Lane 3: corrected G\*01012 (7.0E); Lane 4: G\*01011。

Fig. 7-2. BeWo の HLA-G exon3 の SSCP。 G\*01013 と corrected G\*01012 (7.0E) の heterozygous なバンドパターンを示した。  
Lane 1: G\*01013; Lane 2: BeWo; Lane 3: the corrected G\*01012 (7.0E); Lane 4: G\*01011; Lane 5: G\*0104。



2602 Intron 4

G\*01011 (G/1) GGTCGCGGAGGCTTCATGCTGAGATGGAGtaaggaggagatggagggcatcatgctctgttagggaaagcaggagocctctctgaagacctttaaagggg  
 G\*01012 (G/2) -----  
 G\*01013 (G/4) -----  
 G\*0104 (G/3) -----

2702

G\*01011 (G/1) tccgtggatgagggctgggggtcagagacccaccttcaacctcttccagAGCAGTCTTCCCTGCCACCATCCCGATCATGGGTATCGTTCCTGCGG  
 G\*01012 (G/2) -----  
 G\*01013 (G/4) -----  
 G\*0104 (G/3) -----

2802

G\*01011 (G/1) TGGTCTC  
 G\*01012 (G/2) -----  
 G\*01013 (G/4) -----  
 G\*0104 (G/3) -----

Fig. 1

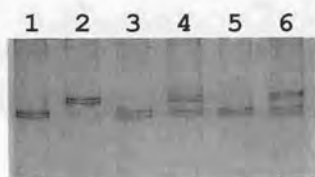


Fig. 2



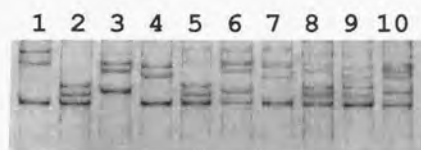


Fig. 3

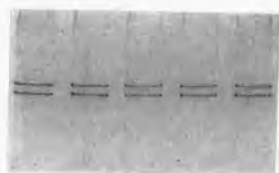


Fig. 4



Fig. 5

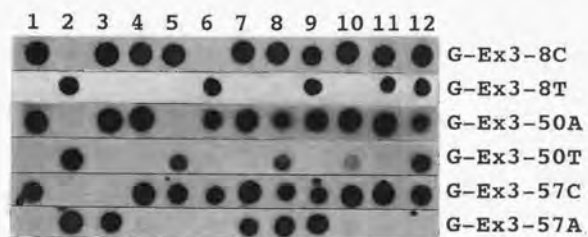


Fig. 6





Fig. 7 - 1

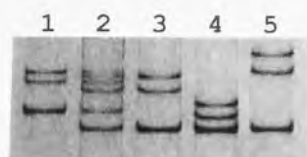
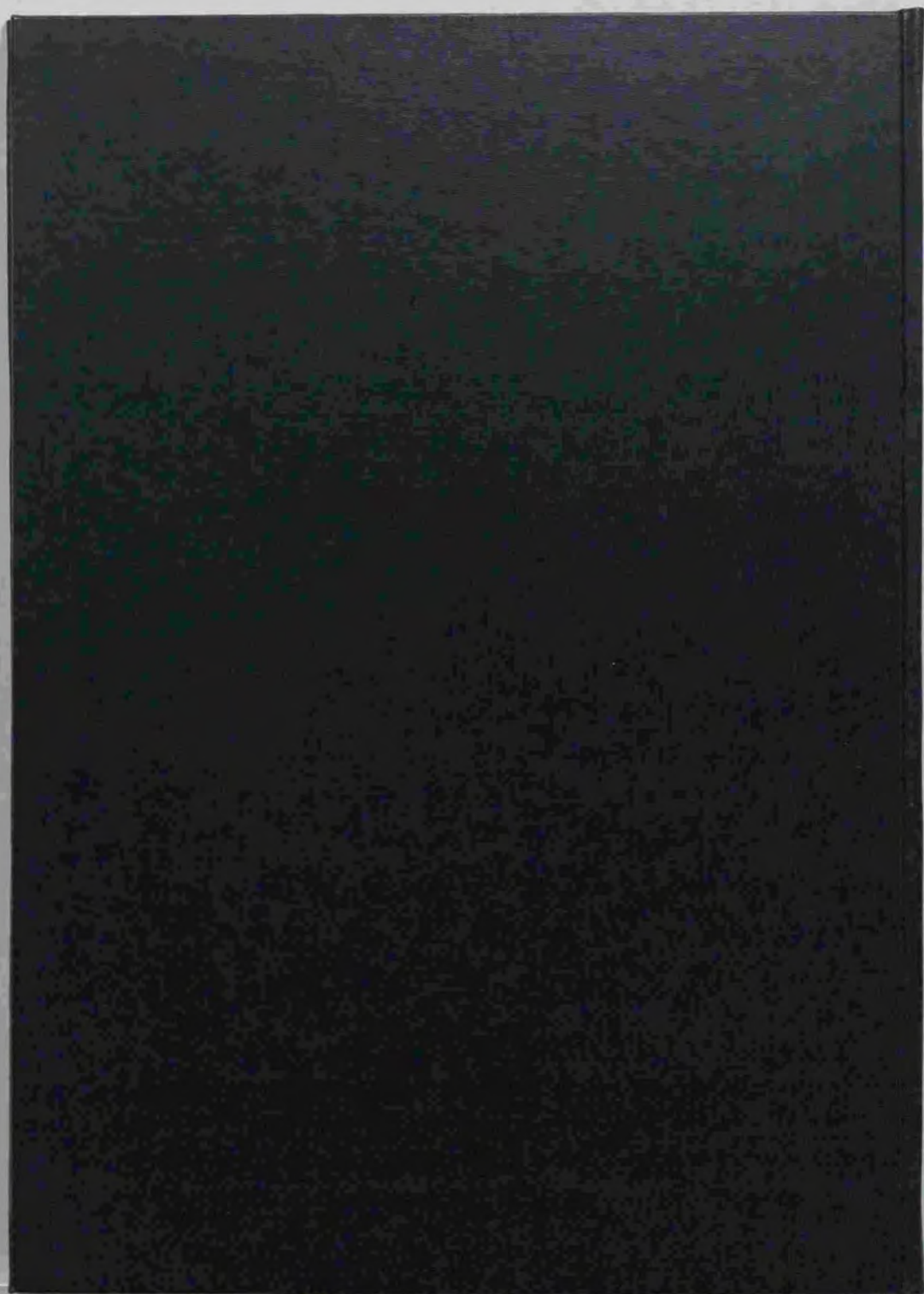
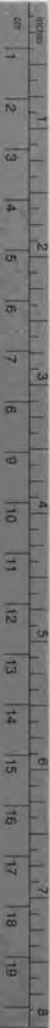


Fig. 7 - 2





# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue    Cyan    Green    Yellow    Red    Magenta    White    3/Color    Black



## Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A    1    2    3    4    5    6    M    8    9    10    11    12    13    14    15    B    17    18    19

