

Thesis

胃癌患者の HLA-B タイピングによるクラス I 遺伝子多型,
および癌組織における HLA クラス I 発現

埼玉医科大学第二外科学教室

(指導: 平山 廉三教授)

荻野 育貞

【背景と目的】

HLA クラス I 分子 (HLA-A, B, C 抗原) は, 癌特異抗原などの非自己抗原ペプチドおよび T 細胞レセプターと合して 3 分子複合体を作り, それが, 主に CD8⁺ 細胞障害性 T 細胞 (CTL) を誘導して腫瘍免疫に深く関与する. 我々は胃癌の発生と進展において HLA クラス I 分子の果たす役割を解析する目的で, HLA クラス I, 特に HLA-B 遺伝子の関与を検索した.

【対象】

胃癌手術がなされた 81 症例.

【方 法】

全例において切除胃および全血液から DNA を抽出し, sequence specific oligonucleotide probe (SSO) 法に準じて HLA-B の DNA タイピングを行い, HLA-B 遺伝子座のアレルを決定した. 81 症例のうち 50 例については凍結切片を免疫染色し, 癌部と正常部における HLA クラス I 抗原発現を比較した. 同時に, 癌部と正常部から別々に抽出した DNA を用い, PCR-SSCP 法によって癌組織における $\beta 2$ -ミクログロブリン遺伝子変異について検討した.

【結 果】

胃癌患者では, HLA-B の DNA タイピングにおける HLA-B39 の頻度が有意に上昇していた. 50 例中 23 例 (46%) において癌組織で HLA クラス I 分子の発現がみられたが, 癌組織型, 進行程度と HLA クラス I 分子発現との間に相関は認められなかった. また, 癌組織における $\beta 2$ -ミクログロブリン遺伝子には変異を認めなかった.

【結 語】

胃癌において HLA-B39 の頻度上昇がみられたことから, 担癌感受性を高めるのに HLA-クラス I の特定遺伝子が直接関与していることが示唆された.

Keywords: Gastric cancer, sequence specific oligonucleotide probe (SSO) method, HLA-B39, HLA class I, $\beta 2$ -microglobulin, immuno-staining avidine-biotinylated enzyme complex (ABC), polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) method.

緒 言

近年, 分子生物学・医学の進歩により, 遺伝子異常の蓄積による癌発生の機序が解明され, 「癌は遺伝子病」であることが明らかにされつつある. その結果, 最近では発癌および進展のメカニズムに基づいた理論的な癌治療が行われるようになった.

HLA (human leukocyte antigen) 系は第 6 染色体短腕において約 4000kb にわたる巨大な領域を占め, 免疫応答制御において中心的な役割を果たすものである¹⁾. 当初は, HLA 抗原の主要組織適合抗原としての性格に注目されたため, HLA に関する研究の多

くは主に移植外科医によってなされ, 抗原特異性の解析が中心課題であった.

その後, HLA クラス I 分子と腫瘍免疫との深い関わり, すなわち, 腫瘍抗原ペプチドと接合した HLA クラス I 分子, および T 細胞レセプターの 3 分子で形成された複合体が CD8⁺ 細胞障害性 T 細胞 (CTL) を誘導して腫瘍免疫に関与すること²⁾ が明らかとなり, これまでに, 大腸癌, 乳癌, 膵癌, 黒色腫等についての研究が進んだ. なかでも黒色腫については精緻な研究がなされ, それによるとキラー T 細胞のほとんどが HLA クラス I 分子に拘束された CD8⁺ T 細胞であった³⁾. 癌細胞においてその表面の HLA 分子が CTL の標的となることから, 癌細胞上の HLA 発現が殺腫瘍作用の効率を左右すると予想される.

癌細胞での HLA 分子発現は HLA タイピングごとに大きく異なり患者の HLA タイプが癌の臨床像に大きく反映することが考えられる⁴⁾。また、HLA クラス I 抗原の発現低下が肺小細胞癌、乳癌⁵⁾、皮膚基底細胞癌等について、また、HLA クラス I 抗原のうちの特定のアレルの欠損や欠如⁶⁾が大腸癌細胞において知られている⁷⁾。しかし、胃癌については、HLA クラス II 抗原である HLA-DQw3⁸⁾以外にこれと明白な関連性をもつものは乏しいとされてきた⁹⁾。

今回、我々は胃癌について HLA-B 遺伝子多型との関連について調べ、HLA-B39 との相関を見出した。さらにこの相関の意味を明らかにするため、免疫組織学的に癌組織における HLA クラス I 分子の発現を調べ、臨床病理学的所見および予後との関連性を検討した。併せて HLA クラス I 分子の軽鎖に相当し、HLA と異なる染色体上に存在する $\beta 2$ ミクログロブリン遺伝子の変異と HLA クラス I 分子発現の有無との関連性についても検討を加えた。

対象と方法

対 象

1994 年～2000 年までの期間に埼玉医科大学付属病院第二外科で切除された胃癌のうち 81 症例を対象とした。手術時の平均年齢は 63.1 才 (34～87)、男女比は 1:0.4 (58:23) であった。症例の内訳は早期癌 38 例、進行癌 43 例。進行程度別では、Stage I 38 例、Stage II 18 例、Stage III 18 例、Stage IV 7 例であった¹⁰⁾。切除胃の組織型分類では、管状腺癌 42 例、低分化腺癌 29 例、印環細胞癌 6 例、粘液癌 3 例、乳頭腺癌 1 例、中村・管野分類では、未分化型癌 38 例、分化型癌 43 例であった。リンパ節転移陽性は 52 例、陰性 29 例であった¹⁰⁾ (表 1)。

また、健常成人ボランティア 76 名の末梢全血液を使用した。

方 法

1) HLA-B タイピング

0.05M EDTA 添加全血液 1ml から DNA Extractor WB Kit (和光純薬、大阪) を用いて genomic DNA を分離した。また、切除胃の正常部組織を細碎した後、同 Kit を用いて DNA を抽出した。さらに、第 12 回国際 HLA ワークショップの sequence specific oligonucleotide probe (SSO) 法に準じた HLA-B の DNA タイピングを行った^{11,12)}。すなわち、多型性を示す領域を PCR (polymerase chain reaction) 法によって増幅したあと、数種類の SSO への反応性によって多型部位を識別した。そして対応する塩基配列の組み合わせから HLA-B 遺伝子座の対立遺伝子型 (アレル) を決定した¹³⁾。各群における HLA 抗原の発現頻度は 2×2 表による χ^2 検定を用いて比較

した¹⁴⁾。また、各抗原について得られた P 値に各遺伝子座のアレル数を乗じ Bonferroni 補正¹⁵⁾を行い Pc 値として表示した (Pc 値が 0.05 以下を有意とした)。各抗原を有するときの罹患危険率をオッズ比 (Odds ratio: OR) で表現し、統計学的有意性を 95% 信頼区間 (95% CI) で表した。

2) 免疫染色

50 件の切除胃標本より癌巣ならびに近傍の正常部組織を切り取り、直ちに -80°C に凍結した。凍結切片を作製し、biotine 標識モノクローナル抗体、Mouse monoclonal anti-human HLA-ABC-class I (DAKO, Copenhagen) と ABC 法 (avidine-biotinylated enzyme complex) による免疫組織染色を行って、HLA クラス I 抗原の発現を検討した。発色基質には DAB; 3'3diaminobenzidineHCl 溶液 (同仁化学、熊本) を用いた^{16,17)}。

3) PCR-SSCP (polymerase chain reaction - single strand conformation polymorphism) 法による $\beta 2$ -ミクログロブリン遺伝子の変異の検出

0.05M EDTA 添加全血液 1ml から DNA Extractor WB Kit (和光純薬、大阪) を用いて genomic DNA を分離した。採取した癌組織を細碎した後、同 Kit を用いて同様に DNA を抽出した。また、パラフィン切片標本は、Oshima らの方法に準じてヘマトキシリンによる核染色をした後、顕微鏡下で癌部のみを採取して、DNA 抽出用試薬 (PK-Tween solution) を用いて癌組織由来の genomic DNA を抽出した¹⁸⁾ (図 1)。

4) $\beta 2$ -ミクログロブリン遺伝子変異の解析

水木らの手法によって $\beta 2$ -ミクログロブリン遺伝子変異を解析した。10 mM Tris-HCl (pH8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5U Taq DNA ポリメラーゼ (Perkin Elmer, NJ, USA), 0.2 mM dNTPs, 5', 3'プライマー (5'-ttgtcctgattggctggg-3', 5'ctgtgctctcgtccgtgactt-3') を含む全量 30 μ l の反応液に template DNA 約 100ng を加え、95 $^\circ\text{C}$ 3 分、(94 $^\circ\text{C}$ 30 秒, 58 $^\circ\text{C}$ 30 秒, 72 $^\circ\text{C}$ 90 秒) 42 サイクル, 60 $^\circ\text{C}$ 10 分の条件下で PCR を行ない、これによって、Exon 1 を含む全長 222 ベースの断片を得ることができた。PCR 増幅産物における変異の検索には、Maruya¹⁹⁾ らの方法に準じて Low Ionic Strength (LIS)-SSCP 法を用いた²⁰⁾。PCR 産物に LIS-Solution (5% glycerol, 0.01% bromophenol blue, 0.01% Xylene cyanol) を加え、95 $^\circ\text{C}$ で 6 分間加熱の後に急冷し、ポリアクリルアミドゲル (6% Acrylamide, 0.4 $\times$ TBE) で 21 $^\circ\text{C}$, 180V で約 2 時間電気泳動した。泳動ののち DNA を銀染色 (Silver Stain II Kit Wako, 和光純薬、大阪) して解析した²⁰⁾。

結 果

1) HLA-B DNA タイピングの結果、胃癌患者では健

表 1. 対象症例

平均年齢±SD *	63.1 ±10.5 (才)		
男女比	1 : 0.4		
病理所見**			(例数)
管状腺癌	42		
低分化腺癌	29		
印環細胞癌	6		
粘液癌	3		
乳頭腺癌	1		
組織型***	未分化型 (胃型)	38	
	分化型 (腸型)	43	
深達度**	t ₁ (早期癌)	38	
	t ₂ > (進行癌)	43	
リンパ節転移**	陽性	41	
	陰性	40	
進行程度**	stage I	38	
	II	18	
	III	18	
	IV	7	

*: 年齢は手術時.

**: 胃癌取り扱い規約、第13版1999 による分類.

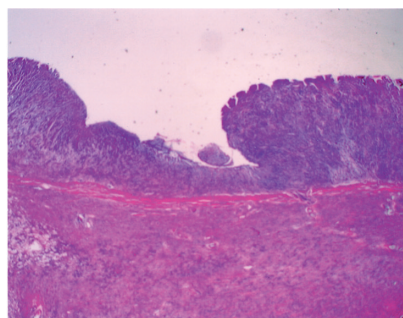
***: 中村・管野 (1964)による胃癌組織型分類.

表 2. 胃癌患者における HLA-B DNA タイピングの頻度

HLA-B	健常対照群		胃癌	
	n=76	(%)	n=81	(%)
B7	7	(9.2)	9	(11.3)
B35	13	(17.1)	15	(18.8)
B38	1	(1.3)	3	(3.8)
B39	2	(2.6)	14	(17.5) *
B40	9	(11.8)	15	(18.8)
B44	8	(10.5)	4	(5.0)
B46	7	(9.2)	6	(7.5)
B48	2	(2.6)	3	(3.8)
B51	14	(18.4)	12	(15.0)
B52	10	(13.2)	13	(16.3)
B54	11	(14.5)	8	(10.0)
B55	3	(3.9)	4	(5.0)
B62	9	(11.8)	9	(11.3)
B71	1	(1.3)	5	(6.3)

* Pc<0.01, OR=7.73 (95%CI=1.69-35.28)

A



B

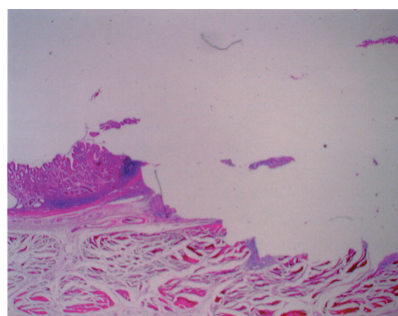
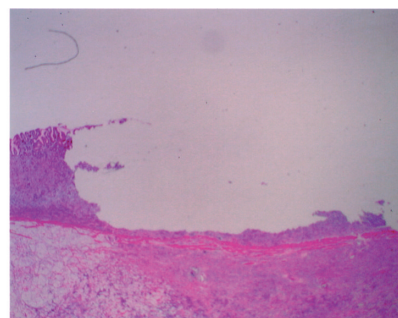
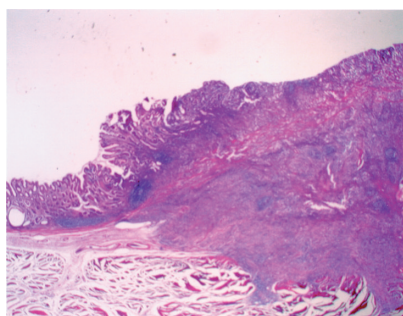


図 1. 切片標本からの癌部の摘出. パラフィン切片をヘマトキシリンにて核染色し, 顕微鏡下で 18G 注射針を用いて癌部を採取した. (HE 染色×100)

A: 63 才, 男性, 管状腺癌,

B: 76 才, 男性, 低分化腺癌. いずれも左が採取前で, 右が採取後.

表 3. 胃癌組織型および深達度別の HLA-B DNA タイピングの頻度

HLA-B	健常対照群		胃癌			
	n=76 (%)		組織型		深達度	
			未分化型癌 n=38 (%)	分化型癌 n=43 (%)	早期癌 n=38 (%)	進行癌 n=43 (%)
B7	7 (9.2)		7 (18.4)	2 (4.6)	3 (7.9)	6 (13.9)
B35	13 (17.1)		8 (21.0)	7 (16.2)	7 (18.4)	8 (18.6)
B39	2 (2.6)		9 (23.6) *	5 (11.6)	7 (18.4)	7 (16.2)
B40	9 (11.8)		7 (18.4)	8 (18.6)	5 (13.2)	10 (23.8)
B44	8 (10.5)		1 (2.6)	3 (6.9)	3 (7.9)	1 (2.3)
B46	7 (9.2)		2 (5.2)	4 (9.3)	5 (13.1)	1 (2.3)
B48	2 (2.6)		2 (5.2)	1 (2.3)	1 (2.6)	2 (4.8)
B51	14 (18.4)		4 (10.5)	8 (18.6)	6 (15.8)	3 (6.9)
B52	10 (13.2)		7 (18.4)	6 (13.9)	8 (21.0)	5 (11.6)
B54	11 (14.5)		2 (5.2)	6 (13.9)	4 (10.5)	4 (9.3)
B55	3 (3.9)		1 (2.6)	3 (6.9)	1 (2.6)	3 (6.9)
B62	9 (11.8)		5 (13.1)	4 (9.3)	6 (15.8)	3 (6.9)
B71	1 (1.3)		2 (5.2)	3 (6.9)	1 (2.6)	2 (4.6)

健常対照群との比較：* $P_c = 0.003$, $OR = 11.48$ (95%CI=2.34-56.38)
ただし、未分化型癌と分化型癌の間に統計的な有意差は認めない。

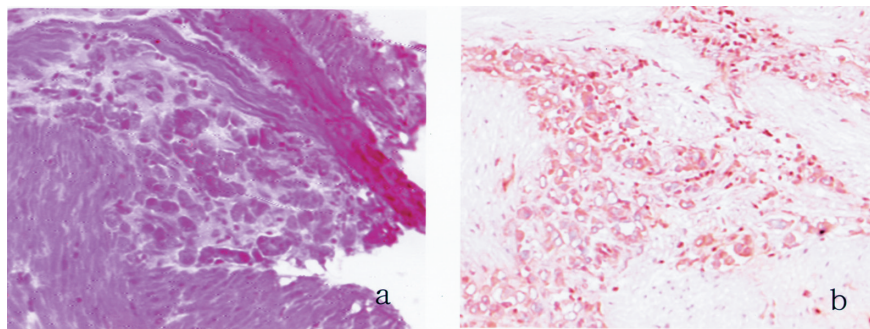


図 2-1. 癌部での抗 HLA クラス I 分子の発現 (陽性). 癌細胞, 間質の細胞, および筋層において HLA クラス I 分子が強く染色されている.
(a: HE 染色, b: HLA クラス I 免疫染色)

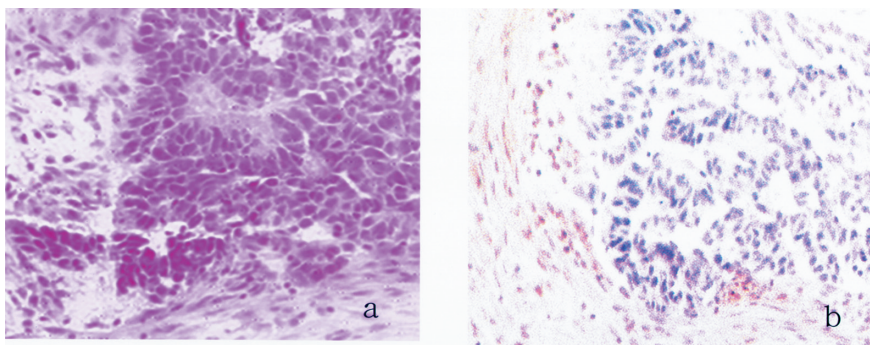


図 2-2. 癌部での抗 HLA クラス I 分子の発現 (陰性). 間質の細胞は HLA クラス I 分子が強く染色されているが, 癌組織は染まっていない.
(a: HE 染色, b: HLA クラス I 免疫染色)

表 4. 胃癌組織における HLA class I 抗原の発現

			免疫染色	
		症例数	陰性	陽性
組織型	未分化型癌	28	14	14
	分化型癌	22	13	9
深達度	t ₁ （早期癌）	10	4	6
	t ₂ >（進行癌）	40	23	17
リンパ節転移	陽性	35	20 *	15
	陰性	15	7	8
免疫染色陰性の者のリンパ節転移陽性になる危険率				
* P= 0.496, OR=1.52 (95%CI=0.45-5.14)				

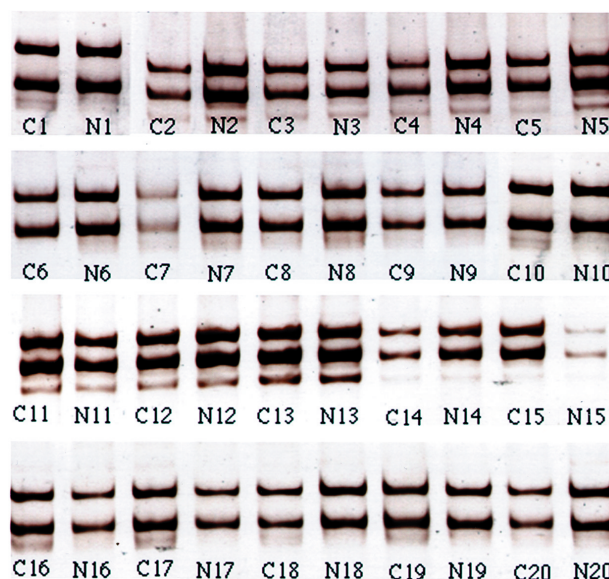
図 3. $\beta 2$ ミクログロブリン遺伝子 Exon 1 の SSCP.
C: 胃癌組織, N: 正常組織, 数字は症例番号を示す.

表 5. HLA-B DNA 型と癌組織内 HLA class I 分子発現

HLA-B	免疫染色			
	陰性 n=38	(%)	陽性 n=25	(%)
B7	2	(5.2)	1	(4.0)
B13	1	(2.6)	0	(0.0)
B15	8	(21.0)	4	(16.0)
B1508	1	(2.6)	1	(4.0)
B35	3	(7.8)	5	(20.0)
B37	1	(2.6)	1	(4.0)
B38	1	(2.6)	0	(0.0)
B39 *	4	(10.5)	1	(4.0)
B40	3	(7.8)	4	(16.0)
B51 **	4	(10.5)	0	(0.0)
B52	3	(7.8)	3	(12.0)
B54	1	(2.6)	1	(4.0)
B55	4	(10.5)	3	(12.0)
B62	1	(2.6)	0	(0.0)
B78	1	(2.6)	1	(4.0)

* P= 0.831, OR=2.82 (95%CI=0.30-26.86)

** P= 0.354, OR=6.65 (95%CI=0.34-129.18)

常人に比して HLA-B39 の頻度の有意な上昇がみられた (Pc 値 < 0.01, $\chi^2 = 9.19$, OR 値 = 7.73, 95% CI = 1.69 ~ 35.28) (表 2). さらに, 病理組織型別に検討を加えると, 未分化型癌において有意に高率であった (Pc 値 = 0.003, $\chi^2 = 12.88$, OR 値 = 11.48, 95% CI = 2.34 ~ 56.38) (表 3). しかし, HLA-B39 と臨床病期分類, リンパ節転移の有無, 予後との関連は認めなかった.

2) 抗 HLA クラス I (A, B, および C) 抗体を用いて行った癌組織の免疫染色では, 50 例中 23 例 (46%) において HLA クラス I 抗原の発現がみられ (図 2-1), 27 例 (54%) では発現をみなかった (図 2-2). しかし, HLA クラス I 抗原の発現と癌組織型・進行程度・リンパ節転移・予後との間に相関を認めなかった (表 4).

3) HLA の B-DNA タイピングと HLA クラス I の発現との関連については, B39, B51 において発現低下の傾向がみられた (表 5).

4) 癌部および近傍組織, 正常部の組織, 末梢血などから抽出した DNA について, PCR-SSCP 法によって $\beta 2$ -ミクログロブリンの遺伝子変異を調べた. しかし, 少なくとも調べた遺伝子領域 (Exon 1) において変異を認めたものはなかった (図 3).

考 察

HLA 抗原は, ほとんどすべての有核細胞に発現しているクラス I 抗原および B リンパ球や抗原提示細胞などに限って発現するクラス II 抗原に大別される. クラス I およびクラス II 抗原は, とともに外来の非自己抗原ペプチドおよび T 細胞レセプターと合し

て3分子複合体を形成し、そこではじめて外来抗原に対する免疫反応が惹起される。すなわち、外来抗原と接合したHLA抗原がT細胞の分化・増殖を誘導し、自らが攻撃（あるいは反応）の標的となって細胞障害性T細胞に結合することにより非自己である外来抗原を排除して自己保全を果している²¹⁾。

癌細胞は、本来「自己」から発生したものである。しかし、癌細胞における遺伝子変異によって正常細胞にみられない分子（すなわち、癌特異抗原）がつくられる。HLA-クラスIと共に細胞表面に現れた癌特異抗原によって、免疫監視T細胞は細胞癌化を察知して、上記の機序で直ちにこの癌細胞を排除する。癌特異抗原とともに細胞表面に現れたクラスI抗原が、細胞障害性T細胞の標的となるのである。この機序が癌細胞排除に有効な役割を果たすことはメラノーマを対象にした一連の研究によって明らかになっている。

それでは癌細胞はいかにして免疫監視機構から逃避しているのだろうか。まず第1に考えられるのは、細胞障害性T細胞の標的となる癌細胞上のHLA-クラスI分子の発現が無くなるか低下することである。癌化したことをT細胞によって認識されなければ、癌細胞は生き残ることができる。HLAクラスI分子の発現と癌との関連については、すでに他の癌においてもいくつかの報告がみられる。Cabrer²²⁾らは、喉頭腫瘍において約20%のHLA-クラスIの消失があるものの、臨床経過との相関はないと報告している。またFerrone²³⁾らは、原発性メラノーマの10%、転移メラノーマの70%でHLA-クラスI抗原の消失が起こることを報告しており、とくに後者はHLA発現の消失による免疫監視機構からの逃避現象の存在を支持する報告であると考えられる。

また消化器癌である大腸癌においてMomburg²⁴⁾らは、HLA-クラスI抗原発現量と組織学的分化度とが相関し、分化度が低くなるほど発現量が低下することを報告しているが、この事実が分化度の低さと悪性度との関連を説明するのか明らかではない。

胃癌に関する今回の検索では癌部組織においてHLA-クラスIの発現欠損を認めたものが約54%であった。残念ながら今回は、発現の有無と進行度や転移の有無との間に相関を観察することはできなかったが、表4にみられるように、発現の無い症例で転移が増加する傾向がみられたことから、今後対象数を増やすことや転移巣でのHLA発現を検討することにより、より明確な答えを得ることが可能になると考えられる。

癌組織におけるHLA発現欠損のメカニズムについては、日本人の大腸癌においてKimura⁶⁾らが、DNAMismatch修復酵素遺伝子群の変異という特有遺伝的背景を有する大腸癌の多くが β 2-ミクログロブリン遺伝子の変異かHLA-クラスI遺伝子の欠失の

いずれかを伴っていることを報告している。ここで対象とした患者の癌細胞における β 2-ミクログロブリン遺伝子については、彼らが検索したExon 1を対象にPCR-SSCP法によって遺伝子変異の検索を行ったが、HLA-クラスIの発現の有無にかかわらず変異を認めたものはなかった。このことから、胃癌におけるHLAクラスI発現欠損の大半は β 2-ミクログロブリンの変異とは別の機序によって起こっていると考えられた。HLAクラスI遺伝子領域の広汎な欠損の可能性については今後の検討課題である。

HLA遺伝子領域の遺伝子群には連鎖不平衡がみられ、特徴的なハプロタイプ（遺伝子のセット）が存在する（たとえば、日本人では、HLA-A24-B52-DRB1*1502-DQB*0501などが特徴的である）。これらのハプロタイプはそれぞれに特有の組み合わせを有し発現調節領域も特徴的であることから、ハプロタイプとして疾患特異性を有することがあると考えられる。本研究では、このようなハプロタイプでHLA分子発現が異なるか否かを調べるため、ハプロタイプマーカーの1つとしてHLA-B遺伝子多型をとりあげた。しかし、HLA-B型においてHLA発現と明確な関連をもつものは認められなかった（表5）。ただし、胃癌患者、とくに未分化型癌患者でHLA-B39の頻度が著しく高いことは注目に値する。HLA-B39については、SLE、大動脈炎症候群などの膠原病疾患と関連²⁵⁾することがこれまでに指摘されていたが、悪性腫瘍との関連を指摘した研究はみられていない。

また、HLA-クラスIIに属するHLA-DQB1と胃癌の関連が報告された²⁶⁾ことがあるが、HLAクラスIIの特定アレルと胃癌・他の消化器癌との関連についての報告はみられていない。しかし、今回HLA-B39の頻度に上昇がみられたことから、HLA-B39自身、あるいは近傍の遺伝子が胃癌における担癌感受性に関与することが示唆されたわけである。

HLA-B39と胃癌との相関を考える上で、免疫監視機構への関与以外にもう一つ重要な点は、HLAが外来病原微生物に対して免疫応答遺伝子として機能していることである。免疫応答の何らかの障害により、適確に排除されなかった外来異物や微生物、例えばHelicobacter pylori (HP)²⁷⁾などの直接刺激による発癌の可能性も考えられるのである。HP感染によって誘発される胃腺癌にHLA-クラスII DQA1が関連するという報告²⁸⁾もあり、HLA-B39と連鎖不均衡にあるHLA-クラスIIについての今後の検討も必要である。

近年、日本において胃癌患者は減少の傾向にあり、各種の環境要因の欧米化の影響がその理由としてあげられる²⁹⁾。他方、増加傾向にある大腸癌や乳癌では、そこに家族集積性を認めることも少なくない。遺伝的要因の強く働く癌多発の家系についての

研究は、発癌の分子機構の解明に有用な情報を与え³⁰⁾, また遺伝子治療の糸口になるものである^{31,32)}。欧米では胃癌の遺伝的要因に関する報告は多いのに比し、環境因子の関わりが多いとされる日本の胃癌については、遺伝的要因について、とくに多型解析を用いてなされた報告はいまだ少ない²⁶⁾。環境因子が優勢の際、遺伝因子が隠蔽されてポジティブデータが得られないのがその理由とも考えられる。今回の検討によって日本人の胃癌にも遺伝的要因の関与が少なくないことが示唆されたが、今後、この方面のさらなる検討が期待される。

また、癌抗原パルス T 細胞療法は、近未来において癌治療の一翼を担うものと考えられる。その際、HLA 分子が標的分子となるためこの方面の知見は重要である。今回の所見を更に発展させ、癌細胞において HLA 発現の欠損がいかなる機序で起こるか、その修復は可能か、また、その生物学的意味合いの検討など、今後のさらなる研究の進展が必要である。

謝 辞

稿を終えるにあたり、直接の御指導と御校閲を賜りました埼玉医科大学医動物学教室平山謙二教授に深謝いたします。御校閲を賜りました同大学第二外科学学教室平山廉三教授に深謝いたします。

御協力頂きました医動物学教室菊池三穂子助手、第二外科教室三吉さおり実験助手、両教室諸兄姉に心より深謝いたします。

なお、本論文の要旨は第 71 回日本胃癌学会総会(平成 11 年 6 月, 東京), 第 100 回日本外科学会総会(平成 12 年 4 月, 東京)において発表した。

参考文献

- 1) 脇坂 明美, 吉木 敬. HLA と癌. 病理と臨床 1998;16(8):62-72.
- 2) Browning M, Dunnion D. HLA, And Cancer: Implications for cancer immunotherapy and vaccination. Eur J Immunogenet 1997;24:293-312.
- 3) Kawakami Y. Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA A-2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. J Exp Med 1994;180(1):347-52.
- 4) Kim CJ, Parkinson DR, Marincola F. Immunodominance across HLA polymorphism: Implications for Cancer Immunotherapy. J Immunother 1998;21(1):1-16.
- 5) Chen HL, Gabrilovich D, Virmani A, Ratnani I, KGirgis KR, Nadaf-Rahrov S, et al. Structural and functional analysis of β 2-microglobulin abnormalities in human lung and breast cancer. Int J Cancer 1996;67:756-63.
- 6) 木村 彰方. 大腸がん と HLA. Biotherapy today 1996;3(2):66-73.
- 7) Bodmer WF, Browning MJ, Krausa P, Rowan A, Bicknell DC, Bodmer JG. Tumor escape from immune response by variation in HLA expression and other mechanisms. Ann NY Acad Sci 1993;12;690:42-9.
- 8) Lee JE, Lowy AM, Thompson WA, Lu M, Loflin PT, Skibber JM, et al. Association of gastric adenocarcinoma with the HLA class II gene DQB1*0301. Gastroenterology 1996;111:426-32.
- 9) Soong TW, Hui KM. Locus-specific Transcriptional control of HLA genes. J Immunology 1992;149:2008-20.
- 10) 日本胃癌学会編: 胃癌取扱い規約. 第 13 版 1999; 金原出版, 東京.
- 11) Kimura A, Sasazuki T. Eleventh international histocompatibility workshop reference protocol for the HLA DNA-typing technique. In: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T, editors. HLA 1991 volume 1. Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference. New York; Oxford University Press. 1992;397-419.
- 12) Kimura A, Hoshino S, Yoshida M, Harada N, Sasazuki T. PCR-SSCP Polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) analysis of HLA genes: a practical HLA-matching system. In: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T, editors. HLA 1991 volume 1. Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference. New York; Oxford University Press. 1992; 511-4.
- 13) Aida K. Immunogenetic analysis of Chagas disease, an infectious disease caused by an intracellular parasite, *Trypanosoma cruzi*. J Saitama Med School 1998;25:91-102.
- 14) Dyer P, Warrens A. Design and interpretation of studies of the major histocompatibility complex in disease. In: Lechler R, editor. HLA & disease. London: Academic press. 1994:93-121.
- 15) Tukey J M. Some thoughts on clinical trials, especially problems of multiplicity. Science 1977;198:679-98.
- 16) Tsioulis GJ, Triadafilopoulos G, Goldin E, Papavassiliou ED, Rizos S, Bassioulas P, et al. Expression of HLA class I antigens in sporadic adenomas and histologically normal mucosa of colon. Cancer Res 1993;53:2374-8.
- 17) Jackson PA, Green MA, Marks CG, King RJB, Hubbard R, Cook MG. Lymphocyte subset infiltration patterns and HLA antigen status in colorectal carcinoma and adenomas. Gut 1996;38:85-9.
- 18) Oshima S, Ying Xu. P53 gene mutations, and CYP1A1

- and GSTM1 genotypes in pulmonary squamous cell carcinomas. *Mol Pathol* 1997;150(2):108-10.
- 19) Maruya E, Saji H, Yokoyama S. PCR-LIS-SSCP (Low Ionic Strength Single-stranded Conformation Polymorphism) - A Simple Method for High-resolution Allele Typing of HLA-DRB1, -DQB1, and -DPB1. *Genome Res* 1996;6:51-7.
 - 20) Kaklamanis L, Gatter KC, Hill AB, Mortensen N, Harris AL, Krausa P, et al. Loss of HLA class-I alleles, heavy chains and beta 2-microglobulin in colorectal cancer. *Int J Cancer* 1992;51(3):379-85.
 - 21) 高田肇, 猪子英俊. HLA 系と HLA タイピング. *medicina* 1994;31(11):698-706.
 - 22) Cabrena T, Salinero J, Fernandez MA, Jimenez P, Canton J, Garrido F. HLA class I alterations in laryngeal tumors. Genetic diversity of HLA. 1997;734-6.
 - 23) Ferrone S, Marincola FM. Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol Today* 1995;16:487-94.
 - 24) Momburg F, Moller P, Moldenhauer G, Hammerling GJ. Loss of HLA-A, B, C in colorectal carcinoma is related to the degree of de-differentiation. *J Immunogenet* 1986;13:195-9.
 - 25) 北村均. 高安動脈炎における HLA-B39 の意義について. *日本内科学会誌* 1996;85 臨増:109.
 - 26) Ohmori M, Yasunaga S, Maehara Y, Sugimachi K, Sasazuki T. DNA typing of HLA class I (HLA-A) and class II genes (HLA-DR, -DQ, and DP) in Japanese patients with gastric cancer. *Tissue Antigens* 1997;50:277-82.
 - 27) Namara DM, Morain CO. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1998;30(3):S294-8.
 - 28) Azuma T, Ito S, Sato F, Yamazaki Y, Miyaji H, Ito Y, et al. The Role of the HLA-DQA1 gene in resistance to atrophic gastritis and gastric adenocarcinoma induced by *Helicobacter pylori* infection. *Cancer* 1998;82(6):1013-8.
 - 29) Hosino T, Seki N, Kikuchi M, Kuramoto T, Iwamoto O, Itoh K, et al. HLA class I restricted and tumor-specific CTL in tumor-infiltrating lymphocytes of patients with gastric cancer. *Int J Cancer* 1997;70:631-8.
 - 30) Browning M, Petronzelli F, Bicknell D, Krausa P, Rowan A, Tonks S, et al. Mechanisms of loss of HLA class I expression on colorectal tumor cells. *Tissue Antigens* 1996;47:364-71.
 - 31) Tsioulas G, Godwin TA, Goldstein MF, McDougall CJ, Sing-shang N, et al. Loss of colonic HLA antigens in familial adenomatous polyposis. *Cancer Res* 1992;52:3449-52.
 - 32) Lopez-Nevot MA, Esteban F, Ferrón A, Gtiérrez J, Oliva MR, Romero C, et al. HLA class I gene expression on human primary tumours and autologous metastases: demonstration of selective losses of HLA antigens on colorectal, gastric and laryngeal carcinomas. *Br J Cancer* 1989;59:221-6.