

Allogeneic BMT Using Unrelated Donors Provided from NMDP / TCTMDR

— Race of donors (N=38) —

Japanese	7 (18%)
Asian / Pacific Islander (API)*	16 (42%)
Korean	1 (3%)
Philippino	1 (3%)
Caucasian (CAU)	5 (13%)
Hispanic	3 (9%)
Native American (NAM)	1 (3%)
North Chinese	1 (3%)
European / Western Russia (ECRWRC)	1 (3%)
Multiple	1 (3%)

(表3)

(JMDP International Committee, Dec. 1998)

Allogeneic BMT Using Unrelated Donors Provided from NMDP / TCTMDR

— Incidence of Grade III - IV Acute GVHD —

○ Incidence by race

API	7 / 24 evaluable	(29%)
Others	5 / 11 evaluable	(45%)

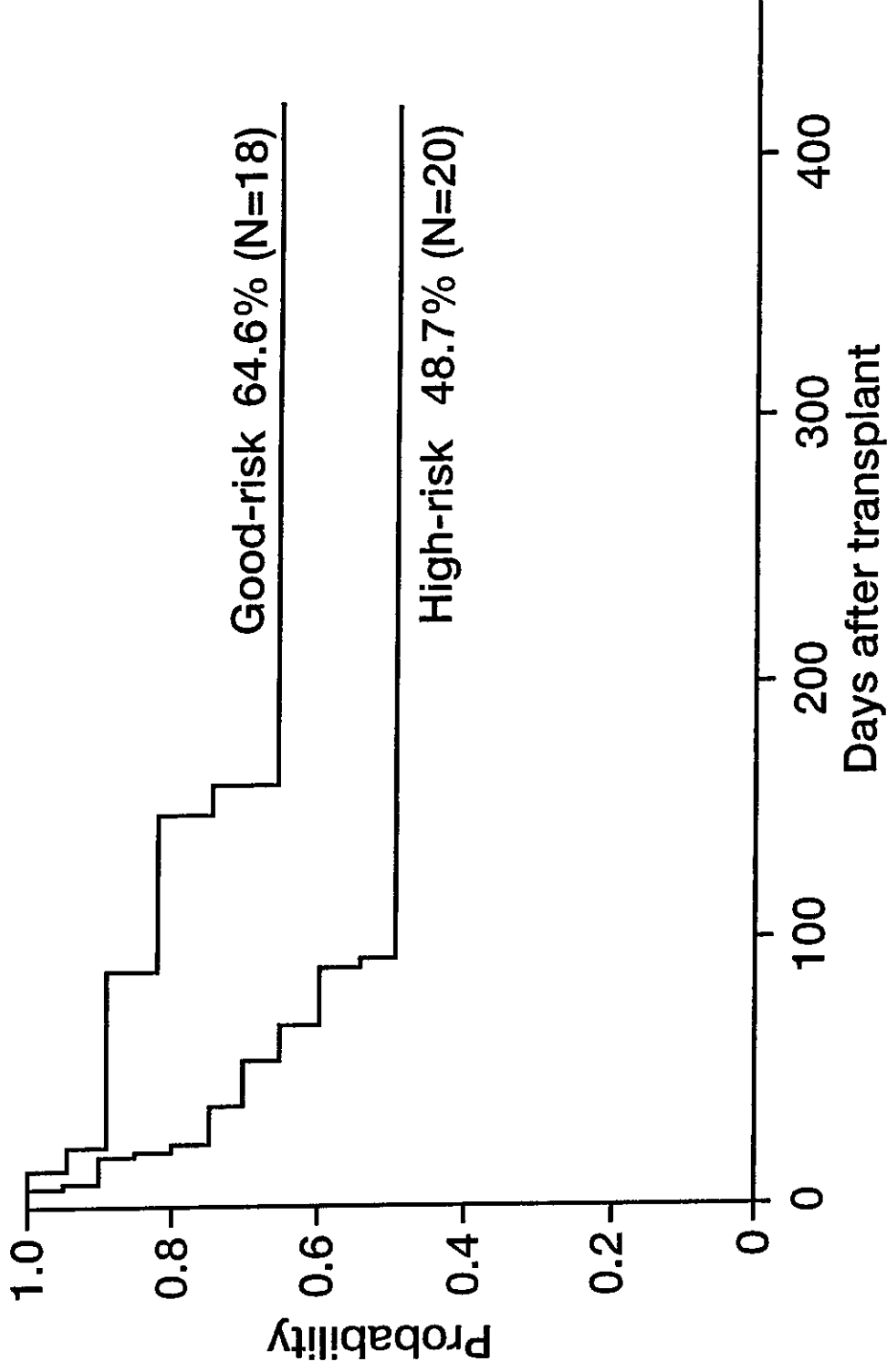
○ Incidence by HLA disparity

DR / DRB1 match	5 / 24 evaluable	(21%)
DR / DRB1 mismatch	7 / 11 evaluable	(64%)
Class I match	11 / 17 evaluable	(65%)
Class I mismatch	1* / 5 evaluable	(20%)

(* Class II allele mismatch)

Allogeneic BMT Using Unrelated Donors Provided from NMDP/TC TMDR

— Probability of overall survival —



(图1)

(JMDP International Committee Dec. 1998)

Allogeneic BMT Using Unrelated Donors Provided from NMDP / TCTMDR

— Donor's Age and survival (N=38)—

Age	N	Survival (%)
20~30	17	53%
31~40	12	75%
41~50	8	63%
50~	1	0%

(JMDF International Committee, Dec. 1998)

(表5)

IV. テーマー2

移植抗原のDNAタイピングと免疫応答

厚生科学研究費補助金（感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業）
分担研究報告書

HLA の DNA タイピングの普及に関する研究

分担研究者 笹月 健彦（九州大学生体防御医学研究所・教授）
班員外協力者 絹川 直子、能瀬 善明（九州大学医学部附属病院医療情報部）
小野 高志、上川路信博（九州大学生体防御医学研究所）

研究要旨 骨髄移植は、造血系の悪性疾患および遺伝性疾患の有効な治療法である。しかし、骨髄移植においては、しばしば致死性の GvHD が発症することから、GvHD を中心とした予後に対する HLA の寄与を詳細に把握することが、最重要である。我々はこれまでに公的骨髄バンクを利用した非血縁者間骨髄移植が行われた、血清学的に HLA-A、B、DR が一致した移植例に関して HLA 型の DNA レベルでの解析を行い、(1)HLA-A もしくは C の DNA レベルでの不一致が重症 GvHD の重要な危険因子となること、(2)HLA-A の DNA レベルでの不一致が死亡に関して重要な危険因子となること、(3)HLA-C の DNA レベルでの一致が白血病の再発に関して危険因子となること、(4)HLA-DPA1、DPB1 の DNA レベルでの一致は、急性 GvHD、生存いずれに関しても影響を与えないことを明らかにした。本年度は、これらの症例に対し新たに詳細な統計解析を行い、(1)HLA-A かつ C の DNA レベルでの不一致が GvHD の重要な危険因子となること、(2)HLA-C のみの DNA レベルでの不一致は GvHD に影響を与えないこと、(3)HLA-A のみの DNA レベルでの不一致が死亡に関して重要な危険因子となること、(4)HLA-C のみの DNA レベルでの不一致は生存率を上げる可能性があることなどを明らかにした。

A. 研究目的

骨髄移植においては、他の臓器移植とは異なり宿主による移植片の拒絶のみならず、移植片の宿主に対する強い免疫応答が、しばしば致死性 GvHD をもたらし予後を左右する。よって、GvHD を中心とした予後に対する HLA の寄与を詳細かつ正確に把握することが最重要である。これまでの研究により、HLA クラス I 遺伝子（HLA-A、B）の一致が予後に良好な結果をもたらすことが明らかにされ、骨髄バンクにおいても 1996 年 8 月以降、HLA-A、B の DNA レベルでのタイピングが始まり、より適合度の高い移植が実施されている。これまでに、我々は非血縁者間骨髄移植例 440 組を対象とした統計学的解析により、(1)HLA-A あるいは HLA-C の DNA レベルでの不一致が GvHD 発症の重要な危険因子となること、(2)HLA-A の DNA レベルでの不一致が死亡に関して重要な危険因子となること、(3)HLA-C の DNA レベルでの一致が白血病の再発に関して危険因子になること、などを明らかにしたが、これらの解析では HLA-A 不一致症例には他の HLA 遺伝子座の不一致症例、

HLA-C 不一致症例には他の HLA 遺伝子座の不一致症例が含まれており、HLA-A あるいは C のみが GvHD 発症あるいは予後に与える影響を新たに解析する必要がある。本年度は、この 440 組に関して統計解析を詳細に行い、各遺伝子座のマッチングの意義をより正確に解明することを目的とした。

B. 研究方法

これまでに集積した 440 組の移植症例の HLA-A、B、C、DRB1、DQB1 の DNA レベルでの解析結果について、新たな統計解析を加え、GvHD 発症および生存率において各遺伝子座のみの不一致例とそれ以外の遺伝子座の不一致を含む不一致例を比較し、各々の遺伝子座の不一致が GvHD 発症および生存に与える影響をより詳細に検討した。

C. 研究結果

(1) 非血縁者間骨髄移植における HLA マッチングと GvHD

前回までの解析によって HLA-A、B、C の不一致が有意にⅢ度以上の GvHD の発症に関

する危険因子となることが示された。今回の解析では、HLA-A、B、C、DRB1、DQB1の各々について、1つの遺伝子座のみが不一致である症例と他の遺伝子座の不一致を含んだその遺伝子座の不一致症例を比較し、上記5つの遺伝子座のGvHD発症におよぼす影響を検討した。

① HLA-A座：HLA-Aのみの不一致では19.4%にGvHDの発症を認めたが、A以外の不一致を含むAの不一致症例では40.2%にGvHDを認め、Aの不一致に加え他の遺伝子座の不一致がGvHD発症に重要であることが示唆された(図1)。

② HLA-C座：HLA-Cのみの不一致では、12.2%にGvHDの発症を認めたが、これはすべてが一致した症例における発症率と同程度であり、Cのみの不一致はGvHD発症には寄与しないことが明らかとなった(図2)。

③ HLA-B、DRB1、DQB1：これらの遺伝子座においては、その遺伝子座のみの不一致例が少ないため(HLA-Bのみ4例、DRB1のみ3例、DQB1のみ3例)結論は得られなかった(図3、4、5)。

④ 5遺伝子座不一致のコンビネーション：HLA-A不一致にCの不一致が加わるとGvHDの発症率が高くなること(19.4%→47.1%)、C以外の遺伝子座の不一致は影響を与えないこと(19.4%→20.0%)が示された。よって上記①における“他の遺伝子座”がCであることが明らかとなった。また、Cの不一致に他の遺伝子座の不一致が加わるとGvHDの発症率が高くなること(Cのみ12.2%、A以外のみ14.1%→C+A 47.1%、C+A以外35.4%)が示され、Cのみの不一致はGvHDの発症に寄与しないものの、それに他の遺伝子座、特にAの不一致が加わることによりGvHDが高率に発症することが明らかとなった(図6)。

(2) 非血縁者間骨髄移植におけるHLAマッチングと生存率

前回までの解析によって、HLA-Aの不一致が死亡に関して重要な危険因子となることが示された。今回の解析では、上記GvHDにおける解析と同様に、5つの遺伝子座の生存率に及ぼす影響を検討した。

① HLA-A座：HLA-Aのみの不一致症例における生存率は40.1%であり、Aのみの不一致が死亡の危険因子となることが明らかとなっ

た(図7)。

② HLA-C座：HLA-Cのみの不一致症例における生存率はすべてが一致する症例に比べ、若干高くなること(71.0%と65.7%)、そしてCの不一致に他の遺伝子座の不一致が加わると生存率が低くなること(45.8%)が示された。しかしこの時の生存率はAのみの不一致症例よりは高い(40.1%) (図7、8)。

③ HLA-B、DRB1、DQB1：これらの遺伝子座においては、その遺伝子座のみの不一致例が少ないため(HLA-Bのみ5例、DRB1のみ2例、DQB1のみ4例)結論は得られなかった(図9、10、11)。

D. 考察

これまでの非血縁者間骨髄移植症例における統計解析では、(1) HLA-A、CのDNAレベルでの不一致がGvHDの重要な危険因子となること、(2) HLA-AのDNAレベルでの不一致が死亡に関して重要な危険因子となること、(3) HLA-CのDNAレベルでの一致が白血病の再発に関して危険因子となることが明らかにされている。今回さらに詳細な解析を行い、各遺伝子座がGvHDおよび生存に与える影響を検討し、新たな知見を得た。まず、GvHDに関しHLA-CのみのDNAレベルでの不一致はGvHDに関して危険因子とはならない。しかしこれに他の遺伝子座の不一致(HLA-Aのみならず他の遺伝子座の不一致)が加わることによって、GvHDが高率に発症する。一方、HLA-AのみのDNAレベルでの不一致はGvHDの発症に寄与するが、これにHLA-Cの不一致が加わるとさらにGvHDが高率に発症し、C以外の遺伝子座の不一致は影響を及ぼさない。即ち、GvHD発症に関しての危険因子として、(1) HLA-Cおよび、Aを含む他の遺伝子座の不一致、(2) HLA-Aのみの不一致が挙げられる。その細胞免疫学的機序として、移植片CTLが主に宿主のHLA-A分子を認識し、Aが不一致の場合細胞障害性が発揮され、GvHDが生じる。この時Cの不一致があるとKIR陽性CTLあるいはNK細胞へのKIRを介した抑制シグナルが入らず、結果としてGvHD発症率が増加する。しかし、HLA-Cのみの不一致の場合、Aが一致している時にはCTLの細胞障害性は発揮されない(表1)。一方、生存率に与える影響

として、HLA-C のみの DNA レベルでの不一致が良好な結果をもたらすことが示唆されたが、これと前回の解析で示された、C の一致が白血病の再発に関して危険因子となること、を考慮すると、細胞免疫学的機序として、HLA-A が一致している場合、KIR 陽性 CTL が HLA-A によって提示された白血病細胞特異的な抗原を認識し、それに加え HLA-C の不一致によって KIR を介した抑制シグナルが入らず細胞障害性が発揮され、GvL が生じる。また、C の不一致がもたらす NK 細胞による白血病細胞の障害がそれに加わり、結果として白血病の再発が抑制され、生存に良好な結果をもたらす可能性が考えられる (表 1)。今後は症例数をさらに増やして今回得られた解析結果を確認することとその細胞レベルでの機序の解明が必要となるであろう。

E. 結論

非血縁者間骨髄移植 440 組の DNA レベルでの HLA 型と GvHD、生存率を詳細に解析することにより以下のことが示唆された。

- (1) HLA-C のみの DNA レベルでの不一致は GvHD の危険因子とはならない。
- (2) HLA-C の DNA レベルでの不一致に他の遺伝子座 (HLA-A、B、DRB1、DQB1) の DNA レベルでの不一致が加わると GvHD の危険因子となる。
- (3) HLA-A のみの DNA レベルでの不一致は GvHD の危険因子となるが、C の DNA レベルでの不一致により増悪する。
- (4) HLA-A のみの DNA レベルでの不一致は死亡の危険因子となる。
- (5) HLA-C のみの DNA レベルでの不一致は生存率に良好な影響を与え得る。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Savoie CJ, Kamikawaji N, Sasazuki T.: The peptide binding motif of HLA-A*0217. *Immunogenetics*, in press, 1999
- 2) Nishimura H, Washizu J, Naiki Y, Hara T, Fukui Y, Sasazuki T, Yoshikai Y: MHC class II-dependent NK1.1+ $\gamma\delta$ T cells are induced in mice by Salmonella infection. *J. Immunol.*, in press, 1999
- 3) Sano T, Yamamoto K, Fukui Y, Sasazuki T: Spontaneous clustering of Thy-1 antigens on CD4⁺ CD8⁺ thymocytes lacking TCR engagement by MHC/ peptide complexes. *Eur. J. Immunol.*, 29:403-412, 1999
- 4) Gytoku T, Fukui Y, Sasazuki T: An endogenously processed self peptide and the corresponding exogenous peptide bound to the same MHC class II molecule could be distinct ligands for TCR with different kinetic stability. *Eur. J. Immunol.*, 28:4050-4061, 1998
- 5) Ono T, Zambenedetti MR, Yamasaki K, Kawano Y, Kamikawaji N, Ito H, Sakurai M, Nishimura Y, Kira J, Kanazawa I, Sasazuki T: Molecular analysis of HLA class I (HLA-A and -B) and HLA class II (HLA-DRB1) genes in Japanese patients with multiple sclerosis (Western type and Asian type). *Tissue Antigens*, 52:539-542, 1998
- 6) Sasazuki T, Juji T, Morishima Y, Kinukawa N, Kashiwabara H, Inoko H, Yoshida T, Kimura A, Akaza T, Kamikawaji N, Kodera Y, Takaku F: Effect of matching of class I HLA alleles on clinical outcome after transplantation of hematopoietic stem cells from an unrelated donor. *New Engl. J. Med.*, 339:1177-1185, 1998
- 7) Takahashi A, Ogasawara K, Matsuki N, Fujinaga K, Nakaya T, Ikuta K, Auwanit W, Honda M, Fukui Y, Sasazuki T, Iwabuchi K, Onoe K: Development of peptide vaccines inducing production of neutralizing antibodies against HIV-1 viruses in HLA-DQ6 mice. *Vaccine*, 16: 1537-1543, 1998
- 8) Fukui Y, Hashimoto O, Inayoshi A, Gytoku T, Sano T, Koga T, Gushima T, Sasazuki T: Highly restricted T cell repertoire shaped by a single major histocompatibility complex-peptide ligand in the presence of a single rearranged T cell receptor β chain. *J. Exp. Med.*, 188:897-907, 1998

- 9) Gapin L, Fukui Y, Kanellopoulos J, Sano T, Casrouge A, Malier V, Beaudoin E, Gautheret D, Claverie JM, Sasazuki T, Kourilsky P: Quantitative analysis of the T-cell repertoire by a single peptide/MHC complex. *J. Exp. Med.*, 187: 1871-1883, 1998
- 10) Savoie CJ, Kamikawaji N, Sudo T, Furuse M, Shirasawa S, Tana T, Sasazuki T: MHC class I bound peptides of a colon carcinoma cell line, a Ki-ras gene-targeted progeny cell line and a B cell line. *Cancer Letters*, 123:193-197, 1998
- 11) Tana T., Kamikawaji, N., Savoie, C.J., Sudo, T., Kinoshita, Y., Sasazuki, T.: A HLA binding motif-aided peptide epitope library: A novel library design for the screening of HLA-DR4-restricted antigenic peptides recognized by CD4⁺ T cells. *J. Human Genet.*, 43:14-21, 1998
- 12) 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*, 50:277-282, 1997
- 13) Fukui Y, Yamamoto K, Koga T, Yamane K, Sasazuki T.: Differential requirement of MHC class II molecules expressed on haematopoietic cells for positive selection of CD4⁺ thymocytes in TCR $\alpha\beta$ and TCR β transgenic mice. *Int. Immunol.*, 9:1385-1391, 1997
- 14) Ishimoto T, Yamamoto K, Fukui Y, Fukuda Y, Dohi K, Sasazuki T.: In Vitro and In Vivo evidence for high frequency of I-Ab-reactive CD4⁺ T cells in HLA-DQ or HLA-DRA transgenic mice lacking endogenous MHC class I and/or class II expression. *J. Immunol.*, 159: 3717-3722, 1997
- 15) Fukui Y, Ishimoto T, Utsuyama M, Gyotoku T, Koga T, Nakao K, Hirokawa K, Katsuki M, Sasazuki, T.: Positive and negative CD4⁺ thymocyte selection by a single MHC class II/peptide ligand affected by its expression level in the thymus. *Immunity*, 6: 401-410, 1997
- 16) Takeshita T, Fukui Y, Yamamoto K, Yamane K, Inamitsu T, Kamikawaji N, Sasazuki T: Identification of HLA-DQ6-derived peptide recognized by mouse MHC class I H-2D^b-restricted CD8⁺ T cells in HLA-DQ6 transgenic mice. *Jpn. J. Human Genet.*, 42: 225-232, 1997

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

図1. 非血縁者間骨髄移植における HLA 型マッチングと GvHD 発症 (1)

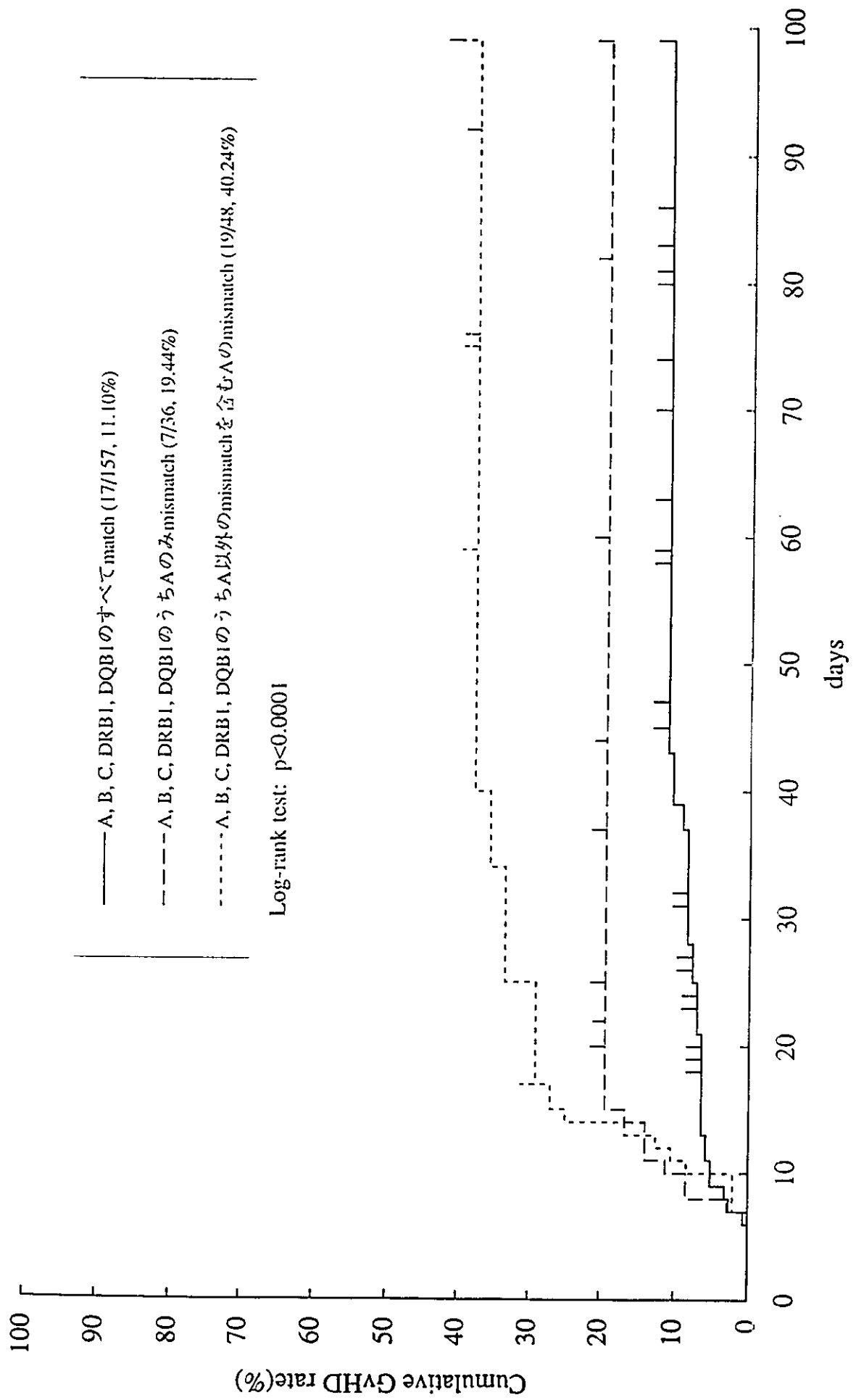


図2. 非血縁者間骨髄移植におけるHLA型マッチングとGvHD発症(2)

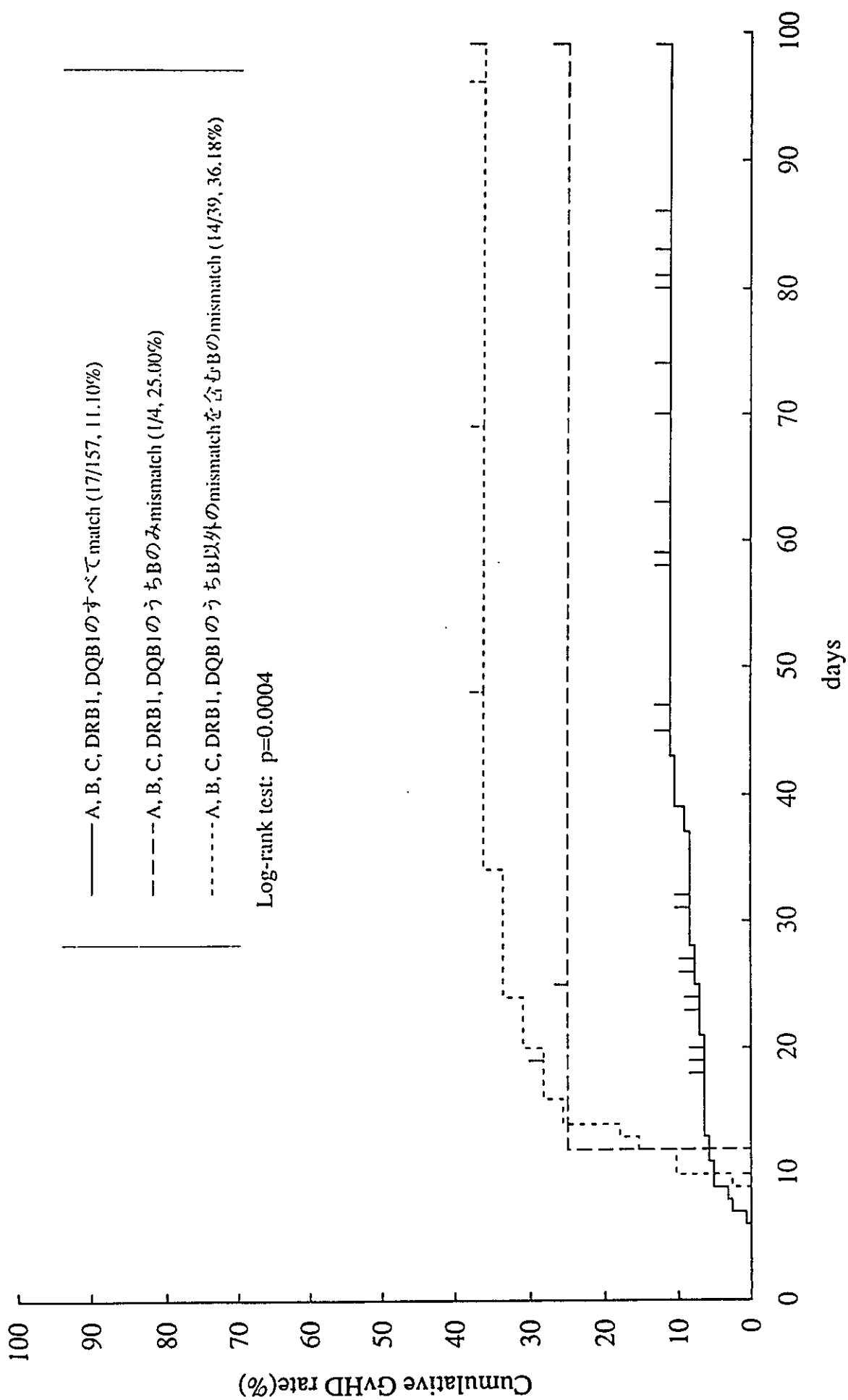


図3. 非血縁者間骨髄移植におけるHLA型マッチングとGvHD発症(3)

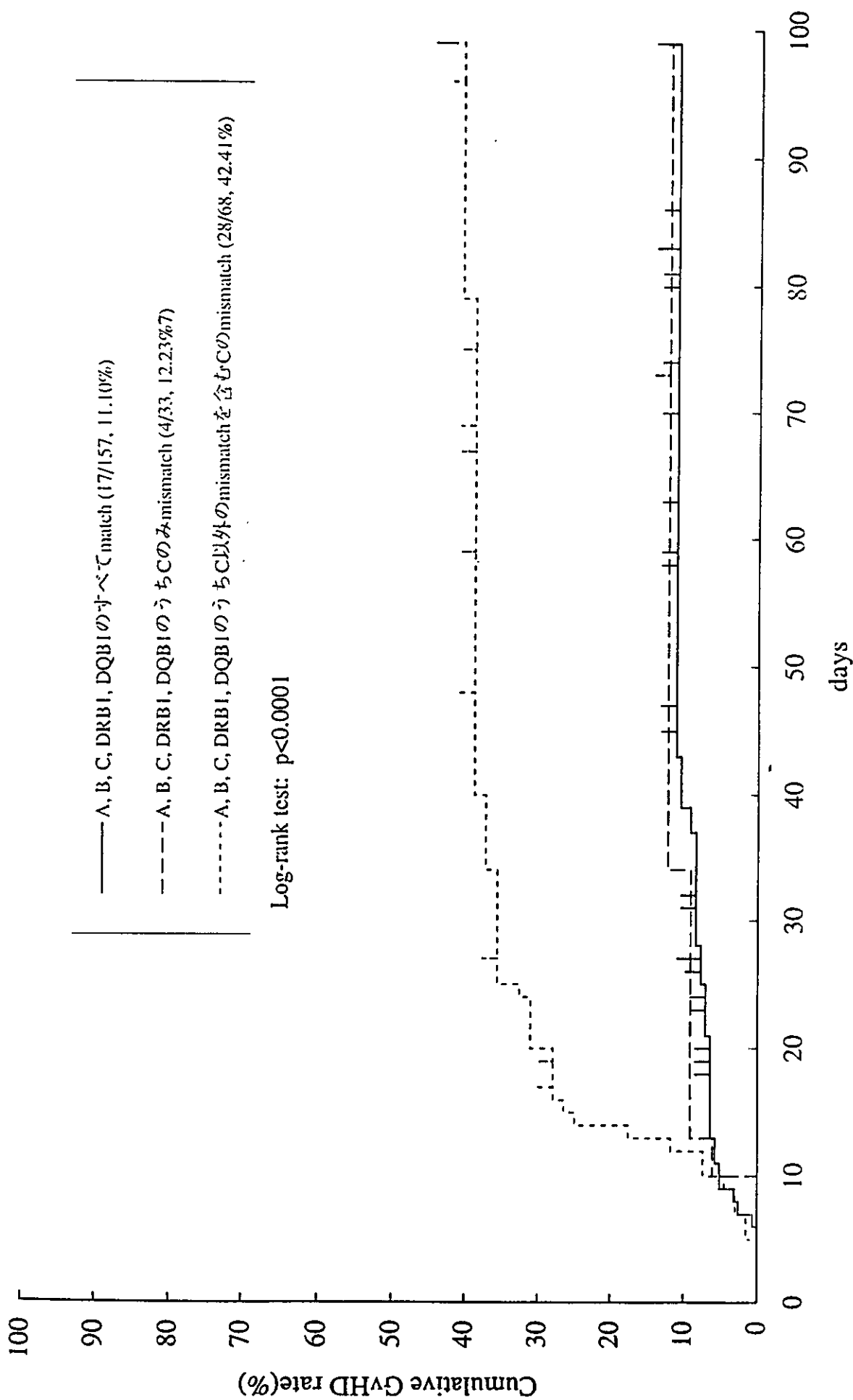


図4. 非血縁者間骨髄移植におけるHLA型マッチングとGvHD発症(4)

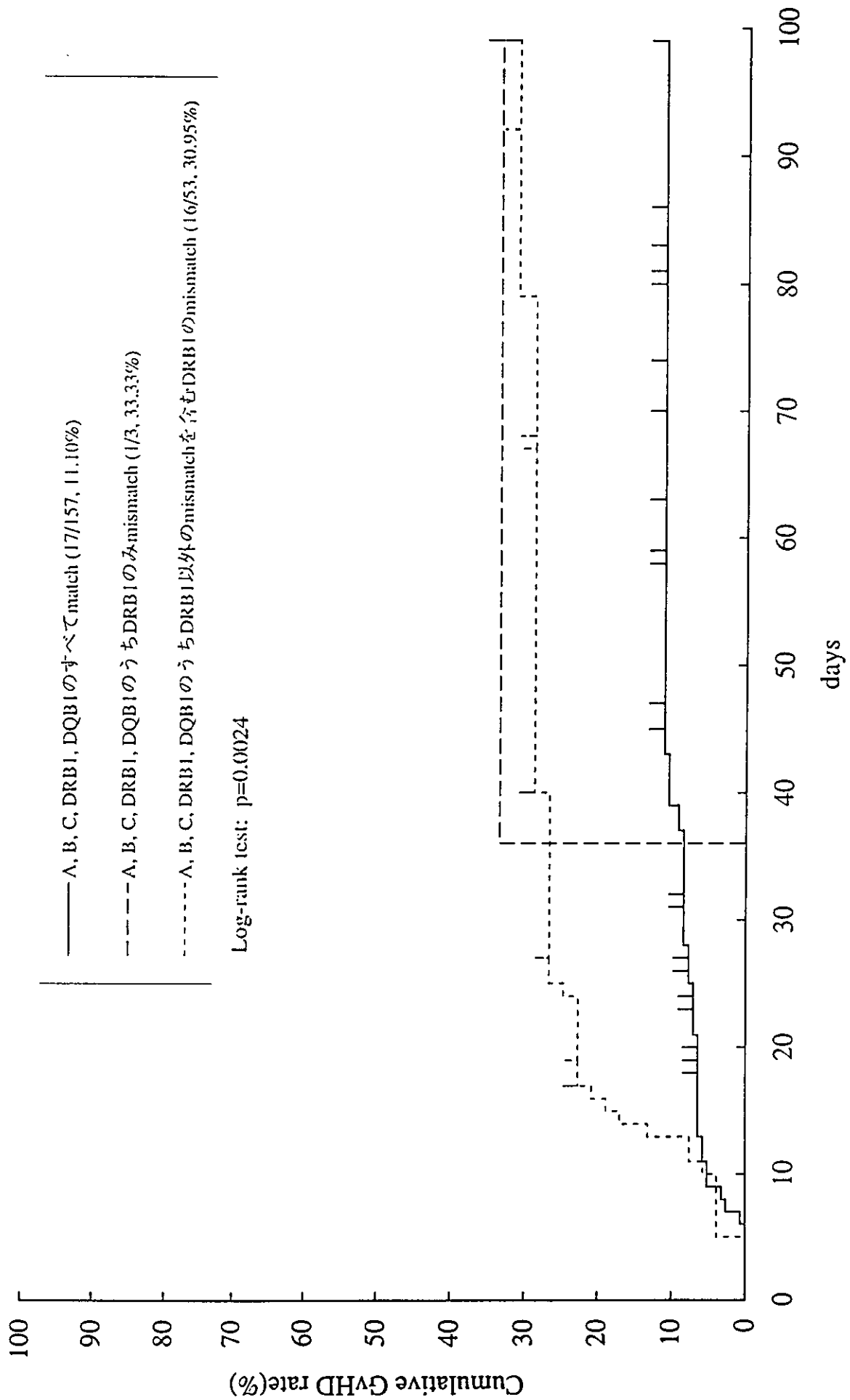


図5. 非血縁者間骨髄移植におけるHLA型マッチングとGvHD発症(5)

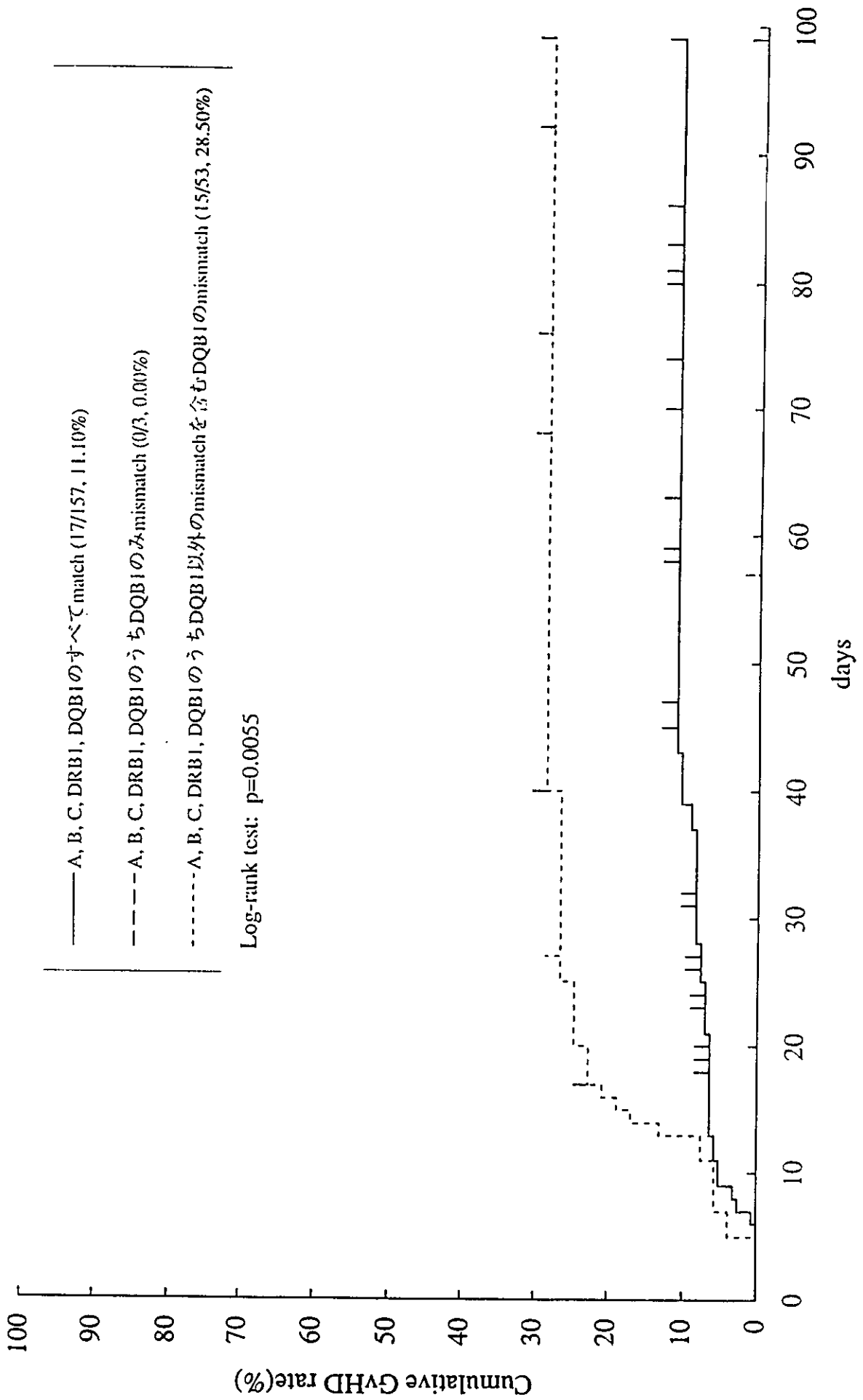


図6. 非血縁者間骨髄移植におけるHLA型マッチングとGvHD発症(6)

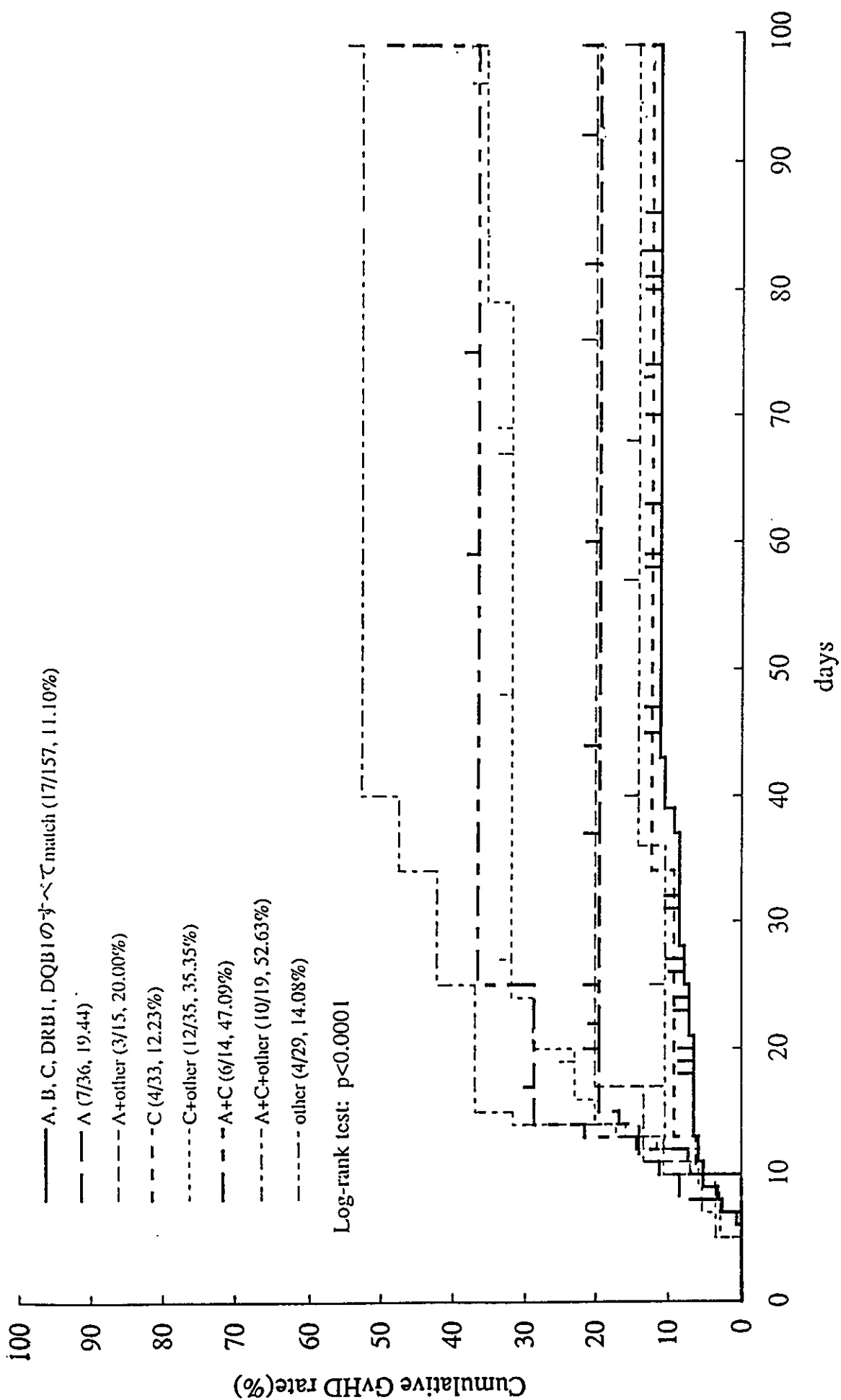


図7. 非血縁者間骨髄移植におけるHLA型マッチングと生存率(1)

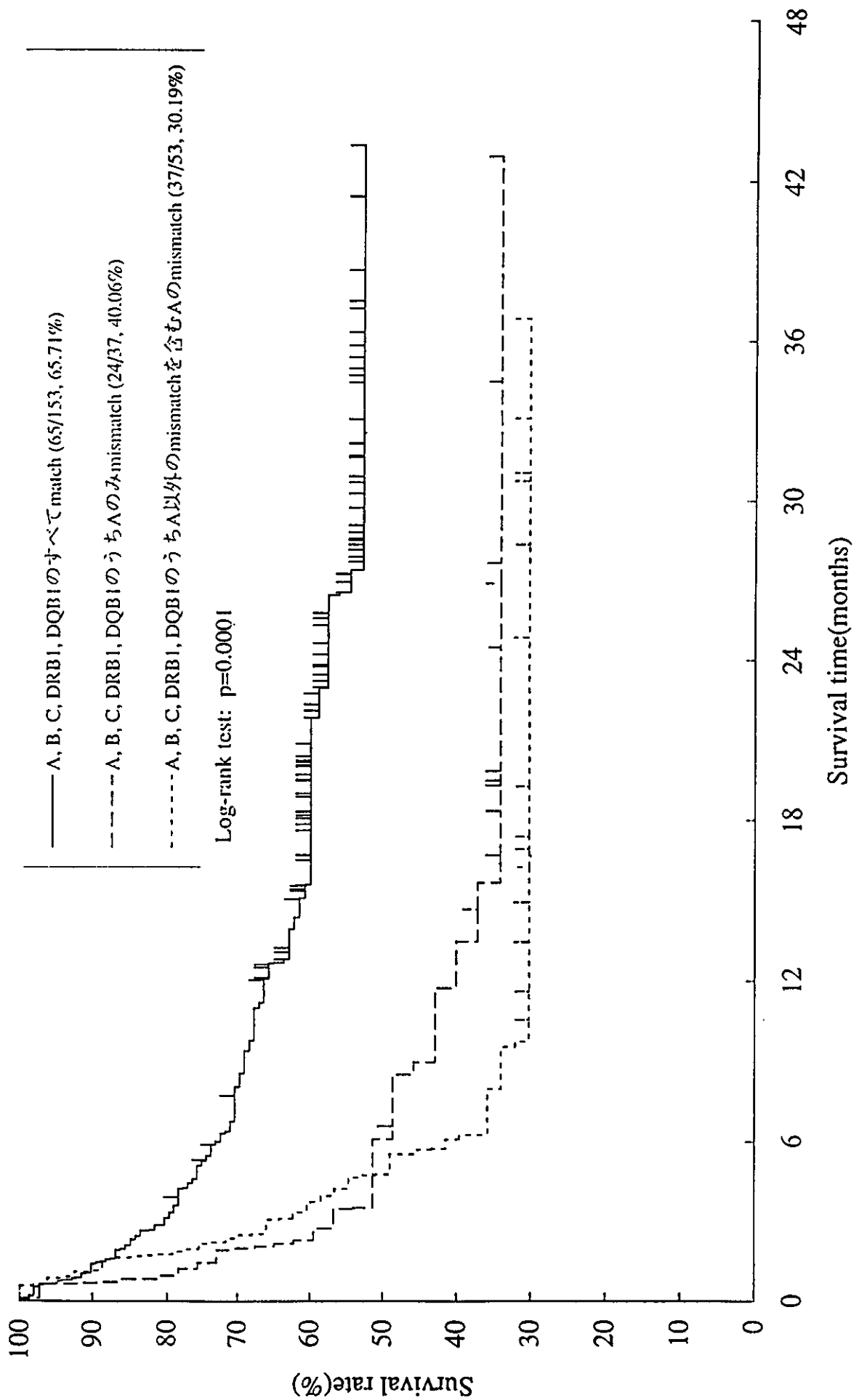


図8. 非血縁者間骨髄移植におけるHLA型マッチングと生存率(2)

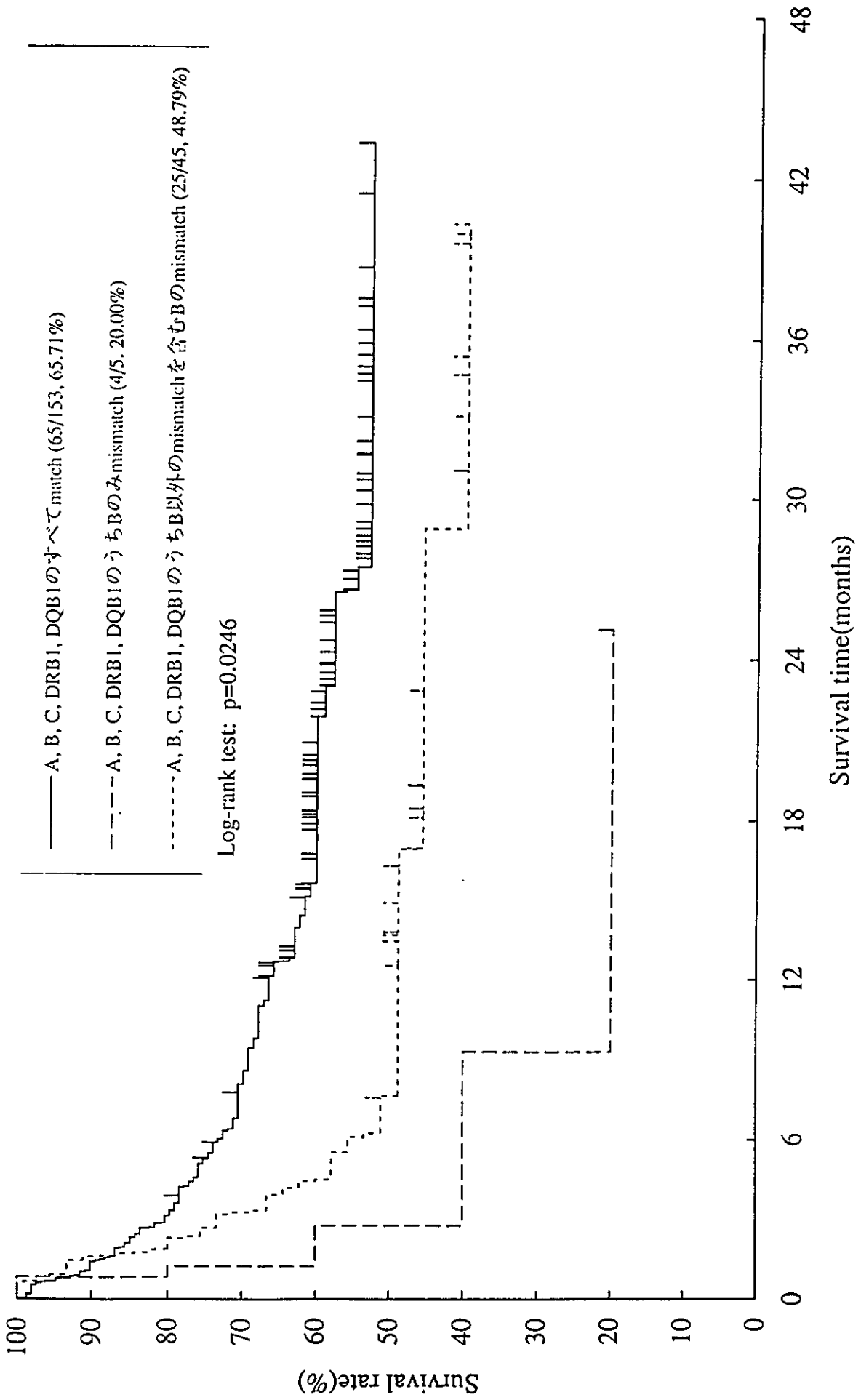


図9. 非血縁者間骨髄移植におけるHLA型マッチングと生存率(3)

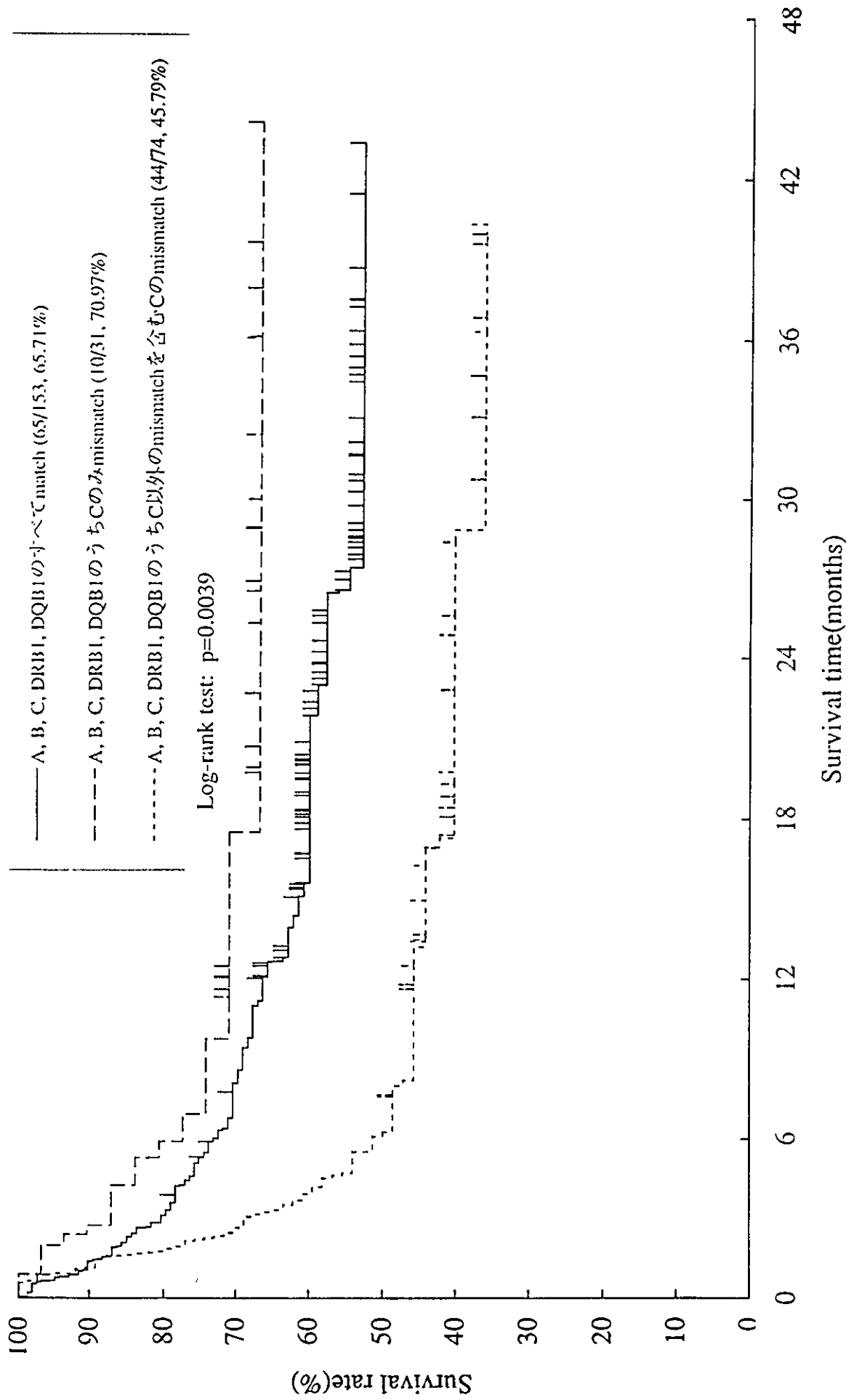


図10. 非血縁者間骨髄移植におけるHLA型マッチングと生存率(4)

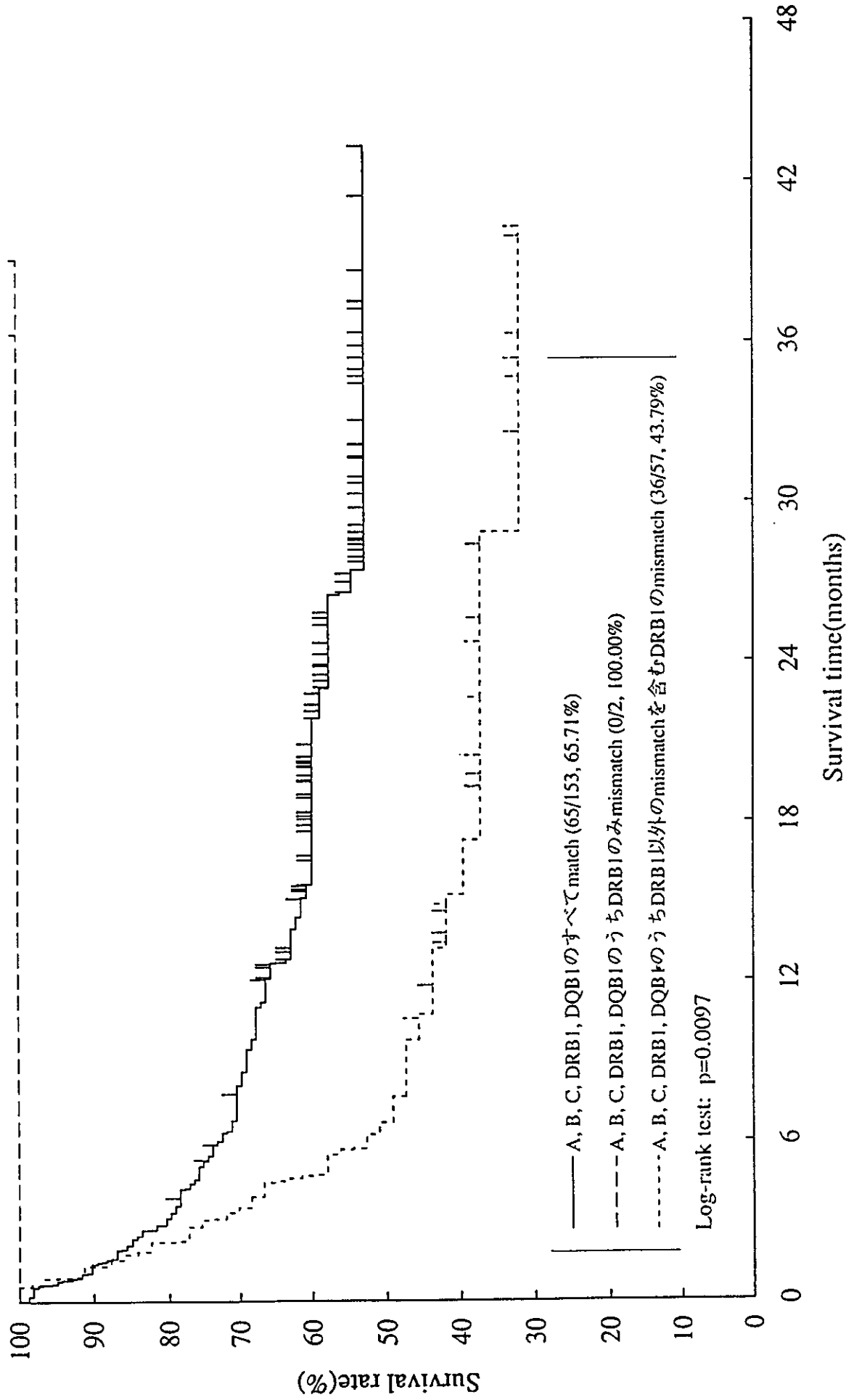


図 11. 非血縁者間骨髄移植における HLA 型マッチングと生存率 (5)

