

厚生科学研究費補助金 ヒトゲノム・再生医療等研究事業  
「造血細胞の自己修復能力、再生能力を利用した  
治療法の開発と普及に関する研究」班（小寺良尚班長）

平成12年度 分担研究報告書

分担研究課題：骨髄非破壊的前処置療法を用いた同種造血幹細胞移植に関する研究  
分担研究者：国立がんセンター中央病院 薬物療法部 医長 高上 洋一

研究要旨

我々は、これまで同種移植の恩恵を受けることができなかった高齢者や臓器障害を有する患者に対する根治的治療法としての同種ミニ移植を開発し、その第I相臨床試験を実施した。その結果、移植前処置に伴う毒性は極めて軽度で、通常の移植術に見られるような重篤な副作用は発生しなかった。他に有効な治療方法を有さない患者を対象としたにもかかわらず、その1年生存率は75%であり、生存患者のQOLも良好に保たれている。今後、その有効性を確認するための第II相臨床試験を計画する。

A. 研究目的

本研究では、より安全性の高い同種造血幹細胞移植法を開発するための第I相臨床試験を実施する。骨髄移植などの同種造血幹細胞移植は多くの白血病患者にとって有効な治療法であるが、反面、移植片対宿主病(GVHD)など多くの合併症も発生する。特に患者の年齢が55歳を超える場合や、移植前に既に肝臓、心臓や腎臓などの臓器の働きが低下している場合には、現在の方法で移植を行うと合併症の頻度と重症度ははるかに強くなり、早期死亡率が著しく高くなるために禁忌とされてきた。一方、最近に至って、移植の抗がん効果は移植前処置療法に加えて、移植後に起こるドナー由来のリンパ球を介した同種免疫反応にも大きく依存することが明かとなった。そこで抗腫瘍免疫を強調した治療を行うならば、抗がん剤治療を控えめに行って治療関連毒性を減らすことで、同種移植をより安全に行うことが可能となる。この新しい概念に基づいた治療が、骨髄非破壊的移植(通称、

ミニ移植)であり、患者の身体的・精神的負担も著しく軽減するので移植適応の拡大が可能となる。ミニ移植の適用によって、これまで同種移植の恩恵を受けることができなかった高齢者や臓器障害を有する患者にも、根治的治療法としての同種移植を行える可能性が開かれる訳であり、画期的な治療開発研究として期待されている。本研究では独自のミニ移植前処置療法を開発して、初年度は特にその安全性を中心に解析した。

B. 研究方法

我々は、新たなプリン誘導体であるクラドリピンを用いた骨髄非破壊的前処置療法を開発し[cladribine (0.11 mg/kg/day x 6日)、busulfan (4 mg/kg x 4日)、抗胸腺細胞グロブリン(ATG; 2.5 mg/kg/day x 2又は4日)]、その第I相臨床試験を開始した。対象となったのは、国立がんセンター中央病院において治療を受ける造血器腫瘍患者のうち、他の治療では治癒や長期生

存を期待できないような疾患や病状であるにもかかわらず、年齢制限（55歳）や各種の臓器機能障害があるために通常の血縁/非血縁者間同種造血幹細胞移植を行うことができない患者である。ATGの投与量は、HLA一致ドナーからの移植においては、安定した生着を各ステップ毎に確認しながら徐々に減量した。ドナーはHLA一致あるいは一座不一致の血縁ドナーとし、G-CSF 5  $\mu$ g/kgを1日2回連日皮下注射し、4日目からCOBESpectraを用いて1回約10リッターの血液を処理して、CD34陽性細胞として3  $\times$  10<sup>6</sup>個/kgを目標に採取して凍結保存し、前処置終了後に急速に解凍して輸注した。移植後GVHDの予防はcyclosporine単剤で行った。移植後6日目から好中球数が0.5  $\times$  10<sup>9</sup>/Lを超えるまでの間、G-CSF(5  $\mu$ g/kg)を連日点滴静注した。主要評価項目は移植後100日以内の早期移植関連死亡とドナー型完全キメラの達成とした。

対象患者については、いずれも患者本人に説明同意文書の内容を極力分かり易い言葉で説明し、説明同意文書2部を作製して本人に渡したうえで文書による同意を得た。説明同意文書に本人の自由意志で同意の署名がなされた後に、この文書の1部を本人に提供することで倫理性も確保した。本研究は、国立がんセンター中央病院の倫理審査委員会における審査を受けて承認された。

### C. 研究結果

予定した16例の登録を終えて、1例の生着不全と1例の生着前の死亡(敗血症)を除く14例にドナー細胞の生着が得られ、その全例が移植後30日目までにドナー細胞が90%以上に達していた。移植前処置に伴う毒性は極めて軽度で、ATGに伴う悪寒、発熱が高頻度に認められたものの、患者のQOLは通常の抗がん剤治療並に保たれて、

全症例が前処置から生着までの期間、経口摂取を維持することができた。結果として、通常の移植術に見られるような重篤な副作用は発生しなかった。

しかし生着例のうち、その後、それぞれ急性GVHD、真菌感染症及び鬱血性心不全によって3例が早期死亡した。HLA一致同胞からの移植では12例中10例が安全にドナー型完全キメラを達成したのに対して、HLA一座不一致血縁ドナーからの移植においては、4例中3例が失敗に終わった。Grade II-IVの急性GVHDは6例に認められた。ATGの投与によりCD4陽性T細胞の回復が遅延したが、感染症の増加は認められなかった。現時点で観察期間の中央値は209日(120-522日)で、12例が生存中である。AMLの進行期に移植をした2例に再発が認められたため、1年生存率、無病生存率はそれぞれ75%と45%である。無病生存例は全例外来通院中であり、QOLは保たれている。

### D. 考察

本研究では、他に有効な治療方法を有さない患者を対象としたにもかかわらず、その1年生存率は75%であり、ミニ移植が画期的な最終的、根治的救済療法となりえることを示した。同種造血幹細胞移植では、超大量化学療法や全身放射線照射によって抗腫瘍効果を強め、その副作用として生じる壊滅的な骨髄傷害をドナーの造血幹細胞を輸注することによって補うという概念で始められた治療方法である。しかし最近に至り、移植の治療効果は大量化学療法や放射線照射だけでなく、むしろ同種免疫効果、すなわちドナー由来のリンパ球が抗腫瘍効果(graft-versus-leukemiaあるいはtumor; GVL/GVT)を発揮することに由来することが判明した。そこで、移植前処置の抗がん剤を減量し、副作用を抑えつつド

ナー造血幹細胞の生着を図り、抗腫瘍効果は主として GVL/GVT 効果に期待するというミニ移植の概念が提案された。GVT 効果は抗がん剤耐性の固形がんにおいても観察されている。

我々は、本研究において新たなプリン誘導体であるクラドリピンを世界では初めてミニ移植に用いる大規模な臨床研究を開始し、その結果から、高齢者あるいは臓器障害を有するなど、従来の移植法では移植を行うことができなかった患者にも、比較的 safely に根治療法を行うことが可能なことを示した。特に、HLA 一致ドナーからの移植においてはミニ移植の安全性が高いため、難治がん治療における本治療の意義は大きいと考える。一方で HLA 不一致ドナーからの移植成績に関しては決して満足な成績であるとは言えなかった。また、急性 GVHD の合併率も高いなど、その改善は急務である。この解決を図るために、我々は現在、第 II 相臨床試験の準備を進めている。ミニ移植を行った場合には、臓器毒性が極めて少ないために移植適応が更に拡大できる可能性もあり、難治性転移巣を有する固形腫瘍を対象とした第 I 相臨床試験も開始した。

#### E. 結論

ミニ移植後の副作用は通常の移植と比較して軽微であるため、根治的治療法を持たなかった多くの患者を救済できる可能性が示された。今後、治療法のさらなる改善を目指した第 II 相臨床試験を進めて、その有効性を評価する必要がある。

#### F. 健康危険情報

特記すべきものはない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ando M, Yokozawa T, Sawada J, Takaue Y, Togitani K, Kawahigashi N, Narabayashi M, Takeyama K, Tanosaki R, Mineishi S, Kobayashi Y, Watanabe T, Adachi I, Tobinai K: Cardiac conduction abnormalities in patients with breast cancer undergoing high-dose chemotherapy and stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 25:185-189, 2000.
2. Watanabe T, Kajiume T, Abe T, Kawano Y, Iwai A, Iwai T, Takaue Y, Kuroda Y: Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in children with hematological malignancies from HLA-matched siblings. *Med Pediatr Oncol* 34:171-176, 2000.
3. Kanamaru S, Kawano Y, Watanabe T, Nakagawa R, Suzuya H, Onishi T, Yamasaki J, Nakayama T, Kuroda Y, Takaue Y: Low numbers of megakaryocyte progenitors in grafts of cord blood cells may result in delayed platelet recovery after cord blood cell transplant. *Stem Cells* 18:190-195, 2000.
4. Azuma M, Kato K, Ikarashi Y, Asada-Mikami R, Maruoka H, Takaue Y, Saito A, Wakasugi H: Cytokines production of U5A2-13-positive T cells by stimulation with glycolipid  $\alpha$ -galactosylceramide. *Eur J Immunol* 30:2138-2146, 2000.
5. Kawano Y, Miyazaki T, Watanabe T, Suzue A, Kan-nuki S, Kagechi T, Onishi T, Kaneko M, Kanamaru S, Wakata Y, Nakagawa R, Suenaga K, Suzuya H, Abe T, Nagahiro S,

- Kuroda Y, Takaue Y: HLA-mismatched CD34-selected stem cell transplant complicated by HHV-6 reactivation in the central nervous system. *Bone Marrow Transplant* 25:787-790, 2000.
6. Kawano Y, Watanabe T, Okamoto Y, Abe T, Kuroda Y, Takaue Y, Watanabe A: Autologous and allogeneic transplantation with blood CD34+ cells: a pediatric experience. In: Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Ho AD, Haas R, Champlin R (eds), Marcel Dekker, Inc., New York, 2000, pp239-249.
  7. Asada-Mikami R, Heike Y, Takaue T, Krasnykh V, Curiel DT, Wakasugi H: Efficient gene transfection by RGD-fiber modified recombinant adenoviruse to dendritic cells. *Jpn J Cancer Res*, accepted for publication.
  8. Kanda Y, Mineishi S, Saito T, Seo S, Saito A, Ohnishi M, Suenaga K, Niiya H, Nakai K, Takeuchi T, Kawahigashi Y, Shoji N, Ogasawara T, Tanosaki R, Kobayashi Y, Tobinai K, Kami M, Mori S, Suzuki R, Kunitoh H, Takaue Y: Pre-emptive therapy against cytomegalovirus (CMV) diseases guided by CMV antigenemia assay after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A single-center experience in Japan. *Bone Marrow Transplant*, accepted for publication.
  9. Saito T, Seo S, Kanda Y, Shoji N, Ogasawara T, Murakami J, Tanosaki R, Tobinai K, Takaue Y, Mineishi S: Early onset Pneumocystis carinii pneumonia after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Am J Hematol*, accepted for publication.
  10. Suenaga K, Kanda Y, Niiya H, Nakai K, Saito T, Saito A, Ohnishi M, Takeuchi T, Tanosaki R, Makimoto A, Miyawaki S, Ohnishi T, Kanai S, Takaue Y, Mineishi S: Successful application of non-myeloablative transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp Hematol*, accepted for publication.
  11. Shimokawa T, Ohashi H, Takaue Y, Kawano Y, Abe T, Kuroda Y: Successful umbilical cord blood transplantation in an infant with ALL who failed initial autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Med Pediatr Oncol*, , accepted for publication.
  12. Kanda Y, Mineishi S, Nakai K, Saito T, Tanosaki R, Takaue T: Frequent detection of rising cytomegalovirus antigenemia after allogeneic stem cell transplantation following a regimen containing anti-thymocyte globulin. *Blood*, accepted for publication.
  13. Watanabe T, Mineishi S, Kawano Y, Takaue Y: Partially matched transplants with allogeneic CD34+ blood cells. *Leuk Lymphoma*, accepted for publication.

## 2. 学会発表

1. 高上 洋一: 細胞療法の新たな展開: 同種免疫療法と樹状細胞療法。第21回癌免疫外科研究会教育講演。(2000年5月25日、和歌山)
2. 高上 洋一: 細胞免疫療法の新たな展開。第100回日本産科婦人科学会関東連合地方部会教育講演。(2000年10月22日、大宮)
3. 高上 洋一: ミニ移植と細胞免疫療法。第22回日本内科学会九州支部生涯教育講演会。(2000年11月19日、熊本)
4. 高上 洋一: ミニ移植と無菌管理。第34回日本無菌生物ノートバイオロジー学会特別講演。(2001年1月27日、神戸)
5. Takaue Y, Tanosaki R, Mineishi S: Cell-mediated immunotherapy. IXth International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2000. Kyoto, June 5-6, 2000.
6. Saito T, Kanda Y, Kanai S, Ohnishi T, Kawano Y, Makimoto A, Tanosaki R, Tobinai K, Takaue Y, Mineishi S: Successful non-myeloablative transplant using a novel combination of cladribine (2-CDA)/busulfan(Bu)/ATG: early full donor chimerism but delayed immune reconstitution. 42ND American Society of Hematology. San Francisco, December 1-4, 2000.
7. Takaue Y: Mini-transplantation for solid tumors. Recent Advances in Hematopoietic Stem Cell Transplantation; Clinical Progress, New Technologies and Gene Therapy. San Diego, March 29-31, 2001.

## H. 知的所有権の取得状況

特になし

## 研究課題 ヒト臍帯血造血前駆細胞の Ex Vivo Expansion

分担研究者 浅野 茂隆 東京大学医科学研究所・分子療法研究分野・教授

研究協力者 高橋 恒夫 東京大学医科学研究所・細胞プロセッシング寄附研究部門

研究要旨： 臍帯血バンクのプロセス法に準拠して凍結保存した赤血球除去濃縮白血球(LC)を用い、造血前駆細胞 (CFC) 特に血小板産生を制御する巨核球系前駆細胞(CFU-Meg)の Ex vivo expansion を無血清液体培養法にて試み、さらに LC より分離した CD34 陽性細胞を用いた結果と比較検討した。この結果、TPO+SCF ±FL の存在下での培養で LC ならびに CD34 陽性細胞共に高い増幅が可能であった。ただしこの時産生された CFU-Meg 総数としては LC からのものが多く、LC から CD34 陽性細胞分離過程での幹細胞の低回収率に起因するものと考えられた。本研究の結果、臍帯血バンクのプロセス法でえられる LC を用いた造血前駆細胞の Ex vivo expansion は、培養期間が短く、CD34 陽性細胞の分離操作を伴わない簡便な方法であることが示され、その有用性が明らかとなった

### A. 研究目的

我々は、東京臍帯血バンクのプロセス法に準拠して凍結保存した赤血球除去濃縮白血球(LC)を用い、造血前駆細胞 (CFC) 特に血小板産生を制御する巨核球系前駆細胞 (CFU-Meg) の Ex Vivo Expansion を無血清液体培養法にて試み、さらに LC より分離した CD34 陽性細胞を用いた結果と比較検討した。

### B. 研究方法

東京臍帯血バンクのプロセス法にて分離、液体窒素下凍結保存された LC を解凍し、有核生細胞数を計数した。遺伝子組換えヒト thrombopoietin (TPO)、flt3-ligand (FL), stem cell factor (SCF) を含む無血清培地 X VIVO-10 に細胞を懸濁し、37°C、5%CO<sub>2</sub> 存在下で培養を行った。CD34 陽性細胞の分離は磁気ビーズ法、CFC および CFU-Meg の測定はそれぞれ各種サイトカインを含むメチルセルロース法、plasma clot 法で行った。

### C. 結果

LC を TPO+FL、TPO+SCF、TPO+FL+SCF 存在下 5 日間の培養で、CFC は培養開始時のそれぞれ 4.0 倍、7.7 倍および 8.9 倍に増加し、また CFU-Meg は 7.7 倍、8.9 倍および 8.4 倍に増加した。一方解凍 LC より CD34 陽性細胞を分離し、同様に TPO+FL、TPO+SCF、TPO+FL+SCF 存在下 15 日間の培養で、CFC は 5.3 倍、31.4 倍および 51.4 倍に、CFU-Meg は 22.9 倍、45.9 倍および 37.0 倍とそれぞれ LC より高い増加が観察された。この時産生された各々の CFU-Meg 総数を比較すると、CD34 陽性細胞を用いた培養で高い増幅率が得られるにもかかわらず、より少ない CFU-Meg しか得られなかった。これは、LC からの CD34 陽性細胞分離過程での消失による低回収率に起因していた。

### D. 考察

本研究の結果、臍帯血バンクのプロセス法で得られる LC を用いた造血前駆細胞の Ex Vivo Expansion は、培養期間が短く、CD34 陽性細胞の分離操作を伴わない簡便な方法であることが示され、その有用性が明らかとなった。

### E. 研究発表

#### 1. 論文発表

Tanabe T., Asano S., et al. Suppression of progression of chronic myelogenous leukemia in mice by an allosterically controlled ribozyme. *Nature* 406:473-474,2000.

Nagayama H., Asano S., Takahashi TA. et al. IL-12 responsiveness and expression of IL-12 receptor in human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* Jul 1;165(1):59-66, 2000.

Watari, K., Asano S., et al. Hyperfunction of neutrophils in a BCR/ABL-negative chronic myeloid leukemia: A case report with in vitro studies. *Cancer* 89:551-560, 2000.

Hase, H., Asano S., et al. Case Report: The availability of TCR-Vβ repertoires analysis with RT-PCR methods for the early detection of pulmonary relapsed T-cell malignancy after the autologous stem cell transplantation. *Am J Hematol*;64(2):124-7, 2000.

Hibino, H., Asano S., et al. Haematopoietic progenitor cells from common marmoset as targets of gene transduction by retroviral and adenoviral vectors. *Eur J Haematol* (in press)

## 2.学会発表

東海村臨界事故被曝患者に対する臍帯血移植：口演  
長山人三、大井 淳、白藤尚毅、井関 徹、東條有信、  
佐藤典治、谷 憲三朗、高橋 恒夫、浅野 茂隆  
第 23 回日本造血細胞移植学会総会 京都 2000.12  
当院の成人急性白血病に対する臍帯血移植の成績：  
口演. 井関 徹、大井 淳、白藤 尚毅、長山人三、  
友成 章、澤田 道夫、森 勇一、足立大樹、東條有信、  
高橋恒夫、谷 憲三朗、 浅野 茂隆  
第 23 回日本造血細胞移植学会総会 京都 2000.12  
成人における臍帯血移植の成績と問題点：シンポジウム  
井関 徹  
第 23 回日本造血細胞移植学会総会 京都 2000.12  
Stem cell transplantation from peripheral blood cells  
T Iseki, J Oci, H Nagayama, A Tomonari, A Tojo,  
K Tani, S Asano. International Symposium on  
the Criticality Accident in Tokaimura.  
Chiba, Japan 2000  
Unrelated cord blood transplatation in adults:  
A single institution experience. T Iseki  
The 7th Congress of Asia-Pacific Bone Marrow  
Transplantation Group. Bangkok, Thailand, 2000.11

## F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### IV. テーマー 2

##### ヒト組織適合抗原の解析と応用



## 研究課題 HLA-C と移植免疫反応との関連についての研究

分担研究者 森島泰雄 (愛知県がんセンター血液化学療法部長)

研究協力者 赤塚美樹 (愛知県がんセンター研究所 腫瘍免疫)

研究要旨 日本骨髄バンク(JMDP)を介した非血縁者間骨髄移植において患者とドナーのHLAの違いが急性移植片対宿主病(GVHD)、生着不全、移植片対白血病効果(GVL)および移植後の生存に及ぼす影響につき、とくに HLA-C 抗原を中心に解析した。GVHDの頻度はHLA-A, CのDNA型単独の違いだけでなく、HLA-B やDRB1の単独の違いでも有意に高くなることが判明した。HLA-C ではいずれかの不適合が加わるとさらに高率になる傾向を示し、HLA-A座とは異なる発症様式を示した。白血病的再発はHLA-C差の不適合により低率な傾向であった。生着不全に関しては、クラスI抗原がクラスII抗原に比べてより重大な影響を及ぼすことが多数症例の解析で初めて明らかになったが、クラスI抗原の中でもとくに HLA-C 抗原が関与している結果は得られなかった。最終的に移植後の生存に関与しているHLA型はHLA-AとBのDNA型の違いであることが白血病のリスク別症例の解析でも明らかになった。

### A. 研究目的

非血縁者間骨髄移植においてはドナーと患者間の主要組織適合性抗原(HLA)の違いが移植の成績を大きく左右している。本厚生科学研究班では日本骨髄バンク(JMDP)を介した非血縁者間骨髄移植 440 症例の HLA-DNA 型をレトロスペクティブに解析し、HLA クラス I 抗原(HLA-A, B, C)の違いが急性 GVHD の発症や移植後の生存に関与していることを見出した (Sasazuki T. et al. New Engl J Med 339:1177 - 1185, 1998)。今年度までに本研究班において実施された HLA-DNA 型の解析結果と臨床成績との関連を、とくに HLA-C を中心に新たに解析を加えたので報告する。

### B. 研究方法

JMDP において HLA-A, B, DR の血清型が適合したドナーから初回非血縁者間骨髄移植が実施され、かつ、本研究班の HLA 研究者によって HLA-A, B, C, DR, DQ の DNA タイピングがレトロスペクティブに実施された 1298 症例を対象とした。これら症例の移植時期は 1993 年 1 月から

1998 年 4 月迄で、2000 年 6 月 30 日付けで臨床データを収集した。患者年齢は 0 - 51 才(中央値 23 才)、疾患は急性非リンパ性白血病(ANLL) 304 例、急性リンパ性白血病(ALL) 365 例、慢性骨髄性白血病(CML) 367 例、骨髄異形成症候群(MDS) 99 例、悪性リンパ腫(ML) 39 例、再生不良性貧血(AA) 101 例、遺伝性疾患(HD) 39 例であった。白血病再発スタンダードリスク群(ANLL と ALL の第 1 寛解期移植、CML の第 1 寛解期移植) は 480 例でスタンダードリスク群より進行した病期の 544 例をハイリスク群とした。GVHD 予防法は T 細胞除去骨髄(TCD)を移植した症例が 16 例、non-TCD 移植が 1283 例でこの中で cyclosporine を基本にした予防法が 964 例、FK506 を基本にした予防法は 141 例、ATG を用いた予防法は 176 例であった。

### C. 研究結果

#### 1. 急性 GVHD

HLA-DNA 型不適合との関連: HLA-A, B, C, DR, DQ 抗原と重症(3 度以上)急性 GVHD との関連の可能性のある臨床データについて Cox's proportional hazard model を用いた多変量解析

の結果、以前の解析結果と同様に臨床的なデータを考慮しても、尚かつ HLA-C と HLA-A の DNA 型の違いはあきらかに独立した急性 GVHD 発症因子であることが示された。さらに、今回は HLA-B と HLA-DRB1 の違いがそれぞれ独立した因子であることが新たに判明した。しかし、HLA-DRB1 の関与は HLA-class I 抗原の関与に比べて弱いものであった。

HLA-C との関連(表 1): HLA-A, B, DR の DNA 型適合症例においては C 座の適合、不適合による GVHD の頻度はそれぞれ 11.8% と 20.6% とやや不適合移植で発症頻度が高かった ( $p=0.0047$ )。HLA-A, B, DR, DQ がいずれか一つ以上不適合症例においては GVHD の頻度は C の適合、不適合でそれぞれ 20.9%、36.1% ( $p<0.0001$ ) と有意に高率であった。HLA-A, B, DRB1 においては他の抗原によりさらに急性 GVHD の頻度が高くなる傾向は HLA-C に比べて低かった。

## 2. 生着不全

生着不全は以下のように定めた。生着を移植後 3 日間好中球数  $500/\text{cmm}$  以上が持続することとし、1 次的生着不全は移植後 21 日以上生存しても生着しない場合、2 次的生着不全は生着後重度の骨髓低形成を呈し、好中球数が  $500/\text{cmm}$  以下になった場合とし、1 次的と 2 次的生着不全を合わせて生着不全とした。

臨床的なデータと HLA 型を用いて単変量、多変量解析すると、HLA の各抗原の違いは有意にならなかったが、クラス I 抗原とクラス II 抗原に大別して解析すると、クラス I 抗原 (HLA-A, B, C) の違いが有意に生着不全に関与していた(表 2)。

。

## 3. 白血病再発

HLA-DNA 型不適合との関連(表 3): 白血病症例で HLA-A, B, C, DR, DQ 抗原と再発との関連を表 3 に示した。有意ではないが、HLA-C が異なると再発率は低下する傾向にあったが(移植後 3 年再発率 19.6%)、HLA-A/B, DRB1/DQB1 ではこの傾向は認められなかった。

## 4. 移植後の生存率

白血病再発スタンダードリスク症例とハイリスク症例に分けて、HLA 型の違いとの関連を調べた(表 4)。いずれのリスク群でも HLA-A, B の違いは生存率を有意に低下させていたが、HLA-C と HLA-DRB1/DQB1 ではその違いは生存率に影響を及ぼしているとは言えなかった。

## D. まとめと考察

今回の検討により、HLA-B と HLA-DRB1 の DNA 型の違いが有意に重症 GVHD の頻度を高めていることが判明した。今回初めて有意差が出たのは単に症例数が 1298 症例と増加したことによるものであろう。従来からのクラス I 抗原がクラス II 抗原に比べてより重大な影響を及ぼすという我々の主張に変わりはない。HLA-C の違いに他の HLA 抗原の違いが加わると重症 GVHD はさらに高頻度に発症するという所見は HLA-C を介した GVHD 発症機序が HLA-A や B を介したものと異なることを意味するかもしれない。Killer inhibitory receptor (CD158, CD94) との関連を今後症例数を増して検討したい。生着不全に関しては、クラス I 抗原がクラス II 抗原に比べてより重大な影響を及ぼすことが多数症例の解析で初めて明らかになったが、クラス I 抗原の中でもとくに HLA-C 抗原が関与している結果は得られなかった。この点で、シアトルの移植グループの報告と異なっており、症例を増して検討する必要がある。

最終的に移植後の生存に関与している HLA 型は HLA-A と B の DNA 型の違いであることが白血病のリスク別症例の解析でも明らかになった。

## E. 結語

HLA-クラス I 抗原 (A B C) は移植免疫反応に強く 関与しており、ドナー選択にとり重要である。とくに HLA-C 抗原は急性 GVHD や graft-versus-leukemia (GVL) 反応に関与しており、他のクラス I 抗原とは異なる移植抗原

であることが示された。

最後に、ここで示した成果はJMDPならびに本研究班全体の成果であることを強調したい。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Utsunomiya A, Miyazaki Y, Takatsuka Y, Hanada S, Uozumi K, Yashiki S, Tara M, Kawano F, Saburi Y, Kikuchi H, Hara M, Sao H, Morishima Y, Kodera Y, Sonoda S, Tomonaga M. Improved outcome of adult T cell leukemia/lymphoma with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2001 Jan;27(1):15-20.

2) Matsuo K, Hamajima N, Morishima Y, Harada M. Hospital capacity and post-transplant survival after allogeneic bone marrow transplantation: analysis of data from the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2000 Nov;26(10):1061-7.

3) Shiobara S, Nakao S, Ueda M, Yamazaki

H, Takahashi S, Asano S, Yabe H, Kato S, Imoto S, Maruta A, Yoshida T, Gondo H, Morishima Y, Kodera Y. Donor leukocyte infusion for Japanese patients with relapsed leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: lower incidence of acute graft-versus-host disease and improved outcome. *Bone Marrow Transplant.* 2000 Oct;26(7):769-74.

4) Sao H, Kato C, Kitaori K, Adachi T, Yano K, Kobayashi M, Kojima H, Tanimoto M, Hirabayashi N, Minami S, Yamada H, Morishita GY, Morishima Y, Kodera Y. Effective and safe interferon treatment for Japanese patients with chronic myelogenous leukemia relapse after bone marrow transplantation. The Nagoya Blood and Marrow Transplantation Group. *Int J Hematol.* 2000 Aug;72(2):237-42.

5) Yano K, Kanie T, Okamoto S, Kojima H, Yoshida T, Maruta I, Dohi H, Morishita Y, Ozawa K, Sao H, Sakamaki H, Hiraoka S, Imoto S, Morishima Y, Kodera Y. Quality of life in adult patients after stem cell transplantation. *Int J Hematol.* 2000 Apr;71(3):283-9

表 1 . Effects of HLA-allele matching to other HLA locus matching on the occurrence of severe acute GVHD.

HLA genotype compatibility	Incidence(%) of severe acute GVHD		
	match	mismatch	p
<b>HLA-C</b>			
HLA-A, B, DR and DQ match cases	11.8 (561*)	20.6 (156)	0.0047
HLA-A, B, DR, DQ and/or DQ mismatch cases	20.9 (301)	36.1 (270)	<0.0001
<b>HLA-A</b>			
HLA-B, C, DR and DQ match cases	11.8 (561)	24.9 ( 95)	0.0002
HLA-B, C, DR and/or DQ mismatch cases	24.4 (480)	33.9 (152)	0.0354
<b>HLA-B</b>			
HLA-A, C, DR and DQ match cases	11.8(561)	44.0 ( 14)	0.0001
HLA-A, C, DR and/or DQ mismatch cases	24.5(592)	34.1 (121)	0.0338
<b>HLA-DR</b>			
HLA-A, B and C match cases	11.4 (602)	19.7 ( 100)	0.0157
HLA-A, B and/or C mismatch cases	27.5 (454)	33.8 (132)	0.1614
<b>HLA-DQ</b>			
HLA-A, B and C match cases	12.0( 595)	15.4 ( 127)	0.2335
HLA-A, B and/or C mismatch cases	27.8 (427)	32.0 (159)	0.2383

\* number of cases analyzed.

表 2 . Influence of HLA mismatch to engraftment failure.

HLA compatibility	No. of cases analyzed	Incidence (%) of engraftment failure	p**
HLA-A B C DR and DQ match	554	1.7	-
Class I (HLA- A and/or B, C) mismatch*	369	6.6	0.007
HLA-A and/or B mismatch*	106	4.8	0.226
HLA-C mismatch*	141	4.1	0.085
Class II (HLA-DRB1 and/or DQB1) mismatch*	121	5.3	0.134
Class I mismatch + Class II mismatch	191	7.9	0.009

\* other HLA antigens were matched. \*\* p value compared with HLA-A B C DR and DQ matched cases.

表 3. Influence of HLA mismatch to leukemia relapse.

HLA compatibility	No. of cases analyzed	3-year relapse rate	p**
HLA-A B C DR and DQ match	442	26.2	-
HLA-A &/or B mismatch*	94	31.5	0.709
HLA-C mismatch*	122	19.6	0.191
HLA-DRB1 &/or DQB1 mismatch*	118	23.4	0.733

\* other HLA antigens were matched. \*\* p value compared with HLA-A B C DR and DQ matched cases.

表 4. Influence of HLA mismatch to overall survival in leukemia cases.

HLA compatibility	No of cases	3-year survival (%)	p**
Cases with standard risk			
HLA-A B C DR and DQ match	210	65.4	
HLA-A &/or B mismatch*	47	39.8	0.0003
HLA-C mismatch*	61	68.7	0.968
HLA-DRB1 &/or DQB1 mismatch*	51	70.8	0.631
Cases with high risk			
HLA-A B C DR and DQ match	214	43.0	
HLA-A &/or B mismatch*	44	23.9	<0.002
HLA-C mismatch*	62	36.1	0.225
HLA-DRB1 &/or DQB1 mismatch*	64	35.5	0.362

\*other HLA antigens were matched. \*\* p value compared with HLA-A B C DR DQ match cases

厚生科学研究費補助金（厚生科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
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 山本 健（九州大学生体防御医学研究所・助手）  
絹川 直子、能瀬 善明（九州大学医学部附属病院医療情報部）

研究要旨

日本人非血縁者間骨髄移植の予後に対する HLA クラス II 遺伝子（HLA-DRB1、DQB1）の寄与を検討する目的で、これまでに HLA DNA タイピングが終了した、血清学的に HLA-A、B、DR が一致した移植例 1370 組に関して、DRB1 および DQB1 の不一致が生存および GvHD 発症に与える影響を解析した。その結果、HLA-A、B が DNA レベルで一致した症例において、DRB1、DQB1 不一致は生存において有意差に到らず（各々  $p=0.086$ 、 $0.068$ ）、若干の差を認めたのみであったが、GvHD 発症に関しては、DRB1、DQB1 不一致が有意差（各々  $p=0.0001$ 、 $0.0016$ ）を示し、GvHD 発症の危険因子となることが示唆された。

A. 研究目的

骨髄移植は、造血系の悪性腫瘍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 GvHD を発症することから、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 440 組に関して HLA 型の DNA レベルでの解析を行い、死亡に関して HLA クラス I、特に 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を明らかにした。これに対し、HLA-DRB1、DQB1 の不一致は有意差には到らなかったが、若干の差を認めた。本年度は新たに DNA レベルでの解析が終了した計 1370 組について、HLA クラス II の DNA レベルでの不一致が生存および GvHD 発症におよぼす影響を検討することを目的とした。

B. 研究方法

これまでに集積した 1370 組の移植例の HLA-A、B、DRB1、DQB1 の DNA レベルでの解析結果に関し、HLA-A、B とともに DNA レベルで一致する症例を対象として、DRB1、DQB1 の不一致が生存および GvHD 発症に及ぼす影響を Kaplan-Meier 曲線により検討した。

（倫理面への配慮）

検体に関する個人識別情報を含む情報の保護を図るため、本研究の研究遂行者は匿名化された検体を実験に用いた。

C. 研究結果・考察

（1）HLA クラス II マッチングと急性 GvHD 発症

HLA クラス II マッチングが非血縁者間骨髄移植の急性 GvHD 発症に及ぼす影響を Kaplan Meier 曲線により検討した。図 1、2 に示すように HLA-A、B、DRB1、DQB1 の DNA タイピングが終了し、急性 GvHD 発症の有無の確認がとれた 1332 症例において、DRB1、DQB1 の不一致

は有意に急性 GvHD 発症の危険因子となることが示された (DRB1, 0.0001; DQB1, P=0.0027)。これまでの解析により、HLA-A、B 不一致が急性 GvHD 発症の重要な危険因子となることが知られている。よって、HLA-A、B、DNA 型が一致した 978 症例におけるクラス II マッチングの影響をさらに検討した。図 3、4 に示すように、HLA-A、B、DNA 型が一致していても、DRB1、DQB1 の不一致が急性 GvHD の危険因子となることが示され、特に DRB1 の不一致では強い有意差を認めた (DRB1, P=0.0001; DQB1, P=0.0016)。よって、日本人非血縁者間骨髄移植においても HLA クラス II 遺伝子の不一致が、急性 GvHD 発症の危険因子となることが示唆された。

#### (2) HLA クラス II マッチングと生存

HLA クラス II マッチングが非血縁者間骨髄移植の生存に及ぼす影響を Kaplan Meier 曲線により検討した。図 5、6 に示すように HLA-A、B、DRB1、DQB1 の DNA タイピングがすべて終了し、生存・死亡の確認がとれた 1370 症例において、DRB1、DQB1 の不一致は若干の有意差をもって危険因子となることが示された (DRB1, 0.0115; DQB1, P=0.0089)。これまでの解析により、HLA-A、B が死亡の重要な危険因子となることが知られている。よって、HLA-A、B の DNA タイプが一致した 979 症例におけるクラス II マッチングの影響をさらに検討した。図 7、8 に示すように、HLA-A、B、DNA 型一致症例では、HLA-DRB1、DQB1 のマッチングは生存に関して有意な影響を与えなかった (DRB1, P=0.0855; DQB1, P=0.0675)。よって、日本人非血縁者間骨髄移植において HLA クラス II 遺伝子の不一致は死亡の危険因子とならないことが示唆された。

#### D. 考察

これまでに HLA-A、B、DR が血清学

的に一致した非血縁者間骨髄移植 440 組を対象とした解析によって、生存および GvHD 発症に HLA クラス I の DNA レベルでの不一致が危険因子となることが示されている。これに基づき、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行われている。一方、欧米では HLA クラス II のマッチングの重要性が示されており、本年度は、新たに HLA DNA タイピングが終了した症例を加え、1370 組を対象として、HLA-DRB1、DQB1 のマッチングと生存、GvHD 発症との関連を検討した。HLA-A、B が生存、GvHD 発症に影響を与えることから、HLA-A、B の DNA 型一致症例をより抽出し、これらにおける DRB1、DQB1 のマッチングと生存、GvHD 発症との関連を解析したが、結果に示したように、生存においては DRB1、DQB1 ともに有意差は示さなかった。

一方、急性 GvHD の発症においては、DRB1、DQB1 の不一致が有意差を示し、特に DRB1 の不一致は急性 GvHD 発症の重要な危険因子となることが示された。よって、HLA-A、B DNA 型一致症例間の非血縁者間骨髄移植では、HLA クラス II の一致が急性 GvHD 発症の予防に重要となろう。クラス II、特に DRB1 の不一致が統計学的に急性 GvHD の危険因子となるが、生存においては危険因子とはならない理由は明確ではない。移植後の初期においては生存曲線に若干の差を認めるため、クラス II マッチングが移植後 1～2 年において影響している可能性は否定できない。今後さらに HLA 以外の他の因子を含めた詳細な統計解析により、より高い生存率の期待できる非血縁者間骨髄移植が可能になると考えられる。

#### E. 結論

HLA-A、B の DNA 型が一致した非血

緑者間骨髄移植において、統計学的に DRB1、DQB1 のマッチングは生存に強い影響を与えないこと、DRB1、DQB1 の不一致は急性 GvHD 発症の危険因子となることが示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Wataya M, Sano T, Kamikawaji N, Tana T, Yamamoto K, Sasazuki T.: Comparative analysis of HLA restriction and cytokine production of hepatitis B surface antigen-specific T cells from low-and high-antibody responders in vaccinated humans. **J. Human Genet.**, in press, 2001

Baba I, Shirasawa S, Iwamoto R, Okumura K, Tsunoda T, Nishioka M, Fukuyama K, Yamamoto K, Mekada E, Sasazuki T: Involvement of deregulated epieregulin expression in tumorigenesis *in vivo* through activated Ki-ras signaling pathway in human colon cancer cells. **Cancer Res.**, 60:6886-6889, 2000

Fukui Y, Oono T, Cabaniols JP, Nakao K, Hirokawa K, Inayoshi A, Sanui T, Kanellopoulos J, Iwata E, Noda M, Katsuki M, Kourilsky P, Sasazuki T.: Diversity of T cell repertoire shaped by a single peptide ligand is critically affected by its amino acid residue at a T cell receptor-contact. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 97:13760-13765, 2000

Ries S, Biederer C, Woods D, Shifman O, Shirasawa S, Sasazuki T, McMahon M, Oren M, McCormick F.: Opposing effects of Ras on p53: Transcriptional Activation of *mdm2* and induction of p19<sup>ARF</sup>. **Cell**, 103: 321-330, 2000

Kawamura K, Yamamura T, Yokoyama K, Chui DH, Fukui Y, Sasazuki T, Inoko H, David CD, Tabira T.: Induction of autoimmune encephalitis by proteolipid

protein 95-116-specific T cells from HLA-DR2 (DRB1\*1502) transgenic mice. **J. Clin. Invest.**, 105:977-984, 2000

Toh H, Kamikawaji N, Tana T, Muta S, Sasazuki T, Kuhara S.: Magnitude of structural changes of the T-cell receptor binding regions determine the strength of T-cell antagonism: molecular dynamics simulations of HLA-DR4 (DRB1\*0405) complexed with analogue peptide. **Protein Engineering**, 13:423-429, 2000

Shirasawa S, Arata A, Onimaru H, Roth K, Brown G, Homing S, Arata S, Okumura K, Sasazuki T and Korsmeyer S: *Rfx*-deficiency results in congenital central hypoventilation. **Nature Genetics**, 24:287-290, 2000

Hamaguchi K, Kimura A, Seki N, Higuchi T, Yasunaga S, Takahashi M, Sasazuki T, Kusuda Y, Okeda T, Itoh K, Sakata T.: Analysis of tumor necrosis factor- $\alpha$  promoter polymorphism in type 1 diabetes: HLA-Band -DRB1 alleles are primarily associated with the disease in Japanese.

**Tissue Antigens**, 55:10-16, 2000

### 2. 学会発表

笹月 健彦: How TCR-MHC-peptide interaction determines the fate of T cells: US-Japan and German-Japan Joint Immunology Meeting 2000, 11/17, 2000

笹月 健彦: 序にかえて、シンポジウム、第 59 回日本癌学会総会、10月4-6日、2000年

笹月 健彦: 免疫システムの多様性と多型性の遺伝学的基盤、シンポジウム、日本人類遺伝学会第45回大会、10月25-27日、2000年

笹月 健彦: MHC による免疫システムの構築とアレルギー、教育講演、第12回日本アレルギー学会春季臨床大会、4月20-22日、2000年



图 1

HLA-DRB1 Matching and GvHD (All cases, n=1332)

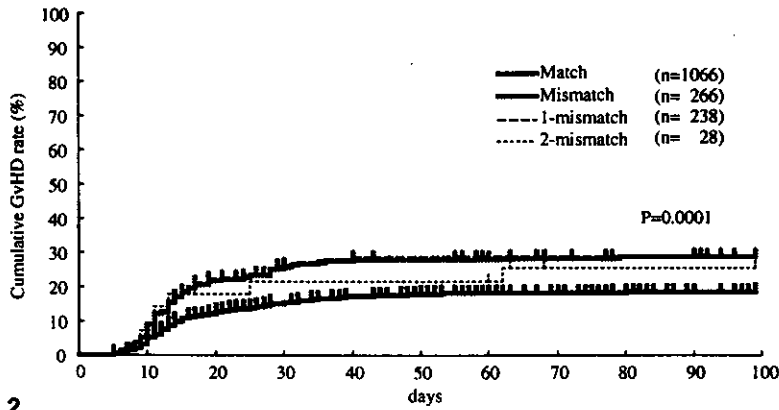


图 2

HLA-DQB1 Matching and GvHD (All cases, n=1332)

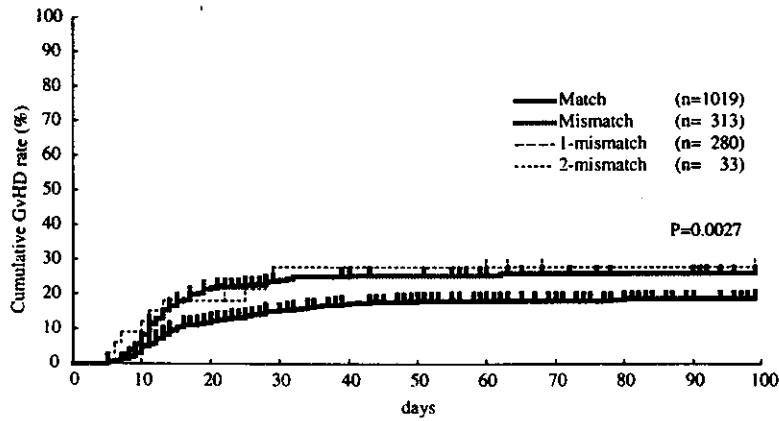


图 3

HLA-DRB1 Matching and GvHD (in HLA-A, B matched cases, n=978)

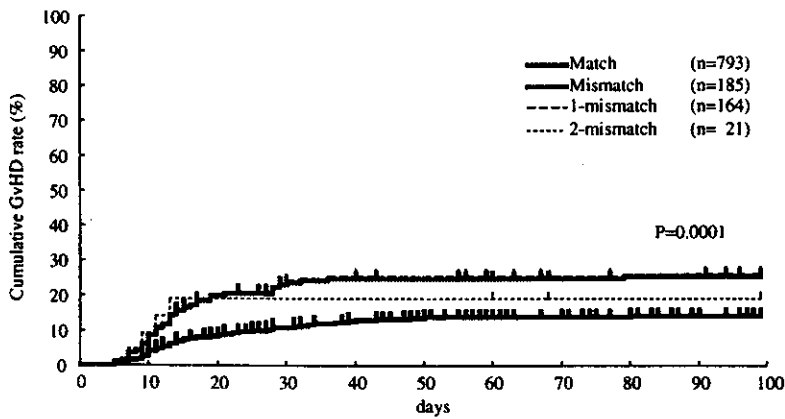
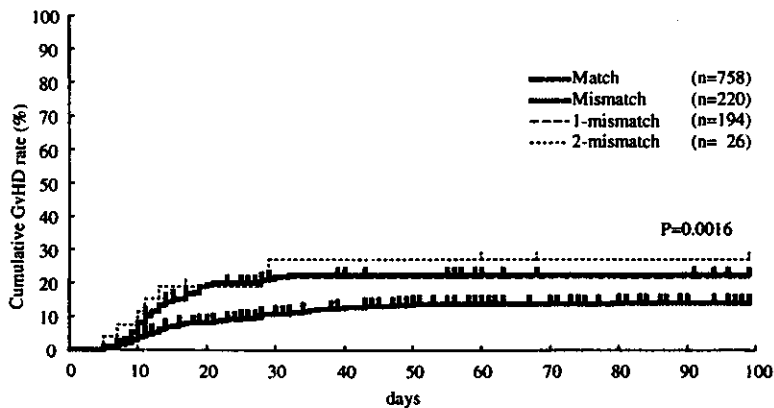


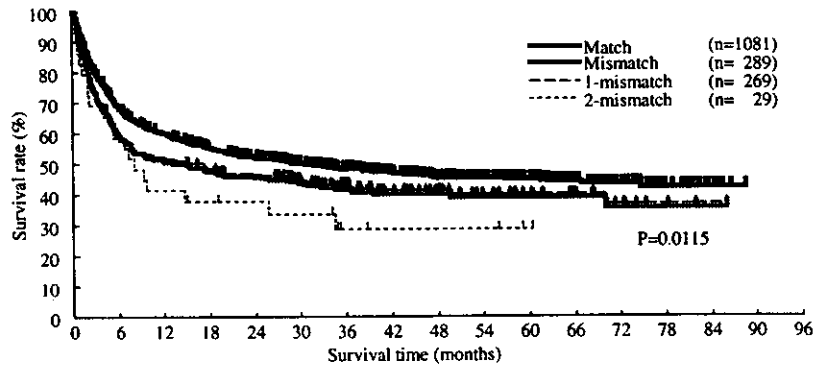
图 4

HLA-DQB1 Matching and GvHD (in HLA-A, B matched cases, n=978)



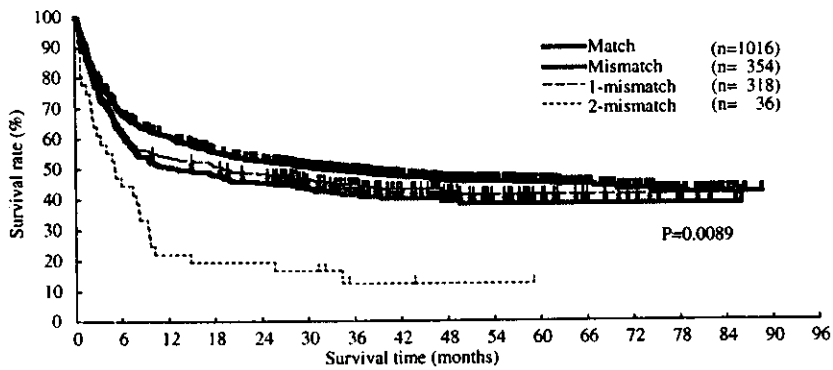
5

HLA-DRB1 Matching and Survival (All cases, n=1370)



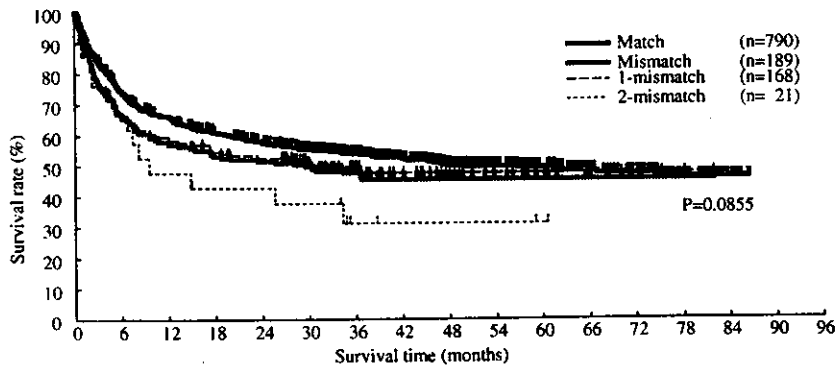
6

HLA-DQB1 Matching and Survival (All cases, n=1370)



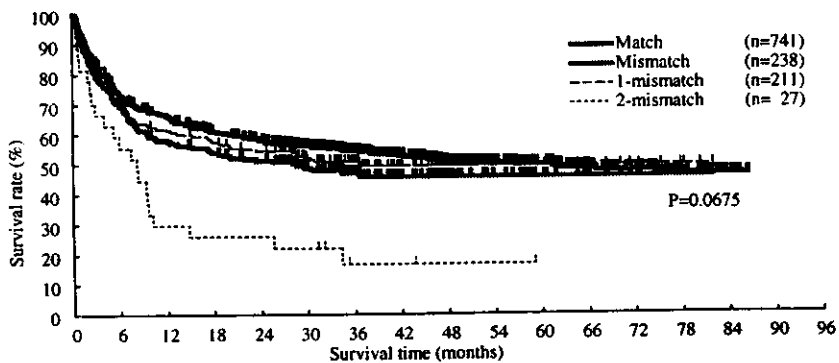
7

HLA-DRB1 Matching and Survival (in HLA-A, B matched cases, n=979)



8

HLA-DQB1 matching and Survival (in HLA-A, B matched cases, n=979)



厚生科学研究費補助金（厚生科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告

HLA 以外のヒトアロ抗原に関する研究

分担研究者 十字猛夫 日本赤十字社中央血液センター所長

非血縁者間骨髄移植において、ミトコンドリアタンパク多型の移植成績への影響を解析した。ミトコンドリアタンパクコーディング領域の高い多型性が確認された。*MTATP8* および *MTNAD3* に頻度の高い非同義置換が見つかったが、HLA-A, B, DRB1 の適合した 340 組の骨髄移植において、この多型は移植成績には影響しなかった。

A：研究目的

非血縁者間骨髄移植において HLA のアレルレベル、特に HLA-A, B の適合が重要であることが明らかとなっている。しかし、HLA 適合移植においても GVHD 発症例があり、HLA 以外のアロ抗原の関与が考えられる。

ミトコンドリア (mt) DNA は約 17kb からなる環状 DNA であり、そのうち約 11kb に 13 種類のタンパクをコードしている。mtDNA は極めて多型性が高く、マウス、ラットで mt 由来のペプチドが MHC に提示され細胞障害性 T 細胞を誘導することが報告されている。mt タンパクの多型がマイナー抗原になり得るとすると、mt は多種類のマイナー抗原供給源となる。そこで、mt タンパクのマイナー抗原としての可能性を調べる目的で、日本人の mtDNA の多型を解析し、さらに頻度の高い非同義置換について骨髄移植成績との関係を解析した。

B：研究方法

1) 多型解析

健常人 80 人（すべて日本人）から抽出

した DNA を用いて mtDNA の多型解析を行った。タンパクコーディング領域全体を約 300~400bp ずつ 45 フラグメントに分け、40~50bp の重なりをもって PCR 増幅を行った。増幅された PCR 産物を SSCP 法により解析を行い、頻度の高い多型については塩基配列を決定した。

2) 多型の骨髄移植への影響

健常人の多型解析でみつかった頻度の高い非同義置換について特異的プライマーを作製し、患者およびドナーから抽出した DNA を用い、PCR-SSP 法により解析した。解析を行った移植サンプルは、1994 年 2 月から 1998 年 1 月までに移植が行われた非血縁者間骨髄移植の内、HLA の A, B, DRB1 のマッチした 340 組を対象とした。多型の不適合の影響を、患者の無病生存率および急性 GVHD (grade III-IV) の発生率について、Kaplan-Meier 法および long-rank statistics を用いて解析を行った。

C：研究結果

1) 多型解析

PCR 増幅した 45 フラグメントのうち、

38 フラグメントで多型が見られ、それぞれ2～8種類のSSCPパターンに分かれた。また、各フラグメントのSSCPパターンの組み合わせとしてコーディング領域全体を比較すると、解析した80検体が59タイプに分けられた。頻度の高い変異がATP合成酵素8(*MTATP8*)、cytochrome-b (*MTCYB*)、NADH脱水素酵素サブユニット3 (*MTNAD3*)で見つかった(表1)。塩基配列の解析から *MTATP8* と *MTNAD3* の変異は非同義置換であった。

## 2) 多型の骨髄移植への影響

HLAのマッチした340組を用い、*MTATP8*と*MTNAD3*の不適合の生存率、急性GVHD発症率への影響を解析したが、移植成績への影響は認められなかった。*MTATP8*と*MTNAD3*から由来するペプチド(MTATP8-L: TMITPMLLT、MTATP8-F: TMITPMELT および、MTND3-A: WLQKGLDWA、MTND3-T: WLQKGLDWT)はいずれもHLA-A\*0201のpeptide-binding motifを持っていることから、A\*0201陽性群について解析を行ったが、有意な差は認められなかった。

## D: 考察

mtDNAには多くの多型が報告されている。今回PCR-SSCP法によりタンパクコーディング領域の全域で多型を比較したところ、80検体が59タイプに分けられた。SSCP法の多型検出率を考えると、タンパクコーディング領域の多型の組み合わせは検体毎に異なると推定された。

これまでGVHD発症例からいくつかの

マイナー抗原が同定されている。しかし、これらのうち移植成績に統計的に有意な影響を与えるマイナー抗原は限られている。今回見つけたアミノ酸変異を伴う頻度の高い2つの多型も、移植成績には影響を与えなかった。今回の結果は、個別のGVHD発症例でのミトコンドリア由来マイナー抗原の関与の可能性を否定するものではないが、ドナー選択においてミトコンドリア多型を調べることの有用性は小さいと思われた。

## E: 結論

mtDNAのタンパクコーディング領域も多型性が極めて高いことが確認された。頻度の高い非同義置換も確認されたが、移植成績への影響は認められなかった。

## F: 研究発表

### 1. 論文発表

1) Akeesaka T, Kashiwase K, Shimamura M, Ishikawa Y, Tanaka H, Fujii M, Akaza T, Hando K, Yuasa S, Takahashi T, Juji T. Identification of a novel HLA-B46 allele, B\*4602, in Japanese. *Tissue Antigens*. 2000; 55(5): 460-2.

2) Wakui M, Tokunaga K, Ishikawa Y, Leelayuwat C, Kashiwase K, Tanaka H, Mariyama S, Nakajima F, Park MH, Jia GJ, Chinge N-O, Sideltseva EW, Juji T. Wide distribution of the MICA-MICB null haplotype in East Asians. *Tissue Antigens*. 2001; 1-8.