

3) Akesaka T, Kashiwase K, Ishikawa Y, Tanaka H, Shimizu M, Kawai S, Akaza T, Takahashi T, Juji T. Allele frequency of HLA-B39 in the Japanese population and identification of a novel B39 allele, B3923. *Tissue Antigens* 2001; 57 (in press)

2. 学会発表

- 1) 柏瀬貢一、石川善英、徳永勝士、赤座達也、十字猛夫：日本人における CD1D 遺伝子の多型性. 第 9 回日本組織適合性学会総会 2000.
- 2) 石川善英、柏瀬貢一、岡井幹、赤座達也、十字猛夫：ミトコンドリア DNA タンパクコーディング領域の多型解析. 第 9 回日本組織適合性学会総会 2000.
- 3) 涌井美紀、徳永勝士、石川善英、柏瀬貢一、田中秀則、中島文明、赤座達也、十字猛夫：MICA 遺伝子の多型と非血縁者間骨髄移植成績との関連. 第 45 回日本人類遺伝学会 2000.
- 4) 涌井美紀、徳永勝士、石川善英、柏瀬貢一、田中秀則、中島文明、赤座達也、十字猛夫：Multiplex PCR 法を用いた MIC-A deletion の検出と東アジアにおける MIC-A-MIC-B null ハプロタイプの分布と進化. 第 9 回日本組織適合性学会総会 2000.
- 5) 明坂珠生、柏瀬貢一、田中秀則、藤井まり恵、島村益広、加藤道、石川善英、赤座達也、高橋明子、十字猛夫：ルーチンタイピングで発見された HLA-B バリエーション. 第 9 回日本組織適合性学会総会 2000.

表1. 高頻度で見つかったmtDNAタンパクコーディング領域の非同義置換

Nucleotide Position	Locus	Nucleotide substitution	Amino Acid substitution	Frequency(%)					
				normal		BMT cases**			
				Freq%	individual*	donor	recipient	match	mismatch
8414	MTATP8	C T	L F	57.5 37.5	63.2 36.8	59.7 40.3	52.2	47.8	
10398, 10400	MTND3	G, T A, C	A T	61.3 26.3	66.8 33.2	74.1 25.9	56.2	43.8	
15043, 15301	MTCYB	A, A G, G	syn	61.3 27.5	- -	- -	-	-	

日本人 HLA-A、B、DR の DNA 検査法の改良

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

PCR-SSOP 法を用い、日本人の多数検体タイピングに適した HLA-DNA 検査法を開発した。HLA-A、B、DR それぞれ 13、24、17（合計 54）種のプローブを用いる事により、日本人集団で頻度が 0.1%以上のアレルをホモ・ヘテロ接合とも血清学レベル以上で判定できる系を設計した。すべてのプローブの洗浄温度を同一温度（55℃）にする事ができた。本法により、ほとんどの既知検体を正しく判定できたが、一部、PCR プライマー認識部位の変異と思われる検体では誤った判定結果を得た。この方法は、ろ紙採血サンプルからのタイピングにも応用可能であった。

A. 研究目的

PCR-SSOP (PCR-sequence-specific oligonucleotide probing) 法は、多数検体を目的とした HLA-DNA タイピング法としてすぐれた方法である。しかし、世界中で報告されている多くのアレルを対象として、また、すべての判定をアレルレベルで行おうとすると、多くのプローブを必要とするため非常に煩雑な方法となる。今回、対象となるアレルを HLA-A、B、DR 座とも日本人集団で通常見られるものに限定し、判定を血清学レベル以上とする事により、プローブ数を最低限に抑えた SSOP 法が可能か検討した。また、ろ紙採血検体から本法を用いてのタイピングが可能であるかについても合わせて検討を行った。

B. 研究方法

SSOP 法の検討にはアレルレベル、または血清学レベルで HLA 型既知の精製 DNA サンプルを用いた。ろ紙採血の場合は、FTA Paper (Whatman) に血液を滴下、保存し、血液浸透部 1.2mm Φ を 0.2ml PCR

チューブ中で専用洗浄液と PCR 緩衝液で洗浄し、ろ紙に吸着した DNA を用いて PCR を行った。多型エクソン (HLA-A、B はエクソン 2 及び 3、HLA-DR はエクソン 2) を増幅後、増幅産物 2 μl をナイロン膜にドットし、アルカリ変成・中和後、80℃で 30 分間乾燥してドットナイロン膜とした。ジゴキシゲニン ddUTP ラベルしたプローブと反応後、TMAC 中で洗浄し、特異的にハイブリダイズしたプローブに対しアルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体を反応させ CSPD による化学発光で検出した。

プローブの設計に当たっては、日本人集団で頻度が 0.1%以上のアレルを対象とし、HLA-DR については DR3 (DRB1*0301/02) も加えた。設計したプローブの数、対象となるアレルの数、及び反応パターンの種類数 (グループ数)、理論上判定不能となるヘテロ接合体の頻度を表 1 に示した。

C. 研究結果

SSOP 法の検討

プローブ塩基配列の長さや位置を調節

する事により、設計した 54 種のプローブすべてについて、一種類の TMAC 洗浄温度(55°C)を設定できた。

多数検体のタイピングを検討するため、HLA 型既知の約 90 検体の PCR 産物をドットし、SSOP を行った。HLA-B プローブの反応の 1 例を図 1 に示した。フィルム感光による目視判定の他、イメージアナライザーを用いて発光シグナルを数値化した場合においても陽性と陰性がはっきりと区別された。他のプローブにおいても程度の差はあるものの、良好な結果が得られた。

目視による実際の判定精度を表 2 に示した。多くのアレル及びそのヘテロ接合体を検討する目的で、なるべくアレルの組み合わせの違う HLA 型既知検体約 90 検体を用いてタイピングしたところ、ほとんどのものが正しく判定された。しかし、HLA-A では判定保留となったもの、誤判定となったものがそれぞれ 1 検体ずつあった。

誤判定検体は HLA-A*0210, 2601 だったが、A*2601 と反応すべき 2 種のプローブでシグナルが著しく弱かった。同様の HLA-A 型を持つ 8 検体について、SSOP を行ったところ、すべて正しく判定された。誤判定検体を別の PCR プライマーで増幅し塩基配列をみたところ、イントロン 3 のこれまで変異の報告のない部位に変異が認められた。この部位は本法で用いている PCR プライマー認識部位だった。

ろ紙採血からのタイピング

ろ紙採血検体は精製 DNA サンプルを用いた場合に比べ、当初増幅が難しかった

が、プライマーの塩基長を調整し、PCR 反応条件を改良した結果、安定した増幅が得られるようになり、増幅産物を用いた SSOP でも正しく判定された。

D. 考察

HLA-A、B、DR 合計 54 種のプローブを用いる事により、日本人で頻度 0.1%以上のアレルに対し、血清学レベル以上(二桁～四桁)での判定が可能な SSOP 法をつくる事ができた。

SSOP 法はプローブの種類が多いと作業が煩雑となるが、今回の 54 種類であれば許容範囲とも思われる。8cm×12cm のナイロン膜に 384 検体ドット可能であり、多数検体を一度にタイピングするのであれば実用的であると思われるが、手順の簡略化、自動化についてはさらに検討を必要とするであろう。

HLA 既知検体の検討で誤判定が見出された。誤判定検体は遺伝子のプライマー認識部位に変異があり、ヘテロ接合体のうち一方のみが優先的に PCR 増幅された事が原因と推察された。変異体を意識した Mix プライマーを用いるなどの方法で対処が可能と思われる。多数検体のタイピングに当たっては、今回の例以外にも誤判定を起こす要因が当然あると推察され、より多くの既知検体で今回の方法を検証する必要があると思われる。

ろ紙採血検体からの DNA 増幅が可能となったが、まだ少ない数での検討に留まっており、有効な増幅と判定についてやはり多数の検体について検証を重ねる必要があると思われる。

今後、実際に多数検体をタイピングした

場合、一度に扱う検体数は膨大なものとなる。専用の判定とデータ管理のためのソフトウェアの開発も必要となる。

E. 結論

日本人で頻度 0.1%以上のアレルに対し、血清学レベル以上（二桁～四桁）での判

定が可能な SSOP 法を開発した。ろ紙採血検体からのタイピングも可能となった。

しかし、本法を用いると誤判定を起こす検体も見出された事から、より多数の検体を用いての検証が必要と思われる。手順の簡素化やソフトウェアの開発についても検討が必要である。

表 1. 設計したプローブ

	プローブ 数	アレル 数	グループ 数	判定不能 ヘテロ
HLA-A	13	15	12	0%
HLA-B	24	35	29	0.17%
HLA-DR	17	30	17	0.67%

表 2. SSOPタイピングの判定精度

	サンプル 数	判定 可能数	誤 判定	判定 保留
HLA-A	90(87)	88	1	1
HLA-B	95(95)	95	0	0
HLA-DR	95(95)	95	0	0

() 内はアレル
組み合わせの数

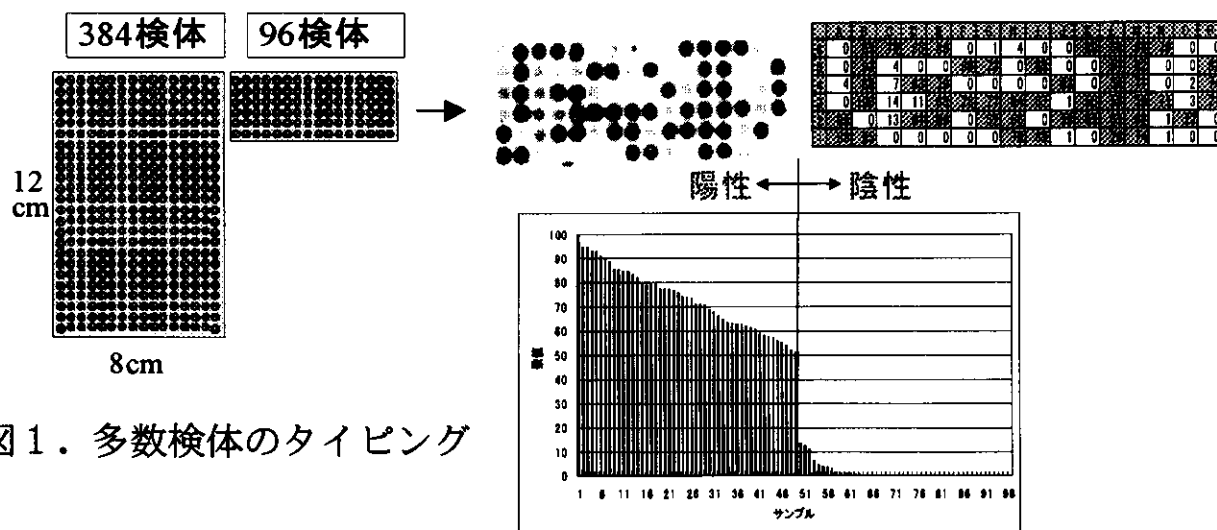


図 1. 多数検体のタイピング

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

TNFA、*TNFR2* 遺伝子多型と移植成績に関する研究
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

TNFA 上流域および *TNFR2* の多型の移植成績への影響を解析した。*TNF α* 高産生型とされている *TNFA-U02* または *-U03* をもつ群では *U01* のみを持つ群に比べ GVHD 発症率の増加、再発率の低下がみられた。この影響は HLA-A、B、DRB1 アリル適合移植においても認められた。*TNFR2* は 196 番目のアミノ酸がメチオニン (M) とアルギニン (R) の 2 つのタイプがあり、ドナーが *196R* を持つ群では *196M* のみを持つ群に比べ GVHD 発症率が高く、再発率が低値であった。しかし患者が *196R* を持つ群では再発率が増加する傾向がみられた。

A. 研究目的

GVHD は HLA 適合移植においても起こり、この原因としてマイナー抗原の不一致が考えられている。一方 HLA に不適合があっても GVHD を発症せずに移植が成功する例もある。これらの結果は GVHD の発症は HLA、マイナー抗原不一致の有無だけでなく免疫反応の感受性の個体差が関与しているためと考えられる。*TNF α* は多機能なサイトカインであり、骨髄移植において、*TNF α* レベルと GVHD の重症度が関連すること、抗 *TNF α* 抗体投与により GVHD 発症を遅延できることが報告されている。*TNF α* のプロモーター領域には多型が知られており、この多型と *TNF α* 産生量との関係も報告されている(1)。また *TNF α* の受容体である *TNFR2* にも多型が知られており、SLE と関連することが報告されている(2)。本研究では *TNFA* の上流域の多型および *TNFR2* のアミノ酸変異を伴う多型の移

植成績への影響を調べた。

B. 研究方法

1994 年 2 月より 1996 年 4 月までに行われた非血縁者間骨髄移植 453 症例を検体として用いた。抽出した DNA から *TNFA* 上流域-1292~822 および *TNFR2* の exon6 を PCR 増幅した。各変異を含む塩基配列を用いてプローブを作製し、PCR-SSOP 法によりタイピングを行った。

C. 研究結果

C-1. *TNFA* 多型の影響

表 1 に *TNFA* のアリル頻度を示した。既に報告されている日本人のアリル頻度と一致する結果であった。

TNFA アリルの GVHD 発症率 (3 度以上) への影響をカプラン-マイヤー法で解析した (図 1)。ドナーの *TNFA* が *U02* または *U03* である場合、*U01* ホモ接合に比べ GVHD 発症率が高値となった。患者

の *TNFA* の比較でも同様の傾向が見られたが、その程度はドナータイプの影響に比べ小さかった(図 1)。図 2 に再発率への影響の解析結果を示した。*U01* ホモ接合に比べ、*U02* あるいは *U03* では再発率は低値であった。この GVHD 発症率、再発率への影響は *HLA-A, B, DRB1* アリル適合移植の症例でも認められた。

C-2. *TNFR2* 多型の影響

TNFR2 は 196 番目のアミノ酸に多型があり、日本人では Methionin (*196M*) タイプが 90%、Arginine(*196R*)タイプが 10%と報告されている。今回の解析でも遺伝子頻度はほぼ同じ結果であった。ドナーが *196R* を持つ群では *196M* ホモ接合の群に比べ、GVHD 発症率が高く、再発率が低い傾向が見られた(図 3)。患者タイプの比較では GVHD 発症率には差はみられなかったが、再発率は *196R* を持つ群で高くなった。*HLA-A, B, DRB1* 適合移植においても同様の傾向が見られた。

TNFR2 の多型はアミノ酸変異を伴っているため、マイナー抗原となる可能性がある。そこで *TNFR2* 適合群、不適合群の間で比較をおこなったが、移植成績に差は認められなかった。

D. 考察

$\text{TNF}\alpha$ レベルの上昇は GVHD を重症化すると考えられている。*TNFA* 上流域には多数の多型が知られており、白人では-308 番目の G/A 多型により $\text{TNF}\alpha$ 産生量が異なることが報告されている。しかし日本人では-308 番目はほとんどが G タイプである。日本人集団の *TNFA* 上流域の

多型解析により、-1031(T/C)、-863(C/A)、-857(C/T)の多型の組み合わせにより 4 種類のアリル (*U01, 02, 03, 04*) があり、*U02, U03* は *U01* に比べ $\text{TNF}\alpha$ 産生量が高いことが報告されている。したがって、移植症例が *U02* あるいは *U03* を持つ場合 $\text{TNF}\alpha$ 産生量が高いことにより、GVHD が重症化することが予想される。今回の解析でその予想と一致する結果が得られた。つまりドナーあるいは患者が *U02* あるいは *U03* を持つ群では 3 度以上の GVHD 発症率が高くなる傾向が見られた。さらに再発率の低下もみられた。

一方、*TNFA* は *HLA* クラス III 領域にコードされており、*HLA* とハプロタイプを組んでいる。このため統計処理においては *HLA* 不適合の影響が *TNFA* アリルの違いとして現れる可能性がある。そこで *HLA-A, B, DRB1* アリル適合移植例のみを抽出し、比較をおこなったが、やはり *TNFA* アリルの違いにより GVHD、再発率に差が認められたことから *TNFA* 多型の影響は *HLA* とは独立した影響と考えられる。

$\text{TNF}\alpha$ は *HLA* の発現を高め、また T 細胞の分化を促進する作用があり、 $\text{TNF}\alpha$ 産生量が高い *U02, U03* を持つ群では結果として GVHD、GVL ともに高められたものと考えられる。 $\text{TNF}\alpha$ は主にマクロファージで産生されると考えられている。患者のマクロファージはケモセラピー、全身放射線照射などの移植前処置で減少しているはずである。しかし移植前の患者血清中の $\text{TNF}\alpha$ 量を抗 $\text{TNF}\alpha$ 抗体で低下させることにより、GVHD 発症が遅延することが報告されている。その産生源

は不明であるが、今回の結果はドナー側だけでなく患者側 TNF α 産生量も移植成績に影響を与えることを示している。

TFNR2 の 196 番目のアミノ酸多型の TNFR2 機能への影響は不明であるが、SLE 患者群では健常人群に比べ 196R の頻度が高いことが報告されている(2)。TNFR2多型の影響は 196Rをドナーと患者どちらが持つかで異なった。ドナーが持つ場合は TNFA-U02、U03の場合と同様に GVHD 発症率が高く、再発率は低い値であった。しかし、患者が 196R を持つ場合これとは逆に再発率の増加が見ら

れた。TNF α は炎症誘発性のサイトカインであり、TNFR2 は広く分布しているため、患者が 196R を持つ場合細胞障害作用が強くなり、患者に負荷を増加させる結果になるものと考えられる。

参考文献

- 1) Higuchi T, Seki N, Kamizono S, et al. Tissue Antigens 51, 605-612, 1998.
- 2) Komata T, Tsuchiya N, Matsushita M, et al. Tissue Antigens 53, 527-533, 1999.

表1 TNFAアレル頻度

allele	nucleotide position			Frequency		
	-1031	-863	-857	R	D	
U01	T	C	C	615	581	0.66 (0.66) *
U02	T	C	T	142	147	0.16 (0.18)
U03	C	A	C	127	145	0.15 (0.14)
U04	C	C	C	15	25	0.02 (0.03)

*Matsusita et al. Tissue Antigens 1999, 54:478-484

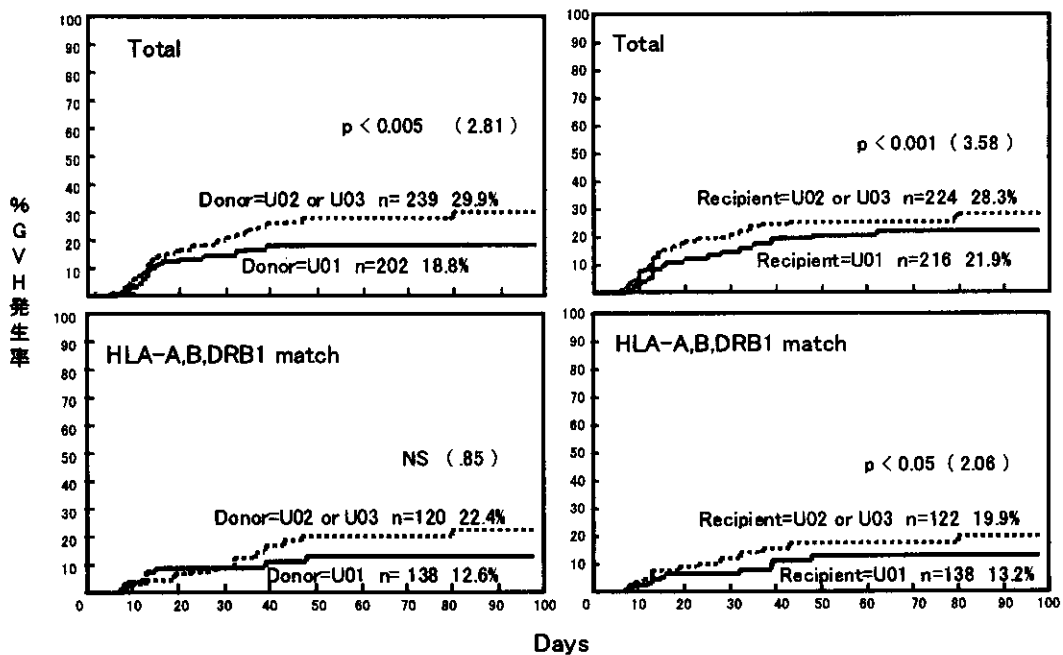


図1 TNFAアレルのGVHD(≥3)発症率への影響

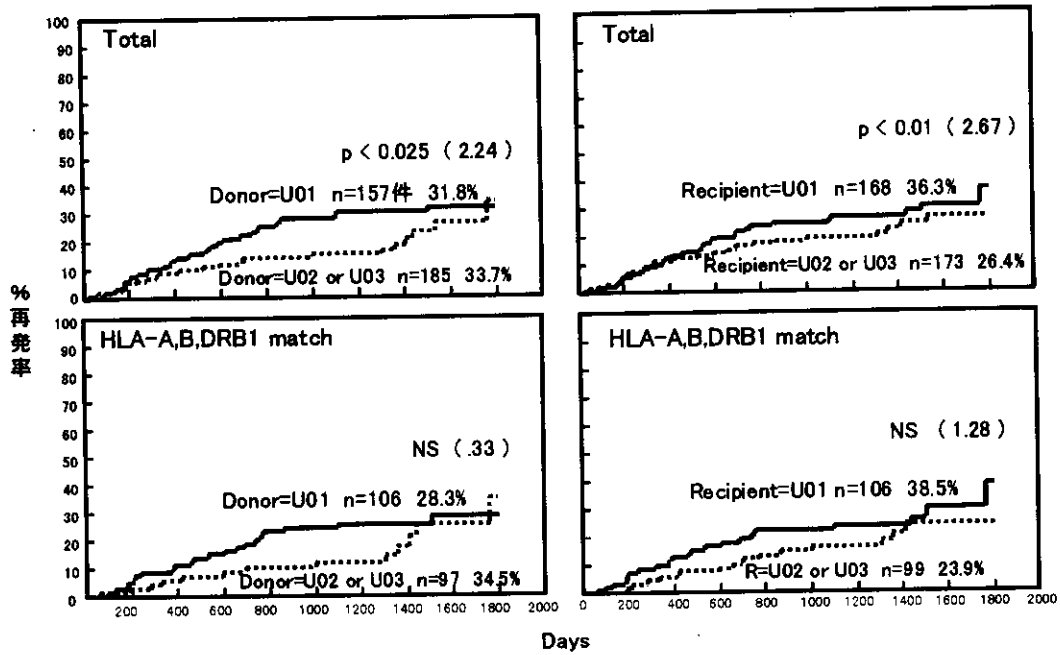


図2 TNFA アリルの再発率への影響

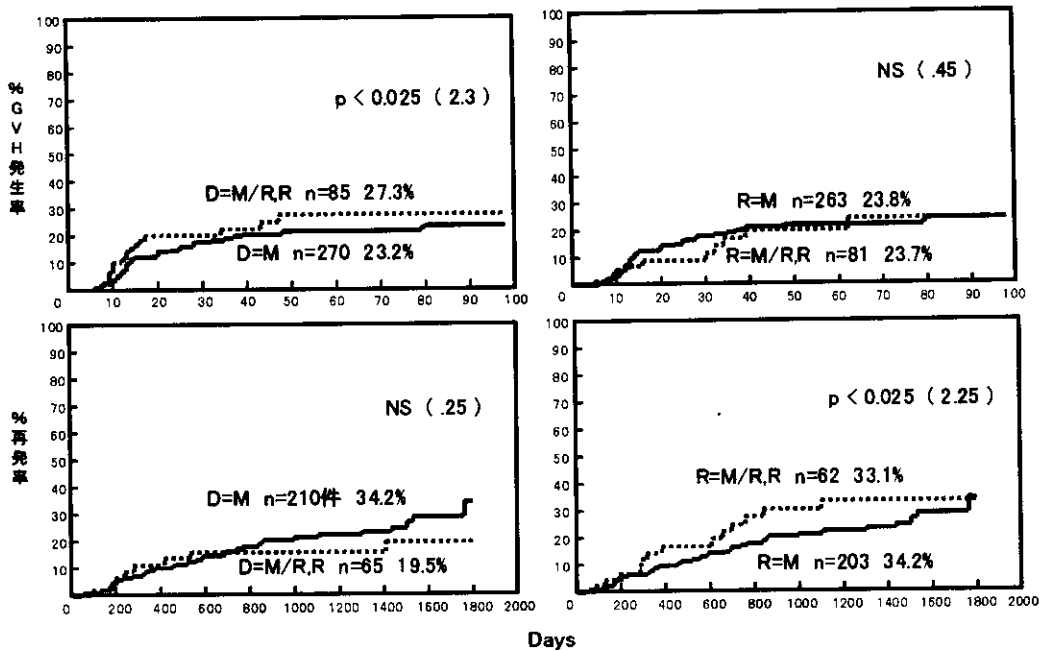


図3 TNFR2 アリルの移植成績への影響

厚生科学研究費補助金(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)
分担研究報告書

分担研究者 猪子 英俊 東海大学医学部 教授

研究要旨

HLA一致の同種骨髄移植における GVHD 発症の要因として、レシピエントの細胞上に発現しているマイナー組織適合抗原(mHags)の関与が挙げられるが、従来の造血細胞移植における組織適合性に関しては、HLA と限られたマイナー抗原のみが、散発的に調べられているのが現状である。そこで本研究は、非血縁ドナーとレシピエントでの骨髄移植施行例について、ゲノムワイドな組織適合性遺伝子の探索法として、約30,000 個の多型マイクロサテライトを用いて、ゲノムワイドレベルで組織適合性に関与する遺伝子を系統的に同定することを目的とした。その結果、現在までに約14,000個の多型マイクロサテライトを収集し、それぞれのヒト染色体上での位置を決定することができた。

A. 研究目的

HLA一致の同種骨髄移植における GVHD 発症の要因として、レシピエントの細胞上に発現しているマイナー組織適合抗原(mHags)の関与が挙げられる。現在までにHA-1~HA-5, H-Yなど、数種のmHagsやその候補抗原が同定されているが、これらのmHagsはHLA、特にクラスI 拘束性CTLの標的となることが知られており、すでにHLA-A2, -B7など特定のHLA抗原特異的拘束性CTLクローンも複数樹立されている。しかしながら、mHagsに関する解析は20年以前より行われているにもかかわらず、未知の抗原に対するCTLクローンの同定は容易ではなく、従って従来の造血細胞移植における組織適合性に関しては、HLAとHA-1など限られたマイナー抗原のみが、散発的に調べられているのが現状である。

そこで本研究は、ゲノムワイドな組織適合性遺伝子の探索法として、約30,000 個の多型マイクロサテライトを用いて、ゲノムワイドレベルで組織適合性に関与する遺伝子を系統的に同定することを試みた。

B. 研究方法

今年度は、多型マイクロサテライトをゲノムワイドに収集するため、すでに明らかにされているヒトのドラフトゲノム塩基配列より、多型を示すと期待されるマイクロサテライト、すなわち2塩基繰り返しは繰り返し数10回以上、3~5塩基繰り返しは繰り返し数5回以上のマイクロサテライトをまず選別した。続いて、当大学倫理委員会において承認の上、インフォームドコンセントを行い、同意を得た100名の日本人健康者より血液を採取し、DNAを抽出した。100検体をプールしたDNAを用いて、各マイクロサテライトを含む200bp~450bpの塩基配列領域をPCR増幅し、繰り返し回数について多型をしめすものを選択した。

C. 研究結果

現在までに約14,000個の多型マイクロサテライトを収集し、さらにそれぞれのヒト染色体上での位置を確認することができた。収集したこれらの多型マイクロサテライトを用いて、尋常性乾癬について相関解析によるゲノムワイドなマッピングを行ったところ、いくつかのゲノム領域について

疾患感受性候補領域がみいだされ、多型マイクロサテライトの有効性が確認された。

D. 考察

非血縁者間の移植、特に造血幹細胞移植における移植後GVHDの発症は、移植予後や成績に大きく影響するため、HLA以外に多数存在するmHagsの早急な解析が必須と考えられるが、現況では遺伝子座の同定がなされているものはごくわずかであり、DNAを用いた実用的な多型解析法も確立されていない。我々が本研究で用いた多型マイクロサテライトは、ゲノムワイドなマッピングの際の優れた遺伝子多型マーカーとして、すでに疾患感受性遺伝子などの絞り込み検索に応用されており、候補領域を的確に100kb前後まで絞り込むことが可能である。従って、従来、散発的に行われてきた組織適合遺伝子の多型解析も、多型マイクロサテライトの採用により、ゲノムワイドなかつ系統的な同定が可能となり、マイナー組織適合遺伝子の解析は一気に加速されると期待される。

プールDNAを用いての多型マイクロサテライトの収集は、迅速、さらに高精度であることが我々の検討から実証されており、従って目標の30,000個の多型マイクロサテライトの収集は、2001年8月頃に完了する予定である。多型マイクロサテライトの収集が完了し、また骨髄移植患者とドナーのDNAが使用可能であれば、直ちに多型マイクロサテライトによるゲノムワイドなマイナー組織適合遺伝子のマッピングを実行したい。すなわち、ドナー、レシピエント間でマイクロサテライト多型に相違がみられた領域を中心に、マイナー組織適合遺伝子の候補領域を約100kb以内に絞り込む。さらにこの候補領域内に存在する発現遺伝子について多型解析を行い、多型がみられるマイナー組織適合抗原遺伝子候補を選択する。さらに、骨髄移植後の臨床経過とこれらの候補遺伝子多型との相関を比較するこ

とにより、候補領域内に存在する骨髄移植の組織適合に関与する遺伝子を同定することを試みる予定である。

E. 結論

非血縁者の骨髄移植施行例における、ゲノムワイドな組織適合遺伝子の探索法として、約30,000個の多型マイクロサテライトを用いてゲノムワイドレベルで組織適合に関与する遺伝子を系統的に同定することを目的とし、健常者100検体のプールDNAを用いて多型マイクロサテライトの収集を行った。結果、現在までに約14,000個の多型マイクロサテライトを収集し、それぞれのヒト染色体上での位置を決定することができた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shiina T, Kikkawa E, Iwasaki H, Kaneko M, Narimatsu H, Sasaki K, Bahram S, Inoko H : The beta 1,3-galactosyltransferase-4 (B3GALT4) gene is located in the centromeric segment of the human MHC class II region. *Immunogenetics* 51 : 75-78, 2000.

2. Gao PS, Kawada H, Kasamatsu T, Mao XQ, Roberts MH, Miyamoto Y, Yoshimura M, Saitoh H, Yasue H, Nakao K, Adra CN, Kun JF, Morooka S, Inoko H, Ho LP, Shirakawa T, Hopkin JM : Variants of NOS1, NOS2 and NOS3 genes in Asthmatics. *Biochem Biophys Res Commun* 267 : 761-763, 2000.

3. Teraoka Y, Naruse TK, Oka A, Matsuzawa Y, Shiina T, Iizuka M, Iwashita K, Ozawa A, Inoko H : Genetic polymorphisms in the cell growth regulated gene, SC1 telomeric of the HLA-C gene and lack of association with psoriasis vulgaris. *Tissue Antigens* 55 : 206-211, 2000.

4. Dai KZ, Vergnaud G, Ando A, Inoko H, Spurkland : The SH2D2A gene encoding the T-cell-specific adapter protein (TSAd) is localized centromeric to the CD1 gene cluster on human chromosome 1. *Immunogenetics* 51 : 179-185, 2000.

5. Keicho N, Ohashi J, Tamiya G, Nakata K, Taguchi Y, Azuma A, Ohishi N, Emi M, Park H, Inoko H, Tokunaga K, Kudoh S : Fine localization of a major disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis. *Am J Hum Genet* 66 : 501-507, 2000.

6. Kawamura K, Yamamura T, Yokoyama K, Chui DH, Fukui Y, Sasazuki T, Inoko H, David CS, Tabira T : Induction of autoimmune encephalitis by proteolipid protein 95-116-specific T cells from HLA-DR2 (DRB1*1502) transgenic mice. *J Clinical Investigation* 105 : 977-984, 2000.
7. Ikewaki I, Tamauti H, Yamada A, Mori N, Yamao H, Inoue H, Inoko H : A unique monoclonal antibody mNI-11 rapidly enhances spread formation in human umbilical vein endothelial cells. *J Clinical Immunology* 20 : 317-324, 2000.
8. Yabuki K, Inoko H, Ohno S : HLA testing in patients with uveitis. *Int Ophthalmol Clin.* 40 : 19-35, 2000.
9. Kobayashi T, Yokoyama I, Inoko H, Naruse T, Hayashi S, Morozumi K, Uchida K, Nakao A : Significance of transporter associated with antigen processing 2 (TAP2) gene polymorphism in living-related renal transplantation. *Human Immunol* 61 : 670-674, 2000.
10. Watanabe Y, Tenzen T, Nagasaka Y, Inoko H, Ikemura T : Replication timing of the human X-inactivation center (XIC) region : correlation with chromosome bands. *Gene* 252 : 163-172, 2000.
11. Naruse TK, Mastuzawa Y, Ota M, Kastuyama Y, Matsumori A, Hara M, Nagai S, Morimoto S, Sasayama S, Inoko H : HLA-DQ1*0601 is primarily associated with the susceptibility to cardiac sarcoidosis. *Tissue Antigens* 56 : 52-57, 2000.
12. Iwasaki M, Kobayashi K, Suzuki K, Anan S, Ohno S, Geneg GL, Inoko H : Polymorphism of the ABO blood group genes in Hans, Kazak and Uygur populations in the Silk Route of northwestern China. *Tissue Antigens* 56 : 136-142, 2000.
13. Niizeki H, Naruse T, Hashigucci K, Yokoyama M, Yamasaki Y, Akiya K, Tojo T, Urushibara T, Yamazaki Y, Inoko H, Nishikawa T : Polymorphisms in the TNFA promoter region is not associated with palmoplantar pustulosis. *Tissue Antigens* 56 : 162-165, 2000.
14. Ota M, Bahram S, Katsuyama Y, Saito S, Nose Y, Sada M, Ando H, Inoko H : On the MICA deleted-MICB null, HLA-B4801 haplotype. *Tissue Antigens* 56 : 268-27, 2000.
15. Kuwana M, Kaburaki J, Pandey JP, Murata Y, Kawakami Y, Inoko H, Ikeda Y : HLA class II alleles in Japanese patients with immune thrombocytopenic purpura. Associations with anti-platelet glycoprotein autoantibodies and responses to splenectomy. *Tissue Antigens* 56 : 337-343, 2000.
16. Kimura A, Ota M, Katsuyama Y, Ohbuchi N, Takahashi M, Kobayashi Y, Inoko H, Numano F : Mapping of the HLA-linked genes controlling the susceptibility to Takayasu's arteritis. *Int J Cardiology* 75 : S105-S110, 2000.
17. Mizuki N, Ota M, Yabuki K, Katsuyama Y, Ando H, Palimeris GD, Kaklamani E, Accorinti M, Pivetti-Pezzi P, Ohno S, Inoko H : Localization of the pathogenic gene of Behcet's disease by microsatellite analysis of three different populations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 3702-3708, 2000.
18. Matsuzaka Y, Makino S, Nakajima K, Tomizawa M, Oka A, Kimura M, Bahram S, Tamiya G, Inoko H : New polymorphic microsatellite markers in the human MHC class II region. *Tissue Antigens* 56 : 492-500, 2000.
18. Saito S, Ota S, Yamada E, Inoko H, Ota M : Allele frequencies and haplotypic associations defined by allelic DNA typing at HLA class I and class II loci in the Japanese population. *Tissue Antigens* 56 : 522-529, 2000.

2. 学会発表

1. Naruse TK, Kawata H, Nakashima M, Inoko H, : Simple and rapid HLA-A and -DRB1 genotyping using the 2 color dyes fluorescence detection system. *Indian Society for Histocompatibility and Immunogenetics. India.* 2001.
2. 河田寿子、成瀬妙子、松澤由美子、猪子英俊.リアルタイムPCR産物自動検出器と蛍光標識プローブを用いたHLA2遺伝子座同時DNAタイピング法の開発.第9回日本組織適合性学会大会. 鹿児島. 2000.
3. 松村嘉之、市原竜生、鈴木 収、成瀬妙子、猪子英俊. DNAオリゴマーマイクロアレイを用いたHLA-DNAタイピング.第9回日本組織適合性学会大会. 鹿児島. 2000.
4. 牧野悟士、岡本浩一、林 英樹、徳保江里子、渡辺裕美、遠藤高帆、今西 規、五條堀孝、田宮 元、猪子英俊.ゲノムワイドな多型マイクロサテライトマーカーの設定. 第23回日本分子生物学会年会. 神戸. 2000.
5. 岡本浩一、岡 晃、富澤麻衣子、牧野悟士、林 英樹、佐藤理恵、徳保江里子、渡辺裕美、田宮 元、猪子英俊. 尋常性乾癬感受性領域のゲノムワイドな遺伝的相関. 第23回日本分子生物学会年会. 神戸. 2000.

IV. テーマー 3

膠原病に対する造血細胞移植

— 適応疾患拡大のモデルとして —

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

難治性自己免疫疾患に対する造血幹細胞移植に関する研究

小池 隆夫（北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学・第二内科 教授）
澤田 賢一（北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学・第二内科 助教授）
西尾 充史（北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学・第二内科 助手）
坊垣 暁之（北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学・第二内科）

研究要旨

既存の治療に抵抗を示す難治性自己免疫疾患（全身性エリテマトーデス、全身性硬化症（強皮症）患者を対象として磁気細胞分離システム(AM9802)により純化した CD34 陽性自己末梢血幹細胞移植を超大量免疫抑制療法(conditioning)に継いで行うことで、従来の治療法に抵抗性の症例における本治療法の有効性ならびに安全性を検討し、本邦におけるその標準的方法を確立することを目的とする。同時に免疫学的な解析を行うことにより難治性自己免疫疾患の病態の解明を目的とする。現在までに全身性强皮症患者 1 例に対して自己末梢血純化 CD34 陽性細胞移植併用超大量免疫抑制療法を施行できた。移植後比較的早期より皮膚症状の改善が確認され、また重篤な治療合併症は認められず、同療法は全身性强皮症に有効であると考えられた。

A. 研究目的

自己免疫疾患は、自己組織に反応してこれを傷害する自己反応性リンパ球クローンや自己抗体によって発症する自己免疫疾患と考えられ、その臨床像は多彩であり、現時点においては根治的治療法は確立されていない。これまでのところ副腎皮質ステロイド剤や免疫抑制剤による免疫抑制療法が治療の主体となっており予後の改善が認められている。しかしながら、これらの治療法に抵抗を示す難治性症例も少なからず存在し、このような例は生命予後ならびに社会的予後が極めて不良である。その病態改善のため自己反応性リンパ球クローンの除去が有効であると考えられている。その1つの方法として超大量免疫抑制療法が挙げられ有効性が認められつつある。この際、超大量免疫抑制療法による骨髄不全回避のため造血幹細胞移植による支持療法が不可欠である。そこで、難治性自己免疫疾患

に対する自己末梢血純化 CD34 陽性細胞移植併用超大量免疫抑制療法の治療法確立のため、その有効性、安全性を検討するとともに免疫学的解析を行うことにより難治性自己免疫疾患の病態解明を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1.対象症例(表 1)

副腎皮質ステロイド剤、免疫抑制剤を含む既存の治療法に抵抗を示す全身性エリテマトーデス、強皮症等の自己免疫疾患患者を対象とする。治療実施に際しては、60 歳以上、高度の心不全、コントロール不能な不整脈、高度の腎障害等を有する症例は除外例とする。また、事前に本人および家族へインフォームドコンセントを行い、文書による同意を得る。さらに当院医の倫理委員会判定委員会の承認した症例に限るものとする。

今回、適応症例となった 57 歳男性の全身性強皮症症例は、発症 3 年以内であり、副腎皮質ステロイド剤、プロスタグランジン E1 製剤等による治療は何れも無効であった。胸部 CT、心エコー上異常を認めなかったが、呼吸機能検査上 %VC 77.1%、%DLCO 80.0% と軽度の拘束性障害と軽度腎障害を認め、強皮症腎クリーゼの既往を有していた。

2. 治療法

G-CSF 単独もしくは、Cyclophosphamide 2 g/m² × 2 日間投与後 G-CSF 併用で末梢血中へ血液幹細胞を動員(mobilization)、採取を行う。採取した末梢血幹細胞を磁気細胞分離システムを用いて CD34 positive selection を行い純化し凍結保存する。同時に CD34 純化を行わない末梢血幹細胞を back up 用として凍結保存する。Cyclophosphamide 200 mg/kg を 4 日間に分けて投与し移植前処置を行う。この際、出血性膀胱炎予防のため Mesna を併用する。前処置後、純化凍結保存しておいた自己末梢血 CD34 陽性細胞を輸注し、その後、G-CSF 投与を行い造血能の回復を促す(図 1、2)。

C. 免疫学的検討

治療前後における末梢血リンパ球サブセットおよびサイトカイン産生能の変化を評価する。

C. 研究結果

1. 臨床症状

移植後 100 日前後での評価では、血圧はアンジオテンシン変換酵素阻害薬の内服は継続していたが、関節痛に対する NSAIDs、末梢循環不全に対する抗血小板剤はともに不要となった。Rodnan total thickness skin score は、38/51 から 26/51 へ改善した(写真 1)。各々の手指に程度の差はあるものの関節可動域は改善を示した。生活上の変化として仰臥位からの起床、衣服の着脱は介助不要となった。血清学的検査は、抗核抗体 1:160 (speckled

pattern)と変化を認めていない。その他、抗トポイソメラーゼ I 抗体、抗セントロメア抗体を含めた自己抗体は経過中陰性であった。呼吸機能検査は、移植前は %VC 77.1%、%DLCO 80.0%、移植後は %VC 86.2%、%DLCO 61.0% であった。

2. 安全性に関する検討

今回の例では、G-CSF 単独で mobilization を行い、純化後 CD34 陽性細胞を 2.96 × 10⁶ /kg 得た。純度 95%、CFU-GM 9.50 × 10⁵ /kg であった。移植後の造血能回復は速やかであり、移植 11 日には WBC 1000 /μl 以上(顆粒球数 500 /μl 以上)、Plt 5.0 × 10⁴ /μl 以上となった(図 3)。移植 14 日にサイトメガロウイルス血症(サイトメガロウイルスアンチゲネミア(C7-HRP) 1/28000)を認めたが、ganciclovir 投与により特に臨床症状を呈することなく経過した。

2. 免疫学的検討(図 4、5)

造血器疾患に対して自己末梢血純化 CD34 陽性細胞移植を施行した際は、一般にリンパ球の回復が遷延することが知られており、本症例も同様の経過を示し、図 4 の様なリンパ球サブセットの回復が観察された。サイトカイン産生能については図 5 の様な推移を示した。本例 1 症例のみから結論を導くことはできず、今後の症例の蓄積が必要である。

D. 考察

膠原病をはじめとした自己免疫疾患に対する根治的治療は現時点では存在せず、副腎皮質ステロイド剤、免疫抑制剤等による免疫抑制療法により病態の改善が得られている。しかしながら、これらの治療に抵抗し生命的、社会的予後が不良な症例も多く存在する。近年、このような難治性自己免疫疾患に対して造血幹細胞移植併用超大量免疫抑制療法が有効であることが報告されている。これまで、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、強皮症、成人発症スティル病、筋炎等への治療成績が報告されており程度の差はあれ病態

の改善が得られたとの報告が多い。強皮症に対する適応症例は1997年のTyndall A, et alによる報告が最初であり移植後6ヶ月の時点でskin score 41/51から34/51と改善が得られている。その後37例に行われた成績では、評価可能26例中16例に効果があったとされている。病態改善の機序は現時点では不明であるが、超大量免疫抑制療法により異常な免疫システムを“破壊”し、自己反応性リンパ球クローンを除去した純化CD34陽性細胞を輸注することにより免疫システムの再構築を惹起するものと説明されている。しかしながら、移植前後における病態変化時の免疫系統の変化の解析は十分に行われていないのが現状であり、今後、造血幹細胞移植併用超大量免疫抑制療法が免疫システムに及ぼす影響の詳細な検討が望まれる。

自己免疫疾患に対する本治療法の問題点として以下の点が挙げられる。

1. 治療関連死が約10%存在すること
2. 全症例に有効であるわけではないこと
3. 有効と判断された症例においてもその長期予後および長期的合併症が不明なこと
4. 日本人における至適薬剤の投与方法、投与量は確立していないこと

以上のことを踏まえて自己免疫疾患の病態解明を進めるとともに、本治療法の有効性ならびに安全性を検討し、本邦における難治性自己免疫疾患に対する造血幹細胞移植治療の標準的方法の確立が望まれる。

E. 結論

57歳男性全身性強皮症症例に対し自己末梢血純化CD34陽性細胞移植併用超大量免疫抑制療法を安全に施行し得た。同治療の長期予後は不明であるが、移植後比較的早期より皮膚症状の改善が認められ、全身性強皮症に対して有効であると考えられた。

F. 健康危険情報

治療期間中、感染性と思われる発熱を認め得たが抗生剤投与によりコントロールが可能であり、造血能回復後には症状は消失した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsuura E, Kobayashi K, Kasahara J, Shoenfeld Y, Koike T: Oxidized autoantigens in atherosclerosis.. Y Shoenfeld, D. Harats, G Wick ed. In *Atherosclerosis and Autoimmunity*. Elsevier Science B.V 143-150, 2001
2. Yamaguchi, M., Hirayama, F., Kanai, M., Sato, N., Fukazawa, K., Yamashita, K., Sawada, K., Koike, T., Kuwabara, M., Ikeda, H., Ikebuchi, K.: Serum-free coculture system for ex vivo expansion of human cord blood primitive progenitors and SCID mouse-reconstituting cells using human bone marrow primary stromal cells. *Exp Hematol* 2001 29:174-182.
3. Bertlaccini, M.L., Atsumi, T., Lanchbury, J., Scaliz, A.R., Katsumata, K., Vaughan, R.W., Kondeatis, E., Kamashta, M.A., Koike, T., Huges, G.R.V.: Plasma tumor necrosis factor α levels and the -238* a promoter polymorphism in patients with antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2001;85. 198-203
4. Nishio, M., Koizumi, K., Endo, T., Haseyama, Y., Fujimoto, K., Yamamoto, S., Kobayashi, H., Koike, T., Sawada, K.: Effective high-dose chemotherapy combined with CD34+-selected autologous peripheral blood stem cell transplantation in a patient with cutaneous

- CD30-negative Large T cell Lymphoma. Bone marrow transplantation. 2000;25. 1315-1317.
5. Koizumi, K., Nishio, M., Endo, T., Takashima, H., Haseyama, Y., Fujimoto, K., Yamamoto, S., Sato, N., Ikebuchi, K., Ikeda, H., Koike, T., Sawada, K. : Large scale purification of human blood CD34+ cells from cryopreserved peripheral blood stem cells, using a nylon-fiber syringe system and immunomagnetic microspheres. Bone Marrow Transplantation. 26. 787-793. 2000.
 6. Tsutsumi, A., Koike, T. : Antiphospholipid syndrome in the elderly. Int. Med. 2000; 39: 529-530.
 7. Takeuti, R., Atsumi, T., Ieko, M., Takeya, H., Yasuda, S., Ichikawa, S., Tsutsumi, A., Suzuki, K., Koike, T. : Coagulation and fibrinolytic activities in 2siblings with β 2-glycoprotein I deficiency. Blood. 2000; 96:4.
 8. Koizumi, K., Nishio, M., Endo, T., Takashima, H., Haseyama, Y., Fujimoto, K., Yamamoto, S., Sato, N., Ikebuchi, K., Ikeda, H., Koike, T., Sawada, K. : Large scale purification of human blood CD34+ cells from cryopreserved peripheral blood stem cells, using a nylon-fiber syringe system and immunomagnetic microspheres. Bone Marrow Transplantation. 2000; 26. 787-793
 9. Subang, R., Levine, J.S., Janoff, A.S., Davidson, S.M.K., Taraschi, T.F., Koike, T., Minchey, S.R., Whiteside, M., Tannenbaum, M., Rauch, J. : Phospholipid-bound β 2glycoprotein I induces the production of anti-phospholipid antibodies. J. Autoimm. 2000; 15:21-32.
 10. Nishio, M., Koizumi, K., Endo, T., Haseyama, Y., Fujimoto, K., Yamamoto, S., Kobayashi, H., Koike, T., Sawada, K. : Effective high+dose chemotherapy combined with CD34+ selected autologous peripheral blood stem cell transplantation in a patient with cutaneous CD30-negative Large T cell Lymphoma. Bone Marrow Transplantation. 2000; 25. 1315-1317
2. 学会発表
1. Koike, T. : "Valine/Leucine²⁴⁷ polymorphysm of β 2-glycoprotein I and prevalence of antiphospholipid syndrome." 6th International Lupus Conference, Barcelona, Spain, March, 24~28, 2001.
 2. Koike, T. : "Antiphospholipid antibodies in arterial thrombosis" XIIIth Paavo Nurium Symposium, Hanasaari, Finland, September, 1~3, 2000.
 3. Koike, T. : " β 2-glycoprotein I-anti- β 2-glycoprotein I Interaction." 9th International Symposium on Antiphospholipid Antibodies., Tours, France, September, 12~16, 2000.
 4. Koike, T. : "Anticardiolipin antibody; Specificity and Pathogenesis ." 5th Dresden symposium on antibodies., Dresden, Germany, October, 18~21, 2000.
- H.知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）
特になし

表1 [適応基準]

全身性びまん性強皮症で原則発症3年以内であり、以下の症状を呈する場合。

- ①末梢循環不全により皮膚潰瘍を繰り返す。
- ②肺線維症の存在(FVC < 80% or %DLCO < 70%)
- ③持続的血清Cr値上昇 or 尿蛋白の持続(0.5 g/day <)
- ④不整脈、心肥大を呈する

[除外基準]

- ①60歳以上
- ②コントロール不能な不整脈、心不全の存在(UCG上EF < 45%)
- ③%DLCO < 45%
- ④GFR < 40 ml/min、血清Cr 2.0 mg/dl <

図1 [CD34陽性自己末梢血幹細胞移植]

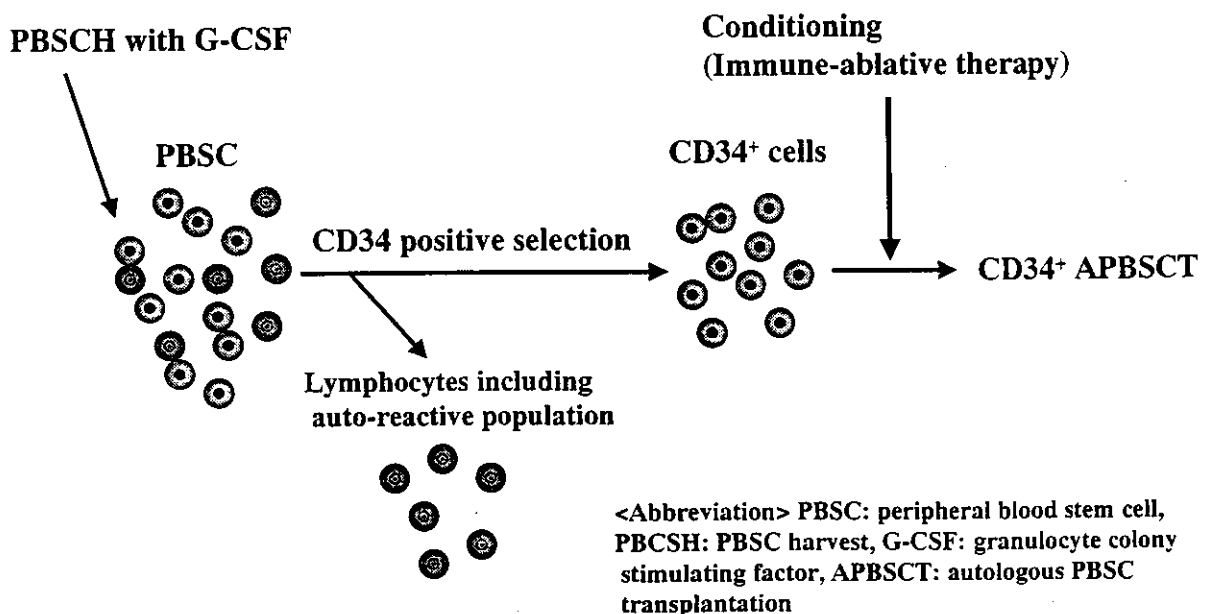
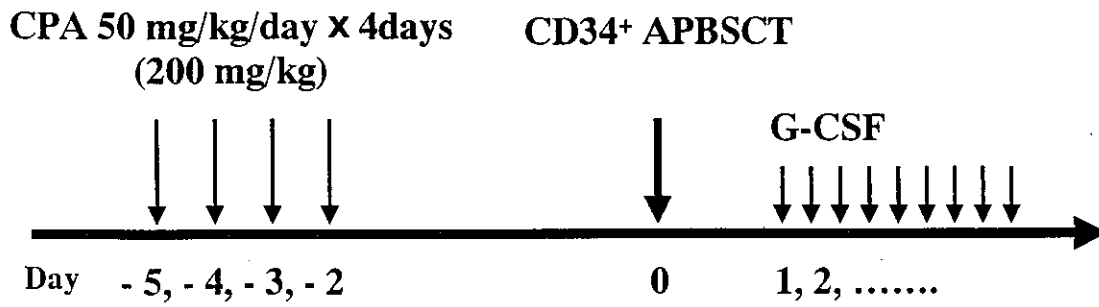


図2

[移植法]



<Abbreviation> CPA: cyclophosphamide, APBSCT: autologous peripheral blood stem cell transplantation, G-CSF: granulocyte colony stimulating factor

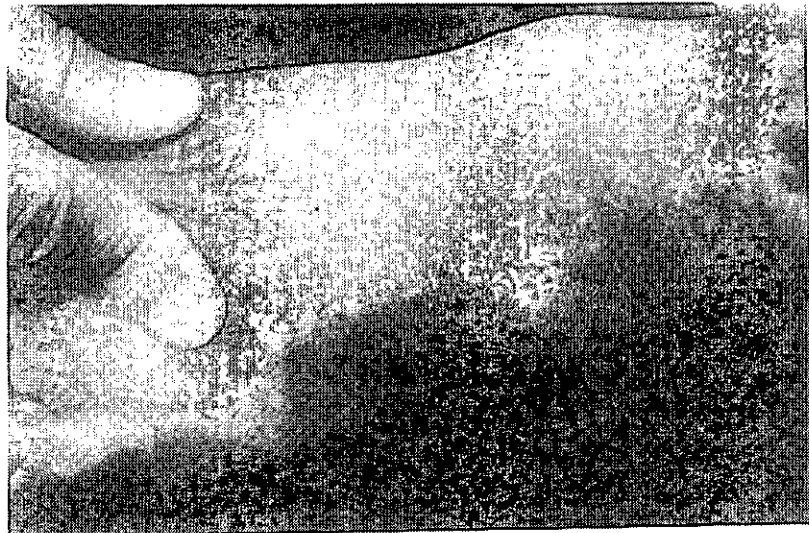


写真1

図3

[臨床経過図]

CD34⁺陽性細胞: $2.96 \times 10^6/\text{kg}$, 純度 95%
 CFU-GM: $9.50 \times 10^5/\text{kg}$

CD34⁺ APBSCT

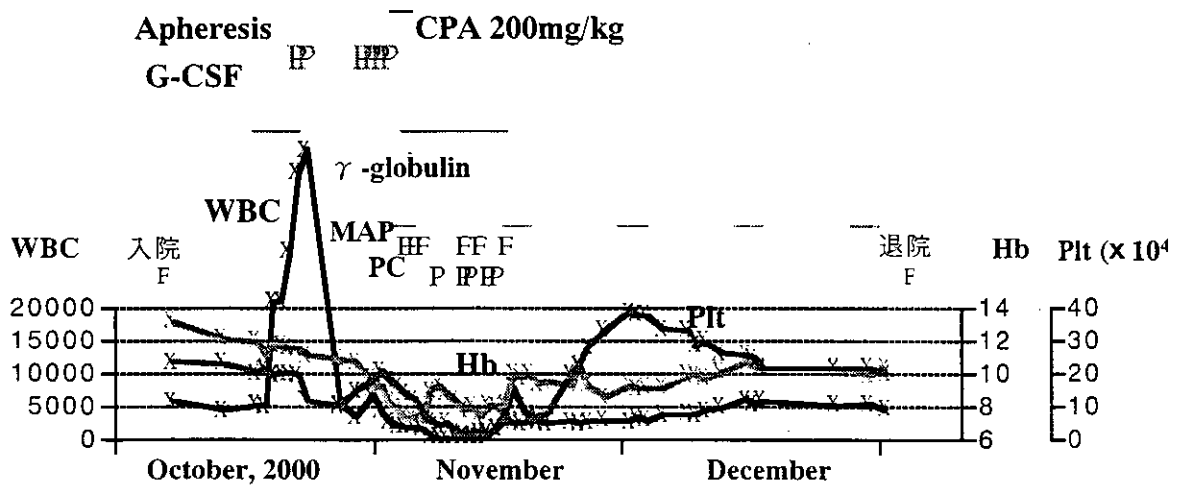


図4

[免疫学的検討1]

