

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（国立国際医療センター研究所・所長
九州大学生体防御医学研究所・教授）

研究要旨

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、血清学的に HLA-A、B、DR がマッチした移植例 800 組を新たに解析対象として加え、HLA-DNA タイピングを行った。これまでに解析が終了した 1370 組に関して、以下の結果が得られた。1) HLA-A、B が DNA レベルでマッチした症例において、DRB1、DQB1 ミスマッチは生存において有意差に到らなかった（各々 $p=0.086$ 、 0.068 ）。2) HLA-A、B が DNA レベルでマッチした症例において、DRB1、DQB1 ミスマッチは GvHD 発症に関して有意差（各々 $p=0.0001$ 、 0.0016 ）を示し、クラス II のミスマッチが 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、しばしば致命的 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 がマッチした移植例 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 レベルでのミスマッチが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 のミスマッチは有意差には到らなかったが、若干の差を認めた。HLA クラス II の DNA レベルでのミスマッチが生存および GvHD 発症におよぼす影響を解析数を増やして検討することを目的とし、本年度は新たに 800 組の HLA-DNA タイピング（HLA-DQB1）を

実施した。

B. 研究方法

HLA タイピングは DQB1 を特異的プライマーにて PCR 増幅後ダイレクトシーケンスを行いアレルを決定した。これまでにタイピングが終了した 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 ともに DNA レベルでマッチする症例を対象として、DRB1、DQB1 ミスマッチが生存および GvHD 発症に及ぼす影響を Kaplan-Meier 曲線によって検討した。

C. 研究結果

生存が追跡調査された症例のうち、HLA-A、B ともにマッチしていた症例は、計 979 例であった。このうち、DRB1 がマッチしていた症例が 790 例、ミスマッチ症例が 189 例であった（2 座ミスマッチ：21 例、1 座ミスマッチ：168 例）。Kaplan-Meier 曲線による解析では、両者の間に統計学的有意差

を認めず ($P=0.0855$) HLA-A, B がマッチしていれば、DRB1 のマッチングは生存に大きな影響を及ぼさないことが示唆された。DQB1 においては、HLA-A, B とともにマッチしていた 979 例中、マッチ症例が 741 例、ミスマッチ症例が 238 例 (2 座ミスマッチ: 27 例、1 座ミスマッチ: 211 例) であったが、Kaplan-Meier 曲線による解析では、DRB1 と同様に両者の間に統計学的有意さを認めず ($P=0.0675$)、生存に対する DQB1 マッチングの影響も否定的であった。一方、GvHD 発症については、追跡調査された症例のうち 978 例が HLA-A, B がマッチしており、DRB1 マッチ症例 793 例とミスマッチ症例 185 例 (2 座ミスマッチ: 21 例、1 座ミスマッチ: 164 例) 間の解析結果から、GvHD 発症に統計学的有意差が認められた ($P=0.0001$)。DQB1 においては、HLA-A, B とともにマッチしていた 978 例中、マッチ症例が 758 例、ミスマッチ症例が 220 例 (2 座ミスマッチ: 26 例、1 座ミスマッチ: 194 例) であり、DRB1 と同様に有意差を認めた ($P=0.0016$)。

D. 考察

これまでの解析により、生存および GvHD 発症に HLA クラス I の DNA レベルでのミスマッチが危険因子となることを明らかにした。これにより、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。欧米でのこれまでの研究では、むしろ HLA クラス II マッチングの重要性が指摘され、また、本研究班でのこれまでの解析でも、HLA クラス II の影響も弱いながら認められたため、今回、HLA クラス II のマッチングが生存および GvHD 発症に及ぼす影響を、1370 組を対象に解析した。HLA-A, B マッチ症例における解析により、DRB1, DQB1 の DNA レベルでのミスマッチが GvHD 発症に関する重要な危

険因子であることが示されたが、一方、生存においては危険因子としては同定されなかった。よって、クラス II 遺伝子のミスマッチによって誘導される GvHD がクラス I 遺伝子のミスマッチによって誘導されるそれとは、臨床診断においては同じ GvHD と診断されるものの、免疫学的な発症機序を含め質的に異なることが示唆される。

E. 結論

非血縁者間骨髄移植における HLA クラス II マッチングの影響を解析し、1) HLA-A, B が DNA レベルでマッチした症例において、DRB1, DQB1 ミスマッチは生存において有意差に到らなかった (各々 $p=0.086, 0.068$)。2) HLA-A, B が DNA レベルでマッチした症例において、DRB1, DQB1 ミスマッチは GvHD 発症に関して有意差 (各々 $p=0.0001, 0.0016$) を示し、クラス II のミスマッチが 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

Morishima Y, Sasazuki T, Inoko H, Juji T, Akaza T, Yamamoto K, Ishikawa Y, Kato S, Sao H, Sakamaki H, Kawa K, Hamajima N, Asano S, Kodera Y, for the Japan Marrow Donor Program. The clinical significance of HLA allele compatibility in patients transplanted with marrow from a serologically HLA-A, B and DR matched unrelated donor. Blood 2002 in press

Oono T, Fukui Y, Masuko S, Hashimoto O, Ueno T, Sanui T, Inayoshi A, Noda M, Sata M, Sasazuki T. Organ-specific autoimmunity in mice whose T cell repertoire is shaped by a single antigenic peptide. J. Clin. Invest., 108: 1589-1596, 2001

Fukui Y, Hashimoto O, Sanui T, Oono T, Koga H, Abe M, Inayoshi A, Noda M, Oike M, Shirai T, Sasazuki T.:

- Hematopoietic cell-specific CDM family protein DOCK2 is essential for lymphocyte migration. *Nature*. 412: 826-831, 2001
- Sakai K, Shirasawa S, Ishikawa N, Ito K, Tamai H, Kuma K, Akamizu T, Tanimura M, Furugaki K, Yamamoto K, Sasazuki T: Identification of susceptibility loci for autoimmune thyroid disease to 5q31-q33 and Hashimoto's thyroiditis to 8q23-q24 by multipoint affected sib-pair linkage analysis in Japan. *Hum. Mol. Genet.*, 10:1379-1386, 2001
- Miyoshi Y, Yamada T, Tanimura M, Taniwaki T, Arakawa K, Ohyagi Y, Furuya H, Yamamoto K, Sakai K, Sasazuki T and Kira J. A novel autosomal dominant spinocerebellar ataxia (SCA16) linked to chromosome 8q22.1-24.1. *Neurology*. 57:96-100, 2001
- Wataya H, Kamikawaji N, Nakanishi Y, Takayama K, Hara N, Sasazuki T: Quantitation of HLA-A*0201 bound tumor associated antigens on a peptide pulsed B cell line. *Hum. Immunol.*, 62:125-132, 2001
- 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.*, 46:197-206, 2001
- Habets GG, Knepper M, Sumartin J, Choi YJ, Sasazuki T, Shirasawa S, Bollag G: cDNA array analyses of K-ras-induced gene transcription. *Methods Enzymol.*, 332:245-260, 2001.
- Shirasawa S, Sasazuki T: The impact of oncogenes on tumor maintenance. *Oncogene-Directed Therapies*, in press, 2002
- Yamamoto K and Sasazuki T.: HLA and Autoimmune Thyroid Diseases. *The Genetics of complex thyroid diseases*. (T. Akamizu, M. Kasuga, TF Davies Eds. Springer-Verlag, Tokyo) 55 – 63, 2002
- Ishikawa Y, Kashiwase K, Okai M, Ogawa A, Akaza T, Morishima Y, Inoko H, Sasazuki T, Kodera Y, Juji T.: Polymorphisms in the coding region of mtDNA and effects on clinical outcome of unrelated bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 28:603-607, 2001
- Begovich AB, Moonsamy PV, Mack SJ, Barcellos LF, Steiner LL, Grams S, Suraj-Baker V, Hollenbach J, Trachtenberg E, Louie L, Zimmerman P, Hill AV, Stoneking M, Sasazuki T, Kononov VI, Sartakova ML, Titanji VP, Rickards O, Klitz W.: Genetic variability and linkage disequilibrium within the HLA-DP region: analysis of 15 different populations. *Tissue Antigens*. 57:424-439, 2001
- Marsh SG, Bodmer JG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Hansen JA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI.: Nomenclature for factors of the HLA system, 2000. *Eur J Immunogenet.*, 28:377-424, 2001
- Marsh SG, Bodmer JG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Hansen JA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki

PI.: Nomenclature for factors of the HLA system. 2000. Hum Immunol, 62:419-468, 2001

Marsh SG, Bodmer JG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Hansen JA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI.: Nomenclature for factors of the HLA system. 2000. Tissue Antigens, 57:236-283, 2001

Ota M, Katsuyama Y, Kimura A, Tsuchiya K, Kondo M, Naruse T, Mizuki N, Itoh K, Sasazuki T, Inoko H.: A second susceptibility gene for developing rheumatoid arthritis in the human MHC is localized within a 70-kb interval telomeric of the TNF genes in the HLA class III region. Genomics, 71:263-270, 2001

Takahashi M, Hashimoto H, Akizuki M, Sasazuki T, Nishikimi N, Ouchi H, Kobayashi Y, Numano F, Kimura A.: Lack of association between the Met196Arg polymorphism in the TNFR2 gene and autoimmune diseases accompanied by vasculitis including SLE in Japanese. Tissue Antigens, 57:66-69, 2001

2. 学会発表

笹月健彦 (2001 8/26-28) 発がん感受性を規定する遺伝子研究の現状. 教育講演. 第 60 回日本癌学会. 横浜.

笹月健彦 (2001 10/29-31) 免疫システムにおけるソフトとハード構築の分子機構. 第 51 回日本アレルギー学会総会. 福岡.

Ken Yamamoto, Takehiko Sasazuki and JMDP (2001, 11/1-2) HLA allele matching and clinical out come of

unrelated bone marrow transplantation. Symposium 'MHC and Transplantation' The 10th Annual Meeting of the Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics, Fukuoka

福井宣規, 笹月健彦 (2001 11/1-2) T細胞レパー トリー形成における TCR-MHC ペプチド複合体 相互作用. シンポジウム「MHC-免疫システムの 中心に据えて」第 10 回日本組織適合性学会大会. 福岡.

白澤専二, 笹月健彦 (2001 11/1-2) 自己免疫性甲 状腺疾患の疾患感受性遺伝子の同定. シンポジウ ム「多因子疾患の遺伝要因としての HLA」第 10 回日本組織適合性学会大会. 福岡.

Senji Shirasawa and Takehiko Sasazuki (2001 11/19- 20) Strategy for identification of susceptibility genes for autoimmune thyroid disease. The 1st Hakone-yama Symposium, Tokyo

Ken Yamamoto, Masayuki Aoki, Kenji Sakai and Takehiko Sasazuki (2001 11/19-20) Genome-wide scan for gastric cancer susceptibility genes. The 1st Hakone-yama Symposium, Tokyo

笹月健彦 (2001 12/9-12) 自己免疫性甲状腺炎発 症関連遺伝子の探索. シンポジウム「Common Disease の原因遺伝子と分子病態」第 24 回日本 分子生物学界年会. 横浜.

Takehiko Sasazuki and Ken Yamamoto (2001 12/14- 16) Genetic analysis of gastric cancer in Japanese population. The 6th Japan-Korea Cancer Research Workshop, Beppu

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

サイトカイン、サイトカイン受容体遺伝子多型に関する研究
分担研究者 石川善英 東京都赤十字血液センター

研究要旨

非血縁者間骨髄移植（n=100）における無病生存率、GVHD 発症率、再発率へのサイトカイン、サイトカイン受容体遺伝子多型の影響を調べた。*IL-1A*、*IL-1B*、*IL-1R*、*IL-1RA*、*IL-2*、*IL-4*、*IL-4RA*、*IL-6*、*IL-10*、*IL-12*、*IFN γ* 、*TGFB1*、*TNFA* の多型を解析した。*TNFA* (-308,-166)、*IL-6* (-175,+565)、*IL-10* (-1082,-819,-590)は遺伝子頻度の偏りが大きいため移植成績への解析は行わなかった。その他の遺伝子多型につき、ドナータイプ、患者タイプの影響を解析した結果、以下のような有意な差が認められた。*IL-1B*(-511C)ホモ接合の患者、*IL-1R*(1970C)ホモ接合ドナーからの移植では *IL-1B*(-511T)、*IL-1R*(1970C/T)を持つ群に比べ III 度以上の GVHD 発症率が低かった。再発率は *IL-1RA*(11100C)、*IL-4*(-590T,-33T)、*IFN γ* (5644A)ホモ接合のドナーからの移植では有意に低く、*IL-4RA*(1902A)ホモ接合のドナーからの移植では高値であった。

A.研究目的

骨髄移植の成績は HLA 抗原の適合度に強く影響されることが明らかとなっているが、抗原不適合の許容度が症例により異なることから、免疫反応の個体差の関与が考えられる。免疫反応はサイトカインにより調節されており、サイトカイン、サイトカイン受容体遺伝子の多型により産生量、感受性が異なることが報告されている。我々も非血縁者間骨髄移植において *TNFA*、*TNFR2* 遺伝子の多型が GVHD 発症率、再発率に関連することをすでに報告している。今回さらに *TNFA* を含め 13 種類のサイトカイン、サイトカイン受容体遺伝子の 22 種類の SNPs を解析し、これらの多型の移植成績への影響

を調べた。

B.研究方法

HLA-A, -B, -DRB1 アリル適合移植 100 症例を対象とした。13th International Histocompatibility Workshop Cytokine Polymorphism Component 用 PCR-SSCP typing Kit を用い、以下の多型を解析した。

IL-1A (-889C/T), *IL-1B* (-511C/T, 3962C/T), *IL-1R* (1970C/T), *IL-1RA* (11100C/T), *IL-4RA* (1902A/G), *IL-12* (-1188A/C), *IFN γ* (5644A/T), *TGFB1* (869C/T, 915C/G), *TNFA* (-238A/G, -308A/G), *IL-2* (-330G/T, -166G/T), *IL-4* (-1098G/T, -590C/T, -33C/T), *IL-6* (-

174C/G, 565A/G), *IL-10* (-1082A/G, -819C/T, -590A/C)。また *IL-10* の多型は PCR-SSOP 法を用い、合計 410 移植ペアについて解析を行った。

C. 研究結果

表 1 に各多型解析の結果を示した。*IL-6* には多型は検出されなかった。*TGFBI*(869C)、*IL-2*(330G)、*IL-10*(819T)の頻度はドナー群に比べ患者群で有意に低い値となった。しかし *IL-10* を 410 移植ペアまで調べたところ遺伝子頻度にドナー群と患者群で有意差は認められなかったことから、*TGFBI*、*IL-2* の遺伝子頻度についてもさらに検体数を増やして確認する必要がある。

各多型の無病生存率、GVHD (grade III-IV)発症率、再発率への影響を Kaplan-Meier 法により比較した。多型の移植成績への影響の比較は以下の組み合わせについて、ドナータイプ、患者タイプそれぞれについて行った。*IL-1A* (C vs T/C,T), *IL-1B* (C vs C/T,T ; C,C/T vs T), *IL-1R* (C vs C/T, T), *IL-1RA* (C vs C/T, T), *IL4RA* (A vs A/G, G), *IL12* (A vs A/C,C ; A, A/C vs C), *IFN γ* (A vs A/T), *TGFBI* (CG vs CG/TG,TG ; CG, CG/TG vs TG), *IL-2* (-330 G vs G/T, T), *IL-4* (TTT vs others)。 *TNFA*, *IL-6*, *IL-10* は遺伝子頻度の偏りが大きいため移植成績への影響の解析は行わなかった。

移植成績への影響に有意差の認められた多型を表 2 に示した。*IL-1B* (-511C) を持つ患者群は *IL-1B* (-511T) を持つ患者群に比べ GVHD 発症率は低値であった。また *IL-1R* (1970C) をホモ接合で持つドナ

ーから HLA 適合移植を受けた患者 32 例では重篤な急性 GVHD は 1 例も起きていなかった。再発率には *IL-1RA*、*IL-4*、*IL-4RA*、*IFN γ* 遺伝子の多型が有意な影響を示した。*IL-1RA* (11100C) をホモ接合、*IL-4* (-590T, -33T) をホモ接合、*IFN γ* (5644A) をホモ接合で持つドナーからの移植では再発率は低く、*IL-4RA* (1902A) をホモ接合で持つドナーからの移植では高値であった。

D. 考察

サイトカイン、サイトカイン受容体遺伝子の多型により免疫反応の個体差が生じていると考えられている。我々もすでに *TNFA*、*TNFR2* 遺伝子の多型が非血縁者間骨髄移植において、GVHD 発症率、再発率に影響することを報告している。今回さらに 12 種類のサイトカイン、サイトカイン受容体遺伝子の多型の移植成績への影響を解析した。

これまでに *IL-10* の多型が GVHD 発症率に影響することが報告されているが、日本人の *IL-10* 遺伝子の多型はその頻度が低発現型に偏っているため、その影響を確認することはできなかった。

今回調べたサイトカイン、サイトカイン受容体遺伝子の内、*IL-1B*、*IL-1R*、*IL-1RA*、*IL-4*、*IL-4RA*、*IFN γ* 遺伝子の多型の移植成績への影響が認められた。*IL-1B* (-511T, 3962T) は *IL-1 β* 産生量が高く、GVHD 発症率を高めると報告されており、今回の結果と一致している。今回調べたその他の多型の移植成績への影響は明らかとなっていない。また、サイトカイン遺伝子多型の影響はそのほとん

どが GVHD 発症率についての解析である。今回の解析ですでに報告した TNFA、TNFR 遺伝子多型だけでなく、サイトカイン、サイトカイン受容体遺伝子多型が GVHD 発症率のみならず、再発率にも影響することが示唆された。

E. 結論

サイトカイン、サイトカイン受容体遺伝子の多型が GVHD 発症率、再発率に影響することが示唆された。これらの現象を確認することは移植ドナーの選択、移植予後の推測、患者毎の治療方針の決定に重要と思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1 論文発表

1. Ishikawa Y, Kashiwase K, Okai M, Ogawa A, Akaza T, Morishima Y, Inoko H, Sasazuki T, Kodera Y and Juji T. Polymorphisms in the coding region of mtDNA and effects on clinical outcome of unrelated bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplantation 28, 603-607, 2001.

2. Ishikawa Y, Kashiwase K, Akaza T, Morishima Y, Inoko H, Sasazuki T, Kodera Y and Juji T. Polymorphisms in TNFA and TNFR2 affect outcome of unrelated bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplantation. in press.

2. 学会発表

1. 坂内誠、柏瀬貢一、田中秀則、石川善英、赤座達也、十字猛夫：日本人集団を対象とした HLA-A, B, DRB1 の血清学レベル SSOP 法と、イントロン変異による誤判定. 第 10 回 日本組織適合性学会.

2. 田中秀則、明坂珠生、清水まり恵、柏瀬貢一、石川善英、池田孝子、加藤道、生田満、赤座達也、高橋朋子、三上俊郎、十字猛夫：Exon4 に塩基置換が認められた HLA-B バリエント抗原について. 第 10 回 日本組織適合性学会.

3. 柏瀬貢一、石川善英、赤座達也、十字猛夫：TNF α 、TNFR2 遺伝子多型の移植への影響. 第 10 回 日本組織適合性学会.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1. サイトカイン、サイトカイン受容体遺伝子の多型頻度

IL1A -889	IL1B -511	3962		IL1R 1970	IL1RA 11100
D R	D R	D R	D R	D R	D R
C 77 74	C 25 29	C 93 89	C 32 34	C 43 36	
C/T 21 24	C/T 49 48	C/T 7 11	C/T 55 51	C/T 45 47	
T 2 2	T 26 23	T	T 13 15	T 12 17	
total 100 100	100 100	100 100	100 100	100 100	
IL2 -330-166	IL4 -1098-590-33	IL4RA 1902	IL6 -174+565	IL10 -1082-819-590	
D R	D R	D R	D R	D R	
GG 22 8	TTT 42 36	A 72 74	GG 98 98	ACC 12 2	
GG/TT 29 33	TTT/TCC 27 35	A/G 25 22		ACC/ATA 29 34	
GG/TG 12 9	TTT/GCC 8 7	G 3 4		ATA 50 53	
TG 3 9	TCC 5 9			ATA/GCC 5 8	
TG/TT 9 15	TCC/GCC 2 4			GCC/ACC 4 3	
TT 14 22	TTT/TTC 1 0				
	GCC/TTC 0 1				
total 89 96	85 91	100 100	98 98	100 100	
IL12 -1188	G-IFN 5644	TGFB1 Co10&25	TNFA -308-238		
D R	D R	D R	D R		
A 18 20	A 81 78	CG 37 19	GG 99 97		
A/C 36 42	A/T 16 20	CG/TG 41 51	GG/AG 1 1		
C 21 24	T 3 2	TG 22 30	GG/GA 0 2		
total 75 86	100 100	100 100	100 100		

表2. 移植成績への影響

Polymorphism	Genotype*	Outcome	N	%	
IL-1B(-511)	Recipient-C	%GVHD	76	12.6	p<0.05
	Recipient-T		22	25.2	
IL-1R(1970)	Donor-C	%GVHD	32	0	p<0.025
	Donor-C/T		67	24.2	
IL-1RA(11100)	Donor-C	%relapse	35	31	p<0.05
	Donor-C/T		33	37.4	
IL-4(-590, -33)	Donor-T,T	%relapse	33	16	p<0.025
	Donor-others		33	41.8	
IL-4RA(1902)	Donor-A	%relapse	56	41.4	p<0.05
	Donor-A/G		21	11.4	
IFNr(5644)	Donor-A	%relapse	80	11	p<0.01
	Donor-A/T		19	38.1	

*C/T: C/T or T, A/G: A/G or G, A/T: A/T or T

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

研究報告書

DNAチップを用いた高分解能レベルのHLA-DNAタイピング法の開発に関する研究

研究者 猪子 英俊 東海大学医学部 分子生命科学系 教授

研究要旨

臓器移植や骨髄移植の臨床検査ならびに研究分野において、ヒト主要組織適合抗原複合体であるHLA抗原の実用的な高分解能DNAタイピングの確立が緊急の課題となりつつある。さらに、このalleleレベルでの適合性は、移植適合性のみならず、各個人の遺伝的多様性に応じた医療法として注目を浴びつつある。癌などに対する細胞免疫療法、ペプチドワクチン投与などにおいても、高分解能レベルの実用的なHLA-DNAタイピングの開発が急務である。そこで、本研究では、実用的簡便、短時間高分解能レベルのHLAタイピングを実施し、組織適合性、細胞免疫療法、ペプチド療法、ペプチドワクチンなどに役立てることを目的として、大量のオリゴヌクレオチドプローブについて、ハイブリダイゼーションが可能なDNAチップによるHLA-DNAタイピングの開発を行った。

A. 研究目的

臓器移植や骨髄移植の臨床検査ならびに研究分野において、ヒト主要組織適合抗原複合体であるHLA抗原の実用的な高分解能DNAタイピングの確立が緊急の課題となりつつある。さらに、このalleleレベルでの適合性は、移植適合性のみならず、各個人の遺伝的多様性に応じた医療法として注目を浴びつつある。癌などに対する細胞免疫療法、ペプチドワクチン投与などにおいても、高分解能レベルの実用的なHLA-DNAタイピングの開発が急務である。現在までに開発されているHLA-DNAタイピング法は、遺伝子増幅法であるPCR (polymerase chain reaction) 反応を利用した方法がほとんど、PCR-SSOP(sequence specific

oligonucleotide probe)、PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism)、PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism)、PCR-SBT (sequencing based typing)法などであるが、いずれも煩雑な行程を含むため、自動化には不向き、型判定が複雑、ある種のヘテロ接合体の判別が困難などの欠点が指摘されていた。特に、従来のPCR-SSOP法では、放射性同位元素を用いなければ高感度な結果が得られず、一般検査室での導入は困難であった。

しかし、PCR-SSOP法は、多数検体の同時処理能力については上述のタイピング法の中ではもっとも効率がよく、型判定ソフトなどの条件をクリアできれば、自動化へ

の行程が容易に開かれることが予想されていたことから、大量のプローブを同時に検査可能なDNAチップの出現はまさに我々の目的に合致していた。そこで、本研究では、大量のオリゴヌクレオチドプローブについて、ハイブリダイゼーションが可能なDNAチップによるHLA-DNAタイピングの開発を行い、実用的簡便、短時間高分解能レベルのHLAタイピングを実施し、組織適合性、細胞免疫療法、ペプチド療法、ペプチドワクチンなどに役立てることを目的とした。

B. 研究方法

本研究ではまず、DNAチップがHLAタイピングに応用可能か否かについて、HLA遺伝子の中でもタイピングの条件が最も確立されており、またもっとも需要の高いHLA-DRB遺伝子について検討を行った。

1. 基礎条件の検討

HLA-DRB1遺伝子をタイピングするオリゴDNAチップの検討として、以下の実験をおこなった。

1) DRB遺伝子特異的プライマーによるPCR

まず、HLA-DRB3, DRB4, DRB5 およびDRB1遺伝子の7グループに特異的に増幅する2組(4本)の蛍光標識プライマーを合成し、HLA型が既知の20種の日本人ホモ接合体DNAを用いて、PCR増幅が行われることを確認した。電気泳動で確認したところ、20本のゲノムのうち、18本は目的物

(292bp) が得られたが、2本はDNAの濃度に問題があり、産物を得られなかった。

2) DNAチップの作製

次にDRB1の7グループとDRB3, DRB4, DRB5遺伝子にそれぞれ対応した鎖長18merの、12本のプローブを作成し、日本レーザー社製の新旧2種類のアレ

イヤー「GTMASS STAMPING」を使用してポリカルボジイミドコートスライドガラス上に固定した。

3) DNAチップのハイブリダイゼーション
次の条件でハイブリダイゼーション反応を行った

n=2

ターゲット：PCR産物18本（実験2.で目的物が得られたもの全て）

ハイブリダイゼーション溶液：PCR産物／Array It UniHyb=1／4

ハイブリダイゼーション条件：42℃、120分

ポストハイブリダイゼーション洗浄：TMAC法-45℃

発色方法：HRP-TMB

4) ポストハイブリダイゼーションの条件検討

前項の実験では、とくていのプローブに誤シグナルがみられたため、ポストハイブリダイゼーション洗浄の条件を変えて比較した。

n=2

ターゲット：PCR産物4本

ハイブリダイゼーション溶液：PCR産物／Array It UniHyb=1／4

ハイブリダイゼーション条件：42℃、60分

ポストハイブリダイゼーション洗浄：

従来法

1)5×SSC, 4℃, 5min, 2times

2)TMAC洗浄液, 45℃, 20min, 2times

3)2×SSC, r.t., 5min

条件1

1)5×SSC, 4℃, 5min, 2times

2)TMAC洗浄液, 50℃, 20min, 2times

3)2×SSC, r.t., 5min

条件2

1)2×SSPE, 0.1%SDS, r.t., 10min, 2times

2)6×SSPE, 1%SDS, r.t., 10min, 2times

3)2×SSC, r.t., 5min
発色方法：HRP-TMB

その結果、新アレイヤーの方がスポット径、スポット位置共に精度が高いことが判明したため、以後の研究には新アレイヤーを用いて行うこととした。

上記の実験で得た20種のPCR産物と、プローブ固相後のガラスチップとのハイブリダイゼーションを行い、洗浄後に蛍光スキャナーにて発色像の検出を行った。発色像を目視にて3段階判定し、判定結果と既知の遺伝子型を比較したところ、正解率は50%であった。原因は、発色の際にシグナルが弱く、誤シグナルとの区別が困難であったためと考えられた。そこでプローブ固定液の濃度を2倍にし、さらにプローブにイノシンの挿入を行い、鎖長を長く設定したところ、正解率は75%(15/20)に向上した。そこで既知HLA型の日本人ヘテロ接合体DNA40種を用いて同様の実験を行ったところ、95%(38/40)の正解率が得られた。ヘテロ接合体での正解率が高かった理由としては、用いたDNAが低濃度であったことが考えられたため、今後の実験は20~40ng程度のDNAでPCR増幅を行うこととした。

2. HLA-DRB遺伝子型の高分解能タイピング

上述の検討により、条件検討については概ね良好な結果が得られたことから、日本人HLA-DRB遺伝子型をすべて網羅するプライマーの設計に取りかかった。現在DNAデータバンクに登録されているHLA-DRB1遺伝子304種、DRB3遺伝子35種、DRB4遺伝子11種、DRB5遺伝子15種の、計365種のDRB遺伝子型について、データベースよりエクソン2を中心とした塩基配列情報を収集した。この情報をもとに、全体で20組のプライマーセットを作製した後、既知

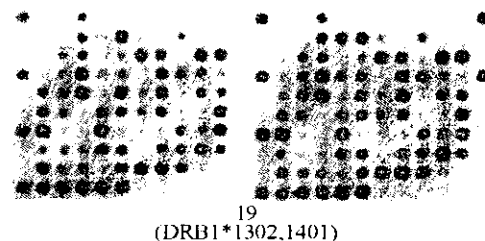
HLA-DRB遺伝子型のDNA100種を用いてプライマーの検定を行った。

その結果、14組が使用可能と判定されたため、この14組のセットに各々最適なプローブをコンピューターで検索し、DRB1遺伝子を中心に124本のプローブを設定した。設定後のプローブを合成し、ポリ-Lリジンコーティングしたスライドガラス上に3穴ずつ固定を行い、14組のプライマーセットを用いて増幅したPCR産物とのハイブリダイゼーションを行った。洗浄後のスライドガラスを蛍光スキャナーで読み取り、発色像の確認を行うと共に、有効なプローブ75本を選定し、残り49本について、鎖長の増減、イノシンの挿入などの改良を加え、最終的に103本のプローブを採用した。

これらのプローブを日本レーザーの新アレイヤーを用いて3穴ずつスポットティングし、20種の日本人ホモ接合体DNAと50種の日本人既知HLA-DRB1遺伝子型のヘテロ接合体DNAを用いてタイピングを行った。

C. 研究結果および考察

ホモ接合体では80%の正解率が得られたが、ヘテロ接合体では69%の正解率であった。この原因については、プローブごとのバックグラウンドが、当初の予想より不均一であるため、ヘテロ接合体でのバックグラウンドが重なった場合、陽性シグナルと判定されることによるものと判明した。今後はプローブごとのシグナルをコントロールして陽性シグナルと明確に区別することで自動判定が可能と考えられた。



ヘテロ接合体DNAを用いたチップの検討例。たて列左端は陽性コントロール

CR-SSOP法は、HLA DNA タイピング法として最初に試みられた方法で、国際HLAワークショップで標準法として開発された。検体よりPCR増幅されたDNAをメンブランフィルターに固定し、多型部分に相補的にデザインされた各種のプローブ(20~22塩基の合成一本鎖DNA)とハイブリダイゼーションを行い、結合の有無により判定を行う。通常、プローブは放射性同位元素³²Pにより標識を行い、プローブDNAと結合した検体DNAがX線フィルムに感光する。また、検出感度では多少劣るが、非放射性的ジゴキシゲニンなどを標識物質として用いる方法も開発されている。現在はHLAクラスI, クラスIIの両遺伝子で利用されている。本法は同一フィルター上に多数の検体DNAが固定可能で、一度に多数検体を処理できる点では優れた方法ではある。しかしすべてのHLA型を識別するためには多数のプローブを使用しなければならず、また、フィルターの洗浄操作も煩雑で、簡便であるとは言い難い。特に、死体腎移植や、脳死者からの臓器移植など、早急なドナータイピングが必要な際には不向きであると言えよう。

少数検体の操作を簡便にするために、プローブを逆にメンブランフィルターに固定し、増幅DNAを加えてハイブリダイゼーションを行うreverse dot blot法も開発されている。最近ではこの方法を応用して、メンブランストラップやマイクロプレートにプローブを固相化した、HLAタイピングキットも数社より市販されているが、その多くが海外で開発されたものであることから、日本人やアジア人に特徴的な遺伝子型については、網羅されているとは言い難い。また、こうしたキットを使用したタイピングでは、ほとんどが他法との併用でなければ高精度タイピングには至れないのが現状である。

D. 結論

本研究により我々は、DNAチップによるDRB遺伝子での大量、かつ高精度なタイピングシステムをほぼ確立するに至った。今後はさらにDQB、DQA、さらにはクラスIのA、B、C遺伝子など、他の遺伝子においても開発を重ね、すべてのHLA遺伝子を同時に検出可能にするべく、検討をおこなって行きたい。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ikewaki I, Tamauti H, Yamada A, Aoki M, Yamamoto R, Sawada A, Inoko H : A microfilament formation inhibitor, cytochalasin strongly enhances the low-affinity Fcε receptor II (CD23) expression on the human monocyte-like cell line, U937. *J Clinical Immunology* 20 : 424-433, 2001.
- 2) Deguchi R, Takagi A, Kawata H, Inoko H, Miwa T: Association between CabA+ Helicobacter pylori infection and p53, BAX and TGFβ-RII gene mutations in gastric cancer patients. *International J Cancer* 91 : 481-485, 2001.
- 3) Sugimura K, Ota M, Matsuzawa J, Katsuyama Y, Ishizuka K, Mochizuki T, Mizuki N, Seki S, Honma T, Inoko H, Asakura H: A close relationship of triplet polymorphism in MHC class I chain-related gene A (MICA) to the disease susceptibility and behavior in ulcerative colitis. *Tissue Antigens* 57 : 9-14, 2001.
- 4) Ota M, Katsuyama Y, Kimura A, Tsuchiya K, Kondo M, Naruse T, Mizuki N, Sasazuki T, Inoko H : A second susceptibility gene for developing rheumatoid arthritis in the human MHC is localized within a 70 kb interval telomeric of the TNF genes in the HLA class III region. *Genomics* 71 : 263-270, 2001.
- 5) Mizuki N, Yabuki K, Ota M, Verity D, Katsuyama Y, Ando H, Onari K, Goto K, Imagawa Y, Mandnat W, Fayyad F, Stanford M, Ohno S, Inoko H : Microsatellite mapping of a susceptible locus within the HLA region for Behcet's disease using Jordanian patients. *Hum Immunol* 62 : 186-

190, 2001.

- 6) Shiina T, Ando A, Suto Y, Kasai , Shigenari A, Takishima N, Kikkawa E, Iwata K, Kuwano Y, Kitamura Y, Matsuzawa Y, Sano K, Nogami M, Kawata H, Li S, Fukuzumi Y, Yamazaki M, Tashiro H, Tamiya G, Kohda A, Okumura K, Ikemura T, Soeda E, Mizuki N, Kimura M, Bahram S, Inoko H : Genomic anatomy of a premier Major Histocompatibility Complex paralogous region on chromosome 1q21-22. *Genome Research* 11 : 789-802, 2001.
- 7) Matsuzaka K, Makino S, Nakajima K, Tomizawa M, Oka A, Bahram S, Kulski JK, Tamiya G, Inoko H : New microsatellite markers in the human MHC class III region. *Tissue Antigens* 57 : 397-404, 2001.
- 8) Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Yabuki K, Ando H, Yoshida M, Katsuhiko O, Nikbin B, Davatchi F, Chams H, Ghaderi AA, Ohno S, Inoko H : HLA class I genotyping including HLA-B*51 allele typing in the Iranian patients with Behcet's disease. *Tissue Antigens* 57 : 457-462, 2001.
- 9) Gasper JA, Shiina T, Inoko H, Edwards SV : Songbirds genomics: Analysis of 45 kb upstream of a polymorphic Mhc class II gene in red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). *Genomics* 75: 26-34, 2001.
- 10) Ando A, Kawata H, Murakami T, Shigenari A, Shiina T, Sada M, Tsuji T, Toriu A, Nakanishi Y, Mitsuhashi T, Sekikawa K, Inoko H : cDNA cloning and genetic polymorphism of the swine major histocompatibility complex (SLA) class II DMA gene. *Anim Genet.* 32 :73-77, 2001.
- 11) Holland LZ, Rached LA, Tamme R, Holland ND, Inoko H, Shiina T, Burgdorf C, Lardelli M : Characterization and developmental expression of the amphioxus homolog of Notch (AmphiNotch): evolutionary conservation of multiple expression domains in amphioxus and vertebrates. *Dev Biol.* 232 :493-507, 2001.
- 12) Obuchi N, Takahashi M, Nouchi T, Satoh M, Arimura T, Ueda K, Akai J, Ota M, Naruse T, Inoko H, Numano F, Kimura A : Identification of MICA alleles with a long Leu-repeat in the transmembrane region and no cytoplasmic tail due to a frameshift-deletion in exon 4. *Tissue Antigens* 57 : 520-535, 2001.
- 13) Arai T, Yoshida K, Kaburaki J, Inoko H, Ikeda Y, Kawakami Y, Kuwana M : Autoreactive CD4(+) T-cell clones to beta(2)-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome: preferential recognition of the major phospholipid-binding site. *Blood.* 98 :1889-1896., 2001.
- 14) Kulski JK, Martinez P, Longman-Jacobsen N, Wang W, Williamson J, Dawkins RL, Shiina T, Naruse T, Inoko H : The association between HLA-A alleles and an Alu dimorphism near HLA-G. *J Mol Evol.* 53 :114-123, 2001.
- 15) Tsuda TT, Tsuda M, Naruse T, kaata H, Ando A, Shiina T, Fukuda M, Kurita M, KeMaho I, Kuliski JK, Inoko H: Phylogenetic analysis of penguin (Spheniscidae) species based on sequence variation in MHC class II gene. *Immunogenetics* 53 : 712-716, 2001.
- 16) Taniguchi Y, Sato M, Tanaka O, Sekiguchi M, InokoH, Kimura M : HOXD3 regulates expression of JAGGED1, a ligand for Notch receptors. *Nuclei Acids Reserach Supplement No.1* : 43-44, 2001.
- 17) Taniuchi Y, Suzuki H, Ohtsuka M, Kikuchi N, Kimura M, Inoko H : Isolation and characteriation of three gemnes paralogus to mouse Ring3. *Nuclei Acids Reserach Supplement No.1* : 247-248, 2001.
- 18) Seki SS, Sugimura K, Ota M, Matsuzawa J, Katsuyama Y, Ishizuka K, Mochizuki T, Suzuki K, Yomeyama Y, Mizuki N, Honma T, Inoko H, Asakura H: A stratification analysis of MICA triplet repeat polymorphisms and HLA-antigens associated with ulcerative colitis. *Tissue Antigens* 58 : 71-76, 2001.
- 19) Sano K, Yabuki Y, Imagawa Y, Shiina T, Mizuku N, Ohno S, KulskinJK, Inoko H : The absence of disease-specific polymorphisms within the HLA-B51 gene taht is teh susceptible locus for Behcet's disease. *Tissue Antigens* 58 : 77-82, 2001.
- 20) Romphruk, AV, Naruse TK, Romphruk

A, Kawata T, Pauapairoj, Kulski JK, Leelayuwat, Inoko H : Diversity of MICA (PERB11.1) and HLA haplotypes in Northeastern Thais. *Tissue Antigens* 58 : 83-89, 2001.

21) Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Yabuki K, Ando H, Shiina T, Nomura E, Onari K, Ohno S, Inoko H. HLA-B*51 allele analysis by the PCR-SBT method and a strong association of HLA-B*5101 with Japanese patients with Behcet's disease. *Tissue Antigens* 58 :181-184, 2001.

22) Kulski JK, Dunn DS, Gaudieri S, Shiina T, Inoko H : Genomic and phylogenetic analysis of the human CD1 and HLA class I multicopy genes. *J Mol Evol.* 53 :642-650, 2001.

23) Ishikawa Y, Kashiwase K, Okai M, Ogawa A, Akaza T, Morishima Y, Inoko H, Sasazuki T, Kodera Y, Juji T.

Polymorphisms in the coding region of mtDNA and effects on clinical outcome of unrelated bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 28 :603-607, 2001.

2. 学会発表

1) 河田寿子、中島舞子、吉川枝里、成瀬妙子、猪子英俊.リアルタイムPCR産物自動検出機と蛍光標識プローブを用いた

DNA middle-high resolution typing法の検討. 第10回日本組織適合性学会大会. 2001年11月. 福岡.

2) 吉川枝里、中島舞子、河田寿子、成瀬妙子、猪子英俊. LongReadTowerTM SystemとABI PRISM 377 を用いた SBT法の比較. 第10回日本組織適合性学会大会. 2001年11月. 福岡.

3) 邵文碩、安波道郎、高橋めぐみ、柴田宏樹、太田正穂、勝山善彦、猪子英俊、浜口和之、坂田利家、木村彰方. 1型糖尿病 (IDDM)の易罹患性に寄与するHLA領域遺伝子の解析. 第10回日本組織適合性学会大会. 2001年11月. 福岡.

4) 松澤由美子、佐野和美、今川由香利、矢吹和朗、椎名隆、成瀬妙子、猪子英俊.

HLA-B遺伝子全領域に関する新しいゲノムシーケンシング解析法の確立. 第10回日本組織適合性学会大会. 2001年11月. 福岡.

5) 橋本奈美、勝山善彦、椎名隆、金子剛久、吉川枝里、成瀬妙子、太田正穂、猪子英俊. HLAクラスIおよびクラスIII領域における日本人ハプロタイプのゲノムシーケンシング解析-1: 遺伝子領域 433kbのPCR増幅とシーケンシング. 第10回日本組織適合性学会大会. 2001年11月. 福岡.

6) 勝山善彦、太田正穂、橋本奈美、椎名隆、金子剛久、吉川枝里、成瀬妙子、大森榮、福島弘文、猪子英俊. HLAクラスIおよびクラスIII領域における日本人ハプロタイプのゲノムシーケンシング解析-2: 遺伝子領域内のSNP解析. 第10回日本組織適合性学会大会. 2001年11月. 福岡.

7) 中島舞子、吉川枝里、太田正穂、勝山善彦、木村彰方、松森昭、篠山重威、成瀬妙子、猪子英俊. 抗HCV抗体陽性心筋症のHLA遺伝子解析. 第10回日本組織適合性学会大会. 2001年11月. 福岡.

8) 佐藤昌子、屋部登志雄、成瀬妙子、植木純一、柏瀬貢一、田中秀則、大橋順、十字猛夫、猪子英俊、花岡一雄、徳永勝士. 帯状疱疹後神経痛とHLAクラスI, IIの関連について2001年11月. 福岡.

9) 佐野和美、椎名隆、水木信、猪子英俊. ベーチェット病におけるMICA遺伝子の解析. 第10回日本組織適合性学会大会. 2001年11月. 福岡.

10) 高橋めぐみ、柴田宏樹、安波道郎、木村彰方、太田正穂、勝山善彦、猪子英俊. HLAに連鎖した高安動脈炎感受性遺伝子領域のマッピング. 第10回日本組織適合性学会大会. 2001年11月. 福岡.

11) 岡本浩一、岡晃、牧野悟士、松坂恭成、馬淵智生、辻ひとみ、細井美沙、長塚由美枝、田宮元、猪子英俊. ゲノムワイド相関解析による尋常性乾癬感受性遺伝子の検索. 第24回日本分子生物学会年会. 2001

年12月. 横浜.

12) 牧野悟士、岡本浩一、林英樹、藤本慶、遠藤高帆、伝田晃弘、徳保江里子、佐藤理恵、多加喜アスミ、長塚由美枝、今西規、五條堀孝、岡晃、田宮元、猪子英俊.
ゲノムワイドなマイクロサテライトマーカーの設定. 第24回日本分子生物学会年会.
2001年12月. 横浜.

13) 井原征治、田中秀則、成瀬妙子、竹腰正隆、前田史子、坂本朋昭、猪子英俊.
HLA-B51 抗体特異的組み換えヒトFab抗体の分離と解析. 第24回日本分子生物学会年会.
2001年12月. 横浜.

IV, テーマー 3

造血細胞移植対象疾患の拡張

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（秋田大学医学部第三内科 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の法の有効性ならびに安全性を検討した。現在までに全身性強皮症患者 3 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した。移植後、比較的早期より皮膚症状の改善が確認された。しかしながら、感染症、出血性膀胱炎等の治療合併症を認め、何らかの治療を要した。免疫学的には一定の傾向は認められず皮膚症状の改善とは必ずしも平行しなかった。今後、症例の蓄積による治療の標準化が望まれるとともに、病態への影響および長期予後の評価が必要である。

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試み、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した。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した。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た。さらに当院医の倫理委員会判定委員会の承認を得た。

当科で適応症例となった 3 例の概要を示した(表 1)。いずれも発症 3 年以内の強皮症

で高度の皮膚硬化を認め、さまざまな治療歴を有していた。

2. 治療法

Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) 単独もしくは、Cyclophosphamide (CPA) $2 \text{ g/m}^2 \times 2$ 日間投与後 G-CSF 併用で末梢血中へ血液幹細胞を動員(mobilization)、採取を行った。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した。同時に CD34 純化を行わない末梢血幹細胞を back up 用として凍結保存した。CPA 200 mg/kg を 4 日間に分けて投与し移植前処置を行った。この際、出血性膀胱炎予防のため Mesna を併用した。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した。

A. 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した。

C. 研究結果

1. 臨床症状

移植前後の理学所見および血清学的変化を含めた経過を示した(表 2、図 1、2)。いずれの症例も造血能の回復は速やかであった。抗核抗体および抗 Scl-70 抗体については、症例間に一定の傾向は認められなかった。皮膚所見については、3 症例ともに modified Rodnan total thickness skin score (mRodnan TSS) で 25% 以上の改善を認め、modified Health Assessment Questionnaire (mHAQ) についても症例 3 を除いて著明な改善を認めた。症例 3 については、移植後、全身状態の悪化のため、mHAQ の悪化を認めた。皮膚所見の改善と血清学的変化は必ずしも平行しないことが示唆された。

2. 安全性に関する検討

前述のプロトコールで mobilization を施行し、3 症例ともに十分量の CD34 陽性細胞が

採取され、移植後の造血能回復は速やかであった。移植後、全症例でサイトメガロウイルス抗原血症を認め、ガンシクロビルによる加療を行った。症例 2 については、移植後に血球貪食症候群の合併を認め、移植後 7 ヶ月後には自己免疫機序によると考えられる血小板減少を来した。症例 3 については、移植後、貧血を伴う出血性膀胱炎、心膜炎、心嚢液貯留による心機能低下、骨髄抑制を認め、最終的に自己末梢血幹細胞非選択移植を必要とし、長期入院を余儀なくされている。

3. 免疫学的検討

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、当科症例も同様の経過を示した。特に CD4 陽性細胞の回復は遷延する傾向にあった。上述の如く血清学的変化は、症例によりさまざまで同療法の病態に対する影響は不明であり、今後、症例の蓄積による解明が望まれる。

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 らによる報告が最初であり、2000 年の EBMT/EULAR (European League Against Rheumatism and European Group for Blood and

Marrow Transplantation)の報告によれば、約70%の症例で skin score で25%以上の改善が認められている。皮膚病変の著明な改善に比して臓器合併症への治療効果は確立しておらず、長期経過観察が必要である。また、強皮症においては、17%と報告されている高い治療関連死が問題として挙げられ、適応除外基準、移植前処置も含めて更なる検討が必要である。

病態改善の機序は現時点では不明である。当初、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たが、最近では有効性の機序は免疫システムの“調節”にあるものと考えられている。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療法の標準的治療の確立が望まれる。

E. 結論

全身性強皮症3症例に自己末梢血純化CD34陽性細胞移植併用超大量免疫抑制療法を施行した。いずれの症例も短期的には皮膚所見の改善を認めているが、臓器合併症への効果および長期予後については不明で

ある。うち1症例で貧血を伴う出血性膀胱炎、心膜炎、骨髄抑制等、重篤な治療合併症を認め、自己末梢血幹細胞非選択移植を施行した。自己免疫疾患に対する本療法は慎重に検討されるべきであり、今後、症例の蓄積による適応除外基準、移植前処置の標準化が望まれる。

F. 健康危険情報

治療期間中、感染性と思われる発熱、ウイルス感染によると思われる出血性膀胱炎、血球貪食症候群、心膜炎、骨髄抑制等を認めた。抗生剤、抗ウイルス剤等の使用により加療可能であったが、1症例で自己末梢血幹細胞非選択移植を必要とした。いずれの症状も造血能回復とともに軽快傾向を示した。

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. Bertlaccini, M.L., Atsumi, T., Lanchbury, J. Sc aliz, A.R., Katsumata, K., Vaughan, R.W., Kondeatis, E., Kamashta, M.A., Koike, T., Hughes, 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
3. Kondo, T., Higashi, H., Nishizawa, H., Ishikawa, S., Ashizawa, S., Yamada, M., Makita, Z., Koike, T., Hatakeyama, M.: Involvement of pRB-related p107 protein in inhibition of S phase progression in response to genotoxic stress. *J Biol Chem* 2001. 276:20. 17559-17567.

4. Kobayashi, K., Mastuura, E., Liu, Q., Furukawa, J., Kaihara, K., Inagaki, J., Astumi, T., Sakairi, N., Yasuda, T., Voelker, R.D., Koike, T.: A specific ligand for β 2-glycoprotein I mediates autoantibody-dependent uptake of oxidized low density lipoprotein by macrophages. *J Lipid Research*. 2001.42. 697-709.
5. T., Astumi, M.B. Bertolaccini, T., Koike. : Genetics of antiphospholipid syndrome. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 2001.27:3. 565-572.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）
特になし

2. 学会発表(招待講演)

1. Koike, T. : "Oxidative mechanism in atherogenesis." European Atherosclerosis Society Workshop on the Immune System in Atherosclerosis, Geneva, Switzerland, March, 8~11, 2001.
2. Koike, T. : "Valine/Leucine²⁴⁷ polymorphism of β 2-glycoprotein I and prevalence of antiphospholipid syndrome." The 6th International lupus conference, Barcelona, Spain, March, 24~28, 2001.
3. Koike, T. : "Laboratory diagnosis of antiphospholipid syndrome." The Congress of the International League Associations for Rheumatology (ILAR), Edmonton, Canada, August, 26~30, 2001.
4. Koike, T. : "Valine/Leucine²⁴⁷ polymorphism of β 2-glycoprotein I and prevalence of antiphospholipid syndrome." The 7th international workshop on autoantibodies and autoimmunity, Awajisland, Japan, September, 26~29, 2001.