

抗原が同定されているが、これらの mHa 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。MHa に関する解析は、すでに20年以上前より行われているが、未知の mHa に対する CTL クローンの同定は容易ではなく、これまで造血幹細胞移植における組織適合性については、HLA と限られた mHa のみが散発的に調べられていた。

本研究では、ゲノムワイドな組織適合遺伝子の検索法として、我々が設定した約 30,000 個の多型マイクロサテライトマーカーを遺伝マーカーとして用いたマッピング法により、全染色体レベルで造血幹細胞移植の組織適合に関与する遺伝子を系統的に同定することを試み、現在までに日本骨髄バンクを通じて施行された、非血縁者間骨髄移植のうち、HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ 適合の 321 組を選出した。これら全てについて解析を行う予定であるが、本年度においては、その中から DNA サンプルの入手が可能であった 100 組について、HLA 遺伝子領域に設定されたマイクロサテライトマーカーを用いて、ドナーとレシピエントのマーカー一致率と、急性 GVHD の重症度との関係を解析した。

その結果、今回の解析においては、9種のマイクロサテライトマーカーは急性 GVHD の各グレードにおいて、ほぼ同様の一致率を示し、マーカー多型の一致率と急性 GVHD 度による差はみられなかった。

各マーカーごとの一致率は、HLA-DQ 近傍

の DQCAR, HLA-B 近傍の MICA, MIB など、HLA 遺伝子との距離に近い程、一致率も高値を示しており、このことは適合度の高い遺伝子周辺ではマイクロサテライトの一致率が高く、これらのマイクロサテライトが、未知の組織適合遺伝子の一致、不一致を検索するのに有用であることを示したといえよう。

非血縁者間移植、特に造血幹細胞移植における急性 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 mHa の早急な解析が必須と考えられる。

これらの事項を踏まえ、現在、未知の組織適合遺伝子検索のモデルケースとして、第 22 番染色体についても解析を行っている。今後は、約 30,000 個の多型マイクロサテライト領域についてゲノムマッピングを行い、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、組織適合遺伝子の候補領域を約 100kb に絞り込み、領域内に存在する遺伝子について多型解析を行い、候補遺伝子の同定を行う予定である。

E. 結論

非血縁者間骨髄移植のうち、HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ 適合の 100 組について、HLA 遺伝子領域に設定されたマイクロサテライトマーカーを用いて、ドナーとレシピエントのマーカー一致率と、急性 GVHD の重症度との関係を解析したところ、9種各マーカーごとの一致率は、HLA-DQ 近傍の DQCAR, HLA-B 近傍の MICA, MIB など、HLA 遺伝子との距離が

近い程、一致率も高値を示しており、適合度の高い遺伝子周辺ではマイクロサテライトの一致率が高く、これらのマイクロサテライトが、未知の組織適合遺伝子の一致、不一致を検索するのに有用であることを示した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Suemizu H, Radosavljevic M, Kimura M, Sadahiro S, Yoshimura S, Bahrama S, Inoko H: A basolateral sorting motif in the MICA cytoplasmic tail. Proc Natl Acad Sci USA 99 : 2971-2976, 2002.
2. Abi-Rached L, Gilles A, Shiina T, Pontarotti P, Inoko H: Evidence of en bloc duplication in vertebrate genomes. Nature Genetics 31 : 100-105, 2002.
3. Ishikawa Y, Kashiwase K, Akaza T, Morishima Y, Inoko H, Sasazuki T, Kodera Y, Juji T : Polymorphisms in TNFA and TNFR2 affect outcome of unrelated bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant. 29 : 569-557, 2002.
4. 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 : The clinical significance of human leukocyte antigen (HLA) allele compatibility in patients receiving a marrow transplant from serologically HLA-A, HLA-B, and HLA-DR matched unrelated donors. Blood. 11: 4200-4206, 2002.
5. Naruse TK, Kawata H, Inoko H, Isshiki K, Yamano K, Hino M, Tatsumi N: The HLA-DOB gene displays limited polymorphism with only one amino acid substitution. Tissue Antigens 59:

512-519, 2002.

6. 吉川枝里、中島舞子、河田寿子、李素雲、成瀬妙子、猪子英俊: Gene Kit sequencing Assay (VISIBLE 社)と Sequencing based typing Kit (Applied Biosystems)法の比較検討、MHC、9 : 78-83, 2002
7. 岡本浩一、猪子英俊: マイクロサテライトマーカー、医学のあゆみ、200:1254-1255, 2002.
8. 岡本浩一、田宮元、猪子英俊: マイクロサテライトの性質と遺伝的マーカーとしての有用性 -ゲノムワイド相関解析による疾患感受性遺伝子の同定を目指して-、ゲノム医学、2: 1254-1255, 2002.
9. 杉田法久、猪子英俊: 膠原病の遺伝的素因究明は進んだか、総合臨床、51:2112-2115, 2002.
10. 岡本浩一、猪子英俊: マイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイドな遺伝的相関解析。医学のあゆみ、202:769-773, 2002.

2. 学会発表

1. Inoko H: HLA to human genome diversities: Genomewide scan of disease genes by association analysis using microsatellites, Plenary session in the 16th European Histocompatibility Conference EFI Meeting, 2002
2. Naruse T K, Ota M, Katsuyama Y, Nakashima M, Kikkawa E, Sugita N, Kimura A, Matsumori A, Sasayama S, Inoko H. Susceptible gene mapping of hepatitis C virus positive cardiomyopathy using microsatellite markers and SNPs within the HLA region. 13th International histocompatibility conference. 2002.
3. Nakashima M, Kikkawa E, Ota M, Katsuyama Y,

Shichi D, Kimura A, Matsumori A, Sasayama S, Naruse T K, Inoko H. HLA and hepatitis C virus positive cardiomyopathy. 13th International histocompatibility conference. 2002.

4. Kikkawa E, Kawata H, Nakashima M, Naruse T K, Inoko H. Simple and rapid HLA-DRB1 and DQB1 SSP genotyping using the 2 color dyes fluorescence simulataneous detection system. 13th International histocompatibility conference. 2002.

5. Matsuzawa Y, samo K, Shiina T, Naruse T K, Inoko H. Development of a novel method for genome sequencing of the entire HLA-B gene. 13th International histocompatibility conference. 2002.

6. 成瀬妙子、志知大輔、中島舞子、吉川枝里、太田正穂、勝山善彦、木村彰方、松森昭、猪子英俊. C型肝炎ウイルスに起因する心筋症の疾患感受性遺伝子マッピング. 第11回日本組織適合性学会. 2002年

7. 末水洋志、Radosavljevic M、木村 穰、貞廣 荘太郎、吉村真一、猪子英俊. MICA 遺伝子産物 (MICA 蛋白)の細胞内局在の解析. 第11回日本組織適合性学会. 2002年

8. 杉田法久、佐藤昌子、安西達也、太田正穂、馬淵智生、小澤 明、屋部登志雄、石川善英、花岡一雄、徳永勝士、成瀬妙子、猪子英俊. 帯状疱疹後神経痛(PHN)における疾患感受性遺伝子解析. 第11回日本組織適合性学会. 2002年

9. 中島舞子、吉川枝里、河田寿子、成瀬妙子 猪子英俊. 2色蛍光同時検出系を用いた HLA クラス II 高精度 DNA タイピング TaqMan 法の開発. 第11回日本組織適合性学会. 2002年

10. 牧野悟士、岡 晃、遠藤 高帆、岡本浩一、藤本 慶、林 英樹、生田智樹、伝田晃弘、今西

規、五條堀 孝、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25回日本分子生物学会. 2002年

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

サイトカイン遺伝子多型の非血縁者間骨髄移植成績への影響に関する研究

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

IL-1A、*IL-1B*、*IL-1RA*、*IL-2*、*IL-4*、*IL-4RA*、*IL-6*、*IL-10*、*IL-12*、*IFN γ* 、*TGFB1*、*TNFA* 遺伝子多型を解析し、非血縁者間骨髄移植（n=197）における GVHD 発症率、再発率への影響を調べた。*IL-6*、*IL-10*の多型は移植成績への影響が報告されているが、日本人では多型に乏しく、その影響は明らかにならなかった。ドナーが *IL-1A*(-889T)、*IL-1RA*(1110C)、*IFN γ* (5644A) を持つ群、患者が *IL-1RA*(1110C)、*IL-4RA*(1902A)、*IL-12*(-1188A) を持つ群では重篤な GVHD 発症率は低値であった。さらに再発率はドナー *IL-12*(-1188A)、*IL-1RA*(1110C) を持つ群で低値を示した。これらの多型とサイトカイン産生量、受容体の感受性との関係を明らかにし、遺伝子多型と成績の因果関係をさらに確認する必要があるが、これらの変異をドナー選択あるいは移植前後の regimen に生かすことにより、移植成績の向上が図れると考えられた。

A.研究目的

骨髄移植における GVHD の重症度、再発率には HLA 適合度だけでなく免疫反応の個体差が影響していると考えられる。いくつかのサイトカインは、遺伝子の多型により産生量が異なること、またサイトカイン遺伝子の多型と免疫疾患との関連、移植成績への影響が報告されている。したがって、ドナー選択において、サイトカイン遺伝子および受容体遺伝子の多型の組み合わせにより、より GVHD を発症しにくく、再発も抑制できる移植が可能になると考えられる。あるいは遺伝子多型の組み合わせから GVHD 発症、再発の可能性の程度があらかじめ予測できれば、移植前後の治療計画に

生かすことができる。昨年度、13種類のサイトカインの遺伝子多型を同時に解析する PCR-SSP 法を用い、100 症例の非血縁者間骨髄移植における GVHD 発症率、再発率への影響を報告した。本年度さらに症例数を増やし、サイトカイン遺伝子多型の影響の確認を試みた。

B.研究方法

1994年4月から1998年4月までに JMDP を通して移植が行われた、*HLA-A*、*-B*、*-DRB1*アレル適合移植症例 197 例を対象とした（表 1）。13th International Histocompatibility Workshop Cytokine Polymorphism Component 用 PCR-SSP

Kit を用い、*IL-1A*、*IL-1B*、*IL-1RA*、*IL-1R*、*IL-2*、*IL-4*、*IL-4R α* 、*IL-6*、*IL-10*、*IL-12*、*IFN γ* 、*TGFB1*、*TNFA* 遺伝子の多型（表 2 参照）を調べた。多型の移植への影響は Kaplan-Meier 法および一般化ウィルコクソン検定により解析した。

C. 研究結果

表 2 に各サイトカイン遺伝子のアレル頻度を示した。すべての遺伝子多型の頻度はドナー群と患者群で有意な差は認められなかった。*IL-6*(-174G)、*IL-10*(-1082G)、*TNFA*(-308A)はそれぞれ産生量を増加させる変異であるが、日本人では多型に乏しく、その影響の解析は行わなかった。

ドナー群および患者群毎に、各サイトカイン遺伝子多型の III 度以上の GVHD 発症率および再発率への影響を解析し、有意差の認められた多型を表 3 に示した。いずれの遺伝子多型も移植後生存率への有意な影響は認められなかった。病態、病期、HLA-Cw 適合度が再発率、GVHD 発症率に影響する可能性があるため、これらの因子に偏りのある群間の比較では、病期が進行している High Risk (HR) 群を除いた解析、あるいは HLA-Cw も適合した群での解析を行い、有意差の認められた多型のみを示した。ドナーが *IL-1A*(-889T)、*IL-1RA*(1110C)、*IFN γ* (5644A)を持つ群、患者が *IL-1RA*(1110C)、*IL-4RA*(1902A)、*IL-12*(-1188A)を持つ群では重篤な GVHD 発症率は低値であった。またドナーが *IL-12*(-1188C)を持つ群は再発率が低値であった。

IL-1RA のドナー型と再発率の解析において、HR 群を含めた解析ではドナーが 1110T を持つ場合、有意に再発率が高かった

($p < 0.05$)。HR 群を除いた解析では有意差はなくなったが、HR 群、それ以外の群を詳細に比較すると、いずれの群でも 1110T を持つ場合に再発率は高値であった。したがって、HR 群を除いた解析でその影響が有意でなくなったのは、症例数が減少したためであって、ドナーの *IL-1RA*(1110T)は再発率を高めると考えられた。

D. 考察

約 200 症例の非血縁者間骨髄移植の成績を解析した結果、*IL-1A*(-889C/T)、*IL-1RA*(1110C/T)、*IL-4R α* (1902A/G)、*IL-12*(-1188A/C)、*IFN γ* (5644A/T)の移植成績への有意な影響が認められた。今回解析した *TNFA* の -308、-238 の多型は日本人ではアレル頻度の偏りが大きくその影響は明らかとはならなかったが、さらに上流の -1031、-863、-857 の多型は日本人の骨髄移植成績に優位な影響を与えることはすでに報告した。炎症性のサイトカインである *IFN γ* は 5644T が high producer だと報告されており、ドナーがこのタイプを持った群の方が重篤な GVHD 発症率が高い原因は *IFN γ* 産生量が高いためと考えられる。しかし、同様に炎症性サイトカインと呼ばれる *IL-1A* では high producer だとされる -889T をドナーが持つ群の方が GVHD 発症率は低値であった。

移植成績に影響が認められたその他のサイトカイン遺伝子の多型と機能との関係は不明である。したがって遺伝子多型が移植成績に影響を与える機構を説明するのは現在のところ困難であるが、これらの知見はドナー選択、あるいは pre-/post-transplantation regimen に生か

すことにより、移植成績の向上を図れるものと考えられる。特に *IL-1RA* の 1110T→C の変異は GVHD 発症率を低下させるとともに、再発率も抑える可能性がある。

昨年度 100 症例を対象に解析した結果と今回さらに症例数を 197 症例に増やして解析した結果とは必ずしも一致しなかった。臨床に応用可能な結果を得るためには、統計学的手法による解析ではなるべく多くの症例を対象とすること、さらに因果関係が説明できる必要がある。今回有意差の認められたサイトカイン、サイトカイン受容体遺伝子多型と機能との関係を明らかにすることが重要と考えられた。

E. 結論

サイトカイン、サイトカイン受容体遺伝子の多型を選択することにより、移植成績を向上できる可能性が示唆された。遺伝子多型とサイトカイン産生量、受容体機能との関係を明らかにすることにより、これらの遺伝子多型はドナー選択、移植前後の患者の処方計画に有用な情報になると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishikawa Y, Kashiwase K, Akaza T, Morishima Y, Inoko H, Sasazuki T, Kodera Y, Juji T. Polymorphisms in TNFA and TNFR2 affect outcome of unrelated bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. 29: 569-575, 2002.
2. 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.: The clinical significance of human leukocyte antigen (HLA) allele compatibility in patients receiving a marrow transplant from serologically HLA-A, HLA-B, and HLA-DR matched unrelated donors. *Blood*. 99: 4200-4206, 2002.

3. Sato M, Ohashi J, Tsuchiya N, Kashiwase K, Ishikawa Y, Arita H, Hanaoka K, Tokunaga K, Yabe T.: Association of HLA-A*3303-B*4403-DRB1*1302 haplotype, but not of TNFA promoter and NKp30 polymorphism, with postherpetic neuralgia (PHN) in the Japanese population. *Genes Immun*. 3:477-481, 2002.

2. 学会発表

1. 石川善英、柏瀬貢一、十字猛夫：サイトカイン、サイトカイン受容体遺伝子多型の非血縁者間骨髄移植への影響：第 11 回日本組織適合性学会総会（2002 年、川越）
2. 柏瀬貢一、峯元睦子、安波道郎、石川善英、津久井和夫、木村彰方、神谷昌弓、香取美津治、佐竹正博：白血病患者において HLA 領域にハプロタイプとして LOH が検出された症例：第 25 回日本造血細胞移植学会総会（2002 年、大阪）
3. Ishikawa Y, Kashiwase K, Akaza T, Morishima Y, Inoko H, Sasazuki T, Kodera Y, Juji T.: Polymorphisms in

- TNFA and TNFR2 affect outcome of unrelated bone marrow transplantation.: 13th International Histocompatibility workshop and conference (2002, Seattle)
4. Tanaka H, Teraki K, Saruwatari A, Isa K, Shimizu M, Kashiwase K, Ishikawa Y, Akaza T, Juji T, Satake M.: Three serologically identified HLA-B22 variant antigens encoded by HLA-B*5402, -B*5510 and -B*5605 in the Japanese population.: 13th International Histocompatibility workshop and conference (2002, Seattle)
5. Yabe T, Kawamura S, Sato M, Kashiwase K, Tanaka H, Asao Y, Oyama J, Tsuruta K, Tokunaga K, Juji T, Ishikawa Y.: A novel HLA class I deficient subject has a homozygous tapasin gene deletion.: 13th International Histocompatibility workshop and conference (2002, Seattle)

表 1. 対象とした移植症例(197 例)

CML	60		
ALL	50		
ANLL	49	Standard Risk	82
MDS	10	High Risk	83
SAA	17		
others	11		

表2. サイトカイン遺伝子のアリル頻度

Gene	多型	頻度	Gene	多型	頻度
IL1A	-889	C		+1902	A
		T			G
		n=387			n=388
IL1B	-511	C		-174, +565	GG
		T			CG/GA/CA
	+3962	C			0
		n=388			n=383
IL1R	pst1 970	C		-1082, -819, -592	ATA
		T			ACC
		n=388			n=386
IL1RA	msp1 1110	C		-1188	C
		T			
		n=388			n=343
IL2	-330, +166	TT		UTR5644	A
		GG			T
		TG			
		n=367			n=383
IL4	-1098, -590, -33	TTT		codon 10, 25	CG
		TCC			TG
		GCC			
		TTC			
		n=358			n=386
IL4RA				-308, -238	GG
					AG
					GA
		n=388			n=388

表3. サイトカイン遺伝子多型の移植成績への影響

Group	Outcome		n	Incidence
dIL1A=CC	GVHD	p < 0.05	135	18.8%
dIL1A=C/T			32	14.4%
dIL1RA=CC	GVHD	p < 0.001	83	16.7%
dIL1RA=C/T			111	19.9%
rIL1RA=CC	GVHD	p < 0.01	70	15.6%
rIL1RA=C/T			120	18.4%
rIL4RA=AA	GVHD	p < 0.025	146	13.0%
rIL4RA=G/A			45	36.8%
dIL12=A/C	Relapse	p < 0.025	96	33.8%
dIL12=CC			37	18.8%
rIL12=A/C	GVHD	p < 0.005	125	17.2%
rIL12=CC			49	30.3%
dIFNr=AA	GVHD	p < 0.025	156	15.0%
dIFNr=A/T			37	34.4%

d: donor-type, r: recipient-type

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

マイナー抗原 HA-8 の非血縁者間骨髄移植成績への影響

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

マイナー抗原 HA-8 不適合の影響を、HLA-A、-B、-DRB1 アリル適合移植 277 症例を対象に調べた。全症例を対象とした解析では、HA-8 不適合による GVHD 発症率の増加は認められなかった。HA-8 は HLA-A*0201 拘束性であるため、HLA-A*0201 陽性の HLA 適合移植群で解析したところ、症例数が少なく、有意差ではないが GVHD 方向の不適合により GVHD 発症率が増加する傾向が見られた。しかし Rejection 方向の不適合でも同じように GVHD 発症率が増加する傾向が見られ、HA-8 不適合以外の影響も否定できなかった。再発率には GVHD 方向、拒絶方向不適合とも差は認められなかった。無病生存率は GVHD 方向不適合群、適合群、Rejection 方向不適合群の順に低下し、Rejection 方向不適合群に比べ GVHD 方向不適合群では有意に高い生存率を示した。HA-8 の移植成績への影響はこれまで考えられているマイナー抗原の反応では説明できず、今回の現象を説明するためには新たな機構が必要と考えられた。

A.研究目的

マイナー抗原 HA-8 は HLA 適合同胞から骨髄移植を受けた患者から誘導された細胞傷害性 T 細胞が認識するペプチドとして同定された。拘束分子は HLA-A*0201 であり、HA-8 ペプチドは 1 アミノ酸の違いにより、アルギニン(R)タイプは A*0201 分子に提示されるが、プロリン(P)タイプは提示されない。つまり、移植において R タイプは P タイプにとって iso 抗原となる。すでに詳しく研究されている、やはり iso-マイナー抗原である HA-1 は移植成績への明らかな影響はないようであるが、HA-1 の発現が血液系細胞に限られるのに対し、HA-8 は広い範囲で発現されている。したがって HA-8 不

適合は抗原として認識されやすく、誘導された細胞傷害性 T 細胞が重要な臓器を攻撃する重篤な GVHD の原因となり得ると考えられる。そこで HA-8 不適合の移植成績への影響を解析した。

B.研究方法

1994年2月から1997年12月までにJMMPを通して移植された HLA-A、-B、-DRB1 アリル適合症例 277 例を対象とした。HA-8 のタイピングは gDNA を用い、PCR-SSP 法により行った。プライマー 8AS : 5'-ggg caa cag tta tgg a-3'および 8P : 5'-gtc agc aga tca ccc-3'あるいは 8R : 5'-gtc agc aga tca ccg-3'との組み合わせで PCR 増幅(95℃、

30sec → 51℃、30sec → 72℃、30sec × 30cycles)によるバンドの有無でPタイプ、Rタイプを判定した。またPCR反応確認のための内部標準として、RH遺伝子用プライマー(5'-cct aaa tct cgt ctg ctt cc-3', 5'-cct cta tga ccc aga agt ga-3')を用いた。移植成績への影響は、カプラン-マイヤー法および一般化ウィルコクソン検定により解析した。

C.研究結果

HA-8のアリル頻度は277症例を対象とした解析では、ドナー群では、P=0.64、R=0.36、患者群ではP=0.58、R=0.42、であり、ドナー群でPタイプ頻度が高値であったが、この差は症例数を増すことにより減少した。HA-8はHLA-A*0201拘束性マイナー抗原として報告されている。表1にHLAアリル適合移植のうち、HLA-A*0201を持つ症例のみを抽出して解析した結果を示した。症例数が少なく、いずれも有意差ではないが、GVHD方向不適合群でGVHD発症率が高い傾向が見られた。しかしRejection方向不適合群でもGVHD発症率が高い傾向にあり、GVHD発症がHA-8不適合によるものとは考えにくい。

表2に今回解析したHLAアリル適合移植全体でのHA-8の影響を示した。HA-8適合群とGVHD方向不適合群間(P→R移植)で再発率に有意差が認められた。GVHD方向不適合群では適合群に比べ病期が進行しているHigh Risk症例の比率が高いことが影響していると考えられる。

図1にHA-8適合群、GVHD方向不適合群、Rejection方向不適合群(R→P移植)の無病生存率曲線を示した。GVHD方向不適合

群に比べ、Rejection方向不適合群では無病生存率は有意に低値であった。有意ではないが、GVHD方向不適合群は適合群より成績がよく、Rejection方向不適合群は大きく低下していた。これらの群間で病態、病期、HLA-Cw不適合度には有意な差はなかった。

D.考察

マイナー抗原HA-8はiso抗原となり、広い組織に発現していることから、その不適合はGVHD発症の原因になり得ると考え、移植成績への影響を解析した。拘束分子であるHLA-A*0201陽性の症例数が少ないため、結論にはならないが、A*0201陽性の移植においてもHA-8不適合はGVHD発症にあまり強い影響は与えないとの印象を得た。HA-8不適合が最も強く影響を示したのは、HLAを選択せずに解析した無病生存率であった。しかもGVHD方向不適合群では適合群と同程度あるいはそれ以上に好成績であるのに対し、Rejection方向不適合群では明らかに成績が低下した。我々は血小板抗原HPA-5の移植成績への影響を解析し、類似の現象をすでに報告している。HPA-5不適合の症例数が少なく、GVHD方向不適合とRejection方向不適合を分けてその影響を比較することはできなかったが、HPA-5a/b不適合はGVHD発症率への影響は小さいにもかかわらず、無病生存率を有意に低下させた。HPA-5a/bで異なるアミノ酸を含むペプチドの拘束分子はA*2402あるいはB*5201と推定されたため、このHLA分子を発現している樹状細胞に合成ペプチドをまぶし、細胞傷害性T細胞の樹立を繰り返し試みたが、樹立にはいたらなかった。一方、HPA-5不一致間のMLRで

は有意な反応が認められている。
 これまでにマイナー抗原或いは多型分子に対する細胞傷害性 T 細胞が誘導され、GVHD 発症の原因になるという仮定に基づき、移植成績への影響が研究されている。しかし症例数が少ない、あるいは症例数が多くても抗原性の確認がとれていないなど、明らかな影響は報告されていない。HPA-5 不適合、HA-8 不適合の移植後生存率への影響はマイナー抗原による GVHD 発症では説明できない。HLA クラス II 分子、CD4 陽性 T 細胞も含めた機構の解析が必要と考えられた。

E. 結論

マイナー抗原 HA-8 不適合はその拘束分子である HLA-A*0201 を持つ移植への影響は症例数が少なかったため明らかとはならなかったが、移植症例全体では、移植後生存率に有意な影響が認められた。GVHD 方向不適合では適合群と同程度かそれ以上の生存率であったのに対し、Rejectoin 方向不適合の場合、移植後生存率が有意に低下した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishikawa Y, Kashiwase K, Akaza T, Morishima Y, Inoko H, Sasazuki T, Kodera Y, Juji T. Polymorphisms in TNFA and TNFR2 affect outcome of unrelated bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. 29: 569-575, 2002.
2. 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.: The clinical significance of human leukocyte antigen (HLA) allele compatibility in patients receiving a marrow transplant from serologically HLA-A, HLA-B, and HLA-DR matched unrelated donors. *Blood*. 99: 4200-4206, 2002.

3. Sato M, Ohashi J, Tsuchiya N, Kashiwase K, Ishikawa Y, Arita H, Hanaoka K, Tokunaga K, Yabe T.: Association of HLA-A*3303-B*4403-DRB1*1302 haplotype, but not of TNFA promoter and NKp30 polymorphism, with postherpetic neuralgia (PHN) in the Japanese population. *Genes Immun*. 3:477-481, 2002.

2. 学会発表

1. 石川善英、柏瀬貢一、十字猛夫：サイトカイン、サイトカイン受容体遺伝子多型の非血縁者間骨髄移植への影響：第 11 回日本組織適合性学会総会（2002 年、川越）
2. 柏瀬貢一、峯元睦子、安波道郎、石川善英、津久井和夫、木村彰方、神谷昌弓、香取美津治、佐竹正博：白血病患者において HLA 領域にハプロタイプとして LOH が検出された症例：第 25 回日本造血細胞移植学会総会（2002 年、大阪）
3. Ishikawa Y, Kashiwase K, Akaza T, Morishima Y, Inoko H, Sasazuki T, Kodera Y, Juji T.: Polymorphisms in

TNFA and TNFR2 affect outcome of unrelated bone marrow transplantation.: 13th International Histocompatibility workshop and conference (2002, Seattle)

4. Tanaka H, Teraki K, Saruwatari A, Isa K, Shimizu M, Kashiwase K, Ishikawa Y, Akaza T, Juji T, Satake M.: Three serologically identified HLA-B22 variant antigens encoded by HLA-B*5402, -B*5510 and -B*5605 in the Japanese population.: 13th International Histocompatibility workshop and

conference (2002, Seattle)

5. Yabe T, Kawamura S, Sato M, Kashiwase K, Tanaka H, Asao Y, Oyama J, Tsuruta K, Tokunaga K, Juji T, Ishikawa Y.: A novel HLA class I deficient subject has a homozygous tapasin gene deletion.: 13th International Histocompatibility workshop and conference (2002, Seattle)

表1 HA-8 の HLA-A*0201 陽性群への影響

HA-8		χ^2	n	Outcome
match	DFS	1.35	32	43.0%
mismatch(GVHD)		NS	10	35.0%
match	GVHD	0.69	30	13.2%
mismatch(GVHD)		NS	10	28.9%
match	Relapse	0.76	23	18.0%
mismatch(GVHD)		NS	5	0.0%
match	DFS	0.90	32	43.0%
mismatch(Rejection)		NS	10	20.0%
match	GVHD	0.23	30	13.2%
mismatch(Rejection)		NS	10	31.4%
match	Relapse	0.48	23	18.0%
mismatch(Rejection)		NS	8	33.3%

DFS: disease free survival, NS: not significant

表2 HA-8の移植成績への影響

HA-8		χ^2	n	Outcome
match	DFS	1.00	150	53.0%
mismatch(GVHD)		NS	77	49.5%
match	GVHD	0.34	146	20.7%
mismatch(GVHD)		NS	75	11.0%
match	Relapse	2.07	115	19.3%
mismatch(GVHD)		$p < 0.05$	51	50.7%
match	DFS	1.58	150	53.0%
mismatch(Rejectoin)		NS	50	36.8%
match	GVHD	1.24	146	20.7%
mismatch(Rejectoin)		NS	49	13.1%
match	Relapse	1.15	115	19.3%
mismatch(Rejectoin)		NS	38	35.4%

DFS: disease free survival, NS: not significant

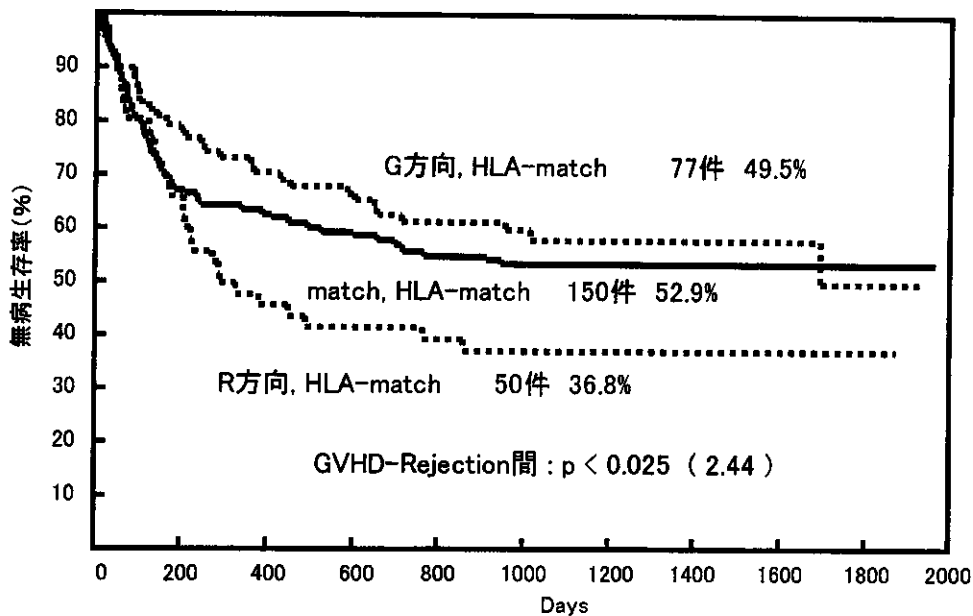


図1 HA-8不適合の無病生存率への影響

NK 受容体 KIR の移植成績への関与

分担研究者 屋部登志雄、石川善英 東京都赤十字血液センター

研究要旨 日本骨髄バンク (JMPD) を介した非血縁者間骨髄移植において患者、ドナー間の HLA 抗原不適合が移植成績に大きな影響を及ぼすことが示されている。HLA クラス I 抗原を認識する受容体のうち NK 細胞及び T 細胞の一部に発現する KIR (Killer Cell Ig-like Receptor) の骨髄移植における役割を解明するために、KIR エピトープ不一致 122 症例について患者、ドナーの KIR 遺伝子 14 種類の有無を PCR-SSP 法により調べた。各 KIR の遺伝子頻度及びその組み合わせである KIR プロファイルは患者、ドナー間で大きな差はなかった。患者、ドナー間の KIR プロファイル適合性と移植成績の関係では、不一致ペアでは完全一致ペアに比べ、重度急性 GVHD 頻度が高い傾向が見られた。GVHD が高率となる GVHD 方向エピトープ不一致症例において、特異性既知の抑制型 KIR 遺伝子の有無とそのリガンドエピトープ間でのミスマッチ症例は見られず、KIR Genotype ではなく、各 NK 細胞表面の KIR 分子発現レパートリー (Phenotype) が発症に関与していることが考えられた。いずれの方向のエピトープミスマッチにおいても KIR 型プロファイルの不一致症例では GVHD 頻度が高くなる傾向が見られた。以上の結果より KIR エピトープ適合性に加え、KIR 遺伝子型適合性も非血縁者間骨髄移植成績に影響する可能性が示唆された。

A. 研究目的

非血縁者間骨髄移植において患者、ドナー間の HLA 抗原型適合性が移植成績に影響を及ぼすことが報告されている。HLA 抗原は抗体、T 細胞受容体に加えて NK 細胞受容体にも認識される。NK 細胞は細胞傷害性及びサイトカイン産生により免疫応答を調節し移植においても重要な役割が知られている。近年 NK 細胞受容体 KIR (Killer Cell Ig-like Receptor) ファミリー分子が HLA クラス I 抗原を認識すること、KIR 遺伝子の有無 (レパートリー) には個体差が

あること、傷害活性を抑える抑制型と増強する活性化型が存在することなどが明らかとなった。HLA-C は KIR により 2 種類 (C1,C2) に認識され (これらを KIR エピトープと呼ぶ)、患者、ドナーの KIR エピトープ適合性が骨髄移植成績に影響することが示されている。森島らは GVHD 方向 KIR エピトープミスマッチ症例で GVHD 発症が高率であることを報告しているが (本研究班)、この場合にドナー側で対応する抑制型 KIR 遺伝子 (C1 認識抑制型 KIR) が欠落するためにドナー NK 細胞が活性化

する可能性が推定される。本研究では KIR の骨髓移植への関与を明らかにするために患者、ドナーの 14 種類の KIR 遺伝子型を決定し HLA 抗原側の KIR エピトープ型と合わせて移植成績との関連を解析した。

B. 方法

KIR エピトープ (C1,C2) 不適合移植 122 症例を対象とした (表 1)。疾患の内訳は ALL(37), CML(33), ANLL(29), MDS(8), NHL(7), SAA(6), HD(2)であった。KIR 抗原遺伝子の有無は Gomez-Lozano らによる PCR-SSP 法 (Tissue Antigens 59:184, 2002) を用いて 14 種類の KIR (2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 3DS1)について解析し、KIR プロファイル型を決定した。重度 (3, 4 度) の急性 GVHD 発症率と KIR 型の相関を統計解析した。

C. 研究結果

患者、ドナーの KIR 遺伝子頻度は 2DL1, 2DL3, 2DL4, 3DL2, 3DL3 ではほぼ全員陽性であり、頻度の大きく異なるものを表 2 に示した。各抗原の患者、ドナーの頻度は患者で 2DS5 が低いこと ($P=0.025$) 以外には大きな差は見られなかった。次にこれらの KIR 遺伝子の組み合わせである KIR プロファイルを決定した。頻度が 0.02 以上のプロファイル型を表 3 に示した。患者、ドナー共に約 3 割の検体は # 1 型であった。KIR プロファイルでも患者、ドナー間での大きな差は認められなかった (# 3 が患者で低かった ($P=0.015$))。

患者ドナー間の KIR プロファイルの適合性と移植成績を調べた結果を表 4 に示した。KIR プロファイルが完全一致する場合 (一致) と、1 種類以上異なる場合 (不一致) に分類し、重症急性 GVHD 発症率との関連を見た。KIR プロファイル不一致症例では完全一致の場合に比べて GVHD 発症率が有意ではないが高い傾向が見られた。

森島らは患者ドナー間の KIR エピトープが抑制型受容体から見て GVHD 方向で不適合の場合 GVHD 発症率が有意に高いことを示したが (本研究班報告今年度及び平成 12 年度報告)、今回の 122 症例においても同様な傾向が見られた (表 5)。この GVHD 方向 KIR エピトープ不一致症例 (患者 C1C2, ドナー C1C1) でドナーの C1 認識抑制性 KIR 遺伝子 (2DL2, 2DL3) 頻度を調べると全員でいずれかが陽性であり、遺伝子型の点ではエピトープとのミスマッチ例はないことが判明した (データは示していない)。このことは今回解析した GVHD 方向エピトープ不一致症例で GVHD 発症が高いのは HLA-C 認識抑制性 KIR 遺伝子の欠如 (図 1 ドナー 1 の場合) ではなく、細胞表面における KIR 分子の発現 (Phenotype) レベルの違いが関与していることを示唆している。つまり C1C2 エピトープ型ドナーの NK 細胞は C1 抑制性 KIR、C2 抑制性 KIR 遺伝子の両者をもつが、個々の細胞レベルでは C1 抑制性 KIR 分子を表面に発現しない NK 細胞群が存在し、これが C1 エピトープ型をもつ患者細胞と遭遇した場合、KIR が認識せず抑制性シグナルが出ないために傷害性反応またはサイトカイン分泌を起こして GVHD 反応に寄与することが考えられる (図 1 ドナー

2の場合)。

D. 考察

今回は患者、ドナーの KIR 遺伝子型を解析し移植成績への影響を検討した。対象はすべて KIR エピトープ (C1、C2) の不適合症例である。個々の KIR 遺伝子頻度、組み合わせの KIR プロファイルともに患者、ドナー間での大きな差はなかったが、2DS5 及びプロファイル#3 型が患者群で低いことについてはさらに検討が必要である。GVHD 方向の C エピトープ不適合症例では C 認識抑制型遺伝子型はエピトープとの間で不一致例はなかったことから、抑制受容体の発現レベル (Phenotype) の違いによる影響が大きいと考えられた。また GVHD 方向、拒絶方向いずれの KIR エピトープ不適合の場合においても、KIR プロファイル不一致により GVHD 発症率が高まる傾向が見られた。予備的解析では GVHD を起こした症例では HLA-C の KIR エピトープ不一致に加えて HLA-A,B,DR 抗原に不一致がある場合が多く、KIR と HLA-C 抗原以外の抗原との適合性が関与する可能性がある (データは示していない)。今回は C 認識抑制型 KIR について詳細に検討したが、今後は HLA-Bw4 や HLA-A3,A11 抗原を認識する抑制型 KIR や HLA 特異性未知 KIR、活性化型 KIR も加え、白血病再発率、生存率なども含めた移植成績との検討が必要であろう。

E. 結論

患者、ドナー間での NK 細胞受容体 KIR 型の適合性が急性 GVHD 発症率に影響す

る可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1、論文発表

Yabe, T., S. Kawamura, M. Sato, J. Ohashi, K. Tokunaga, T. Juji, Y. Ishikawa. 2002. Natural killer receptor KIR gene repertoires of Japanese populations (Abstract). *Tissue Antigens*. 59: 104

2、学会発表

屋部登志雄、川村純代、佐藤昌子、大橋純、徳永勝士、十字猛夫、石川善英 Natural killer receptor KIR gene repertoires of Japanese populations、第 13 回国際組織適合性会議、シトル、米国、2002 年

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

表1 解析症例(122ペア)

ミスマッチ方向	KIRエピトープ		症例数
	患者	ドナー	
GVHD方向	C1C1	C1C2	49
	C2C2	C1C2	3
拒絶方向	C1C2	C1C1	62
	C1C2	C2C2	4
双方向	C1C1	C2C2	1
	C2C2	C1C1	3

方向は抑制型受容体から見たもの
(活性化型から見ると逆方向となる)

表2 患者、ドナーのKIR型遺伝子頻度

	n	2DL2	2DL5	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DL1	3DS1
患者	122	0.11	0.38	0.35	0.12	0.15	0.63	0.25	0.92	0.25
ドナー	122	0.12	0.46	0.45	0.12	0.12	0.65	0.38	0.91	0.33
全体	244	0.11	0.42	0.4	0.12	0.14	0.64	0.32	0.91	0.29

表3 患者、ドナーのKIRプロファイル頻度

型	2DL2	2DL5	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DL1	3DS1	患者	ドナー	計
#1	-	-	-	-	-	■	-	■	-	0.34	0.33	0.34
#2	-	-	-	-	-	-	-	■	-	0.19	0.16	0.17
#3	-	■	■	-	-	■	■	■	■	0.05	0.14	0.09
#4	-	■	■	-	-	-	■	■	■	0.07	0.07	0.07
#5	-	■	■	-	-	-	■	-	■	0.02	0.07	0.05
#6	■	-	-	■	-	■	-	■	-	0.04	0.05	0.05
#7	-	■	■	-	-	■	■	■	-	0.03	0.05	0.04
#8	-	■	■	-	■	-	■	■	■	0.04	0.02	0.03
#9	-	-	-	-	■	■	-	■	-	0.03	0.02	0.02

■ 陽性 - 陰性 * 0.02以上のみを示した

表4 KIRプロファイル型適合性と移植成績

KIR適合性	症例数	急性GVHD (III-IV)
全体	113	26.5%
KIRプロファイル型一致	32	18.8%
KIRプロファイル型不一致	81	29.6%

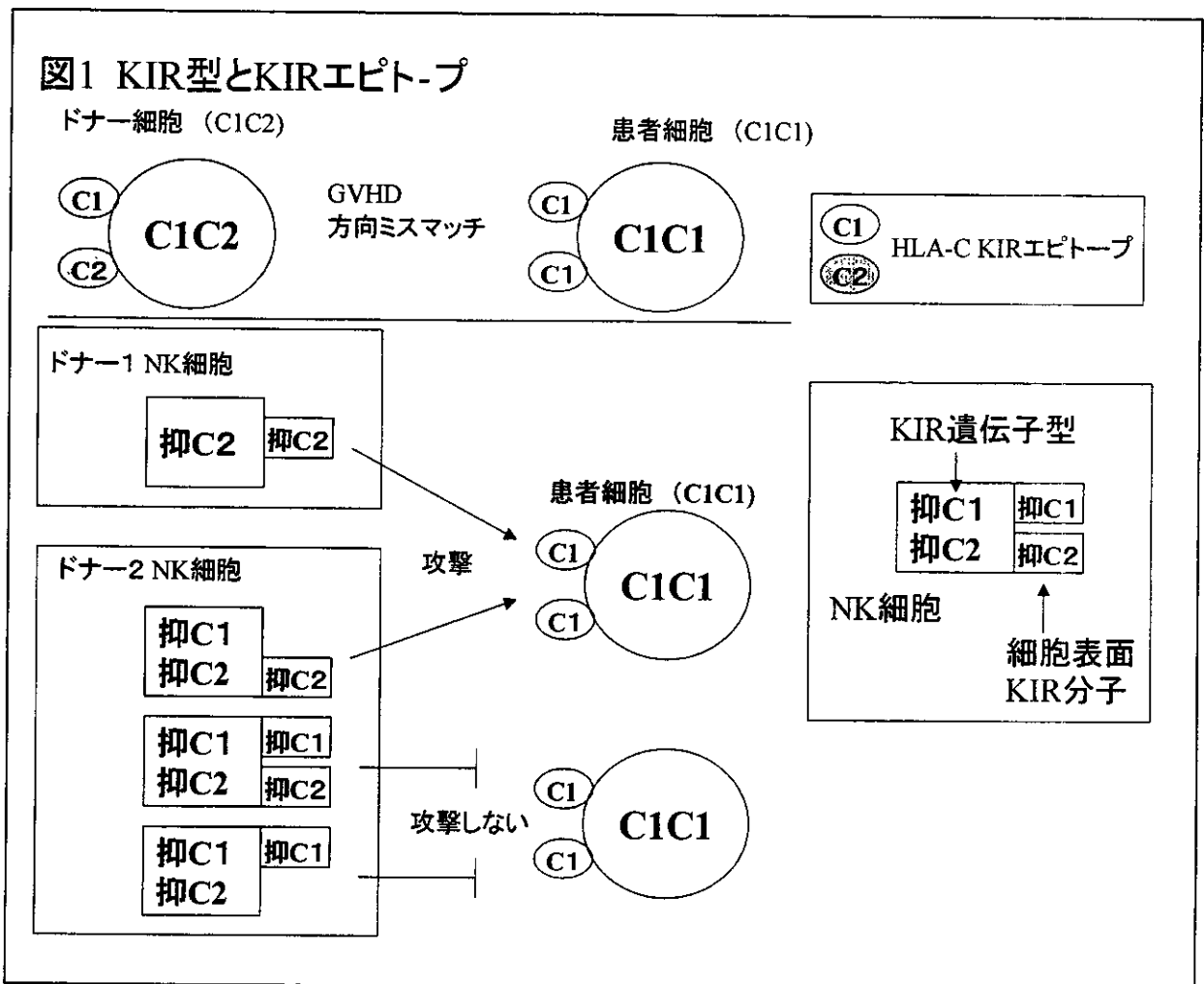
P=0.238

表5 KIRエピトープ適合性と移植成績

ミスマッチ方向	症例数	急性GVHD (III-IV)
GVHD方向	49	30.6%
拒絶方向	60	20.0%
双方向	4	75.0%

P=0.202 (GVHD方向 vs 拒絶方向)
 P=0.037 (拒絶方向 vs 双方向)
 P=0.108 (GVHD方向 vs 双方向)

方向は抑制型受容体から見たもの
(活性化型から見ると逆方向となる)



(別添6) 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍 なし
雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Morishima Y,</u> <u>Sasazuki T,</u> <u>Inoko H,</u> Juji T, Akaza T, Yamamoto K, <u>Ishikawa Y,</u> Kato S, Sao H, Sakamaki H, Kawa K, Hamajima N, Asano S, Kodera Y.	The clinical significance of human leukocyte antigen (HLA) allele compatibility in patients receiving a marrow transplant from serologically HLA-A, HLA-B, and HLA-DR matched unrelated donors.	Blood.	99(11)	4200-6.	2002
<u>Ishikawa Y,</u> Kashiwase K, Akaza T, <u>Morishima Y,</u> <u>Inoko H,</u> <u>Sasazuki T,</u> Kodera Y, Juji T.	Polymorphisms in TNFA and TNFR2 affect outcome of unrelated bone marrow transplantation.	Bone Marrow Transplant.	29(7)	569-75.	2002

20020456

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.61の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。