

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

非血縁者間骨髄移植におけるゲノムワイドなマイナー組織適合遺伝子の検索に関する研究

分担研究者 猪子 英俊 東海大学医学部基礎医学系 教授

研究要旨

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。13 種のマーカーの一致率は、HLA 遺伝子との距離が近い程、一致率も高値を示しており、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。さらに、第 22 番染色体において 100 組のうち、GVHD III, IV 度 25 組と 0 度 25 組の計 50 組について一致度を比較したところ、37 種のうち 3 種に正の相関が、また 1 種に負の相関が認められ、GVHD 発症に関わる遺伝子の存在が示唆された

A. 研究目的

造血幹細胞移植は、移植後の拒絶や重篤な GVHD (graft versus host disease) の発症を防ぐため、ドナーと患者の HLA を適合させて行われる。しかし、HLA が適合した組み合わせであっても、GVHD を発症する場合があります、その際重症度に差が見られることが報告されている。この原因として HLA 以外のマイナー組織適合性抗原 (mHA) の存在が考えられるが、これまで mHA に関する研究は散発的に行われているのみで、遺伝子座の同定や詳細な染色体上の位置は不明なものが多いのが現状である。

我々は、ヒト染色体上に我々が設定した約 30,000 個の多型マイクロサテライトマーカーを用いて、疾患感受性遺伝子マッピングを行な

血縁者間骨髄移植におけるドナーと移植患者のマイクロサテライト多型を検索し、両者で不適合が見られる遺伝子領域を特定することにより、mHA 遺伝子を同定することを試みている。今回は第 6 番および 22 番染色体について報告する。

B. 研究方法

日本骨髄バンクを介して施行された非血縁者間骨髄移植について、HLA-A,-B,-C,-DR,-DQ 一致の白血病患者とドナー 321 組を選出した。このうち、DNA サンプルの入手が容易であった 100 組 (200 例) について、急性 GVHD 0 度～IV 度に分類した。IV 度については 8 組のみで

あつたため、III 度の 17 組と合わせて 25 組とし、0, I, II 度それぞれを 25 組ずつの 4 群とした。方法は、第 6 番染色体 HLA 遺伝子領域に存在する 13 種、および第 22 番染色体長腕 13.0Mb から 23.0Mb に存在する 37 種の多型マイクロサテライトマーカーを用いて、個々のマーカーにおける患者とドナーの繰り返し数を検出後、患者、ドナー間での繰り返し数の差異を検討し、統計学的解析を行なった。

(倫理面への配慮)

本研究の実施にあたっては、東海大医の倫理委員会において審議の結果、承認をえた上で実施され、試料提供者やその家族について、倫理上の配慮が十分なされた上で行われた。

C. 研究結果

第 6 番染色体 HLA 遺伝子領域に設定された 13 種の多型マイクロサテライトの、ドナーとレシピエントの一致率を比較したところ、急性 GVHD 0 度～IV 度の各群において、多型マーカーの一致率における差はみられなかった。

各マーカーごとの一致率の比較では、クラス II 領域に位置するマイクロサテライト DQCAR では、急性 GVHD 度に関係なく、一致率 92%～100%と、高値を示したが、クラス I 領域のテロメア方向に位置する C3-2-11 では、32%～56%と一致率は低かった(図 1)。

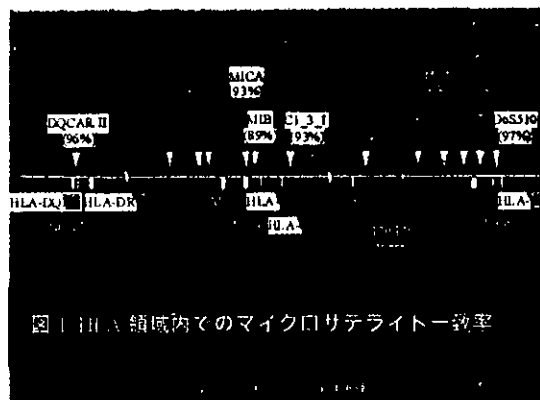


図 1 HLA 領域内でのマイクロサテライト一致率

このようにそれぞれのマーカーにおいて 46%～97%の一致率を示したが、HLA 遺伝子との距離が短いマーカーほど一致率が高値を示し、マイクロサテライトマーカーが遺伝子多型の一一致、不一致を検索する上で有用な指標となりうることを示した。

第 22 番染色体においては 100 組のうち、GVHD III, IV 度 25 組と 0 度 25 組の計 50 組について一致度を比較したところ、37 種のうち 3 種に正の相関が、また 1 種に負の相関が認められた(図 2)。

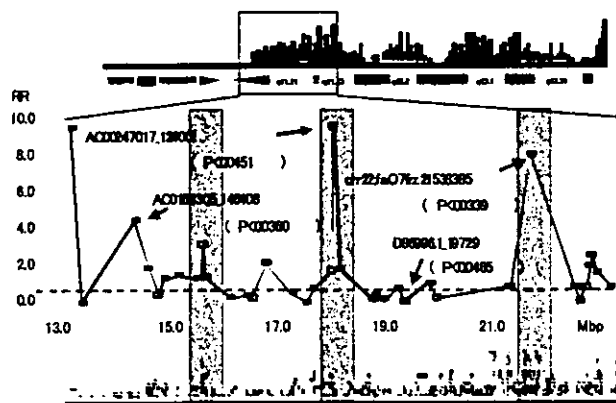


図 2. 第 22 番染色体長腕におけるマイクロサテライトマーカー解析の結果

D. 考察

HLA 一致の同種造血幹細胞移植における GVHD (graft versus host disease) 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(mHa)の関与が挙げられる。現在までに数種の mHa やその候補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,-D 遺伝子適合の 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、現在、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、第 6 番染色体の 13 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では、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、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。

次に我々は、染色体の中でもっとも短く、しかも塩基配列情報が比較的得られやすい第 22 番染色体に着目した。22 番染色体は約 30MB の塩基配列中に、約 500 個の遺伝子を含んでおり、我々はすでに 308 個のマイクロサテライトマーカーを設定している。今回はそのうち長腕 13.0Mb から 23.0Mb に存在する 37 種を用いて、患者とドナーの多型の一致、不一致を検討した。

結果、3 種に正の相関が、また 1 種に負の相関が認められたが、このうち、正の相関がみられた 3 種については、マーカー付近に多数の既知、未知遺伝子が存在している。特に 17.89Mb, 21.54Mb に存在する 2 種については、既知、新規遺伝子が密に存在している領域であることから、この付近に急性 GVHD の発症に関与するなんらかの遺伝子が存在する可能性が示された。

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、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。13 種のマーカーの一致率は、HLA 遺伝子との距離が近い程、一致率も高値を示しており、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。さらに、第 22 番染色体において 100 組のうち、GVHD III, IV 度 25 組と 0 度 25 組の計 50 組について一致度を比較したところ、37 種のうち 3 種に正の相関が、また 1 種に負の相関が認められ、GVHD 発症に関わる遺伝子の存在が示唆された。

G: 研究発表

1. 論文発表

1) Okamoto K, Makino S, Yoshikawa Y, Takaki A, Nagatsuka Y, Ota M, Tamiya G, Kimura A, Bahram S, Inoko H: Identification of IkBL as the second Major Histocompatibility Complex-Linked susceptibility locus for rheumatoid arthritis. *Am J*

Hum Genet. 72: 303-312, 2003.

2) Tsuji H, Okamoto K, Matsuzaka Y, Iizuka H, Tamiya G, Inoko H: SLURP-2, a novel member of the human Ly-6 superfamily that is up-regulated in psoriasis vulgaris (small star, filled). *Genomics.* 81: 26-33, 2003.

3) Oka A, Hayashi H, Tomizawa M, Okamoto K, Hui J, Kulski JK, Beilby J, Inoko H, Tamiya G: Localization of a non-melanoma skin cancer susceptibility region within the Major Histocompatibility Complex by association analysis using microsatellite markers. *Tissue Antigens* 61:203-210, 2003

4) Hashiguchi K, Niizeki H, Naruse T, Yokoyama M, Inamoto N, Urushibara T, Yamazaki Y, Inoko H, Nishikawa T: The clinical feature is associated with a specific haplotype of the TNF region in Japanese patients with palmoplantar pustulosis. *Hum Immunol.* 264:530-537, 2003.

5) Nomura A, Sato M, Suemizu H, Watanabe T, Kimura T, Yabuki K, Goto K, Ito N, Bahram S, Inoko H, Mizuki N, Ohno S, Kimura M. Hyperkeratosis and leukocytosis in transgenic mice carrying MHC class I chain-related gene b (MICB). *Tissue Antigens* 61:300-307, 2003

6) Niizeki H, Yokoyama M, Inamoto N, Nishikawa T, Naruse T, Inoko H, Hashiguchi K. Lack of association of the interleukin-1 receptor antagonist gene with palmoplantar pustulosis in Japanese. *European Journal of Immunogenetics* 30: 249-252, 2003.

7) Niizeki H, Yokoyama M, Inamoto N, Nishikawa T, Naruse T, Inoko H, Hashiguchi K.

Lack of association of the interleukin-1 receptor antagonist gene with palmoplantar pustulosis in Japanese. *European Journal of Immunogenetics* 30: 249–252, 2003.

8) Dn SD, Inoko H, Kulski JK: Dimorphic Alu element located between the TFIID and CDSN genes within the major histocompatibility complex. *Electrophoresis*, 24: 2740–2748, 2003.

9) Uenishi H, Hiraiwa H, Yamamoto R, Yasue H, Takagaki Y, Shiina T, Kikkawa E, Inoko H, Awata T: Genomic structure around joining segments and constant regions of swine T-cell receptor alpha/delta (TRA/TRD) locus. *Immunology* 109: 515-526, 2003.

10) Romphruk AV, Oka A, Romphruk A, Tomizawa M, Choonhakarn C, Naruse TK, Puapairoj C, Tamiya G, Leelayuwat C, Inoko H: Corneodesmosin gene: no evidence for PSORS 1 gene in North-eastern Thai psoriasis patients. *Tissue Antigens* 62: 217-224, 2003.

11) Dunn DS, Ota M, Inoko H, Kulski JK: Association of MHC dimorphic Alu insertions with HLA class I and MIC genes in Japanese HLA-B48 haplotypes. *Tissue Antigens* 62: 259-262, 2003.

12) Ikewaki N, Yamada A, Inoko H: Depolymerization of actin filament by cytochalasin E induces interleukin8 production and up-regulates CD54 in the Hela epithelial cell line. *Microbiol. Immunol.* 47: 775-783, 2003.

13) Zierhut M, Mizuki N, Ohno S, Inoko H, Gul A, Onoe K, Isogai E: Human genome and disease: Immunology and functional genomics of Behcet's disease. *Cell Mol Life Sci* 60: 1903-1922, 2003.

14) Li S, Kawata H, Katsuyama Y, Ota M, Morishima Y, Mano S, Kulski J K, Naruse T K, Inoko H. Association of polymorphic MHC microsatellites with GVHD, survival and leukemia relapse in unrelated hematopoietic stem cell transplant donor / recipient pairs matched at 5 HLA loci. *Tissue Antigens*. 63: 362-368, 2004.

15) 吉川枝里、宮原詞子、成瀬妙子、島田和典、東史啓、原啓高、猪子英俊：PCR-Luminex法を用いた、HLA-A、HLA-B および HLA-DRB1 遺伝子の日本人対応4桁 DNA タイピング方法の検討、*MHC*、9：21-31、2003.

2. 学会発表

1) Li S, Kawata H, Ota M, Morishima Y, Naruse T, Inoko H: Polymorphism of microsatellite markers in HLA region and effects on clinical outcome of unrelated hematopoietic stem cell Transplantation. 7th Asia-Oceania Histocompatibility Workshop and Conference, 2003.

2) Takemoto Y, Naruse T, Shindo Y, Ito N, Ota M, Mizuki N, Ohno S, Inoko H : Comparison of HLA-B51 haplotypes and Microsatellite polymorphisms in bechet's disease of multiple populations. 7th Asia-Oceania Histocompatibility Workshop and Conference, 2003.

3) Shichi D, Kikkawa E F, Ota M, Katsuyama Y, Kimura A, Matsumori A, Naruse T K, Inoko H. Susceptibility gene mapping of HCV-induced cardiomyopathy in 100 kb interval telomeric from *TNFA*. 7th Asia- Oceania Histocompatibility

Workshop and Conference. 2003.

4) Adachi A, Naruse T, Kikkawa E, Watai Y, Shimada R, Inoko H. A Pyrosequencing™ method for typing of HLA-A gene. 7th Asia- Oceania Histocompatibility Workshop and Conference. 2003.

5) Frjadian S, Naruse T K, Kawata H, Ghaderi A, Bahram S, Inoko H. HLA polymorphism in baloch ethnic group from Iran and their genetic relationship to Baloch from Pakistan. 7th Asia- Oceania Histocompatibility Workshop and Conference. 2003.

6) Shinagawa H, Mabuchi T, Ozawa A, Kikkawa E, Nakashima M, Anzai T, Naruse T, Inoko H, Sato M, Ishikawa Y, Hanaoka K, Tokunaga K, Yabe T. The difference of the immunoresponse to varicella zoster virus (VZV) and HLA association. 7th Asia- Oceania Histocompatibility Workshop and Conference. 2003.

7) 佐々木佳奈、河田寿子、李 素雲、田宮 元、森島泰雄、成瀬妙子、猪子英俊：非血縁者間骨髄移植における白血病患者と骨髄提供者の第22番染色体マイクロサテライト多型解析と移植片対宿主(GVHD)発症に関わるマイナー組織適合性抗原遺伝子の検索、第12回日本組織適合性学会、2003.

8) 猿渡卓哉、牧野 悟士、新屋みのり、間野修平、米倉 学、高山正賢、仲見 優、山口台輔、藤本 慶、相川 圭、小柳香奈子、羽原拓哉、田村卓郎、今西 規、五條堀孝、猪子英俊：ヒトゲノムのアノテーション情報を統合した多型データベース、第26回日本分子生物学会、2003.

9) 佐々木佳奈、河田寿子、李 素雲、田宮 元、森島泰雄、成瀬妙子、猪子英俊：非血縁者間骨髄移植における第22染色体マイクロサテライト多型解析、第26回日本分子生物学会、2003.

造血幹細胞移植における NK 細胞受容体の解析

分担研究者	屋部登志雄	(東京都赤十字血液センター技術部)
分担研究者	森島泰雄	(愛知県がんセンター血液・細胞療法部)
研究協力者	柏瀬貢一	(東京都赤十字血液センター検査部)

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、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、昨年度に引き続き HLA-C 抗原 KIR リガンド不一致症例を中心に 91 ペアを選択し患者、ドナーの KIR 遺伝子 16 種類の有無を PCR-SSP 法により判定し移植成績との関連を調べた。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、ドナー間に差は見られなかった。移植成績との関連ではドナーがプロファイル#5、活性化型 2DS2 陽性の場合に急性重症度 GVHD 発症率が高かった。一方、患者が活性化型 2DS5 陽性の場合には発症率は低かった。また 2DS2 に関して KIR リガンド GVH 方向不適合時の症例数を増やして解析したところ(計 62 症例)、ドナー 2DS2 陽性例では陰性例に比べさらに高率に急性重症度 GVHD を発症していた。これは患者の HLA-C 抗原 KIR リガンド G2 特異性をドナー 2DS2 が認識し反応したためと考えられる。また患者が 2DS2 および 3DS1 陽性の場合に白血病再発率が高い傾向が見られたが KIR リガンド拒絶方向不適合時で患者 2DS2 陽性の場合にはさらに高率となった。以上よりドナー及び患者の活性化型 KIR 遺伝子の有無が移植成績に影響すること、特に抑制型 KIR が働かないような KIR リガンド不適合移植においてより顕著であることが判明した。HLA-C 抗原タイピングにより KIR リガンド特異性を適合させること及び KIR 遺伝子型タイピングを行いリガンド特異性との適合性を検討することが移植成績向上に重要と考えられる。

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、反応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(G1:Cw2,w4,w5,w6, G2:Cw1,w3,w7,w8)に認識され(これらをKIRリガンド特異性と呼ぶ)、患者ドナー間のKIRリガンド適合性が骨髄移植成績に影響することが示されている(Ruggeriら Science 2002, 295:2097)。森島らはGVHD方向KIRリガンド不適合症例で急性重症GVHD発症が高率で生存率が低下すること、拒絶方向不適合で移植片生着率が低下することを見出している(本研究班今年度報告)。本研究では昨年度の解析をさらに発展させ患者、ドナーの16種類のKIR遺伝子型を決定しリガンド適合性と合わせてKIR遺伝子型適合性と移植成績との関連を解析した。

B. 方法

骨髄バンクを経由したHLA-A,B,DR血清型一致非血縁者間骨髄移植症例約2500症例からGVHD予防法としてシクロスポリン及び短期メトトレキサート投与、ATG非投与、T細胞除去未処理、約1500症例を選択しHLA-C型からKIRリガンド型(G1,G2)を判定し患者、ドナー間のリガンド適合性の組み合わせを分類した(表1)。HLA-Bw4, A3, A11のKIRリガンドについては殆どが一致している。HLA-CのKIRリガンド不適合症例を中心に91ペアを選択した。疾患の内訳はALL(34), CML(22), ANLL(18), MDS(9), NHL(6), SAA(1), HD(1)であった。KIR遺伝子の有無は昨年度同様にGomez-LozanoらによるPCR-SSP法(Tissue Antigens 59:184, 2002)を用いて16種類のKIR(2DL1,

2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 3DS1,2DP1, 3DP1)について解析し、KIRプロファイル型を決定し移植成績との相関を検討した。ドナー2DS2についてはさらに検体数を181症例まで増やして解析した(表1)。

C. 研究結果

91ペアの患者、ドナーKIR遺伝子頻度を表2に示す。各KIRの頻度は患者、ドナー間で差は見られなかった(図1)。HLA-C抗原KIRリガンドG1(HLA-Cw2,w4,w5,w6)認識の2DL1はほぼ全員、2DS1は約半数が陽性である。一方G2(HLA-Cw1,w3,w7,w8)認識の2DL3はほぼ全員陽性だが、2DL2、2DS2(両者は強く連鎖している)陽性は11-15%であった。白人集団ではこれらは半数前後が陽性であり、他人種と比較しても日本人の2DS2,2DL2頻度は著しく低いものである。次にこれらのKIR遺伝子の組み合わせであるKIRプロファイル型を決定した。上位7種類のプロファイル型を表3に示した。患者、ドナー共に半数近くの検体が#1型であり他人種と比べて日本人での頻度が最も高い。KIRプロファイルでも患者、ドナー間で有意な差は認められなかった(図2)。患者、ドナーのKIR型およびプロファイル型と移植成績との相関を検討した。表4に示すようにドナーが#5プロファイル、2DL2,2DS2それぞれ陽性者の場合に急性重度(III-IV度)GVHD発症が高率であり、患者2DS5陽性の場合には発症率が低いことが判明した。さらに患者、ドナー間のKIRリガンド適合性別に比較したところGVH方向不適合時

に GVHD 発症が高いことが判明した。そこで新たに 90 検体 (計 181 検体) のドナーの 2DS2,2DL2 を調べた。その結果 KIR リガンド GVH 方向不適合 (62 検体) では拒絶方向不適合 (68 検体) あるいは適合時 (51 検体) に比べて有意に急性 GVHD 発症が高いことが判明した (表 4)。昨年度報告したように GVH 方向不適合ではドナーが G2 認識抑制 KIR を細胞表面に発現しない NK 細胞亜集団が存在し、これらが G2 陽性の患者細胞に反応するため GVHD が発症すると考えられる。この時に G2 を認識する活性化 2DS2 がドナーNK で陽性の場合より強く反応し GVHD 発症がさらに高まると思われる。2DL2 は 2DS2 との強い連鎖のために相関が得られたと考えられる。また #5 プロファイルは 2DS2 を含むために相関が検出されたと考えられる。一方白血病再発と患者の KIR との相関が示された (表 4)。患者が 3DS1,2DS2,2DL2,2DL5 それぞれ陽性の場合に白血病再発が高率であった。2DS2,2DL2 については拒絶方向リガンド不適合の場合が高かった。これは先の GVHD の場合と逆で患者の NK 細胞がドナー細胞に反応する組み合わせであり、ドナーリンパ球が攻撃されるためにそれらの GVL 効果が減衰し白血病再発を招いた可能性が考えられる。3DS1 についても同様な機構が考えられる。2DL5 は 3DS1 と強く連鎖するために相関が得られた可能性がある。Gange ら (フランス) は非血縁者間骨髄移植ペアにおいて患者の KIR 型がドナーの KIR 型に含まれる時 (つまりドナーに余分な KIR、特に活性化型がある場合を指す)、他の組み合わせに比べて急性 GVHD (II-IV 度) が有意に高いこと (11 例中

11 例) を報告している (Human Immunol. 2002 63:271)。そこで今回の検体でも同様な解析をした所、そうした傾向は見られなかったが、ドナーの KIR 型が患者 KIR 型に含まれる場合は他の場合よりも急性 GVHD (III - IV) 発症が低めであった ($P < 0.08$)。また Bishara ら (イスラエル) は血縁者間ハプロ一致末梢血幹細胞移植においてドナーが活性化型 KIR 遺伝子を 4 個以上もつ場合に急性 GVHD (II-IV) 発症が高い (10 例中 9 例) ことを報告した (Tissue Antigens. 2004 63:204)。そこで同様な解析をした所、GVHD 発症についてはその傾向は見られなかったが、患者とドナーの両者が 4 個以上の活性化型 KIR 遺伝子を持つ場合に白血病再発が高率 (7 例中 5 例) であった。Cook ら (英国) は血縁者間 HLA 完全一致移植症例 112 例中で患者が骨髄性白血病で KIR リガンドが G1 ホモの場合 (22 例) に生存率が有意に低く、特にドナーが 2DS2 陽性者の場合は 10 例中 9 例が死亡 (再発及び感染症による) したことを報告した (Blood 2004. 103:1521)。JMDP での HLA アリル完全一致の骨髄性白血病症例で G1 ホモの場合は 6 例あったがそうした生存率の低下は見られなかった。

D. 考察

前年度に引き続き患者、ドナーの KIR 遺伝子型を解析し、GVHD 予防法としてシクロスポリン及び短期メトトレキサート投与、ATG 非投与例、T 細胞除去未処理症例に絞って移植成績との関係を検討した。森島らは GVH 予防法により移植成績が異なり HLA のバリアーも違ってくることを明らかにしている (本研究班昨年度報告)。ATG

は T 細胞と同様 NK 細胞にも抑制性に作用すると考えられ、また通常の T 細胞除去処理では NK 細胞も同様に除去されるので、移植幹細胞中に含まれる成熟 T 細胞、NK 細胞の残存度が異なってくる。今回は対象を限定し HLA および NK、T 細胞機能に強い影響を及ぼすような要素による成績の変動を極力除外した。別稿にあるように森島はこれらの症例を解析し KIR リガンド GVH 方向不適合時に急性重症 GVHD 発症が有意に高く、生存率が低下していること、KIR リガンド拒絶方向不適合時には拒絶反応により移植片生着率が低下することを見出している。今回の KIR ゲノタイプ解析からリガンド適合性に加えて、患者ドナーの KIR 遺伝子の有無が移植成績に影響を及ぼすことが判明した。特に活性化型 KIR は個人間でその種類、数が異なるために適合性を合わせる事が重要であり今後さらに詳細な検討を行うことが必要となろう。

E. 結論

患者、ドナー間での NK 細胞受容体 KIR 遺伝子型と KIR リガンドとの適合性が移植成績（急性 GVHD、白血病再発率）に影響を及ぼすことが判明し、ドナー選択時での HLA-C 抗原タイピング、KIR ゲノタイプによる適合性検討の重要性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Morisima, Y., Yabe, T., Inoko, H., Saji, H., Juji, T., Sasazuki, T., Kodera, Y. for

the Japan Marrow Donor Program. Clinical Significance of Killer Ig-like Receptor(KIR) on Acute GVHD, Rejection and Leukemia Relapse in Patients Transplanted Non-T Cell Depleted Marrow from Unrelated Donor –Roles of Inhibitory KIR Epitope Matching and Activating KIR genotype.(Abstract). Blood. 2003. 102(11):153a.

2. Yabe, T., Sato-Takeda, M., Tokunaga, K., Tadokoro, K., Morishima, Y. and Satake, M. Natural Killer Receptor KIR genotype and HLA-C KIR epitope incompatibility in acute GVHD of unrelated bone marrow transplantation.(abstract) MHC. 2004. 10(3):192.

学会発表

1. Morisima, Y., Yabe, T., Inoko, H., Saji, H., Juji, T., Sasazuki, T., Kodera, Y. for the Japan Marrow Donor Program. Clinical Significance of Killer Ig-like Receptor(KIR) on Acute GVHD, Rejection and Leukemia Relapse in Patients Transplanted Non-T Cell Depleted Marrow from Unrelated Donor –Roles of Inhibitory KIR Epitope Matching and Activating KIR genotype. American Society of Hematology Meeting. 2003. USA.

2. Yabe, T., Sato-Takeda, M., Tokunaga, K., Tadokoro, K., Morishima, Y. and Satake, M. Natural Killer Receptor KIR

genotype and HLA-C KIR epitope incompatibility in acute GVHD of unrelated bone marrow transplantation. 7th Asia-Oceania Histocompatibility Workshop and Conference.. 2003 September 16-19. Karuizawa.

3. Yabe, T., Ishikawa, Y., and Morishima, Y. "Evaluation of KIR epitope and KIR genotype incompatibility for unrelated BMT through JMDP: High frequencies of acute GVHD in the KIR epitope and KIR genotype incompatible cases." The 5th Nagoya International Blood and Marrow Transplantation Symposium. April 19, 20. Nagoya.

4. Yabe, T., Tokunaga, K., Morishima, Y., and Satake, M. "Diversity of NK receptor KIR genes and its clinical significance in bone marrow transplantation." International Symposium "Genome Diversity in Immunity and Disease" 2003 Tokyo.

5. 屋部登志雄, 佐藤昌子, 徳永勝士, 田所憲治, 森島泰雄, 佐竹正博「ナチュラルキラー細胞受容体 KIR 遺伝子型、HLA 型と非血縁者間骨髄移植成績」第 27 回日本血液事業学会総会 2003 年 9 月 17-19 日 京都

H. 知的財産権の出願、登録状況
なし

表 1

KIR適合性	KIRリガンド		n	%	KIRゲノタイプ解析	
	患者	ドナー			16KIR	ドナー2DS2
適合	G1G1	G1G1	9	0.6%	-	-
	G2G2	G2G2	1202	81.9%	-	-
	G1G2	G1G2	106	7.2%	12	51
不適合 GVH方向	G1G1	G1G2	0	0.0%	-	-
	G2G2	G1G2	64	4.4%	24	62
拒絶方向	G1G2	G1G1	3	0.2%	2	-
	G1G2	G2G2	82	5.6%	51	68
双方向	G1G1	G2G2	1	0.1%	1	-
	G2G2	G1G1	1	0.1%	1	-
計			1468		91	181

表 2

KIR名	型	リガンド特異性	KIRゲノタイプ頻度	
			患者 n=91	ドナー n=91
2DL1	抑制	HLA-C group 1(G1)	99	98
2DL2		HLA-C group 2(G2)	11	15
2DL3		HLA-C group 2(G2)	99	99
2DL4		HLA-G	100	100
2DL5		unknown	41	45
3DL1	活性化	HLA-Bw4	91	89
3DL2		HLA-A3,A11	99	100
3DL3		unknown	98	100
2DS1	活性化	HLA-C group 1(G1)	41	46
2DS2		HLA-C group 2(G2)	11	15
2DS3		unknown	13	18
2DS4		unknown	88	85
2DS5		unknown	31	37
3DS1	偽遺伝子	unknown	41	43
2DP1			98	98
3DP1		97	99	

図 1

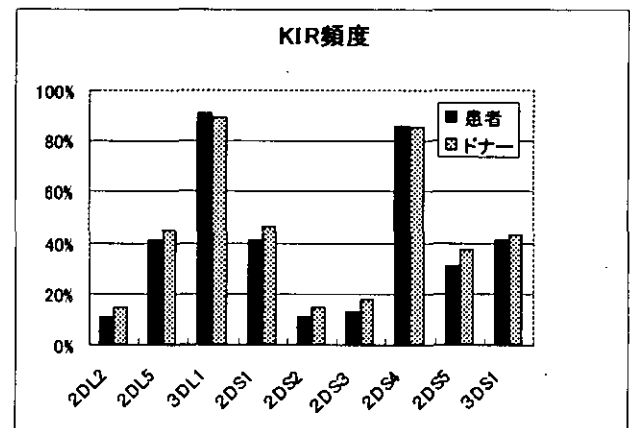


表 3

KIRプロフィール頻度

プロフィール	プロフィール									患者 n=91	ドナー n=91
	2L2	2L5	3L1	2S1	2S2	2S3	2S4	2S5	3S1		
#1	-	-		-	-	-		-	-	50.5%	42.9%
#2	-				-	-				16.5%	20.9%
#3	-				-			-		3.3%	3.3%
#4	-		-		-	-	-			5.5%	5.5%
#5		-		-		-		-	-	3.3%	6.6%
#6	-				-	-	-			2.2%	2.2%
#7	-				-	-		-		2.2%	1.1%

図 2

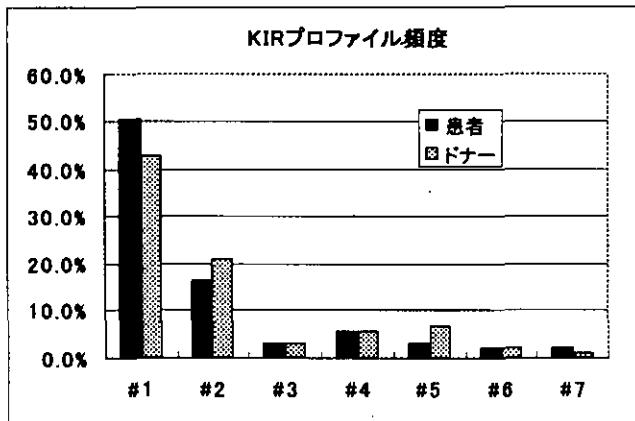


表 4

91pairs

outcome		direction	KIR	p	%	n	
GVHD	high	donor					
	high	donor	2DS2	0.084	46.2%	13	
	high	donor					
	high	donor	#5profile	0.04	66.7%	6	
	high	donor	GVH	2DS2	0.004	100.0%	5
	high	donor	GVH	2DL2	0.004	100.0%	5
	high	donor	GVH	#5profile	0.055	100.0%	3
low	patient		2DS5	0.026	11.1%	27	

relapse	high	patient		3DS1	0.005	30.0%	30
	high	patient		2DL5	0.027	26.7%	30
	high	patient		2DS2	0.042	50.0%	6
	high	patient		2DL2	0.042	50.0%	6
	high	patient	rejection	2DS2	0.043	60.0%	5
	high	patient	rejection	2DL2	0.043	60.0%	5

181donors

GVHD	high	donor	GVH	2DS2	0.05	66.7%	12
	high	donor	GVH	2DL2	0.05	66.7%	12

IV. 研究班会議発表者報告文書

第一回研究班会議：平成 15 年 7 月 12 日

第二回研究班会議：平成 16 年 2 月 27 日 (1 日目)

平成 16 年 2 月 28 日 (2 日目)

(再掲)

IV. 研究班会議発表者報告書

一. 平成 15 年度第一回研究班会議

2003 年 7 月 12 日【土】午前 10 時～午後 5 時 30 分

会場: 名古屋第一赤十字病院 古川講堂

主任研究者挨拶並びに報告

小寺良尚

名古屋第一赤十字病院 第四内科、骨髄移植センター

分担研究報告

テーマⅠ. 造血幹細胞移植と組織適合性抗原

1. 日本骨髄バンクにおける HLA 検査のあり方 129
森島泰雄 愛知県がんセンター病院 血液・細胞療法部
2. HLA-DNAタイピングの意義の確立
—非血縁者間骨髄移植におけるHLAクラスⅡ遺伝子マッチングの影響— 135
山本 健^① 笹月健彦^② ①九州大学生体防御医学研究所 遺伝学部門
②国立国際医療センター研究所
3. 非血縁者間骨髄移植におけるNK受容体の関与 — HLA-C型からの解析 — 136
森島泰雄 愛知県がんセンター病院 血液・細胞療法部
4. NK受容体KIRの移植成績への関与:活性化KIR不適合とGVHD発症 142
屋部登志雄 東京都赤十字血液センター 技術部
5. マイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイドな組織適合遺伝子の検索 144
成瀬妙子 猪子英俊 東海大学医学部 生命科学系
6. HLA-A24 拘束性マイナー抗原 ACC-1 が移植後経過に及ぼす影響の検討 145
赤塚美樹^① 西田徹也^② ①②愛知県がんセンター研究所 腫瘍免疫学部
②現名古屋大学大学院医学系研究科 病態内科
7. HLA-A24 拘束性マイナー組織適合性抗原 (ACC-1) の適合性と GVL/GVH との相関 148
丸屋悦子 佐治博夫 特定非営利活動法人 HLA 研究所
8. ドナー欠損型マイナー抗原UGT2B17の同定およびその臨床的意義に関する検討 150
村田 誠 名古屋大学大学院医学系研究科 血液内科

テーマⅡ. 同種末梢血造血幹細胞移植

1. 難治性自己免疫疾患に対する自己 CD34 陽性末梢血幹細胞移植 151
長藤宏司 原田実根 九州大学大学院医学研究院 病態修復内科
2. 同種末梢血幹細胞至適採取時期決定における末梢血 circulating immature cell count の有効性に関する検討 153
小塚輝彦^① 原 雅道^① 谷本光音^② ①愛媛県立中央病院 内科
②岡山大学医歯学総合研究科 病態制御
3. 同種末梢血採取における適正な採取量に関する研究 154
比留間潔 坂巻 壽 都立駒込病院 造血細胞移植チーム
4. 自家造血幹細胞移植と海外ドナーバンクの適正使用に関する提案 155
岡本真一郎 慶應義塾大学医学部 内科

テーマⅢ. 細胞治療とその適正運用

1. 非血縁者間造血細胞移植と骨髄バンクの効率的運用に関する研究 157
小寺良尚 名古屋第一赤十字病院 骨髄移植センター
2. 骨髄バンクを介して行われたドナーリンパ球輸注の成績 159
堀部敬三 JMDP 医療委員会

3. AML,CML,MDS を対象とした G-CSF 併用前処置法による臍帯血・骨髄移植の比較 — 東大医科研における経験 —	161
高橋 聡 浅野茂隆 東京大学医科学研究所 先端医療研究センター	
4. FK506 を GVHD 予防に用いた NIMA 相補的血縁者間 造血幹細胞移植に関する臨床第 I - II 相試験	163
一戸辰夫 京都大学大学院医学研究科血液・腫瘍内科学	
5. CD34 陽性細胞純化法を用いた HLA2,3 抗原不一致血縁者ドナーからの同種末梢血幹細胞移植の 安全性及び有効性の検討	165
谷口修一 国家公務員共済組合連合会虎の門病院 血液科	
6. HLA Class - 1 抗原 2 座不一致同胞ドナーより RIST を行った重症再生不良性貧血の 1 例	167
政氏伸夫① 佐治博夫② ①市立函館病院 内科 ②特定非営利活動法人 HLA 研究所	
7. HLA haploidentical ミニ移植	169
小川啓恭 大阪大学大学院医学系研究科 分子病態内科学	
8. 膠原病に対する造血幹細胞移植のための臨床試験体制の確立と実施に関する研究	171
天崎吉晴 小池隆夫 北海道大学大学院医学研究科 病態内科学	
9. 臨床試験におけるデータセンターの役割	173
熱田由子 浜島信之 名古屋大学大学院医学系研究科 予防医学/医学推計・判断学	
10. 活性化 CD-4 リンパ球による DLI のための臨床試験体制の確立と実施に関する研究	175
伊藤仁也 先端医療センター 再生医療研究部	
11. ウイルス抗原特異的 T 細胞による細胞療法	177
工藤寿子 渡辺修大 小島勢二 名古屋大学大学院医学系研究科 小児科	
12. マイナー抗原特異的 T 細胞による養子免疫療法	179
赤塚美樹 愛知県がんセンター研究所 腫瘍免疫学部	
13. 樹状細胞を用いたペプチド特異的 T 細胞の増幅とヘルパー抗原の効果	181
北脇年雄 門脇則光 京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学	
14. 骨髄内骨髄移植の有用性——マウス、ラット、モンキーを用いて	182
池原 進 関西医科大学 第一病理学	

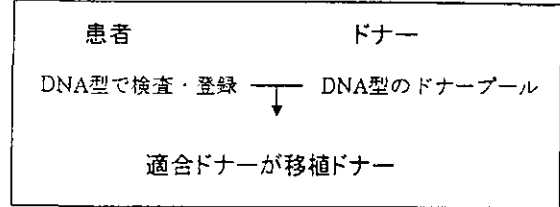
平成15年7月12日

日本骨髄バンクにおけるHLA検査のあり方

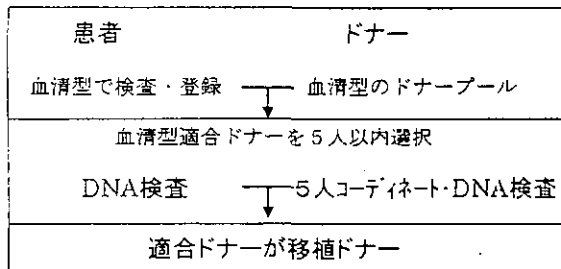
愛知県がんセンター病院
血液・細胞療法部
森島泰雄

非血縁者間移植におけるHLA検査と コーディネートのあり方 答申

HLA DNA型(遺伝子型)検査を基本
—より早くより詳細なHLA検査—

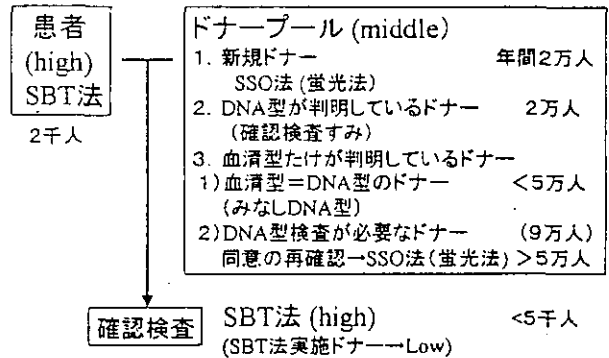


現行



答申利点：無駄なコーディネートの必要がない
コーディネート期間の短縮
DNA型検査でも検査費用は高くならない。

骨髄バンクにおけるHLA検査：答申 HLA DNA型(遺伝子型)検査を基本



患者HLA検査について

1. 患者登録後ただちに財団において患者HLA-A, B, DRB1のDNA検査を実施する。
2. 検査法はSBT法(特異性はhigh resolution)とする。
3. 検体採取は試験管を使った採血法とする。

ドナーHLA検査について

1. 新規登録者 (HLA未検査)
すべてのドナーにHLA-A, B, DRのDNA検査を実施し、その検査法はHLA型の特異性が"middle resolution" 以上の方法を用いる。
2. すでにHLA検査済のドナー登録者
日本人で血清型からHLA-DNA型が推測できる場合はみなしDNA型とし、血清型がDNA型で分かれる場合には、middle resolution以上の方法でこの型のDNA型を検査する。
3. 検体採取
試験管採血を原則とするが、試験管採血ができない場合には、ろ紙法も認める。ろ紙法の場合には血液型検査はその後の検査時に実施することになる。試験管法・ろ紙法とも検体は一定期間保存する。

HLA型照合について

1. 患者のHLA-DNA型とドナーのHLA型 (DNA型、一部血清型) とを照合する。

確認検査について

1. 選択されたドナーにつき、コーディネートを開始する。
2. 選択されたドナーにはHLA確認検査を実施する。
3. ドナーHLA確認検査は SBT法(特異性は high resolution)とする。ただし、すでに high resolution法によりHLA-DNA型が判明しているドナーについては low resolution法でドナー本人であることを確認する。

HLA検査法、検査機関とHLA検査の精度管理について

骨髄移植推進財団は患者HLA検査、HLA確認検査、ドナーHLA検査、検体採取法が適切なものであることをHLA検査の品質管理も含めて検証する。

その他

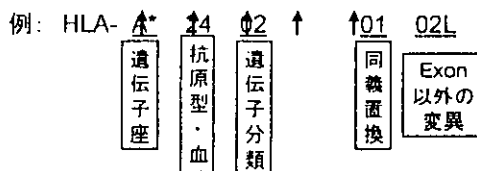
患者・骨髄バンクの経済的な負担をできるかぎり軽減するために、骨髄バンクを介したHLA検査は「骨髄バンク」特別仕様として、できるかぎり低価格に抑えるよう努める。HLA検査機関の選定にあたっては選定過程を明らかにする。

検体保存事業について

ドナー・患者の同意を得て検体を保存する検体保存事業を早急に再開する。日本骨髄バンクにおける組織適合性試験の有用性を確認し、組織適合性抗原の同定とその臨床研究を推進することは、移植成績の向上のために不可欠である。HLA検査残余検体ならびに患者HLA検査時とドナー確認検査時に採取した検体を保存する。

HLAアレル(遺伝子型)の命名法

Nomenclature for factors of the HLA system, 2002.



Low resolution = 2桁レベル = 血清学レベル
 Middle = 中精度レベル
 High resolution = 4桁レベル = DNA(アレル)レベル

Middleレベルとは

2桁レベル (Low) Middle 4桁レベル (high)

		A*0201
	A*0201= 0202= 0203	A*0202
		A*0203
		A*0204
A*02	A*0206= 0204= 0205	A*0205
		A*0206
		A*0207
	A*0207= 0208= 0209	A*0208
		A*0209
	A*0210= 0211= 0218	A*0210
		...
		A*0218
		...
		A*0260

Green: common allele (0.1% <)
 Blue : rare allele (0.1% >) in Japanese

平成 15 年度厚生科学研究ヒトゲノム・再生医療研究事業
第一回班会議・分担研究報告書

HLA - DNA タイピングの意義の確立
—非血縁者間骨髄移植における HLA クラス II 遺伝子マッチングの影響—

分担研究者 笹月 健彦
(国立国際医療センター研究所)
(代理出席：山本 健、九州大学生体防御医学研究所)

研究目的

非血縁者間骨髄移植における急性 GvHD 発症と最終的な Clinical Output である生存に対して、HLA クラス II 遺伝子 (HLA-DRB1, -DQB1) のマッチングが与える影響を明確にする。

背景

これまでの、血清学的に HLA-A, B, DR が一致した非血縁者間骨髄移植における HLA 遺伝子座のマッチングに関する解析により、日本人においては、HLA クラス I 遺伝子 (HLA-A, B) のミスマッチが急性 GvHD および死亡の有意な危険因子であることが示された。クラス II に関しては、DPA1 および DPB1 のマッチングは差を示さなかったが、DRB1, DQB1 については若干の差を認め、また、欧米での成績では DRB1 マッチングの重要性が示されていることから、さらに症例数を増やした検討が必要と考えられた。

これまでの結果 (既報告)

平成 13 年度までに HLA タイピングが終了し、生存が追跡調査された 2097 例を対象に HLA クラス I (HLA-A, B, C) および HLA クラス II (HLA-DRB1, DQB1) の DNA レベルでのマッチングと急性 GvHD 発症、生存との関連を Kaplan-Meier 曲線により解析した。特に、クラス II 遺伝子のマッチングに焦点をあて、クラス I マッチ症例におけるクラス II マッチングの影響を検討した。なお、研究分担者らは HLA-DQB1 の DNA タイピングを担当した。

急性 GvHD を解析した症例のうち、DRB1 のタイピングが利用可能で HLA-A, B とともにマッチしていた症例は、計 1600 例であった。このうち、DRB1 がマッチしていた症例が 1302 例、ミスマッチ症例が 298 例であった。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 ($P=0.0002$)、急性 GvHD 発症に関して、DRB1 マッチングの重要性が示された。DQB1 においては、HLA-A, B とともにマッチしていた 1548 例中、マッチ症例が 1161 例、ミスマッチ症例が 387 例であり、DRB1 と同様に両者の間に統計学的有意差を認めた ($P=0.0187$)。DRB1 と DQB1 は強い連鎖不平衡にあるため、どちらの影響が重要かを明らかにする目的で、HLA-A, B, DQB1 マッチ 1161 例における DRB1 の影響を解析した。このうち DRB1 ミスマッチ症例は 73 例と少数であったが、マッチ例との間で有意差を認めず (DQB1 についての同様の解析においても有意差なし)、少なくとも DRB1 かつ DQB1 のミスマッチが急性 GvHD 発症の危険因子となることがあらためて示された。

一方、生存に対する DRB1, DQB1 マッチングの影響は、これまでの結果と同様に有意差を認めず、生存においてクラス II ミスマッチは危険因子として採択されなかった。

本年度の計画

平成 14 年度、新たに 750 症例の HLA タイピングが終了しており、本年度はさらに約 800 症例の HLA タイピングを共同で行う。九州大学では DQB1 を担当する。これらをあらたに解析し、これまでの症例と合せ HLA-A, B 遺伝子座マッチ症例における DRB1, DQB1 のマッチングの重要性を基礎疾患、リスクグループなど他の要因も考慮し明らかにする。

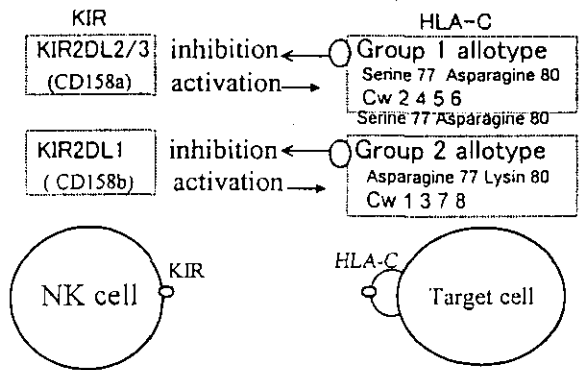
非血縁者間骨髄移植におけるNK受容体の関与

— HLA-C型からの解析 —
CSP+MTX法によるGVHD予防症例での検討

愛知県がんセンター病院
血液・細胞療法部
森島泰雄

HLA-C	東海大学 HLA研究所	猪子英俊 佐治博夫	成瀬妙子 丸屋悦子
HLA-A, B	日本赤十字血液センター	石川善英 赤座達也	柏瀬真一 十字猛夫
HLA-DQ	国立国際医療センター 九州大学	笹月健彦 山本 健	

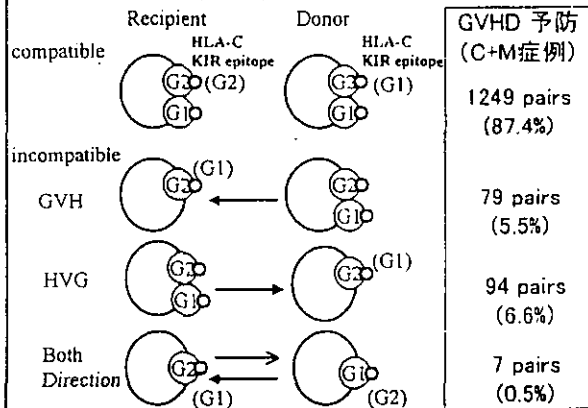
HLA-C epitopeによるNK細胞のKIRを介した抑制



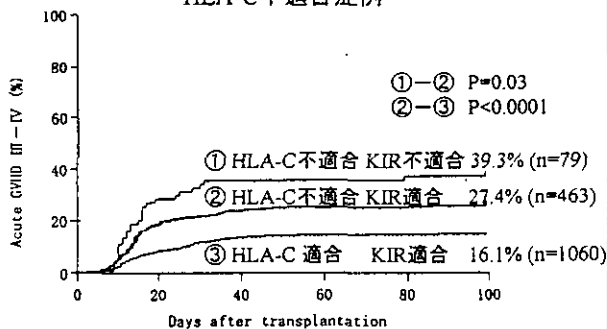
KIR specific for HLA-C
JMDPでの頻度

Receptor	Ligand (HLA-C allotype)	頻度 2468 pairs
KIR2DL2/3 (CD158a)	Group 1 Cw 2, 4, 5, 6	7.3%
KIR2DL1 (CD158b)	Group 2 Cw 1, 3, 7, 8	92.7%

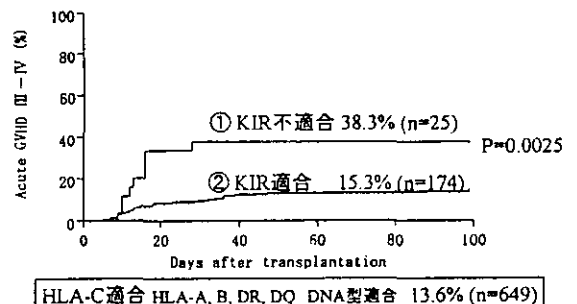
KIR epitope compatibility



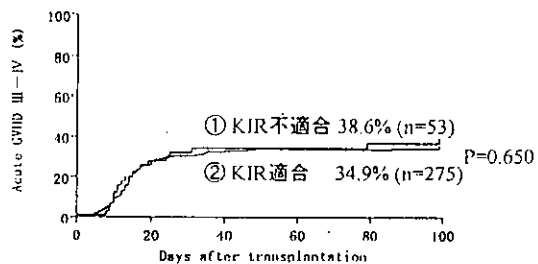
KIR適合 (GVHD方向) と急性GVHD (Ⅲ-Ⅳ)
GVHD予防法: CSP+MTX法
HLA-C不適合症例



KIR適合度 (GVHD方向) と急性GVHD (Ⅲ-Ⅳ)
GVHD予防法: CSP+MTX法
HLA-C不適合 HLA-A, B, DR, DQ DNA型適合



KIR適合度 (GVHD方向) と急性GVHD (Ⅲ-Ⅳ)
 GVHD予防法: CSP+MTX法
 HLA-C不適合 HLA-A, B, DR, DQ DNA型不適合



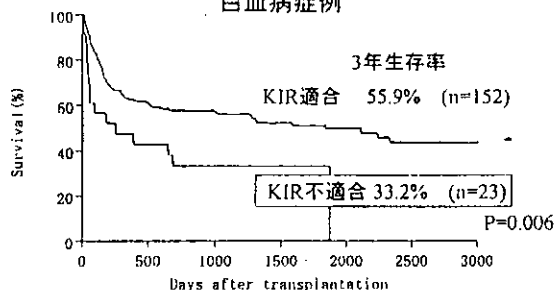
HLA-C適合 HLA-A, B, DR, DQ DNA型不適合 17.0% (n=328)

KIR適合と生着不全

GVHD予防法: CSP+MTX法
 HLA-C不適合 HLA-A, B, DR, DQ DNA型適合

生着不全 (1次+2次)		
HLA-C不適合		
KIR不適合	12.7% (n=36)	P=0.065
KIR適合	2.8% (n=163)	
HLA-C適合		
	1.3% (n=644)	

KIR適合度 (GVHD方向) と生存
 GVHD予防法: CSP+MTX法
 HLA-C不適合 HLA-A, B, DR, DQ DNA型適合
 白血病症例

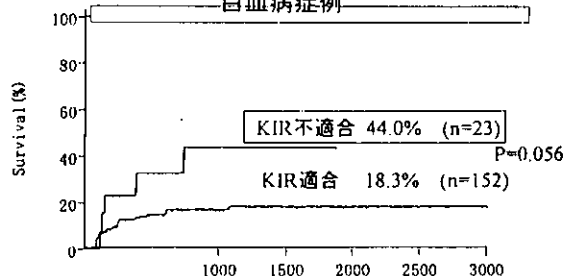


3年生存率
 KIR適合 55.9% (n=152)

KIR不適合 33.2% (n=23)

P=0.006

KIR適合度 (GVHD方向) と再発
 GVHD予防法: CSP+MTX法
 HLA-C不適合 HLA-A, B, DR, DQ DNA型適合
 白血病症例



KIR不適合 44.0% (n=23)

KIR適合 18.3% (n=152)

P=0.056

KIR まとめ

1. NK受容体であるKIR2DL2/3とKIR2DL1をHLA-C型から推測し、その適合度と急性GVHD、生着不全、再発、生存との関連をCSP+MTX法によるGVHD予防法を用いた非血縁者骨髄移植1429症例で解析した。
2. KIRのGVHD方向不適合は急性GVHDの発症に関与する。
3. KIRの拒絶方向不適合は生着不全に関与している可能性がある。
4. KIRのGVHD方向不適合は白血病全例では再発を抑制していない。今後、多数例での病型別の解析が必要である。
5. KIRのGVHD方向不適合は生存率を低下させている。