

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

非血縁者間移植における HLA 抗原適合度に基づくドナー選択順位

分担研究者 森島泰雄 愛知県がんセンター
分担研究者 笹月健彦 国立国際医療センター
研究協力者 山本 健 九州大学

研究要旨:日本骨髄バンクを介した非血縁者間移植においてドナーと患者間の HLA 抗原の違いが移植成績に大きな影響を与えていることが本研究班での解析で明らかになってきた。HLA-A, B, C, DRB1 の遺伝子型が同定できた症例につき解析し、その結果に基づき HLA 適合度に基づくドナー選択のアルゴリズム（選択順位）を決定することができた。このアルゴリズムには NK 細胞受容体である killer cell Ig-like receptor (KIR) の ligand 不適合も考慮されている。日本骨髄バンクのコーディネートにおける HLA 型の検索と照合に有用であり、最適なドナーの選定により移植成績の向上が期待される。

A. 研究目的

HLA-A, B, C, DRB1 の遺伝子型不適合度と臨床成績、重症 GVHD との関連を解析することにより、ドナーの選択順位を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

現在までに本研究班で HLA-A, B, C, DR, DQ の DNA タイピングをドナーと患者の検体を用いてレトロスペクティブに実施した 2500 症例を対象にした。さらに、NK 細胞受容体である killer cell Ig-like receptor (KIR) の ligand 不適合を HLA-C 型から推測し、その影響につき検討した。

C. 研究結果

1) 表 1 に HLA-A, B, DR 血清型適合移植において HLA-A B C DRB1 の遺伝子型適合度

別の 3 年生存率、6 年生存率、重症 GVHD 発症率を示した。P は全適合症例との比較である。選択順位は 1 位 全適合、2 位 DRB1 1 座不適合、3 位 HLA-C 座 1 座不適合（ただし表 2 に示す KIR ligand 不適合を考慮する）、4 位 HLA-C+DRB1 2 座不適合、5 位 HLA-A または HLA-B の 1 座不適合、6 位 4 位を除く 2 座不適合、7 位 3 座不適合、8 位 すべての抗原で 1 座以上の不適合となった。なお、1 抗原座で二つの型が不適合の場合は、このような症例が極めて少なく解析不可能であった。

2) HLA-C 不適合症例における KIR 不適合の影響（表 2）。

NK 細胞受容体の一つである KIR2DL1 は標的細胞の HLA-C の Group 1 エピトープ(Cw2,4,5,6 に共通)を認識し、この ligand 結合により NK 細胞の活性が抑制されるこ

とが判明している。同じく、KIR2DL2/3 は Group2 エピトープ (Cw1, 3, 7, 8 に共通) と結合する。非血縁者間移植では、ドナーと患者の HLA-C 型が異なる場合に、この ligand 結合が外れる症例がある。GVHD 方向 (ドナーのエフェクター細胞は活性化される組み合わせ) のみの不適合は 4.6% の症例、拒絶方向のみの不適合は 5.8% の症例、両方向の不適合は 0.5% の症例に認められた。

HLA-C 不適合症例の中で、HLA-C 単独不適合 (表 1 で順位 3 位) では、KIR ligand 不適合 (GVHD 方向) で重症急性 GVHD の頻度が 34% と適合症例の 18% にくらべ有意に高率であり、HLA-C+DRB1 不適合症例 (表 1 で順位 4 位) でも KIR ligand 不適合 (GVHD 方向) で重症急性 GVHD の頻度が 41% と適合症例の 25% にくらべ有意に高率であった。

さらに、KIR ligand 不適合症例の 3 年生存率、6 年生存率は適合例に比べ、有意に劣っていた。

D. 考察

日本骨髄バンク (JMDP) では新たな HLA 検査とコーディネートシステムに移行した (図 1)。このシステムにおいてここで示したドナー選択のアルゴリズムは有用なものであろう。KIR ligand 適合度についてもその不適合数は少ないものの考慮に値するものであろう。

また、HLA-C 型の検査はドナー HLA 検査ならびにコーディネートにおける照合検査に必須検査として導入することが不可欠である。

今回は現在可能な約 2500 症例の解析結

果に基づくものであるが、H16 年末には JMDP を介して 6000 症例以上の移植がなされており、今後多数例の HLA 遺伝子型やその他の HLA 以外の組織適合性抗原を本研究班で同定・解析することにより、さらに詳細で確かなアルゴリズムが確立されるものと考えられる。

E. 結論

ドナーと患者の HLA 遺伝子型を本研究班においてレトロスペクティブに同定・解析することにより、組織適合性から見て最適のドナーを選択するための選択順位 (アルゴリズム) を確立することができた。今後の移植成績の向上に有用であろう。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Li S, Morishima Y. Association of polymorphic MHC microsatellites with GVHD, survival, and leukemia relapse in unrelated hematopoietic stem cell transplant donor/recipient pairs matched at five HLA loci. *Tissue Antigens*. 2004 Apr;63(4):362-8.

Iida H, Morishima Y. Twenty years' experience in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia in the Nagoya Blood and Marrow Transplantation Group. *Int J Hematol*. 2004 Jan;79(1):79-84.

Nishida T, Morishima Y. Clinical relevance of a newly identified HLA-A24-restricted minor histocompatibility antigen epitope derived from BCL2A1, ACC-1, in patients receiving HLA genotypically matched unrelated bone marrow transplant. *Br J Haematol*. 2004 Mar;124(5):629-35.

Izutsu K, Morishima Y. Japan Marrow Donor Program. Unrelated bone marrow transplantation for non-Hodgkin lymphoma: a study from the Japan Marrow Donor Program. *Blood*. 2004 Mar 1;103(5):1955-60.

Kondo E, Morishima Y. Identification of novel CTL epitopes of CMV-pp65 presented by a variety of HLA alleles. *Blood*. 2004 Jan 15;103(2):630-8.

Morishima Y. Efficacy and Safety of Imatinib Mesylate for Patients in the First Chronic Phase of Chronic Myeloid Leukemia: Results of a Japanese Phase II Clinical Study. *Intern J Hematol* 80:261-266, 2004

Ogura M, Morishima Y. Durable Response but Prolonged Cytopenia after Cladribine Treatment in Relapsed Patients with Indolent non-Hodgkin's Lymphomas: Results of a Japanese Phase II Study. *Intern J Hematol* 80: 267-277, 2004

Karnan S, Morishima Y. Analysis of chromosomal imbalances in de novo

CD5-positive diffuse large-B-cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, 2004 39:77-81.

Tagawa H, Morishima Y. Genome-wide array-based comparative genomic hybridization of diffuse large B-cell lymphoma: comparison between CD5-positive and CD5-negative cases. *Cancer Res*. 2004 Sep 1;64(17):5948-55.

Akatsuka Y, Morishima Y. Major and minor histocompatibility antigens in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cur. Opin. Organ. Transplant*., 2004 9: 64-71.

3. 学会発表

Morishima Y. Clinical significance of the matching of HLA alleles and NK cell receptors in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. The 2004 Tandem BMT Meetings. 2004 (Orland USA).

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. HLA 適合度に基づくドナー選択順位とその成績 (JMDP)

○ HLA 遺伝子型適合 × HLA 遺伝子型 1 型不適合 A, B, DRB1 : 血清型適合
 HLA-A, B, C, DRB1 遺伝子型が同定できた全症例 ne : 症例数が 9 例以下のため解析せず。

順位	A	B	C	DR B1	n	3年生存	6年生存	P	A-GVHD (grade3,4)	P
1	○	○	○	○	1128	58%	52%	-	13%	-
2	○	○	○	×	219	55	53	0.745	14	0.536
3	○	○	×	○	371	54	45	0.052	20	0.001
4	○	○	×	×	172	49	48	0.011	28	<0.0001
5a	×	○	○	○	155	42	36	<0.0001	22	0.001
5b	○	×	○	○	22	34	-	0.013	28	<0.0001
6a	○	×	×	○	84	37	37	<0.0001	31	<0.0001
6b	×	○	×	○	100	31	30	<0.0001	31	<0.0001
6c	×	○	○	×	30	35	28	0.003	15	0.697
6d	○	×	○	×	19	26	20	0.001	28	0.046
6e	×	×	○	○	7	ne	ne		ne	
7a	○	×	×	×	28	42	18	0.009	38	0.0002
7b	×	○	×	×	47	31	31	<0.0001	35	<0.0001
7c	×	×	○	×	6	ne	ne		ne	
7d	×	×	×	○	34	30	27	0.0004	41	<0.0001
8	×	×	×	×	19	24	16	<0.0001	28	0.029

表2. HLA-C不適合移植におけるNK細胞受容体(KIR:NKG2L)適合の臨床的意義

順位	A	B	C	DR B1	KIR	n	3年生存	6年生存	P	A-GVHD (grade3,4)	P
HLA-C 単独不適合											
3a	○	○	×	○	○	324	56%	47%	-	18%	-
3b	○	○	×	○	×	52	40	20	0.016	34	0.008
HLA-C + DRB1 不適合											
4a	○	○	×	×	○	147	53	53	-	25	-
4b	○	○	×	×	×	29	34	28	0.012	41	0.085

KIR 不適合 : GVHD 方向

NK細胞受容体 (KIR 2 DL) と HLA-C 抗原とのリガンド適合度とは。

NK細胞受容体の一つである KIR 2 DL の KIR 2 DL 2 と KIR 2 DL 3 は HLA-C のアミノ酸配列 Ser77, Asp80 (Group1 エピトープ) と結合してNK細胞の活性化を抑制している。

KIR 2 DL1 は HLA-C の配列 Asp77, Lys80 (Group2 エピトープ) と結合してNK細胞の活性化を抑制している。HLA-C 抗原は以下に示すように Group1 か Group 2 のどちらかのエピトープを有する。

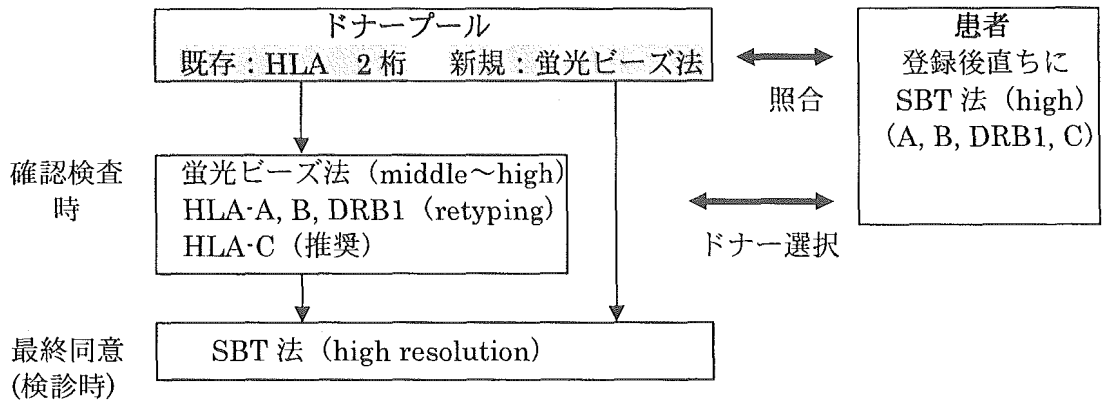
造血細胞移植ではドナー由来の造血細胞に置き換わるため、HLA-C 不適合移植においては、以下に示すように患者 (あるいはドナー) の KIR 2 DL と結合する HLA-C のエピトープが存在しない場合があり、このため患者 (あるいはドナー) の KIR 陽性細胞が活性化され、GVHD (あるいは拒絶) が生じる可能性がある。KIR の GVHD 方向 (拒絶方向) の不適合は通常のリンパ球による HLA 不適合とは逆方向になることに注意。

HLA-C エピトープ	HLA 型	
Group 1 (G1) (Ser77, Asp80)	血清型	Cw2, Cw4, Cw5, Cw6
	遺伝子型	Cw*0401, Cw*0501, Cw*0602, Cw*1502
Group 2 (G2) (Asp77, Lys80)	血清型	Cw 1, Cw3, Cw7, Cw8
	遺伝子型	Cw*0102, Cw*0302, Cw*0303, Cw*0304, Cw*0702, Cw*0704, Cw*0801, Cw*0803, Cw*1202 Cw*1402 Cw*1403

JMDP での頻度 G1 7.3% G2 92.7%

適合度	患者		ドナー		JMDP での頻度
GVHD 方向の不適合	G2	G2	G1	G2	4.6%
	G1	G1	G1	G2	
拒絶方向の不適合	G1	G2	G2	G2	5.8%
	G1	G2	G1	G1	
両方向の不適合	G1	G1	G2	G2	0.5%
	G2	G2	G1	G1	
適合	G1	G2	G1	G2	89.2%
	G2	G2	G2	G2	
	G1	G1	G1	G1	

図1.JMDPにおけるHLA検査とコーディネート（新システム）



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

厚生科学研究費補助金 (ヒトゲノム・再生医療等研究事業)

研究要旨

非血縁者間骨髄移植が行われた HLA-A,-B, -C, -DR, -DQ 一致例 100 組について、当研究室で設定し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におけるマーカーの一致率と、急性 GVHD 重症度との関係を解析した。HLA class-I 関連遺伝子が存在する染色体領域でのマーカー 20 種の解析では、第 6 番染色体に GVHD 発症と負の相関を示すマーカーが 1 種認められた。さらに、第 22 番染色体とケモカイン遺伝子がクラスター化している第 4、第 17 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、第 22 番染色体の 60 種のマーカーのうち 1 種に正の相関が、また 3 種に負の相関が認められた。また第 4 番染色体にも 2 種に正の相関が見られ、GVHD 発症に関わる遺伝子の存在が示唆された

A. 研究目的

造血幹細胞移植におけるドナー選択の際には、拒絶や重篤な GVHD(graft versus host disease)の発症を防ぐため、可能な限りドナーと患者の HLA を適合させて行われる。しかし、HLA が一致した症例においても、GVHD を発症する場合があります、重症度にも差が見られることが報告されている。この原因として HLA の他に免疫反応に関与するマイナー組織適合抗原(minor histocompatibility antigen,mHA)の存在が考えられる。しかし、現在まで 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

て非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、新たな mHA 遺伝子を同定することを試みている。今回は HLA class-I 関連遺伝子領域、および第 22 番染色体とケモカインクラスター領域について報告する。

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 組のみであったため、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、まず検索したい染色体領域に設定した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した。次に患者、ドナー間での繰り返し多型が同じ場合を一致、異なる場合を不一致と定義し GVHD 重症度と比較し統計学的解析を行った。今回我々が解析した領域とマーカー数は、HLA class-I 関連遺伝子が存在する第1,第6,第7,第19,第20番染色体上の計20種、ケモカイン遺伝子がクラスター化している第4,第17番染色体上の計14種、および第22番染色体長腕の14.0Mbから28.0Mbに存在する計60種である。

(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。

B. 研究結果

HLA-class I 関連遺伝子領域での計20種類のマーカーを用いた解析では第6番染色体長腕上のマーカー1種に負の相関が認められた。

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、60種のうち1種に正の相関が、また3種に負の相関が認められた(図1)。同じ50組で検討したケモカインクラスター領域の解析では第4番染色体上の2種に正の相関がみられた(図2)。

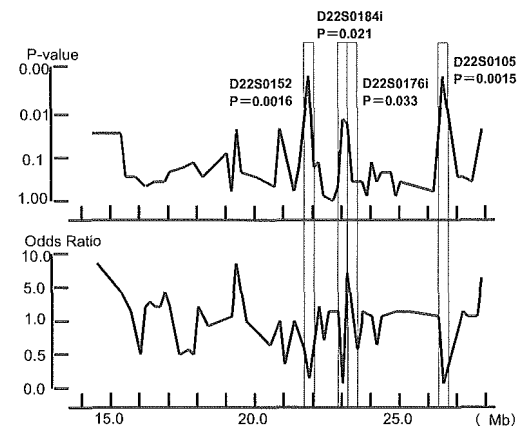


図1,第22番染色体14Mb-28Mbの解析結果(上段P値、下段 O.R)

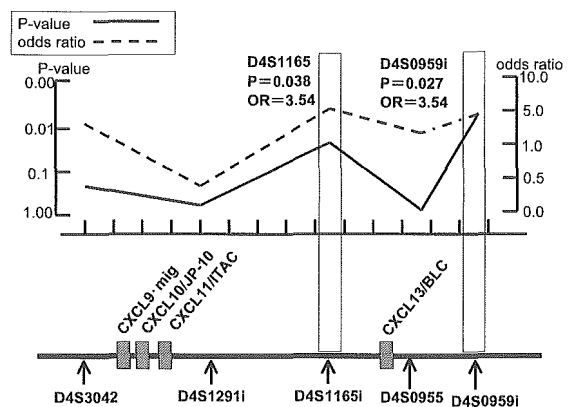


図2、ケモカインクラスター領域 4q21の解析結果

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、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、多くは HLA class-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、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、各染色体領域に設定し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の一致率と、急性 GVHD の重症度との関係を解析した。

まず我々は、HLA class-I 関連遺伝子に着目した(表 1)。これらは、HLA class-I 分子と組成的および構造的に極めて類似しており、ある程度の多型を有するため、現在報告されている機能の他にも免疫反応に重要な役割を果たしている可能性が考えられている。

遺伝子名	遺伝子座位
RAET-1(E,G,H,I,L,N)	6q25
AZGP1	7q22.1
CD1(A, B, C, D, E,)	1q21-23
MR1	1q25.3
FCGRT	19q13.3
EPCR	20q11.2

表1 今回解析した HLA-class I 関連遺伝子

今回我々が HLA class-I 関連分子領域 1q21-23, 6q25, 7q22.1, 20q11.2, 19q13.3 での計 20 種のマーカー解析では、6q25 に存在するマ-

ーカー 1 種が負の相関を示した。この領域は RAET-1(retinoic acid early transcript-1)遺伝子がクラスター化している領域である。RAET-1 遺伝子は最新の報告によると NK 細胞受容体と会合するといわれ、我々の結果は RAET-1 分子が、GVHD の発症に関与することが示唆された。

また我々は、GVHD 発症への関与が次々に明らかにされているケモカイン分子にも着目した。ケモカイン遺伝子がクラスター化している 4q21 および 17q11-21 について 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、4q21 の正の相関を示すマーカーが 2 種認められた。この 2 種のマーカーはケモカイン分子 CXCL13 を挟む形で存在するため、この分子がケモカイン作用のみならず、新たな組織適合抗原の可能性も示唆された。

最後に網羅的にアプローチする方法として常染色体の中で 2 番目に短い第 22 番染色体に着目した。第 22 番染色体長腕は 33.4Mb の塩基配列中に、545 個の遺伝子を高密度に含んでおり、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 28.0Mb に設定した 60 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。その結果 1 種に正の相関が、また 3 種に負の相関が認められた。よってこの付近に急性 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、さらに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 class-I 関連遺伝子領域の20種類のマイクロサテライトマーカーを用いて一致度を検索したところ6q25に設定した1種に負の相関が認められた。

また第22番染色体とケモカインクラスター領域において移植例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、ケモカインクラスター領域では2種に正の相関が、第22番染色体では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) Li S, Kawata H, Katsuyama Y, Ota M, Morishima Y, Mano S, Kulski JK, Naruse T, Inoko H: Association of polymorphic MHC microsatellites with GVHD, survival, and leukemia relapse in unrelated hematopoietic stem cell transplant donor/recipient pairs matched at five HLA loci. *Tissue Antigens* 63: 362-368, 2004.

2) Hui J, Oka A, Tomizawa M, Tay GK, Kulski JK,

Penhale WJ, Isachi SPA, Tamiya G, Inoko H: Identification of two new C4 alleles by DNA sequencing and evidence for a historical recombination of serologically defined C4A and C4B alleles. *Tissue Antigen* 63: 263-269, 2004.

3) Koishi S, Yamazaki K, Yamamoto K, Koishi S, Enseki Y, Nakamura Y, Oya A, Yasueda M, Asakura A, Aoki Y, Atsumi M, Inomata J, Inoko H, Matsumoto: Notch4 gene polymorphisms are not associated with autism in Japanese population. *Am J Med Genet* 125B: 61-62, 2004.

4) Mano S, Yasuda N, Katoh T, Tounai K, Inoko H, Imanishi T, Tamiya G, Gojobori T: Notes on the maximum likelihood estimation of haplotype frequencies. *Annals of Human Genetics* 68: 257-264, 2004.

5) Farjadian S, Naruse T, Kawata H, Ghaderi A, Bahram S, Inoko H. Molecular analysis of HLA allele frequencies and haplotypes in Baloch of Iran compared with related populations of Pakistan. *Tissue Antigens* 64: 581-587, 2004.

2. 学会発表

1) 橋本奈美、椎名 隆、勝山善彦、太田正穂、猪子英俊：LR-PCR法によるHLAクラス領域の多様性解析。第13回日本組織適合性学会大会、2004。

2) 成瀬妙子、志知大輔、吉川枝里、重成敦子、河田寿子、割田貴之、勝山善彦、太田正穂、猪子英俊：HLA領域におけるSNPs、マイクロサテライトのLDブロック解析。第13回日本組織適合性学会大会、2004。

3) 太田正穂、勝山善彦、成瀬妙子、猪子英俊、

佐田正晴、福島弘文：HLA 領域内マイクロサテライトのハプロタイプ解析.第 13 回日本組織適合性学会大会、2004.

4) 清水佐良子、椎名 隆、桜井敬之、安西達也、重成敦子、安藤麻子、坂本修一、小松賢志、猪子英俊：HLA クラス I 領域に位置する DNA 修復関連遺伝子 MDC1 の比較ゲノム解析および比較機能解析. 第 13 回日本組織適合性学会大会、2004.

5) Li S, Kawata H, Kikuchi T, Ota M, Morishima Y, Naruse T, Inoko H: Correlation between disparity for microsatellites markers and clinical outcome after unrelated HLA identical Hematopoietic stem cell transplantation. 第 13 回日本組織適合性学会大会、2004.

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)
研究協力者	平安恒幸	(東京都赤十字血液センター技術部)

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、HLA-C 抗原 KIR リガンド不一致症例を中心に新たに 95 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、昨年度までの解析症例と合わせて計 186 症例ペアと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昨年度と同様に、ドナーがプロファイル #4、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。KIR リガンド GVH 方向不適合時にドナー 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。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 抗原タイプングにより KIR リガンド特異性を適合させること及び KIR 遺伝子型タイプ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

近年 NK 細胞受容体 KIR (Killer Cell Ig-like Receptor) ファミリー分子がクラス I 抗原、特に HLA-C を認識することが明らかとなり移植成績との関連性が注目されるようになった。HLA-C は KIR により 2 種類 G1 (C2) ;Cw2,w4,w5,w6 および G2 (C1) ;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

一間の KIR リガンド適合性が造血幹細胞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 (本研究班一昨年度報告)。本研究では昨年度に引き続き、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

骨髓バンクを経由した HLA-A, B, DR 血清型一致非血縁者間骨髓移植約 2500 症例の中から GVHD 予防法としてシクロスポリン及び短期メトトレキセート投与、ATG 非投与、T 細胞除去未処理のもの約 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、昨年度解析した 91 ペア以外の症例から 95 ペアを選択し解析した。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昨年までの解析症例と合わせた 186 症例の結果と移植成績との関連を検討した。(表 1)。疾患の内訳は ALL(64), CML(47), ANLL(37), MDS(19), NHL(10), SAA(7), HD(1), ID(1) であった。

C. 研究結果

186 ペアの患者、ドナー KIR 遺伝子頻度は昨年までの 91 ペアの結果とほぼ同様であり各 KIR の頻度は患者、ドナー間で差は見られなかった (データ非提示)。

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、他集団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 プロファイルを決定した。昨年度の結果と同様に患者、ドナー共に半数近くの検体が #1 型であり他集団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。186 症例の患者、ドナーの KIR 型およびプロファイル型と移植成績との関連を検討した。図 1 に示すようにドナーが #4 プロファイルあるいは 2DS2, 2DL2 陽性者の場合に急性重度 (III-IV 度) GVHD 発症が高率であることが判明した。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 方向不適合時でドナーが 2DS2, 2DL2 陽性の場合に GVHD 発症が高いことが判明した (表 2、図 2)。2DL2 は 2DS2 との連鎖不平衡のために相関が得られたと考えられる。また #4 プロファイルは 2DS2 を含んでいる。一方昨年度観察された患者活性化型 KIR 陽性と白血病再発との相関については、症例数を増やした今回の解析では有意差はみられなかった。

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セート投与、

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（本研究班昨年度報告）。昨年度と同様に KIR ジェ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 は個体間でその種類、数が大きく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 ジェ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、Miyashita R, Tsuchiya N, Hikami K, Kuroki K, Fukazawa T, Bijl M, Kallenberg CG, Hashimoto H, Yabe T, Tokunaga K. Molecular genetic analyses of human NKG2C (KLRC2) gene deletion. *Int Immunol*. 2004 Jan;16(1):163-8.

学会発表

1、Toshio Yabe, Yasuo Morishima, Koichi Kashiwase, Masahiro Satake, Katsushi Tokunaga, Hidetoshi Inoko, Hiroo Saji, Takeo Juji, Ken Yamamoto, Takehiko Sasazuki, Yoshihisa Kodera, for the Japan Marrow Donor Program (JMDP). KIR genotype and HLA-C KIR ligand incompatibility promotes acute GVHD of unrelated bone marrow transplantation in Japan. the 8th Annual Meeting of the Society for Natural Immunity and 20th International Natural Killer Cell in The Netherlands. April. 2004.

2、屋部登志雄、宮下リサ、八幡真人、八幡信代、Peter Parham、土屋尚之、森島泰雄、小寺良尚、平安恒幸、柏瀬貢一、佐竹正博、徳永勝士 ヒト NK 細胞受容体 KIR, LIR 多型性と骨髄移植成績への影響 第 34 回日本免疫学会総会、学術集会 平成 16 年 12 月 1-3 日、札幌市

3、屋部登志雄、柏瀬貢一、高梨美乃子、徳永勝士、森島泰雄、佐竹正博 NK 細胞受容体 KIR 型適合性と骨髄移植成績：不適合は急性 GVHD 発症を高め生存率を低下させる 第 28 回日本血液事業学会総会 平成 16 年 9 月 13-15 日 横浜市

4、屋部登志雄 造血幹細胞移植における NK 細胞受容体適合性の意義 第 13 回日本組織適合性学会大会 特別講演 平成 16 年 9 月 23-25 日、豊中市

5、屋部登志雄、森島泰雄 ヒト NK 細胞

受容体KIR適合性とGVHD 第46回日本小児血液学会シンポジウム講演、平成16年10月22-23日、京都市

6、屋部登志雄、平安恒幸、柏瀬貢一、佐竹正博、森島泰雄 NK細胞受容体KIR、LILR型適合性と非血縁者間骨髄移植成績 第3回組織適合性学会近畿地方会シンポジウム講演 平成17年2月5日、大阪市

H. 知的財産権の出願、登録状況
なし

図1

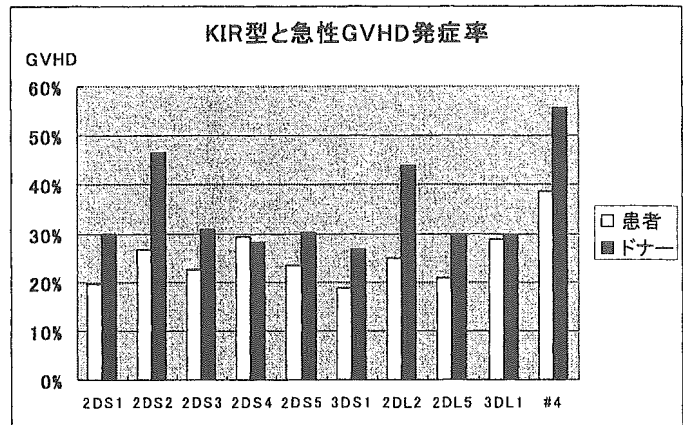


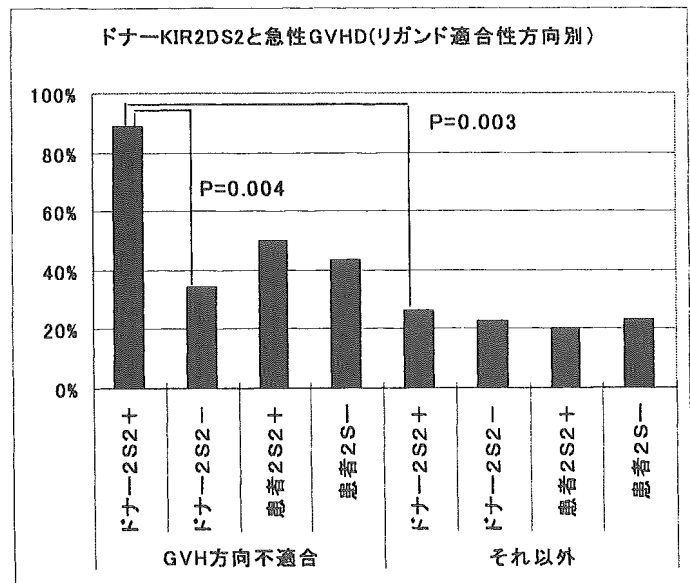
表2 急性GVHD発症とドナーKIR型

outcome		direction	KIR	n	GVHD%	p	
GVHD	high	donor	2DS2+	28	46.4%	0.02	
	high	donor	2DL2+	25	44.0%	0.07	
	high	donor	#4profile	9	55.6%	0.07	
	high	donor	GVH	2DS2+	9	88.9%	0.004
	high	donor	GVH	2DL2+	8	100%	0.0006
	high	donor	GVH	#4profile	4	100%	0.03

表1 KIRジェノタイプ解析検体

KIR適合	KIRリガンド		ジェノタイプ解析		
	患者	ドナー	n	%	n
適合	G1G1	G1G1	9	0.6%	0
	G2G2	G2G2	1202	81.9%	48
	G1G2	G1G2	106	7.2%	32
不適合	G1G1	G1G2	0	0.0%	0
	G2G2	G1G2	64	4.4%	50
拒絶方向	G1G2	G1G1	3	0.2%	3
	G1G2	G2G2	82	5.6%	51
双方向	G1G1	G2G2	1	0.1%	1
	G2G2	G1G1	1	0.1%	1
計			1468		186

図2



IV. 研究班会議発表者報告文書

第一回研究班会議：平成16年6月19日

第二回研究班会議：平成17年1月28日(1日目)

平成17年1月29日(2日目)

(再掲)

IV. 研究班会議発表者報告書

1. 平成16年度第一回研究班会議

2004年6月19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	139
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
厚生労働省挨拶	
井内 努	厚生労働省健康局疾病対策課臓器移植対策室
分担研究報告	
テーマ I. 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	140
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
2. 日本造血細胞移植学会における各種造血細胞移植登録システム一元化の取り組み	145
山本一仁 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
3. 第5回国際骨髄バンク会議報告	147
岡本真一郎	慶應義塾大学医学部 内科
4. FK506を用いた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	152
一戸辰夫	京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学
5. AM9802(磁気細胞分離システム)臨床試験HLA2,3抗原不一致血縁者間同種造血幹細胞移植に関する研究	154
谷口 修一	虎の門病院 血液科
6. HLA haploidentical ミニ移植	155
小川啓恭	大阪大学大学院医学系研究科 分子病態内科学
7. 高齢者白血病に対する標準的前処置を用いた臍帯血移植の成績	157
高橋 聡 ^① 浅野茂隆 ^②	①東京大学医科学研究所 先端医療研究センター ②(財)パブリックヘルスリサーチセンター
8. 膠原病とくに強皮症に対する末梢血幹細胞移植に関する研究	159
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. 難治性膠原病に対する自己末梢血純化CD34陽性細胞移植	161
長藤宏司 原田実根	九州大学医学部大学院医学研究院 病態修復内科学
10. マイナー抗原を標的とした養子免疫療法の準備状況	165
赤塚美樹	愛知県がんセンター研究所 腫瘍免疫学部
11. GVL効果を惹起するmHaの研究ー接着多型分子とHA-1分子の重要性	166
片桐孝和、塩原信太郎、中尾眞二	金沢大学大学院医学系研究科 保健学科/輸血部/機能再生学
12. MHCテトラマーによるウイルス特異的細胞障害性T細胞(CTL)のモニタリングの有用性と治療への応用	168
谷ヶ崎 博 工藤寿子 小島勢二	名古屋大学大学院医学系研究科 小児科
13. 造血幹細胞移植後の難治性CMV感染症、アデノウイルス感染症に対するドナーCD4T細胞輸注療法プロトコール(案)	169
伊藤仁也 ^① 清水則夫 ^② 森尾友宏 ^②	①神戸先端医療センター 再生医療研究部 ②東京医科歯科大学医学部附属病院 細胞治療センター
14. 抑制性NK細胞受容体発現T細胞のGVHD/GVL制御への応用	174
田中淳司 今村雅寛	北海道大学大学院医学研究科 血液内科学

15. 同種骨髄移植における UGT2B17 遺伝子欠損の影響	176
寺倉精太郎 村田 誠	名古屋大学大学院医学系研究科 病態内科
16. 骨髄内骨髄移植の有用性	178
池原 進	関西医科大学 第一病理学/移植センター/再生医学難病治療センター
テーマⅡ. 同種末梢血造血幹細胞移植	
17. KG1a 細胞を用いた CD34 陽性細胞測定の精度管理	179
比留間 潔 坂巻 壽	東京都立駒込病院 造血細胞移植チーム
18. 健常人ドナーアフエーシスの安全性に関する検討	180
小林直樹 笠井正晴	札幌北楡病院 血液内科
テーマⅢ. 造血幹細胞移植と組織適合性抗原	
19. HLA-DP 抗原適合の臨床的意義	181
山本 健① 笹月健彦② 成瀬妙子③ 猪子英俊③ 丸屋悦子④ 佐治博夫④	
屋部登志雄⑤ 十字猛夫⑥ 柏瀬貢一⑤ 森島泰雄⑦	／組織適合抗原部会
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	⑤東京都赤十字血液センター 技術部・研究一課
③東海大学医学部 分子生命医学	⑥日本赤十字社中央血液センター
④特定非営利活動法人 HLA 研究所	⑦愛知県がんセンター病院 血液・細胞療法部
20. JMDP を介した非血縁者間造血幹細胞移植における HLA 遺伝子型ミスマッチの検討	182
川瀬孝和 赤塚美樹 森島泰雄	愛知県がんセンター／組織適合抗原部会
21. ゲノムワイドなマイナー組織適合抗原遺伝子の検索	184
成瀬妙子 猪子英俊	東海大学医学部 分子生命医学
22. NK 細胞受容体と非血縁者間造血幹細胞移植： LIR 領域の解析	186
屋部登志男 柏瀬貢一	東京都赤十字血液センター 技術部・研究一課
森島泰雄	愛知県がんセンター病院 血液・細胞療法部
23. 日本列島人を対象とした蛍光ビーズ法による HLA-A および B ローカス DMA タイピング法の開発 その現状と 919 組の非血縁者間骨髄移植におけるリタイピング結果	187
柏瀬貢一	東京都立赤十字血液センター 技術部・研究一課
森島泰雄	愛知県がんセンター病院 血液・細胞療法部
24. 炎症性サイトカイン阻害因子： IL - 10 Promoter 多型性と a-GVHD の相関 — IL-10 高分泌型は a-GVHD を抑制するか？ —	189
丸屋悦子 佐治博夫	特定非営利活動法人 HLA 研究所
25. 移植後間質性肺炎と遺伝子多型性に関する研究	191
鬼塚真仁 堀田知光	東海大学医学部 内科学第四内科

平成16年度厚生労働科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業

「骨髄等を利用した効率的な造血幹細胞移植の
運用・登録と臨床試験体制の確立に関する研究」班

主任研究者報告

名古屋第一赤十字病院
小寺良尚
平成16年6月19日、名古屋

平成15年度、16年度の分担研究課題と進捗状況

1. 非血縁者間造血幹細胞移植と骨髄バンクの効率的選用に
関する研究
同種末梢血幹細胞ドナー安全情報の深化
2. 自家造血幹細胞移植と海外骨髄バンクの適正選用に
関する研究
海外骨髄バンク最新情報の把握、特にPBSCCTの
応用状況について
3. HLA不適合造血幹細胞移植の臨床試験体制の
確立と適正選用に
関する研究 —母児間移植—
第I、II相試験の進展
4. HLA不適合造血幹細胞移植の臨床試験体制の
確立と適正選用に
関する研究 —成分移植—
第I、II相試験の進展

5. 各種造血幹細胞移植の患者及、ドナーの登録
システムの一元化とその運用方法に関する研究
学会との共同作業による登録システム一元化の
進展
6. 膠原病に対する造血幹細胞移植療法のための
臨床試験体制の確立と実施に関する研究
班員、研究協力者施設における症例の蓄積、
有用性の確立
7. 活性化CD-4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
前臨床試験症例の蓄積、臨床試験の仕組みに
つき考察中
8. ウイルス抗原特異的T細胞によるDLIのための
臨床試験体制の確立と実施に関する研究
前臨床試験実施中

9. マイナー抗原特異的T細胞によるDLIのための
臨床試験体制の確立と実施に関する研究
特許申請済み、プロトコール作成済み、
症例特徴中
10. 造血幹細胞の骨髄内直接移植法に関する研究
海外とに共同研究考察中
11. 造血幹細胞移植の潜在需要の策定とその
充足法に関する研究
潜在需要、大略試算済み

12. 造血幹細胞移植における組織適合性抗原の
関与
13. HLA-DNAタイピングの意義
14. ゲノムワイドな組織適合遺伝子の検索
15. 造血幹細胞移植におけるNK細胞受容体の
解析

12～15:骨髄移植推進財団との共同研究進展、
ドナーHLA情報のDNAタイピング化準備中

16. 同種末梢血幹細胞移植の有用性に関する
研究(1)
17. 非血縁者間末梢血幹細胞移植の有用性と
採取に関する研究
18. 同種末梢血幹細胞移植の有用性に関する
研究(2)

16～18:
課題-1と連動して、同種末梢血幹細胞ドナー
安全情報の深化並びに、移植の成功に必要
な細胞数下限の設定

平成15年度厚生労働科学研究ヒトゲノム、再生医療等研究事業

「骨髄等を利用した効率的な造血幹細胞移植の運用、登録と臨床試験体制の確立に関する研究」(主任研究者:小寺良尚)班

分担研究課題

非血縁者間造血幹細胞移植と骨髄バンクの効率的運用に関する研究

分担研究者

小寺良尚

名古屋第一赤十字病院内科

平成16年6月19日 於 名古屋

非血縁者間造血幹細胞移植の需要予測

登録年齢原則0～50歳としての、JMDFにおける年間新規登録患者数:1,500名(年間実施例数:750例、供給率:50%)、150名/5歳区切り(この数字は昨年実績であり、既に脐帯血移植、HLA不適合移植、グリベック等の影響は相殺されていると考えられる)

白血病年間発生:0～50歳:3/100,000、50～60歳:6/100,000
登録年齢65歳までが“常態”となると、50～65歳の年間新規登録患者:150人×3区切り×2倍発生率=900人

骨髓異形性症候群:～50歳のMDS 4人に対し50～65歳は15人
(Winthro, 第9版, 1991)

従って50～65歳では現在の4倍の需要、JMDFのMDSに対する移植実績:70例/年、70例×50%供給率×4=560人

即ち、非血縁者間造血幹細胞移植(主として骨髄移植)の需要は、対象年齢上限65歳が“常態”になるとすると、900人+560人=1,460人/年増加すると推測される。

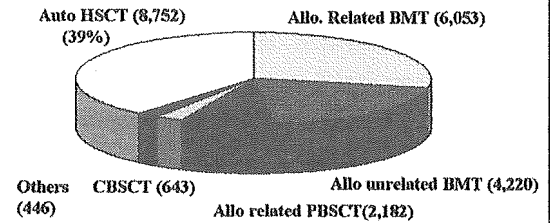
非血縁者間造血幹細胞移植の需要(まとめ)

1,500人(現行)+1,460人(50～65歳)=約 3,000人/年
2003年骨髄バンク移植実績:737人
さい帯血/バンクネットワーク移植実績:504人、計 1,331人/年

需要の残り1/2強を満たすために、

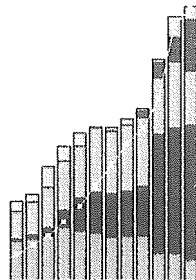
1. 骨髄バンクにおけるドナープールサイズ(現在180,000人)の拡大と患者登録～移植実施期間の短縮(一次検査DNAタイピング化、日程調整のための凍結保存)、末梢血幹細胞採取法の導入
2. 保存脐帯血数(現在約20,000)の拡大
3. HLA Class-II一産不適合非血縁ドナーの利用
4. 母児間免疫寛容ドナーの利用
5. CD34+細胞移植
6. 自家造血幹細胞移植

Status of HSCT in Japan
Cumulative case numbers according to the stem cell source
Dec. 2003, JSHCT



Status of HSCT in Japan
(As of Dec. 2003, JSHCT, JMDF, JCBSC Network) cumulative

- Others
- CBSCT
- Auto BMT+PBSCT
- Allo related PBSCT
- Allo-UR-BMT
- Allo-related BMT
- Cumulative



同種末梢血幹細胞移植の、非血縁ドナーへの適用のために

血縁ドナーの安全性に関する情報