

厚生労働科学研究ヒトゲノム、再生医療等研究事業
 「骨髄、末梢血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並びにドナーの安全確保に関する研究」班
 平成17年度第2回研究会議 平成18年1月27日

NK細胞受容体KIR遺伝子型 と非血縁者間骨髄移植成績

東京都赤十字血液センター
 屋部登志雄、柏瀬貢一、平安恒幸

愛知県がんセンター中央病院
 森島泰雄

小寺班組織適合性部会

KIRリガンド適合性

リガンド特異性 C1 Cw1,3,7,8 (92%) Cw2,4,5,6 (8%)

KIRリガンドGVH方向不適合 (KIR-L-MM)

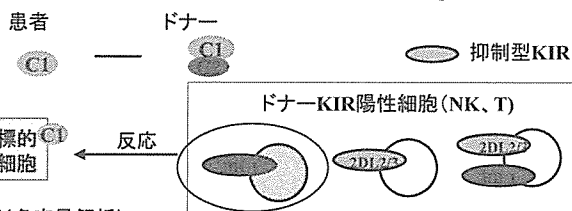
患者にドナーのリガンドが不在の場合 (Missing Self モデル)

組み合わせ	患者	ドナー	JMDP頻度
C2不在	C1	Cw2,4,5,6	2 (<0.1%)
	C1	C1	141 (6%)
C1不在	Cw2,4,5,6	C1	1 (<0.1%)
	Cw2,4,5,6	Cw2,4,5,6	5 (0.2%)

KIRリガンド不適合と移植成績 (森島)

KIRリガンドGVH方向不適合 (KIR-L-MM)

患者にドナーのリガンドが不在の場合 (Missing Selfモデル)



成績 (多変量解析)

リガンド不適合 (適合vs不適合)	急性GVHD(3-4)	白血病再発 (N=1867)	死亡率(白血病 N=1868)
	HR 95%CI p-value	HR 95%CI p-value	HR 95%CI p-value
GVH vector	1.79 1.30-2.47 <0.001	1.65 1.01-2.72 0.045	1.66 1.29-2.14 <0.001
HVG vector	1.24 0.87-1.78 0.229	0.71 0.39-1.31 0.278	1.03 0.79-1.36 0.778

*Adjusted for age, sex, donor age, sex-mismatch, disease, GVHD prophylaxis, TBI conditioning, leukemia status, HLA matching and KIR matching.

リガンド-リガンドモデル

KIR遺伝子型とリガンドの適合性1、抑制型KIR

リガンド特異性 抑制型KIR Cw1,3,7,8 2DL1/2/3 Cw2,4,5,6 2DL1

抑制型KIR陰性の場合

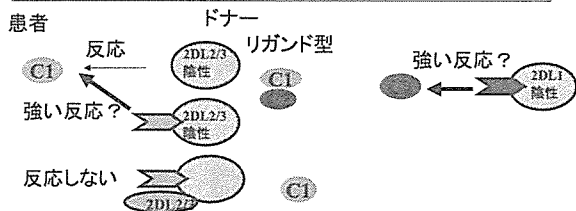


リガンド	KIR	JMDP (N=426)
C2	2DL1	99%
C1	2DL2	14%
C1	2DL3	99%
Bw4	3DL1	94%

JMDPでは抑制KIR遺伝子型不適合はない
 細胞表面発現解析が必要(リガンド型から推定)

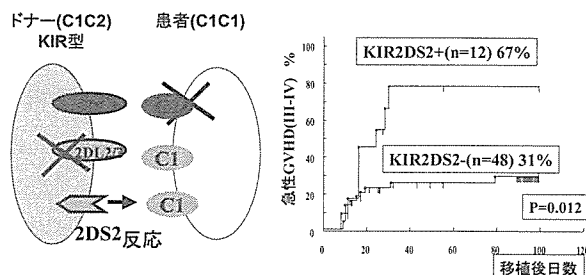
KIR遺伝子型とリガンドの適合性 2、活性化型KIR

リガンド特異性 活性化型KIR Cw1,3,7,8 2DS2 2DS1 Cw2,4,5,6



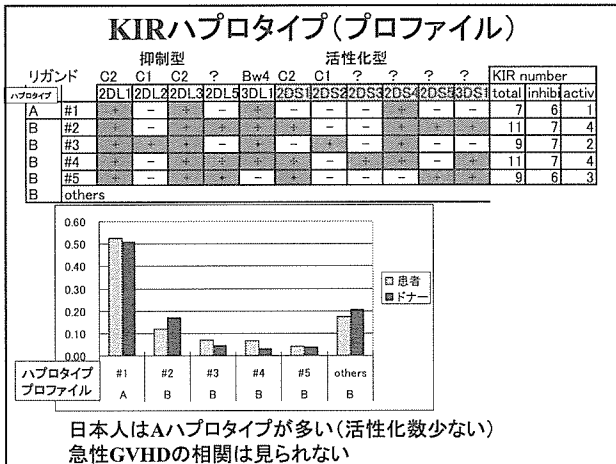
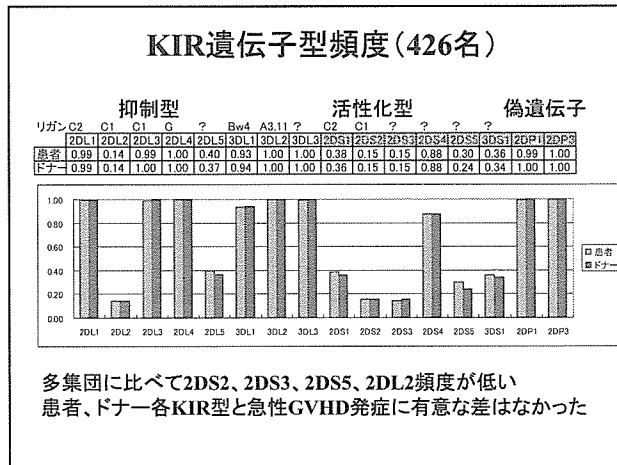
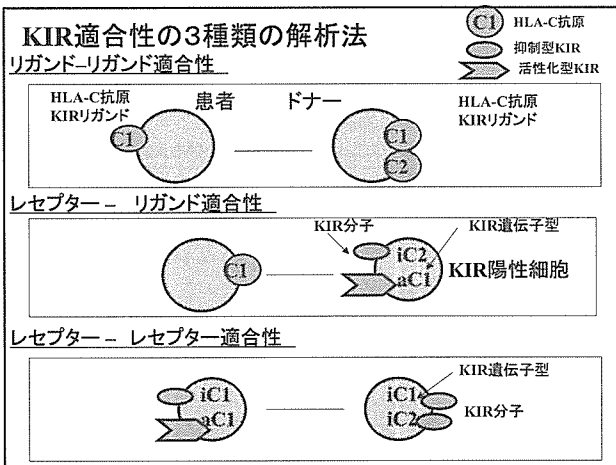
抑制KIR頻度	JMDP (N=426)
C2	2DS1 37%
C1	2DS2 15%

ドナーKIR2DS2遺伝子と急性GVHD (III-IV) (リガンドGVH方向不適合KIR-L-MMの場合)



抑制型リガンド不適合時にドナー活性化KIR遺伝子2DS2の
 リガンド(C1)が患者に存在すると急性GVHD発症が高い

レセプター-リガンドモデル



KIR遺伝子型と移植成績(他のモデル)

- KIR遺伝子数**
ドナーKIR数(7<)でaGVHD低く生存良い UR(104) DeSantis(2004)
ドナー活性化KIR数(3<)でaGVHD高い Rハプロ(62) Bishara(2003)
患者、ドナーでの抑制、活性化をスコアにする(0<) aGVHD高い UR, AML(65) Sun(2005)
- ドナーKIR型**
2DS1,2DS2陽性で再発低い R一致(65) Verhyden(2005)
2DS2陽性-患者C2ホモで生存悪い R一致Myeloid(112) Cook(2004)
- 患者、ドナーKIR型比較**
ドナーKIR>患者KIRの時にaGVHD高い UR(41) Gange(2002)
- Missing Ligand**
患者に抑制KIRのリガンド不在だと再発低く、生存良い R一致(178) (AML) Hsu(2005)

JMDPではいずれのモデルも当てはまらなかった

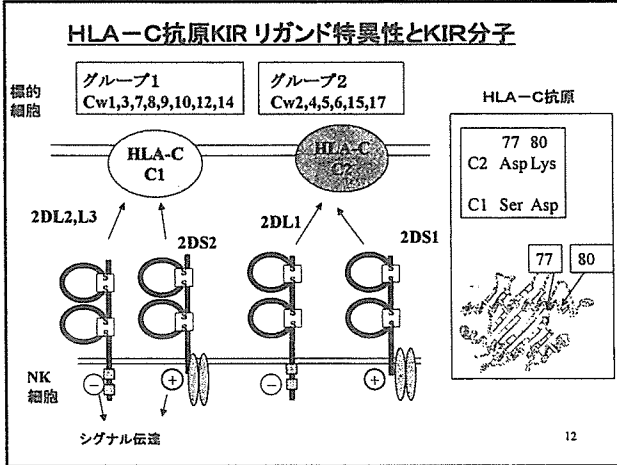
まとめ

抑制型が働かない時にドナー活性化KIRに対する患者リガンドが存在すると急性GVHD発症が高まる

他グループから報告されたKIR遺伝子型と成績との相関モデルはJMDPには当てはまらなかった

今後

- 多変量統計解析
- KIRアリルレベルの解析
- 活性化KIR発現細胞の同定および作用機序の解明



Clinical Significance of HLA Matching in Patients Transplanted Non-T Cell Depleted Marrow from Unrelated Donor.

Japan Marrow Donor Program (JMDP)

Takehiko Sasazuki, Yasuo Morishima, Toshiro Yabe, Kouichi Kashiwase, Takeo Juji, Taeko Naruse, Hidetoshi Inoko, Etsuko Maruya, Hiroo Saji, Seiji Ogawa, Shunichi Kato, Yoshihisa Kodera.

Matsuo Keitaro (Statistics)
HLA committee of JMDP,
Staff of JMDP Transplant Center, Donor Center, Office and Coordinator.

2423 patients

- transplanted non-T cell depleted marrow.
- Myelo-ablative conditioning regimen.
- HLA-A, B and DR serological match.
- HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 and DPB1 allele type were retrospectively analyzed in all pairs.
- Patient age 0-59 (med. 25) years old
- Donor age 20-52 (med. 35) years old
- GVHD prophylaxis
Cyclosporine based 1563 Tacrolimus based 601 +ATG based 259
- Disease
AML 602 ALL 658 CML 627 MDS 204 AA 173 ML 97 HD 62

Statistical Method

Multivariate analysis by a Cox regression model

Hazard Ratio (HR) of

Acute GVHD, Chronic GVHD, Rejection in all patient.
Relapse and Survival in leukemia patient.

Co-variant

HLA-A, -B, -C, -DRB1, DQB1, DPB1 matching
Patients age, Donor age, Sex, Sex matching,
GVHD prophylaxis, TBI,
Disease, Leukemia risk (stage of transplantation)

HLA allele matching

	All patients (n=2423)	AML (n=602)	ALL (n=658)	CML (n=627)
HLA allele mismatch* (%)				
HLA-A	18.9	18.4	18.7	21
HLA-B	9	7.7	9.1	10.2
HLA-C	34	32.4	31.9	34.6
HLA-DRB1	20.8	19.6	23.6	21.2
HLA-DQB1	23.5	20.1	26.7	24.7
HLA-DPB1	74.9	74.2	77.5	74.3

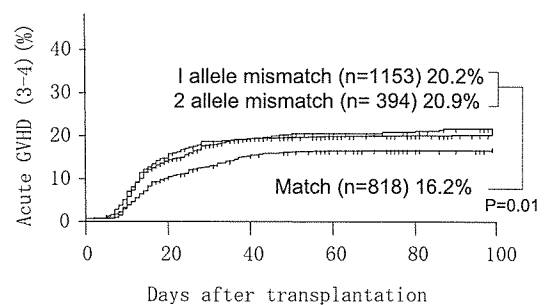
* GVH vector and/or HVG vector.

HLA matching and acute GVHD

<Multivariate analysis by Cox regression models>

	A-GVHD (grade 2-4)		A-GVHD (grade 3-4)	
	HR	p	HR	p
HLA allele mismatch				
HLA-A	1.25	0.005	1.36	0.007
HLA-B	1.40	0.002	1.44	0.011
HLA-C	1.39	<0.001	1.75	<0.001
HLA-DRB1	1.20	0.086	1.25	0.143
HLA-DQB1	1.09	0.401	1.18	0.248
HLA-DPB1	1.38	<0.001	1.25	0.036
Significant clinical factor				
	Pt. age	Donor age	Pt. age	Donor age
	Stage of leukemia		Disease	
	GVHD prophylaxis		Stage of leukemia	
			GVHD prophylaxis	

HLA-DPB1 matching and acute GVHD (3-4)



HLA matching and chronic GVHD

<Multivariate analysis by Cox regression models>

	HR	(95%CI)	p
HLA allele mismatch			
HLA-A	1.37	(1.09-1.75)	0.008
HLA-B	1.09	(0.77-1.55)	0.628
HLA-C	1.36	(1.11-1.65)	0.003
HLA-DRB1	1.05	(0.77-1.44)	0.753
HLA-DQB1	1.12	(0.83-1.51)	0.451
HLA-DPB1	0.88	(0.73-1.05)	0.161
Significant clinical factor	Pt. age	Disease TBI	
	Leukemia stage at Transplant		
	GVHD prophylaxis		

HLA matching and rejection

<Multivariate analysis by Cox regression models>

	HR	(95%CI)	p
HLA allele mismatch			
HLA-A	0.66	(0.25-1.70)	0.391
HLA-B	1.53	(0.57-4.12)	0.567
HLA-C	1.64	(0.84-3.19)	0.144
HLA-DRB1	0.44	(0.13-1.48)	0.186
HLA-DQB1	0.92	(0.33-2.54)	0.875
HLA-DPB1	0.99	(0.52-1.88)	0.970
Significant clinical factor	GVHD prophylaxis		
	Transplanted cell number		

HLA matching and leukemia relapse

<Multivariate analysis by Cox regression models>

	HR	(95%CI)	p
HLA allele mismatch			
HLA-A	1.23	(0.93-1.62)	0.151
HLA-B	1.00	(0.64-11.6)	0.984
HLA-C	0.72	(0.56-0.93)	0.013
HLA-DRB1	1.04	(0.72-1.48)	0.849
HLA-DQB1	1.08	(0.33-2.54)	0.875
HLA-DPB1	0.70	(0.57-0.86)	0.001
Significant clinical factor	Disease		
	Stage of Transplant		

HLA-C: ALL
HLA-DPB1: CML

HLA matching and survival in leukemia patients (n=1868)

<Multivariate analysis by a Cox regression model>

	HR	p
HLA allele mismatch		
HLA-A	1.36	(1.17-1.58)
HLA-B	1.39	(1.13-1.71)
HLA-C	1.30	(1.13-1.49)
HLA-DRB1	0.98	(0.79-1.20)
HLA-DQB1	1.25	(1.03-1.52)
HLA-DPB1	1.08	(0.94-1.26)
Significant clinical factor	Pt. age	Donor age
	Leukemia risk	

Summary

Significant HLA allele mismatch

HLA	A-GVHD	C-GVHD	拒絶	再発*	生存*
A	↑↑	↑			↓↓
B	↑↑				↓↓
C	↑↑	↑		↓ ALL	↓↓
DRB1					
DQB1					↓
DPB1	↑			↓ CML	

* leukemia case

厚生労働科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業

「骨髄、末梢血等を利用した効率的な造血細胞移植の運用・登録と臨床試験体制の確立並びにドナーおよびレシピエントの安全確保と QOL 向上に関する研究」班 平成17年度第二回研究会議

I.4, マイクロサテライトマーカーを用いた造血幹細胞移植関連遺伝子の探求

1,2 鬼塚真仁、菊地智樹 3, 1 李素雲、1 猪子英俊 1 東海大学基礎医学系分子生命科学, 2 東海大学内科学系血液腫瘍内科, 3 札幌医科大学病理学

はじめに

造血幹細胞移植において最も特徴的な点は、ドナーおよびレシピエントの免疫遺伝学的背景が結果に重大な役割を果たすということである。我々は、分子遺伝学的手法によりドナーとレシピエントの遺伝子解析を行い、移植成績に影響を与える候補遺伝子の検索をおこなってきた。

マイクロサテライトマーカーについて

マイクロサテライトとは遺伝子配列の中に2塩基〜6塩基程度の短い反復配列であり、このマイクロサテライト配列は高度な多型性を示し、全ゲノム中約120万個存在し、比較的偏り無く散在している。我々の教室ではこのマイクロサテライトマーカーを約30,000個(1個/100kb)収集・設定するプロジェクトを完了させており、全染色体に多型マイクロサテライトマーカーを配置したゲノムワイドな遺伝的相関解析を可能とした。

遺伝的相関解析とは、単純化すると疾患遺伝子座周辺で距離に依存した一様な連鎖不平衡パターンを期待し、疾患発症と関連して有意差を示したマーカー近傍に目的とする原因遺伝子の存在を予測する方法である。

ゲノムワイドなマイクロサテライトマーカーによる探索

22番染色体に存在する約545個の遺伝子に対してマイクロサテライトマーカーを用いて、造血幹細胞移植後GVHD関連遺伝子を探索した(Table1)。

候補遺伝子近傍のマイクロサテライトマーカーを利用した探索

Table2にある遺伝子に関して多型解析を施行した。再発率に影響を与えるマーカーとGVHDの重症度に関係するマーカーが発見された。

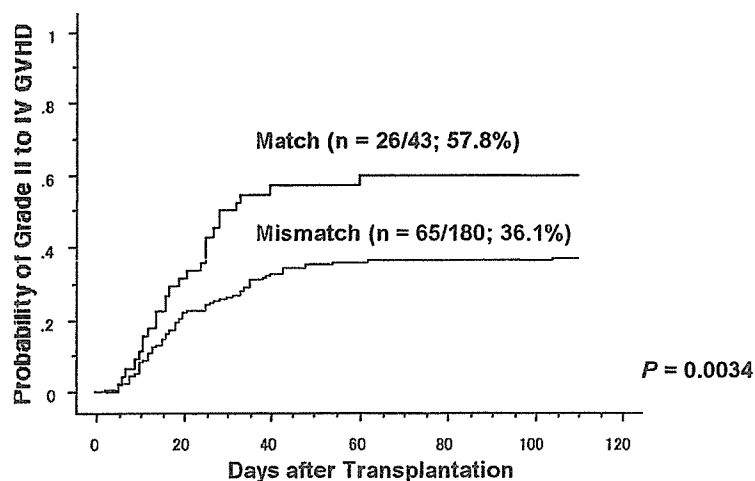
結果:ドナーとレシピエント間で遺伝子多型が不一致である場合だけでなく、一致している場合にGVHDのリスクとなるいくつかのマーカーが存在した。今後はマイクロサテライトマーカーの利点である遺伝情報の豊富な点と、SNP解析の結果の両者を用いたより精度の高い探索をおこなう予定である。

Table 1. Statistically Significant markers about mismatch

Marker	Position	aGVHD grade0		aGVHD gradeIII+IV		Odds Ratio(95% CI)	P
		Match	Mismatch	Match	Mismatch		
D22S267i	22q11.21	38	2	23	7	5.78(1.10-30.24)	0.028
D22S0152i	22q11.23	25	15	29	1	0.05(0.01-0.41)	0.0005
D22S0145i	22q11.23	8	32	14	16	0.29(0.10-0.82)	0.017
Z66750	22q12.1	28	12	28	2	0.17(0.03-0.81)	0.014
D22S0085i	22q12.3	6	34	11	19	0.30(0.10-0.96)	0.035
D22S0220i	22q12.3	17	23	4	26	4.80(1.41-16.35)	0.008
D22S683	22q12.3	6	34	0	30	11.86(0.64-219.35)	0.027
D22S0197i	22q13.33	16	24	22	8	0.24(0.087-0.67)	0.005

Table 2. Candidate genes analysis

Position	Target Gene	association
1q21-25	CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, MR1	n.s
7q22.1	AZGP1	relapse rate
19q13.3	FCGRT	n.s
19q13.4	LILRA1, LILRB1	n.s
20q11.2	EPCR	n.s
6q25	RAET1E~N	GVHD



IL-10/ IL-10 Receptor β 多型性と急性GVHD

佐治博夫、丸屋悦子、一戸辰夫、玉木茂久
特定非営利活動法人 HLA研究所
京都大学医学部 血液・腫瘍内科
山田赤十字病院 内科

Patient characteristics

(n=101)			
Gender : Male/Female	43/58		
Age: ≥ 16 y.o., $< 36 \leq 16$ y.o.			
Diagnosis:		Status at SCT:	
malignancy	92	CR/CP	40
non malignancy	9	other	61
GVHD Prophylaxis		Conditioning regimen:	
CSAMP	16	TBI regimen	63
MTX	17	non-TBI regimen	38
CyA+MTX	55		
FK+MTX	2	ATG regimen	3
mPL+CyA	4	non-ATG regimen	98
other	7		

IL-10 /-592 polymorphism (A/C) and Grades II /III Acute GVHD 101 Japanese Transplants (HLA ID sibling pairs)

IL-10 position -592	# of Recipients	Incidence of GVHD (odds)		#of Donors	Incidence of GVHD	
		\geq III	\geq II		\geq III	\geq II
A/A or A/C	89	3.4% (1.0)	18% (1.0)	90	7%	22%
C/C	12	25.0%* (7.3)	33% (1.7)	11	0%	18%

*p < 0.05

Not significant

Gene Frequencies of IL-10 promoter polymorphism (position -592) A/C

	IL-10 /-592			
	Tested Number	A	C	expected C/C
Japanese	297	0.64	0.36	<u>0.13</u>
American	570	0.28	0.72	<u>0.52</u>

high producer low producer

Gene Frequencies for -592 (A/C) of IL-10 gene reported in different populations

Population	number	-592(A/C) gene frequency		expected C/C	Reference
		A	C		
Korea	179	0.70	0.30	0.09	Roh et al., (2002)
Singapore (Chinese)	81	0.67	0.33	0.11	Meenagh et al., (2002)
Southern-China	83	0.67	0.33	0.11	Mok et al., (1998)
Japanese	297	0.64	0.36	0.13	Our data
Sami (aboriginal inhabitants of Norway and Fennoscandinavia)	200	0.56	0.44	0.19	Torkildsen et al., (2005)
U.S. African-American	99	0.44	0.56	0.31	Rady et al., (2004)
U.S. Hispanic	99	0.42	0.58	0.34	Rady et al., (2004)
U.S. Black	55	0.41	0.59	0.35	Hoffmann et al., (2002)
South-Africa, Zulu ethnic group	84	0.34	0.66	0.44	Meenagh et al., (2002)
Northern Italy, Brescia (Caucasian)	143	0.31	0.69	0.48	Chiavetto et al., (2002)
Northern Italy, Milan (Caucasian)	363	0.29	0.71	0.50	Poli et al., (2002)
Caucasian	570	0.28	0.72	0.52	Lin et al., (2003)
Germany	340	0.28	0.72	0.52	Koch et al., (2001)
France (Strasbourg)	140	0.25	0.75	0.56	Donger et al., (2001)
Norway	87	0.24	0.76	0.58	Myhr et al., (2002)
U.S. Caucasian	97	0.24	0.76	0.58	Rady et al., (2004)
U.K. Scotland (Glasgow)	349	0.23	0.77	0.59	Donger et al., (2001)
U.S. Ashkenazi Jew	76	0.23	0.77	0.59	Rady et al., (2004)
Poland (Caucasian)	166	0.22	0.78	0.61	Kosv et al., (2000)
U.K. (Manchester, London)	295	0.21	0.79	0.62	Coakley et al., (1998)
U.K. (Northwest England)	238	0.21	0.79	0.62	Tumer et al., (1997)
Dutch	162	0.18	0.82	0.67	Rood et al., (1999)
U.K., Caucasian (Southeast England)	152	0.16	0.84	0.71	Reynard et al., (2000)

Sever
GVHD risk
factor



Table 3. Multivariate analysis of grades 2 to 4 acute GVHD for patients aged 20 years and older

Ethnic group	N	Relative risk (95% CI)	P
Japanese	510	1.00 ←	NA
White American	317	1.77 (1.42-2.24)	<.001†
African American	97	1.84 (1.19-2.87)	.006†
Scandinavian	150	0.94 (0.65-1.37)	.89
Hispanic	92	2.22 (1.53-3.23)	<.001†

Other significant comparisons: Scandinavian vs hispanic (RR = 0.42, 95% CI, 0.27-0.67, P = .002); Scandinavian vs white American (RR = 0.53, 95% CI, 0.36-0.75, P = .002)†

NA indicates not applicable.
 † degrees of freedom test, P < .001.
 ‡ Adjusted for 10 multiple comparisons.

Population	no.	Allele Freq	expected C/C
Japanese	297	0.56	0.31
Sami (aboriginal inhabitants of Norway and	200	0.44	0.19
U.S. African American	99	0.66	0.43
U.S. Black	55	0.59	0.35
South Africa, Zulu ethnic group	84	0.68	0.46
Caucasian	570	0.72	0.52
U.S. Caucasian	92	0.76	0.58
U.K., Scotland (Glasgow)	349	0.77	0.59
U.S. Ashkenazi Jew	76	0.77	0.59
Poland (Caucasian)	166	0.78	0.61
U.K. (Manchester, London)	295	0.79	0.62
U.K. (Northwest England)	238	0.79	0.62

IL-10 Receptor β /238 polymorphism (A/G) and Grades II /III Acute GVHD 99 Japanese Transplants (HLA ID sibling pairs)

IL-10 R β c238	# of Recipients	Incidence of GVHD		# of Donor	Incidence of GVHD	
		\geq III	\geq II		\geq III	\geq II
G/G	26	G+	27%	27	G+	30%
A/G	52	8%	19%	57	7%	18%
A/A	21	0%	10%	15	0%	7%
Odds		16.0	2.6	11.5		3.8
		P<0.05				P<0.05

Association between IL-10 R β & a-GVHD - Comparison: Japanese with Caucasian \geq Grade III

IL-10 R β c238	Japanese		Caucasian	
	%	Odds	%	Odds
G/G	15%	4.8	12%	0.6
A/G	4%	1.0	17%	0.8
A/A	0%	0	21%	1.0

Gene Frequencies of IL-10 Receptor β polymorphism (position 238) A/G

	IL-10 Receptor β			
	Tested Number	G	A	expected A/A
Japanese	202	0.53	0.47	<u>0.22</u>
American	814	0.26	0.74	<u>0.55</u>

Combined Analysis of IL-10 promoter -592 (Recipient)/ IL-10 Receptor β c238 (Donor) and Acute GVHD. Japanese, HLA ID Tx. N=99

IL-10 -592	IL-10 R β c238	# of Recipients	Incidence of GVHD			
			\geq III	Odds/ P	\geq II	Odds/ P
A/A or A/C	G/G or A/G	77	4%	4.9 P<0.05	18%	2.4 P<0.05
	A/A	12	0%		8%	
C/C	G/G or A/G	9	33%	15.0 P<0.05	44%	24.0 P<0.05
	A/A	3	0%		0%	

Conclusion

- Recipient の IL-10 -592 が C/C のとき、a-GVHD は重症化しやすい
- Donor の IL-10 Receptor- β c238 が G+ であるとき、a-GVHD は発症しやすく、かつ重症化しやすい (G- のときは重症化しない)
- Recipient の IL-10 -592 が C/C で、Donor の IL-10 R β c238 が G+ のとき、発症率・重症化率がともに高い
- IL-10 R β c238 多型性と a-GVHD の相関はアメリカ人 (Lee ら) と日本人では逆転している。

造血幹細胞移植/白血病と HLA 遺伝子欠損

丸屋悦子、田中康博¹⁾、道野淳子²⁾、野村恵子²⁾、金兼弘和²⁾、平久保由香³⁾、海田勝仁⁴⁾、
 浅越康助⁵⁾、赤座達也、佐治博夫

特定非営利活動法人 HLA 研究所、¹⁾ 京都大学医学部付属病院血液腫瘍内科、²⁾ 富山医科薬科大学、
³⁾ 自治医科大学付属病院小児科、⁴⁾ 大阪大学医学部付属病院血液内科、⁵⁾ 住友病院血液内科

はじめに

HLA 遺伝子欠損には後天的遺伝子欠損と先天的遺伝子欠失がある。前者は loss of heterozygosity (LOH) として知られ、腫瘍細胞の宿主免疫監視機構からのエスケープ戦略として知られる。主に固形腫瘍で研究がなされているが、造血器腫瘍の LOH、特に HLA gene の LOH について、発生頻度や疾患の重症度・再発との関係などは不明である。後者は極めて希な現象で、今までに HLA-A 座遺伝子欠失のハプロタイプが 1 例報告されている。我々はドナー検索を目的とした HLA 家系調査や造血幹細胞の再移植を目的とした、HLA 型再確認検査のための家系調査、総数 730 家系より、上述の HLA 欠損遺伝子を発見したので報告する

方法・結果

730 家系の血液由来 DNA による家族の HLA タイピング結果より、両親と患者の間に遺伝関係が否定される結果が得られた場合、体細胞由来（口腔内粘膜）DNA を用いリタイピングを行い、血液細胞における LOH の有無を確認した。欠損部位の決定にはマイクロサテライトを用いた DNA 多型解析を行った。マイクロサテライトは HLA-A 遺伝子のセントロメア側 31Kb に位置する D6S510 から DQA1 遺伝子のセントロメア側 8Kb に位置する DQCARI までに局在する 28 種類を用いた。以下の表に検出された欠損および欠失遺伝子を示す。

Inherited HLA gene defect

Defect Locus	Inherited	Disease	Deletion area
1 A	M to C	Leukemia	17Kb (P5.8 to D6S2852)
2 A	M to 3C	Leukemia	17Kb (P5.8 to D6S2852)
3 DRB1	T to C	Lymphoma	testing

in 730 families

M: mother, F: Father, C: child or children

考察

造血幹細胞移植適応患者における LOH 現象はそれほどまれな現象ではなく（約 1%）、再発のメカニズムに関与する可能性があり、LOH 現象の検出は治療上重要であり、NK を利用する作戦が有望と考えられる。また先天的な HLA-deletion gene を保有する 3 家系、共に血液腫瘍患者を有する家系であることから、腫瘍発生との関連が示唆される。今後も HLA-Gene deletion のスクリーニングを続け検証する予定である。

Acquired HLA gene defect

Defect Loci	Disease	Stage
1 Cw, B, MIC	ATL	80% blast cells #
2 A, Cw, B	AML	relapse
3 B	AML	
4 A, B	AML	relapse
5 A, Cw, B, DR	MDS	
6 A, Cw, B, DR	MDS	relapse
7 B	MDS	

in 730 families

A: *1101, *0201, *2601, A*3101

B: *4002=2, *1501=2, *5901, *1501, *3501

Cw: *0102, *0401

#: Deleted region = 844kb (C2-2-2 to D6S2924)

大規模SNPタイピングによる非血縁者間移植合併症の遺伝的背景の探索

研究組織

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(主任研究者:小寺良尚)

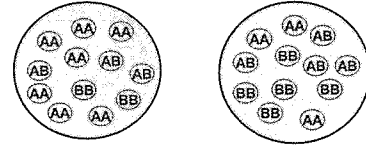
日本科学技術推進財団 戦略的創造研究推進事業(CREST)

愛知県がんセンター
九州大学
東海大学
東京大学
名古屋第一赤十字病院
日本赤十字東京血液センター

森島泰雄・赤塚美樹
山本健
猪子英俊
小川誠司(研究代表)
小寺良尚・宮村耕一
佐竹 正博・柏瀬 貢一

目的: 移植合併症の発症に関与する遺伝的背景の探索。

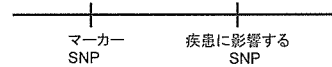
方法: 全ゲノム関連解析を用いた後方的疫学研究



合併症(+群) 合併症(-)群

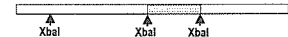
疾患群と相関のあるSNPを見いだす。

近くにあるSNP間には相関がある(連鎖不平衡)。

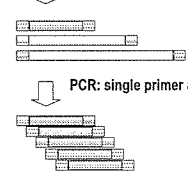


Affymetrix 500KアレイによるSNPタイピング

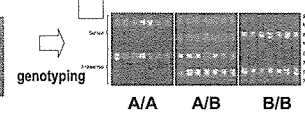
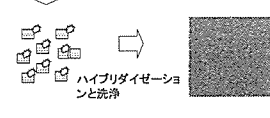
Genomic DNA (250ng)



RE digestion and adaptor ligation

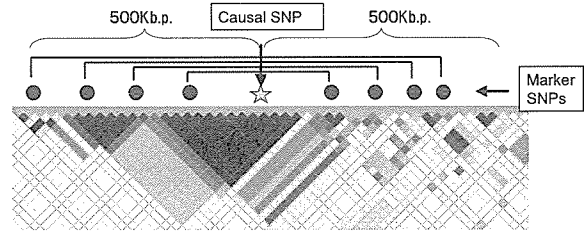


DNaseIによる断片化と末端標識

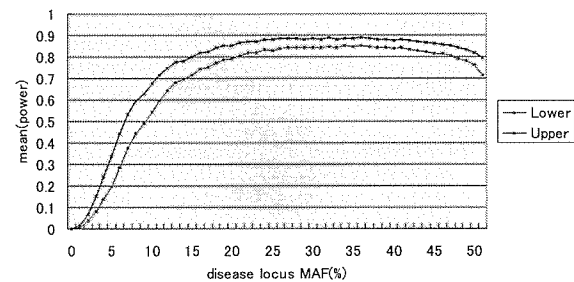


HapMap dataを用いたWGAのpower解析

- HapMapの全SNPのそれぞれをCausal SNPと仮定して、与えられたMarkerセットを用いたassociation解析における解析力を算出し、全てのSNPにおける算出結果について平均をとることにより、解析のパワーを評価する。

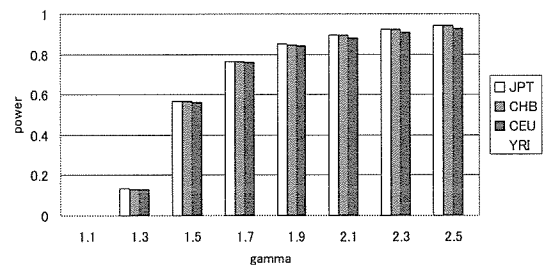


CEU N1000 faa0.001 MOI3 gamma1.7



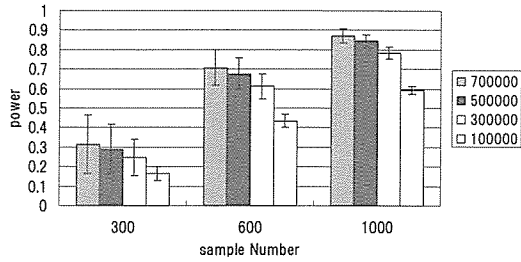
民族間のpowerの違い

N1000 faa0.001 MOI3



マーカー-SNP数と解析パワー

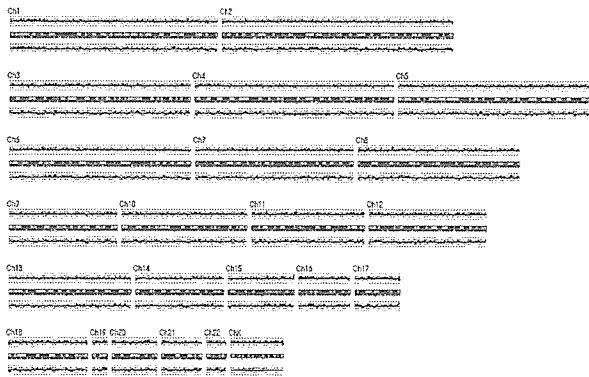
JPT gamma1.7 MO13



検体の収集と整備

- DNA試料
 - H13年4月以前にJMDPを通じて行われた非血縁骨髄移植
 - HLA A, B, C, DR, DQがDNAレベルで全て一致
 - GVHD予防としてMTX+CyAを使用
- 該当移植数=956移植(1912検体)
 - 234 degraded samples
 - 190 DNA量不足
 - 1488検体が利用可能
- 目標解析数=2000移植4000試料
 - 保存buffy coatからのDNA抽出
 - H13年度以降の症例の解析
- WGAによるarchiving事業
 - 貴重なバンク試料の有効利用のためのDNA増幅
 - Phi29 phage polymeraseを使用
 - 微量DNA(1ng)よりDNAを増幅可能
 - 東海大学に移管して管理

WGAにより得られたDNAと増幅前のDNA間でのコピー数/SNPタイピングの比較



SNPタイピング

- 500Kアレイの性能評価
 - 実サンプルでのCall rateは90-95%程度
 - 100Kアレイに比してプロトコールは不安定
 - より高品質なDNAが必要
 - 独自にSNP callアルゴリズムを開発
 - Hetero-SNP callの増加とHWEの改善
- 解析のスループット
 - 32-64 arrays (or 16-32試料, or 8-16移植)/day
 - Affymetrix社が600移植を負担
- 現時点までの解析と今後のRoadMap
 - 176移植について500Kのタイピングを終了
 - 6月までに900移植を解析する
 - 新たな移植症例の解析
 - Pool DNAによる解析も考慮

代謝酵素GSTM1の有無が非血縁者間骨髄移植の
経過に与える影響

村田 誠 寺倉朝太郎
名古屋大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学

② UGT2B17の多型 (positive/null) と TRM / survival / DFS

UGT2B17

- ・??の代謝に関与
- ・全長にわたる遺伝子欠損

URL-BMT (n=435)
 ・ JMDFP: 0-51Y (24y)
 ・ TRM UGT2B17 positive donor: RR 1.89 (p<0.007)
 Survival UGT2B17 positive donor: RR 1.75 (p=0.004)
 DFS UGT2B17 positive donor: RR 1.54 (p=0.024)

(Terakura et al. Br. J. Haematol. 2005)

Patient characteristics (I)

URBMT through JMDFP: HLA-A, B, C, DRB1-genotypes matched, myeloablative preconditioning, CsA or tacrolimus

Number (male/female) 323 (211/112)
 Median age (years (range)) 24 (1-51)

Diagnoses

Acute myeloid leukemia 101
 Acute lymphoblastic leukemia 92
 Chronic myeloid leukemia 98
 Myelodysplastic syndrome 25
 Hodgkin's lymphoma 11
 Non-Hodgkin's lymphoma 18
 Severe aplastic anemia 25

Status of malignant disease

Standard (AML/ALL, ICR, CML, ICF, MDS RA) 164
 Advanced 177
 Unknown 7

Introduction

- ・薬物代謝酵素の遺伝子多型は薬物血中濃度に影響を与える

主な薬物代謝酵素:
 cytochrome P450 (CYP), UDP glycosyltransferase (UGT),
 glutathione S-transferase (GST), N-acetyltransferase (NAT),
 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)など

- ・同種造血幹細胞移植後の薬物血中濃度に影響を与えると報告された薬物代謝酵素

- ① MTHFR (Ulrich et al. Blood 2001;98:231)
- ② UGT2B17 (Terakura et al. Br. J. Haematol. 2005;129:221)
- ③ GST-M1 (Srivastava et al. Blood 2004;104:1574)

③ GST-M1の多型 (positive/null) と VOD

GST-M1

- ・BUの代謝に関与
- ・全長にわたる遺伝子欠損
- β-Thalassemia (n=114)
 ・ 2-16Y (6y): BU+CY or BU+ATG
 ・ 両アリル欠損症: ~38%
- ・VOD発症率
 GST-M1 positive 患者: 18.3%
 GST-M1 null 患者: 46.5%
 (p=0.001)

(Srivastava et al. Blood 2004)

Patient characteristics (II)

Preconditioning regimen

TBI containing	303
TBI + CY	102
TBI + CY + BU	31
TBI + CY + others	130
TBI + BU + others	1
TBI + others	13
TBI + others	24
Non-TBI containing	70
BU + CY	33
BU + CY + others	33
BU + others	2
CY + others	11

G/VD prophylaxis
 CsA + MTX (+ anti-thymocyte globulin) 299 (64%)
 Tacrolimus + MTX 31

BU (others), n=105 : CY (others), n=333

① MTHFRの多型と口腔粘膜癌

MTHFR

- ・MTXの代謝に関与
- ・C667T (C=alanine, T=valine)
 C/T: wild type
 C/T: 60% activity of CC
 T/T: 30% activity of CC

CML-CPI (n=220)

- ・18-61Y (40y): BU+CY or CY+TBI
- ・MTX: 15mg/m2 (d1), 10mg/m2 (d3, 6, 11) + CsA
- ・頻度: CC 42%, CT 60%, TT 30%
- ・T/T群における移植後18日以内の口腔粘膜癌率は、C/C群のそれと比べて有意に高かった (scoreが高かった)

(Ulrich et al. Blood 2001)

目的

- ・GST-M1/T1は、様々な薬剤や酸化ストレス副産物などのグルタチオン結合を行う
- ・GST-M1/T1の欠損は日本人においても高頻度である
 GST-M1 約60%
 GST-T1 約40%



GST-M1/T1の欠損が日本人の移植予後にも影響を与えるか否か

Methods

- ・両アリル遺伝子欠損の決定: PCR法

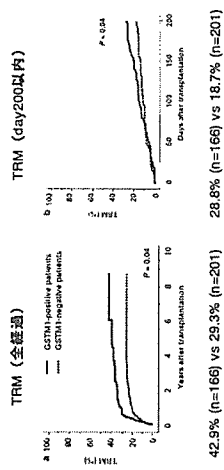
Primers for GSTM1 gene
 5'-GAAGCTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3'
 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3'
 Primers for GSTT1 gene
 5'-TTCCCTTACTGGTCCCTCACATCTC-3'
 5'-TCACCCGGATCATGCGCAGCA-3'
 Primers for β-globin gene
 5'-ACACAACTGTTGTTCTACTAGC-3'
 5'-CAACTTCATCCAGCTTCCAC-3'

- ・統計解析
 X² test
 Cox proportional-hazard model (backward, stepwise)
 Kaplan-Meier

欠損頻度

- GSTM1の欠損頻度
患者 207 / 373 (55.5%)
ドナー 177 / 313 (56.5%)
- GSTT1の欠損頻度
患者 168 / 373 (45.0%)
ドナー 145 / 313 (46.3%)

治療関連死亡率: Kaplan-Meier



生存率

Outcome and significant factor	Univariate analysis P-value	Multivariate analysis Odds ratio (95% CI)	P-value
DFS			
Higher patient age	0.02	1.02 (1.01-1.03)	0.0002
Advanced disease	<0.0001	2.54 (1.85-3.50)	<0.0001
[GSTM1-positive patient]	0.025	1.50 (1.08-1.97)	0.013
OS			
Higher patient age	0.0013	1.03 (1.02-1.04)	<0.0001
Advanced disease	<0.001	2.54 (1.83-3.53)	<0.0001
[GSTM1-positive patient]	0.070	1.41 (1.04-1.92)	0.030

急性GVHD、慢性GVHD、再発率

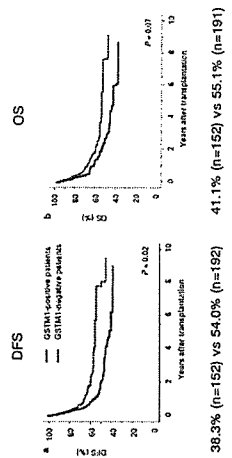
Outcome and significant factor	Univariate analysis P-value	Multivariate analysis Odds ratio (95% CI)	P-value
Acute GVHD (II-IV)			
Advanced disease	0.025	1.46 (1.04-2.07)	0.031
CXA as GVHD prophylaxis	0.008	6.23 (1.54-25.2)	0.010
Chronic GVHD	0.002	1.81 (1.25-2.61)	0.002
Relapse rate	<0.0001	3.64 (2.21-5.99)	<0.0001
Advanced disease			

移植後200日以内の死因 (再発を除く)

	GSTM1陽性患者 (n=201)	GSTM1陰性患者 (n=166)
Total	44	37
拒絶/生着不全	3 (6.8%)	1 (2.7%)
GVHD	11 (25.0%)	7 (18.9%)
間質性肺炎	8 (18.2%)	13 (35.1%)
敗血症	7 (15.9%)	6 (16.2%)
出血	3 (6.8%)	3 (8.1%)
VOD	2 (4.5%)	1 (2.7%)
アデノウイルス感染症	1 (2.3%)	2 (5.4%)
心不全	1 (2.3%)	
脳梗塞	1 (2.3%)	
出血性尿毒症症候群	1 (2.3%)	
白質脳症	1 (2.3%)	
肺炎	1 (2.3%)	
腎不全	1 (2.3%)	
ヘモジテロシス		1 (2.7%)
TMA		1 (2.7%)
不明	4 (9.6%)	

P=0.52

生存率: Kaplan-Meier



治療関連死亡率

Outcome and significant factor	Univariate analysis P-value	Multivariate analysis Odds ratio (95% CI)	P-value
TRM			
Higher patient age	0.001	1.03 (1.02-1.04)	<0.0001
Advanced disease	0.015	1.80 (1.23-2.63)	0.002
[GSTM1-positive patient]	0.043	1.49 (1.03-2.16)	0.036

GSTM1の有無とVOD

- BU (+ others) : n=105
VODを原因とした死亡例 0 (0%)
- CY (+ others) : n=333
VODを原因とした死亡例
GSTM1陽性患者 2 / 145 (1.4%)
GSTM1陰性患者 0 / 188 (0%)

まとめと考察

- GSTM1陽性患者は、TRM、生存率に関する危険因子である。
- その機序として、
1) GSTsが存在することで毒性を持った中間代謝産物が蓄積し、TRMが増える
2) GSTsはロイコトリエン (特にA4) やプロスタグランジン (特にD2) のpathwayに関与 (促進に作用) することから、GSTsが存在することで移植後の様々な炎症反応がより亢進し、TRMが増える
などが考えられる。
- GSTM1陽性患者と陰性患者の間で、死因に違いはなかった。今後、死因には至らなかった合併症 (間接死因) にも疑問を拡大して検討することが必要と考えられる。

厚生労働科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業
「骨髄、末梢血等を利用した効率的な造血細胞移植の運用・登録と臨床試験体制の確立並びにドナー及びレシピエントの安全確保とQOL向上に関する研究」班

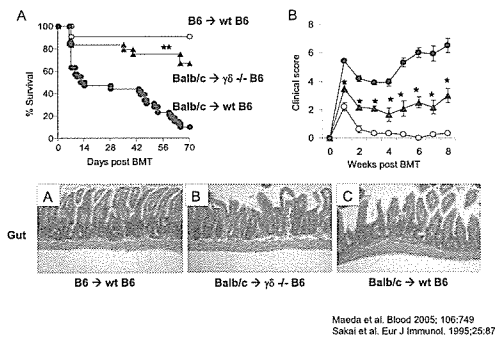
GVHDおよびGVLにおけるhost $\gamma\delta$ T細胞の役割の検討

岡山大学医学部付属病院 血液・腫瘍内科
前田嘉信、谷本光音

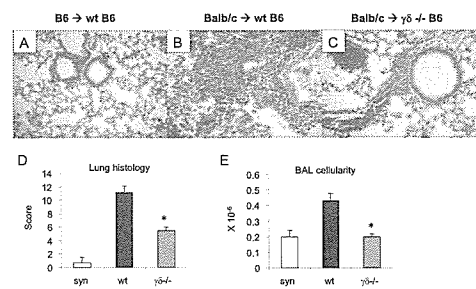
Allogeneic bone marrow transplantation (BMT)

- Acute graft-versus-host disease (GVHD) is one of the major obstacles of allogeneic bone marrow transplantation (BMT).
- Donor T cells activated by host alloantigen-presenting cells (APCs) have been implicated in the pathogenesis of acute GVHD.
- $\gamma\delta$ T cells have immune modulating function and have been shown to localize to tissues including those potentially involved in GVHD (eg, skin, colon, lung and liver) suggesting that these cells may contribute GVHD.
- However, the role played by host $\gamma\delta$ T cells in the pathogenesis of allogeneic GVHD is not well defined.

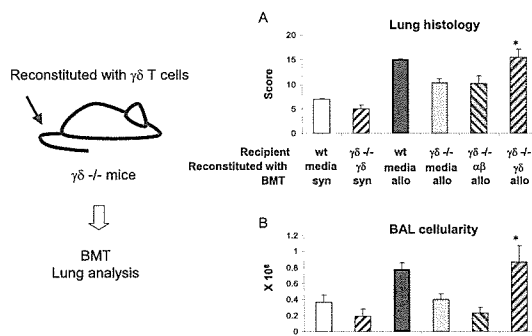
Absence of $\gamma\delta$ T cells in allogeneic BMT recipients reduces GVHD severity



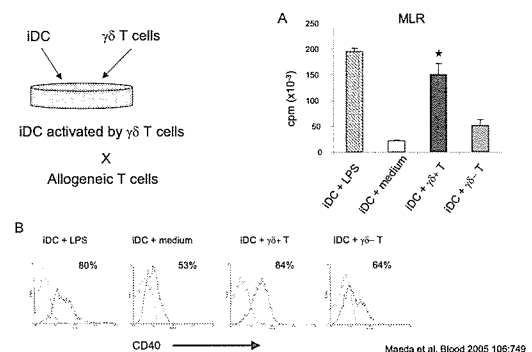
Absence of $\gamma\delta$ T cells in allogeneic BMT recipients reduces idiopathic pneumonia syndrome (IPS) severity

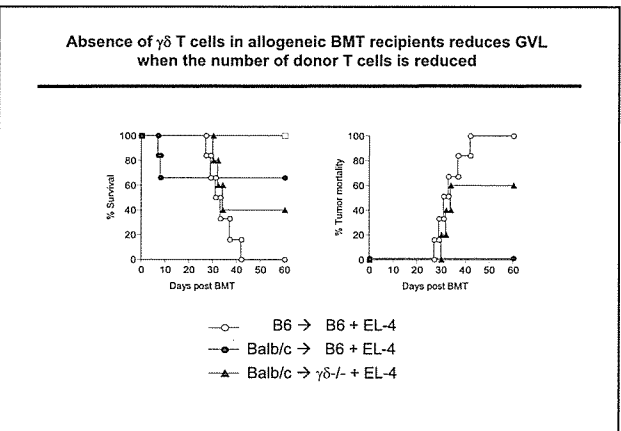
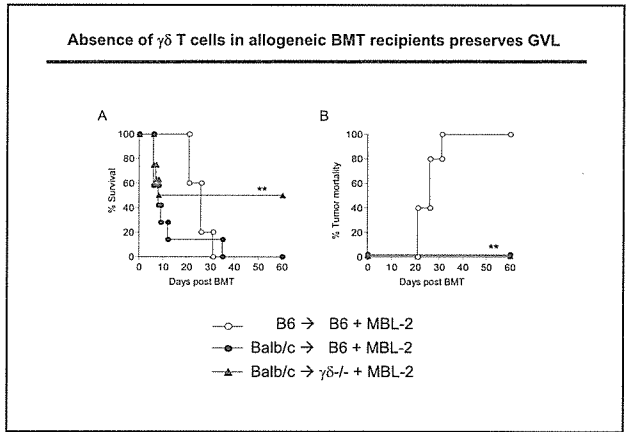
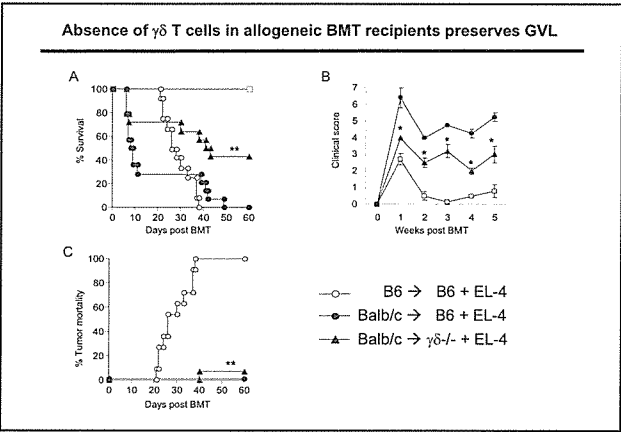
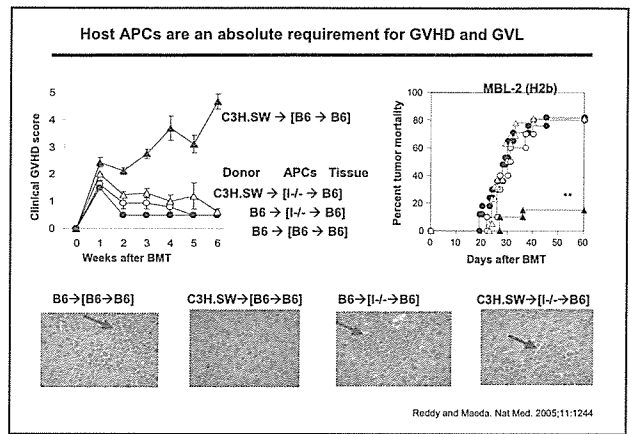
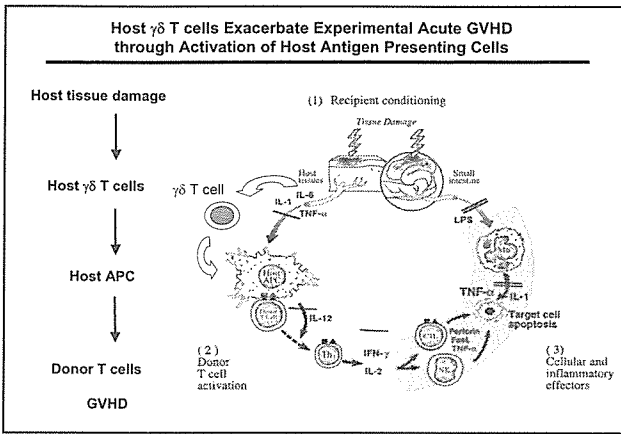


Adoptive transfer of host $\gamma\delta$ T cells aggravate IPS



$\gamma\delta$ T cells activate dendritic cells (DCs)





まとめ

- ホストの $\gamma\delta$ T細胞を欠いた場合、肺を含むGVHDが軽減された。
- 十分量のドナーT細胞を輸注した場合、GVL効果が保たれた。
- しかし、輸注ドナーT細胞を減少させるとGVL効果の低下を認めた。
- ホスト $\gamma\delta$ T細胞による直接的なGVL効果以外に、ホストDCの不十分な活性化がGVL効果を低下させた可能性が示唆された。

平成17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
第2回研究会 2006年1月27日、28日（東京）

造血幹細胞移植前後の微生物モニタリングと活性化DC4-DLI

森尾友宏^{1,3} 清水則夫^{2,3}
 1. 東京医科歯科大学・大学院・発達病態小児科学分野
 2. 同・難治疾患研究所・ウイルス治療学
 3. 同・医学部附属病院・細胞治療センター

造血幹細胞移植前後のウイルスモニタリング及び解析

原疾患48症例の内訳

白血病	21
先天性免疫不全症	14
慢性活動性EBV感染症	8
血球貪食症候群	
固形腫瘍	3
再生不良性貧血	1
副腎白質ジストロフィー	1

造血幹細胞移植前後のウイルスモニタリング及び解析

48名の患者に対して合計693回の解析

22名：移植前後の経時的解析

先天性免疫不全症	9名
白血病	7名
CAEBV	5名
血球貪食症候群	1名
副腎白質ジストロフィー	1名

26名：診断及びフォロー（症状・所見出現後）

高感度網羅的迅速ウイルス検査

Sensitive assay system for rapid detection of multiple viruses

難治疾患研究所：清水則夫助教授、渡邊 健、水上美樹
リンフォテック：馬場憲三、大隈一興

HSV1	BKV	HIV1
HSV2	JCV	HIV2
VZV	Parvovirus B19	HTLV1
EBV	Adenovirus	HTLV2
CMV	Adenovirus	Norovirus (SRSV)
HHV6	HBV	Cryptosporidium
HHV7	HCV	Pneumocystis carinii
HHV8	GBV	Mycoplasma sp.
	Mycobacterium sp. Fungi...	

青字は多項目高感度網羅的迅速検査以外で検出可能な微生物

移植前後の経時的解析 —22症例—

（ウイルスが一度も検出されない症例：6/22）

検出されたウイルス

Virus	Positive	>1,000 copies/ml
EBV	15	6
CMV	10	5
HHV6	9	6
HHV7	2	2
ADV	3	3
BKV	4	3
JCV	5	2
NLV	3	3
HSV1	2	0
VZV	1	0
HPV B19	1	1

移植後のモニタリング・解析 —全症例—

（ウイルスが一度も検出されない症例：6/48）

検出されたウイルス

Virus	Positive	>1,000 copies/ml
EBV	20	7
CMV	13	6
HHV6	14	6
HHV7	2	2
ADV	9	7
BKV	10	7
JCV	6	4
NLV	4	4
HSV1	3	1
VZV	1	0
HPV B19	1	1

HHV6 virus load before and after SCT

Patient	preSCT	day<30	<60	<90	<180	<365
PID	2.5x10 ³	17, 3.7x10 ⁴ (腸)		74	1.1x10 ⁷	
PID		6.0x10 ³	(+)	(+)	(+)	2.0x10 ³ (肝)HHV7, EBV
MDS	3.4x10 ²		(-)	(-)	(-)	(-)
ALL	4.2x10 ³ , 2x10 ³	(+)		(-)	(-)	
AML	2.2x10 ³	1.6x10 ³	(-)	(-)		
AML		35				
AML		19				
CML	(-)	(-)	(-)	(-)	1.3x10 ³ (口腔水疱)	2x10 ⁶ (喀痰)
CAEBV	(-)	2.8x10 ³ , 6.4x10 ² (骨髓)	(-)	(-)		
CAEBV	(-)	4.6x10 ²	(-)			
CAEBV	(-)		(+)	(-)	(+)	(+)
ALD	(-)	6.2x10 ²	(-)	(-)	(-)	(-)
RMS			1.8x10 ⁴	1.2x10 ³	(-)	
AML			2.6x10 ⁶ (CMV, ADV)			

BKV infection post-SCT

Patient	day<30	<60	<90	<180	<365
PID					JCV 260
WAS		B+J		B+J	
Blau				B 2.4x10 ³ , 4x10 ¹⁰	
AML		B 5.4x10 ⁴ , 8.2x10 ⁹			
AML		B 9x10 ⁹	6.8x10 ⁶	(-)	
CAEBV			B 1.9x10 ⁹ , 1.7x10 ⁸	(-)	
			J 2.3x10 ¹⁰ , 2.9x10 ⁹	(-)	
CAEBV		B 1.7x10 ¹⁰ , 5.7x10 ⁵	6x10 ⁵ (+CMV)		
ALL			B 580 (+ADV, CMV)		
RMS		B 6.5x10 ⁴	J 1x10 ⁴	J 2.7x10 ⁵	
		ADV 1.8x10 ⁷	25 (+HHV6)		
AML			B 880 (+ADV)		9名で膀胱炎
AML			B 120, 2.2x10 ¹⁰		6名はADV(-)

定期的モニタリングが有用

Day10でのCMVの検出(→1.6x10⁴ copies)→早期治療

Day22 GVH様症状発現時のHHV6の検出(5x10³ copies)

Day14 膀胱炎症状発現時のBKVの検出

Day17 膀胱炎症状発現時のBKVの検出

移植後6ヶ月目発熱・全身性発疹時のHHV6の検出

移植後>1yr PPGSS (Parvovirus B19感染症) の診断

モニタリングの注意点

- CAEBV移植後1年
 - EBV in CSF 1.6x10⁷
 - EBV in blood negative
 - + Toxoplasma encephalitis
- Polychondritis/IPを伴う免疫不全症
 - 便からEBV 6.6x10², HHV6 7.9x10³, ADV 4.4x10⁴
 - NLV 1.3x10⁵
 - *Cryptosporidium parvum* (PCR+ Oocyst -)
 - 喀痰からHHV6 1.5x10³, EBV 6.3x10⁶
 - MAC + *Cryptosporidium hominis* & *parvum*

他の感染症の合併
他の感染症に併発したウイルス検出の可能性

Co-infection/identification, Superinfection?

検出数	人数	部位
2	78	血液47, 便11, 尿5, 喀痰5, 咽頭2, 気管内2 骨髓・肝生検・直腸・胃・口腔粘膜・水疱 1
3	9	血液3, 便4, 胃粘膜1, 水疱1
4	6	喀痰3, 便2, 咽頭1
5	1	喀痰
7	1	便

13.7% : 95/693

造血幹細胞移植後CMV感染症、Adenovirus感染症に対する活性化CD4DLI療法に関する臨床第I-II相試験

平成17年度 厚生労働科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業
「骨髓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: 小寺良尚(名古屋赤十字病院第4内科)

登録症例(2005年4月から)

	1	2	3	4	5
Disease	MLL+AML	AML(M0)	RMS	CML (CP)	AML(M0)
UR/R	UR	R	R	UR	UR
HLA	5/6	6/6	4/6	5/6	6/6
aGVHD	IV	0	II	IV	0
Infection	CMV	ADV cystitis	ADV cystitis	ADV cystitis	ADV cystitis
Treatment	DHPG FCV	AraA Cidofovir	Acyclovir	Cidofovir	AraA Cidofovir
Viral load	CMV 5.1x10E4 →2.4x10E3	ADV(+) 5.0x10E5 (type 14)→(-)	ADV 1.8x10E7 →3.3x10E4	ADV 8.5x10E6 →8.8x10E2	ADV 2.1x10E5 →<2.5x10E3
Other Info.	Etoposide, Steroid 人工呼吸器	Ccr 27			

治療経過

- 血液 CMV 2.4x10E3/ml
- 血液
ADV 8.6x10E3/ml→not detected(治療前)→not detected
尿
ADV not detected→not detected→8.3x10E2→not detected
- 血液
ADV 2.3x10E3/ml→not detected→not detected
尿
ADV 1.8x10E7/ml→3.3x10E4/ml→1.6x10E2/ml→not detected
- 血液
尿
ADV 8.5x10E6/ml→8.8x10E2/ml(投与前)→2.8x10E2/ml→4.2x10E2→(-)
- 血液
尿
ADV (20以下)

- 血液 CMV 2.3x10E3/ml, BKV 1.2x10E3/ml
 - 血液 CMV 1.8x10E4/ml→1.5x10E4/ml→not detected
ADV 8.6x10E3/ml→not detected(治療前)→not detected
尿
ADV not detected→not detected→8.3x10E2→not detected
BKV not detected→not detected→5.8x10E2/ml→not detected
 - 血液 CMV(20以下)→CMV(20以下)
HHV6 1.8x10E4/ml→3.5x10E3/ml→not detected→1.2x10E3
ADV 2.3x10E3/ml→not detected→not detected
EBV(20以下)
尿
ADV 1.8x10E7/ml→3.3x10E4/ml→1.6x10E2/ml→not detected
BKV 6.5x10E4/ml→5.0x10E4/ml→not detected
HHV6 not detected→2.0x10E1/ml→not detected
JCV →2.7x10E5
 - 血液 CMV 1.5x10E2/ml→6.1x10E3/ml(投与前)→not detected
尿
ADV 8.5x10E6/ml→8.8x10E2/ml(投与前)→2.8x10E2/ml→4.2x10E2→(-)
CMV 9.3x10E1/ml→2.0x10E1/ml→4.5x10E2/ml→not detected
調製細胞(2回目)からHHV6(+)
 - 血液 EBV(20以下)
尿
ADV(20以下)
BKV 8.8x10E2/ml
- 複数以上のウイルス

その後のエントリー症例

- 症例2
ADV cystitisの再燃→ADV↓↓
- 自己炎症疾患
BKV cystitis
CMV感染症 (3.5x10E4/ml)
- AML
CMV感染症 (9x10E2/ml)
- AML
ADV cystitis (Ccr 2.4ml/min †)
CMV感染症 (3.3x10E3/ml)
- CAEBV
ADV?BKV? cystitis

「Steroid中止条項」の見直し

BKV感染症についてのトライアル

複数以上のウイルスが検出される感染症のエントリー

共同研究者

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・ウイルス治療学
清水則夫、渡邊 健、水上美樹、熊谷麻理、井上 静
東京医科歯科大学・医学部附属病院・細胞治療センター
梶原道子、峯岸志津子、落合央、海老澤美穂
株式会社リンフォテック
大隅一興、関根暉彬
神戸先端医療センター研究所
伊藤仁也
茨城県立こども病院
土田昌宏
名古屋第一赤十字病院
加藤剛二、小寺良尚

厚生労働科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業
 「骨髓、末梢血等を利用した効率的な造血細胞移植の運用・登録と臨床試験体制の確立
 並びにドナー及びレシピエントの安全確保とQOL向上に関する研究」班

平成17年度 第2回 研究班会議

新規マイナー抗原の同定と 臨床試験に向けての前臨床試験

赤塚 美樹
 愛知県がんセンター研究所
 腫瘍免疫学部

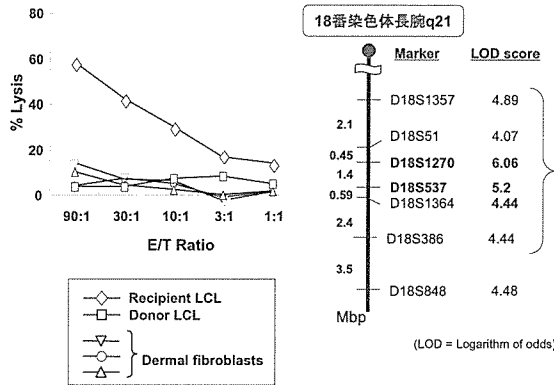
治療の標的となりうるマイナー抗原

マイナー抗原	抗原+頻度	拘束性HLA	HLA+頻度(日本)	不適合が起る確率
ACC-1 ^Y	80 %	A*2402	60 %	10 %
ACC-2 ^P	50 %	B*4402/3	20 %	5 %
HA-1 ^H	62 %	A*0201	20 %	5 %
ACC-4 ^R	25 %	A*3101	20 %	3.5 %
ACC-5 ^R	25 %	A*3303	25 %	4 %
LRH-1	-- %	B*0702	10 % >	-- %
合計				27.5 %

現在同定中の新規マイナー抗原

CTLクローン	抗原+頻度	拘束性HLA	HLA+頻度(日本)	不適合が起る確率
2A12	40 %	B*4403	20 %	5 %
1B9	85 %	A*2402	60 %	5 %

2A12の細胞傷害性と連鎖解析



プールDNAを用いたAllele 相関解析

- マイナー抗原陰性、陽性の B-LCL より DNA を抽出し、等量ずつプール化
- 対象領域にある約 100 kb 間隔でデザインされたマイクロサテライトマーカーを使用し、GeneScan で2群間の Allele image pattern を比較(東海大学医学部基礎医学系 分子生命科学 岡 晃先生 よりご提供)

マーカー名 (位置)

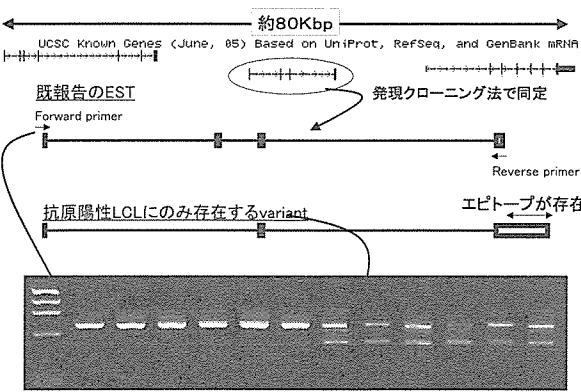
1803F03 (59.54Mbp) 1806F01 (59.69Mbp) 1806C08 (59.78Mbp) 1803C09 (60.47Mbp)

近傍の遺伝子

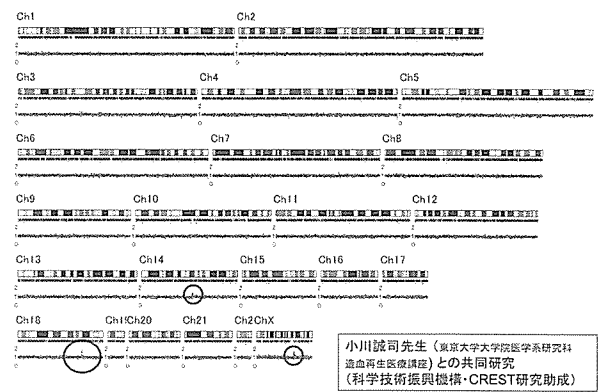
AY245778 SERPINB7 SERPINB2 LOC284293
 SERPINB11 BX641156 SERPINB10 SERPINB8

(Kawase, T. Unpublished Data)

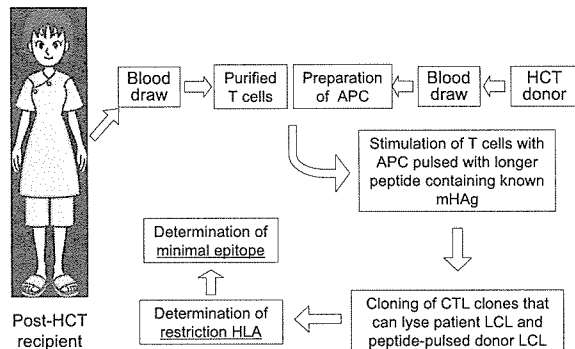
2A12 抗原性決定機構



SNP アレイ解析による 2A12 抗原遺伝子座の決定



既知のマイナー抗原の新規拘束性 HLA アリルの検索

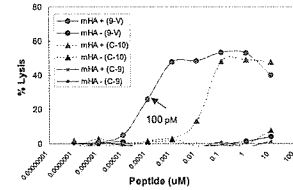


既知のマイナー抗原の新規拘束性 HLA アリルの検索

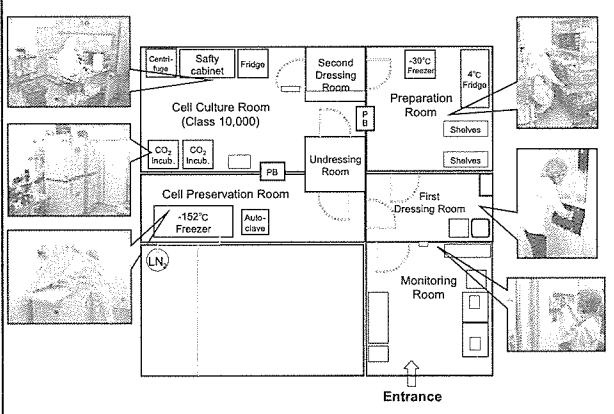
限界希釈法で得られたクローンの HLA拘束性の解析

クローン 3B11 を用いた minimal epitope の解析

%lysis	1E3	1F1	2G3	2B11	4B1	4B12	EH6
PL LCL	73	1	EB	70	65	0	-4
Do LCL	3	0	2	-2	-1	1	-3
Do LCL + peptide	72	4	73	71	71	3	3
221 / A*0206	62	4	67	69	70	8	2
221 / A*3303	2	0	-1	-1	-2	2	1
221 / B*4006	5	0	0	-1	0	1	1
221 / B*4403	5	4	-1	-1	1	3	1
221 / C*0801	5	7	2	4	4	1	-1
221 / A*0201	82	7	69	72	74	8	56



愛知県がんセンター細胞調製施設



養子免疫療法の進捗状況 (1)

CPCの運営

- ◆ GMPに準じた文書体系で指図記録書が大半終了
- ◆ 書類作成の一部はアウトソーシングを採用
- ◆ 依然マンパワーの問題

CTL 株の樹立・クローニング・REP の培養条件

- ◆ 比較的長期培養してもメモリー形質を残し、体内に戻しても機能を維持できるような培養条件
- 刺激方法、IL-2のタイミング条件の決定
- マウスモデル (NOG の系を交渉中) の確立

養子免疫療法の進捗状況 (2)

フィーダーと培養用血清

- ◆ 移植ドナーの負担を減らす
- ◆ 現状ではアロのプールフィーダーの方が安定的増殖
 - 健康人5名より成分採取済 (IRB承認)
- ◆ 血清は成分採取時に血漿を同時採取
 - 健康人6名より採取しプール化済

症例登録

- ◆ 2症例あったが、一時中断 (条件再設定等)
- ◆ ACC-1不適合が1症例あり、至適化後にACC-1特異的 CTL株の樹立。今後、クローニング・増幅をして保存。
- ◆ 近日中に症例の登録を再開予定

臨床研究にエントリーされた症例

UPN	Age	Dx	Stage	Type of Tx	mHAg	Comments
MHA-01	45	CMML	Non CR	HLA-id Sib.	BCL2A1	11 mo
MHA-						

