

本症例では、採取骨髓細胞数が少ないため、逆方向 (N4→N3, N3→N2, N2→N1) から生理食塩液を注入し、骨髓細胞を採取した (往復“灌流法”)。

次に、左側の腸骨でも同様の操作を行った。

<採取結果>

1) Total cell countは 2×10^6 (/ml) \times 400 (ml) = 0.8×10^9 で通常の1/10の量であった。

2) そのうち、C34⁺/CD45⁺細胞は1.6%であった。

3) T細胞 (CD4⁺ + CD8⁺)数は15%であった。但し、逆方向の方がややT細胞の%が多かった。

4) Hemopoietic progenitor cell countに関しては、順方向と逆方向でCFU-GM/BFU-Eの比率が逆転していたが、逆方向では末梢血が混入した可能性が考えられた。

5) 体重60kgとして、CFU-GM数は、 0.3×10^4 /kgで、健常ドナーの吸引法での値と比較すると1/10以下の採取量であったが、これは“Poor Mobilizer”患者のためと考えられた。

<結論>

1) “Poor Mobilizer”の患者の腸骨を用いて、安全に灌流法が実施できた。

2) 両側4箇所ずつ計8箇所から採取し、1時間以内に終了した。

3) 術後の腰痛は認められず、麻酔から完全に覚醒後、当日より歩行可能であった。

4) 末梢血の混入は、ほとんど無視できたので、赤血球やT細胞の除去は不要であった。

5) 出血がないため、輸血は不要であった。

<これまでの経過と今後の方針>

・平成18年2月24日、東京で、第一回の“骨髓内骨髓移植研究会—臨床応用に向けて—”という全国規模の研究会を開催し、先ず、灌流法の手技的な安全性を関西医科大学で確認するPhase I Studyを開始することが了承された。

・平成18年12月に国内初の灌流法を悪性リンパ腫で“Poor Mobilizer”患者に実施し、安全性を確認した (添付毎日新聞参照)。

・平成19年2月16日、福岡で、第2回の骨髓内骨髓移植研究会を開催し、灌流法の実際を紹介したところ、症例をさらに重ねるとともに、Phase I/II Studyも開始するよう提言があった。症例を厳選して、今年中にPhase I/II Studyを実施したい。

G. 研究発表

1. 論文発表

(国内)

1. 池原 進: 新しい骨髓移植法: ヒトへの応用を目指して. 移植 41: 95-100, 2006.

2. 池原 進: 難病の革新的治療法—移植と再生を利用して—. 臨床血液 47: 439-444, 2006.

(国外)

① Takada K, Inaba M, Ichioka N, Ueda Y, Taira M, Baba S, Mizokami T, Wang X, Hisha H, Iida H, and Ikehara S: Treatment of senile osteoporosis in SAMP6 mice by intra-bone marrow injection of allogeneic bone marrow cells. Stem Cells 24:399-405, 2006.

② Adachi Y, Oyaizu H, Taketani S, Minamino K, Yamaguchi K, Shultz LD, Iwasaki M, Tomita M, Suzuki Y, Nakano K, Koike Y, Yasumizu R, Sara M, Hiram N, Kubota I, Fukuhara S, and Ikehara S: Treatment and transfer of emphysema by a new bone marrow transplantation method from normal mice to Tsk mice and vice versa. Stem Cells 24: 2071-2077, 2006.

③ Baba S, Iwai H, Inaba M, Kawamoto K, Omae M, Yamashita T, and Ikehara S: Transfer of accelerated presbycusis by transplantation of bone marrow cells from senescence-accelerated mice. Brain. Res. 1120: 93-99, 2006.

④ Koike Y, Adachi Y, Suzuki Y, Iwasaki M, Koike-Kiriyama N, Minamino K, Nakano K, Mukaide H, Shigematsu A, Kiyozuka Y, Tubura A, Kamiyama Y, and Ikehara S: Allogeneic Intra-Bone Marrow-Bone Marrow Transplantation plus Donor Lymphocyte Infusion Suppresses Growth of Colon Cancer Cells Implanted in Skin and Liver of Rats. Stem Cells 25: 385-391, 2007.

⑤ Ueda Y, Inaba M, Takada K, Fukui J, Sakaguchi Y, Tsuda M, Kushida T, Iida H, and Ikehara S: Induction of senile osteoporosis in normal mice by intra-bone marrow-bone marrow transplantation from osteoporosis-prone mice. Stem Cells In press.

2. 学会発表

(国内)

池原 進: 難病の革新的治療法—移植と再生を利用して—

2006年12月 第47回日本肺癌学会総会「特別講演」

(国外)

6月

・“Revolutionary BMT Method for Intractable Diseases”

First Annual Robert A. Good Immunology Symposium: Perspectives in Immunology 2006 招聘講演 (アメリカ)

・“A Novel Bone Marrow Transplantation Method for Autoimmune Diseases, Age-Associated Diseases, and Cancers”

University of California at Davis

(Prof. M. Eric Gershwin) 招聘講演 (アメリカ)

・“An Innovative BMT Method (Perfusion Method + Intra-Bone Marrow-BMT): From Animals (Mice, Rats, Monkeys) to Humans”

Fred Hutchinson Cancer Research Center

(Prof. Rainer Storb) 招聘講演 (アメリカ)

・“A Novel Therapeutic Bone Marrow Transplantation Method for Cardiovascular and Other Age-Associated Diseases: From Laboratory to Bedside”

New York Medical College

(Prof. Nader G. Abraham) 招聘講演 (アメリカ)

・“An Innovative Method for Bone Marrow Transplantation”

Institute of Human Virology, University of Maryland Baltimore (Prof. Robert C. Gallo)
招聘講演 (アメリカ)

・“New BMT Method (Perfusion Method + Intra-Bone Marrow-BMT): From Animals (Mice, Rats, Monkeys) to Humans”

Northwestern University Feinberg School of Medicine (Prof. Richard K. Burt)
招聘講演 (アメリカ)

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

A Method of Inducing Immunological Tolerance
特開2001-172188
特願09-531891

2. 実用新案登録

骨髓液採取セット及び骨髓針
特願2001-241586
平成13年8月9日 (未)
権利者名: 株式会社日本抗体研究所

悪性腫瘍の治療方法

特願2003-49198
平成15年2月26日 (未)
権利者名: 関西TLO株式会社



新毎日新聞

発行所：大阪市北区梅田3丁目4番5号 〒530-8251電話(06)6345-1551
 郵便振替口座 00920-0-450
 毎日新聞大阪本社 ©毎日新聞社 2006

オプトイメージングとデジタルアクセサリーの
Kenko
 株式会社 ISO14001認証取得
<http://www.kenko-tokina.co.jp/>
 ケンコーグループ アウトレット 商品を適価販売しております。
 ケンコー光学ショップ <http://ec1.kenko-web.jp/>

News Click

独立行政法人1900億円削減 **2**

大学ラグビー 関西2校が4強 **15**

栗林中将少年期の日記発見 **29**

碁将棋 **13** 読んであげて **24**

小説「西遊記」**22**

お天気

6時	12	18	24	26(火)	27(水)	28(木)	29(金)	30(土)
大阪	☀	☀	☀	10	70	50	50	30
京都	☀	☀	☀	6	13	9	13	2
京都市	☀	☀	☀	10	70	50	50	30
京都府	☀	☀	☀	4	13	7	13	0
京都府	☀	☀	☀	0	70	50	50	30
京都府	☀	☀	☀	3	12	6	12	1
京都府	☀	☀	☀	0	70	50	50	30
京都府	☀	☀	☀	7	13	10	13	3
京都府	☀	☀	☀	0	70	50	50	30

移植普及に“光”

関西医科大学（大阪府守口市）のグループが、「灌流法」と呼ばれる新しい骨髄採取法の国内初の臨床試験に成功した。採取される人の負担が軽く、痛みも軽減される。

関西医大グループ

骨髄採取時の負担の重さは骨髄移植普及を阻む壁の一つになっており、画期的な方法として注目される。関連病院などで臨床試験を重ね、国内外に普及を進めるといふ。

【奥野敦史】

骨髄採取 痛み軽く

手術時間 半分

従来の骨髄採取は、直径約1・5mmの針を患者の腰骨の約100カ所に刺し、計0・5〜1ccの骨髄液を吸い出す。健康な骨髄提供者（ドナー）でも、痛み止めの投与を受けながら3、4日の入院が必要だった。

灌流法は、同大学の池原進教授（病理学）らが開発した。2本の針を同時に刺し、片方から生理

骨に穴100→8

食塩水を注入、他方からあふれ出る骨髄液を採取する。効率よく採取でき、吸引しないのが特長。免疫機能を担う末梢血中のリンパ球の混入が少なく、他人に移植して白血球の型が合わなくても、リンパ球が患者の体内に戻す治療の一環で初めて実施、成功している。

今回は安全性確認のため、男性患者(58)が採取を受けた。自分の骨髄液を採取し抗がん剤投与後、体内に戻す治療の一環で初めて実施、成功している。

国内初 臨床試験に成功

資郎教授）が実施。腰骨に開けた穴は8カ所、骨髄液採取量も約0・4ccで済み、時間も従来の半分以下の1時間弱だった。男性は21日朝には自分で歩き、22日に一時帰宅した。主治医の森真一郎講師は「従来の症例と比べ、痛みの訴えは格段に少なかった」と話す。

灌流法を使った手術は04年12月、依頼を受けて池原教授らが中国の病院で初めて実施、成功して

Ⅲ. テーマーⅡ

造血幹細胞移植とその組織適合性抗原

造血幹細胞移植における組織適合性抗原の関与に関する研究

—HLA型不適合のGVHDと生存に与える影響—

分担研究者 森島泰雄 愛知県がんセンター
研究協力者 川瀬孝和 愛知県がんセンター
研究協力者 松尾恵太郎 愛知県がんセンター
研究協力者 柏瀬貢一 東京都赤十字血液センター

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, DPB1の遺伝子型の不適合、およびNK細胞受容体であるKIR2DLのリガンド不適合(GVHD方向)が急性GVHDの頻度を高めることが、平成17年度までに判明した。今年度は、HLA型不適合の組み合わせと急性GVHDとの関連を5210症例につき解析し、重症急性GVHDハイリスクな組み合わせを17組同定することができた。このことにより、より適切なドナーの選択と移植成績の向上する可能性が示された。

A. 研究目的

HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 遺伝子型適合度と臨床成績、とくに重症GVHD、との関連を解析することにより、HLA型適合度に基づいたドナー選択の基礎データを作り、移植成績の向上に資することを目的とする。

B. 研究方法

現在までに本研究班でHLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1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5210症例を対象にした。T細胞除去法を用いた症例と海外ドナー症例は除外した。

統計解析はCox regression modelsによ

る多変量解析法を使用し、変数として各HLA座におけるHLA型不適合な組み合わせ症例の重症GVHDの発症リスク(HR)をHLA型適合な症例と比較した。他のHLA座の不適合度、患者・ドナーの年齢、性、性適合、疾患、移植病期、TBIの有無、GVHD予防法などによりadjustした。Pが0.005以下の組み合わせと有意とし、さらにBootstrapping法により検証した。

C. 研究結果

1) HLA座の適合度(GVHD方向)

HLA-A座で13.4%、HLA-B座で6.4%、HLA-C座で29.2%、HLA-DRB1座で19.6%、HLA-DQB1座で22.5%、HLA-DPB1座で65.7%の遺伝子型不適合が認められた。

2) HLA-A座におけるHLA型不適合な組み合わせとその重症GVHD発症リスク

表1に示すように10症例以上の症例を有するHLA-A型不適合な組み合わせは15組あった。この中で有意に($P < 0.005$)重症GVHDが高率であった組み合わせは4組認められた。

この組み合わせは、ドナーがA*0206で患者がA*0201、ドナーがA*0206患者A*0207、ドナーがA*2602患者A*2601、ドナーがA*2603患者A*2601であったが、いずれも反対の組み合わせでは有意ではなかった。

3) 重症GVHDが生じるHLA型の組み合わせ (GVHDハイリスク)。

HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1につき上記HLA-A座と同様に解析した結果、表2に示すように17組の重症GVHDが有意($P < 0.005$)に高率に生じる組み合わせが同定できた。HLA-Bは1組、Cは7組、DRB1は2組、DQB1が1組、DPB1は1組であった。

HLA-C7組のうち4組はKIR2DLリガンド不適合な組み合わせであった。

4) GVHDハイリスクの数と重症GVHDの発症頻度 (発症リスク) (図1)

GVHDハイリスク数1では、HRは2.10と増加し、2ではさらに3.43と増加していた。HLA型が不適合であるが上記にて同定したGVHDハイリスクでない組み合わせのHRは0.99とHLA完全適合症例と比べGVHDが増加していない。

5) GVHDハイリスクの数と移植後の生存 (図2)

不適合数が1の場合にはHR1.50と完全

適合に比べ死亡危険度が有意にたかくなり、2以上ではさらに高くなった。

一方、不適合は1つあるがGVHDハイリスクでない症例では死亡危険率が1.10と有意ではなかった。

D. 考察

HLA座不適合といっても不適合はHLA座の組み合わせによって、重症GVHDを有意に高率に生じるものと、有意でないものがあることが、われわれの解析で明らかになった。5210ペアという多数例でHLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1の遺伝子型が本研究班において後方視的に同定されたことと、さらに多変量解析とその結果の検証を行ったことにより確かな結果を得ることができた。

HLA-C型の不適合のなかで4組はNK細胞受容体であるKIR2DLリガンド不適合な組み合わせであることは、この不適合がGVHDを生じさせるというJMDFの結果(論文1)を裏付けるものである。

今回の解析結果は

①GVHDハイリスクな組み合わせをドナー選択やGVHDの予防法の選択に役に立つこと。

②将来HLA不適合であっても重症GVHDを生じない組み合わせ、言い換えれば、許容できる組み合わせを同定できる可能性が広がったこと。このことによりドナーが選択できる可能性が高くなり、相対的にドナープールの拡大につながることを考えられる。

③さらに、HLA不適合移植により生じるGVHDの発症機序解明のための基礎データが得られた。

E. 結論

HLA型不適合の組み合わせと急性GVHDとの関連を5210症例につき解析し、重症急性GVHDハイリスクな組み合わせを17組同定することができた。このことにより、より適切なドナーの選択と移植成績の向上する可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1: Morishima Y, Yabe T, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, Yamamoto K, Maruya E, Akatsuka Y, Onizuka M, Sakamaki H, Sao H, Ogawa S, Kato S, Juji T, Sasazuki T, Kodera Y; Japan Marrow Donor Program. Effects of HLA Allele and Killer Immunoglobulin-Like Receptor Ligand Matching on Clinical Outcome in Leukemia Patients Undergoing Transplantation With T-cell-Replete Marrow From an Unrelated Donor. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007 Mar;13(3):315-28.

2: Yamada K, Takahashi M, Ogura M, Kagami Y, Taji H, Kamiya Y, Sugiura H, Morishima Y. High-dose chemotherapy and autologous peripheral blood stem cell transfusion for adult and adolescent patients with small round cell sarcomas. *Bone Marrow Transplant.* 2007 Mar 5; [Epub ahead of print]

3: Ito Y, Demachi-Okamura A, Ohta R, Akatsuka Y, Nishida K, Tsujimura K, Morishima Y, Takahashi T, Kuzushima K. Full-length EBNA1 mRNA-transduced dendritic cells stimulate cytotoxic T lymphocytes recognizing a novel HLA-Cw*0303- and -Cw*0304-restricted epitope on EBNA1-expressing cells. *J Gen Virol.* 2007 Mar;88(Pt 3):770-80.

4: Mizuta S, Kohno A, Morishita Y, Atsuta Y, Sao H, Miyamura K, Sakamaki H, Ueda R, Morishima Y. Long-term Follow-up of 14 Patients with Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia following Autologous Bone Marrow Transplantation in First Complete Remission. *Int J Hematol.* 2007 Feb;85(2):140-5.

5: Kato K, Kanda Y, Eto T, Muta T, Gondo H, Taniguchi S, Shibuya T, Utsunomiya A, Kawase T, Kato S, Morishima Y, Kodera Y, Harada M; Japan Marrow Donor Program. Allogeneic bone marrow transplantation from unrelated human T-cell leukemia virus-I-negative donors for adult T-cell leukemia/lymphoma: retrospective analysis of data from the Japan Marrow Donor Program. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007 Jan;13(1):90-9.

6: Kikuchi T, Naruse TK, Onizuka M, Li S, Kimura T, Oka A, Morishima Y, Kulski JK, Ichimiya S, Sato N, Inoko H. Mapping of susceptibility and protective loci for

- acute GVHD in unrelated HLA-matched bone marrow transplantation donors and recipients using 155 microsatellite markers on chromosome 22. *Immunogenetics*. 2007 Feb;59(2):99-108.
- 7: Inamoto Y, Nishida T, Suzuki R, Miyamura K, Sao H, Iida H, Naoe T, Maruyama F, Hirabayashi N, Hamaguchi M, Iseki T, Kami M, Yano K, Takeyama H, Morishita Y, Morishima Y, Kodera Y. Significance of additional high-dose cytarabine in combination with cyclophosphamide plus total body irradiation regimen for allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2007 Jan;39(1):25-30.
- 8: Morishima S, Akatsuka Y, Nawa A, Kondo E, Kiyono T, Torikai H, Nakanishi T, Ito Y, Tsujimura K, Iwata K, Ito K, Kodera Y, Morishima Y, Kuzushima K, Takahashi T. Identification of an HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope from human papillomavirus type-16 E6: the combined effects of bortezomib and interferon-gamma on the presentation of a cryptic epitope. *Int J Cancer*. 2007 Feb 1;120(3):594-604.
- 9: Morishima Y, Ogura M, Yoneda S, Sakai H, Tobinai K, Nishiwaki Y, Minami H, Hotta T, Ezaki K, Ohe Y, Yokoyama A, Tsuboi M, Mori K, Watanabe K, Ohashi Y, Hirashima K, Saijo N; Japan Erythropoietin Study Group. Once-weekly epoetin-beta improves hemoglobin levels in cancer patients with chemotherapy-induced anemia: A randomized, double-blind, dose-finding study. *Jpn J Clin Oncol*. 2006 Oct;36(10):655-61.
- 10: Akatsuka Y, Torikai H, Inamoto Y, Tsujimura K, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Takahashi T. Bone marrow may be a reservoir of long-lived memory T cells specific for minor histocompatibility antigen. *Br J Haematol*. 2006 Nov;135(3):413-4.
- 11: Asano N, Oshiro A, Matsuo K, Kagami Y, Ishida F, Suzuki R, Kinoshita T, Shimoyama Y, Tamaru J, Yoshino T, Kitamura K, Fukutani H, Morishima Y, Nakamura S. Prognostic significance of T-cell or cytotoxic molecules phenotype in classical Hodgkin's lymphoma: a clinicopathologic study. *J Clin Oncol*. 2006 Oct 1;24(28):4626-33.
- 12: Hsu KC, Gooley T, Malkki M, Pinto-Agnello C, Dupont B, Bignon JD, Bornhauser M, Christiansen F, Gratwohl A, Morishima Y, Oudshoorn M, Ringden O, van Rood JJ, Petersdorf E; International Histocompatibility Working Group. KIR ligands and prediction of relapse after unrelated donor hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006 Aug;12(8):828-36.

- 13: Suguro M, Tagawa H, Kagami Y, Okamoto M, Ohshima K, Shiku H, Morishima Y, Nakamura S, Seto M. Expression profiling analysis of the CD5+ diffuse large B-cell lymphoma subgroup: development of a CD5 signature. *Cancer Sci.* 2006 Sep;97(9):868-74.
- 14: Torikai H, Akatsuka Y, Miyazaki M, Tsujimura A, Yatabe Y, Kawase T, Nakao Y, Tsujimura K, Motoyoshi K, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Takahashi T. The human cathepsin H gene encodes two novel minor histocompatibility antigen epitopes restricted by HLA-A*3101 and -A*3303. *Br J Haematol.* 2006 Aug;134(4):406-16.
- 15: Fukuhara N, Tagawa H, Kameoka Y, Kasugai Y, Karnan S, Kameoka J, Sasaki T, Morishima Y, Nakamura S, Seto M. Characterization of target genes at the 2p15-16 amplicon in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci.* 2006 Jun;97(6):499-504.
- 16: Ogura M, Morishima Y, Kagami Y, Watanabe T, Itoh K, Igarashi T, Hotta T, Kinoshita T, Ohashi Y, Mori S, Terauchi T, Tobinai K. Randomized phase II study of concurrent and sequential rituximab and CHOP chemotherapy in untreated indolent B-cell lymphoma. *Cancer Sci.* 2006 Apr;97(4):305-12.
- 17: Oshiro A, Tagawa H, Ohshima K, Karube K, Uike N, Tashiro Y, Utsunomiya A, Masuda M, Takasu N, Nakamura S, Morishima Y, Seto M. Identification of subtype-specific genomic alterations in aggressive adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood.* 2006 Jun 1;107(11):4500-7.
3. 学会発表
 Morishima Y. et al. Identification of non-permissive HLA allele mismatch combinations and amino acid substitution responsible for acute graft-versus-host disease in unrelated allogeneic bone marrow transplantation. 48th annual meeting of American Society of Hematology. Dec. 2006. Orland. USA
- H.知的財産権の出願・登録状況
 葛島清隆、出町文子、伊藤嘉規、赤塚美樹、森島泰雄。「エプスタイン-バーウイルス感染細胞を特異的に攻撃する細胞傷害性T細胞エピトープペプチド及びその用途」:平成17年10月28日出願（特願2005-315306）

表 1. HLA型の組み合わせと重症GVHDのリスク

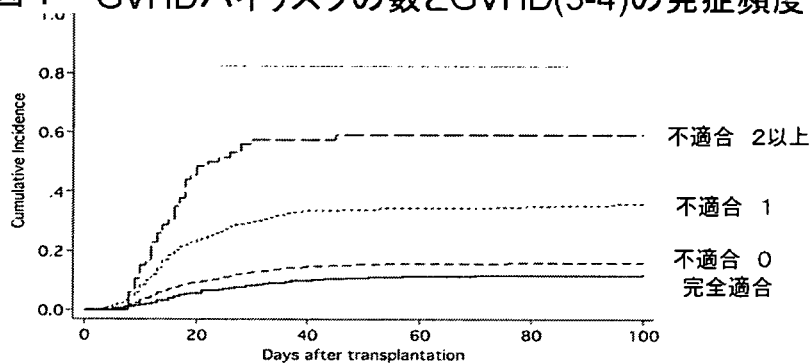
HLA-A座

Donor - Patient	n	HR (95%CI)	P
A*0201-A*0206	138	1.23 (0.87-1.73)	0.223
A*0206-A*0201	131	1.78 (1.32-2.41)	<0.001
A*0201-A*0207	28	0.83 (0.34-2.03)	0.699
A*0207-A*0201	20	1.12 (0.42-3.02)	0.809
A*0201-A*0210	11	1.57 (0.58-4.23)	0.367
A*0206-A*0207	27	3.45 (2.09-5.70)	<0.001
A*0207-A*0206	22	0.71 (0.23-2.24)	0.571
A*2402-A*2420	60	0.64 (0.32-1.30)	0.225
A*2420-A*2402	30	1.18 (0.56-2.49)	0.660
A*2601-A*2602	24	0.64 (0.26-1.58)	0.340
A*2602-A*2601	21	3.35 (1.89-5.91)	<0.001
A*2601-A*2603	34	1.37 (0.73-2.57)	0.326
A*2603-A*2601	35	2.17 (1.29-3.64)	0.003
A*2602-A*2603	10	1.23 (0.30-4.98)	0.763
A*2603-A*2602	12	1.50 (0.48-4.68)	0.485
A other mismatch	97	1.47 (1.00-2.15)	0.047

表 2 重症GVHDが生じるHLA型の組み合わせ

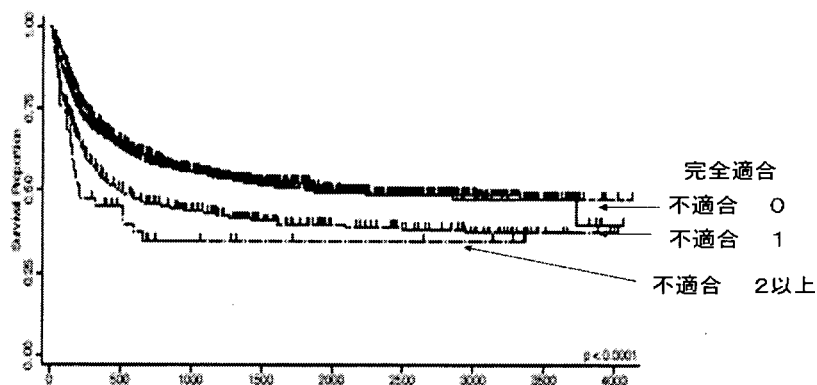
Donor - Patient	n	HR(95% CI)	P
A*0206-A*0201	131	1.78 (1.32-2.41)	<0.001
A*0206-A*0207	27	3.45 (2.09-5.70)	<0.001
A*2602-A*2601	21	3.35 (1.89-5.91)	<0.001
A*2603-A*2601	35	2.17 (1.29-3.64)	0.003
B*1501-B*1507	19	3.34 (1.85-5.99)	<0.001
C*0303-C*1502	25	3.22 (1.75-5.89)	<0.001
C*0304-C*0801	69	2.34 (1.55-3.52)	<0.001
C*0401-C*0303	42	2.81 (1.72-4.60)	<0.001
C*0801-C*0303	80	2.32 (1.58-3.40)	<0.001
C*1402-C*0304	23	3.66 (2.00-6.68)	<0.001
C*1502-C*0304	27	3.77 (2.20-6.47)	<0.001
C*1502-C*1402	50	4.97 (3.41-7.25)	<0.001
DRB1*0405-0403	53	2.13 (1.28-3.53)	0.003
DRB1*1403-1401	23	3.19 (1.77-5.73)	<0.001
DQB1*0301-0502	19	2.81 (1.44-5.51)	0.002
DPB1*0301-0501	49	2.41 (1.49-3.89)	<0.001
DPB1*0501-0901	71	2.03 (1.30-3.16)	0.002

図1 GVHDハイリスクの数とGVHD(3-4)の発症頻度



HLA	GVHDハイリスクの組み合わせの数	N	HR (95% CI)	P
完全適合		972	1.00	
不適合	0	2,442	0.99 (0.76-1.30)	0.969
不適合	1	571	2.10 (1.56-2.83)	<0.001
不適合	2以上	65	3.43 (2.25-5.23)	<0.001

図2 GVHDハイリスクの数と生存



HLA	GVHDハイリスクの組み合わせの数	N	HR (95% CI)	P
完全適合		972	1.00	
不適合	0	2,442	1.10 (0.97-1.24)	0.135
不適合	1	571	1.50 (1.29-1.76)	<0.001
不適合	2以上	65	1.94 (1.36-2.80)	<0.001

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

HLA の DNA タイピングの意義に関する研究

分担研究者 笹月 健彦（国立国際医療センター）
研究協力者 山本 健（九州大学生体防御医学研究所）

研究要旨

非血縁者間骨髄移植でのGvHD発症リスクに関わるHLA以外の遺伝子多型が同定されつつある中、リスクHLAに加えて新規遺伝子多型をマッチさせるには、大きなドナープールサイズが要求されよう。我々は、これまで知られる日本人HLA対立遺伝子頻度とハプロタイプ頻度から、A、B、DRB1遺伝子座に新規遺伝子多型を加味して、プールサイズを試算した。その結果、50万人のプールサイズにおいて、新規遺伝子多型（SNP）のMinor allele frequencyが0.25では約0.7、0.5では約0.6のProportion of patients matchedを得た。今後、新規遺伝子多型とGvHD発症や予後との関係を詳細に解明した上で、あらためて各HLA遺伝子座もふくめて遺伝的寄与度を算出し、重要な遺伝子座の選択と、それに基づくプールサイズの検討が必要となろう。

A. 研究目的

骨髄移植は、造血系の悪性腫瘍および遺伝性疾患の有効な治療法である。しかし、骨髄移植においては、しばしば致死性的GvHDを発症することから、GvHDを中心とした予後に対するHLAの寄与とHLA以外の遺伝子座の関与を詳細に把握することが最重要である。

HLAは高度の多型性を有することから、主要HLAをDNAレベルでマッチさせるためには相当数の公的骨髄バンク登録数を必要とする。さらに、GvHD発症のリスクに関わるHLA以外の遺伝子多型が発見された場合、それを含めてマッチさせるには、さらに多くの登録者数が要求されよう。したがって本年度は、新規の重要な遺伝子多型が同定されつつある中、十分な充足率を得るためのバンクサイズの試算を試みた。

B. 研究方法

HLA-A, B, C, DRB1について、1-3遺伝子座マッチを得るためのドナープールサイズをまず計算した。日本人におけるアレル頻度は、Morishimaら（Blood 2002, n=2326-2483）、Nakajimaら（MHC 2001, n=516-523）、Tanakaら（Clin. Transpl 1996, n=493）、Tokunagaら（Immunogenet. 1997, n=114）、Hashimotoら（Tissue Antigens 1994, n=916）を参考にし平均値を用いた。ハプロタイプ補正值は、Nakajimaらの報告にあるハプロタイプ頻度を、同一の報告にあるアレル頻度の積によって得られる値で除することで求めた。A-B、A-C、A-DRB1、A-C-B、A-B-DRB1、A-C-DRB1について、それぞれ、28, 19, 0, 52, 32, 0個のハプロタイプについて補正值を利用した。Proportion of patients matchedは1遺伝子座の場合（遺伝子型頻度×（プールサイズ×遺伝子型頻度））の全ての遺伝子型についての総和（ただし（プールサイズ×遺伝子型頻度）

が1を超える場合は1)によって求め、2遺伝子座以上のときは、遺伝子型頻度の積に補正値を考慮し、全ての遺伝子型の組み合わせについて算出し、その総和をとった。また、新たに同定される遺伝子多型は Biallelic の SNP を想定し、MAF が 0.25 と 0.5 の 2 通りについて試算した。

C. 研究結果

1 遺伝子座のみ考慮した場合、A および C 遺伝子座においては、約 100 人、B および DRB1 遺伝子座においては、約 200 人のドナープールサイズで、Proportion of patients matched が 0.9 となった。

2 遺伝子座を考慮した場合、A-C、A-B、A-DRB1 の組み合わせにおいて、約 20,000 人のサイズで、Proportion of patients matched が 0.95 を越えた。

3 遺伝子座を考慮した場合、A-B-C、A-C-DRB1 の組み合わせにおいては、約 20 万人、A-B-DRB1 の組み合わせにおいては、約 40 万人のサイズで、Proportion of patients matched が 0.8 を越えた。

A-B-DRB1 に新たな遺伝子多型 (SNP) が加わった場合、50 万人のサイズにおいて、SNP の MAF が 0.25 では約 0.7、0.5 では約 0.6 の Proportion of patients matched であった。

D. 考察

非血縁者間骨髄移植において、HLADNA 型が完全にマッチしたドナープールを準備することは著しく困難であり、予後に重要な影響を及ぼす HLA 遺伝子座についてマッチさせることとなる。今回の試算では、日本人においては、約 40 万人のドナープールサイズで、約 80% の患者において、HLA-A, B, DRB1 がマッチしたドナーが準備可能となった。これに新しく重要な遺伝子多型が加わった場合、十分な充足率を満たすには、さらに多くのドナープールが必要となる。これには、新規多型の対立遺伝子頻度も大きく影響することから、今後、新規遺伝子多型を詳細に解明した上で、これも含めて

HLA やマイナー抗原について、あらためて骨髄移植予後に関わる遺伝的貢献度を算出し、重要な遺伝子座の選択と、それに基づくプールサイズの検討が必要となろう。

F. 研究発表

1. 論文発表

1: Morishima Y, Yabe T, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, Yamamoto K, Maruya E, Akatsuka Y, Onizuka M, Sakamaki H, Sao H, Ogawa S, Kato S, Juji T, Sasazuki T, Kodera Y; Japan Marrow Donor Program. Effects of HLA allele and killer immunoglobulin-like receptor ligand matching on clinical outcome in leukemia patients undergoing transplantation with T-cell-replete marrow from an unrelated donor. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007 Mar;13 (3): 315-328.

2: Sarthy AV, Morgan-Lappe SE, Zakula D, Verneti L, Schurdak M, Packer JC, Anderson MG, Shirasawa S, Sasazuki T, Fesik SW. Survivin depletion preferentially reduces the survival of activated K-Ras-transformed cells. *Mol Cancer Ther.* 2007 Jan; 6 (1): 269-276.

3: Klampfer L, Huang J, Kaler P, Sasazuki T, Shirasawa S, Augenlicht L. STAT1-independent inhibition of cyclooxygenase-2 expression by IFN γ ; a common pathway of IFN γ -mediated gene repression but not gene activation. *Oncogene.* 2007 Mar 29; 26 (14): 2071-2081.

4: Kunisaki Y, Nishikimi A, Tanaka Y, Takii R, Noda M, Inayoshi A, Watanabe K, Sanematsu F, Sasazuki T, Sasaki T, Fukui Y. DOCK2 is a Rac activator that regulates motility and polarity

- during neutrophil chemotaxis. *J Cell Biol.* 2006 Aug 28; 174 (5): 647-652.
- 5: Liu Z, Li H, Wu X, Yoo BH, Yan SR, Stadnyk AW, Sasazuki T, Shirasawa S, LaCasse EC, Korneluk RG, Rosen KV. Detachment-induced upregulation of XIAP and cIAP2 delays anoikis of intestinal epithelial cells. *Oncogene.* 2006 Dec 14; 25 (59): 7680-7690.
- 6: Teraishi F, Guo W, Zhang L, Dong F, Davis JJ, Sasazuki T, Shirasawa S, Liu J, Fang B. Activation of sterile20-like kinase 1 in proteasome inhibitor bortezomib-induced apoptosis in oncogenic K-ras-transformed cells. *Cancer Res.* 2006 Jun 15; 66 (12): 6072-6079.
- 7: Furuno K, Masatsugu T, Sonoda M, Sasazuki T, Yamamoto K. Association of Polycomb group SUZ12 with WD-repeat protein MEP50 that binds to histone H2A selectively in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Jul 7; 345 (3): 1051-1058.
- 8: Smakman N, van den Wollenberg DJ, Elias SG, Sasazuki T, Shirasawa S, Hoeben RC, Borel Rinkes IH, Kranenburg O. KRAS (D13) Promotes apoptosis of human colorectal tumor cells by ReovirusT3D and oxaliplatin but not by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Res.* 2006 May 15; 66 (10): 5403-5408.
- 9: Kunisaki Y, Tanaka Y, Sanui T, Inayoshi A, Noda M, Nakayama T, Harada M, Taniguchi M, Sasazuki T, Fukui Y. DOCK2 is required in T cell precursors for development of Valpha14 NK T cells. *J Immunol.* 2006 Apr 15; 176 (8): 4640-4645.
- 10: Liu Z, Li H, Derouet M, Berezkin A, Sasazuki T, Shirasawa S, Rosen K. Oncogenic Ras inhibits anoikis of intestinal epithelial cells by preventing the release of a mitochondrial pro-apoptotic protein Omi/HtrA2 into the cytoplasm. *J Biol Chem.* 2006 May 26; 281 (21): 14738-14747.

「ゲノムワイドな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分子生命科学 教授

研究協力者 鬼塚 真仁 東海大学医学部内科学系血液内科学

研究協力者 島田 誠子 東海大学医学部内科学系血液内科学

研究要旨

我々は移植後合併症発症に関わる遺伝的素因の解明を目的としマイクロサテライト多型や SNP (single nucleotide polymorphism) を遺伝子マーカーとして用いた解析を行ってきた。今年度は、自己免疫疾患関連遺伝子として FCRL3 と PADI4 について慢性 GVHD との関連を検討するとともに、非古典的 HLA-class I 分子である HLA-G も遺伝子解析対象とし、それぞれの移植後合併症に与える影響について検討した。

A. 研究目的

造血幹細胞移植の成否に最も重要な因子は HLA の一致度であるが、HLA haplo-identical な同胞間移植であっても、ときに重篤な移植後合併症を経験する。このことから、我々は HLA 以外に移植成績に影響を与える因子の存在として、マイナー組織適合抗原およびサイトカイン・ケモカインなどの移植後免疫応答に深く関わるタンパクの遺伝子多型性を解析し、HLA 以外の新たな造血幹細胞移植関連因子の探求を目的として研究をおこなっている。

B. 研究方法

今年度は、これまでと同様にマイクロサテライトマーカーによる移植関連遺伝子探索と、日本人における自己免疫疾患関連遺伝子の同定が報告されたことから、同様の病態を示す、慢性 GVHD に関して、自己免疫疾患関連遺伝子との関係について検討した。

HLA 一致血縁間造血幹細胞移植症例におけるドナー・レシピエントの遺伝子多型性解析を行い、自己免疫疾患関連遺伝子の多型性が慢性 GVHD 発症に影響するかどうかを検討した。

マイクロサテライトマーカーを用いた研究では、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、GVHD 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した。この手法を用いて、FCRL1~5 までに 4 カ所のマイクロサテライト多型を見だし、FCRL3 の SNP の結果と同時にマイクロサテライト多型の結果も考慮し、疾患関連遺伝子の探求を行った。

C. 研究結果

自己免疫疾患関連遺伝子の FCRL3 遺伝子多型性は慢性 GVHD の発症に影響すること

が判明した。FCRL3-169C/T 多型で、C/C を有する症例はリウマチ、SLE、橋本病などの自己免疫疾患症例で有意に高率に認められる遺伝子型であるが、慢性 GVHD においては C/C をレシピエントが有する症例では有意に発症率が低くなることが判明した。特にリウマチに強く関連する疾患関連遺伝子である PADI4 遺伝子多型性は慢性 GVHD 発症に影響は与えないことが判明した。マイクロサテライト多型を用いた結果では、いずれの FCRL1~5 に存在するマイクロサテライト多型も、慢性 GVHD の発症と関連を見いだすことはできなかった。

HLA-G に存在する 14bp の insertion/deletion 多型性では、insertion を有する症例は日本人において 2%程度と非常に低率であるために、GVHD の発症とは関連を見いだすことができなかった。

D. 考察

自己免疫疾患関連遺伝子の FCRL3 遺伝子では、慢性 GVHD の発症率が低率となるハプロタイプを認めた。しかし、マイクロサテライト多型を用いた解析では、FCRL1,2,4,5 では慢性 GVHD の発症と関連を認めなかった。FCRL3 は慢性 GVHD 発症に何らかの影響をあたえている可能性がある。

HLA-G の insertion/deletion 多型性は日本人におけるヘテロ接合度が低率であるために、GVHD 発症に影響するかどうかを検討することはできなかった。今後は、HLA-G のタイピングを進め、移植後合併症発症との関連を調査する予定である。

E. 結論

移植後合併症に影響する非 HLA 遺伝子多

型と HLA-G について検討した。

- 自己免疫疾患関連遺伝子である FCRL3 プロモーター領域の SNP が、慢性 GVHD 発症に影響することが判明した。
- リウマチに特異的に関連している PADI4 遺伝子多型性は、慢性 GVHD 発症に影響しなかった。
- HLA-G insertion/deletion 多型性は日本人におけるヘテロ接合度が低率であるために、GVHD 発症との関連を示すことはできなかった。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Masako Shimada, Makoto Onizuka, Shinichiro Machida, Rikio Suzuki, Minoru Kojima, Koichi Miyamura, Yoshihisa Kodera, Hidetoshi Inoko, Kiyoshi Ando. Association of autoimmune disease-related gene polymorphisms with chronic graft-versus-host disease. Br J Haematol, in press

2. 学会発表

1) Onizuka M, Simada M, Kojima M, Oki M, Sirasugi Y, Ogawa Y, Miyamura K, Kodera Y, Inoko H, Ando K. Genetic risk factors for post allogeneic HSCT complication among Japanese population. EBMT Annual Congress.2007, Lyon.

2) Masako Shimada, Makoto Onizuka, Taku

Oba, Yosiaki Ogawa, Hiroshi Kawada, Koichi Miyamura, Tomomitsu Hotta, Yoshihisa Kodera, Hidetoshi Inoko, Kiyoshi Ando. Inflammatory disease associated gene polymorphisms detected in patients with chronic graft-vs-host disease. The American Society of Hematology□48th Annual Meeting and Exposition. 2006, Orland.

3) 鬼塚真仁、島田誠子、大庭拓、宮村耕一、小寺良尚、安藤潔、猪子英俊。同種造血幹細胞移植に与える非 HLA 遺伝子多型の影響。第 68 回日本血液学会総会 2007。福岡

4) 島田誠子、鬼塚真仁、鈴木利貴央、川田浩志、小川吉明、稲本賢弘、大庭拓、宮村耕一、堀田知光、小寺良尚、猪子英俊、安藤潔。慢性 GVHD と遺伝子多型性。第 68 回日本血液学会総会 2007。福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

特記事項なし

造血幹細胞移植における NK 細胞受容体およびサイトカイン遺伝子多型の影響

分担研究者	屋部登志雄	(東京都赤十字血液センター)
分担研究者	森島泰雄	(愛知県がんセンター)
研究協力者	松尾恵太郎	(愛知県がんセンター)
研究協力者	柏瀬貢一	(東京都赤十字血液センター)
研究協力者	平安恒幸	(東京都赤十字血液センター)

研究要旨 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 NK 細胞受容体 KIR (Killer Ig-like Receptor) の認識する HLA-C 抗原の KIR リガンド不適合が移植成績に影響を及ぼすことが森島らにより示されている。本研究では KIR リガンド適合性効果に影響する因子と考えられる *KIR* 遺伝子型を判定し移植成績の関連を調べてきた。昨年度までに患者、ドナーの *KIR* 遺伝子 16 種類の有無を PCR-SSP 法で 275 症例解析したが、今年度はそれらの遺伝子型と骨髄移植成績について新たに Cumulative Incidence による単変量解析と多変量解析を用いた関連解析を行った。また KIR リガンド適合性効果における患者への ATG 投与の影響についても検討した。Cumulative Incidence 解析から抑制型 KIR が働かない KIR リガンド不適合時には、ドナー活性化型 *KIR2DS2* 陽性の場合では陰性例に比べ高率に急性重症度 GVHD を発症することが示された。多変量解析からも HLA-C 抗原不適合症例においてドナー *KIR2DS2* が急性重症 GVHD 発症の危険因子であるという結果が得られた。また ATG 投与により KIR リガンド不適合による急性 GVHD 発症、全生存率への悪化効果が見られなくなることを判明した。

A. 研究目的

森島らは NK 細胞受容体 KIR が認識する HLA-C 抗原の KIR リガンドが GVHD 方向不適合症例では急性重症 GVHD 発症が高く全生存率が低下することを報告してきた(本研究班昨年度報告)。この KIR リガンド適合性効果に影響する因子として患者、ドナーの *KIR* 遺伝子型適合性および患者への ATG 投与について移植成績との関連を解析した。

B. 研究方法

(1) JMDP を介した HLA-A,-B,-DR 血清学型一致非血縁者間骨髄移植約 2500 症例のうち T 細胞除去例を除き、昨年度までに KIR のジェノタイピングを終えた造血系悪性疾患 (AML, CML, ALL, MDS, non-Hodgikin lymphoma) のうち GVHD 予防法として Cyclosporine と短期 Methotolexate 投与を行った 187 症例の 16

種類の KIR (2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 3DS1, 2DP1, 3DP1) 遺伝子型と移植成績との関連について Cumulative Incidence による単変量解析と Cox Regression Test による多変量解析を用いた関連解析を行った。また KIR リガンド適合性への ATG 効果については Cyclosporine と短期 Methotrexate 投与を行った造血系悪性疾患 1489 症例について解析した。

(2) 倫理面への配慮

本研究は東京都赤十字血液センター、愛知がんセンター、JMDF の倫理委員会の承認を得てその規定に従って行った。

C. 研究結果

昨年度のカプランマイヤー法による解析からドナー *KIR2DS2* 陽性症例で急性重症 GVHD 発症が高いことが示唆された。今回は新たに Cumulative Incidence による解析を行った。図 1 に示すように KIR リガンド不適合時にドナー *KIR2DS2* 陽性で患者がそのリガンド C1 をもつ場合は 3-4 度急性 GVHD 発症が高いことが判明した。これは ATG 非投与症例に限った場合も同様であった。Cox Regression Test による多変量解析からもドナー *KIR2DS2* は急性重症 GVHD 発症の危険因子であることが明らかとなった (表 1)。

KIR リガンド不適合効果について患者への ATG 非投与、投与群に分けて造血系悪性疾患について Cumulative Incidence 解析を行った。ATG 非投与群(1395 症例)では森島らが白血病症例について報告した結果と同様に、急性重症 GVHD 発症が高く、全生

存率が低かった (図 2 A)。一方 ATG 投与群(94 症例)の KIR リガンド不適合(11 症例)では 3-4 度急性 GVHD 発症が見られず、KIR リガンド適合症例 (27 症例) よりも有意に発症が抑制されていた (図 2 B)。また ATG 非投与群で観察された全生存率悪化効果も見られなかった(データ非提示)。Cox Regression Test による多変量解析からも ATG 投与により KIR リガンド不適合では急性 GVHD 発症が低下する一方で全生存率の悪化効果がなくなることが示された (表 2)。

LILR 受容体については *LILRA3*, *LILRB2* 遺伝子座の多型スクリーニングを進め、日本人健常者集団のアリル頻度を明らかにした。これを基に来年度、骨髄移植成績と *LILR* 多型との関連を解析する予定である。

抑制性サイトカインである *IL-10* のプロモーター領域 3 箇所の SNP を PCR-SSO 法により解析し、骨髄移植約 6000 ペアのハプロタイプを明らかにした。来年度に移植成績との統計解析を行う予定である。

D. 考察

昨年度までに報告してきた KIR リガンド不適合時にドナー *KIR2DS2* と患者 C1 リガンドの組み合わせで重症急性 GVHD 発症が高いことが今回 Cumulative Incidence 解析および多変量解析からも明らかとなった。この活性化 *KIR* とそのリガンドの組み合わせと造血幹細胞移植成績との関連は初めての報告である。ドナー選択時に KIR リガンド適合性ととも活性化 *KIR* 遺伝子型を考慮する重要性が示された。また KIR リガンド不適合による成績悪化効果は患者へ

の ATG 投与により軽減できる可能性が示された。

E. 結論

患者、ドナー間での KIR リガンド不適合による成績悪化効果にはドナー活性化 KIR 遺伝子型と患者リガンドの組み合わせと患者への ATG 投与という2つの要因が大きな影響を及ぼしていることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Morishima Y, Yabe T, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, Yamamoto K, Maruya E, Akatsuka Y, Onizuka M, Sakamaki H, Sao H, Ogawa S, Kato S, Juji T, Sasazuki T, Kodera Y for the Japan Marrow Donor Program. Effects of HLA Allele and Killer Immunoglobulin-like Receptor Ligand Matching on Clinical Outcome in Leukemia Patients Undergoing Transplantation With T-Cell-Replete Marrow From an Unrelated Donor. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 13:315-328, 2007.

2. Yabe T, Matsuo K, Hirayasu K, Kashiwase K, Kawamura-Ishii S, Tanaka H, Ogawa A, Takanashi M, Satake M, Nakajima K, Tokunaga K, Inoko H, Saji H, Ogawa S, Juji T, Sasazuki T, Kodera Y and Morishima Y for the Japan Marrow

Donor Program. Donor killer immunoglobulin-like receptor (KIR) genotype and anti-thymocyte globulin (ATG) pre-administration are critical factors in outcome of HLA-C-KIR ligand mismatched T cell-replete unrelated bone marrow transplantation. (投稿中)

3. Hirayasu K, Ohashi J, Kashiwase K, Takanashi M, Satake M, Tokunaga K, and Yabe T. Long-term persistence of both functional and non-functional alleles at the leukocyte immunoglobulin-like receptor A3 (*LILRA3*) locus suggests balancing selection. *Human Genetics* 119 : 436-43, 2006.

学会発表

1、平安恒幸、大橋順、田中秀則、柏瀬貢一、高梨美乃子、佐竹正博、徳永勝士、屋部登志雄

LILRA3 遺伝子にみる東アジア特異的な自然淘汰 第15回日本組織適合性学会(平成18年10月、東京)

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし