

- 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, 13:315-28.
10. 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, 59:99-108.
11. 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, 39:25-30.
12. 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, 13:90-9.
13. Kawase T, Akatsuka Y, Torikai H, Morishima S, Oka A, Tsujimura A, Miyazaki M, Tsujimura K, Miyamura K, Ogawa S, Inoko H, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Takahashi T. Alternative splicing due to an intronic SNP in HMSD generates a novel minor histocompatibility antigen. *Blood*, 2007, 110:1055-1063.
14. Torikai H, Akatsuka Y, Miyauchi H, Terakura S, Onizuka M, Tsujimura K, Miyamura K, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Takahashi T. The HLA-A*0201-restricted minor histocompatibility antigen HA-1H peptide can also be presented by another HLA-A2 subtype, A*0206. *Bone Marrow Transplant.*, 2007, 40: 165-174.
15. 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 CTLs recognizing a novel HLA-Cw*0303 and Cw*0304-restricted epitope on EBNA1-expressing cells. *J. Gen. Virol.*, 2007, 770-780.

16. 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, 120: 594-604.
17. Kenji Furuno, Kazuyuki Ikeda, Shinjiro Hamano, Kayako Fukuyama, Miki Sonoda, Toshiro Hara, Takehiko Sasazuki, Ken Yamamoto. Oncut transcription factor: OC2 is a direct target of T-bet in type-1 T-helper cells. *Genes and Immunity*, 2008, in press.

3. 学会発表

Kawase T, Morishima Y. et al.

Identification of HLA Allele Mismatch Combinations and Amino Acid Substitution Positions Associated with GVL Effect after Unrelated HSCT. 49th annual meeting of American Society of Hematology. Dec. 2007. Atlanta. USA

H. 知的財産権の出願・登録状況

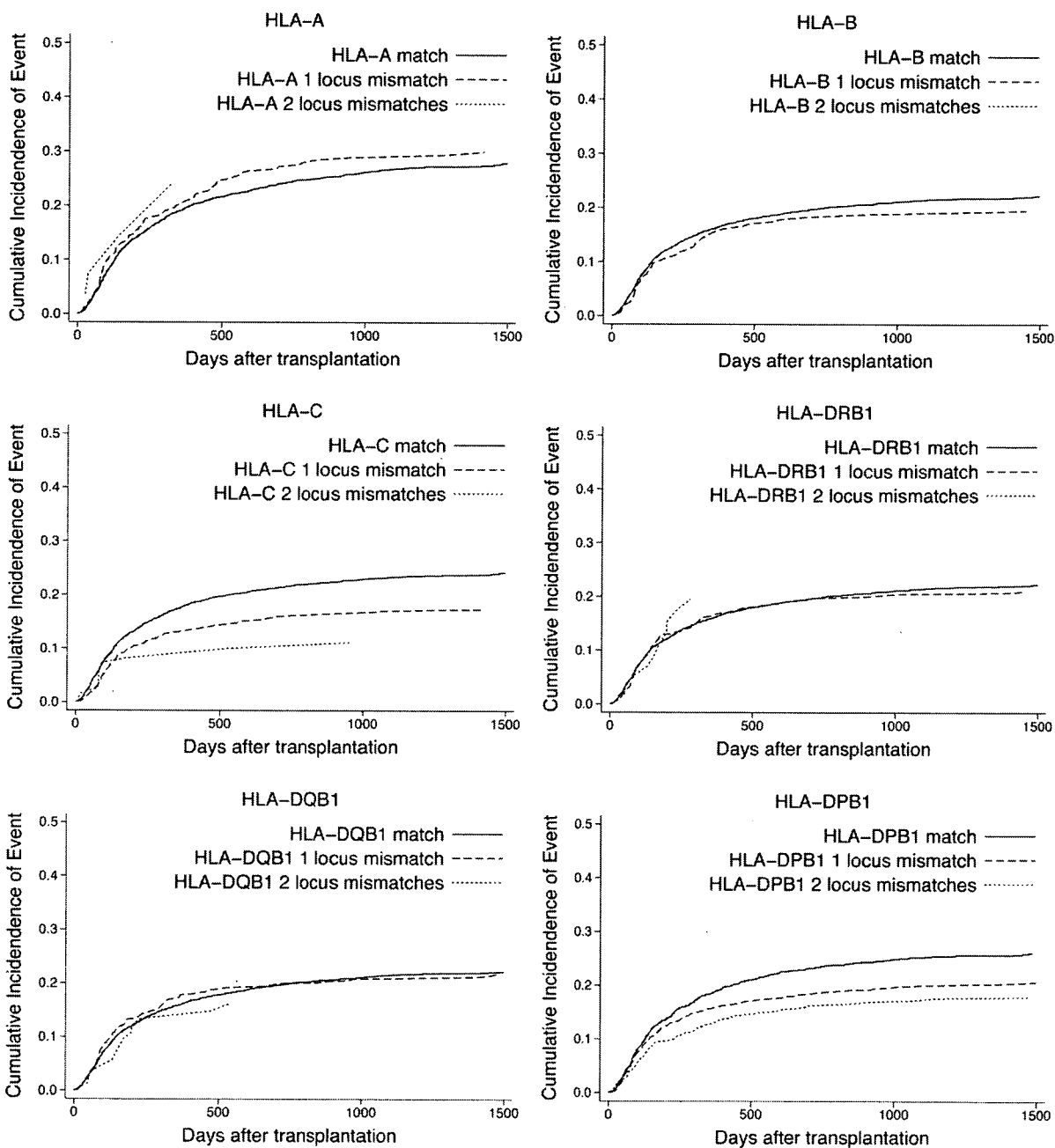
赤塚美樹、高橋利忠、葛島清隆、森島泰雄：
「LOC284293バリエント遺伝子並びに該遺伝子がコードするCD8+細胞傷害性Tリンパ球mHAエピトープペプチド及びその用途」、平成18年5月31日出願（特願2006-152098）

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）

赤塚美樹、高橋利忠、葛島清隆、森島泰雄：
「CD8+細胞傷害性Tリンパ球エピトープペプチドおよびその用途」平成15年2月14日出願（特願2003-03696）

Figure 1.

a



b

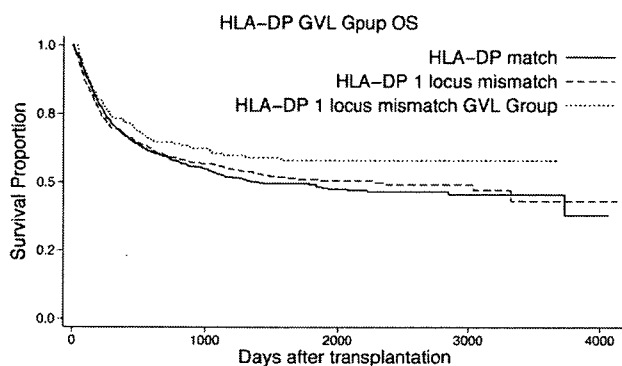


表1 白血病の再発のリスク (OR) と有意な HLA 型の組み合わせ

Mismatch combination, donor-recipient	N	OR (95% CI)	P
●C0102-C1402	13	0	<0.001
C0303-C1502	19	0.22 (0.05-0.98)	0.048
●C0801-C0102	10	0	<0.001
C1402-C0304	20	0	<0.001
●DP0402-DP0201	54	0.41 (0.17-0.99)	0.049
●DP0501-DP0201	301	0.7 (0.52-0.94)	0.017
●DP0501-DP0401	48	0.45 (0.2-0.99)	0.049
●DP0501-DP0402	112	0.59 (0.35-0.99)	0.046
●DP0901-DP0201	43	0.38 (0.15-0.99)	0.047
●DP1301-DP0201	20	0	<0.001

丸印 重症急性 GVHD は有意でない組み合わせ

表2 白血病再発リスクに関与する HLA 上のエピトープの位置とそのアミノ酸

Posisiton and kind of amino acid substitution (Donor-Recipient)	N	OR (95% CI)	P
HLA-C locus			
●Tyr9C-Ser9C	152	0.54 (0.31-0.94)	0.028
○Tyr99C-Phe99C	153	0.53 (0.31-0.93)	0.026
●Leu156C-Arg156C	225	0.58 (0.36-0.92)	0.020
HLA -DPB1 locus			
No significant substitutions			

厚生労働科学研究費補助金(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 大学院

研究協力者 豊崎 誠子 東海大学医学部内科学系血液内科学 大学院

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、疾患の類似性から自己免疫疾患関連遺伝子と慢性 GVHD との関連を検討した。

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ipient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。また、FCRL3 以外の自己免疫疾患関連遺伝子として CTLA4 と IL17F について同様の解析を行った。

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。マイクロサテライト多型を用いた結果では、FCRL3 近傍に存在する2つのマイクロサテライト多型において、慢性 GVHD の発症と関連が認められた。マイクロサテライト多型の結果は FCRL3-169C/T 多型での結果を指示するものであり、FCRL3 遺伝子が慢性 GVHD 発症に何らかの影響を与えていることが判明した。

さらに、CTLA4、IL17F についてもレシピエント側の遺伝子型が慢性 GVHD の発症と関連していることが判明した。

CTLA4 において SNP-318、+49、CT60 を検討した。SNP+49 において、レシピエントの遺伝子型が AA の症例では AG,GG にくらべて有意に慢性 GVHD の発症率が低値であった ($p = 0.037$)。

IL17F では SNP rs721430 において CC を遺伝子型として保有する症例では CT、TT の症例に比べて有意に慢性 GVHD の発症率が低かった ($p = 0.036$)。IL17F に存在する TagSNP を日本人における HapMap 情報から 2 種選択した (rs602670、rs763780)。上記の SNP と加えて 3 種の SNP のハプロタイプ解析を行ったところ、-T-C-G-あるいは-T-T-G-

をハプロタイプとして有する症例で慢性 GVHD の発症率が有意に低値であった ($p = 0.0053$)。

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。

CTLA4 に関してはすでに欧米から慢性 GVHD との関連を示す報告が存在するが、ドナー側であり、本邦の検討ではレシピエント側に有意差が存在した。CTLA4 は T 細胞に発現するタンパクであり、移植後 100 日を経過し発症する慢性 GVHD とレシピエントの T 細胞がどのように関係するのか、今後検討する必要がある。

IL17F に関しては、慢性 GVHD との関連を示す報告はこれまでにないものの、Th17 細胞が自己免疫疾患において中心的な役割を果たすことが示されていることから、今後メカニズムの解明を急ぐこととする。

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。

- CTLA4 と慢性 GVHD の関連性を認め
たが、ドナー側ではなく、レシピエント
側の多型性であった。
- IL17F における3つの SNP のハプロタイ
プにより慢性 GVHD の発症に有利なハ
プロタイプが存在することが判明した。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ota M, Fukushima H, Kulski JK, Inoko H.
Single nucleotide polymorphism detection by
polymerase chain reaction-restriction
fragment length polymorphism. *Nat.*
Protocols 2007; 2(11): 2857-2864.
- 2) Yabe T, Matsuo K, Hirayasu K, Kashiwase
K, Kawamura-Ishii S, Tanaka H *et al.* Donor
Killer Immunoglobulin-Like Receptor (KIR)
Genotype-Patient Cognate KIR Ligand
Combination and Antithymocyte Globulin
Preadministration Are Critical Factors in
Outcome of HLA-C-KIR Ligand-Mismatched
T⁺Cell-Replete Unrelated Bone Marrow
Transplantation. *Biology of Blood and*
Marrow Transplantation 2008; 14(1): 75-87.

2. 学会発表

- 1) Association of Fc receptor-like protein
family with chronic graft-versus-host disease
Makoto Onizuka, Masako Toyosaki,
Shinichiro Machida, Minoru kojima, Rikio

Suzuki, Koichi Miyamura, Yoshihisa Kodera,
Hidetoshi Inoko, Kiyoshi Ando. 49th ASH
Annual Meeting 2007, Atlanta

- 2) Association of interleukin 17F gene
polymorphisms with chronic
graft-versus-host disease M. Toyosaki, M.
Onizuka, S. Machida, R. Suzuki, M. Kojima,
K. Miyamura, Y. Kodera, H. Inoko. K. Ando.
34th Annual Meeting of the EBMT 2008,
Florence

H. 知的財産権の出願・登録状況

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	佐治博夫	(特定非営利活動法人 HLA 研究所)

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を悪化させる要因について検討した。昨年度までに行った患者 ATG 投与及びドナー活性化型 KIR2DS2 の影響についての解析結果をまとめて国際学会での発表および論文として報告した。さらに別の活性化型である KIR3DS1 (ドナー) とリガンドである HLA-Bw4I80 (患者) の組合せでは KIR リガンド不適合による成績悪化効果 (急性 GVHD 発症、生存率の低下) がなくなることが判明した。NK 細胞受容体 LILR について遺伝子多型のスクリーニングを終了し、移植成績との関連解析を開始する準備ができた。抑制性サイトカインである *IL-10* 遺伝子のプロモーター領域患者 SNP ハプロタイプと急性重症 GVHD 発症率との関連が見られた。

A. 研究目的

造血幹細胞移植成績に HLA をはじめとする組織適合性抗原の適合性が大きく影響している。HLA 抗原は抗体、T 細胞受容体に加え、NK 細胞受容体によっても認識されることが近年判明し、HLA 抗原適合性を NK 細胞アロ反応性からも考慮することが必要となってきた。NK 細胞は腫瘍細胞や感染細胞にも傷害性をもつため、GVL 効果や移植関連感染症防御に働く可能性があり細胞治療への応用も期待されている。我々は移植反応における NK 細胞機能を明らかにして移植成績を向上させるために、NK 受容体と移植成績との関連解析を行って

る。

昨年度 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た (森島ら、*Biol.Blood and Marrow Transp.* 13:315-328, 2007)。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。急性 GVHD は炎症性のサイトカインストームにより重篤化することが示唆されている。*IL-10* は抗炎症作用をもつ抑制性サイトカインであり、患者の *IL-10* 遺

伝子プロモーター領域多型が急性重症度 GVHD 発症と生存率に関連することが米国での HLA 一致血縁者間造血幹細胞移植症例解析から報告された (Lin ら, New Eng. J. Med., 2003)。今回、国内非血縁者間骨髄移植成績への *IL-10* 遺伝子プロモーター多型の影響について検討を行った。

B. 研究方法

(1) JMDP を介した HLA-A、-B、-DR 血清型一致非血縁者間骨髄移植のうち T 細胞除去例を除いた約 2500 症例の造血系悪性疾患 (AML, CML, ALL, MDS, non-Hodgkin 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 および Kaplan-Meier 法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 Methotolexate 投与を行った造血系悪性疾患 1489 症例について解析した。

IL-10 遺伝子プロモーター領域については -1082, -819, -592 の 3 箇所の SNPs について HLA-A~DP 6 座一致、T 細胞非除去、ATG 非投与、Cyclosporine と短期 Methotolexate 投与を行った 341 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、JMDP 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

昨年度までに得られた HLA-C の KIR リガンド不適合における非血縁者間骨髄移植成績悪化効果 (急性重症 GVHD 発症率の増加、ALL での再発率増加、全生存率の低下) が患者 ATG 投与により消失すること及び非 ATG 投与時にドナー活性化型 *KIR2DS2* 遺伝子陽性で患者がそのリガンドである C1 エピトープホモの場合に急性重症 GVHD 発症率が高いという解析結果をまとめた (論文発表 1 および学会発表 1)。今年度さらに他の活性化型 *KIR* 遺伝子、リガンドの組合せについての解析を開始した。患者 ATG 非投与症例で、HLA-C の KIR リガンド不適合、つまり抑制型 KIR が機能せず NK 細胞のアロ反応性が惹起される組み合わせの時に、ドナーが活性化 *KIR3DS1* 遺伝子陽性で患者がリガンドとされている HLA-Bw4 で 80 番目のアミノ酸がイソロイシンの場合 (Bw4I80) には急性重症 GVHD 発症率の悪化が見られず、全生存率および無病生存率の低下も起きなくなることが判明した。HLA-B 抗原のみならず HLA-A 抗原にも Bw4I80 陽性のものがあるが、これらは *KIR3DS1* のリガンドではないとされていたが、今回の解析では HLA-A の Bw4I80 陽性者でも同様な効果が観察されこれらもやはり *KIR3DS1* リガンドとなる可能性が示唆された。

もう一つの HLA 抗原と結合する NK 細胞受容体 LILR については *LILRA3*, *LILRB2* 遺伝子座の多型スクリーニングを進め、日本人および世界の 7 つの集団の健康者集団のアリル頻度を明らかにした。こ

れを基に骨髄移植成績と *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* 遺伝子については HLA-A~DP 6 座[01]アレル一致移植症例 *IL-10* 遺伝子プロモーター領域 SNPs を蛍光ビーズ法により遺伝子型を決定し移植成績との関連を解析した。[02]その結果、患者の (-1082, -819, -592) SNP ハプロタイプが ACC の場合、重症急性 GVHD 発症率が低かった。また -592 が A/A では A/C、C/C に比べ重症急性 GVHD 発症率が高かった。一方、ドナー *IL-10* 遺伝子ではこのような[03]関連は見られなかった。これより国内非血縁者間造血幹細胞移植においても患者 *IL-10* 遺伝子プロモーター多型が移植成績と関連することが判明した。

D. 考察

KIR リガンド不適合における活性化型 KIR の効果は種類により異なりドナー選択時に 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。*KIR* 遺伝子型、リガンド型ともに集団間で大きく頻度が異なることや ATG 投与率が国内外で大きく異なることが報告されているので、これらの違いが国内と外国での KIR リガンド不適合の成績への効果が異なっていることの一因であると考えられる。*IL-10* プロモーター領域解析の結果は、SNP ハプロタイプ ATA および -592 が A/A の場合に重症急性 GVHD 発症率が低いという米国の報告と異なることから、*IL-10* 遺伝子プロモーター領域多型と移植成績と[04]の関連は、血縁、非血縁者

間、あるいは集団間で異なることが示唆された。

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。活性化型 KIR の効果は種類により異なる。非血縁者間造血幹細胞移植においても患者 *IL-10* 遺伝子プロモーター多型が移植成績と関連することが判明した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1). 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. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 13:315-328, 2007.
- 2). Hirayasu K, Ohashi J, Tanaka H, Kashiwase K, Ogawa A, Takanashi M, Satake M, Jia GJ, Chinge NO, Sideltseva EW,

Tokunaga K , Yabe T. Evidence for natural selection on leukocyte immunoglobulin-like receptors for HLA class I in Northeast Asians. *American Journal of Human Genetics*. in press 2008

2.学会発表

1). Yabe T, Matsuo K, Hirayasu K, Kashiwase K, Kawamura-Ishii S, Satake M, Ogawa A, Takanashi M, Nakajima K, Tokunaga K, Inoko H, Saji H, Ogawa S, Juji T, Sasazuki T, Kodera Y and Morishima Y for the JMDP. Donor *KIR2DS2* genotype and anti-thymocyte globulin (ATG) pre-administration are critical factors for HLA-C-KIR ligand mismatched T cell-replete unrelated bone marrow transplantation outcome. 10th Meeting of the Society for Natural Immunity (International NK workshop 2007) in Cambridge, UK. April 2007

2). 屋部登志雄、松尾恵太郎、平安恒幸、柏瀬貢一、佐竹正博、小川篤子、高梨美乃子、中島一格、猪子英俊、佐治博夫、小川誠司、

笹月健彦、小寺良尚、森島泰雄 ドナー活性化 *KIR* 遺伝子型と ATG 投与は HLA-C 抗原 *KIR* リガンド型不適合非血縁者間骨髄移植成績に影響する 第 30 回日本造血細胞移植学会 平成 20 年 2 月、大阪

3). 柏瀬貢一、市原考浩、峯元睦子、平安恒幸、田中秀則、鬼塚真仁、猪子英俊、佐治博夫、小川誠司、笹月健彦、小寺良尚、森島泰雄、佐竹正博、屋部登志雄 抑制性サイトカイン *IL-10* 遺伝子プロモーター領域多型と非血縁者間骨髄移植成績との関連 第 30 回日本造血細胞移植学会 平成 20 年 2 月、大阪

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

同種造血幹細胞移植における遺伝子多型の与える影響に関する研究

分担研究者 村田 誠 名古屋大学医学部附属病院血液内科助教

研究要旨

1. 葉酸代謝酵素遺伝子 *5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)* の一塩基多型 C677T が移植予後に与える影響について、GVHD 予防に短期 MTX+シクロスポリンを用いた HLA 一致同胞間移植 159 例を対象として、検討した。Grade I-IV 急性 GVHD の発症率は 677TT 型患者において有意に低く ($P=0.038$)、grade II-IV 急性 GVHD の発症率も 677TT 型患者において低い傾向 ($P=0.10$) にあった。
2. HLA 遺伝子の多型（即ち患者ドナー間での HLA 不適合）も造血幹細胞移植後の予後に影響を与える。我々は、臍帯血移植後に生着不全を来した患者末梢血中から、ドナーのみが持つ HLA 分子に特異的な細胞傷害活性を示す患者由来 T リンパ球クローンの分離に成功した。このことは、臍帯血移植における生着不全には患者の残存 T リンパ球が関与しうることを示す。
3. 同種末梢血幹細胞移植後の患者においてドナー細胞由来白血病の発症を確認した。これは患者とドナーの遺伝子多型に着目して解析を行った結果 (short tandem repeat analysis)、確認し得たものである。

A. 研究目的

1. 葉酸代謝酵素遺伝子 *MTHFR* には一塩基多型 C677T が存在し、677C/C が 100%の酵素活性を有するのに対し、677C/T は 60%、677T/T は 30%の活性しか持たない。*MTHFR* は葉酸代謝拮抗剤 MTX の代謝に関与することが知られており、昨年米国からは MTX を用いた同種造血幹細胞移植において、活性低下型 *MTHFR* を持つ患者の急性 GVHD 発症率が他の患者のそれと比べて有意に低いことが報告された。今回我々は、日本人における *MTHFR* の多型と移植予後との相関を検討した。
2. HLA 遺伝子の多型（即ち患者ドナー間での HLA 不適合）が GVHD の発症に大きな影響を及ぼすことはよく知られている。しかし生着不全に与える影響については十分な検

討がなされていない。今回我々は、臍帯血移植後に生着不全を来した女性患者の末梢血中から、ドナーのみが持つ HLA 分子に特異的な細胞傷害活性を示す患者由来 T リンパ球クローンの分離に成功した。

3. 近年、患者ドナー間の不適合 HLA 遺伝子やその他の遺伝子多型に着目して、移植後のキメリズム解析を行うことが容易になってきた。我々は、short tandem repeat (STR) analysis 法により、ドナー細胞由来白血病の発症を確認したので報告する。

B. 研究方法

1. GVHD 予防に短期 MTX+シクロスポリンを用いた HLA 一致同胞間移植 159 例を対象として、患者およびドナーの *MTHFR* C677T 遺伝子型を PCR-RFLP 法により決定

した。統計解析は Cox 比例ハザードモデルを用いた。尚、本研究の遂行にあたり、あらかじめヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従い、審査・承認を受けた。

2. 生着不全を来した患者の末梢血単核球を IL-2 存在下で 2 週間培養し、増殖した各々の T リンパ球について Cr 放出試験を行い、ドナー細胞を傷害しかつ患者細胞を傷害しない CTL クローンを選択した。尚、本研究に必要な血液細胞の採取にあたり、あらかじめ患者から文書による同意を得た。

3. 移植前白血病細胞、移植後白血病細胞、ドナー細胞のそれぞれを STR 法で解析し、移植後白血病細胞の細胞起源を明らかにした。尚、本研究に必要な血液細胞の採取にあたり、あらかじめ患者から文書による同意を得た。

C. 研究結果

1. 患者の CC 型、CT 型、TT 型の頻度はそれぞれ 35%、52%、13%、ドナーのそれらは 30%、62%、8% だった。多変量解析の結果、急性 GVHD (I-IV 度) の発症率は活性低下型 (TT 型) を持つ患者および非腫瘍性疾患で低く (RR, 0.34; 95%CI, 0.12-0.94; $P=0.038$: 0.22, 0.05-0.88, 0.033)、II-IV 度は骨髓を用いた移植で低かった (0.35, 0.13-0.98, 0.047)。また Kaplan-Meier 法による解析では、急性 GVHD (I-IV 度) の発症率は活性低下型 (TT 型) 患者 19% vs CC/CT 型患者 45% (log-rank, $P=0.033$)、II-IV 度は TT 型患者 5% vs CC/CT 型患者 24% ($P=0.075$) だった。

2. 様々な HLA を持つ第三者由来 EBV-transformed B 細胞株に対する Cr 放出試験、HLA cDNA plasmid を遺伝子導入したドナー由来 EBV-transformed B 細胞株に対する Cr 放出試験、さらには同 plasmid を遺伝子導入した COS 細胞による IFN- γ 放出試験などの結果より、分離した CTL クローンはドナーのみが有する HLA-B*1501 分

子を特異的に認識することが明らかとなった。またその後の解析により、この CTL クローンは移植実施前から患者末梢血中に存在していたことも明らかとなった。

3. 白血病細胞を 77% 含む移植後の患者骨髓細胞を STR 法でキメリズム解析したところ、100% ドナー型だった。また移植前白血病細胞には C/EBPA 遺伝子の変異を認めたが移植後白血病細胞には認めなかったこと、細胞表面マーカー検索の結果が前後で異なっていたことなども、STR 法の結果を支持した。

D. 考察

1. 日本人においても TT 型患者の急性 GVHD 発症率は有意に低かった。GVHD 予防薬である MTX の投与量は MTHFR 遺伝子型に基づいて調節する必要があるかもしれない。

2. 臍帯血移植における生着不全に、患者由来の T リンパ球が関与し得ること、またその際ドナーの持つ不適合 HLA 分子が標的となり得ることが示された。また、移植前からこの CTL クローンが存在していた理由として、この女性患者には夫由来の B*1501 を持つ子がおり妊娠中に B*1501 の感作を受けた可能性が考えられた。

3. これまでに骨髓移植後のドナー由来白血病は 50 例以上が報告されており、また近年臍帯血移植後のドナー由来白血病も連続的に報告されている。しかし末梢血幹細胞移植後のドナー由来白血病は、20 年近くに及ぶその長い歴史にもかかわらず、わずか 5 例しか報告されていない。

E. 結論

1. 患者における MTHFR 酵素の多型は移植後 GVHD の発症に影響を与える。

2. 移植片のみが持つ HLA 分子特異的な患者由来細胞傷害性 T リンパ球は臍帯血移植における生着に影響を与える。

3. 同種末梢血幹細胞移植後におけるドナー由来白血病の発症頻度は、その他の造血幹細胞移植後のそれに比べ、低い可能性がある。

F. 健康危険情報
なし。

G. 研究発表
論文発表

1. Narimatsu H, **Murata M**, Sugimoto K, Terakura S, Kinoshita T, Naoe T. Successful umbilical cord blood transplantation using a reduced-intensity preparative regimen without total body irradiation and tacrolimus plus methotrexate for prophylaxis of graft-versus-host disease in a patient with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leukemia Lymphoma*, 48 (4): 841-843 (2007).
2. Terakura S*, **Murata M***, Warren EH, Sette A, Sidney J, Naoe T, Riddell SR. A single minor histocompatibility antigen encoded by UGT2B17 and presented by HLA-A*2902 and B*4403. *Transplantation*, 83 (9): 1242-1248 (2007). (*equal contribution)
3. Mizutani E, Narimatsu H, **Murata M**, Tomita A, Kiyoi H, Naoe T. Successful second cord blood transplantation using fludarabine and cyclophosphamide as a preparative regimen for graft rejection following reduced-intensity cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 40 (1): 85-87 (2007).
4. Terakura S, Azuma E, **Murata M**, Kumamoto T, Hirayama M, Atsuta Y, **Kodera Y**, Yazaki M, Naoe T, Kato K. Hematopoietic engraftment in recipients of unrelated donor umbilical cord blood is affected by the CD34⁺ and CD8⁺ cell doses. *Biol Blood Marrow Transplant*, 13 (7): 822-830 (2007).
5. Inamoto Y, Miyamura K, Suzuki R, Yasuda T, Takahashi T, Kuwatsuka Y, Tsujimura A, Sugimoto K, Oba T, Terakura S, Atsuta Y, **Murata M**, Ito M, **Kodera Y**. Long-term outcome after bone marrow transplantation for aplastic anemia using cyclophosphamide and total lymphoid irradiation as conditioning regimen. *Biol Blood Marrow Transplant*, 14 (1): 43-49 (2008).
6. Abe A, Ninomiya M, Wang S, Katsumi A, **Murata M**, Kiyoi H, Naoe T. Human leukemia-xenograft NOG mice as a therapeutic model. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, in press.
7. Sugimoto K, Narimatsu H, Kawase T, Iida H, Watanabe M, Kohno A, Kuwatsuka Y, Uchida T, Hamaguchi M, Terakura S, Naoe T, Matsuo K, **Murata M**, Sawa M, Miyamura K, Morishita Y for the Nagoya Blood and Marrow Transplantation Group (NBMTG). Clinical characteristics of chronic graft-versus-host disease following umbilical cord blood transplantation for adults. *Bone Marrow Transplant*, in press.
8. Narimatsu H, Watanabe M, Kohno A, Sugimoto K, Kuwatsuka Y, Uchida T, **Murata M**, Miyamura K, Morishita Y for the Nagoya Blood and Marrow Transplantation Group (NBMTG). High incidence of graft failure in unrelated cord blood transplantation using a reduced intensity preparative regimen consisting of fludarabine and melphalan. *Bone Marrow Transplant*, in press.
9. Narimatsu H, **Murata M**, Terakura S, Sugimoto K, Naoe T. Potential role of a mismatched HLA-specific CTL clone developed pretransplant in graft rejection following cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, in press.
10. Sugimoto K, **Murata M**, Onizuka M,

Inamoto Y, Terakura S, Kuwatsuka Y, Oba T, Miyamura K, **Kodera Y**, Naoe T. Decreased Risk of Acute Graft-versus-Host Disease Following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Patients with the 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase 677TT Genotype. *Int J Hematol*, in press.

学会発表

1. Sugimoto K, **Murata M**, Onizuka M, Inamoto Y, Terakura S, Kuwatsuka Y, Oba T, Miyamura K, **Kodera Y**, Naoe T. Decreased risk of acute GVHD following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with MTHFR 677TT genotype. The 12th Congress of the Asian-Pacific Bone Marrow Transplantation / The 11th Congress of the International Society of Hematology, Asian-Pacific Division, in Beijing, China. September 2007.
2. Miyakoshi S, Yamaguchi T, Kami M, Matsumura T, Yuji K, Narimatsu H, Kusumi E, Sakamaki H, Kouzai Y, Okada M, Osugi Y, Kobayashi R, Inoue M, Takahashi S, **Murata M**, Kai S, Kato K, Nagamura T, Taniguchi S, Kato S. Acute graft-versus-host disease following umbilical cord blood transplantation: retrospective survey involving 2015 Japanese patients. The 49th annual meeting of the American Society of Hematology, in Atlanta, Georgia. December 2007.
3. Takita M, Yuji K, Yamaguchi T, Matsumura T, Kami M, Sakamaki H, Kouzai Y, Okada M, Osugi Y, Kobayashi R, Inoue M, Takahashi S, **Murata M**, Kai S, Kato K, Nagamura T, Taniguchi S, Kato S. Unrelated cord blood transplantation for malignant lymphoma: A retrospective study from the Japan Cord Blood Bank Network (JCBNW). The 49th annual meeting of the American Society of Hematology, in Atlanta, Georgia. December 2007.
4. Terakura S, **Murata M**, Sugimoto K, Suzuki M, Abe A, Naoe T. Peptide-dependency of alloreactive T cell clones after HLA-mismatch hematopoietic stem cell transplantation. The 49th annual meeting of the American Society of Hematology, in Atlanta, Georgia. December 2007.
5. Narimatsu H, **Murata M**, Terakura S, Sugimoto K, Naoe T. Potential role of a mismatched HLA-specific cytotoxic T lymphocyte clone developed pre-transplant in graft rejection following cord blood transplantation. The 49th annual meeting of the American Society of Hematology, in Atlanta, Georgia. December 2007.
6. **Murata M**, Narimatsu H, Terakura S, Sugimoto K, Naoe T. Potential role of mismatched HLA-specific CTL clone developed pre-transplant in graft rejection following cord blood transplantation. 2008 BMT Tandem Meetings, in San Diego, California. February 2008.
7. Sugimoto K, **Murata M**, Onizuka M, Inamoto Y, Terakura S, Kuwatsuka Y, Oba T, Miyamura K, **Kodera Y**, Naoe T. Decreased risk of acute GVHD following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase 677TT genotype. 2008 BMT Tandem Meetings, in San Diego, California. February 2008.
8. 石川裕一, 清井 仁, 尾関和貴, 鈴木達也, 村田 誠, 宮崎泰司, 栗山一孝, 朝永万左男, 宮脇修一, 直江知樹. WHO 分類に基づく急性骨髄性白血病における網羅的遺伝子変異の解析. 第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会・合同総会 2007 年 10 月 於: 横浜.

9. 稲本賢弘, 伊藤雅文, 大庭 拓, 柳田正光, 市橋亮一, 村田 誠, 西田徹也, 澤正史, 西脇 聡, 河野彰夫, 飯田浩充, 濱口元洋, 鈴木律朗, 宮村耕一, 森下剛久, 平林紀男, 直江知樹, 小寺良尚. 腸管移植関連微小血管障害 (i-TAM) の臨床病理像と予後因子の解析—名古屋骨髓移植グループ—. 第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会・合同総会 2007 年 10 月 於: 横浜.
10. 杉本恭子, 村田 誠, 稲本賢弘, 鬼塚真仁, 鋤塚八千代, 大庭 拓, 寺倉精太郎, 宮村耕一, 小寺良尚, 直江知樹. MTX を用いた同種造血幹細胞移植における急性 GVHD の発症率は活性低下型 MTHFR を持つ患者で低い. 第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会・合同総会 2007 年 10 月 於: 横浜.
11. 安部明弘, 南 陽介, 早川文彦, 北村邦朗, 野村由佳, 鈴木百子, 村田 誠, 勝見 章, 清井 仁, Jamieson CH, Yi JW, 直江知樹. 慢性骨髄性白血病における造血幹細胞・前駆細胞分画の解析: イマチニブ治療後の BCR-ABL の残存. 第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会・合同総会 2007 年 10 月 於: 横浜.
12. 成松宏人, 村田 誠, 寺倉精太郎, 杉本恭子, 水谷絵美, 直江知樹. 臍帯血移植後 graft rejection を来した患者からの移植片に対する細胞傷害性 T リンパ球の分離. 第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会・合同総会 2007 年 10 月 於: 横浜.
13. 村田 誠, 尾関和貴, 大橋春彦, 寺倉精太郎, 清井 仁, 直江知樹. 同種末梢血幹細胞提供ドナー由来の急性骨髄性白血病. 第 30 回日本造血細胞移植学会総会 2008 年 2 月 於: 大阪.
14. 村田 誠. 不適合 HLA 分子を標的とする移植免疫反応の in vitro 解析. 第 30 回日本造血細胞移植学会総会 2008 年 2 月 於: 大阪.
15. 杉本恭子, 成松宏人, 川瀬孝和, 飯田浩充, 渡邊正人, 河野彰夫, 鋤塚八千代, 内田俊樹, 濱口元洋, 寺倉精太郎, 直江知樹, 松尾恵太郎, 村田 誠, 澤 正史, 宮村耕一, 森下剛久. 臍帯血移植における慢性 GVHD. 第 30 回日本造血細胞移植学会総会 2008 年 2 月 於: 大阪.
16. 稲本賢弘, 倉橋信悟, 福島庸晃, 今橋伸彦, 村田 誠, 津下圭太郎, 宮村耕一, 木下朝博, 直江知樹, 小寺良尚, 杉浦勇. 自家移植後多発性骨髄腫の予後予測と再発後の予後. 第 30 回日本造血細胞移植学会総会 2008 年 2 月 於: 大阪.
17. 杉浦立尚, 稲本賢弘, 鈴木律朗, 熱田由子, 村田 誠, 小寺良尚, 直江知樹. 日本造血細胞移植学会総会 (造血) と日本血液学会総会・日本臨床血液学会総会 (日臨血) との発表演題比較. 第 30 回日本造血細胞移植学会総会 2008 年 2 月 於: 大阪.
18. 鈴木利江, 前田有紀, 塚本恵理, 松原史江, 林美津子, 栗原三奈, 山口実々子, 高野 緑, 成松宏人, 村田 誠. 当病棟における看護師のストレスの特徴. 第 30 回日本造血細胞移植学会総会 2008 年 2 月 於: 大阪.
19. 功刀愛子, 三輪雅代, 浅岡真奈美, 田崎仁美, 大橋知子, 高野 緑, 村田 誠. 大量アルケラン投与を受ける患者の口腔・咽頭痛予防—咽頭外部冷却の有用性の検討—. 第 30 回日本造血細胞移植学会総会 2008 年 2 月 於: 大阪.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特許申請なし。

全ゲノム関連解析を用いた移植合併症の解析

分担研究者 小川 誠司 東京大学大学院医学系研究科 21 世紀 COE プログラム特任准教授

研究要旨

本分担研究では、造血幹細胞移植の重篤な合併症に関わる遺伝的な背景を明らかにする目的で、日本骨髄移植推進財団を通じて行われた HLA 完全一致のドナー・レシピエントについて Affymetrix 社の GeneChip 500K アレイを用いた大規模 SNP タイピングを行い、全ゲノム関連解析の手法を用いて移植合併症の発症、特に GVHD の発症に関わる遺伝的多型の探索を行った。HLA-A, B, C, DR, DQ 座が遺伝子レベルで完全に一致する 1615 移植について 50 万 SNP の遺伝子型の解析を行い、これらの遺伝子型と GVHD の発症の相関解析を行った結果、GVHD の発症と相関を示す遺伝子座の候補が多数同定された。

A. 研究目的

造血幹細胞移植は難治性造血器疾患に対する現時点で最も強力な治療手段であるが、移植前処置に伴う臓器障害や移植片対宿主病 (GVHD) は、患者の予後や QOL に深刻な影響を及ぼす重篤な合併症である。移植成績向上の観点からは、これらの合併小のコントロールが重要な課題であることはいうまでもない。一方、これらの移植に伴う合併症の出現には個人差があり、同一の前処置においても、合併症の発症の有無は患者ごとに異なっており、これらは放射線や薬剤に対する感受性などの遺伝的な背景によって影響されると考えられる。さらに、GVHD においては、ドナーとレシピエントの遺伝的背景の差異が決定的に重要である。

そこで、本研究では、これらの合併症に対する効果的な予防手段を開発することを目的として、種々の移植合併所の発症に関わる遺伝的な多型を全ゲノム関連解析により同定することを試みる。

B. 研究方法

日本骨髄バンクを通じて H16 年までに行われた約 7800 件の非血縁者間骨髄移植のドナー/レシピエントの保存試料のうち、以下の基準を満たす 1615 移植について、Affymetrix GeneChip 500K マッピングアレイを用いて 50 万 SNP 座の SNP タイピングを行った。

- (1) HLA A, B, C, DR, DQ 座が DNA レベルで完全に一致する。
- (2) 急性 GVHD 予防としてシクロスポリンないしタクロリムスとメトソレキセートが用いられた。
- (3) 急性 GVHD に関する臨床データが利用可能。

- (4) ドナー・レシピエントについて高品質なゲノム DNA が利用可能。

得られた SNP データに基づいて、全ゲノム関連解析により、GVHD の発症に関わる遺伝子多型の同定を試みた。すなわち、GVHD の標的となる mHA 遺伝子座に関しては、GVHD 陽性群および陰性群における、ドナーおよびレシピエントの個々の genotype から定義される不適合アレル数の差について、一方、GVHD の発症に関連するドナーないしレシピエントの多型に関しては、GVHD 陽性・陰性群におけるドナーないしレシピエントのアレル数の差について、統計検定を行い、有意な SNP の同定を行った。有意性の検定については、50 万 SNP 座における統計検定量の permutation test により genome-wide な第一種の過誤が 5%となるような統計量を算出し、これを閾値として採用した。特に、GVHD に係わる不適合アレルの検定については、mHA の HLA 拘束性を考慮し、共通の HLA を有する移植について、有意に不適合を示すアレルの検出を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針および臨床研究に関する倫理指針に基づき、日本骨髄移植推進財団のデータ試料利用委員会および東京大学医学部倫理委員会の承認を得て行われている。

C. 結果

1615 移植、3230 例のタイピングにおけるタイピング精度は、平均コールレート 98.1%で、99.6%のアレイで 90%以上の call rate が確認された。Hardy-Weinberg 平衡

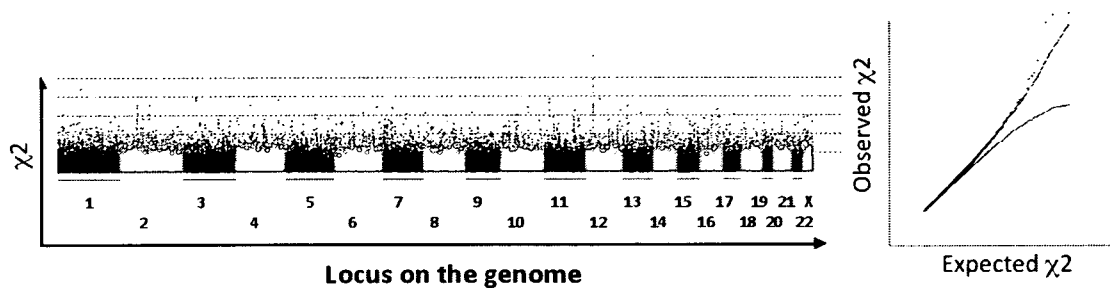


図1. HLA-B52拘束性のマイナー抗原に関する関連解析

から有意に逸脱する ($P < 0.001$) SNP、ドナーとレシピエントで3%以上のコールレートとの乖離を示す SNP、および minor allele 頻度が5%以下の SNP を除いた 346,499 SNP SNP について、急性および慢性 GVHD に関する相関解析を行った。

ドナー・レシピエントの SNP のミスマッチに基づくマイナー抗原遺伝子座の探索では、HLA を考慮しない解析において、6番染色体短腕の DPB1 遺伝子座に一致する SNP 群で有意な統計量のピークが確認された。一方、HLA 拘束性を考慮した解析においては、ドナーとレシピエントで HLA-B52 を共有する移植例の解析から、2度以上の急性 GVHD の発症と関連する 12番染色体長腕に高いピークを認め、これはゲノムワイドな多重解析を考慮にいれても有意なピークであった(図1)。同領域を含む約300Kbに渡る LD ブロック内には4つの遺伝子がコードされているが、このうち、mH12 の遺伝子は GVHD の標的臓器である肝および皮膚で発症が高いことが報告されていることから、mH12 遺伝子が本領域の標的遺伝子であることが示唆された(図2)。

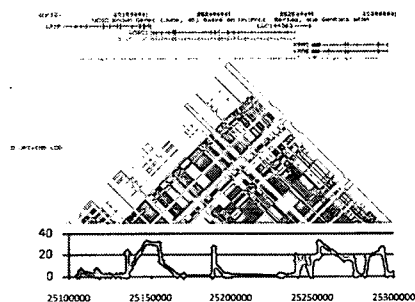


図2 HLA-B52拘束性の陽性SNPの候補遺伝子座

その他の HLA 型についても、同様に高い統計量を示すピークが複数同定された(表1)。

表1. HLA 拘束と陽性遺伝子座

GVHD種類	HLA拘束性	染色体	位置	統計量
chronic	no	7	●●●●	25.10
chronic	no	17	■●●●	21.29
chronic	A2	5	◇◇◇◇	25.11
acute	A11	14	○○○○	28.18
acute	A24	3	■●●●	23.36
chronic	A24	16	××××	29.69
chronic	A26	3	■●●●	29.92
acute	A33	10	●●●●	25.89
acute	B7	1	▽▽▽▽	24.56
chronic	B7	17	○○○○	25.08
acute	B44	10	××××	31.91
acute	B51	9	◇◇◇◇	20.95
chronic	B51	14	●●●●	25.44
chronic	B52	13	▲▲▲▲	22.52
chronic	B54	4	○○○○	25.43
acute	B61	10	▽▽▽▽	25.30
chronic	B61	5	△△△△	25.58

一方、ドナー、レシピエントそれぞれの SNP についての関連解析についても、表2に示したように、GVHD の発症に関わる遺伝子座の候補が複数同定された。

アレル	GVHD種類	染色体	位置	統計量
Patint	acute	18	●●●●	26.61
Patint	acute	12	■●●●	20.10
Patint	acute	9	◇◇◇◇	20.10
Patint	chronic	6	○○○○	21.01
Donor	acute	16	■●●●	24.96
Donor	acute	20	××××	20.03
Donor	acute	13	■●●●	20.61
Donor	chronic	5	●●●●	24.13
Donor	chronic	9	▽▽▽▽	20.37
Donor	chronic	1	○○○○	18.86

D. 考察

JMDP 試料を用いた全ゲノム関連解析による急性 GVHD 関連多型の探索により、GVHD の発症に関わる複数の遺伝子座の候補が同定された。本解析の開始時点では、DPB1 のミスマッチと aGVHD の関連は明確で無かったために、解析症例の選定にあつ

ては、HLA-A, B, C, DR, DQ のみを一致させた
が、近年、森島らによる解析から、DPB1
と aGVHD の関連が明確にされた。本解析
において、急性 GVHD の発症に関わる、HLA
拘束によらない多型の相違として DPB1 遺
伝子座がユニークなピークとして同定され
たことは、本解析法の妥当性を示すもの
と考えられる。

一方、HLA 拘束に基づくミスマッチと GVHD
発症の関連解析から、統計的に有意と思
われる複数の新規遺伝子座が同定された。
これらの遺伝子座には、GVHD 発症の標的
となるマイナー抗原がコードされている
と考えられることから、今後標的 SNP の
同定を含めた生物学的な解析に期待が持
たれる。

GVHD の発症に影響を及ぼす多型につい
ても、複数の遺伝子座が同定された。これ
らの領域にコードされる遺伝子は IL10 な
どのよう免疫応答に関わる可能性が十分
に期待されるが、より多数例での標的
タイピングによる確認と遺伝子の機能、
多型による遺伝子機能の制御の検討が今
後の課題である。

E. 結論

1615 症例の JMDP 移植例に関する 50 万 SNP
のタイピングに基づく全ゲノム関連解析
による GVHD の発症に関わる遺伝子多型の
探索を行い、複数の標的遺伝子座の候補
を同定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yabe T, Matsuo K, Hirayasu K, Kashiwase
K, Kawamura-Ishii K, Tanaka H, Ogawa A,
Takanashi M, Satake M, Nakajima K,
Tokunaga K, Inoko H, Saji H, Ogawa S, Juji
J, Sasazuki T, Kodera Y, Morishima Y. Donor
killer immunoglobulin-like receptor (KIR)
genotype-patient cognate KIR ligand
combination and anti-thymocyte globulin
pre-administration are critical factors in
outcome of HLA-C-KIR ligand mismatched
T cell-replete unrelated bone marrow
transplantation. *Biol Blood Marrow
Transplant.* 14:75-87, 2008.

2. Suzuki M, Kato M, Chen J, Takita J,
Sanada M, Nannya Y, Yamamoto G,
Takahashi A, Ikeda H, Kuwano K, Ogawa S,
Hayashi Y. Whole-genome profiling of
chromosomal aberrations in hepatoblastoma
using high-density single-nucleotide
polymorphism genotyping microarrays.
*Cancer Sci*2008.

3. Lehmann S, Ogawa S, Raynaud SD,
Sanada M, Nannya Y, Ticchioni M, Bastard
C, Kawamata N, Koeffler HP. Molecular
allelotyping of early-stage, untreated
chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*2008.

4. Kumano K, Masuda S, Sata M, Saito T,
Lee SY, Sakata-Yanagimoto M, Tomita T,
Iwatsubo T, Natsugari H, Kurokawa M,
Ogawa S, Chiba S. Both Notch1 and Notch2
contribute to the regulation of melanocyte
homeostasis. *Pigment Cell Research*2008.

5. Kawase T, Nannya Y, Torikai H, Yamamoto
G, Onizuka M, Morishima S, Tsujimura K,
Miyamura K, Kodera Y, Morishima Y,
Takahashi T, Kuzushima K, Ogawa S,
Akatsuka Y. Identification of human minor
histocompatibility antigens based on genetic
association with highly parallel genotyping
of pooled DNA. *Blood*2008.

6. Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M,
Kato M, Sanada M, Hemminki K, Yamamoto
G, Nannya Y, Koehler R, Flohr T, Miller CW,
Harbott J, Ludwig WD, Stanulla M,
Schrappe M, Bartram CR, Koeffler HP.
Molecular allelotyping of pediatric
acute lymphoblastic leukemias by
high-resolution single nucleotide
polymorphism oligonucleotide genomic
microarray. *Blood.* 111:776-784, 2008.

7. Yamamoto G, Nannya Y, Kato M, Sanada
M, Levine RL, Kawamata N, Hangaishi A,
Kurokawa M, Chiba S, Gilliland DG,
Koeffler HP, Ogawa S. Highly sensitive
method for genomewide detection of allelic
composition in nonpaired, primary tumor
specimens by use of affymetrix
single-nucleotide-polymorphism genotyping
microarrays. *Am J Hum Genet.* 81:114-126,
2007.

8. Nannya Y, Taura K, Kurokawa M, Chiba S,
Ogawa S. Evaluation of genome-wide power
of genetic association studies based on
empirical data from the HapMap project.
Hum Mol Genet. 16:3494-3505, 2007.

9. 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. 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.*
13:315-328, 2007.

10. Matsumoto A, Haraguchi K, Takahashi T, Azuma T, Kanda Y, Tomita K, Kurokawa M, Ogawa S, Takahashi K, Chiba S, Kitamura T. Immunotherapy against metastatic renal cell carcinoma with mature dendritic cells. *Int J Urol.* 14:277-283, 2007.

11. Kawazu M, Yamamoto G, Yoshimi M, Yamamoto K, Asai T, Ichikawa M, Seo S, Nakagawa M, Chiba S, Kurokawa M, Ogawa S. Expression profiling of immature thymocytes revealed a novel homeobox gene that regulates double-negative thymocyte development. *J Immunol.* 179:5335-5345, 2007.

12. Kawase T, Akatsuka Y, Torikai H, Morishima S, Oka A, Tsujimura A, Miyazaki M, Tsujimura K, Miyamura K, Ogawa S, Inoko H, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Takahashi T. Alternative splicing due to an intronic SNP in HMSD generates a novel minor histocompatibility antigen. *Blood.* 110:1055-1063, 2007.

2. 学会発表

1. 南谷泰仁, 鬼塚真仁, 柏瀬貢一, 森島泰雄, 真田昌, 赤塚美樹, 佐竹正博, 千葉滋, 黒川峰夫, 山本健, 佐治博夫, 丸屋悦子, 猪子英俊, 小寺良尚, 笹月健彦, 小川誠司. 全ゲノム関連解析を用いた急性GVHDの発症に關与する遺傳学的背景の網羅的探索(第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会)

2. 南谷泰仁, 田浦健次郎, 千葉滋, 黒川峰夫, 小川誠司. 全ゲノム関連解析の検出力に關する検討(Estimation of realistic power in whole genome association studies)(第66回日本癌学会総会)

3. 南谷泰仁, 鬼塚真仁, 柏瀬貢一, 森島泰雄, 真田昌, 赤塚美樹, 佐竹正博, 千葉滋, 黒川峰夫, 山本健, 佐治博夫, 丸屋悦子, 猪子英俊, 小寺良尚, 笹月健彦, 小川誠司. 全ゲノム関連解析を用いた急性GVHDの発症に關与する遺傳学の探索(第30回造血幹細胞移植学会)

4. Yasuhito Nannya, Makoto Onizuka, Koichi Kashiwase, Masashi Sanada, Yoshiki Akatsuka, Masahiro Satake, Shigeru Chiba, Mineo Kurokawa, Ken Yamamoto⁷, Hiroo Saji, Etsuko Maruya, Hidetoshi Inoko, Yasuo Morishima, Yoshihisa Kodera, Seishi Ogawa. Exploring genetic basis of GVHD by whole-genome association studies in a large series from the Japan Marrow Donation Program (JMDP) (The American Society of Hematology □49th Annual Meeting and

Exposition.

G. 知的財産權の出願・登録状況
(予定を含む)

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特になし