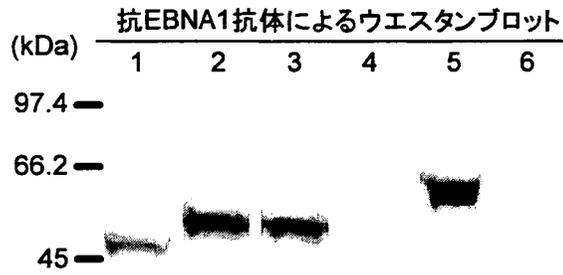
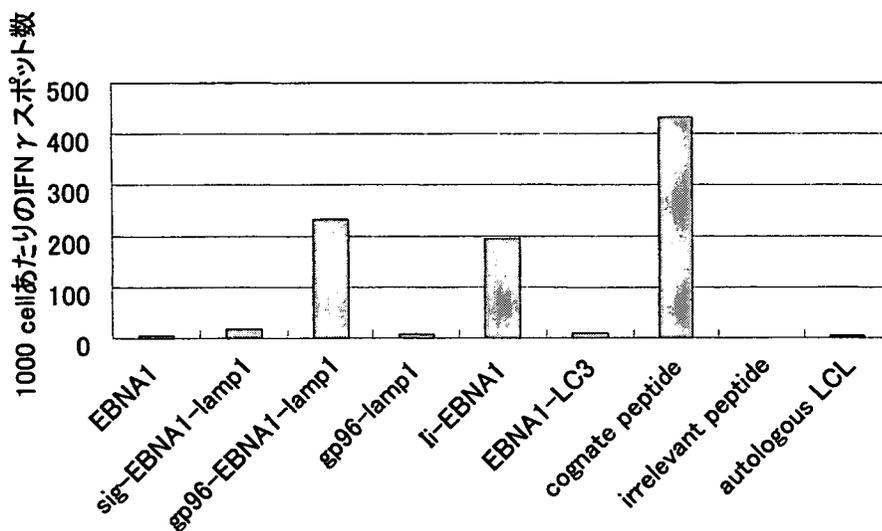


図3. プラスミド導入HEK293T細胞におけるEBNA1蛋白の発現



1. pcDNA-ΔGA EBNA1
2. pcDNA-sig- ΔGA EBNA1-lamp1
3. pcDNA-gp96- ΔGA EBNA1-lamp1
4. pcDNA-ΔGA-EBNA1-LC3
5. pcDNA-li-ΔGA EBNA1
6. Mock transfection

図4. mRNA導入抗原提示細胞を用いたELISPOT assay



Responder : an EBNA1 specific CD4⁺T cell clone, Y3G2
 Stimulator : autologous CD40-activated B lymphocytes plus mRNA

厚生労働科学研究費補助金（第3次がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

マイナー組織適合抗原特異的 CTL の解析と臨床応用

分担研究者 赤塚美樹（愛知県がんセンター研究所腫瘍免疫学部 室長）

研究要旨 現在でもハイリスク造血器腫瘍の予後は、同種移植を行ってもいぜんとして不良である。移植後の同種免疫反応を強化すると、移植片対白血病／リンパ腫（GVL）効果が期待できる反面、致命的な移植片対宿主病（GVHD）をしばしば併発するため、選択的に GVL 効果を高める抗原特異的免疫療法の開発が必要である。我々は本年度 HLA-A24 分子によって提示される、GVL 効果誘導に有用な新規マイナー抗原（ACC-1^C）を BCL2A1 蛋白質の多型部位に同定した。ここは過去に我々が同定した ACC-1^Y マイナー抗原をコードする BCL2A1 と偶然にも同一部位であるが、抗原多型部位の Tyrosine が Cysteine に置き換わったものであった。今回の遺伝子同定は、全く新規に開発した免疫学的解析と全ゲノム SNP 解析を融合した新手法で行った。今回のマイナー抗原の同定により、選択的 GVL 効果を誘導できるマイナー抗原数は5つとなり、日本人の4割の患者をカバーできるようになった。さらに本法を改良した、Public なリソースを用いた簡便で迅速なマイナー抗原同定方法もほぼ開発を終了しつつある。また、マイナー抗原を標的としたペプチドワクチン療法の開発にむけて、臨床試験の適応となりうる症例を9例までリクルートしており、近日中に投与開始の予定である。

A. 研究目的

同種造血幹細胞移植は、造血器腫瘍に対して確立された治療であるが、難治性造血器腫瘍では移植後再発が 20～50%と高率であるため、まだその成績は満足できるものではない。同種移植後にはドナーのリンパ球が患者に残存する腫瘍細胞を傷害する移植片対白血病・リンパ腫（GVL）効果が期待できるが、多かれ少なかれ移植片対宿主病（GVHD）も併発し、移植成績を下げる原因となっている。GVL 効果の主要な標的はアロ抗原であるマイナー抗原と、WT1 などの腫瘍関連抗原である。特に前者はドナー・患者間の遺伝子多型の違いに由来す

る蛋白質断片（ペプチド）が患者の HLA 分子に提示されて非自己抗原物質となったもので、過剰発現した自己抗原である腫瘍抗原より抗原性が強く免疫寛容にもなりにくいという特長をもつ。これらのマイナー抗原のうち、腫瘍細胞を含む血液系細胞に特異的に発現する蛋白質（すなわち分化抗原）にコードされるマイナー抗原は、移植後の再発腫瘍に対する選択的免疫療法の標的抗原として有用である。

マイナー抗原はドナー、患者間の遺伝子多型の差に由来するため、移植ペア毎に適応となるマイナー抗原が異なる。しかし、遺伝子タイピングにより移植前（あるいは

移植後でも) に不適合の有無が分かることから、各症例にふさわしいマイナー抗原を選択するという、テーラーメイド治療が可能となり、移植後再発腫瘍に対し、適切に対応できると期待される。この方式で多くの患者をカバーするには、今後さらに複数のマイナー抗原を同定する必要がある。

本年度は、過去にクローニングした HLA-A24 拘束性の細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が認識する新規マイナー抗原を、免疫学的手法と全ゲノム解析法を組み合わせた新手法を開発することで同定に成功したことを中心に報告する。また、ワクチン療法の臨床試験の進捗状況についても報告する。

B. 研究方法

① 新規マイナー抗原の同定： HLA-A24 拘束性の 1B9-CTL は急性骨髄性白血病に対し HLA 一致同胞から移植を受けた患者末梢血より限界希釈法にてクローニングした。また、健康人末梢血から樹立した EBV 不活化細胞株 (B-LCL) に必要に応じて拘束性 HLA-A24 遺伝子を導入し、細胞パネルを作成した。細胞傷害性試験により 1B9-CTL による各 B-LCL の傷害の有無を決定した。1B9-CTL により傷害された、傷害されない B-LCL がそれぞれ 40~50 検体収集出来たところで、各 B-LCL よりゲノム DNA を抽出し定量後、一定量ずつをまとめて行き、抗原陽性群および陰性群の 2 プールを作成した。このプール DNA を制限酵素で消化した後、Affymetrix 社の 100K と 500K の SNP アレイで SNP タイピングを行い、2 群間で SNP のゲノタイプ分布に有意に偏りがある部分を統計学的に同定した (東京大学医学部附属病院血液腫瘍内科・小川誠司博士との共同研究)。ついで、候補に挙げられた領域に存在する遺伝子上の SNP 付近のアミノ酸配列につき 1B9-CTL のエピトープとなる部

分を決定した。

② ペプチドワクチンのマウスモデルの検討： 2006 年に英国のグループから、HLA-A2 トランスジェニックマウスを用いた、HA-1・HA-2 マイナー抗原エピトープ発現ベクターによる DNA ワクチンモデルが報告されている。本年度は A2 トランスジェニックマウスを入手出来たため、我々がワクチンの臨床試験で行う予定であるペプチドのうち、HA-1 で実際に CTL が誘導できるかを検討した。マウスに HA-1^H ペプチドを Montanide ISA51VG とともに反復皮下投与し、脾細胞を *in vitro* で刺激後、interferon- γ の産生と細胞傷害活性を測定した。

③ ペプチドワクチン療法臨床試験： HLA-A24 拘束性 ACC-1^Y、HLA-B44 拘束性 ACC-2^D、HLA-A*0201/A*0206 拘束性 HA-1^H のペプチドが GMP グレードで準備済みであるため、これらの HLA を有する患者について、マイナー抗原タイピングを HLA 研究所 (京都) で行い、ワクチン療法の対象症例をリクルートし、適応例に臨床試験を行う体制を取っている。

(倫理面への配慮)

本研究で行うゲノム解析は、政府の定める各種倫理指針に準拠し、すでに各研究参加施設の倫理委員会の審査・承認を得たものであり、説明と理解を得た後、書面にて同意を得られた場合のみに実施された。さらに、マイナー抗原を標的とした移植後再発造血器腫瘍に対するペプチドワクチン療法、養子免疫療法は、愛知県がんセンターのヒトゲノム・遺伝子倫理委員会で承認済みの研究実施書と同意文書に基づいて、書面による同意の得られた場合のみに実施されたものである。

また、マウスを用いた実験動物については、愛知県がんセンターの動物委員会にて了承されたプロトコルに基づき、動物愛護の配慮を行いつつ実施した。

以上の厳格な遵守により、本研究は倫理面で問題が無かったものとする。

C. 研究結果

① HLA-A24 拘束性新規マイナー抗原の同定： HLA-A24 拘束性の CTL クローンは造血系細胞 (B-LCL、PHA 芽球、AML 細胞) を強く傷害し、非造血組織である皮膚の線維芽細胞に対する傷害は認められなかった (図 1)。マイナー抗原遺伝子の同定を、CEPH 家系を用いた連鎖解析法と、cDNA 発現クローニング法で試みたが、同定には至らなかったため、「B.方法」に記載したごとく、まず DNA プール (テストプール：陽性 57 例、陰性 38 例；確認用プール：陽性 75、陰性 34) を作成し、全ゲノム SNP 解析を実施した。この結果 2 つのプールとも、染色体 15q25.1 領域 (図 2 A, B) に 1 つだけ強い相関を示す SNP (rs1879894) が認められ、これはわずか 26kb という linkage disequilibrium (LD) 領域に存在していた (図 3)。この LD に存在する既知の遺伝子は *BCL2A1* の Exon 1 のみであった。

次いで *BCL2A1* の全長 cDNA を患者およびドナー B-LCL から発現プラスミドにクローン化し、HLA-A24 導入 293T 細胞に導入したところ、患者型 cDNA のみ 1B9-CTL からの IFN- γ の放出を促したため、*BCL2A1* をマイナー抗原遺伝子として確定した (図 4 A)。本遺伝子上のアミノ酸のうち、SNP を含み、かつ HLA-A24 結合性モチーフをもつものは、我々が 2003 年に同定した ACC-1^Y エピトープ部位のみであった。そこで今回の患者型 Cysteine (C) を含むペプチドを合成し、Y 型のペプチドと共に 1B9-CTL を

用いた細胞傷害性試験を施行した。その結果、C 型の DYLQC^YVLQI をパルスした細胞のみが傷害を受けた (図 4 B)。さらに Cysteine が酸化され Cystine になっている可能性もあったため、DYLQC^YVLQI と DYLQC^{*}VLQI をタイトレーションしたところ、DYLQC^YVLQI の方がより強く 1B9-CTL にされたため (図 4 C)、Cysteine をもつ方のエピトープを 1B9-CTL のマイナー抗原エピトープ (ACC-1^C と命名) と決定した。

さらに 1B9-CTL と同じ T 細胞受容体 β 鎖の CDR3 配列をもつ T 細胞の患者末梢血中での動態を、定量 PCR 法にて検討した。CTL は移植後半年をピーク (末梢血 CD3 陽性細胞の 1%) に上昇し、以後漸減した。この症例は移植後微少残存白血病を認めなかったため、GVL 効果との関連は不明であるが、少なくともこの患者が併発した慢性 GVHD の病勢とは相関しなかった (図 5) (川瀬孝和・南谷泰仁、Blood, in press)。

② ペプチドワクチンのマウスモデル：

A2-トランスジェニックマウスの腹部の皮下に 50 μ g の HA-1^H ペプチドと不完全フロイントアジュバントである Montanide ISA51VG を 2 回接種 (1 週間おき) 後、脾細胞を分離し、10 μ M の HA-1^H ペプチドでさらに 3 回 in vitro で刺激した。得られた T 細胞株を、cognate HA-1^H ペプチド、反対アリの HA-1^R ペプチド、陽性コントロールとして PMA とイオノマイシンで刺激して interferon- γ の放出を intracellular cytokine staining 法で検討したところ、HA-1^R に比較し HA-1^H ペプチドで刺激した場合に interferon- γ 産生細胞が多く認められた (図 6 A)。また、HLA-A2 の α 3 ドメインを H2-D^b で置換した MHC を B6 由来の EL4 細胞に導入し、これに HA-1^R ペプチドないしは HA-1^H ペプチドを種々の濃度で添加し、

T 細胞株による細胞傷害性を検討した。抗原特異細胞が 5%前後の T 細胞株を用いたためか、高いペプチド濃度を要したものの、T 細胞株は HA-1^H ペプチドを添加した標的細胞のみを特異的に傷害した。

③ ペプチドワクチン療法臨床試験：

HLA-A24 拘束性 ACC-1^Y、HLA-B44 拘束性 ACC-2^D、HLA-A*0201/A*0206 拘束性 HA-1^H ペプチドは GMP グレードで合成された後、当センターの細胞調製施設にて無菌的に溶解・分注後、-30℃で凍結保存された。

本臨床試験に適応のある患者の検索は、研究協力に同意した施設にて HLA-A2、A24、B44 のいずれかをもつ症例が同種移植を受けた際に、マイナー抗原の遺伝子型もタイピングすることで行った。集計の結果、平成 20 年 1 月末の段階で 48 例がタイピング検査を受け、うち 36 例がそのドナーとペアで結果判定が可能であった。この中で 9 例 (25%) が 3 種類のマイナー抗原のうち、少なくとも 1 つについて GVL 方向の不適合を有していた。3 例が移植後再発を経験しており、うち 1 例は合併症のため適応外、2 例は化学療法単独で再寛解に至ったため、ワクチン接種には至っていない。しかし、平成 19 年 10 月より、当センターのヒトゲノム・遺伝子倫理審査委員会で移植後 30% 以上の再発ハイリスク例では再発予防投与実施も認められたため、今後、本人の意思の確認後に予防投与を行うか、慎重に決定する予定である。

D. 考察

今回同定した ACC-1^C マイナー抗原は、日本人の 65% が有する HLA-A24 拘束性であり、ACC-1^C 陰性：陽性者が 8：2 であることを考慮すると、ACC-1^C の GVL 方向不適

合は 11% の確率で発生することとなる。本 ACC-1^C 抗原は、以前我々が同定した ACC-1^Y マイナー抗原の抗原性を決定づける SNP の対側アリルにコードされるものであり、HB-1 マイナー抗原のように、両方向性に抗原性を持つことが本研究で明らかにされた。ACC-1^Y の対側アリルであるため、ACC-1^C の臨床における利用可能性も同等となり、結果として ACC-1 マイナー抗原は 22% の日本人患者において臨床応用が可能と推定される。従って、今回の発見は日本人患者におけるマイナー抗原を標的とした免疫療法の臨床試験遂行に貢献すると考える。また、今回開発したマイナー抗原同定法は免疫領域とゲノム解析領域の最先端技術の融合により完成したもので、異分野の協調の重要性を示唆するものである。

BCL2A1 は抗アポトーシス機能を有した蛋白質であり、腫瘍が抗癌剤や放射線、細胞傷害性のサイトカインにさらされた場合に誘導されることが知られている。従って、BCL2A1 由来のエピトープは、GVL 効果誘導においてきわめて有用な標的抗原である。

今回の全ゲノム解析法は 100 以上の B-LCL を細胞傷害性試験で選別後、それぞれの細胞より DNA を抽出・定量し、均等に DNA プールを作ったうえ、その DNA プールを SNP アレイで解析する操作も必要であった。この DNA のプール化、SNP アレイでのタイピングを行わずに済めば、時間の節約と、SNP アレイ解析といった特殊な技術・機器を必要とせず、マイナー抗原の同定が容易となり、テーラーメイドな免疫療法の開発につながると考えられる。我々は、現在 HapMap のデータセットを利用してマイナー抗原が同定出来ないか検討しており、HA-1 マイナー抗原遺伝子が同定できることを double blind で確認し、また prospective な

試験でも新規な2マイナー抗原の同定に成功している。今後、さらにアッセイ法を工夫し、迅速な抗原同定法を完成させる予定である。

マイナー抗原ペプチドワクチンによる免疫療法は、移植後白血病の再発や、予防に有用な選択的 GVL を引き起こすことができると推測され、我々はその安全性、有用性について臨床試験を開始している。WT1 などの腫瘍関連抗原と異なり、非自己抗原に対するアロ免疫を誘導することで強い GVL 効果が期待できる反面、移植が必要であることと、ドナー患者間で利用可能なマイナー抗原の GVL 方向不適合が必要な点などの制約もある。これが、本試験の遂行を遅らせている理由であるが、これまでの36例の移植ペアの検査では対象の3抗原で9例と、ほぼ統計的に予想される頻度で不適合ペアが見つかっている。今後、今回同定した ACC-1C および昨年度同定した ACC-6 などもペプチドを準備する計画であり、これにより患者カバー率は40%を超えることとなる。現時点では、残念ながらまだワクチン接種を実施できていないが、今後さらに症例をリクルートし、早急に本免疫療法の有用性を確立していく予定である。

E. 結論

造血器腫瘍に特異的に発現する BCL2A1 遺伝子にコードされる HLA-A24 拘束性の新規マイナー抗原 (ACC-1^C) を同定した。この結果、ACC-1 抗原を利用できる日本人患者集団は両方向の GVL 不適合を合わせて2倍となった。また、今回の抗原同定は新たな技術開発により成功したもので、ほとんどの CTL に応用でき、さらに HapMap のデータを利用した方法の開発により、マイナー抗原の同定が加速されると考えられた。

以上をもとに、今後免疫療法の対象となる症例の蓄積をはかりたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawase T, Nanya Y, Ogawa S, Akatsuka Y, et al. Identification of human minor histocompatibility antigens based on genetic association with highly parallel genotyping of pooled DNA. **Blood**, 2008, *in press*.
- 2) Akatsuka Y, et al. Minor histocompatibility antigens as targets for immunotherapy using allogeneic immune reactions. **Cancer Sci.** 98: 1139-1146, 2007.
- 3) Vigna KL, Fujii N, Mito JK, Koo KKW, Xuereb SM, Sala-Torra O, Gibbs JS, Radich JP, Akatsuka Y, Van den Eynde BJ, Riddell SR, Warren EH. DDX3Y Encodes a Class I MHC-Restricted H-Y Antigen That Is Expressed In Leukemic Stem Cells. **Blood**, 2008, *in press*.

2. 学会発表

- 1) 川瀬孝和、赤塚美樹、鳥飼宏基ら。HMSD 遺伝子に由来する新規マイナー抗原 ACC-6 の同定と白血病幹細胞における ACC-6 の発現。第11回基盤のがん免疫研究会総会、東京 2007年7月
- 2) 鳥飼宏基、赤塚美樹、谷田部恭ら。BCL2A1 にコードされる血液細胞特異的マイナー組織適合抗原のメラノーマにおける異所性発現。第66回日本癌学会総会、横浜 2007年9月
- 3) 川瀬孝和 南谷泰仁 赤塚美樹ら。遺伝子連鎖解析による HLA-A*2402 拘束性の新規マイナー組織適合性抗原の同定。第69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会総会、横浜 2007年10月
- 4) 赤塚美樹。GVHD を増強せずに GVL 効

果を高める治療法の可能性（シンポジウム）。第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会、横浜 2007 年 10 月

5) 赤塚美樹。造血器腫瘍に対する細胞免疫療法の今後（教育講演）。第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会、横浜 2007 年 10 月

6) 赤塚美樹。マイナー組織適合抗原を標的とした免疫療法。第 55 回日本輸血学会総会（教育講演）、名古屋 2007 年 5 月

7) 亀井美智、南谷泰仁、赤塚美樹ら。新規遺伝子連鎖解析法による HLA-B*4002 拘束性のマイナー組織適合性抗原の同定。第 30 回日本造血細胞移植学会総会、シンポジウム。大阪 2008 年 2 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

図1 1B9-CTLの細胞傷害性パターン

クロム遊離試験により、細胞傷害性を検討した。(A) 特異性試験。B-LCLはEBVで不死化したB細胞、CD40-BはCD40リガンド発現細胞で活性化した正常B細胞、dermal fibroblastは1B9-CTLを得た患者の皮膚生検より樹立、AMLは初診時の本患者の白血病細胞。(B) HLA拘束性の決定試験。No.5はHLA-A24を持たないB-LCLで、これにレトロウイルスベクターでHLA-A24 cDNAを導入前後に細胞傷害性を調べた。

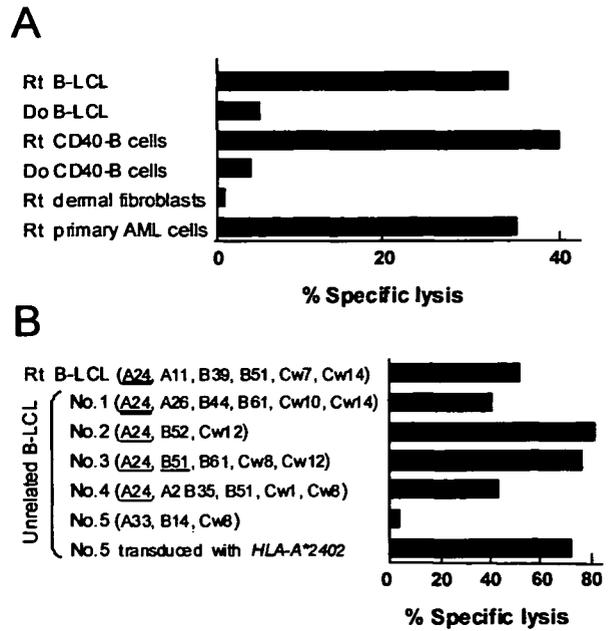


図2 SNPアレイを用いた全ゲノム解析

SNPアレイで全染色体中、相関を認めた15q25部位について、2つのDNAプールセットを用いて検討した。(A) テストDNAプール：1B9-CTLが認識するマイナー抗原陽性57例、陰性38例。(B) 確認用プール：抗原陽性75、陰性34。

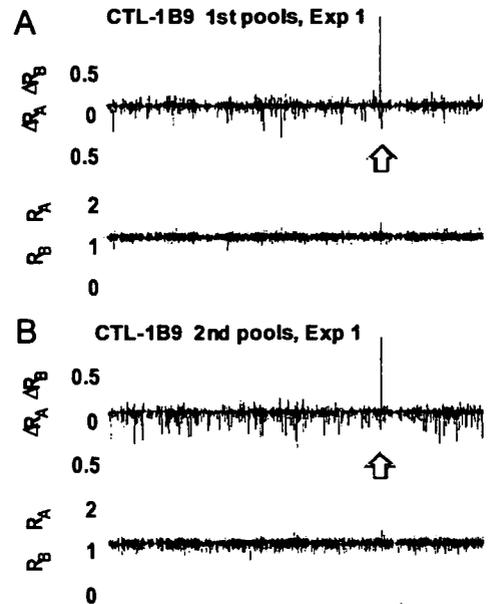


図3 強い相関が認められたSNP (rs1879894) 周辺の連鎖不均衡ブロックと遺伝子の関係

矢印の範囲はrs1879894が含まれる連鎖不均衡ブロックのサイズを示す。

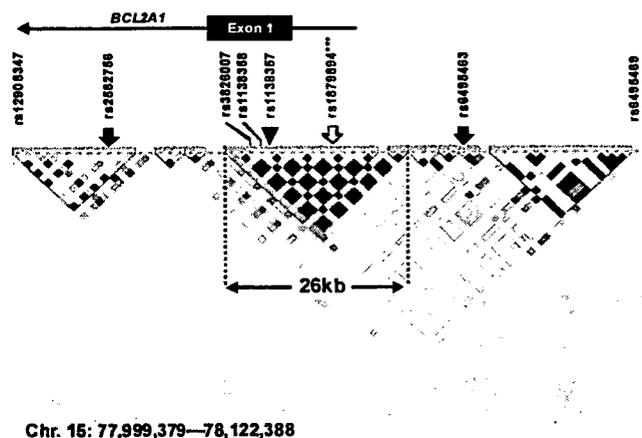


図4 1B9-CTL が認識する BCL2A1 上のエ
ピトープの決定

(A) 患者およびドナーから BCL2A1 の cDNA をクローン化し、HLA-A24 安定導入 293T 細胞にそれぞれトランスフェクション後、1B9-CTL の反応性を interferon- γ の産生量で比較した。

(B) 最小エピトープの決定。BCL2A1 のアミノ酸配列のうち、CTL 傷害性と相関を示した SNP を含む部分で、HLA-A24 に結合しうる部分のペプチドを合成し、1B9-CTL の反応性を細胞傷害性試験で検討した。DYLQYLQI は ACC-1^Y 特異的 CTL のエピトープ (陰性コントロール)。(C) DYLQCLQI と Cysteine 部分が酸化され Cystine となった DYLQC*LQI との比較検討。DYLQCLQI がより低濃度で 1B9-CTL を刺激した。

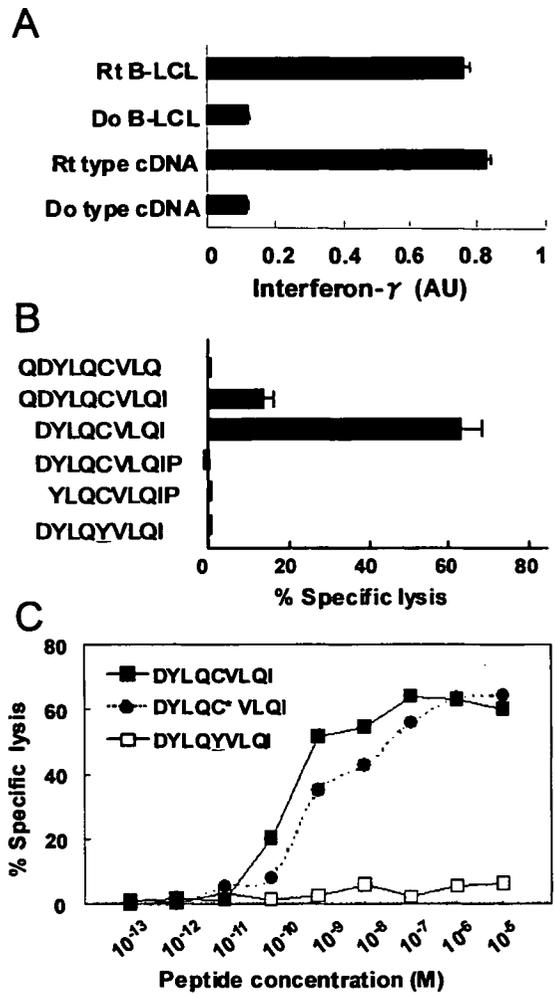


図5 ACC-1^C 特異的 TCR- β 鎖 CDR3
をもった T 細胞の移植後の経時的
変化

患者は移植後に慢性 GVHD (c-GVHD) を発症したが、その経過と ACC-1C 特異的 T 細胞の体内動態に相関を認めなかった。CSA, サイクロスポリン A; PSL, プレドニゾン。

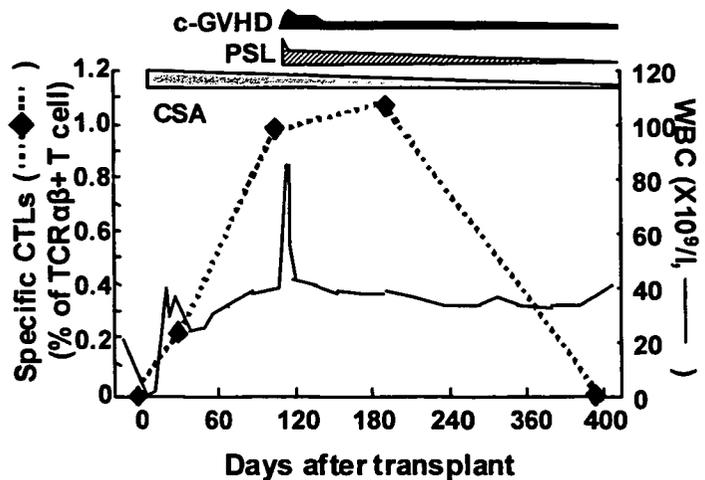
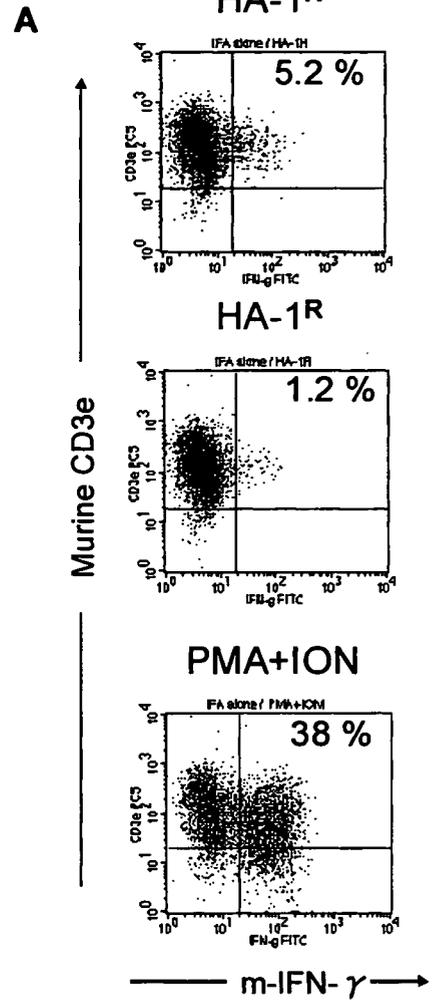
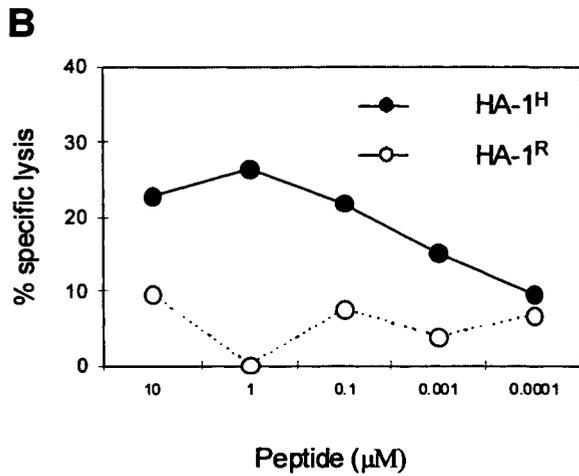


図6 A2-トランスジェニックマウスを用いた、HA-1^H ペプチドによる抗原特異的 T 細胞誘導

(A) *In vivo* で2回、*in vitro* で3回ペプチド刺激して得られた T 細胞株について、HA-1^H ペプチド、HA-1^R ペプチド、PMA+イオノマイシンで刺激し、interferon- γ の産生を検討した。HA-1^H ペプチドでは HA-1^R ペプチドの4倍以上の interferon- γ の産生を認めた。

(B) HLA-A2/D^b キメラ MHC を導入した EL4 細胞に HA-1^H ペプチド、HA-1^R ペプチドを各種濃度で添加して、T 細胞株による細胞傷害性を検討した。



厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

同種造血幹細胞移植における移植免疫反応の解明とその細胞治療への応用

分担研究者 森島泰雄 愛知県がんセンター中央病院

研究要旨：非血縁者間骨髄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明らかになり、HLA-C, DPB1 座の不適合が白血病の移植後の再発の頻度を低めることが判明している。今年度は、HLA 型不適合の組み合わせと再発との関連を 4643 症例につき多変量解析法を用いて解析し、白血病の移植後の再発抑制効果(GVL)に関与するドナーと患者間の不適合な HLA 分子上の部位と置換アミノ酸を同定することができた。この知見は、同種移植における GVL の機序解明への道を開くものであり、これらを標的とする特異的細胞免疫療法開発の基礎データとして重要である。

A. 研究目的

HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 遺伝子型適合度と臨床成績、とくに白血病再発との関連(GVL 効果)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

HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 の DNA タイピングがされ非血縁者間骨髄移植を実施された白血病 4643 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再発リスク(OR)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 0.05 以下の組み合わせと有意とし、さらに Bootstrap resampling 法により検証した。

C. 研究結果

1) HLA 不適合な組み合わせにおける HLA 分子上のアミノ酸が異なる部位とその置換アミノ酸の組み合わせ

HLA-A 分子では 31 部位で 52 の組み合わせが見出された。

HLA-B 分子では 31 部位で 65 のアミノ酸の組み合わせが見出された。

HLA-C では 55 部位で 159 の組み合わせが見出された(表 1)

2) GVL 効果が生じる HLA 分子上の部位とそのアミノ酸

表 2 に示すように HLA-C において 9 番、99 番、156 番のアミノ酸の置換により有意に再発は低下していた。なお、9 番と 99 番のデータはほぼ一致しており、このどちらかが関与していることになる。156 番の Leu(ドナー)と Arg(患者)の組み合わせは重症 GVHD を生じる組み合わせとは異なっていた。HLA-A, B, DRB1, DQB1, DPB1 では HLA-C に見られたような部位を同定することはできなかった。

D. 考察

4643 ペアという多数例で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 と HLA-DPB1 のドナーと患者の HLA 座の違いにより GVL 効果を生じることが明確になっているが、本研究では、HLA-C においてアミノ酸の置換部位を同定できたことは、GVL 効果のメカニズムを考える上で興味深い。また、HLA-DPB1 でアミノ酸置換部位を同定できなかったことは、HLA-DPB1 による GVL 効果の作用機序が異なる可能性を示唆している。

E. 結論

HLA 型不適合の組み合わせと再発との関連を解析し、HLA-C において GVL 効果と関連のある部位とアミノ酸置換を同定することができた。今後、GVL 効果の作用機序解明により特異的同種細胞療法を開発するための基礎的所見を得ることができた。

F. 健康危険情報

特になし

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, Morishima Y for the Japan Marrow Donor Program. Donor killer immunoglobulin-like receptor (*KIR*) genotype and anti-thymocyte globulin pre-administration are critical factors in outcome of HLA-C-KIR ligand mismatched T cell-replete unrelated bone marrow transplantation. *Biology Blood Marrow Transplant*, 2008, 14(1):75-87.
2. Kawase T, Morishima Y, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, Kato S, Juji T, Kodera Y, Sasazuki T; Japan Marrow Donor Program. High-risk HLA allele mismatch combinations responsible for severe acute graft-versus-host disease and implication for its molecular mechanism. *Blood.*, 2007 110:2235-41.
3. Oyama T, Yamamoto K, Asano N, Oshiro A, Suzuki R, Kagami Y, Morishima Y, Takeuchi K, Izumo T, Mori S, Ohshima K, Suzumiya J, Nakamura N, Abe M, Ichimura K, Sato Y, Yoshino T, Naoe T, Shimoyama Y, Kamiya Y, Kinoshita T, Nakamura S. Age-related EBV-associated B-cell lymphoproliferative disorders constitute a distinct clinicopathologic group: a study of 96 patients. *Clin Cancer Res.*, 2007, 13:5124-32.
4. Morishima Y, Kawase T, Malkki M, Petersdorf EW; International Histocompatibility Working Group in Hematopoietic Cell Transplantation Component. Effect of HLA-A2 allele disparity on clinical outcome in hematopoietic cell transplantation from unrelated donors. *Tissue Antigens.*, 2007, 69(Suppl 1):31-5.
5. Setterholm M, Morishima Y, Pepperall J, Schmidt A. Strategies for typing new volunteer donors. *Tissue Antigens.*, 2007, 69(Suppl 1):6-7.
6. Ozawa S, Nakaseko C, Nishimura M, Maruta A, Cho R, Ohwada C, Sakamaki H, Sao H, Mori S, Okamoto S, Miyamura K, Kato S, Kawase T, Morishima Y, Kodera Y; Japan Marrow Donor Program. Chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation from an unrelated donor: incidence, risk factors and association with relapse. A report from the Japan Marrow Donor Program. *Br J Haematol.*, 2007,

- 137:142-51.
7. 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, 39:471-6.
 8. 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, 85:140-5.
 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; 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., Kodaera, 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.

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

特になし

表 1

position and amino acid substitution
of HLA molecule in HLA allele mismatch combination

HLA-C mismatch	beta-Plated Sheet								alfa Helix						TCR contact			
	9	24	95	97	99	113	114	116	66	73	77	80	152	156	163	66	163	
*01 02-*01 03								ND	FY									
*01 02-*03 03	YF	AS	IL	RW	YC								LR	LT			LT	
*01 02-*04 01	SF	AS		RW	FC			ND	FY		AT	NS	KN					
*01 02-*08 01	YF	AS		RW	YC			ND	FY				YE	LR				
*03 03-*1 502							HY		LY	NK		NS	KN		TL	NK	TL	
*03 04-*04 01	SY		LI		FY			ND	FY		AT	NS	KN		RL	TL	TL	
*03 04-*07 02	DY	SA	LI		SY				SY		AT			AE		TL	TL	
*03 04-*08 01			LI						ND	FY				TE		TL	TL	
*03 04-*1 402	SY		LI	WR	FY				SY							RL	TL	TL

↓
Ser116C-Tyr116C

● Substituted position and amino acid in HLA allele mismatch

HLA-A : 52 combinations in 31 positions

HLA-B : 65 combinations in 31 positions

HLA-C : 159 combinations in 55 positions

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

Positon 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			

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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, <u>Morishima Y</u> for the Japan Marrow Donor Program.	Donor killer immunoglobulin-like receptor (KIR) genotype and anti-thymocyte globulin pre-administration are critical factors in outcome of HLA-C-KIR ligand mismatched T cell-replete unrelated bone marrow transplantation.	Biology Blood Marrow Transplant.	14(1)	75-87	2008
Kawase T, Nanya Y, Torikai H, Yamamoto G, Onizuka M, Morishima S, Tsujimura K, Miyamura K, Kodera Y, <u>Morishima Y</u> , Takahashi T, <u>Kuzushima K</u> , Ogawa S, <u>Akatsuka Y</u> .	Identification of human minor histocompatibility antigens based on genetic association with highly parallel genotyping of pooled DNA.	Blood	111(6)	3286-94	2008
Ikehara Y, Shiuchi N, Kabata-Ikehara S, Nakanishi H, Yokoyama N, Takagi H, Nagata T, Koide Y, <u>Kuzushima K</u> , Takahashi T, Tsujimura K, Kojima N.	Effective induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposome targeting to intraperitoneal phagocytic cells.	Cancer Letters	260(1-2)	137-145	2008
Kawase T, <u>Akatsuka Y</u> , Torikai H, Morishima S, Oka A, Tsujimura A, Miyazaki M, Tsujimura K, Miyamura K, Ogawa S, Inoko H, <u>Morishima Y</u> , Kodera Y, <u>Kuzushima K</u> , Takahashi T.	Alternative splicing due to an intronic SNP in HMSD generates a novel minor histocompatibility antigen.	Blood	110(3)	1055-1063	2007
<u>Akatsuka Y</u> , <u>Morishima Y</u> , <u>Kuzushima K</u> , Kodera Y, Takahashi T.	Minor histocompatibility antigens as targets for immunotherapy using allogeneic immune reactions.	Cancer Sci.	98(8)	1139-1146	2007
Torikai H, <u>Akatsuka Y</u> , Miyauchi H, Terakura S, Onizuka M, Tsujimura K, Miyamura K, <u>Morishima Y</u> , Kodera Y, <u>Kuzushima K</u> , 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.	40(2)	165-174	2007
Ito Y, Demachi-Okamura, A, Ohta R, <u>Akatsuka Y</u> , Nishida K, Tsujimura K, <u>Morishima Y</u> , Takahashi T, <u>Kuzushima K</u> .	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.	88(Pt 3)	770-80	2007
Kawase T, <u>Morishima Y</u> , Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, Kato S, Juji T, Kodera Y, Sasazuki T; Japan Marrow Donor Program.	High-risk HLA allele mismatch combinations responsible for severe acute graft-versus-host disease and implication for its molecular mechanism.	Blood	110(7)	2235-41	2007
Oyama T, Yamamoto K, Asano N, Oshiro A, Suzuki R, Kagami Y, <u>Morishima Y</u> , Takeuchi K, Izumo T, Mori S, Ohshima K, Suzumiya J, Nakamura N, Abe M, Ichimura K, Sato Y, Yoshino T, Naoe T, Shimoyama Y, Kamiya Y, Kinoshita T, Nakamura S.	Age-related EBV-associated B-cell lymphoproliferative disorders constitute a distinct clinicopathologic group: a study of 96 patients.	Clin Cancer Res.	13(17)	5124-32	2007

<u>Morishima Y</u> , Kawase T, Malkki M, Petersdorf EW; International Histocompatibility Working Group in Hematopoietic Cell Transplantation Component.	Effect of HLA-A2 allele disparity on clinical outcome in hematopoietic cell transplantation from unrelated donors.	<i>Tissue Antigens</i>	69 (Suppl 1)	31-5	2007
Setterholm M, <u>Morishima Y</u> , Pepperall J, Schmidt A.	Strategies for typing new volunteer donors.	<i>Tissue Antigens</i>	69 (Suppl 1)	6-7	2007,
Ozawa S, Nakaseko C, Nishimura M, Maruta A, Cho R, Ohwada C, Sakamaki H, Sao H, Mori S, Okamoto S, Miyamura K, Kato S, Kawase T, <u>Morishima Y</u> , Kodera Y; Japan Marrow Donor Program.	Chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation from an unrelated donor: incidence, risk factors and association with relapse. A report from the Japan Marrow Donor Program.	<i>Br J Haematol</i>	137(2)	142-51	2007
Yamada K, Takahashi M, Ogura M, Kagami Y, Taji H, Kamiya Y, Sugiura H, <u>Morishima Y</u> .	High-dose chemotherapy and autologous peripheral blood stem cell transfusion for adult and adolescent patients with small round cell sarcomas.	<i>Bone Marrow Transplant.</i>	39(8)	471-6	2007
Mizuta S, Kohno A, Morishita Y, Atsuta Y, Sao H, Miyamura K, Sakamaki H, Ueda R, <u>Morishima Y</u> .	Long-term follow-up of 14 patients with philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia following autologous bone marrow transplantation in first complete remission.	<i>Int J Hematol.</i>	85(2)	140-5	2007
<u>Morishima Y</u> , Yabe T, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, Yamamoto K, Maruya E, <u>Akatsuka Y</u> , 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.	<i>Biol Blood Marrow Transplant.</i>	13(3)	315-28	2007
Kikuchi T, Naruse TK, Onizuka M, Li S, Kimura T, Oka A, <u>Morishima Y</u> , 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.	<i>Immunogenetics</i>	59(2)	99-108	2007
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, <u>Morishima Y</u> , Kodera Y.	Significance of additional high-dose cytarabine in combination with cyclophosphamide plus total body irradiation regimen for allogeneic stem cell transplantation.	<i>Bone Marrow Transplant.</i>	39(1)	25-30	2007
Kato K, Kanda Y, Eto T, Muta T, Gondo H, Taniguchi S, Shibuya T, Utsunomiya A, Kawase T, Kato S, <u>Morishima Y</u> , 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.	<i>Biol Blood Marrow Transplant.</i>	13(1)	90-9	2007

IV. 研究成果の刊行物・別刷



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

Toshio Yabe,^a Keitaro Matsuo,^b Kouyuki Hirayasu,^{ac} Koichi Kashiwase,^a Sumiyo Kawamura-Ishii,^d Hidenori Tanaka,^a Atsuko Ogawa,^a Minoko Takanashi,^a Masahiro Satake,^a Kazunori Nakajima,^a Katsushi Tokunaga,^c Hidetoshi Inoko,^c Hiroo Saji,^f Seishi Ogawa,^g Takeo Fuji,^d Takebiko Sasazuki,^b Yoshibisa Kodera,ⁱ and Yasuo Morishima^j for the Japan Marrow Donor Program

^aJapanese Red Cross Tokyo Metropolitan Blood Center, Tokyo, Japan; ^bAichi Cancer Center Research Institute, Division of Epidemiology and Prevention, Nagoya, Japan; ^cUniversity of Tokyo, Department of Human Genetics, Tokyo, Japan; ^dJapanese Red Cross Central Blood Institute, Tokyo, Japan; ^eTokai University School of Medicine, Division of Molecular Science, Isehara, Japan; ^fHLA Laboratory, NPO, Kyoto, Japan; ^gTokyo University Hospital, Tokyo, Japan; ^hInternational Medical Center of Japan, Tokyo, Japan; ⁱJapanese Red Cross Nagoya First Hospital, Nagoya, Japan; and ^jAichi Cancer Center Hospital, Department of Hematology and Cell Therapy, Nagoya, Japan

Correspondence and reprint requests: Toshio Yabe, PhD, Japanese Red Cross Tokyo Metropolitan Blood Center, 2-1-67 Tatsumi, Koto-ku, Tokyo 135-8639, Japan; Tel: +81-3-5534-7546; Fax: +81-3-5534-7547 (e-mail: to-yabe@tokyo.bc.jrc.or.jp).

Received July 18, 2007; accepted September 21, 2007

ABSTRACT

We previously reported the potent adverse effects of killer immunoglobulin-like receptor (KIR) ligand mismatch (KIR-L-MM) on the outcome of T cell-replete unrelated hematopoietic stem cell transplantation (UR-HSCT) through the Japan Marrow Donor Program. Other UR-HSCT studies have yielded inconsistent results. To address this discrepancy, we evaluated candidate factors contributing to the effects of KIR-L-MM on transplantation outcomes in retrospectively selected hematologic malignancy cases with uniform graft-versus-host disease (GVHD) prophylaxis (n = 1489). KIR-L-MM in the graft-versus-host direction (KIR-L-MM-G) was associated with a higher incidence of acute GVHD (aGVHD; $P < .002$) and a lower overall survival (OS; $P < .0001$) only without the preadministration of antithymocyte globulin (ATG). Furthermore, in KIR-L-MM-G, the donor *KIR2DS2* gene with the patient cognate C1 ligand was associated with a higher incidence of aGVHD ($P = .012$). Multivariate analysis by Cox proportional hazard models suggested that donor *2DS2* and ATG preadministration were critical factors in grade III-IV aGVHD (hazard ratio = 1.96; 95% confidence interval = 1.01-3.80; $P = .045$, and hazard ratio = 0.56; 95% confidence interval = 0.31-0.99; $P = .047$, respectively). These results indicate that the adverse effects of KIR-L-MM-G depend on combination of donor-activating KIR genotype-patient cognate KIR ligand type and no ATG preadministration, thereby suggesting the importance of these factors in UR-HSCT and in leukemia treatment using natural killer (NK) cell alloreactivity.

© 2008 American Society for Blood and Marrow Transplantation

INTRODUCTION

Natural killer (NK) cell alloreactivity plays an important role in hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) and its therapeutic use in leukemia treatment has been considered because of its possible graft-versus-leukemia (GVL) effect [1]. The beneficial effects of NK cell receptor killer immunoglobulin-like recep-

tor (KIR) ligand incompatibility between patient and donor in the HLA-mismatched related hematopoietic stem cell transplantation (R-HSCT) has been reported [2,3]. These effects in unrelated hematopoietic stem cell transplantation (UR-HSCT) have been controversial, however [4]. We recently reported the potent adverse effects of HLA-C-KIR ligand incompatibility