

200832039A

厚生労働科学研究費補助金

免疫・アレルギー疾患等予防・治療研究事業

組織適合性に基づく非血縁同種造血幹細胞移植の成績向上

に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 森島泰雄

平成21年（2009）年4月

目 次

I. 総括研究報告

- 組織適合性に基づく非血縁同種造血幹細胞移植の成績向上に関する研究 1

主任研究者 森島 泰雄

II. 分担研究報告

- 分担研究課題：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ハプロタイプと急性GVHD—
分担研究者 森島 泰雄 9
- 分担研究課題：検体保存事業並びにマイクロサテライト多型を用いた研究
分担研究者 猪子 英俊 14
- 分担研究課題：GvHD発症とHLAアレルミスマッチ方向性
分担研究者 笹月 健彦 16
- 分担研究課題：ゲノムワイド関連解析によるGVHDの遺伝学的背景の解析
分担研究者 小川 誠司 20
- 分担研究課題：HLA不適合移植における免疫反応のin vitro解析および
ドナー選択アルゴリズム
分担研究者 村田 誠 23
- 分担研究課題：造血幹細胞移植におけるNK細胞受容体、サイトカイン遺伝子
多型の影響およびHLAタイピング法の構築と検証
分担研究者 屋部登志雄 27

III. 研究班会議報告

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

V. 研究成果の刊行物・別冊

厚生労働科学研究費補助金（免疫・アレルギー疾患等予防・治療研究事業）
（H20・免疫一般・014）

総括研究報告書

組織適合性に基づく非血縁同種造血幹細胞移植の成績向上に関する研究

主任研究者 森島泰雄 愛知県がんセンター中央病院 副院長・部長

研究要旨：日本骨髄バンク（JMDP）を介した患者とドナーのペアの同意が得られた検体を保存し、そのHLA遺伝子型の同定を行うとともに、H21年度には1）HLA座の違い、HLA遺伝子型の組み合わせの違いが白血病の再発に及ぼす影響（移植片対白血病効果：GVL）、2）HLAハプロタイプ自身が急性GVHDに及ぼす影響、3）日本人以外の非血縁者間造血幹細胞移植と日本人間の骨髄移植の成績を同一な国際データベースを用いて解析することにより、日本人間移植がより低率な急性GVHD頻度と良好な移植後生存を示すことを明らかにした。さらに、より精緻な細胞遺伝学的な手法（HLAとその分子解析、HLAハプロタイプ解析、HLA遺伝子以外の多型解析（Whole genome SNPs、マイクロサテライト、サイトカイン受容体、NK細胞受容体）、In vitro 解析）を実施し、移植免疫反応に関与する因子を解明している。

分担研究者氏名・所属機関（職名）

森島 泰雄・愛知県がんセンター中央病院・
副院長 部長
猪子 英俊・東海大学医学部・
医学部長 教授
笹月 健彦・国立国際医療センター研究所・
特任研究員
小川 誠司・東京大学大学院・
特任准教授
村田 誠・名古屋大学医学部附属病院・
助教
屋部 登志雄・東京都赤十字血液センター・
係長

さい帯血ネットワークからの移植が9年間に5000例実施されているが、長期生存率はそれぞれ約60%と40%に留まり満足すべきものではない。成績を悪化させる主な原因は同種移植に伴う重症移植片対宿主病（GVHD）の発症、移植片の拒絶と移植後の造血器腫瘍の再発であり、ドナーと患者の組織適合性抗原の違いがこれら免疫反応と生存に大きく関与することが本研究代表者と分担研究者のJMDP症例を用いた解析で次第に明らかになってきた。

A. 研究目的

日本骨髄バンク（JMDP）からの非血縁者間骨髄移植が16年間に10000例、日本

本研究班目的は、JMDPを介した患者とドナーのペアの同意が得られた検体を保存し、より精緻な細胞遺伝学的な手

法 (HLA とその分子解析、HLA ハプロタイプ解析、HLA 遺伝子以外の多型解析 (Whole genome SNPs、マイクロサテライト、サイトカイン受容体、NK 細胞受容体)、In vitro 解析) を用い、HLA と HLA 以外の組織適合性抗原とその多型が移植免疫反応に与える影響を明らかにし、これら患者とドナーの組織学的な情報と臨床情報に基づき、適切なドナー選択の個別化アルゴリズム (基準) を構築する)。同時に、骨髄バンクと臍帯血バンクに適したドナースクリーニング法を検証し、正確で効率的なドナー選択手順を構築し、ドナーコーディネートの迅速化を計る。

B. 研究方法

1. 非血縁者間骨髄移植症例とそのドナーの検体整備

同意が得られた非血縁者間骨髄移植を実施予定の患者とドナーの血液検体 (年間約 800 ペア、1600 検体) を細胞、DNA に分離し、保存するとともに、HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 の遺伝子型を同定する。さらに、whole genome 増幅法を用い、検体を増量し、解析用サンプルセットを作成する。

2. HLA 抗原座および HLA 抗原型の違いが移植免疫反応と生存に及ぼす影響の解析

1) 日本骨髄バンクを介した非血縁者間骨髄移植症例におけるドナーと患者の HLA 型と臨床データからなるデータベースを上記 1 項により作成し、Cox hazard model 等を用いた多変量解析法により GVL 効果、ならびに移植免疫反応に関与

する不適合 HLA 抗原の組み合わせを同定する。

平成 20 年には検討可能な症例数は増し、約 9000 症例のデータベースが構築された。急性 GVHD だけでなく、慢性 GVHD、再発、移植片の拒絶、移植後日和見感染症などとの関連を解析し、非血縁者間移植における「許容されない HLA 型の不適合の組み合わせ」を臨床的に同定するとともに、「許容される HLA 型の組み合わせ」を検索し、従来 HLA 抗原座の不適合により選択されなかったドナーからの移植を可能にさせる。

2) HLA ハプロタイプの移植免疫反応への関与を明らかにする

3) 本研究で得られる知見が、日本人間だけではなく他の民族においても認められる普遍的なものであることを検証するため、国際組織適合性ワークショップにおいて国際的な移植データベースによる解析を実施する

3) In vitro での解析

HLA 不適合非血縁者間骨髄移植、臍帯血移植症例の移植後の末梢リンパ球から不適合 HLA 型に反応する T 細胞等を分離し、上記統計学的に見出された知見を in vitro で検証可能な実験モデルを作成する。

3. HLA 以外の組織適合性に関与する抗原と多型の移植成績に及ぼす影響を以下の解析手法を用いて解明する。

1) NK 細胞受容体関連抗原の関与

KIR 関連遺伝子とその多型

2) HLA 領域とその他の領域のマイクロサテライト解析

3) サイトカイン受容体多型等の解析

IL-10 レセプター等の多型の解

析

4) Whole genome SNPs 解析

HLA 適合移植症例における GVHD 原因遺伝子の解析

C. 研究結果

1. 非血縁者間骨髄移植症例とそのドナーの検体整備

H20年度は患者とドナーの血液検体(約800ペア、1600検体)を細胞、DNAに分離し、保存するとともに、HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1の遺伝子型を同定した。さらに、whole genome 増幅法を用い、約6000検体を増量し、解析用サンプルセット作成を可能にした。

2. 非血縁者間骨髄移植におけるHLA型の違いと移植片対白血病効果(GVL)の解析(論文参照)

造血器腫瘍症例につき多変量解析を用いて解析し

1) HLA-C座とHLA-DPB1座の違いがGVLを生じる。

2) HLA-Cはリンパ系腫瘍、HLA-DPB1は骨髄系腫瘍においてGVL効果が認められる。

3) HLA-C座不適合の中で、GVL効果を生じさせるC遺伝子型の組みあわせを明らかにすることが出来た。

3. 非血縁者間骨髄移植におけるHLAハプロタイプと急性GVHDとの関連解析(分担研究報告参照)

1) 日本人に高頻度に認められるHLA-AからHLA-DPB1と広範囲に及ぶHLAハプロタイプを同定することができた。

2) 特定のHLAハプロタイプ(HP-

P2)を有する患者において急性GVHDの発症頻度が低く、HP-P3では高くなる傾向が認められた。

4. 国際組織適合性ワークショップにおける解析(研究班報告参照)

HLA-AからDRB1まで適合したT細胞除去法を用いないGVHD予防法を実施した非血縁者間骨髄移植5555症例(表1)を同一データベースを用いて多変量解析することにより

1) 日本人間移植では明らかに急性GVHDの頻度が低く

2) 日本人間移植では明らかに移植後の生存が良好であった。

5. In vitroでの解析

HLA-A, B, DRB1一致、Cw1座不一致の非血縁ドナーから骨髄移植を受け、移植片対宿主病および移植片対腫瘍効果を認めた急性リンパ性白血病患者の末梢血から、7つの細胞傷害性Tリンパ球クローンを分離した。それらは全て、患者のみが有するHLA-Cw*03分子をその分子上に提示されているペプチドとともに認識していた。

5. HLA以外の組織適合性に関与する抗原と多型の移植成績に及ぼす影響の解析(分担研究報告書参照)

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SNPおよびIL-10受容体遺伝子SNPと移植成績について解析し、患者IL-10遺伝子プロモーターSNPハプロタイプが急性GVHD重症化および無病生存率と関連することを明らかにした。

D. 考察

非血縁者間骨髄移植症例の解析で明らか

になったことを、臍帯血移植や海外の異なった人種間で検証することが重要であると考えられた。

E. 結論

非血縁者間骨髄移植を受けた患者とドナーのHLA遺伝子型とその他の組織適合性抗原を精緻な細胞遺伝学的な手法(HLAとその分子解析、HLAハプロタイプ解析、HLA遺伝子以外の多型解析(Whole genome SNPs、マイクロサテライト、サイトカイン受容体、NK細胞受容体)、In vitro解析)で解析することにより、GVHD、GVLに関与する組織適合性抗原を同定できた。さらに、移植免疫反応の発症機序を解明することにより、移植成績の向上をはかることができると考えられた。

F. 健康被害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawase T, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, Ogawa S, Kato S, Sasazuki T, Kodera Y, Morishima Y; Japan Marrow Donor Program. HLA mismatch combinations associated with decreased risk of relapse: implications for the molecular mechanism. *Blood*. 2009 Mar 19;113(12):2851-8.
- 2) Ogawa S, Matsubara A, Onizuka M, Kashiwase K, Sanada M, Kato M, Nannya Y, Akatsuka Y, Satake M, Takita J, Chiba S, Saji H, Maruya E, Inoko H, Morishima Y, Kodera Y, Takehiko S; Japan Marrow Donation Program (JMDP). Exploration of the genetic basis of GVHD by genetic association studies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009 Jan;15(1 Suppl):39-41.
- 3) Atsuta Y, Suzuki R, Nagamura-Inoue T, Taniguchi S, Takahashi S, Kai S, Sakamaki H, Kouzai Y, Kasai M, Fukuda T, Azuma H, Takanashi M, Okamoto S, Tsuchida M, Kawa K, Morishima Y, Kodera Y, Kato S. Disease-specific analyses of unrelated cord blood transplant compared with unrelated bone marrow transplant in adult patients with acute leukemia. *Blood*. 2008 Dec 22. [Epub ahead of print]
- 4) 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 Mar 15;111(6):3286-94.
- 5) 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: Japan Marrow Donor Program. 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. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008 Jan;14(1):75-87.
- 6) Hui J, Oka A, James A, Palmer LJ, Musk AW, Beilby J, Inoko H: A genome-wide association scan for asthma in a general Australian population. *Hum Genet* 123: 297-306, 2008.
- 7) Meguro A, Ota M, Katsuyama Y, Oka A, Ohno S, Inoko H, Mizuki N: Association of the toll-like receptor 4 gene polymorphisms with Behcet's disease. *Ann Rheum Dis* 67: 725-727, 2008.
- 8) Ohtsuka M, Inoko H, Kulski JK, Yoshimura S: Major histocompatibility complex (Mhc) class Ib gene duplications, organization and expression patterns in mouse strain C57BL/6. *BMC Genomics* 9:178-192, 2008
- 9) Kimura T, Kobayashi T, Munkhbat B, Oyungerel G, Bilegtsaikhan T, Anar D, Jambaldorj J, Munkhsaikhan S, Munkhtuvshin N, Hayashi H, Oka A, Inoue I Inoko H: Genome-wide association analysis with selective genotyping identifies candidate loci for adult height at 8q21.13 and 15q22.33-q23 in Mongolians. *Hum Genet* 123: 655-660, 2008.
- 10) Ando A, Uenishi H, Kawata H, Tanaka-Matsuda M, Shigenari A, Flori L, Chardon P, Lunney JK, Kulski JK, Inoko H: Microsatellite diversity and crossover regions within homozygous and heterozygous SLA haplotypes of different pig breeds. *Immunogenetics* 60: 399-407, 2008.
- 11) Shibuya E, Meguro A, Ota M, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Kawase K, Yamamoto T, Nakamura M, Negi A, Sagara T, Nishida T, Inatani M, Tanihara H, Aihara M, Araie M, Fukuchi T, Abe H, Higashide T, Sugiyama K, Kanamoto T, Kiuchi Y, Iwase A, Ohno S, Inoko H, Mizuki N: Association of toll-like receptor 4 gene polymorphisms with normal tension glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49: 4453-4457, 2008.
- 12) Kulski JK, Shigenari A, Shiina S, Ota M, Hosomichi K, James I,

- Inoko H: Human endogenous retrovirus (HERVK9) structural polymorphism with haplotypic HLA-A allelic associations. *Genetics*.108: 446-457, 2008.
- 13) Takemoto Y, Naruse T, Namba K, Kitaichi N, Ota M, Shindo Y, Mizuki N, Gul A, Madanat W, Chams H, Davatchi F, Inoko H, Ohno S, Kimura A Re-evaluation of heterogeneity in HLA-B*510101 associated with Behçet's disease. *Tissu Antigens* 72: 347-353, 2008.
- 14) Sumiyama D, Kitamura S, Terasawa F, Hori Y, Murata K, Kulski JK, Inoko H: Paternity determination of captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) using microsatellite DNA analysis. *J Vet Med Sci* 70: 711-713, 2008.
- 15) Hosomichi K, Miller MM, Goto RM, Wang Y, Suzuki S, Kulski JK, Nishibor20 M, Inoko H, Hanzawa K, Shiina T: Contribution of mutation, recombination, and gene conversion to chicken MHC-B haplotype diversity. *J Immunol* 181:3393-3399, 2008.
- 16) Akiyama M, Yatsu K, Ota M, Katsuyama Y, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Kawase K, Yamamoto T, Nakamura M, Negi A, Sagara T, Kumagai N, Nishida T, Inatani M, Tanihara H, Ohno S, Inoko H, Mizuki N Akiyama M, Yatsu K, Ota M, Katsuyama Y, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Kawase K, Yamamoto T, Nakamura M, Negi A, Sagara T, Kumagai N, Nishida T, Inatani M, Tanihara H, Ohno S, Inoko H, Mizuki N: Microsatellite analysis of the GLC1B locus on chromosome 2 points to NCK2 as a new candidate gene for normal tension glaucoma. *Br J Ophthalmol* 92: 1293-1296, 2008.
- 17) Kulski JK, Shigenari A, Shiina T, Ota M, Hosomichi K, James I, Inoko H: Human endogenous retrovirus (HERVK9) structural polymorphism with haplotypic HLA-A allelic associations *Genetics* 180: 445-457, 2008.
- 18) 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).
- 19) 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*, 41(8): 729-736 (2008).
- 20) 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*, 41(8): 753-756 (2008).
- 21) 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*, 14(4): 397-402 (2008).
- 22) 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*, 87(5): 451-458 (2008).
- 23) Murata M, Ishikawa Y, Ohashi H, Terakura S, Ozeki K, Kiyoi H, Naoe T. Donor Cell Leukemia after Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplantation: A Case Report and Literature Review. *Int J Hematol*, 88(1): 111-115 (2008).
- 24) 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. *Am J Hum Genet* 2008;82: 1075-83
- 25) Ueta M, Tokunaga K, Sotozono C, Inatomi T, Yabe T, Matsushita M, Mitsuishi Y, Kinoshita S. HLA class I and II gene polymorphisms in Stevens-Johnson syndrome with ocular complications in Japanese. *Mol Vis* 2008;14: 550-5
- 26) Fujimoto T, Doi K, Koyanagi M, Tsunoda T, Takashima Y, Yoshida Y, Sasazuki T, Shirasawa S. ZFAT is an antiapoptotic molecule and critical for cell survival in MOLT-4 cells. *FEBS Lett.* 2009 Feb 4;583(3):568-72.
- 27) Fujimoto T, Miyasaka K, Koyanagi M, Tsunoda T, Baba I, Doi K, Ohta

- M, Kato N, Sasazuki T, Shirasawa S. Altered energy homeostasis and resistance to diet-induced obesity in KRAP-deficient mice. *PLoS ONE*. 2009;4(1):e4240.
- 28) Furuno K, Ikeda K, Hamano S, Fukuyama K, Sonoda M, Hara T, Sasazuki T, Yamamoto K. Onecut transcription factor OC2 is a direct target of Tbet in type-1 T-helper cells. *Genes Immun*. 2008 Jun;9(4):302-8.
- 29) Koyanagi M, Nakabayashi K, Fujimoto T, Gu N, Baba I, Takashima Y, Doi K, Harada H, Kato N, Sasazuki T, Shirasawa S. ZFAT expression in B and T lymphocytes and identification of ZFAT-regulated genes. *Genomics*. 2008 May;91(5):451-7.
- 30) Gotoh K, Tanaka Y, Nishikimi A, Inayoshi A, Enjoji M, Takayanagi R, Sasazuki T, Fukui Y. Differential requirement for DOCK2 in migration of plasmacytoid dendritic cells versus myeloid dendritic cells. *Blood*. 2008 Mar 15;111(6):2973-6.
- 31) 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*. in press.
- 32) Lehmann S, Ogawa S, Raynaud S, Sanada M, Nannya Y, Ticchioni M, Bastard C, Akagi T, Kawamata N, Koeffler H. Molecular allelokaryotyping of early stage untreated chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. in press.
- 33) Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, Kato M, Sanada M, Hemminki K, Yamamoto G, Nannya Y, Koehler R, Flohr T, Miller C, Harbott J, Ludwig W, Stanulla M, Schrappe M, Bartram C, Koeffler HP. Molecular allelokaryotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemias by high resolution single nby high resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide by high resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide genomic microarray. *Blood*. in press.
- 34) 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*. in press.

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ハプロタイプと急性GVHD—

分担研究者	森島泰雄	愛知県がんセンター中央病院
研究協力者	森島聡子	愛知県がんセンター研究所
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	川瀬孝和	愛知県がんセンター研究所

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。今年度はHLA遺伝子型から推定したHLAのハプロタイプそのものが急性GVHDの発症に関与していることを明らかにした。この知見により、HLAハプロタイプを考慮したドナー選択により移植成績の向上が期待されるとともに、GVHDの発症機序解明のための基礎データとなった。さらに、日本人のHLAハプロタイプの大規模データを提供できた。

A. 研究目的

ドナーと患者のHLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 遺伝子型に基づくHLAハプロタイプの同定とHLAハプロタイプの急性GVHD発症への影響につき解析し、HLAハプロタイプ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

1) 本年度までに本研究班で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非血縁者間骨髄移植症例とそのドナーの6188ペアを対象にして、HLA-AからHLA-DPB1に及ぶHLAハプロタイプを同定した。

2) HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1適合1810症例(T細胞除去法を用いた症例と海外ドナー症例は除外)を用いてHLAハプロタイプと急性GVHD(2度以上)の発症頻度を解析した。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予防法などにより調整した。症例を表2に示した。

C. 研究結果

1) HLAハプロタイプの同定

HLA-A型からDPB1型までhomozygousなペアを検索することにより、表1に示すように、HLA-AからDPB1までの頻度の高いハプロタイプ3つ

を同定することができた。頻度の高い順に HP-P1, HP-P2, HP-P3 とし、homozygous な個人はそれぞれ108名、24名、15名見出された。

2) HP-P1, HP-P2, HP-P3 と急性GVHD発症率

表3に示すように、HP-P1陽性症例と陰性症例でGVHDの発症頻度に有意差は認められなかった。

HP-P2陽性症例は有意にHP-P2陰性症例に比べGVHDの発症頻度は低かった。

HP-P3陽性症例は陰性症例に比べGVHDの頻度は高い傾向を示した。

HP-P1陽性症例が331例と多数存在したので、HP-P1陽性症例においても一方のHLAハプロタイプのGVHDに対する影響を解析することが可能であった。

その結果、HP-P1/P1の症例にくらねP1/P3の症例は有意にGVHDの頻度が高かった。

HP-P1/P1とHP-P1/P2症例はそれぞれGVHDの発症率16.2%、12.0%と低率であった。

D. 考察

HLAハプロタイプ自身がGVHDに関与していることを示した最初の知見であり、今後その詳細を検討したい。

E. 結論

HLAハプロタイプ自身が急性GVHDの発症に関与していることが明らかになった。

日本人ではHLA A-C-B-DRB1-DQB1-DPB1に及ぶ広範囲なH

LA領域に及ぶHLAハプロタイプが存在していた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1: Ogawa S, Matsubara A, Onizuka M, Kashiwase K, Sanada M, Kato M, Nannya Y, Akatsuka Y, Satake M, Takita J, Chiba S, Saji H, Maruya E, Inoko H, Morishima Y, Kodera Y, Sasazuki T; Japan Marrow Donation Program (JMDP). Exploration of the genetic basis of GVHD by genetic association studies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008 Jan;15(1 Suppl):39-41.
- 2: Atsuta Y, Suzuki R, Nagamura-Inoue T, Taniguchi S, Takahashi S, Kai S, Sakamaki H, Kouzai Y, Kasai M, Fukuda T, Azuma H, Takanashi M, Okamoto S, Tsuchida M, Kawa K, Morishima Y, Kodera Y, Kato S. Disease-specific analyses of unrelated cord blood transplant compared with unrelated bone marrow transplant in adult patients with acute leukemia. *Blood*. 2008 Dec 22. [Epub ahead of print]
- 3: Kawase T, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, Ogawa S, Kato S, Sasazuki T, Kodera Y, Morishima Y. HLA mismatch combinations associated with decreased risk of relapse: Implications for molecular

- mechanism. Blood. 2008 Nov 7. [Epub ahead of print]
- 4: 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 Mar 15;111(6):3286-94.
- 5: 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; Japan Marrow Donor Program. 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. Biol Blood Marrow Transplant. 2008 Jan;14(1):75-87.
3. 学会発表
- Morishima Satoko, Ogawa Seishi, Kawase Takakazu, Matsubara Aiko Nanya Yasuhito, Kashiwase Koichi, Saji Hiroo, Inoko Hidetoshi, Kato Shunichi, Kodera Yoshihisa, Sasazuki Takehiko, and Morishima Yasuo for the Japan Marrow Donor Program. Impact of Highly Conserved HLA Haplotype on Acute Graft-versus-Host Disease in Unrelated Bone Marrow Transplantation. 50th Annual Meeting of American Society of Hematology. Dec. 2008. San Francisco.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1 HLA ハプロタイプと homozygous 個人の人数

Haplotype	Among 12,376 individuals	
		Frequency among Japanese (%)
P1	A*2402-Cw*1202-B*5201-DRB1*1502-DQB1*0601-DPB1*0901 No. of homozygous P1 individuals = 108	5.451
P2	A*3303-Cw*1403-B*4403-DRB1*1302-DQB1*0604-DPB1*0401 No. of homozygous P2 individuals = 24	2.935
P3	A*2402-Cw*0702-B*0702-DRB1*0101-DQB1*0501-DPB1*0402 No. of homozygous P3 individuals = 15	1.677

表 2 HLA 適合症例

N=712						
Median age (y.) (range)	Gender (no.) (donor/patient)		Disease (no.)			
Patient 33 (0-70)	M / M	312	ALL	162	ML	69
	M / F	134	ANLL	196	MM	8
Donor 33 (20-51)	F / M	115	CML	119	SAA	33
	F / F	151	HD	14	Others	20
			MDS	91		
Risk of leukemia relapse	GVHD prophylaxis		ATG	Preconditioning		
High 228	Cyclosporine based	402	ATG 48	TBI regimen	539	
Standard 249	Taclorimus based	310	non-ATG 658	non-TBI regimen	173	

表3 HLAハプロタイプ別急性GVHD発症頻度

-Multivariate analysis for A-GVHD grade II to IV-

Haplotype		N	HR (95% CI)	P
P1	negative	381	Ref. 1.00	0.665
	positive	331	1.06 (0.81-1.39)	
P2	negative	601	Ref. 1.00	0.032
	positive	111	0.63 (0.41-0.96)	
P3	negative	608	Ref. 1.00	0.07
	positive	104	1.38	

図1 HLAハプロタイプP1陽性症例における他のハプロタイプ別急性GVHD発症曲線

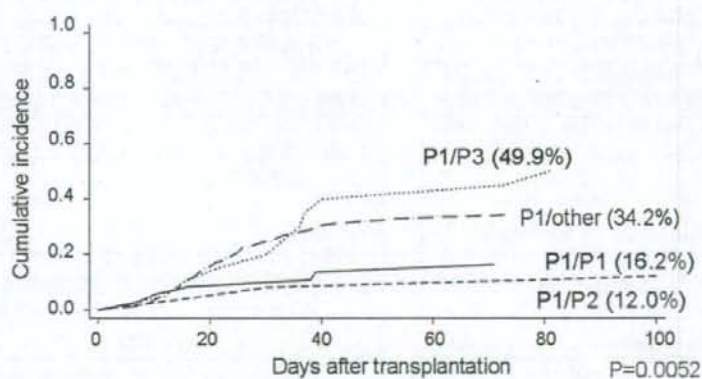


表4 HLAハプロタイプP1陽性症例における他のハプロタイプ別急性GVHD発症リスク (多変量解析)

	N	HR (95% CI)	p
P1P1	36	Ref. 1.00	
P1P2	25	0.71 (0.17-2.93)	0.64
P1P3	19	3.35 (1.18-9.55)	0.024
P1/other	251	2.49 (1.06-5.85)	0.036
Total	712		

厚生労働科学研究費補助金(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)

分担研究報告書

非血縁者間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、HLA 一致同胞間同種造血幹細胞移植症例間における Gene Chip を用いた移植後合併症に関連する遺伝子解析および、非血縁者間造血幹細胞移植症例におけるマイクロサテライト多型を用いた GVHD 発症に関わる関連遺伝子の探索を行った。

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、Gene Chip を用いた網羅的疾患関連遺伝子多型解析を約 160 ペアの HLA 一致同胞間移植症例において施行した。Affymetrix 社の SNP5.0 を使用し、50 万 SNP の同胞間における差異が移植後合併症発症に関してどのように関連するかを解析する。非血縁者間造血幹細胞移植症例におけるマイクロサテライト多型解析は一次コホートとして 460 例のプール DNA を用いた解析、その結果を基に 300 例プール DNA による二次コホート解析、さらに一次、二次コホートを元にした 300 例の個別解析をおこない、最終的に疾患関連遺伝子を特定する。対象とする遺伝子は 2956 遺伝子とし、各遺伝子にマイクロサテライト多型を 2-3 設定し解析した。

C. 研究結果

Gene Chip を用いた HLA 一致同胞間移植における解析は現在進行中である。マイクロサテライト多型を用いた非血縁者間移植解析では一次コホートを終了し、統計学的に有意水準に達しているマーカーが得られており、以降の解析を進めてゆく予定である。

D. 考察

HLA 一致同胞間移植における網羅的遺伝子多型解析は過去に例が無く、HLA がきわめて近い関係にある同胞であることから、HLA に依存しない移植後合併症発症に関わる遺伝子の同定が期待される。マイクロサテライト多型を用いた非血縁者間造血幹細胞移植症例に対する疾患関連遺伝子多型解析もこれまでに前例が無く、また、SNP とことなり、マイクロサテライト多型は対立遺伝子が豊富であることから、より正確に疾患関連遺伝子を捉えることが可能ではないかと考える。

E. 結論

我々は HLA 一致血縁者間および非血縁者間造血幹細胞移植症例に対して SNP Chip およびマイクロサテライト多型を用いた網羅的疾患関連遺伝子多型解析を行い、いずれも現在解析中である。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kawase T, Matsuo K, Kashiwase K, et al: HLA mismatch combinations associated with decreased risk of relapse Implications for molecular mechanism. Blood 2008

Ogawa S, Matsubara A, Onizuka M, Kashiwase K, Sanada M, Kato M, Nannya Y, Akatsuka Y, Satake M, Takita J, Chiba S, Saji H, Maruya E, Inoko H, Morishima Y, Koderu Y, Takehiko S; Japan Marrow Donation Program (JMDP): Exploration of the genetic basis of GVHD by genetic association studies. Biol Blood Marrow Transplant. 5(1 Suppl): 39-41, 2008.

Hui J, Oka A, James A, Palmer LJ, Musk AW, Beilby J, Inoko H: A genome-wide association scan for asthma in a general Australian population. Hum Genet 123:297-306, 2008.

Meguro A, Ota M, Katsuyama Y, Oka A, Ohno S, Inoko H, Mizuki N: Association of the toll-like receptor 4 gene polymorphisms with Behcet's disease. Ann Rheum Dis 67: 725-727, 2008.

その他

2.学会発表

猪子英俊, HLA の多型性とその生物学的意義, 第1回移植免疫学を学ぶ会, 2009.

猪子英俊, ヒト疾患遺伝子のゲノム解析から、創薬、予防・健康医学の臨床応用の時代へ、第80回臨床HLA研究会 2008

目黒明、石原麻美、勝山善彦、南田研一、蕪城俊克、猪子英俊、その他：日本人サルコイドーシスにおける BTNL 2 遺伝子多型の解析、第 17 回日本組織適合性学会大会、2008 年 9 月

清水佐良子、光永滋樹、吉川枝里、岡晃、猪子英俊：Loop-Mediated Isothermal Amplification 法による ambiguity 解決の可能性、第17回日本組織適合性学会大会、2008年9月

椎名隆、細道一善、北夕紀、井関直政、猪子英俊、その他：ほ乳類の主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 領域における比較ゲノム解析、第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学大会合同大会 2008 年12月

その他

H. 知的財産権の出願・登録状況
特記事項なし

厚生労働科学研究費補助金
(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)

組織適合性に基づく非血縁同種造血幹細胞移植の成績向上に関する研究 分担研究報告書

GvHD 発症と HLA アリルミスマッチ方向性

笹月 健彦 国立国際医療センター

研究要旨

非血縁者間骨髄移植成績に及ぼす HLA アリルミスマッチの影響を解析することによって、GvHD 発症に、ドナー・レシピエント間での HLA アリルミスマッチ方向性が重要であることは、すでに本研究班で報告している。本研究では、その免疫学的機序は、ドナーおよびレシピエントにおいて、T 細胞が共通に認識する HLA・ペプチド複合体の発現量多寡に基づくとの仮説を提唱し、動物モデルによって検証することを目的とした。本年度は、B6 マウスを背景として、ドナーモデルとしての $\beta 2m$ ノックアウトマウスのヘテロ接合、レシピエントモデルとしての H2-Kb トランスジェニックマウス 2 系統を樹立した。今後、Kb 分子の発現量差異を検討し、移植実験によって上記作業仮説の検証を進める。

A. 研究目的

胸腺細胞及びそれらから分化する T 細胞は、主要組織適合抗原により提示される自己抗原により、正の選択 (positive selection) 及び負の選択 (negative selection) を受け、免疫応答における自己/非自己識別に中心的な役割を担う。非血縁者間臍帯血移植の際に重大な問題となる移植片対宿主病 (graft versus host disease; GvHD) は、移植片に含まれる T 細胞が宿主抗原を非自己として認識することに起因する。T 細胞の自己/非自己認識の分子機構を理解し、さまざまな HLA の組み合わせにおいて反応性を予測することは、非血縁同種造血幹細胞移植の成績向上に直結する重要な問題である。本年

度は、主要組織適合抗原の発現量の多寡、すなわち主要組織適合抗原により提示される自己抗原の多寡によって胸腺細胞及び T 細胞のレパトア選択にどのような影響があり、自己/非自己の認識にどのようなインパクトがあるのかについて動物モデルを用いて検証を試みた。

B. 研究方法

マウス主要組織適合抗原 H2-Kb を過剰発現するトランスジェニックマウスを作成した。H2-Kb cDNA を β アクチンプロモーター下流に連結したトランスジーンを組み換えにより作成し、常法により直線状プラスミドにした後に受精卵へ移入した。生まれてきた産仔の尾を採取

し、DNA を抽出して PCR 及びサザンプロットによりトランスジーンを持つマウスを選別した。これらを交配して系統化した。さらに、発現量の高いマウスを得るため、トランスジェニックマウス間での交配を行い、ホモトランスジェニックマウスを作成した。また、H2-Kb 発現が低下したマウスとして、 β_2m microglobulin (β_2m) ヘテロ欠損マウスを用いた。

得られた H2-Kb ホモトランスジェニックマウス、ヘテロマウス、野生型 C57BL/6 マウスを宿主として、致死量放射線照射後に野生型 C57BL/6 及び β_2m ヘテロ欠損マウスより採取した骨髓細胞と成熟 T 細胞を含む脾臓細胞を移植した。移植後経時的な観察を行い、体重減少や皮膚炎を指標として GvHD 発症の有無を観察した。

(倫理面への配慮)

本研究は、遺伝子組換え実験、動物実験を含む。「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」「研究開発に関わる遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成 18 年厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)」他、関係法令、規則を遵守し遂行した。研究計画に係る遺伝子組み換え実験ならびに動物実験は、所属する研究機関のバイオセーフティー委員会・動物実験委員会の審査を受け、承認を得て実施した。

C. 研究結果

得られたトランスジェニックマウスの 2 系統(#17, #25) について、末梢血中の白血球分画

を解析し H2-Kb の過剰発現の程度をフローサイトメトリーにより調べた。#17 系統では、非リンパ球画分で軽度の増加が確認された。#25 系統では、特に非リンパ球画分で発現の増強がみられ、B 細胞でも発現増強が観察された。T 細胞ではむしろ減少傾向にあった。非リンパ球分画の発現で比較したところ、傾向輝度から推察して#17 系統では正常の 1.5-2 倍程度、#25 系統では 2-3 倍程度の過剰発現があるものと思われた。これらとは別にトランスジーンを持つファウンダーマウスが数匹得られており、系統化を試みているところである。

主要組織適合抗原が少ない環境下で選択された T 細胞は、主要組織適合抗原/自己抗原ペプチド複合体に比較的反応性が高く、主要組織適合抗原/自己抗原ペプチド複合体が多量に存在する環境に移入した場合、GvHD の原因となる可能性を考えこのモデルの検証を試みた。#17 系統については、交配が順調に進みホモトランスジェニックマウスが得られた。ホモ、ヘテロ、ノントランスジェニックマウスに致死量の放射線を照射し、 β_2m ヘテロ欠損マウスより採取した骨髓細胞と成熟 T 細胞を含む脾臓細胞を移植した。体重減少、皮膚症状を経時的に観察し、GvHD が起こるかどうかが検討した。観察数がまだ少数にとどまるものの明らかな体重減少や皮膚炎は観察されていない。リンパ球の浸潤等組織学的な検討による評価を計画している。また、より発現が高い系統を宿主に用いた検討が必要であり、#25 系統の交配をはじめ準備を進めている。

D. 考察

これまでの本研究班の解析によって、GvHD

発症に、ドナー・レシピエント間での HLA アリルミスマッチ方向性が重要であることが示されている。例えば、ドナー・レシピエント間でのミスマッチが、HLA-A*0206-A*0201 の場合 GvHD のリスクとなるが、その逆方向はリスクとならない。A*0206 と A*0201 では、ペプチド結合溝ベータシートの一アミノ酸残基のみに差異を認め、特に P2 がロイシンの結合ペプチドレバトアは、A*0201 が A*0206 よりも多様であることが示されている。これらのことは、ドナーにおいて、比較的発現量の低い A*0206+P2L 自己ペプチド複合体によって選択を受けた T 細胞が、レシピエントにおいて発現量の高い A*0201+P2L 自己ペプチド複合体を認識し、免疫応答が惹起された可能性を示唆している。本研究では、この可能性を動物モデルを構築し実証しようというものである。現段階では、発現量の高いレシピエントを確立するために、いくつかの系統のトランスジェニックマウスを樹立し、交配を進めている。ドナーにおいては、 $\beta 2m$ ノックアウトのヘテロ接合を用いているが、今後、このドナーに比して、少なくとも 10 倍は発現量に差を認めるレシピエントマウスの作成を第一段階の目標として研究を進めている。

E. 結論

GvHD 発症におけるアリルミスマッチ方向性の重要性に関し、その機序を解明するための動物モデル作成を進め、本年度は、ドナーモデルとしての $\beta 2m$ ノックアウトマウスのヘテロ接合、レシピエントモデルとしての H2-Kb トランスジェニックマウス 2 系統を樹立した。

G. 研究発表

論文発表

1: Fujimoto T, Doi K, Koyanagi M, Tsunoda T, Takashima Y, Yoshida Y, Sasazuki T, Shirasawa S. ZFAT is an antiapoptotic molecule and critical for cell survival in MOLT-4 cells. *FEBS Lett.* 2009 Feb 4;583(3):568-72.

2: Fujimoto T, Miyasaka K, Koyanagi M, Tsunoda T, Baba I, Doi K, Ohta M, Kato N, Sasazuki T, Shirasawa S. Altered energy homeostasis and resistance to diet-induced obesity in KRAP-deficient mice. *PLoS ONE.* 2009;4(1):e4240.

3: Kawase T, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, Ogawa S, Kato S, Sasazuki T, Kodera Y, Morishima Y; Japan Marrow Donor Program. HLA mismatch combinations associated with decreased risk of relapse: implications for the molecular mechanism. *Blood.* 2009 Mar 19;113(12):2851-8.

4: Furuno K, Ikeda K, Hamano S, Fukuyama K, Sonoda M, Hara T, Sasazuki T, Yamamoto K. Onecut transcription factor OC2 is a direct target of T-bet in type-1 T-helper cells. *Genes Immun.* 2008 Jun;9(4):302-8.

5: Koyanagi M, Nakabayashi K, Fujimoto T, Gu N, Baba I, Takashima Y, Doi K, Harada H, Kato N, Sasazuki T, Shirasawa S. ZFAT expression in B and T lymphocytes and identification of ZFAT-regulated genes.