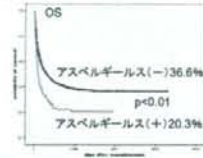


アスペルギルス症

1. 発症例数: 症例42例, 疑い例150例
2. 発症時期: 移植前 34例
移植後158例
3. 発症率
 - 1) 確実例 (10例で発症時期不明のため32例で解析)
発生率 day 100 1.3%
 - 2) 確実+疑い例 (28例で発症時期不明のため164例で解析)
発生率 day100 6.6%
3. 検出菌種

Aspergillus	50
A. fumigatus	6
A. terreus	2
A. flavus	1



急性白血病におけるアスペルギルス症発症にかかわる危険因子 (移植前の因子による単変量解析)

	危険因子	HR	p
1. Patient Age	小児	3.28	0.001
	成人	1.05	
2. Day since grafting	<15	1.79	0.130
	≥15	0.99	
3. CD34 ⁺ cells/kg	0.00-0.20	1.29	0.198
	>0.20	0.95	
4. Pretransplant SCT	Y/N	5.78	0.005
	Y/N	10.14	
5. HLA-DQA1*01:01	0	3.88	0.038
	1	1.89	
	2	1.89	
6. Disease status	CR/CR1	0.95	0.981
	CR/CR2	0.96	
7. Pretransplant TBI	Y/N	0.29	<0.001
	Y/N	0.99	
8. GVHD prophylaxis	MTX+1	1.28	0.061
	MTX+2	0.95	
	EtOH+1	0.99	0.997
	EtOH+2	0.95	
	FK506+1	0.79	0.114
	FK506+2	0.99	
	PSL+1	0.95	0.998
	PSL+2	0.95	

アスペルギルス感染症発症の危険因子 (多変量解析)

	HR	p	
1. Patient Age	小児	1.898	0.028
2. Disease status	CR/CR1	1.817	0.012

Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid organ transplantation, Morgan et al. (2005)

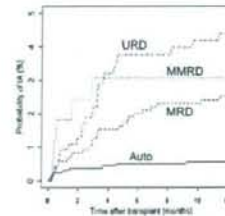


Fig. 1 Cumulative incidence of invasive aspergillosis (IA) among autologous HSCT recipients (-), allogeneic HSCT recipients who received grafts from matched related donors (-), mismatched related donors (-), or unrelated donors (-).

厚生労働科学研究費 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業
分担研究報告書

臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究
小児臍帯血移植におけるシクロスポリン至適使用法の検討（3時間点滴の TDM）

分担研究者 足立壮一 京都大学大学院医学研究科発達小児科学 講師

研究要旨

造血細胞移植において免疫抑制剤のシクロスポリンの標準的投与方法は未だ確立していない。しかし、ネオーラル®（シクロスポリン内服薬）が導入されてからは、ネオーラル®の薬物動態と効果およびシクロスポリンの薬理作用が検討され AUC₀₋₄、C₂ 値（内服 2 時間後の血中濃度）および C_{max} が効果に相関することが明らかになった。そこで、小児臍帯血移植でのシクロスポリン 3 時間点滴における C₃ 値を設定してシクロスポリンの体内薬物動態を検討する治療研究を開始した。

A. 研究目的

造血幹細胞移植においてシクロスポリンの目標血中濃度値、至適使用量および点滴静注時間等シクロスポリンの使い方は各施設の経験に基づき行なわれている。小児造血幹細胞移植においては、京都大学小児科より、パイロット試験として、3 時間点滴の有用性と点滴時の C₃ 値（シクロスポリン投与後 3 時間の血中濃度）や内服時の C₂ 値の検討について報告がある。そこで、これまでの報告やパイロット試験などを参考にして、3 時間点滴における C₃ 値を設定してシクロスポリンの体内薬物動態を多施設にて検討する。

B. 研究方法

小児臍帯血移植において、シクロスポリン注射液（CyA-IV; サンディミュン®注射液）を 1.5mg/kg の 3 時間点滴で 1 日 2 回行ない、投与後 3 時間値（C₃ 値）目標値として CyA 使用量を

調節して、シクロスポリンの体内薬物動態を検討し、CyA の標準的な使い方を確立する。Day29 以降から、サンディミュン注射液の 2 倍量（シクロスポリン量として）の経口剤ネオーラルに切り替えて、同様の検討をする。また、合わせて、急性 GVHD の抑制効果に適切な血中濃度を検討する。

用量調節

サンディミュン®注射（CyA-IV）、投与開始後、Day3 に、血中濃度を測定し、用量調節を行う。血中濃度の目標値は、投与後 3 時間値（C₃ 値）が、800ng/ml を下回らず、1500ng/ml を超えないようにする。トラフ値（C₀ 値）が、300ng/ml を上回った場合は、副作用が発現しない限り継続する。経口摂取が可能になった場合は、ネオーラル®（CyA-MEPC）を注射投与量の倍量を投与し、投与開始約 3 日後に、血中濃度を測定する。

用量調節方法

C3 値を A ng/ml として、以下の計算式に基づいて調節する。

800ng/ml を下回った場合

$(900/A) \times (\text{現在の使用量}) = (\text{新たな使用量})$

1,500ng/ml を上回った場合

$(1,400/A) \times (\text{現在の使用量}) = (\text{新たな使用量})$

(評価項目)

以下の項目について検討する

主要評価項目:シクロスポリンの体内薬物動態の検討

副次的評価項目:移植後 50 日間の急性 GVHD の発生率, 急性 GVHD および腎障害と CyA 血中濃度(C3 値, C2 値, C0 値)の関係, 安全性(副作用)

(予定登録数と登録期間)

10 例

登録期間: 2 年, 追跡期間: 1 年, 研究期間: 3 年。

(研究組織, 参加施設と登録)

総括責任医師:

京都大学大学院医学研究科発達小児科学

足立壮一

研究事務局

京都大学大学院医学研究科発達小児科学

松原 央

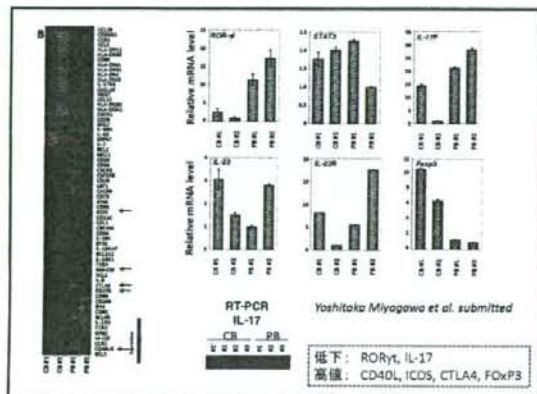
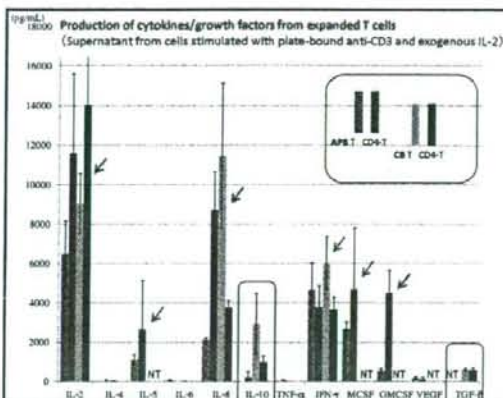
研究参加施設

当該研究に対する参加募集を行っており、小児造血細胞移植を行なっている施設から 6 施設の参加表明があった。2008 年 12 月末時点での登録症例数は 4 例である。登録予定数は 10 例であり、現在も登録受付を継続中である。

平成20年度厚生労働科学研究(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)
「臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究」
(研究代表者 加藤俊一) 平成21年1月17日 東京

ex vivo増殖臍帯血T細胞 輸注療法の臨床研究

東京医科大学・院・発生発達病態学分野、
同・医学部附属病院細胞治療センター、同難治疾患研究所
梶原道子、清水則夫、森尾友宏



ex vivo増殖臍帯血CD4-T細胞輸注療法依頼 (2008.1-12)

投与目的	疾患名	数	細胞調製	増殖
生着不全・感染症に備えて	重症複合型免疫不全症	2	○	○
	再生不良性貧血 (2nd SCT)	1	NE	#
再発予防	腫瘍性リンパ腫	1	○	X
	乳児白血病	1	○	○
再発	急性骨髄性白血病	3*	○	○
	成人T細胞性白血病	1	NE	#
	乳児白血病	1	○	○
生着不全・拒絶	急性骨髄性白血病	1	○	X
感染症(CMV/BKV)	慢性活動性EBV感染症	1	NE	#

バッグからの培養: 2/7で培養不可

NE: not expanded
*: 2例は生着細胞から

臍帯血ex vivo増殖活性化CD4T細胞(CD4-DLI)アンケート

- 将来的にex vivo増殖臍帯血T細胞輸注療法(CD4あるいはCD4+CD8)を行っていただく可能性がありますか?
A はい
B いいえ
- 臍帯血CD4-DLIの運化として重要と思うものから順番に番号をつけてください。
A 生着不全・拒絶 ()
B 感染症の再発 ()
C 日和見感染症(Dを除く) ()
D 移植後EBV/LPD ()
E 予防投与(生着不全・拒絶回避目的) ()
F 予防投与(再発回避目的) ()
G 予防投与(感染症対策Dを含む) ()
H その他 ()
(内容を記載ください)
- 再発・感染症・拒絶時などに、生着した細胞からのCD4増殖には問題があり、あらかじめ一部を増殖して保存し、必要時に増殖させる方法が現実的と考えています。現在は投与後のバッグから細胞を回収していますが、仮に一部の細胞を増殖に供することが正式に承認された場合、どのくらいの量までならご提供いただけますか?
A ≤ 0.5ml
B 0.5ml < ≤ 1ml
C 1ml < ≤ 2ml
D 輸注細胞数による

臍帯血ex vivo増殖活性化CD4T細胞(CD4-DLI)アンケート

- II IVGVHDやhigh gradeの有害事象がない状態で、臍帯血CD4-DLIを2度程度投与する臨床試験を計画しています。実施された場合、ご協力いただけますか?
A はい
B いいえ
- 第1相臨床試験に引き続き、第II相臨床試験の計画に入りたいと考えております。プロトコル作成委員の立ち上げが必要ですが、プロトコル委員としてご参加いただくことは可能でしょうか?
A 引き受けても良い
B 希望しない
C 代理を推薦する(お名前と御所属を記載ください)
- その他臍帯血移植後CD4-DLIについて、あるいは臍帯血移植後において応用を希望する細胞治療について、自由にご意見をお聞かせ下さい。

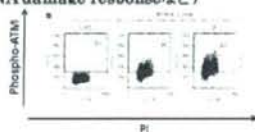
臍帯血 *ex vivo* 増殖活性化CD4T細胞(CD4-DLI)アンケート
途中集計結果(1)

臍帯血 *ex vivo* 増殖活性化CD4T細胞(CD4-DLI)アンケート
途中集計結果(2)

ex vivo 増殖臍帯血T細胞輸注療法の課題

細胞調製に関する課題

1. 無血清化、FBS使用の推奨→FBSの回避・無血清化条件検討
2. 増殖不良例の解析
(TREC、培養細胞のDNA damage responseなど)



3. CD4, CD8, CD4+CD8

(探索的臨床研究ではCD4+CD8でもIII-IV GVHDなし)

ex vivo 増殖臍帯血T細胞輸注療法の課題

臨床研究

臨床第I相試験(加藤班+HS振興財団藤原班)

- 2009.1 アンケート結果集計
- 2009.2 プロトコル委員会→プロトコル策定
- 2009秋 臨床試験開始(10症例程度): 2010.3までに終了

臨床第II相試験(加藤班+HS振興財団藤原班)

- 2010.4 プロトコル策定

Contributors

東京医科歯科大学・院・発生発達病態学分野
森尾友宏(細胞治療センター)、松本耕一郎

東京医科歯科大学難治疾患研究所・フロンティア研究室ウイルス治療学
清水則夫(細胞治療センター)、水上美樹、渡邊 健

東京医科歯科大学医学部附属病院細胞治療センター
大山 英、基岸志摩子、藤合 央、辻 彩子、星川あき子
梶原道子(輸血部・細胞治療センター)

国立成育医療センター研究所
宮川世志幸、榎阿信敬、藤原成悦

サイメッド
黒岩保幸

リンフォテック
塩部、大隅一典、関根輝彬



高齢者に対する 臍帯血を用いた ミニ移植の試み

虎の門病院血液科
内田直之、谷口修一

患者背景

2005年12月から2008年12月までに虎の門病院で臍帯血ミニ移植を施行した55歳以上、PS 0-2の造血器疾患患者

解析患者総数	: 45
男	33 (73%)
女	12 (27%)

年齢
中央値: 64 (57 - 72)

診断名	
AML/MDS	35 (78%)
ALL	2 (4%)
ML	3 (7%)
CML	2 (4%)
SAA	3 (7%)

疾患リスク	
標準*	11 (24%)
高**	34 (76%)

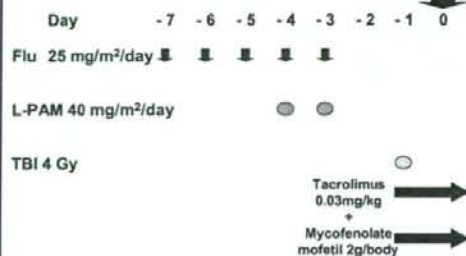
*標準リスク: CR1, CR2, MDS RA, and SAA
**高リスク: 標準リスク以外

患者背景 (55歳以上)

移植前処置	No.	%
Flu / Mel / TBI	26	58
Flu / ivBu / TBI	8	18
Flu / ivBu / Mel	9	20
Flu / Mel	2	4

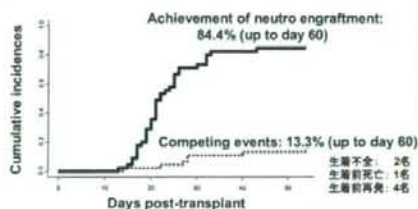
GVHD予防	No.	%
Tacrolimus + MMF	45	100

移植前治療

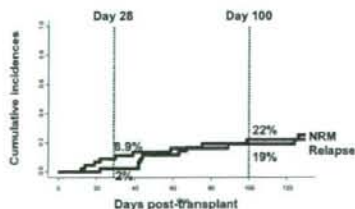


好中球生着達成率(55歳以上45名)

Time to ANC $\geq 0.5 \times 10^9/L$
median: 21 (13-43) days



非再発死亡・再発の累積発生率 (55歳以上45名)

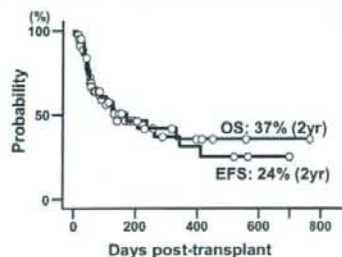


死因 (55歳以上45名)

死因 (Total 23)	No.	≤100	>100
非再発死亡	12 (52%)	9	3
感染症	1 (4%)	1	0
GVHD	3 (13%)	2	1
肺合併症	7 (30%)	6	1
生着不全	1 (4%)	0	1
再発死亡	11 (48%)	6	5

全生存率・無イベント生存率 (55歳以上45名)

Median observation time of survivors: 153 (26-954) 日



まとめ

55歳以上の高齢者に、FK+MMFによるGVHD予防を用いた
臍帯血ミニ移植を行うと

1. HPSなどに起因する生着不全の発生率が低下する。
2. 生着前の感染症死亡が低下する。
3. 生着後のGVHDや肺合併症などの頻度は必ずしも低くない。
4. 非再発死亡の75%が移植後100日以内に発生。
再発は100日前後でほぼ同程度。

拒絶例に対するOne-day regimenを用いた緊急臍帯血移植:臨床試験の提案

NTT西日本金沢病院 内科
金沢大学医学部附属病院 血液内科
山下剛史

金沢大学医学部附属病院 血液内科
山崎宏人、杉盛千春、奥村廣和
高見昭良、近藤恭夫、中尾真二

長野赤十字病院 血液内科
清水郁夫、小林光

背景

- ・移植片拒絶の克服は、造血幹細胞移植における重要課題の一つである。
- ・拒絶例では、多くの場合重症感染症を合併しているため、通常の移植前処置を用いた再移植は困難である。
- ・緩和的移植前処置を用いたとしても、通常は投与に5~7日を要するため、白血球が回復するまでに感染死をきたす可能性が高い。
- ・我々は改良One-day regimenを用いた臍帯血再移植により、拒絶・白血病再発を克服して長期生存している4例を経験した。
- ・その後、拒絶を経験した多くの施設からone-day regimenに関する問い合わせがあった。
- ・臨床試験を立案するため、4症例の特徴と経過を検討した。

One-day regimenを用いた同種造血幹細胞移植

Duke大学Gogginsら、2003年(Blood. 2003;102:476b)

・Flu 30 mg/m²+CY 2 g/m²+TBI 2 Gy+alemtuzumab 20 mgの翌日に、HLA2座以上不一致の血縁ドナーから同種末梢血幹細胞移植を施行。

・5例中3例に生着が得られた。

金沢大学望月ら、2005年臨床血液学会総会

・同胞間末梢血幹細胞移植後に拒絶を来したMDS白血病化症例に対し、Flu 30 mg/m²+CY 2 g/m²+TBI 2 Gy+ATG(リンフォグロブリン) 15 mg/kgの前処置の翌日に別のHLA一致同胞から末梢血幹細胞移植を施行。

・前処置開始時高熱を認めていたにもかかわらず生着し、3年以上寛解を維持している。

超短期レジメンによる臍帯血移植成功例

症例	年齢	原疾患	移植歴	感染症	前回移植からの日数	超短期前処置	NCC	GVHD予防
1	55	FL	CBT	sepsis	28	Flu/CY TBI 2	2.6	FK506
2	66	MDS→AML	CBT	pneumonia (Aspergillus)	-	L-PAM Flu/CY TBI 4	2.9	FK506 + CsA +MMF
3	42	AML(M4)	CBT CBT	sepsis	48	Flu/CY TBI 2	2.1	FK506
4	19	Pre T-ALL	RBMT CBT	sepsis (MRSE)	34	Flu/CY TBI 2	2.2	FK506

超短期レジメンによる臍帯血移植成功例: 移植前処置

症例	CY投与終了から移植までの時間	TBI	GVHD予防
1	26.5	d-1	FK506
2	25.0	d 0	FK506 + CsA+MMF
3	22.0	d-1	FK506
4	18.0	d-1	FK506

超短期レジメンによる臍帯血移植成功例 移植後経過

症例	生着	ドナー型キメラ	最終治療効果
1	d19	d28	Partial Remission
2	d17	d46	Remission
3	d24	d76	Remission
4	d26	d48	Relapse at 5 months

4症例の経験から言えること

- 2回目または3回目の移植の場合、Flu 30 mg/m²+CY 2 g/m²+TBI 2 Gyだけで生着が得られる可能性が高い。
- CY投与終了時点から臍帯血輸注開始までの間隔は、0時間以上であれば生着を妨げない。
- 前処置開始時に重症の局所感染症を合併している場合でも、超短期レジメンであれば安全にCBTを行える可能性がある。
- 白血球細胞量が多い場合、L-PAM 40 mg/m²の追加が有用な可能性がある。
- 非寛解状態での移植であったにもかかわらず、超短期レジメン後のCBTにより長期寛解が得られている例もある事から、CBTには強力なGVL効果があると思われる。

「拒絶例に対するOne-day regimenを用いた緊急臍帯血移植」に関する臨床試験

目的

同種造血幹細胞移植後の拒絶症例に対する、One-day regimenを前処置とした緊急臍帯血移植の安全性と有用性を検討する。

対象・適格基準

- ① 同種造血幹細胞移植後21日目までに好中球の増加が全くみられず(一次性生着不全状態であり)、かつ骨髓のキメリズム解析によってドナー細胞が検出されない(拒絶である)ことが証明されている。
- ② 原疾患は問わない。
- ③ 年齢が65歳以下である。
- ④ HLA(血清型)不一致が2座以下であり、細胞数として 2.0×10^7 /kg以上の臍帯血が利用できる。
- ⑤ 臍帯血が持つHLA抗原に対する抗体が検出されない。
- ⑥ 文書による同意が得られている。

エンドポイントと症例数

1) Primary endpoint

非再発死亡を回避してday 42までに生着が得られる(ドナー由来の好中球数が3ポイント連続して500/ μ Lを超える)率

2) Secondary endpoint

- ① 急性GVHDの発現率、重症度
- ② 慢性GVHDの発現率、重症度
- ③ 全生存率(Overall survival)
- ④ 無増悪生存期間(Progression-free survival)
- ⑤ 有害事象発現率

3) 症例数

第一段階7例、第二段階9例

第一段階終了時点で登録を中断し、成功例が3例以下の場合研究を中止する。

前処置レジメンとGVHD予防

移植前処置と移植

day-1
10時 Flu 30 mg/m² 0.5時間で投与
11時 CY 2 g/m² 3時間で投与
CY終了後 TBI 2 Gy
day 0
12時以降 CBT

GVHD予防

- タクロリムス単剤とする。
- 同剤による有害事象が生じた際にはシクロスポリン・MMFなどに適宜変更する。
- GVHDに対する治療は各参加施設の方針に委ねる。

臨床試験の流れ

同種造血幹細胞移植後 day 21までに好中球増加が全くみられない、骨髓のキメリズム解析でドナー型細胞を検出出来ない、適格基準を満たす。HLA不一致2座以内・NCC $\geq 2.0 \times 10^7$ /kg以上の臍帯血が利用できる。

臨床試験に登録

Flu 30 mg/m²+CY 2 g/m²+TBI 2 Gy on day-1

臍帯血移植

Day 42に生着の有無を判定

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者間造血幹細胞移植の
成績向上に関する研究」班 (H20-免疫一般-014)

平成 20 年度第 2 回班会議のご案内

2009 年 1 月 17 日 (土) 午後 4 時~6 時

会場 東京医科歯科大学歯学部特別講堂

1. 研究班の目的と研究課題 (5 分)

主任研究者 森島泰雄 (愛知県がんセンター中央病院)

座長: 笹月健彦

2. 人種別非血縁移植成績の比較: 第 15 回国際組織適合性ワークショップ 解析 (10 分)
森島泰雄 川瀬孝和 (愛知県がんセンター)
3. HLA-C 型の違いと移植成績との関連: 第 15 回国際組織適合性ワークショップ 解析 (10 分)
川瀬孝和 森島泰雄 松尾恵太郎 (愛知県がんセンター)
4. 高度に保存された HLA ハプロタイプとその急性 GVHD への影響 (10 分)
森島聡子 (愛知県がんセンター) 小川誠司 (東京大学)
5. 全ゲノム関連解析による GVHD 関連遺伝子座の探索 (10 分)
小川誠司 (東京大学)
6. HLA-Cw 不適合非血縁者間骨髄移植を受けた患者より分離した CTL クローンの解析
杉本恭子 村田 誠 (名古屋大学血液内科) (10 分)

特別発言 笹月健彦 (国際医療センター)

座長: 小川誠司

7. Non-HLA genetic associations with GVHD in Japanese HSCT recipients: High density screening of the immunogenome with microsatellite markers (10 min.)
Christian Harkensee, Makoto Onizuka, Akira Oka, Hidetoshi Inoko
Division of Molecular Life Sciences, Tokai University
8. NK 細胞受容体およびサイトカイン遺伝子多型と非血縁造血細胞移植成績 (10 分)
屋部登志雄 柏瀬貢一 (東京都赤十字血液センター)
9. 小腸特異的ケルチン受容体遺伝子 CCR9 の一塩基多型は皮膚急性 GVHD 発症と相関する
稲本賢弘 村田 誠 勝見 章 (名古屋大学血液内科) (10 分)
10. HLA 一致造血幹細胞移植と IL-6、MBL-2 多型の関り (10 分)
佐治博夫 丸屋悦子 (NPO HLA 研究所)
11. 移植免疫反応と遺伝子多型の解析 (10 分)
高見明良 (金沢大学血液内科)

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者間造血幹細胞移植の成績向上に
関する研究」班(H20-免疫一般-014)
平成20年度第2回班会議2009年1月17日(土)

人種別非血縁移植成績の比較 : 第15回国際組織適合性ワークショップ解析

森島泰雄 川瀬幸和(愛知県がんセンター)
JMDP



IHWG Hematopoietic Cell Transplantation Working Group

Purpose

- Comparison of the incidence of acute GVHD between ethnic groups based on the same background
 1. Large scale IHWG HCT database
 2. HLA allele matched transplant.
 3. GVHD prophylaxis : T cell replete stem cell source
- Results obtained from this analysis will become basic data for further international analysis of HLA mismatched unrelated HSCT and for donor exchange of unrelated donor.



IHWG Hematopoietic Cell Transplantation Working Group

Patients and Methods

5555 unrelated transplants
from HLA-A, B, C, DRB1 and DQB1 allele match donor

- HLA-DPB1 match 1367 1 mismatch 1935 2 mismatch 1005
- Disease ALL 1310 AML 1930 AL 11 CML 1438 MDS 866
- Risk of relapse high 1019 intermediate 3236 low 1001
- Non-T cell depleted stem cell : All transplant
- Stem cell source BM 2264 PBSCT 1251
- GVHD prophylaxis
tacrolimus base 1987 cyclosporine base 3173 other regimen 71
- Conditioning regimen myeloablative 4423 non-myeloablative 617

Acute GVHD (2-4 degree, 3-4 degree) Survival*

univariate analyses: chi-square test *Kaplan-Meier Method
multivariate analysis: logistic regression *Cox regression model



IHWG Hematopoietic Cell Transplantation Working Group

Ethnicity

Patient - Donor

Asian/Pacific - Asian/Pacific	2062 pairs
(Japanese - Japanese JMDP)	2039 pairs
Caucasian - Caucasian	2419 pairs
Black - Black	39 pairs
Hispanic - Hispanic	21 pairs
Native American - Native Amer.	2 pairs
Mismatch race pair (non-JMDP)	268 pairs
Unknown donor race	744 pairs



IHWG Hematopoietic Cell Transplantation Working Group

Acute GVHD and ethnicity

Ethnicity (pt-donor)	n	Acute GVHD	
		(2-4) %	(3-4) %
A - A	2062	38.5	15.2
C - C	2419	54.7	22
		p <0.0001	<0.0001
H - H	21	47.6	23.8
B - B	39	48.7	30.8
N - N	2	50	0
Mismatch	268	55.7	22.8
Missing	744	60	19.9

A:Asian/Pacific C:Caucasian H:Hispanic B:Black N:Native America



IHWG Hematopoietic Cell Transplantation Working Group

Acute GVHD and ethnicity

HLA-DPB1 match (GVH vector)

Ethnicity (pt-donor)	n	Acute GVHD	
		(2-4) %	(3-4) %
A - A	753	30.4	12.1
C - C	457	52.8	18.2
		p <0.0001	0.01
H - H	13	53.8	23.7
B - B	3	86.6	33.3
N - N	0		
Mismatch	38	53.8	18.4
Missing	102	53.3	21.1

A:Asian/Pacific C:Caucasian H:Hispanic B:Black N:Native America



IHWG Hematopoietic Cell Transplantation Working Group

Acute GVHD and ethnicity Multivariate analysis

Ethnic group	A-GVHD II-IV		A-GVHD III-IV	
	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
CC vs AA	2.13 (1.83-2.47)	<0.001	1.73 (1.44-2.08)	<0.001
BB vs AA	1.67 (0.82-3.39)	0.154	2.61 (1.33-5.95)	0.007
HH vs AA	1.86 (0.71-4.82)	0.2	2.13 (0.74-6.06)	0.159
MM vs AA	2.21 (1.64-2.97)	<0.001	1.88 (1.34-2.64)	<0.001
NN vs AA	NE		NE	

A: Asian/Pacific C: Caucasian H: Hispanic
MM: Mismatch race (non-JMDP) NN: Native North American



IHWG Hematopoietic Cell Transplantation Working Group

Leukemia Relapse Low and intermediate leukemia

Ethnicity (pt-donor)	n	Relapse Rate (%)
A - A	1122	17.5
C - C	1280	25.5
p=0.0001		
H - H	18	22.2
B - B	29	20.7
Mismatch	187	29.4

A: Asian/Pacific C: Caucasian H: Hispanic B: Black



IHWG Hematopoietic Cell Transplantation Working Group

Overall Survival multivariate analysis

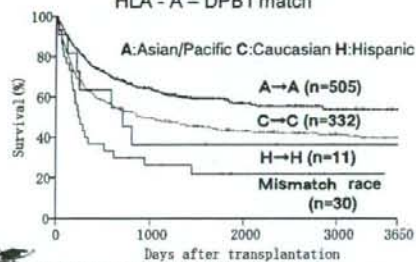
Ethnic group	Overall Survival (Mortality)	
	HR (95% CI)	p
CC vs AA	1.57 (1.43-1.73)	<0.001
BB vs AA	2.68 (1.83-3.93)	<0.001
HH vs AA	2.32 (1.36-3.94)	0.002
MM vs AA	1.75 (1.47-2.08)	<0.001
NN vs AA	1.91 (0.26-13.6)	0.517

A: Asian/Pacific C: Caucasian H: Hispanic
MM: Mismatch race (non-JMDP)
NN: Native North American



IHWG Hematopoietic Cell Transplantation Working Group

Survival Low and intermediate leukemia HLA - A - DPB1 match



IHWG Hematopoietic Cell Transplantation Working Group

Summary

- Ethnicity influences to clinical outcome of UR-HSCT from HLA match donor with non-T cell depleted GVHD prophylaxis.
- 1. Asian/Pacific (=Japanese) showed apparently lower incidence of acute GVHD, leukemia relapse and mortality than Caucasian.
- 2. Asian/Pacific (=Japanese) showed possibly lower incidence of acute GVHD and mortality than Black, Hispanic.



IHWG Hematopoietic Cell Transplantation Working Group

Discussion

Cause of different outcomes by ethnic group
:Asian/Pacific (=JMDP) vs. Caucasian

- Clinical factors : No (adjusted)
- Transplant procedure : No (adjusted)
- Transplant center effect : No
- Biological effect
 - HLA haplotype matching ?
 - specific ethnic HLA haplotype
reduces A-GVHD:JMDP
 - Minor HAs ?
 - ??



IHWG Hematopoietic Cell Transplantation Working Group

HLA-C 型の違いと移植成績との関連
: 第 15 回国際組織適合性ワークショップ解析

川瀬孝和(1) 松尾恵太郎(1) 柏瀬貢一(2) 森島泰雄(3)

1. 愛知県がんセンター研究所 疫学予防部
2. 東京都赤十字血液センター
3. 愛知県がんセンター中央病院 血液・細胞療法部

これまで非血縁者間造血幹細胞移植における、HLA-A,B,C,DR,DQ,DP locus の臨床的重要性が明らかにされ、HLA 一部ミスマッチのドナー選択において有用な情報となっている。また、最近の解析により不適合 HLA 型の組み合わせと重度急性 GVHD 発症に関する臨床的意義が明らかとなり(Blood. 2007;110(7):2235-41)、ドナー選択の新たな基準となるものと期待されている。さらに、不適合 HLA 型の組み合わせと GVL の関係についても、本研究班の解析により明らかになり(Blood in press)、さらなる移植成績の向上が期待される。現在このように日本から発信されたエヴィデンスである『不適合 HLA 型の組み合わせとアロ免疫反応の関係』が海外でも注目されており、日本人以外の人種に関しては CIBMTR を中心に Validation Study が進んでいる。しかし、真に人種差を超えて高いアロ反応性を示す不適合 HLA 型の組み合わせを求めらるれば、同時に同様の解析手法を用いて多人種に関する解析を行い、比較検討する事が望ましい。今回我々は、第 15 回国際組織適合性ワークショップのワーキンググループの一員として、HLA-C に関して、このような多人種にわたる解析を行う機会をえた。まだプレリミナリーではあるが、解析結果に関して報告する。

高度に保存された HLA ハプロタイプとその急性 GVHD への影響

森島聡子(1), 小川誠司(2), 川瀬孝和(1), 松原亜以子(2) 南谷泰仁(2), 柏瀬貢一(3), 佐治博夫(4), 猪子英俊(5), 加藤俊一(5), 小寺良尚(6), 笹月健彦(7), 森島泰雄(1)
日本骨髄バンク

(1)愛知県がんセンター (2)東京大学 (3)東京都赤十字血液センター
(4)NPO HLA 研究所 (5)東海大学 (6)愛知医科大学 (7)国際医療センター

【背景】

非血縁者間骨髄移植(UR-BMT)において、ドナーと患者の HLA locus のマッチングと移植成績については数多くの報告があり、JMDP の解析においてもその臨床的な重要性が明らかにされてきている。しかし、造血幹細胞移植における HLA ハプロタイプ (HP) の臨床的な意義については、これまでほとんど解明されていない。

また、日本人に高頻度の HLA HP (common HLA HP)は、HLA allele の遺伝子型の combination として家系調査 (*MHC* 2001: 8: 1-32) や非血縁者の解析 (*Immunogenetics* 1997: 46:199-205, *Tissue Antigens* 2000: 56: 522-9) で明らかにされている。しかし、これらの HP が HLA allele 以外の領域も含めてどの程度保存されているかは、まだ解明されていない。

【目的】

JMDP の大規模なデータを用いて、日本人の common HLA HP の保存性を検討し、さらに UR-BMT における HLA-HP の臨床的な意義を明らかにする。

【方法】

JMDP を介して UR-BMT が施行された 6188 ペア (12376 人)の HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 の遺伝子型を同定した。その中で 1810 ペア (3620 人)の HLA 領域の 1310 SNPs を Affymetrix GeneChip mapping 500K array で同定した。Homozygous な common HLA HP を持つ個人(HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 が全て homozygous allele) を抽出し、HP の均一性を SNPs データを用いて検討した後に、SNPs の consensus sequence を決定した。さらに、HLA allele 型から同定した heterozygous な HP の個人が SNP の consensus sequence を認めるか検討した。HLA 型が全て一致した 712 例 (HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1) において、HLA HP と Grade 2-4 急性 GVHD 発症の関係を cumulative incidence 法と Cox regression model で解析した。

【結果】

(1) 日本人の common HLA haplotype の保存性の検討

・ 12376 人の中で homozygous HP-P1 (HLA-A*2402 -Cw*1202 -B*5201 -DRB1*1502

-DQB1*0601 -DPB1*0901)は 108 人、homozygous HP-P2 (HLA-A*3303 -Cw*1403 -B*4403 -DRB1*1302 -DQB1*0604 -DPB1*0401) は 24 人、homozygous HP-P3 (HLA -A*2402 -Cw*0702 -B*0702 -DRB1*0101 -DQB1*0501 -DPB1*0402)は 15 人認められた。

- SNPs 解析が可能であった homozygous HP-P1 の 72 人中の 65 人及び、homozygous HP-P3 の 8 人中 4 人は HLA-A から HLA-DPB2 の 3.2Mb の範囲で 99%以上が一致した連続性の homozygous SNP allele を認めた。Homozygous HP-P2 の 10 人全てで解析した少なくとも 4.9Mb の範囲で 99%以上が一致した連続性の homozygous SNP allele を認めた。これらのデータより、SNPs の consensus sequence を決定することができた。
- Common HLA HP と同じ HLA allele を持つ個人 (heterozygous HP)の検討では、HP-P1 の 1053 人中 1000 人 (95.0%)、HP-P2 では 387 人中 380 人 (98.2%)、HP-P3 では 437 人中 381 人 (87.2%)が HLA-A から HLA-DPB2 の 3.2Mb の範囲で consensus sequence を認めた。さらに、HP-P2 では 80%で 4.9Mb の範囲にわたって consensus sequence を認めた。
- これらの結果より HLA アリルの combination で common HLA-HP を同定した場合、HLA allele 以外の領域も含めて一致している可能性が高いと考えられた。

(2) HLA haplotype と急性 GVHD の発症の解析

- 特定の HP が GVHD 発症頻度に及ぼす影響を解析するため、各々の HP を持つ群と持たない群に分けて、grade2-4 の急性 GVHD 発症リスクを検討した。HLA 型が全て一致したドナーから移植を受けた 712 例のうち、HP-P1 は 331 例に認め、P1(-) 群と比較して差はなかった (HR=1.06, p=0.665)。HP-P2 (n=111)は P2(-)と比較して優位に発症リスクが低かった (HR=0.63, p=0.032)。一方、HP-P3 (n=104) は P3 (-)と比較して発症リスクが高い傾向が認められた (HR=1.38, p=0.07)。
- HP-P1(+)の患者を多数認めたため、これらの患者においても一方の HP の影響を検討した。Homozygous HP-P1 (n=36)の急性 GVHD 発症頻度は 16.2%、HP-P1/P2 (n=25)では 12.0%であり、HP-P1/P3 (n=19, 49.9%)や HP-P1/other (n=251, 34.2%)と比べて有意に低かった (p=0.0052)。多変量解析でも同様に、homozygous HP-P1 と比較して HP-P1/P2 (HR=0.71, p=0.64)は発症リスクに差は認めなかったが、P1/P3 (HR=3.35, p=0.024)及び P1/other (HR=2.49, p=0.036)は有意に発症リスクが高かった。

【まとめ】

- (1) 大規模な JMDP の HLA データ及び SNPs データを用いることにより、日本人の common HLA haplotype が高度に保存されていることが示された。
- (2) HP-P2 では GVHD 発症のリスクを減少し、一方 HP-P3 では増加する傾向が認められたことより、HLA ハプロタイプ自身すなわち genetic background の違いが GVHD 発症と関連すると考えられた。
- (3) 特定の HLA ハプロタイプが GVHD のリスクを減少あるいは増加させるメカニズムについて今後検討していく必要がある。

全ゲノム関連解析による GVHD 関連遺伝子座の探索

小川誠司(東京大学, 日本科学技術振興機構)、柏瀬貢一(東京都赤十字血液センター)、鬼塚真(東海大学)、川瀬孝和(愛知県がんセンター)、赤塚美樹、佐治博夫(日本 HLA 研究所)、森島泰雄(愛知県がんセンター)、小寺良尚(愛知医科大学)、笹月健彦(国立国際医療センター)、日本骨髄バンク

腫瘍細胞に対するアロ免疫反応は、造血幹細胞移植の主要な治療効果を担うメカニズムであるが、同様の反応は患者のレシピエントの健常組織に対しても惹起され、GVHD として知られる重篤な合併症を引き起こす。GVHD の誘導にはドナーとレシピエントの遺伝学的背景の相違が本質的であるが、HLA 適合移植の場合、このアロ免疫反応は、ドナー T 細胞が HLA 分子を介してレシピエントの細胞上に提示される不適合抗原(マイナー組織適合性抗原, mHAg)を認識することにより誘導され、ドナーないしレシピエントの遺伝的背景や前処置・GVHD 予防などの環境因子により修飾される。本研究では、日本骨髄バンクを通じて行われた非血縁骨髄移植のうち、HLA A, B, C, DR, DQ 座が DNA レベルで肝前適合し、かつ GVHD 予防としてメトトレキセートおよびシクロスポリンないしタクロリムスが用いられた 1598 移植のドナーおよびレシピエントの DNA 試料について、Affymetrix GeneChip を用いて 50 万 locus の SNP タイピングを行い、全ゲノム関連解析により、GVHD の発症に関わるアロ抗原その他の遺伝的多型の探索を行った。HLA DP 座については 1033 移植(63%)で GVHD 方向の不適合を認めており、654 例(41.7%)に II 度以上の、また、254 例(14.9%)に III 度以上の急性 GVHD の発症が認められた。

直接タイピングを行った 50 万 SNP に加え、HapMap PhaseII データに基づいて未観測の SNP を推定したのち、95%以上の call rate を有し、Hardy-Weinberg 平衡を満たす SNP のうち、5%以上のアレル頻度を有する SNP、1,276,699 SNP について、GVHD との関連を各 SNP 座について LogRank 統計量を算出することにより、検定した。極端な多重解析が不可避なため、random permutation (N=1000)を行うことにより、経験的な genome-wide $p=0.05$ を与える統計量を算出して閾値を決定し、有意な SNP を抽出した。また、関連解析は、ドナーおよびレシピエントの SNP に加え、両者の SNP で定義される遺伝型不適合についても検討を行った。

遺伝型不適合の解析では、全ゲノムで唯一の有意なピークとして DPB1 遺伝子座

に一致する rs6937034 が同定され ($P=1.81 \times 10^{-9}$)、DPB1 不適合と急性 GVHD の既知の関連 ($HR=1.91$, $P=2.88 \times 10^{-13}$) を捕らえることができたことから、本方法論の有効性が確認された。そこで、マイナー組織適合性抗原の HLA 拘束を考慮して腫瘍な HLA サブタイプについて同様の関連解析を行ったところ、A*2402/B*5201/C*1201/DRB1*1501/DQB1*0601 アレルに拘束される rs17473423(12 番染色体)の不適合と III 度以上の GVHD の関連 ($P=3.99 \times 10^{-13}$)、および A*3303/B*4403/C*1403 アレルに拘束される rs9657655(9 番染色体)の不適合と III 度以上の GVHD の関連 ($P=8.56 \times 10^{-10}$) を含む 6 遺伝子座と急性 GVHD との関連が抽出された。同様に慢性 GVHD および再発のリスクと関連する遺伝子座も同定された。これらの SNP については、独立な症例セットを用いた検証研究が必要であるが、今回の結果は、全ゲノム関連解析により、造血幹細胞移植の成績に影響する遺伝的多型を同定できる可能性を示唆するものと考えられる。

平成 21 年 1 月 17 日

「HLA-Cw 不適合非血縁者間骨髄移植を受けた患者より分離した CTL クローンの解析」
名古屋大学血液内科 杉本恭子 村田 誠

HLA-A, B, DRB1 遺伝子型適合ドナーからの非血縁者間骨髄移植における HLA-Cw 不適合は、重症急性 GVHD の発症危険度を上昇させる。急性 GVHD は、主としてドナー T リンパ球によって誘導されるが、しかし HLA-Cw 抗原は一般に細胞表面上の発現レベルが低く、従ってその抗原性は低いと考えられている。事実、HLA-Cw 不適合移植を受けかつ実際に急性 GVHD を発症した患者体内において、不適合 Cw に対する T リンパ球免疫応答が誘導されているかどうかについて詳細な解析はまだなされていない。最近、日本骨髄バンクを介した非血縁者間骨髄移植を対象とした統計学的解析により、特定の HLA 不適合の組み合わせが重症急性 GVHD の発症危険率と相関すること、さらに特定の部位のアミノ酸相違が重症急性 GVHD の発症危険率と相関することが報告された (Kawase et al. Blood 2007)。具体的には、HLA-A の 9 番、116 番のアミノ酸相違、および HLA-Cw の 9 番、77 番、80 番、90 番、116 番、156 番のアミノ酸相違が有意な部位として抽出されており、特に HLA-Cw から多くのアミノ酸部位が抽出されたことは興味深い。

今回我々は、上記報告で急性 GVHD の発症危険度が高いと分類された HLA-Cw 不適合 (患者 Cw*0303、ドナー Cw*0801) の非血縁者間骨髄移植を受け、実際に grade II の急性 GVHD を発症した白血病患者の末梢血中 T 細胞の *in vitro* 解析を行い、この不適合 Cw 分子に対する T 細胞応答の存在を確認し得たので報告する。

Non-HLA genetic associations with GVHD in Japanese HSCT recipients: High density screening of the immunogenome with microsatellite markers)

Christian Harkensee, Makoto Onizuka, Akira Oka, Hidetoshi Inoko

Division of Molecular Life Sciences, Tokai University, Isehara, Kanagawa

Background

The genetics of outcomes of haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) extend far beyond HLA matching or mismatching. Studies in various settings and from various populations have implicated more than 150 genetic polymorphisms in non-HLA genes with outcomes after HSCT, namely graft-versus-host disease (GVHD). GVHD is the strongest determinant of morbidity and mortality in survivors of HSCT, hence identification of genetic variation that pose a risk, or protect against GVHD would potentially be useful to stratify recipient GVHD risk at a pre-transplant stage. Previous studies investigating non-HLA polymorphisms in HSCT outcomes often have methodological limitations: focus on a narrow set of candidate markers, highly heterogenous populations (genetically and clinically), limited statistical power due to small sample size, and lack of independent confirmation. As a result data are lacking consistency between populations and settings. Therefore, more systematic explorations using statistically more robust methodologies are required to evaluate to a full extend the significance of non-HLA polymorphisms for HSCT outcomes.

Aims and Objectives

This study investigates the effect of non-HLA genetic polymorphisms on GVHD in a Japanese HSCT population by systematically scanning the immunogenome. We are applying the methodology of a multi-step genomic screening using high-density microsatellite markers in pooled DNA. This methodology has been derived from case-control whole genome association (WGA) studies, and is employed here for the first time in a transplantation setting.

Methods

Study population: We aim to include approximately 1100 HSCT recipient and donor pairs into this study. Systematic statistical exploration of a larger dataset was used to identify a cohort in which variation from known clinical and genetic risk factors was minimised. Inclusion criteria are a diagnosis of ALL or ANLL, age between 4-40 years, myeloablative conditioning, and a CSA/MTX or Tacrolimus/MTX-based GVHD prophylaxis.

Genes and markers: An extensive literature search identified a set of n=2956 genes of key immunoregulatory function and relevance in an HSCT context. N=4108 microsatellite markers were selected to cover these genetic regions in high density.

Study design and procedures: This is a case-control study with a nested cohort study: modifying a design previously used in WGA studies with microsatellites. DNA is pooled by degree of GVHD (Grade 0-I v Grade II-IV) using a highly accurate pooling method. Three independent screening steps are applied to verify the results, using n=460 (pooled DNA 1st screening), n=300 (pooled DNA 2nd screening) and a further n=300 donor-recipient pairs (individual genotyping). The first screening step tests the entire marker set, involving the largest cohort for maximised power and sensitivity. Only markers positively associated in 1st screening are transferred to subsequent screening steps, applying rigorous statistical tests, thus minimising association by chance and multiple testing error. The remaining positive markers after 3rd screening each indicate a candidate gene region of approximately 100kB in

size, which will be investigated further by SNP typing on the combined cohort of all three screening steps.

Data analysis: Allele frequency number in pools is derived from the peak height of the fluorescent signal from the genotyping process. After each screening step, data are analysed in four directions: Comparing recipients with grade 0-I and recipients with grade II-IV GVHD ('intrinsic recipient risk for severe GVHD'), donors accordingly ('intrinsic donor risk to induce recipient GVHD'), donors grade 0-I with recipients grade 0-I GVHD, and donors grade II-IV with recipients grade II-IV GVHD. The latter two analyses are combined to identify specific markers that indicate protection (grade 0-I GVHD analysis) or risk (grade 2-4 GVHD) by allele frequency mismatch. While with the first screening step only simple statistical methods (Hardy-Weinberg, Chi square, Fishers exact test for 2x2, 2xm) are applied to achieve high sensitivity, more stringent tests are applied in subsequent screening steps (including Bonferroni correction for multiple testing).

Results

The 1st screening step has been completed, yielding preliminary results which are consistent with both a set of SNP markers used for internal validation, as well as with findings from previous studies on genetic polymorphisms and gene expression in the context of GVHD.