

200934026A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森島泰雄

平成22年（2010）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
研究代表者 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	
研究分担者 森島 泰雄	13
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	
研究分担者 猪子 英俊	20
分担研究課題：GvHD発症とHLAアレルミスマッチ方向性	
研究分担者 笹月 健彦	23
分担研究課題：ゲノムワイド関連解析によるGVHDの遺伝子座の探索	
研究分担者 小川 誠司	27
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	
研究分担者 村田 誠	30
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	
研究分担者 屋部登志雄	32
分担研究課題：移植免疫反応と遺伝子多型の解析	
研究分担者 高見 昭良	35
III. 研究班会議報告	38
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	63
V. 研究成果の刊行物・別冊	64

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

研究代表者 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：日本骨髄バンクを介した患者とドナー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、平成21年度には1)非血縁者間造血幹細胞移植における急性GVHD発症率、白血病再発率、移植後生存率の人種による違いをHLA適合度とHLA遺伝子型に基づく人種特異的HLAハプロタイプを解析することにより明らかにした。日本人間の非血縁移植の急性GVHDの頻度、白血病再発率、移植後の死亡率はCaucasian間の移植に比べ有意に低かった。2)HLA領域のmulti-SNPs解析に基づき日本人に高頻度に認められるHLA-A、-C、-B、-DRB1、-DQB1、-DPB1ハプロタイプが高度に保存されており、保存の範囲はHLA-A遺伝子のテロメア側に広く広がっていることを明らかにした。3)HLA不適合非血縁者間骨髄移植において、許容できる不適合HLA型の組み合わせを検討した。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免疫遺伝学的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
高見 昭良・金沢大学病院輸血部 准教授

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18年間に約12000例、日本さい帯血ネットワークからの移植が約6000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班における JMDP 症例を用いた解析で次第に明らかになってきた。

本研究は、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する。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）を構築することを目的とする。

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保存

同意が得られた非血縁者間骨髄移植実施患者とドナーの血液検体を細胞、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

JMDP 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作成し、Cox hazard model 等を用いた多変量解析法に

より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。

前年度までの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」に加えて、「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。

3. HLA ハプロタイプの均一性の検討

HLA 領域の multi-SNPs データを用いて解析する。

4. 国際ワークショップにおける検討

本研究で得られる知見が、日本人間だけで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。

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検討

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の解析
- 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
- 4) Whole genome SNPs 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

H21 年度は患者とドナーの血液検体（約 600 ペア、1200 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 2000 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. 許容される HLA 型の組み合わせ

(資料 1)

許容されない HLA 型の組み合わせ群を対照として、有意に重症 GVHD の頻度が低くなる組み合わせを予備的に「許容される組み合わせ」として 12 組を明らかにした。

3. 日本人に特有な HLA ハプロタイプとその高度な保存性の解析 (資料 2)

高頻度な HLA-A~DPB1 ハプロタイプ HP-P1, HP-P2, HP-P3 では HLA-A 座から HLA-DPB1 座までの 3.3 Mb が高度に保存されているだけでなく、HLA-A 座のテロメア側に広範囲に保存されていた。さらに、HP-1 では HLA-A のテロメア側で subtype A と B に分かれることが判明した。

4. 非血縁者間造血幹細胞移植における急性 GVHD 発症率、白血病再発率、移植後生存率の人種による違いの解析 (分担研究報告書参照)

HLA-A から DQB1 まで適合した T 細胞除去法を用いない GVHD 予防法をにより非血縁者間移植を実施した 5543 症例を用いて多変量解析することにより、日本人間の移植の急性 GVHD の頻度、白血病の再発率、移植後の死亡率はいずれも白人間の移植に比べて有意に低いことが明らかになった。人種特異的に頻度の高い HLA ハプロタイプを有する日本人と白人の移植の比較でも、日本人間の移植は白人間に比し有意に急性 GVHD の頻度が低かった。

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)

1) 日本人の同種造血幹細胞移植において、T リンパ球の活性化を抑制する分子 cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (*CTLA-4*) の多型が移植成績に影響を与えるか否か、その遺伝子ハプロタイプに着目して検討した。*CTLA-4* 遺伝子の 3 塩基 (-318, +49, CT60) が C-A-A となるハプロタイプを有するドナーから移植を受けた場合は、そうでないドナーから移植を受けた場合と比べ、再発率が低く、GVHD 発症率は変わらず、生存率が高いことが確認された。

2) *IL-17* 遺伝子多型 (rs2275913, G197A) 解析を行い、197A 陽性 vs. 197A 陰性で比較検討した。骨髄破壊的移植 (360 ペア) 群では、患者側の 197A 陽性は、急性 GVHD の有意な危険因子であった (ハザード比 1.33・95%信頼区間 1.00-1.76・ $P=0.05$)。骨髄非破壊的移植 (150 ペア) 群を対象にこれを検証したところ、患者 197 陽性が急性 GVHD の危険因子であることが裏付けられた (ハザード比 2.36・95%信頼区間 1.23-4.51・ $P=0.01$)。

3) KIR リガンド不適合移植ドナーおよび HLA6 座 12 抗原一致症例ペアの約 800 検体のタイピングを行った。LILR 受容体のうち抑制型 *LILRB2* の遺伝子多型と移植成績との関連解析を行い、急性 GVHD 重症化との関連を見出した。抑制性サイトカイン *IL-10* 遺伝子多型と移植成績の関連解析は昨年までに判明した患者遺伝子プロモーター 3 箇所の SNP ハプロタイプに加えて新たに上流側の SNP も急性 GVHD 重症化と関連することを明らかにした。さらに近接する *IL-19* 遺伝子 SNP が急性 GVHD 重症化および無病生存率と関連する結果を得た。

4) HLA 5 座適合 1600 移植に関する全ゲノム関連解析を実施し、GVHD 関連遺伝子座の探索

を行い、昨年度までに新規マイナー組織適合性抗原遺伝子座に関わると考えられる 20 個の GVHD 関連候補遺伝子座を同定したが、本年度は、これらの候補遺伝子座について独立な移植症例セットを用いた関連の検証研究を行った。検証解析の結果、5 番染色体の SNP 座の不適合と GVHD との関連は再度確認された。

6. HLA 不適合非血縁移植における GVHD 発症機構の解明 (分担研究報告書参照)

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て、B6 マウスを遺伝背景として、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発現量の異なる 3 系統の H2-Kb トランスジェニックマウスを樹立した。さらにホモ接合 H2-Kb トランスジェニックマウスを作成して、同一 HLA 複合体の発現量が異なる個体間での骨髄移植による GVHD 発症モデルとしての検証を試みた。

D. 考察

わが国の HLA 解析研究は世界の非血縁移植の HLA 研究を常にリードし、その解析結果は JMDP における HLA 検査法とドナー選択への適格で迅速な導入がなされてきた。計画的かつ継続的な保存事業による多数検体の保存と組織適合性研究者による最新の組織適合性研究手法の導入によりはじめて可能になるものである。本研究で得られる新しい精緻な組織適合性検索とドナー選定への応用により、今後いっそう移植成績の向上と両バンクの効率的な運

用に寄与するものと考えられる。また、人の GVHD 発症機構を明らかにする上で、基礎的にも重要な知見を提供している。

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) Morishima S, Ogawa S, Matsubara A, Kawase T, Nannya Y, Kashiwase K, Satake M, Saji H, Inoko H, Kato S, Kodera Y, Sasazuki T, Morishima Y. Impact of highly conserved HLA haplotype on acute graft-versus-host disease. Blood 2010 Mar 24 [Epub ahead of print]

2) Muramatsu H, Kojima S, Morishima Y, et al. Outcome of 125 children with CML who received transplants from unrelated donors: the Japan Marrow Donor Program (JMDP). Biol Blood Marrow Transplant. 2009 Sep 29. [Epub ahead of print]

- 3) Kamei M, Nannya Y, Torikai H, Kawase T, Taura K, Inamoto Y, Takahashi T, Yazaki M, Morishima S, Tsujimura K, Miyamura K, Ito T, Togari H, Riddell SR, Kodera Y, Morishima Y, Kuzushima K, Ogawa S, Akatsuka Y. HapMap scanning of novel human minor histocompatibility antigens. *Blood*. 113:5041-5048, 2009.
- 4) Takami A, Espinoza JL, Onizuka M, Ishiyama K, Kawase T, Kanda Y: A single nucleotide polymorphism of the Fcγ receptor type IIIA gene in the recipient predicts transplant outcomes after HLA-fully-matched unrelated bone marrow transplantation for myeloid malignancies, *Bone Marrow Transplant* 2010 (in press)
- 5) Espinoza JL, Takami A, Onizuka M, Sao H, Akiyama H, Miyamura K, Okamoto S, Inoue M, Kanda Y, Ohtake S, Fukuda T, Morishima Y, Kodera Y, Nakao S, for the Japan Marrow Donor Program: NKG2D gene polymorphism has a significant impact on transplant outcomes after HLA-fully-matched unrelated bone marrow transplantation for standard risk hematologic malignancies. *Haematologica* 2009, 94:1427-1434
- 6) Haraguchi K, Suzuki T, Koyama N, Kumano K, Nakahara F, Matsumoto A, Yokoyama Y, Sakata-Yanagimoto M, Masuda S, Takahashi T, Kamijo A, Takahashi K, Takanashi M, Okuyama Y, Yasutomo K, Sakano S, Yagita H, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S. Notch activation induces the generation of functional NK cells from human cord blood CD34-positive cells devoid of IL-15. *J Immunol*. 182:6168-6178, 2009.
- 7) 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 the molecular mechanism. *Blood*. 113:2851-2858, 2009.
- 8) Sasawatari S, Yoshizaki M, Taya C, Tazawa A, Furuyama-Tanaka K, Yonekawa H, Dohi T, Makrigiannis AP, Sasazuki T, Inaba K, Toyaoma-Sorimachi N. The Ly49Q receptor plays a crucial role in neutrophil polarization AND migration by regulating raft traffickin. *Immunity*, 32: 200-213, 2010
- 9) Keicho N, Itoyama S, Kashiwase K, Phi NC, Long HT, Ha LD, Ban VV, Hoa BK, Hang NT, Hijikata M, Sakurada S, Satake M, Tokunaga K, Sasazuki T, Quy T. Association of human leukocyte antigen class II alleles with severe acute respiratory syndrome in the Vietnamese population. *Hum Immunol.*, 70: 527-531, 2009
- 10) Sugimoto K, Murata M, et al. Cytotoxic T lymphocyte clones isolated from an HLA-Cw-mismatched bone marrow transplant recipient with acute graft-versus-host disease. *J Immunol*, 183(9): 5991-5998 (2009).
- 11) Inamoto Y, Murata M, et al. Donor

single nucleotide polymorphism in the CCR9 gene affects the incidence of skin GVHD. Bone Marrow Transplant, 45(2): 363-369 (2010).

2. 学会発表

1) Yasuo Morishima, Takakazu Kawase, Satoko Morishima, Mari Malkki, Steve Spellman, Andrea Velardi, Effie W. Petersdorf. Impact of Donor-Recipient Ethnicity on Risk of Acute Graft-Versus-Host Disease, Leukemia Relapse and Survival in Hematopoietic Stem Cell Transplantation from HLA-Compatible Unrelated Donors. A Report from the International Histocompatibility Workshop Group. 51st Annual Meeting of American Society of Hematology. Dec. 2009. New Orleans USA.

2) Yoshiyuki Takahashi IB, Yoshiki Akatsuka, Hideki Muramatsu, Nobuhiro Nishio, Asahito Hama, Hiroshi Yagasaki, Hiroh Saji, Motohiro Kato, Seishi Ogawa, and Seiji Kojima. Relapse of Leukemia with Loss of Mismatched HLA Due to Uniparental disomy Following Haploidentical Hematopoietic Transplantation. The 51st annual meeting of American Society of Hematology Dec. 2009. New Orleans USA.

3) Takami A. Significant Impact of IL-17A Gene Polymorphism On Transplant Outcomes After HLA-Fully-Matched Unrelated Bone Marrow Transplantation. The 51th annual meeting of the American Society of Hematology, in New Orleans,

Louisiana. December 2009 USA.

4) Takami A. A single nucleotide polymorphism of the Fcγ receptor type IIIA gene in the recipient predicts transplant outcomes after HLA-fully-matched unrelated bone marrow transplantation for myeloid malignancies. Annual Meeting of EBMT. Vienna, Austria. March 2010.

5) Murase M, Murata M, et al. Effect of Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) polymorphism on allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. 2010 BMT Tandem Meetings, in Orlando, Florida. USA February 2010.

6) 森島聡子, 小川誠司. HLA Revisited HLA ハプロタイプと急性 GVHD. 第 18 回日本組織適合性学会総会. 2009 年 9 月 名古屋

7) 小川誠司, 松原亜以子, 鬼塚真, 柏瀬貢一, 真田昌, 加藤元博, 南谷泰仁, 赤塚美樹, 佐竹正博, 千葉滋, 佐治博夫, 丸屋悦子, 猪子英俊, 森島泰雄, 小寺良尚, 笹月健彦. 造血幹細胞移植と組織適合性抗原 ゲノムワイド関連解析による GVHD 関連多型の探索. 第 18 回日本組織適合性学会大会. 2009 年 9 月 名古屋

8) 屋部登志雄, 平安恒幸, 峯元睦子, 柏瀬貢一. 非血縁者間造血幹細胞移植における NK 細胞受容体解析. 第 18 回日本組織適合性学会大会 2009 年 9 月、名古屋

9) 屋部登志雄 KIR 遺伝子多型解析と移植成績. 第 18 回日本組織適合性学会大会 2009 年 9 月、名古屋

10) 平安恒幸, 柏瀬貢一, 峯元睦子, 鬼塚真仁, 小川篤子, 高梨美乃子, 猪子英

俊、佐治博夫、小川誠司、笹月健彦、徳永勝士、森島泰雄、佐竹正博、中島一格、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多型と非血縁者間骨髄移植成績との関連。第 18 回日本組織適合性学会大会 2009 年 9 月、名古屋

11) Fujii N, Akatsuka Y, Ogawa S, Riddell SR, EH W. Identification of navel minor H antigens targeted by CTL in Phase 1 adoptive immunotherapy. 第 71 回日本血液学会総会. 2009. 10 月 京都

12) 高見昭良 : IL-17A 遺伝子多型は HLA 一致非血縁者間骨髄移植成績に影響する 第 71 回日本血液学会 2009 年 10 月京都

資料 1

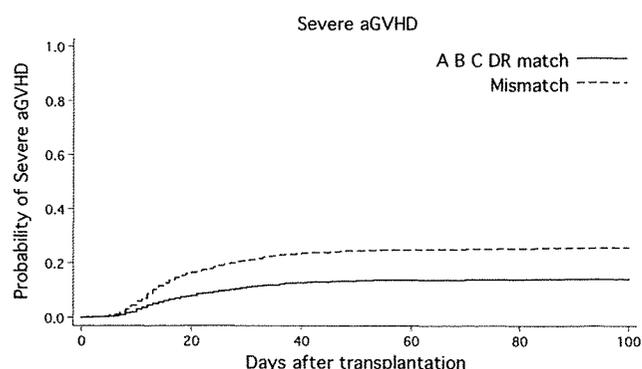
非血縁者間骨髄移植における許容可能な遺伝子型 HLA 型不適合組合せの検討

近年日本骨髄バンクを介した非血縁者間骨髄移植 (UR-BMT) の解析により、HLA 遺伝子型不適合組合せと急性 GVHD のリスク及び予後の関連を報告した (1)。この報告で重症急性 GVHD 発症リスクを有意に上昇させる 16 の HLA 不適合組合せ (高リスク不適合組合せ) が明らかとなった (1)。さらに、これらの不適合を幾つ有するかは重症急性 GVHD の発症・移植後に相関し、HLA 一部不一致ドナー選択の際の重要な情報となっている。この解析では高リスク不適合組合せ以外の不適合組合せの中に統計解析上の制限により、許容不可能組合せが残存する可能性を残していた。ここでは、許容可能な不適合組合せを検討することを目的に解析を行った。JMDP を介した UR-BMT 5210 例を多変量解析の手法を用い、重症急性 GVHD 高リスク不適合組合せ群を基準とし、HLA 一致群および各不適合組合せの重症急性 GVHD 発症リスク (Hazard ratio (HR)) および 95% 信頼区間 (95% CI) を算出した。さらに、重症急性 GVHD 高リスク群に比し、有意に重症急性 GVHD の発症リスクが低かった不適合組合せを許容可能な不適合組合せ候補と定義し、この組合せの全生存に関して同様の解析を施行し検討を行った。

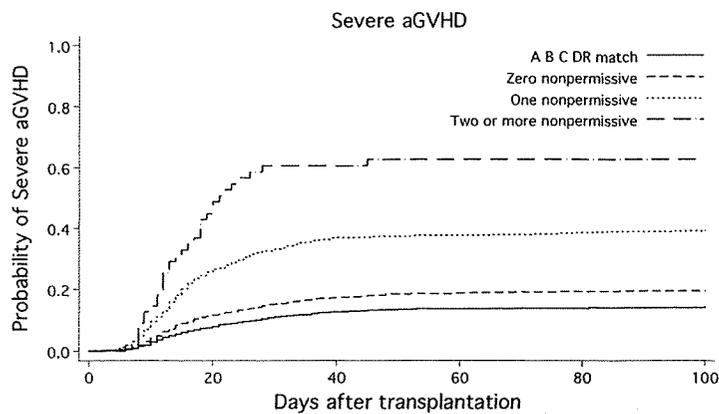
(表 1) HLA-A、B、C、DR ローカスにおける許容可能な遺伝子型 HLA 型不適合組合せ候補 (網かけは全生存でも有意であった組合せ)

不適合組合せ	重症急性GVHD			全生存	
	n	HR(multi) (95%CI)	P	HR(multi) (95%CI)	P
重症急性GVHD 高リスク不適合群		Ref.		Ref.	
12/12 match	712	0.38 (0.28-0.52)	<0.001	0.60 (0.51-0.69)	<0.001
A0201_0206	138	0.66 (0.46-0.94)	0.023	0.96 (0.75-1.22)	0.769
A2402_2420	60	0.32 (0.16-0.66)	0.002	0.56 (0.38-0.84)	0.005
A2601_2602	24	0.36 (0.14-0.89)	0.028	0.94 (0.53-1.68)	0.857
C0303_0102	38	0.41 (0.18-0.94)	0.035	0.63 (0.37-1.08)	0.096
C0303_0304	83	0.42 (0.25-0.73)	0.002	0.63 (0.44-0.90)	0.013
C0304_0303	62	0.31 (0.15-0.64)	0.001	0.55 (0.35-0.87)	0.010
C0303_0801	76	0.44 (0.25-0.75)	0.003	0.87 (0.64-1.20)	0.413
DR0405_0406	47	0.36 (0.17-0.78)	0.010	0.72 (0.46-1.13)	0.165
DR0405_0410	56	0.33 (0.16-0.68)	0.003	0.66 (0.44-0.98)	0.040
DR0802_0803	64	0.54 (0.32-0.93)	0.027	0.87 (0.62-1.24)	0.469
DR0803_0802	53	0.49 (0.25-0.94)	0.032	0.87 (0.58-1.31)	0.522
DR1502_1501	36	0.32 (0.12-0.89)	0.029	0.67 (0.40-1.10)	0.118

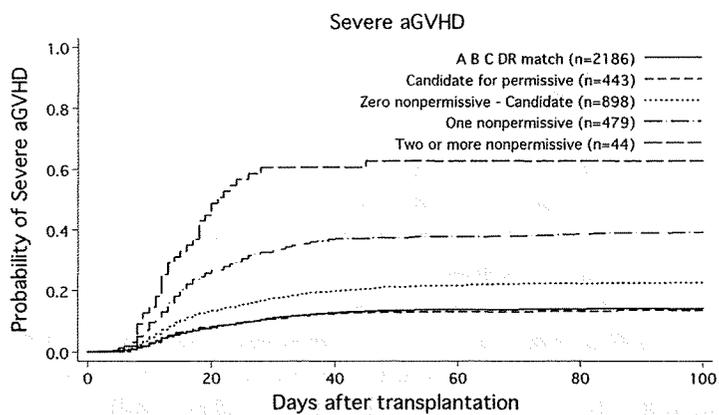
(図 1) HLA-A、B、C、DR アリル不適合における重症急性 GVHD 発症率



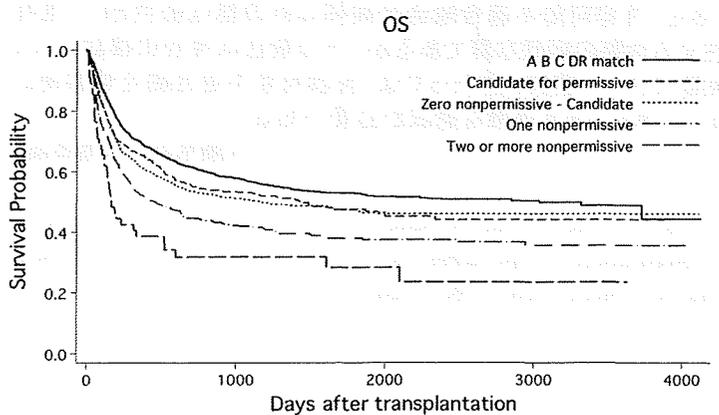
(図2) 許容不可能な HLA 遺伝子型不適合における重症急性 GVHD 発症率



(図3) 許容可能な HLA 遺伝子型不適合候補・許容不可能な HLA 遺伝子型不適合における重症急性 GVHD 発症率



(図4) 許容可能な HLA 遺伝子型不適合候補・許容不可能な HLA 遺伝子型不適合における全生存



(表2)

従来のHLA座の 適合・不適合	重症急性GVHD 高リスク不適合	重症急性GVHD 高リスク不適合 +許容可能組み合わせ候補	N	%
HLA-A B C DRB1 適合	HLA-A B C DRB1 適合	HLA-A B C DRB1 適合	2186	54.0%
HLA-A B C DRB1 不適合	高リスク不適合なし (Zero nonpermissive)	許容可能不適合 組み合わせ候補(Candidate)	443	10.9%
		許容可能不適合 組み合わせ候補以外 (Zero nonpermissive - Candidate)	595	22.2%
	高リスク不適合1	高リスク不適合1	479	11.8%
	高リスク不適合2以上	高リスク不適合2以上	44	1.1%

【解説】

HLA-A、B、C、DR座における検討で許容可能な不適合組合せの候補となり得る組合せが12組存在し(表1)、これらの不適合組合せを許容可能不適合組合せ候補と定義した。ただし、これら12組のうち全生存でも有意な関連を維持した不適合組合せは4組であった。HLA-A、B、C、DR アリルのいずれかに不適合がある場合の重症急性GVHDに関するグラフを(図1)に示した(従来のHLA座の適合・不適合による群分け)。(図2)ではHLA-A、B、C、DRアリルのいずれかに不適合がある群を高リスク不適合組合せ(1)の数で3群に分類した結果を示した。(図3)では、HLA-A、B、C、DR アリルのいずれかに不適合があるもの高リスク不適合はない群(Zero nonpermissive)をさらに、許容可能な不適合組合せ候補群(Candidate for permissive)とそれ以外の群(Zero nonpermissive - Candidate)に分類した結果を示した。(図4)に(図3)と同様の群分けにおける全生存のグラフを示した。この結果より、統計学的な証明は困難であるものの、許容可能な不適合組合せ候補群(Candidate for permissive)は、重症急性GVHD発症率においてHLA完全一致群と差がない事が示唆された。臨床因子を補正した多変量解析でも同様の結果であった。従来HLA各座の適合・不適合で議論されていたドナー選択は重症GVHD高リスク不適合の概念の導入により従来のHLA不適合群が高リスク不適合あり、なしの大きく2群に分類されることとなった。しかし高リスク不適合組合せではない組合せ=許容可能不適合組合せではないという大きな問題を抱えていた。今回の検討でこの高リスク不適合なし群をさらに許容可能不適合組合せ候補群とそれ以外の群に分類し得た。許容可能不適合組合せ候補以外の群は依然として潜在的な高リスク不適合と許容可能不適合が混在する判断の困難な群であるが、その割合は今回の検討により20%程度まで絞り込む事が出来た(表2)。実際のドナー選択にあたっては、許容可能不適合組合せ候補が、必ずしも生存への有意な影響があるわけではない事もふまえ慎重な選択が必要である。

(川瀬孝和、森島泰雄)

【Reference】

1. Kawase T, Morishima Y, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, Kato S, Juji T, Kodera Y, Sasazuki T, Sasazuki T. High-risk HLA allele mismatch combinations responsible for severe acute graft-versus-host disease and implication for its molecular mechanism. Blood. 2007;110(7):2235-41.

資料 2

Multi-SNP 解析による HLA haplotype の保存性の検討

【背景】

我々は JMDP の HLA タイピングデータ及び HLA 領域 4.9Mb 範囲の multi-SNP データを用いて、日本人に頻度の高い HLA ハプロタイプは非血縁者間においても HLA allele 以外の領域も含めて高度に保存されていることを示した。さらに、HLA ハプロタイプに由来する genetic background が急性 GVHD の発症と関係する可能性を示した。

今回、さらに multi-SNPs データの解析範囲を広げ、HLA ハプロタイプの保存性を再検討した。

【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 6 番染色体短腕の 20 - 46 Mb 領域の 1310 SNPs を Affymetrix GeneChip mapping 500K array で同定した。Homozygous な common HLA HP 持つ個人 (HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 が全て homozygous allele) を抽出し、SNPs の homozygosity 検討した後に、各 HP における SNP の consensus sequence を決定した。さらに、HLA allele 型から同定した少なくとも one copy の HP を持つ個人が consensus sequence を連続性に有するかどうか検討した。

【結果】

もっとも頻度の高い homozygous HP-P1 (HLA-A*2402 -Cw*1202 -B*5201 -DRB1*1502 -DQB1*0601 -DPB1*0901) 72 人の homozygosity を検討したところ、65 人は HLA-A から HLA-DPB1 の 3.3Mb で連続性の homozygous SNP を有し、さらに 32 人は 6.9Mb に渡って (HLA-A より 3.6Mb telomere 側まで)、homozygous SNP を連続性に有していた。この 32 人全てで、nucleotide 29414635 (HLA-A の 0.6Mb telomere 側) から nt 33187790 (HLA-DPB1 の 2.4kb centromere 側) までは同じ allele を有していた。Nt 29414635 から telomere 側は 2 つの subtype に clear に分けることができ、32 人のうち 24 人は subtype A を、6 人は subtype B の HP であった。Homozygous HP-P2 (HLA-A*3303 -Cw*1403 -B*4403 -DRB1*1302 -DQB1*0604 -DPB1*0401) の 10 人のうち 9 人は、7.6Mb の範囲で一致した連続性の homozygous SNP を有していた。homozygous HP-P3 (HLA -A*2402 -Cw*0702 -B*0702 -DRB1*0101 -DQB1*0501 -DPB1*0402) は 8 人中 5 人で 3.3Mb の範囲で連続性の homozygous SNP を有していた。そのうちの 1 人で 25.4Mb に及ぶ長い領域で homozygosity を認めた。この結果より決定した各 HP における consensus sequence を one copy の HP を持つ個人が有するかどうかを検討した結果を Fig. 1 に示す。

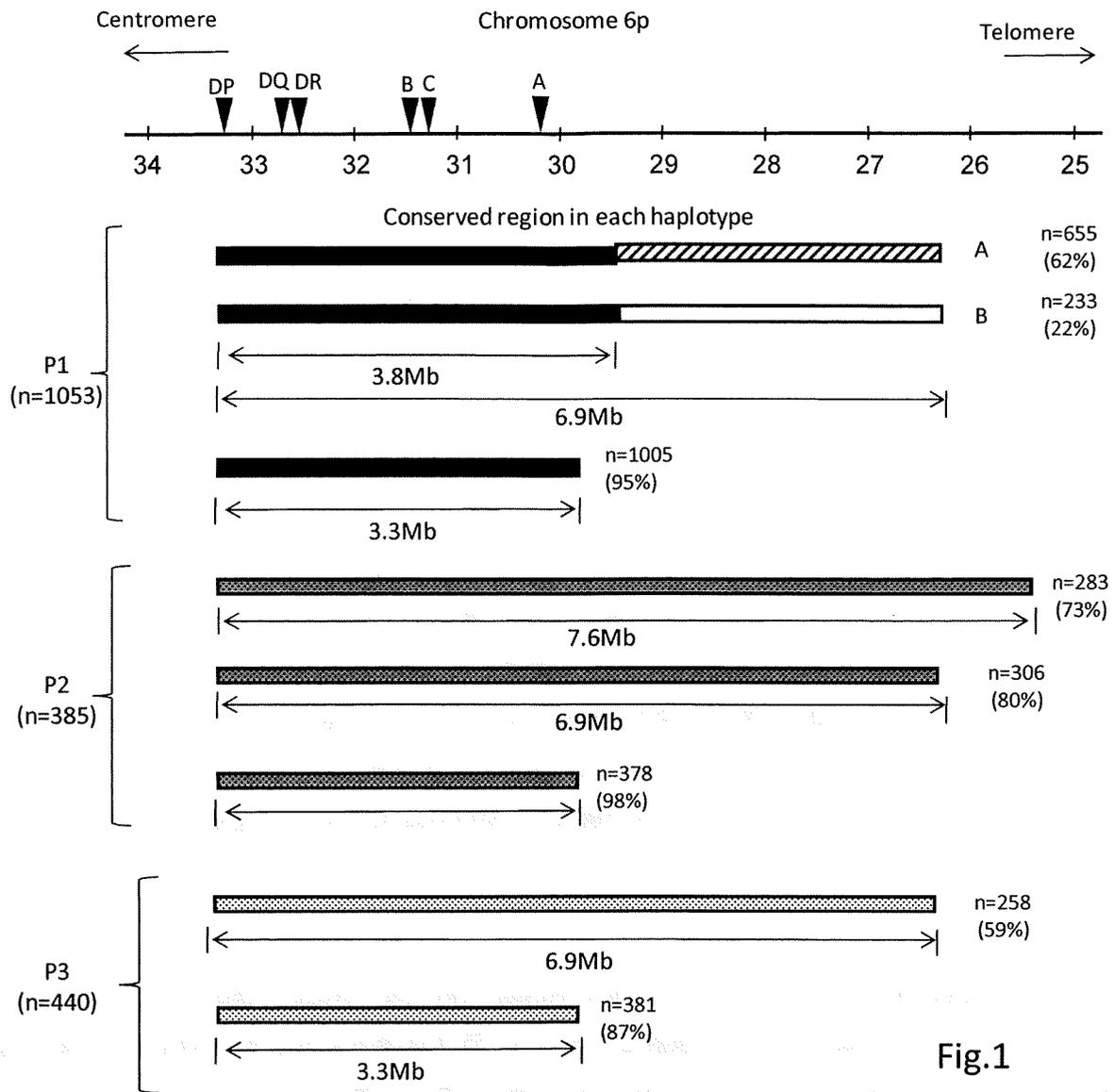


Fig.1

【まとめと考察】

- 1) 日本人に頻度の高い HLA haplotype は、少なくとも HLA-A から HLA-DPB1 の 3.3Mb の範囲では HLA allele 以外の領域も含めて大多数で保存されており、さらに保存されている領域は、HLA-A の telomere 側に長く存在することが明らかとなった。
- 2) HP-P1 の telomere 側の領域は、主に 2 つの haplotype に分けられることが今回の解析で初めて明らかとなった。
- 3) 今後、GVHD の発症も含めた疾患感受性と HLA haplotype 上の責任遺伝子との関係を検討する際には、長く保存された領域も含めた解析が重要である。

(森島聡子、小川誠司、森島泰雄 他)

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

一人種別移植免疫反応の比較—

研究分担者 森島泰雄 愛知県がんセンター中央病院

研究協力者 川瀬孝和 愛知県がんセンター研究所

研究協力者 森島聡子 愛知県がんセンター中央病院

研究要旨：国際組織適合性ワークショップグループ（IHWG）において、人種別移植免疫反応の比較を HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 がドナーと適合した非血縁造血幹細胞移植データに基づき解析した。その結果、日本人間の移植の急性 GVHD の頻度、白血病の再発率、移植後の死亡率はいずれも白人間の移植に比べて有意に低いことが明らかになった。人種特異的に頻度の高い HLA ハプロタイプを有する日本人と白人の移植の比較でも、日本人間の移植は白人間に比し有意に急性 GVHD の頻度が低かった。

A. 研究目的

血縁者間 HLA 適合骨髄移植においては、人種により急性 GVHD の頻度や生存が異なることが Oh らにより明らかにされているが、非血縁者間造血細胞移植においては比較検討がなされてなかった。そこで、国際組織適合性ワークショップグループ（IHWG）において、共通の HLA と臨床のデータベースを用いて移植免疫反応に及ぼす人種の影響につき HLA をベースに解析し、国際間（人種間）の非血縁移植実施に際しての基本情報を得ることを目的とした。

B. 研究方法

- 1) IHWG のデータベースから次の症例を選択した。(1) HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 適合ドナー、(2)白血病、MDS 症例、(3)GVHD 予防法として T 細胞非除去で ATG 非使用の症例。5543 症例の内訳を Table 1 に示した。
- 2) 日本人と白人にそれぞれ特異的な高頻度 HLA ハプロタイプ (Table 3. footnote 参照) を有する症例の急性 GVHD 頻度を比較した。
- 3) 統計解析は Cox regression models による多変量解析法を使用し、変数として人種、患者・ドナーの年齢、性、性適合、疾患、移植病期、移植細胞、GVHD 予防法などにより調整した。

GVHD 頻度と白血病再発は cumulative incidence 法により、生存率は Kaplan-Meire 法を用いた。

C. 研究結果

Asian/Pacific ペア (n=2062: 大部分が日本人ペア) は白人 (Caucasian) ペアに比べ有意に急性 GVHD の頻度が低かった (日本人ペア 39.2% of grade 2-4 と 15.0% of grade 3-4 vs. Caucasian ペア (55.2% of grade 2-4 と 21.9% of grade 3-4) ($p < 0.001$)

(Figure 1a, 1b). 多変量解析の結果も同様であった (Table 2). HLA ハプロタイプによる解析結果も同様に白人の HLA ハプロタイプを有する人の急性 GVHD の頻度は日本人の頻度よりも有意に高かった (Table 3).

日本人の白血病再発率は白人に比し有意に低かった (Table 2, Figure 1c, 1d). HLA-DPB1 適合度別、白血病型別でも同様な傾向が認められた (Table 4).

日本人の移植後死亡は白人に比し有意に低かった (Table 2, Figure 1e).

日本人の急性 GVHD 発症率と移植後死亡率は黒人間ペアやヒスパニックペアに比べ低い傾向にあった (症例数は少ない) (Table 2).

D. 考察

HLA-A から DPB1 までの HLA 遺伝子型がすべて同定された HLA データと臨床データを含んだ多数ペアの共通 IHWG データベースを解析することにより初めて移植免疫反応を人種別に解析することが可能になった。JMDP のデータが大きく貢献しており、われわれが中心になり、研究計画の作成と解析を実

施することができた。急性 GVHD 発症率の日本人と白人の違いは、HLA 適合血縁者骨髄移植の成績から推測できたものであるが、本研究は、HLA ハプロタイプにもとづき集団を抽出した。これは、人種という多様な集団を HLA という免疫遺伝学を背景にした集団として解析できたもので、意義深い。さらに、移植後の白血病再発率の違いは新しい知見である。GVHD や移植片対白血病 (GVL) 効果に関与する HLA 領域内外の責任遺伝子の同定と人種差の関与の解明が今後の課題である。

非血縁移植の臨床にとっても、国際間のドナー選択を考える上で、重要な基礎データとなる。

E. 結論

日本人間の移植の急性 GVHD の頻度、白血病の再発率、移植後の死亡率はいずれも白人間の移植に比べて有意に低いことが明らかになった。人種特異的に頻度の高い HLA ハプロタイプを有する日本人と白人の移植の比較でも、日本人間の移植は白人間に比し有意に急性 GVHD の頻度が低かった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Morishima S, Ogawa S, Kawase T, Inoko H, Sasazuki T, Morishima Y, et al.. Impact of highly conserved HLA haplotype on acute graft-versus-host disease. *Blood*. 2010 (in press).

2) Muramatsu H, Kojima S, Morishima Y, et

al. Outcome of 125 children with CML who received transplants from unrelated donors: the Japan Marrow Donor Program (JMDP). *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009 Sep 29. [Epub ahead of print]

3) Espinoza JL, Takami A, Morishima Y, Nakao S. et al. NKG2D gene polymorphism has a significant impact on transplant outcomes after HLA- fully-matched unrelated bone marrow transplantation for standard risk hematologic malignancies.

Haematologica. 2009 Oct;94(10):1427-34.

3) Kamei M, Kawase T, Morishima Y, Ogawa S, Morishima S, Akatsuka Y. et al. HapMap scanning of novel human minor

histocompatibility antigens. *Blood*. 2009 May 21;113(21):5041-8. 3 .

2. 学会発表

Yasuo Morishima, Takakazu Kawase,

Satoko Morishima, Mari Malkki, Steve Spellman, Andrea Velardi, Effie W. Petersdorf. Impact of Donor-Recipient Ethnicity on Risk of Acute Graft-Versus-Host Disease, Leukemia Relapse and Survival in Hematopoietic Stem Cell Transplantation from HLA-Compatible Unrelated Donors. A Report from the International Histocompatibility Workshop Group. 51st Annual Meeting of American Society of Hematology. Dec. 2009. New Orleans.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Table 1. Characteristics of hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donor and ethnicity.

Ethnicity of Pair	Total No.	Asian /Pacific	Caucasian	Black	Hispanic	North American	Mismatch ethnicity	Unknown ethnicity
	5543	2062	2414	39	21	2	268	737
HLA-DPB1 matching status (GVH direction)								
Match	1365	753	457	3	13	0	39	100
1-allele mismatch	1929	940	738	13	4	0	67	167
2-allele mismatch	1002	352	476	5	4	1	54	110
Unknown	1247	17	743	18	0	1	108	360
Patient age (mean)	35.2	31.6	37.9	33.9	28.5	34.5	36	36.4
Donor age (mean)	35.1	34.3	35.7	37.7	34.1	41	35	35.5
Diseases*								
ALL	1308	631	470	9	6	0	59	133
AML	1923	713	828	12	4	1	107	258
CML	1437	410	720	15	9	1	61	221
MDS	864	308	393	3	2	0	41	117
Acute leukemia	11	0	3	0	0	0	0	9
Leukemia risk at transplantation**								
Low	1000	276	513	5	7	1	35	163
Standard	2866	1139	1468	27	11	1	183	399
High	787	362	428	7	3	0	49	170
Unknown	890	285	5	0	0	0	1	5
Sex								
Match	3324	1289	1246	22	10	0	154	423
Mismatch	2172	768	982	17	11	2	114	278
GVHD prophylaxis								
Cyclosporine based	3166	1128	1444	22	12	2	139	419
Taclorimus based	1986	919	849	17	9	0	111	81
Other	71	8	47	0	0	0	10	6
Unknown	320	7	74	0	0	0	8	231
Conditioning regimen								
Myeloablative	4423	1895	1926	31	20	2	224	325
Non-myeloablative	617	166	385	8	1	0	40	17
Unknown	503	1	103	0	0	0	4	395

* ALL denoted acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloblastic leukemia; CML, chronic myeloid leukemia; MDS, myelodysplastic syndrome

** Leukemia risk is described in the text.

Table 2. Hazard risk (HR) of acute GVHD, relapse and mortality by ethnicity

Ethnicity*	n	Acute GVHD (grade 2-4)		Acute GVHD (grade 3-4)		Relapse		Mortality		
		HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p	
Asian/Pacific pair	2062	1.00 (Ref.)		1.00 (Ref.)		1.00 (Ref.)		1.00 (Ref.)		
Caucasian pair	2414	1.63 (1.48-1.80)	<0.001	1.54 (1.31-1.79)	<0.001	1.61 (1.40-1.85)	<0.001	1.51 (1.38-1.66)	<0.001	
Black pair	39	1.27 (0.80-2.01)	0.309	2.16 (1.20-3.88)	0.010	1.94 (1.03-3.65)	0.041	2.59 (1.77-3.80)	<0.001	
Hispanic pair	21	1.39 (0.74-2.60)	0.300	1.84 (0.76-4.46)	0.179	2.18 (0.09-5.29)	0.084	2.25 (1.32-3.82)	0.003	
Mismatch ethnicity**	268	1.59 (1.33-1.91)	<0.001	1.62 (1.22-2.16)	0.001	1.75 (1.36-2.26)	<0.001	1.69 (1.43-2.01)	<0.001	
Unknown ethnicity***	737	2.63 (2.25-3.07)	<0.001	1.46 (1.12-1.91)	0.005	1.40 (1.11-1.78)	0.005	1.40 (1.11-1.78)	0.005	
HLA-DPBI matching ****										
Match	1365	1.00 (Ref.)		1.00 (Ref.)		1.00 (Ref.)		1.00 (Ref.)		
1-allele mismatch	1929	1.35 (1.21-1.50)	<0.001	1.36 (1.14-1.61)	<0.001	0.71 (0.61-0.81)	<0.001	1.02 (0.93-1.13)	0.619	
2-allele mismatch	1002	1.52 (1.35-1.72)	<0.001	1.49 (1.23-1.80)	<0.001	0.60 (0.50-0.72)	<0.001	1.08 (0.96-1.21)	0.188	
Unknown	1247	1.15 (1.01-1.30)	0.036	1.03 (0.84-1.28)	0.762	0.75 (0.63-0.88)	0.001	0.78 (0.69-0.88)	<0.001	

Multivariate analysis adjusted by clinical factors (see Table 1).

* Data of 2 North American pairs are not shown in this table.

** Combination of mismatch ethnicity is described in the text.

*** Either patient or donor

**** GVH direction

Table 3. Comparison of acute GVHD in patients with common HLA haplotype.

Ethnicity	N	Acute GVHD (%)	
		(grade 2-4)	(grade 3-4)
Caucasian pair	124*	55.4	22.8
		p<0.001	p=0.041
Asian Pair	250**	36.9	14.8

Common North European HLA haplotype (European haplotype frequency)

(1) A*01:01-Cw*07:01-B*08:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01 (7.408)

(2) A*03:01-Cw*07:02-B*07:02-DRB1*15:01-DQB1*06:02 (3.547)

(3) A*02:01-Cw*05:01-B*44:02-DRB1*04:01-DQB1*03:01 (2.436)

(4) A*02:01-Cw*07:02-B*07:02-DRB1*15:01-DQB1*06:02 (2.341)

Common Japanese HLA haplotype (Japanese haplotype frequency)

(5) A*24:02-Cw*12:02-B*52:01-DRB1*15:02-DQB1*06:01 (7.171)

(6) A*33:03-Cw*14:03-B*44:03-DRB1*13:02-DQB1*06:04 (4.071)

(7) A*24:02-Cw*07:02-B*07:02-DRB1*04:05-DQB1*05:01 (2.713)

(8) A*24:02-Cw*01:25-B*64:01-DRB1*04:05-DQB1*04:01 (1.936)

* Haplotype combination and its number (1)(1): 28, (1)(2): 32, (1)(3): 16,

(1)(4): 20, (2)(2): 9, (2)(3): 8, (2)(4): 4, (3)(4): 7.

** Haplotype combination and its number (5)(5): 60, (5)(6): 54, (5)(7): 35,

(5)(8): 27, (6)(6): 19, (6)(7): 23, (6)(8): 13, (7)(7): 8, (8)(8): 11

Table 4. Five-year leukemia relapse rate by ethnicity and leukemia cell type.

	n	ALL	n	AML	n	CML
Leukemia relapse risk-I**						
Asian/Pacific pair	478	24.6*	504	21.5	272	7.7
		p<0.001		p<0.001		p=0.026
Caucasian pair	379	33.1	616	33.5	502	11.0
Leukemia relapse risk-II***						
Asian/Pacific pair	126	55.3	170	43.4	124	24.1
		p=0.879		p=0.003		p=0.246
Caucasian pair	70	45.8	173	56.4	205	24.9
HLA-DPB1 match****						
Asian/Pacific pair	213	37.6	250	35.8	146	20.3
		p=0.436		p=0.004		p=0.102
Caucasian pair	83	36.0	117	44.5	164	23.8
HLA-DPB1 mismatch****						
Asian/Pacific pair	390	26.9	427	21.9	250	8.3
		p=0.003		p<0.0001		p=0.027
Caucasian pair	230	33.2	324	32.6	453	12.4

ALL:acute lymphoblastic leukemia, AML:acute myeloblastic leukemia, CML:chronic myelocytic leukemia

* Cumulative incidence (%) of relapse at 5 years after transplantation.

** 1st complete remission of ALL, AML, and chronic phase of CML

*** More advanced stage than leukemia relapse risk-I.

**** GVH direction.

Figure 1a. Cumulative incidence of acute GVHD (grade 2-4)

AA: Asian pairs, CC: Caucasian pairs, BB: Black pairs, HH: Hispanic pairs, MM: mismatch ethnicity pairs.

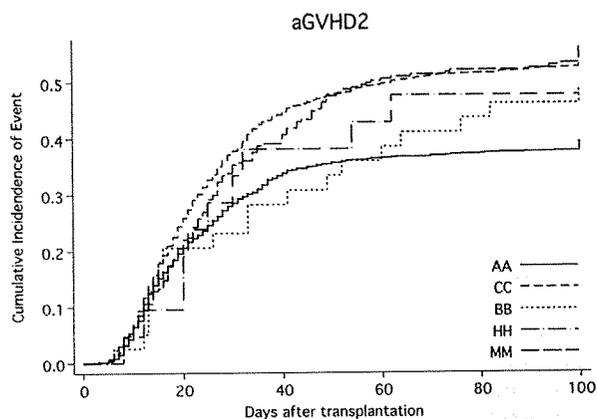


Figure 1b. Cumulative incidence of acute GVHD (grade 3-4)

