

Figure 1c. Leukemia relapse curve after transplantation in standard risk leukemia

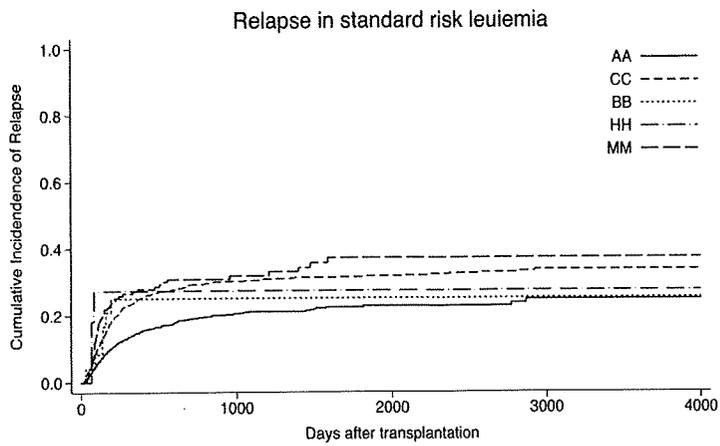


Figure 1d. Leukemia relapse curve after transplantation in high risk leukemia

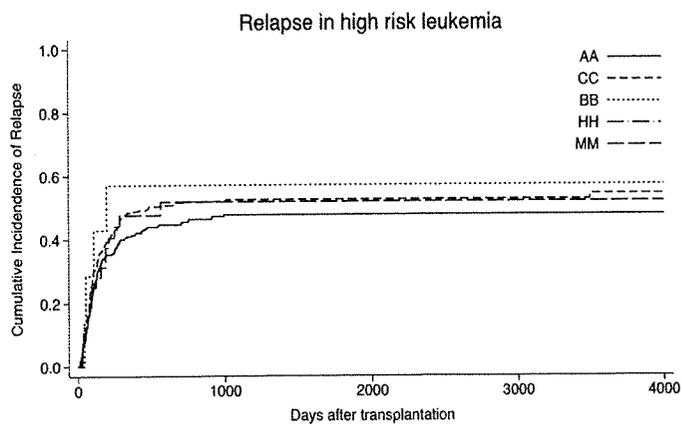
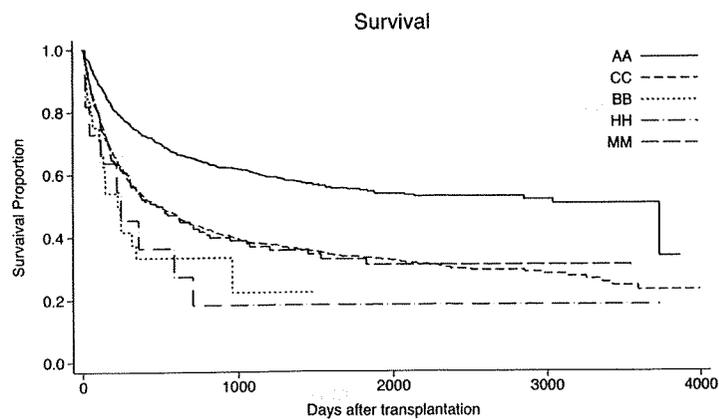


Figure 1e. Survival curve after transplantation in standard risk leukemia



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、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

Non-HLA 遺伝子多型は免疫反応に関与し、移植片対宿主病 (GVHD) を引き起こす。我々は、非血縁者ドナーからの移植における DNA プールを用いて、多数の免疫関連遺伝子のマイクロサテライト (MS) 多型解析を行い、患者やドナーの GVHD 発症に関与する多型を見出すことを目的とした。

B. 研究方法

3093 の標的遺伝子を標的とする 4231 の MS マーカーを選択し、JMDP 症例から以下の条件に適合する 922 症例につき MS 解析を実施した。

(1) 白血病、(2) 4-40 才の患者、(3) 骨髄破壊的移植前治療法、(4) 骨髄移植。

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した。

C. 研究結果

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患者で 39、ドナーで 58 得られている。この中で、個別解析では、4

loci が確認され、2 loci がその傾向にあった。

(donor: DXS0629i: $p=0.001$, OR 0.293; D6S0035i: $p=0.005$, OR 0.725; D17S0219i: $p=0.001$, OR 0.464; TNFc: $p=0.052$, OR 1.264; recipient: DXS0324i: $p=0.008$, OR 1.352; D16S3082: $p=0.065$, OR 1.372.

D. 考察

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は、これまでに前例が無く、また、SNP と異なり、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か可能ではないかと考える。

E. 結論

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、急性 GVHD と関連する多型を見出し、その詳細を解析中である。

F. 健康危険情報

特記事項なし

研究発表

1. 論文発表

1. Mano S, Endo TA, Oka A, Ozawa A, Gojobori T, Inoko H: Detecting linkage between a trait and a marker in a random mating population without pedigree record. *PLoS ONE* 4: e4956, 2009.
2. Hinohara K, Nakajima T, Yasunami M, Houda S, Sasaoka T, Yamamoto K, Lee BS, Shibata H, Tanaka-Takahashi Y, Takahashi M, Arimura T, Sato A, Naruse T, Ban J, Inoko H, Yamada Y, Sawabe M, Park JE, Izumi T, Kimura A. Megakaryoblastic leukemia factor-1 gene in the susceptibility to coronary artery disease. *Hum Genet.* 2009 Jun 10. [Epub ahead of print]
3. Komiyama T, Kobayashi H, Tateno Y, Inoko H, Gojobori T, Ikeo K: An evolutionary origin and selection process of goldfish. *Gene* 430: 5-11, 2009
4. Shiina T, Hosomichi K, Inoko H, Kulski JK: The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *J Hum Genet* 54: 15-39, 2009.
5. Tomiyama R, Meguro A, Ota M, Katsuyama Y, Nishide T, Uemoto R, Iijima Y, Ohno S, Inoko H, Mizuki N: Investigation of the association between Toll-like receptor 2 gene polymorphisms and Behçet's disease in Japanese patients. *Hum Immunol* 70: 41-44, 2009.
6. Kulski JK, Shigenari A, Shiina T, Hosomichi K, Yawata M, Inoko H: HLA-A allele associations with viral MER9-LTR nucleotide sequences at two distinct loci within the MHC alpha block. *Immunogenetics* 61: 257-270, 2009.
7. Ohtsuka M, Kimura M, Tanaka M, Inoko H: Recombinant DNA technologies for construction of precisely designed transgene constructs. *Curr Pharm Biotechnol.* 10: 244-251, 2009.
8. Shichi D, Ota M, Katsuyama Y, Inoko H, Naruse TK, Kimura A: Complex divergence at a microsatellite marker C1_2_5 in the lineage of HLA-Cw/-B haplotype. *J Hum Genet* 54: 224-229, 2009.
9. Yonezawa T, Kurata R, Kimura M, Inoko H: PKC Delta and Epsilon in drug targeting and therapeutics. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences* 3: 96-101, 2009.
10. Kikkawa EF, Tsuda TT, Sumiyama D, Naruse TK, Fukuda M, Kurita M, Wilson RP, LeMaho Y, Miller GD, Tsuda M, Murata K, Kulski JK, Inoko H. Trans-species polymorphism of the Mhc class II DRB-like gene in banded penguins (genus *Spheniscus*). *Immunogenetics* 61: 341-352, 2009.
11. Tabeta K, Shimada Y, Tai H, Ishihara Y, Noguchi T, Soga Y, Takashiba S, Suzuki G, Kobayashi T, Oka A, Kobayashi T, Yamazaki K, Inoko H, Yoshie H. Assessment of chromosome 19 for genetic association in severe chronic periodontitis. *J Periodontol* 80: 663-671, 2009.
12. Ohtsuka M, Warita T, Sakurai T, Watanabe S, Inoko H, Sato M: Development of CRTEIL and CETRIZ, Cre-loxP-based systems, which

allow change of expression of red to green or green to red fluorescence upon transfection with a cre-expression vector. *J Biomed Biotechnol.* 2009:985140, Epub 2009.

13. Horie Y, Meguro A, Ota M, Kitaichi N, Katsuyama Y, Takemoto Y, Namba K, Yoshida K, Song YW, Park KS, Lee EB, Inoko H, Mizuki N, Ohno S: Association of TLR4 polymorphisms with Behcet's disease in a Korean population. *Rheumatology* 48: 638-642, 2009.
14. Shojima J, Tanaka G, Keicho N, Tamiya G, Ando S, Oka A, Inoue Y, Suzuki K, Sakatani M, Okada M, Kobayashi N, Toyota E, Kudo K, Kajiki A, Nagai H, Kurashima A, Oketani N, Hayakawa H, Takemura T, Nakata K, Ito H, Morita T, Matsushita I, Hijikata M,

Sakurada S, Sasazuki T, Inoko H: Identification of MICA as a Susceptibility Gene for Pulmonary Mycobacterium avium Complex Infection. *J Infect Dis* 199: 1707-1715, 2009.

15. Kongmaroeng C, Romphruk A, Ruangwerayut R, Paupairoj C, Leelayuwat C, Inoko H, Romphruk A: HLA-B*15 subtypes in Burmese population by sequence-based typing. *Tissue Antigens.* 2009.

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。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。

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。本研究では、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、主要組織適合抗原の発現量の異なる個体間での骨髄移植が GvHD の発症の原因となるかどう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 及びサザンブ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、ホモ接合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 2-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髄細胞と成熟 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 発症の有無を検討した。

(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・動物実験委員会の承認を得て、実験動物に対する動物愛護上の配慮をもって実施した。

C. 研究結果

独立するトランスジェニックマウスを 3 系統樹立した。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。非リンパ球分画の発現で比較したところ、蛍光強度から推察して正常の 1.5 倍から 3 倍程度の過剰発現があるものと思われた。そのうち発現の高い 2 つの系統についてホモ接合トランスジェニックマウスを作成した。

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。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、主要組織適合抗原/自己抗原ペプチド複体の発現が少ないと考えられる β 2m ヘテロ欠損マウスより

採取した骨髄細胞と成熟 T 細胞を含む脾臓細胞を移植した。経時的に体重減少、皮膚症状を観察し、GvHD の発症を検討した。その結果、体重減少や皮膚炎は観察されず、本実験で検討したドナーとレシピエントの組み合わせでは明らかな GvHD の発症が誘導されることはなかった。

D. 考察と結論

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パトアは、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て検証しようと試みた。β2m ノックアウトマウスのヘテロマウスをドナーに、H2-Kb トランスジェニックマウスをレシピエントとして GvHD の発症を指標にして検討したが、明らかな GvHD は発症しなかった。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が胸腺細胞及び T 細胞のレパトア選択、

自己／非自己の認識に影響を及ぼすのではないかという作業仮説の証明と疾患モデルの樹立には至らなかった。ただし、発現量の差が十分ではなかった可能性は現時点では否定できない。本来の主要組織適合抗原とは異なり、トランスジーンによる発現では各種刺激による発現誘導が起こらないことも懸念の一つとして残る。一方、本実験の結果は、同一構造を持つ主要組織適合抗原複合体の発現量が数倍違うのみでは、選択される T 細胞レパトアへの影響はさほど影響しないことを支持するものと考えられた。

G. 研究発表

論文発表

1. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Viña M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maiers M, Mayr WR, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens.*, 75: 291-455, 2010
2. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Viña M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maiers M, Mayr WR, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J. An update to HLA Nomenclature, 2010. *Bone Marrow Transplant.*, in press, 2010
3. 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*, in press, 2010

4. 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

5. 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

全ゲノム関連解析による GVHD 関連遺伝子座の探索

分担研究者 小川 誠司 東京大学医学部附属病院がんゲノミクスプロジェクト 特任准教授

研究要旨

移植片対宿主病 (GVHD) は同種造血幹細胞移植におけるもっとも重要な合併症の一つである。GVHD はドナーとレシピエントの遺伝学的相違によって発症し、また、それぞれの遺伝学的背景によっても影響される。本研究では日本骨髄バンク (JMDP) の 5 座適合 1600 移植に関する全ゲノム関連解析の手法を用いた 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、本年度については、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が、その他の遺伝子座については、症例数が少なく十分な検証感度を得られなかった。さらに解析症例数を増やした検討が必要と考えられた。

A. 研究目的

同種造血幹細胞移植は現時点で難治性造血器腫瘍に対する最も強力な治療手段の一つと考えられている。その治療効果の主体をなすのは、生着した T 細胞によって担われる腫瘍細胞に対するアロ免疫反応であるが、同様の免疫反応はレシピエントの正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誘発する。移植成績の向上と言う観点から GVHD の病態解明と新規予防・治療手段の開発を行うためには、GVHD の標的となるようなマイナー組織適合性抗原の同定と、その発症に関わるその他の多型を同定することが重要である。本研究では、昨年までに JMDP の保存試料を用いたゲノムワイド関連解析によって GVHD の発症に関与する可能性のあるマイナー組織適合性抗原の候補遺伝子座として 20 個の遺伝子座の同定をおこなった。そこで本年度については検出された関連について独立な移植セットを用いた検証研究を行った。

B. 研究方法

(1) 移植症例

本解析では、H16 年以降に JMDP を通じて行われた 5 座 (HLA-A, B, C, DRB1, DQB1) 適合移植のうち、GVHD 予防としてカルシニューリン阻害剤と MTX の併用が行われ、かつドナー・レシピエントのゲノム DNA および GVHD に関する臨床情報が利用可能

な 400 件の移植を解析の対象として以下の検証研究を行った。また、SNP アレイによるタイピングを行った 1600 移植についても、確認タイピングを施行した。

(2) SNP タイピング

上記移植 (1600+400 移植) のドナー・レシピエントに関する保存ゲノム DNA 試料について、Sequenome 社 Mass ARRAY (iPLEX) を用いて昨年度までに同定された候補 SNP およびその周辺 SNP について SNP タイピングを行った。

(3) タイピング結果と関連の検証

昨年度までに SNP アレイで解析を行った試料については、SNP アレイによるタイピング結果と Mass ARRAY によるタイピング結果の一致度を比較検討する。また、検証セットについては、各 SNP の Mass Array によるタイピング結果に基づいて GVHD 発症との関連に関する log Rank 統計量を算出することにより関連の検証を行った。

(倫理面への配慮)

検討に用いた検体は、JMDP を通じて研究への許諾が得られている試料を、JMDP の試料検討委員会および東京大学医学部の設置する倫理委員会の承認を経て行われた。

C. 結果

(1) タイピング性能の評価

iPLEX を用いた 4000 試料・25 SNP に関する

るタイピングの call rate は平均 97% であった。また、SNP アレイによるタイピング結果 / 未観測 SNP についての Imputation 結果 と iPLEX によるタイピングは、平均 99.6% で一致していた。

(2) 関連の検証

探索研究で GvHD との関連が認められた 20 個の候補 SNP のうち iPLEX で解析が可能であった 18 SNP 座および周辺 SNP について当初観察された関連の検証を行ったところ、Chr5 p14.3 rs7447336 については GVHD との関連が検証セットでも確認できたが他の SNP については関連は確認できなかった。

D. 考察

今回、昨年度までの探索研究で同定された GvHD 候補 SNP 座についてそのタイピング精度と関連の確認を行った。質量分析の原理に基づく iPLEX による SNP タイピングは極めてスループットが高く、かつ十分な call rate が得られる優れたタイピング法であった。これらの SNP に関する限り SNP アレイと iPLEX のタイピングの一致率は極めて良好であることから、探索研究における SNP アレイによるタイピング結果とその統計解析の結果の信頼性が確認できた。とくに、未知の SNP に関する imputation の結果と iPLEX のタイピングの結果は極めて一致率が高く、観測 SNP に基づく非観測 SNP の推定は極めて高精度に行われていることが検証できた。

一方、探索研究において同定された GVHD との関連については、関連が再度確認できたのは 1 SNP 座のみであった。これは、マイナー組織適合性抗原の抗原提示における HLA 拘束が存在するために、各マイナー抗原候補 SNP について十分な再ブル数が得られなかったことが大きな原因であった。これらの候補 SNP の検証には、今後さらに解析症例を増やすことにより関連解析検出力を向上させることが必要であると考えられた。

E. 結論

探索セット 1600 移植および検証セット 400 移植について iPLEX を用いた SNP タイピングを行い、SNP アレイによるタイピング精度および候補関連 SNP に関する検証をおこなった。SNP アレイの精度は極めて高く再現性の高いことが確認されたが、サンプル数における制限のために、候補 SNP における GVHD との関連の検証は困難であった。今後さらに症例数を増やした

検証解析を行うことが必要と考えられた。

F. 研究発表

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. HLA mismatch combinations associated with decreased risk of relapse: implications for the molecular mechanism. **Blood**. 113:2851-2858, 2009.

2. 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.

3. 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.

学会発表

1. 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;16:135.

2. 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総会. 2009;16:133.

3. 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.

4. 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 Hematopoietic Transplantation. The 51st annual meeting

of American Society of Hematology
@NewOrleans. 2009.

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

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の構築

分担研究者 村田 誠 名古屋大学医学部附属病院 血液内科 講師

研究要旨：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。

A. 研究目的

同種造血幹細胞移植後の移植片対宿主病 (GVHD) および移植片対腫瘍 (GVL) 効果などの同種免疫反応には、サイトカイン、代謝酵素、ケモカインなど様々な遺伝子多型がその強弱に影響を与えることが報告されている。しかし、GVHD や GVL 効果に直接関わる T リンパ球の表面分子については、その活性化を抑制する分子である *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4* (CTLA-4) と GVHD/GVL 効果との相関を示した海外からの報告に限られている。

今回我々は、日本人の同種造血幹細胞移植において、ドナーの CTLA-4 遺伝子の多型が移植成績に影響を与えるか否か、ハプロタイプに着目して検討した。

B. 研究方法

対象は、1987 年から 2006 年に施行した同種造血幹細胞移植症例のうち、

成人造血器悪性疾患患者、HLA 一致同胞ドナーからの移植、CyA+MTX による GVHD 予防を受けた、の 3 条件すべてを満たす 147 例。

CTLA-4 遺伝子の 3 塩基 (-318, +49, CT60) の多型について、シークエンス法および Taqman PCR 法を用いてタイピングを行った。

統計解析は、cumulative incidence 法、Kaplan-Meier 法、Cox 比例ハザードモデル (backward stepwise 法、因子：年齢・性別・幹細胞源・疾患リスク・前治療) を用いて行った。

C. 研究結果

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に着目して解析を行ったところ、ドナーが C-A-A ハプロタイプを有する場合 (n=78)、C-A-A ハプロタイプを有しない場合 (n=69) と比べ、再発率が有意に低く、GVHD 発症率は変わらず、生存率が有意に高かった。

D. 考察

これまでの海外からの報告と違い、日本人における *CTLA-4* 遺伝子多型は急性 GVHD 発症率には影響を与えなかった。その理由として、人種差や、幹細胞源の割合の違いが影響を与えた可能性が考えられる。また今回の統計学的解析結果を裏付ける生物学的メカニズムの解明が今後必要と考えている。

E. 結論

造血器悪性疾患患者に対する同種造血幹細胞移植において、ドナーの *CTLA-4* 遺伝子多型はその成績に影響を与える。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Inamoto Y, Murata M, et al. Clinicopathological manifestations and treatment of intestinal transplant-associated microangiopathy (i-TAM). *Bone Marrow Transplant*, 44(1): 43-49 (2009).
2. 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).
3. 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).

4. Tanizaki R, Murata M, et al. Irrespective of CD34 expression, lineage-committed cell fraction reconstitutes and reestablishes transformed Philadelphia chromosome-positive leukemia in NOG mice. *Cancer Science*, in press.

学会発表

1. Terakura S, Murata M, et al. Optimization of fludarabine + melphalan conditioning for marrow transplantation from unrelated donors for patients with hematopoietic malignancies: a prospective dose-finding trial using modified continual reassessment method. *The 51th annual meeting of the American Society of Hematology*, in New Orleans, Louisiana. December 2009.
2. 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. February 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

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	東京都赤十字血液センター製剤部
研究協力者	柏瀬貢一	東京都赤十字血液センター検査部
研究協力者	平安恒幸	学術振興会特別研究員、東京大学医学部

研究要旨 JMDP を介した非血縁者間骨髄移植における NK 受容体 KIR の移植成績への影響を明らかにするために、患者、ドナーの KIR 遺伝子型のタイピングを行った。本年度は昨年度までに確立した少量 DNA からの増幅検体を用いた多数検体の解析系を用いて 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 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。

A. 研究目的

造血幹細胞移植成績に HLA 適合性が大きく影響している。HLA クラス I は抗体、T 細胞受容体に加え、NK 受容体の KIR (Killer Ig-like Receptor) および LILR (Leukocyte Ig-like Receptor) から認識される。NK は腫瘍細胞や感染細胞に対して傷害性をもち GVL 効果や移植関連感染症防御に関与し細胞治療での効果が期待されている。NK のアロ反応性を考慮した HLA の KIR リガンド型の組み合わせ (KIR 適合性) および *KIR*、*LILR* 遺伝子多型と移植成績との関連を調べることで、より適切なドナー選択の可能性が期待される。また急性 GVHD はサイトカインスト

ムにより重篤化するので、抗炎症作用をもつサイトカイン *IL-10* は GVHD 抑制効果が期待される。そこで *IL-10* および隣接の *IL-19* 遺伝子多型と移植成績との関連を調べその効果を解析する。

B. 研究方法

(1) JMDP を介した HLA-A, -B, -DR 血清型一致非血縁者間骨髄移植のうち T 細胞除去例を除いた造血系悪性疾患で T 細胞非除去症例を解析対象とした。

(2) *KIR* 遺伝子多型解析は PCR-SSP 法及び蛍光ビーズ法による PCR-SSO 法を用いて検査した。*LILRB2* 遺伝子型は蛍光ビーズ法による PCR-SSO 法及び PCR-SBT 法により

検査した。

(3) 抑制性サイトカイン遺伝子解析では患者ドナーの *IL-10* 遺伝子プロモーター領域-4188 SNP を蛍光ビーズによる PCR-SSO 法で、*IL-19* 遺伝子内 SNP(rs3950619)は TaqMan SNP Genotyping system を用いて検査した。

(4) 遺伝子多型と移植成績との関連について Cumulative Incidence および Kaplan-Meier 法による単変量解析と Cox Regression Test による多変量解析を用いた解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づき、骨髄移植推進財団データ・試料管理委員会および日本赤十字社、愛知県がんセンターの倫理委員会の承認を得てその規定に従って行った。

C. 研究結果

(1) 患者、ドナーの 16 種類の *KIR* 遺伝子型のタイピングを行った。本年度は昨年度までに確立した少量 DNA からの増幅検体を用いた多数検体の解析系を用いて *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。今後移植成績との関連について統計解析を行う予定である。もう一つの HLA クラス I 認識受容体 *LILR* については昨年度までに *LILRB2* 遺伝子座多型の多数スクリーニング系を完成させ日本人健常者集団のアリル頻度を明らかにしたが、今年度は HLA 6 座 12 抗原アリルー一致症例 (N=317) ペアのタイピングを行った。多変量解析において患者 *LILRB2* 高発現型は

急性 GVHD 重症化の要因であった (P=0.0098)。

(4) *IL-10* 遺伝子について HLA 6 座 12 抗原アリルー一致症例 (N=312) ペアを解析した。昨年までに患者 SNP ハプロタイプ(-1084, -819, -592)ACC 陽性の場合に急性重症 GVHD (2-4) 発症軽減 (P=0.00011) および無病生存率向上 (P=0.037) することが判明していた。今回さらに-4188 SNP も急性重症 GVHD との関連が得られた (P=0.036 trend test)。東京大学小川誠司先生より全ゲノム解析における *IL-10* 遺伝子周辺領域の SNP データのご供与を頂き解析したところ、*IL-10* 上流側の *IL-19* 遺伝子内 SNP(rs3950619)が急性 GVHD 重症化と関連することが判明した。さらに検体数を増やし解析したところ急性重症 GVHD (P=0.00086, trend test)、全生存率 (P=0.042, trend test)との関連が得られた。

D. 考察

KIR 遺伝子型の造血幹細胞移植成績への影響は主に白人集団における解析が行われているが、成績向上と成績悪化の相反する結果が報告されまだ定まっていない。そこで JMDP における *KIR* 遺伝子型効果を明らかにするべく解析を行ってきた。問題点だった解析に必要な多量の検体 DNA の確保については昨年度行った遺伝子増幅および PCR-SSO 法による解析系構築によりほぼ解決された。今回約 800 検体の 16 種類 *KIR* 型を決定したので、次年度に関連解析に着手できる。マウス MHC 認識受容体 *PIR* が GVHD 重症化と関連することが報告されている。そこでヒトの *PIR* 相同分子である

LILR の東北アジア人集団における遺伝子多型解析を行ってきた。今回移植患者ドナーペアの解析に着手し、*LILRB2* 遺伝子 SNP と急性 GVHD 重症化の関連が得られたことより、マウスとヒトに共通する機構の存在が考えられた。日本人集団における *LILRB2* 高発現型アリル頻度は低いので今後さらに他集団での解析も含めた replication study による確認が重要と思われる。患者 *IL-10* SNP 多型と急性 GVHD 重症化および生存率との関連は米国血縁者 HLA 一致移植の結果と同様であり、造血幹細胞移植における *IL-10* の重要性を示唆している。今回近接する *IL-19* 遺伝子 SNP と移植成績との関連を初めて明らかにした。この関連は *IL-10* とは独立したものであり、現在詳細な解析を進めている。

E. 結論

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計 800 検体の *KIR* 遺伝子型タイピングを行った。*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新たな関連を明らかにした。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。

F. 健康危険情報

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.

2) 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;113:2851-8

2. 学会発表

1) 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 平成 21 年 9 月、名古屋

2) 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 平成 21 年 9 月、名古屋

3) 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 平成 21 年 9 月、名古屋

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

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 金沢大学附属病院血液内科・輸血部准教授

研究要旨

がん監視機構や自己免疫疾患の疾患感受性・感染免疫・同種移植への影響が示唆され、TaqMan PCR 法で解析可能な免疫関連遺伝子多型を解析し、同種移植後転帰との関連を後方視的に解析した。対象は、HLA-A/B/C/DRB1 一致非血縁者間骨髄移植を受けた前移植歴の無い血液がん患者とそのドナー(510 ペア)。IL-17 遺伝子多型(rs2275913, G197A)解析を行い、197A 陽性 vs. 197A 陰性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、急性移植片対宿主病(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・ $P=0.01$)。ただし、IL-17 遺伝子多型は、治療関連死亡率や全生存率に有意な影響を及ぼさなかった。HNK1 陽性以上から、免疫関連遺伝子多型解析は、同種造血細胞移植治療成績向上に役立つ可能性が示唆された。

A. 研究目的

サイトカインや先天免疫、ガンマグロブリンレセプターなど免疫関連遺伝子には、免疫誘導能の強弱に影響する 1 塩基多型(SNP)がしばしば認められる。最近の研究から、そのような遺伝子多型が、自己免疫疾患やがん・重症感染症の起こりやすさ(疾患感受性)や治りやすさ(治療感受性)、臓器移植の成否に影響することが明らかとなってきた。同種造血細胞移植は、血液腫瘍に対する免疫療法としての側面を持ち、移植成績を低下させる主な原因は重症移植片対宿主病(GVHD)および致命的感染症である。したがって、がん監視機構・自己免疫疾患発症・感染免疫に影響する免疫関連遺伝子多型が、同種造血細胞移植にも何らかの形でかかわっている可能性は十分に考えられる。

本研究の目的は、がん監視機構・自己免疫疾患発症・感染免疫・臓器移植への影響が既に示されている免疫関連遺伝子多型を対象に、非血縁者間同種骨髄移植成績との関連を検討することである。患者(ホスト)・ドナーDNAを用い

た多型解析と後方視的検討により、急性または慢性 GVHD・生存・再発・感染症・生着不全との関連を明らかにし、今後の移植成績の向上を目指している。本研究計画の特徴として、TaqMan PCR 法(1 時間で約 100 検体の多型解析が可能)が確立している既知の 1 塩基遺伝子多型(SNP)に限定しているため、解析が短時間で済み、比較的速やかに結論を導き出せるという利点がある。今回は、IL-17(自己免疫疾患に関連)遺伝子多型に着目し、解析した。

B. 研究方法

対象

HLA-A/B/C/DRB1 一致非血縁者間骨髄移植を受けた前移植歴の無い血液がん患者とそのドナー(510 ペア)。

試料(DNA)と臨床情報

日本骨髄移植推進財団(日本骨髄バンク)検体・データ保存事業で収集された非血縁者間同種骨髄移植患者・ドナーの DNA および臨床情

報を使用した。

免疫関連遺伝子多型解析

TaqMan SNP 遺伝子型解析法により、患者・ドナーの IL-17 遺伝子多型(rs2275913, G197A)を決定した。解析は、TaqMan probe (ABI 社) により ABI PRISM 7900HT 機を用いて行った。

統計解析

患者・ドナー遺伝子多型の同種造血細胞移植成績に対する影響を、エクセル (マイクロソフト社) ・オリジンプロ (ライトストーン社) を用いて統計学的に解析した。

倫理面への配慮

本研究は、患者・ドナーの同意と、日本骨髄バンクおよび金沢大学医学系研究科の倫理委員会の審査・承認を得た上で実施された。

C. 研究結果

骨髄破壊的前処置群(360 ペア)・骨髄非破壊的前処置群(150 ペア)各々に関して、197A 遺伝子多型陽性 vs. 197A 遺伝子多型陰性で比較検討した。多変量解析では、骨髄破壊的前処置群において、患者 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・ $P=0.01$)。ただし、IL-17 遺伝子多型は、治療関連死亡率や全生存率に有意な影響を及ぼさなかった。また、多変量解析上、ドナーの IL-17 遺伝子多型は移植後転帰に有意な影響を示さなかった。

D. 考察

移植ソースが単一で、血縁者間骨髄移植やさい帯血移植より GVHD の発症頻度が高く、HLA と臨床情報を含む十分なデータベースを有する非血縁者間同種骨髄移植患者は、本研究の解析対象に適している。そこで、本研究は、非血縁者間同種骨髄移植患者・ドナーを対象に、IL-17 遺伝子多型と移植成績との関連を検討し

た。患者の IL-17-197A 遺伝子型が急性 GVHD 発症に影響することが明らかとなった。さらに、再発高リスク群において、ドナー FCGR3A 遺伝子多型が TRM・再発率に影響することも示された。今後他の免疫関連遺伝子多型の解析も予定している。

非血縁者間骨髄移植では、HLA が DNA レベルで完全に一致するなど同一条件のドナーが複数見いだされることも少なくない。この場合、血液型・性別・年齢・体重・地域性だけでドナーを選んでいるのが現状である。将来的に、免疫関連遺伝子多型解析が至適ドナーを選択するための有益な情報となり、非血縁者間同種骨髄移植の治療成績向上が期待できると考えられる。また、患者・ドナーの遺伝子多型からイベント発現を予測し、適切な防御策を講じるなどの利点も考えられる。このような、免疫関連遺伝子多型解析を利用した治療成績向上の試みは、血縁者間移植やさい帯血移植、さらに今後開始予定の非血縁者間末梢血幹細胞移植にも応用可能と考えられる。さらに、本研究計画の特徴として、解析遺伝子を、自己免疫疾患発症・がん監視機構・感染免疫・臓器移植成否への関与が報告され、TaqMan PCR 法(1 時間で約 100 検体以上の多型解析が可能)が確立している既知の SNP に限定している。したがって、検体があれば短期間で結論が得られ、成果を臨床へ速やかに還元できるという利点がある。

E. 結論

同種造血細胞移植患者・ドナーの免疫関連遺伝子多型解析により、移植後合併症を予測し、適切に対処できるようになる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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:

2) Yamashita T, Sugimori C, Ishiyama K, Yamazaki H, Okumura H, Kondo Y, Takami A, Nakao S: Cord blood transplantation using minimum conditioning regimens for patients with hematologic malignancies complicated by severe infections, Int J Hematol 2009, 89:238-242

3) Ishiyama K, Takami A, Suzuki S, Konaka H, Namiki M, Ooi A, Nakao S: Relationship Between Tumor-infiltrating T Lymphocytes and Clinical Response After Reduced-intensity Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Advanced Renal Cell Carcinoma: A Single Center Prospective Study, Jpn J Clin Oncol 2009, 39:807-812

4) 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

2. 学会発表

1) 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23日-25日 京都

2) Takami A. Significant Impact of IL-17A Gene Polymorphism On Transplant Outcomes After HLA-Fully-Matched Unrelated Bone Marrow Transplantation. ASH Annual Meeting. 5-8 December 2009, New Orleans, USA.

3) 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. 21-24 March 2010, Vienna, Austria.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

平成 21 年度 第 1 回合同班会議 プログラム

2009 年 6 月 20 日 (土) 13:00-14:30

会場 愛知県がんセンター国際医学交流センター メインホール

司会 笹月健彦

- 1 「非血縁者間骨髄移植における許容可能な遺伝子型 HLA 型不適合組み合わせの研究」(10 分)
川瀬 孝和 松尾 恵太郎 森島 泰雄 : 愛知県がんセンター
柏瀬 貢一 : 東京都赤十字センター
- 2 「非血縁者間骨髄移植を受けた患者より分離した不適合 HLA-Cw 特異的 CTL の臨床的意義の検討」(10 分)
杉本 恭子 村田 誠 : 名古屋大学 血液内科
- 3 「日本列島人の HLA ハプロタイプについて」 (10 分)
佐治 博夫 丸屋悦子 : 特定非営利活動法人 HLA 研究所
- 4 「Multi-SNPs 解析による HLA ハプロタイプの保存性の検討」 (10 分)
森島 聡子 森島 泰雄 : 愛知県がんセンター
小川 誠司 : 東京大学
笹月 健彦 : 国際医療センター

司会 小川誠司

- 5 「Screening of the immunogenome with microsatellite markers in pooled DNA for non-HLA genetic associations with GVHD: Preliminary results」 (10 分)
Christian Harkensee, Makoto Onizuka, Akira Oka, Hidetoshi Inoko
Division of Molecular Life Sciences, Tokai University
- 6 「移植免疫反応と遺伝子多型の解析」 (10 分)
高見 昭良 : 金沢大学付属病院 血液内科・輸血部
- 7 「NK 細胞受容体、サイトカイン遺伝子多型の解析及び HLA タイピング法の検証」 (10 分)
屋部 登志雄 柏瀬 貢一 平安 恒幸 峰元 睦子 : 東京都赤十字血液センター

組織適合性部会 国際医学交流センター視聴覚室 6 月 20 日 11:00 - 12:30