

**平成21年度 造血幹細胞移植合同班会議 総合プログラム**

平成21年度 厚生労働省がん研究助成金  
森島班

平成21年度 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)  
大島班・神田班・宮村班・池原班・森島班

平成21年度 厚生労働科学研究費補助金(がん臨床研究事業)  
福田班・森班・岡村班

日時 : 平成21年6月20日(土)・21日(日)  
場所 : 愛知県がんセンター国際医学交流センター  
名古屋市千種区鹿子殿1-1  
TEL 052-762-6111

## 造血幹細胞移植合同班会議プログラム

愛知県がんセンター 国際医学交流センター大ホール

6月20日(土) 午後1時～7時

1. 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 (H20-免疫-一般-014)  
研究代表者 森島 泰雄 (愛知県がんセンター中央病院) 13:00 - 14:30
2. 新しい造血幹細胞移植技術の開発に関する研究 (H20-免疫-一般-019)  
研究代表者 池原 進 (関西医科大学病理学第一講座) 14:30 - 16:00
3. 薬物治療モニタリングによる造血幹細胞移植成績の向上に関する研究 (H20-免疫-若手-029)  
研究代表者 大島 久美 (自治医科大学附属さいたま医療センター) 16:30 - 17:00
4. 成人難治性造血器腫瘍に対する非血縁者間の同種造血幹細胞移植法の確立に関する研究  
(がん研究助成金 総合19-1) 17:00 - 19:00  
研究代表者 森島 泰雄 (愛知県がんセンター中央病院)

6月21日(日) 午前9時～12時15分

5. アレムツズマブを用いたHLA不一致同種造血幹細胞移植療法の医師主導治験および造血幹細胞移植領域における医師主導治験発展のための研究 (H19-免疫-一般-011) 9:00 - 9:45  
研究代表者 神田 善伸 (自治医科大学附属さいたま医療センター)
6. 治療関連合併症を減少させて同種造血幹細胞移植後の生存率の向上を目指す標準的治療法の開発研究 (H20-がん臨床-一般-019) 9:45 - 12:00  
研究代表者 福田 隆浩 (国立がんセンター中央病院)
7. 成人T細胞白血病(ATL)に対する同種幹細胞移植療法の開発とそのHTLV-1排除機構の解明に関する研究 (H19-がん臨床-一般-013) 12:00 - 12:15  
研究代表者 岡村 純 (国立病院機構九州がんセンター)

6月21日(日) 午後1時～4時

8. 再発等の難治性造血器腫瘍に対する同種造血幹細胞移植を用いた効果的治療法確立に関する研究 (H19-がん臨床-一般-026) 13:00 - 14:00  
研究代表者 森 慎一郎 (国立がんセンター中央病院)
9. 同種末梢血幹細胞移植を非血縁者間で行う場合等の医学、医療、社会的基盤に関する研究 (H20-免疫-一般-017) 14:00 - 16:00  
研究代表者 宮村 耕一 (名古屋第一赤十字病院)

## 造血幹細胞移植合同班会議 研究班紹介（H21年度）

### 1. 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

(H20-免疫-一般-014)

研究代表者 森島 泰雄（愛知県がんセンター中央病院）

研究分担者 猪子 英俊、笹月 健彦、小川 誠司、村田 誠、高見明良、屋部 登志雄

[非血縁移植におけるドナーと患者の HLA をはじめとする組織適合性抗原とその違いが移植免疫反応にどのように関わっているかを明らかにし、移植成績を向上させることを目的として、JMDP 発足と同時に組織適合性研究者を中心に組織され、継承されている研究班である。]

### 2. 新しい造血幹細胞移植技術の開発に関する研究 (H20-免疫-一般-019)

研究代表者 池原 進（関西医科大学病理学第一講座）

研究分担者 小島 勢二、森尾 友宏、赤塚 美樹、一戸 辰夫、品川 克至、小川 啓恭

[本研究班では従来の造血幹細胞移植技術とは違った、新しい技術を開発し、臨床応用に役立てる。池原らが開発した骨髓細胞採取技術（灌流法）と骨髓内骨髓移植技術（IBM-BMT法）を基本とし、さらに安全で有効な新しい技術を開発し、BMTの適用範囲を拡大し、難病で苦しんでいる患者さんのための根本治療法を開発する。]

### 3. 薬物治療モニタリングによる造血幹細胞移植成績の向上に関する研究

(H20-免疫-若手-029)

研究代表者 大島 久美（自治医科大学附属さいたま医療センター）

研究分担者 伊豆津 宏二、森 有紀、山本 久史

[本研究班では、同種造血幹細胞移植で使用する薬剤について、適切な有効治療濃度の設定と投与方法の検討を行うとともに、個々の患者に対して治療の最適化をはかることを目指しています。免疫抑制剤、抗菌剤（抗ウイルス剤、抗真菌剤）を中心に検討中です。]

### 4. 成人難治性造血器腫瘍に対する非血縁者間の同種造血幹細胞移植法の確立に関する研究

(がん研究助成金 総合 19-1)

研究代表者 森島 泰雄（愛知県がんセンター中央病院）

研究分担者 宮村 耕一、豊島 崇徳、坂巻 壽、高橋 聡、加藤 俊一、谷本 光音、  
岡本 真一郎、今村 雅寛、中尾 眞二、石川 淳、森 慎一郎

[本研究班では成人臍帯血移植と非血縁末梢血幹細胞移植の位置付けを明らかにすることを最終目的とする。成人臍帯血移植の第2相試験の支援と、移植後再発率と移植関連死亡の減少を目的とした移植前治療法を検討する第II相臨床試験を実施している。さらに、臍帯血移植と非血縁骨髓移植との比較ならびに血縁者間同種末梢血幹細胞移植の後方視的解析を行うとともに、非血縁移植に伴う合併症（GVHD、免疫不全、感染症など）を軽減させるための研究を分担研究として実施している。]

### 5. アレムツズマブを用いた HLA 不一致同種造血幹細胞移植療法の医師主導治験および造血幹細胞移植領域における医師主導治験発展のための研究 (H19-免疫-一般-011)

研究代表者 神田 善伸（自治医科大学附属さいたま医療センター）

研究分担者 大橋 靖雄、中尾 眞二、千葉 茂、谷口 修一、宮村 耕一、宮本 敏浩、森 慎一郎

[アレムツズマブを用いた HLA 不一致同種造血幹細胞移植療法の医師主導治験および造血幹細胞移植領域における医師主導治験発展のための研究班では、主要なテーマとしてアレムツズマブを用いた HLA 不一致同種造血幹細胞移植療法の医師主導治験を推進するだけでなく、造血幹細胞移植診療の健全な発展のために、今後の移植領域での医師主導治験のありかたについて考察するとともに、HLA 不一致移植にかかわる包括的な研究を行っている。]

6. 治療関連合併症を減少させて同種造血幹細胞移植後の生存率の向上を目指す標準的治療法の開発研究 (H19-がん臨床-一般-019)

研究代表者 福田 隆浩 (国立がんセンター中央病院)

研究分担者 谷口 修一、松井 利充、高見 昭良、神田 善伸、鈴木 律朗、豊嶋 崇徳、

日野 雅之、池亀 和博、萩原 將太郎、山口 拓洋、森 毅彦、緒方正男、金 成元

[GVHD や感染症などの治療関連合併症は骨髄バンクや臍帯血など代替ドナーからの移植時に多い。海外で広く使われている ATG、MMF、FCN などの薬剤は、本邦では造血細胞移植領域での適応がない。本研究班ではこれらの薬剤の日本人における至適用法・用量や安全性・有効性に関するエビデンス確立と適応拡大を目指す。]

7. 成人 T 細胞白血病 (ATL) に対する同種幹細胞移植療法の開発とその HTLV-1 排除機構の解明に関する研究 (H19-がん臨床-一般-013)

研究代表者 岡村 純 (国立病院機構九州がんセンター)

研究分担者 神奈木 真理、松岡 雅雄、谷 憲三朗、豊島 崇徳、宇都宮 興、谷口 修一、田野崎 隆二、

宮崎 泰司、鶴池 直邦、今村 雅寛、谷脇 雅史、山中 竹春

[平成 12 年から高齢者層 ATL (急性型・リンパ腫型) に対する血縁者末梢血を移植幹細胞源とした臨床試験を開始した。これまでの 2 試験 (第 1 相) から、RIST の安全性と抗ウイルス療法としての有効性を証明し、標準的治療としての可能性を指摘した。現在、第 3 期試験 (血縁者末梢血による第 2 相)、および非血縁者骨髄による第 4 期試験 (第 1 相) を実施中である]

8. 再発等の難治性造血器腫瘍に対する同種造血幹細胞移植を用いた効果的治療法確立に関する研究 (H19-がん臨床-一般-026)

研究代表者 森 慎一郎 (国立がんセンター中央病院)

研究分担者 田野崎 隆二、内田 直之、中尾 眞二、山本 弘史、山下 卓也、長藤 宏司、

河野 嘉文、加藤 裕久

[薬力学/薬物動態学的試験を中心とした臨床試験を実施し、造血幹細胞移植時に用いられる移植前治療薬、免疫抑制剤などの適正使用の方法論を確立する事を目指す研究班です。今回の班会議では、これからのプロトコール研究の検討、ならびに新規研究課題の検討を予定しています。班員に限らず、新たな研究の提案があれば事前にお知らせください。]

9. 同種末梢血幹細胞移植を非血縁者間で行う場合等の医学、医療、社会的基盤に関する研究 (H20-免疫-一般-017)

研究代表者 宮村 耕一 (名古屋第一赤十字病院)

研究分担者 小寺 良尚、日野 雅之、岡本 真一郎、田中 淳司、長藤 宏司、神田 善伸

[本研究では厚生労働科学研究「血縁者同種末梢血幹細胞ドナーに関わる調査」で確認されたドナーの安全性を基に、非血縁者間末梢血幹細胞移植を本邦で速やかに開始するために、ドナー適格基準、施設基準、効率的な採取方法などを研究し、速やかにこれを開始する医学、医療、社会的基盤を整える。]

以上

6月20日(土)  
午後

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

2009年6月20日

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 班会議資料

## 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

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

【背景】近年本研究班の成果として、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 (Blood 2007)。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。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・移植予後に相関し、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。今回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。【方法】JMDFPを介したUR-BMT5210例を多変量解析の手法を用い、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度急性 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、HLA 一致群と各不適合組合せの HR、95%CI を比較検討し、許容可能な HLA 不適合組合せを検討する事を試みた。【結果】HLA-A 座では HLA 一致群が HR=0.38 (95%CI: 0.28-0.52) あるのに対し、A2402\_2420(ドナーが HLA-A\*2402、患者が HLA-A\*2420 を持つ不適合組合せ)で HR=0.32 (95%CI: 0.16-0.66) (P=0.002)、A2601\_2602 で HR=0.36 (95%CI: 0.14-0.89) (P=0.028)と、許容可能な不適合組合せの候補となり得る組合せが 2 組存在した。HLA-B, C, DRB1, DQB1, DPB1 座でも同様に検討した結果、同様の組合せが計 23 組存在した。【結語】今回の解析で許容可能な不適合組合せを提示し得る事が示唆された。今後、本解析結果をもとに、移植予後に関する解析も合わせて検討し、許容可能な遺伝子型 HLA 不適合組合せに対するコンセンサスを形成し、HLA 一部不一致ドナー選択のアルゴリズムを再構築することにより、移植適合ドナーを拡大させる事ができると考えられた。

平成21年6月20日

「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」

名古屋大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学

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一方、白血病の再発率を低下させることが報告されている。GVHD および GVL 効果などの同種移植後免疫反応は、主としてドナー T リンパ球によって誘導される。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 GVHD または GVL 効果が認められた患者の体内において、不適合 Cw 分子に対する 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。

我々は、HLA-A, B, DRB1 適合、Cw1 座不適合（患者 Cw\*0303、ドナー Cw\*0801）の非血縁ドナーから骨髄移植を受け、GVHD および GVL 効果を認めた急性リンパ性白血病患者の末梢血から CTL クローンを分離し、*in vitro* 解析を行った。前回、これらの CTL クローンは、この不適合 HLA-Cw\*0303 分子をペプチド依存性に認識していることを報告した。今回、これらの CTL と GVHD あるいは GVL 効果との関連について解析し、臨床的意義の検討をさらに加えたので報告する。



日本列島人の HLA-A~DPB1 アリル型ハプロタイプ頻度  
==血液腫瘍患者および家族の HLA 組み換え率は高いか?==

佐治博夫、丸屋悦子

HLA 研究所

造血幹細胞移植における適合性は、HLA の一致だけではなく、ハプロタイプ一致も重要である(森島聡子ら)。NK KIR リガンドや移植成績の観点から HLA-C 適合性が重視されるようになり、HLA-DPB1 適合性が移植予後に与える影響が注目されている。また、血液腫瘍(白血病など)細胞は高率に組み換えや転座などの染色体異常が認められ、これらの患者または家族は、遺伝子組み換え率が高い可能性が示唆される。患者を含む HLA 家族データからハプロタイプ頻度と、組み換え率、遺伝子間距離などを計算し、白血病患者および家族において HLA 座間組み換え率が高いかどうかを検証する。

【作業仮説(帰無仮説)】

1、血液腫瘍患者家族の HLA ハプロタイプ頻度は健常人群と異なる。2、血液腫瘍患者家族の HLA 座間組み換え率は高い。3、血液腫瘍患者はその同胞より HLA 座間組み換え率が高い。4、精子と卵子の HLA 座間組み換え率は差がない。

【材料・方法】

造血幹細胞移植ドナー検索を目的とした HLA タイピングを実施した家系のうち、ハプロタイプ頻度(直接カウント法)に用いたのは、HLA-A,C,B,DRB1: 1,389 家系、HLA-A, C, B, DRB1, DQB1, DPB1: 727 家系である。

組み換え率については 1、血液腫瘍患者を含む同胞 3 名以上が得られた家族データ(A-DRB1: 480 家系、A-DPB1: 401 家系)からハプロタイプ頻度を、既報健常人群ハプロタイプ頻度と比較。2、座間組み換え率、遺伝子間距離(cM)を計算し、既報データと比較。3、患者/健常同胞間および精子/卵子間の組み換え率を比較した。

【結果・考察】 (R=DRB1、Q=DQB1、P=DPB1)

- 1、ハプロタイプ頻度、HLA-A-R 座で 1,389 家系 (5,308 haplotypes, 1,552 種)、HLA-A-P 座で 727 家系(2,826 haplotypes, 1,460 種)のアリル型ハプロタイプ頻度解析の結果、トップ 15 を表 1(A-R) と表 2(A-P) に示す(次ページ)。当研究所のホームページにハプロタイプ頻度とアリル頻度を公開している。<http://www.hla.or.jp/hapro/top.html>。今後もデータを蓄積し定期的に更新したい。
- 2、A-Q ハプロタイプ頻度(別演題で提示)は既報健常人ハプロタイプと有意差ない。A-P, Q-P ハプロタイプ頻度は比較対象なく差違は不明である。
- 3、遺伝子距離(cM): A-C: 0.47 (0.6-0.8), A-B: 0.57 (0.7-0.9), A-R(Q): 1.35 (1.5-2.0), A-P: 2.74 (2.7-3.1), C-B: 0.10 (0.1), B-R(Q): 0.78 (0.9-1.0), B-P: 2.06 (2.2-2.5), R(Q)-P: 1.28 (1.4-1.5)。既報値と有意差を認めない。( )内は既報値。
- 4、患者/健常同胞 組み換え率 Odd ratio: A-P: 0.957 (p=0.896), A-R: 2.05 (p=0.08), R-P: 0.242

(p=0.039)。

5、精子/ 卵子 組み換え率 Odd ratio: A・P: 0.33 (p<0.001), R・P: 0.10 p<0.001) 。

【結論】

- 1、日本列島人に進化的に保存されている(頻度上位の)、HLA - A,C,B,R ハプロタイプ頻度は、既報健常人ハプロタイプ頻度と大差なく、仮説 1 は棄却される。よって、得られたハプロタイプ頻度は、日本列島人の頻度として利用できる。ただし、Q・P ハプロタイプについては、既報健常人データがなく今後の課題となる。
- 2、血液腫瘍患者家族群の HLA 座間遺伝子距離は、既報と差がなく(むしろ低値)、仮説 2 は棄却できる。よって、血液腫瘍患者の家族における HLA 座間組み換え率は高いとはいえない。
- 3、血液腫瘍患者とその同胞間の A・P 組み換え率は差がない。仮説 3 は棄却される。家族内において患者の HLA 座間組み換え率が高いとはいえない。ただし Q・P 組み換え率は、健常群において高い (p<0.05)。今後の検討課題である。
- 4、卵子は、精子より組み換え率が有意に高い (p<0.001)。よって、仮説 4 は棄却され、HLA 座間組み換えハプロタイプは、母由来ハプロタイプに起こりやすい。

表 1 n=1, 389

順	HLA-A,C,B,DRB1	頻度%
1	*2402-*1202-*5201-*1502	8.57
2	*3303-*1403-*4403-*1302	4.31
3	*2402-*0702-*0702-*0101	3.50
4	*2402-*0102-*5401-*0405	2.43
5	*0207-*0102-*4601-*0803	1.98
6	*1101-*0401-*1501-*0406	1.28
7	*2402-*0102-*5901-*0405	1.06
8	*1101-*0102-*5401-*0405	0.77
8	*2601-*0304-*4002-*0901	0.77
10	*2402-*1402-*5101-*0901	0.72
11	*2402-*0801-*4006-*0901	0.68
12	*3101-*1402-*5101-*0802	0.66
13	*2402-*0102-*4601-*0803	0.56
14	*0206-*0801-*4006-*0901	0.55
15	*1101-*0702-*3901-*0803	0.53

表 2 n=727

順	HLA-A,C,B,DRB1,DQB1,DPB1	頻度%
1	*2402-*1202-*5201-*1502-*0601-*0901	6.90
2	*3303-*1403-*4403-*1302-*0604-*0401	2.83
3	*2402-*0702-*0702-*0101-*0501-*0402	2.62
4	*2402-*0102-*5401-*0405-*0401-*0501	1.98
5	*1101-*0102-*5401-*0405-*0401-*0501	0.92
6	*0207-*0102-*4601-*0803-*0601-*0501	0.89
7	*2402-*1202-*5201-*1502-*0601-*0201	0.78
8	*1101-*0401-*1501-*0406-*0302-*0201	0.71
9	*2402-*0102-*5901-*0405-*0401-*0402	0.67
10	*0207-*0102-*4601-*0803-*0601-*0202	0.60
11	*2402-*0702-*0702-*0101-*0501-*0501	0.50
12	*2601-*0304-*4002-*0802-*0302-*0501	0.46
13	*1101-*0401-*1501-*0406-*0302-*0501	0.46
13	*2402-*1202-*5201-*1502-*0601-*0501	0.46
13	*3303-*1403-*4403-*1302-*0604-*0201	0.46

## Multi-SNP 解析による HLA haplotype の保存性の検討

森島聡子(1), 小川誠司(2), 柏瀬貢一(3), 笹月健彦(4), 森島泰雄(1)

(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)国際医療センター

### 【背景】

前回の班会議にて、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

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。

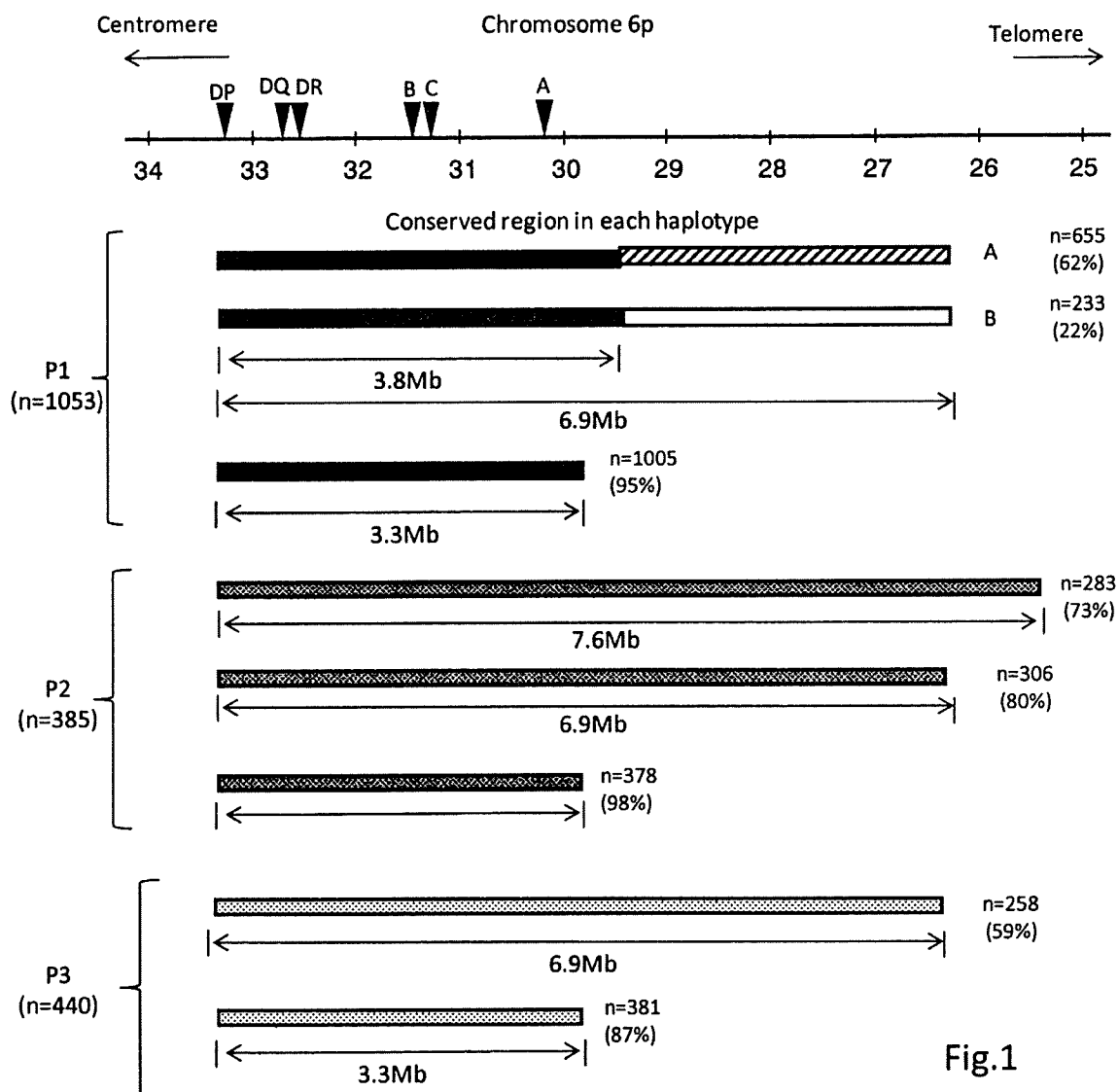


Fig.1

【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。

# Screening of the immunogenome with microsatellite markers in pooled DNA for non-HLA genetic associations with GVHD: Preliminary results )

Christian Harkensee, Makoto Onizuka, Akira Oka, Hidetoshi Inoko

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

## Background

Graft-versus-Host Disease (GVHD) remains the most important barrier to successful haematopoietic stem cell transplantation (HSCT), leading to significant morbidity and mortality. While clinical factors (i.e. conditioning regimen, age, gender, GVHD prophylaxis regimen) play an important role in GVHD pathogenesis; these factors act on a genetic background that is not only determined by matching of the HLA antigens between recipient and donor, but also by genetic variations in immune response genes.

To date, around fifty non-HLA genes have been implicated with GVHD or other HSCT outcomes, using the candidate gene approach. This study aims to undertake a more comprehensive analysis of the immunogenome (the gene set of the immune system) in relation to GVHD following HSCT in Japanese patients with acute leukaemia.

## Methodology

The methodology has been described and presented before (JMDP meeting 17 January 2009 in Tokyo). In summary, we are studying 1220 donor and recipient pairs for genetic association with GVHD using a three-step screening and confirmation process. The first screening step, which has been completed, involved 460 pooled recipient-donor pairs, which were typed for 4000 microsatellite markers. Analysis included intrinsic risk of recipient and risk from donor for severe GVHD, as well as risk from mismatch between donors and recipients. The second screening step, which is currently in progress, replicates the first step, but independently on a separate set of 460 recipient-donor pairs, typing only markers that were significantly associated with GVHD during the first screening. The third, confirmatory step (on 400 pairs) will study the associated microsatellite loci applying individual typing of SNP markers.

## Results

Here we are presenting the results of the first screening step, representing the preliminary results of our study before confirmation by second pooled screening and individual typing.

In the first screening, each of the four directions of analysis (comparing each recipients with GVHD 0-I with recipients GVHD II-IV, their donors accordingly, and mismatch between donors and recipients GVHD 0-I and GVHD II-IV) yielded a rate of approximately 20% positive markers. This high proportion is expected because no multiple testing correction was applied in order to achieve a high sensitivity for potentially associated loci in the first screening. Hence, a total of 1994 GVHD-associated markers are currently re-typed in the second screening, which will provide the required specificity by the independent testing on a separate set of 460 recipient-donor pairs, and application of multiple testing statistics.

We will present indicators for validity of the first screening results, which include highly significant p-values, clustering of marker associations at specific gene loci, and individual SNP typing of selected loci.

# 移植免疫反応と遺伝子多型の解析

J.ルイス・エスピノーザ 高見昭良 中尾真二



金沢大学

## 背景

■ NKG2Dは、遺伝子多型により、高NK活性型(NKG2D-HNK1)・低NK活性型(NKG2D-LNK1)がある<sup>1</sup>。

■ HLAアリル一致非血縁者間骨髄移植の解析で、HNK1陽性ドナーから移植を受けた患者の生存率(OS)・移植関連死亡率(TRM)は有意に優れていた(図1-2)<sup>2</sup>。

1 T. Hayashi et al. *Cancer Res* 66, 563 (Jan 1, 2006).  
2 J. L. Espinoza et al. *Haematologica* (in press), (2009)

図1. ドナーNKG2D多型とOS

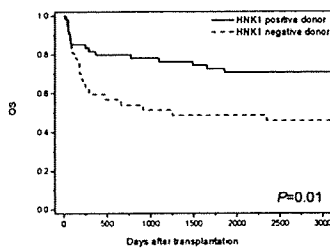
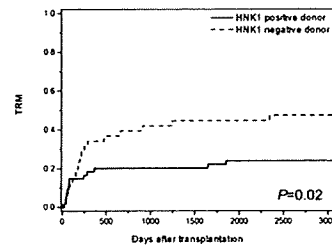


図2. ドナーNKG2D多型とTRM



## 目的と方法

■ 移植免疫におけるNKG2D遺伝子多型の影響を検討するため、NK細胞の機能解析を行った。

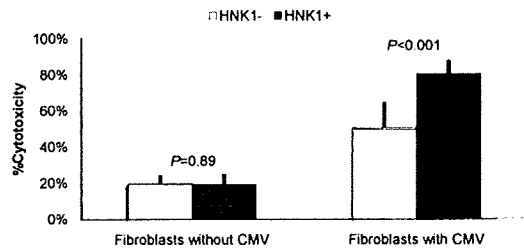


図3. hCMV感染線維芽細胞に対するNK細胞の細胞傷害活性  
健康人のNK細胞をエフェクターとして、ヒトCMV感染線維芽細胞に対する細胞傷害活性を検討した。HNK1陽性NK細胞は、HNK1陰性NK細胞に比べ、高い細胞傷害活性を示した。



造血幹細胞移植合同班会議(厚生労働科学研究) 平成21年6月20日  
 厚生労働科学研究免疫・アレルギー疾患等研究事業  
 「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」班

分担研究課題

**NK細胞受容体等の解析及び  
HLAタイピング法の構築と検証**

東京都赤十字血液センター

屋部登志雄、平安恒幸、峯元睦子、柏瀬貢一

1

**平成21年度解析計画**

1. NK受容体とリガンド遺伝子型適合性

2. サイトカインと受容体遺伝子多型

共同研究者:

東海大学 鬼塚真仁、Christian Harkensee、猪子英俊  
 HLA研究所 丸屋悦子、佐治博夫

3. HLAタイピング法の構築と検証  
及び検体保存事業協力

2

1. NK受容体とリガンド遺伝子型適合性

**KIR解析**

これまでJMDPのHLA-C抗原不一致症例についてC抗原をリガンドとするKIR2DLおよび2DS遺伝子型と移植成績についての解析を行ってきた。今年度はHLA-Bw4、A3、A11特異性を認識するKIR3DLおよび3DS遺伝子について同様に解析を行っている。またHLA一致症例におけるKIRリガンド型、KIR遺伝子型、ハプロタイプの影響についても解析を行う予定である。

**LILR解析**

HLAクラスII抗原をリガンドとするLILRファミリー分子は急性GVHD重症化との関連が報告されたマウスPIR分子のヒトホモログである。健常者のLILRB2、LILRA3遺伝子解析から機能的多型を見出したので、これらと移植成績との関連を解析している。

3

2. サイトカインと受容体遺伝子多型

急性GVHD発症にはサイトカインストームが重要な役割を果たしている。炎症性サイトカインが反応を亢進する一方、抑制性サイトカインはアロ反応や炎症反応を抑えGVHDの発症を制御すると推定される。

JMDPのHLA6座一致移植症例の解析から抑制性サイトカインIL-10遺伝子プロモーター領域3か所のSNPハプロタイプと急性重症GVHD発症と無病生存率とが関連することを昨年度報告した。海外での血縁者同移植症例での報告と現象としてほぼ同様な結果だが、関連するハプロタイプは全く異なっていたことから、近傍に責任領域が存在すると考えられる。そこでさらに周辺領域のSNPおよびマイクロサテライト多型解析を東海大学と共同で行っている。

IL-10受容体の多型解析についても同様にプロモーター多型の組み合わせ効果について検討している。

4

3. HLAタイピング法の構築と検証  
及び検体保存事業協力

★HLAタイピング法の構築と検証

- ・蛍光ビーズ法によるHLA-C座遺伝子タイピング (SBT法の比較検証)

★検体保存事業への協力

- ・ゲノムDNA抽出
- ・HLAタイピング (HLA-A,B,C,DRB1,DQB1,DPB1)
- ・全ゲノム増幅(WGA)及び解析検体セット化

5

**HLA-Cタイピング系の検証**

[方法]

健常者503人を対象として、自家製SBT試薬にてHLA-C座のタイピングを実施した。また、蛍光ビーズ法による「WAKFlow HLAタイピング試薬 HLA-C(湧永製薬)」のタイピングも併せて実施した。

[結果・考察]

503件中、1例に新規アリルが検出された(Cw\*0303V)。Cw\*0303Vは非同義置換を伴うアリルで「WAKFlow HLAタイピング試薬 HLA-C」では通常のCw\*0303と判定された。この1例を除き蛍光ビーズ法で得られた結果とSBT法との結果はすべて一致した(一致率99.8%)。このことから、SBT法と比べ多数検体処理能に優れた蛍光ビーズ法においても、HLA-C座の検査が可能であることが示唆された。

allele	N	GF(%)	allele	N	GF(%)
Cw*0102	157	19.8	Cw*0702	143	14.2
Cw*0103	2	0.2	Cw*0704	9	0.9
Cw*0302	7	0.7	Cw*0801	78	7.8
Cw*0303	125	12.4	Cw*0803	14	1.4
Cw*0303V	1	0.1	Cw*1202	130	12.9
Cw*0304	118	11.5	Cw*1218	1	0.1
Cw*0401	42	4.2	Cw*1402	59	5.9
Cw*0501	5	0.5	Cw*1403	75	7.5
Cw*0602	4	0.4	Cw*1502	38	3.8

6



造血幹細胞移植合同班会議（厚労科学研究）

新しい造血幹細胞移植技術の開発に関する研究（H21-免疫-一般-019）

研究代表者 池原 進 （関西医科大学病理学第一講座）（14:30-16:00）

14:30-14:45

1. 革新的な幹細胞移植技術（“灌流法+IBM-BMT”）の最新知見：  
モデル動物のデーター

池原 進（関西医科大学病理学第一講座）

14:45-15:00

2. 新移植技術（“灌流法+IBM-BMT”）の Phase I/II Study のための臨床プロト  
コール案

吉原 哲、小川啓恭（兵庫医科大学内科学講座血液内科）

15:00-15:10

3. 骨移植片の生着に HLA 抗体が与える影響の検討

一戸 辰夫（京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科）

15:10-15:20

4. 選択的 GvL 反応の誘導

赤塚美樹、鳥飼宏基（愛知県がんセンター研究所・腫瘍免疫学部）

15:20-15:30

5. 免疫学的再構築と抗原特異的 T 細胞増殖を目的とした移植後養子免疫療法

森尾友宏<sup>1,2</sup>、大山敦<sup>2</sup>、落合央<sup>2</sup>、峯岸志津子<sup>2</sup>、梶原道子<sup>2</sup>、清水則夫<sup>2,3</sup>

（東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・発生発達病態学分野<sup>1</sup>、

同・医学部附属病院細胞治療センター<sup>2</sup>、同・難治疾患研究所・ウイルス治療学<sup>3</sup>）

15:30-15:40

6. 移植後 CD20 陰性 EB ウイルスリンパ増殖症に対する治療法の開発：  
EB ウイルス特異的細胞障害性 T 細胞の利用

高橋義行、小島勢二（名古屋大学大学院医学系研究科 小児科学）

15:40-15:50

7. マウスモデルを使った造血幹細胞の静脈内と骨髄内輸注法の比較

品川克至、前田嘉信（岡山大学血液・腫瘍内科）

15:50-16:00

総合討論

# 革新的な幹細胞移植技術（“灌流法+IBM-BMT”）の最新知見

## I. モデル動物のデーター

関西医科大学病理学第一講座

池原 進

### (1) Disorders of Hemopoietic Stem Cells (HSCs)

#### 1) 関節リウマチ(RA)のモデル：SKG マウス(Treg↓)

RA の発症を予防 (J. Autoimmunity 32: 216, 2009) 並びに治療可能 (投稿)

予定)。現在、病気の transfer 実験を実施中。

#### 2) 自己免疫性膵炎(AIP)のモデル：WBN/Kob ラットを用いて膵炎を予防

(Clin. Exp. Immunol. 152: 1-12, 2008)。現在、治療実験を実施中。

### (2) Disorders of Mesenchymal Stem Cells (MSCs)

骨粗鬆症、肺気腫は、MSC disorders である (J. Autoimmunity 30: 108-115, 2008)。

Age-associated diseases : アルツハイマー病(SAMP8 or SAMP10)を予防。

### (3) Therapy of Malignant Tumors


胸腺移植を併用すると GvHD を予防するが、GvT 効果を温存。

## II. 臨床プロトコールについて

兵庫医科大学内科学講座血液内科

吉原 哲、小川啓恭

(1)新移植技術（“灌流法+IBM-BMT”）の Phase I/II Study のための臨床プロトコール案。



「灌流法により採取された骨髄細胞を用いた、骨髄内骨髄移植療法」臨床試験プロトコル案

兵庫医科大学 吉原 哲、小川啓恭

### 本臨床試験のrationale

- 「灌流法による骨髄採取＋骨髄内骨髄移植」の有用性については、動物モデルにおいて多数の報告により示されている。
- 骨髄内 CD34陽性細胞純化移植の有用性について、本邦より症例報告がなされている。
- 骨髄内臍帯血移植については、欧米で臨床試験が進行している。

### 臨床応用の現状

- 中国でβ-thalassemia majorの女兒に対してHLA2抗原不適合の父親より1例施行。
- 自家移植の系において、灌流法による骨髄採取の安全性を検討する臨床試験を施行(関西医大、1例)。
- 以上より、「灌流法による採取」の安全性については、概ね問題ないと考えられる。

### 「灌流法による骨髄採取＋骨髄内骨髄移植」によって期待される利益

- ドナーにおける利益
  - 骨髄採取に伴う負担の軽減  
(採取時間の短縮、自己血貯血不要、全身麻酔も不要?)
- レシピエントにおける利益
  - 拒絶・生着不全のリスク低下
  - GVHDの軽減
  - 造血・免疫回復の改善

### 臨床試験の骨子(コンセプト)

- 「灌流法による骨髄採取＋骨髄内骨髄移植」を一体の治療として行う。
  - 灌流法による骨髄採取 ⇒ T細胞↓、ストローマ細胞↑
  - 骨髄内骨髄移植 ⇒ 肺へのトラップ↓、免疫寛容誘導
- ドナーについては、「灌流法による骨髄採取」の安全性、レシピエントについては、「骨髄内骨髄移植」の安全性、および「灌流法による骨髄採取＋骨髄内骨髄移植」の有効性について評価する。

### 試験の目的

- 安全性および有効性の検討(臨床第I/II相試験)
- ドナー
  - 主要評価項目:灌流法による骨髄採取に伴う安全性をprimary endpointとする
- レシピエント
  - 主要評価項目:第I相試験では、骨髄投与法(骨髄内骨髄移植)の安全性をprimary endpointとする。第II相試験では、ドナー型生着率をprimary endpointとする。

## 対象疾患

1. 急性骨髄性白血病・急性リンパ性白血病  
病期: 第2寛解期以降の寛解期、初回寛解不能、非寛解期。  
骨髄における芽球が30%未満。
2. 骨髄異形成症候群、WHOにおけるCMMoL  
IPSSでintermediateまたはhighに分類される症例。寛解後の再発例。
3. 悪性リンパ腫  
初回治療(第1種類目)でPRに至らない、第1再発後の第1種類目の救済療法でPRに至らない、第2再発後、造血幹細胞移植後も寛解に至らない症例または再発例

## レシピエント適格条件

1. 登録時年齢が12歳以上65歳以下。
  2. 本臨床試験につき、説明の上文書による同意が得られた被験者。
  3. 血縁(兄弟、親または子)に、HLA適合を含む、HLA haplotypeの一致したGVH方向3抗原不適合までのドナーを有する症例  
(HLA2-3抗原不適合ドナーから移植を行う場合は、骨髄バンク(JMDF)においてHLA-A,B,DR血清型一致かつ遺伝子型でHLA-A,B,DRB1の不一致が1座以内の非血縁ドナーを有さないか、病勢が強く早期の移植が必要であると考えられる症例)
  4. PSがECOGの基準で0~1の症例。
  5. 心臓、肺、肝臓、腎臓に重篤な臓器障害がない症例。
- 以下略

## 骨髄採取法

- 全身麻酔下で両腸骨から灌流法で採取する。
  - 2本の骨髄穿刺針を腸骨に約3-5cmの間隔で穿刺し、生理食塩液30 mlを一方よりゆっくり注入し、同時に対側から軽く吸引する。この時、採取側シリンジには、ヘパリン(10~30 U/mlとする)加生理食塩液を約0.5 ml含む。
  - 採取は、骨髄の有核細胞数 $2.0\sim 3.0 \times 10^8$ 個/kg以上の細胞数を目標として行う。ただし、 $1.0 \times 10^8$ /kg以上の細胞数が確保できれば、骨髄内骨髄移植法による臨床試験を継続する( $1.0 \times 10^8$ /kgの細胞数が確保できなかった場合は、本臨床試験からは脱落とし、従来の骨髄吸引法など他の方法を施行する)。

- 移植前処置:
  - 特に規定せず、骨髄破壊的、RICとも可とする。
- GVHD予防
  - 特に規定しないが、HLA適合ドナーからの移植では、CSP+short term MTXを基本とし、HLA不適合ドナーからの移植では、TAC+ステロイドを基本とした方法を推奨する。

## 骨髄投与方法

- 脛骨または腸骨の骨髄内に移植する。
  - ドナーから灌流法で採取された骨髄細胞は、バッグ遠心法により無菌的に血漿除去を行った後、約20~30mlの生理食塩水に再浮遊させる。
  - 骨髄細胞を脛骨または腸骨の骨髄内に投与する。
    - 可能であれば、投与前にレシピエントの骨髄から約10ml~15mlの骨髄液を採取する(骨髄内への注入時の圧を減じるため)。
    - 骨髄細胞を半分ずつ2本のシリンジに分け、それぞれを左右の骨髄内に注入する。注入前には、ミダゾラム等による鎮静を行う。穿刺部に対しては、圧迫止血を行い注入した骨髄液が出血と共に漏れないように注意する。

## まとめと今後の方針

- 本治療法は、ドナーの負担を軽減し、かつレシピエントにも利益をもたらす可能性があり、将来的には、標準的治療法となり得るものである。そのため、臨床試験としても、HLA適合移植を含めたものとした。
- プロトコル確定し、倫理委員会の承認が得られれば、本年中に臨床試験を開始予定(関西医大等)。