

-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。

「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.

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

「NK細胞受容体およびサイトカイン遺伝子多型と非血縁者間骨髄移植成績」

東京都赤十字血液センター 柏瀬貢一、平安恒幸、三好佳名子、屋部登志雄
愛知県がんセンター病院 松尾恵太郎、川瀬孝和、森島泰雄

1、KIR遺伝子型、HLAリガンド型適合性

昨年度までに非血縁者間骨髄移植症例においてHLA-C抗原のKIRリガンド型（C1, C2）GVH方向不適合の場合に急性GVHDの重症化および全生存率の低下が見られること⁽¹⁾、その効果はATG投与およびドナーKIR2DS2遺伝子の有無に影響されること⁽²⁾を報告してきた。今年度からはHLA-A, B抗原上に存在するKIRリガンド（Bw4I80）と認識受容体KIR3DL1/S1遺伝子の組み合わせについての解析を開始している。今回はKIRリガンドGVH方向不適合症例のドナーについてKIR3DL1/S1アレルタイピングを実施し移植成績との関連を解析した。

2、LILR遺伝子型多型

マウスMHCクラスI抗原認識受容体PIR-Bが骨髄移植急性GVHD重症化と関連することを東北大学の中村らが報告している⁽³⁾。ヒトの相同分子と考えられるLILRはNK, DC, 顆粒球細胞などで発現する活性化型ならびに抑制型の11種類からなるHLAクラスI抗原認識ペア型受容体ファミリーである。このうち機能的にPIR-Bと類似するLILRB2に注目し、遺伝子多型解析系を構築し健常者を解析し細胞表面高発現性と関連するSNPを検出した⁽⁴⁾。このSNPについてHLA6座アレル一致非血縁者間骨髄移植症例ペアを判定し移植成績との関連を統計解析した。

3、サイトカイン/サイトカイン受容体遺伝子多型

昨年度までに非血縁者間骨髄移植において、患者の抑制性のサイトカインであるIL-10遺伝子のプロモーター領域3箇所SNPハプロタイプが急性重症GVHD発症と関連することを報告した。血縁者間HLA一致骨髄移植においてはIL-10型に加えてIL-10受容体遺伝子多型も成績に影響することが報告されており（Linら⁽⁵⁾、佐治ら⁽⁶⁾）、今年度はHLA6座アレル一致非血縁者間骨髄移植症例ペアのIL-10受容体SNP（IL-10R2, rs2834167）を判定し移植成績との関連について統計解析を行った。

4、HLAタイピング法の構築と検証

JMDPではドナー登録時におけるHLA-C座検査導入が検討されており、高精度DNAタイピング法によるHLA-C座の検査法について比較検討した。健常者503人を対象として最も高精度とされているSBT法と現在HLA-A, -B, -DR査に用いられている蛍光ビーズ法とによる大規模頻度調査を実施した

5、検体保存事業協力

後方視野的研究のためにJMDPが収集、保存する患者ドナー検体の血液から抽出されたDNAを用いてHLA-AからDPの6座を蛍光ビーズ法でアリルタイピングしており、本年は2006年度に保存された1300検体について行った。また今後の解析のための試料確保を目的に、これまでに保存されていたDNAの全ゲノム増幅（WGA）系の構築と検証作業および解析希望検体セットをロボットシステムで作成、配布する系の構築作業（東海大学担当）にも協力した。

文献

1. Morishima Y et al. 2007. Effects of HLA Allele and Killer Immunoglobulin-Like Receptor Ligand Matching on Clinical Outcome in Leukemia Patients Undergoing Transplantation With T-cell-Replete Marrow From an Unrelated Donor. *Biol Blood Marrow Transplant* 13: 315-28
2. Yabe T et al. 2008. Donor killer immunoglobulin-like receptor (KIR) genotype-patient cognate KIR ligand combination and antithymocyte globulin preadministration are critical factors in outcome of HLA-C-KIR ligand-mismatched T cell-replete unrelated bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 14: 75-87
3. Nakamura A et al. 2004. Exacerbated graft-versus-host disease in Pirb-/- mice. *Nat Immunol* 5: 623-9
4. Hirayasu K et al. 2008. Evidence for natural selection on leukocyte immunoglobulin-like receptors for HLA class I in Northeast Asians. *Am J Hum Genet* 82: 1075-83
5. Lin MT et al. 2005. Genetic variation in the IL-10 pathway modulates severity of acute graft-versus-host disease following hematopoietic cell transplantation: synergism between IL-10 genotype of patient and IL-10 receptor beta genotype of donor. *Blood* 106: 3995-4001
6. 佐治ら. IL-10/IL-10 Receptor β 多型性と急性GVHD. 平成17年度厚生労働研究班報告

小腸特異的ケモカイン受容体遺伝子 CCR9 の一塩基多型は皮膚急性 GVHD 発症と関連する

稲本賢弘、村田 誠、勝見 章

名古屋大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学

【緒言】CCR9 はリンパ球が小腸特異的に homing する際に発現する受容体である。我々はこの遺伝子 CCR9 の nonsynonymous な一塩基多型の 1 つである 926A/G に着目し、同種移植においてドナー CCR9 の遺伝子型が臓器特異的な急性 GVHD 発症および移植予後に及ぼす影響を解析した。【対象と方法】1987 年から 2006 年に連続的に施行された HLA 完全一致同胞間同種移植のうち CsA+MTX を GVHD 予防法とする非 T 細胞除去移植を対象とした。ドナーの CCR9 926A/G 遺伝子型は PCR-RFLP 法を用いて決定した。臓器別急性 GVHD 発症率、II 度以上の急性 GVHD 発症率、生存率、再発率、非再発死亡率に影響する因子を Cox 比例ハザードモデルを用いて解析した。共変数は CCR9 遺伝子型、年齢、RIST、TBI、疾患リスク、移植前寛解状態、移植片種（骨髄/末梢血幹細胞）とした。【結果】症例数は 167 例。年齢中央値 38 歳（15-62 歳）、疾患は悪性疾患 148 例、良性疾患 19 例であった。遺伝子型は AA 型 94%、AG 型 6%であった。急性 GVHD は I 度 22%、II 度 12%、III 度以上 6.6% で認めた。AG 型は stage2 以上の皮膚急性 GVHD 発症率と有意な相関を示したが(hazard ratio 4.6; 95%CI, 1.7-12)、腸・肝臓の急性 GVHD 発症率、II 度以上の急性 GVHD 発症率、生存率、再発率、非再発死亡率とは有意な相関が見られなかった。急性 GVHD を発症した 69 例に限って検討しても AG 型は stage2 以上の皮膚急性 GVHD 発症率のみと有意な相関を示した(hazard ratio 3.3; 95%CI, 1.2-8.7)。遺伝子型によるリンパ球の機能的相違を明らかにするため、レトロウイルスベクターを用いて Jurkat 細胞株にそれぞれの遺伝子型の cDNA を導入した。走化性試験を施行したところ、926G 導入細胞は 926A 導入細胞と比べて走化性が高いことが示された。【考察】CCR9 の遺伝子型が腸ではなく皮膚の急性 GVHD 発症と相関したことは興味深い。最近の報告によれば、ある臓器に GVHD を起こすリンパ球が生じる場所は特定ではなく、様々な臓器の二次リンパ組織でありうるとされる。腸管のパイエル板は抗原提示の場として重要であり、CCR9-926G の遺伝子型によってドナーリンパ球のパイエル板への homing 能が増すことで腸以外の臓器の急性 GVHD 発症率に差が生じた可能性がある。

HLA 一致同胞間移植における予後因子、IL-6、MBL-2 の SNPs 多型性
佐治博夫、丸屋悦子、特定非営利活動法人 HLA 研究所

HLA 以外の予後因子を探るため、マイナー組織適合性抗原適合性や、接着分子の SNPs 多型性、各種サイトカインの SNPs 多型性、自然免疫関連物質の SNPs 多型性などと、HLA 一致同胞間移植の予後との関連を検索している。今回は炎症性サイトカインである IL-6 と、自然免疫関連物質である MBL-2 (mannose binding lectin 2) の SNPs を検討した。

方法と材料

- 1、IL-6 の SNPs (-572(G/C),-174(G/C)) は、自から開発した Luminex 法 (未発表) でタイプした。IL-6 のプロモーター領域には -597 にも SNPs(G/A)があるが、-174 の SNPs と強い連鎖不平衡があり、-174 のタイピングから推定した。
- 2、MBL-2のSNPs (-619,-290,-66, cdn52, cdn54, cdn57) を自ら開発したLuminex法 (Human Immunology 69 (2008) 877-884)によりタイプし、表2により、High producer, Intermediate producer, Low producer, Deficiency に分類した。
- 3、HLA 一致同胞間移植ペア 91 例の DNA を被検体とした。a-GVHD と一年以内の生存により群わけをして解析した。感染についてはデータに不備があり解析できなかった。

結果 1、表 1、IL-6 SNPs の頻度

Position	Nucleic acid	Japanese N=109	Caucasian N=45	Position	Nucleic acid	Japanese N=109	Caucasian N=45
-174 or -597	G/G	1.00	0.40	-572	G/G	0.05	0.95
	G/C	0	0.42		G/C	0.45	0.05
	C/C	0	0.18		C/C	0.49	0
	G	1.00	0.61		G	0.28	0.98
	C	0	0.39		C	0.72	0.02

日本人には-174 の多型性はないが、-572 に多様性がある。GGG ハプロタイプは日本人は 28%、白人は 60%に検出される。(GGG ハプロタイプは IL-6 low producer とされる)

結果 2、表 2、MBL-2 SNPs ハプロタイプとその機能

Function	Promoter			Exon 1			Frequency			
	-619	-290	-66	52	54	57	Japan. n=57		Cauc. n=49	
High producer	C	G	T	C	G	G	0.079	0.483	0.163	0.449
	G	G	C	C	G	G	0.403		0.286	
Intermed	C	G	C	C	G	G	0.132	0.132	0	0
Low pro.	C	C	C	C	G	G	0.105	0.105	0.265	0.265
Deficiency	C	G	C	C	A	G	0.263	0.263	0.133	0.255
	C	G	T	C	G	A	0		0.020	
	G	G	C	T	G	G	0		0.102	

MBL-2 のプロモーターの 3 箇所、Exon 1 の 3 箇所の SNPs のハプロタイプは 7 種あり、High-, Intermediate-, Low- producer および、Deficiency に分類できる。High producer (45~48%) と Deficiency (26%) の頻度は人種で大差はない。

結果 3、表 3、GVHD と Donor の IL-6 SNPs (2×2 表)

	GGG(+)	GGG(-)	Total
≥II GVHD	5	11	16
< II GVHD	32	43	75
Total	37	54	91

ハプロタイプ GGG をもつとき、GVHD の relative risk (Odds) =0.6

ハプロタイプ GGG negative、GVHD の relative risk (Odds) =1.63 P> 0.05

結論：GGG ハプロタイプを持つ Donor は GVHD を起こしにくい傾向があるが、有意さは認められない。

結果 4、表 4、MBL-2 High producer と Deficiency が移植後生存に与える影響

Haplotype	1 year Alive		Death within 1 year	
Deficiency/ Deficiency	3/ 67	4%	3/ 24	12%
High pro./ High pro.	24/ 67	36%	4/ 24	17%
other	40/ 67	60%	17/ 24	70%

Deficiency allele homozygote の Recipient は 1 年以内の死亡率が高く、High-producer allele homozygote は生存率が高い傾向がある。P<0.05 (Yates 補正後は有意差なし)

考察とまとめ

- 1、炎症性サイトカイン IL-6 のプロモーター領域 SNPs は人種により多型性が異なる。日本人は白人に多様性のある「-174 (および-597)」については多型性がなく、むしろ、白人に多様性の低い「-572」に多様性が高い。
- 2、IL-6 のプロモーター領域の SNPs haplotype 「GGG」は、IL-6 Low producer とされ、腎移植において、低い拒絶率が報告されている。日本人集団の造血幹細胞移植においては、GGG haplotype が GVHD 抑制的 (Odds=0.6) に働く可能性が示唆された。
- 3、自然免疫の最前線にあるとされる MBL-2 は、ウイルス、細菌、真菌などの感染防御に primary な役割を果たしている。MBL-2 は 6 個の SNPs haplotype により、High producer と Deficiency に分類できることがわかっている。Deficiency allele の頻度は無視できない高さ (26%) にあり、予後因子になり得る。
- 4、感染と MBL-2 SNPs の関連は、臨床データの不備で解析できなかった。移植後 1 年の生存率で見ると、Deficiency allele homozygote は低く、High-producer allele homozygote は高い傾向にあった (P=0.05) 。

移植免疫反応と遺伝子多型の解析

金沢大学附属病院 高見昭良

目的と方法

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

HLA-A/B/C/DRB1 一致非血縁者間骨髄破壊的前処置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(145 ペア)。

結果

1. NKG2D 遺伝子多型 : HNK1 ハプロタイプ陽性(高 NK 活性) vs. 陰性(低 NK 活性)

再発低リスク群では、HNK1 陽性ドナーを有する患者の生存率(OS)・移植関連死亡(TRM)は有意に優れていた(図1・2)。これは多変量解析でも確認された(表1)。一方、再発高リスク群では、このような影響はみられなかった。

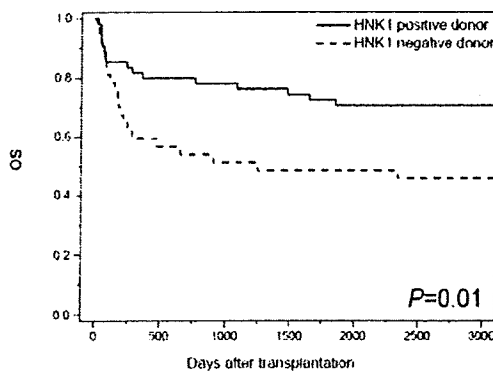


図1. ドナーNKG2D多型とOS (低リスク群)

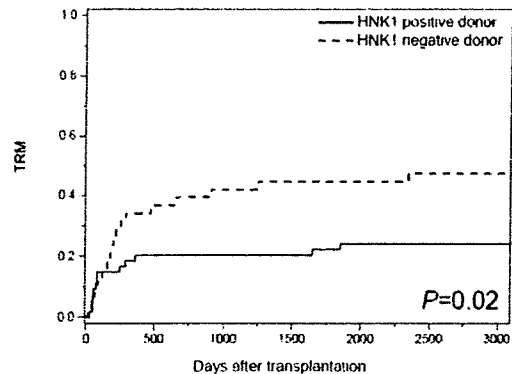


図2. ドナーNKG2D多型とTRM (低リスク群)

表 1. NKG2D 遺伝子多型と移植後転帰 多変量解析

		ドナーHNK1 陽性	患者 HNK1 陽性
		Adjusted hazard ratio (95% confidence interval), <i>P</i>	
Low risk disease	OS	0.44 (0.21-0.92), 0.03	1.12 (0.49-2.56), 0.78
	TRM	0.39 (0.17-0.89), 0.03	1.07 (0.43-2.62), 0.89
	Relapse	0.69 (0.15-3.09), 0.62	1.25 (0.24-6.42), 0.79
	II-IV aGVHD	0.95 (0.39-2.33), 0.91	1.33 (0.56-3.20), 0.52
	cGVHD	0.89 (0.34-2.29), 0.81	0.94 (0.40-2.23), 0.89
High risk disease	OS	0.88 (0.27-2.85), 0.83	0.99 (0.40-2.48), 0.99
	TRM	0.66 (0.14-3.11), 0.60	0.70 (0.18-2.81), 0.62
	Relapse	1.89 (0.16-22.95), 0.62	2.76 (0.52-14.52), 0.23
	II-IV aGVHD	3.02 (0.70-12.99), 0.14	0.22 (0.07-0.72), 0.01
	cGVHD	0.58 (0.11-3.03), 0.52	0.72 (0.21-2.46), 0.61

2. FCGR3A 遺伝子多型：158V ハプロタイプ陽性(高 ADCC) vs. (低 ADCC)

骨髄系腫瘍の場合、158V 陽性患者の TRM は有意に低く ($P=0.02$)、OS も良好であった(図 3)。リンパ系腫瘍では逆に、158V 陽性患者の OS は有意に不良であった(図 4)。これらは多変量解析でも確認された(表 2)。ドナーの FCGR3A 多型は、腫瘍の種類にかかわらず、移植後転帰に影響しなかった。

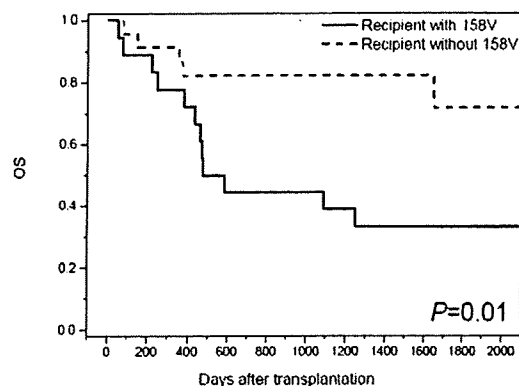
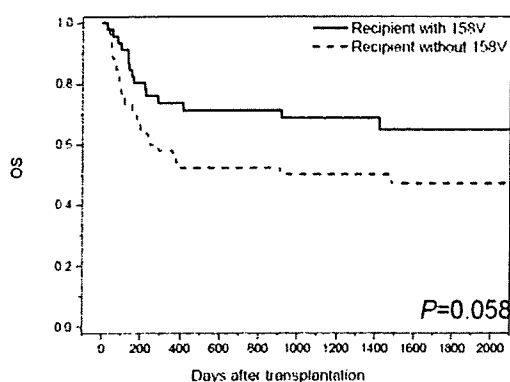


図3. 患者FCGR3A多型とOS (骨髄系腫瘍) 図4. 患者FCGR3A多型とOS (リンパ系腫瘍)

表 2. FCGR3A 遺伝子多型と移植後転帰 多変量解析

		ドナー158V 陽性	患者 158V 陽性
		Adjusted hazard ratio (95% confidence interval), P	
Myeloid malignancy	OS	1.29 (0.70-2.38), 0.42	0.49 (0.26-0.93), 0.03
	TRM	1.73 (0.84-3.54), 0.14	0.30 (0.14-0.67), 0.003
	Relapse	0.82 (0.27-2.55), 0.74	0.67 (0.22-2.02), 0.47
	II-IV aGVHD	1.24 (0.63-2.46), 0.53	0.55 (0.27-1.10), 0.09
	cGVHD	0.55 (0.25-1.21), 0.14	0.45 (0.20-0.99), 0.049
Lymphoid malignancy	OS	1.17 (0.40-3.42), 0.78	3.93 (1.28-12.08), 0.02
	TRM	1.01 (0.29-3.48), 0.99	2.72 (0.80-9.30), 0.11
	Relapse	1.52 (0.39-5.89), 0.54	1.65 (0.43-6.39), 0.47
	II-IV aGVHD	0.80 (0.18-3.51), 0.77	1.83 (0.50-6.73), 0.36
	cGVHD	0.82 (0.30-2.27), 0.71	1.71 (0.64-4.59), 0.29

厚生労働科学研究 がん研究助成金

「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」班

(研究代表者 森島泰雄)

平成 20 年度第 2 回班会議プログラム

2009 年 1 月 17 日 (土) 午後 6 時～

会場 東京医科歯科大学歯学部特別講堂

1. 急性リンパ性白血病患者に対する中等量 VP-16、シクロフォスファミド、全身放射線照射前処置を用いた同種造血幹細胞移植法の有用性の検討 (臨床第 II 相試験)

: スタートアップミーティング

北海道大学血液内科 重松昭男 今村雅寛

2. 成人難治性血液悪性腫瘍に対する非血縁者間臍帯血移植の有用性に関する研究 (臨床第 II 相試験)

名古屋大学血液・腫瘍内科学 西田徹也

名古屋第 1 赤十字病院 宮村耕一

成人難治性造血器腫瘍に対する非血縁者間同種造血幹細胞移植の確立に関する研究班 (がん研究助成金10-1 主任研究者 森島康雄)

急性リンパ性白血病患者に対する中等量VP-16、シクロホスファミド、全身放射線照射(Medium-dose VP/CY/TBI)前処置を用いた同種造血幹細胞移植法の有用性の検討
～臨床第II相試験～

Start-up Meeting 2009.1.17

(C-SHOT試験番号0901)

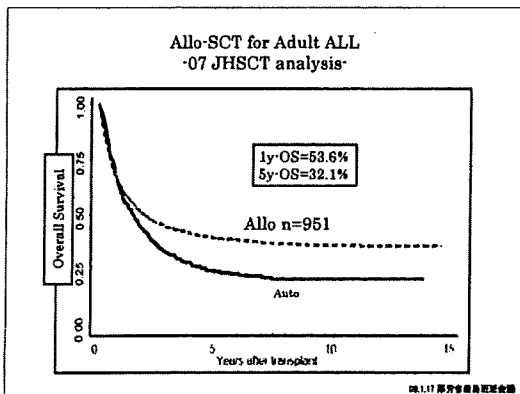
北海道大学病態血液腫瘍治療センター/血液内科
重松明男、今村雅寛

04.1.17 厚労省がん研究助成金

Background
-Adult ALL-

- 成人ALLの予後は不良であり、治療成績の改善が乏しい。
- Ph染色体陽性などHigh risk症例が多い
- 治療に対する忍容性が低い。
- High risk 例はCR1での同種移植が適応となるが、長期生存は30-50%
- Standard risk例における移植適応は定まっていないが、化学療法、同種移植とも長期生存率は30-60%と不良である。
- CR1以外の移植成績は長期生存率<30%と不良である。

04.1.17 厚労省がん研究助成金



Background
-VP-16 (Etoposide)-

- Topoisomerase II 阻害によるDNA傷害による抗腫瘍効果
- 副作用は血液毒性の他に肝障害、粘膜炎、間質性肺炎など
- 二次性悪性腫瘍のリスク

- VP-16のALLに対する有用性は証明されている。
- ALLに対する移植前処置の報告は多数あり、その多くが50-60mg/kgである
- 再発率の低下は認めるものの、NRMが高予後の改善につながっていない。
- NRMの原因としては肺、肝合併症やTMA、出血などが多く認められる。

04.1.17 厚労省がん研究助成金

Conditioning regimen of Current Study

VP-16 15mg/kg 3時間点滴

CY 60mg/kg 3時間点滴

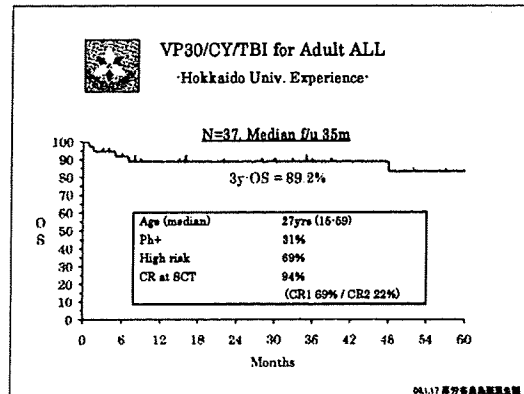
TBI (2Gy×6)

移植細胞輸注

-7 -6 -5 -4 -3 -2 -1 0

- Relapse decrease?
- RRT→NRM increase?
- Secondary malignancy increase?

04.1.17 厚労省がん研究助成金

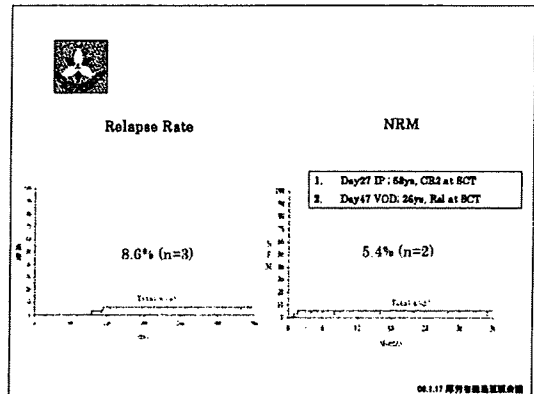


Toxicity

RRT, any grade ≥ 3 toxicity	82%
Stomatitis	58%
Diarrhea	33%
Cardiovascular	6%
Pulmonary	3%
Hepatic	8%
VOD/TMA	6%/6%
Febrile episode before engraftment	70%
Acute GVHD, grade II-III	41% (grade IV: none)
Chronic GVHD, extensive	36%
Secondary malignancy	0%

Death due to organ toxicity	5.4%
Death due to GVHD	0.0%

08.1.17 厚労省がん臨床試験会報



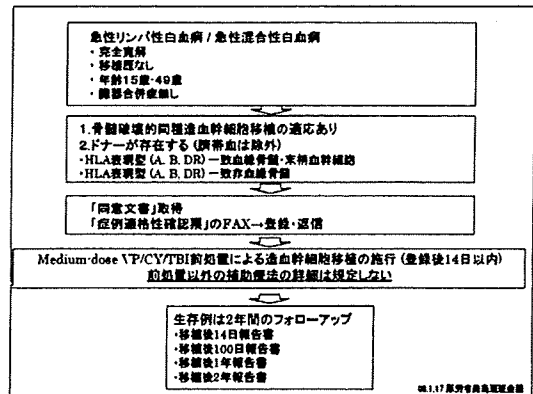
Study design & Purpose

臨床試験課題
15歳以上の急性リンパ性白血病およびその類縁疾患に対するMedium-dose VP/CY/TBI前処置を用いた同種造血幹細胞移植の有用性の検討

試験デザイン
多施設共同非対照、非盲検臨床第II相試験

目的
同種造血幹細胞移植が適応となる15歳以上50歳未満のALLまたはABLに罹患した患者を対象として、Medium-dose VP/CY/TBIによる骨髄破壊的処置を用いた同種移植の有用性を前向きに検討する。

08.1.17 厚労省がん臨床試験会報



Endpoint

Primary
移植後1年EFS (Event: relapse or death)

Secondary

- ・1年および2年全生存率 (OS), 2年EFS
- ・Day 100 非再発死亡率 (NRM) および1年NRM
- ・Day 28までの治療関連毒性
- ・Day 100再発率および1年再発率
- ・好中球および血小板生着割合
- ・急性GVHDおよび慢性GVHDの発症頻度および重症度
- ・移植後感染症の発症頻度
- ・晚期障害および二次性悪性腫瘍の発症頻度
- ・サブクラス解析

ドナー : 血縁と非血縁ドナー

移植細胞種類

年齢	: 40歳以上と40歳未満
染色体異常	: Ph染色体有無
移植前病態	: CR1とCR2以降
疾患リスク	: High risk とstandard riskおよびリスク因子

08.1.17 厚労省がん臨床試験会報

Eligibility

Inclusion Criteria

1. 疾患: ALL, ABL
2. 年齢: 15歳以上50歳未満
3. 血液学的完全寛解
4. 過去に自家移植または同種移植を行っていない
5. PS (ECOG) 0-2
6. 主要臓器 (肺、腎、肝、心臓) 機能が保たれている
7. 移植細胞ソースが存在する (後述)
8. 文書で同意が得られた患者

※未成年の場合は代読者および本人からの文書による同意が得られている患者

08.1.17 厚労省がん臨床試験会報

Eligibility
-Inclusion Criteria 2-

主要臓器機能(詳細)

- AST/ALT <正常値上限の5倍
- T.BiL <正常値上限の1.5倍
- S-Cr <正常値上限の1.5倍
- PaO₂ >80mmHg (またはSpO₂>93%), room air
- 重篤な心電図異常がない
- 心エコーまたは核医学的検査でEFが50%以上

DL117 厚生労働省医薬品等委員会

Eligibility
-Exclusion Criteria-

- 1.HB_s抗原、HCV抗体、HIV抗体のいずれかが陽性
- 2.活動性の重積嚢を有する患者
- 3.抗生物質投与が必要な感染症(活動性の結核を含む)を有する患者
- 4.有効な同意を得ることが困難であると考えられる精神障害を有する患者
- 5.妊娠又は妊娠している可能性がある女性および授乳中の女性患者
- 6.インスリンの使用によっても、コントロール不良の糖尿病のある患者
- 7.心筋梗塞の既往/1年以内に治療を要した心不全の既往のある患者
- 8.肝硬変のある患者
- 9.BMI35以上の肥満患者
- 10.CTCAE v.3.0 grade 3以上の不整脈を有する患者
- 11.ベントスタチンを投与中の患者
- 12.エトポシド製剤又はシクロホスファミド製剤のいずれかに対する重篤な過敏症の既往歴のある患者
- 13.その他、主治医が不適当と判断した患者

DL117 厚生労働省医薬品等委員会

Stem cell source & HLA

・移植細胞:骨髄、末梢血幹細胞
臍帯血は含まない

・HLA適合性
HLA-A、B、DR座表現型完全一致ドナー

※非血縁ドナーの場合にはDNA typingをHLA-A座、B座、C座、DR座に対するDNA typingを施行し、一致度に応じて主治医判断でドナー選択を行う。

DL117 厚生労働省医薬品等委員会

Enrollment

N=50

プライマリーエンドポイントである、再発または死亡をイベントとした1年EFSの閾値を55%、期待される1年EFS75%、 α エラー0.05、 β エラー0.2で、Fleming's single-stage procedureに基づいて計算すると45例必要である。これに不適格症例を10%見込み、必要症例数50例と設定した。

*北海道における移植症例 (n=45) の後方視的解析では、1年EFSは84.4%であり、以後のイベントは2例のみであった。

登録期間:2009年2月より2年間、フォローアップ期間:2年

DL117 厚生労働省医薬品等委員会

Benefits vs. Risks for Patients

予測される利益

VP/CY/TBI前処置により、移植後再発のリスクは低下するものと考えられる。従来の報告ではNRMの増加は認めないため、再発率の低下は無イベント生存率の増加につながると考えられる。

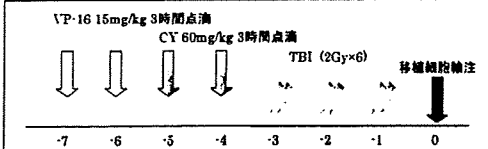
予測される不利益

VP-16を前処置に追加したことにより、粘膜炎や肝障害などの前処置関連合併症 (regimen-related toxicity, RRT) は増加すると考えられる。北海道大学病院における検討ではNRMの増加を認めていないが、NRMが増加する可能性は否定できない。

また、VP-16は明らかな発がん作用を持つため、移植後長期生存者において2次性悪性腫瘍が出現する可能性は否定できない。

DL117 厚生労働省医薬品等委員会

Conditioning regimen

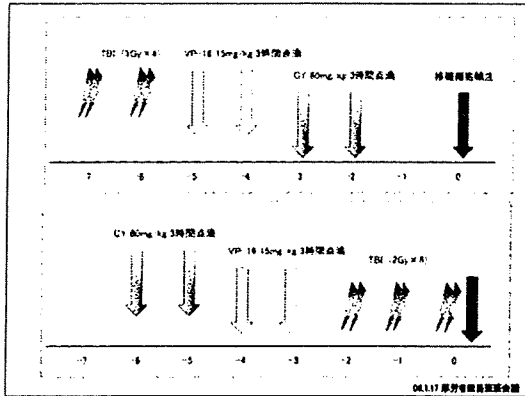


TBIの照射方法はTotal 12 Gy / 6分割を基本とするが、施設により分割方法が異なるため分割方法の詳細は移植施設の方法によることを許容する。

抗腫瘍薬 (CY, VP-16) の投与日は、施設のTBI照射可能日 (通常平日と思われる) により、前後させても構わない。その際は抗腫瘍薬最終投与から48時間以上の間隔を空けてから、造血幹細胞輸注を行うこととする。この場合、前処置開始日はday -8からとなる。

TBIはday 0の造血幹細胞輸注前なら照射しても構わない。

DL117 厚生労働省医薬品等委員会



Drug Administration

VP-16 (etoposide, ラステット®, ベブシド®)

- ・一回投与量は15 mg/kg、3時間点滴投与
- ・10mg単位で切捨てた量を投与することとする。
- ・前治療開始以後の体重変動に伴う投与量調節は行わない。
- ・中心静脈カテーテルより投与する。
- ・投与時および投与後に、発熱や不整脈が認められることがある。
- ・高濃度のVP-16投与時には、**高濃度薬剤の投与により、損傷が生じることがあるため**、添付文書を熟読の上、適切な生じない薬剤のものを使用すること

<投与方法>

- 1 VP-16は原液のままシリンジポンプを用いて3時間かけて点滴投与を行う。この時、生理食塩液1000ml以上を割合より同時に点滴する。
- 2 VP-16は予め100mgあたり29ml以上の生理食塩液等の輸液に混和し、3時間かけて点滴投与する。

参考

・VP-16が使用可能な製品・

1. 輸液セット
 - ・ニプロ MIS-TNG-212(PEシリコン), MIS-202(PE)など
 - ・JMS JY-N232L(HSBR), JY-132L01(HSBR)など・ IMI 50053(PEシリコン), S76053(PEシリコン)など
 - ・テルモ TS-PM374L10(PB), TS-M270LK(PB)など
2. 中心静脈カテーテル
 - ・アーガイル メディカットUKⅢカテーテルキット, CVカテーテルキットなど
 - ・アロー アローブラッドアクセスカテーテルキット(AKシリーズ)など
 - ・メディコン ヒックマンカテーテル, グローションカテーテルなど
 - ・ニプロ セーフレットカテーテルキット/バイオライン(PVC/nonDEHP)
3. 延長チューブ
 - ・JMS JY-EN050,100(PE)など
 - ・ニプロ TNG-ET60,100(PE)など
 - ・トップ XI-FL50N,100(NPE)など

<http://www.kyowa-med.co.jp/kyojin/kyowa/kyowa.html>

Supportive Care

特に規定しない

1. GVHD予防法は標準的予防法であるCyA+short MTXまたはTac+short MTXを用いることとするが、投与方法の詳細は規定せず、施設の方法に一任する。
2. この移植前処置においては、粘膜炎、肝障害などのRRTが強く出現すると考えられるため、粘膜炎および感染症予防、VOD予防、疼痛管理などは施設で可能な限り施行する。
疼痛管理に関しては麻薬系鎮痛薬の投与が必要となる場合が多い。

ほぼ全例が不妊症になると考えられるため、配偶子もしくは受精卵保存などの処置に関しては主治医が患者と相談の上、検討する。

参考

-北海道大学病院における補助療法-

1. GVHD予防法
 - ・血縁同胞、DNA完全一致非血縁：CyA+short MTX
 - ・DNA不一致非血縁：Tac+short MTX
 - ※aMTX：(day1-3:6, 15-10-10mg/m²)
2. G-CSF: day1またはday5より生着まで
3. 生着前感染予防
 - ・LVFX 300mg/8× day-14~
 - ・真菌予防: 特々 (最近はMCFG50-100mg) day-14~
 - ・ヘルペス予防: ACV 1000mg po day-7~day35
4. 粘膜炎
 - ・歯科口腔ケアチームとの密接なコンタクト
 - ・ハイリスクと思われる患者(年齢、化学療法中の粘膜炎の既往など)ではMTX後のLVレスキューを考慮
 - ・舌皸: LV含嗽、など
 - ※疼痛に対してはためらわずに麻薬系鎮痛薬を使用する
5. VOD予防
 - ウルソ 6T/3×、フラグミン: 6000U/day civ day-7~

再発・増悪時または生着不全時の対応

・各施設の判断により治療を行う。

・「有害事象急送1次報告書」をFAXにてデータセンターに送信する (FAX 052-719-1984)。

注) BCR-ABL融合遺伝子陽性ALL患者において、PCR法において分子学的再発を認めたと、細胞遺伝学的再発が認められない場合「分子学的再発の定義」を満たした時点で「再発」とする。

分子学的再発: Ph+ ALLにおいては、PCR法において1ヶ月以上の間隔をあけて、2回連続して陽性となった場合を分子学的再発と診断する (特異的増加、可能であれば定量的評価にてMRD値の上昇を確認する)。

生着不全

- ・生着不全: Day28までに3ポイント連続して末梢血中球数 $0.5 \times 10^3 / \mu\text{l}$ 以上を確認できなかった場合を一次生着不全と定義する。

急送報告義務のある有害事象

- ・移植後100日までのすべての死亡
 - ・生着不全および2次性生着不全
 - ・予期されないgrade 4の非血液毒性
- 以上の有害事象発症時、試験分担医師は発症後72時間以内に「有害事象急送1次報告書」に記入してデータセンターにFAXを送信する(1次報告)。より詳しい報告書(有害事象通常報告書)を14日以内にデータセンターにFAX送信する(2次報告)。

08.1.17 厚生省血癌臨床試験会

登録方法

1. 施設担当医師は、被験者適格基準を満たしていると思われたら、同意説明文書を用いて文書にて同意を得る。
 2. 登録前検査を行い、
 3. その結果を「登録適格性確認票」に記入の上、データセンターへFAXする。
- データセンターにて「適格」と判定後「登録適格性確認票」が返送されるので診療録に保管する。その際被験者登録番号が付与されるので、以後はこの登録番号を用いて、データのやりとりを行う。
4. 登録後7日以内に「治療前症例報告書」をデータセンターへ郵送する。
 5. 登録後14日以内に移植前処置を開始する。

被験者登録先・問い合わせ先:
特定非営利活動法人(NPO) 血液疾患臨床研究サポートセンター (C-SHOT)
TEL: 052-719-1983 FAX:052-719-1984
E-mail: support@c-shot.or.jp

08.1.17 厚生省血癌臨床試験会

記録用紙の種類と提出期限

基本的には移植登録一元管理プログラム(TRUMP)のデータベースの調査項目に基じる (TRUMPに含まれていない項目は別途記載が必要)

※本試験においてはTRUMPにおいて記載される電子データについては、TRUMP提出データのコピーを記録簿にCD-Rで郵送することとする。

- ・移植後14日報告書 : 移植日より14日以内にデータセンターへ郵送
- ・移植後100日報告書 : 移植後100日より14日以内にデータセンターへ郵送
- ・移植後1年報告書 : 経過観察終了(死亡時/1年時)または中止後14日以内にデータセンターへ郵送
- ・移植後2年報告書 : 経過観察終了(死亡時/2年時)または中止後14日以内にデータセンターへ郵送
- ・追跡調査依頼書 : 追跡調査依頼書に別途記載

08.1.17 厚生省血癌臨床試験会

研究組織

がん研究助成金(19-1) 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の確立に関する研究班(主任研究者 森島泰雄)

- 15-2. 研究代表者
北海道大学病院造血細胞治療センター/血液内科 寺村雅寛
- 15-3. 効果・安全性評価委員
名古屋第一赤十字病院小児医療センター血液腫瘍科 加藤剛二
札幌医科大学小児科 小杉良二
- 15-4. 統計解析担当者
名古屋大学医学部造血細胞移植情報管理理学 鈴木博典
名古屋大学医学部造血細胞移植情報管理理学 駒田由子
- 15-5. プロトコール委員
慶応義塾大学医学部血液内科 岡本真一郎
国立がんセンター中央病院幹細胞移植療法科 森 慎一郎
九州大学病院遺伝子・細胞療法科 豊嶋 崇彦
東京大学医科学研究所内科 高橋 聡
北海道大学病院造血細胞治療センター 石原博、西尾光生、湯澤輝之、宮本明男

08.1.17 厚生省血癌臨床試験会

15-6. 研究事務局
北海道大学病院造血細胞治療センター/血液内科 重松明男
〒060-8638 札幌市北区北15条西7丁目
TEL: 011-706-7214 FAX:011-706-7823
E-mail: shigemasa@med.hokudai.ac.jp

15-7. データセンター
特定非営利活動法人(NPO) 血液疾患臨床研究サポートセンター
Center for Supporting Hematology-Oncology Trials(C-SHOT)
TEL: 052-719-1983 FAX:052-719-1984
E-mail: support@c-shot.or.jp

15-8. 参加施設
がん研究助成金(19-1) 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の確立に関する研究班(主任研究者 森島泰雄)班研究に協力する施設

08.1.17 厚生省血癌臨床試験会

急性リンパ性白血病/急性骨髄性白血病

- ・完全寛解
- ・移植適当なし
- ・年齢15歳-49歳
- ・臓器合併症なし

1. 骨髄腫瘍的明瞭造血幹細胞移植の適応あり
 2. ドナーが存在する(調製血は除く)
- ・HLA型別型 (A, B, DR) 一致血縁骨髄・末梢血幹細胞
 - ・HLA型別型 (A, B, DR) 一致非血縁骨髄

「同意文書」取得
「登録適格性確認票」のFAX→登録・送信

Medium-dose VP/CY/TBI前処置による造血幹細胞移植の施行(登録後14日以内)
前処置以外の補助療法は推奨しない

- 生存例は2年間のフォローアップ
- ・移植後14日報告書
 - ・移植後100日報告書
 - ・移植後1年報告書
 - ・移植後2年報告書

08.1.17 厚生省血癌臨床試験会

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の確立に
関する研究班（がん研究助成金19-1 主任研究者 森島泰雄）

臨床試験実施計画書

急性リンパ性白血病患者に対する中等量 VP-16、シクロフォスファミド、
全身放射線照射 (*Medium-dose VP/CY/TBI*) 前処置を用いた
同種造血幹細胞移植法の有用性の検討

～臨床第 II 相試験～

C-SHOT 試験番号 0901

研究代表者

北海道大学病院造血細胞治療センター/血液内科

今村雅寛

2008 年 12 月 18 日作成 (Version 1.6)

研究事務局・連絡先 北海道大学病院造血細胞治療センター/血液内科 重松明男
〒060-8638 札幌市北区北 15 条西 7 丁目
TEL: 011-706-7214 FAX: 011-706-7823
E-mail: shigema@med.hokudai.ac.jp