

当科における「骨髄内臍帯血ミニ移植」の経験



兵庫医科大学 血液内科
岡田昌也、吉原哲、池亀和博、甲斐俊朗、小川啓恭

骨髄内臍帯血ミニ移植 臨床I/II相試験

主要評価項目

第I相試験では、骨髄内への臍帯血移植の安全性をprimary endpointとする。

第II相試験は、ドナー型生着率をprimary endpointとする。
「ドナー型生着」は、好中球数が3ポイント以上の連続した検査日において回復し、かつキメリズム解析において移植後60日以内にドナー由来細胞が90%以上になることと定義する。

目標症例: 第I相試験10例、第II相試験40例
参加施設: 兵庫医科大学内科学 血液内科

患者選択基準（抜粋）

- (1) 従来の治療では治癒が望めない造血器悪性腫瘍患者
急性骨髄性白血病; 初回寛解期以外
急性リンパ性白血病; 初回寛解期以外
極めて予後不良の初回寛解期急性白血病(寛解導入に複数コースの化学療法を要した初回寛解急性白血病、Ph陽性急性白血病など)を含む慢性骨髄性白血病; 第一寛解期以外
治療抵抗性悪性リンパ腫
骨髄異形成症候群; int-2以降、寛解後再発
- (2) 初回造血幹細胞移植
- (3) 55歳以上、70歳未満の成人患者
55歳未満で臓器障害などにより骨髄破壊的前処置が適応と成らない患者
- (4) 非血縁者にHLA一致ドナーが得られない患者、あるいはHLA一致ドナーがいても、患者の病態から早急に移植を必要とする患者

前処置

	Day -6	-5	-4	-3	-2	-1	0
TBI (3Gy /day)							↓ CBT
Fludarabine (40 mg/m ² /day)		↓	↓	↓	↓	↓	★
CY (50 mg/kg/day)		↓					

GVHD予防

シクロスポリン

移植3日前(day -3)よりシクロスポリン3mg/kgを24時間持続点滴する。目標血中濃度は、250~450 μg/mlとする。生着後、内服が可能であれば経口投与に切り替え(持続投与時の2.5倍量を分割投与)、GVHDがなければ漸減する。

ミコフェノール酸モフェチル

移植前3日(day -3)より、移植後30日まで、15 mg/kg/day (分2ないし分3)で経口投与する。

支持療法

G-CSF

移植後day 1ないしday5よりG-CSFを投与する。

4例目より30mg/kg/day
と増量

骨髄内臍帯血移植法

移植前投薬

移植前投薬として、ヒドロコルチゾン100mg、塩酸ヒドロキシジン(アタラックス-P®)25mg等の投与を行う。移植時に必要に応じてミダゾラム(ドルミカム®)等による鎮静を行う。

移植手技

臍帯血を37°Cの恒温槽で解凍後、通常の骨髄穿刺と同様の手技で腸骨の1-2ヶ所に穿刺を行い、臍帯血を注射する。臍帯血の洗浄は行わない。

予防的抗生剤投与

手技に伴う骨髄炎を予防するため、移植日には抗生剤を経静脈投与する。

症例背景

IBM-CBT					
No.	Diagnosis	Clinical stage	Sex	Age(Ys)	BW(kg)
1	MDS overt	EP	M	64	48.4
2	MDS overt	CR5 MRD+	F	58	43.0
3	ALLPh+	CR1 MRD+	M	60	56.5
4	AML M4	RF	F	66	47.1
5	T-MDS	RF	M	51	62.4
6	ALL	CR1	M	62	66.0
7	NHL(FL)	RF	M	57	86.3

臍帯血

IBM-CBT No.	ABO Pl/CB	HL Acompatibility		Cell dose	
		GVH	HVG	NCC($\times 10^6/7/kg$)	CD34+($\times 10^6/5/kg$)
1	A/A	4/4		3.05	0.88
2	AB/O	4/4		3.50	0.69
3	A/B	5/6		3.27	0.99
4	B/O	5/5		2.05	0.45
5	B/B	5/5		2.58	0.45
6	A/O	5/5		2.71	0.30
7	A/O	4/4		2.04	0.63

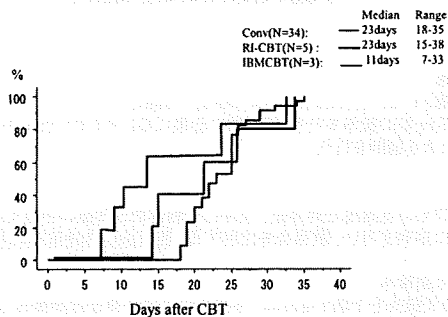
症例経過

IBM-CBT No.	Recovery PMN $\geq 0.5 \times 10^9/L$	PLT $\geq 20 \times 10^9/L$	aGvHD (grade)
1	7	12	II
2	11	67	III
3	9	42	I
4	24	51	I
5	17	30	II
6	33	55	I
7	17	40	I
	17(7-33)	42(12-67)	

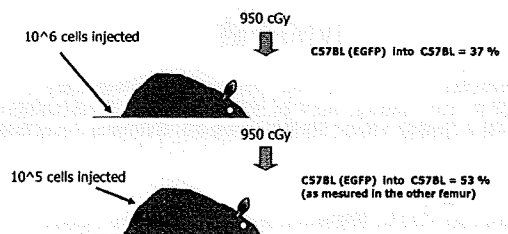
同時期の経静脈臍帯血ミニ移植症例経過

IV-CBT No.	Recovery PMN $\geq 0.5 \times 10^9/L$	PLT $\geq 20 \times 10^9/L$	aGvHD (grade)
1	38	59	I
2	23	41	I
3	16	46	I
4	15	34	I
5	28	40	I
	23(15-38)	41(34-59)	

Cumulative proportion with Neutrophil count $500/\mu l \leq$



骨髓内移植 versus 経静脈移植



骨髓内移植が経静脈移植に比べ1/10量で生着する。


Francesco Frasson
Exp Hematol. 2004 ;32:782-7.

公開さい帯血の採取年度別細胞数階層 (今年7月末現在)

細胞数 (年度)	2003	2004	2005	2006	2007
未過	0	0	0	0	0
1~2	0	0	0	0	0
2~3	1	0	0	0	0
3~4	3	1	2	4	0
4~5	36	52	92	18	0
5~6	183	113	180	105	0
6~7	883	717	644	413	7
7~8	809	737	681	557	52
8~9	602	634	571	530	174
9~10	434	453	433	454	172
10~11	227	286	266	363	143
11~12	129	147	173	205	122
12~13	43	42	67	128	83
13~14	4	9	21	55	50
14~15	0	2	8	29	34
15~16	0	0	2	11	25
16~17	1	0	0	5	14
17~18	0	0	0	3	4
18~19	0	0	1	1	3
19~20	0	0	0	1	6
20以上	0	1	1	1	5
年度計	3357	3194	3142	2883	894

BW=50kg
 ↓
 1.0x10⁷/kg
 ↓
 2.0x10⁷/kg

脾帯血バンクNOW
 第43号



まとめ

1. 骨髄内臍帯血ミニ移植を7例に施行した。
2. 臍帯血輸注に際し、特に副作用は認めなかった。
3. 7例とも比較的早期の好中球回復を確認できた。

臍帯血移植後に発症する臍帯血由来白血病の遺伝子解析

信州大学医学部附属病院 小児科 坂下一夫、小池健一

信州大学医学部附属病院 臨床検査部 松田和之

(背景)

白血病治療における造血幹細胞移植療法は根治を目指す上で重要な治療法になっている。近年は臍帯血バンクの充実により臍帯血移植の割合は年々上昇し、平成 21 年 5 月には臍帯血移植例は 5000 例を超えた。このような状況の中で臍帯血移植後に臍帯血由来の白血病が発症したとする症例が報告されるようになった (Matsunaga T, et al. *Am J Hematol.* 2005, Nagamura-Inoue T, et al. *Cytotherapy* 2007, Mitsui H, et al. *Int J Hematol.* 2007, Hamaki T, et al. *Bone Marrow Transplantation* 2008.)。また造血幹細胞移植学会等で報告されている症例も合わせると、これまでに 9 症例となる。臍帯血由来白血病の特徴は、移植後 2 年以内に MDS または AML で発症し、monosomy 7 など 7 番染色体関連の異常が 9 例中 5 例にみられる。臍帯血由来白血病発症のメカニズムについては全く不明であり、原因究明に向けたアプローチは安全な臍帯血移植を行う上で極めて重要である。

当科はこれまで小児白血病の治療及び研究を行ってきた。小児でみられる若年性骨髄単球性白血病(JMML)は *in vitro* で GM-CSF に高感受性を示すことが特徴的な白血病である。近年遺伝子異常の解析が行われ RAS/MARK シグナル伝達関連の遺伝子異常が明らかとなってきた。JMML の約 35% に PTPN11 遺伝子異常、約 20% に RAS 遺伝子の異常、約 15% に NF1 遺伝子の異常、約 10~15% に c-CBL 遺伝子の異常が報告されている。PTPN11 の遺伝子変異は JMML だけでなく、monosomy 7 を伴うハイリスク MDS においても検出されることが報告されている (Tartaglia M, et al. *Nature Genetics.* 2003)。JMML を発症した児のガスリー血を取り寄せ real-time PCR を用い

て解析したところ、全例で JMML 発症時の PTPN11 や RAS の遺伝子変異が検出された(Matsuda K, Koike K, Br J Haematol. 2009)。このことは PTPN11 や RAS の遺伝子変化が子宮内ですでに起こっている可能性が示唆される。これまでも t(12;21)陽性白血病などの遺伝子変化も子宮内で起こっていることが報告されている。この遺伝子異常は正常臍帯血にも認められるものの、白血病発生にはさらなる遺伝子異常の付加が必要と考えられているため、正常臍帯血に存在してもその児は白血病を発症しないと考えられている。

このような背景があり、前回の班会議において臍帯血由来白血病の調査を提案させていただいた。現在調査に向け倫理委員会の審査、及び共同研究に向け準備中である。

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
(研究代表者 森島泰雄)

平成 21 年度第 2 回班会議プログラム

2010 年 1 月 30 日 (土) 午後 4 時～6 時
会場 東京医科歯科大学 5 号館 4 階講堂

座長 村田 誠

(演題 発表 10 分 討議 2 分)

1. 非血縁者間移植の人種別比較成績
森島泰雄 川瀬孝和 森島聡子 E. Petersdorf
International Histocompatibility Workshop Group
2. ゲノムワイド関連解析による GVHD 関連遺伝子座の探索-Update (10 分)
松原亜以子、柏瀬貢一、鬼塚真仁、赤塚美樹、森島泰雄、小寺良尚、笹月健彦、
小川誠司
東京大学医学部付属病院 キャンサーボード がんゲノム 他
3. 同種造血幹細胞移植における Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 遺伝子多型の影響
村瀬未帆、西田徹也、村田 誠
名古屋大学大学院 血液・腫瘍内科
4. 非血縁者間骨髄移植における免疫関連遺伝子多型解析
高見昭良 Jルイス・エスピノーザ 中尾眞二
金沢大学付属病院 輸血部

座長 屋部登志雄

(演題 発表 10 分 討議 2 分)

5. Single nucleotide polymorphisms in immunoregulatory genes associate with HSCT outcomes in a Japanese population.
C. Harkensee, A. Oka, P.G. Middleton, M. Onizuka, H. Inoko, Y. Morishima,
T. Yabe, K. Hirayasu, K. Kashiwase, A.R. Gennery, for JMDP.
Toukai University
6. A systematic scanning of the immunogenome with microsatellite markers in a Japanese HSCT population reveals multiple genetic risk loci for graft-versus-host Disease
C. Harkensee, A. Oka, P.G. Middleton, M. Onizuka, H. Inoko, Y. Morishima,
A.R. Gennery, for JMDP.
Toukai University
7. ドナー由来のT細胞から見たHLA-Cの適合度とNK細胞受容体(KIR2DL ligand)適合度に基づいた治療成績の分析
川瀬孝和 柏瀬貢一 森島泰雄
愛知県がんセンター 東京都赤十字血液センター
8. NK 細胞受容体、サイトカイン遺伝子多型解析および検体保存事業協力
屋部登志雄、平安恒幸、中本貴之、峯元睦子、柏瀬貢一
東京都赤十字血液センター
9. 検体保存事業：進捗報告
鬼塚真仁 東海大学

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
平成22年1月30日

1. 非血縁者間移植の人種別比較成績

IHWG Hematopoietic Cell Transplantation Working Group

Impact of Donor-Recipient Ethnicity on Risk of Acute GVHD, Leukemia Relapse and Survival in HSCT from HLA-Compatible Unrelated Donors.

The International Histocompatibility Workshop Group

Yasuo Morishima¹, Takakazu Kawase¹, Satoko Morishima¹, Mari Malkki², Steve Spellman³, Andrea Velardi⁴, and Effie W. Petersdorff²

1. Aichi Cancer Center and Japan Marrow Donor Program, Japan,
2. Fred Hutchinson Cancer Research Center, USA,
3. Center for International Blood and Marrow Transplant Research, USA,
4. European Group for Blood and Marrow Transplantation, Italy.

IHWG Hematopoietic Cell Transplantation Working Group

Purpose

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

IHWG Hematopoietic Cell Transplantation Working Group

Patients and Methods

5555 unrelated transplants

1 HLA-A, B, C, DRB1 and DQB1 allele match donor

HLA-DPB1 match 1367 1 mismatch 1935 2 mismatch 1005

2. GVHD prophylaxes : Non-T cell depleted stem cell

tacrolimus base 1987 cyclosporine base 3173 other regimen 71

3. Disease ALL 1310 AML 1930 AL 11 CML 1438 MDS866

Risk of relapse high 1019 intermediate 3236 low 1001

Conditioning regimen myeloablative 4423 non-myeloablative 617

Acute GVHD, Leukemia relapse, Survival*

*Kaplan-Meire Method, Multivariate analysis: Cox regression model

Patient ~ Donor Ethnicity

Patient	Donor	No. of Pairs
Asian/Pacific	Asian/Pacific	2062
(Japanese)	(Japanese)	(2039)
Caucasian	Caucasian	2419
Black	Black	39
Hispanic	Hispanic	21
Native American	Native American	2
Mismatch race pair (in non-JMDP)		268
Unknown donor ethnicity		744

IHWG Hematopoietic Cell Transplantation Working Group

Acute GVHD and ethnicity

Ethnic combination	Donor / Patient	n	Incidence of acute GVHD	
			Grade 2-4	Grade 3-4
Asian / Asian		2062	39.2%	15.0%
Cauc. / Cauc.		2414	55.2%	21.9%
Black / Black		39	48.7%	30.8%
Hisp. / Hisp.		21	47.6%	23.8%
Mismatch ethnicity*		268	56.0%	22.8%

IHWG Hematopoietic Cell Transplantation Working Group

Acute GVHD and ethnicity Multivariate analyses

Ethnic combination Donor / Patient	n	aGVHD 2-4		aGVHD 3-4	
		HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
Asian / Asian	2062	1.00 (Ref.)		1.00 (Ref.)	
Cauc. / Cauc.	2414	1.63 (1.48-1.8)	<0.001	1.54 (1.31-1.79)	<0.001
Black / Black	39	1.27 (0.8-2.01)	0.309	2.16 (1.2-3.89)	0.01
Hisp. / Hisp.	21	1.39 (0.74-2.6)	0.3	1.84 (0.76-4.46)	0.179
Mismatch ethnicity*	268	1.59 (1.33-1.91)	<0.001	1.62 (1.22-2.16)	0.001

* in non-JMDP
Other significant clinical factor (p<0.01)
HLA-DPB1 matching
GVHD prophylaxis
Donor Age



IHWG Hematopoietic Cell Transplantation Working Group

A-GVHD in patients with common HLA Haplotype (HLA-A – DQB1)patient

						EUR_freq
Cauc. HPC1	A*0101	Cw*0701	B*0801	DRB1*0301	DQB1*0201	7 408
Cauc. HPC2	A*0301	Cw*0702	B*0702	DRB1*1501	DQB1*0602	3 547
Cauc. HPC3	A*0201	Cw*0501	B*4402	DRB1*0401	DQB1*0301	2 436
Cauc. HPC4	A*0201	Cw*0702	B*0702	DRB1*1501	DQB1*0602	2 341
						JAP_freq
Asian HPA1	A*2402	Cw*1202	B*5201	DRB1*1502	DQB1*0601	5 451
Asian HPA2	A*3303	Cw*1403	B*4403	DRB1*1302	DQB1*0604	2 935

Common HP	n	Incidence of acute GVHD	
		Grade 2-4	Grade 3-4
Cauc. HPC1	707	54.2%	21.8%
Cauc. HPC2	410	50.9%	18.9%
Cauc. HPC3	239	48.7%	22.5%
Cauc. HPC4	263	49.9%	17.8%
Asian HPA1	764	36.3%	13.8%
Asian HPA2	390	33.6%	11.9%



IHWG Hematopoietic Cell Transplantation Working Group

Relapse and Survival multivariate analysis

Ethnic combination Donor / Patient	n	relapse		mortality	
		HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
Asian / Asian	2062	1.00 (Ref.)		1.00 (Ref.)	
Cauc. / Cauc.	2414	1.61 (1.4-1.85)	<0.001	1.51 (1.38-1.66)	<0.001
Black / Black	39	1.94 (1.03-3.65)	0.041	2.59 (1.77-3.8)	<0.001
Hisp. / Hisp.	21	2.18 (0.9-5.29)	0.084	2.25 (1.32-3.82)	0.003
Mismatch ethnicity*	268	1.75 (1.36-2.26)	<0.001	1.69 (1.43-2.01)	<0.001

* in non-JMDP

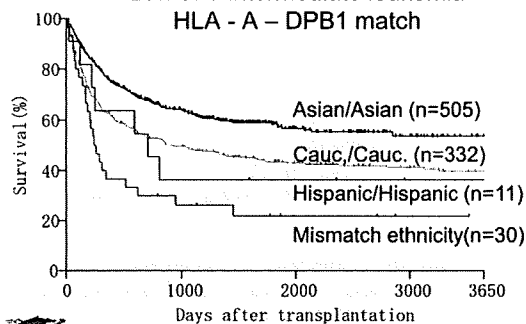
Other clinical factor (p<0.01)
HLA-DPB1 Disease
Leukemia risk
GVHD prophylaxis
Leukemia risk
Patient age
Disease



IHWG Hematopoietic Cell Transplantation Working Group

Survival

Low and intermediate leukemia
HLA - A – DPB1 match



IHWG Hematopoietic Cell Transplantation Working Group

Summary

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



IHWG Hematopoietic Cell Transplantation Working Group

Discussion

- Cause of different outcomes by ethnic group Asian/Pacific (=JMDP) vs. Caucasian
 - Clinical factors : adjusted → No
 - Transplant procedure : adjusted → No
 - Transplant center effect : → No
 - Genetic background
 - HLA haplotype itself, or matching
 - Minor HAs
 - Cytokine receptor polymorphism.
 - Unknown

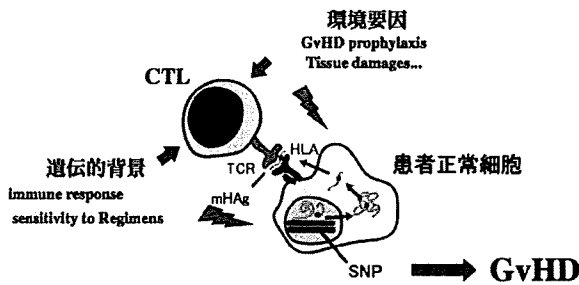


IHWG Hematopoietic Cell Transplantation Working Group

「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
 全ゲノム関連解析による
 GVHD 関連遺伝子多型のゲノムワイドな探索-Update

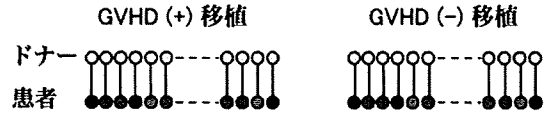
東京大学 小川誠司
 東海大学 猪子英俊 鬼塚真仁
 愛知県がんセンター 森島泰雄 赤塚真樹
 愛知医科大学 小寺良尚
 名古屋第一赤十字病院 宮村耕一
 九州大学 山本隆
 東海大学 猪子英俊
 日本赤十字東京血液センター 佐竹 正博 柏瀬 貴一
 国立国際医療センター 後月健彦
 日本科学技術振興機構(JST)・日本青腫バンク

同種造血幹細胞移植におけるGvHD



- ◎ GvHDの原因となるマイナー抗原は？
- ◎ GvHDに影響を及ぼす遺伝的背景は？

GVHDに対する全ゲノム関連解析



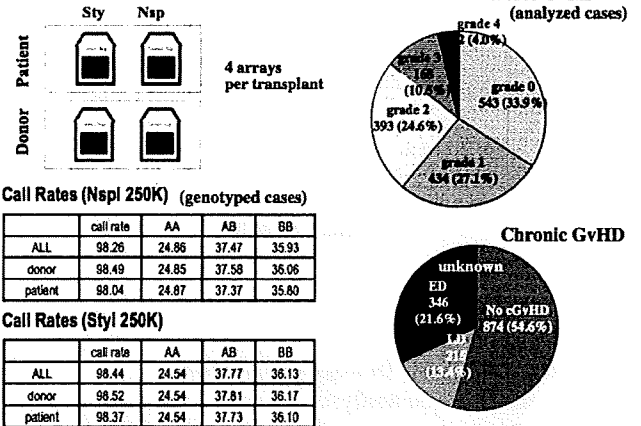
- ◎ 2004年までにJMDPを通じて行われた非血縁者間骨髄移植 (~7800)
- ◎ HLA-A, B, C, DR, DQの5座がDNAレベルで適合
- ◎ GVHD予防がCyA+MTX または Tacrolimus+MTX
- ◎ gDNA が利用可能
- ◎ acute GvHDに関する情報が得られる

- ▶ 1600 移植
- ▶ Affymetrix GeneChip 500K を用いてGenotypingを行った

解析の概要

- Microarray解析
 - 1600 donor/recipient samples
 - Affymetrix® 500K GeneChip
 - 各サンプルにつきcall rate >90% (DM algorithm)
- 全DataのGenotyping
 - Chiamo
- 未観測SNPのImputation
 - PhaseII HapMap のHaplotype data → ~2,500,000 SNPs
- low-performance SNPsの除外
 - call rates < 95%
 - Donor samplesでHWEからの逸脱がある
 - MAF <5%
 - donors・recipients間のcall rateの差 3%>
- ログランク統計量を計算
- permutation testを行い、genome-wide $p < 0.05$ のassociationをもつSNPを検出

Demographic Features



Candidate SNPs

category	event	HLA mismatch	chromosome	position	SNP rsID	allele	Logrank test chi-square value	p-value	
acute GVHD associated									
SNPs showing strong evidence of association with acute GVHD (genome wide $P < 5\%$)									
allele mismatch	grade 2-4 acute GVHD	no mismatch	8	33187734	MHC	rs6807059	AG	36.15 1.83E-09	
allele mismatch	grade 2-4 acute GVHD	A	2402	6	33188874	MHC	rs2868813	CT	32.58 1.14E-08
allele mismatch	grade 2-4 acute GVHD	C	122	5	33150508	MHC	rs1431403	CT	42.27 7.86E-11
allele mismatch	grade 2-4 acute GVHD	C	122	5	22086858		rs1747338	CT	28.89 7.86E-08
allele mismatch	grade 2-4 acute GVHD	DOB1	801	1	18893847		rs12883218	AT	34.66 4.97E-06
allele mismatch	grade 3-4 acute GVHD	B	4403	9	110471041		rs987855	AT	37.83 8.56E-10
allele mismatch	grade 3-4 acute GVHD	B	5881	12	25258444		rs11473423	AG	44.81* 2.08E-11
allele mismatch	grade 3-4 acute GVHD	B	3251	8	168942327		rs6565684	AG	26.32 1.07E-07
allele mismatch	grade 3-4 acute GVHD	C	1202	12	25254944		rs17473423	AG	44.81* 2.08E-11
allele mismatch	grade 3-4 acute GVHD	C	1202	8	188942327		rs6565684	AG	26.32 1.03E-07
allele mismatch	grade 3-4 acute GVHD	C	1403	9	110471041		rs987855	AT	37.83 8.56E-10
allele mismatch	grade 3-4 acute GVHD	DOB1	1502	12	25254944		rs11473423	AG	42.80* 7.07E-11
allele mismatch	grade 3-4 acute GVHD	DOB1	801	12	25254944		rs11473423	AG	40.46* 1.98E-12
patient allele	grade 2-4 acute GVHD	-	22	31853264		rs5968746	CT	31.33 2.18E-08	
patient allele	grade 3-4 acute GVHD	-	18	67101122		rs11873515	AG	30.82* 2.82E-08	
SNPs showing moderate evidence of association with acute GVHD (genome wide $P < 10\%$)									
allele mismatch	grade 2-4 acute GVHD	B	5401	5	172292507		rs12516108	CG	31.69 1.81E-08
allele mismatch	grade 2-4 acute GVHD	B	5401	8	33182886	MHC	rs8117231	AG	31.81 1.70E-08
allele mismatch	grade 2-4 acute GVHD	B	5401	4	153380271		rs12376450	AG	28.19 9.41E-08
allele mismatch	grade 2-4 acute GVHD	C	122	5	22086858		rs1747338	CT	31.15* 2.36E-08
allele mismatch	grade 2-4 acute GVHD	DOB1	121	1	18893847		rs12883218	AT	32.20 1.36E-08
allele mismatch	grade 3-4 acute GVHD	A	3500	9	110473010		rs18738007	CT	32.90 9.31E-08
allele mismatch	grade 3-4 acute GVHD	DOB1	601	20	22036086		rs13042154	CG	37.54 1.84E-07
patient allele	grade 2-4 acute GVHD	-	11	7435266		rs12828795	AG	26.77 2.29E-07	
patient allele	grade 3-4 acute GVHD	-	8	90457784		rs1843958	CT	26.66* 2.43E-07	

Candidate SNPs (continued)

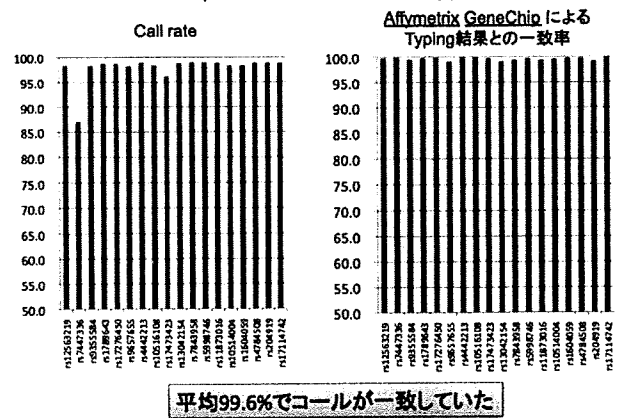
category	event	HLA mismatch	chromosome	position	SNP rsID	allele	Logrank test chi-square value	p-value	
chronic GVHD associated									
SNPs showing strong evidence of association with chronic GVHD (genome wide $P < 5\%$)									
allele mismatch	ED chronic GVHD	no mismatch	-	-	rs1284508	CT	31.43	2.07E-08	
allele mismatch	ED chronic GVHD	A	3402	16	63640072		rs1784908	CT	36.08 1.80E-08
patient allele	ED chronic GVHD	-	-	-	rs1284508	CT	33.70*	6.45E-08	
SNPs showing moderate evidence of association with chronic GVHD (genome wide $P < 10\%$)									
donor allele	ED chronic GVHD	-	-	-	rs204919	C/A	28.22*	1.08E-07	

* Log Rank test for trend

Validation analysis

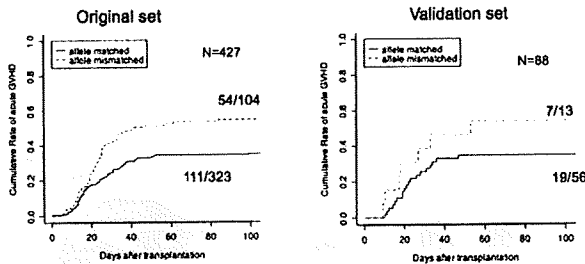
- 全ゲノム解析によって挙げた候補18SNPについて
 - Affymetrix GeneChipにより解析されたサンプル (1600移植=3200 samples)を用いたTyping Validation
 - 独立のセット(~400)を用いたReplication study
- SEQUENOM iPLEX® (MassARRAY solution for Genotyping)を用いたSNP typingを行った

iPLEX result (Validation of SNP typing)



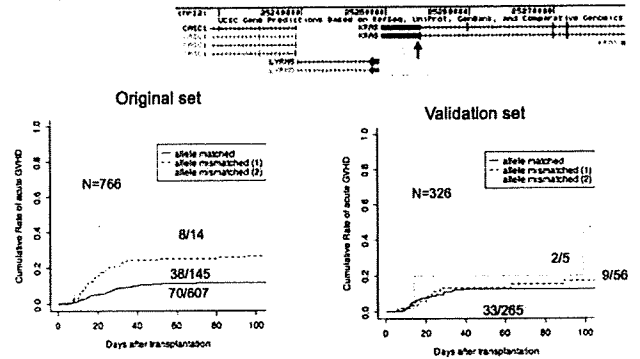
grade2-4 acute GvHDと関連のあるアレルミスマッチ (HLA Cw*0102拘束性)

Chr5 p14.3 rs7447336



grade3-4 acute GvHDと関連のあるアレルミスマッチ (HLA DQB1*0601拘束性)

Chr12 p12.1 rs17473423



Future study

- Demonstrating biological evidence
 - Expression analysis
 - Demonstrating mHag by inducing CTL from post transplant patients

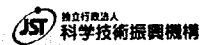
Collaborators

Japan Marrow Donation Program

Japanese Red Cross Nagoya First Hospital
Yoshihisa Kudara, Koichi Miyamura



Japanese Red Cross Tokyo Metropolitan Blood Center
Masahiro Satake, Koichi Kshiwase



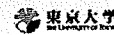
Tokai University School of Medicine 東海大学
Hidetoshi Inoko, Makoto Onizuka

Aichi Cancer Center Research Institute
Yoshiaki Akatsuka, Kazuaki Kawase, Hironori Torikaji, Satoko Morishima, Kunio Tsujimura, Yasuo Morishima, Toshitada Takahashi, Kiyotaka Kuzushima

NPO HLA laboratory 日本赤十字社 HLA研究所
Hiroo Saji, Etsuko Maruya

Kyushu University KYUSHU UNIVERSITY
Ken Yamamoto

University of Tokyo
Aiko Matsubara, Yasuhito Nannya, Yasuko Ogino, Masashi Sanada, Wang Lili, Motohiro Kato, Mineo Kurokawa, Shigeru Chiba



同種造血幹細胞移植における Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 遺伝子多型の影響

村瀬未帆¹、西田徹也¹、鬼塚真仁^{2,3}、村田誠¹、宮村耕一²、猪子英俊⁴、直江知樹¹

1. 名古屋大学大学院 血液・腫瘍内科学 2. 名古屋第一赤十字病院 血液内科

3. 東海大学 血液・腫瘍内科 4. 東海大学 分子生命科学

【背景】Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4) は、T細胞の活性化を抑制する分子であり、その遺伝子多型と自己免疫疾患や移植後免疫反応との関連が報告されている。今回、我々は、ドナーの CTLA-4 遺伝子多型が同種造血幹細胞移植に及ぼす影響を検討した。

【方法】1987年から2006年に名古屋大学病院血液内科及び名古屋第一赤十字病院血液内科にて造血器悪性疾患に対して施行された HLA 一致同胞間造血幹細胞移植のうち、短期メソトレキセートとシクロスポリンを GVHD 予防法とする非 T細胞除去移植 147例を対象とした。ドナーにおける CTLA-4 の 3つの SNP: -318 (rs5742909)、+49 (rs231775)、CT60 (rs3087243)の遺伝子型を Taqman PCR 法及びシーケンス法により決定し、日本人の HapMap データをもとにハプロタイプを決定した。Cox 比例ハザードモデルを用いて多変量解析を行った。

【結果】HapMap データから日本人におけるハプロタイプ (-318, +49, CT60) は、CGG、CAA、TAG の 3種類のみであることがわかった。147 症例のハプロタイプ頻度は、CGG 59.5%、CAA 30.6%、TAG 9.9%であった。多変量解析の結果、ハプロタイプ CAA を有するドナーから移植を受けた場合、再発率は有意に低く (HR: 0.53, 95%CI: 0.29-0.96, p=0.035)、全生存率は有意に高かった (HR: 0.60, 95%CI: 0.36-0.99, p=0.047)。また無病生存率は高い傾向が見られた (HR: 0.66, 95%CI: 0.41-1.06, p=0.085)。急性及び慢性 GVHD 発症と非再発死亡については、ハプロタイプ CAA の有無で差は認められなかった。

【考察】HLA 一致同胞間造血幹細胞移植において、ドナーの CTLA-4 ハプロタイプ (-318, +49, CT60) が CAA の場合に、再発を抑制し生存率を向上させることが示され、ドナー選択に有用な情報となる可能性が示唆された。

移植免疫反応と遺伝子多型の 解析



金沢大学
Jルイス・エスピノーザ
高見昭良
中尾眞二

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

- JMDPを通じてHLAアリル一致非血縁者間骨髄移植を受けた血液がん患者とそのドナー(360例)。

IL-17(A)

- プロモーター領域のSNP(rs2275913, G197A)を解析。
- 患者側197A遺伝子型はII-IV急性GVHDの有意な危険因子(HR 1.87; 95%CI 1.23-2.85; $P=0.004$)であった(図1)。
- 急性GVHD関連死亡に関与する傾向もみられた($P=0.095$)。
- 健常人の末梢血単核球をIL2とIL-15で刺激し、IL-17産生量を検討したところ、197A遺伝子型保有者の誘導能は有意に低かった(図2)。
- したがって、IL-17 197A遺伝子型を有する患者は、IL-17低誘導能の結果、急性GVHD発症率が高まる可能性が示唆された。

NKG2D

- SNP(rs1049174)に基づく、高NK活性型(NKG2D-HNK1)と低NK活性型(NKG2D-LNK1)のハプロタイプ保有を解析。
- HNK1ハプロタイプ陽性ドナーを持つ患者の移植関連死亡率(TRM)は低く、全生存率(OS)も良好であった(HR 0.44; 95% CI 0.23-0.85; $P=0.01$)(図3)。

FCGR3A

- SNP(rs396991)に基づく、高ADCC型158Vと低ADCC型158Fの保有を解析。
- 158V陽性患者のTRMは低く(図4)、OSも良好であった(HR 0.49; 95% CI 0.26-0.93; $P=0.03$)。

图1

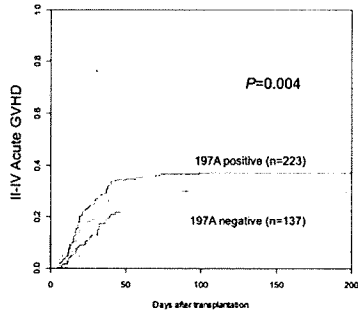


图2

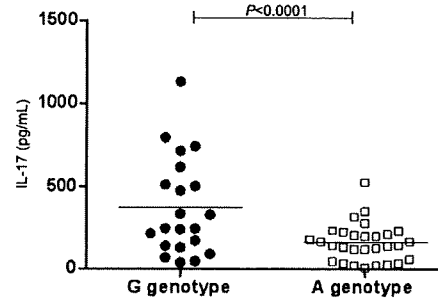


图3

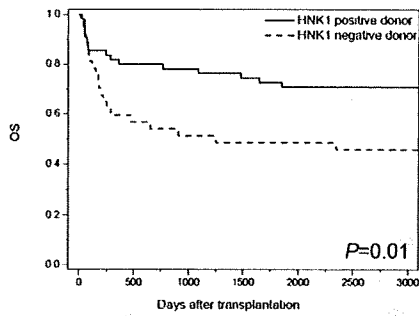
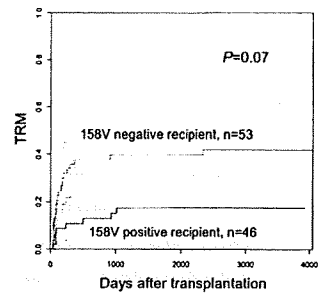


图4



Single nucleotide polymorphisms in immunoregulatory genes associate with HSCT outcomes in a Japanese population

C. Harkensee (1,2), A. Oka (1), P.G. Middleton (2), M. Onizuka (1), H. Inoko (1), Y. Morishima (3), T. Yabe (4), K. Hirayasu (4), K. Kashiwase (4), A.R. Gennery (2), for the Japan Marrow Donor Programme (JMDP)

(1) Division of Molecular Life Sciences, Tokai University, Isehara, Japan; (2) Institute of Cellular Medicine, University of Newcastle upon Tyne, UK; (3) Aichi Cancer Center, Nagoya, Japan; (4) Japanese Red Cross Tokyo Metropolitan Blood Center, Tokyo, Japan

Non-HLA genetic variation associating with outcomes of haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) has been described by a large number of studies. Findings, however, are rarely consistent, as the overall effect size of the polymorphism on the outcome is often small and may be affected by variation in population and clinical characteristics (ethnicity, related/unrelated transplant, HLA matching, clinical risk factors).

The aim of this study is to identify in a robust way single nucleotide polymorphisms (SNP) that display consistent association over a longer period of time, withstanding changes in clinical characteristics of the transplantation.

We have selected 39 SNP markers in 20 immunoregulatory genes, all of these were described as being associated with HSCT outcomes in previous studies. We individually genotyped all 39 markers on a first set of 460 HSCT pairs from the JMDP registry (1993-2000) using standard or custom TaqMan assays (Applied Biosystems). Markers that showed a positive association or a trend were genotyped for confirmation on a second set of 460 HSCT pairs (from the time period 2001-2005). Both cohorts were stratified for underlying disease (acute leukaemia), age (4-40 years), conditioning regimen (myelo-ablative) and HLA matching (35% 10/12 or 12/12 match) and had no statistically significant differences of these clinical characteristics (these two cohorts are identical with the 1st and 2nd screening DNA pools of the microsatellite study). Investigated outcomes include acute Graft-versus-host disease (aGVHD), chronic GVHD (cGVHD), engraftment, relapse and survival, analysed also in a subgroup containing the 10/12 and 12/12 HLA matched pairs. Fisher's Exact Test and Kaplan-Meier analyses were performed using SPSS (v15.0). All p-values were corrected for multiple testing using Bonferroni's correction according to the number of SNP tested in each step of the study.

At the first screening step 5 SNP showed significant association or trend with HSCT outcomes (Donor: IL10-1082 AG genotype risk for survival, $p=0.0018$; recipient: CTLA4 rs231777 TT genotype risk for severe aGVHD, $p=0.0018$; TNF-1031 TT-CC genotype match risk for aGVHD grade 4, $p=0.0017$; trend for genotype mismatch with aGVHD grade 4, $p=0.0224$; FAS-670 TT genotype risk for aGVHD, $p=0.0013$; CT genotype protective against relapse, $p=0.0025$; IL2-330 GG genotype risk for aGVHD grade 4, $p=0.0014$, GT genotype protective for survival, $p=0.0021$, and a trend of the GT genotype with risk of cGVHD in the HLA subgroup only ($p=0.0391$). At the confirmatory typing, the IL2-330 GT genotype associated with cGVHD ($p=0.013$), which was even more marked in HLA-matched subgroup analysis ($p=0.0004$). The TNF-1031 TT genotype showed association with aGVHD ($p=0.0094$); and genotype mismatch correlated with aGVHD grade 4 ($p=0.0053$).

When combining the data of both screenings (920 pairs), associations of the TNF-1031 TT genotype with aGVHD ($p=0.0275$, OR 1.47) and genotype mismatch with aGVHD grade 4 ($p=0.0002$, OR 2.91), as well as the IL2-330 GT genotype association with cGVHD ($p=0.0217$, OR 1.39 overall; $p=0.00005$, OR 2.54, in HLA matched subgroup) were confirmed.

This study has identified the recipient IL2-330 GT SNP genotype (cGVHD) and TNF-1031 genotype mismatch (aGVHD) as consistent risk factors in both screening steps and combined analysis. Other associations were less consistent, suggesting that significance may depend on variation in clinical risk factors. For clinical application as a risk predictive tool, SNP associations independent of subtle changes in clinical factors would be desirable.

A systematic scanning of the immunogenome with microsatellite markers in a Japanese HSCT population reveals multiple genetic risk loci for graft-versus-host disease

C. Harkensee (1,2), A. Oka (1), P.G. Middleton (2), M. Onizuka (1), A.R. Gennery (2), H. Inoko (1), Y. Morishima (3), for the Japan Marrow Donor Programme (JMDP)

(1) Division of Molecular Life Sciences, Tokai University, Isehara, Japan; (2) Institute of Cellular Medicine, University of Newcastle upon Tyne, UK; (3) Aichi Cancer Center, Nagoya, Japan

Non-HLA gene polymorphisms contribute to the immune response leading to Graft-versus-host Disease (GVHD). We applied a systematic approach using microsatellite (ms) marker typing for a large number of immune response genes on pooled DNA of Japanese donors and recipients of haematopoietic stem cell transplants (HSCT) to identify recipient and donor risk loci for GVHD. Ms, due to their multiple alleles, are more informative than single nucleotide polymorphisms (SNP).

We selected 4,231 ms markers, tagging 3,093 target genes (representing the 'immunogenome') at close proximity (<100kb). We selected 922 unrelated HSCT donor/recipient pairs from the Japan Marrow Donor Programme (JMDP) registry, based on clinical homogeneity (acute leukaemia, age 4-40 years, myeloablative conditioning, bone marrow source). 35% of pairs had a 10/12 or 12/12 HLA match. The population was split into discovery and confirmation cohorts with 460/462 pairs each. Eight DNA pools, four for each of the two independent screening steps were created using a highly accurate DNA pooling method. While 4,321 ms were typed on the four pools of the 1st screening step, only markers positive here were typed on the 2nd screening pools. Fisher's exact test for 2x2 (each ms allele) and 2xm ChiSquare tests were performed, comparing allele frequencies of recipients with GVHD grade 0-1 with GVHD grade 2-4 (donors accordingly). Markers positive after both independent screening steps (p-value <0.05, same associated allele, consistent odd's ratio (OR)) were genotyped for confirmation on individual samples of all 922 pairs.

The independent, 2-step pooled DNA screening process has effectively reduced false-positive associations. In the final analysis, 39 (recipient) and 58 (donor) ms loci remain associated with risk or protection from GVHD. Of 14 microsatellite loci so far investigated by individual typing, four loci were confirmed while two showed a trend (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).

Our data show that genetic susceptibility to GVHD following HSCT is complex and depends on multiple recipient and donor risk loci. Large-scale genomic screening with microsatellites on pooled DNA, here described for the first time in a HSCT population, is a useful method for the systematic evaluation of multigenic traits.

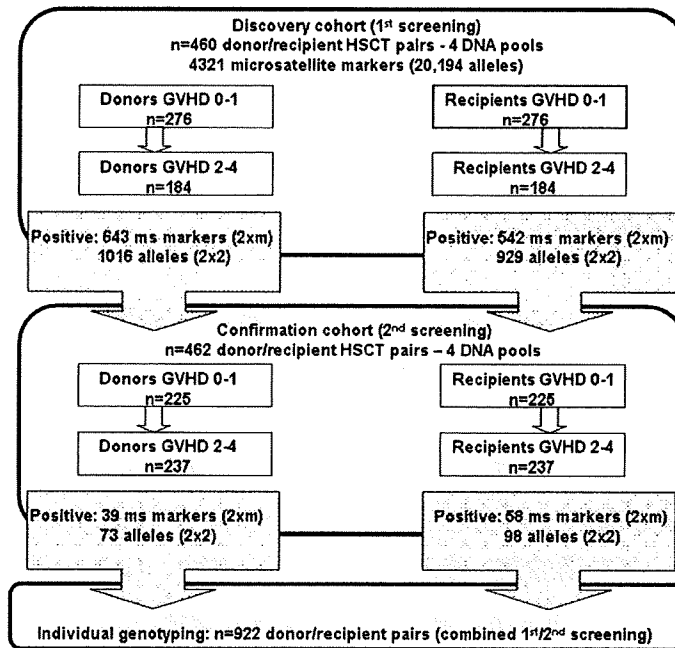


Fig. 1. Study design and results, comparing microsatellite allele frequencies in pooled DNA. Allele frequencies were derived from allele peak height in microsatellite typing

ドナー由来の T 細胞から見た HLA-C の適合度と NK 細胞受容体(KIR2DL ligand)適合度に基づいた治療成績の分析

川瀬孝和(1) 柏瀬貢一(2) 森島泰雄(1) 組織適合性部会

1. 愛知県がんセンター研究所 2. 東京都赤十字血液センター

ドナー・患者間での HLA の適合度が非血縁者間骨髄移植の臨床成績に関与している事がこれまでの解析で明らかにされてきた。HLA-C の適合度に関しては、ドナー由来の T 細胞から見た適合度(適合、GVH 方向に適合、HVG 方向に不適合、両方向に不適合、以下 HLA-C 適合度と略す)と NK 細胞受容体(KIR2DL ligand)の適合度(以下 NK 細胞受容体適合度と略す)がある。JMDP を介した移植における各々の臨床的重要性はこれまでの解析で明らかとなっているが、相互の関係については十分な解析がなされていない。そこで今回、HLA-A、B、DR の血清型が適合した JMDP5210 症例を、ドナー由来の HLA-C 適合度と NK 細胞受容体適合度で下表のように群分けし解析を行った。方法は多変量解析の手法を用い、HLA-C 適合群を基準として、各群の重症急性 GVHD 発症リスク・死亡リスク(Hazard ratio (HR)) および 95%信頼区間(95%CI) を算出した。調整因子として臨床的因子と他座の適合度を用いた。

NK細胞受容体 (KIR2DL ligand)適合度	ドナー由来のT細胞から見たHLA-Cの適合度			
	適合	HVG方向不適合 (Hetero to Homo)	GVH方向不適合 (Homo to Hetero)	両方向に 1アレル不適合
適合	①	②	④	⑥
HVG方向不適合				⑦
GVH方向不適合		③		
両方向不適合				⑤

【結果】

HLA-C、NK 細胞受容体の HVG 方向の不適合はともに重症急性 GVHD 発症リスク、死亡リスクの上昇はわずかであり、一方、GVH 方向の不適合は重症急性 GVHD 発症リスク、死亡リスクを上昇させることが示唆された。さらに、HLA-C の GVH 方向の不適合、NK 細胞受容体の GVH 方向の不適合がともにある群(⑧)の重症急性 GVHD 発症リスクが最も高かった。

今後の更なる検討が必要であるが、今回の解析により、JMDP を介した移植におけるドナー由来の T 細胞から見た HLA-C の適合度と NK 細胞受容体(KIR2DL ligand)適合度の相互関係がある程度明らかとなった。

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 平成21年度第2回班会議

「NK細胞受容体、サイトカイン遺伝子多型および検体保存事業協力」

東京都赤十字血液センター

○屋部登志雄、平安恒幸、中本貴之、峯元陸子、柏瀬貢一

1、KIR遺伝子型、HLAリガンド型適合性

昨年度までに1993～2000年の非血縁者間骨髄移植症例を解析し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、その効果はATG投与およびドナー活性化型KIR遺伝子の有無に影響されることを報告してきた。今年度は2001～2005年までの移植症例の解析を行い、これまでの結果の再現性確認およびHLA適合症例におけるKIR型と成績との関連について検討した。

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が報告されている(Nat Immunol 2004)。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。昨年度は機能的にPIR-Bと類似するLILRB2のSNPタイピングを行った。今年度はさらに他のLILR遺伝子SNPについてもHLA6座アリル一致症例ペアをタイピングして、移植成績との関連解析を行っている。

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か所のSNPハプロタイプが急性重症GVHD発症および無病生存率と関連することを報告した。本研究では、米国での血縁者間HLA一致骨髄移植解析(New Eng J Med 2003)と関連するハプロタイプが全く異なる結果となり、白人と東アジア人集団でのハプロタイプ多様性の違いによるものと考えられた。そこで今年度はさらに周辺領域のSNPと成績との関連を解析した。

4、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2007年度に保存された1588検体について行った。また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、配布する系の構築を終了し、解析希望研究者への検体配布作業(東海大学担当)に協力した。

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
(主任研究者 森島泰雄)

平成 21 年度第 2 回班会議プログラム

2010 年 1 月 30 日 (土) 午後 6 時～7 時

会場 東京医科歯科大学 5 号館 4 階講堂

座長 岡本真一郎

(発表 8 分 討議 2 分)

1. 成人血液悪性腫瘍患者における HLA 不一致非血縁者間骨髄移植と臍帯血移植の比較
熱田由子、鈴木律朗、森島泰雄、加藤俊一
名古屋大学 愛知県がんセンター 東海大学
2. 成人各種移植法の単一施設における評価—骨髄異形成症候群・多発性骨髄腫・悪性リンパ腫
などにおける生存率の比較
大橋一輝、坂巻 壽、秋山秀樹、山下卓也、小林 武
都立駒込病院
3. 移植後早期ホスカルネット投与による HHV-6 脳炎予防の試み
石山謙 大畑欣也 近藤恭夫 中尾真二
金沢大学付属病院
4. 再発性濾胞性リンパ腫に対する非血縁者間骨髄移植
小野由佳子 森毅彦 岡本真一郎
慶應義塾大学血液内科

座長 森島泰雄

5. 急性リンパ性白血病患者に対する Medium-dose VP/ CY/TBI 前処置を用いた同種造血
幹細胞移植法の有用性の検討 (臨床第 II 相試験) : 進捗状況 (8 分)
重松昭男 今村雅寛
北海道大学血液内科
6. 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) : 進捗状況 (8 分)
西田徹也 宮村耕一
名古屋大学血液・腫瘍内科学 名古屋第 1 赤十字病院
7. 研究班総括
森島泰雄
愛知県がんセンター中央病院