

201023014A

厚生労働科学研究費補助金

免疫・アレルギー疾患等予防・治療研究事業

組織適合性に基づく非血縁同種造血幹細胞移植の成績向上

に関する研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森島 泰雄

平成 23 年 (2011) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	
組織適合性に基づく非血縁同種造血幹細胞移植の成績向上に関する研究	1
研究代表者 森島 泰雄	
II. 分担研究報告	10
分担研究課題：造血幹細胞移植における組織適合性抗原の関与に関する研究	
研究分担者 森島 泰雄	
分担研究課題：ドナー選択アルゴリズムの構築—ハイリスクHLAアレル組合せの解析	
研究分担者 笹月 健彦	
分担研究課題：非血縁者間骨髄移植におけるゲノムワイドな組織適合遺伝子の検索に関する研究	
研究分担者 猪子 英俊	
分担研究課題：ゲノムワイド関連解析によるGVHDの遺伝子座の探索	
研究分担者 小川 誠司	
分担研究課題：HLA不適合移植における免疫反応のin vitro解析およびドナー選択アルゴリズム	
研究分担者 村田 誠	
分担研究課題：造血幹細胞移植におけるNK細胞受容体、サイトカイン遺伝子多型の影響およびHLAタイピング法の構築と検証	
研究分担者 屋部登志雄	
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	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	31
V. 研究成果の刊行物・別冊	32

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）

(H20-免疫一般-014)

総括研究報告書

組織適合性に基づく非血縁同種造血幹細胞移植の成績向上に関する研究

研究代表者 森島泰雄 愛知県がんセンター中央病院 副院長・部長

研究要旨：日本骨髄バンクを介した患者とドナーの同意が得られた検体を保存し、そのHLA遺伝子型の同定を行うとともに、非血縁者間骨髄移植を受けた患者とドナーのHLA遺伝子型とその他の組織適合性抗原を精緻な細胞遺伝学的な手法（HLAとその分子解析、HLAハプロタイプ解析、HLA遺伝子以外の多型解析（Whole genome SNPs、マイクロサテライト、サイトカイン受容体、NK細胞受容体）、In vitro解析）で解析することにより得られたGVHD、GVLに関与する組織適合性抗原の同定や新知見は、JMDPでのドナー選択HLA検査や移植の臨床に応用され、移植成績の向上をはかることができた。

研究分担者氏名・所属機関（職名）

森島 泰雄・愛知県がんセンター中央病院・

副院長 部長

猪子 英俊・東海大学医学部・

医学部長 教授

笹月 健彦・九州大学高等研究院・

特任主幹教授

小川 誠司・東京大学大学院・

特任准教授

村田 誠・名古屋大学医学部附属病院・

講師

屋部登志雄・東京都赤十字血液センター・係長

高見 昭良・金沢大学病院輸血部 准教授

A. 研究目的

日本骨髄バンク（JMDP）からの非血縁者

間骨髄移植が18年間に約12000例、日本さい帯血ネットワークからの移植が約6000例実施されているが、長期生存率はそれぞれ約60%と40%に留まり満足すべきものではない。成績を悪化させる主な原因は同種移植に伴う重症移植片対宿主病（GVHD）の発症、移植片の拒絶と移植後の造血器腫瘍の再発であり、ドナーと患者の組織適合性抗原の違いがこれら免疫反応と生存に大きく関与することが本研究班におけるJMDP症例を用いた解析で次第に明らかになってきた。

本研究は、JMDPを介した患者とドナーのペアの同意が得られた検体を保存し、より精緻な細胞遺伝学的な手法（HLAとその分子解析、HLAハプロタイプ解析、HLA遺伝子

以外の多型解析 (Whole genome SNPs、マイクロサテライト、サイトカイン受容体、NK細胞受容体)、In vitro 解析) を用い、HLA と HLA 以外の組織適合性抗原とその多型が移植免疫反応に与える影響を明らかにする。これら患者とドナーの組織学的な情報と臨床情報に基づき、適切なドナー選択の個別化アルゴリズム (基準) を構築することを目的とする。

B. 研究方法

1. 非血縁者間骨髄移植症例とドナーの検体保存

同意が得られた非血縁者間骨髄移植実施患者とドナーの血液検体を細胞、DNA に分離し、凍結保存する (骨髄移植推進財団検体保存事業として実施)。

2. HLA 抗原座および HLA 抗原型の違いが移植免疫反応と生存に及ぼす影響の解析

JMDP を介した非血縁者間骨髄移植症例におけるドナーと患者の HLA 型と臨床データからなるデータベースを作成する。HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 の遺伝子型を同定し、whole genome 増幅法を用い、検体を増量し、解析用サンプルセットを作成する。

Cox hazard model 等を用いた多変量解析法により移植免疫反応に関与する不適合 HLA 抗原の組み合わせを同定する。非血縁者間移植における「許容されない HLA 型の不適合の組み合わせ」と「許容される HLA 型の組み合わせ」を検索し、従来 HLA 抗原座の不適合により選択されなかったドナーからの移植を可能にさせる。

3. HLA ハプロタイプの検討

HLA 領域の multi-SNPs データと HLA 型

を用いて解析。

4. 国際ワークショップにおける検討

本研究で得られる知見が、日本人間だけではなく他の民族においても認められる普遍的なものであることを検証するため、国際組織適合性ワークショップにおいて国際的な移植データベースによる解析を行った。

5. HLA 以外の組織適合性に関与する抗原と多型の移植成績に及ぼす影響の検討

以下の解析手法を用いて解明する。

1) NK 細胞受容体関連抗原の関与 : KIR 関連遺伝子とその多型の解析

2) HLA 領域とその他の領域のマイクロサテライト解析

3) サイトカイン受容体多型等の解析

4) Whole genome SNPs 解析

6. 統合解析

本研究で有意になった多数の組織適合性抗原多型の中で臨床的に有用な多型の重みづけ解析 (統合解析) を行い、影響の大きい多型を見出し JMDP での組織適合検査に組み込むことを目的として、本研究班で同定された、あるいは論文化されている 50 種の多型を抽出し、HLA 完全適合 450 ペアの DNA を用いて Tagman 法で解析を実施している。。

(倫理面への配慮)

本研究で用いるデータと試料は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」「疫学研究に関する倫理指針」により骨髄バンク等により患者、ドナーへの説明と同意が得られたものを用いた。

C. 研究結果

1. 非血縁者間骨髄移植症例とそのドナーの検体整備

患者とドナーの血液検体（約 500 ペアー 1000 検体）を細胞、DNA に分離し、保存した。

2. HLA 適合度が移植免疫反応に与える影響の解析

1) 検体の調整と HLA 検査法の確認

約 1000 検体の HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 の遺伝子型を同定した。

(2) 市販の WGA キット 3 種類を用いて全ゲノム増幅効率と増幅前後検体による HLA タイピング結果を比較し、最適な系（約 1 万倍の増幅率）を決定し、東海大学と協力して同系を用いて患者ドナー保存検体の増幅作業を実施した。また解析希望検体セットをロボットシステムで作成、配布する系を構築した。

2) 許容されない HLA 型の組み合わせのドナー選択アルゴリズムへの導入

許容されない HLA 型の組み合わせ群が明らかになっていたが、許容できない組み合わせは、JM DP のドナー選択アルゴリズムに組み入れられた。

4. 日本人に特有な HLA ハプロタイプとその高度な保存性と移植免疫反応への関与

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

非血縁者間骨髄移植における HLA ハプロタイプと急性 GVHD との関連を解析すると、日本人に高頻度に認められる HLA-A から HLA-DPB1 と広範囲に及ぶ HLA ハ

プロタイプを同定することができた。さらに、特定の HLA ハプロタイプ (HP-P2) を有する患者において急性 GVHD の発症頻度が低く、HP-P3 では高くなる傾向が認められた。

この HLA ハプロタイプの SNP のコンセンサスシーケンスに基づき、250 名の日本人に存在する HLA ハプロタイプとその均一性を明らかにすることができた。これら同定された多数の HLA ハプロタイプを用いて HLA が HLA-A から HLA-DPB1 までは完全一致していれば HLA ハプロタイプとして適合しているかどうか検索中である。

2) HLA ハプロタイプは造血幹細胞移植における移植片対宿主病 (GVHD) に関わる重要な遺伝的要因であるが、関連性の研究においてはしばしば HLA ハプロタイプ推定が行われる。日本骨髄バンク (JM DP) 1800 移植のドナー・レシピエントの SNP タイピングデータからデータベースを構築し、その情報に基づいた HLA ハプロタイプ推定方法を検討した。さらに、HLA 領域にアレル不均衡がある症例を用いて妥当性の評価を行った。妥当性の評価が可能な JM DP 症例 9 例についてハプロタイプ推定を実施した結果、9 例中 5 例においてデータベースから選択されたデータとの Incompatible rate が 1% を下回り、残り 4 例については 1.6-6.3% であった。不適合度の低い 5 例中全例において推定ハプロタイプの妥当性が認められた一方、不適合度が比較的高い (1% 以上) 症例については、1 例において推定ハプロタイプが妥当と評価されたが、4 例中 3 例においては HLA-A, DPB1 locus において推定ハプロタイプからの recombination が予測された。

またこの3例については、妥当性の検討において、Incompatible SNPs がコピー数の変化が検出された領域に集中していた。これらの結果から、SNP タイピングとJMDP データに基づく HLA ハプロタイプ推定は、有用なハプロタイプ推定方法と考えられた。

3) ドナー選択アルゴリズムの構築—ハイリスクHLAアレル組合せの解析

HLA-DPB1 遺伝子座のミスマッチは、GvH あるいは GvL を惹起するが、それぞれにおいてミスマッチの組み合わせは異なる。また、ミスマッチ間での HLA 分子内アミノ酸置換に特定の傾向は認められず、DPB1 ミスマッチと GvH および GvL における HLA 多型の意義は不明で解決すべき課題である。本年度は、HLA 領域に位置する一遺伝子多型と DPB1 各アレルとの連鎖不平衡を解析し、DPB1 と非 HLA 遺伝子との関連を検討した。その結果、DPB1*02:01 および DPB1*05:01 では DPB1 遺伝子座近傍の限定的な領域に位置する SNP とのみ連鎖不平衡にあったが、DPB1*04:01, *04:02, *09:01 では中等度に連鎖不平衡の関係にある SNP が広い範囲で分布することが明らかとなった。したがって、後者の DPB1 アレルでは、HLA 領域内非 HLA 遺伝子多型を考慮した解析の必要性が示唆された。

5. 非血縁者間造血幹細胞移植における急性GVHD発症率、白血病再発率、移植後生存率の人種による違いの解析

HLA-AからDQB1まで適合したT細胞除去法を用いないGVHD予防法をにより非血縁者間移植を実施した5543症例を用いて多変量解析することにより、日本人間の移植の急性GVHDの頻度、白血病の再発率、移植

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

6. HLA以外の組織適合性に関与する抗原と多型の移植成績に及ぼす影響の解析

1) マイクロサテライト多型解析により、IL1RAPL2, MAPK14, DNAH17, TNF, TBL1X, MMP25, ELTD1, MAP3K4, IL7R, AKT3, S100Z, CAV1に急性GVHD発症と統計学的に有意な関連を認めた。IL2-330のG/TのSNPが慢性GVHD発症に強く関連していることが見いだされた(p=0.00007)。またTNF α -1031とTNFRSF1Bは重症急性GVHDの発症と統計学的に有意に関連していた。

2) 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。

3) IL-17遺伝子多型(rs2275913, G197A)解析を行い、197A陽性 vs. 197A陰性で比較検討した。骨髓破壊的移植(360ペア)群では、患者側の197A陽性は、急性GVHDの有意な危険因子であった(ハザード比1.33・95%信頼

区間 1.00-1.76 · $P=0.05$)。骨髓非破壊的移植 (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 · $P=0.01$)。

4) 抑制性サイトカインである *IL-10* 遺伝子のプロモーター領域 SNP および *IL-10* 受容体遺伝子 SNP と移植成績について解析し、患者 *IL-10* 遺伝子プロモーター-SNP ハプロタイプが急性 GVHD 重症化および無病生存率と関連することを明らかにした。昨年度までの解析で急性 GVHD 重症化との関連が得られた抑制性サイトカイン *IL-10* 遺伝子多型について、mRNA 産生量との関係についての解析を行った。患者 *IL-10* 遺伝子が高発現型の場合に急性重症 GVHD 発症率が低いことが明らかとなった。

5) 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 *HLA*-6 座 12 抗原一致症例の解析を継続し、昨年度までの解析分と合わせて合計約 600 検体の *KIR* タイピングを終了した。各遺伝子の組合せハプロタイプ A, B および新しく提案された *Cen*, *Tel* モチーフ分類も加えて、*KIR* 遺伝子型と移植成績との関連解析を行った。*Tel-B* モチーフ陽性ドナー AML 症例移植では急性 GVHD 重症化の低下が見られた。

6) *HLA* 5 座適合 1600 移植に関する全ゲノム関連解析を実施し、GVHD 関連遺伝子座の探索を行い、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。さらに、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。

7) Granzyme B が T リンパ球による細胞傷害活性の中心を担っていること、一塩基多型 (SNP) が Granzyme B 誘導能に関与することに着目し、同種造血幹細胞移植における Granzyme B 遺伝子多型の影響を解析した。対象は、*HLA*-A/B/C/DRB1/DPB1/DQB1 一致非血縁者間骨髓破壊の前処置骨髓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 360 組。Granzyme B SNP (rs7144366, A295G) を解析を行い、GG (Granzyme B 低誘導型) vs. AG/AA (Granzyme B 高誘導型) で比較検討した。GG 陽性ドナーからの移植は、再発の有意な危険因子であった(ハザード比 4.17 · 95% 信頼区間 1.63-4.17 · $P<0.01$)。ただし、生存率に有意な影響はなかった。以上から、GZMB 多型解析により、移植後再発率の低いドナーを選べる可能性が示唆された。

伝子発現を調整している可能性が示唆された。これにより、NKG2D 遺伝子多型が、移植後転帰に影響していると考えられた。

7. HLA 不適合が関わる移植免疫発症機構の in vitro での解析

GVH 方向に *HLA* 1 座不適合の母から骨髓移植を受け、移植後制御不良な GVHD を合併していたにも関わらず T-LBL/L が再発した症例に着目し、移植後再発白血病細胞における *HLA* の発現量低下と、その *HLA* 分子特異的な T リンパ球との関連について検討を行った。移植後再発 T-LBL/L 細胞では不適合 *HLA* の発現量が低下していた。移植後患者体内からはこの *HLA* 分子特異的な細胞傷害活性を示すドナー由来 T リンパ球クローンが多数分離された。それらはいずれも、移植前 T-LBL/L 細胞を傷害したが移植後

再発 T-LBL/L 細胞は傷害しなかった。これらの結果は、移植後に難治性の GVHD が持続しながら同時に白血病再発を来すメカニズムを説明しうるものと考えられる。

D. 考察

わが国の HLA 解析研究は世界の非血縁移植の HLA 研究を常にリードし、その解析結果は JMDP における HLA 検査法とドナー選択への適格で迅速な導入がなされてきた。計画的かつ継続的な保存事業による多数検体の保存と組織適合性研究者による最新の組織適合性研究手法の導入によりはじめて可能になるものである。本研究で得られる新しい精緻な組織適合性検索とドナー選定への応用により、今後いっそう移植成績の向上と両バンクの効率的な運用に寄与するものと考えられる。また、人の GVHD 発症機構を明らかにする上で、基礎的にも重要な知見を提供している。今後、非血縁さい帯血移植、非血縁末梢血幹細胞移植における同様な解析とこれらの結果にもとづく、移植法選択のアルゴリズムの確立が急務である。

E. 結論

非血縁者間骨髄移植を受けた患者とドナーの HLA 遺伝子型とその他の組織適合性抗原を精緻な細胞遺伝学的な手法 (HLA とその分子解析、HLA ハプロタイプ解析、HLA 遺伝子以外の多型解析 (Whole genome SNPs、マイクロサテライト、サイトカイン受容体、NK 細胞受容体)、In vitro 解析) で解析することにより得られた GVHD、GVL に関与する組織適合性抗原の同定や新知見は、JMDP で

のドナー選択 HLA 検査や移植の臨床に応用され、移植成績の向上をはかることができた。

F. 健康危機情報

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; Japan Marrow Donor Program. Impact of highly conserved HLA haplotype on acute graft-versus-host disease. *Blood*. 2010 Jun 10;115(23):4664-70.
- 2: Nishiwaki S, Inamoto Y, Sakamaki H, Kurokawa M, Iida H, Ogawa H, Fukuda T, Ozawa Y, Kobayashi N, Kasai M, Mori T, Iwato K, Yoshida T, Onizuka M, Kawa K, Morishima Y, Suzuki R, Atsuta Y, Miyamura K. Allogeneic stem cell transplantation for adult Philadelphia chromosome-negative acute lymphocytic leukemia: comparable survival rates but different risk factors between related and unrelated transplantation in first complete remission. *Blood*. 2010 Jul 27. [Epub ahead of print]
- 3: Takami A, Espinoza JL, Onizuka M, Ishiyama K, Kawase T, Kanda Y, Sao H, Akiyama H, Miyamura K, Okamoto S, Inoue M, Ohtake S, Fukuda T,

- Morishima Y, Kodera Y, Nakao S. A single-nucleotide polymorphism of the Fc-gamma receptor type IIIA gene in the recipient predicts transplant outcomes after HLA fully matched unrelated BMT for myeloid malignancies. *Bone Marrow Transplant.* 2011. 46: 238-243. Apr 19.
- 4: Murase M, Nishida T, Onizuka M, Inamoto Y, Sugimoto K, Imahashi N, Murata M, Miyamura K, Kodera Y, Inoko H, Naoe T. Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 haplotype correlates with relapse and survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, in press.
- 5: Inamoto Y, Murata M, Katsumi A, Kuwatsuka Y, Tsujimura A, Ishikawa Y, Sugimoto K, Onizuka M, Terakura S, Nishida T, Kanie T, Taji H, Iida H, Suzuki R, Abe A, Kiyoi H, Matsushita T, Miyamura K, Kodera Y, Naoe T. Donor single nucleotide polymorphism in the *CCR9* gene affects the incidence of skin GVHD. *Bone Marrow Transplant*, 2010, 45(2): 363-369.
- 6: Warren EH, Fujii N, Akatsuka Y, Chaney CN, Mito JK, Loeb KR, Gooley TA, Brown ML, Koo KK, Rosinski KV, Ogawa S, Matsubara A, Appelbaum FR, Riddell SR. Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation with T cells specific for minor histocompatibility antigens. *Blood.* 2010;115:3869-3878.
- 7: Villalobos IB, Takahashi Y, Akatsuka Y, Muramatsu H, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Saji H, Kato M, Ogawa S, Kojima S. Relapse of leukemia with loss of mismatched HLA resulting from uniparental disomy after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2010;115:3158-3161.
- 8: 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.*, 45(5):846-848, 2010
- 9: Onizuka M, Kunii N, Toyosaki M, Machida S, Ohgiya D, Ogawa Y, Kawada H, Inoko H, Ando K: Cytochrome P450 genetic polymorphisms influence the serum concentration of calcineurin inhibitors in allogeneic hematopoietic SCT recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2010, 1-6.

2. 学会発表

- 1: Kawase T, Morishima Y, et al. Universal role for HLA-C and KIR2DL ligand mismatch in severe acute

- graft-versus-host disease after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation in Japanese and Caucasian recipients. BMT Tandem Meeting. Feb. 18, 2011 Hawaii, USA
- 2: Takami A, et al. A Minor Genetic Variation In the Granzyme B Gene Predicts Relapse After HLA-Fully-Matched Unrelated Bone Marrow Transplantation for Hematologic Malignancies. ASH Annual Meeting. 4-7 December 2010, Orlando, USA
- 3: Takami A, et al. A Functional Variation In the NKG2D Gene Regulates NKG2D Receptor Expression and Is Associated with Better Transplant Outcomes After Fully-HLA-Matched Unrelated Bone Marrow Transplantation. ASH Annual Meeting. 4-7 December 2010, Orlando, USA
- 4: Takamasa Katagiri, Aiko Matsubara, Koichi Kashiwase, Motohiro Kato, Yasuo Morishima, Kohei Hosokawa, Shigeki Ohtake, Seishi Ogawa, Shinji Nakao. Immunologically-Selected hematopoiesis caused by HLA Allelic Loss In Patients with Aplastic Anemia. The 52nd annual meeting of American Society of Hematology. Orland USA 2010 Dec..
- 5: T. Yabe, K. Hirayasu, K. Kashiwase, T. Nakamoto, A. Matsubara, M. Onizuka, A. Ogawa, M. Takanashi, M. Satake, H. Saji, S. Ogawa, T. Sasazuki, Y. Kodera, Y. Morishima, K. Nakajima *IL-19* and *IL-10* SNPs are associated with acute Graft-versus-Host Disease and survival after *HLA*-fully-matched unrelated bone marrow transplantations in Japan. 14th International Congress of Immunology. Osaka. 2010. 8. 25
- 6: Kondo Y, Katagiri T, Hosokawa K, Ohata K, Yamazaki H, Ogawa S, Nakao S. Loss of HLA Class-I Expression In Leukemic Cells That Relapsed After HLA-Matched and -Mismatched SCT. The 52st annual meeting of American Society of Hematology. Orland, UAS Dec. 2010.
- 7: Takamasa Katagiri, Motohiro Kato, Aiko Matsubara, Shigeki Ohtake, Seishi Ogawa, Shinji Nakao. Immunologically-Selected Hematopoiesis Caused by HLA Allelic Loss In Patients with Aplastic Anemia. 第 72 回日本血液学会総会 平成 22 年 9 月, 横浜
- 8: 屋部登志雄。クラス I 認識受容体と造血幹細胞移植。第 19 回日本組織適合性学会大会シンポジウム 平成 22 年 9 月、東京
- 9: 中本貴之、平安恒幸、東史啓、峯元睦子、柏瀬貢一、小川篤子、高梨美乃子、佐竹正博、中島一格、屋部登志雄。抑制性サイトカイン *IL-10* 遺伝子多型と発現量との関連。第 19 回日本組織適合性学会大会 平成 22 年 9 月、東京
- 10: 森島聡子、小川誠司、松原亜似子、柏瀬貢一、笹月健彦、森島泰雄。Multi-SNP 解析による日本人 HLA パプロタイプの一貫性の検討。第 19 回日本組織適合性学会大会 平成 22 年 9 月、東京

- 11: 小川誠司、松原亜以子、鬼塚真、柏瀬貢一、真田昌、南谷泰仁、佐竹正博、千葉滋、佐治博夫、丸谷悦子、猪子英俊、森島泰雄、GWAS の手法による同種造血幹細胞移植の遺伝学的背景の探索、第 19 回日本組織適合性学会、2010 年 9 月
- 12: 細道一善、椎名隆、井ノ上逸朗、猪子英俊、次世代シーケンサーによる HLA ハプロタイプのリシーケンス、第 19 回日本組織適合性学会、2010 年 9 月 東京
- 13: 中本貴之、屋部登志雄、東史啓、峯元睦子、柏瀬貢一、佐竹正博、小川篤子、高梨美乃子、中島一格。東京都血液センター臍帯血バンク由来の臍帯血移植における KIR

適合性の関連。第 33 回日本造血細胞移植学会総会 平成 23 年 3 月 9 日 松山

- 14: 森島聡子、小川誠司、松原亜以子、柏瀬貢一、笹月健彦、森島泰雄。Multi-SNP 解析による日本人 HLA ハプロタイプの均一性と非血縁者間骨髄移植における SNP 一致度と急性GVHDへの関与の検討。第 33 回日本造血細胞移植学会総会 平成 23 年 3 月 松山

H. 知的財産権の取得状況

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）

(H20・免疫・一般・014)

分担研究報告書

分担研究課題：非血縁者間造血細胞移植に関わる組織適合性抗原の統合解析

研究分担者 森島泰雄 愛知県がんセンター中央病院

研究協力者 松尾恵太郎 愛知県がんセンター研究所

研究要旨： JMDP を介した UR-BMT における移植成績とドナー・患者の組織適合性との関連解析により、移植免疫反応に関与する HLA 抗原、HLA 領域の非 HLA 遺伝子、HLA 領域以外の遺伝子とその多型が次第に明らかになってきた。しかしながら、同定された個々の遺伝子とその多型が、全体の遺伝子とその多型と比較してどの程度の影響を与えているかは明らかでない。このため、HLA 抗原と一部の遺伝子（KIR など）を除いては組織適合性に基づくドナー選択に用いられていない。本解析は、本研究班の組織適合性解析により得られた個々の遺伝子とその多型に加え、文献上有用であることが推測される多型つき、共通の試料（DNA）を用い、これら遺伝子と多型の移植免疫反応と移植成績に対する影響度を測定する。臨床的に意義のある遺伝子と多型を明らかにし、ドナー選択のアルゴリズムに組み込むことを目的とした。

A. 研究目的

JMDP を介した UR-BMT における移植成績とドナー・患者の組織適合性との関連解析により、移植免疫反応に関与する HLA 抗原、HLA 領域の非 HLA 遺伝子、HLA 領域以外の遺伝子とその多型が次第に明らかになってきた。しかしながら、同定された個々の遺伝子とその多型が、全体の遺伝子とその多型と比較してどの程度の影響を与えているかは明らかでない。このため、HLA

抗原と一部の遺伝子（KIR など）を除いては組織適合性に基づくドナー選択に用いられていない。

本解析は、組織適合性解析として骨髄移植推進財団にデータ・試料の利用を申請し承認された研究により得られる個々の遺伝子とその多型につき、共通の試料（DNA）を用い、これら遺伝子と多型の移植免疫反応と移植成績に対する影響度を測定することにより、臨床的に意義

のある遺伝子と多型を明らかにし、ドナー選択に有用な知見を得ることを目的とする。さらに、統一したデータベースが構築されることにより、今後の組織適合性研究が効率的かつ精緻に実施されることが期待される。

B. 研究方法(研究計画)

(添付資料：研究計画概念図)

- 1) TagMan法、Luminex法によるSNP解析(頻度20%以上)
- 2) 特定遺伝子領域のシーケンスと多型の解析
- 3) 解析予定の遺伝子を別表に記載
- 4) 臨床データも含めた多変量解析によるリスク分析
- 5) 利用データ・試料の内容、対象数

A: 統合解析 part-1 (study 1-4)

以下の1から4の条件を満たす400ペア

1. HLA-A～-DPB1 適合 UR-BMT 症例。
2. 白血病・MDS 症例
3. GVHD 予防法：non-T cell depletion.
CSP+MTX 法 または TAC+MTX 法
4. Whole genome amplification 試料が保存されているペア。

B: 統合解析 part-2

以下の条件を満たす3000ペア(Validation + HLA mismatch との比較)

1. 統合解析 part-1 を除くペア
2. 白血病・MDS 症例
3. Whole genome amplification 試料が保存

されているペア。

研究担当者：分担研究者と研究協力者

7. 研究実施期間

平成22年9月～平成26年8月

C. 研究結果

平成22年度は統合解析part-1 (study 1) を実施している。対象SNPを約60選定し、TagMan法を用いて解析中である。

D. わが国の HLA 解析研究は世界の非血縁移植の HLA 研究を常にリードし、その解析結果は JMDP における HLA 検査法とドナー選択への適格で迅速な導入がなされてきた。計画的かつ継続的な保存事業による多数検体の保存と組織適合性研究者による最新の組織適合性研究手法の導入によりはじめて可能になるものである。本研究で得られる新しい精緻な組織適合性検索とドナー選定への応用により、今後いっそう移植成績の向上と両バンクの効率的な運用に寄与するものと考えられる。また、人の GVHD 発症機構を明らかにする上で、基礎的にも重要な知見を提供している。今後、非血縁さい帯血移植、非血縁末梢血幹細胞移植における同様な解析とこれらの結果にもとづく、移植法選択のアルゴリズムの確立が急務である。

E. 結論

非血縁者間骨髄移植を受けた患者とドナーの HLA 遺伝子型とその他の組織適合性抗原を精緻な細胞遺伝学的な手法 (HLA とその分子解析、HLA ハプロタイプ解析、HLA 遺伝子

以外の多型解析 (Whole genome SNPs、マイクロサテライト、サイトカイン受容体、NK細胞受容体)、In vitro 解析) で解析することにより得られたGVHD、GVLに関する組織適合性抗原SNPsを統合解析することにより、JMDPでのドナー選択HLA検査や移植の臨床に応用され、移植成績の向上をはかることができると考えられる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

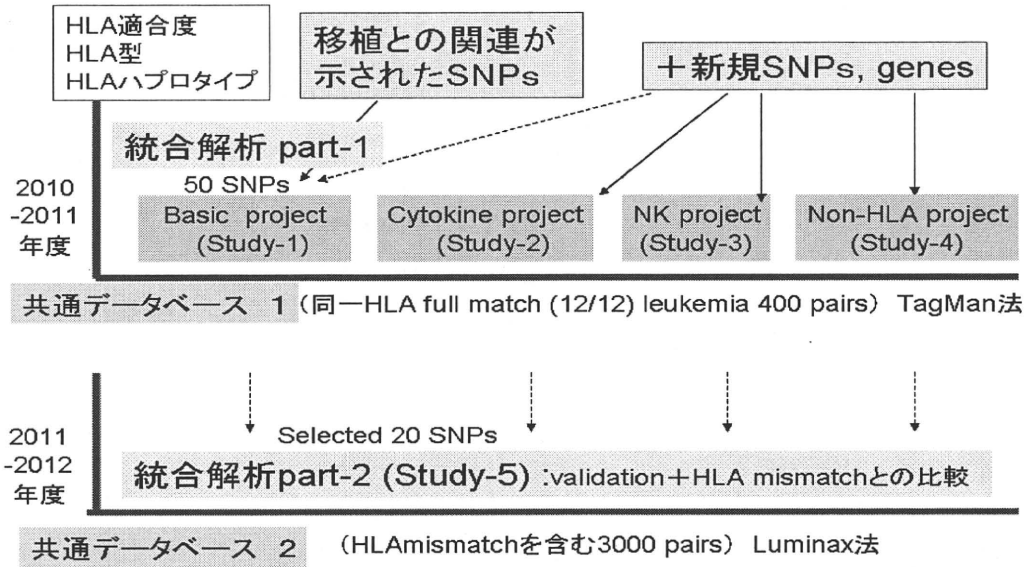
1. 論文発表

- 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; Japan Marrow Donor Program. Impact of highly conserved HLA haplotype on acute graft-versus-host disease. *Blood*. 2010 Jun 10;115(23):4664-70.
 - 2: Nishiwaki S, Inamoto Y, Sakamaki H, Kurokawa M, Iida H, Ogawa H, Fukuda T, Ozawa Y, Kobayashi N, Kasai M, Mori T, Iwato K, Yoshida T, Onizuka M, Kawa K, Morishima Y, Suzuki R, Atsuta Y, Miyamura K. Allogeneic stem cell transplantation for adult Philadelphia chromosome-negative acute lymphocytic leukemia: comparable survival rates but different risk factors between related and unrelated transplantation in first complete remission. *Blood*. 2010 Jul 27. [Epub ahead of print]
- ### 2. 学会発表
- 1: Kawase T, Morishima Y, et al. Universal role for HLA-C and KIR2DL ligand mismatch in severe acute graft-versus-host disease after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation in Japanese and Caucasian recipients. BMT Tandem Meeting. Feb. 18, 2011 Hawaii, USA
 - 2: Takamasa Katagiri, Aiko Matsubara, Koichi Kashiwase, Motohiro Kato, Yasuo Morishima, Kohei Hosokawa, Shigeki Ohtake, Seishi Ogawa, Shinji Nakao. Immunologically-Selected hematopoiesis caused by HLA Allelic Loss In Patients with Aplastic Anemia. The 52nd annual meeting of American Society of Hematology. Orland USA 2010 Dec..
 - 3: 森島聡子、小川誠司、松原亜似子、柏瀬貢一、笹月健彦、森島泰雄。Multi-SNP解析による日本人HLAパプロタイプの均一性の検討。第19回日本組織適合性学会大会 平成22年9月、東京
 - 4: 森島聡子、小川誠司、松原亜似子、柏瀬貢一、笹月健彦、森島泰雄。Multi-SNP解析による日本人HLAパプロタイプの均一性と非血縁者間骨髄移植におけるSNP一致度と急性GVHDへの関与の検討。第33回日本造血細胞移植学会総会 平成23年3月 松山

H. 知的財産権の取得状況

なし

統合解析概念図



解析遺伝子候補

Study-1

HLA	HLA-E, (F), (G)
HLA	HLA-C rs9264942
HLA 領域	HCP5
HLA 領域	TAP1/TAP2
HLA 領域	LMP2/LMP7
HLA 領域	TNFA 3rs
NK	NKG2D
minorHA	BCL2A1 (ACC-1Y, -2)
minorHA	BCL2A1 (ACC-1C)
minorHA	UGT2B28
minorHA	UGT2B17
minorHA	LCE3C
minorHA	OR51A2
minorHA	GST-M1
minorHA	GST-T1
cytokine	IL-2
cytokine	IL-10 3'UT
cytokine	IL-10 promotor 3rs
cytokine	IL-10R
Apoptosis	PD-1
Apoptosis	FAS
Apoptosis	Granzyme B
Apoptosis	perforin
innate	FCGR3a
innate	NOD2/CARD15
innate	ATG16L1
薬剤感受性遺伝	CYP2C19
薬剤感受性遺伝	CYP3A5
薬剤感受性遺伝	MDR1
薬剤感受性遺伝	OCT1
薬剤感受性遺伝	MXR
others	DCAL1
others	HPSE 2rs
others	TP53
others	MDM2
others	MTHFR
others	TL5-9 2rs

Study-2

cytokine	IL-1A
cytokine	IL-1B
cytokine	IL-4R
cytokine	IL-6 2rs
cytokine	IL-8
cytokine	IL-9
cytokine	IL-12
cytokine	IL-17A -F
cytokine	IL-18
cytokine	IL-19 7rs
cytokine	IL-19R
cytokine	IL-22
cytokine	IL-23
cytokine	IL-23R
cytokine	IL-27
cytokine	IL-35
cytokine	TGF-β 1 4rs
cytokine	TGF-β R
cytokine	TNFR2
others	MBL
cytokine	CTLA4
chmokine	CCL2 2rs
chmokine	CCL21
chmokine	CCR5
chmokine	CCR7
chmokine	CCR9
chmokine	CXCL12
innate immunity	FCGR2a
innate immunity	FCGR3b
innate immunity	MPO
innate immunity	PTPN22
innate immunity	TLR-1
innate immunity	TLR-2
innate immunity	TLR-4
innate immunity	FCRL3

others MBL-2 6rs

Study-3

糖鎖	Siglec-1	NK	KIR3DP1
糖鎖	Siglec-10	NK	KIR3DS1
糖鎖	Siglec-14	NK	KLRB1(NKRP1A)
糖鎖	Siglec-15	NK	KLRF1(NKp80)
糖鎖	Siglec-2(CD22)	NK	LILRA3, 5
糖鎖	Siglec-3(CD33)	NK	LILRB1,2
糖鎖	Siglec-4(MAG)	NK	LIRA(Ly49)(10650)
糖鎖	Siglec-5	NK	NKG2A(KLRC1)
糖鎖	Siglec-6	NK	NKG2C(KLRC3)
糖鎖	Siglec-7	NK	NKG2E
糖鎖	Siglec-8	NK	NKp30
糖鎖	Siglec-9	NK	NKp44
糖鎖	Siglec-E	NK	NKp46
糖鎖	Siglec-F	NK	RAET1E
糖鎖	Siglec-G	NK	RAET1L
糖鎖	Siglec-H	NK	RAETG
NK	CD94(KLRD1)	NK	ULBP1
NK	KIR2DL1	NK	ULBP2
NK	KIR2DL2	NK	ULBP3
NK	KIR2DL3	NK	CD226(D-NAM1)
NK	KIR2DL4	NK	CD69
NK	KIR2DL5	NK	CLEC12A(MICL)
NK	KIR2DP1	NK	CLEC12B
NK	KIR2DS1	NK	CLEC1A(10100K)
NK	KIR2DS2	NK	CLEC1B(10037K)
NK	KIR2DS3	NK	CLEC2B
NK	KIR2DS4	NK	CLEC2D
NK	KIR2DS5	NK	CLEC7A(Dectin 1)
NK	KIR3DL1	NK	NKG5(Granulysin)
NK	KIR3DL2	NK	NKG7(GMP-17)
NK	KIR3DL3		

Study-4 (sequence 解析)

HLA 領域	MICA/B	HLA 領域	TAP1/TAP2
HLA 領域	HCP5	HLA 領域	LMP2/LMP7

ドナー選択アルゴリズムの構築—ハイリスクHLAアレル組合せの解析

研究分担者 笹月健彦 九州大学高等研究院特別主幹教授

研究要旨

HLA-DPB1 遺伝子座のミスマッチは、GvH あるいは GvL を惹起するが、それぞれにおいてミスマッチの組み合わせは異なる。また、ミスマッチ間での HLA 分子内アミノ酸置換に特定の傾向は認められず、DPB1 ミスマッチと GvH および GvL における HLA 多型の意義は不明で解決すべき課題である。本年度は、HLA 領域に位置する一遺伝子多型と DPB1 各アレルとの連鎖不平衡を解析し、DPB1 と非 HLA 遺伝子との関連を検討した。その結果、DPB1*02:01 および DPB1*05:01 では DPB1 遺伝子座近傍の限定的な領域に位置する SNP とのみ連鎖不平衡にあったが、DPB1*04:01, *04:02, *09:01 では中等度に連鎖不平衡の関係にある SNP が広い範囲で分布することが明らかとなった。したがって、後者の DPB1 アレルでは、HLA 領域内非 HLA 遺伝子多型を考慮した解析の必要性が示唆された。

A. 研究目的

HLA-DPB1 遺伝子座の特定のアレルミスマッチは、GvH あるいは GvL を惹起する。しかし、両者におけるミスマッチの組み合わせは異なり、さらにミスマッチ間のアミノ酸レベルでの差異に一定の傾向が無い。本研究では、DPB1 アレルと HLA 領域内 SNP との連鎖不平衡を解析し、HLA 領域の非 HLA 遺伝子の関与の可能性について検討した。

B. 研究方法

DPB1 遺伝子型が明らかな EB 細胞株 92 検体について、イルミナ 100 万 SNP をタイピングし、拡大 HLA 領域 (26-34M) に位置する 6506SNP を解析対象とした。これらと、本検体群で 5%以上の頻度を示した DPB1*02:01, *03:01, *04:01, *04:02, *05:01, *09:01, 6 アレル間の r^2 値を HaploView にて算出した。

C. 研究結果

1. DPB1 アレルタグ SNP の同定

DPB1 アレルと $r^2=1$ を示すタグ SNP を同定した。
*04:01 (rs3130215), *04:02 (rs1367728, rs2301225, rs2281390, rs3128918, rs3130192), *05:01 (rs9378177, rs2281388, rs9380342, rs12174662, rs6937034)

2. r^2 の分布

r^2 について、0.6-0.8, 0.8-1, 1.0 を示す SNP 数を各 DPB1 アレル毎に示す。
*02:01 (12, 0, 0), *03:01 (1, 0, 0), *04:01 (14, 8, 1), *04:02 (3, 1, 5), *05:01 (15, 9, 5), *09:01 (25, 1, 0)。
 r^2 が 0.6-0.8 の SNP と各 DPB1 アレルとの距離

の平均値と最大値を示す (kb)。*02:01 (54.7, 81.1), *04:01 (456.7, 888.0), *04:02 (115.3, 136.2), *05:01 (44.0, 80.4), *09:01 (306.8, 927.0)。

D. 考察

DPB1*04:01, *04:02, *05:01 には $r^2=1$ を示す SNP が存在し、これをタイピングすることによって各 DPB1 アレルの有無が決定できる可能性がある。中等度の連鎖不平衡を示す SNP と DPB1 座との距離分布から、*04:01, *04:02, *09:01 は比較的広い範囲の SNP と連鎖不平衡の関係にあり、中でも*04:01, *09:01 では DRB1 座を越えた領域に位置する SNP と関連がある。したがって、*04:01, *09:01 を含むミスマッチには、非 HLA 遺伝子の効果を考慮する必要がある。

E. 結論

DPB1 アレルは、HLA 領域の SNP との連鎖不平衡において 2 群に大別される。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tsunoda T, Takashima Y, Tanaka Y, Fujimoto T, Doi K, Hirose Y, Koyanagi M, Yoshida Y, Okamura T, Kuroki M, Sasazuki T, Shirasawa S. Immune-related zinc finger gene ZFAT is an essential transcriptional regulator for hematopoietic differentiation in blood islands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107:14199-14204.

分担研究報告書

分担研究課題：

非血縁者間骨髄移植におけるゲノムワイドな組織適合遺伝子の検索に関する研究

研究分担者 猪子 英俊 東海大学医学部

研究要旨：マイクロサテライト多型解析により、IL1RAPL2, MAPK14, DNAH17, TNF, TBL1X, MMP25, ELTD1, MAP3K4, IL7R, AKT3, S100Z, CAV1 に急性 GVHD 発症と統計学的に有意な関連を認めた。生存率、慢性 GVHD との関連性は現在解析中である。
次に、TaqMan法によるSNP解析ではIL2-330のG/TのSNPが慢性GVHD発症に強く関連していることが見いだされた (p=0.00007)。またTNF α -1031とTNFRSF1Bは重症急性GVHDの発症と統計学的に有意に関連していた。

A. 研究目的

造血幹細胞移植の成否に最も重要な因子は HLA の一致度であるが、HLA haplo-identical な同胞間移植であっても、ときに重篤な移植後合併症を経験する。このことから、我々は HLA 以外に移植成績に影響を与える因子の存在として、マイナー組織適合抗原およびサイトカイン・ケモカインなどの移植後免疫応答に深く関わるタンパクの遺伝子多型性を解析し、HLA 以外の新たな造血幹細胞移植関連因子の探求を目的として研究をおこなっている。

B. 研究方法

1. 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解析は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462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462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する。対象とする遺伝子は2956

遺伝子とし、各遺伝子にマイクロサテライト多型を2~3設定し解析した。

2. また、造血幹細胞移植に影響すると思われる候補遺伝子として22遺伝子を対象

象に合計41のSNPについてTaqMan法による解析を行った。いずれの研究も評価項目は急性GVHD、慢性GVHD、再発、生存率に関して検討している。

C. 研究結果

マイクロサテライト多型解析により、IL1RAPL2, MAPK14, DNAH17, TNF, TBL1X, MMP25, ELTD1, MAP3K4, IL7R, AKT3, S100Z, CAV1に急性GVHD発症と統計学的に有意な関連を認めた。生存率、慢性GVHDとの関連性は現在解析中である。

次に、TaqMan法によるSNP解析ではIL2-330のG/TのSNPが慢性GVHD発症に強く関連していることが見いだされた (p=0.00007)。またTNF α -1031と

TNFRSF1Bは重症急性GVHDの発症と統計学的に有意に関連していた。

D. 考察

非血縁者間の同種骨髄移植症例において、本邦の症例においても、HLA以外の遺伝子多型が移植後の有害事象発生と関連していることが、我々の研究から見いだされた。遺伝子多型により、移植後合併症のリスクが予測可能となり、今後の造血幹細胞移植医療の安全性を高める上で、重要な研究と考える。

(参考文献)

E. 結論

マイクロサテライト多型解析および SNP 解析により、非血縁者間の同種造血幹細胞移植後合併症の発症に関連する疾患関連遺伝子が見いだされた。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ikewaki N, Nakaichi M, Mizuno T, Takamura N, Tokunaga J, Ogata K, Inoko H, Otsu R: Anti-human very late antigen-alpha4 (CD49d) monoclonal antibody (BU49) cross-reacts with the canine B-cell leukemia cell line GL-1, resulting in the induction of homotypic cell aggregation. *Cell Immunol* 263: 55-64. 2010.
2. Ikewaki N, Yamao H, Kulski JK, Inoko H: Flow cytometric identification of CD93 expression on naive T lymphocytes (CD4(+)/CD45RA(+) cells) in human neonatal umbilical cord blood. *J Clin Immunol* 30:723-733, 2010.
3. Mizuki N, Meguro A, Ota M, Ohno S, Shiota T, Kawagoe T, Ito N, Kera J, Okada E, Yatsu K, Song YW, Lee EB,

Kitaichi N, Namba K, Horie Y, Takeno M, Sugita S, Mochizuki M, Bahram S, Ishigatsubo Y, Inoko H: Genome-wide association studies identify IL23R-IL12RB2 and IL10 as Behçet's disease susceptibility loci. *Nature Genet.* 42: 703-706, 2010.

4. Onizuka M, Kunii N, Toyosaki M, Machida S, Ohgiya D, Ogawa Y, Kawada H, Inoko H, Ando K: Cytochrome P450 genetic polymorphisms influence the serum concentration of calcineurin inhibitors in allogeneic hematopoietic SCT recipients. *Bone Marrow Transplant.* Nov 22, 2010.

2. 学会発表

1. 小川誠司、松原亜以子、鬼塚真、柏瀬貢一、真田昌、南谷泰仁、佐竹正博、千葉滋、佐治博夫、丸谷悦子、猪子英俊、森嶋泰雄、GWAS の手法による同種造血幹細胞移植の遺伝学的背景の探索、第 19 回日本組織適合性学会、2010 年 9 月
2. 細道一善、椎名隆、井ノ上逸朗、猪子英俊、次世代シーケンサーによる HLA ハプロタイプのリシーケンス、第 19 回日本組織適合性学会、2010 年 9 月
3. 奥平裕子、光永滋樹、崔泰林、河田寿子、細道一善、山口香織、岡晃、井ノ上逸朗、猪子英俊、A*24:02 を有する HLA-A 遺伝子近傍の欠失領域の解析、第 19 回日本組織適合性学会、2010 年 9 月

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得
特記事項なし
2. 実用新案登録
特記事項なし
3. その他
特記事項なし