

ゲノムワイド関連解析による GVHD の遺伝学的背景の解析
－ SNP タイピングデータに基づく HLA ハプロタイプ推定 －

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

研究要旨

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。本研究では日本骨髄バンク(JMDP)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結果、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。

A.研究目的

造血幹細胞移植における GvHD や自己免疫疾患の発症に関わる重要な遺伝的要因として、HLAハプロタイプが挙げられる。これらの疾患と HLA ハプロタイプの関連性の研究は HLA ハプロタイプの情報をもとに行われるが、ファミリースタディが実施されないなどの理由からハプロタイプの推定が必要となる場合も多い。そこで本年度は、SNP ジェノタイプが得られた場合に有効となる HLA ハプロタイプ推定法を検討した。

B.研究方法

JMDP に登録されている計 1800 移植のドナー・患者について、本研究において既に Affymetrix GeneChip® 500K Array による SNP タイピングが実施されている。各個人の HLA 領域の SNP ジェノタイプおよび HLA タイピング情報と、HP-P1, HP-P2, HP-P3 のコンセンサス配列 (Morishima et al. Blood 2010;115(23):4664-70.)に基づいて、HLA 領域の SNP ハプロタイプとそれに対応する

HLA(6座)ハプロタイプからなるデータベースを構築した(N=1576)。次に、HLA ハプロタイプを推定したい症例について、保有 HLA (6座)のとり得る全組み合わせのハプロタイプに対応する SNP データを上記データベースから抽出、対象例の SNP ジェノタイプと比較の上、incompatible rate(対象例のジェノタイプデータとデータベースの SNP データが両立しない SNP の頻度)を両者の不適合度の指標として、この割合が最も低いハプロタイプを選択することにより HLA ハプロタイプの推定を行った。

さらに本推定を、HLA 領域を含む片親性二倍体を有する試料に適用することにより、本推定方法の妥当性の評価を行った。SNP アレイの Intensity データにより、推定ハプロタイプのコピー数を求めたのち、CBS(Circular binary segmentation)アルゴリズムと Wilcoxon 検定に基づいて推定されたハプロタイプ内にゲノムコピー数の異なるセグメントが存在するか検定を行った。検証結果に基づき、ゲノムコピー数が一定の場合には推定ハプ

ロタイプが妥当であるとし、異なるセグメントの存在が認められる症例については推定ハプロタイプが妥当でないと評価した。

(倫理面への配慮)

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

C.研究結果

妥当性の評価が可能な JMDP 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。

D.考察

Incompatible rate が低い(1%未満)症例においては、SNP タイピングデータを用いた推定が全例妥当であることから、一定の基準を設定することで精度の高い推定ができる可能性が示唆された。また、今後はファミリースタディによりハプロタイプが決定される例を用いて検討を行う必要性があると考えられた。

E.結論

JMDP 症例の SNP タイピングデータと HLA タイピングデータに基づいたデータベースを構築し、HLA ハプロタイプ推定を行う方法を

検討した。本方法は Incompatible rate が低い場合には有用なハプロタイプ推定方法と考えられた。今後はファミリースタディが可能な例を用いて、検討を行う必要があると考えられた。

F.研究発表

1.論文発表

1. 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.
2. 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.

2.学会発表

1. 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の検討. 第 19 回日本組織適合性学会大会. 2010;17:153.
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 52st annual meeting of American Society of Hematology. 2010.

3. 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. 2010.

4. 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 2010.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

HLA 不適合移植における免疫反応の *in vitro* 解析および
ドナー選択アルゴリズムの構築

研究分担者 村田 誠 名古屋大学医学部附属病院 血液内科 講師

研究要旨：GVH 方向に HLA 1 座不適合の母から骨髄移植を受け、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するものと考えている。

A. 研究目的

ハプロ移植後の再発白血病細胞において、loss of heterozygosity (LOH) による HLA 分子の発現消失が報告されている (NEJM 361:478-88, 2009、Blood 115:3158-61, 2010)。しかしハプロ移植以外の移植後再発における、白血病細胞の HLA 発現量低下もしくは消失の報告はほとんどない。

我々は、HLA 1 座不適合骨髄移植後の再発白血病細胞における不適合 HLA 選択的な発現量の低下と、その HLA 分子特異的な細胞傷害活性を有する T リンパ球との関連について検討を行った。

本研究の成果は、我が国で増加傾向にある HLA 不適合移植後の再発メカニズムの解明に役立ち、同種造血幹細胞移植の成績向上に

寄与しうると考える。

B. 研究方法

患者は、T-LBL/L に対し、GVH 方向に HLA 1 座不適合の母から骨髄移植を受けた。移植後制御不良な GVHD を合併していたにも関わらず、再発した。この患者から、文書による説明と同意を得て、血液等の提供をうけた。

フローサイトメトリー解析、T リンパ球培養、限界希釈法によるクローン化、細胞傷害性試験 (Cr 放出試験)、細胞刺激試験 (IFN γ 産生刺激試験)、PCR 等の分子生物学的解析などを行った。

C. 研究結果

移植後再発 T-LBL/L 細胞では、移植前

T-LBL/L 細胞と比べて、不適合 HLA の発現量が低下していた。移植後患者血液から 10 個のドナー由来 T リンパ球クローンの分離に成功した。それらは全てこの不適合 HLA を標的とする細胞傷害活性を示した。また、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。

D. 考察

この症例では、不適合 HLA 分子を認識する T リンパ球から免疫学的圧力を受け、この HLA を発現していない分画の T-LBL/L 細胞が移植後に増殖し、再発に至ったと考えられる（白血病エスケープ）。このことは、移植後に難治性 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ている。

E. 結論

HLA 1 座不適合移植では、その不適合 HLA 分子選択的な T リンパ球応答が dominant に発生するが、移植後体内に残存している白血病細胞のうち、その HLA の発現が低下もしくは消失している分画の白血病細胞が増殖し、再発に至る。この現象を我々は実際のヒト移植で確認した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Murase M, Nishida T, Murata M, et al. Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4

haplotype correlates with relapse and survival after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*, 2010 Dec 20. [Epub ahead of print]

2. Terakura S, Atsuta Y, Murata M, et al. A prospective dose-finding trial using a modified continual reassessment method for optimization of fludarabine plus melphalan conditioning for marrow transplantation from unrelated donors in patients with hematopoietic malignancies. *Ann Oncol*, 2011 Feb 2. [Epub ahead of print]

学会発表

1. Nishida T, Suzuki S, Murata M, et al. Generation of CMV antigen specific CTL using closed culture system. 第 72 回日本血液学会総会、横浜、2010 年 9 月.
2. Kato T, Nishida T, Murata M, et al. Exhaustion of CMV specific T cells with enhanced PD-1 expression in persistent cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. The 52nd Annual Meeting of the American Society of Hematology, in Orlando, Florida. December 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

造血幹細胞移植におけるNK細胞受容体、サイトカイン遺伝子多型の影響
およびHLAタイピング法の構築と検証

研究分担者	屋部登志雄	東京都赤十字血液センター製剤部
研究協力者	柏瀬貢一	東京都赤十字血液センター検査部
研究協力者	中本貴之	東京都赤十字血液センター製剤部
研究協力者	東史啓	東京都赤十字血液センター検査部
研究協力者	平安恒幸	大阪大学免疫学フロンティア研究センター

研究要旨 JMDPを介した非血縁者間骨髄移植におけるNK受容体KIRの移植成績への影響を明らかにするために、患者、ドナーの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。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。

A. 研究目的

造血幹細胞移植成績にHLA適合性が大きく影響している。HLAクラスIは抗体、T細胞受容体に加え、NK受容体のKIR(Killer Ig-like Receptor)からも認識される。NKは腫瘍細胞や感染細胞に対して傷害性をもちGVL効果や移植関連感染症防御に関与し細胞治療での効果が期待されている。NKのアロ反応性を考慮したHLAのKIRリガンド型の組み合わせ(KIR適合性)およびKIR遺伝子型多型と移植成績との関連を調べることで、より適切なドナー選択の可能性が期待される。また急性GVHDはサイトカインストームにより重篤化するので、抗炎症作用をもつサイトカインIL-10はGVHD抑制効果が期待される。そこでIL-10遺伝子多型とmRNA産生量および移植成績との関連を調べその効果を解析する。

B. 研究方法

(1) JMDPを介した非血縁者間骨髄移植症例のうちHLA-A, -B, -C, -DR, -DQ, -DP6座12抗原一致症例でGVHD予防法としてサイクロスポリンと短期メトトレキサート投与群のうち、ATG投与、T細胞除去例を除いた造血系悪性疾患を解析対象とした。

(2) KIR遺伝子多型解析は蛍光ビーズ法によるPCR-SSO法およびPCR-SSP法を用いて検査した。

(3) 抑制性サイトカインIL-10遺伝子発現解析では健常者ドナーのIL-10遺伝子プロモーター領域3箇所のSNPs(-592, -819, -1082)について蛍光ビーズ法により遺伝子型を決定し三種類のハプロタイプ(CCG, CCA, ATA)陽性者の末梢血単核球中より抽出したRNAよりcDNAを合成し、リアルタイムPCR法を用いて、IL-10および内在性コントロールのGAPDHのmRNA量を測定した。各ハプロタイプとIL-10mRNA量との関

連について統計解析を行った。

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

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

(1) HLA-6 座 12 抗原一致症例患者、ドナー約 400 検体の 16 種類の KIR 遺伝子型のタイピングを行った。昨年度までにタイピングした 200 検体と合わせて合計約 600 検体の結果から、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* モチーフ分類を行った。KIR 遺伝子領域は個体により遺伝子構成が異なり遺伝子座数および遺伝子座位置にも多様性がある。基本的な配置としてはセントロメア側から

$3DL3-2DS2-2DL2-2DL3-2DP1-2DL1-3DP1-2DL4-3DL1/S1-2DL5-2DS3/5-2DS1-2DS4-3DL2$

となっており枠で囲んだ座はほぼすべてのハプロタイプで保存されている。中央部の 3DP1, 2DL4 部分でセントロメア(上流)側、テロメア(下流)側に分割し、さらにそれぞれを *Cen-A*(2DL3-2DP1-2DL1), *Cen-B*(2DS2-2DL2), および *Tel-A*(3DL1-2DS4), *Tel-B*(3DS1-2DL5-2DS3/5-2DS1) に二分する。これらのハプロタイプと各モチーフについて移植成績との関連解析を行った。HLA-6 座 12 抗原アリル一致症例において *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。一方米国の解析で AML 移植患者での再発抑制と生存率向上効果が見られたドナー *Cen-B/Cen-B* 型の JMDP における頻度は 1% 以下しかなかった。

(2) 昨年度までの解析で HLA-6 座 12 抗原アリル一致症例 (N=312) ペアにおいて、患者 SNP ハプロタイプ (-1084, -819, -592) CCA 陽性の場合に急性重症 GVHD (2-4) 発症が軽減 (P=0.002) する結果が得られていた。今年度は *IL-10* 遺伝子多型について各 SNP ハプロタイプ陽性健常者における *IL-10* mRNA 産生量を測定した。*IL-10* 遺伝子プロモーター SNP ハプロタイプが CCA 陽性者の細胞では、陰性者の細胞に比べて mRNA 量が有

意に高かった。これより SNP ハプロタイプ CCA 陽性者細胞では *IL-10* 産生量が高いことが判明した。

D. 考察

KIR 遺伝子型の移植成績への影響についての解析はこれまで 16 種類の KIR 遺伝子の有無およびそれらの組合せのハプロタイプ A, B の 2 型について行ってきた。最近 KIR 遺伝子領域をさらに細分化したハプロタイプが移植成績に影響を及ぼすことがミネソタ大学から報告された。非血縁者間 AML 患者造血幹細胞移植においてドナーの KIR ハプロタイプが *Cen-B/Cen-B* の場合に有意に再発率が低く、無病生存率が向上していること、ドナー *Tel-B* 陽性の場合も再発率が低い (Cooley S et al. *Blood*. 2010;116:2411)。今回国内移植患者ドナーを解析したところ *Cen-B/Cen-B* 型の頻度は 1% 以下であることが判明し、日本人集団における AML 再発抑制効果の検証はできなかった。ドナー *Tel-B* については再発抑制効果が見られない一方で、急性重症 GVHD 発症率が低かった。集団により KIR ハプロタイプ頻度が異なるとともに移植成績への効果にも差異があることが判明した。今後さらに解析症例数を増やして検討を進めていきたい。

IL-10 プロモーター領域 SNP が CCA ハプロタイプ陽性の患者では、*IL-10* mRNA 産生量が多いために *IL-10* 濃度が高くなり炎症反応、免疫応答反応が抑制され、重症急性 GVHD 発症が低下する可能性が考えられた。一方シアトルグループによる白人集団が中心の解析結果では ATA ハプロタイプで重症急性 GVHD 発症が低く、非再発死亡率も低いと報告されている (Lin M et al. *New Engl J Med* 2003;349(23):2201) ので、集団により *IL-10* の効果が異なる、あるいは *IL-10* 産生量と関連するハプロタイプが異なる可能性が考えられる

E. 結論

HLA-6 座 12 抗原アリル一致症例において *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。一方 *Cen-B/Cen-B* 型の頻度は低いために、米国から報告された AML 再発抑制効果の検証はできなかった。*IL-10* プロモーター領域 SNP の CCA ハプロタイプ陽性患者では産生量が高いために、*IL-10* 濃度が高くなり炎症反応、免疫応答反応が抑制され、重症急性 GVHD 発症が低下する可能性が考えられた

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Morishima S, Ogawa S, Matsubara A, Kawase T, Nannya Y, Kashiwase K, Satake M, Saji H, Inoko H, Kato S, Kodera Y, Sasazuki T, Morishima Y. Impact of highly conserved *HLA* haplotype on acute graft-versus-host disease. *Blood* 2010;115(23):4664-70.

2) Yuliwulandari R, Sachrowardi Q, Nakajima H, Kashiwase K, Hirayasu K, Mabuchi A, Sofro AS, Tokunaga K. Association of *HLA-A*, *-B*, and *-DRB1* with pulmonary tuberculosis in western Javanese Indonesia. *Hum Immunol*. 2010 71(7):697-701.

2. 学会発表

1) 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

2) 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

3) 中本貴之、平安恒幸、東史啓、峯元睦子、柏瀬貢二、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

4) 中本貴之、屋部登志雄、東史啓、峯元睦子、柏瀬貢二、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

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

移植免疫反応と遺伝子多型の解析

研究分担者 高見昭良 金沢大学附属病院血液内科・輸血部准教授

研究要旨：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。

A.研究目的

同種造血幹細胞移植では、移植前治療に続き HLA 適合ドナーから採取した造血幹細胞を移植する。その後数か月、場合によっては数年にわたり、合併症管理の支持療法を行う。しかし、このような集学的治療を行っても、長期生存できる血液難病患者は、全体の40-60%に過ぎない。サイトカインや先天免疫などに関わる免疫関連遺伝子には免疫能の強弱に影響する1塩基多型(SNP)が認められ、その遺伝子多型が自己免疫疾患やがん・感染免疫、臓器移植へ関与することが明らかとなってきた。同種造血幹細胞移植では、ドナーと患者の免疫担当細胞が抗腫瘍効果や感染免疫、拒絶反応を起こすことが知られている。したがって、がん監視機構・自己免疫疾患発症・感染免疫に影響する免疫関連遺伝子多型が、同種造血細胞移植にも何らかの形でかかわっている可能性は十分に考えられる。本研究の目的は、がん監視機構・自己免疫疾患発症・感染免疫・臓器移植への影響が既に示されている免疫関連遺伝子多型を対象に、非血縁者間同種骨髄移植成績との関連を検討することである。患者(ホスト)・ドナーDNA を用いた多型解析と後方視的検討により、急性または慢性移植片対宿主病(GVHD)・生存・再発・感染症・生着不全との関連を明らかにし、今後の移植成績の向上を目指している。本研究計画の特徴として、TaqMan PCR 法(1時間で約100検体の多型解析が可能)が確立している既知の1塩基遺伝子多型(SNP)

に限定しているため、解析が短時間で済み、比較的速やかに結論を導き出せるという利点がある。

Granzyme B は、抗白血病活性(Mori: *Cancer Immunol Immunother* 1997)やGVHD (Kircher: *BMT* 2009)への関与が示唆されている。さらに、Granzyme B SNP (rs7144366, A295G)が Granzyme B 誘導能に関与すること(Girmita: *Transplant* 2009)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。

B. 研究方法

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360 組。

試料(DNA)と臨床情報

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

免疫関連遺伝子多型解析

TaqMan SNP 遺伝子型解析法により、患者・ドナーの Granzyme B SNP (rs7144366, A295G)を決定した。解析は、TaqMan probe (ABI 社)により ABI PRISM 7900HT 機を用いて行った。

統計解析

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

倫理面への配慮

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

C. 研究結果

GG（Granzyme B 低誘導能型）・AG（Granzyme B 高誘導能型）・AA（Granzyme B 高誘導能型）の割合は、患者側で6%・37%・57%、ドナー側で5%・34%・61%であった。ドナーGG vs. ドナーAG/AAで比較したところ、多変量解析上、GG 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、生存率や治療関連死亡率、GVHDには有意な影響はみられなかった。患者側のGranzyme B 遺伝子多型は、移植後転帰に有意な影響を及ぼさなかった。

D. 考察

移植ソースが単一で、血縁者間骨髄移植やさい帯血移植よりGVHDの発症頻度が高く、HLAと臨床情報を含む十分なデータベースを有する非血縁者間同種骨髄移植患者は、本研究の解析対象に適している。そこで、本研究は、非血縁者間同種骨髄移植患者・ドナーを対象に、Granzyme B 遺伝子多型と移植成績との関連を検討した。GG 陽性ドナーから移植を受けた患者では、移植後再発率が高まる可能性が示された。生存率には差がみられなかったが、GG ドナーが比較的少ないことが影響しているかもしれない。Granzyme B-295GG型は、AA型やAG型よりGranzyme B発現量が低いと報告されている（Girmita: Transplant 2009）。GG 陽性ドナーから移植を受けた患者では、Granzyme Bを介した細胞傷害性T細胞による抗腫瘍効果が弱く、再発が助長されている可能性が示唆された。

E. 結論

同種造血細胞移植患者・ドナーの免疫関連遺伝子多

型解析により、移植後合併症を予測し、適切に対処できるようになる可能性が示唆された。

移植後再発の予後は極めて不良であり、GG 陽性ドナー回避による再発予防は、今後有望なアプローチになるかもしれない。Granzyme B-295GG型は全体の5%に過ぎず、AG型・AA型ドナーを見いだすことは比較的容易である。今後さらに解析対象を広げ、検証したい。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takami A, Espinoza JL, et al. A single-nucleotide polymorphism of the Fcγ receptor type IIIA gene in the recipient predicts transplant outcomes after HLA fully matched unrelated BMT for myeloid malignancies. *Bone Marrow Transplant.* 2011 Feb;46(2):238-43.

2. Ishiyama K, Okumura H, Takami A, et al. Intensive chemotherapy for a relapsed ALL patient who received living-donor lobar lung transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2011 Feb 7.

3. Espinoza JL, Takami A, et al. A single nucleotide polymorphism of IL-17 gene in the recipient is associated with acute GVHD after HLA-matched unrelated BMT. *Bone Marrow Transplant.* 2011 Jan 10.

4. Asakura M, Ikegame K, Takami A, et al. Use of foscarnet for cytomegalovirus infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from a related donor. *Int J Hematol.* 2010 Sep;92(2):351-9.

2. 学会発表

1) 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

2) 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

3) Resveratrol, a Natural Antioxidant From Grapes and Red Wines, Prevents EBV-Associated Lymphoproliferation and Transformation through

Inducing Apoptosis. ASH Annual Meeting. 4-7 December 2010, Orlando, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Espiniza JL, Takami A, et al.	A single nucleotide polymorphysim of IL17 gene in the recipient is associated with acute GVHD after HLA-matched unrelated BMT.	Bone Marrow Transplant	46	On line publication	2011
Takami A, et al.	A single nucleotide polymorphysim of Fc gamma receptor type HLA gene in the recipient predicts transplant outcomes after HLA fully atched unrelated BMT for myeloid malignancies	Bone Marrow Transplant	46	238 - 243	2011
Morishima S, Ogawa S, Morishima Y, et al.	Impact of highly conserved HLA haplotype on acute graft-versus-host disease.	Blood	115	4664 - 4670	2010
Inamoto Y, Murata M, et al.	Donor single nucleotide polymorphism in the CCR9 gene affects the incidence of skin GVHD.	Bone Marrow Transplant	45	363 - 369	2010
Onizuka M, Inoko H, et al.	Cytochrome P450 genetics polymorphisms influence the serum concentration of calcinurin inhibitors in allogeneic hematopoietic SCT recipients.	Bone Marrow Transplant	46	On line publication	2010
Murase M, Murata M, et al.	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 correlates with relapse and survival after allogeneic hematopoietic SCT.	Bone Marrow Transplant	46	On line publication	2010

ORIGINAL ARTICLE

A single nucleotide polymorphism of IL-17 gene in the recipient is associated with acute GVHD after HLA-matched unrelated BMT

JL Espinoza¹, A Takami¹, M Onizuka², T Kawase³, H Sao⁴, H Akiyama⁵, K Miyamura⁶, S Okamoto⁷, M Inoue⁸, S Ohtake¹, T Fukuda⁹, Y Morishima¹⁰, Y Kodera¹¹ and S Nakao¹, for the Japan Marrow Donor Program

¹Department of Hematology and Oncology, Kanazawa University Hospital, Kanazawa, Japan; ²Department of Hematology and Oncology, Tokai University School of Medicine, Isehara, Japan; ³Division of Epidemiology, Aichi Cancer Center Hospital, Nagoya, Japan; ⁴Department of Hematology, Meitetsu Hospital, Nagoya, Japan; ⁵Hematology Division, Tokyo Metropolitan Cancer and Infectious Diseases Center, Komagome Hospital, Tokyo, Japan; ⁶Department of Hematology, Japanese Red Cross Nagoya First Hospital, Nagoya, Japan; ⁷Division of Hematology, Department of Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan; ⁸Department of Hematology and Oncology, Osaka Medical Center and Research Institute for Maternal and Child Health, Osaka, Japan; ⁹Hematopoietic Stem Cell Transplantation Unit, National Cancer Center Hospital, Tokyo, Japan; ¹⁰Department of Hematology and Cell Therapy, Aichi Cancer Center Hospital, Nagoya, Japan and ¹¹Department of Promotion for Blood and Marrow Transplantation, Aichi Medical University, Nagoya, Japan

IL-17 has an important role in the host defense against extracellular pathogens and the pathophysiology of autoimmune diseases. This study retrospectively examined the impact of a single-nucleotide polymorphism (rs2275913, G197A) in the IL-17 gene of a total 510 recipients with hematologic malignancies and their unrelated donors on the clinical outcomes in HLA-matched myeloablative (discovery study) and nonmyeloablative (validation study) BMT through the Japan Marrow Donor Program (JMDDP). In the discovery study, the presence of a 197A genotype in the recipient resulted in a higher incidence of grades II–IV acute GVHD (hazard ratio (HR), 1.87; 95% confidence interval (CI), 1.23–2.85; $P=0.004$). The donor IL-17A genotype did not significantly influence the transplant outcomes. The validation study showed a trend toward an association of the recipient 197A genotype with an increased risk of grades III–IV acute GVHD (HR, 5.84; 95% CI, 0.75–45.72; $P=0.09$), as well as a significantly increased risk for chronic GVHD (HR, 3.86; 95% CI, 1.29–11.59; $P=0.02$). These results suggest an association of the 197A genotype in the recipient side with the development of acute GVHD.

Bone Marrow Transplantation advance online publication, 10 January 2011; doi:10.1038/bmt.2010.325

Keywords: IL-17; unrelated donor; single-nucleotide polymorphism

Introduction

Hematopoietic SCT represents a therapeutic approach that can potentially cure many patients with otherwise fatal hematologic malignancies. However, its utility is limited because of transplant-related life-threatening complications including GVHD, infections and disease relapse.¹ Among these, acute GVHD is the main cause of early mortality and morbidity. Although HLA matching represents the major genetic determinant in clinical outcome after allo-SCT, recent evidence suggests that non-HLA immune-associated genes are also implicated.² Previous investigations have revealed that several single-nucleotide polymorphisms (SNPs), which impact on individual immune response to infections and inflammatory reactions are associated with SCT outcomes including the risk of acute GVHD.^{3–12}

IL-17, also known as IL-17A, is the hallmark cytokine of a new T-helper subset termed Th17.^{13–16} $\gamma\delta$ T cells, macrophages and neutrophils are sources of IL-17 as well.^{17,18} IL-17 receptor (IL-17RA), a ubiquitous type-I membrane glycoprotein, is expressed in particularly high levels in hematopoietic tissues.^{13,19,20} IL-17 has important roles in bridging innate and adaptive immunity, and is involved in the host defense against extracellular pathogens, the pathophysiology of autoimmune diseases, and allograft rejection of solid organs.^{21–29} Moreover, several reports have so far shown that Th17 cells and IL-17 has a significant impact on the development of acute GVHD in mouse models.^{30–35}

Recent reports have shown association of SNPs in the IL-17 gene with autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis and ulcerative colitis.^{36–39} The promoter SNP of the IL-17 gene, rs2275913 (G197A), was found to be associated with the susceptibility of rheumatoid arthritis in the Norwegian population³⁸ as well as that of ulcerative colitis in the Japanese population.³⁶ The finding that GVHD mimics some aspects of autoimmune diseases prompted us to investigate the impact of donor and recipient SNPs in the IL-17 gene (rs2275913,

Correspondence: Dr A Takami, Department of Hematology and Oncology, Kanazawa University Hospital, 13-1 Takaramachi, Kanazawa 920-8641, Japan.

E-mail: takami@med3.m.kanazawa-u.ac.jp

Received 29 June 2010; revised 7 October 2010; accepted 1 November 2010

G197A) on the clinical outcomes in patients following allogeneic myeloablative BMT using an HLA allele-matched unrelated donor. The data herein show that the presence of the 197A allele in the recipient is associated with a significantly higher incidence of acute GVHD.

Design and methods

Patients

In a total 510 recipients with hematologic malignancies and their unrelated donors on whom IL-17 genotyping was performed, 360 recipients in the discovery study cohort received myeloablative transplantation between January 1993 and July 2002, and 150 recipients in the validation study cohort received nonmyeloablative transplantation between January 1996 and December 2007. Transplantation was undertaken through the Japan Marrow Donor Program (JMDP) with T-cell-replete marrow from an HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 and -DPB1 allele-matched donor. HLA genotypes of patient and donor were determined by the Luminex microbead method described previously (Luminex 100 System; Luminex, Austin, TX, USA).^{40,41} Although the Luminex microbead method does not provide unambiguous HLA four-digit typing for all genotypes, JMDP has confirmed that this method can identify all HLA alleles with >0.1% frequency among the Japanese population.⁴² No patients had a history of any previous transplantation. The final clinical survey of these patients was completed by November 1, 2008. Diagnoses were acute myeloid leukemia in 156 (31%), acute lymphoblastic leukemia in 100 (20%), chronic myeloid leukemia in 94 (18%), myelodysplastic syndrome in 79 (15%), malignant lymphoma in 71 (14%), and multiple myeloma in 10 (2%; Table 1). The recipients were defined as having standard risk disease if acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia were in first CR, malignant lymphoma was in any CR and chronic myeloid leukemia was in any chronic phase and myelodysplastic syndrome. All others were designated as high-risk disease. The myeloid malignancies include acute myeloid leukemia, chronic myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome, and the lymphoid malignancies included acute lymphoblastic leukemia and malignant lymphoma. CYA- or tacrolimus-based regimens were used in all patients for GVHD prophylaxis and anti-T-cell therapy such as anti-thymocyte globulin and *ex vivo* T-cell depletion was not. All patients and donors gave their written informed consent to participate in molecular studies of this nature according to the declaration of Helsinki at the time of transplantation. The project was approved by the Institutional Review Board of Kanazawa University Graduate School of Medicine and JMDP.

IL-17 G197A genotyping

Genotyping of IL-17 was performed using the TaqMan-Allelic discrimination method⁴³ with a 7900-HT Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and results were analyzed using the Allelic Discrimination software program (Applied Biosystems). The genotyping assay was conducted in 96-well PCR plates. The amplification reaction contained template DNA, TaqMan universal master mix and the specific probe rs2275913 designed for

SNP of IL-17 G197A (product No. C_15879983_10; Applied Biosystems).

Data management and statistic analysis

Data were collected by the JMDP using a standardized report form. Follow-up reports were submitted at 100 days, 1 year and annually after transplantation. Pretransplant CMV serostatus was routinely tested for only patients but not for their donors. Engraftment was confirmed by an ANC of more than $0.5 \times 10^9/L$ for at least 3 consecutive days. Acute- and chronic GVHD were diagnosed and graded using established criteria.^{44,45} The OS was defined as the number of days from transplantation to death from any cause. Disease relapse was defined as the number of days from transplantation to disease relapse. Transplant-related mortality was defined as death without relapse. Any patients who were alive at the last-follow-up date were censored. The data on causative microbes of infections and postmortem changes in cause of death, as well as the data on supportive care including infections prophylaxis and therapy of GVHD, which were given on institution basis, were not available in this cohort. The analysis was performed using the Excel 2007 (Microsoft Corp, Redmond, WA, USA), OriginPro version 8.0J (Lightstone Inc., Tokyo, Japan) and R (The R Foundation for Statistical Computing, Perugia, Italy) software programs.⁴⁶ The probability of OS was calculated using the Kaplan–Meier method and compared using the log-rank test. The probabilities of transplant-related mortality, disease relapse, acute GVHD, chronic GVHD and each cause of death were compared using the Grey test⁴⁷ and analyzed using the cumulative incidence analysis,⁴⁶ considering relapse, death without disease relapse, death without acute GVHD, death without chronic GVHD and death without each cause as respective competing risks. The variables were recipient age at time of transplantation, sex, CMV serostatus before transplantation, disease characteristic (disease type, disease lineage and disease risk at transplantation), donor characteristics (age, sex, sex compatibility and ABO compatibility), transplant characteristics (TBI-containing regimen, tacrolimus vs CYA and total nucleated cell count harvested per recipient weight) and the year of transplant. The median was used as the cutoff point for continuous variables. The χ^2 -test and Mann–Whitney test were used to compare two groups. The Hardy–Weinberg equilibrium for the IL-17 gene polymorphism was tested using the Haploview program.⁵ Multivariate Cox models were used to evaluate the hazard ratio (HR) associated with the IL-17 polymorphism. Covariates found to be significant in univariate analyses ($P \leq 0.20$) were included in the models. For both the univariate and multivariate analyses, *P*-values were two-sided and outcomes were considered to be significant with $P \leq 0.05$.

Results

Discovery study

Frequencies of the IL-17 genotyping. The IL-17 gene polymorphism was analyzed in 360 unrelated BM donor-myeloablative transplant recipient pairs (Table 1). The genotype frequencies of 197A/A, 197A/G and 197G/G were 16, 46 and 38% in recipients and 14, 51 and 36% in

Table 1 Donor and recipient characteristics

	Discovery study (myeloablative transplantation)				P	Validation study (nonmyeloablative transplantation)				P
	Recipient IL-17 genotype					Recipient IL-17 genotype				
	197A positive n = 223, 62%		197A negative n = 137, 38%			197A positive n = 87, 58%		197A negative n = 63, 42%		
	No.	Ratio (%)	No.	Ratio (%)	No.	Ratio (%)	No.	Ratio (%)		
<i>Age, years</i>										
<i>Recipient</i>										
Median		33		29	0.12		53		51	0.99
Range		2–65		1–65			1–70		3–68	
<i>Donor</i>										
Median		34		33	0.11		35		33	0.47
Range		20–51		22–51			21–50		20–51	
<i>Year of transplant</i>										
Median		1998		1998	0.65		2004		2004	0.22
Range		1993–2002		1993–2002			1996–2007		1996–2007	
<i>Donor IL-17 genotype</i>										
197A positive	145	65	87	64	0.77	53	61	40	63	0.75
197A negative	78	35	50	36		34	39	23	37	
<i>Sex, male</i>										
<i>Recipient</i>										
Recipient	136	61	74	54	0.81	61	70	39	62	
<i>Donor</i>										
Donor	141	63	77	56	0.19	26	30	24	38	
<i>Recipient/donor sex</i>										
Sex matched	138	62	86	63	0.99	62	71	43	68	0.20
Male/female	45	20	27	20		14	16	6	10	
Female/male	40	18	24	18		11	13	14	22	
<i>Disease</i>										
Acute myeloid leukemia	73	33	37	27	0.25	23	26	23	37	0.19
Acute lymphoblastic leukemia	48	22	38	28	0.18	9	10	5	8	0.62
Chronic myeloid leukemia	53	24	31	23	0.80	4	5	6	10	0.23
Myelodysplastic syndrome	25	11	16	12	0.89	26	30	12	19	0.13
Malignant lymphoma	23	10	14	10	0.98	19	22	15	24	0.78
Multiple myeloma	1	0	1	1	0.73	6	7	2	3	0.32
<i>ABO matching</i>										
Match	148	66	88	64	0.35	52	60	40	63	0.65
Major mismatch	38	17	17	12		18	21	16	25	
Minor mismatch	32	14	28	20		21	24	10	16	
Bidirectional	5	2	4	3		4	5	3	5	
<i>Conditioning regimen</i>										
With total body irradiation	177	79	115	84	0.28	53	61	39	62	0.90
Without total body irradiation	46	21	22	16		34	39	24	38	
<i>Pretransplant CMV serostatus</i>										
CMV positive recipient	149	67	98	72	0.35	68	78	53	84	0.36
Missing	26	12	18	13	0.68	8	9	10	16	0.21
<i>GVHD prophylaxis</i>										
With cyclosporine	145	65	91	66	0.71	39	45	26	41	0.66
With tacrolimus	78	35	46	34		48	55	37	59	
<i>TNC × 10⁸ per kg</i>										
Median		5.7		5.7	0.89		4.2		4.5	0.13
Range		0.1–87.0		0.6–87.0			0.8–74.2		1.3–33	
Engraftment	220	99	136	99	0.59	81	93	59	94	0.89

Abbreviation: TNC = total nucleated cell count harvested.

donors. These were similar to previous reports^{38,48} in Japanese populations (15, 52 and 33%, respectively) and Caucasian populations (13, 48 and 39%, respectively), and were in accord with the Hardy–Weinberg equilibrium ($P = 0.91$).

Transplant outcome according to the IL-17 genotype. The median follow-up duration in the cohort was 90 months among the survivors (range 4–171 months), 102 recipients (28%) had relapsed or progressed and 187 (52%) had died. Three patients (1%) died before engraftment.

The transplant outcomes according to the IL-17 genotype are summarized in Table 2. The presence of the 197A genotype in the recipient was associated with a significantly higher incidence of grades II–IV acute GVHD (37 vs 23%, $P=0.004$; Figure 1a) as well as a trend toward a higher incidence of grades III–IV acute GVHD (16 vs 10%, $P=0.08$; Figure 1b), whereas no significant differences between the 197A/A and the 197A/G genotype in the recipient were seen in incidences of grades II–IV (38 vs 34%, $P=0.69$) and grades III–IV (17 vs 16%, $P=0.96$) acute GVHD. The 197A genotype on the recipient side showed a tendency to increase a risk of mortality of acute GVHD as a primary cause of death (6 vs 2%, $P=0.095$). There were no significant differences in the impact of a 197A in the recipient genotype on OS, transplant-related mortality, relapse, chronic GVHD or extensive chronic GVHD (data not shown). The donor genotype showed no significant effects on either of these variables in addition to acute GVHD (Table 2).

Multivariate analysis. All of the factors found to be significant in univariate analyses were included in the model. The 197A genotype in recipients remained statistically significant in the multivariate analyses for the development of grades II–IV acute GVHD (Table 3). The presence of a 197A genotype in the recipient side resulted in a higher incidence of grades II–IV acute GVHD (HR, 1.87; 95% confidence interval (CI), 1.23 to 2.85; $P=0.004$) when adjusted for the other factors in the models. In the combined patient group of acute lymphoblastic leukemia and acute myeloid leukemia, this effect was also positive and was close to statistical significance (HR, 1.84; 95% CI, 0.98–3.43; $P=0.056$).

Validation study

The characteristics of the patients in the validation study were similar to those of the patients in the discovery study except for conditioning regimen and recipient age (Table 1). The univariate analysis showed a significant association between the recipient 197A genotype and a higher incidence of grades III–IV acute GVHD (15 vs 4%, $P=0.04$; Figure 1d), whereas no significant difference in the incidence of grades II–IV acute GVHD (33 vs 26%, $P=0.37$; Figure 1c). In the multivariate analysis, the validation study performed on nonmyeloablative SCT did not confirm the association of recipient 197A with grades II–IV acute GVHD found in the discovery study, although there was a trend toward an association with grades II–IV acute GVHD (HR, 5.84; 95% CI, 0.75–45.72; $P=0.09$; Table 4). The recipient 197A genotype was associated with a significantly increased risk for chronic GVHD (HR, 3.86; 95% CI, 1.29–11.59; $P=0.02$), although this association was not found in the discovery study.

Discussion

The discovery study on the basis of myeloablative transplantation showed that the IL-17 197A genotype on the recipient side was associated with a higher risk of grades

Table 2 Univariate analysis of the association of IL-17 genotype with clinical outcomes after transplantation in the discovery study

	No.	5-year OS (%)	P	5-year TRM (%)	P	5-year relapse (%)	P	II–IV acute GVHD (%)	P	III–IV acute GVHD (%)	P	Chronic GVHD (%)	P
Recipient IL-17A genotype													
197A positive	223	53	0.89	27	0.20	24	0.21	37	0.004	16	0.08	48	0.94
197A negative	137	53		21		31		23		10		48	
Donor IL-17A genotype													
197A positive	232	50	0.13	27	0.09	27	0.93	31	0.71	14	0.70	49	0.66
197A negative	128	56		21		27		34		13		47	

Bold values have statistical significance.

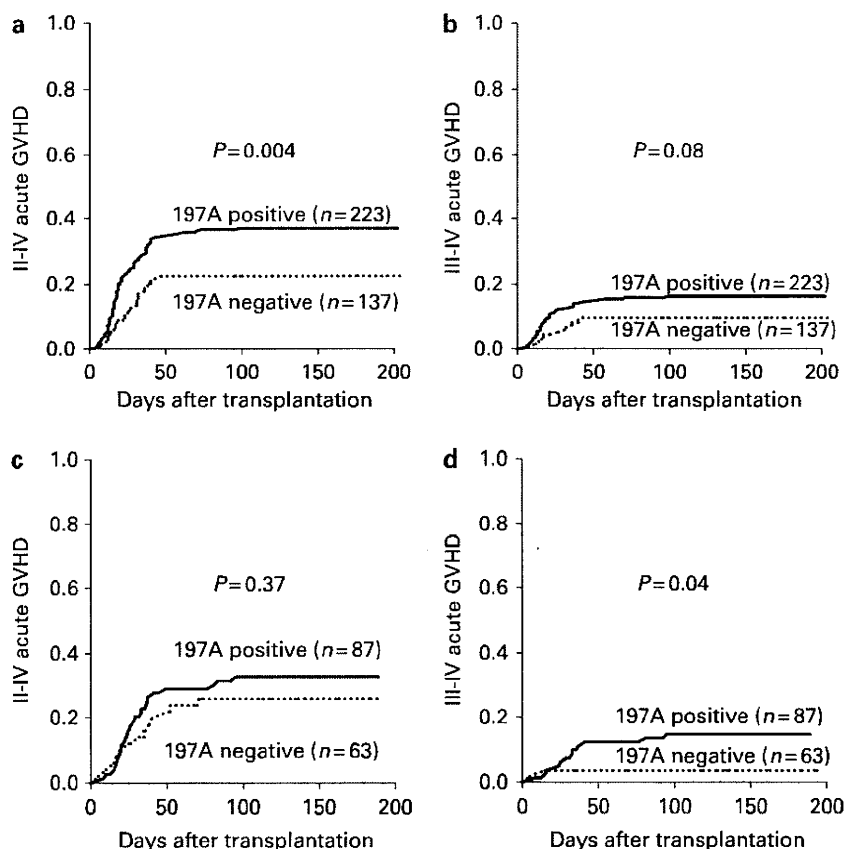


Figure 1 Estimated cumulative incidence curves of grades II-IV (a, c) and grades III-IV (b, d) acute GVHD according to the recipient IL-17 genotype in the discovery study (a, b) and the validation study (c, d).

Table 3 A multivariate analysis of the association of IL-17 genotype with the clinical outcomes after transplantation in the discovery study

	OS			TRM			Relapse		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P	HR	95%CI	P
197A-positive recipient	0.99	0.72-1.37	0.97	1.00	0.64-1.56	0.99	0.92	0.61-1.37	0.67
197A-positive donor	1.22	0.88-1.71	0.24	1.26	0.79-2.00	0.33	1.04	0.69-1.58	0.85
Recipient age, > 30 years	1.63	1.17-2.28	0.004	2.02	1.25-3.28	0.004	—	—	—
Donor age, > 32 years	—	—	—	1.29	0.81-2.08	0.29	—	—	—
Female-to-male transplant	—	—	—	1.37	0.82-2.28	0.22	0.76	0.42-1.37	0.36
High-risk disease	2.02	1.47-2.79	<0.001	—	—	—	2.42	1.62-3.61	<0.001
Minor ABO incompatibility	1.19	0.81-1.74	0.38	1.28	0.77-2.15	0.34	—	—	—
CMV-positive recipient	1.84	1.18-3.67	0.01	1.35	0.74-2.48	0.33	—	—	—

	II-IV acute GVHD			III-IV acute GVHD			Chronic GVHD		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
197A-positive recipient	1.87	1.23-2.85	0.004	1.69	0.90-3.22	0.10	0.96	0.69-1.35	0.83
197A-positive donor	0.86	0.59-1.27	0.45	1.13	0.60-1.97	0.70	1.10	0.78-1.55	0.59
Recipient age, > 30 years	—	—	—	—	—	—	1.38	0.99-1.93	0.06
Donor age, > 32 years	1.41	0.94-2.10	0.10	2.17	1.10-4.23	0.02	1.31	0.92-1.86	0.14
Female-to-male transplant	—	—	—	0.63	0.27-1.49	0.29	—	—	—
High-risk disease	1.32	0.91-1.94	0.15	—	—	—	—	—	—
Minor ABO incompatibility	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CMV-positive recipient	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Abbreviations: CI = confidence intervals; HR = hazard ratio. Bold values have statistical significance.

II-IV acute GVHD after unrelated HLA-matched myeloablative BMT through JMDP. The validation study for nonmyeloablative transplantation revealed a trend toward

the association of the recipient 197A genotype with an increased risk of grades III-IV acute GVHD, although its association on grades II-IV acute GVHD was unclear. Of

Table 4 A multivariate analysis of the association of IL-17 genotype with the clinical outcomes after transplantation in the validation study

	OS		P	TRM		P	Relapse		P
	HR	95% CI		HR	95% CI		HR	95% CI	
197A-positive recipient	0.97	0.55–1.69	0.91	0.92	0.45–1.88	0.82	1.09	0.54–2.20	0.81
197A-positive donor	0.99	0.57–1.71	0.98	0.78	0.39–1.55	0.48	1.52	0.73–3.18	0.26
Recipient age, > 52 years	1.63	1.17–2.28	0.004	2.02	1.25–3.28	0.004	—	—	—
Donor age, > 32 years	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Female-to-male transplant	—	—	—	—	—	—	3.33	1.55–7.13	0.002
High-risk disease	1.21	0.70–2.09	0.49	—	—	—	2.22	1.14–4.30	0.02
Major ABO incompatibility	0.60	0.28–1.27	0.18	—	—	—	—	—	—
Minor ABO incompatibility	0.85	0.43–1.67	0.63	—	—	—	—	—	—
CMV-positive recipient	5.45	1.30–22.87	0.02	6.98	0.94–51.93	0.06	—	—	—
TNC, > 4.3 × 10 ⁸ per kg	—	—	—	—	—	—	—	—	—
GVHD prophylaxis with tacrolimus	—	—	—	—	—	—	2.04	1.00–4.13	0.049

	II–IV acute GVHD			III–IV acute GVHD			Chronic GVHD		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
197A-positive recipient	1.42	0.74–2.71	0.29	5.84	0.75–45.72	0.09	3.86	1.29–11.59	0.02
197A-positive donor	1.03	0.55–1.94	0.93	1.12	0.33–3.83	0.86	0.27	0.10–0.74	0.01
Recipient age, > 52 years	—	—	—	—	—	—	0.20	0.08–0.53	0.001
Donor age, > 32 years	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Female-to-male transplant	2.49	1.23–5.04	0.01	—	—	—	—	—	—
High-risk disease	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Major ABO incompatibility	0.40	0.15–1.02	0.06	—	—	—	—	—	—
Minor ABO incompatibility	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CMV-positive recipient	—	—	—	—	—	—	0.20	0.07–0.60	0.004
TNC, > 4.3 × 10 ⁸ per kg	—	—	—	—	—	—	0.48	0.19–1.20	0.12
GVHD prophylaxis with tacrolimus	—	—	—	0.49	0.14–1.68	0.26	0.57	0.22–1.48	0.25

Abbreviations: CI = confidence intervals; HR = hazard ratio.
Bold values have statistical significance.

note, the validation study has demonstrated the association between the recipient 197A genotype and the increased incidence of chronic GVHD. This might reflect the association between the recipient 197A genotype and the risk of late acute GVHD,⁴⁹ considering that late acute GVHD occurs frequently after nonmyeloablative conditioning transplantation⁵⁰ and that the manifestation of late acute GVHD is usually indistinguishable from chronic GVHD.⁵¹ In this study, the diagnosis of chronic GVHD was based on historical criteria,⁴⁵ and data on chronic GVHD classification according to the new NIH criteria⁴⁹ were unavailable, thus suggesting that late-onset, prolonged or delayed acute GVHD could have been diagnosed as chronic GVHD. Taken together, it would appear that the validation cohort data is consistent with the discovery cohort data, although additional validation studies are warranted. This is the first report to demonstrate that IL-17 may be involved in the pathophysiology of acute GVHD in humans.

The role of IL-17 in pathogenesis of acute GVHD remains unclear. Several mouse model experiments have revealed that transfer of IL-17-producing cells induced acute GVHD,^{33–35} whereas in contrast there is a report³¹ showing that donor IL-17-producing cells ameliorated acute GVHD. Host DCs are critical in the initiation of acute GVHD,^{52–54} leading to a hypothesis that IL-17-producing cells could modify the function of host DCs through unknown mechanisms. Direct interaction between IL-17 and host DCs may be supported by the fact that DCs expressed IL-17 receptors.²⁶ As the IL-17 G197A polymorphism is located in the promoter region of IL-17

gene, it is conceivable that it may exert some roles in the transcriptional regulation of IL-17 secretion. Thus, investigating the influence of the IL-17 G197A polymorphism on the expression of IL-17 may offer useful information on this issue.

The current study did not show an association between the risk of acute GVHD and the IL-17 genotype in the donor side, implying an influence of host IL-17-secreting cells such as Th17 cells might be more important than the influence of donor IL-17-secreting cells on the pathophysiology of acute GVHD. However, it is still unclear how IL-17 secreted from the host IL-17-secreting cells is involved in the development of acute GVHD. Patient serum and lymphocytes may offer useful information on this issue, although these samples were not obtained for our study.

This study showed that the increased risk of acute GVHD associated with the host 197A genotype of IL-17 did not significantly benefit those with transplant-related mortality and OS after BMT. This might result from the low incidence of acute GVHD-related mortality regardless of the host IL-17 genotype in this cohort. Further investigations for patients at higher risk for acute GVHD including PBSC or HLA-mismatched transplant recipients should be warranted to clarify this issue.

The discovery study also identified higher recipient age, high-risk disease and CMV-positive recipient as significant predictive factors for worse transplant outcomes (Table 3), which is consistent with earlier studies.^{55–57} In addition, similar to a previous report,⁵⁸ higher donor age was associated with the increased risk of grades III–IV acute GVHD, which might result from the replacement of naive T cells by memory T cells with aging.⁵⁹

This study suggests that genotyping of IL-17 in transplant recipients before transplantation may provide a 197A-positive recipient an opportunity to avoid the risk of acute GVHD by favoring a BM or cord blood, and an HLA-matched graft rather than a PBSC or HLA-mismatched graft. However, single polymorphisms in one cytokine gene are unlikely to determine the majority of acute GVHD. Future development of predictive strategies including multiple sets of genes will be required.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We are indebted to Drs Hiroko Oshima, Masanobu Oshima and Atsushi Hirao, Ms Kayoko Yamada, Mayu Yamada and Yuki Motohashi at Kanazawa University, and Dr Keitaro Matsuo at Aichi Cancer Center Research Institute for their technical assistance. We thank all of the Japan Marrow Donor Program transplant teams who have contributed patients and donors to this study. This study was supported by grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare, and the Ministry of Education, Culture, sports and Technology, and Funds from the Mitani Research and Development Assistance Organization (Kanazawa, Japan) and by the Japan Leukemia Research Fund (Tokyo, Japan).

References

- 1 Gratwohl A, Brand R, Frassoni F, Rocha V, Niederwieser D, Reusser P *et al*. Cause of death after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: an EBMT analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time. *Bone Marrow Transplant* 2005; **36**: 757–769.
- 2 Dickinson AM, Middleton PG, Rocha V, Gluckman E, Holler E. Genetic polymorphisms predicting the outcome of bone marrow transplants. *Br J Haematol* 2004; **127**: 479–490.
- 3 Elmaagacli AH, Koldehoff M, Landt O, Beelen DW. Relation of an interleukin-23 receptor gene polymorphism to graft-versus-host disease after hematopoietic-cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2008; **41**: 821–826.
- 4 Gerbitz A, Hillemanns P, Schmid C, Wilke A, Jayaraman R, Kolb HJ *et al*. Influence of polymorphism within the heme oxygenase-1 promoter on overall survival and transplantation-related mortality after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; **14**: 1180–1189.
- 5 Kim DH, Jung HD, Lee NY, Sohn SK. Single nucleotide polymorphism of CC chemokine ligand 5 promoter gene in recipients may predict the risk of chronic graft-versus-host disease and its severity after allogeneic transplantation. *Transplantation* 2007; **84**: 917–925.
- 6 Noori-Daloui MR, Rashidi-Nezhad A, Izadi P, Hossein-Nezhad A, Sobhani M, Derakhshandeh-Peykar P *et al*. Transforming growth factor-beta1 codon 10 polymorphism is associated with acute GVHD after allogeneic BMT in Iranian population. *Ann Transplant* 2007; **12**: 5–10.
- 7 Viel DO, Tsuneto LT, Sossai CR, Lieber SR, Marques SB, Vigorito AC *et al*. IL2 and TNFA gene polymorphisms and the risk of graft-versus-host disease after allogeneic

haematopoietic stem cell transplantation. *Scand J Immunol* 2007; **66**: 703–710.

- 8 Sugimoto K, Murata M, Onizuka M, Inamoto Y, Terakura S, Kuwatsuka Y *et al*. Decreased risk of acute graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase 677TT genotype. *Int J Hematol* 2008; **87**: 451–458.
- 9 Ostrovsky O, Shimoni A, Rand A, Vlodavsky I, Nagler A. Genetic variations in the heparanase gene (HPSE) associate with increased risk of GVHD following allogeneic stem cell transplantation: effect of discrepancy between recipients and donors. *Blood* 2010; **115**: 2319–2328.
- 10 Takami A, Espinoza JL, Onizuka M, Ishiyama K, Kawase T, Kanda Y *et al*. 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* 2010 (e-pub ahead of print 19 April 2010; doi:10.1038/bmt.2010.88)
- 11 McDermott DH, Conway SE, Wang T, Ricklefs SM, Agovi MA, Porcella SF *et al*. Donor and recipient chemokine receptor CCR5 genotype is associated with survival after bone marrow transplantation. *Blood* 2010; **115**: 2311–2318.
- 12 Espinoza JL, Takami A, Onizuka M, Sao H, Akiyama H, Miyamura K *et al*. NKG2D gene polymorphism has a significant impact on transplant outcomes after HLA-fully-matched unrelated bone marrow transplantation for standard risk hematologic malignancies. *Haematologica* 2009; **94**: 1427–1434.
- 13 Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, Rousseau AM, Painter SL, Comeau MR *et al*. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity* 1995; **3**: 811–821.
- 14 Yu JJ, Gaffen SL. Interleukin-17: a novel inflammatory cytokine that bridges innate and adaptive immunity. *Front Biosci* 2008; **13**: 170–177.
- 15 Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**: 556–567.
- 16 Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 2009; **361**: 888–898.
- 17 O'Brien RL, Roark CL, Born WK. IL-17-producing gamma-delta T cells. *Eur J Immunol* 2009; **39**: 662–666.
- 18 Schulz SM, Kohler G, Holscher C, Iwakura Y, Alber G. IL-17A is produced by Th17, gamma-delta T cells and other CD4+ lymphocytes during infection with Salmonella enterica serovar Enteritidis and has a mild effect in bacterial clearance. *Int Immunol* 2008; **20**: 1129–1138.
- 19 Awasthi A, Kuchroo VK. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *Int Immunol* 2009; **21**: 489–498.
- 20 Ishigame H, Kakuta S, Nagai T, Kadoki M, Nambu A, Komiyama Y *et al*. Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucocutaneous bacterial infection and allergic responses. *Immunity* 2009; **30**: 108–119.
- 21 Chabaud M, Fossiez F, Taupin JL, Miossec P. Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines. *J Immunol* 1998; **161**: 409–414.
- 22 Kirkham BW, Lassere MN, Edmonds JP, Juhasz KM, Bird PA, Lee CS *et al*. Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: a two-year prospective study (the DAMAGE study cohort). *Arthritis Rheum* 2006; **54**: 1122–1131.
- 23 Ciprandi G, De Amici M, Murdaca G, Fenoglio D, Ricciardolo F, Marseglia G *et al*. Serum interleukin-17 levels are related to clinical severity in allergic rhinitis. *Allergy* 2009; **64**: 1375–1378.

- 24 Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y *et al*. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003; **52**: 65–70.
- 25 Zrioual S, Ecochard R, Tournadre A, Lenief V, Cazalis MA, Miossec P. Genome-wide comparison between IL-17A- and IL-17F-induced effects in human rheumatoid arthritis synovocytes. *J Immunol* 2009; **182**: 3112–3120.
- 26 Antonysamy MA, Fanslow WC, Fu F, Li W, Qian S, Troutt AB *et al*. Evidence for a role of IL-17 in organ allograft rejection: IL-17 promotes the functional differentiation of dendritic cell progenitors. *J Immunol* 1999; **162**: 577–584.
- 27 Vanaudenaerde BM, Dupont LJ, Wuyts WA, Verbeken EK, Meys I, Bullens DM *et al*. The role of interleukin-17 during acute rejection after lung transplantation. *Eur Respir J* 2006; **27**: 779–787.
- 28 Van Kooten C, Boonstra JG, Paape ME, Fossiez F, Banchereau J, Lebecque S *et al*. Interleukin-17 activates human renal epithelial cells *in vitro* and is expressed during renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 1998; **9**: 1526–1534.
- 29 Loong CC, Hsieh HG, Lui WY, Chen A, Lin CY. Evidence for the early involvement of interleukin 17 in human and experimental renal allograft rejection. *J Pathol* 2002; **197**: 322–332.
- 30 Yi T, Chen Y, Wang L, Du G, Huang D, Zhao D *et al*. Reciprocal differentiation and tissue-specific pathogenesis of Th1, Th2, and Th17 cells in graft-versus-host disease. *Blood* 2009; **114**: 3101–3112.
- 31 Yi T, Zhao D, Lin CL, Zhang C, Chen Y, Todorov I *et al*. Absence of donor Th17 leads to augmented Th1 differentiation and exacerbated acute graft-versus-host disease. *Blood* 2008; **112**: 2101–2110.
- 32 Tawara I, Maeda Y, Sun Y, Lowler KP, Liu C, Toubai T *et al*. Combined Th2 cytokine deficiency in donor T cells aggravates experimental acute graft-vs-host disease. *Exp Hematol* 2008; **36**: 988–996.
- 33 Kappel LW, Goldberg GL, King CG, Suh DY, Smith OM, Ligh C *et al*. IL-17 contributes to CD4-mediated graft-versus-host disease. *Blood* 2009; **113**: 945–952.
- 34 Iclozan C, Yu Y, Liu C, Liang Y, Yi T, Anasetti C *et al*. Th17 cells are sufficient but not necessary to induce acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009; **16**: 170–178.
- 35 Carlson MJ, West ML, Coghill JM, Panoskaltis-Mortari A, Blazar BR, Serody JS. *In vitro*-differentiated TH17 cells mediate lethal acute graft-versus-host disease with severe cutaneous and pulmonary pathologic manifestations. *Blood* 2009; **113**: 1365–1374.
- 36 Arisawa T, Tahara T, Shibata T, Nagasaka M, Nakamura M, Kamiya Y *et al*. The influence of polymorphisms of interleukin-17A and interleukin-17F genes on the susceptibility to ulcerative colitis. *J Clin Immunol* 2008; **28**: 44–49.
- 37 Furuya T, Hakoda M, Ichikawa N, Higami K, Nanke Y, Yago T *et al*. Associations between HLA-DRB1, RANK, RANKL, OPG, and IL-17 genotypes and disease severity phenotypes in Japanese patients with early rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2007; **26**: 2137–2141.
- 38 Nordang GB, Viken MK, Hollis-Moffatt JE, Merriman TR, Forre OT, Helgetveit K *et al*. Association analysis of the interleukin 17A gene in Caucasian rheumatoid arthritis patients from Norway and New Zealand. *Rheumatology (Oxford)* 2009; **48**: 367–370.
- 39 Southam L, Heath O, Chapman K, Loughlin J. Association analysis of the interleukin 17 genes IL17A and IL17F as potential osteoarthritis susceptibility loci. *Ann Rheum Dis* 2006; **65**: 556–557.
- 40 Kawase T, Morishima Y, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H *et al*. High-risk HLA allele mismatch combinations responsible for severe acute graft-versus-host disease and implication for its molecular mechanism. *Blood* 2007; **110**: 2235–2241.
- 41 Sasazuki T, Juji T, Morishima Y, Kinukawa N, Kashiwabara H, Inoko H *et al*. Effect of matching of class I HLA alleles on clinical outcome after transplantation of hematopoietic stem cells from an unrelated donor. Japan Marrow Donor Program. *N Engl J Med* 1998; **339**: 1177–1185.
- 42 Morishima Y, Yabe T, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H *et al*. 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* 2007; **13**: 315–328.
- 43 Livak KJ. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal* 1999; **14**: 143–149.
- 44 Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J *et al*. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant* 1995; **15**: 825–828.
- 45 Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, McDonald GB, Striker GE, Sale GE *et al*. Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med* 1980; **69**: 204–217.
- 46 Scrucca L, Santucci A, Aversa F. Competing risk analysis using R: an easy guide for clinicians. *Bone Marrow Transplant* 2007; **40**: 381–387.
- 47 Gooley TA, Leisenring W, Crowley J, Storer BE. Estimation of failure probabilities in the presence of competing risks: new representations of old estimators. *Stat Med* 1999; **18**: 695–706.
- 48 Shibata T, Tahara T, Hirata I, Arisawa T. Genetic polymorphism of interleukin-17A and -17F genes in gastric carcinogenesis. *Hum Immunol* 2009; **70**: 547–551.
- 49 Alexandra HF, Daniel W, Steven P, Gerard S, John RW, Stephanie JL *et al*. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biol Blood and Marrow Transplantation* 2005; **11**: 945–956.
- 50 Murashige N, Kami M, Mori S, Katayama Y, Kobayashi K, Onishi Y *et al*. Characterization of acute graft-versus-host disease following reduced-intensity stem-cell transplantation from an HLA-identical related donor. *Am J Hematol* 2008; **83**: 630–634.
- 51 Vigorito AC, Campregher PV, Storer BE, Carpenter PA, Moravec CK, Kiem H-P *et al*. Evaluation of NIH consensus criteria for classification of late acute and chronic GVHD. *Blood* 2009; **114**: 702–708.
- 52 Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, McNiff J, Robert ME, Liu J *et al*. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 1999; **285**: 412–415.
- 53 Teshima T, Ordemann R, Reddy P, Gagin S, Liu C, Cooke KR *et al*. Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat Med* 2002; **8**: 575–581.
- 54 Duffner UA, Maeda Y, Cooke KR, Reddy P, Ordemann R, Liu C *et al*. Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease. *J Immunol* 2004; **172**: 7393–7398.
- 55 Goldstone AH, Richards SM, Lazarus HM, Tallman MS, Buck G, Fielding AK *et al*. In adults with standard-risk acute lymphoblastic leukemia, the greatest benefit is achieved from a matched sibling allogeneic transplantation in first complete remission, and an autologous transplantation is less effective than conventional consolidation/maintenance chemotherapy in all patients: final results of the International ALL