

者ドナー保存検体の増幅作業を開始した。また解析希望検体セットをロボットシステムで作成、配布する系の構築作業中である。

2) HLA型適合度につき症例数を増して多変量解析しHLA-A7レル、HLA-B7レル、HLA-C7レル、HLA-DPB17レルのドナーと患者間の違いが急性GVHDの発症頻度を高め、HLA-DRB1とHLA-DQB1の違いは高めないことを確認し、従来移植コーディネート時に実施されているHLA適合確認検査にHLA-C検査を新たに追加するためのデータを提供した。

3) 許容される、されないHLA型の組み合わせの同定

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、この許容されない組み合わせを対照として、有意に重症GVHDの頻度が低くなる組み合わせを予備的に「許容される組み合わせ」として12組を明らかにした。許容できない組み合わせは、JMDPのドナー選択アルゴリズムに組み入れられた。

2. 非血縁者間骨髄移植におけるHLA型の違いと移植片対白血病効果 (GVL) の解析

1) HLA-C座とHLA-DPB1座の違いがGVLを生じる。

2) HLA-Cはリンパ系腫瘍、HLA-DPB1は骨髄系腫瘍においてGVL効果が認められる。

3) HLA-C座不適合の中で、GVL効果を生じさせるC遺伝子型の組み合わせを明らかにした。

3. 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

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個の日本人に存在するHLAハプロタイプとその均一性と、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までが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。

4. 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。

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解析

1) 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。

2) *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。骨髄破壊的移植(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・ $P=0.05$)。骨髄非破壊的移植(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・ $P=0.01$)。

3) 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。

4) KIRリガンド不適合移植ドナーおよびHLA6座12抗原一致症例ペアの約800検体のタイピングを行った。LILR受容体のうち抑制型 *LILRB2* の遺伝子多型と移植成績との関連解析を行い、急性GVHD重症化との関連を見出した。抑制性サイトカイン *IL-10* の遺伝子多型と移植成績の関連解析は昨年までに判明した患者遺伝子プロモーター3箇所のSNPハプロタイプに加えて新たに上流側のSNPも急性GVHD重症化と関連することを明らかにした。さらに近接する *IL-19* 遺伝子SNPが急性GVHD重症化および無病生存率と関連する結果を得た。

5) 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。

6) NKG2Dは、遺伝子多型により、高NK活性型 (NKG2D-HNK1) と低NK活性型 (NKG2D-LNK1) がある。HLAアレル一致非血縁者間骨髄破壊的前処置骨髄移植145症例を解析したところ、HNK1ハプロタイプ陽性ドナーから移植を受けた患者 (標準リスク群) の生存率 (OS) ・移植関連死亡 (TRM) は有意に優れていた。この結果は第2コホート (360例) 解析でも確認された。そこで、移植免疫におけるNKG2D遺伝子多型の影響を検討するため、NK細胞の機能解析を行った。健常人のNK細胞をエフェクターとして、CMV感染線維芽細胞・NKG2D-L誘導 (VPA処理) 骨髄性白血病細胞株に対する細胞傷害活性を検討したところ、HNK1陽性NK細胞はHNK1陰性NK細胞に比べて、高い細胞傷害活性を示した。活性化NK細胞上のNKG2D発現は、HNK1陽性の方が高く、mRNA発現も同様であった。次に、NKG2Dハプロタイプを決定するSNP (rs1049174) がNKG2D 3' UTR領域にあることを考慮し、NK細胞内NKG2D mRNAに対する影響をレポーター遺伝子解析で検討した。NKG2Dアレル種類にかかわらずNKG2D 3' UTR挿入後レポーター遺伝子発現は低下したが、LNK1アレルの方がHNK1アレルより、発現低下が顕著であった。標識したNKG2Dアレルプローブと核内抽出物との反応をゲルシフト解析でみたところ、LNK1アレルの方が、核内抽出物と高い結合性を示した。以上から、NKG2D 3' UTR SNP (rs1049174) は機能的なSNPで、核内の抑制因子と結合することにより、NKG2D遺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。

6. HLA不適合非血縁移植におけるGVHD発症機構の解明

その免疫学的機序は、ドナーおよびレシピエントにおいて、T細胞が共通に認識するHLA・ペプチド複合体の発現量多寡に基づくとの仮説を提唱し、動物モデルによって検証することを目的として、B6マウスを遺伝背景として、ドナーモデルとしての $\beta 2m$ ノックアウトマウスのヘテロ接合、レシピエントモデルとして発現量の異なる3系統のH2-Kbトランスジェニックマウスを樹立した。さらにホモ接合H2-Kbトランスジェニックマウスを作成して、同一HLA複合体の発現量が異なる個体間での骨髄移植によるGVHD発症モデルとしての検証を試みた。

7. HLA不適合が関わる移植免疫発症機構のin vitroでの解析

HLA-A, B, DRB1一致、Cw 1座不一致の非血縁ドナーから骨髄移植を受け、移植片対宿主病および移植片対腫瘍効果を認めた急性リンパ性白血病患者の末梢血から、7つの細胞傷害性Tリンパ球クローンを分離した。それらは全て、患者のみが有するHLA-Cw*03分子をその分子上に提示するペプチドとともに認識していた。

まとめ

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、移植成績の向上に資することが期待される。

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同種造血幹細胞移植の成績向上に関する研究」班
(H20-免疫-一般-014)
平成 22 年度 第 2 回班会議

2. 移植に関与する組織適合性抗原の統合解析

松尾恵太郎 * 愛知県がんセンター研究所疫学予防部
組織適合性研究班 班員・研究協力者

研究課題

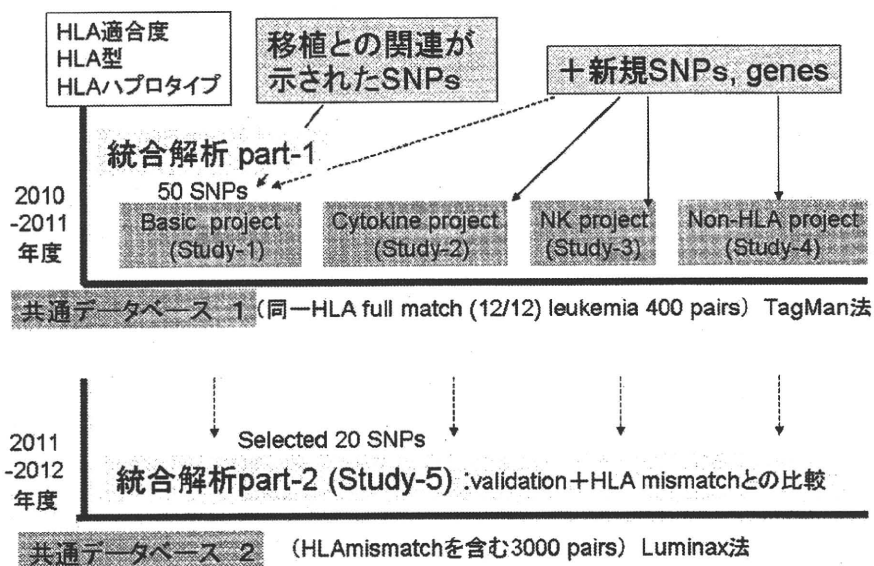
非血縁者間造血細胞移植に関わる組織適合性抗原の統合解析と統一データベースの構築

背景と目的

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。本研究は、共通のデータベース・試料に基づき個々の遺伝子とその多型の影響度を明らかにすることを目的とする。本研究により確立された統合データベース (試料も含む) を公開・提供し、今後の日本における移植関連組織適合性研究の基盤とすることを目的とする。

実施計画

統合解析概念図



統合解析-part 1

Study-1 (基本プロジェクト)

1) 症例・試料 (共通データ・試料ベース 1)

以下の 1 から 5 の条件を満たす 400 ペア (UPN 順)

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 (WGA) 試料が保存されているペア。
5. GWAS 解析結果が得られているペアを優先

2) 組織適合性解析

1. 解析 SNP の選定 (約 50 SNPs)

選定基準 (優先順位)

- 1) 研究者から申請のあった約 200 SNPs
- 2) 多型の頻度が 30% (20%) 以上の SNPs
- 3) 過去に臨床成績との関連が認められている SNPs
- 4) 新規のアリルは HLA 領域、minor HA, アポトーシス、薬剤感受性を優先。

現在担当者間の評価により、約 40 の多型を選定済み。

2. 遺伝子多型解析の実施: 愛知県がんセンター研究所

TaqMan 法 400 ペア、TaqMan 法以外での解析系が確立されているものは、それを利用。

3) 統計解析

臨床データ、HLA 型、HLA ハプロタイプを cofounder とする多変量解析。

主要評価項目を急性、GVHD (primary endpoint), 全生存のリスク分析、慢性 GVHD、白血病再発、非再発死亡、及び移植合併症を副次的評価項目とする。

- 4) 担当 松尾 (責任者) 柏瀬 東 屋部 森島聡子 鬼塚 赤塚 村田 佐治 高見
小川 森島泰雄

「HLA ハプロタイプ保存性の意義と今後の方向性」

森島聡子¹⁾、小川誠司²⁾、松原亜以子²⁾、柏瀬貢一³⁾、笹月健彦⁴⁾、森島泰雄⁵⁾

- 1) 藤田保健衛生大学血液内科
- 2) 東京大学医学部附属病院がんゲノミクスプロジェクト
- 3) 東京都赤十字血液センター検査部
- 4) 九州大学生体防御医学研究所
- 5) 愛知県がんセンター中央病院

我々は JMDP の HLA 型と Affymetrix 500K SNP Array によって SNP タイピングを行った患者とドナー1800 ペア (3600 例) の HLA 領域の SNP データを用いて、日本人に頻度の高い3つの HLA ハプロタイプ(HP-P1, P2,P3)をホモ接合型で持つ複数の個人の SNP 配列より、各 HLA ハプロタイプのコンセンサス配列を決定し、非血縁者間においても HLA 座以外の領域も含めて高度に保存されていることを報告した (*Blood*.2010;115(23):4664-4670)。

前回の班会議 (2010 年 7 月) では、HP-P1, P2, P3 のコンセンサス配列を基に、各々のハプロタイプを片方に持ち、かつそのコンセンサス配列を 99.5%以上連続性に有する個人において、もう一方のハプロタイプの SNP 配列を決定した後に、各ハプロタイプを有する個人集団別とその均一性を解析し、90%以上の個人が同一の SNP 配列を連続性に有するハプロタイプや、異なる SNP 配列を有した二つ以上の subtype に分かれるものなど均一性の度合いがハプロタイプにより異なること報告した。

HP-P1, P2, P3 のコンセンサス配列を基にして、3600 例の中で約 60%の個人の持つ2つのハプロタイプの SNP 配列を、HLA-A から DQB1 までを含む 3.2Mb の連続した領域で推定できた。

連続する SNP の phase を推定するにあたっては、これまで様々な方法が開発されているが、これらの方法は限られた数の SNP の phase の推定は効果的にできるが、多くの LD ブロックにわたる long-range の SNP の phase の推定は、特に非血縁の集団データを用いた場合、困難である。

現在、前述した P1, P2, P3 ハプロタイプ以外の HLA ハプロタイプのコンセンサス配列を順次決定していき、上記で配列を推定できた個人以外の持つ2つの HLA ハプロタイプの SNP 配列の推定を進めているところである。この方法を用いて、できる限り多くの個人の持つ2つのハプロタイプの SNP 配列を決定したい。

得られた解析結果を基にして、今後日本人の HLA ハプロタイプのデータベース構築やハプロタイプの系統樹作成などを進めていきたいと考えている。

SNP タイピングデータに基づく HLA ハプロタイプ推定の妥当性について

松原亜以子¹⁾、森島聡子²⁾、柏瀬貢一³⁾、鬼塚真仁⁴⁾、小寺良尚⁵⁾、森島泰雄⁶⁾、小川誠司¹⁾

1) 東京大学医学部附属病院がんセンターボード 2) 藤田保健衛生大学血液内科 3) 東京都赤十字血液センター
4) 東海大学血液内科 5) 愛知医科大学 6) 愛知県がんセンター中央病院

[研究の背景]

HLA ハプロタイプは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学的要因となっている。こうした疾患と HLA ハプロタイプの関連性の研究においてはしばしば HLA ハプロタイプの推定が行われるが、本解析では SNP タイピングに基づいた HLA ハプロタイプ推定とその妥当性について検討を行った。

[方法および結果]

JMDP に登録されているドナー・患者で、既に Affymetrix 500K SNP Array により SNP タイピングおよび HLA タイピングが実施された計 3600 人を対象に、日本人においてメジャーな HLA ハプロタイプである P1,P2,P3 ハプロタイプを保有する検体について、HLA 領域の各 SNP ジェノタイプと P1,P2,P3 のコンセンサス配列(Morishima *et al.* Blood 2010;115(23):4664-70.)の情報から、対側アレルの SNP 配列を求めた。これを P1-P3 のコンセンサス配列と合わせ SNP ハプロタイプデータベースとした(N=1576)。次に、HLA ハプロタイプ推定を行いたいサンプルについて、保有 HLA(6座)のとり得る全ての組み合わせのハプロタイプを上記データベースから抽出した。続いて抽出された SNP ハプロタイプデータと観察サンプルの SNP ジェノタイプを比較し、incompatible rate を両者の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。

次に、SNP タイピングに基づいた HLA ハプロタイプ推定を、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、本推定の妥当性の評価を行った。SNP アレイの Intensity データより、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あるかどうかを検定したところ、少数の試料をのぞいて推定ハプロタイプの妥当性が確認された。

[結論]

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、少数の例外を除いて有用なハプロタイプ推定方法と考えられた。

HLA1 座不一致骨髄移植後患者における HLA 特異的 CTL からの白血病エスケープ

名古屋大学大学院 血液・腫瘍内科学

加藤智則、寺倉精太郎、西田徹也、村田 誠、直江知樹

ハプロ移植後の再発白血病細胞において、LOH (loss of heterozygosity) による HLA 分子の発現消失と白血病エスケープとの関連が報告されている。我々は、HLA1 座不一致骨髄移植後の再発白血病細胞における選択的な HLA の発現低下と、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ので報告する。

症例は 24 歳、男性、T lymphoblastic leukemia/lymphoma。母からの同種骨髄移植 (GVHD 方向に HLA-B*51:01 の 1 アリル不一致) を実施した。難治性の急性/慢性 GVHD を合併しながら、移植 9 カ月後に再発した。移植後再発白血病細胞では、移植前白血病細胞と比べて HLA-B51 の発現が低下していた。生着後の患者 PBMC (すなわちドナー由来 PBMC) から細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) クローンを分離したところ、全ての CTL は HLA-B*51:01 分子を認識していた。いずれの CTL も、(B51 発現の低下した) 移植後再発白血病細胞に対する傷害活性は全く示さず、一方で (B51 発現陽性の) 移植前白血病細胞に対しては傷害活性を示した (保存細胞数に制限があり一部のクローンで確認)。また、全ての CTL は *HLA-B*51:01* を導入した EBV 感作ドナー血液細胞を傷害したことから、白血病抗原以外の抗原を認識していることが分かった。

これらの結果は、この患者が移植後に持続する GVHD を発症しながら、その最中に T リンパ球からのエスケープによる白血病再発を来したことに矛盾しないものと考えている。

2011 年 1 月 29 日 於：東京医科歯科大学

Scanning of the Immunogenome for GVHD genetic risk loci with microsatellite markers.

Christian Harkensee (1,2), Akira Oka (1), Makoto Onizuka (1), Peter G Middleton (2), Hidetoshi Inoko (1), Andrew R Gennery (2), Kiyoshi Ando (1), Hirofumi Nakaoka (1), Yasuo Morishima (3) for JMDP.

(1)Tokai University, School of Medicine, Isehara, Japan (2) Newcastle University, Institute for Cellular Medicine, 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).

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 pooled DNA analysis 40 (recipient) and 57 (donor) ms loci remain associated with risk or protection from GVHD. Using strength of significance and pooled DNA typing quality as criteria, we selected 11 (recipient) and 18 (donor) microsatellites for individual typing. Of these, 12 ms markers (donor: 7, recipient: 5) were confirmed as risk loci for aGVHD grade 2-4, all of these are loci not previously described in this context.

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.

Non-HLA SNP polymorphisms and HSCT outcome: A systematic approach.

Christian Harkensee (1,2), Akira Oka (1), Makoto Onizuka (1), Peter G Middleton (2), Hidetoshi Inoko (1), Andrew R Gennery (2), Kiyoshi Ando (1), Hirofumi Nakaoka (1), Yasuo Morishima (3) for JMDF.

(1) Tokai University, School of Medicine, Isehara, Japan (2) Newcastle University, Institute for Cellular Medicine, Newcastle upon Tyne, UK. (3) Aichi Cancer Center, Nagoya, Japan

Previous studies in haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) have identified a variety of risk factors for the most important outcomes (acute graft-versus-host disease (aGVHD), chronic graft-versus-host disease (cGVHD), relapse and survival). These include demographic, clinical and genetic risk factors.

A large number of previous candidate gene association studies have implicated several non-HLA gene polymorphisms, most of these single nucleotide polymorphisms (SNP). When comparing these studies, the variation of outcome risk factors is huge, the risks of individual SNP markers often disparate, and positive findings were rarely confirmed in cohorts of similar characteristics and adequate statistical power.

The aim of our study is to confirm or refute SNP associations from previous studies. We typed a selection of commonly associated SNP markers independently in two cohorts which were stratified for important risk factors.

We selected 41 SNP markers in previously studied genetic risk loci, and typed these on a discovery cohort of 460 HSCT pairs. Only markers that showed an association were selected for the confirmatory cohort, consisting of a further 462 HSCT pairs. We used Bonferroni correction and an OR cut off (<0.5 ; >2) for the selection of markers for confirmatory typing. Both cohorts were stratified for age (4-40 y), underlying disease (acute leukaemias), conditioning (myeloablative), GVHD prophylaxis (cyclosporin or tacrolimus + methotrexate) and HLA matching (distribution of HLA mismatching). We conducted subgroup analysis for HLA matched pairs, and an analysis of the combined cohorts. As the discovery cohort represents HSCT pairs between 1993 and 2000 and the confirmatory cohort those between 2001-2005, we were also able to observe longitudinal trends.

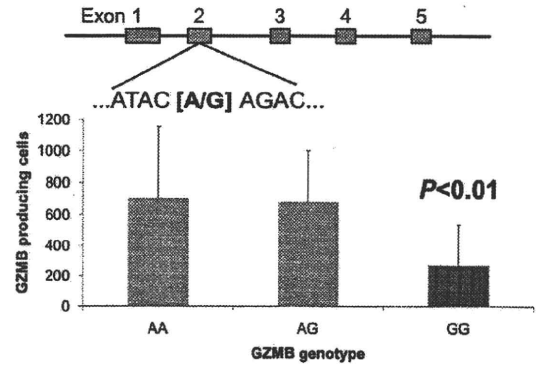
In the discovery cohort, 9 markers (donor) and 8 markers (recipient) showed an association with a HSCT outcome (HLA subgroups: 8 markers (donor) and 3 markers (recipient)). In the confirmatory cohort, only one SNP showed a consistent association (TNF rs1799964, donor-patient genotype mismatch associated with risk of aGVHD). In the HLA subgroup, the recipient GT genotype of IL2 rs2069762 was consistently associated with cGVHD. In multivariate analysis, both these associations were independent risk factors.

Typing of previous HSCT outcome associated SNP in two independent, comparable cohorts of adequate statistical power demonstrates that most associations are not consistent. Only very few of the associations we found coincide with findings from previous studies. Our results indicate that the effect size of most of such non-HLA polymorphisms is too small to be resistant against changes in risk factors over time. Further systematic and larger scale studies are required to identify polymorphisms which are consistent, the existence of which we have demonstrated in this study.

非血縁者間骨髄移植におけるGranzyme B遺伝子多型解析

金沢大学附属病院
 ジルイス・エスピノーザ 高見昭良 中尾真二

GZMB SNP rs8192917 (A/G)

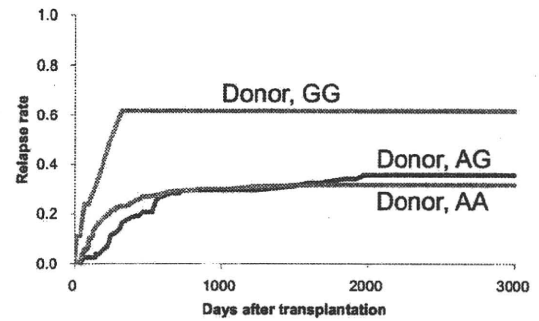


Girrita: Transplant 2009;87:1801

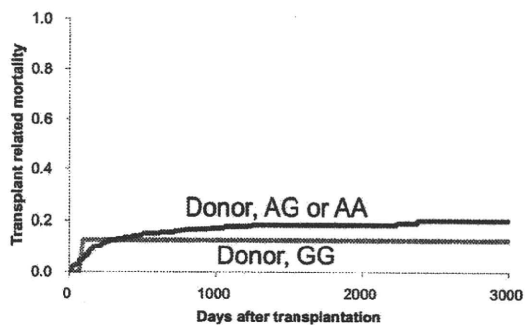
Recipient and donor characteristics

- N=360
- Myeloablative conditioning without ATG nor TCD
- Donor: Unrelated, HLA 12/12 matched
- Age:
 - Recipient, 1-65 (median, 31)
 - Donor, 21-51 (median, 33)
- Disease:
 - AML, 156 (31%); ALL, 100 (20%); CML, 94 (18%)
 - MDS, 79 (15%); ML, 71 (14%); MM, 10 (2%)
- Disease risk:
 - High, 128 (36%); Low, 232 (64%)

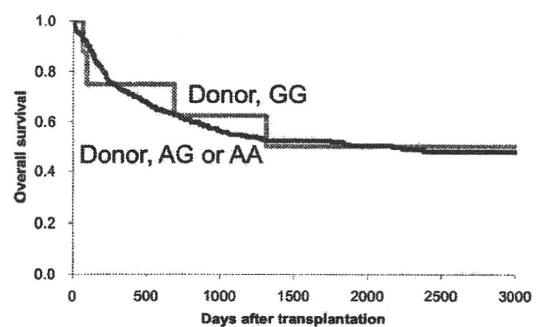
Relapse



Transplant related mortality



Overall survival



Association of GZMB genotype with transplant outcomes
Multivariate analysis

● Donor GG genotype	HR (95%CI)	
Relapse	4.17 (1.63-4.17)	P<0.01
TRM	0.78 (0.11-5.70)	
OS	0.93 (0.34-2.54)	
II-IV aGVHD	1.69 (0.53-5.39)	
cGVHD	1.47 (0.54-4.03)	
● Recipient GG genotype	HR (95%CI)	
Relapse	1.16 (0.49-2.75)	
TRM	0.33 (0.05-2.41)	
OS	0.65 (0.26-1.61)	
II-IV aGVHD	0.71 (0.26-1.96)	
cGVHD	1.24 (0.54-2.87)	

No significant differences between AG and AA genotypes

Summary and Conclusions

- The GZMB GG genotype, expected to be low GZMB secretors, in the donor side was associated with a higher risk of relapse after unrelated HLA matched myeloablative BMT through JM DP.
- Untoward effects of GZMB GG genotype on OS were not evident, which may be partly due to the small number of patients with GG genotype donors and the majority of such patients having CML and malignant lymphoma susceptible to respond to salvage therapy.
- Preventing relapse after transplantation with donor selection could be a useful approach to improve the transplant outcomes.
- Additional studies, including a prospective study and validation cohort analysis, are warranted.

「NK 受容体 *KIR* 多型と非血縁者間造血細胞移植成績」

中本貴之、柏瀬貢一、小川篤子、佐竹正博、高梨美乃子、屋部登志雄
 東京都赤十字血液センター 製剤部、検査部

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(Cooley et al. *Blood*. 2010;116:2411)。今回は JMDP の非血縁者間骨髄移植約 600 症例検体及び東京都赤十字血液センター臍帯血バンクの協力で得られた臍帯血移植約 300 症例検体について、患者およびドナーの従来の *KIR* 型に加えて細分化ハプロタイプ型も判定して、それぞれの型と移植成績との関連について解析を行った。*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 Centromere 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* 間部分で Centromere (上流)側、Telomere(下流)側に分割され、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)* に二分される(図 1)。Cooley らは非血縁者間 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ことを報告している。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こと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。臍帯血移植造血器腫瘍疾患症例についても同様な解析をおこなったところドナー *Tel-B* 陽性者では再発率および急性重症 GVHD 発症率が高く、Cooley らの報告とは対照的な結果となった。移植源によっても効果が異なる可能性がある。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。

図 1

Haplotype	Gen motif	Centromeric part						Telomeric part									
		3DL1	2DS2	2DL2	2DL3	2DP1	2DL1	3DP1	2DL4	3DL1	3DS1	2DL5	2DS3/5	2DS1	2DS4	3DL2	
A	<i>Cen-A</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	<i>Tel-A</i>
	<i>Cen-B</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	<i>Tel-B</i>
B	<i>Cen-A</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	<i>Tel-A</i>
	<i>Cen-B</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	<i>Tel-B</i>

「組織適合性に基づく非血縁同種造血幹細胞移植の成績向上に関する研究」班
平成 22 年度 第 2 回班会議

「HLA クラス I 認識 LILR 受容体多型と非血縁者間骨髄移植成績」
平安恒幸*^{1,2}、中本貴之¹、柏瀬貢一¹、佐竹正博¹、屋部登志雄¹

1) 東京都赤十字血液センター

2) 大阪大学免疫学フロンティア研究センター

Leukocyte Ig-like receptor (LILR) 遺伝子群は 19 番染色体の KIR 遺伝子領域の隣に位置する、2 種類の偽遺伝子を含めた 13 種類の遺伝子座から構成されており、免疫細胞に幅広く発現している。LILR は、活性化型 (LILRA1, -A2, -A4, -A5, -A6)、抑制型 (LILRB1, -B2, -B3, -B4, -B5)、および分泌型 LILRA3 からなる HLA クラス I 認識ペア型受容体ファミリーであり、LILRB1 および LILRB2 は HLA クラス I をアレルの区別なく認識する。LILR の生理的な役割に関してはいまだ不明であるが、マウスの相同分子と考えられる Paired Ig-like Receptor (PIR) 遺伝子ファミリーの研究から、GVHD 発症の制御に関わることが示唆されている。マウス骨髄移植モデルにおいて抑制型 PIR-B 欠損マウスがレシピエントの場合に GVHD が重症化することを東北大学高井俊行グループが報告した (Nakamura et al., *Nat Immunol*, 2004)。リガンド認識および発現パターンなどの機能的な側面から考えて、LILRB2 が PIR-B と最も類似性を示す。そこで我々は、LILRB2 遺伝子多型と非血縁者間骨髄移植成績との関連解析を行った。解析対象は、JMDP を介して非血縁者間骨髄移植を受けた HLA-A, B, C, DR, DQ, DP の HLA アレルフルマッチをドナーとし、非 T 細胞除去で GVHD 予防法としてシクロスポリンと短期メトトレキサートが使用された造血器腫瘍の患者に絞った。

我々は、健常者において LILRB2 遺伝子多型をスクリーニングする過程で、LILRB2 遺伝子多型が発現レベルとの関連を示し、東アジア人には低発現型が多いことを明らかにした (Hirayasu et al., *Am J Hum Genet*, 2008)。さらに、発現と関連を示す LILRB2 遺伝子多型が非血縁者間骨髄移植成績へ及ぼす影響について調べたところ、LILRB2 が高発現型の患者では、重症急性 GVHD の発症率が有意に高いことが明らかとなった。これは、PIR-B 欠損マウスで GVHD が重症化する先行研究の結果とは正反対の結果であり、ヒト LILR とマウス PIR では異なった GVHD 発症の制御メカニズムが存在する可能性が示唆される。

がん研究開発費（研究課題）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
2010年1月29日（土）午後3時～午後4時
会場 東京医科歯科大学

司会 森島泰雄

（1）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効性に関する臨床第II相試験

名古屋大学血液・腫瘍内科学 西田徹也

名古屋第I赤十字病院血液内科 宮村耕一

司会 今村雅寛

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

北海道大学血液内科 重松昭男 今村雅寛

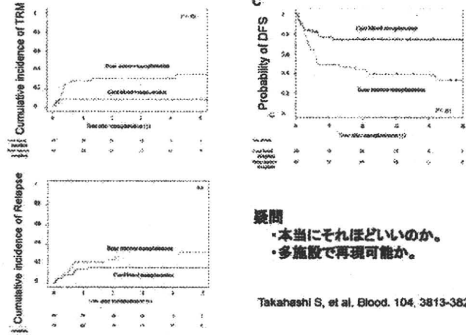
がん研究開発費「成人難治性造血器腫瘍に対する非血縁者間の
同種造血幹細胞移植法の確立に関する研究」
2011年1月29日

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効性に関する研究 (臨床第Ⅱ相試験、C-SHOT 0601)

名古屋大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学 西田 徹也
名古屋第一赤十字病院 血液内科 宮村 耕一

1

東大医科研からの臍帯血移植の成績



疑問
・本当にそれほどいいのか。
・多量投与で再発可能か。

Takahashi S, et al. Blood. 104, 3813-3820, 2004

2

東大医科研方式臍帯血移植

Day -9 -8 -7 -6 -5 -4 -3 -2 -1 0

TBI 3Gy x 4

Ara-C 3g/m²
(G-CSF in Myeloid)

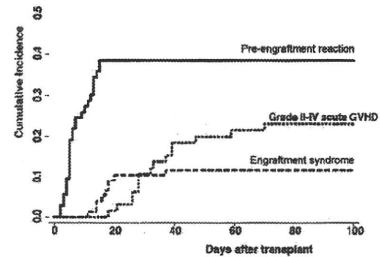
CY 60mg/kg

CBT

CyA 3mg/kg 10hr
MTX Day (1, 3, 6) = (15, 10, 10)mg/m²

3

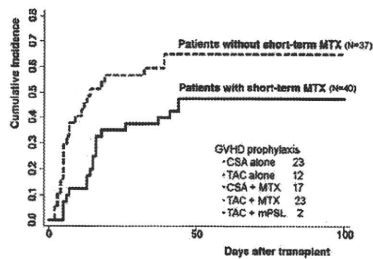
Incidence of Post-CBT Immune Reactions



Narimatsu et al. BMT 2007
Nagoya Blood and Marrow Transplantation Group

4

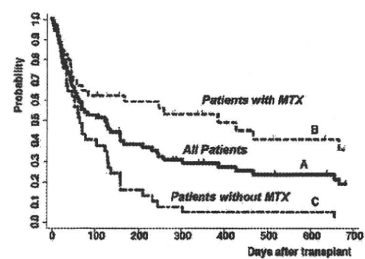
Incidence of Post-CBT Immune Reactions



Narimatsu et al. BMT 2007
Nagoya Blood and Marrow Transplantation Group

5

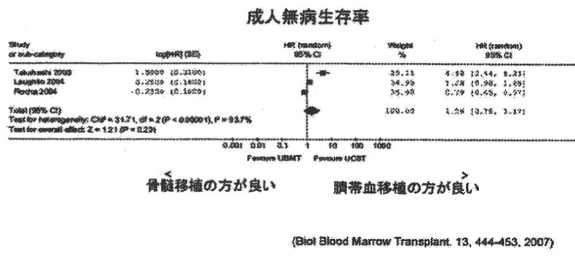
Overall Survival



Narimatsu et al. BMT 2007
Nagoya Blood and Marrow Transplantation Group

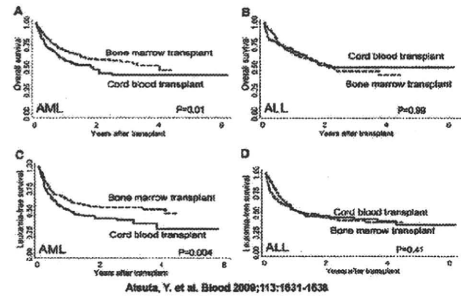
6

非血縁者間骨髄移植と臍帯血移植の成績 (meta-analysis)



13

非血縁者間骨髄移植と臍帯血移植の成績 (全国データ)



14

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効性に関する研究
(臨床第Ⅱ相試験)
(C-SHOT 0601)

15

目的

- ・再発高リスク血液悪性疾患患者
- ・適切な血縁・非血縁ドナーが得られない患者
- ・寛解期患者
- ・均一な前治療 (AraC/CY/TBI with or without G-CSF) および免疫抑制療法 (sMTX+Tacrolimus)
- ・UCBTの安全性と有効性を評価する。
- ・UCBTとUR-BMTの前方視的な比較

16

JMDP登録後
時間 (day)

0

90

180

シエーマ

JMDP登録

ドナー・コーディネーター

Donor Available Not available

観察研究
適切な非血縁ドナー
・HLA適合
・HLA-DRB1遺伝子学的一産不適合
・HLA-C一産不適合ドナーについては
各施設の判断に委ねる

UBMT

・AML/ALL/MDS/CMMoL
(病期は問われない)
・18-65歳
・移植歴がない

0601試験
仮登録

(JMDP登録後90日以内、
UCBT適否決定前)

UCBT 症例
本登録

17

本登録適格基準 (原病)

- AML : ① CR1; - Poor risk Karyotype features
 - FAB. M0, M6, M7
 - 寛解導入に2コース以上 (染色体予後良好群を除く)
 - FLT3/ITD変異を有する (JALSG studyに登録)
- ② CR2 or later CR except M3 in molecular remission
③ AML transformed from MDS
- B-ALL : ① CR1; a. WBC at onset >30,000/μl and >30 y.o.
 b. Ph chromosome (+)
 c. 11q23 translocation or MLL recombination (+)
 d. Poor primary response or delayed CR
 (4 weeks or more needed)
- ② CR2 or later CR
- T-ALL : ① CR1; a. WBC at onset >50,000/μl and >30 y.o.
 d. Poor primary response or delayed CR
- ② CR2 or later CR
- MDS : IPSS Int-2 or high risk category
Other : Proliferative CMMoL

18

本登録適格基準(その他)

1. 年齢: 16歳以上55歳未満.
2. Performance status 0-1, HCT-CI 0点
3. 臍帯血ユニット: HLA-A/B/DR血清型 4/6以上一致
凍結時有核細胞数 $2 \times 10^7/\text{kg}$ (患者体重) 以上
4. 初回造血幹細胞移植.
5. 文書による同意が得られている.

19

本登録除外基準

- 1) HBe抗原、HCV抗体、HIV抗体のいずれかが陽性の患者
- 2) T細胞除去などの移植細胞処理を行う予定のある患者
- 3) 過去6ヶ月以内に gemtuzumab ozogamicin 投与歴のある患者
- 4) 妊娠・授乳中の患者
- 5) 活動性の重複癌を有する患者
- 6) コントロール不良な精神疾患を有する患者
- 7) コントロール不良な活動性の感染症を有する患者
- 8) 前治療ならびに急性GVHD予防に用いる薬剤に対して過敏症の既往のある患者
- 9) 重篤な臓器機能障害を有する患者
- 10) 担当医師が不適格と判断した患者

20

治療計画

Day -8 -7 -6 -5 -4 -3 -2 -1 0

TBI 3Gy × 4

Ara-C 2g/m²
(G-CSF in Myeloid)

CY 60mg/kg

無償提供可能

- HLA-A/B/DR血清型 4/6以上一致
- 凍結時有核細胞数 $2 \times 10^7/\text{kg}$ (患者体重) 以上

CBT

Tacrolimus 0.02mg/kg cont iv
MTX Day (1, 3, 6) = (15, 10, 10)mg/m²

21

エンドポイント

主要評価項目:

Day 180 生着生存

副次的評価項目:

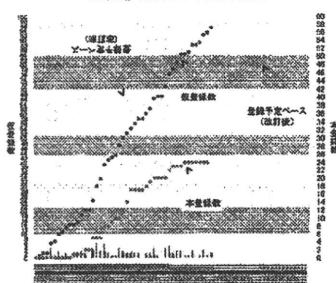
- | | |
|--------------------|--------------------|
| 1) 生着までの期間 | 6) Day 180 治療関連死亡率 |
| 2) 生着率 | 7) Day 180 再発率 |
| 3) 移植後28日以内の治療関連毒性 | 8) 移植後2年無病生存率 |
| 4) 急性GVHDの発症頻度と重症度 | 9) 移植後2年全生存率 |
| 5) 慢性GVHDの発症頻度と重症度 | 10) 死因 |

予定症例数、登録期間、追跡期間

予定症例数: 60例
登録期間: 2007年1月1日～2012年12月31日
追跡期間: 最終症例の移植後2年

22

登録進捗状況(2010年12月末現在)



23

C-SHOT 0601 モニタリング検討結果

検討会開催日: 2010年12月22日

モニタリング項目

- 1) 集積達成状況: 登録数-累積/期間別、全施設/施設別
- 2) 適格性: 不適格例/不適格の可能性のある患者/施設
- 3) プロトコル治療中/治療終了の別、中止/終了理由
- 4) 治療前背景因子
- 5) 重篤な有害事象
- 6) 有害反応/有害事象
- 7) プロトコル逸脱: 患者/施設
- 8) その他、試験の進捗や安全性に関する問題点

24

治療関連毒性

観本登録症例における Day0-day28 の最高 Grade (28日/全投28日間)

毒性	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Grade 5	Grade 6
心毒性	0症例 (0%)	0症例 (0%)	0症例 (0%)	0症例 (0%)	24症例 (100%)	0症例 (0%)
神経毒性	20症例 (85%)	0症例 (0%)	0症例 (0%)	0症例 (0%)	0症例 (0%)	0症例 (0%)
腸毒性	23症例 (96%)	0症例 (0%)	1症例 (4%)	0症例 (0%)	24症例 (100%)	0症例 (0%)
腎/泌尿器毒性	13症例 (54%)	2症例 (8%)	0症例 (0%)	0症例 (0%)	24症例 (100%)	0症例 (0%)
T-Bil	19症例 (79%)	0症例 (0%)	0症例 (0%)	0症例 (0%)	24症例 (100%)	0症例 (0%)
ALT	0症例 (0%)	11症例 (46%)	0症例 (0%)	0症例 (0%)	24症例 (100%)	0症例 (0%)
ALP	12症例 (50%)	0症例 (0%)	0症例 (0%)	0症例 (0%)	24症例 (100%)	0症例 (0%)
口腔粘膜毒性	2症例 (8%)	0症例 (0%)	0症例 (0%)	0症例 (0%)	24症例 (100%)	1症例 (4%)
嘔吐/嘔血	0症例 (0%)	0症例 (0%)	0症例 (0%)	0症例 (0%)	24症例 (100%)	0症例 (0%)
下痢	0症例 (0%)	0症例 (0%)	0症例 (0%)	0症例 (0%)	24症例 (100%)	0症例 (0%)
皮膚毒性	11症例 (46%)	0症例 (0%)	0症例 (0%)	0症例 (0%)	24症例 (100%)	0症例 (0%)
TTP/PTT	24症例 (100%)	0症例 (0%)	0症例 (0%)	0症例 (0%)	24症例 (100%)	0症例 (0%)
血腫	12症例 (50%)	0症例 (0%)	0症例 (0%)	0症例 (0%)	24症例 (100%)	0症例 (0%)
出血	0症例 (0%)	0症例 (0%)	0症例 (0%)	0症例 (0%)	24症例 (100%)	0症例 (0%)
感染	0症例 (0%)	0症例 (0%)	0症例 (0%)	0症例 (0%)	24症例 (100%)	0症例 (0%)

31

安全性の評価

1. 急送報告義務のある有害事象
 - 1) 移植前処置開始から移植後100日までのすべての死亡:3例
 - ・0601-ADR-001 (046-11) 死因 両側間質性肺炎 (Day66)
 - ・0601-ADR-003 (052-14) 死因 間質性肺炎 (Day100)
 - ・0601-ADR-004 (064-21) 死因 急性GVHD, TAM (Day68)
 いずれも効果安全性評価委員に報告。
試験継続可、プロトコル修正不要との判断。
 - 2) 予期されないGrade4の非血液毒性:なし
 - 3) 生着不全あるいは二次性生着不全と診断された場合:なし
2. 通常報告義務のある有害事象:なし

32

プロトコル逸脱・違反

1. 薬剤投与量
 - ・投与開始時の体重によって変動するため、±10%は許容とした。
 - ・逸脱 1例 (0601-044-13): Lenograstim 報告投与量 240µg/body
データセンター算出投与量 200µg/body
2. 末梢血T細胞分画ドナーキメラリズム評価:無記入例多数
 検討結果:末梢血T細胞分画は別の臨床研究で評価可能であるが、全参加施設がその研究に参加しているわけではないため
 今後はT細胞分画に限定せず、異性間FISHや全有核細胞キメラリズムでの評価も可能とする。
3. 体表面積算出方法
 プロトコルで規定した方法以外のDuBois式で算出している施設がある。
 体表面積算出方法=体重(kg)^{0.444}×身長(cm)^{0.663}×88.83/10⁴
 DuBois式=体重(kg)^{0.425}×身長(cm)^{0.725}×0.007184
 検討結果:両式の違いは3~4%であり許容範囲とする。

33

その他の問題点 (1)

・本登録日から移植日までの期間の基準がない。(中央値16日、最長 8日、最長 254日)
 →30~60日の間で設定する。

No.	登録日	移植日	移植後経過日	移植後経過日(%)
0601-011-01	2007/12/18	2007/12/28	2007/12/28	1日
0601-020-03	2008/2/26	2008/2/24	2008/2/24	1日
0601-018-02	2008/3/13	2008/3/17	2008/3/17	4日
0601-014-04	2008/3/28	2008/3/31	2008/3/31	3日
0601-012-02	2008/3/20	2008/3/19	2008/3/19	1日
0601-016-04	2008/3/3	2008/3/28	2008/3/28	25日
0601-011-02	2008/3/20	2008/3/22	2008/3/22	2日
0601-015-04	2008/3/27	2008/3/11	2008/3/11	11日
0601-019-06	2008/4/2	2008/3/17	2008/3/17	15日
0601-013-02	2008/11/7	2008/10/31	2008/10/31	49日
0601-018-11	2009/1/7	2009/1/15	2009/1/15	7日
0601-010-11	2009/1/23	2009/2/2	2009/2/2	11日
0601-016-13	2009/2/11	2009/2/19	2009/2/19	7日
0601-018-14	2009/2/27	2009/2/13	2009/2/13	14日
0601-018-15	2009/3/1	2009/3/1	2009/3/1	0日
0601-015-15	2009/3/25	2009/3/11	2009/3/11	14日
0601-015-17	2009/3/26	2009/4/14	2009/4/14	17日
0601-016-18	2009/3/18	2009/3/4	2009/3/4	15日
0601-018-19	2009/3/24	2009/3/13	2009/3/13	11日
0601-018-20	2009/3/17	2009/3/6	2009/3/6	9日
0601-018-21	2009/3/16	2009/3/22	2009/3/22	7日
0601-018-22	2009/3/18	2009/3/11	2009/3/11	17日
0601-017-23	2009/3/28	2009/3/28	2009/3/28	1日
0601-017-24	2009/3/24	2009/3/24	2009/3/24	1日
0601-018-25	2009/3/17	2009/3/11	2009/3/11	5日
0601-018-26	2009/3/28	2009/3/14	2009/3/14	17日

34

その他の問題点 (2)

- ・本登録の適格基準と除外基準の臓器機能障害の基準に矛盾がある。
- 適格基準 HCT-CI 0点
- ・心臓 1点:EF ≤50%
 - ・中等度肺障害 2点:DLCO and/or 1秒率 66%~80%、あるいは軽度の労作での息切れ
 - ・軽度肝障害 1点:慢性肝障害、T-Bil>ULN~1.5×ULN、AST/ALT>ULN~2.5×ULN
 - ・腎障害 2点:血清Cr>2mg/dlあるいは透析治療中あるいは腎移植の既往があること。
- 除外基準
- ・EF ≤40%
 - ・肺機能検査において%DLCO/一秒率/予測肺活量のいずれかひとつでも予測値の30%以下
 - ・AST/ALT ≥5×ULN(NCI-CTCAE Grade 3)
 - ・血清クレアチニン ≥3×ULN(NCI-CTCAE Grade 3)
- 臓器機能障害の除外基準をなしとし、適格基準のHCT-CI 0点のみとする。

35

研究グループ
Nagoya Blood and Marrow Transplantation Group

研究代表者
宮村 耕一 名古屋第一赤十字病院 血液内科

効果安全性評価委員
加藤 剛二 名古屋第一赤十字病院 小児血液腫瘍科
井関 徹 千葉大学医学部附属病院輸血部

事務局
西田 徹也 名古屋大学医学部附属病院 血液内科
fnishida@med.nagoya-u.ac.jp
Tel: 052-744-2145
Fax: 052-744-2161

データセンター
NPO 血液疾患臨床研究サポートセンター(C-SHOT)
support@c-shot.or.jp

36