

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) 解析対象 SNP の選定

過去に臨床成績との関連が認められている遺伝子多型を研究者間の議論に基づき 31 遺伝子上の 43 個の多型を Confirmatory analysis の対象として選定した。また、過去に臨床成績との関連の報告はないが、研究者の個別の仮説に基づき 22 遺伝子上の 31 多型を選定し、Exploratory analysis の対象とした。測定は、Fluidigm Dynamic Array System を用いて決定した。

## 3) 統計解析

エンドポイントを急性 GVHD (2-4, 3-4)、全生存率とした。性、年齢、ドナー・レシピエントの性不一致、ドナー年齢、診断名、移植リスク、GVHD 予防法、TBI の有無を共変量とした比例ハザードモデル、競合リスク回帰分析を用いた。二つの回帰分析法を用いるのは得られた結果の頑健性を評価するためである。また、bootstrap 法も用いて更に関連の頑健性の評価も行った。

説明変数には各 SNP のアリル数 (per allele model)、優性モデル、劣勢モデルを、ドナー、レシピエント別に用いた。

$P < 0.05$  以下のものを多遺伝子スコアとして、最終モデルに投入対象として選択する。

## 予備的な結果

OS に関する Confirmatory analysis では、31 遺伝子中 6 遺伝子の 9 遺伝子多型が候補として選択された。9 遺伝子多型中 7 遺伝子多型はレシピエント由来、2 遺伝子多型はドナー由来の遺伝子型が関連を示した。

aGVHD 2-4 に関する confirmatory analysis では、31 遺伝子中 3 遺伝子の 6 遺伝子多型が選択された。いずれもレシピエント由来の遺伝子型が関連を示した。Cox モデルでも、競合リスク回帰解析でも、選択される多型に差は認められなかった。

aGVHD3-4 に対する解析では、3 遺伝子上の 3 多型が選択された。aGVHD2-4 で選択されたものは 1 多型のみであった。うち 1 多型は、レシピエントとドナーのいずれの由来でも選択され、しかも関連の方向が逆であった。

# 非血縁者間同種骨髄移植における 免疫調整遺伝子多型解析

高見昭良 Jルイスエスピノーザ

中尾眞二



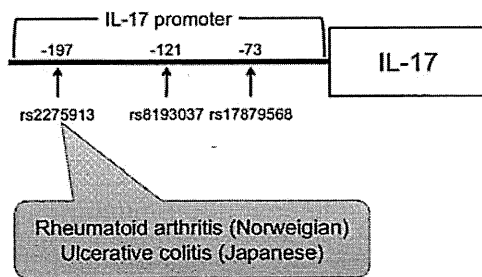
金沢大学

平成23年度第2回造血細胞移植関連研究会合同会議  
平成23年1月8日 総務委員会第10回

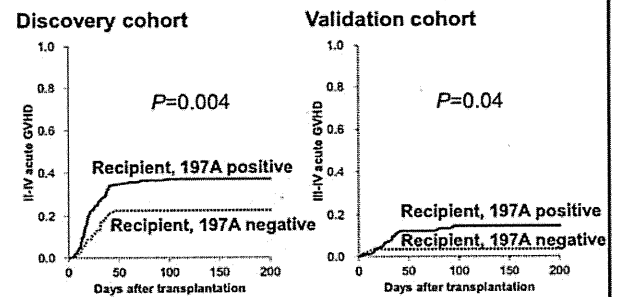
## 要旨

- 非血縁者間同種移植成績と免疫調整遺伝子多型の関連を検討するため、骨髄移植推進財団・日本造血細胞移植学会の協力を得て、HLA一致非血縁者間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のDNA試料と臨床情報を入手して解析した。後方視的臨床解析により、患者・ドナーのIL-17 (rs2275913)・NKG2D (rs1049174)・FCGR3A (rs396991)・Granzyme B (rs8192917)・CXCL10 (rs3921)・Heme oxygenase-1 (rs2071746)など複数の遺伝子多型が、GVHDや移植関連死亡、再発といった移植後転帰に影響することがわかった。この中で、IL-17の遺伝子多型解析では、197A/Aまたは197A/G型が急性GVHDの危険因子であった。この遺伝子多型部位はプロモーター領域にあることから、発現量との関連を機能的に検討した。その結果、IL-17の197A/Aまたは197A/G型では、IL-17の発現が197G/G型に比べ高いことがわかった。さらに、197Aアリルは197Gアリルに比べ、転写因子NFAT1に対する親和性が高かった。したがって、IL-17プロモーター遺伝子多型が転写レベルでIL-17発現を調整し、急性GVHD発症に関与している可能性が示唆された。このように、機能的役割を持つ免疫調整遺伝子多型情報を用いれば、移植成功率が最も高いと予想される理想のドナーを選ぶ、または有害事象を予測し適切な予防策を講じるなどにより、移植成績向上が期待できるかもしれない。

## IL-17 promoter SNP

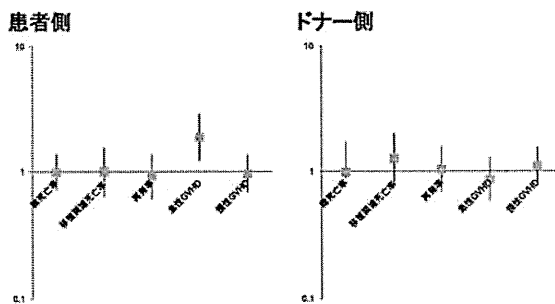


## 臨床解析



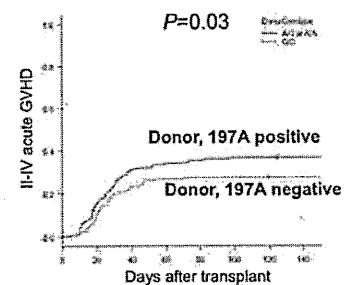
Espinosa JL, Takami A: Bone Marrow Transplant. 2011; Epub

## 多変量解析: IL-17 197A

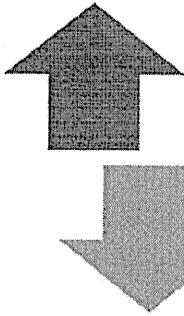


Espinosa JL, Takami A: Bone Marrow Transplant. 2011; Epub

## Validation cohort study



## GVHDにおけるIL-17の役割



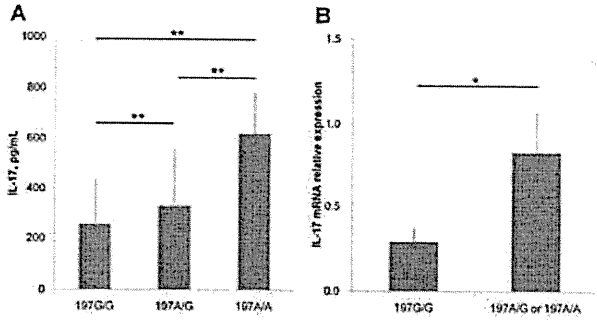
### GVHD誘導

- Kappel LW. Blood. 2009;113:945-952.
- Iclozan C. Biol Blood Marrow Transplant. 2009.
- Carlson MJ. Blood. 2009;113:1365-1374.

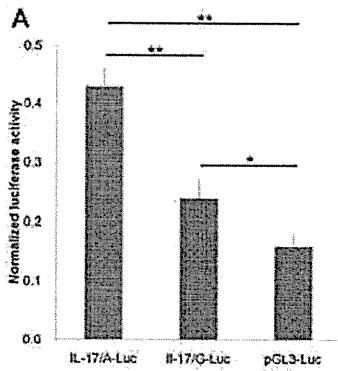
### GVHD抑制

- Yi T. Blood. 2008;112:2101-2110.

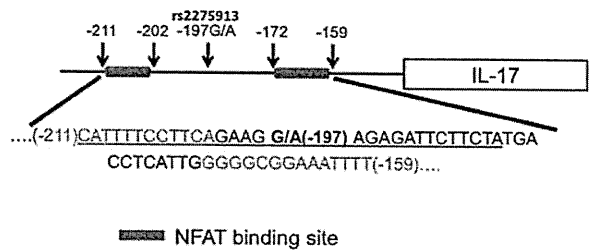
## IL-17 expression



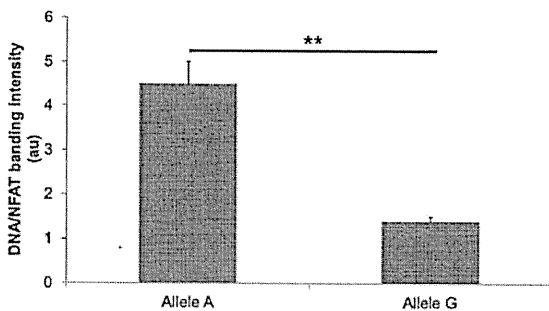
## Reporter gene assay



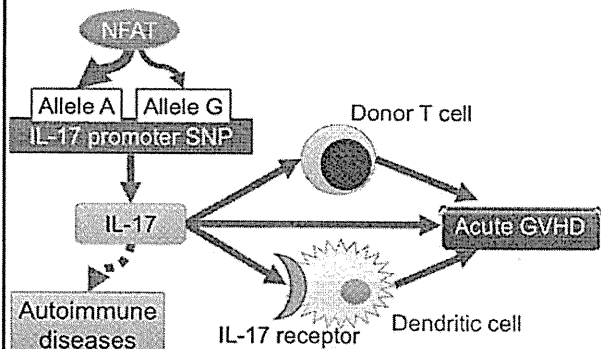
## IL-17 promoter



## The intensity of the bands corresponding to the DNA/protein interaction: EMSA assay



## Role of IL-17 promoter SNP in pathogenesis of acute GVHD



### 1. 3) 移植後肺合併症とレニンアンギオテンシン系

東海大学血液腫瘍内科 鬼塚真仁

#### 背景

造血幹細胞移植後の非感染性肺合併症は、比較的まれな合併症であるが、致死率が高く、有効な治療方法が存在しないやっかいな合併症である。さらには、発症のメカニズム、病態生理について依然として解明されていない部分が多い合併症である。これまでに我々は2つの独立した日本人集団における非感染性移植後肺合併症の発症に ACE (angiotensin converting enzyme) 遺伝子の In/del 多型が関係することを報告してきたが、今回 Fred Hutchinson Cancer Research Center (FHCRC) における移植症例について、同様の遺伝子多型解析を行ったので、ここに報告する。

#### 方法と対象集団

FHCRC において施行された 816 例の造血幹細胞移植症例のうち移植後 100 日以内に発症した IPS (idiopathic pneumonia syndrome) 症例を対象とし、ACE, AGT, SFTPB, CCL5, DARC, MCP1, TNF $\alpha$ , TNFR2 を対象遺伝子として、同コホートに対して施行された Affymetrix-GeneChip5.0 および Illumina 社の SNP array により得られた SNP 情報を元にして、遺伝子多型解析を施行した。

#### 結果

レシピエントにおける AGT 遺伝子において、IPS 発症症例で有意に頻度が高い SNP がクラスターとして見いだされた (Fig1)。ACE も含めてこのほかに調べた遺伝子群において、IPS 発症と関連する SNP は存在しなかった。

#### 考察

ACE 遺伝子多型は FHCRC における移植症例を対象とした今回の解析では、有意な SNP を見つけることが出来なかった。また、マウスモデルで IPS の発症メカニズムにおいて重要とされるサイトカイン、ケモカインにおいても、function に影響する SNP が報告されているが、それらの SNP も含めて IPS 発

症に関連が見られなかった。しかし、angiotensinogen を code する AGT 遺伝子において強い関連が見られたため、非感染性移植後肺合併症におけるレニンアンジオテンシン系の関与を改めて示唆する結果となった。

Fig.1

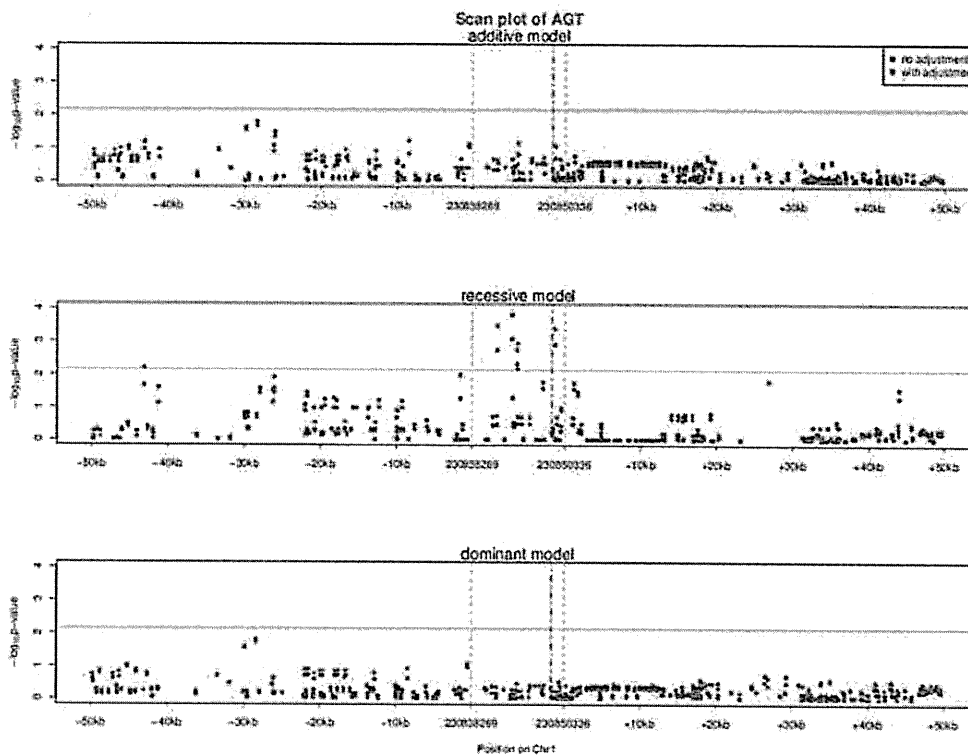
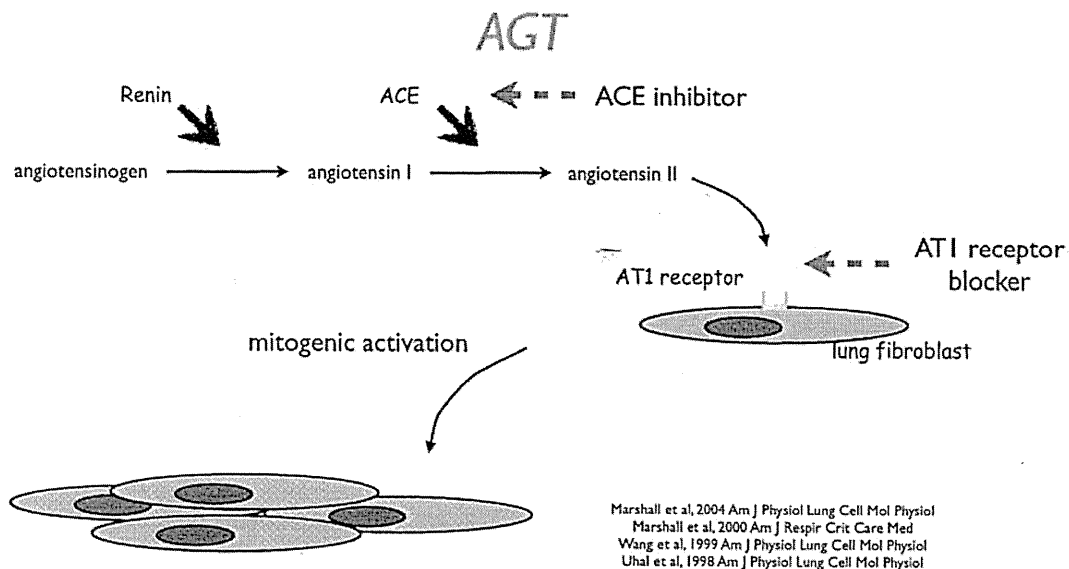
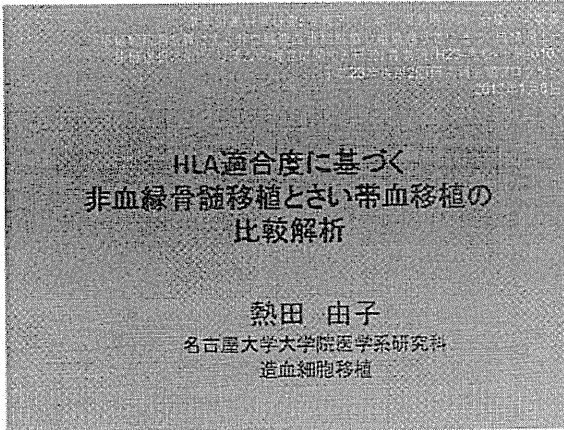


Fig. 2

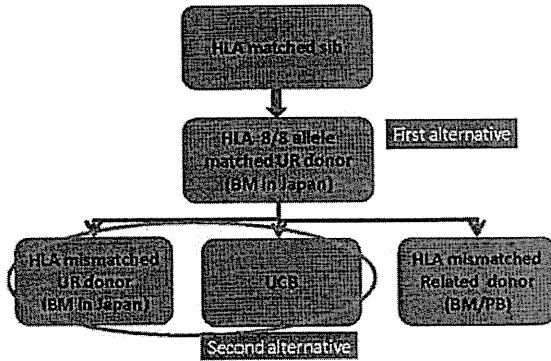




UCBT vs. UBMT in adults

- Comparison Studies
  - Laughlin et al. 2004 NEJM
  - Rocha et al. 2004 NEJM
  - Takahashi et al. 2004 Blood
    - Favorable alternative stem cell source
    - Compared to HLA -A, -B, and -DRB1 6/6 allele matched UBMT
- Comparison with HLA-A, -B, -C, and -DRB1 8/8 allele matched UBMT
  - Atsuta et al. 2009 Blood
  - Eapen et al. 2010 Lancet Oncology

Donor selection



Patients

- Adult patients, >15 years of age
- AML, ALL, or MDS
- Received either CB (single unit) or BM from unrelated donors
  - UBMT; limited to HLA A, B, C, DR 7/8 or 6/8 matched
  - UCBT; zero to two HLA A, B, low resolution and DRB1 high resolution mismatched
- First HSCT
- Myeloablative conditioning
- Year of transplant
  - 1996-2005 for UBMT, 2000-2005 for UCBT
  - To avoid the inclusion of the pioneering period of UBMT / UCBT

Patients 2

		DRB1	248
BMT	7/8 matched	672	A/B 137
			C 287
			C+DRB1 144
		356	A/B+C 122
		Other	90
CBT	6/6, 5/6, or 4/6		351

	6/6	20
	5/6	87
	4/6	244

Patient characteristics

	Bone Marrow Transplant			Cord Blood Transplant
	Class II 1 locus mismatch	Class I 1 locus mismatch	2 loci mismatch	
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)
Number of transplants	248	424	356	351
Patient age at transplant				
Median (Range)	36 (16-60)	34 (16-67)	34 (16-59)	37 (16-58)
Patient sex				
Male	151(61)	241(57)	210(59)	162(46)
Female	97(39)	183(43)	146(41)	189(54)
Sex matching				
Matched	145(58)	268(63)	217(61)	170(48)
Male to Female	52(21)	82(19)	73(21)	97(28)
Female to Male	50(20)	71(17)	64(18)	84(24)
Unknown	1(<1)	3(1)	2(1)	0(0)

Relapse and TRM

Adjusted by multivariate analyses (Fine and Gray model)

	Degree of mismatch	N	Relapse			TRM		
			RR	(95%CI)	P value	RR	(95%CI)	P value
BMT	Single DRB1 (7/8)	248	1.00			1.00		
	Single A or B (7/8)	137	0.65	(0.41-1.01)	0.056	1.07	(0.77-1.49)	0.698
	Single C (7/8)	287	0.60	(0.41-0.87)	0.007	1.13	(0.86-1.49)	0.391
	C + DRB1 (6/8)	144	0.76	(0.49-1.17)	0.208	1.10	(0.78-1.55)	0.600
	A/B + C (6/8)	122	0.70	(0.44-1.10)	0.12	1.42	(1.03-1.96)	0.032
	Other 2 loci (6/8)	90	0.60	(0.35-1.02)	0.061	1.48	(1.03-2.13)	0.035
CBT		351	1.28	(0.93-1.76)	0.125	0.68	(0.50-0.92)	0.011

Overall mortality and treatment failure

Adjusted by multivariate analyses (Cox model)

	Degree of mismatch	N	Overall mortality			Treatment failure		
			RR	(95%CI)	P value	RR	(95%CI)	P value
BMT	Single DRB1 (7/8)	248	1.00			1.00		
	Single A or B (7/8)	137	0.84	(0.64-1.11)	0.216	0.82	(0.63-1.08)	0.158
	Single C (7/8)	287	0.89	(0.72-1.12)	0.324	0.86	(0.69-1.07)	0.170
	C + DRB1 (6/8)	144	0.97	(0.74-1.27)	0.831	0.95	(0.73-1.24)	0.726
	A/B + C (6/8)	122	1.22	(0.94-1.59)	0.143	1.15	(0.88-1.49)	0.300
	Other 2 loci (6/8)	90	1.25	(0.92-1.68)	0.146	1.13	(0.84-1.53)	0.409
CBT		351	0.85	(0.68-1.06)	0.149	0.97	(0.92-1.35)	0.747

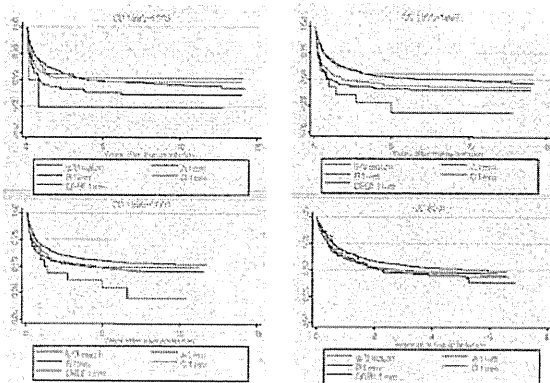
Conclusion

- HLA zero to two antigen mismatched UCBT is a reasonable second alternative donor / stem cell source
  - Similar survival outcome with HLA-DRB1 one allele or one antigen mismatched UCBT, the current recommended second alternative donor.
- Decreased grade 2 to 4, and grade 3 to 4 acute GVHD
  - Despite less use of tacrolimus and more HLA disparity
- In the absence of a suitable donor in suitable time, UCBT should be planned promptly.
  - Short coordination time for UCB

Reviewerより

- Reviewer 1
  - Class I mismatches in previous analysis of the JMDP were worse than class II; here, it does not seem to be the case.....
- Reviewer 2
  - BMT with single class I mismatches appear to do better than class II mismatches, which would seem to fly in the face of prior analyses from the Japanese registry that are mentioned in the Introduction.

Reviewer-only materials



謝辞

- 研究執筆グループ (JCBBN/JMDP) 敬称略
 

森島泰雄	鈴木律朗	長村登紀子
谷口修一	高橋聡	甲斐俊朗
坂巻壽	香西康司	小林直樹
福田隆浩	森毅彦	土田昌宏
川瀬孝和	河敬成	小寺良尚
加藤俊一		
- 骨髄移植推進財団
  - データ・資料管理委員会
- 日本さい帯血バンクネットワーク
  - 移植データ管理小委員会
- 全国の移植施設の先生方

## HLA-A, B, DR 6抗原適合非血縁者間移植におけるアリル不適合の影響の年次変化

～造血細胞移植学会 HLAと移植成績WGの解析～

## 背景

- 1990年代の非血縁者間骨髄移植のデータの解析によってDRB1の1アリル不適合よりもクラスIの1アリル不適合のほうに予後の与える影響が大きいとされてきた。
- しかし、1990年代はDRB1だけが担当医が知り得る不適合であったため、DRB1不適合症例に対しては十分な対策がなされていたのに対して、クラスIの不適合は担当医は知らなかったもので、HLA適合として扱われていた。
- すなわち、DRB1の予後が優れていたのは十分な対策がとられていたことが主な理由かもしれない。

→ クラスIの不適合が担当医にも事前にはわかるようになった2000年以降は状況が変わっているのではないかと

## 対象

- 1993～2009年に初回非血縁者間骨髄移植を行った16歳以上の患者。
- 疾患、病期は問わない。
- A, B, DRの6抗原適合症例の中で、A, B, C, DRB1の8アリル判明症例のうち、8/8適合、あるいは1アリルのみの不適合の症例を対象とした。
- HLA不適合数はGVH方向のアリル不適合総数と、HVG方向のアリル不適合総数のうち、大きいほうの数字を採用している。
- ただし、GVH方向とHVG方向で異なる座に不適合がある症例は除外した。
- C座については抗原レベルでの不適合も含む。

## 患者背景

(Early=1999年まで、Late=2000年以降)

SCT year	MUD88	A.mis	B.mis	C.mis	DRB1.mis
Early	653	97	10	176	93
Late	2460	191	35	646	407
Age					
<50	2248	225	39	617	363
>=50	865	63	6	205	137
Sex (R)					
0	1198	111	18	374	191
1	1915	177	27	448	309
GVHD prophylaxis					
CSA	1400	135	20	382	177
TAC	1642	147	24	415	312
Disease risk					
Low risk	1630	142	21	426	238
High risk	771	84	14	213	140
Others	712	62	10	183	122
Conditioning					
MAC	2272	217	35	585	352
RIC	435	32	7	118	74
High risk mismatch					
Absent	3113	211	42	663	467
Present	0	77	3	159	33

## 解析方法

- 交絡因子となり得る因子として、患者・ドナーの年齢・性別、性不適合、ABO不適合、細胞数、GVHD予防法、疾患、疾患リスク、前処置(RIC/MAC)を候補とし、まずこれらの因子を用いた比例ハザードモデルを構築した。
- 独立変数の選択はP値に基づく方法とAICに基づく方法で行い、いずれも同じ変数が選択された。
- 最終的にこのモデルにHLA不適合、移植年代を投入することによって、HLA不適合、移植年代の影響を他の重要な因子で補正した。
- 統計解析には簡単でとても便利なEZRを使用した。

## 全年代におけるHLA不適合(MUD88をreference)、年代の影響

HLA Mismatch	Hazard Ratio	95% CI
1 A mismatch	1.0150	1.0110
1 B mismatch	1.0090	1.0040
1 C mismatch	1.1850	1.0640
1 DRB1 mismatch	0.8957	0.8288
2 A mismatches	0.4117	0.2951
2 B mismatches	1.2370	1.1010
2 C mismatches	0.8277	0.6916
2 DRB1 mismatches	0.9786	0.8457
3 A mismatches	0.6277	0.5406
3 B mismatches	0.6765	0.5874
3 C mismatches	0.5643	0.4436
3 DRB1 mismatches	0.6536	0.4826
4 A mismatches	2.7898	2.5180
4 B mismatches	2.5348	2.2960
4 C mismatches	1.7048	1.2059
4 DRB1 mismatches	1.5930	1.0982
5 A mismatches	1.3940	1.1690
5 B mismatches	1.1750	1.0200
5 C mismatches	0.8384	0.7493

A, B, C, DRB1がいずれも有意となる。



～1999年のHLA不適合(MUD88をreference)の影響

HLA mismatch	HR	95% CI	P-value
MUD88	1.0220	1.0130	1.0310 6.342e-07
A mis.	1.0120	1.0020	1.0220 2.445e-02
B mis.	0.9803	0.8256	1.1640 5.207e-01
C mis.	0.7938	0.6293	1.0310 5.126e-02
DRB1 mis.	0.9726	0.3022	1.6650 6.721e-02
A mis.	1.3020	1.4950	1.6650 1.719e-02
B mis.	1.0980	0.9488	4.9440 5.012e-01
C mis.	0.9980	0.7810	1.2430 9.876e-01
DRB1 mis.	0.6713	0.4275	0.9317 2.955e-02
A mis.	3.3510	0.7623	14.7800 1.894e-01
B mis.	0.5117	0.2574	1.0170 5.997e-02
C mis.	0.6265	0.1821	2.1550 4.582e-01
DRB1 mis.	2.9410	2.3720	3.5730 0.000e+00
A mis.	2.4450	1.8180	4.1710 1.143e-02
B mis.	1.2080	0.9750	1.7000 7.490e-02
C mis.	2.5260	1.2840	4.9680 7.245e-03
DRB1 mis.	1.0340	0.8219	1.3060 7.742e-01
A mis.	0.9334	0.6074	1.2570 6.607e-02

C, DRB1の不適合は生存に影響が無く、A, Bの不適合の影響が強い。

2000年～のHLA不適合(MUD88をreference)の影響

HLA mismatch	HR	95% CI	P-value
MUD88	1.0140	1.0100	1.0180 2.469e-12
A mis.	1.0090	1.0020	1.0160 7.007e-03
B mis.	1.2270	1.1150	1.3550 5.978e-05
C mis.	0.9210	0.8345	1.0170 1.025e-01
DRB1 mis.	0.3453	0.2260	0.5274 3.635e-07
A mis.	1.2290	1.0720	1.4070 3.088e-03
B mis.	0.8666	0.6491	1.1570 3.324e-01
C mis.	0.9882	0.8173	1.1860 8.753e-01
DRB1 mis.	0.6090	0.5251	0.7210 9.930e-09
A mis.	0.9242	0.8042	1.2210 1.119e-01
B mis.	0.5867	0.4504	0.7644 7.795e-05
C mis.	0.6740	0.4882	0.9307 1.657e-02
DRB1 mis.	2.7670	2.4590	3.1150 0.000e+00
A mis.	2.4362	1.9340	3.0650 1.188e-14
B mis.	1.9000	1.0630	1.5090 1.056e-02
C mis.	1.3440	0.9526	2.1190 2.030e-01
DRB1 mis.	1.4080	1.2430	1.5950 7.124e-08
A mis.	1.2450	1.0720	1.4440 3.921e-03

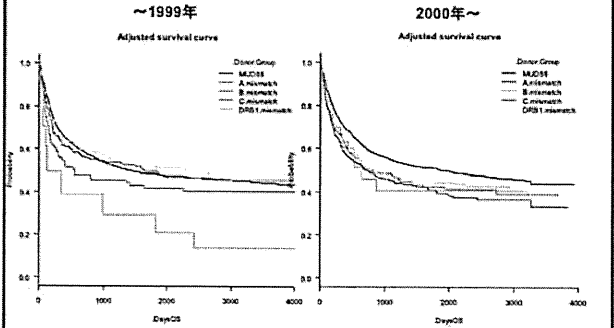
2001年以降は様相が変わり、C, DRB1のアルル不適合によって有意に生存率は低下する。ただし、症例数、検出力に差がある。ハザード比で見ると、どの不適合にも大差はないかもしれない。

年代とHLA不適合の交互作用の解析

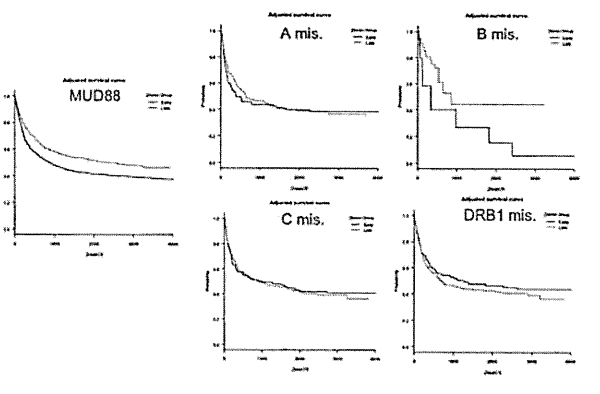
HLA mismatch	HR	95% CI	P-value
MUD88	1.0150	1.0120	1.0180 5.110e-14
A mis.	1.0090	1.0040	1.0130 5.281e-04
B mis.	1.3370	1.0600	1.6820 9.110e-04
C mis.	0.8970	0.8204	0.9818 5.819e-02
DRB1 mis.	0.4078	0.2923	0.5690 1.302e-07
A mis.	1.2480	1.1280	1.3820 2.189e-04
B mis.	0.8230	0.6935	1.0020 3.630e-01
C mis.	0.9740	0.8433	1.1250 1.194e-01
DRB1 mis.	0.4021	0.2924	0.5620 1.302e-07
A mis.	2.4700	2.0830	2.9250 5.417e-10
B mis.	0.6420	0.4421	0.9230 2.795e-04
C mis.	0.6505	0.4809	0.8810 3.481e-03
DRB1 mis.	2.6050	2.1320	3.1000 9.000e-03
A mis.	2.8770	2.1090	3.9500 9.090e-02
B mis.	1.2850	0.9622	1.6800 9.238e-02
C mis.	0.6520	0.4800	0.8810 3.481e-03
DRB1 mis.	1.0450	0.8216	1.3130 7.940e-01
A mis.	0.9280	0.6400	1.2570 6.024e-01
B mis.	0.7337	0.6751	0.7913 7.111e-04
C mis.	1.0220	0.7781	1.3360 9.547e-01
DRB1 mis.	0.5080	0.2284	1.1250 9.036e-02
A mis.	1.8400	1.3370	2.5100 1.749e-02
B mis.	1.5400	0.9411	2.5850 9.379e-02

B, C, DRB1の不適合は年代p<0.10の交互作用が示された。

年代別、HLA不適合別の補正生存曲線  
(他の有意な交絡因子については平均値を採用)



HLA適合度別の年代での変化(他の有意な因子で補正)



結論

- B, C, DRB1の交互作用の原因はMUD88, B不適合群で近年になって生存率が改善しているのに対し、C不適合群、DRB1不適合群では改善していないためと考えられる。
- 1990年代はDRB1不適合だけが担当医に知られていた → DRB1不適合だけGVHD対策が強化されていた。一方、クラスIの不適合は担当医は気づいていなかったため、特に対策は行われていなかった。
- 2000年代はクラスI不適合がhigh-riskとして認識されるようになった。一方、DRB1不適合は適合と変わらないものと認識されるようになり、GVHD対策がゆるめられたかもしれない。
- Cについては2000年代の多くの症例でも主治医が不適合を知らないため対策が行われていない。(実際、CSAとTACの使用比率を見ると、A, B, DRB1の不適合ではTACが多いのに対して、MUD88やCの不適合はCSAが多い)

## 他の不適合との関係は・・・

DRB1のみ不適合をReferenceとした場合、	HA	HA
DRB1のみ不適合	0.0220	1.1994e-14
DRB1のみ不適合 + DRB3のみ不適合	0.0180	6.663e+05
DRB1のみ不適合 + DRB4のみ不適合	1.5750	1.551e+03
DRB1のみ不適合 + DRB5のみ不適合	0.0260	2.037e+01
DRB1のみ不適合 + DRB6のみ不適合	0.9380	2.653e+02
DRB1のみ不適合 + DRB7のみ不適合	1.3240	4.197e+03
DRB1のみ不適合 + DRB8のみ不適合	1.0250	1.329e+01
DRB1のみ不適合 + DRB9のみ不適合	0.1110	6.052e+01
DRB1のみ不適合 + DRB10のみ不適合	0.7160	0.720e+08
DRB1のみ不適合 + DRB11のみ不適合	0.3540	7.307e+01
DRB1のみ不適合 + DRB12のみ不適合	0.0230	0.4690
DRB1のみ不適合 + DRB13のみ不適合	0.7290	0.4990
DRB1のみ不適合 + DRB14のみ不適合	2.7510	2.3220
DRB1のみ不適合 + DRB15のみ不適合	2.3570	1.9790
DRB1のみ不適合 + DRB16のみ不適合	NA	NA
DRB1のみ不適合 + DRB17のみ不適合	0.5510	0.6930
DRB1のみ不適合 + DRB18のみ不適合	1.1400	0.8685
DRB1のみ不適合 + DRB19のみ不適合	1.8090	1.0720
DRB1のみ不適合 + DRB20のみ不適合	1.2360	1.0110
DRB1のみ不適合 + DRB21のみ不適合	1.0590	0.3030
DRB1のみ不適合 + DRB22のみ不適合	1.1330	0.4904
DRB1のみ不適合 + DRB23のみ不適合	1.0350	0.7447
DRB1のみ不適合 + DRB24のみ不適合	1.7240	1.9630
DRB1のみ不適合 + DRB25のみ不適合	0.7647	0.8233

末尾の + は他のアレルにも不適合があることを意味する

- MUD88は有意に予後がよい。
- A、B、Cの1アレル不適合とはほとんど差がない。
- DRの1抗原不適合とも有意差はない。
- 複数のアレル不適合だけが有意に悪い。

## High-risk mismatchの影響

	HA	HA	HA	HA
HA	1.0150	1.0110	1.0160	3.331e-16
HA + DRB1	1.0050	1.0040	1.0150	3.845e-04
HA + DRB2	0.8523	0.8160	0.9750	1.251e-02
HA + DRB3	1.2390	1.1020	1.3910	3.145e-04
HA + DRB4	0.9766	0.8450	1.1200	7.470e-01
HA + DRB5	0.6277	0.5490	0.7230	9.593e-10
HA + DRB6	0.8506	0.6340	1.0080	1.780e-01
HA + DRB7	0.8482	0.4443	0.7120	3.340e-06
HA + DRB8	0.6707	0.3894	1.1860	1.742e-01
HA + DRB9	0.4131	0.2962	0.5762	1.900e-07
HA + DRB10	0.6547	0.4895	0.9566	6.185e-03
HA + DRB11	2.7000	2.5110	3.0700	0.000e+00
HA + DRB12	2.5420	2.0840	3.1140	0.000e+00
HA + DRB13	0.8057	0.7360	0.9820	2.871e-06
HA + DRB14	1.1400	0.9600	1.3120	1.212e-01
HA + DRB15	1.1570	1.0620	1.2600	8.262e-04
HA + DRB16	0.8397	0.7496	0.9406	2.550e-03

Low risk mismatchでも有意に生存率は低下する。LowとHighの間に有意差はない。  
(MUD88 3113例、Low risk 1 allele mismatch 1383例、High risk 1 allele mismatch 272例)

## このデータからの結論は・・・

とにかく不適合の数を少なくすることが重要!!

・・・かもしれない。

厚生労働科学研究：免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

「移植細胞源を異にする非血縁造血細胞移植の組織適合性に基づく成績向上と移植選択アルゴリズムの確立に関する研究」森島班 (H23-免疫一般-010)

### 「非血縁者間移植における HLA ハプロタイプ適合の可能性」

森島聡子<sup>1)</sup>、小川誠司<sup>2)</sup>、佐藤亜以子<sup>2)</sup>、柏瀬貢一<sup>3)</sup>、笹月健彦<sup>4)</sup>、森島泰雄<sup>5)</sup>

- 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研究所

非血縁者間造血幹細胞移植におけるドナーと患者の HLA 座のマッチングの重要性についてはこれまで数多くの報告があり、日本骨髄バンク (JMDP) を介した移植でも様々なレトロスペクティブ解析が報告されている。これらの解析で得られた成果は、ドナー選択や GVHD 予防法などの移植法の選択に生かされている。

HLA 一致同胞間移植では HLA ハプロタイプそのものが一致するが、非血縁者間移植においては HLA 座が完全に一致しても、ハプロタイプそのものが一致するか確定はできない。シアトルのグループは、HLA-B を probe にして genomic DNA を分離し、同一のハプロタイプ上の HLA-A, B, DR を同定する方法を開発した (PNAS, 2006;103:6964-9)。HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 が完全に一致したドナーと患者のペアで、同一のハプロタイプ上の HLA-A, B, DR がマッチする群と、ハプロタイプがミスマッチの群に分けて grade3-4 の急性 GVHD 発症率を比較すると、有意に後者で高くなることを報告している (PLoS Med 2007;4:e8)。非血縁者間移植における HLA ハプロタイプのマッチングの意義については、今後日本人のデータで検証していく必要がある。

我々は、JMDP を介して非血縁者間移植が行われた患者とドナーの HLA 型と multi-SNP データを用いて日本人で頻度の高い3つの HLA ハプロタイプの保存性について報告した (Blood 2010;115:4664-70)。さらにその3つの HLA ハプロタイプのコンセンサス配列を用いて、対側ハプロタイプの SNP 配列の同定を進めていることを本研究班で報告してきた。これまでの解析では、HLA ハプロタイプの保存性はハプロタイプによってさまざまであり、頻度の高い方がかならずしも保存性が高いということはない。また、HLA-A から DPB1 まで一致した患者とドナーのペアにおいて、同一ハプロタイプ上にのっている HLA 型の組み合わせが異なっていると推測されるペアも存在している。現在、日本人の主要な HLA ハプロタイプの LD block を同定することを目的にして解析を進めており、HLA 座と複数の tag SNP から HLA ハプロタイプの推測が可能となれば、家系のデータのない非血縁者間移植や臍帯血移植などで患者とドナーの HLA ハプロタイプをより正確に推測することが可能になると考えている。

「移植細胞源を異にする非血縁造血細胞移植の組織適合性に基づく成績向上と移植選択アルゴリズムの確立に関する研究」班 (H23-免疫一般-010)

平成23年度第2回班会議 (平成24年1月9日東京医科歯科大学)

## 2. 非血縁者間 HLA 不適合移植の可能性

### 4) 非血縁者間 HLA 不適合移植の今後の取り組み

森島泰雄 (愛知県がんセンター研究所)

#### 背景

- UR-BMT での HLA に基づくドナー選択順位の明確化
- HLA バリアーの低下
- T 細胞非除去 HLA ハプロタイプ不一致血縁移植
- 免疫抑制法の工夫 (ATG など)

#### 臨床試験

前向き第2相?

Endpoint A-GVHD? OS?

患者選択基準

HLA 不適合度 HLA-1 座ミスマッチ?

疾患

CBT の適応

GVHD 予防法

ATG 使用の可否

検体保存

付随研究: 非血縁移植における HLA ハプロタイプ解析など

#### 今後の取り組み

プロトコール作成のための WG 結成

H24 年度開始

## 「NK細胞受容体KIR適合性と臍帯血移植成績」

—東京都血液センター臍帯血バンク、京阪さい帯血バンク症例解析より—

東京都赤十字血液センター

屋部登志雄、中本貴之、東史啓、柏瀬貢一、小川篤子、中島一格、高梨美乃子

東京都西赤十字血液センター

佐竹正博

大阪府赤十字血液センター

松本加代子、福森泰雄

大阪府北大阪赤十字血液センター

神前昌敏

### 1、臍帯血移植検体の解析

これまでに東京都赤十字血液センター臍帯血バンク経由移植症例検体のNK細胞受容体とリガンド型、サイトカイン遺伝子型と移植成績との関連解析を行い、*KIR*遺伝子型、*KIR*リガンド型と白血病再発率が関連することを報告してきた。今年度は解析症例数を増やし、また大阪府赤十字血液センターと協力して京阪さい帯血バンク経由移植症例検体についても同様の解析を行なったので、併せて結果を報告する。さらに全国の臍帯血バンクに協力をいただき、本研究班によるオールジャパン体制での組織適合性遺伝子多型と臍帯血移植成績との関連解析を行うための臍帯血、患者DNA検体と臨床データ収集に向けての準備作業を担当している。

### 2、非血縁者間骨髄移植検体の解析

JMDP統合解析グループの分担課題としてNK細胞受容体、リガンド、抑制性サイトカインファミリーについての解析を行っている。mRNA発現解析結果より、重症急性GVHD発症率低下との関連が得られている*IL-10*プロモーター領域SNP、CCAハプロタイプ陽性細胞では*IL-10*mRNA発現量が高いことが明らかとなり、*IL-10*遺伝子が高発現型の患者では炎症反応、免疫応答反応が抑制され、急性重症GVHD発症率が低下する可能性が考えられた。

### 3、移植検体HLAタイピング

レトロスペクティブ研究のためにJMDPが収集、保存する患者/ドナー検体の血液から抽出されたDNAを用いて毎年、*HLA-A*から*DP*まで6座を蛍光ビーズ法でアレルタイピングしており、今年度は2009年度に保存された1959検体を行っている。今後さらに臍帯血移植症例におけるHLA適合性の移植成績への影響のレトロスペクティブ研究のために、全国の臍帯血バンクの協力を得て研究班にて収集される検体についての*HLA-A*から*DP*までの6座アレルタイピングを行っていく予定である。

「移植細胞源を異にする非血縁造血細胞移植の組織適合性に基づく成績向上と移植選択アルゴリズムの確立に関する研究」班 (H23-免疫一般-010)

平成23年度第2回班会議 (平成24年1月8日東京医科歯科大学)

3. さい帯血移植における組織適合性解析

2) さい帯血移植成績に関与する多型遺伝子に関する研究プロトコール

さい帯血移植組織適合性共同研究グループ

研究計画概要

(改訂第1版平成23年8月, 改訂第2版平成24年1月予定)

研究課題 臍帯血移植成績に関与する多型遺伝子に関する研究

【研究組織】

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)

「移植細胞源を異にする非血縁造血細胞移植の組織適合性に基づく成績向上と移植選択アルゴリズムの確立に関する研究 (H23-免疫一般-010)」班

主任研究者 東京都赤十字血液センター 屋部登志雄

研究事務局 東京都赤十字血液センター 製剤3課

研究実施施設: 東京都赤十字血液センターおよび共同研究者の所属施設

共同研究施設: 検体、移植データ提供の同意が得られた国内臍帯血バンク等

北海道臍帯血バンク、東京都赤十字血液センター臍帯血バンク、東海大学さい帯血バンク、東海臍帯血バンク、京阪さい帯血バンク、兵庫さい帯血バンク、福岡県赤十字血液センターさい帯血バンク (平成23年12月現在)

【目的】臍帯血移植は非血縁者間骨髄移植に比べて臍帯血中に存在するリンパ球のアロ反応性が弱いためHLA一座、または二座不一致の臍帯血まで移植可能ではあるが、HLA遺伝子型やHLA以外の遺伝子多型の移植成績への影響に関しては十分に明らかになっていない。本研究ではHLA遺伝子型とこれらの遺伝子多型の臍帯血移植成績への影響について解析し、移植成績が向上する患者、ドナー間の多型遺伝子型組み合わせを特定することを目的として、全国共同研究を実施する。

【方法と手順】

1. さい帯血バンクで検査、研究用に保存されている臍帯血検体、患者血検体および移植データの中で以下の条件を満たすものを選択

(1) 患者、臍帯血のHLA型またはペア検体及び移植データがそろっている症例

(2) 初回移植、単一臍帯血移植症例

(3) 研究解析用の同意が得られているもの

2. 送付される試料は各さい帯血バンクで匿名符号化されたもので、血液検体1ml以下またはGenomic DNA検体100 $\mu$ l以下とする。

3. 造血細胞移植学会登録一元管理委員会より該当移植症例の移植データの提供を受ける。

4. それぞれの検体試料よりDNAを抽出、あるいは既抽出DNA試料を用いてPCR-SSO、PCR-SSP、PCR-SBTなどの方法により遺伝子型検査を実施し、得られた多型結果と移植成績との関連を統計解析する。

解析予定遺伝子: HLA遺伝子型、NK細胞受容体とそのリガンド、および液性因子 (サイトカイン、細胞傷害分子など) とその受容体の多型、HLAハプロタイプ等の造血細胞移植において成績に影響を及ぼす可能性があるもの。

【研究期間】

平成23年9月から5年間

【展望】本検討で移植成績の向上あるいは悪化を伴うような患者、ドナー間の多型遺伝子型組み合わせを特定できれば、より適切な臍帯血ドナー選択方法への基盤となる。また骨髄移植解析結果との相違を検討することにより、造血幹細胞移植における適切なドナー源選択への指標を得ることができる。

# 再生不良性貧血における 6pUPDによる特定のアレルの欠失

佐藤亜以子<sup>1</sup>, 片桐孝和<sup>2</sup>, 柏瀬貢一<sup>3</sup>, 森島聡子<sup>4</sup>, 森島泰雄<sup>5</sup>, 中尾眞二<sup>2</sup>, 小川誠司<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京大学がんゲノミクスプロジェクト, <sup>2</sup>金沢大学第三内科, <sup>3</sup>東京都赤十字血液センター, <sup>4</sup>藤田保健衛生大学, <sup>5</sup>愛知県がんセンター

突発性の再生不良性貧血 (AA) は、自己免疫により造血幹細胞が攻撃されることで引き起こされる造血不全であると考えられているが、この機序の詳細は明らかでない。また一部の AA 患者の末梢血にはクローナリティが認められることが知られているが、このメカニズムの詳細についても依然不明である。

これらの分子機構を明らかにすることを目的として、我々は 306 例の AA 患者の末梢血のゲノムコピー数を Affymetrix 500K SNP アレイにより解析した。その結果、306 例中 40 例 (13%) の患者末梢血細胞中に、6 番染色体短腕に UPD (コピー数変化を伴わない LOH) を起こしているクローンが含まれていることがわかった。(図 1, 2) またその全例において UPD は HLA 領域を共通に含んでいた。

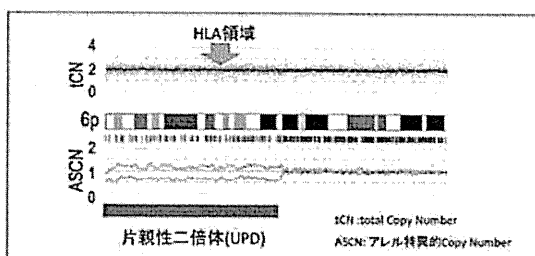


図 1: AA において観察された 6pUPD の一例

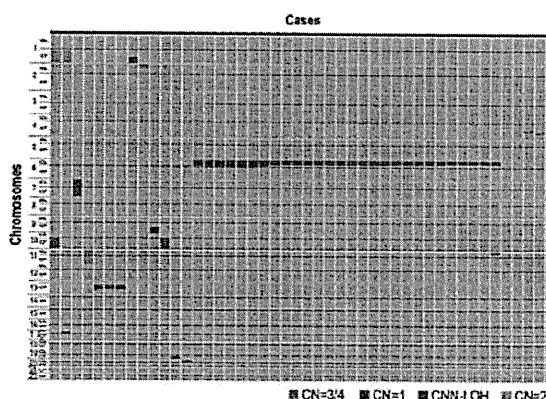


図 2: ゲノムコピー数異常の検出された症例  
縦に染色体、横に症例を並べ、異常の位置を示した。

次に 6pUPD 症例についてフローサイトメトリーを用いて HLA-A の発現を調べたところ、片アレルの HLA の発現が失われていることが確認された。

この欠失は顆粒球、単球、B 細胞で生じており、T 細胞でも少ない程度で認められた。さらに、骨髄の CD34+細胞においても片アレル HLA-A の発現低下が認められた。

また、SNP アレイデータと HLA タイピングデータを統合して、HLA ハプロタイプを推定し、アレル別のコピー数を計算することにより、各座について欠失した HLA の型を推定した。この推定結果はフローサイトメトリーにより発現低下が検出された HLA-A の型と一致していた。さらに、UPD によって失われるアレルが、HLA-A\*02:01, A\*02:06, A\*31:01, B\*40:02 の 4 つの class I HLA を持つアレルに偏っていることがわかった。

さらに、これらの HLA が AA 発症のリスクとなっている可能性を検討するために、JMDF を通じて移植が行われた 6, 613 例の移植例における、上記の 4HLA type についての AA

発症の相対リスクを計算したところ、それぞれ A\*02:01 : 1.87 (95%CI; 1.43 - 2.43) 、 A\*02:06 : 2.22 (95%CI; 1.70 - 2.90) , A\*31:01 : 1.37 (95%CI; 1.00 - 1.88) , B\*40:02 : 1.95 (1.48 - 2.58) であり、4 つのいずれかの HLA を持つ場合には、相対リスクは 1.75 (1.42 - 2.17) ( $P = 1.3 \times 10^{-7}$ ) であった。このことから、これらの HLA が AA の発症に関わる可能性が示唆された。

以上の結果から、AA では免疫異常により、特定の型の HLA が提示する自己抗原を認識する CTL が誘導され、造血不全が生じること、またそのような CTL の存在下では、標的自己抗原を提示する HLA を欠失した細胞クローンは、CTL の攻撃からエスケープすることが可能であり、相対的に増殖することが示唆された。さらに、標的となる自己抗原を提示する特定の HLA が AA 発症のリスクアレルとなっていることが示唆された。

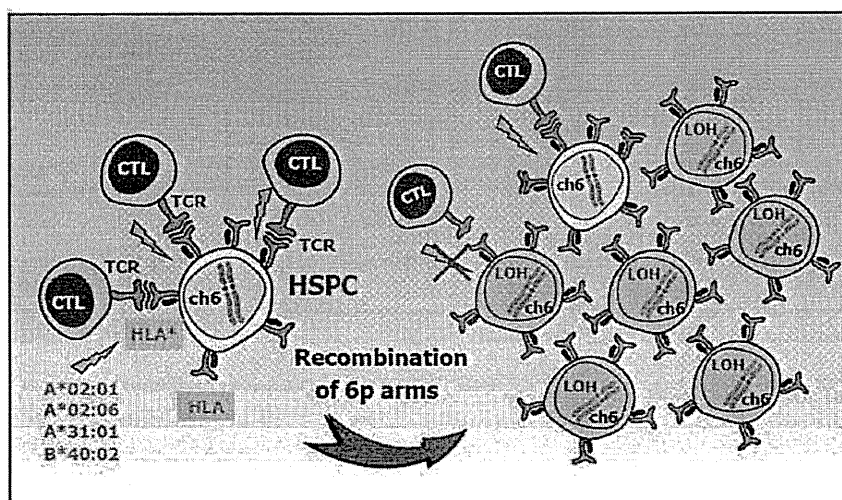


図 3 : 6pUPD (+) AA 症例における、escape のメカニズム

【発表論文】

Katagiri T, Sato-Otsubo A, Kashiwase K, Morishima S, Sato Y, Mori Y, Kato M, Sanada M, Morishima Y, Hosokawa K, Sasaki Y, Ohtake S, Ogawa S, Nakao S. Frequent loss of HLA alleles associated with copy number-neutral 6pLOH in acquired aplastic anemia. *Blood*. 2011. Online publication



## 移植後 HLA LOH/ 6p-UPD は腫瘍細胞以外でも起こる

○佐治博夫<sup>1)</sup>、小沼正栄<sup>2)</sup>、小島裕人<sup>1)</sup>

1)HLA 研究所、2)東北大学医学部附属病院 小児科

### <背景>

LOH (loss of heterozygosity) はヘテロ接合性の消失、つまり 2 本の遺伝子のうち片方の遺伝子を部分的に消失する現象である。片方の遺伝子に何らかの障害や複製エラーがおきて点突然変異などの異常が生じて機能が失われた場合に、もう片方の遺伝子が LOH を起こしやすくとされ (Knudson の 2 ヒット説)、抗腫瘍免疫による進化的選択が HLA 領域の LOH を惹起する。最近のマイクロアレイの進歩によって片親性ダイソミー (UPD, uniparental disomy)、つまり片親由来の遺伝子が 2 本ある、みかけ上の LOH があることがわかっている。

癌抑制遺伝子に LOH が起きて細胞が癌化することから、癌の発生前に起こる現象でもあるが、HLA の LOH は抗腫瘍免疫の結果と考えられる。血液腫瘍では起こりにくいとされてきたが、我々は血液腫瘍でも進行期にはまれでなく起こることを報告してきた。また HLA ハプロ半合致造血幹細胞移植後の血液腫瘍細胞において HLA 領域での LOH (UPD の可能性もあるため、LOH/6p-UPD と記載) が確認され、予後が悪いことから新たな話題となっている。しかし、体細胞における HLA の LOH/6p-UPD の報告はなく、今回 HLA ハプロ半合致移植後に腫瘍細胞のみならず、Buccal、Hair にも LOH/6p-UPD を認めた一例を経験したので報告する。

<臨床経過> IMA: inherited maternal antigens、IPA: inherited paternal antigens

14 歳の男児。2006 年 10 月に AML (M2) と診断され、化学療法で寛解導入不能のためサルベージとして IDA-FLAG 療法を行い寛解し、2007 年 2 月に臍帯血移植を実施。前処置: TBI(12Gy)+CY、GVHD は軽度。その後 2008 年 5 月に骨髄再発を認め、IDA-FLAG 療法、マイロタグにも反応なく、非寛解で 2008 年 12 月臍帯血移植。非破壊的レジメで前処置: FLU+Mel+low-dose TBI(4Gy)、GVHD は軽度。2009 年 12 月骨髄再発。HD-MTX 療法を試みところ、重症感染 (HHV-6) を合併したが、寛解を得た。その後原因不明の大量下血を繰り返し、保存的に改善するも再移植はリスクが高いとし無治療経過観察していたが、2010 年 7 月骨髄再発。Clofarabine を含めた治療を行ったが寛解は得られず、非寛解で 2010 年 12 月に父をドナーとした HLA ハプロ半合致 PBSCT を実施。前処置: FLU+MEL+ATG。無事生着したが重症 GVHD を合併し、全身状態不良も徐々に改善していた。2011 年 7 月に末梢血に blast 出現。骨髄では 5%程度。免疫抑制剤を減量中止して GVL を誘導しようと試みたが blast は緩徐な増加傾向を示した。DLI を考慮するため、LOH 現象を調べた。HLA は以下のとおり。

Recipient ; IPA ハプロタイプ A\*24:02-C\*01:02-B\*54:01-DRB1\*14:03

IMA ハプロタイプ A\*02:06-C\*08:01-B\*40:06-DRB1\*15:01

1<sup>st</sup> Donor ; A\*02:01/\*24:02, B\*40:03/\*54:01, DRB1\*14:05/\*04:05

2<sup>nd</sup> Donor ; A\*02:06/\*24:02, B\*40:02/\*54:01, C\*01:02/\*15:02, DRB1\*14:06/\*04:05

3<sup>rd</sup> Donor (父) ; ハプロタイプ① A\*24:02-C\*01:02-B\*54:01-DRB1\*14:03

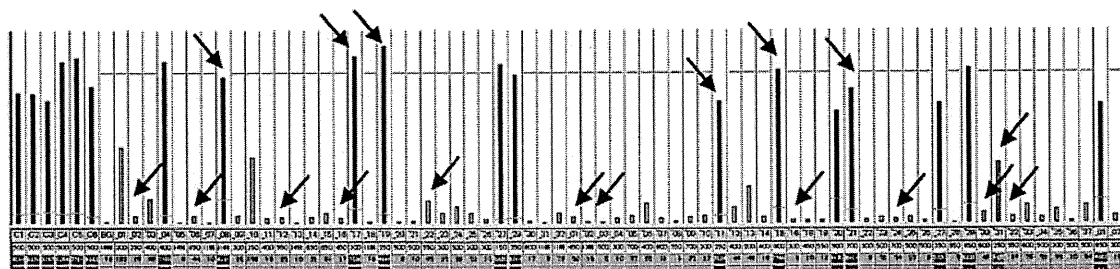
ハプロタイプ② A\*24:02-C\*08:03-B\*48:01-DRB1\*15:01

<材料・方法> 3<sup>rd</sup> 移植後 day 289 の腫瘍細胞、Buccal、Nail、Hair について、

1. HLA 領域以外の LOH 現象有無の検査には 14 種類のマイクロサテライトを用いた。
2. HLA 領域の LOH 現象有無の検査には Luminex 法 (WAKFlow) を用いた。

<結果>

1. 3<sup>rd</sup> 移植後 day 289 の腫瘍細胞、Buccal、Nail、Hair のマイクロサテライト多型性はすべて Recipient 型であり、heterozygote にアンバランスはみられなかった。
2. Luminex 法による検査では、HLA-A,B,C 座において 3<sup>rd</sup> 移植後 day 289 の Nail は IMA の Signal 強度が移植前 Buccal に対してほぼ同程度であったが、腫瘍細胞、Buccal、Hair においてはそれぞれ 1%,1%,10%程度であった。HLA-DR 座はすべてにおいて同程度であった。



↙ . . . A\*24:02 specific signal      ↘ . . . A\*02:06 specific signal

(3<sup>rd</sup> 移植後 day 289 Buccal の Luminex 法検査結果 生データ)

<考察>

Luminex 法による検査結果から、3<sup>rd</sup> 移植後 day 289 の腫瘍細胞、Buccal、Hair は HLA-A,B,C 座の IMA ハプロタイプ、つまり 3<sup>rd</sup> Donor (父) に対するミスマッチ Class I ハプロタイプにおいて LOH/ 6p-UPD が確認された。サンプルによって比率に差が出たのは、LOH/ 6p-UPD を起こしている細胞数に差があるためと考えられる。HLA-DR 座は Donor/ Recipient で一致しており LOH/ 6p-UPD を認めなかった。さらにマイクロサテライト多型性の検査においても LOH/ UPD が確認されなかったため、今回の症例では HLA 領域の、最低でも HLA-A,B,C 座の領域に限定して LOH/ 6p-UPD が起ったと推定される。

今回の症例では腫瘍細胞のみならず、体細胞においても LOH/ 6p-UPD が確認された。これは腫瘍細胞の転移による可能性を否定できないが、白血病幹細胞理論から理解しがたい。Buccal や Hair が Donor の強烈な GVH 攻撃を受け、(上皮) 幹細胞クローンとして存在していた LOH/ 6p-UPD 細胞が生き残り、進化的に選択されて増殖したと考えるほうが妥当である。すなわち、ハプロ半合致移植の GVH 反応は進化的選択により体細胞の HLA LOH/ 6pUPD を惹起する。

Donor の免疫によって Recipient の体細胞が LOH/ 6p-UPD を起こしたのであれば、Recipient の免疫が Donor の体細胞を攻撃 (HVG 反応) する臓器移植でもそれを考慮する必要がある。臓器の場合は、細胞周期が Buccal などの上皮細胞より遅いため LOH/ 6p-UPD を起こしにくいであろうが、血管内皮については可能性がある。ハプロ半合致の血縁間臓器移植では寛容の成立が早く、高率であることの説明になるかもしれない。今回の一例が細胞/ 臓器移植の GVH および HVG 反応への寛容のメカニズムを知るうえで、ブレイクスルーとなることを期待する。

# 造血細胞移植合同班会議（厚労科学研究）

1月8日（日）

灌流法により採取された骨髄細胞を用いた骨髄内骨髄移植療法：基礎から臨床へ（H22-免疫-一般-009）  
研究代表者 池原 進（関西医科大学 共同研究講座 幹細胞異常症学）

15:00-15:10

1. 骨髄内骨髄移植マウスモデルを用いた移植後肺障害に関する検討  
前田嘉信、山筋好子、西森久和、松岡賢市、品川克至（岡山大学病院 血液・腫瘍内科）

15:10-15:20

2. 間葉系幹細胞を利用した造血促進に関する検討  
一戸 辰夫<sup>1</sup>、三浦 康生<sup>2</sup>、八尾 尚幸<sup>3</sup>、吉岡 聡<sup>3,4</sup>、前川 平<sup>5</sup>  
（<sup>1</sup>佐賀大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科、<sup>2</sup>京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部、  
<sup>3</sup>京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部、<sup>4</sup>京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科  
<sup>5</sup>京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部）

15:20-15:30

3. 同種移植後の再発白血病の治療法開発  
赤塚美樹（藤田保健衛生大学血液内科、愛知県がんセンター研究所腫瘍免疫学部）  
廣澤友也（愛知県がんセンター研究所腫瘍免疫学部）

15:30-15:40

4. 難治性ウイルス感染症に対するウイルス抗原特異的細胞障害性T細胞（CTL）の体外増幅法の開発と臨床第1相試験  
高橋義行、小島勢二（名古屋大学大学院医学系研究科 小児科学）

15:40-15:50

5. 新しい造血幹細胞移植技術評価のための、移植後モニタリングシステムの開発に関する研究  
森尾友宏（東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学分野）  
清水則夫（東京医科歯科大学・難治疾患研究所・ウイルス治療学）

15:50-16:00

6. 骨髄内臍帯血移植療法の開発  
村田 誠（名古屋大学医学部附属病院 血液内科）

16:00-16:10

7. 灌流法により採取された骨髄細胞を用いた骨髄内骨髄移植療法の問題点と今後の計画  
相馬俊裕、小川 啓恭（兵庫医科大学 内科学 血液内科）

16:10-16:30

8. 整形外科医からみた“灌流法の実際”  
串田剛俊、飯田寛和（関西医科大学 整形外科科学講座）  
森 眞一郎、野村昌作（関西医科大学 血液呼吸器膠原病内科学講座）  
池原 進（関西医科大学 共同研究講座 幹細胞異常症学）

## 骨髓内骨髓移植マウスモデルを用いた移植後肺障害に関する検討

前田嘉信、山筋好子、西森久和、松岡賢市、品川克至

岡山大学病院 血液・腫瘍内科

### 【目的】

移植後肺障害 Idiopathic pneumonia syndrome (IPS)は、移植後に感染症以外の原因による肺胞障害をきたす予後不良な肺合併症である。原因として肺への放射線照射の影響やドナー免疫担当細胞の関与が考えられている。ドナー免疫担当細胞を含む造血幹細胞は、静脈内骨髓移植 (IV-SCT) 後では多くが肺へトラップされるが、骨髓内骨髓移植 (IBM-SCT) では少ないと考えられる。またマウスモデルでは IBM-SCT では IV-SCT よりも GVHD が抑制されることが報告されている。これらの背景から IBM-SCT では IV-SCT よりも IPS の発症が軽減されるとの仮説を立てマウスモデルを用いて両者の比較検討を行った。

### 【方法】

ドナーマウスには C57BL/6J を用い、放射線照射で前処置したレシピエントマウス B6D2F1 に IV-SCT と IBM-SCT を行い比較検討した。移植後経時的に体重、GVHD スコアおよび生命予後を評価、移植 6 週間後に気管支肺胞洗浄 broncho-alveolar lavage (BAL) を行い回収液中の細胞を解析、また肺組織の病理所見を検討した。さらに移植 2 日後の肺組織中ケモカイン CXCL1、CCL2、3、5、8 の mRNA 発現を測定した。次にドナーマウスに FVB/N *lacZ*、レシピエントマウスに BALB/c を用いた系で、*in vivo* bioluminescence imaging (BLI) 分析により移植後輸注細胞の体内における時間的、場所的推移を IV-SCT 群と IBM-SCT 群で比較検討した。

### 【結果】

移植後の体重減少は IBM-SCT 群で IV-SCT 群に比べて少ない傾向にあり、また GVHD スコアが低かった。これらの結果は全身状態維持に有利に作用したと考えられ、IBM-SCT 群で生存率が高かった。また移植 6 週後の BAL 回収洗浄液中の総細胞数および T 細胞数は IBM-SCT 群において IV-SCT 群よりも有意に少なく ( $9.6 \pm 3.5$  vs.  $21.3 \pm 0.5 \times 10^4$ /ml;  $p < 0.05$ )、組織学的にも IBM-SCT 群において細胞浸潤、組織障害が軽度であった。BLI 分析では、移植後 1h では IV-SCT 群でほとんどの細胞が肺に取り込まれたが、IBM-SCT 群では輸注下肢にとどまり肺に取り込まれた細胞は有意に少なかった ( $3.1 \pm 0.7$  vs.  $16.7 \pm 1.1 \times 10^5$  photons/sec/animal;  $p < 0.01$ )。また移植後 2 日目の各種ケモカイン mRNA 発現は IV-SCT 群で高い傾向にあり、CCL2 では有意であった ( $0.098 \pm 0.020$  vs.  $0.020 \pm 0.003$  units/GAPDH mRNA;  $p < 0.05$ )。以上の 2 つの結果は syngeneic の系においても同様の結果が得られたため、移植早期の輸注細胞の肺へのとりこみは IV と IBM の移植手技の違いによることが示唆された。移植後 5 日目の BLI 分析では syngeneic の系において肺への取り込みは IV-SCT 群と IBM-SCT 群で差はなかったが ( $4.8 \pm 1.1$  vs.  $4.6 \pm 2.5 \times 10^7$  photons/sec/animal;  $p = 0.94$ )、allogeneic の系では移植後 2 日目より有意に IV-SCT で増加していた ( $50.9 \pm 6.6$  vs.  $16.0 \pm 6.2 \times 10^7$  photons/sec/animal;  $p < 0.05$ )。以上の結果より移植後 2 日目の各種ケモカイン mRNA 発現の増加は同種免疫反応を誘導していると考えられた。

### 【結論】

IPS マウスモデルによる IV-SCT と IBM-SCT での比較において、移植後経時的な肺局所のリンパ球の集積およびケモカイン発現レベルの差異が証明され、IPS は IV-SCT 群に比し IBM-SCT 群において軽度である可能性が示唆された。臨床的に IBM-SCT の有利な点により明らかにされることが期待される。