

201126032A

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

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森 島 泰 雄

平成 24 (2012) 年 3 月

# 目 次

## I. 総括研究報告

- 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 . . . . . 1  
研究代表者 森島 泰雄

## II. 分担研究報告 . . . . . 10

- 分担研究課題：非血縁ドナーからの造血細胞移植の国際間解析  
研究分担者 森島 泰雄
- 分担研究課題：非血縁移植のドナー・移植細胞源の選択に有用な HLA と非 HLA  
遺伝子の選択アルゴリズムの確立  
研究分担者 村田 誠
- 分担研究課題：造血幹細胞移植の治療成績に関わる遺伝的背景の解析  
研究分担者 小川 誠司
- 分担研究課題：移植免疫反応に関与する NK 細胞関連遺伝子とその多型の同定  
研究分担者 屋部 登志雄
- 分担研究課題：薬剤感受性遺伝子多型の移植後合併症に与える影響  
研究分担者 鬼塚 真仁
- 分担研究課題：ドナー選択アルゴリズムの構築—ハイリスクHLAアレル組合  
せの解析  
研究分担者 笹月 健彦
- 分担研究課題：移植免疫反応と遺伝子多型の解析  
研究分担者 高見 昭良
- 分担研究課題：HLA ハプロタイプの適合性と移植免疫反応  
研究分担者 森島 聡子
- 分担研究課題：HLA 適合度に基づく非血縁ドナー移植と臍帯血移植の比較  
研究分担者 熱田 由子

分担研究課題：NK 細胞反応に基づく同種移植成績の解析

研究分担者 田中 淳司

分担研究課題：ドナー選択に関与する HLA および HLA 以外の因子の影響

研究分担者 南谷 泰仁

分担研究課題：海外ドナーからの非血縁造血細胞移植の成績

研究分担者 一戸 辰夫

分担研究課題：HLA に基づく臍帯血移植データベースの基盤整備と関連解析

研究分担者 神前 昌敏

分担研究課題：HLA に基づく臍帯血移植データベースの基盤整備と関連解析

研究分担者 高梨 美乃子

分担研究課題：HLA に基づく血縁者間造血細胞移植データベースの基盤整備と関連解析

研究分担者 宮村 耕一

分担研究課題：アジア地域の同種移植データベース構築とその解析に関する研究

研究分担者 小寺 良尚

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . . 61

V. 研究成果の刊行物・別冊 . . . . . 63

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）  
（H23-免疫一般-010）  
総括研究報告書

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

研究代表者 森島泰雄 愛知県がんセンター研究所

研究分担者氏名・所属機関（職名）

森島泰雄 愛知県がんセンター研究所  
（研究員）  
村田誠 名古屋大学医学部附属病院  
血液内科学（講師）  
小川誠司 東京大学医学部附属病院  
（特任准教授）  
屋部登志雄 東京都赤十字血液センター  
（係長）  
鬼塚真仁 東海大学医学部血液内科（講師）  
笹月健彦 九州大学高等研究院  
（特任主幹教授）  
高見昭良 金沢大学附属病院輸血部  
（准教授）  
森島聡子 藤田保健衛生大学血液内科  
（講師）  
熱田由子 名古屋大学大学院（講師）  
田中淳司 北海道大学大学院（准教授）  
南谷泰仁 東京大学医学部附属病院  
（特任講師）  
一戸辰夫 佐賀大学医学部血液内科  
（准教授）  
神前昌敏 大阪府赤十字血液センター  
（北センター所長）  
高梨美乃子 東京都赤十字血液センター  
（部長）  
宮村耕一 名古屋第一赤十字病院（部長）

小寺良尚 愛知医科大学医学部（教授）

A 研究目的

日本骨髄バンク（JMDP）からの非血縁者間骨髄移植が12000例以上、日本さい帯血ネットワークからの移植が7000例以上実施されているが、長期生存例は約半数に留まり満足すべきものではない。成績を悪化させる主な要因は重症移植片対宿主病（GVHD）の発症、移植片の拒絶と移植後の再発であり、ドナー・臍帯血と患者との組織適合性抗原の違いがこれら移植免疫反応と生存に大きく関与することが、これまでの厚生労働科学研究班により次第に明らかになってきた。

本研究は、これら研究成果をさらに発展させ移植の現場に導入すべく、現在我が国の同種造血幹細胞移植が直面している3つの研究課題につき組織適合性を基盤にして取り組んでいる。

第1は、組織適合性に基づく骨髄移植、末梢血幹細胞移植ならびに臍帯血移植成績の解析による最適移植法の選択である。非血縁骨髄移植をコントロールとして、さい帯血移植とH22年度からJMDPで開始された末梢血幹細胞移植の臨床成績を共通のHLAデータに基づき比較検討し、どのようなHLA

適合度のどの移植法を選択することが患者にとり最適かを示す選択アルゴリズムを確立する。このためにはさい帯血移植・末梢血幹細胞移植のHLAが同定されたデータベース作りが不可欠である。

第2は、ドナー・移植細胞源選択に有用なHLAと非HLA遺伝子の同定とその移植選択アルゴリズムへの導入である。JMDPやさい帯血移植の検体を用いて、より精緻な細胞遺伝学的な手法（HLAとその分子解析、HLAハプロタイプ解析、HLA遺伝子以外の多型解析（Whole genome SNPs、マイクロサテライト、サイトカイン受容体）、NK細胞受容体）により移植免疫反応に影響を与えるHLAとHLA以外の組織適合性抗原とその多型を同定するとともに、これらの多型の中でどれが臨床成績に影響があるかの重み付け解析（統合解析）を共通の基盤で実施し、適切なドナー選択の個別化アルゴリズムを構築する。

第3は、非血縁者間移植の人種別比較成績に基づく国際間移植ドナーの効率的運用である。人種間で移植免疫反応の程度が大きく異なっていることが明らかになってきた。白人やアジアにおける人種間の違いを共通データベースにより解析することにより、海外バンクからの移植の位置付けと国際間移植の促進に資する。

わが国の組織適合性に関する研究は世界の非血縁移植のHLA研究を常にリードし、その解析結果はJMDPにおけるHLA検査法とドナー選択への適格で迅速な導入がなされてきた。非血縁さい帯血移植・末梢血幹細胞移植へと解析研究を発展させることにより、造血幹細胞移植全体のアルゴリズムを確立し、我が国における造血器腫瘍治療の効率

的・経済的な運用をはかることを目的としている。

## B 方法と結果

### 1. 統合解析による非血縁骨髓移植ドナー選択に有用なHLAと非HLA遺伝子の同定

HLAアレル(A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1)の適合度と現在までにJMDP等の解析結果や文献によりGVHD・生存に関与する可能性のあるHLAアレル以外の72SNPsを選択し、その多型解析をTagMan法にて実施している。本年度は第1次解析としてHLA-AからDPB1まで完全適合しT細胞非除去GVHD予防法を用いた白血病等の400ペアという均一なコホートを対象に解析した。患者、ドナー、患者とドナー不適合のいずれかで有意なSNPs多型を有する抗原を見出し、現在bootstrap法にてvalidation中である。

さらに、サイトカイン受容体多型、innate immunityに関与する多型、グランザイムB多型cytotoxic molecule、薬剤感受性遺伝子多型（CYP3A5, ACE）などの新規解析が進行中である。

### 2. HLAハプロタイプ解析

HLA領域の約5500のmulti-SNPの解析により、HLA-A~DQB1のハプロタイプ（HP）320種類を同定し、そのSNPsコンセンサスシーケンス（CS）を決定することができた。このCSを用いて患者と非血縁ドナー間でHLAハプロタイプが適合しているかどうかをHLA完全適合非血縁移植800症例を対象にして解析中であり、日本人間の移植ではハプロタイプ適合の可能性が高いことが推測され、日本人間移植ではGVHDが白人間移植に比べ低率である一因と考えられる。

### 3. NK細胞レセプター解析

KIR2DLのリガンドがドナーと患者で不適合であると高率に重症GVHDが生じ予後を悪くすることが今までのJMDP解析で明らかになっていた。国際組織適合性ワークショップ (IHWG)のデータベースにおける6400ペアーを解析し、日本人間の移植ではKIR2DLリガンドの不適合が重症GVHDを生じさせるのに対し、白人間移植ではGVHDを生じさせないことが明らかになり、人種による遺伝的背景の解析重要性が明らかになった。さらに、16種類同定されたKIR2DL遺伝子に基づくKIR2DL領域のハプロタイプ (HP) をJMDP200症例で解析し、白人の報告と比較すると、両者ではHPの頻度が異なり、このことが急性GVHDと生存への影響の違いの一因であることが明らかになった。

#### 4. さい帯血移植におけるHLA・組織適合性抗原の関与

この解析には患者と移植さい帯血の検体 (DNA) を用いることが不可欠である。本年度全国各地のさい帯血バンクとの共同研究体制を確立し、オールジャパン体制で1000例以上のペアーの検体収集が収集され、組織適合性解析プロジェクトとしてHLAアリル適合性とNK細胞レセプターの移植免疫反応への関与の解析が進行中である。

#### 5. 非血縁者間移植とさい帯血移植成績の組織適合性に基づく比較解析

成人白血病症例を対象に HLA-0～2 座不適合さい帯血移植 351 症例と非血縁者間骨髄移植 1028 症例の後方視的比較解析の結果、さい帯血移植は HLA-DRB1 不適合骨髄移植に比べ、死亡リスクは 0.85 と変わりなく、好中球の回復は遅れるが急性 GVHD は低率であり、この HLA 適合度の両移植は補完しうるということが明らかになった。

#### 6. 国際的移植データベースによる人種の遺伝的背景が移植免疫反応と移植成績に及ぼす影響

IHWG のデータベース 4400 症例の解析で HLA 適合非血縁者間造血幹細胞移植において急性 GVHD の頻度は日本人間移植は白人間移植に比べ有意に低く、移植後の生存率が有意に良好であり、さらにスタンダードリスク白血病の移植後の再発が低率であることが明らかになった。アジア諸国においてこのような違いがあるかは明らかでなく、アジア太平洋造血移植学会において HLA ワーキンググループを組織し、東アジア 6 カ国が中心になり検討が開始されている。

#### 7. HLA 不適合移植における生体内反応の免疫学的機序の解析

統計学的に見出された HLA 不適合移植免疫反応の機序の解明や GVHD 抑制法、移植片対白血病反応の増強法の開発につなげることを目的した。HLA1 座不適合移植後症例の CTL を用いて in vivo 解析し、HLA 特異的 CTL の選択圧により白血病エスケープが生じ、移植後の白血病再発への関与が明らかになった。

#### 8. 分担課題研究

上記 1 - 8 以外に課題研究が分担研究者の専門性を生かして進行中である (分担研究報告参照)

(倫理面への配慮：本研究は疫学研究に関する倫理指針ならびにヒト・ゲノム倫理指針に基づいて実施されている)

#### C 考察

造血移植免疫反応に関与する HLA 以外の遺伝子多型は数多く見い出されているが、その位置付けが明らかでなかった。HLA 完全適合した同一のデータ試料ベースに基

づく統合解析(重みづけ解析)結果により、臨床に応用すべき遺伝子多型の順位が明らかになる。さい帯血移植と非血縁骨髄移植成績の比較が移植選択のアルゴリズム構築のためには不可欠であるが、HLA-A、B血清型とDRB1が同定されたさい帯血とHLAアレルが同定された非血縁移植のバンク症例を用いた後方視解析の結果が明らかになった。今年度から構築されたさい帯血移植の試料データベースを用いて、今後HLAアレルや非HLA遺伝子多型、NK細胞レセプターの解析とHLAハプロタイプ解析を実施し、より精緻は両移植成績の組織適合性に基づく比較を予定している。人種による移植免疫反応とくに急性GVHDの発症率や移植片対白血病反応による白血病再発率の違いは人種による遺伝的素因(HLAハプロタイプや非HLA組織適合性抗原、KIR遺伝子など)の違いが背景にあり、国際間移植ドナーの効率的運用や移植免疫反応の解明に寄与する。

#### D. 結論

非血縁者間造血細胞移植症例とさい帯血移植症例の良く整備されたデータと試料を蓄積し、精緻な遺伝学的な手法を用いHLAと非HLA遺伝子を解析することにより、組織適合性にもとづく移植法選択のアルゴリズムを構築することが可能になってきた。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Atsuta Y, Morishima Y, Suzuki R, Nagamura-Inoue T, Taniguchi S, Takahashi S, Kai S, Sakamaki H, Kouzai Y, Kobayashi N, Fukuda T, Azuma H, Takanashi M, Mori T, Tsuchida M, Kawase T, Kawa K, Kodera Y, Kato S; for the Japan Marrow Donor Program and the Japan Cord Blood Bank Network. Comparison of Unrelated Cord Blood Transplantation and HLA-Mismatched Unrelated Bone Marrow Transplantation for Adults with Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011 Oct 18. [Epub ahead of print]
- 2) Kanda J, Hishizawa M, Utsunomiya A, Taniguchi S, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Masuda M, Nagafuji K, Hara M, Takanashi M, Kai S, Atsuta Y, Suzuki R, Kawase T, Matsuo K, Nagamura-Inoue T, Kato S, Sakamaki H, Morishima Y, Okamura J, Ichinohe T, Uchiyama T. Impact of graft-versus-host disease on outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia: a retrospective cohort study. *Blood*. 2012 Jan 10. [Epub ahead of print]
- 3) Kanda J, Saji H, Fukuda T, Kobayashi T, Miyamura K, Eto T, Kurokawa M, Kanamori H, Mori T, Hidaka M, Iwato K, Yoshida T, Sakamaki H, Tanaka J, Kawa K, Morishima Y, Suzuki R, Atsuta Y, Kanda Y. Related transplantation with HLA 1-antigen mismatch in the graft-versus-host direction and HLA 8/8-allele-matched unrelated

- transplantation: a nationwide retrospective study. *Blood*. 2011 Oct 31. [Epub ahead of print]
- 4) Shigematsu A, Tanaka J, Suzuki R, Atsuta Y, Kawase T, Ito YM, Yamashita T, Fukuda T, Kumano K, Iwato K, Yoshiba F, Kanamori H, Kobayashi N, Fukuhara T, Morishima Y, Imamura M. Outcome of medium-dose VP-16/CY/TBI superior to CY/TBI as a conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol*. 2011 Nov;94(5):463-71.
- 5) Espinoza JL, Takami A, Nakata K, Onizuka M, Kawase T, Akiyama H, Miyamura K, Morishima Y, Fukuda T, Kodera Y, Nakao S; Japan Marrow Donor Program. A genetic variant in the IL-17 promoter is functionally associated with acute graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation. *PLoS One*. 2011;6(10):e26229. Epub 2011 Oct 20.
- 6) 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; Japan Marrow Donor Program. Frequent loss of HLA alleles associated with copy number-neutral 6pLOH in acquired aplastic anemia. *Blood*. 2011 Dec 15;118(25):6601-9.
- 7) Espinoza LJ, Takami A, Nakata K, Yamada K, Onizuka M, Kawase T, Sao H, Akiyama H, Miyamura K, Okamoto S, Inoue M, Fukuda T, Morishima Y, Kodera Y, Nakao S; Japan Marrow Donor Program. Genetic variants of human granzyme B predict transplant outcomes after HLA matched unrelated bone marrow transplantation for myeloid malignancies. *PLoS One*. 2011; 6(8):e23827.
- 8) Yagasaki H, Kojima S, Yabe H, Kato K, Kigasawa H, Sakamaki H, Tsuchida M, Kato S, Kawase T, Morishima Y, Kodera Y; Japan Marrow Donor Program. Acceptable HLA-mismatching in unrelated donor bone marrow transplantation for patients with acquired severe aplastic anemia. *Blood*. 2011 Sep 15;118(11):3186-90.
- 9) Tanabe T, Yamaguchi N, Matsuda K, Yamazaki K, Takahashi S, Tojo A, Onizuka M, Eishi Y, Akiyama H, Ishikawa J, Mori T, Hara M, Koike K, Kawa K, Kawase T, Morishima Y, Amano H, Kobayashi-Miura M, Kakamu T, Nakamura Y, Asano S, Fujita Y. Association analysis of the NOD2 gene with susceptibility to graft-versus-host disease in a Japanese population. *Int J Hematol*. 2011 Jun;93(6):771-8.
- 10) Askar M, Sobecks R, Morishima Y, Kawase T, Nowacki A, Makishima H, Maciejewski J. Predictions in the face of clinical reality: HistoCheck versus high-risk HLA allele mismatch combinations responsible for severe acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011 Sep;

17(9):1409-15.

11) Espinoza JL, Takami A, Onizuka M, Kawase T, Sao H, Akiyama H, Miyamura K, Okamoto S, Inoue M, Ohtake S, Fukuda T, Morishima Y, Kodera Y, Nakao S; Japan Marrow Donor Program. 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 Nov;46(11):1455-63.

12) Inamoto Y, Miyamura K, Okamoto S, Akiyama H, Iida H, Eto T, Morishima Y, Kawa K, Kikuchi A, Nagatoshi Y, Tanaka J, Ashida T, Hirokawa M, Tsuchida M, Mori S. Disease stage stratified effects of cell dose in unrelated BMT for hematological malignancies: a report from Japan Marrow Donor Program. *Bone Marrow Transplant.* 2011 Sep;46(9):1192-202.

13) Waki F, Murata M, et al. Feasibility of reduced-intensity cord blood transplantation as salvage therapy for graft failure: results of a nationwide survey of 80 adult patients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011; 17(6): 841-851.

14) Terakura S, 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; 22(8):

1865-1871.

15) Katsumi A, Murata M, et al. Virus-associated hemophagocytic syndrome caused by pandemic swine-origin influenza A (H1N1) in a patient after unrelated bone marrow transplantation. *J Clin Exp Hematop.* 2011; 51(1): 63-65.

16) Hirayasu K, Ohashi J, Kashiwase K, Hananantachai H, Naka I, Ogawa A, Takanashi M, Satake M, Nakajima K, Parham P, Arase H, Tokunaga K, Patarapotikul J, Yabe T. Significant association of KIR2DL3-HLA-C1 combination with cerebral malaria and implications for co-evolution of KIR and HLA. *PLoS Pathogens*, 2012 in press

17) Yahata T, Takanashi T, Muguruma Y, Ibrahim, Abd Aziz, Matsuzawa H, Uno T, Sheng Y, Onizuka M, Ito M, Kato S, Ando K : Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. *Blood* 118: 2941-2950. 2011.

18) Miyoshi-Akiyama T, Ishida I, Fukushi M, Yamaguchi K, Matsuoka Y, Ishihara T, Tsukahara M, Hatakeyama S, Itoh N, Morisawa A, Yoshinaka Y, Yamamoto N, Lianfeng Z, Chuan Q, Kirikae T, Sasazuki T. Fully human monoclonal antibody directed to proteolytic cleavage site in severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus S protein neutralizes the virus in a rhesus macaque SARS model.

- J Infect Dis.* 203; 1574-1581, 2011
2. 19) Nakabayashi K, Tajima A, Yamamoto K, Takahashi A, Hata K, Takashima Y, Koyanagi M, Nakaoka H, Akamizu T, Ishikawa N, Kubota S, Maeda S, Tsunoda T, Kubo M, Kamatani N, Nakamura Y, Sasazuki T, Shirasawa S. Identification of independent risk loci for Graves' disease within the MHC in the Japanese population. *J Hum Genet* 56; 772-778, 2011
- 20) Takami A, Espinoza JL, Onizuka M, 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* 46:238-43, 2011
- 21) Morio T, Atsuta Y, Tomizawa D, Nagamura-Inoue T, Kato K, Ariga T, Kawa K, Koike K, Tauchi H, Kajiwara M, Hara T, Kato S; Japanese Cord Blood Bank Network. Outcome of unrelated umbilical cord blood transplantation in 88 patients with primary immunodeficiency in Japan. *Br J Haematol.* 2011;154:363-72
- 22) Tanaka J, Sugita J, Shiratori S, Shigematsu A, Asanuma S, Fujimoto K, Nishio M, Kondo T, Imamura M. Expansion of NK cells from cord blood with antileukemic activity using GMP-compliant substances without feeder cells. *Leukemia* (in press)
- 23) Koya J, Nannya Y, Ichikawa M, Kurokawa M. The clinical role of Procalcitonin in hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2012 Feb 20. in press
- 24) Goyama S, Takeuchi K, Kanda Y, Nannya Y, Chiba S, Fukayama M, Kurokawa M. Post-transplant endothelial disorder after hematopoietic SCT: a blinded autopsy study. *Bone Marrow Transplant.* 2011 Dec 19. in press
- 25) Kagoya Y, Takahashi T, Nannya Y, Shinozaki A, Ota S, Fukayama M, Kurokawa M. Hyperbilirubinemia after hematopoietic stem cell transplantation: comparison of clinical and pathologic findings in 41 autopsied cases. *Clin Transplant.* 2011 Sep-Oct;25(5) 552-7
- 26) Nannya Y, Kataoka K, Hangaishi A, Imai Y, Takahashi T, Kurokawa M. The negative impact of female donor/male recipient combination in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation depends on disease risk. *Transpl Int.* 2011;24(5):469-76.
- 27) Sato T, Ichinohe T, Kanda J, Yamashita K, Kondo T, Ishikawa T, Uchiyama T, Takaori-Kondo A. Clinical significance of subcategory and severity of chronic graft-versus-host disease evaluated by National Institutes of Health consensus criteria. *Int J Hematol.* 2011;93:532-541.

- 28) Takanashi M, Tanaka H, Kohsaki M, Nakajima K, Tadokoro K, Nakabayashi M. A suggested total size for the cord blood banks of Japan. *Bone Marrow Transplant*. 2011;46:1024-5.
- 29) Kato K, Yoshimi A, Ito E, Oki K, Hara J, Nagtoshi Y, Kikuchi A, Kobayashi R, Nagamura-Inoue T, Kai S, Azuma H, Takanashi M, Isoyama K, Kato S, Japan Cord Blood Bank Network. Cord blood transplantation from unrelated donors for children with acute lymphoblastic leukemia in Japan: the impact of methotrexate on clinical outcomes. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 2011;17:1814-21
- 30) Tada N, Hinotsu S, Urushihara H, Kita F, Kai S, Takahashi TA, Kato S, Takanashi M, Ito K, Sawai H, Maekawa T, Kosugi S, and Kawakami K. The current status of umbilical cord blood collection in Japanese medical centers: survey of obstetricians. *Transfusion and Apheresis Science*, 2011;44:263-8.
- 31) Roskopf K, Ragg SJ, Worel N, Grommé M, Preijers FW, Braakman E, Schuurhuis GJ, van Riet I, Wendel S, Fontão-Wendel R, Lazar A, Goldman M, Halpenny M, Giulivi A, Letcher B, McGann L, Korhonen M, Arvola A, Humpe A, Buwitt-Beckmann U, Wiesneth M, Schauwecker P, Schrenzenmeier H, Bönig H, Henschler R, Seifried E, Accorsi P, Bonfini T, Takanashi M, van Beckhoven JM, Brand A, Gounder D, Wong A, Doocey R, Forrest E, Galea G, Smythe J, Pawson R, Reems JA, Oh J, Reesink HW, Panzer S. Quality controls of cryopreserved haematopoietic progenitor cells (peripheral blood, cord blood, bone marrow). *Vox Sanguinis* 2011; 101(3):255-75.
- 32) Matsumura T, Kami M, Yamaguchi T, Yuji K, Kusumi E, Taniguchi S, Takahashi S, Okada M, Sakamaki H, Azuma H, Takanashi M, Kodo H, Kai S, Inoue-Nagamura T, Kao K, Kato S. Allogeneic cord blood transplantation for adult acute lymphoblastic leukemia: retrospective survey involving 256 patients in Japan. *Leukemia* 2012, in press
- 33) Hirose T, Torikai H, Yanagisawa M, Kamei M, Imahashi N, Demachi-Okamura A, Tanimoto M, Shiraishi K, Ito M, Miyamura K, Shibata K, Kikkawa F, Morishima Y, Takahashi T, Emi N, Kuzushima K, Akatsuka Y. Mismatched human leukocyte antigen class II-restricted CD8 cytotoxic T cells may mediate selective graft-versus-leukemia effects following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Cancer Sci* 2011; 102(7): 1281-6.
- 34) Imahashi N, Inamoto Y, Ito M, Koyama D, Goto T, Onodera K, Seto A, Watanabe K, Imahashi M, Nishiwaki S, Tsukamoto S, Yasuda T, Ozawa Y, Miyamura K. Clinical significance of

hemophagocytosis in BM clot sections during the peri-engraftment period following allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2011.

35) Kroger N, Miyamura K, Bishop MR. Minimal residual disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17(1 Suppl): S94-100.

36) Terakura S, Atsuta Y, Sawa M, Ohashi H, Kato T, Nishiwaki S, Imahashi N, Yasuda T, Murata M,

Miyamura K, Suzuki R, Naoe T, Ito T, Morishita Y. 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; 22(8): 1865-71.

H. 知的財産権の取得状況  
なし

非血縁ドナーからの造血細胞移植の国際間解析

研究分担者 森島泰雄 愛知県がんセンター研究所

研究要旨：世界各国からの非血縁者間造血幹細胞移植の移植免疫反応、とくに急性 GVHD の頻度は異なり、わが国での頻度は欧米の頻度に比べ低率であるとの報告が多い。国際組織適合性ワークショップにおける解析を継続しているが、今回、更新が行われたデータベースに基づき再解析を実施し、1) 移植後の白血病の再発頻度は、再発スタンダードリスク群において日本人間の移植に比べ白人間の移植が有意に高いこと、2) 日本人間移植と白人間移植の両移植とも、急性 GVHD の頻度と白血病の再発率には有意な相関が認められないことが明らかになった。移植片対白血病効果とその機序を解析する上で有用な知見を得ることができた。

A. 研究目的

非血縁者間造血細胞移植において人種別の移植免疫反応の違いを国際間の同一データベースを用いて解析することを目的にした。比較検討のためには HLA 適合で、同一 GVHD 予防法を用いることが不可欠である、本解析では急性白血病における移植片対白血病効果（graft-versus-leukemia effect）を中心に比較検討した。

B. 研究方法

1) 国際組織適合性ワークショップ (IHWG) の造血細胞移植で 2011 年に更新されたデータベースから次の症例を選択した。(1) HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 適合ドナー、(2) 白血病症例(急性骨髄性白血病 (AML)、急性リンパ性白血病 (ALL) ならびに慢性骨髄性白血病 (CML) 4335 患者 (3)GVHD

予防法として T 細胞非除去で ATG 非使用の症例。

2) GVHD 頻度と白血病再発は cumulative incidence 法を用いた。

(倫理面への配慮：本研究は疫学研究に関する倫理指針ならびにヒト・ゲノム倫理指針に基づいて実施されている)

C. 研究結果

日本人ペアーは白人 (Caucasian) ペアーに比べ有意に急性 GVHD の頻度が低かった (日本人ペアー 40.0% of grade 2-4 と 15.3% of grade 3-4 vs. Caucasian ペアー (56.5% of grade 2-4 と 22.6% of grade 3-4) ( $p < 0.001$ ) が、日本人以外のアジア人ペアーの急性 GVHD の頻度は 42.1% of grade 2-4 と 15.7% of grade 3-4 と日本人ペアー

と同じであった。白血病スタンダードリスク群（CML 第一慢性期、ALL と AML の第 1, 2 寛解期移植）において日本人ペアの白血病再発率は白人ペアに比し有意に低かった（表 1）。

急性 GVHD 重症度別の移植後 5 年の再発率を日本人ペアと白人ペアに分けて解析したが、急性 GVHD と白血病再発には関連がなかった（添付表 2）。

#### D. 考察

HLA-A から DPB1 までの HLA 遺伝子型がすべて同定された HLA データと臨床データを含んだ多数ペアの共通 IHWG データベースを解析することにより移植免疫反応を人種別に解析することが可能であるになった。急性 GVHD 発症率の日本人と白人の違いは、HLA 適合血縁者骨髄移植の成績からも推測できたものである。移植後の白血病再発率の違いはスタンダードリスク患者にいて日本人間と白人間に有意差が認められたが、ハイリスク白血病では有意でなかった。また、従来から GVHD 発症症例ほど GVL 効果がある言われているが、今回の解析では GVHD の発症度との関連はなかった。このことは非血縁者間移植における GVL 効果の発症機序が GVHD の発症機序と異なっている可能性を示しており、今後の研究課題である、

#### E. 結論

日本人間の非血縁ドナーからの移植の急性 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り、その詳細な遺伝免疫学的比較解析の基盤となった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Atsuta Y, Morishima Y, Suzuki R, Nagamura-Inoue T, Taniguchi S, Takahashi S, Kai S, Sakamaki H, Kouzai Y, Kobayashi N, Fukuda T, Azuma H, Takanashi M, Mori T, Tsuchida M, Kawase T, Kawa K, Koderu Y, Kato S; for the Japan Marrow Donor Program and the Japan Cord Blood Bank Network. Comparison of Unrelated Cord Blood Transplantation and HLA -Mismatched Unrelated Bone Marrow Transplantation for Adults with Leukemia. Biol Blood Marrow Transplant. 2011 Oct 18. [Epub ahead of print]
- 2) Kanda J, Hishizawa M, Utsunomiya A, Taniguchi S, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Masuda M, Nagafuji K, Hara M, Takanashi M, Kai S, Atsuta Y, Suzuki R, Kawase T, Matsuo K, Nagamura-Inoue T, Kato S, Sakamaki H, Morishima Y, Okamura J, Ichinohe T, Uchiyama T. Impact of graft-versus-host disease on outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia: a retrospective cohort study. Blood. 2012 Jan 10. [Epub ahead of print]

- 3) Kanda J, Saji H, Fukuda T, Kobayashi T, Miyamura K, Eto T, Kurokawa M, Kanamori H, Mori T, Hidaka M, Iwato K, Yoshida T, Sakamaki H, Tanaka J, Kawa K, Morishima Y, Suzuki R, Atsuta Y, Kanda Y. Related transplantation with HLA 1-antigen mismatch in the graft-versus-host direction and HLA 8/8-allele-matched unrelated transplantation: a nationwide retrospective study. *Blood*. 2011 Oct 31. [Epub ahead of print]
- 4) Shigematsu A, Tanaka J, Suzuki R, Atsuta Y, Kawase T, Ito YM, Yamashita T, Fukuda T, Kumano K, Iwato K, Yoshida F, Kanamori H, Kobayashi N, Fukuhara T, Morishima Y, Imamura M. Outcome of medium-dose VP-16/CY/TBI superior to CY/TBI as a conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol*. 2011 Nov;94(5):463-71. Epub 2011 Nov 1.
- 5) Espinoza JL, Takami A, Nakata K, Onizuka M, Kawase T, Akiyama H, Miyamura K, Morishima Y, Fukuda T, Kodera Y, Nakao S; Japan Marrow Donor Program. A genetic variant in the IL-17 promoter is functionally associated with acute graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation. *PLoS One*. 2011;6(10):e26229. Epub 2011 Oct 20.
- 6) 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; Japan Marrow Donor Program. Frequent loss of HLA alleles associated with copy number-neutral 6pLOH in acquired aplastic anemia. *Blood*. 2011 Dec 15;118(25):6601-9.
- 7) Espinoza LJ, Takami A, Nakata K, Yamada K, Onizuka M, Kawase T, Sao H, Akiyama H, Miyamura K, Okamoto S, Inoue M, Fukuda T, Morishima Y, Kodera Y, Nakao S; Japan Marrow Donor Program. Genetic variants of human granzyme B predict transplant outcomes after HLA matched unrelated bone marrow transplantation for myeloid malignancies. *PLoS One*. 2011; 6(8):e23827.
- 8) Yagasaki H, Kojima S, Yabe H, Kato K, Kigasawa H, Sakamaki H, Tsuchida M, Kato S, Kawase T, Morishima Y, Kodera Y; Japan Marrow Donor Program. Acceptable HLA-mismatching in unrelated donor bone marrow transplantation for patients with acquired severe aplastic anemia. *Blood*. 2011 Sep 15;118(11):3186-90.
- 9) Tanabe T, Yamaguchi N, Matsuda K, Yamazaki K, Takahashi S, Tojo A, Onizuka M, Eishi Y, Akiyama H, Ishikawa J, Mori T, Hara M, Koike K, Kawa K, Kawase T, Morishima Y, Amano H, Kobayashi-Miura M, Kakamu T, Nakamura Y, Asano S, Fujita Y. Association analysis of the NOD2 gene with susceptibility to graft-versus-host disease in a Japanese population. *Int J*

Hematol. 2011 Jun;93(6):771-8.

10) Askar M, Sobecks R, Morishima Y, Kawase T, Nowacki A, Makishima H, Maciejewski J. Predictions in the face of clinical reality: HistoCheck versus high-risk HLA allele mismatch combinations responsible for severe acute graft-versus-host disease. Biol Blood Marrow Transplant. 2011 Sep;17(9):1409-15.

11) Espinoza JL, Takami A, Onizuka M, Kawase T, Sao H, Akiyama H, Miyamura K, Okamoto S, Inoue M, Ohtake S, Fukuda T, Morishima Y, Koderu Y, Nakao S; Japan Marrow Donor Program. 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 Nov;46(11):1455-63.

12) Inamoto Y, Miyamura K, Okamoto S, Akiyama H, Iida H, Eto T, Morishima Y, Kawa K, Kikuchi A, Nagatoshi Y, Tanaka J, Ashida T, Hirokawa M, Tsuchida M, Mori S. Disease stage stratified effects of cell dose in unrelated BMT for hematological malignancies: a report from Japan Marrow Donor Program. Bone Marrow Transplant. 2011 Sep;46(9):1192-202.

## 2. 学会発表

1) Yasuo Morishima. 2<sup>nd</sup> Chinese Blood and Marrow Transplantation Forum. Sep. 2<sup>nd</sup> 2012 Guilin, China

H. 知的財産権の取得状況  
なし

表 1 疾患病期別日本人間ペアと白人間ペアの白血病 5 年再発率。

	n	ALL	n	AML	n	CML
Early status **						
Japanese pair	469	23.9*	501	20.9	269	7.3
		p=0.004		p<0.001		p=0.023
Caucasian pair	300	30.5	437	30.7	478	10.7
Advanced status ***						
Japanese pair	124	54.5	169	43.7	123	24.3
		p=0.429		p=0.147		p=0.298
Caucasian pair	116	51.0	252	48.4	187	25.8
* Cumulative incidence (%) of leukemia relapse at 5 years after transplantation.						
** 1st and 2nd CR of ALL or AML at transplantation, 1st chronic phase of CML at transplantation						
*** more advanced status than early status.						
ALL:acute lymphoblastic leukemia, AML:acute myeloblastic leukemia, CML:chronic myelocytic leukemia.						

表 2 急性 GVHD 重症度と日本人間ペアと白人間ペアの白血病 5 年再発率

acute GVHD	Japanese pairs		Caucasian pairs	
	n	5-yr relapse rate (%)	n	5-yr relapse rate (%)
grade 0 - II	290	26.6	376	34.4
		p=0.853		p=0.619
grade III - IV	38	29.8	74	26.6
grade 0 - I	218	28.3	205	35.9
		p=0.285		p=0.164
grade II - IV	110	23.9	245	30.5

## 非血縁移植のドナー・移植細胞源の選択に有用な HLA と非 HLA 遺伝子の選択 アルゴリズムの確立

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

我々はこれまでに、GVH 方向に HLA 1 座不適合の母から骨髄移植を受け、移植後に T-LBL/L が再発した患者の検体を解析し、再発白血病細胞における HLA-B51 の発現量低下と、その B51 分子特異的に細胞傷害活性を示す T リンパ球の性質について報告してきた。本年度、この患者から分離した HLA 分子特異的細胞傷害性 T リンパ球クローンの性格付けを進め、この患者の移植後臨床経過における意義について解析を行ったので、その結果を報告する。移植後に難治性の GVHD が持続しながら同時に白血病再発を来すメカニズムを説明しうるものとして重要な知見だと考えている。

### 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 24 歳、男性。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移植後約 9 ヶ月に再発した。この患者から、文書による説明と同意を得て、移植前後の白血病細胞および末梢血単核球等の提供をうけた。

フローサイトメリー解析、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  $\gamma$  産生刺激試験)、TCR クローニング、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入、IFN  $\gamma$  -ELISPOT 等を行った。

### 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-B51 の発現量が低下していた。B51 cDNA の塩基配列に変異は確認できず、またその promoter region の高メチル化も確認できなかった。急性 GVHD を発症中の移植後患者血液から、6 個の独立した T リンパ球クローンを分離することに成功した。それらは全て CD3/CD8 陽性だった。また全てのクローンはこの不適合 HLA-B51 分子を標的とする細胞傷害活性を示した。B51 のペプチド結合アンカーを形成するアミノ酸置換変異体を作成し、COS 細胞に遺伝子導入して T リンパ球クローンを刺激する実験により、6 個の T リンパ球クローンは B51 に結合しているペプチド依存性に B51 分子を認識することを確認した。さらに、T リンパ球クローンは純化した移植前保存 T-LBL/L 細胞を傷害したが、移植後再発 T-LBL/L 細胞は全く傷害しなかった。加えて、移植後約 8 ヶ月後(再発 1 ヶ月前)の末梢血中にも、B51 反応性 T リンパ球は存在していた。

#### D. 考察

この患者の移植後白血病再発メカニズムについては、白血病抗原以外のペプチドを認識する B\*51:01 特異的 T リンパ球応答が GVHD を誘導し、さらにその応答は移植 8 ヶ月後まで持続したが、その間に B51 陰性分画の白血病細胞が T リンパ球応答による免疫学的圧力からエスケープし、やがて白血病の臨床的再発に至った、と考察できる(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の少なくとも一部

を説明す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. Waki F, Murata M, et al. Feasibility of reduced-intensity cord blood transplantation as salvage therapy for graft failure: results of a nationwide survey of 80 adult patients. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2011; 17(6): 841-851.
2. Terakura S, 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; 22(8): 1865-1871.
3. Katsumi A, Murata M, et al. Virus-associated hemophagocytic syndrome caused by pandemic swine-origin influenza A (H1N1) in a patient after unrelated bone marrow transplantation. *J Clin Exp Hematop*. 2011; 51(1): 63-65.

4. Nishiwaki S, Murata M, et al. Dexamethasone palmitate successfully attenuates hemophagocytic syndrome after allogeneic stem cell transplantation: macrophage-targeted steroid therapy. *Int J Hematol*. 2012 Feb 15. [Epub ahead of print]

学会発表

1. Kato T, Murata M, et al. Exhaustion of cytomegalovirus specific T cells after allogeneic stem cell transplantation. 第73回日本血液学会総会 2011年10月 於：名古屋.

2. Kato T, Murata M, et al. Leukemia Escape From HLA-Specific T Lymphocyte Pressure in a Recipient of HLA One Locus-Mismatched Bone Marrow Transplantation. The 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, in San Diego, California. December 2011.

3. Oshima K, Murata M, et al. The effect of sex mismatch on outcome in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. 2012 BMT Tandem Meetings, in San Diego, California. February 2012.

4. 村田 誠、他. Grade II以上の急性 GVHD の対する治療成績：TRUMP データを用いた解析. 第34回日本造血細胞移植学会総会 2012年2月 於：大阪.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。