

201229022A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業

(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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森島 泰雄

平成 25 年 (2013) 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
研究代表者 森島泰雄 ----- 1

II. 分担研究報告

1. 非血縁者間骨髄移植における HLA-DPB1 適合度の慢性 GVHD・GVL 効果への影響
森島泰雄 ----- 8
2. 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
村田誠 ----- 15
3. 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
屋部登志雄 ----- 17
4. 薬剤感受性遺伝子多型の移植後合併症に与える影響
鬼塚真仁 ----- 20
5. 移植免疫反応と遺伝子多型の解析
高見昭良 ----- 22
6. 非血縁者間骨髄移植における HLA ハプロタイプ適合性の意義
森島聡子 小川誠司 笹月健彦 ----- 27
7. 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
熱田由子 ----- 30
8. KIR リガンド不適合が移植成績に及ぼす影響の検討
田中淳司 ----- 33
9. 移植後免疫抑制剤としての calcineurin 阻害剤の選択と移植成績
南谷泰仁 ----- 36
10. 海外ドナーからの造血幹細胞移植の成績
一戸辰夫 ----- 39
11. 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
高梨美乃子 松本加代子 ----- 45
12. 急性白血病における HLA 適合非血縁者間骨髄移植の位置付けに関する研究
宮村耕一 ----- 49

1 3. アジア地域の同種移植データベース構築とその解析 飯田美奈子	----- 56
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 59
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 60

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業
(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)
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 研究員

研究要旨 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。

研究分担者

森島泰雄 愛知県がんセンター研究所 研究員
村田 誠 名古屋大学医学部血液内科 講師
小川誠司 東京大学附属病院 特任准教授
屋部登志雄 日本赤十字社関東甲信越ブロック
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 特別主幹教授
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 名古屋大学大学院医学系研究科造血細胞
移植情報管理・生物統計学 講師
田中淳司 北海道大学大学院 准教授
南谷泰仁 東京大学附属病院 特任講師
一戸辰夫 広島大学原爆放射線医科学研究所
血液・腫瘍内科研究分野 教授
松本加代子 日本赤十字社近畿ブロック血液センター
課長
高梨美乃子 日本赤十字社関東甲信越ブロック
血液センター 部長
宮村耕一 名古屋第一赤十字病院 部長
飯田美奈子 愛知医科大学医学部 助教

骨髄移植が14000例以上、日本さい帯血ネットワークからの移植が9000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の課題は、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

A. 研究目的

日本骨髄バンク(JMDP)からの非血縁者間

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ことである。

第2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を示す選択アルゴリズムを確立することである。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。

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 C. 結果

1. 非血縁者間骨髄移植におけるHLA-DPB1適合度の急性GVHD、慢性GVHDと移植後白血病再発に対する影響

JMDP症例の中でHLA-A, B, C, DRB1, DQB1遺伝型が完全適合の白血病症例が1681症例得られ、より正確度の高い解析が可能であった。

結果として、以前の日本骨髄バンクを介した症例解析で得られた結果であるHLA-DPB1不適合により急性GVHDの発症率が高くなることが確認できた。また、HLA-Cの不適合とHLA-DPB1の不適合で白血病の再発は低くなる移植片対白血病効果（GVL effect）も確認できた。新知見として、HLA-DPB1不適合は慢性GVHDのリスクファクタではないこと、およびHLA-DPB1不適合は強いGVL効果を生じ、慢性GVHDを発症したことによるGVL効果は限定的（進行型に限る）であった。

2. Multi-SNPsによるHLAハプロタイプ適合度とそのリスク解析

HLA領域のmulti-SNPの解析により、HLA-A～DQB1のハプロタイプ（HP）520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した結果、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、さらにHLAアレル適合症例ではハプロタイプ不適合症例の急性GVHDのリスクは適合症例と有意差が認められず、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た。

3. 非血縁骨髄移植の移植免疫反応に関する非HLA遺伝子の解析

1) 40歳までのALL, AML症例を対象にマイクロサテライト多型を用いてDiscovery cohort 460ペア、Confirmatory cohort 462ペアを解析した。Discovery cohortではGVHD grade 0-I群とII-IV群に分類し、それぞれ一定量のDNAを混注しプールDNAを作成し、それぞれのプールDNAに対して2855の遺伝子を網羅することが可能な4321のマイクロサ

テライトマーカを用いて、GVHD 関連遺伝子を2つの cohort で確認される遺伝子を抽出することができた。

2) 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 アリル以外の 72SNPs を選択し、その多型解析を TagMan 法にて実施している。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 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 多型有する 26 抗原を見出し、現在 HLA-DPB1 不適合 800 ペア用いて validation 中である。

3) 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 SNP の解析が進行中である。患者が NLRP3 遺伝子 GG 型の場合、CC 型または CG 型に比べ、5 年生存率は有意に不良であった (34% vs. 50%, $P=0.006$)。一方、ドナー NLRP3 遺伝子型は移植後転帰に有意な影響を及ぼさないなど新規知見が得られた。さらに、CD53 intron rs6679497 は機能的 SNP で、CD53 転写量を通じ TNF α 誘導能を調整し、同種造血幹細胞移植予後に影響していると考えられた。

3. さい帯血移植における HLA・組織適合性抗原の関与

1) さい帯血移植における HLA 一致度が移植成績に与える影響に関する検討を行った。16 歳未満の小児患者においては、HLA 一致度を上げることで重度の GVHD の発症および移植関連死亡を減らし生存成績を向上させることが示されたが、成人患者においては HLA 一致度と生存成績との関連を認めなかった。

2) さらなるさい帯血移植解析のため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。全国 7 つ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 2000 例以上のペアの検体収集が収集された。現在、さい帯血組織適合性解析プロジェクトとして HLA アリルの同定とその適合性、さらに 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。

4. さい帯血移植における NK 細胞受容体適合度の臨床成績に及ぼす影響の解析

2001~2010 年に臍帯血移植を施行した全年齢の患者で、HLA-C 遺伝子型の判明している症例でかつ完全寛解期に移植された ALL (219 例), AML (297 例) を対象とした解析により、KIR リガンドとして HLA-C の GVHD 方向、HVG 方向ミスの有無と OS, DFS, Relapse, NRM, aGVHD, 生着には有意な相関は認められなかった。

5. さい帯血移植と非血縁者間移植成績の比較

造血幹細胞移植が必要な患者での第二代替ドナー・幹細胞として位置づけられる HLA 不適合非血縁ドナーからの骨髓移植 (UBMT) と非血縁ドナーからの臍帯血移植 (UCBT) の比較研究を行った。背景因子で補正を行った補正比較解析で、UCBT は DRB1 1 座不一致 UBMT と同等の生存成績であった。さらに、UCBT が DRB1 1 座あるいはその他 (HLA-A, -B, γ C) の 1 座不一致 (7/8) UBMT と類似の生存成績を示し、良好な第二代替ドナー・幹細胞であることを示した。

6. 非血縁者間移植とさい帯血移植における GVHD 治療法とその効果の後方視的解析

GVHD は非再発死亡の直接または間接の原因となることから、移植成績向上や移植選択アルゴリズムの確立のためには、本邦における

GVHD 治療の現状を正確に把握することが非常に重要である。本邦における急性 GVHD に対するステロイド一次治療の有効率に影響を与える因子を明らかにするため、日本造血細胞移植学会の有する登録データから、grade II 以上の急性 GVHD を発症し、かつ GVHD に対する一次治療の内容が明らかな初回同種造血幹細胞移植を受けた症例のデータを抽出し、統計学的解析を行った。その結果、HLA 適合非血縁ドナーからの骨髓移植、HLA 不適合ドナーからの移植ではステロイド一次治療の有効率が低く、臍帯血ドナーからの移植ではステロイド一次治療の有効率が高いことが明らかとなった。

7. 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

国際組織適合性ワークショップ (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けるデータの収集と予備的解析を開始した。

8. 海外ドナーからの造血幹細胞移植の成績：国内非血縁幹細胞ソースを用いた移植との matched-pair 解析

2009 年までに JMDP を介して実施された海外非血縁ドナーからの移植 140 例のうち、原疾患が急性骨髄性白血病・急性リンパ性白血病または骨髄異形成症候群である 84 例を解析対象として、背景因子をマッチングさせた

国内ドナーからの非血縁者間骨髓移植 (国内 BM 群) およびさい帯血移植 (国内 CB 群) との間で、主要な移植成績の比較を行った。移植後 5 年生存率、累積再発率、累積治療関連死亡率のいずれのエンドポイントについても、海外非血縁ドナー群の成績は国内 BM 群・国内 CB 群に劣らず、海外ドナーは国内に適切なドナーを得ることができない症例に対する貴重な幹細胞源であると考えられた。

9. 分担課題研究

上記 1-8 に加えて、分担研究者の専門性を生かした分担研究が進行中である (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)

D. 考察

非血縁者間移植において HLA-DPB1 不適合の GVHD 発症と GVL 効果への影響が明らかになってきた。さらに HLA 適合非血縁者間移植において HLA アリルが適合していれば HLA ハプロタイプが適合している可能性が高いことが示唆された。現在、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出されているが、その位置付けが明らかでない。我々の 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髓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。HLA-A, B 血清型と DRB1 が同定されたさい帯血と HLA アリ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を明らかにした。さらに、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アリルや非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することにより、より精緻に両移植成績の組織適合性に基づく比較が可能になろう。

E. 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, Kanda J, Takanashi M, Morishima Y, Taniguchi S, Takahashi S, Ogawa H, Ohashi K, Ohno Y, Onishi Y, Aotsuka N, Nagamura-Inoue T, Kato K, Kanda Y. Different effects of HLA disparity on transplant outcomes after single-unit cord blood transplantation between pediatric and adult patients with leukemia. *Haematologica*. 2013 Jan 24. [Epub ahead of print]

2: Nakata K, Takami A, Espinoza JL, Matsuo K, Morishima Y, Onizuka M, Fukuda T, Kodera Y, Akiyama H, Miyamura K, Mori T, Nakao S; Japan Marrow Donor Program. The recipient CXCL10 +1642C>G variation predicts survival outcomes after HLA fully

matched unrelated bone marrow transplantation. *Clin Immunol*. 2013 Feb;146(2):104-11.

3: Kanda J, Atsuta Y, Wake A, Ichinohe T, Takanashi M, Morishima Y, Taniguchi S, Takahashi S, Ogawa H, Ohashi K, Ohno Y, Aotsuka N, Onishi Y, Kato K, Nagamura-Inoue T, Kanda Y; HLA Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Impact of the Direction of HLA Mismatch on Transplantation Outcomes in Single Unrelated Cord Blood Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013 19(2):247-54.

4: Espinoza JL, Takami A, Onizuka M, Morishima Y, Fukuda T, Kodera Y, Akiyama H, Miyamura K, Mori T, Nakao S; Japan Marrow Donor Program. Recipient PTPN22 -1123 C/C Genotype Predicts Acute Graft-versus-Host Disease after HLA Fully Matched Unrelated Bone Marrow Transplantation for Hematologic Malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013 Feb;19(2):240-6.

5: Kurosawa S, Yakushijin K, Yamaguchi T, Atsuta Y, Nagamura-Inoue T, Akiyama H, Taniguchi S, Miyamura K, Takahashi S, Eto T, Ogawa H, Kurokawa M, Tanaka J, Kawa K, Kato K, Morishima Y, Suzuki R, , Sakamaki H, Fukuda T. Changes in incidence and causes of non-relapse mortality after allogeneic hematopoietic cell transplantation in patients with acute leukemia/myelodysplastic syndrome: an analysis of the Japan Transplant Outcome

- Registry. Bone Marrow Transplant. 2012 Sep 10. doi: 10.1038/bmt.2012.172. [Epub ahead of print]
- 6: Imahashi N, Suzuki R, Fukuda T, Kakihana K, Kanamori H, Eto T, Mori T, Kobayashi N, Iwato K, Sakura T, Ikegame K, Kurokawa M, Kondo T, Iida H, Sakamaki H, Tanaka J, Kawa K, Morishima Y, Atsuta Y, Miyamura K. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for intermediate cytogenetic risk AML in first CR. Bone Marrow Transplant. 2012 Jun 18. doi: 10.1038/bmt.2012.84. [Epub ahead of print]
- 7: Ishida T, Hishizawa M, Kato K, Tanosaki R, Fukuda T, Taniguchi S, Eto T, Takatsuka Y, Miyazaki Y, Moriuchi Y, Hidaka M, Akashi K, Uike N, Sakamaki H, Morishima Y, Kato K, Suzuki R, Nishiyama T, Utsunomiya A. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for adult T-cell leukemia-lymphoma with special emphasis on preconditioning regimen: a nationwide retrospective study. Blood. 2012 Aug 23;120(8):1734-41.
- 8: Harkensee C, Oka A, Onizuka M, Middleton PG, Inoko H, Hirayasu K, Kashiwase K, Yabe T, Nakaoka H, Gennery AR, Ando K, Morishima Y; Japan Marrow Donor Program. Single nucleotide polymorphisms and outcome risk in unrelated mismatched hematopoietic stem cell transplantation: an exploration study. Blood. 2012 Jun 28;119(26):6365-72.
- 9: Kato T, Murata M, et al. Escape of leukemia blasts from HLA-specific CTL pressure in a recipient of HLA one locus-mismatched bone marrow transplantation. Cell Immunol. 2012; 276: 75-82.
- 10: Nishiwaki S, Murata M, et al. Efficacy and safety of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for supporting hematopoiesis. Int J Hematol. 2012; 96(3): 295-300.
- 11: Espinoza JL, Takami A, Yoshioka K, Nakata K, Sato T, Kasahara Y, et al. Human microRNA-1245 down-regulates the NKG2D receptor in natural killer cells and impairs NKG2D-mediated functions. Haematologica. 2012 Sep;97(9):1295-303.
- 12: Kanda Y, Kanda J, Atsuta Y, Maeda Y, Ichinohe T, Ohashi K, Fukuda T, Koichi Miyamura K, Iida H, Mori T, Iwato K, Eto T, Kawa K, Morita S, Morishima Y. Impact of a single HLA allele mismatch on the outcome of unrelated bone marrow transplantation over two time periods. A retrospective analysis of 3003 patients from the HLA Working Group of the Japan Society for Blood and Marrow Transplantation. Brit J Haematol (in press).
- 13: 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. and 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 2012;18:780-787.

G. 知的財産権の取得状況
なし

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業
(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)
分担研究報告書

非血縁者間骨髄移植における HLA-DPB1 適合度の慢性 GVHD・GVL 効果への影響

研究分担者 森島泰雄 愛知県がんセンター研究所
研究協力者 松尾恵太郎 愛知県がんセンター研究所
柏瀬貢一 日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター
東 史啓 日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター

研究要旨：HLA 遺伝子型の判明した多数例の非血縁者間骨髄移植ペアを多変量解析にて解析することにより、HLA-DPB1 不適合は急性 GVHD の発症率を増加させるだけでなく、移植後の白血病再発率の低下、すなわち GVL 効果を得ることが明確となった。また、HLA-DPB1 不適合の GVL 効果は慢性 GVHD の GVL 効果より強力であった。これらの知見は、非血縁者間造血幹細胞移植において、HLA-DPB1 の適合性を考慮に入れたドナー選択が治療成績向上のためには重要であることを示唆している。

A. 研究目的

HLA-DPB1 抗原座はクラス II 抗原である HLA-DRB1 や HLA-DQB1 抗原座よりもセントロメア側に位置しており、古くは primed lymphocyte test (PLT) により同定されていた。ドナー・患者間の HLA-DPB1 アリルのミスマッチは非血縁者間造血細胞移植症例の約 3 分の 2 に認められ、移植免疫反応や移植成績への影響が解析されてきた。JMDP の解析では HLA-DPB1 ミスマッチで急性 GVHD の発症頻度が有意に高くなり (NEJM 339:1177, 1998)、その後 HLA-DPB1 ミスマッチ症例では移植後の白血病再発のリスクが低くなること (graft-versus-leukemia effect (GVL)) を明らかにした (Blood 113:2851, 2009)。海外でも、HLA-DPB1 ミスマッチの GVHD

や生存への影響が解析され、関与する HLA-DPB1 エピトープも報告されている

本研究の目的は、研究班において後方視的に解析された HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 のアリルデータに基づき、非血縁者間骨髄移植における HLA-DPB1 適合度の慢性 GVHD・GVL 反応への影響をより詳細に検討し、HLA-DPB1 をドナー選択のアルゴリズムに導入するための基盤データを構築することである。

B. 研究方法

症例：日本骨髄バンクを介したドナーから 1993 年～2008 年に移植された非血縁者間骨髄移植症例の中で、本研究班において後方視的に HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 遺伝子型が retyping されたドナー・

患者ペアの中から以下の基準を満たす症例を選択した。

上記 HLA アリル型が判明している HLA-A~DQB1 アリル適合症例。

GVHD 予防法として T 細胞非除去法、ATG 未使用例。

白血病再発解析は AML, ALL, CML 症例。

統計：Competing risk regression model を用い臨床因子を cofounder として調整した。

(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

1) HLA-DPB1 不適合 (GVH方向) の急性GVHDの発症に与える影響

表1に急性GVHD(II-IV度)のHLA座別のhazard risk(HR)を示したが、DPB1不適合のリスクは適合に比べ1.40と有意(P<0.001)に高かった。急性GVHD(III-IV度)のDPB1不適合のHRリスクは1.28と有意(P=0.001)に高かった。

2) HLA-DPB1 不適合 (GVH方向) の慢性GVHDの発症に与える影響

表2に慢性GVHDのHLA座別のhazard risk(HR)を示した。

HLA-C不適合のリスクは適合に比べ1.34と有意(P=0.001)に高かった。

クラスII抗原であるHLA-DRB1, DQB1, DPB1の不適合は慢性GVHDの発症に影響を与えないことが明らかになった。

3) HLA-DPB1 不適合 (GVH方向) の白血病再発の発症に与える影響

移植後100日以上生存例を解析した。表3に白血病再発のHLA座別のhazard risk(HR)を示したが、HLA-C不適合のリスク

は適合に比べ0.76と有意(P=0.005)に低かった。さらに、HLA-DPB1不適合のリスクは適合に比べ0.62と有意(P<0.001)に低かった。

4) HLA-A~DQB1 適合症例における HLA-DPB1 不適合 (GVH方向) の白血病再発の発症に与える影響 (表4)

移植後100日以上生存例につき解析した。HLA-DPB1 1座不適合のHRは適合に比べ0.59と有意に(P<0.001)低くHLA-DPB1 2座不適合のHRは適合に比べた0.53とさらに低かった。

同時に慢性GVHDを変数としてその白血病再発のリスクを解析すると、限局型慢性GVHD発症群リスクは無発症群に比べ0.95と有意差はなかった。Extensive type群は0.73(P=0.036)と有意に白血病の再発が少なかった。

D. 考察

非血縁移植においてはHLA-A, B, C, DRB1の遺伝子型の適合度に基づきドナーの選択が行われるため、HLA-DPB1適合度の移植免疫反応に対する影響の解析においては、移植前の主治医へのinformationバイアスがないと考えられ、biologicalな効果を客観的にnatural cohort studyとして解析することが可能であった。さらに、症例の積み重ねによりHLA-A, B, C, DRB1, DQB1遺伝型が完全適合の白血病症例が1681症例得られ、より正確度の高い解析ができた。今回の解析の結果、以前の日本骨髄バンクを介した症例解析で得られた結果であるHLA-DPB1不適合により急性GVHDの発症率が高くなることが確認できた。また、HLA-Cの不適合とHLA-DPB1の不適合で

白血病の再発は低くなる移植片対白血病効果 (GVL effect) も確認できた。新知見として、HLA-DPB1 不適合は慢性 GVHD のリスクファクタではないこと、HLA-DPB1 不適合は強いGVL効果を生じ、慢性GVHDを発症したことによる GVL 効果は限定的 (進行型) であることが示された。後者は、移植後 100 日以上生存例を抽出したことにより重症 GVHD のバイアスを除いき、慢性 GVHD の変数として time dependent time covariant 法を用いたことでより明確になった。

E. 結論

HLA 遺伝子型の判明した多数例の非血縁者間骨髄移植ペアを多変量解析にて解析することにより、HLA-DPB1 不適合は急性 GVHD の発症率を増加させるだけでなく、移植後の白血病再発率の低下、すなわち GVL 効果を得ることが明確となった。また、HLA-DPB1 不適合の GVL 効果は慢性 GVHD の GVL 効果より強力であった。これらの知見は、非血縁者間造血幹細胞移植において、HLA-DPB1 の適合性を考慮に入れたドナー選択が治療成績向上のためには重要であることを示唆している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1: Atsuta Y, Kanda J, Takanashi M, Morishima Y, Taniguchi S, Takahashi S, Ogawa H, Ohashi K, Ohno Y, Onishi Y, Aotsuka N, Nagamura-Inoue T, Kato K, Kanda Y. Different effects of HLA disparity on transplant outcomes after

single-unit cord blood transplantation between pediatric and adult patients with leukemia. *Haematologica*. 2013 Jan 24. [Epub ahead of print]

2: Nakata K, Takami A, Espinoza JL, Matsuo K, Morishima Y, Onizuka M, Fukuda T, Kodera Y, Akiyama H, Miyamura K, Mori T, Nakao S; Japan Marrow Donor Program. The recipient CXCL10 +1642C>G variation predicts survival outcomes after HLA fully matched unrelated bone marrow transplantation. *Clin Immunol*. 2013 Feb;146(2):104-11.

3: Hatanaka K, Fuji S, Ikegame K, Kato R, Wake A, Hidaka M, Ito T, Inoue M, Nagatoshi Y, Takami A, Uike N, Sakamaki H, Yabe H, Morishima Y, Suzuki R, Atsuta Y, Fukuda T. Low incidences of acute and chronic graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation with low-dose anti-T lymphocyte globulin. *Int J Hematol*. 2012 Dec;96(6):773-80.

4: Kanda J, Atsuta Y, Wake A, Ichinohe T, Takanashi M, Morishima Y, Taniguchi S, Takahashi S, Ogawa H, Ohashi K, Ohno Y, Aotsuka N, Onishi Y, Kato K, Nagamura-Inoue T, Kanda Y; HLA Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Impact of the Direction of HLA Mismatch on Transplantation Outcomes in Single Unrelated Cord Blood Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013 Feb;19(2):247-54.

- 5: Espinoza JL, Takami A, Onizuka M, Morishima Y, Fukuda T, Kodera Y, Akiyama H, Miyamura K, Mori T, Nakao S; Japan Marrow Donor Program. Recipient PTPN22 -1123 C/C Genotype Predicts Acute Graft-versus-Host Disease after HLA Fully Matched Unrelated Bone Marrow Transplantation for Hematologic Malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013 Feb;19(2):240-6.
- 6: Kurosawa S, Yakushijin K, Yamaguchi T, Atsuta Y, Nagamura-Inoue T, Akiyama H, Taniguchi S, Miyamura K, Takahashi S, Eto T, Ogawa H, Kurokawa M, Tanaka J, Kawa K, Kato K, Morishima Y, Suzuki R, Sakamaki H, Fukuda T. Changes in incidence and causes of non-relapse mortality after allogeneic hematopoietic cell transplantation in patients with acute leukemia/myelodysplastic syndrome: an analysis of the Japan Transplant Outcome Registry. *Bone Marrow Transplant.* 2012 Sep 10. doi: 10.1038/bmt.2012.172. [Epub ahead of print]
- 7: Imahashi N, Suzuki R, Fukuda T, Kakihana K, Kanamori H, Eto T, Mori T, Kobayashi N, Iwato K, Sakura T, Ikegame K, Kurokawa M, Kondo T, Iida H, Sakamaki H, Tanaka J, Kawa K, Morishima Y, Atsuta Y, Miyamura K. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for intermediate cytogenetic risk AML in first CR. *Bone Marrow Transplant.* 2012 Jun 18. doi: 10.1038/bmt.2012.84. [Epub ahead of print]
- 8: Ishida T, Hishizawa M, Kato K, Tanosaki R, Fukuda T, Taniguchi S, Eto T, Takatsuka Y, Miyazaki Y, Moriuchi Y, Hidaka M, Akashi K, Uike N, Sakamaki H, Morishima Y, Kato K, Suzuki R, Nishiyama T, Utsunomiya A. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for adult T-cell leukemia-lymphoma with special emphasis on preconditioning regimen: a nationwide retrospective study. *Blood.* 2012 Aug 23;120(8):1734-41.
- 9: Harkensee C, Oka A, Onizuka M, Middleton PG, Inoko H, Hirayasu K, Kashiwase K, Yabe T, Nakaoka H, Gennery AR, Ando K, Morishima Y; Japan Marrow Donor Program. Single nucleotide polymorphisms and outcome risk in unrelated mismatched hematopoietic stem cell transplantation: an exploration study. *Blood.* 2012 Jun 28;119(26):6365-72.
- 10: Yamamura T, Hikita J, Bleakley M, Hirosawa T, Sato-Otsubo A, Torikai H, Hamajima T, Nannya Y, Demachi-Okamura A, Maruya E, Saji H, Yamamoto Y, Takahashi T, Emi N, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Riddell SR, Ogawa S, Akatsuka Y. HapMap SNP Scanner: an online program to mine SNPs responsible for cell phenotype. *Tissue Antigens.* 2012 Aug;80(2):119-25.

11: Fleischhauer K, Shaw BE, Gooley T, Malkki M, Bardy P, Bignon JD, Dubois V, Horowitz MM, Madrigal JA, Morishima Y, Oudshoorn M, Ringden O, Spellman S, Velardi A, Zino E, Petersdorf EW; International Histocompatibility Working Group in Hematopoietic Cell Transplantation. Effect of T-cell-epitope matching at HLA-DPB1 in recipients of unrelated-donor haemopoietic-cell transplantation: a retrospective study. *Lancet Oncol.* 2012 Apr;13(4):366-74.

2) 学会発表

1. Yasuo Morishima. The role of HLA and its matching for transplant-related immune response in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. 36th Asia-Pacific Histocompatibility and Immunogenetics Association. November 17, 2012. Adelaide. Australia.

2. Yasuo Morishima. Impact of HLA and HLA haplotype on transplantation-related immunological events as an artificial model of disease susceptibility. International Symposium II Autoimmune Disease –Etiology and Therapeutics. December 2, 2012. Fukuoka, Japan.

3. S. Morishima, S. Ogawa, A. Sato-Otsubo, K. Kashiwase, T. Sasazyki, Y. Morishima. Multi-SNP analysis of HLA haplotype and its matching effect on acute graft versus host disease in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donor. 16th International HLA and Immunogenetics Workshop and Conference. June 1, 2012. Liverpool. UK.

4. C Harkensee, A Oka, PG Middelton, AR Gennery, H Inoko, Y. Morishima. TNF-1031 single nucleotide polymorphism: An independent predictor of severe graft-versus-host disease? 16th International HLA and Immunogenetics Workshop and Conference. June 1, 2012. Liverpool. UK.

5. C Harkensee, A Oka, PG Middelton, M Onizuka, AR Gennery, H Inoko, K. Ando, Y. Morishima. Microsatellite scanning of the immunogenome for associations with hematopoietic stem cell transplantation outcome. 16th International HLA and Immunogenetics Workshop and Conference. June 1, 2012. Liverpool. UK.

H. 知的財産権の取得状況

なし

表 1

Effect of HLA locus matching on acute GVHD (2-4)

5443 pairs (1993-2008)
 HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 allele typing
 GVHD prophylaxis: Non-T cell depletion ATG(-)
 HLA-A, B, DR antigen match

HLA		N	SHR	[95% Conf.	Interval]	P
A	match	4817	1.00			
	mismatch*	626	1.24	1.11	1.40	<0.001
B	match	5152	1.00			
	mismatch	291	1.31	1.11	1.54	0.001
C	match	3887	1.00			
	mismatch	1556	1.23	1.12	1.34	<0.001
DRB1	match	4416	1.00			
	mismatch	1027	1.15	1.00	1.33	0.046
DQB1	match	4257	1.00			
	mismatch	1186	1.09	0.96	1.25	0.189
DPB1	match	1816	1.00			
	mismatch	3627	1.40	1.28	1.53	<0.001

* GVH direction
 adjusted with patient age, donor age, disease, leukemia relapse risk,
 conditioning, GVHD prophylaxis, year by competing risk regression analysis.

表 2

Effect of HLA locus matching on chronic GVHD

JMDP analysis: All cases
 GVHD prophylaxis: Non-T cell depletion ATG(-)
 HLA-A, B, DR antigen match

HLA		N	SHR	[95% Conf.	Interval]	P
A	match	4817	1.00			
	mismatch*	626	1.18	0.93	1.51	0.173
B	match	5152	1.00			
	mismatch	291	0.95	0.66	1.36	0.762
C	match	3887	1.00			
	mismatch	1556	1.34	1.13	1.60	0.001
DRB1	match	4416	1.00			
	mismatch	1027	1.00	0.77	1.30	0.995
DQB1	match	4257	1.00			
	mismatch	1186	1.00	0.78	1.29	0.972
DPB1	match	1816	1.00			
	mismatch	3627	1.02	0.87	1.21	0.778

* GVH direction

表 3

Effect of HLA locus matching on Leukemia Relapse

AML, ALL, CML (Survived more than 100 days)
GVHD prophylaxis: Non-T cell depletion ATG(-)

HLA		N	SHR	[95% Conf. Interval]	P
A	match	2946	1.00		
	mismatch	350	0.91	0.71 1.18	0.492
B	match	3134	1.00		
	mismatch	162	1.20	0.85 1.69	0.290
C	match	2412	1.00		
	mismatch	884	0.76	0.63 0.92	0.005
DRB1	match	2685	1.00		
	mismatch	611	0.96	0.73 1.25	0.740
DQB1	match	2597	1.00		
	mismatch	699	1.01	0.79 1.29	0.962
DPB1	match	1133	1.00		
	mismatch	2163	0.62	0.53 0.72	<0.001

adjusted with patient age, donor age, disease, leukemia relapse risk, conditioning, GVHD prophylaxis, year by competing risk regression analysis.

表 4

Effect of HLA-DPB1 Matching and chronic GVHD
on Leukemia Relapse
HLA-A ~ DQB1 match (N=1681)

	N	HR	[95% Conf. Interval]	P
Survived more than 100 days				
HLA-DPB1 (GVH direction)				
match	632	1		
1 locus mismatch	777	0.59	0.48 0.73	<0.001
2 locus mismatch	272	0.53	0.38 0.72	<0.001
Chronic GVHD*				
no	902	1		
limited	272	0.95	0.69 1.29	0.733
extensive	421	0.73	0.54 0.97	0.036

*time dependent covariate analysis

adjusted with patient age, donor age, disease, leukemia relapse risk, conditioning, GVHD prophylaxis, year

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業
(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)
分担研究報告書

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

同種造血幹細胞移植後の急性 GVHD は移植関連死亡の原因となる。一次治療としてステロイド全身投与が選択されるが、日本人におけるその有効性、あるいはその有効性に影響を与える因子については十分明らかにされていない。今回我々は、造血細胞移植学会のデータベースを利用し、移植後急性 GVHD に対するステロイド一次治療の反応性について、移植細胞源の種類やその HLA 適合度の違いなどに着目して統計学的解析を行った。特記すべき結果として、臍帯血移植後の急性 GVHD (grade II 以上) は、HLA 一致血縁者間骨髄移植と比べてステロイド一次治療の有効率が有意に高いことが明らかとなった。

A. 研究目的

日本造血細胞移植学会では移植登録一元管理プログラム (TRUMP) を用いた移植データの一元化電子登録が行われており、そこには非血縁骨髄移植や非血縁臍帯血移植を含め、5 万件を超える移植データが納められている。今回我々は、このデータベースを利用し、移植後急性 GVHD に対するステロイド一次治療の反応性について、移植細胞源の違いや HLA 適合度などに着目して統計学的解析を行った。

この研究により、我が国におけるステロイド一次治療の有効率、有効性に影響を与える因子、治療結果がその後の予後に与える影響などが明らかになると期待される。またそれらは移植細胞源の選択アルゴリズムを確立する上で有用な情報となると考えられる。

B. 研究方法

初回同種移植後に grade II-IV の急性

GVHD を発症し、一次治療としてステロイド投与 (外用ステロイドを除く) を受けた 3552 例を対象とした。移植細胞源を HLA 一致血縁 BMT、HLA 不一致血縁 BMT、HLA 一致血縁 PBSCT、HLA 不一致血縁 PBSCT、HLA 一致非血縁 BMT、HLA 不一致非血縁 BMT、CBT の 7 つに分類した。その他、様々な患者背景および移植背景を変数に加え、ステロイド一次治療の有効率に与える因子を多変量解析により同定した。また、一次治療後の非再発死亡率や全生存率に与える因子についても、多変量解析を用いて同定した。

C. 研究結果

多変量解析の結果、ステロイド一次治療反応性の良好な予測因子として、患者年齢: 18-49 歳 (vs. 18 歳未満) と移植細胞源: CBT (vs. HLA 一致血縁 BMT) が同定された。反対に、ステロイド一次治療反応性の不良

な予測因子として、移植細胞源:HLA 不一致血縁 BMT、HLA 不一致血縁 PBSCT、HLA 一致非血縁 BMT、HLA 不一致非血縁 BMT (vs. HLA 一致血縁 BMT)、GVHD grade:III、IV (vs. II)、GVHD 病変部位:skin and gut、gut and liver、skin、gut and liver (vs. skin only) が同定された。また、ステロイド一次治療が無効な場合 (有効な場合と比較して)、その後の非再発死亡率が有意に上昇し、またその後の全生存率が有意に低下することも確認された。

D. 考察

急性 GVHD に対するステロイド一次治療の有効率が臍帯血移植において (HLA 一致血縁 BMT と比較し) 有意に良好であるとする報告は初めてであり、貴重な解析結果と考える。現在、その他の解析結果と合わせて、論文報告したいと考えている。またステロイド一次治療の反応性が不良な場合はその後の予後が不良であることから、諸外国同様、我が国においても急性 GVHD に対する二次治療の開発が強く望まれる。

E. 結論

急性 GVHD に対するステロイド一次治療の有効率は、臍帯血移植において良好である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Kato T, Murata M, et al. Escape of leukemia blasts from HLA-specific CTL pressure in a recipient of HLA one locus-mismatched bone marrow transplantation. *Cell Immunol.* 2012; 276: 75-82.
2. Kuwatsuka Y, Murata M, et al. Phase II

study of dose-modified busulfan by real-time targeting in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myeloid malignancy. *Cancer Sci.* 2012; 103(9): 1688-1694.

3. Nishiwaki S, Murata M, et al. Efficacy and safety of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for supporting hematopoiesis. *Int J Hematol.* 2012; 96(3): 295-300.

学会発表

1. Murata M, et al. Clinical factors predicting the response of acute graft-versus-host disease to corticosteroid therapy. 54th ASH Annual Meeting and Exposition, Atlanta, Dec 2012.
2. Nakane T, Murata M, et al. Older age increases non-relapse mortality in patients with grade II-IV acute GVHD after allogeneic hematopoietic cell transplantation: A retrospective analysis from the Japanese TRUMP database. 54th ASH Annual Meeting and Exposition, Atlanta, Dec 2012.
3. Kato K, Murata M, et al. The impact of ATG/ALG in preconditioning on the allogeneic stem cell transplantation for patients with acute leukemia. 54th ASH Annual Meeting and Exposition, Atlanta, Dec 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業
(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)
分担研究報告書

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 日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター検査部
研究協力者 柏瀬貢一 日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター検査部
研究協力者 東史啓 日本赤十字社関東甲信越ブロック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 他分担研究者とともに臍帯血移植における組織適合性遺伝子の移植成績への影響のレトロスペクティブ解析のため、全国の臍帯血バンクと協力して DNA 検体収集、DNA 増幅、HLA タイピング、検体保存およびデータベース作成を行った。それらの検体について KIR 遺伝子解析を行い移植成績への影響について検討した。

A. 研究目的

造血幹細胞移植成績への NK 細胞関連遺伝子型の影響が報告されているが、その効果ははっきりとは定まっていない。研究分担者らは以前の研究班において JMDP の骨髄移植症例の *KIR* 遺伝子解析を担当してきたが、本研究班においても解析を継続している。今年度はさらに臍帯血移植症例検体の *KIR* 遺伝子型およびリガンド HLA タイピングを行い、移植成績への影響解析を行う。

研究代表者森島および松尾による組織適合性遺伝子統合解析プロジェクトに協力して、検体準備と解析の一部を分担する。また臍帯血移植における組織適合性遺伝子の移植成績への影響のレトロスペクティブ解析のため、当班分担研究者である松本、高梨らとともに全国の臍帯血バンクと協力して DNA 検体収集、調製および遺伝子多型解析を行う。

B. 研究方法

(1) さい帯血バンクより収集した移植ペア DNA 検体を全ゲノム増幅(WGA)したのち、*KIR* 遺伝子型を蛍光ビーズ法による PCR-SSO 法にてタイピングを行う。HLA タイピングデータより *KIR* リガンド型を判定する。移植成績と得られた *KIR* 遺伝子型、リガンド型との関連について統計解析を行う。

(2) 統合解析プロジェクト用 DNA 検体の抽出、WGA、バーコード付記容器での試料管理、解析用プレートの作成を行う。

(3) 他分担研究者高梨、松本らの全国臍帯血移植症例検体の収集、全ゲノム増幅(WGA)および *HLA* 遺伝子型タイピング作業に協力する。

(倫理面への配慮)

本研究はヒトゲノム・遺伝子解析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