

認を得てその規定に従って行った。

C. 研究結果

(1) 臍帯血移植約 650 症例ペア 1300 検体の *KIR* 遺伝子型を判定した。これらのうち移植成績および HLA タイピングデータの得られている 350 症例について成績との関連統計解析を行った。*KIR* 遺伝子型は 16 個の各 *KIR* 遺伝子型、ハプロタイプ型 (A, B) および Centromere 側、Telomere 側に分けたモチーフ (Cen, Tel モチーフ A, B) について、*KIR* リガンド型としては *HLA-C* 座の C1, C2、*HLA-A, B* 座の Bw4、*HLA-A* 座の A3, A11 の 4 型を考慮した患者、ドナー間 *KIR* リガンド不適合性について、生存率、白血病再発率、重症 GVHD 発症率との関連を解析した。*KIR* 遺伝子型モチーフ Tel-B 陽性ドナーからの移植では急性重症 GVHD (2-4 度) の発症率が高かった。生着症例のみ解析では *KIR* リガンド不適合移植での白血病再発率の抑制効果が認められた。

(2) 統合解析用 *HLA-A~DQB1* 一致 *HLA-DPBI* 不一致約 1000 症例ペア検体の SNP 解析用プレートを作成した。(3) 全国さい帯血バンク移植症例の 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作業に協力した。本年度は 1476 症例ペア検体を収集した。

D. 考察

骨髄移植、末梢血幹細胞移植症例において *KIR* 遺伝子型の移植成績への影響が報告されているが臍帯血移植成績との関連はまだ報告されていない。今回の解析から *KIR* モチーフ Tel-B 陽性ドナー移植での急性

GVHD 発症との関連が見出された。海外の骨髄、末梢血幹細胞移植症例で示されているような Tel-B の AML 症例での有意な再発抑制効果は見いだせなかった。AML の症例数 (141 例) が少ないことによる可能性もあり、今後さらに解析数を増やして検討する必要がある。やはり AML の再発率に強く影響することが骨髄、末梢血幹細胞移植症例で示されているドナー Cen-B/Cen-B 陽性者、ドナー *KIR2DS1* 陽性-C2/C2 陽性者については日本人集団における頻度が低い (Cen-B/Cen-B, C2/C2 それぞれ 1%未満) ために評価ができなかった。欧州で報告された臍帯血移植症例での *KIR* リガンド不適合の白血病再発抑制効果は生着症例のみの解析で同様な傾向がみられたが全症例解析では有意な差は認められなかった。

E. 結論

臍帯血移植症例の *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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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 ;119(26):6365-72.

2) 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 Pathog.* 2012;8(3):e1002565.

2. 学会発表

なし

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

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 東海大学医学部 講師

研究要旨

造血幹細胞移植後非感染性肺合併症発症にレニン・アンギオテンシン系が関与している可能性は、さらに高くなり、今後、予防や治療に活かされることが期待される。

A. 研究目的

我々は HLA 以外に移植成績に影響を与える因子の存在として、マイナー組織適合抗原およびサイトカイン・ケモカインなどの移植後免疫応答に深く関わるタンパクの遺伝子多型性を解析し、HLA 以外の新たな造血幹細胞移植関連因子の探求を目的として研究をおこなっている。

特に、今年度は移植後肺合併症とレニン・アンギオテンシン系の関与および薬剤代謝関連遺伝子多型と移植成績に重点的に解析した。

B. 研究方法

1. 米国 Fred Hutchinson Cancer Research Center (FHCRC) との共同研究との共同研究である非血縁者間造血幹細胞移植症例における非感染性肺合併症発症に関連する遺伝子多型解析で、Angiotensinogen をコードする AGT 遺伝子に複数の移植後非感染性肺合併症の発症リスクとなる遺伝子多型を認めた。また、これらの遺伝子多型が血中の Angiotensinogen に影響するかどうかを検討した。このため、第一コホートとは別に 378 症例の造血細胞移植症例の移植前の血漿中の Angiotensinogen 濃度と、high risk 遺伝子多型の関連を評価した。

また、今年度は我が国における造血細胞移植症例における遺伝子多型と移植後治療成績を比較する統合解析において、カルシニューリン阻害剤

の代謝に影響する CYP3A5 の遺伝子多型が影響するかどうかを検討した。

2. 被験者からは遺伝子多型解析を行うことを文章で説明し、同意書を得ている。また、米国 FHCRC における共同研究においては IRB の通過を確認している。

C. 研究結果

移植後非感染性肺合併症 high risk の遺伝子型は有意に Angiotensinogen の血中濃度が低い傾向を認めた。このことから、移植後肺合併症に high risk である AGT 遺伝子多型は functional な機能を有する可能性が示された。

薬物代謝遺伝子多型解析においては、CYP3A5 の遺伝子多型の中で、カルシニューリン阻害剤の血中濃度に影響する遺伝子多型と急性 GVHD の発症率および生存率を評価したが、レシピエントの遺伝子多型では血中濃度が低値になる遺伝子多型では急性 GVHD の発症率が高い傾向を認めた。また、ドナー側の解析では血中濃度が低値になる遺伝子多型は統計学的に有意に GVHD 発症率が上昇し、生存率も低い傾向にあった。

D. 考察

レニン・アンギオテンシン系の移植後非感染性肺合併症における何らかの関与が、はっきりして

きているが、しかし、その発症のメカニズムの解明には至っていない。今後、動物実験などにより、詳細な解析を行う必要がある。また、同時に前方視的臨床試験を行うことにより、診断の難しい移植後非感染性肺合併症発症の詳細を確認してゆく必要性がある。

薬剤代謝関連遺伝子多型解析について、レシピエント側ではなく、ドナー側で統計学的に有意な結果が得られていることから、想定されていた結果と異なった結果である。この現象を解明するためには、別のコホートによる同様の検討を重ねると同時に、肝ではなく、リンパ球におけるCYP3A5の意義を確認してゆく必要がある。

E. 結論

造血幹細胞移植後非感染性肺合併症発症にレニン・アンジオテンシン系が関与している可能性は、さらに高くなり、今後、予防や治療に活かされる可能性が高いと考える。

薬剤代謝遺伝子多型が移植成績に何らかの影響を与えることが示唆され、さらに研究を深めることとする。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. K Nakata, A Takami, J. L Espinoza, K Matsuo, Y Morishima, M Onizuka, T Fukuda, Y Kodera, H Akiyama, K Miyamura, T Mori and S Nakao. The recipient CXCL10 +1642C<G variation predicts survival outcomes after HLA fully matched unrelated bone marrow transplantation. *Clinical Immunology*. 146, 104-11, 2013
2. Ohgiya, D. Matsushita, H. Onizuka, M. Nakamura, N. Amaki, J. Aoyama, Y. Kawai, H.

Ogawa, Y. Kawada, H. and Ando, K.

Association of Promyelocytic Leukemia Protein with Expression of IL-6 and Resistance to Treatment in Multiple Myeloma. *Acta Haematologica*. 128, 213-22, 2012

3. C Harkensee, A Oka, M Onizuka, P G Middleton, H Inoko, K Hirayasu, K Kashiwase, T Yabe, H Nakaoka, A R. Gennery, K Ando and Y Morishima. Single nucleotide polymorphisms and outcome risk in unrelated mismatched hematopoietic stem cell transplantation: an exploration study. *Blood*. 119, 6365-72, 2012

2. 学会発表

1. Makoto Onizuka, Mitsuki Miyamoto, Shinichiro Machida, Masako Toyosaki, Yoshiaki Ogawa, Hiroshi Kawada, Kiyoshi Ando; ACE Polymorphism and Idiopathic Pneumonia Syndrome After Allogeneic Stem Cell Transplantation.

第54回米国血液学会, 2012年12月

2. Makoto Onizuka, Yao Li, Wenhong Fan, Cindy Zhang, Hongwei Wang, Lue Ping Zhao, David K. Madtes, Paul J Martin, Barry Storer, John A. Hansen, Jason Chien: Association Between AGT SNPs, Plasma AGT Levels, and Risk for IPS After Allogeneic HCT. *BMT Tandem Meetings*, 2013年2月

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得

特記事項なし

2. 実用新案登録

特記事項なし

3. その他

特記事項なし

移植免疫反応と遺伝子多型の解析

研究分担者 高見昭良 金沢大学附属病院血液内科・輸血部 准教授

研究要旨

CD53 は、白血球や血管内皮細胞、胸腺、肺などに発現され、細胞の増殖や活性化、アポトーシス抑制、免疫調整への関与が示唆されている。CD53 の intron には 1 塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) rs6679497 (C>G) があり、TNF α 誘導能との関連が示唆されている。CD53 SNP の造血幹細胞移植免疫における役割を明らかにするため、臨床的検討と機能解析を行った。日本骨髄バンクを通じ HLA アリルー一致非血縁者間同種骨髄移植を受けた血液腫瘍患者 322 例とドナーを対象に、CD53 SNP と移植後転帰の関連を解析したところ、患者 GG 型の 5 年生存率は、患者 CC 型に比べ有意に低かった (29% vs. 53%; $P=0.01$)。多変量解析でも裏付けられた (relative risk=1.97; 95% confidence interval, 1.22-3.18; $P=0.01$)。機能解析では、健康人 G アリル陽性白血球は、G アリル陰性白血球に比べ、TNF α 誘導能亢進の傾向がみられた ($P=0.09$)。さらに、CD53 SNP G アリルは CD53 SNP C アリルに比べ、転写量が有意に多いことがわかった。以上から、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。

A. 研究目的

CD53 は膜 4 回貫通型の細胞表面糖タンパク質抗原で、白血球全般、血管内皮細胞、肺、唾液腺、胸腺などに発現している。CD53 はインテグリンと細胞表面で複合体を形成し、細胞の分化や増殖、活性化、遊走、接着、アポトーシス抑制などへの関与が示唆されている。CD53 遺伝子が欠損すると高度の免疫不全になることから、CD53 は免疫調整機能に重要な役割を担っていると考えられる。最近オランダで行われた全ゲノム連鎖解析で、CD53 遺伝子 intron の遺伝子多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) rs6679497 (C>G) と tumor necrosis factor (TNF α) の誘導能の関連が明らかとなった。この SNP のマイナーアリル (=G アリル) 頻度 (minor allele frequency; MAF) は、日本人 0.452、中国人 0.451、北および西ヨーロッパに祖先を持つ集団 0.430、サハラ砂漠以南のアフリカ居住者 0.500 と、民族間の差は少ない。

HLA が一致した他人の造血幹細胞を移植する同種造血幹細胞移植は、血液難病の根治を期待して行われ

る。ただし、重症感染症や拒絶反応、移植片対宿主病 (graft-versus-host disease; GVHD) など合併症や再発による死亡も多く、長期生存率は約 50% にとどまる。同種造血幹細胞移植後の感染症や拒絶反応、GVHD の発症や病態には、様々なサイトカインや免疫調整遺伝子が関与している。特に、TNF α と同種造血細胞移植後 GVHD や感染症など移植後合併症との関連が、臨床および実験的観察より明らかになってきた。今回、国内の非血縁者間骨髄移植患者およびドナーを対象に、CD53 rs6679497 SNP と移植後転帰の関連を後方視的に検討した。さらに、CD53 SNP の機能を検証するため、CD53 SNP と CD53 発現量、TNF α 誘導能との関連を検討した。

B. 研究方法

対象症例

日本骨髄バンクを通じ実施された HLA-A/B/C/DRB1/DPB1/DQB1 アリルー一致非血縁者間同種骨髄移植患者およびドナーを対象とし、1993 年

から 2005 年血液腫瘍に対する非T細胞除去初回移植 322 例について解析した。内訳は、急性骨髄性白血病 (AML; acute myeloid leukemia) 133 例、急性リンパ性白血病(acute lymphoblastic leukemia; ALL) 83 例、骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndrome; MDS) 58 例、悪性リンパ腫(malignant lymphoma; ML) 48 例。AMLまたはALLの第1寛解期移植例、MDS、MLの寛解期移植例を標準リスク群(standard risk)とし、その他を病期の移植例を高リスク群(high risk)に分類したところ、標準リスク群 183 例(57%)、高リスク群 129 例(40%)となった。10 例(3%)の病期は不明であった。移植前処置は、骨髄破壊的前処置 288 例(89%)、骨髄非破壊的前処置 34 例(11%)、全身放射線照射(total body irradiation; TBI)使用 249 例(77%)であった。GVHD予防は、シクロスポリン+メトトレキセート 191 例(59%)、タクロリムス+メトトレキセート 131 例(41%)。輸注有核細胞数中央値は、3.0 (0.1 から 296.0) x 10⁸/kg。

患者・ドナー試料(DNA)と臨床情報

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

CD53 SNP rs6679497 解析

CD53 genotyping probe (product number: c_31638818_10, Applied Biosystems)と、TaqMan genotyping master mix (Applied Biosystems)を用い、TaqMan PCR 法により、患者・ドナーの CD53 SNP (rs6679497)を決定した。PCR 増幅と解析は Step One Plus (Applied Biosystems)を使用した。PCR 条件は、pre-denaturation 60°C、30 秒、denaturation 95°C、10 分、annealing 92°C、15 秒、elongation 60°C、1 分、post-elongation 60°C、30 秒で行った。

試料準備

健常人 (日本居住のアジア人種) 27 名(20-25 歳)より、ヘパリン加末梢血を採取した。

TNF α 誘導能解析

TNF α 誘導能の解析は全血液培養法(Whole blood Culture system)により行った。健常人より採取した末梢血試料に IMDM と LPS 5 μ g/mL を加え、37°C で 4 時間(ex vivo で培養)。1.5 mL tube に移し 1,500 rpm、5 分間遠心後上清と遠沈細胞に分離し、解析まで一

80°C で保存した。培養上清の TNF α 濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法で定量した。試薬は、ELISA ASSAY FOR HUMAN TNF α (MABTECH)を用いた。吸光度測定はマイクロプレートリーダー(Thermo LabSystems Multiskan JX: フナコシ)を用い、450 nm の吸光度を測定した。

DNA・RNA 抽出と cDNA 作製

遠沈細胞から QIAamp RNA Blood Mini Kit (QIAGEN)で RNA を抽出した。さらに、High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems)で cDNA を作製し、解析まで -20°C 保存した。別に genomic DNA も抽出した。

CD53 発現解析

CD53 SNP と転写量の関係を明らかにするため、アリアル特異的転写量測定法(Allele-specific transcript quantification)を行った。健常人由来の CD53 CG 型 genomic DNA、cDNA を Step One Plus (Applied Biosystems)を用いたアリアル増幅解析を行い、G/C アリアル比を算出した。

CC 型・GG 型の genomic DNA を 1:0、3:1、2:1、3:2、1:1、2:3、1:2、1:3、0:1 で混合後アリアル増幅解析を行い、コントロールとした。

統計解析

統計解析は、Microsoft Office Excel 2010 と EZR を用いた。2 群間比較は t 検定とウィルコクソンの符号順位検定で行った。全生存率(overall survival; OS)算出・比較は Kaplan-Meier 解析・log-rank 解析、移植関連死亡率(Transplant-related mortality; TRM)、再発率(relapse)、急性(acute)・慢性(chronic) GVHD の算出・比較は累積発生率解析法・Gray 法を用いた。

倫理的事項

本研究は、日本骨髄バンクと金沢大学の倫理委員会で審査・承認を受け、実施された。

C. 研究結果

非血縁者間同種骨髄移植 322 例の CD53 SNP (rs6679497)を決定した。遺伝子型頻度は、ドナーが CC 35% CG 49% GG 17%、患者が CC 33% CG 50% GG 17%であった。これは、International HapMap Project による日本人データ(CC 24% CG 52% GG 14%)に一致すると考えられた。

ドナーCD53 SNP と移植後転帰の関連を検討したところ、単変量解析では有意な影響はみられなかったが、多変量解析において、ドナーCG型はOSの低下と有意に関連していた (relative risk [RR]=1.56; 95% confidence interval [CI]=1.06-2.30; $P=0.03$)。また、ドナーGG型は、有意に再発を高めた (RR=2.87; 95% CI=1.02-8.08; $P=0.05$)。

患者 CD53 SNP と移植後転帰の関連を検討したところ、単変量解析において、患者 GG 型の生存率は患者 CC 型に比べ有意に低かった (5 年生存率 29% vs. 53%; $P=0.01$)。これは多変量解析でも裏付けられた (RR=1.97; 95% CI=1.22-3.18; $P=0.01$)。ただし、移植関連死亡率 (TRM)、再発率 (Relapse) への有意な影響はみられなかった。

CD53 SNP 多型の機能を解析するため、健康人の試料を用いて、TNF α 誘導能との関連を全血培養法で解析した。CG 型または GG 型は、CC 型より TNF α 誘導能が高い傾向がみられた ($P=0.09$)。CD53 遺伝子多型の影響をアリル特異的転写量測定法で解析したところ、G アリルは、C アリルより転写量が有意に多いことが示された ($P=0.03$)。LPS 刺激前後で、G アリル転写量・C アリル転写量比に変化は無かった。

D. 考察

血液悪性腫瘍 322 例を対象に、CD53 SNP (rs6679497; C>G) と非血縁者間同種骨髄移植後転帰の関連を検討したところ、患者 CC 型に比べ患者 GG 型は OS を有意に低下させることがわかった。逆に、患者 CC 型は患者 GG 型より予後良好とも言える。

ドナー CC 型に比べ、ドナー CG 型、ドナー GG 型も若干 OS は低下した (5 年生存率はそれぞれ 55%, 40%, 43%) が、有意差には至らなかった。ただし多変量解析では、ドナー CG 型は、有意に OS を低下させた。遺伝子多型の解析は通常、優性 (dominant) モデル (CD53 の場合 CC vs. CG, GG)、劣性 (recessive) モデル (CD53 の場合 CC, CG vs. GG)、線形 (linear) モデル (CD53 の場合 CC vs. CG vs. GG) を用いるが、雑種 (heterosis) モデル (CD53 の場合 CG vs. CC, GG) の影響も提唱されている。ドナー側遺伝子多型の影響は、ドナー選択の最適化につながる可能性があり、大きな価値がある。今回のドナー CG 型の影響が雑種モデルに基づくのか、患者側遺伝子多型の再検討も含め、新たなコホート研究で検証すべきと考えられる。

健康人の末梢血を用い、TNF α 誘導能における CD53 遺伝子多型の影響を調べたところ、マイナーアリルの

G アリル保有者は高 TNF α 誘導能を示した。さらに、G アリルの転写量は C アリルより高かった。したがって、CD53 rs6679497 G アリル保有者は、CD53 発現量亢進を通じ効率良く TNF α を分泌する可能性が示唆された。rs6679497 は intron SNP であり、intron-mediated enhancement (IME) 機能への影響を通じ、CD53 発現量を調整しているのかもしれない。

臨床解析、機能解析より、CD53 CC 型の患者は TNF α 誘導能が低く、生存率が高まる可能性が示唆された。移植後の TNF α が GVHD 誘導や臓器障害誘発に関与するという報告は、この仮説を支持する。CD53 はほぼ全白血球が発現しているが、血管内皮細胞や肺、唾液腺、胸腺といった臓器も CD53 を発現している。同種造血幹細胞移植により、患者の白血球はドナー由来白血球に入れ替わる。したがって、血管内皮細胞など臓器由来の CD53 の SNP が重要な役割を担っている可能性がある。しかし、臓器に発現する CD53 がどのような機序で移植後生存率に影響するか、臓器由来 CD53 遺伝子多型がどのようにドナー単球に作用し TNF α の多寡に影響を及ぼすか、移植患者で CD53 遺伝子多型が TNF α 誘導能に影響するかなど、未解決の問題も多く残されている。

これまで CD53 rs6679497 SNP と TNF α 誘導能の関連を検討した報告は、オランダ居住者を対象に実施された 1 つのみである。今回も同じ全血液培養法を用い、メジャーアリル (C) 保有者はマイナーアリル (G) 保有者より TNF α 誘導能が高い、すなわち、今回と正反対の結果であった。今回機能解析で用いた試料は全て日本 (北陸) に居住するアジア人種由来である。また、血液悪性腫瘍症例・ドナーの試料・データもほぼ 100% 日本に居住するアジア人種由来と考えられる。今回とオランダの報告の違いが人種差によるものか、今後さらに試料を増やして再検討する必要がある。可能なら欧州居住者または欧州起源の試料も取り寄せる必要性が考えられた。

E. 結論

今回の結果から、CD53 SNP (rs6679497; C>G) は機能的 SNP で、CD53 転写量を通じ TNF α 誘導能を調整し、同種造血細胞移植後に影響していると考えられた。これらは、同種造血細胞移植後の予後予測だけでなく、移植後抗 TNF α 抗体療法³⁴ など、新たな治療開発につながる可能性がある。また、TNF α が関与する疾患、特に関節リウマチ、強直性脊椎炎、クローン病、乾癬、汗腺膿瘍、難治性喘息など自己免疫疾患の診断・治療・

予後予測にも役立つかもしれない。

さらに、再発難治感染症など免疫不全における CD53 SNP の機能や役割をさらに知ることができれば、感染症予防にも役立つかもしれない。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Seiki Y, Sasaki Y, Hosokawa K, Saito C, Sugimori N, Takami A, et al. Increased plasma thrombopoietin levels in patients with myelodysplastic syndrome: a reliable marker for a benign subset of bone marrow failure. *Haematologica*. 2013 Feb 12. PubMed PMID: 23403320. Epub 2013/02/14. Eng.

2. Quoc Trung L, Espinoza JL, Takami A, Nakao S. Resveratrol Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Malignant NK Cells via JAK2/STAT3 Pathway Inhibition. *PLoS One*. 2013;8(1):e55183. PubMed PMID: 23372833. Pubmed Central PMCID: 3555980. Epub 2013/02/02. eng.

3. Nakata K, Takami A, Espinoza JL, Matsuo K, Morishima Y, Onizuka M, et al. 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. PubMed PMID: 23291247. Epub 2013/01/08. eng.

4. Takami A, Ohtake S, Morishita E, Terasaki Y, Fukushima T, Kurokawa T, et al. Late response to low-dose imatinib in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia. *Int J Hematol*. 2012 Sep;96(3):357-63. PubMed PMID: 22893108. Epub 2012/08/16. eng.

5. Takami A. [Agranulocytosis (neutropenia)]. *Nihon Rinsho*. 2012 Aug;70 Suppl 6:443-6. PubMed PMID: 23156547. Epub 2012/11/20. jpn.

6. Ishiyama K, Takami A, Kanda Y, Nakao S, Hidaka M, Maeda T, et al. Prognostic factors for acute myeloid leukemia patients with t(6;9)(p23;q34) who underwent an allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Leukemia*. 2012 Jun;26(6):1416-9. PubMed PMID: 22157737. Epub 2011/12/14. eng.

7. Ishiyama K, Takami A, Kanda Y, Nakao S, Hidaka M, Maeda T, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia with t(6;9)(p23;q34) dramatically improves the patient prognosis: a matched-pair analysis. *Leukemia*. 2012 Mar;26(3):461-4. PubMed PMID: 21869835. Epub 2011/08/27. eng.

8. Ishiyama K, Okumura H, Yamazaki H, Kondo Y, Waseda Y, Takami A, et al. Intensive chemotherapy for a relapsed ALL patient who received living-donor lobar lung transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2012 Jan;47(1):135-6. PubMed PMID: 21297671. Epub 2011/02/08. eng.

9. Ishiyama K, Katagiri T, Ohata K, Hosokawa K, Kondo Y, Takami A, et al. Safety of pre-engraftment prophylactic foscarnet administration after allogeneic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis*. 2012 Feb;14(1):33-9. PubMed PMID: 21794043. Epub 2011/07/29. eng.

10. Hosokawa K, Yamazaki H, Nishitsuji M, Kobayashi S, Takami A, Fujimura M, et al. Pulmonary veno-occlusive disease following reduced-intensity allogeneic bone marrow transplantation for acute myeloid leukemia. *Intern Med*. 2012;51(2):195-8. PubMed PMID: 22246490. Epub 2012/01/17. eng.

11. Hosokawa K, Yamazaki H, Mochizuki K, Ohata K, Ishiyama K, Takami A, et al. Successful treatment of Trichosporon fungemia in a patient with refractory acute myeloid leukemia using voriconazole combined with liposomal amphotericin B. *Transpl Infect Dis*. 2012 Apr;14(2):184-7. PubMed PMID: 22093149. Epub 2011/11/19. eng.

12. Hatanaka K, Fuji S, Ikegame K, Kato R, Wake A, Hidaka M, et al. 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. PubMed PMID: 23132596. Epub 2012/11/08. eng.

13. 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. PubMed PMID: 22491735. Pubmed Central PMCID: 3436229. Epub 2012/04/12. eng.

14. Espinoza JL, Takami A, Trung LQ, Kato S, Nakao S. Resveratrol prevents EBV transformation and inhibits the outgrowth of EBV-immortalized human B cells. *PLoS One*. 2012;7(12):e51306. PubMed PMID: 23251493. Pubmed Central PMCID: 3519585. Epub 2012/12/20. eng.

15. Espinoza JL, Takami A, Onizuka M, Morishima Y, Fukuda T, Kodera Y, et al. 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*. 2012 Sep 28. PubMed PMID: 23025987. Epub 2012/10/03. Eng.

2. 学会発表

1. Kanamori H, Takami A, et al. Outcome and Prognostic Index for Reduced-Intensity Allogeneic Stem Cell Transplantation (RIST) for Elderly Patients with De Novo Acute Myeloid Leukemia (AML): A Study From the AML Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation (JSHCT). *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2012 November 16, 2012;120(21):1918-.

2. Takami A, Espinoza JL, Matsuo K,

Morishima Y, Onizuka M, Kashiwase K, et al. Association of Functional Single Nucleotide Variation in the NLRP3 Gene with Survival Outcomes After Unrelated Bone Marrow Transplantation. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2012 November 16, 2012;120(21):3140-.

3. Trung LQ, Takami A, et al. Resveratrol Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Malignant NK Cells Via JAK2/STAT3 Pathway Inhibition. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2012 November 16, 2012;120(21):1343-.

4. Yamashita T, Takami A, et al. Intravenous Busulfan-Based Myeloablative Conditioning Is Comparable to TBI-Based Regimen in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Recipients with Acute Myeloid Leukemia: A Nationwide Retrospective Study From the Adult Acute Myeloid Leukemia Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2012 November 16, 2012;120(21):1922-.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

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 ハプロタイプ適合性の意義

研究分担者 森島聡子 藤田保健衛生大学医学部血液内科 講師

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

研究分担者 笹月健彦 九州大学高等研究院 特別主幹教授

研究要旨：家系関係のない集団での長い領域の SNP の相の推測は、一般的に困難と考えられているが、UR-BMT の JMDP データセットでは、日本人に頻度の高い HLA ハプロタイプの割合が一般集団より著明に高く、ホモ接合体の配列をベースにハプロタイプを推測する Clark 法に準じた方法で LRP が可能となった。日本人の HLA 適合 UR-BMT では HLA ハプロタイプ不適合の頻度や急性 GVHD に対する影響は少なく、HLA ハプロタイプ適合の意義は人種間で異なる可能性が示された。

A. 研究目的

HLA 一致同胞間移植では、HLA アリル以外の領域も含めた HLA ハプロタイプそのものが一致するが、HLA 一致非血縁者間骨髄移植 (UR-BMT) においては、その保証はない。HLA 一致 UR-BMT の患者とドナーで同一ハプロタイプ上の HLA-A, B, DR の連鎖が異なる場合 (ハプロタイプ不適合)、連鎖が一致している場合 (ハプロタイプ適合) と比較して重症急性 GVHD のリスクが有意に高くなることがシアトルから報告された (PLoS Med. 2007; 4: e8)、日本人においては不明である。本研究では、multi-SNP による HLA ハプロタイプの long-range-phasing (LRP) を試み、UR-BMT におけるハプロタイプ適合性の意義を検証した。

B. 研究方法

JMDP を介した移植例で HLA-A, B, C, DRB1,

DQB1 一致の患者・ドナー1593 ペアについて、Affymetrix 500K array による SNP タイピングを施行後、HLA-A から DQB1 までの約 3.0 Mb について解析した。日本人で高頻度な3つの HLA ハプロタイプ (P1, P2, P3) のホモ接合体から 3.0 Mb のコンセンサス配列 (CS) を決定 (Blood. 2010; 115: 4664)。P1, P2, P3 と同じ HLA 座と CS を有する個人の相を推定 (step1)。Step1 で推定した対立ハプロタイプの配列を基に、残りの個人の相を推定 (step2)。ハプロタイプ適合性と急性 GVHD との関係は Cox regression model で解析した。

C. 研究結果

1) HLA ハプロタイプの適合度 (表 1)

3186 人中 2808 人 (88.1%) で 3.0 Mb 領域の相が推定できた。1593 ペアの中で、ハプロタイプ適合は 1260、不適合が 42、不確定が 291 であった。急性 GVHD のリスクは 2-4 度、3-4 度ともに 3 群

間での有意差は認めなかった。

なし

2) HLAハプロタイプ適合度と急性GVHD発症頻度との関連(表 2、表 3)

HLA ハプロタイプ不適合症例の急性 GVHD (II～IV度)発症リスクは0.98(P=0.94)とハプロタイプ適合症例と同じであった。同時に変数として解析した HLA-DPB1 適合度においては DPB1 不適合のリスクは適合に比し 1, 45 (P<0.001)と有意に高く、解析に用いたデータベースが急性 GVHD のリスクを評価できるものであることを示している。

HLA ハプロタイプ不適合症例の急性 GVHD (III～IV度)発症リスクは1.21(P=0.62)とハプロタイプ適合症例と有意差は認められなかった。

D. 考察

家系関係のない集団での長い領域の SNP の相の推測は、一般的に困難と考えられているが、UR-BMT の本データセットでは、日本人に頻度の高い HLA ハプロタイプの割合が一般集団より著明に高く、ホモ接合体の配列をベースにハプロタイプを推測する Clark 法に準じた方法で LRP が可能となった。日本人の HLA 適合 UR-BMT では HLA ハプロタイプ不適合の頻度や急性 GVHD に対する影響は少なく、HLAハプロタイプ適合の意義は人種間で異なる可能性がある。

E. 結論

日本人のドナーと患者の UR-BMT においては、ハプロタイプ適合性と GVHD の関連は認めない。ドナーと患者の HLA ハプロタイプの相が推定できたことより、HLA 領域と移植免疫反応の関連について、さらに詳細な解析が可能となった。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Moran D, Morishima S, Mallki M, Petersdorf EW. Identification of the MICA*070 allele by sequencing and phasing. Hum Immunol. 2012 Nov 28 [Epub ahead of print]

2) 学会発表

1. 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.
2. 森島聡子 小川誠司 佐藤亜似子 柏瀬貢一 笹月健彦 森島泰雄. 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。第21回日本組織適合性学会大会。平成24年9月15日 東京
3. 森島聡子。造血幹細胞移植におけるHLAハプロタイプの意義。第35回日本造血細胞移植学会 シンポジウムI 急性GVHDの基礎と臨床。平成25年3月9日 金沢

H. 知的財産権の取得状況

なし

表 1. HLA ハプロタイプ適合度

HLA haplotype matching	No.of pairs	(%)
match	1260	(79.0%)
mismatch	42	(2.6%)
undetermined	291	(18.2%)
total	1593	

表 2. 急性 GVHD 2-4 度の発症率と HLA ハプロタイプ適合度との関連

Variable	N	HR	95% Conf. Interval	P
HLA haplotype				
match	1260	1.00 (ref)		
mismatch	42	0.98	0.57 - 1.68	0.94
undetermined	291	1.10	0.90 - 1.34	0.33
HLA-DPB1				
match	450	1.00 (ref)		
mismatch	1143	1.49	1.24 - 1.80	<0.0001

表 3. 急性 GVHD3-4 度の発症率と HLA ハプロタイプ適合度との関連

Variable	N	HR	95% Conf. Interval	P
HLA haplotype				
match	1260	1.00 (ref)		
mismatch	42	1.21	0.56 - 2.61	0.62
undetermined	291	1.02	0.74 - 1.43	0.86
HLA-DPB1				
match	450	1.00 (ref)		
mismatch	1143	1.33	0.98 - 1.81	0.07

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

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 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

研究要旨

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髄移植 (UBMT) と非血縁ドナーからの臍帯血移植 (UCBT) の比較研究を行い、論文発表を行った (Atsuta et al. BBMT 2012)。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 と同等の生存成績を示した。本研究では、UCBT が DRB1 1 座あるいはその他の 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。さらに、UCBT 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により重度の 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を示し、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ことを示した。

A. 研究目的

造血幹細胞移植が必要な患者での第一選択ドナーである HLA 一致同胞が見つかる可能性は 30%未満である。そのため、70%以上の患者において代替ドナーを探す必要がある。代替ドナー選択のアルゴリズムに重要な知見を登録データ (日本造血細胞移植学会全国調査データ) を用いて検討することを本研究の目的とする。

現在の第一代替ドナー・幹細胞は HLA-A, -B, -C および DRB1 一致の非血縁ドナーであり、本邦ではこれまでは骨髄に限られていた。第二代替ドナー・幹細胞としては、HLA 不適合非血縁ドナー、非血縁ドナーよりの臍帯血、HLA 不適合血縁ドナーが挙げられる。近年本邦では、年間約 3000 件の同種造血幹細胞移植が実施されており、そのうちの約 65-70%は非血縁者ドナーからの移植 (非血縁者間骨髄移植: 非血縁者間臍帯血移植=1100: 1000 程度) である。第二代替ドナー・幹細胞に位置づけられる HLA 不適合非血縁ドナーからの骨髄移植 (UBMT) と非血縁ドナーからの臍帯血移植 (UCBT) の比較を行った。さらに、UCBT 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。

B. 研究方法

日本造血細胞移植学会、日本小児血液学会、骨髄移

植推進財団 (骨髄バンク)、日本さい帯血バンクネットワークが協力して造血細胞移植登録の一元化・電子化を 2006 年より行っている造血細胞移植登録一元管理プログラム (TRUMP) データベースを用いて研究を実施した。主評価項目は、いずれの研究も全生存とした。UBMT と UCBT との比較研究では HLA-DRB1 1 座ミスマッチ UBMT と HLA-A, -B low resolution, -DRB1 high resolution で 2 座までのミスマッチの UCBT の比較を主比較とし、HLA Class I (HLA-A, -B, もしくは-C) 1 座ミスマッチのあるいは II 座ミスマッチの UBMT は参考数値として表示した。UCBT の HLA 研究に関しては、単一ユニット UCBT を対象とし、16 歳未満の小児と 16 歳以上の成人に分けて HLA-A, -B low resolution, -DRB1 high resolution で一致度が 6/6, 5/6, 4/6 および 3/6 のものを 6/6 を指標として検討した。

統計解析に関しては、競合リスクイベントを含んだアウトカムの解析に関しては Cumulative incidence 法を用いて時間における頻度を求める単変量解析およびその曲線を描出し、多変量解析は Fine and Gray's model を用いた。その他のアウトカムに関しては、Kaplan-Meier 法で時間における生存率の算出および生存曲線の描出、また多変量解析では Cox proportional hazard model を用いた。補正生存曲線の描出は Cox proportional hazard model を用いて描

出した。

C. 研究結果

●UBMT と UCBT の比較研究

補正比較解析で、UCBT は DRB1 1 座不一致 UBMT と同等の生存成績を示した (relative risk [RR] = 0.85, 95% confidence interval [CI], 0.68-1.06, P = 0.149)。DRB1 1 座不一致 UBMT に比べ、UCBT では、好中球回復が劣ったが (RR = 0.50, 95% CI, 0.42-0.60, P < 0.001)、II から IV 度の急性 GVHD のリスクが有意に低く (RR = 0.55, 95% CI, 0.42-0.72, P < 0.001)、移植関連死亡が低かった (RR = 0.68, 95% CI, 0.50-0.92, P = 0.011)。再発リスクでは有意な違いは認めなかった (RR = 1.28, 95% CI, 0.93-1.76, P = 0.125)。本研究の解析結果に関しては、文献 1 で報告した。

●UCBT HLA 研究

補正比較解析で、小児患者においては 4/6 一致 (2 座ミスマッチ) において 6/6 に比べ有意に全死亡リスク (relative risk [RR]=1.61, P=0.042) および移植関連死亡リスク (RR=3.55, P=0.005) の増加が認められた。6/6 一致に比べ II から IV 度の急性 GVHD のリスクが 5/6 一致 (RR=2.18, P=0.003) および 4/6 一致 (RR=2.51, P=0.001) において有意に高かった。小児患者においては、HLA 不一致度による再発の影響は認めなかった。一方成人患者においては HLA 不一致の死亡リスクへの影響は認めなかった (RR=0.98, P=0.924 for 5/6, RR=0.88, P=0.423 for 4/6, and RR=0.95, P=0.746 for 3/6)。成人においては 4/6 一致 UCBT 患者において有意に再発リスクの低下を認めた (RR=0.67 P=0.029)。本研究の解析結果に関しては、国内外で 2 回の学会発表を行った。

D. 考察

UCBT は、HLA 8/8 一致 UBMT ドナーがない場合の良好な第二代替ドナー・幹細胞であると考えられる。HLA 7/8 一致 UBMT との比較では、UCBT を優先して選択するという結果にはならなかったが、本邦で第二代替ドナー・幹細胞の第一選択として検討されることの多い DRB1 1 座不一致 UBMT に比べ、急性 GVHD および移植関連死亡が低いという結果が得られた。申込から幹細胞受け取りまでの時間の短さからよりよい疾患病期に移植できるメリットを生かし、状況に応じて積極的に UCBT を第二代替ドナー・幹細胞

として選択することを支持する結果であったと考える。

成人における UCBT は、欧米では複数臍帯血移植の実施件数が増加している。一方、本邦においては、単一ユニットを用いた UCBT が年間 1,000 件以上行われており、その 8 割以上が成人患者対象である。ことに単一ユニットの UCBT として多くの輸注細胞数が期待できる小児患者においては、HLA 一致度を上げることにより、HLA 8/8 一致 UBMT と同等の、あるいはそれ以上の移植成績が得られる可能性が欧米の研究結果より示唆されている。本邦での UCBT HLA 研究においても、小児患者においては欧米からの報告と同様に HLA 一致度を上げることの重要性が示唆された。一方成人患者においては HLA 一致度を上げることによる生存への positive な影響は認められなかった。成人患者では myeloid malignancy が多いこと、あるいは輸注細胞数が小児患者、成人患者間で大きく違うことなどが影響していると考えられる。

E. 結論

本研究では、UCBT が DRB1 1 座あるいはその他の 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。さらに、UCBT においては、16 歳未満の小児患者においては、HLA 一致度を上げることにより重度の 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を示し、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ことを示した。

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*. (in press)
2. 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;96(6):773-80.
3. 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, Suzuki R, Morishima Y, 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(in press)
 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. Impact of the direction of HLA mismatch on transplant outcome in single unrelated cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013;19(2):247-54.
 5. 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.

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

KIR リガンド不適合が移植成績に及ぼす影響の検討

研究分担者 田中淳司 北海道大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨

本邦における ATG を使用しない、Single cord による臍帯血移植において KIR リガンドとして HLA-C の GVHD 方向ミスは生存率や再発などの移植成績に大きな影響を与えていなかった。

A. 研究目的

KIR リガンド不適合が移植成績に及ぼす影響については、その前処置、対象疾患などによって有効性が認められるという報告と反対に効果が認められないという報告が混在しているのが現状であり、一定の見解が得られていない。このため我が国における KIR リガンド不適合移植成績の現状を正確に把握し、どのような条件下であれば KIR リガンド不適合移植が移植成績を向上させるかを明らかにする必要がある。

B. 研究方法

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。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, 生着などとの相関を患者年齢、性別、性不適合、PS、前処置 (RIC/MAC) などとともに解析した。
(倫理面への配慮) 本研究は北大病院 IRB の承認のもとに行った。

C. 研究結果

臍帯血移植において 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, R elapse, NRM, aGVHD, 生着などには有意な相関は認められなかった。

E. 結論

臍帯血移植では HLA 不一致が多くその移植成績と KIR 適合度の関連が注目されており、ヨーロッパのグループ(Willemze et al. Leukemia 23: 492, 2009)は 80%の症例に ATG を併用する完全寛解期 AML, ALL における KIR ミスマッチ移植が特に AML の生存率を有意に改善することを報告している。しかし、今回の我々の解析では ATG 使用例がわずかに 9 例(ALL 3 例、AML 6 例)しか含まれていなかったこともその結果に関連しているものと推測された。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka J, Sugita J, Shiratori S, Shigematsu A, Imamura M.

Dasatinib enhances the expansion of CD56+CD3- NK cells from cord blood. *Blood* 119 (25):6175-6176, 2012.

2. 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* 26(5):1149-1152, 2012.

3. Sugita J, Matsushita T, Kashiwazaki H, Kosugi M, Takahashi S, Wakasa K, Shiratori S, Ibata M, Shono Y, Shigematsu A, Obara M, Fujimoto K, Endo T, Nishio M, Kondo T, Hashino S, Tanaka J, Asaka M, Imamura M.

Efficacy of folinic acid in preventing oral mucositis in allogeneic hematopoietic stem cell transplant patients receiving MTX as prophylaxis for GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 47(2):258-264, 2012.

4. Kashiwazaki H, Matsushita T, Sugita J, Shigematsu A, Kasashi K, Yamazaki Y, Kanehira T, Yamamoto S, Kondo T, Endo T, Tanaka J, Hashino S, Nishio M, Imamura M, Kitagawa Y, Inoue N.

Professional oral health care reduces oral mucositis and febrile neutropenia in patients treated with allogeneic bone marrow transplantation. *Support Care Cancer.* 2012 Feb;20(2):367-373, 2012.

5. Kashiwazaki H, Matsushita T, Sugita J, Shigematsu A, Kasashi K, Yamazaki Y, Kanehira T, Kondo T, Endo T, Tanaka J, Hashino S, Nishio M, Imamura M, Kitagawa Y, Inoue N. A comparison of oral mucositis in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation between conventional and reduced-intensity regimens. *Support Care Cancer.* 20(5):933-939, 2012.

6. Tsutsumi Y, Ogasawara R, Ito S, Sasaki J, Morita A, Senoo N, Murata N, Tanaka J, Asaka M, Imamura M. Retrospective analysis of an efficient peripheral blood stem cell collection and the relation between infused cell dose and clinical outcome in patients with malignant lymphoma and multiple myeloma. *Int J Lab Hematol.* 34(4):403-409, 2012.

7. Tsutsumi Y, Ogasawara R, Miyashita N, Tanaka J, Asaka M, Imamura M. HBV reactivation in malignant lymphoma patients treated with rituximab and bendamustine. *Int J Hematol.* 95(5):588-591, 2012.

8. Kurosawa M, Yonezumi M, Hashino S, Tanaka J, Nishio M, Kaneda M, Ota S, Koda K, Suzuki N, Yoshida M, Hirayama Y, Takimoto R, Torimoto Y, Mori A, Takahashi T, Iizuka S, Ishida T, Kobayashi R, Oda T, Sakai H, Yamamoto S, Takahashi F, Fukuhara T. Epidemiology and treatment outcome of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies. *Int J Hematol.*

96(6):748-757, 2012.

9. 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 acute myeloid leukemia in first complete remission. Bone Marrow Transplant (in press)

10. Nishiwaki S, Miyamura K, Ohashi K, Kurokawa M, Taniguchi S, Fukuda T, Ikegame K, Takahashi S, Mori T, Imai K, Iida H, Hidaka M, Sakamaki H, Morisima Y, Kato K, Suzuki R, Tanaka J. Impact of donor source on adult Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia: a retrospective analysis from the Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Ann Oncology (in press)

2. 学会発表

1. Tanaka J, Sugita J, Shiratori S, Shigematsu A, Imamura M. The effect of dasatinib on the expansion of CD56+CD3- NK cells from cord blood. 41st Annual Meeting of International Society of Hematology (ISEH) 2012. 8. 23-26. Amsterdam, Netherlands.

2. Tanaka J, Kanamori H, Nishiwaki S, Ohashi K, Taniguchi S, Eto T, Nakamae H, Katayama Y, Morishima Y, Suzuki R,

Kato K, Sakamaki H, Nishimoto N, Masauzi N. Reduced-Intensity Versus Myeloablative Conditioning Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Patients Aged Over 45 Years with Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) in Remission: A Study From the ALL Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation (JSHCT). 54th Annual Meeting of American Society of Hematology (ASH), 2012. 12. 8-11. Atlanta, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
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

移植後免疫抑制剤としての calcineurin 阻害剤の選択と移植成績

研究分担者 南谷泰仁 東京大学医学部附属病院血液・腫瘍内科 特任講師

研究要旨:再発低リスク群の造血器疾患に対する造血幹細胞移植後の免疫抑制剤として CsA と FK506 の成績の比較から、GVHD 低リスク群においては FK506 群の方が重症 GVHD の抑制を通じて全生存率を向上させた。CsA 群は血中濃度と GVHD 発症の間に相関を認め、GVHD 低リスク群における MTX の減量使用が calcineurin 阻害剤の抑制に必要な濃度を高めている可能性が示唆された。

A. 研究目的

造血幹細胞移植は難治性造血器腫瘍性疾患および造血不全症候群に対する有効な治療法である。同種造血幹細胞移植における免疫抑制剤の使用は、short term MTX + calcineurin 阻害剤が基本となっている。しかし、その使い分けや至適血中濃度は明らかでない。複数の比較試験により、FK506 は cyclosporin A (CsA) よりも重症急性 GVHD が少ないことが示されているが、従来の試験では FK506 の濃度は高く、一方 CsA の目標濃度が必要と考えられる濃度よりも低く設定されてきたため、適切な比較とはいえなかった。そこで、CsA、FK506 をそれぞれ最適な血中濃度で使用した場合の免疫抑制効果と毒性を後方視的に比較・検討することを目的とする。

B. 研究方法

当院では、再発低リスク造血器疾患に対する同種造血幹細胞移植の免疫抑制剤を、2008年5月より CsA (持続投与の目標濃度 500ng/ml) から FK506 (同 15ng/ml) に変更した。その際に MTX の使用方法、calcineurin 阻害剤の減量方法に変更はない。CsA から FK506 への変更前後で、GVHD の発生率、非再

発死亡率、再発率、全生存率、無再発生存率、副作用を後方視的に解析した。再発低リスクの定義は急性白血病第1、第2寛解期、慢性骨髄性白血病第一慢性期、芽球の増殖のない骨髄異形成症候群、化学療法感受性のある悪性リンパ腫とした。

(倫理面への配慮)

本研究の対象者には、データの利用に対する同意を文章で取得している。

C. 研究結果

111名の患者(CsA 76名、FK506 35名)を対象として、解析を行った。背景因子に差は認められなかった。患者群全体では全生存率(OS)、非再発生存率(RFS)、再発率、非再発死亡率(TRM)、grade2-4急性GVHD、grade3-4急性GVHD、慢性GVHD、extended型慢性GVHDの頻度にFK506群とCsA群の間に有意な差は見られなかったが、FK506群の方がOS、RFSにおいて良好な傾向を示した。しかし、患者をGVHDの低リスク群(HLA一致同胞と臍帯血移植)と高リスク群に分けて解析を行ったところ、OS(p=0.048)、RFS(p=0.043)は有意にFK506群の方が良好であった。一方、GVHD高リ

スク群において、OS($p=0.70$)、RFS($p=0.74$)ともに、両群の差は全く見られなかった。その原因を調べてみると、GVHD 低リスク群では NRM が FK506 群の方が低い傾向があり($p=0.09$)、grade 3-4 の重症 GVHD が抑制されていることがその理由と考えられた。急性 GVHD の発症と免疫抑制剤の血中濃度を調べてみると、GVHD 低リスク群では移植後 2~3 週目の CsA の濃度と GVHD の発症の間に相関を認めたが、FK506 群ではこのような相関は見られなかった。また GVHD 高リスク群でもこの相関は見られなかった。さらに calcineurin 阻害剤の合併症について調べたところ、血栓性微小血管障害は有意に CsA の方が多く認められた。その他腎障害などの合併症に差は見られなかった。

D. 考察

本研究では、再発低リスクの患者における移植後免疫抑制剤としての calcineurin 阻害剤として、FK506 を用いた群が CsA を用いた群よりも生命予後が良いこと、その理由は重症 GVHD が少ないことによる TRM の減少であることを示した。本研究は後方視的研究であり、2008 年以前と以降の移植に関する支持療法の進歩が及ぼす影響が否定できない。GVHD 低リスクにおいては CsA 群においてのみその血中濃度が GVHD の発症と相関しており、その理由として、以下のようなメカニズムを想定する。FK506 が 10ng/mL 以上の濃度に到達していれば、それ以上の濃度の高低によって GVHD の発症への影響は少ないのに対して、CsA は 300~500ng/ml の濃度の差が GVHD の発症へ影響する事が報告されている。GVHD 高リスク群では MTX を十分に用いているため、MTX と calcineurin 阻害剤を合わせた免疫抑制能は GVHD の抑制に必要とされる強さをカバーしており、CsA の濃度依存性に影響されることはない。一方、GVHD 低リスク群では MTX をシアトル原法の半分程度しか用いていないため(45mg 対 24mg)、GVHD 抑制に必要とされる免疫抑制能の減少よりも MTX の減量による免疫抑制作用の減少の方が大き

く、その結果 MTX と calcineurin 阻害剤を合わせた免疫抑制能は CsA 濃度に影響を受ける程度まで減少してしまう。本邦で頻用される GVHD 低リスク群に対する MTX の減量使用は、CsA と組み合わせた場合には濃度依存性を受ける可能性があるため、十分な濃度を確保することが重要と思われる。

E. 結論

本研究の結果は、再発低リスク群の造血器疾患に対する幹細胞移植の免疫抑制剤の選択において、CsA の濃度目標を 500ng/ml と設定した場合でも、FK506 の方が重症 GVHD をより効果的に抑制することで TRM を減らし、OS を改善する傾向があること、そしてその効果は GVHD 低リスク群においてより顕著である事を示した。今後、大規模な解析を行うことで、さらにいろいろな因子について移植成績に対する影響の解析を進めていくことが肝要である。そのため、今後、骨髄移植推進財団に登録された各種データの利用を行い、解析する因子と症例数を拡大し、包括的な解析を行っていく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表
 1. Outcome after first relapse in adult patients with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukaemia. Kako S, Kanamori H, Kobayashi N, Shigematsu A, Nannya Y, et al Br J Haematol. 2013 Epub ahead of print
 2. Prospective multicenter study of single-unit cord blood transplantation with myelablative conditioning for adult patients with high-risk hematologic malignancies. Mori T, Tanaka M, Kobayashi T, Ohashi K, Fujisawa S, Yokota A, Fujita H, Nakaseko C, Sakura T, Nannya Y et al Biol Blood Marrow Transplant. 2013 Mar;19(3):486-91
 3. Efficacy of pleural biopsy for diagnosis of pleural effusion due to chronic GVHD after hematopoietic stem cell transplantation. Miyauchi M, Yoshimi A, Nannya Y et al Int J Hematol. 2012 Jul;96(1):146-8.
 4. HapMap SNP Scanner: an online program to mine SNPs responsible for cell phenotype. Yamamura T, Hikita J, Bleakley M, Hirose T, Sato-Otsubo A, Torikai H, Hamajima T, Nannya Y et al. Tissue Antigens. 2012 Aug;80(2):119-25.