

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 移植医療研究分野)
分担研究報告書

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	日本赤十字社血液事業本部、関東甲信越さい帯血バンク
	松本加代子	日本赤十字社近畿ブロック血液センター、近畿さい帯血バンク
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
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
研究協力者	石井博之	日本赤十字社近畿ブロック血液センター
研究協力者	中村文明	日本赤十字社近畿さい帯血バンク、東京大学大学院

研究要旨: 臍帯血移植データベースの構築を目的としてさい帯血バンクを経由した移植症例患者、臍帯血ペアの検体および移植臨床成績、HLA データの収集を行い、検体の DNA 調製、保存および HLA タイピング作業を行った。

A . 研究目的

当研究班は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源および遺伝子型選択アルゴリズムの確立を目指している。本分担研究においては臍帯血移植を担当し、臍帯血バンク経由移植症例検体 DNA 試料および臨床データを収集して、HLA 6 座 12 抗原アリル型を含む HLA 領域および非 HLA 領域の組織適合性抗原遺伝子タイピングを行い、それら遺伝子多型の移植臨床成績への影響について総合的な解析を行って、詳細な臍帯血移植データベースを構築し臍帯血移植成の向上を目指している。

B . 研究方法

1、分担研究者屋部らと共同研究グループを組織して全国のさい帯血バンクから検体を収集する。解析対象として血液系悪性疾患、初回移植、単数臍帯血移植、臍帯

血と患者の DNA 検体あるいは血液検体がペアで揃うという条件に該当する症例を選択し、各バンクで抽出した検体の送付を受け、必要なものは検体より DNA を抽出し、全検体で遺伝子多型解析のため全ゲノム DNA 増幅 (WGA) を行う。2、さい帯血バンクより各症例の移植成績臨床データおよび HLA-A, -B, -C, -DRB1 タイピングデータを入手し、必要なものについてはさらに HLA アリルタイピングを実行し、患者、臍帯血ペアの HLA 6 座 (-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DPB1) 12 抗原のアリルデータを揃える。3、HLA 領域および非 HLA 領域の組織適合性遺伝子の多型を TaqMan 法、ルミネックス蛍光ビーズ法、遺伝子シーケンシング法などによりタイピングしてデータベースを作成する。4、得られた HLA 型、遺伝子型と臨床移植成績との関連解析を行う(図 1)。 (倫理面への配慮)

本研究はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針および造血細胞移植学会倫理指針に基づき、日本さい帯血バンクネットワーク倫理委員会、近畿さい帯血バンク倫理委員会、日本赤十字社倫理委員会の承認を得てその規定に従って行った。

C. 研究結果

全国7か所のさい帯血バンクより共同解析の快諾を得て研究グループを構築して、検体の収集作業を行った。これまでに2145症例ペア(4290検体)を収集し、DNA抽出、WGAおよび、HLA-A, -B, -DR座のアリル再タイピングとHLA-C座のタイピングした。今回新たに578症例のHLA-Cアリルデータが得られ、合計2090症例で4座のアリルデータを確定できた。これらについて、各バンクでのタイピング結果と照合可能であったものについて相違を調べたところ、アリルレベルでの不一致率は約1%で、主にambiguityと検査法の違いによるものであった(図2)。HLAデータを現在までに得られている移植成績データと結合したところ1633症例の解析データセットを作成することができた。これらよりHLA-C座および4座のアリルレベルの適合性が移植成績に及ぼす影響について関連統計解析を開始している。

D. 考察

HLA-A, -B, -C, -DRB1の4座のアリルレベルデータと移植成績データを揃えた臍帯血移植組織適合性遺伝子解析用データセットを作成することができた。以前当センターで骨髓バンクを経由した非血縁者間骨髓移植症例の再タイピングを行った際に、タイピング方法の進歩に伴い、元のデータとの間にかなりの相違がみられたため、今回の臍帯血検体についてもHLA-A, -B, -DRB1に

ついて再タイピングを行った。移植時の各バンクのタイピングと再タイピングの相違点は約1%と大変低いものであった。これは今回収集した検体の9割近くは2005年以降の移植症例であり、その殆どが蛍光ビーズ法によるHLAアリルタイピングを行っているためと考えられる。今回はHLA-C座のアリルタイピングを終え、HLA-C座適合性と移植成績との関連および、HLA4座8抗原のアリルレベル適合性と移植成績との関連解析に着手している。当初目標としていたHLA-DQ, -DP座を含めた6座12抗原アリルレベルまでのデータを今年度までに作成することはできなかった。作成した解析セットが今後新たな組織に引き継がれ、HLA-DQ, -DP座を含めたHLA領域、非HLA領域の組織適合性遺伝子、免疫関連遺伝子の多型解析と移植成績との統合的な関連解析が進み、より充実した各種免疫遺伝情報と移植成績からなる臍帯血移植データベースが作成されることで、新たな非血縁者間移植ドナー源選択アルゴリズム構築が行われて、移植成績の向上に貢献することができると考える。

E. 結論

臍帯血移植症例に関するデータベース作成の基盤整備として全国さい帯血バンクより移植患者、ドナー検体収集、DNA増幅、HLA-A, -B, -DR座アリル再タイピングおよびHLA-C座タイピングを行い、組織適合性遺伝子解析用データセットを作成した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1). Kanda Y, Kanda J, Atsuta Y, Fuji S, Maeda Y, Ichinohe T, Takanashi M, Ohashi K, Fukuda T, Miyamura K, Mori T, Sao H, Kobayashi N, Iwato K, Sawada A, Mori S;

- HLA working group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Changes in the Clinical Impact of High-Risk Human Leukocyte Antigen Allele Mismatch Combinations on the Outcome of Unrelated Bone Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014; S1083-87 91(14)00017-2
- 2). van der Meer PF, Reesink HW, Panzer S, Wong J, Ismay S, Keller A, Pink J, Buchta C, Compernelle V, Wendel S, Biagini S, Scuracchio P, Thibault L, Germain M, Georgsen J, Bégué S, Dernis D, Raspollini E, Villa S, Rebullà P, Takanashi M, de Korte D, Lozano M, Cid J, Gulliksson H, Cardigan R, Tooke C, Fung MK, Luban NL, Vassallo R, Benjamin R. Should DEHP be eliminated in blood bags? *Vox Sang*. 2014;106(2):176-95. .
- 3). Yamaguchi R, Takanashi M, Ito M, Ogawa A, Hashimoto M, Ishii Y, Mazda T, Tadokoro K, Nakajima K, Minami M. Plasticizer concentration in cord blood cryopreserved with DMSO. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49(1):157-8.
- 4). Pamphilon D, Selogie E, McKenna D, Cancelas-Peres JA, Szczepiorkowski ZM, Sacher R, McMannis J, Eichler H, Garritsen H, Takanashi M, van de Watering L, Stroncek D, Reems JA. Current practices and prospects for standardization of the hematopoietic colony-forming unit assay: a report by the cellular therapy team of the Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative. *Cytotherapy*. 2013;15(3):255-62.
- 5). 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. *Hematologica*. 2013;98:814-22.
- 6). Eichler H, Schrezenmeier H, Schallmoser K, Strunk D, Nystedt J, Kaartinen T, Korhonen M, Fleury-Cappellesso S, Sensebé L, Bönig H, Rebullà P, Giordano R, Lecchi L, Takanashi M, Watt SM, Austin EB, Guttridge M, McLaughlin LS, Panzer S, Reesink HW. Donor selection and release criteria of cellular therapy products. *Vox Sang*. 2013;104(1):67-91.
- 7). 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.

2. 学会発表

1) 中村文明、畑中一生、松本加代子、魚嶋伸彦、井上雅美、石川淳、谷慶彦、河敬世
 「臍帯血移植の100日死亡割合は経年的に増加している」 第36回日本造血細胞移植

学会総会(2014年3月、宜野湾市)

H. 知的財産権の出願・登録状況
 なし

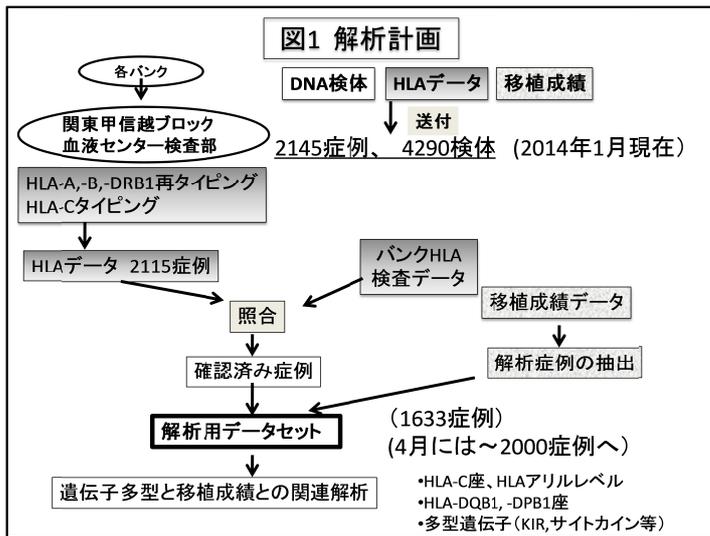


図2 再タイピングデータとバンク検査データとの照合

解析数	2956検体
DNA不良	56検体
タイピング済み	2900検体
HLAデータ照合終了	2654検体
照合結果が異なったもの	29検体 (1.1%)
判別困難(ambiguity)	13検体
チューブ取り違え、記載ミス	7検体
データの相違	
アリルミスタイプ	2検体
検査法差による相違	6検体
不明(精査中)	1検体

