

201441011A

厚生労働科学研究委託費 難治性疾患等実用化研究事業
(免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 移植医療技術開発研究分野)

免疫遺伝情報に基づく非血縁移植統合データベースの構築
と
最適なドナー・さい帯血の選択

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 森島 泰雄

平成 27 年 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業（難治性疾患等実用化研究事業（免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 移植医療技術開発研究分野））による委託業務として、篠田雅幸（受託者の名称）が実施した平成26年度「免疫遺伝情報に基づく非血縁移植統合データベースの構築と最適なドナー・さい帯血の選択（契約書第1条で定めた委託業務題目）」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

免疫遺伝情報に基づく非血縁移植統合データベースの構築と最適なドナー・さい帯血の選択 業務主任者 森島泰雄	----- 1
---	---------

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. HLAクラスII適合度の移植免疫反応への影響に関する研究 担当責任者 森島 泰雄 担当責任者 笹月 健彦	----- 7
2. 非血縁者間骨髄移植におけるHLAアレルHLAハプロタイプに基づく急性GVHDの解析 担当責任者 森島 聡子	----- 13
3. 非HLA遺伝子多型の統合解析 担当責任者 松尾 恵太郎	----- 19
4. 移植免疫反応と遺伝子多型の解析 担当責任者 高見 昭良	----- 28
5. 移植免疫反応の機序の解明 担当責任者 村田 誠	----- 34
6. 超高解像度HLAタイピング（SS-SBT）法の有用性評価と非血縁移植への応用 担当責任者 椎名 隆	----- 37
7. NK細胞受容体遺伝子の解析 担当責任者 屋部 登志雄	----- 40
8. 非血縁移植HLAタイピングとデータベースの整備 担当責任者 佐竹 正博	----- 43
9. 移植関連合併症と遺伝子多型の解析 担当責任者 鬼塚 真仁	----- 47
10. 非血縁ドナー選択アルゴリズムについての研究 担当責任者 一戸 辰夫	----- 49
11. GWA S解析による臨床に有用な遺伝子多型の同定に関する研究 担当責任者 小川 誠司	----- 53

III. 学会等発表実績・別冊	----- 55
-----------------	----------

厚生労働科学研究委託費 難治性疾患等実用化研究事業
(免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 移植医療技術開発研究分野)

委託業務成果報告

(免疫遺伝情報に基づく非血縁移植統合データベースの構築と最適なドナー・さい帯血の選択)

総括研究報告

業務主任者 森島 泰雄 愛知県がんセンター研究所 研究員

研究要旨：最新の免疫学的手法で得られるより詳細な HLA 型や HLA 型以外の免疫遺伝学的知見と臨床情報を統合した非血縁移植データベースを構築・解析することにより、適切なドナー選択、治療法選択のアルゴリズムを確立し、非血縁移植成績の向上に資することを目的とする。骨髄バンクとさい帯血バンクでの同意の得られた患者とドナーの試料を用い、精緻な最新の免疫学的手法により移植免疫反応に関与し臨床に有用な免疫遺伝情報を得る。日本人間の移植という遺伝学的に比較的均一な集団での多数症例を用いることにより初めて臨床的に意味のある HLA や非 HLA 遺伝子とその多型が明確になると考えられる。その手法として、次世代シーケンサによる HLA typing, genome wide association study (GWAS) の検証により得られた SNPs, 非 HLA 遺伝子多型、HLA ハプロタイプブロック、NK 細胞受容体遺伝子等を用いた。非血縁者間移植において、アリルレベルでの HLA 座の不適合は急性 GVHD, 慢性 GVHD, 移植片対白血病反応に関与しており、HLA 座ごとに異なっていた。HLA クラス II 抗原である HLA-DRB1 と DQB1 の不適合が相互に作用し急性 GVHD を生じていた。さらに、NGS を用いた HLA 検査法は実用化可能であることが明らかになり、数年以内に移植における HLA タイピング法として従来法に取って代わると考えられた。HLA 型や HLA ハプロタイプそのものの移植免疫反応に与える影響はドナーと患者の HLA 不適合による影響に匹敵していた。統合解析による non-HLA SNP 多型の多大な影響も明らかにされつつあり、これらの知見を本研究班が構築を目指している非血縁移植統合データベースに加えることにより、最適なドナー・さい帯血の選択がより精緻なものとなろう。

担当責任者

森島泰雄 愛知県がんセンター研究所研究員
笹月健彦 九州大学高等研究院特別主幹教授
森島聡子 藤田保健衛生大学医学部 講師
松尾恵太郎 九州大学大学院医学研究院教授
高見昭良 愛知医科大学医学部 教授
村田誠 名古屋大学医学部 講師
椎名隆 東海大学医学部基礎医学医系 分子生物学 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検査開発二係長
佐竹正博 日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター 副所長
一戸辰夫 広島大学原爆放射線医科学研究所 教授
小川誠司 京都大学大学院医学系研究科教授
鬼塚真仁 東海大学医学部 講師

A. 研究目的

我が国において日本骨髄バンクを介した非血縁者間移植は 2013 年までに 16,409 例、さい帯血バンクを介したさい帯血移植は 10,398 例実施されているが、重症 GVHD や移植片の拒絶など移植合併症が生じ、その成績は満足すべきものではない。移植免疫反応にドナー（さい帯血）と患者の HLA 抗原・アレルの適合度が関与していることがこれまでの厚労省組織適合性研究班解析により次第に明らかになってきた。しかし、移植免疫反応や患者の予後の予測、治療法の選択に用いられているデータベースは主に患者とドナー・さい帯血の HLA 型の適合度だけが免疫遺伝情報として用いられている。本研究の目的は、最新の免疫学的手法で得られるより詳細な HLA 型や HLA 型以外の免疫遺伝学的知見と臨床情報を統合した非血縁移植データベースを構築・解析する

ことにより、適切なドナー選択、治療法選択のアルゴリズムを確立し、非血縁移植成績の向上に資することである。

骨髄バンクとさい帯血バンクでは同意の得られた患者とドナーの試料が多数蓄積されており（非血縁者間移植約 9000 ペアー、さい帯血移植ペアー約 3000 ペアー）、先ず 2014, 15 年度にはこれらの DNA を用いた精緻な最新の免疫学的手法により移植免疫反応に関与し臨床に有用な免疫遺伝情報を得ることを目的とする。その手法として、次世代シーケンサによる HLA typing, genome wide association study (GWAS) の検証により得られた SNPs, 非 HLA 遺伝子多型、HLA ハプロタイプブロック、NK 細胞受容体遺伝子等を用いる。2016 年度には得られた情報を包括的に挿入した免疫遺伝情報共有試料ファイルを構築し、個別化された患者の情報（年齢、疾患、病期、HLA 型など）に基づくドナー・さい帯血の選択を可能にすることを目的とする。

日本人間の移植という遺伝学的に比較的均一な集団で一万例を超える症例を用いることにより初めて臨床的に意味のある HLA や非 HLA 遺伝子とその多型が明確になると考えられ、世界に先駆けて非血縁移植におけるドナー（さい帯血）選択に応用できることが期待できる。さらに、本研究でさい帯血移植での同様な免疫遺伝情報を解析し共有することにより両移植の詳細な移植選択アルゴリズムの確立を可能にする。

B. 研究方法 C. 結果

1) 超解像度 HLA タイピング (SS-SBT) 法の有用性評価と非血縁移植への応用

研究分担者椎名らが開発した Next

generation sequence 法による HLA 遺伝子解析は HLA アリルを 6 桁レベルで ambiguity(あいまいさ)がなく同定できる究極の HLA タイピング法である。造血細胞移植のドナー(さい帯血を含む)と患者の HLA タイピングに導入することを目的にしたデータを作成した。HLA 9 抗原 (HLA-A, -B, -C, DRB1/3/4/5, -DQB1, -DPB1) を日本骨髄バンクから得た 46 検体(日本人の HLA 型の 99.5%以上をカバー)について、新たな multiplex PCR 増幅法を加えタイピングした。その結果、既知のアリル型(4 桁)と一致するとともに、新たに 6 桁レベルで同定でき、さらに少量(1 μg genome DNA)で測定できることを検証できた。

2) HLA アリルタイピングに基づいたさい帯血移植データベースの構築

さい帯血移植における HLA 適合度の影響は非血縁骨髄移植とは質的に異なると考えられるが、HLA アリルレベルでの解析は十分になされていない。そこで、日本のさい帯血バンクとの共同研究として研究分担者・協力者の屋部・佐竹・柏瀬・東らを中心にして、さい帯血と患者の約 2000 ペアについて、HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DPB1 タイピングを完了した。現在、さい帯血移植におけるこれら抗原の適合度を解析中であるが、とくに-C, -DQB1, -DPB1 の報告は世界的になく、さい帯血移植における新発見となろう(論文投稿中)。

3) 非血縁者間骨髄移植における HLA クラス II 抗原適合の臨床的意義

日本骨髄バンクを介した非血縁者間移植におけるドナーと患者間の HLA 座の HLA アリルレベルでの違いが移植免疫反応(GVHD、移植片の生着、移植片対白血病(GVL)反応など)と生存に及ぼす影響の包括的解析は、厚労科

学研究班による後方視的な HLA タイピングに基づきなされ 1998 年、2002 年、2007 年に論文化され、その時々 HLA 適合度に基づくドナー選択の基盤となってきた。今年度 7898 症例の解析を実施することが出来た。その結果、HLA-A, -B, -C のアリルレベルの適合度の移植免疫反応に与える影響を確認するとともに、新たに HLA-DRB1 と DQB1 の両アリルのミスマッチがあると急性 GVHD と移植後死亡のリスクが相乗的に高くなること、ならびに HLA-A-DPB1 不適合の GVL 効果は慢性 GVHD 発症による GVL 効果と独立したものであることを見出した。これら成果は 2014 年 12 月に論文化された。今後の日本骨髄バンクのドナー選択に有用であろう(論文発表 1))

4) 移植免疫反応に関与するドナー/患者の HLA 領域遺伝子・ハプロタイプの同定

ドナーと患者間の HLA 座の適合度(前項 3)だけでなく、ドナーあるいは患者の HLA 抗原や、同一染色体上の HLA 抗原群からなる HLA ハプロタイプそのものが移植免疫反応に関与しているかどうかについて、非血縁骨髄移植 6967 ペアを、5%以上の頻度がある HLA アリル 43 個につき解析した結果、急性 GVHD で有意($p < 0.002$)に低率なアリルとして HLA-A*33:03, -C*14:03, -B*44:03, -DRB1*13:02, -DQB1*06:04 が同定され、これらはいずれも日本人で 2 番目に頻度の高い HLA ハプロタイプ P-2 に属していた。さらに急性 GVHD で高率なアリルとして HLA-B*51:01 と -C*14:02 が同定され、これらと連鎖するこの領域の HLA ハプロタイプから KIR2DL リガンドミスマッチとの関連が推測された。これらの GVHD 発症リスクは HLA 座ミスマッチに匹敵しており、非血縁ドナー選択に有用と考えられた。さら

に、今回の解析で同定された HLA アリルは自己免疫疾患関連遺伝子として報告されており、GVHDを生じさせる疾患遺伝子としての HLA の機能を明らかにできた（論文投稿中）。

5) 臨床的に有用な非 HLA 遺伝子多型の選択：臨床データとの関連解析

非血縁者間骨髄移植において、HLA 適合度は移植後の急性 GVHD を始め、臨床的な予後と関係があることが知られている。近年、非 HLA 領域の遺伝子多型が移植後の臨床経過と関連するとの報告が相次ぐが、いずれも散発的なものであり系統的な評価がなされていないのが現状である。本研究は、非血縁者間骨髄移植者のドナー・レシピエントの遺伝子多型が測定できるコホートを用いて、非 HLA 遺伝子多型による急性 GVHD 予測のための遺伝的リスクスコアを作成することを目的とした。コホートは HLA 完全一致群(n=391)と HLA DPB1 不一致群(n=960)を用いた。49の候補遺伝子多型をコンセンサスパネルにより選択し、その後統計学的な評価を行った上、aGVHD II-IV に関連するドナー遺伝子多型を6座、レシピエント遺伝子多型を5座決定した。それぞれに関してリスクアレルの総数によりリスクスコアを算出し、最終的に低・中等・高リスク群の3群の遺伝的リスクグループを決定した。HLA 完全一致群では、遺伝子的リスクグループは、aGVHD II-IV のみならず、aGVHD III-IV に関しても予測能を高めることが明らかとなった。一方、遺伝的リスクグループは、DPB1 不一致群における aGVHD の発生予測には十分な能力を持っていないことも明らかとなった。今後の別コホートを用いた検証が必要であるが、非 HLA 遺伝子多型が非血縁者間骨髄移植の aGVHD の予測に有効であり、ドナー選択に資する可能性を示した。

さらに、移植免疫反応や移植合併症に関与

する新規の遺伝子多型につき共有試料を用いて同定し、その機能解析を実施している。新規多型としてトロンボモジュリン遺伝子多型や CD53 多型が見出された。

GWAS により有意であると同定された遺伝子多型（昨年度まで）につき新たな共有試料を用いて検証している。

D. 考察

日本骨髄バンクを介した非血縁者間骨髄移植症例とそのドナーの移植免疫反応を HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 のアリルをすべて retyping した 7898 ペアーという均一な大規模コホートで解析することにより、非血縁者間移植における HLA 適合度の影響を生物学的に意義づけることが可能になった。

今年度明らかになった HLA クラス II 抗原である HLA-DRB1 と DQB1 の不適合が重なると急性 GVHD が生じ、移植後の生存が悪くなるという知見は新しいもので、HLA 座適合度や不適合数によるドナー選択に重要であることが示された。

また、両抗原が関与することによりはじめて重症急性 GVHD が生じるとすれば、GVHD の発症機序として複数の HLA 抗原の関与が考えられ、この知見は HLA クラス II の基礎的研究に寄与するものと考えられる。

さらに、NGS を用いた HLA 検査法は実用化可能であることが明らかになり、数年以内に移植における HLA タイピング法として従来法に取って代わると考えられた。HLA 型や HLA ハプロタイプそのものの移植免疫反応に与える影響はドナーと患者の HLA 不適合による影響に匹敵していた。統合解析による non-HLA SNP 多型の多大な影響も明らかにされつつあり、これらの知見を本研究班が構

築を目指している非血縁移植統合データベースに加えることにより、最適なドナー・さい帯血の選択がより精緻なものとなろう。

E. 結論

非血縁者間移植において、アレルレベルでの HLA 座の不適合は急性 GVHD, 慢性 GVHD, 移植片対白血病反応に関与しており、HLA 座ごとに異なっていた。HLA クラス II 抗原である HLA-DRB1 と DQB1 の不適合が相互に作用し急性 GVHD を生じることが明らかになり、ドナー選択アルゴリズムに導入可能な新知見である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Morishima Y, Kashiwase K, Matsuo K, Azuma F, Morishima S, Onizuka M, Yabe T, Murata M, Doki N, Eto T, Mori T, Miyamura K, Sao H, Ichinohe T, Saji H, Kato S, Atsuta Y, Kawa K, Kodera Y, Sasazuki T. Biological significance of HLA locus matching in unrelated donor bone marrow transplantation. *Blood*. 2015; 125(7):1189-1197.
2. Takami A, Yano S, Yokoyama H, Kuwatsuka Y, Yamaguchi T, Kanda Y, Morishima Y, Fukuda T, Miyazaki Y, Nakamae H, Tanaka J, Atsuta Y, Kanamori H. Donor lymphocyte infusion for the treatment of relapsed acute myeloid leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation:

a retrospective analysis by the Adult Acute Myeloid Leukemia Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 Nov;20(11):1785-90.

2) 学会発表

1. Yasuo Morishima, Koichi Kashiwase, Keitaro Matsuo, Fumihiko Azuma, Satoko Morishima, Makoto Onizuka, Toshio Yabe, Makoto Murata, Noriko Doki, Tetsuya Eto, Takehiko Mori, Koichi Miyamura, Hiroshi Sao, Tatsuo Ichinohe, Hiroo Saji, Shunichi Kato, Yoshiko Atsuta, Keisei Kawa, Yoshihisa Kodera, Takehiko Sasazuki. HLA matching and outcome of unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. The 19th Congress of the Asia-Pacific Blood and Marrow Transplantation. 2014年10月17日 杭州 中国
2. Shingo Suzuki, Yuki Ozaki, Atsuko Shigenari, Yuko Okudaira, Anri Masuya, Shigeki Mitsunaga, Masao Ota, Hidetoshi Inoko, Takashi Shiina. Development of the advanced super high resolution single molecule - sequence based typing (SS-SBT) method. The 28th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference (25-28 JUNE, 2014, Stockholm, Sweden)
3. Shingo Suzuki, Brett N. Bowman, Yuki Ozaki, Shigeki Mitsunaga, Hidetoshi Inoko, Swati Ranade, Takashi Shiina. Application of single molecule real-time

- (SMRT) sequencing technology for the field 4 level genotyping of classical HLA loci. The 40th Annual Meeting, the American Society for Histocompatibility & Immunogenetics (20-24 October, 2014, Denver, Colorado).
4. Yuki Ozaki, Shingo Suzuki, Atsuko Shigenari, Sayaka Ito, Yuko Okudaira, Anri Masuya, Shigeki Mitsunaga, Masao Ota, Hidetoshi Inoko, Takashi Shiina. Development of advanced NGS based HLA DNA typing method: SS-SBT. The 40th Annual Meeting, the American Society for Histocompatibility & Immunogenetics (20-24 October, 2014, Denver, Colorado).
 5. 森島泰雄、森島聡子、村田 誠、松尾恵太郎、諫田淳也、大橋一樹、福田隆浩、金森平和、吉田 均、熱田由子、一戸辰夫、神田善伸。HLA 適合血縁者間移植において GVHD の発症は移植後白血病再発に影響を与えるか。第 27 回日本造血細胞移植学会総会。2015 年 3 月 6 日 神戸
 6. 東 史啓、柏瀬 貢一、松尾 恵太郎、森島 聡子、屋部 登志雄、一戸 辰夫、佐治 博夫、熱田 由子、笹月 健彦、小寺 良尚、森島 泰雄、日本骨髓バンク「非血縁者間骨髓移植における、各 HLA 座のアリルレベル適合の影響の解析」 第 23 回日本血組織適合性学会大会 (2014 年 9 月、長崎市)
 7. 大原裕子、小野あいこ、東史啓、屋部登志雄、武田直也、宮城徹、柏瀬貢一、大村和代、鈴木雅治、佐竹正博、森島泰雄、中島一格 「データベース作成のための臍帯血移植患者および臍帯血検体の収集と HLA タイピング」 第 23 回日本血組織適合性学会大会 (2014 年 9 月、長崎市)
 8. 屋部登志雄、東史啓、柏瀬貢一、折原武、矢部普正、橋本正美、松本加代子、甲斐俊朗、森鉄男、大村和代、鈴木雅治、高梨美乃子、佐竹正博、森島泰雄、中島一格 「臍帯血移植組織適合性共同研究グループの立ち上げと進捗状況」 第 38 回日本血液事業学会総会 (2014 年 10 月、広島市)
 9. 鈴木進悟、尾崎有紀、榎屋安里、重成敦子、光永滋樹、猪子英俊、椎名 隆。超高精度次世代シーケンス用アリル判定プログラム (SeaBass) の開発とその検証。日本組織適合性学会第 23 回大会 (2014 年 9 月 13 日～15 日、長崎県長崎市)。
 10. 榎屋安里、鈴木進悟、尾崎有紀、森島聡子、森島泰雄、猪子英俊、椎名隆。縁間造血幹細胞移植ドナー/患者ペアを用いた HLA 遺伝子全領域の SS-SBT と移植成績との関連性。日本組織適合性学会第 23 回大会 (2014 年 9 月 13 日～15 日、長崎県長崎市)。
 11. 尾崎有紀、柏瀬貢一、鈴木進悟、重成敦子、伊藤さやか、奥平裕子、榎屋安里、屋部登志雄、東史啓、光永滋樹、猪子英俊、森島泰雄、椎名隆。骨髓移植前保存ドナー検体を用いた PCR-SSOP 法と SS-SBT 法による DNA タイピング検査の比較と検証。日本組織適合性学会第 23 回大会 (2014 年 9 月 13 日～15 日、長崎県長崎市)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
なし

厚生労働科学研究委託費 難治性疾患等実用化研究事業
(免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 移植医療技術開発研究分野)

委託業務成果報告
(免疫遺伝情報に基づく非血縁移植統合データベースの構築と最適なドナー・さい帯血の選択)

HLAクラスII適合度の移植免疫反応への影響に関する研究

担当責任者 森島 泰雄 愛知県がんセンター研究所 研究員
担当責任者 笹月 健彦 九州大学高等研究院 教授
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

研究要旨: 日本骨髄バンクを介した非血縁者間骨髄移植症例とそのドナーの移植免疫反応を HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 のアリルをすべて **retyping** した 7898 ペアという均一な大規模コホートで解析することにより、非血縁者間移植における HLA 適合度の影響を生物学的に意義づけることが可能になった。

非血縁者間移植において、アリルレベルでの HLA 座の不適合は急性 GVHD、慢性 GVHD、移植片対白血病反応に関与しており、HLA 座ごとにその影響は異なっていた。HLA クラスII 抗原である HLA-DRB1 と DQB1 の不適合が相互に作用し急性 GVHD を生じることが明らかになり、HLA 座適合度や不適合数によるドナー選択アルゴリズムとして重要であることが示された。

A. 研究目的

組織適合性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-DRB1 と DQB1 の適合度の移植免疫反応への影響を詳細に検討し、HLA クラスII に基づくドナー選択のアルゴリズムを導入するための基盤データを構築することを目的にした。

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～2010 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 アリルが **retyping** されたドナー・患者ペアで、以下の基準を満たす症例を選択した。1) 上記ドナーと患者の HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 アリルが同定されている。2) GVHD 予防法として T 細胞非除去法、ATG 未使用例。3) 移植後 7 日以上生存例 4) 日本人間移植該当 7898 ペアを解析した。症例の詳細を表 1 に示した。年代別の内訳は 1993 年-2000 年 2331 症例、2001 年-2005 年 3084 症例、

2006年-2010年 2503 症例であった。

統計：Competing risk Cox regression model を用い臨床因子と他の HLA 座の適合度を cofounder として調整した。Kaplan-Mire 生存解析を用いた。

(倫理面への配慮：本研究は愛知県がんセンターヒトゲノム遺伝子倫理審査委員会ならびに日本骨髄バンクの承認を得て実施している。)

C. 研究結果

1. アリルレベルでのHLA座の不適合と移植免疫反応。

有意 ($p < 0.01$) を示したのは、3度以上の急性 GVHD が HLA-A, B, C, DPB1、慢性 GVHD が HLA-C、白血病再発が HLA-C, DPB1 であった。

2. HLA-DRB1 と DQB1 の不適合と急性GVHD、移植後死亡解析（層別化解析） （表 2）

HLA-DRB1 あるいは DQB1 単独の不適合では急性 GVHD の発症に影響を与えてないが、HLA-DRB1 と DQB1 両者の不適合があると有意に急性 GVHD の頻度が高くなり、移植後の死亡率は高くなった。

3. HLA 座の不適合（1アリル）数と移植後の生存曲線（図 1、図 2）

HLA-DRB1 と DQB1 両者の不適合がある場合に 1 アリル不適合として不適合数別の生存曲線は、図 1 に示すように不適合数が増すにつれて移植後の生存率は明らかに低下していた。

HLA-DRB1 と DQB1 の不適合を各々単独の不適合とすると、図 2 に示すように 1 座から 3 座不適合の曲線が重なり、HLA 座の不適合数により生存曲線の違いを示すことは難し

かった。

D. 考察

日本骨髄バンクを介した非血縁者間骨髄移植症例とそのドナーの移植免疫反応を HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 のアリルをすべて retyping した 7898 ペアという均一な大規模コホートで解析することにより、非血縁者間移植における HLA 適合度の影響を生物学的に意義づけることが可能になった。

今年度明らかになった HLA クラス II 抗原である HLA-DRB1 と DQB1 の不適合が重なると急性 GVHD が生じ、移植後の生存が悪くなるという知見は新しいもので、HLA 座適合度や不適合数によるドナー選択に重要であることが示された。

また、両抗原が関与することによりはじめて重症急性 GVHD が生じるとすれば、GVHD の発症機序として複数の HLA 抗原の関与が考えられ、この知見は HLA クラス II の基礎的研究に寄与するものと考えられる。

E. 結論

非血縁者間移植において、アリルレベルでの HLA 座の不適合は急性 GVHD、慢性 GVHD、移植片対白血病反応に関与しており、HLA 座ごとに異なっていた。HLA クラス II 抗原である HLA-DRB1 と DQB1 の不適合が相互に作用し急性 GVHD を生じることが明らかになり、ドナー選択アルゴリズムに導入可能な新知見である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

- 1: Morishima Y, Kashiwase K, Matsuo K, Azuma F, Morishima S, Onizuka M, Yabe T, Murata M, Doki N, Eto T, Mori T, Miyamura K, Sao H, Ichinohe T, Saji H, Kato S, Atsuta Y, Kawa K, Kodera Y, Sasazuki T. Biological significance of HLA locus matching in unrelated donor bone marrow transplantation. *Blood*. 2015; 125(7):1189-1197.
- 2: Kanda J, Ichinohe T, Fuji S, Maeda Y, Ohashi K, Fukuda T, Miyamura K, Iwato K, Eto T, Nakamae H, Kobayashi N, Mori T, Mori S, Morishima Y, Atsuta Y, Kanda Y; HLA Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Impact of HLA Mismatch Direction on the Outcome of Unrelated Bone Marrow Transplantation: A Retrospective Analysis from the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Feb;21(2):305-11.
- 3: Takami A, Yano S, Yokoyama H, Kuwatsuka Y, Yamaguchi T, Kanda Y, Morishima Y, Fukuda T, Miyazaki Y, Nakamae H, Tanaka J, Atsuta Y, Kanamori H. Donor lymphocyte infusion for the treatment of relapsed acute myeloid leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective analysis by the Adult Acute Myeloid Leukemia Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 Nov; 20(11):1785-90.
- 4: Mizuta S, Matsuo K, Nishiwaki S, Imai K, Kanamori H, Ohashi K, Fukuda T, Onishi Y, Miyamura K, Takahashi S, Onizuka M, Atsuta Y, Suzuki R, Morishima Y, Kato K, Sakamaki H, Tanaka J. Pretransplant administration of imatinib for allo-HSCT in patients with BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2014 Apr 10;123(15):2325-32.
- 2) 学会発表
1. Yasuo Morishima, Koichi Kashiwase, Keitaro Matsuo, Fumihiro Azuma, Satoko Morishima, Makoto Onizuka, Toshio Yabe, Makoto Murata, Noriko Doki, Tetsuya Eto, Takehiko Mori, Koichi Miyamura, Hiroshi Sao, Tatsuo Ichinohe, Hiroo Saji, Shunichi Kato, Yoshiko Atsuta, Keisei Kawa, Yoshihisa Kodera, Takehiko Sasazuki. HLA matching and outcome of unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. The 19th Congress of the Asia-Pacific Blood and Marrow Transplantation. 2014年10月17日 杭州 中国
2. 森島泰雄、森島聡子、村田 誠、松尾恵太郎、諫田淳也、大橋一樹、福田隆浩、金森平和、吉田 均、熱田由子、一戸辰夫、神田善伸。HLA 適合血縁者間移植において GVHD の発症は移植後白血病再発に影響を与えるか。第 27 回日本造血細胞移植学会総会。2015 年 3 月 6 日 神戸
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
なし

表 1. 患者とドナーの特徴

HLA locus matching match / mismatch -no (%)	
HLA-A	7048(89) / 850(11)
HLA-B	7475(95) / 423(5)
HLA-C	5565(70) / 2333(30)
HLA-DRB1	5878(74) / 2020(26)
HLA-DQB1	5681(72) / 2217(28)
HLA-DPB1	2604(33) / 5294(67)
Patient age - year	
Median (Range)	35 (0 - 77)
Donor age - year	
Median (Range)	34 (20 - 56)
Disease - no (%)	
Acute lymphoblastic leukemia	1861(24)
Acute myeloblastic leukemia	2609(33)
Chronic myeloid leukemia	983(12)
Myelo-dysplastic syndrome	841(11)
Other leukemia	312(4)
Lymphoid malignancy	542(7)
Aplastic anemia	489(6)
Multiple myeloma	33(<1)
Others	228(3)
GVHD prophylaxis - no (%)	
Cyclosporine based	3078(39)
Tacrolimus based	4779(61)
Others	41(<1)
Leukemia risk - no (%)	
Standard	2508(32)
High	2772(35)
N/A	2618(33)
Conditioning - no (%)	
Myeloablative	6653(84)
Reduced intensity	1245(16)
Sex matching (donor to patient) - no (%)	
Female to Male	1494(19)

Male to Male	3253(41)
Female to Female	1442(18)
Male to Female	1709(22)
Transplanted year period - no (%)	
1993 - 2000	2311(29)
2001 - 2005	3084(39)
2006 - 2010	2503(32)

表 2. HLA-DRB1 と HLA-DQB1 適合度の 急性 GVHD と死亡に関する層別化解析

HLA matching*	N	Acute GVHD (grade III - IV) **				Acute GVHD (grade II - IV) **				Mortality **		
		RR	[95% CI]	P	RR	[95% CI]	P	RR	[95% CI]	P		
DRB1 match and DQB1 match	5,356	1.00				1.00				1.00		
DRB1 mismatch and DQB1 match	325	0.98	0.74 1.28	0.866	1.19	1.00 1.42	0.046	1.04	0.88 1.22	0.662		
DRB1 match and DQB1 mismatch	522	0.92	0.73 1.16	0.482	1.05	0.91 1.21	0.517	1.04	0.92 1.19	0.532		
DRB1 mismatch and DQB1 mismatch	1,695	1.32	1.16 1.50	<0.001	1.34	1.23 1.46	<0.001	1.17	1.08 1.27	<0.001		

RR: relative risk. CI: confidence interval, *GVH direction ** survived 7 or more days

Multivariable competing risk regression 解析

図1 HLA-A, B, C, DRB1+DQB1適合数と生存 (各座1アレル不適合を選択)

DRB1+DQB1: DRB1 と DQB1 の両座に不適合がある場合に1アレル不適合とした。

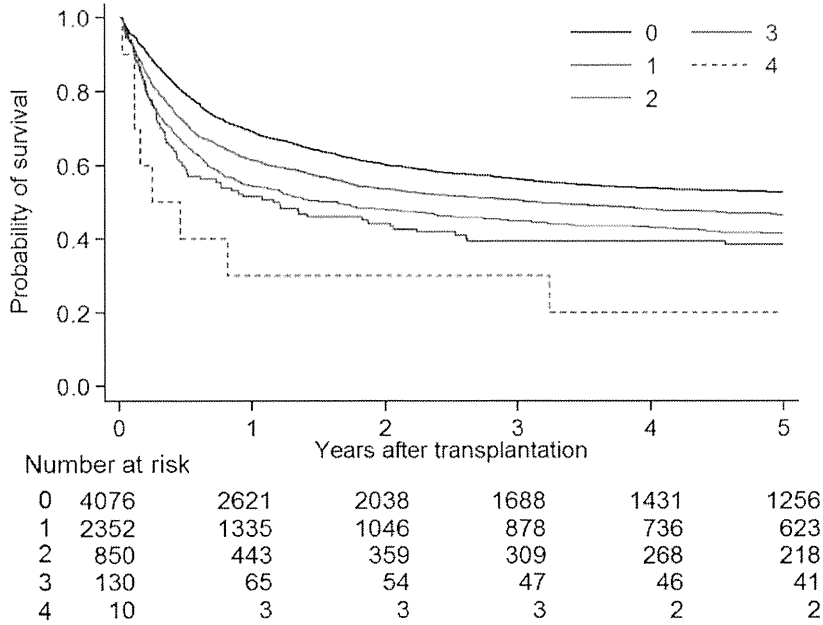
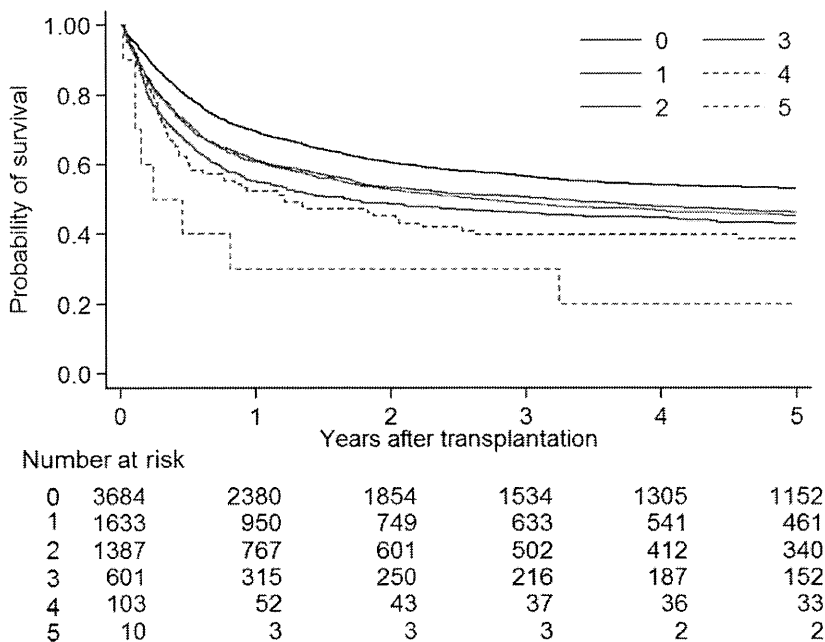


図2. HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 適合数と生存 (各座1アレル不適合を選択)



委託業務成果報告

(免疫遺伝情報に基づく非血縁移植統合データベースの構築と最適なドナー・さい帯血の選択)

非血縁者間骨髄移植におけるHLAアレル、HLAハプロタイプに基づく急性GVHDの解析

担当責任者 森島 聡子 藤田保健衛生大学医学部血液内科学 講師

研究要旨：

非血縁者間骨髄移植が施行され、HLA アレルのリタイピングが施行された患者とドナー6967例のHLAアレルデータ及び臨床データを用いて、患者及びドナーのHLAアレルやハプロタイプそのものと移植後の急性GVHDの関連を解析した。頻度が5%以上あった43アレルの中で、患者とドナーのHLA-A*33:03, -C*14:03, -B*44:03, -DRB1*13:02, -DQB1*06:04は有意に急性GVHD 2-4度のリスクが低いことと関連し、この5つのアレルが属する日本人で2番目に頻度の高いハプロタイプも同様な関連を示した。一方、患者とドナーのHLA-B*51:01と患者のHLA-C*14:02は有意に急性GVHD 3-4度のリスクが高いことと関連した。患者とドナーのHLAアレルの適合性だけではなく、患者あるいはドナーのHLAアレルやハプロタイプそのものが移植後の同種免疫反応と関連することが示された。有意な関連を示したアレルやハプロタイプは、自己免疫疾患との関連が報告されており、自己免疫や同種免疫のメカニズムを考える上で示唆に富む結果と考えられた。

A. 研究目的

HLA 領域には免疫と関連した遺伝子が集中して存在し、自己免疫疾患、感染症、悪性腫瘍などの疾患感受性との関連が数多く報告され、HLAアレルやHLAハプロタイプそのものと疾患との関連性の報告も多い。一方、同種造血幹細胞移植においては急性GVHDとドナーと患者のHLA適合度の関連は重要であるが、患者やドナーのHLAアレルやHLAハプロタイプそのものに由来する遺伝学的背景因子との関連は明らかではない。本研究は、非血縁者間骨髄移植におけるHLAアレルやハプロタイプが急性GVHDに及ぼす影響を解析した。

B. 研究方法

1993年から2010年の間に日本骨髄バン

ク(JMDP)を介してT細胞非除去の骨髄移植が行われた患者とドナーでHLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DPB1アレルのリタイピングが行われた6967ペアで解析を行った。頻度が5%以上のアレルを選択し、アレルが陽性のグループの急性GVHDのリスクを陰性のグループと比較した。統計解析に関しては、competing risk regression modelを用い、GVHDに影響を及ぼす様々な臨床因子と各アレルのGVHD方向のミスマッチを変数に含めて調整した。

C. 研究結果

頻度が5%以上のアレルはHLA-A 7、-B 8、-C 8、-DRB1 7、-DQB1 8、-DPB1 5の43アレルであった。Bonferroni法に基づき、 $P < 0.0016$ を統計学的有意差と判定した。

1) 急性 GVHD のリスクが低いことと関連するアリル

患者とドナーの HLA-A*33:03, -C*14:03, -B*44:03, -DRB1*13:02, -DQB1*06:04 は有意に急性 GVHD 2-4 度のリスクが低いことと関連した (表 1)。この 5 つのアリルは日本人で 2 番目に頻度の高い HLA ハプロタイプに (HP-P2) に属しており、HP-P2 が急性 GVHD 2-4 度に及ぼす影響はこれらのアリルと同様な結果であった (患者: HR, 0.82; P=0.001、ドナー: HR, 0.81; P<0.001) (図 1)。

2) 急性 GVHD のリスクが高いことと関連するアリル

患者及びドナーの HLA-B*51:01 は有意に急性 GVHD 3-4 度のリスクが高いことと関連した (患者: HR, 1.37; P<0.001, ドナー: HR, 1.35; P<0.001) (表 1、図 2)。患者の HLA-C*14:02 は有意に急性 GVHD 3-4 度のリスクが高いことと関連したが (HR, 1.35; P<0.001)、ドナーの HLA-C*14:02 は有意な関連を認めなかった。HLA-B*51:01 と -C*14:02 は強い連鎖不平衡を示し、患者の HLA-C*14:02-B*51:01 ハプロタイプも同様なリスクとの関連を認め、特に killer-cell immunoglobulin-like receptor 2DL1 ligand が GVH 方向にミスマッチのペアで著明であった。

D. 考察

急性 GVHD のリスクが低いことと関連した HP-P2 は最近日本人の自己免疫性甲状腺炎への抵抗性と関連することが報告されている。一方、急性 GVHD のリスクが高いことと関連した HLA-B*51:01 は、ベーチェット病の疾患感受性との関連が数多く

報告されており、自己免疫反応と同種免疫反応を増強あるいは抑制する効果が共通の HLA アリルと関連している可能性が考えられ、発症のメカニズムを解明する上で示唆に富む結果である。これまで、HLA 領域内の TNF- α や MICA など非 HLA 遺伝子の多型が移植の成績と関連するという報告もあり、今回有意に出てきたアリルやハプロタイプと連鎖不平衡にある領域の多型との関連も今後解析を進めていく予定である。臨床的には、患者やドナーの HLA アリルやハプロタイプそのものが急性 GVHD のリスクを予測する因子として有用となる可能性もある。

E. 結語

非血縁者間骨髄移植において、患者とドナーの HLA アリルの適合性だけではなく、患者あるいはドナーの HLA アリルやハプロタイプそのものが移植後の同種免疫反応と関連することが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Morishima S, Nakamura S, Yamamoto K, Miyauchi H, Kagami Y, Kinoshita T, Onoda H, Yatabe Y, Ito M, Miyamura K, Nagai H, Moritani S, Sugiura I, Tsushita K, Mihara H, Ohbayashi K, Iba S, Emi N, Okamoto M, Iwata S, Kimura H, Kuzushima K, Morishima Y. Increased T-cell responses to Epstein-Barr virus with high viral load in patients with

Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2014;1-7.

2. Fuji S, Kanda J, Kato S, Ikegame K, Morishima S, Miyamoto T, Hidaka M, Kubo K, Miyamura K, Ohashi K, Kobayashi H, Maesako Y, Adachi S, Ichinohe T, Atsuta Y, Kanda Y; HLA Working Group of Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation.. Impact of HLA allele mismatch on the clinical outcome in serologically matched related hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49(9):1187-1192.

3. Morishima Y, Kashiwase K, Matsuo K,

Azuma F, Morishima S, Onizuka M, Yabe T, Murata M, Doki N, Eto T, Mori T, Miyamura K, Sao H, Ichinohe T, Saji H, Kato S, Atsuta Y, Kawa K, Kodera Y, Sasazuki T, Japan Marrow Donor P. Biological significance of HLA locus matching in unrelated donor bone marrow transplantation. *Blood*. 2015;125(7):1189-1197.

2) 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

表 1: 有意に急性 GVHD と関連を認めた HLA アリル

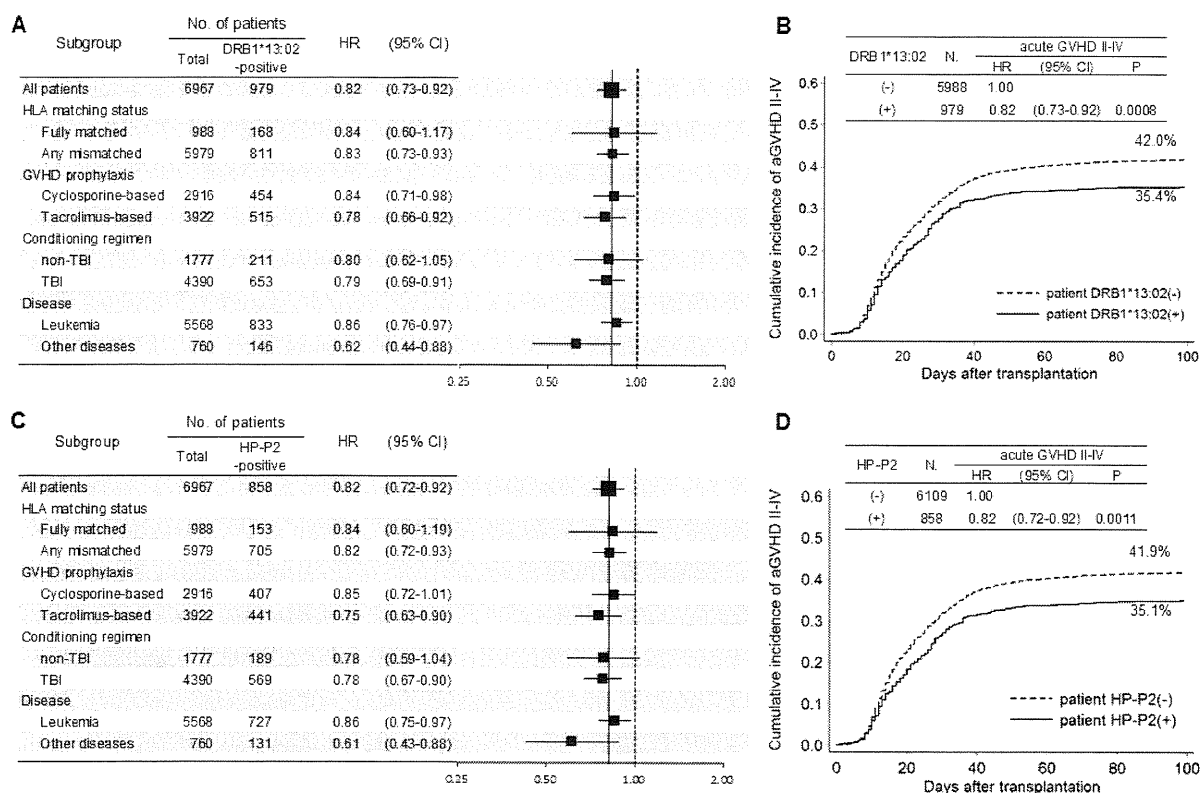
HLA allele [†]	N [‡]	(%)	Grades II-IV			Grades III-IV		
			HR [§]	(95% CI)	P	HR [§]	(95% CI)	P
<i>HLA alleles associated with decreased risk of acute GVHD</i>								
Patient								
A*33:03	1,094	(16)	0.83	(0.74-0.92)	0.0007	0.82	(0.82-0.69)	0.0256
B*44:03	1,041	(15)	0.82	(0.74-0.92)	0.0006	0.79	(0.66-0.94)	0.0086
C*14:03	1,041	(15)	0.82	(0.74-0.92)	0.0004	0.79	(0.66-0.94)	0.0087
DRB1*13:02	979	(14)	0.82	(0.73-0.92)	0.0008	0.82	(0.68-0.99)	0.0308
DQB1*06:04	933	(13)	0.82	(0.73-0.92)	0.0007	0.81	(0.67-0.98)	0.0305
Donor								
A*33:03	1,094	(16)	0.83	(0.74-0.92)	0.0007	0.82	(0.69-0.98)	0.0256
B*44:03	1,041	(15)	0.83	(0.74-0.92)	0.0007	0.80	(0.67-0.96)	0.0173
C*14:03	1,040	(15)	0.83	(0.74-0.92)	0.0008	0.80	(0.67-0.95)	0.0137
DRB1*13:02	982	(14)	0.83	(0.74-0.93)	0.0011	0.84	(0.70-1.01)	0.0599
DQB1*06:04	935	(13)	0.82	(0.73-0.92)	0.0010	0.83	(0.69-1.00)	0.0446
<i>HLA alleles associated with increased risk of acute GVHD</i>								
Patient								
B*51:01	1,058	(15)	1.14	(1.03-1.26)	0.0111	1.37	(1.19-1.59)	<0.0001
C*14:02	860	(12)	1.13	(1.02-1.26)	0.0222	1.35	(1.15-1.58)	0.0002
Donor								
B*51:01	1,079	(15)	1.14	(1.03-1.25)	0.0110	1.35	(1.17-1.55)	0.0001

[†] HLA alleles associated with reduced or increased risk of grades II-IV or grades III-IV acute GVHD (after Bonferroni correction: $\alpha=0.05$, $n=43$, $P<0.00116$).

[‡] Number of HLA allele-positive donors or patients.

[§] HR (hazard ratio) indicates comparison of the specific HLA allele-positive group to -negative group adjusted for clinical factors and HLA allele matching as listed in Table 1.

図 1: 患者の HLA-DRB1*13:02 と HLA-A*33:03-C*14:03-B*44:03-DRB1*13:02-DQB1*06:04 ハプロタイプ (HP-P2) の急性 GVHD 2-4 度に及ぼす影響



- (A) 患者の HLA-DRB1*13:02 が急性 GVHD 2-4 度に及ぼす影響を示す (competing risk regression model)。
 (B) HLA-DRB1*13:02 が陽性と陰性の患者における急性 GVHD 2-4 度の cumulative incidence を示す。
 (C) 患者の HP-P2 が急性 GVHD 2-4 度に及ぼす影響を示す (competing risk regression model)。
 (D) HP-P2 が陽性と陰性の患者における急性 GVHD 2-4 度の cumulative incidence を示す。