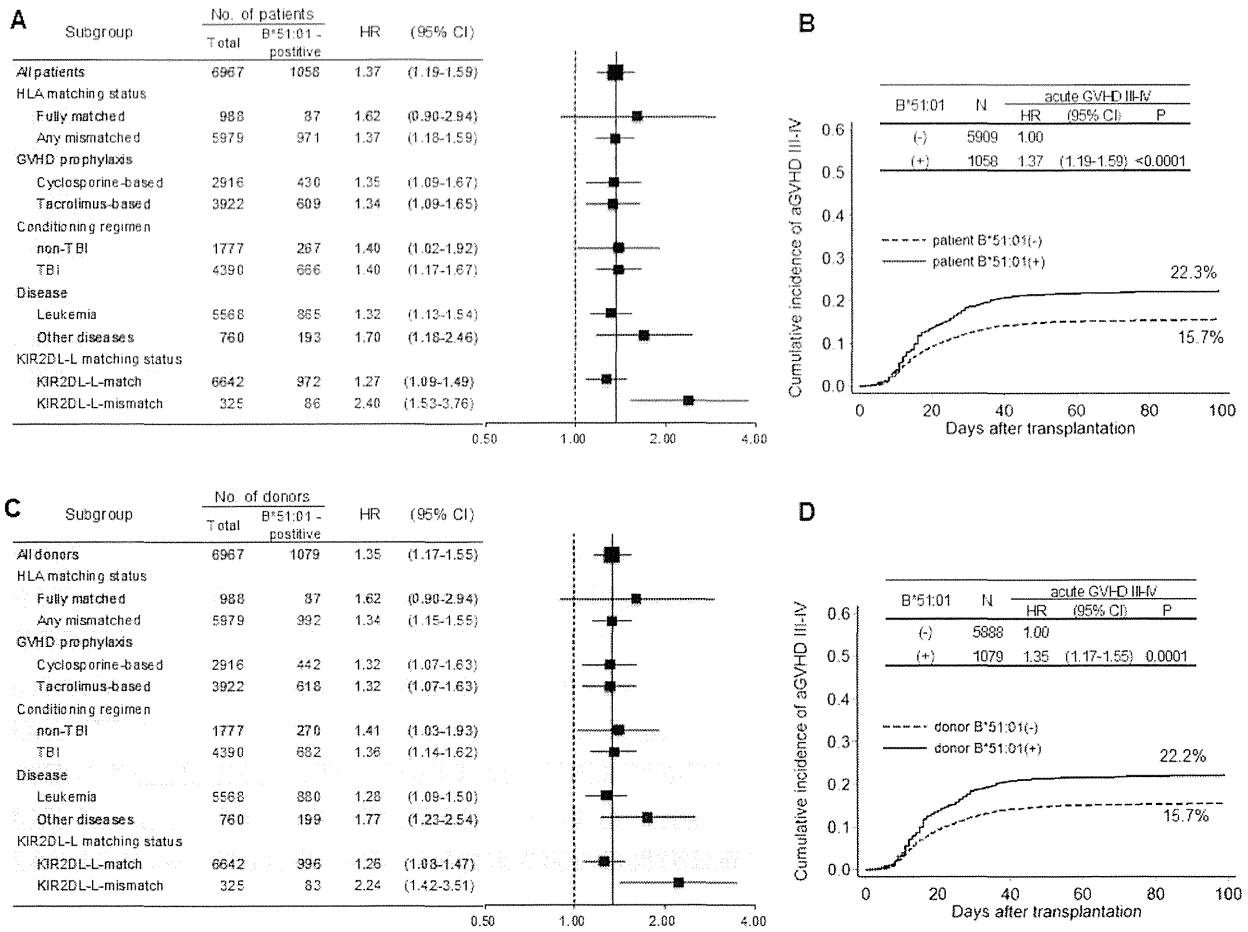


図 2: 患者とドナーの HLA-B*51:01 が急性 GVHD 3-4 度に及ぼす影響



(A) 患者の HLA-B*51:01 が急性 GVHD 2-4 度に及ぼす影響を示す (competing risk regression model)。

(B) HLA-B*51:01 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) ドナーの HLA-B*51:01 が急性 GVHD 2-4 度に及ぼす影響を示す (competing risk regression model)。

(D) HLA-B*51:01 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。

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HLA遺伝子多型の統合解析

担当責任者 松尾恵太郎 九州大学大学院医学研究院 教授

研究要旨

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、遺伝的リスクグループは、aGVHD II-IV のみならず、aGVHD III-IV につい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 不一致群においける 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。

A. 研究目的

非血縁者間の造血細胞移植において、HLA 領域の適合度がその急性 GVHD (aGVHD)、慢性 GVHD (cGVHD)、生存などの臨床上的アウトカムに大きな影響を与えることが知られており、実地医療におけるドナー選択に利用されるに至っている。近年の遺伝子多型と造血細胞移植予後との検討において、サイトカイン関連遺伝子などの数多くの遺伝子の多型性が、予後に影響を与えることが報告されているが、いずれも散発的な報告にとどまり、ドナー選択に有用な情報になるには至っていないのが現状である。本検討では、日本人における大規模な非血縁者間

骨髄移植の臨床データとその生体試料にて測定された、遺伝子多型情報を用い、ドナー選択に貢献しうる情報を構築することを目的とする。

B. 研究方法

本研究の研究デザインは前向きコホート研究である。コホート対象集団は、1993～2005 年の間に日本骨髄移植推進財団を経由して非血縁骨髄移植を実施された 1407 名である。本コホート集団は HLA の遺伝子型適合度により二つの集団に分けられる。① HLA A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 遺伝子型完全適合ペア (n=409)、② HLA A, B, C, DRB1, DQB1 一致

例 (DPB1 不適合例、n=998)。うち、臨床情報、aGVHD 発生情報、生体試料に欠損のない①391 ペア、②960 ペアを解析対象集団とする。

検討対象遺伝子多型は、研究班に属する造血細胞移植の専門家パネルによるコンセンサスに基づき決定した。パネル参加研究者は、候補となる遺伝子多型を、既存の臨床的検討において統計学的に有意な関連を示したをパネルに提示した。候補より、パネル内で合意の得られた 49 遺伝子多型(表1)を検討対象とした。

検討対象遺伝子多型の遺伝子型の決定は、対象となるドナー、レシピエントのペア DAN に対して、TaqMan 法(LifeTechnology 社)あるいは SNPTYPE 法 (Fluidigm)を用いて行った。

本件等の primary endpoint は aGVHD II-IV とした。解析は、個々の遺伝子多型の意義は、ドナーとレシピエント別に Cox 比例ハザードモデル (Bootstrap 法 1000 回繰返し)により、患者年齢、ドナー年齢、ドナーの性、ドナー・レシピエント間の性の違い、診断名、移植リスク、GVHD 予防法、前処置、移植年を調整して検討した。遺伝子多型は、per-allele model による検討とした。本検討結果を基に、minor allele 頻度が10%を越え、かつ per-allele model による P 値が 0.20 を満たすものを、49遺伝子多型より選択し、遺伝的リスクスコアに組み入れる対象の遺伝子多型とした。近接する遺伝子多型間で連鎖不平衡が強い場合は関連のより強い方を採用することとした。リスクスコアは、aGVHD II-IV が増えるアレルの合計本数という形で計算した。最終統計モデルで安定した結果を得るため、リスクスコアは3つの遺伝的リスクグループに分けて検討を行った。

各コホートに対して行う解析は下記の通りである。

1. コホート①において遺伝的リスクグループを含めた、aGVHD II-IV 予測モデルを構築し、遺伝的リスクグループを考慮した場合と考慮しなかった場合のリスク予測能を ROC 解析の Harrel's C(AUC 値)にて検討した。
2. コホート②に対して、コホート①で構築した予測

モデルによる予測を行い、その ROC 解析を行う。

3. コホート①、②を全て含めたデータを用い、①群と②群の異質性を検討する。

(倫理面での配慮)

愛知県がんセンターのヒトゲノム倫理審査委員会により承認済みである。

C. 研究結果

表 2 に対象者の特性を示す。背景疾患はコホート①、②ともに悪性疾患が主体である。骨髄非破壊的移植はコホート②で多くなっている。

表3に、コホート①を対象としたドナーの49遺伝子多型の per-allele model によるハザード比を示す。Minor allele の頻度、P 値、近傍に位置する遺伝子多型との連鎖不平衡を考慮した上でリスクスコアに採用された遺伝子多型は、rs3087243(CTLA4 遺伝子)、rs396991 (FCGR3A 遺伝子)、rs3764653 (HMHA1 遺伝子)、rs7975232(VDR 遺伝子)、LCE3C 遺伝子、rs1800871 (IL10 遺伝子)であった。これらを元に、リスクアレル数の和をリスクスコアとした。

表4にはコホート①を対象としたレシピエントの49遺伝子多型の per-allele model によるハザード比を示す。前記と同様の基準に基づいて選択されたのは、rs3764653(HMMA1 遺伝子)、GSTM1 多型、GSTT1 多型、rs1800871(IL10 遺伝子)、rs2834167(IL10RB 遺伝子)であった。同様にリスクスコアをリスクアレル数に基づき算出した。

表5左上部に、コホート①における表3に基づき作成したリスクスコアに基づく遺伝的リスクグループ(低リスク:アレル数0~4, 中程度:アレル数5~6, 高リスク:アレル数7以上)による aGVHD II-IV, III-IV に対するハザード比を示す。aGVHD II-IV に関するハザード比は、中程度群で 1.45, 高リスク群で 2.53 で、傾向有意も統計学的に有意であった。この関連は aGVHD III-IV でも同じように認められ、コホート①ではドナーの aGVHD II-IV に関する遺伝的リスクグループの aGVHD 発症に関する関連が明らかであった。

本関連を aGVHD II-IV, III-IV に関する累積罹患率で示したのが図1である。一方、DPB1 不一致の非血縁者間骨髄移植コホートであるコホート②においては(表5右上)、コホート①で認めた関連が全く認められなかった。

表5左下に、レシピエントにおける遺伝的リスクグループの関連を示す。aGVHD II-IV に関しては有意な関連を示したものの、aGVHD III-IV では明確な関連とは言いがたかった。コホート②においても同様に、明確な関連は認めなかった。

最後に ROC 解析の結果を示す。表5にて網掛を行っている部分は、遺伝的リスクグループを考慮することが、考慮しなかった場合よりも AUC (Harrell's C) が大きくなっていった。HLA 完全一致コホートにおいては、本検討のような遺伝的リスクグループが有効に aGVHD 発生の予測に使える可能性を示したものと考えられる。

D. 考察

本研究は、日本人の非血縁者間骨髄移植集団を対象に、ドナー・レシピエントの遺伝子多型から遺伝的リスクスコアを算出し、移植予後に対するドナー選択につながる知見を出すことを目的に実施された。

その結果、HLA 完全一致の非血縁者間骨髄移植においては、aGVHD II-IV リスクに関する遺伝的リスクスコアが、aGVHD II-IV のみならず、aGVHD III-IV の予測に資する可能性を示すことができた。

一方この関連は、HLA DPB1 不一致の移植においては全く関連を見せていない。この背景には二つ大きな理由が考えられる。一つ目は、HLA DPB1 不一致な条件下では、遺伝的リスクスコアの影響は消えてしまう可能性が考えられる。もう一つは、HLA 完全一致例で認められた関連が偶然である可能性である。後者は Bootstrap 法などの内的妥当性を確保する解析の結果としての遺伝的リスクグループであることから、可能性が低いと考えられるが、将来的に HLA 完全一致の別の集団において検証することが必要であろうと考えられる。

E. 結論

本研究により、ドナーにおける特定の遺伝子多型を用いた遺伝的リスクグループ(あるいは遺伝的リスクスコア)が、非血縁者間骨髄移植後の aGVHD の予測に役立つ可能性を示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(特になし)

2. 学会発表

(特になし)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特に無し

表1. 本研究において検討対象となった遺伝子多型一覧

遺伝子名	染色体、ポジション	アリル	遺伝子座の機能	アミノ酸置換	置換されるアミノ酸部位
CTLA4	chr2:204732347	C/T	Promoter	-	-
CTLA4	chr2:204732714	A/G	Coding exon	T/A	17
CTLA4	chr2:204738919	A/G	Downstream	-	-
CCR5	chr3:46412308	A/G	Intron	-	-
CCR9	chr3:45943130	A/G	Coding exon	M/V	272
B9D2	chr19:41860296	C/T	Downstream	-	-
B9D2	chr19:41858921	C/T	Downstream	-	-
FCGR3A	chr1:161514542	G/T	Coding exon	F/V	211
GZMB	chr14:25102160	A/G	Coding exon	R/G	55
IL1A	chr2:113542960	C/T	5' UTR	-	-
IL1B	chr2:113594867	A/G	Promoter	-	-
IL2	chr4:123377980	G/T	Promoter	-	-
IL6	chr7:22766221	A/G	Promoter	-	-
IL17A	chr6:52051033	A/G	Promoter	-	-
HMGB1	chr13:31036642	C/G	Intron (boundary)	-	-
HMGB1	chr13:31037903	C/G	Intron (boundary)	-	-
HMHA1	chr19:1068734	C/T	Coding exon	L/L	138
HPSE	chr4:84241357	A/G	Intron	-	-
HPSE	chr4:84223713	C/T	Intron	-	-
CCL2	chr17:32580231	A/T	Promoter	-	-
CCL2	chr17:32579788	C/T	Promoter	-	-
CXCL9	chr4:76933484	C/T	Promoter	-	-
CXCL10	chr4:76942943	C/G	3' UTR	-	-
CXCL10	chr4:76943677	A/G	Intron (boundary)	-	-
CXCL10	chr4:76945685	A/G	Promoter	-	-
VDR	chr12:48238837	A/C	Intron (boundary)	-	-
VDR	chr12:48239835	A/G	Intron	-	-
LTA/TNF	chr6:31542308	T/C	Downstream	-	-
LTA/TNF	chr6:31542482	C/T	Downstream	-	-
LTA/TNF	chr6:31542476	C/A	Downstream	-	-
TNFRSF1B	chr1:12252955	G/T	Coding exon	M/R	106
FASAS	chr10:90749963	C/T	Downstream	-	-
IFNG	chr12:68555011	C/T	Promoter	-	-
UGT2B17		deletion	Coding exon	-	-
UGT2B28		deletion	Coding exon	-	-
LCE3C		deletion	Coding exon	-	-
GSTM1		deletion	Coding exon	-	-
GSTT1		deletion	Coding exon	-	-
OR51A2		deletion	Coding exon	-	-
KLRK1	chr12:10525365	C/G	3' UTR	-	-
MTHFR	chr1:11856378	C/T	Coding exon	A/V	222
LTA	chr6:31327045	C/T	Intron	-	-
TLR9	chr3:52261031	C/T	Promoter	-	-
IL19	chr1:206980977	C/T	Intron	-	-
IL19	chr1:206986926	C/T	Intron	-	-
IL10	chr1:206946897	A/G	Promoter	-	-
IL10	chr1:206946634	C/T	Promoter	-	-
IL10	chr1:206946407	A/C	Promoter	-	-
IL10RB	chr21:34640788	A/G	Coding exon	K/E	47

表2. 対象者集団の特性

	コホート1 HLA完全一致	コホート2 DPB1不適合
総人数	391	960
ドナー年齢中央値(最小、最大)	35 (1, 65)	33 (0, 70)
レシピエント年齢中央値(最小、最大)	33 (21, 54)	34 (20, 51)
患者男女(人数)	156:235	349:611
ドナー・レシピエント性差		
女性—女性	74	188
女性—男性	82	161
男性—女性	61	160
男性—男性	174	448
診断名		
急性リンパ性白血病	93	232
急性骨髄性白血病	129	270
慢性骨髄性白血病	64	160
骨髄異形成症候群	37	94
悪性リンパ腫	1	10
再生不良性貧血	15	57
その他	52	137
移植リスク		
標準リスク	142	358
高リスク	129	268
不明	120	334
GVHD予防法		
Cyclosporineを含む	229	559
Tacrolimusを含む	162	400
その他	0	1
前処置		
骨髄破壊的	353	840
骨髄非破壊的	38	120
移植年		
2000年以前	131	284
2001年以後	260	676

表3. 検討対象遺伝子多型(ドナー)のaGVHD II-IVとの関連

遺伝子名	rs#	Hazard Ratio	95% CI	p	マイナーアレル頻度	リスクモデルへの採用
CTLA4	rs5742909	0.77	(0.51 - 1.16)	0.213	0.12	
CTLA4	rs231775	1.08	(0.81 - 1.44)	0.598	0.39	
CTLA4	rs3087243	1.26	(0.95 - 1.69)	0.111	0.27	○
CCR5	rs1800023	1.02	(0.81 - 1.30)	0.861	0.44	
CCR9	rs12721497	0.98	(0.01 - 79.85)	0.993	0.02	
B9D2	rs1800469	0.89	(0.68 - 1.18)	0.432	0.49	
B9D2	rs1800470	1.08	(0.83 - 1.39)	0.580	0.48	
FCGR3A	rs396991	1.29	(0.96 - 1.73)	0.096	0.25	○
GZMB	rs8192917	0.83	(0.58 - 1.18)	0.304	0.21	
IL1A	rs1800587	0.93	(0.58 - 1.49)	0.766	0.09	
IL1B	rs16944	0.94	(0.72 - 1.21)	0.619	0.43	
IL2	rs2069762	0.91	(0.70 - 1.18)	0.477	0.33	
IL6	rs1800797	NE	(- - -)		0.00	
IL17A	rs2275913	1.02	(0.76 - 1.36)	0.909	0.38	
HMGB1	rs3742305	0.83	(0.54 - 1.26)	0.379	0.16	
HMGB1	rs2249825	0.77	(0.48 - 1.25)	0.295	0.14	
HMHA1	rs3764653	0.79	(0.59 - 1.06)	0.114	0.35	○
HPSE	rs4693608	0.97	(0.72 - 1.30)	0.817	0.25	
HPSE	rs4364254	1.23	(0.89 - 1.70)	0.217	0.19	
GCL2	rs1024610	0.80	(0.41 - 1.56)	0.510	0.07	
GCL2	rs1024611	1.17	(0.91 - 1.51)	0.217	0.34	
CXCL9	rs1554013	0.75	(0.39 - 1.46)	0.404	0.07	
CXCL10	rs3921	0.73	(0.37 - 1.42)	0.347	0.07	
CXCL10	rs4859588	0.73	(0.36 - 1.44)	0.360	0.07	
CXCL10	rs4257674	0.73	(0.35 - 1.48)	0.378	0.07	
VDR	rs7975232	1.29	(0.99 - 1.69)	0.059	0.33	○
VDR	rs1544410	1.11	(0.71 - 1.73)	0.650	0.10	
LTA/TNF	rs1799964	1.36	(0.85 - 2.19)	0.200	0.09	
LTA/TNF	rs1799724	0.92	(0.66 - 1.30)	0.649	0.18	
LTA/TNF	rs1800630	1.12	(0.73 - 1.71)	0.612	0.10	
TNFRSF1B	rs1061622	0.83	(0.55 - 1.25)	0.374	0.12	
FASAS	rs1800682	1.03	(0.80 - 1.33)	0.813	0.49	
IFNG	rs2069705	1.12	(0.78 - 1.59)	0.537	0.17	
UGT2B17		1.30	(0.86 - 1.94)	0.210	0.38	
UGT2B28		NE	(- - -)	0.955	0.01	
LCE3C		0.72	(0.48 - 1.08)	0.113	0.16	○
GSTM1		1.17	(0.80 - 1.72)	0.418	0.25	
GSTT1		1.00	(0.70 - 1.42)	0.992	0.24	
OR51A2		0.74	(0.42 - 1.27)	0.274	0.08	
KLRK1	rs1049174	0.99	(0.77 - 1.27)	0.939	0.40	
MTHFR	rs1801133	0.96	(0.74 - 1.25)	0.759	0.40	
LTA	rs909253	1.08	(0.83 - 1.40)	0.587	0.30	
TLR9	rs187084	0.99	(0.76 - 1.29)	0.960	0.50	
IL19	rs3950619	0.92	(0.56 - 1.50)	0.737	0.06	
IL19	rs7521798	0.94	(0.57 - 1.55)	0.812	0.07	
IL10	rs1800896	1.01	(0.65 - 1.55)	0.980	0.05	
IL10	rs1800871	1.27	(0.98 - 1.63)	0.069	0.30	○
IL10	rs1800872	1.27	(0.97 - 1.64)	0.077	0.30	rs1800871とLD
IL10RB	rs2834167	1.06	(0.84 - 1.34)	0.614	0.46	

表4. 検討対象遺伝子多型(レシピエント)のaGVHD II-IVとの関連

遺伝子名	rs#	Hazard Ratio	95% CI	p	マイナーアレル頻度	リスクモデルへの採用
CTLA4	rs5742909	1.16	(0.76 - 1.79)	0.493	0.12	
CTLA4	rs231775	1.07	(0.82 - 1.38)	0.619	0.39	
CTLA4	rs3087243	1.01	(0.74 - 1.38)	0.927	0.27	
CCR5	rs1800023	0.99	(0.77 - 1.27)	0.950	0.44	
CCR9	rs12721497	NE	(- - -)	0.986	0.02	
B9D2	rs1800469	1.10	(0.85 - 1.42)	0.457	0.49	
B9D2	rs1800470	0.88	(0.68 - 1.13)	0.308	0.48	
FCGR3A	rs396991	0.87	(0.64 - 1.20)	0.402	0.25	
GZMB	rs8192917	1.02	(0.75 - 1.40)	0.897	0.21	
IL1A	rs1800587	1.55	(0.98 - 2.45)	0.059	0.09	
IL1B	rs16944	0.97	(0.75 - 1.26)	0.804	0.43	
IL2	rs2069762	1.10	(0.84 - 1.44)	0.486	0.33	
IL6	rs1800797	1.00	1 - 1.00)		0.00	
IL17A	rs2275913	1.10	(0.82 - 1.46)	0.529	0.38	
HMGB1	rs3742305	1.19	(0.88 - 1.61)	0.264	0.16	
HMGB1	rs2249825	1.19	(0.85 - 1.68)	0.305	0.14	
HMHA1	rs3764653	0.77	(0.57 - 1.03)	0.076	0.35	○
HPSE	rs4693608	0.81	(0.58 - 1.13)	0.211	0.25	
HPSE	rs4364254	0.94	(0.67 - 1.34)	0.747	0.19	
CCL2	rs1024610	0.73	(0.44 - 1.22)	0.230	0.07	
CCL2	rs1024611	0.93	(0.72 - 1.20)	0.565	0.34	
CXCL9	rs1554013	1.14	(0.72 - 1.83)	0.572	0.07	
CXCL10	rs3921	1.17	(0.74 - 1.85)	0.490	0.07	
CXCL10	rs4859588	1.17	(0.73 - 1.88)	0.505	0.07	
CXCL10	rs4257674	1.17	(0.74 - 1.85)	0.490	0.07	
VDR	rs7975232	1.04	(0.8 - 1.34)	0.783	0.33	
VDR	rs1544410	0.99	(0.61 - 1.61)	0.967	0.10	
LTA/TNF	rs1799964	1.12	(0.7 - 1.78)	0.635	0.09	
LTA/TNF	rs1799724	0.95	(0.67 - 1.33)	0.762	0.18	
LTA/TNF	rs1800630	0.99	(0.67 - 1.45)	0.941	0.10	
TNFRSF1B	rs1061622	1.17	(0.78 - 1.75)	0.438	0.12	
FASAS	rs1800682	1.01	(0.77 - 1.32)	0.949	0.49	
IFNG	rs2069705	0.85	(0.61 - 1.18)	0.331	0.17	
UGT2B17		0.92	(0.58 - 1.48)	0.742	0.38	
UGT2B28		0.34	(0 - 26.17)	0.627	0.01	
LCE3C		0.91	(0.63 - 1.31)	0.603	0.16	
GSTM1		0.73	(0.5 - 1.06)	0.103	0.25	○
GSTT1		1.37	(0.97 - 1.94)	0.074	0.24	○
OR51A2		1.21	(0.73 - 1.99)	0.457	0.08	
KLRK1	rs1049174	1.14	(0.88 - 1.48)	0.330	0.40	
MTHFR	rs1801133	0.84	(0.65 - 1.10)	0.205	0.40	
LTA	rs909253	1.10	(0.84 - 1.42)	0.491	0.30	
TLR9	rs187084	0.96	(0.76 - 1.21)	0.731	0.50	
IL19	rs3950619	1.46	(0.82 - 2.59)	0.196	0.06	
IL19	rs7521798	1.53	(0.89 - 2.66)	0.127	0.07	
IL10	rs1800896	0.95	(0.49 - 1.87)	0.888	0.05	
IL10	rs1800871	0.75	(0.57 - 0.99)	0.044	0.30	○
IL10	rs1800872	0.75	(0.57 - 0.99)	0.046	0.30	rs1800871とLD
IL10RB	rs2834167	1.24	(0.96 - 1.61)	0.098	0.46	○

表5. aGVHD II-IVを元に作成した遺伝的リスクスコアとaGVHD II-IV、III-IVとの関連

Donor/Recipient	Endpoint	遺伝的リスクスコア	Cohort 1				Cohort 2			
			HR	95%CI	p	Harrell's C	HR	95%CI	p	Harrell's C
Donor	aGVHD II-IV	Low (0-4 risk alleles)	1	(reference)		0.644*2	1	(reference)		0.615
		Moderate (5-6 risk alleles)	1.45	(0.93-2.25)	0.0990		0.93	(0.74-1.16)	0.5120	
		High (7 or more risk alleles)	2.53	(1.57-4.07)	0.0001		0.91	(0.69-1.20)	0.5090	
					trend p=	0.0001			trend p=	0.4850
Donor	aGVHD III-IV	Low (0-4 risk alleles)	1	(reference)		0.723*3	1	(reference)		0.6520
		Moderate (5 risk alleles)	2.33	(1.09-5.02)	0.0300		1.18	(0.80-1.74)	0.4150	
		High (6 or more risk alleles)	2.68	(1.14-6.35)	0.0240		1.11	(0.69-1.79)	0.6520	
					trend p=	0.0230			trend p=	0.601
Recipient	aGVHD II-IV	Low (0-4 risk alleles)	1	(reference)		0.633*4	1	(reference)		0.615
		Moderate (5-6 risk alleles)	1.40	(0.91-2.17)	0.1290		1.02	(0.80-1.31)	0.8530	
		High (7 or more risk alleles)	1.66	(1.10-2.49)	0.0150		0.90	(0.71-1.15)	0.4000	
					trend p=	0.0140			trend p=	0.4060
Recipient	aGVHD III-IV	Low (0-4 risk alleles)	1	(reference)		0.652	1	(reference)		0.652
		Moderate (5 risk alleles)	1.18	(0.80-1.74)	0.4150		0.86	(0.57-1.31)	0.4910	
		High (6 or more risk alleles)	1.11	(0.69-1.79)	0.6520		0.95	(0.64-1.41)	0.7990	
					trend p=	0.6010			trend p=	0.791

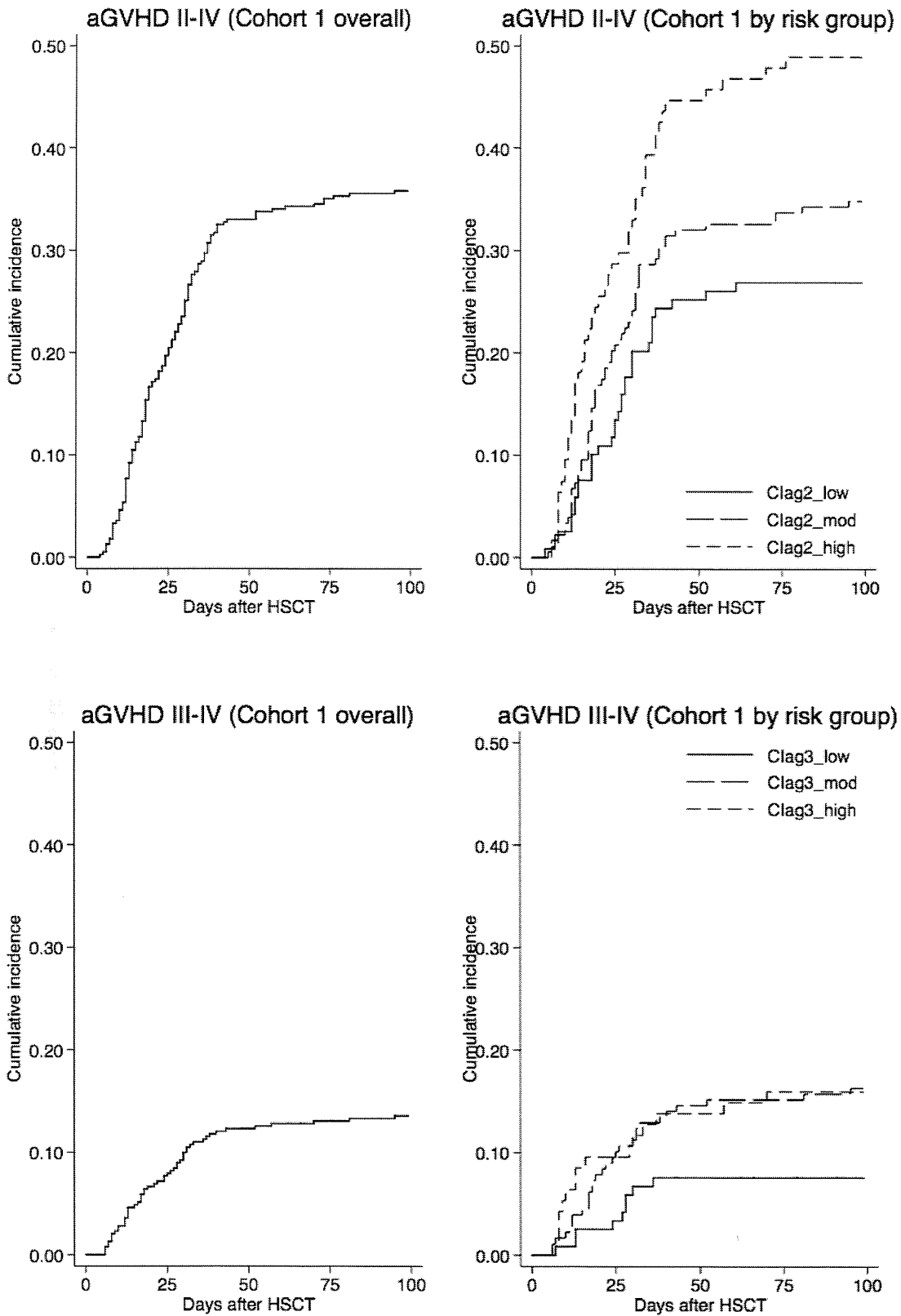
*全てのHRは、表2にリストされる変数を共変量として調整

*2 遺伝的リスクスコアが無いモデルにおけるHarrell's C=0.612

*3 遺伝的リスクスコアが無いモデルにおけるHarrell's C=0.705

*4 遺伝的リスクスコアが無いモデルにおけるHarrell's C=0.612

図1. コホート①における遺伝的リスクグループ別の aGVHD II-IV、III-IV 累積罹患率



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)

移植免疫反応と遺伝子多型の解析

担当責任者 高見昭良 愛知医科大学血液内科 教授

研究要旨：トロンボモジュリン (TM) は主に血管内皮細胞上に発現し、抗凝固作用や抗炎症作用など様々な機能を有している。TM 遺伝子の *THBD* の下流非翻訳領域には 1 塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) rs3176123 (2729A>C)があり、血管障害との関連が示唆されている。*THBD* 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 アリル一致非血縁者間同種骨髄移植を受けた血液腫瘍患者 317 例とドナーを対象に、*THBD* SNP と移植後転帰の関連を解析したところ、ドナー AC または CC 型は II 度から IV 度急性移植片対宿主病 (GVHD) 発症率が低いことがわかった。II 度から IV 度急性 GVHD 発症患者に限ると、ドナー AC または CC 型の場合全死亡率の低下がみられた。機能解析では、A アリル mRNA 転写量亢進がみられた。以上から、*THBD* SNP は機能的 SNP で、TM 転写量を通じ、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

トロンボモジュリン (TM) は主に血管内皮細胞上に発現し、抗凝固作用や抗炎症作用など様々な機能を有している。TM 遺伝子の *THBD* の下流非翻訳領域には 1 塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) rs3176123 (2729A>C)があり、血管障害との関連が示唆されている。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、調整蛋白や遺伝子が関与している。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、*THBD* rs3176123 SNP と移植後転帰の関連を後方視的に検討した。さらに、*THBD* SNP の機能を検証するため、*THBD* SNP と mRNA 発現量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 アリル一致非血縁者間同種骨髄移植患者およびドナ

一を対象とし、2006年から2009年血液腫瘍に対する非T細胞除去初回移植317例について解析した。内訳は、急性骨髄性白血病153例、急性リンパ性白血病67例、慢性骨髄性白血病12例、骨髄異形成症候群53例、悪性リンパ腫32例。

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。

遺伝子多型解析

THBD genotyping probe と、TaqMan genotyping master mix (Applied Biosystems)を用い、TaqMan PCR法により、患者・ドナーの *THBD* SNP 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。

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。

*THBD*発現解析

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

AA型・CC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 2013 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、日本骨髄バンクと施設倫理委員会で審査・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317例の *THBD* SNP を決定した。遺伝子型頻度は、ドナーが AA 51% AC 40% CC 9%、患者が AA 54% AC 36% CC 10%であった。これは、International HapMap Project による日本人データに一致すると考えられた。

ドナー-SNP と移植後転帰の関連を検討したところ、ドナーAC または CC 型は II 度から IV 度急性移植片対宿主病 (GVHD) 発症率が低いことがわかった (HR = 0.66; 95% CI = 0.44 – 0.99; P = 0.05)。II 度から IV 度急性 GVHD 発症患者に限ると、ドナーAC または CC 型の場合全死亡率の低下がみられた (HR = 0.45; 95% CI = 0.21 – 0.99; P = 0.05)。0 度から 1 度急性 GVHD 患者では、*THBDSNP* の影響はみられなかった。患者側の SNP に関しては、有意な影響はみられなかった。機能解析では、A アリル mRNA 転写量亢進がみられた。

D. 考察

血液悪性腫瘍 317 例を対象に、*THBD* SNP 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、ドナーAA 型に比べドナーAC/CC 型は急性 GVHD の頻度が少なく、急性 GVHD 発症後の予後が良好であることがわかった。ドナー選択の最適化につながる可能性がある。健常人の末梢血を用い、C アリルの転写量は A アリルより高いことを示した。したがって、*THBD* C アリル保有者は、*THBD* 発現量亢進を通じ効率良く TM を産生する可能性が示唆された。この SNP は下流非翻訳領域に有り、microRNA など調整因子との結合に影響を与えている可能性がある。

臨床解析、機能解析より、*THBD*AC/CC 型ドナーから移植を受けた場合、高 TM 発現により急性 GVHD 発症率および死亡率の低下がもたらされる可能性が示唆された。移植後の TM が GVHD 予防・治療や臓器障害改善に関与するという報告は、この仮説を支持する。TM は血管内皮に加え白血球

も発現している。今回はドナー由来白血球の影響かもしれない。

E. 結論

THBDSNP は機能的 SNP で、TM 転写量を通じ、同種造血幹細胞移植予後に影響していると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Umeda K, Adachi S, Tanaka S, Ogawa A, Hatakeyama N, Kudo K, Sakata N, Igarashi S, Ohshima K, Hyakuna N, Chin M, Goto H, Takahashi Y, Azuma E, Koh K, Sawada A, Kato K, Inoue M, Atsuta Y, Takami A, Murata M, on behalf of the GWGotJSfHCT. Comparison of continuous and twice-daily infusions of cyclosporine A for graft-versus-host-disease prophylaxis in pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatric blood & cancer*. 2014 Oct 12.

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.

3. Takami A. Graft source of hematopoietic stem cell transplantation in adult patients with hematologic diseases. [Rinsho ketsueki] *The Japanese journal of clinical hematology.* 2014 Oct;55(10):2103-12.

4. Mochizuki K, Kondo Y, Hosokawa K, Ohata K, Yamazaki H, Takami A, Sasaki M, Sato Y, Nakanuma Y, Nakao S. Adenovirus pneumonia presenting with nodular shadows on chest X-ray in two unrelated allogeneic bone marrow transplant recipients. *Intern Med.* 2014;53(5):499-503.

5. Kanda J, Fuji S, Kato S, Takami A, Tanaka J, Miyamura K, Ohashi K, Fukuda T, Ozawa Y, Kanamori H, Eto T, Kobayashi N, Iwato K, Morishima Y, Sakamaki H, Atsuta Y, Kanda Y, Group HLAW, Donor/Source Working G, Adult AMLWG, Adult ALLWGotJSfHCT. Decision analysis for donor selection in

stem cell transplantation-HLA-8/8 allele-matched unrelated donor vs HLA-1 AG mismatched related donor. *Blood cancer journal.* 2014;4:e263.

6. Hosokawa K, Yamazaki H, Nakamura T, Yoroidaka T, Imi T, Shima Y, Ohata K, Takamatsu H, Kotani T, Kondo Y, Takami A, Nakao S. Successful hyperbaric oxygen therapy for refractory BK virus-associated hemorrhagic cystitis after cord blood transplantation. *Transpl Infect Dis.* 2014 Oct;16(5):843-6.

7. Hosokawa K, Takami A, Tsuji M, Araoka H, Ishiwata K, Takagi S, Yamamoto H, Asano-Mori Y, Matsuno N, Uchida N, Masuoka K, Wake A, Makino S, Yoneyama A, Nakao S, Taniguchi S. Relative incidences and outcomes of *Clostridium difficile* infection following transplantation of unrelated cord blood, unrelated bone marrow, and related peripheral blood in adult patients: a single institute study. *Transpl Infect Dis.* 2014 Jun;16(3):412-20.

8. Hosokawa K, Sugimori N, Katagiri T, Sasaki Y, Saito C, Seiki Y, Mochizuki K, Yamazaki H, Takami A, Nakao S. Increased glycosylphosphatidylinositol-anchored protein-deficient

granulocytes define a benign subset of bone marrow failures in patients with trisomy 8. *European journal of haematology*. 2014 Nov 18.

9. Aoki J, Ishiyama K, Taniguchi S, Fukuda T, Ohashi K, Ogawa H, Kanamori H, Eto T, Iwato K, Sakamaki H, Morishima Y, Nagamura T, Atsuta Y, Takami A. Outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia patients with central nervous system involvement. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 Dec;20(12):2029-33.

2) 学会発表

1. Takagi S, Masuoka K, Uchida N, Kurokawa M, Nakamae H, Tsudo M, Iwato K, Ichinohe T, Atsuta Y, Takami A. Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Patients with Acute Myeloid Leukemia Transformed from Ph-Negative Myeloproliferative Neoplasm: A Study from the Adult AML Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation (JS...2014.

2. Nomoto H, Morishita E, Takami A, Katsu S, Yamaguchi D, Morishima Y, Onizuka M,

Kashiwase K, Fukuda T, Kodera Y, Nakao S, Ohtake S. Thrombomodulin Has a Significant Impact on Transplant Outcomes after HLA-Fully-Matched Unrelated Bone Marrow Transplantation for Standard Risk Hematologic Malignancies 2014.

3. Mizutani M, Hara M, Fujita H, Aoki J, Kanamori H, Machida S, Yamasaki S, Ohashi K, Usuki K, Fukuda T, Chou T, Tanaka J, Atsuta Y, Takami A. Comparable Leukemia-Free Survival after Autologous Hematopoietic Cell Transplantation Versus HLA-Identical Sibling Hematopoietic Cell Transplantation for Adult Acute Myeloid Leukemia in First Complete Remission: A Registry Study By the Adult AML Working ...2014.

4. Espinoza LJ, Trung LQ, Yoshida A, Yamada K, Nakao S, Takami A. The Effects of the Repeated Administration of Resveratrol Monomer and Resveratrol Dimer on Circulating Immune Cells in Healthy Individuals 2014.

5. Espinoza LJ, Matsuo K, Toda S, Morishima Y, Onizuka M, Kashiwase K, Fukuda T, Kodera Y,

Nakao S, Takami A. A Genetic Variant in the CD53 Gene Is Associated with Clinical Outcomes after Unrelated Bone Marrow Transplantation2014.

6. Aoki J, Seo S, Tanaka M, Kanamori H, Fukuda T, Kobayashi N, Onizuka M, Ichinohe T, Atsuta Y, Takami A. Impact of Low-Dose TBI on Outcome of Reduced Intensity Allogeneic Hematopoietic Stem

Cell Transplantation from HLA Identical Sibling for Acute Myeloid Leukemia2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。本研究班に関連したものに限る)

なし

移植免疫反応の機序の解明

担当責任者 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

移植後患者血液中に残存するドナーHLA 特異的抗体はドナー造血幹細胞に対する細胞傷害活性を有するのか、ドナーHLA 特異的 CTL は移植前後でどう頻度が変化するのか等を明らかにするため、移植後拒絶患者検体を用いて解析を行った。移植前処置を受けてもなお患者血液中に残存するドナーHLA 特異的抗体によりドナー造血幹細胞は傷害されること、そのような HLA 抗体が存在するときには同じ HLA を認識する CTL が存在し、それら液性免疫と細胞性免疫が協働して拒絶に関与すること、移植前から存在するドナーHLA 特異的 CTL は移植時にドナー細胞からの刺激を受けて著しく頻度が上昇し拒絶に関与すること等を確認した。

A. 研究目的

臨床データを用いた統計解析により、造血幹細胞移植前の患者血液中にドナーHLA 特異的抗体が存在すると、移植細胞の拒絶率が高まることが示されている。しかし大量の抗癌剤や全身放射線照射を受けた後に残存したドナーHLA 特異的抗体が、実際にドナー造血幹細胞を傷害することを生物学的に証明した報告はまだない。

一方、以前から造血幹細胞移植後の拒絶において、ドナーHLA を特異的に認識する患者細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が重要な役割を果たしていると考えられてきた。しかし移植前に存在していた HLA 特異的 CTL が、抗癌剤投与と放射線照射を受けた後 day0 にドナー細胞からの刺激を受けて、その結果どれくらいまで頻度が高まり拒絶に関与するのかを明らかにした報告はまだない。

今回我々は、移植後患者血清中に残存

するドナーHLA 特異的抗体は造血幹細胞に対して細胞傷害活性を発揮するのか否か、ドナーHLA 特異的 CTL の頻度は移植前後でどう変化するのか等を明らかにするため、臍帯血移植後の拒絶患者から検体を採取し、解析を行った。

B. 研究方法

臍帯血移植後拒絶を来した患者から同意を得て移植前後の血液を採取した (名古屋大学医学部生命倫理審査委員会承認済み)。血清を分離し、HLA 抗体の有無を抗体ビーズを用いた FCM で検出した。単核球を分離し、限界希釈法により T 細胞クローンを分離した。細胞傷害活性については Cr 放出試験を、幹細胞に対する傷害活性についてはコロニーアッセイを、非自己 HLA 刺激による IFN γ 産生能については ELISPOT アッセイを、CTL クローンの頻度については次世代シーケンサーによる TCR 特異的 deep sequence

法を用いた。

C. 研究結果

移植前の血液中にはドナーのみが有する HLA-B*54:01 に対する抗体が存在し、拒絶時の血液中からも同じく B*54:01 特異的抗体の検出が可能であった。次に B*54:01 陽性骨髄単核球を、拒絶時血清および保存患者 NK 細胞と共培養した上で (ADCC 活性)、コロニー形成能を評価したところ、拒絶時血清では有意にコロニー形成能が抑制された。ただし CDC 活性の関与は確認できなかった。以上より、移植前から患者血液中に存在していた B*54:01 抗体は、移植前処置を受けてもなお患者血液中に残存し、かつその B*54:01 抗体によりドナー造血幹細胞が傷害されることが示された。

拒絶時患者末梢血単核球からドナー細胞に対してのみ細胞傷害性を有する 2 つの CTL クローンを分離した。1 つの CTL クローンは抗体と同じく HLA-B*54:01 を認識し、かつ B*54:01 陽性骨髄単核球のコロニー形成能を抑制した。他方のクローンは HLA-DRB1*15:02 を認識し、かつ DRB1*15:02 陽性骨髄単核球のコロニー形成能を抑制した。次に CTL クローンの T 細胞受容体 (TCR) Vbeta CDR3 に特異的な RT-PCR を行い、移植前患者血液中にも B*54:01 特異的 CTL クローンが存在していたことを確認したが、DRB1*15:02 特異的 CTL クローンは TCR 特異的 RT-PCR 産物は得られなかった。そこで移植前後の末梢血 T リンパ球について TCR deep sequence を行ったところ、B*54:01 特異的 CTL クローンは移植前約 0.0001% だったのに対し移植後は約 9% へ、DRB1*15:02 特異的 CTL クローンは移植前 0.0001% 未満だったのに対し、移植後は約 1% へ、それぞれ著しく頻度が上昇していた。以上より、ドナーのみが有する

HLA- B*54:01 を認識する CTL クローンが移植前から血液中に存在し、そのクローンは B*54:01 陽性ドナー細胞からの刺激を受けて著明に増幅し、ドナー造血幹細胞を傷害したこと、また DR*15:02 を認識する CTL クローンは移植前には検出不能なほど頻度が低かったもしくは存在しなかったにも関わらず、移植により DR*15:02 陽性ドナー細胞からの刺激を受けて増幅し、ドナー造血幹細胞を傷害したことが示された。

さらに、他の HLA 抗体陽性血液疾患患者 3 名および HLA 抗体陰性血液疾患患者 3 名から末梢血 T リンパ球を分離し、各種 HLA cDNA を遺伝子導入した細胞を用いて刺激したところ (ELISPOT アッセイ)、前 3 名では存在する HLA 抗体と同じ HLA を認識する T 細胞の存在が確認されたが、後 3 名では HLA を認識する T 細胞の存在は確認できなかった。

D. 考察

移植前の患者血液中にドナー HLA 抗体が存在する場合は、その HLA 抗体が移植後も患者血液中に残存し、拒絶に関与することが生物学的に確認された。そのような HLA 抗体が存在するときには、同じ HLA を認識する CTL が存在し、それら液性免疫と細胞性免疫が協働して拒絶に関与することも確認された。特にドナー HLA 特異的 CTL が移植前に存在するとき、移植時にドナー細胞からの刺激を受けて著明に増幅し拒絶に関与することが示された。

E. 結論

非血縁者間移植後の拒絶には液性免疫と細胞性免疫の両者が関与しうる。拒絶機序を解明することは、非血縁者間移植の最適なドナー選択法の確立に寄与すると考える。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Watanabe K, Terakura S, Martens AC, van Meerten T, Uchiyama S, Imai M, Sakemura R, Goto T, Hanajiri R, Imahashi N, Shimada K, Tomita A, Kiyoi H, Nishida T, Naoe T, Murata M. Target Antigen Density Governs the Efficacy of Anti-CD20-CD28-CD3 ζ Chimeric Antigen Receptor-Modified Effector CD8+ T Cells. J Immunol. 2015 Feb 1;194(3):911-20.
2. 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 Program. Biological significance of HLA locus matching in unrelated donor bone marrow transplantation. Blood. 2015 Feb 12;125(7):1189-97.
3. Nakane T, Fukuda T, Kanda J, Taniguchi S, Eto T, Ohashi K, Nakamae H, Kurokawa M, Mori T, Morishima Y, Nagamura-Inoue T, Sakamaki H, Atsuta Y, Murata M. Age influences post-graft-versus-host disease non-relapse mortality in adults with acute graft-versus-host disease of varying severity following allogeneic hematopoietic cell transplant. Leuk Lymphoma, in press.

2) 学会発表

1. Watanabe K, Terakura S, Uchiyama S, Martens AC, van Meerten T, Kiyoi H,

- Nishida T, Naoe T, Murata M. Excessively high-affinity single-chain fragment variable region in a chimeric antigen receptor can counteract T-cell proliferation. The 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Dec 2014, San Francisco, California.
2. Watakabe K, Miyamura K, Ozawa Y, Okada M, Yamashita T, Murata M, Ishikawa T, Uike N, Hidaka M, Kobayashi R, Imamura M, Tanaka J, Ohashi K, Taniguchi S, Ikeda T, Eto T, Mori M, Muroi K, Ozawa K. Efficacy of mesenchymal stem cells for the treatment of steroid-refractory aGVHD. The 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Dec 2014, San Francisco, California.
 3. Kanda J, Morishima Y, Wake A, Terakura S, Uchida N, Takahashi S, Ono Y, Onishi Y, Kanamori H, Aotsuka N, Kato K, Atsuta Y, Murata M. Impact of Acute and Chronic Graft-Versus-Host Disease on Outcomes after Single Cord Blood Transplantation: A Retrospective Analysis by the JSHCT Gvhd Working Group. 2015 BMT Tandem Meetings. Feb 2015, San Diego, California.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

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 東海大学医学部 准教授

研究要旨: HLA遺伝子における次世代シーケンサーを用いたHLAタイピング法 (SS-SBT法) の有用性を、非血縁患者・ドナーを用いて多面的 (データの精度、作業工程の煩雑さ、解析時間、解析費用など) に検証し、非血縁バンクへの導入を図ることが本研究班の目的の一つである。本年度では、HLA主要9座マルチプレックスPCR法を開発し、骨髄移植前保存ドナー46検体を用いた本法の精度を検証した。その結果、SS-SBT法により得られたアレル情報は、いずれのHLA座とも既知アレルと矛盾しないことを確認した。また本法の開発にて煩雑なPCR産物の定量、各HLA座由来のPCR産物のpoolingなどの操作が不必要となった。よって本法は、高い判定精度を保ちながら、労力、時間および操作ミス的大幅な軽減が期待され、且つコストパフォーマンスに優れた非血縁バンクへの導入に極めて有用なHLA検査法であると考えられた。

A. 研究目的

分担者らが開発を進めている次世代シーケンサーを用いた超高解像度 DNA タイピング法 (Super high resolution Single molecule - Sequence Based Typing method; SS-SBT 法) は、long-range PCR の特性を生かし、ambiguity を排除した第4区域までのアレル判定を可能とする。ところが、本法をルーチンタイピング法として非血縁バンクへの導入を図るに应用するためには、複雑な工程を要する本法の簡略化、迅速化およびランニングコストを考慮する必要がある。本研究では、PCR-SSO 法 (主として、Luminex 法) や SBT 法などの従来法からの移行モデルとして、多型に富むエクソンのアレル判定を目指した HLA 9 座 (A, B, C, DRB1/3/4/5, DQB1, DPB1) のマルチプレックス PCR 法を開発し、本法の有用性を評価することを目的とした。

B. 研究方法

マルチプレックス PCR の条件は、アニーリング温度やプライマーの混合比を検討することにより設定した。

検証実験には、JMDP の 2006-2010 年移植前ドナー3115 検体から、ヘテロ接合体を優先的に選択した 46 検体を用いて、HLA 9 座マルチプレックス PCR 法により DNA 増幅を行った。これら 46 検体は、HLA 6 座 (A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1) それぞれにて日本人の 99.5%以上のアレルを網羅するものである。それら PCR 産物の Ion PGM を用いた次世代シーケンシングおよびアレル判定プログラム SeaBass を用いたアレル判定を行い、既知アレル情報と照合させることにより本法の精度や有用性を評価した。

倫理的事項

本研究は、東海大学の医の倫理委員会で審査・承認を受け、実施された。