

C. 研究結果

マルチプレックス PCR 法を用いた DNA タイピングから、276 座すべてが PCR-SSO 法により判定された既知アレルと矛盾しないことを確認した。また 30 種類の *DRB1-DRB3/4/5* ハプロタイプが同定された。これまでの次世代シーケンサーを用いた HLA タイピング法では、各々の PCR 産物を定量し、必要量を pooling する煩雑な操作が必要であったが、本法の開発によりそれら操作が不要になった。また、48 検体の PCR に必要な時間は 3 日間から 1 日間に短縮され、Ion PGM を用いた場合のランニングコストは、1 検体あたり 8,707 円、1 座あたり 1,451 円（定価、税抜、開発費抜）と算定された。

D. 考察

国外では、複数本の PCR チューブで PCR を行い、遺伝子座ごとに NGS ライブラリーを作製する方法（single locus amplification and single locus library contraction 法）、あるいは複数本の PCR チューブで PCR を行い、PCR 産物を pooling し、検体ごとに NGS ライブラリーを作製する方法（single locus amplification and multiple loci library contraction 法）について開発が進められている。これらに対して 9 座マルチプレックス PCR 法は、1 本の PCR チューブで PCR を行い、検体ごとに NGS ライブラリーを作製する方法（multiple loci amplification and multiple loci library contraction 法）であることから、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方

法であると考えられた。

E. 結論

本研究にて開発した 9 座マルチプレックス PCR 法は、非血縁バンクへの導入に極めて有用な方法である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

なし

2) 学会発表

1. 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)
2. 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).
3. 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).
 4. 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) .
 5. 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) .
 6. 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. 骨髄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) .
 7. 椎名隆、鈴木進悟、尾崎有紀、重成敦子、伊藤さやか、奥平裕子、榎屋安里、光永滋樹、猪子英俊. HLA 主要 6 座位の Middle Ranged Multiplex PCR 法の開発と SS-SBT への応用. 日本適合性学会第 23 回大会 (2014 年 9 月 13 日～15 日、長崎県長崎市) .
 8. 重成敦子、鬼塚真仁、尾崎有紀、鈴木進悟、猪子英俊、安藤潔、椎名隆. LOH が疑われる再生不良貧血患者の SS-SBT 法による DNA タイピングと LOH の検出. 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**
1. 特許出願番号：特願 2014-116217、名称：HLA 遺伝子の DNA タイピング方法及び当該方法のデータ解析に使用するコンピュータプログラム、発明者：鈴木 進悟、和田 有紀、光永 滋樹、猪子 英俊、椎名 隆、特許出願日：2014 年 6 月 4 日
 2. 国際公開番号：WO2014/181854A1、名称：HLA 遺伝子のマルチプレックス DNA タイピング方法及びキット、発明者：椎名 隆、鈴木 進悟、和田 有紀、光永 滋樹、猪子 英俊、国際公開日：2014 年 11 月 13 日
 3. PCT 出願番号：PCT/JP2014/081464、名称：超並列高速シーケンサーによる簡便な HLA 遺伝子の DNA タイピング方法およびキット、発明者：椎名 隆、鈴木 進悟、和田 有紀、光永 滋樹、猪子 英俊、PCT 出願日：2014 年 11 月 27 日

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・臍帯血の選択)

NK 細胞受容体遺伝子の解析

担当責任者 屋部登志雄	日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター
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：臍帯血移植における NK 細胞受容体遺伝子の多型解析と移植成績への影響の検討を行うために、他分担研究者とともに全国のさい帯血バンクと協力して DNA 検体の収集、HLA タイピング、およびデータベース作成作業を実施し、KIR をはじめとした NK 細胞受容体遺伝子群の解析用データセット作成を行った。新規入手移植成績と KIR タイピングデータを用いての関連解析と NKG2D 遺伝子とそのリガンドである ULBP 遺伝子の SNP タイピングを開始した。

A. 研究目的

造血幹細胞移植成績への NK 細胞関連遺伝子型の影響が報告されているが、その効果はまだはっきりと定まっていない。研究分担者らは以前の研究班において JMDP の非血縁者間骨髄移植症例の NK 細胞受容体遺伝子解析を担当してきたが、本研究班においても同解析を継続している。これまでに非血縁者間骨髄移植症例、臍帯血移植症例の KIR 遺伝子型を判定し、成績との関連解析を行ってきたが、明確な結論は得られていない。そこで統計学的な結論を得るに十分な NK 細胞受容体遺伝子解析用データベース作成のため、同研究班分担研究者の佐竹正博らとともに全国さい帯血バンク移植症例患者、ドナー DNA 検体の収集と HLA タイピング作業を行った。

B. 研究方法

(1) 臍帯血移植ペア検体より NK 細胞受容体遺伝子型 (KIR、NKG2A-D、LILR など)、リガンド遺伝子型を蛍光ビーズ法による PCR-SSO 法および TaqMan プローブにてタイピングを行う。移植成績と得られた NK 細胞受容体遺伝子型、リガンド型との関連について統計解析を行う。

(2) 臍帯血移植症例検体の収集及び HLA 遺伝子型タイピング作業を行う。同班分担研究者の佐竹正博と協力して、各バンクから送付された移植症例患者ドナーの検体の HLA 6 座 (-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DPB1) アリルタイピングを行う。得られた HLA 型、遺伝子型と各バンクより入手する移植臨床成績との関連解析を行い解析用データセットを作成し、その中から NK 細胞受容体遺伝子解析検体を選定する。

(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に基づき、日本骨髄バンクデータ・試料管理委員会および日本赤十字社、愛知県がんセンターの倫理委員会の承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検体の収集作業を行っている。これまでに2145症例ペア(4290検体)を収集し、HLA-A, -B, -DRB1座のアリル再タイピングとHLA-C座のタイピングを行い合計2090症例の4座のアリルデータを確定してきた。今年度はさらにDQB1, DPB1座についてアリルタイピングを実行した。1月現在で約1500症例分を終了しており、年度末までに合計約1800症例となる予定である。HLAデータを各バンクより入手した移植成績データと結合して約1600症例の解析データセットを作成し、このデータセットを用いてNK細胞受容体遺伝子群の多型解析を再開している。今回新たに最新の移植成績データが得られたので、これを用いてこれまでにKIR遺伝子型タイピング済みの約500症例について、成績との関連解析に着手している。また当研究班分担研究者の高見らが非血縁者間骨髄移植症例解析で生存率との有意な関連を報告したNKG2D遺伝子およびそのリガンドであるULBP遺伝子についても臍帯血移植検体のSNP解析を実施している。

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詳細には報告されていない。これまでに関東甲信越さい帯血バンクおよび近畿さい帯血バンク経由移植症例の患者及びドナー検体のKIR遺伝子型解析を行ってきたが、移植成績との関連解析では一貫した結果が得られなかった。バンク間の症例の偏りなどの可能性もあるが、解析症例数が十分でないことによる統計解析のパワー不足が最大の要因と考えられるため、解析対象を拡大する必要があった。そこで全国のさい帯血バンクとの共同で検体収集を行ってきた。今年度も主にこの作業に従事した。HLA-6座アリルデータからなる解析用データセットを作成し、それらを用いてNK細胞受容体解析を再開している。これによりKIR遺伝子型と移植成績の関連についてのより正確な情報を得て、本邦におけるKIR適合性効果についての結論を出す予定である。さらにNKG2Dなど他のNK細胞受容体遺伝子解析に着手しており、移植成績への影響についての検討を来年度以降に行う予定である。

E. 結論

臍帯血移植におけるNK細胞受容体、リガンド遺伝子多型の移植成績への影響についてより詳細な解析を行うために、全国のさい帯血バンクより検体を収集、HLAタイピングを行い、臨床成績データと併合した解析用データセットを作成しNK細胞受容体タイピングを開始した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1、論文発表

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、学会発表

1) 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、日本骨髄バンク「非血縁者間骨髄移植における、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)

2) 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)

3) 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)

H. 知的財産権の出願、登録状況

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・臍帯血の選択)

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	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	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
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:非血縁移植における統合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 データの収集し、検体の DNA 調製、保存および HLA タイピング、HLA マッチング、移植成績との関連解析作業を行った

A. 研究目的

当研究班は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非血縁移植の臍帯血移植、骨髄移植における患者、ドナーの HLA タイピングおよびデータベースの整備を担当している。前研究班から引き継いで、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する。また骨髄移植症例の HLA 6 座 12 抗原アリル型タイピングも担当する。

B. 研究方法

1、前研究班にて立ち上げた共同研究グループ組織で収集した全国のさい帯血バン

ク、臍帯血移植患者 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。

(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(移植時期1999年—2012年)、DNA抽出、WGAおよび、HLA-A、-B、-DRB1座のアリル再タイピングとHLA-C座のタイピングを行い合計2090症例の4座のアリルデータを確定してきた。今年度はさらにDQB1、DPB1座についてアリルタイピングを実行した。1月現在で約1500症例分を終了しており、年度末までに合計約1800症例となる予定である。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約1600症例の解析データセットを作成することができた。各移植症例におけるHLAマッチングについて解析を行った。HLA-A、-B、DRB1の3座抗原レベルのマッチングは熱田らの既報と同様な結果で、臍帯血移植ではマッチよりもミスマッチ移植が多く、90%近くがマッチの非血縁者間骨髄移植とは対照的であった。成人患者移植ではさらにミスマッチ移植率が高かった。今回HLA-C座マッチングを解析したところ抗原、アリルレベルともにミスマッチが約30%と他座よりも多く、特に2抗原ともに異なる場合が20%近くあった。DQB1座不適合は連鎖しているDRB1座とほぼ同様であった。DPB1座は約8割がミスマッチであるが、これは骨髄移植よりも少し

多い傾向であった。6座合計のミスマッチ率でも臍帯血移植は高いことが判明した。HLA-C座および6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の詳細な関連統計解析を開始している。予備的解析において、HLA-C座不適合と好中球生着率および全生存率の低下との有意な関連が観察された。

D. 考察

今回の新たな研究班においても非血縁者間造血細胞移植におけるHLAをはじめとする組織適合性解析が引き続き行われることとなり、これまで当血液センターが行ってきたHLAアリルタイピングとデータベース作成を分担研究課題として担当することとなった。前研究班でHLA-A、-B、-C、-DRB1の4座アリルデータまで得られていたが、本分担研究ではさらにHLA-DQB1、-DPB1座タイピングを開始し、HLA6座のアリルレベルデータをそろえた臍帯血移植組織適合性遺伝子解析用データセットの完成を目指している。これまでにタイピングされた症例について各移植でのHLAマッチングを調べたところ、臍帯血移植では骨髄移植にくらべて非常に多くのミスマッチ移植が行われていることが確認された。作成した解析セットからHLA-DQB1、-DPB1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、HLA6 座アレルタイピングを行い、組織適合性遺伝子解析用データセットを作成している。今年度は HLA-DQB1, -DPB1 座のタイピングを行った。

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). Satake M, Yamada Y, Atogami S, Yamaguchi K The incidence of adult T-cell leukemia/lymphoma among HTLV-1 carriers in Japan. *Leuk Lymphoma*. 2014 Sep 15:1-28.

2、学会発表

1) 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、日本骨髄バンク「非血縁者間骨髄移植における、各 HLA 座のアレ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)

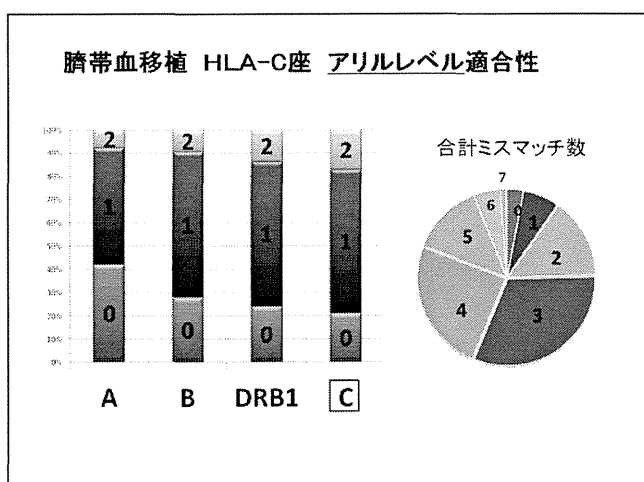
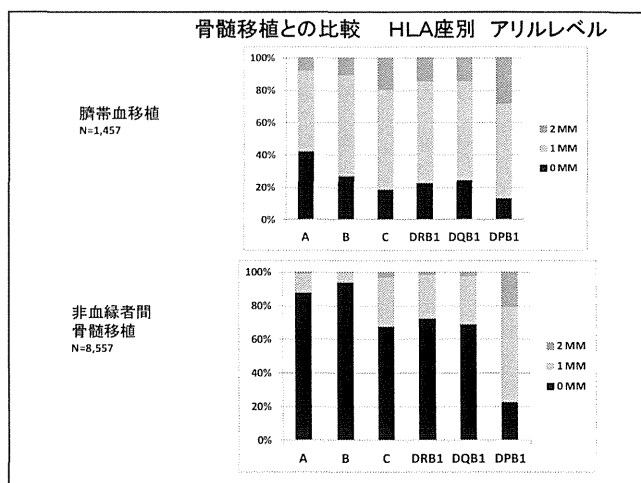
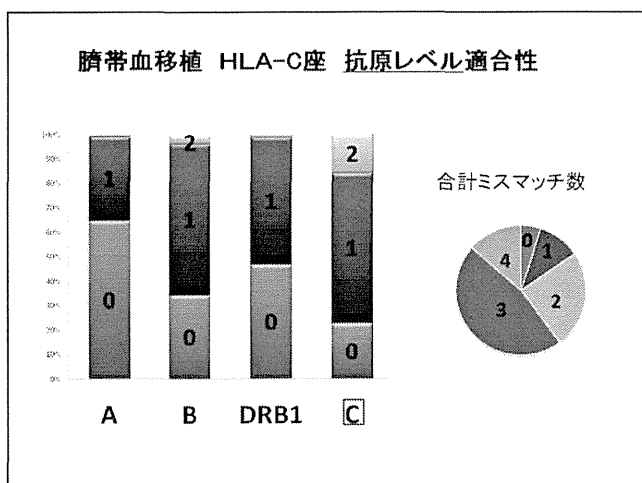
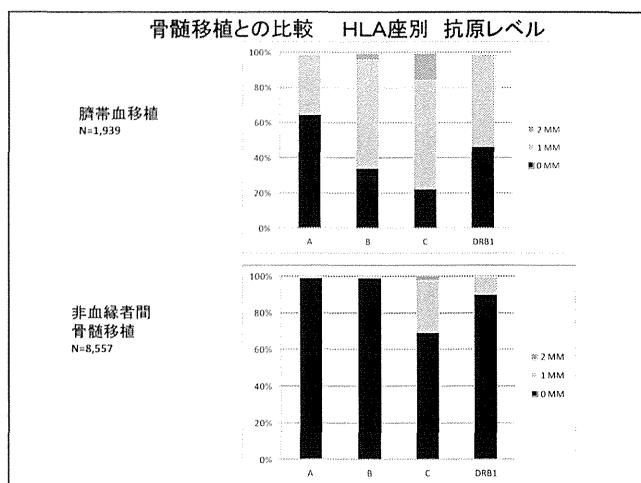
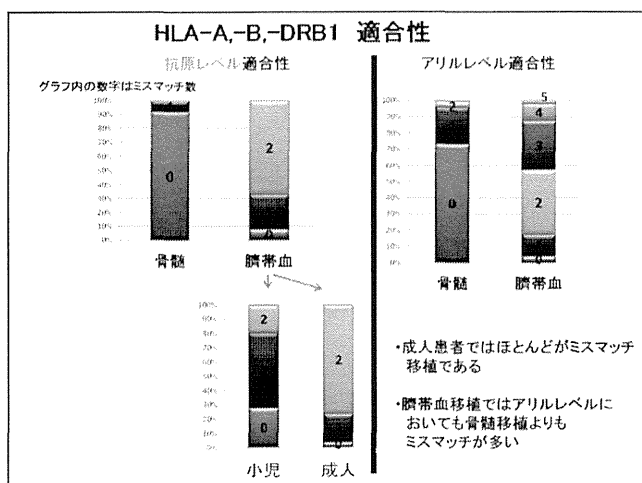
2) 大原裕子、小野あいこ、東史啓、屋部登志雄、武田直也、宮城徹、柏瀬貢一、大村和代、鈴木雅治、佐竹正博、森島泰雄、

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)

3) 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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



まとめ

国内臍帯血移植におけるHLA-C,-DQB1,-DPB1の適合性解析を行った

抗原レベル、アリルレベルいずれにおいても臍帯血移植は非血縁者間骨髄移植にくらべてHLA不適合移植が多く、特に成人患者では殆どが不適合移植である

臍帯血移植ではHLA-C座は8割以上が不適合移植であり2ミスマッチも多い

HLA-DQB1,-DPB1も不適合移植が多いことが明らかとなった

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

移植関連合併症と遺伝子多型の解析

担当責任者 鬼塚 真仁 東海大学医学部

研究要旨

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する

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 HLA 領域に改めて注目し、HLA 領域の Loss of Heterozygosity (LOH) の移植後再発に与える影響を確認するため、次世代シーケンサーによる LOH 探索をおこなった。また、薬剤代謝関連遺伝子多型と白血病治療成績を解析し論文化した。

B. 研究方法

1. 同種造血幹細胞移植後再発は深刻な転帰をもたらす重大なイベントである。すなわち、移植後再発後の生存率は極めて低く、回避すべき事象である。しかし、腫瘍細胞自体が同種免疫反応のターゲットである HLA を欠損することにより、同種免疫反応を回避し再発につながるメカニズムが提唱されているが、腫瘍細胞の LOH 検出を高感度におこなう方法は存在していなかった。そこで、今回我々は、東海大学基礎医学系分子生命科学椎名研究室と共同し、次世代シーケンサーによる HLA 領域の LOH

探索をおこなった。

2. 東海大学医学部付属病院にて HLA 不一致同種移植が施行された急性白血病症例で、移植後再発に至った 18 症例を解析した。

3. 次世代シーケンサーとマイクロサテライト多型を組み合わせ、再発時のレシピエント腫瘍細胞に LOH が存在するかどうかを評価した。

4. 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。

C. 研究結果

18 症例中、再発1回のみ13症例を確認したところ3症例で再発時にレシピエント由来の LOH をみとめた。

次に、18 症例中、再移植がおこなわれ、再々発している症例5症例について LOH の有無を検討したところ、2 症例で再発時に患者由来の HLA が LOH を起こしていることが判明した。これらの症例はいずれも、さらに HLA 不一致ドナーから再移植が施行され、再々発時の LOH について確認したところ、初回再発時の LOH パターンと同様の LOH が確認された。

D. 考察

今回の結果から、SS-SBT 法により移植後再発時の LOH を検出することが可能であり、また、定

量的に確認することが可能であった。複数移植後の再発時のLOHパターンは、初回再発のパターンをとることが明らかとなった。

今後、SS-SBT法の持つ定量性を活かし、HLA一致症例でのLOHについても確認する。さらに、LOHが移植後に後天的に獲得するものなのか、白血病発症時にすでに存在するのかを明らかにする予定である。

E. 結論

移植後腫瘍細胞におけるHLA領域のLOH探索に次世代シーケンサーは有力なツールであることが示された。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Jun Amaki, Makoto Onizuka, Ken Ohmachi, Yasuyuki Aoyama, Ryujiro Hara, Akifumi Ichiki, Hidetsugu Kawai, Ai Sato, Mitsuki Miyamoto, Masako Toyosaki, Shinichiro Machida, Minoru Kojima, Yukari Shirasugi, Hiroshi Kawada, Yoshiaki Ogawa and Kiyoshi Ando. Single nucleotide polymorphisms of cytarabine metabolic 1 genes influence clinical outcome in acute myeloid leukemia patients receiving high-dose cytarabine therapy. *Int J Hematol* 2015, In Press.
2. 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 Koderu, and Takehiko Sasazuki, for the Japan Marrow Donor Program. Biological significance of HLA locus matching in unrelated donor bone marrow transplantation

Blood. 2015;125(7):1189-1197

3. Kihara R, Nagata Y, Kiyoi H, Kato T, Yamamoto E, Suzuki K, Chen F, Asou N, Ohtake S, Miyawaki S, Miyazaki Y, Sakura T, Ozawa Y, Usui N, Kanamori H, Kiguchi T, Imai K, Uike N, Kimura F, Kitamura K, Nakaseko C, Onizuka M, Takeshita A, Ishida F, Suzushima H, Kato Y, Miwa H, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Naoe T. Comprehensive analysis of genetic alterations and their prognostic impacts in adult acute myeloid leukemia patients. *Leukemia* 28(8), 1586-1595, 2014
2. 学会発表
 1. 重成敦子、鬼塚真仁、尾崎有紀、鈴木進悟、猪子英俊、安藤潔、椎名隆. LOHが疑われる再生不良性貧血患者のSS-SBT法によるDNAタイピングとLOHの検出. 第23回日本組織適合性学会大会. 2014

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

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

非血縁ドナー選択アルゴリズムについての研究

業務担当責任者:一戸 辰夫 広島大学原爆放射線医科学研究所血液・腫瘍内科研究分野 教授

研究協力者:大島 久美 広島大学原爆放射線医科学研究所 血液・腫瘍内科研究分野 講師

川瀬 孝和 広島大学原爆放射線医科学研究所 血液・腫瘍内科研究分野 助教

中瀬 浩一 愛媛県立中央病院 血液内科 部長

日本造血細胞移植学会「海外ドナーからの移植ワーキンググループ」

研究要旨: 日本骨髄バンクは、海外 4 地域(米国、台湾、韓国、中国)の造血幹細胞バンクとの業務提携を締結しており、国内において HLA 適合ドナーが得られにくい場合には、非血縁ドナーソースを海外に求めることが可能となっている。したがって、海外バンクにおいて HLA 適合性の高いドナーを得られやすい HLA 型の特徴が明らかとなれば、ドナーコーディネートの迅速化と円滑化に寄与することが予測される。そこで本研究では、非血縁者間造血幹細胞移植における適切なドナー選択アルゴリズム策定の一助とするため、過去にわが国で海外ドナーからの移植を受けた症例における HLA 型・HLA ハプロタイプの特徴を検討した。

A. 研究目的

海外ドナーからの非血縁者間造血幹細胞移植は、さい帯血移植や HLA 不適合血縁者間移植が普及する以前は、国内の骨髄バンクに HLA 適合ドナーを得られない症例にとって、非常に貴重な幹細胞源であった。現在でも、一定期間コーディネートを待機することが許容される病状で、HLA-A, -B, -C, -DRB1 四座位のアリル適合ドナーが得られる可能性があれば、海外ドナーからの造血幹細胞移植は、非血縁ドナー選択肢のアルゴリズムに積極的に組み入れられるべきと考えられる。そこで本研究では、迅速な非血縁ドナーのコーディネートをを行う一助とするために、過去にわが国で海外ドナーからの移植を受けた症例における HLA 型・HLA ハプロタイプの

特徴を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1997 年から 2011 年までの間に、骨髄バンクを介して海外ドナーから移植が行われた 140 症例を対象として、HLA-A, -B, -DRB1 の抗原型を TRUMP から抽出し、最も蓋然性の高い HLA ハプロタイプを推定し、それらのリストを作成した。なお、HLA ハプロタイプの推定は、すでに公開されている骨髄提供希望登録者のハプロタイプ (N=190,856) などを利用して、日本列島に 0.1%以上の頻度 (おおむね上位 200 位) で存在するものを優先し、0.1%未満のハプロタイプ同士の組み合わせで複数の可能性が存在する場合には推定困難例として扱った。

(倫理面への配慮)

本研究は、日本造血細胞移植学会造血細胞移植登録一元管理委員会の設置する「海外ドナーからの移植」ワーキンググループの研究として同委員会での承認を受け、疫学研究の倫理指針に準拠して実施した。

C. 研究結果

海外ドナーから造血幹細胞移植を実施された症例集団の中における、日本列島高頻度ハプロタイプの頻度を表 1 に示す。また、東アジア 3 地域 (台湾・韓国・中国) における高頻度ハプロタイプを保有していた症例の比率を表 2 に示す。海外ドナーからの移植例における日本列島上位 3 位までの A-B-DR ハプロタイプ (A24-B52-DR15, A33-B44-DR13, A24-B7-DR1) の頻度は合計しても 6%以下であり、国内ドナーから移植を行なっている症例集団とは大きく異なっていることが明らかとなった。一方、海外ドナーからの移植例において最も高頻度のハプロタイプは、台湾・韓国においても比較的高頻度に存在する A2-B46-DR8 (日本列島における頻度第 5 位: A*02:07-B*46:01-DRB1*08:03) であった。

D. 考察

今回の予備的な解析の結果、海外ドナーから移植を行なわれた症例集団においては、日本列島における一般集団と異なる HLA ハプロタイプの分布様式が観察され、骨髄バンクが提携する海外バンクにおける高頻度ハプロタイプの分布比率が高いことが推測された。本研究を通じて、わが国で海外ドナーから移植を受けた症例の HLA 型および HLA ハプロタイプの特徴をさらに明らかとするとともに、これらの結果を適切な形で公開することが可能となれば、ドナーコーディネートの迅速化と円滑化に寄与することが予測される。

E. 結論

海外ドナーから移植を実施された症例集団における HLA 抗原型ハプロタイプの頻度は、日本列島におけるハプロタイプ頻度と大きく異なっていた。

F. 健康危険情報

特記すべき内容はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

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. Impact of HLA allele mismatch on the outcome in serologically-matched related hematopoietic SCT. **Bone Marrow Transplant.** 2014 Sept; **49(9):1187-92.**

Kanda J, Ichinohe T, Fuji S, Maeda Y, Ohashi K, Fukuda T, Miyamura K, Iwato K, Eto T, Hirohisa Nakamae H, Kobayashi N, Mori T, Mori SI, Morishima Y, Atsuta Y, Kanda Y on behalf of the HLA Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. The impact of HLA mismatch direction on the outcome of unrelated bone marrow transplantation: A retrospective analysis from the JSHCT. **Biol Blood Marrow Transplant.** 2015 Feb; **21(2): 305-11.**

Nakasone N, Fukuda T, Kanda J, Mori T, Yano S, Kobayashi T, Miyamura K, Eto T, Kanamori H, Iwato K, Uchida N, Mori SI, Nagamura-Inoue T, Ichinohe T, Atsuta Y, Teshima T, Murata M. Impact of conditioning intensity and total body irradiation on acute graft-versus-host disease after hematopoietic cell transplantation. **Bone Marrow Transplant.** Epub 2014 Dec 22.

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, Koderu Y, Sasazuki T. Biological significance of HLA locus matching in unrelated donor bone marrow transplantation. **Blood**. 2015 Feb; 125(7):1189-97.

2. 学会発表

Aoki J, Ishiyama K, Aoki K, Ishikawa T, Itonaga H, Fukuda T, Ohashi K, Iwato K, Kato C, Mori T, Miyamura K, Nagamura T, Mori S, Ichinohe T, Atsuta Y, Miyazaki Y. Impact of graft-versus-host disease on outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for low-risk myelodysplastic syndrome. 19th Congress of the European Hematology Association, Milan, Italy, June 12-15, 2014.

Takagi S, Matsuoka 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 the Japanese Society for Hematopoietic Cell Transplantation.

56th Annual Meeting of the American Society for Hematology, San Francisco, CA, December 7, 2014.

Aoki T, Suzuki R, Kuwatsuka Y, Kako S, Fujimoto K, Taguchi J, Kondo T, Yoshida A, Ito T, Kamoda Y, Fukuda T, Ichinohe T, Takeuchi K, Izutsu K, Suzumiya J. Long-term survival with high-dose chemotherapy followed by autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for patients with blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: a retrospective registry study from the Japanese Society for Hematopoietic Cell Transplantation. 56th Annual Meeting of the American Society for Hematology, San Francisco, CA, December 7, 2014.

栗屋忠祐, 大島久美, 山田恭平, 今川 潤, 一戸辰夫. 同種造血幹細胞移植後サイトメガロウイルス感染症に対する少量バルガンシクロビル投与後の骨髄抑制 (ポスター). 第 37 回日本造血細胞移植学会総会. 神戸市, 2015 年 3 月 6 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

表 1: 海外ドナーからの移植例における日本列島高頻度ハプロタイプ保有者の比率*

	海外ドナーからの 移植例における ハプロタイプ頻度	日本列島における ハプロタイプ頻度
A24-B52-DR15	2.9%	8.6%
A33-B44-DR13	0.7%	4.5%
A24-B7-DR1	2.1%	3.9%
A24-B54-DR4	1.4%	2.9%
A2-B46-DR8	3.6%	2.2%

表 2: 海外ドナーからの移植例における東アジア三地域(中国・台湾・韓国)高頻度ハプロタイプ保有者の比率*

	海外ドナーからの 移植例における ハプロタイプ頻度	日本列島における ハプロタイプ頻度
A2-B46-DR8/9	8.6%	2.8%
A11-B60-DR4/9	3.6%	0.2%
A33-B58-DR3/13	2.9%	0.4%
A33-B44-DR7	2.1%	<0.1%
A2-B13-DR12	2.1%	<0.1%
A30-B13-DR7	0.7%	0.2%
A11-B75-DR12	0%	<0.1%

?

*日本列島の一般集団におけるハプロタイプ頻度は公益財団法人 HLA 研究所の統計資料に基づいて推定した。

(http://hla.or.jp/haplo/frequency_search/haplomavi.php?type=ag&lang=ja)

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 京都大学大学院医学研究科 腫瘍生物学・教授

研究要旨： 後天性再生不良性貧血は、自己免疫学的な機序による造血幹細胞の破壊と考えられているが自己抗原に関する知見は乏しい。また再生不良性貧血はしばしば造血器腫瘍に移行し、再生不良性貧血そのものにもクローン性造血を認めるが、再生不良性貧血におけるクローン構造に関しても不明な点が多い。今回、我々は AA に対する遺伝子解析を行い、HLA タイピングを行い、AA におけるクローン構造の詳細な評価を行い、そのクローン構造が自己免疫学的な病態や予後へどのように関与しているかを解析した。

その結果、AA における変異スペクトラムまたその継時的な挙動・予後への影響を明らかにした。また、AA の発症・病態に関わる特定の HLA アレルを同定した。

A. 研究目的

後天性再生不良性貧血は(AA)、骨髄不全により汎血球減少を来す代表的な疾患である。AAの大多数は、特発性であるが、その主因は、自己免疫学的な機序による造血幹細胞の破壊と考えられている。実際、免疫抑制剤の導入により、AA 症例の予後は大きく改善してきた。しかし、AA における自己抗原等の免疫学的病態に関しては不明な点が多い。一方で、十数%の症例が、経過中に、発作性夜間血色素尿症 (PNH) や骨髄異形成症候群 (MDS) ・急性骨髄性白血病 (AML) といった明らかなクローン性疾患に移行することが知られており、これらの疾患との病態学的な関連が疑われる。また、AA 自体にも、染色体異常や、PNH 型血球・女性患者における X 染色体不活化パターンの偏向など、クローン性造血を示唆する所見がしばしば観察される。しかし、AA におけるクローン性造血の病態への関与に関しても不明な点が多い。

B. 研究方法

日米 3 施設 (米国国立衛生研究所 (NIH) (256 症例)、金沢大学 (159 症例)、Cleveland clinic (24 症例)) より提供された再生不良性貧血患者末梢血 DNA を用いて、骨髄系腫瘍の主要標的を含んだ 106 遺伝子に対するターゲットシーケンスを施行した。また、HLA タ

イピングも併せて行い、臨床情報とともに解析を行った。

(倫理面への配慮)

患者検体の収集、遺伝子解析については、参加施設において倫理委員会の承認を受けて実施されており、匿名化による個人情報保護等の人権擁護上の配慮、不利益・危険性の排除、説明と文書による同意が行なわれている。患者死亡等により本人よりの同意取得が不可能な検体に関しては倫理委員会の承認を得た上で連結不可能匿名化を行った後に解析を実施した。

C. 研究結果

標的シーケンスにより 33%の症例に、遺伝子変異を認め、変異は、BCOR/BCORL1 (9.2%)、DNMT3A (8.4%)、PIGA (7.5%)、ASXL1 (6.2%) に高頻度に認めた。また、SNP アレイによるコピー数変化も併せて評価したところ、ゲノムコピー数異常・不均衡を示す症例も 15%認め、HLA クラス I 領域を含む 6 番染色体の片親性二倍体 (6pUPD) が最も多く認められ約 13%の症例に認めた。BCOR/BCORL1 変異症例は非変異症例に比べ、免疫抑制剤に対する反応性が良好であった。さらに、BCOR/BCORL1・PIGA 変異は非変異例に比べ、良好な生存率を呈し、MDS への進展も少なかった。一方、BCOR/BCORL1・PIGA 以外の変

異を認めた症例は、それ以外の症例に比べ予後不良であった。変異クローンの継時的挙動を解析したところ、DNMT3A・ASXL1 変異クローンは時間経過とともに増大する傾向を呈したが、BCOR・PIGA 変異クローンは縮小または横ばいの傾向であった。

我々は、以前金沢大学との共同研究で AA において、6pUPD における欠失ハプロタイプに含まれている HLA クラス I アレルには大きな偏りがあり、特に HLA-A*0201、A*02:06、A*31:01、B*40:02 の 4 アレルに高頻度に認められることを報告したが、今回米国の症例でも HLA-B : 40:02 の濃縮を認めた。

D. 考察

PIGA 遺伝子は、変異が生じると GPI アンカー蛋白が欠損し、その GPI アンカー蛋白が欠損した細胞は免疫細胞からの認識を逃れ相対的に増加することが知られているが、6pUPD に関しても、陽性例で欠失している HLA アレルは、特定の HLA に偏っており、自己抗原提示に関与し、特定の HLA アレルを欠失することで自己免疫反応からのエスケープに関与していると考えられる。6pUPD で欠失しているアレルを含まないドナー幹細胞を利用することで生着不全を抑制するなど、AA における造血幹細胞移植に役立つ可能性がある。また、今回 AA において高頻度に変異を認めた BCOR/BCORL1 遺伝子に関しても免疫抑制療法に対する反応が良好である、継時的にクローンの縮小または横ばいの傾向を呈するなどの挙動から PIGA 変異や 6pUPD と同様に自己免疫からのエスケープに関与している可能性が示唆される。

E. 結論

AA を対象として、標的シーケンス・SNP アレイを行い約 47%の症例にクローン造血を同定した。また変異クローンと特定の HLA アレルの病態への関与の一端を示した。

F. 研究発表(本研究に関わるもの)

1. 論文発表

- 1) Dumitriu B, Feng X, Townsley DM, Ueda Y, Yoshizato T, Calado RT, Yang Y, Wakabayashi Y, Kajigaya S, Ogawa S, Zhu J, Young NS. Telomere attrition and candidate gene mutations preceding monosomy 7 in aplastic anemia. *Blood*;125:706-709 2015.
- 2) Lin TL, Nagata Y, Kao HW, Sanada M, Okuno Y, Huang CF, Liang DC, Kuo MC, Lai CL, Lee EH,

Shih YS, Tanaka H, Shiraishi Y, Chiba K, Lin TH, Wu JH, Miyano S, Ogawa S, Shih LY. Clonal leukemic evolution in myelodysplastic syndromes with TET2 and IDH1/2 mutations. *Haematologica*;99:28-36 2014.

3) Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, Schnittger S, Sanada M, Kon A, Alpermann T, Yoshida K, Roller A, Nadarajah N, Shiraishi Y, Shiozawa Y, Chiba K, Tanaka H, Koeffler HP, Klein HU, Dugas M, Aburatani H, Kohlmann A, Miyano S, Haferlach C, Kern W, Ogawa S. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*;28:241-247 2014.

2. 学会発表

1. Tetsuichi Yoshizato, Ogawa S他, Chronological analysis of clonal evolution in acquired aplastic anemia/ The 18th Congress of European Hematology Association, Milan, Italy, 2014/6/14
2. Tetsuichi Yoshizato, Ogawa S 他, Chronological Analysis of Clonal Evolution in Acquired Aplastic Anemia/ 56th American Society of Hematology Annual meeting, San Francisco, USA, 2014/12/8
3. Tetsuichi Yoshizato,Ogawa S 他, Chronological analysis of clonality in patients with SAA/第 73 回日本癌学会学術集会. 横浜. 2014/9/26
4. Tetsuichi Yoshizato,Ogawa S 他, Complete chronological history of clonal evolution in sMDS from acquired aplastic anemia/第 76 回日本血液学会学術集会. 大阪. 2014/11/1

G. 知的財産権の出願・登録状況

- 1.特許取得
該当事項なし
- 2.実用新案登録
該当事項なし
- 3.その他
該当事項なし

別紙4 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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, Koderu Y, Sasazuki T.	Biological significance of HLA locus matching in unrelated donor bone marrow transplantation.	Blood	125(7)	1189-1197.	2015
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:	Biol Blood Marrow Transplant	20(11)	1785-1790.	2014

Regular Article

TRANSPLANTATION

Biological significance of HLA locus matching in unrelated donor bone marrow transplantation

Yasuo Morishima,¹ Koichi Kashiwase,² Keitaro Matsuo,³ Fumihiro Azuma,² Satoko Morishima,⁴ Makoto Onizuka,⁵ Toshio Yabe,² Makoto Murata,⁶ Noriko Doki,⁷ Tetsuya Eto,⁸ Takehiko Mori,⁹ Koichi Miyamura,¹⁰ Hiroshi Sao,¹¹ Tatsuo Ichinohe,¹² Hiroo Saji,¹³ Shunichi Kato,¹⁴ Yoshiko Atsuta,^{15,16} Keisei Kawa,¹⁷ Yoshihisa Kodera,¹⁸ and Takehiko Sasazuki,¹⁹ for the Japan Marrow Donor Program

¹Division of Epidemiology and Prevention, Aichi Cancer Center Research Institute, Nagoya, Japan; ²Japanese Red Cross Kanto-Koshinetsu Block Blood Center, Tokyo, Japan; ³Department of Preventive Medicine, Kyushu University School of Medicine, Fukuoka, Japan; ⁴Department of Hematology, Fujita Health University School of Medicine, Toyoake, Japan; ⁵Department of Hematology and Oncology, Tokai University School of Medicine, Isehara, Japan; ⁶Department of Hematology and Oncology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan; ⁷Hematology Division, Tokyo Metropolitan Cancer and Infectious Diseases Center Komagome Hospital, Tokyo, Japan; ⁸Department of Hematology, Hamanomachi Hospital, Fukuoka, Japan; ⁹Division of Hematology, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan; ¹⁰Department of Hematology, Japanese Red Cross Nagoya First Hospital, Nagoya, Japan; ¹¹Department of Hematology, Meitetsu Hospital, Nagoya, Japan; ¹²Department of Hematology and Oncology, Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University, Hiroshima, Japan; ¹³HLA Laboratory, Kyoto, Japan; ¹⁴Department of Cell Transplantation, Tokai University School of Medicine, Isehara, Japan; ¹⁵Japanese Data Center for Hematopoietic Cell Transplantation, Nagoya, Japan; ¹⁶Department of Healthcare Administration, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan; ¹⁷Japanese Red Cross Kinki Block Blood Center, Osaka, Japan; ¹⁸Department of Promotion for Blood and Marrow Transplantation, Aichi Medical University, Aichi, Japan; and ¹⁹Institute for Advanced Study, Kyushu University, Fukuoka, Japan

Key Points

- Significant HLA locus mismatches responsible for transplant-related events were determined in 7898 unrelated marrow donor transplants.
- This information provides a rationale for use of an algorithm for unrelated donor selection.

We hypothesized that the compatibility of each HLA loci between donor and patient induced divergent transplant-related immunologic responses, which attributed to the individualized manifestation of clinical outcomes. Here, we analyzed 7898 Japanese pairs transplanted with T-cell–replete marrow from an unrelated donor with complete HLA allele typing data. Multivariable competing risk regression analyses were conducted to evaluate the relative risk (RR) of clinical outcomes after transplantation. A significant RR of HLA allele mismatch compared with match was seen with HLA-A, -B, -C, and -DPB1 for grade III-IV acute graft-versus-host disease (GVHD), and HLA-C for chronic GVHD. Of note, only HLA-C and HLA-DPB1 mismatch reduced leukemia relapse, and this graft-versus-leukemia effect of HLA-DPB1 was independent of chronic GVHD. HLA-DRB1 and HLA-DQB1 double (DRB1_DQB1) mismatch was revealed to be a significant RR for acute GVHD and mortality, whereas single mismatch was not. Thus, the number of HLA-A, -B, -C, -DPB1, and DRB1_DQB1 mismatches showed a clear-cut risk difference for acute GVHD, whereas the number of mismatches for HLA-A, -B, -C, and DRB1_DQB1 showed the same for mortality. In conclusion, we determined the biological response to HLA locus mismatch in transplant-related immunologic events, and provide a rationale for use of a personalized algorithm for unrelated donor selection. (*Blood*. 2015;125(7):1189-1197)

Introduction

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors (UR-HSCT) has been established as a mode of curative therapy for hematologic malignancies and other hematologic or immunologic disorders when an HLA-identical sibling donor is unavailable. Identification of the HLA locus matching at the allele level responsible for immunologic events related to HSCT is important in optimizing HLA matching and minimizing graft-versus-host disease (GVHD) and engraftment failure, as well as in enhancing the graft-versus-leukemia (GVL) effect.¹⁻³

In the late 1990s, the Japan Marrow Donor Program (JMDP) demonstrated for the first time the effect of matching of HLA class I alleles on acute GVHD and the importance of HLA-A and -B allele matching for survival.² Analysis of a large cohort in the United States also indicated that HLA allele mismatching is a significant risk factor for severe acute GVHD and mortality.³ Subsequent extensive analysis of the JMDP, US National Marrow Donor Program (NMDP), European registries, and the International Histocompatibility Workshop Group (IHWG) revealed considerable evidence that HLA allele

Submitted October 6, 2014; accepted December 8, 2014. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, December 17, 2014; DOI 10.1182/blood-2014-10-604785.

The online version of this article contains a data supplement.

There is an Inside *Blood* Commentary on this article in this issue.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2015 by The American Society of Hematology

compatibility,⁴⁻¹¹ HLA haplotype,^{12,13} and HLA epitope¹⁴⁻¹⁶ are significantly associated with clinical outcomes.

We hypothesized that the compatibility of the respective HLA loci between donor and patient accounts for the divergence in transplant-related immunologic responses, and that this effect influences the individualized manifestation of clinical outcomes overall.

Here, to elucidate the biological effects of HLA locus matching on clinical outcomes, we selected pairs transplanted with T-cell–replete marrow for whom precise data for the complete HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, and -DPB1 alleles were obtained by retyping.

Methods

Study population

Unrelated donor transplant pairs (7898) from the JMDP database met the following criteria and were included in the analysis: (1) transplantation pairs retyped for HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, and -DPB1 alleles; (2) T-cell–replete marrow without in vivo use of anti-thymocyte globulin or anti-T-cell monoclonal antibody for GVHD prophylaxis; (3) first transplantation; (4) Japanese ethnicity; and (5) survival for >7 days after transplantation. All pairs were transplanted between January 1993 and December 2010. A total of 12 502 pairs were facilitated through the JMDP during this period. The present 7898 study pairs with retyped HLA data consisted of 74.7% of the 10 575 pairs who matched selection criteria 2 to 5. No significant difference in clinical factors was seen between the HLA retyped and nonretyped pairs (data not shown). Patient diagnosis is listed in Table 1. Standard-risk leukemia was defined as chronic myeloid leukemia (CML) in the first chronic phase or acute lymphoblastic leukemia (ALL) and acute myeloblastic leukemia (AML) in the first complete remission (CR) at the time of transplantation, and diagnosed in 2508 patients, whereas high-risk leukemia was defined as transplantation at a more advanced stage than in standard-risk leukemia, and was diagnosed in 2772 patients. Sex matching between donor and patient was female (donor) to male (patient) in 1494 pairs, male to male in 3253, female to female in 1442, and male to female in 1709. For GVHD prophylaxis, no patient had in vivo use of anti-thymocyte globulin or a monoclonal antibody such as CAMPATH-1H. Tacrolimus-based regimens were used in 4779 patients, in combination with methotrexate in 4529; cyclosporine-based regimens were used in 3078, in combination with methotrexate in 2993; and other regimens were used in 41. The conditioning regimen was classified as myeloablative if it included total body irradiation (TBI) ≥ 8 Gy, oral busulfan (Bu) ≥ 9 mg/kg, IV Bu ≥ 7.2 mg/kg, or melphalan > 140 mg/m²; otherwise, it was classified as a reduced-intensity regimen. Transplantation conditioning was done with a myeloablative regimen in 6653 patients and with a reduced-intensity regimen in 1245 patients. Patient and donor characteristics and HLA matching in the GVH direction in total pairs are shown in Table 1, and by HLA locus matching in supplemental Table 1 (see supplemental Data available on the *Blood* Web site).

A final clinical survey of patients was completed by September 2012 using the Transplant Registry Unified Management Program.¹⁷ Informed consent was obtained from patients and donors in accordance with the Declaration of Helsinki, and approval for the study was obtained from the Institutional Review Board of Aichi Cancer Center and the JMDP.

Outcome definition

Mortality was defined as time from transplantation to death from any cause. Clinical grading of acute GVHD was performed according to established criteria.^{18,19} Chronic GVHD was defined as limited or extensive chronic GVHD according to the Seattle criteria.²⁰ Neutrophil engraftment was defined as more than 500 cells per cubic millimeter in peripheral blood at 3 consecutive measurements. Relapse was evaluated in patients with AML, ALL, or CML.

Table 1. Patient and donor characteristics

Characteristics	Value
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, y	
Median (range)	35 (0-77)
Donor age, y	
Median (range)	34 (20-56)
Disease, no. (%)	
Acute lymphoblastic leukemia	1861 (24)
Acute myeloblastic leukemia	2609 (33)
Chronic myeloid leukemia	983 (12)
Myelodysplastic 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)

Patient and donor characteristics by HLA locus matching are shown in supplemental Table 1.

N/A, not applicable.

HLA typing and matching

All donor-patient pairs were retrospectively genotyped between 2009 and 2011 for all HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, and -DPB1 alleles at the field 1 and field 2 level of the 2010 World Health Organization Nomenclature for factors of the HLA system.²¹ The polymerase chain reaction–sequence specific oligonucleotide method was used for all samples, and the polymerase chain reaction–sequencing based typing method was used to confirm rare alleles and new alleles. HLA alleles were identified with >99.9% accuracy among Japanese. HLA alleles and their number are shown in supplemental Table 2, which also shows HLA loci and their level at confirmatory typing before transplantation.

HLA locus mismatch among the donor-recipient pairs was scored when the recipient's HLA alleles or antigens were not shared by the donor in the GVH direction for acute GVHD, chronic GVHD, leukemia relapse and survival analysis, and in the HVG direction for neutrophil engraftment. HLA allele match rate in the GVH direction by HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, and -DPB1 was 89.2%, 94.6%, 70.5%, 74.4%, 71.9%, and 33.0%, respectively, whereas serological HLA antigen match rate in the GVH direction by HLA-A, -B, -C, and -DR was 99.7%, 99.5%, 72.3%, and 91.8%, respectively.