

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 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る。

## 担当責任者

森島泰雄 愛知県がんセンター研究所研究  
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  
愛知医科大学医学部 教授 高見昭良  
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。本研究班の目的は、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、さい帯血移植ペア約 3000 ペア)、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 タイピングを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知見となろう(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 抗原である HLA-DRB1 と DQB1 の不適合が重くなると急性 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 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)
  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)
- H. 知的財産権の出願・登録状況**  
(予定を含む。)  
なし