

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 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 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 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 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。

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: 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アリル不適合を選択)

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

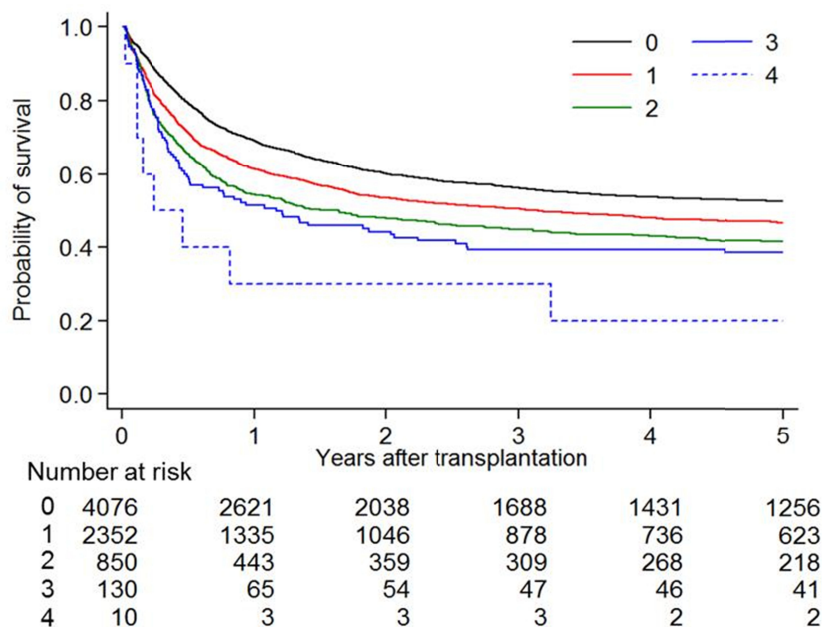
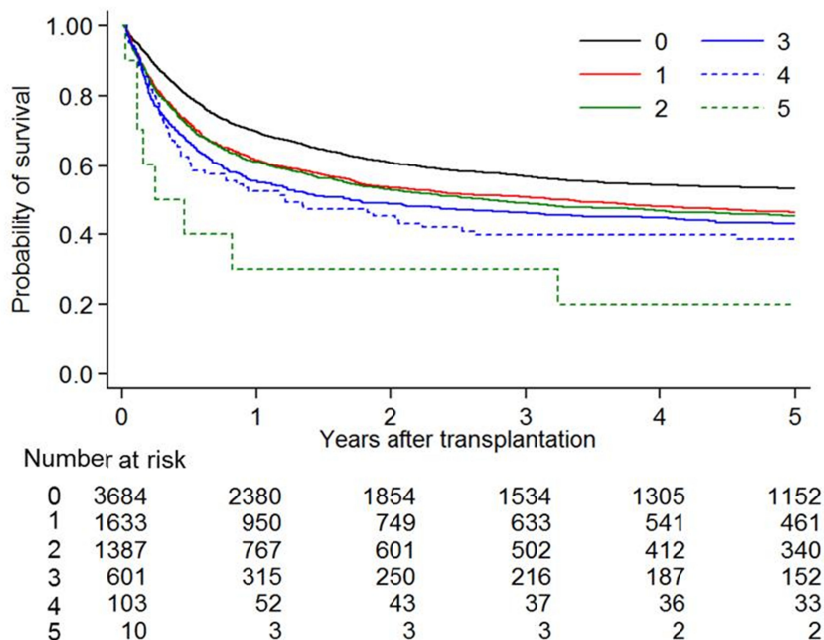


図2 . HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 適合数と生存 (各座1アリル不適合を選択)



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)

非血縁者間骨髄移植におけるHLAアリル、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 アリルのリタイピングが施行された患者とドナー6967例のHLAアリルデータ及び臨床データを用いて、患者及びドナーのHLAアリ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アリルの中で、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つのアリ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。有意な関連を示したアリ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。

H. 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 アリルや 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アリルや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アリルやハプロタイプが急性GVHDに及ぼす影響を解析した。

I. 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アリ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%以上のアリルを選択し、アリ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リルのGVHD方向のミスマッチを変数に含めて調整した。

J. 研究結果

頻度が5%以上のアリルはHLA-A 7、-B 8、-C 8、-DRB1 7、-DQB1 8、-DPB1 5の43アリルであった。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。

K. 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。

L. 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。

M. 健康危険情報

なし

N. 研究発表

3) 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, Koderu 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.

4) 学会発表
なし

○. 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

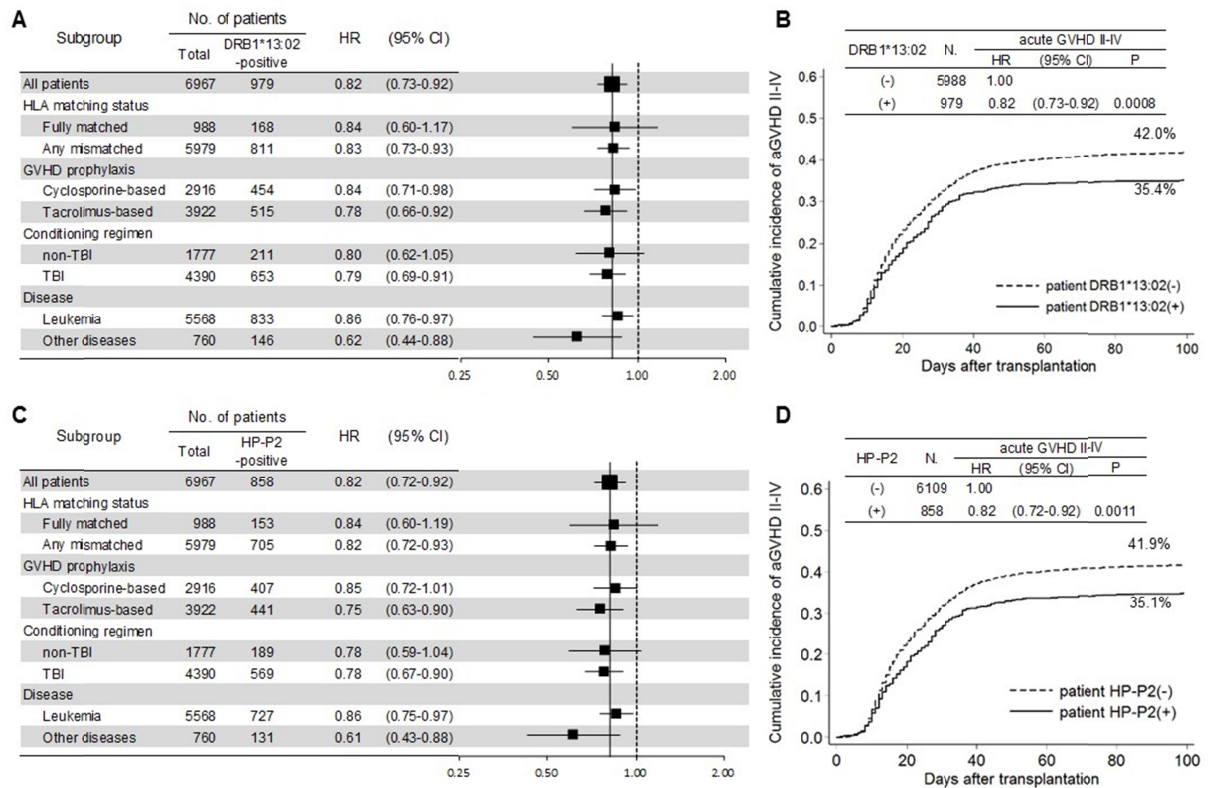
HLA allele†	N‡	(%)	Grades II-IV			Grades III-IV		
			HR§	(95% CI)	P	HR§	(95% CI)	P
HLA alleles associated with decreased risk of acute GVHD								
Patient								
A*33:03	1,094	(16)	0.83	(0.74-0.92)	0.0007	0.82	(0.82-0.69)	0.0256
B*44:03	1,041	(15)	0.82	(0.74-0.92)	0.0006	0.79	(0.66-0.94)	0.0086
C*14:03	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
HLA alleles associated with increased risk of acute GVHD								
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.

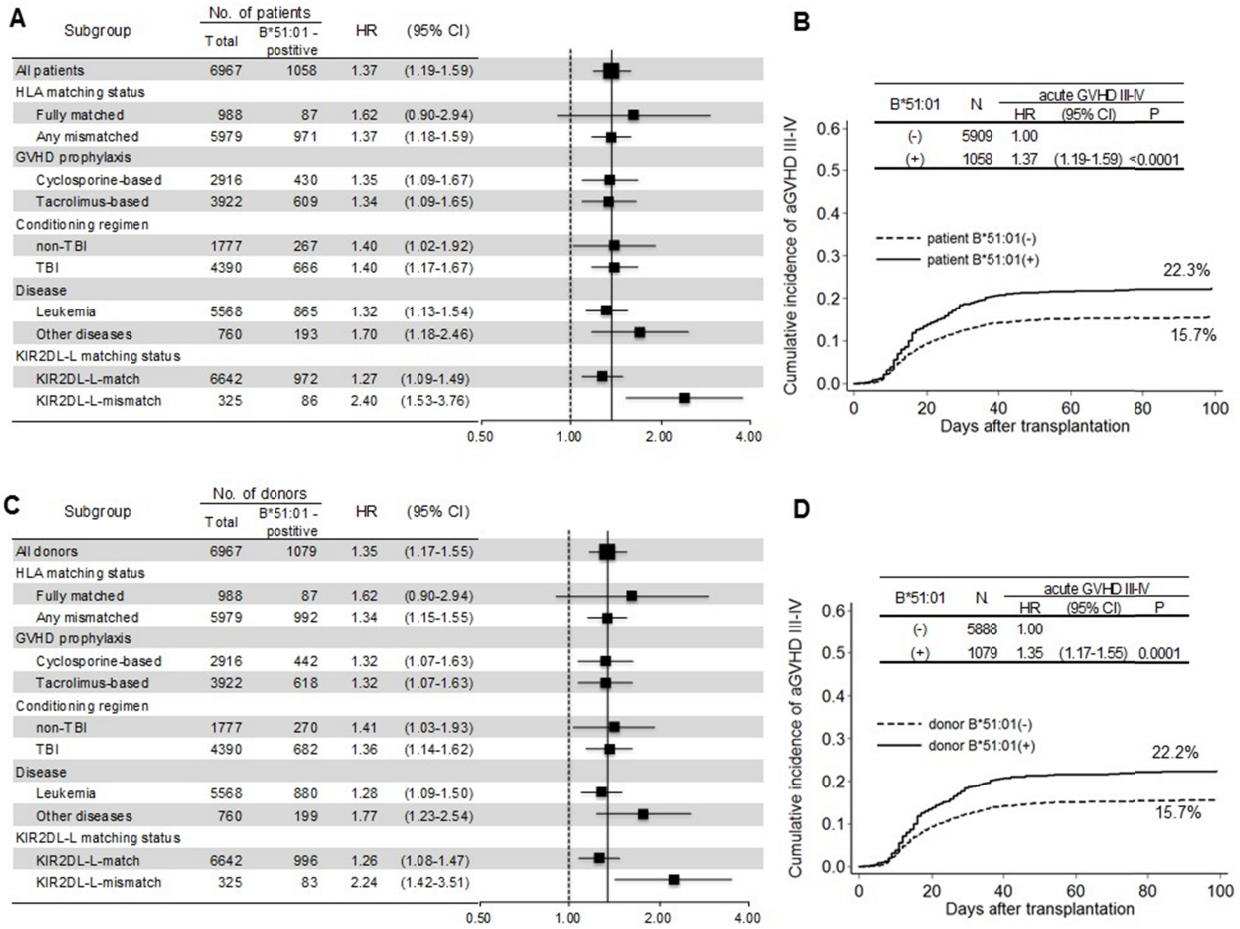
§ HR (hazard ratio) indicates comparison of the specific HLA allele-positive group to -negative group adjusted for clinical factors and HLA allele matching as listed in Table 1.

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。

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 領域の適合度とその急性 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經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。HLA A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 遺伝子型完全適

合ペア(n=409)、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 391 ペア、960 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 SNPTyping 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 が増えるアリ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 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 に対して、コホート 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 、 を全て含めたデータを用い、 群 と 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 、 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 で多くなっている。

表3に、コホート 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 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 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 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 においては(表5右上)、コホート で認められ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 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/Q	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	196
FASAS	chr10:90749963	C/T	Downstream	-	-
IFNG	chr12:68555011	C/T	Promoter	-	-
UGT2B17		deletion	Coding exon	-	-
UGT2B28		deletion	Coding exon	-	-
LGE3C		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	
CCL2	rs1024610	0.80	(0.41 - 1.56)	0.510	0.07	
CCL2	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		

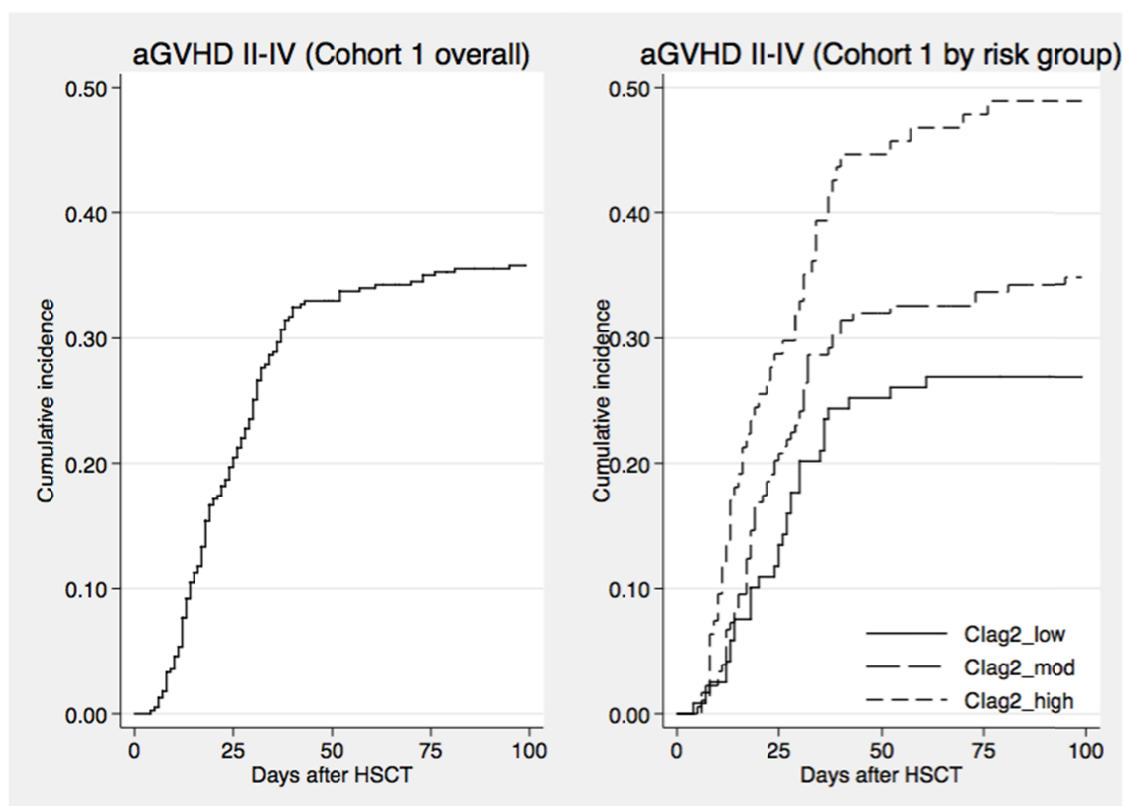
*全てのHRは、表2にリストされる変数を共変量として調整

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

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

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

図1. コホート 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



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)

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。

P. 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。

Q. 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

ーを対象とし、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。

R. 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、THBD SNP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。

S. 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。

T. 結論

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。

U. 健康危険情報

なし

V. 研究発表

5) 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 HLA, Donor/Source Working G, Adult AMLWG, Adult ALLWG, JSfHCT. 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.

6) 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 Malignancies2014.

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 Individuals2014.

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

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)

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 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 クローンの 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 クローンは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, Koderu 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。

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)

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リル情報は、いずれのHLA座とも既知アリ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。

W. 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区域までのアリ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適用するためには、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リル判定を目指した 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。

X. 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% 以上のアリ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リル判定プログラム SeaBass を用いたアリル判定を行い、既知アリ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。

Y. 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リ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必要になった。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。

Z. 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。

AA. 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。

BB. 健康危険情報

なし

CC. 研究発表

7) 論文発表

なし

8) 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レル判定プログラム (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

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)

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 タイピングデータを入手し、必要なものについてはさらに HLA アリルタイピングを実行し、患者、臍帯血ペアの HLA 6 座 (-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DPB1)12 抗原のアリルデータを揃える。3、HLA 領域および非 HLA 領域の組織適合性遺伝子の多型を TaqMan 法、ルミネックス蛍光ビーズ法、遺伝子シーケンシング法などによりタイピングしてデータベースを作成する。4、得られた HLA 型、遺伝子型と臨床移植成績との関連解析を行う。

(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

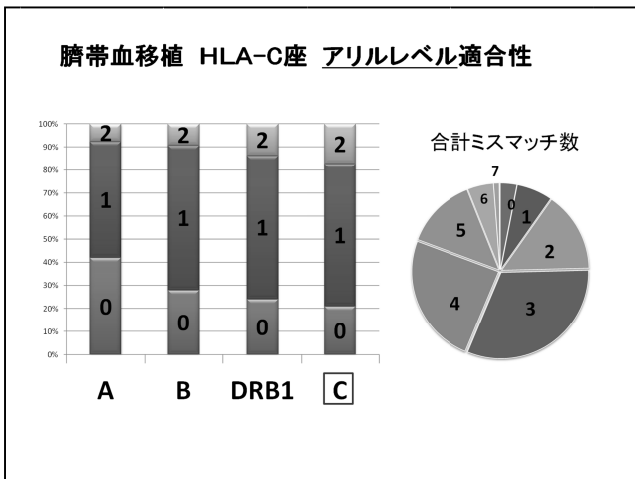
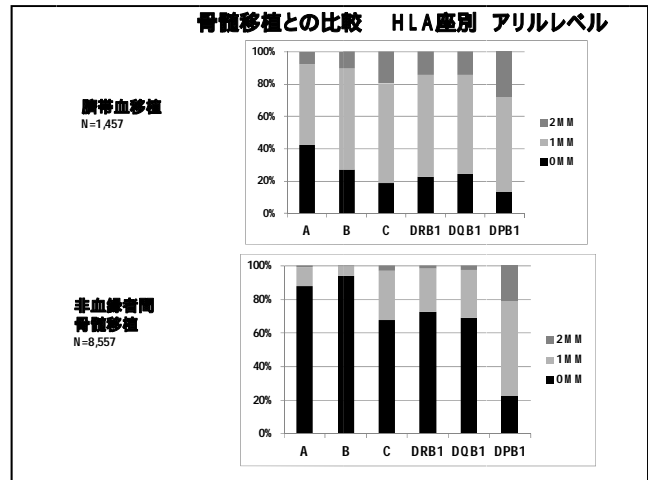
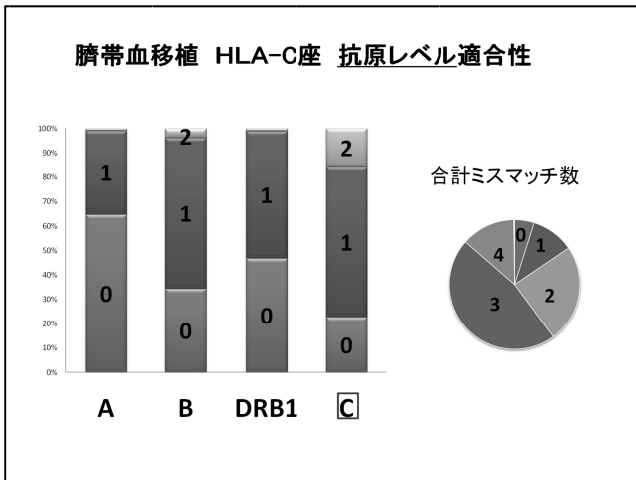
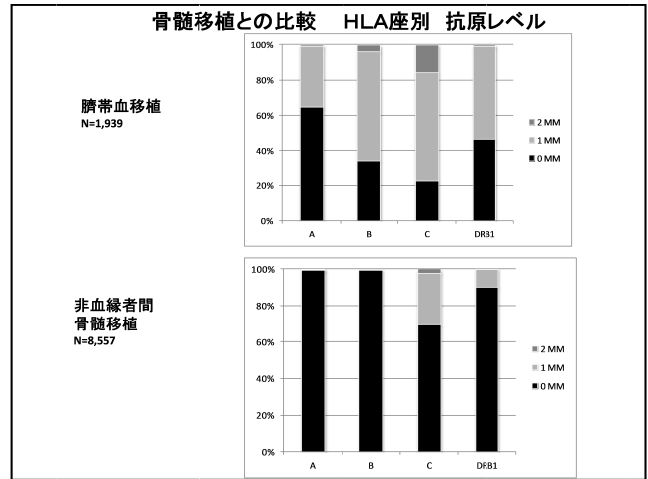
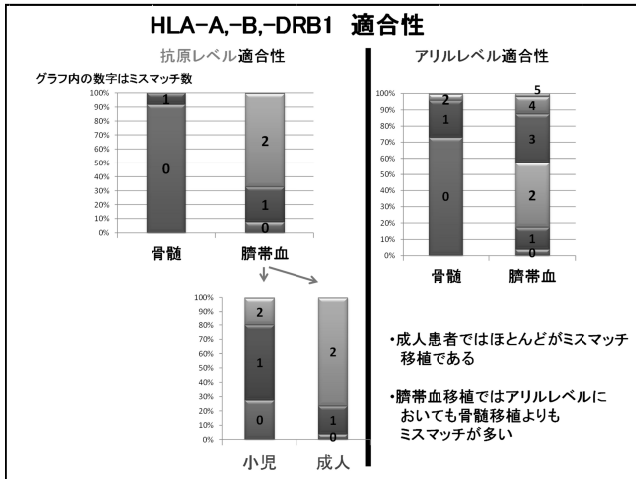
- 1). Morishima Y, Kashiwase K, Matsuo K, Azuma F, Morishima S, Onizuka M, Yabe T, Murata M, Doki N, Eto T, Mori T, Miyamura K, Sao H, Ichinohe T, Saji H, Kato S, Atsuta Y, Kawa K, Koderu Y, Sasazuki T. Biological significance of HLA locus matching in unrelated donor bone marrow transplantation. Blood. 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3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. 東海大学医学部附属病院にて 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

る、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

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

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, Kodera 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.

粟屋忠祐, 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/haplonavi.php?type=ag&lang=ja)

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)

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

研究分担者： 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(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*02:01、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