

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：83901

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22133011

研究課題名（和文）GvH反応とGvL反応の差を決定するHLA遺伝子及び非HLA遺伝子の解明

研究課題名（英文）Immunogenetic factor responsible to GvH reaction and/or GvL reaction.

研究代表者

森島 泰雄（Morishima, Yasuo）

愛知県がんセンター（研究所）・疫学・予防部・研究員

研究者番号：20220056

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 42,300,000円

研究成果の概要（和文）：造血細胞移植ではドナーと患者の間で特別な移植免疫反応が生じる。生着したドナー由来の免疫担当細胞が患者組織を攻撃する重症移植片対宿主病（GVHD）の抑制や白血病細胞を攻撃し移植後の白血病の再発を防ぐ移植片対白血病効果（GVL効果）の惹起は移植成績の向上のための最重要課題である。本研究では骨髄バンクを介した大規模な移植症例を用いて精緻な免疫遺伝学的手法を駆使し、人は多様なHLA抗原とHLA領域の構造を有し、この多様性が規則性をもってGVHDやGVL効果を生み出していることを明らかにした。移植の臨床に有用であるとともに、どうして移植免疫反応・自己免疫反応が生じるのかを明らかにする重要な知見となった。

研究成果の概要（英文）：Hematopoietic stem cell transplantation induces specific immunological reactions. Donor-derived immune cells attack patient tissues resulting in graft-versus-host disease (GVHD), and do patient leukemia cells in graft-versus-leukemia (GVL) effect. This study focused on these GVHD and GVL effect using large cohort of unrelated donor transplant with HLA data and clinical data. Refined immuno-genetic methods elucidated that the diversity of HLA antigen and their conservative segment of HLA region induces ordered degree of GVHD and GVL effect. These findings is important not only for clinical transplant but also for understanding the mechanism of transplant-related immunological reaction and auto-immune reaction.

研究分野：血液内科学

キーワード：GVHD GVL効果 HLA

1. 研究開始当初の背景

(1) HLA の多様性と移植関連免疫反応：多様な細菌・ウイルスなどの外的要因により選択・獲得されてきた HLA (ヒト主要組織適合性抗原) の高度な多型性は、他人の細胞・組織を患者に移入するという人工的な医療行為である造血細胞移植においては、ドナーとレシピエント間で特異的な移植免疫反応を惹起する最大の要因となっており、生着したドナー由来の免疫担当細胞が惹起する重症移植片対宿主病 (graft-versus-host disease :GVH)、移植片対白血病反応 (graft-versus-leukemia reaction :GVL) が惹起される。HLA とともに HLA と連鎖し、特定の HLA アレルと強い連鎖不平衡を保っている HLA 領域の非 HLA 遺伝子もこの要因と考えられるが推察の域を出ず、非 HLA 遺伝子や GVL や GVH の免疫遺伝学的発症機序の基礎的解明はなされていない。

(2) 同種造血幹細胞移植は重症造血器腫瘍患者等に治癒をもたらす治療法として確立され、日本骨髄バンクを介した非血縁者間移植やさい帯血バンクを介した非血縁者間移植がそれぞれ年間 1000 例以上実施されている。重症 GVHD の発症の克服と GVL 反応の惹起が移植成績を向上させるための最重要課題になっており、移植臨床データを用いた疫学的コホート研究では、HLA がドナーと患者間で不適合な場合に GVH や GVL が生じやすいなどの知見が蓄積されている。GVH を発症しない症例も認められることや、日本人に固有な HLA ハプロタイプそのものが GVH の発症に関与していることが示唆されている。

(3) 本研究で用いるデータ・試料は日本骨髄バンクを介して得られる約 1 万ペアという多数の質の高いもので、日本人の組織適合性の均一性とともに、本研究を可能にしている。さらに、国際組織適合性ワークショップグループ (IHWG) に参加しており、国際間の比較が可能である。

2. 研究の目的

本研究では、よく整備された非血縁者間骨髄移植ペアの試料を用い、GVH と GVL に関する HLA ならびに、連鎖不平衡にある非 HLA 遺伝子を最新のゲノム科学と免疫遺伝学的手法を用いて明らかにすることを目的とし、以下の 4 研究課題を設定した。

- (1) HLA アレルの適合度が GVHD と GVL に与える影響とその相互作用。
- (2) 日本人に特有な HLA ハプロタイプの同定と関連する連鎖不平衡 (LD) ブロックの同定することによる HLA 領域の保存性の検証。
- (3) HLA アレルと関連ハプロタイプそのものが GVHD と GVL に与える影響、すなわち HLA アレルの移植免疫反応に対する免疫原性の検証。
- (4) 日本人間移植と他の人種間移植で生じる GVHD/GVL の比較による人種間での組織適合性抗原関与の違いの検証。

3. 研究の方法

- (1) 日本骨髄バンクを介して得られたドナーと患者の試料を用いて HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 の第 1、第 2 領域のアレルタイピングを実施し、臨床成績と統合したデータベースを作成した。
- (2) 上記ペアの試料を用い全ゲノム関連解析 (GWAS) がなされたデータから HLA 領域 (6 番染色体短腕のテロメア側から 25-34Mb の約 1500 の SNP アレルと HLA 型からなるデータベースを作成した。
- (3) 国際組織適合性ワークショップグループ (IHWG) で得られた HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 アレルと臨床データからなる IHWG データベースを用いた。
- (4) 急性 GVHD、慢性 GVHD、白血病の再発と HLA 適合度、HLA アレル、HLA ハプロタイプ、SNP との関連解析は competing risk regression 法 (STATA) を用いて解析した。

4. 研究成果

- (1) HLA アレルの適合度が GVHD と GVL に与え

る影響とその相互作用：

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、後方視的に HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 アリルを retyping したドナー・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) 日本人間移植で該当 7898 ペアを解析した。

表 1. Hazard ratio (HR) of specific HLA locus mismatch for transplant outcomes (Morishima et al. 2015)

HLA MM locus ¹⁾	number	Acute GVHD (III - IV degree)		Leukemia Relapse	
		HR	p-value	HR	p-value
A	850	1.29	0.001	0.92	0.381
B	423	1.42	0.001	0.91	0.493
C	2,333	1.63	<0.001	0.7	<0.001
DRB1	2,020	1.21	0.022	0.93	0.468
DQB1	2,217	1.08	0.336	1.00	0.974
DPB1	5,294	1.23	0.001	0.69	<0.001
DRB1 M / DQB1 M	5,356	1			
MM / MM ²⁾	325	0.98	0.866		
M / MM ²⁾	522	0.92	0.482		
MM / MM ²⁾	1,695	1.32	<0.001		

1) Compared with each HLA locus match, Total number= 7898.

2) Compared with: DRB1 M + DQB1 M (M; match MM; mismatch)

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 (表 1)。

HLA-DRB1 と DQB1 の不適合と急性 GVHD、移植後死亡解析 (層別化解析)：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。このように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、HLA クラス の基礎的研究に寄与すると考えられた (表 1)。

HLA-DPB1 の不適合により GVL 効果を生じさせる。一方、慢性 GVHD の発症により GVL が

得られるが、これら両者の GVL 効果は independent であることが明らかになった。

(2)日本人に特有な HLA ハプロタイプと関連する連鎖不平衡 (LD) ブロックの同定と HLA 領域の保存性の検証：

患者とドナーの Affymetrix GeneChip Mapping 500K array でタイピングした multi-SNP データを用いて明らかにした日本人で頻度の高い 3 つの HLA ハプロタイプ (P1, P2, P3) (Blood. 2010; 115: 4664) のホモ接合体の SNP シークエンスを基に、HLA-A から DQB1 にわたる約 3.0 Mb の領域で、患者とドナーの HLA ハプロタイプの相の推定し、同じ HLA アリルを持つハプロタイプをグループ化して、主要なハプロタイプグループのコンセンサス配列を同定した。各ハプロタイプグループの保存性を検討すると、保存の度合いはグループごとに様々であった。その中で、SNP 配列が均一でコンセンサス配列の決定が容易であった 25 のハプロタイプグループについて、グループ間のコンセンサス配列を比較することで、異なるハプロタイプが共有する領域を捉えることが可能となった (図 1)。

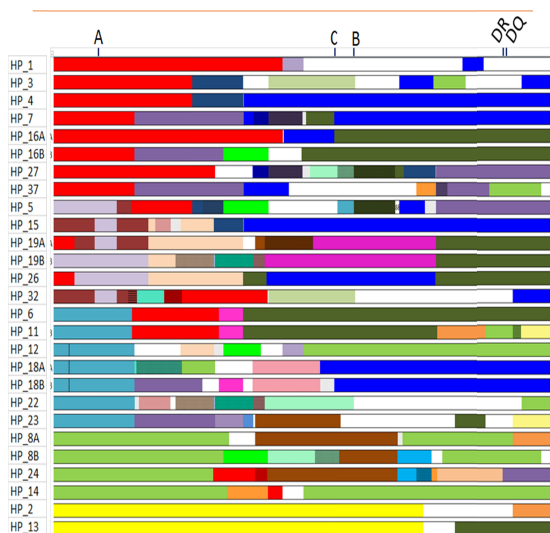


図 1 . 主要な日本人 HLA ハプロタイプと共有する領域 (multi-SNP 解析)

HP	A	C	B	DRB1	DQB1
HP_1	24:02	12:02	52:01	15:02	06:01
HP_3	24:02	07:02	07:02	01:01	05:01
HP_4	24:02	01:02	54:01	04:05	04:01
HP_7	24:02	01:02	59:01	04:05	04:01
HP_16A	24:02	01:02	46:01	08:03	06:01
HP_16B	24:02	01:02	46:01	08:03	06:01
HP_27	24:02	03:03	15:07	04:03	03:02
HP_37	24:02	07:04	15:18	04:01	03:01
HP_5	11:01	04:01	15:01	04:06	03:02
HP_15	11:01	01:02	54:01	04:05	04:01
HP_19A	11:01	07:02	39:01	08:03	06:01
HP_19B	11:01	07:02	39:01	08:03	06:01
HP_26	11:01	01:02	54:01	08:03	06:01
HP_32	11:01	07:02	67:01	16:02	05:02
HP_6	02:07	01:02	46:01	08:03	06:01
HP_11	02:07	01:02	46:01	09:01	03:03
HP_12	02:06	08:01	40:06	09:01	03:03
HP_18A	02:06	01:02	54:01	04:05	04:01
HP_18B	02:06	01:02	54:01	04:05	04:01
HP_22	02:06	03:03	35:01	15:01	06:02
HP_23	02:01	03:04	13:01	12:02	03:01
HP_8A	26:01	03:04	40:02	09:01	03:03
HP_8B	26:01	03:04	40:02	09:01	03:03
HP_24	26:01	03:04	40:02	08:02	03:02
HP_14	26:02	08:01	40:06	09:01	03:03
HP_2	33:03	14:03	44:03	13:02	06:04
HP_13	33:03	14:03	44:03	08:03	06:01

(3)HLA アリルと関連ハプロタイプそのものがGVHDとGVLに与える影響:

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(表2)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。

表2. HLA-B*51:01を有する患者の重症GVHDのリスク

Subgroup	No. of patients		HR	(95% CI)	P
	Total	B*51:01-positive			
All patients	6967	858	1.37	(1.19-1.59)	<0.001
HLA matching status					
Fully matched	988	153	1.62	(0.90-2.94)	0.110
10/10 matched	5979	811	1.25	(0.95-1.64)	0.105
9/10 matched			1.30	(0.96-1.76)	0.094
DPB1 matched	2916	454	1.39	(1.06-1.82)	0.017
DPB1 mismatched	3922	515	1.36	(1.15-1.62)	<0.001

(4)日本人間移植と他の人種間移植で生じるGVHD/GVLの比較による人種間での組織適合性抗原関与の違いの検証:

国際組織適合性ワークショップ(IHWG)で収集された非血縁者間造血細胞移植白血病症例4335ペアの解析で日本人間移植(1734ペア)は白人間移植(1794ペア)に比べ急性GVHDの発症リスクは有意に低く、予想外に移植後の白血病の発症率も有意に低く、その結果として移植後の生存率は良好であることが、共通データベースに基づく解析で明らかになった。

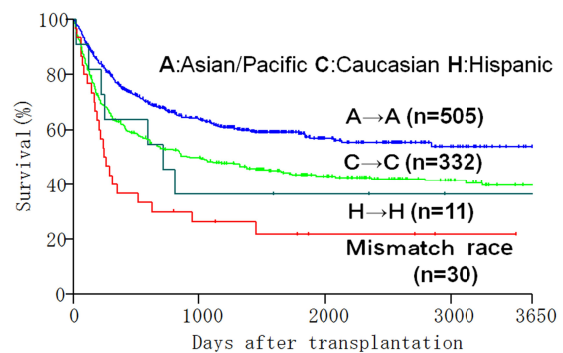


図2. 白血病標準リスク患者の非血縁者間造血細胞移植における人種別移植後生存曲線 (Asianの大部分は日本人間移植)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(1) [雑誌論文] (計7件)

Morishima Y, Kashiwase K, Matsuo K, Morishima S, Sasazuki T, et al. Biological significance of HLA locus matching in

unrelated donor bone marrow transplantation. Blood. 2015; 125(7):1189-1197 (査読有) .

Ozaki Y, Suzuki S, Kashiwase K, Shigenari A, Okudaira Y, Ito S, Masuya A, Azuma F, Yabe T, Morishima S, Mitsunaga S, Satake M, Ota M, Morishima Y, Kulski JK, Saito K, Inoko H, Shiina T. Cost-efficient multiplex PCR for routine genotyping of up to nine classical HLA loci in a single analytical run of multiple samples by next generation sequencing. BMC genomics 16: 318, 2015(査読有) .

Morishima Y, Kawase T, Mallki M, et al. Significance of ethnicity in the risk of acute graft-versus-host disease and leukemia relapse after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2013; 19(8): 1197-1203 (査読有) .

Harkensee C, Oka A, Onizuka M, Middleton PG, Inoko H, Hirayasu K, Kashiwase K, Yabe T, Nakaoka H, Gennery AR, Ando K, Morishima Y, Japan Marrow Donor P. Single nucleotide polymorphisms and outcome risk in unrelated mismatched hematopoietic stem cell transplantation: an exploration study. Blood. 2012;119(26):6365-6372 (査読有) .

Espinoza JL, Takami A, Nakata K, Onizuka M, Kawase T, Akiyama H, Miyamura K, Morishima Y, Fukuda T, Koder Y, Nakao S; Japan Marrow Donor Program. A genetic variant in the IL-17 promoter is functionally associated with acute graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation. PLoS One. 2011;6(10):e26229 (査読有) .

Yagasaki H, Kojima S, Yabe H, Kato K,

Kigasawa H, Sakamaki H, Tsuchida M, Kato S, Kawase T, Morishima Y, Koder Y; Japan Marrow Donor Program. Acceptable HLA-mismatching in unrelated donor bone marrow transplantation for patients with acquired severe aplastic anemia. Blood. 2011 Sep 15;118(11):3186-90 (査読有) .

Morishima S, Ogawa S, Matsubara A, Kawase T, Nannya Y, Kashiwase K, Satake M, Saji H, Inoko H, Kato S, Koder Y, Sasazuki T, Morishima Y; Japan Marrow Donor Program. Impact of highly conserved HLA haplotype on acute graft-versus-host disease. Blood. 2010 Jun 10;115(23):4664-70 (査読有) .

(2)〔学会発表〕(計12件)

森島泰雄、森島聡子 他。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。神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)。2015 年 3 月 6 日

Morishima Y, Kashiwase K, Morishima S, Sasazuki T, et al. HLA matching and outcome of unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. 19th Congress of the Asian-Pacific Blood and Marrow Transplantation. Hangzhou China. 2014.10.7.

Morishima S, Kashiwas K, Azuma F, Yabe T, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Shiina T, Satake M, Saji H, Kato S, Koder Y, Sasazuki T, Morishima Y. Impact of HLA allele and haplotype on acute graft-versus-host disease and survival in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donor. 55th Annual Meeting of American Society of Hematology. New Orleans, USA. 2013.12.9.

森島聡子：同種造血幹細胞移植における HLA ハプロタイプの意義。第 22 回日本組織適合性学会大会(シンポジウム)。福島コンベ

ンションセンター（福島県・福島市）。2013年9月16日

森島聡子、森島泰雄 他。HLA一致同胞間移植におけるHLA型およびHLAハプロタイプが急性GVHDに及ぼす影響。第36回日本造血細胞移植学会総会。沖縄コンベンションセンター（沖縄県・宜野湾市）。2013年3月8日。

Morishima Yasuo: The role of HLA and its matching for transplant-related immune response in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. 36th Meeting of Asia-Pacific Histocompatibility and Immunogenetics Association. (招請講演)。Adelaide Australia. 2012.11.17.

Morishima Yasuo: Impact of HLA and HLA haplotype on transplantation related immunological events as an artificial model of disease susceptibility. International Symposium. Autoimmune Disease - Etiology and Therapeutics. (招請講演)。Fukuoka Japan. 2012.12.02.

Morishima Satoko, Morishima Yasuo, et al.: Multi-SNP analysis of HLA haplotype and its matching effect on hematopoietic stem cell transplantation. 16th International HLA and Immunogenetics Workshop and Conference. Liverpool England. 2012.6.01.

森島聡子、笹月健彦、森島泰雄 他：非血縁者間骨髄移植におけるHLAハプロタイプの意義。第21回日本組織適合性学会大会。明治大学（東京都・千代田区）。2012年9月15日

森島聡子：造血幹細胞移植におけるHLAハプロタイプの意義（シンポジウム）。第35回日本造血細胞移植学会。石川県立音楽堂（石川県・金沢市）。2012年3月9日

Morishima Yasuo. Impact of HLA on unrelated HSCT. 2nd Chinese Blood and

Marrow Transplantation Forum. (招請講演)。Cuilin China. 2011.9.2

森島聡子、笹月健彦、森島泰雄 他。Multi-SNP解析による日本人HLAハプロタイプの均一性の検討。東京大学（東京都・文京区）。第19回日本組織適合性学会大会。2010年9月18日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森島泰雄 (Morishima Yasuo)

愛知県がんセンター(研究所)・疫学・予防部・研究員

研究者番号：20220056

(2) 研究分担者

森島聡子 (Morishima Satoko)

藤田保健衛生大学医学部・講師

研究者番号：40463195