

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：83901  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21591256  
 研究課題名（和文）マイナー抗原等に関与する責任 SNP の新規同定法の開発とネットツールの公開  
 研究課題名（英文）Development of novel identification methods of SNPs responsible for minor H antigens and open public internet software tool.  
 研究代表者  
 赤塚 美樹（AKATSUKA YOSHIKI）  
 愛知県がんセンター研究所・腫瘍免疫学部・客員研究員  
 研究者番号：70333391

研究成果の概要（和文）：マイナー抗原は白血病などの造血器腫瘍に対する骨髄移植後に、ドナーの免疫力で腫瘍を根治させるための標的タンパク質である。この標的は個人間の違いに対して拒絶反応が働くことを利用しており、その強さは遺伝子の多型で決定される。本研究では何十万と遺伝子の違いの中から免疫細胞の標的となっている遺伝子多型の探索を迅速に行うためのソフトウェアの開発を進め、インターネットを通じて研究者が使いやすいウェブツールを公開できた。

研究成果の概要（英文）：Minor histocompatibility antigens (H) are polymorphic proteins targeted by donor immune cells to cure hematological malignancies following allogeneic hematopoietic cell transplantation. This immune response utilizes rejection reaction due to genetic disparities between individuals. In this study, we developed a software that can efficiently identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) responsible for generation of minor H antigens among large number of SNPs and have made the software available via internet as researcher-friendly interactive manners.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：同種造血細胞移植、白血病、腫瘍免疫、遺伝子多型、国際 HapMap プロジェクト、オンラインソフトウェア

## 1. 研究開始当初の背景

アロ免疫を利用した同種造血幹細胞移植は難治性血液疾患に対する有効な治療法であり、造血幹細胞ソースの多様化や“ミニ”移植の導入などにより、年間 3,000 例以上実施されている。移植成績は年々向上してい

るが、再発ハイリスク腫瘍の再発率は依然として高く、移植片対宿主病（GVHD）を併発せず、抗腫瘍効果（GVT 効果）だけを增强する免疫療法の確立が望まれている。造血系細胞に特異的な分化抗原蛋白の多型部位に由来するマイナー組織適合性抗原（mHAgs）は選

択的 GVT 効果の標的として有望視されている。我々はこの選択的 GVT 効果誘導能を検討するためのマイナー抗原ワクチン臨床第 I 相試験を実施している。我々はこれまでに 5 種類の造血細胞特異的 mHAg を報告してきたが、2008 年度には、国際 HapMap 計画に登録された個人由来の不活化 B 細胞株 (B-LCL) の表現型タイピングと一塩基多型 (SNP) データを組み合わせることで極めて短期間に mHAg 遺伝子を同定するアルゴリズムを世界に先駆けて独自に開発し報告した。

本研究では、当初開発した JPT+CHB 以外の民族の B-LCL をタイピングにも対応するデータセットを準備して、そのタイピングデータをもとにウェブページのアルゴリズムを利用するオンラインツールを開発することと第一の目標とした。またクロム遊離試験を用いたキラー T 細胞 (CTL) による細胞傷害試験だけでなく、別の表現型をタイピングする手段を見出し、mHAg 以外の SNP、例えば薬剤耐性を規定する SNP などを同定できないかを検討することを副次的目標とした。

## 2. 研究の目的

我々が開発した SNP 検索ソフトウェアを国内外の研究者が容易に利用できるようなインターネット環境の整備を主眼とし、さらに関連研究を行って適用拡大を目指した。

(1) これまでに開発した責任 SNP 同定のためのアルゴリズムのソフトウェアと、JPT+CHB 以外の民族由来 B-LCL 細胞株にも対応できるようなデータセットを追加し、HapMap B-LCL の表現型タイピングデータをもとに、ウェブのインターフェースを介してソフトウェアとリンク可能な対話型コンピュータシステムの構築する。

(2) 分泌型に改変した HLA 分子を遺伝子導入した B-LCL パネルを作製し、その上清を用いるだけで抗原特異的 T 細胞による迅速なアッセイが出来るシステムを各 HLA 型について準備を行う。

(3) HapMap バンクから入手できる試料は B-LCL のみであるが、これより Epstein-Barr ウイルスを除去して B 細胞とし、これに iPS 等で用いられている技術で他種類の細胞に分化出来ないか検討する。実現すれば、その細胞種でのみ検討しうる形質の差を利用し、責任 SNP を同定。

(4) 解析の基礎となる HapMap データを現行のフェーズ 2 から、次世代のフェーズ 3 に更新を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 責任 SNP 同定のための対話型ウェブページの開発：我々が開発したアルゴリズムソフトウェアは Unix 上で C++ 言語を用いて書かれている。今後新規に開設するウェブペー

ジ (自施設の公式ホームページにリンク) にインプットされた各 HapMap の表現型データをこのソフトウェアと橋渡しして、解析結果をウェブページに表示するような新規のソフトウェアを開発し公開する。データ入力画面では各民族由来の個人標識番号を列挙し、その横に細胞傷害性試験やその他のアッセイ系で決定した細胞の表現型をプルダウンで +、-、NA (データ欠損) などと選択できるようにする。また出力画面では連鎖の高い SNP 順にその番号、染色体上での位置、 $\chi^2$  乗値、 $p$  値などが表示されるようにする。これらの開発は専門のシステムエンジニアと共同で実施する。

(2) HapMap B-LCL スクリーニング迅速化のための、新規 T 細胞機能アッセイ系の確立：本申請の分担研究者である葛島は、HLA クラス I 分子を完全に欠損する白血病細胞株である K562 をプラットフォームとした抗原提示細胞を開発した。この方法で分泌された HLA-A24 分子は、もとの細胞の表面上に発現している HLA-A24 分子と同様に細胞内のエпитープを持っているはずなので、改変 K562 に結合後 CTL に特異的に認識されることとなる。以上の方法で作製した HLA-A24 レトロウイルスベクターを 90 種類以上に上る HapMap B-LCL に導入し、その上清を改変 K562 に添付するだけで細胞傷害性試験を迅速に実施できるようにする。

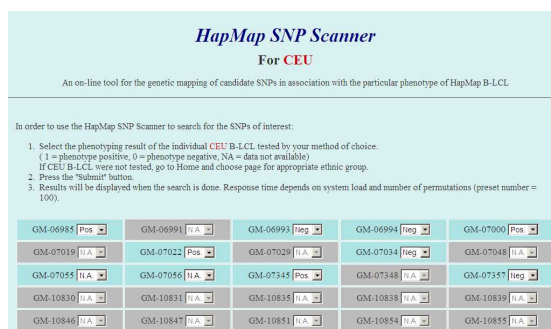
(3) HapMap B-LCL からの脱分化・再分化による、細胞機能評価系の確立：HapMap 計画では B-LCL 以外の体細胞株を収集していないため、血液細胞としての B-LCL 以外にアッセイを組むことが困難である。B-LCL は内部に感染している EBV が除去されればほぼ正常な B リンパ球が得られると想定されるため、Yamanaka 4 因子を導入し iPS 化出来ないか検討する。可能となれば、血液系以外の系列への分化を試みる。

(4) HapMap B-LCL のパネルの充実と SNP タイピングデータの更新：現行の HapMap はフェーズ 2 であるが、現在さらに異なった民族の試料とゲノムデータの蓄積がなされており、SNP 密度も向上したフェーズ 3 のデータが公開される予定であるので、データセットを更新する。

## 4. 研究成果

(1) ①ソフトウェアは Unix で作成されたため、CGI 言語にてウェブページを作成する一方、ユーザーに使いやすくするため各民族ごとのデータセットに合わせて個々の B-LCL 名を列記し、その表現型をプルダウン方式で入力することとした。また必要に応じて Permutation 回数を任意に設定できることとした。入力したデータは Unix ソフトウェアに転送された上、計算結果を表形式で別画

面を開いて返すこととした。入力した元画面が残されるため、表現型判定が不完全なデータを容易に削除・追加・変更し、再計算できるようにした。結果は相関係数の高い SNP 順に表示されるが、この表示された各 SNP に HapMap プロジェクトウェブページの該当 SNP とリンクを張ることで、SNP が存在する遺伝子などの情報がすぐに得られるようにした。本ツールは HapMap SNP Scanner として公開した（下図）。



<http://hapmap-scanner.fujita-hu.ac.jp/>

②さらに、mHAg を検索する際に、拘束性 HLA 分子が検討したい B-LCL に無い場合は遺伝子導入が必要となる。しかし既に該当 HLA を保有する場合もあり無駄となる。これまで HapMap の各個人の SNP データは公開されていたが HLA 型情報については一切検討されていなかった。そこで本研究では頻用が予想される白人 (CEU)、日本人 (JPT)、中国人 (CHB) について HLA-A, B, C, DRB1 座について遺伝子型を同定し、これも公開した。各個人についてはその ID に対してこの HapMap B-LCL の配布を行っている Corriell 財団のウェブページにリンクを張り、各個人の情報が入手できるように配慮した。（下図）。

HapMap SNP Scanner								
An on-line tool for the genetic mapping of candidate SNPs in association with the particular phenotype of HapMap B-LCL								
HLA Genotypes of JPT Individuals								
ID#	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DQB1	HLA-DPB1	HLA-DPA1	HLA-DPB2	HLA-DPA2
GM18940	24:02	-	46:01	52:01	01:03	12:02	08:02	15:02
GM18942	24:02	33:03	35:01	44:03	03:03	14:03	04:05	12:01
GM18943	02:06	02:07	35:01	46:01	01:02	03:03	08:02	08:03
GM18944	02:06	24:02	40:02	51:01	03:04	14:02	08:02	12:01
GM18945	31:01	33:03	15:01	44:03	07:02	14:03	09:01	13:02
GM18947	02:06	24:02	52:01	-	12:01	-	15:02	-
GM18948	26:01	30:01	07:02	13:02	06:02	07:02	01:01	07:01
GM18949	24:02	26:03	07:02	40:02	03:04	07:02	01:01	09:01
GM18951	24:02	-	40:01	59:01	01:02	03:04	04:05	11:01
GM18952	24:02	31:01	07:02	51:01	07:02	14:02	09:01	14:01
GM18953	11:01	31:01	40:01	40:02	03:04	-	04:05	08:02
GM18956	02:01	26:01	15:01	40:02	03:03	03:04	09:01	15:02
GM18959	11:01	24:02	52:01	67:01	07:02	12:02	15:01	15:02

(2) HapMap B-LCL スクリーニング迅速化のための、新規 T 細胞機能アッセイ系の確立については、分担研究者の葛島が K562 に IL-15 受容体 (IL-15R) を導入したものを HLA 提示細胞のプラットホームとして樹立した。この細胞表面に各 B-LCL から分泌された HLA 分子が結合するように HLA の  $\alpha$  3 ドメイン末に IL-15 の一部を結合し、K562 表面の IL-15R

へトランプされるようにした。HLA-A\*24:02-IL15 キメラ遺伝子をレトロウイルスベクターに組み込んで B-LCL に感染させ数日間培養後に上清を回収、改変 K562 細胞と 15 分程度転倒混和して混ぜたあと、抗 HLA 抗体で染色しフローサイトメトリーで解析した。その結果、従来 HLA が陰性の K562 細胞が 1 Log 以上陽性になった。そこで JPT+CHB の 90 種類の B-LCL 全てに遺伝子導入を行い、同様な実験を行ったところ、半数のキメラ遺伝子導入 B-LCL の上清では 1 Log のシフト未満しか得られなかった。CTL クローンによっては弱い発現でも認識しうるが、Avidity の低い CTL クローンでは本来陽性の B-LCL からの上清で偽陰性となった。本 SNP 同定法は最初の表現型判定制度に SNP 検出率が大きく影響を受けるため、改良が必要と考えられた。原因として導入した HLA と同じ HLA 型を持っている場合に、結合するペプチドを競合し不利になる可能性が考えられた。

(3) HapMap B-LCL からの脱分化・再分化については、まずエピゾームで核内に存在する EBV を EBNA1 相補的 DNA で阻害を試みたが阻害は不十分であったため、別の報告にあった競合的ペプチドの添加を行ったところ未添加と比較して約 5 割程度の増殖抑制ができた。次いで、血液細胞からの iPS 作成実績が報告されているセンダイウイルスベクター系で、GFP を組み込んだ陽性コントロールベクターを用いた予備実験ではほとんど遺伝子導入が出来ないことが判明した。そこで Addgene より Yamanaka 因子をコードする 2 つのエピゾーマルプラスミドを入手し、EBV を含む B-LCL の性質を逆に利用して効率を上げることが出来ないか、電気穿孔法で遺伝子導入を試みている。

(4) HapMap B-LCL のパネルの充実と SNP タイピングデータの更新については、データがリリースされたので実施可能な状態にある。しかしながら次世代シーケンシングが急速に広まっているため、現世代のデータである程度関連解析を行って連鎖不均衡ブロック候補を挙げ、その後にシーケンシングを行うアプローチも考慮されるため、アップデートを見合わせている。研究成果(1)で示したように JPT+CHB のデータセットに白人由来の CEU データセットを加えることで、Fred Hutchinson がん研究所における移植後再発白血病に対して投与された CTL クローンの標的抗原 SNP を 2 種類同定でき（論文⑤）、現段階のデータセットでも国内のみならず欧米での本ソフトウェアは有用であることが示され、パブリックリソースとしての目的を十分果たすことが出来たと考える。

## 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)

[雑誌論文] (計7件)

- ① Yamamura T, Hikita J, Bleakley M, Hirosawa T, Sato-Otsubo A, Torikai H, Hamajima T, Nannya Y, Demachi-Okamura A, Maruya E, Saji H, Yamamoto Y, Takahashi T, Emi N, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Riddell SR, Ogawa S, Akatsuka Y. HapMap SNP Scanner: an online program to mine SNPs responsible for cell phenotype. *Tissue Antigens*. 2012. (in press) (査読有) doi: 10.1111/j.1399-0039.2012.01883.x.
- ② Suzuki S, Yoshikawa T, Hirosawa T, Shibata K, Kikkawa F, Akatsuka Y, Nakatsura T. Glypican-3 could be an effective target for immunotherapy combined with chemotherapy against ovarian clear cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2011, 102: 1622-9. (査読有) doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02003.x.
- ③ Hirosawa T, Torikai H, Yanagisawa M, Kamei M, Imahashi N, Demachi-Okamura A, Tanimoto M, Shiraishi K, Ito M, Miyamura K, Shibata K, Kikkawa F, Morishima Y, Takahashi T, Emi N, Kuzushima K, Akatsuka Y. Mismatched human leukocyte antigen class II-restricted CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells may mediate selective graft-versus-leukemia effects following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Cancer Sci*. 2011, 102:1281-6. (査読有) doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01949.x.
- ④ Villalobos IB, Takahashi Y, Akatsuka Y, Muramatsu H, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Saji H, Kato M, Ogawa S, Kojima S. Relapse of leukemia with loss of mismatched HLA resulting from uniparental disomy after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2010, 115:3158-61. (査読有) doi: 10.1182/blood-2009-11-254284.
- ⑤ Warren EH, Fujii N, Akatsuka Y, Chaney CN, Mito JK, Loeb KR, Gooley TA, Brown ML, Koo KK, Rosinski KV, Ogawa S, Matsubara A, Appelbaum FR, Riddell SR. Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation with T cells specific for minor histocompatibility antigens. *Blood*. 2010, 115(19):3869-78. (査読有) doi: 10.1182/blood-2009-10-248997.
- ⑥ Ogawa S, Matsubara A, Onizuka M, Kashiwase K, Sanada M, Kato M, Nannya Y, Akatsuka Y, Satake M, Takita J, Chiba S, Saji H, Maruya E, Inoko H, Morishima Y, Kodera Y, Takehiko S; Japan Marrow Donation Program (JMDP). Exploration of the genetic basis of GVHD by genetic association studies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009, Suppl: 39-41. doi:10.1016/j.bbmt.2008.11.020.
- ⑦ Taniguchi K, Shimazaki C, Ochiai N, Maruya E, Akatsuka Y, Ashihara E, Maekawa T, Taniwaki M, Saji H. Modified ELISPOT assay may predict T-cell hyporesponsiveness to non-inherited maternal antigens. *Int J Lab Hematol*. 2010 Feb;32(1 Pt 1):e163-8. (査読有) DOI: 10.1111/j.1751-553X.2008.01121.x

[学会発表] (計9件)

- ① Akatsuka Y, ら. An online tool to scan single nucleotide polymorphisms for identification of novel minor antigens. 第73回日本血液学会学術集会、2011年10月14日、名古屋国際会議場、名古屋市.
- ② 赤塚美樹, ら. マイナー組織適合抗原をコードする一塩基多型のオンライン検索ツール. 第70回日本癌学会総会、2011年10月3日、名古屋国際会議場、名古屋市.
- ③ 赤塚美樹, ら. 同種移植後再発予防・治療を目的としたマイナー抗原ワクチン臨床試験(中間報告). 第15回日本がん免疫学会総会、2011年6月30日、千里ライフサイエンスセンター、大阪市.
- ④ Akatsuka Y, ら. Characterization And Clinical Application of Minor Histocompatibility Antigens. The 15th Annual Winter Meeting of the Korean Society of Blood and Marrow Transplantation、2011年2月25日、Muju Resort、Muju, Korea.
- ⑤ Yamamura T, et al. Development of an Online Tool to Scan Single Nucleotide Polymorphisms for Identification of Novel Minor Histocompatibility Antigens. 第17回BMT Tandem Meetings、2011年2月19日、Hawaii Convention Center、Honolulu.
- ⑥ Akatsuka Y, ら. Identification of novel minor histocompatibility antigens using HAPMAP EBV-LCL panels transduced with restricting HLA cDNA retrovirally. 第16回日本遺伝子治療学会総会、2010年7月1日、栃木県総合文化センター、宇都宮市.
- ⑦ 鳥飼宏基, ら. HLAクラスII不適合骨髄移植患者より樹立した不一致クラスII拘

束性アロ CD8+CTL クローン解析. 第 71 回日本血液学会学術集会、2009 年 10 月 25 日、国立京都国際会館、京都市.

- ⑧ Torikai H、ら. Clinical significance of CD8+ CTL clone recognizing mismatched HLA class II. 第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 2 日、パシフィコ横浜、横浜市.
- ⑨ 赤塚美樹、ら. 移植後再発白血病に対するマイナー抗原特異的 CTL 養子免疫療法後に重症肺 GVHD の合併を来した標的抗原の同定. 第 13 回日本がん免疫学会総会、2009 年 6 月 24 日、北九州国際会議場、北九州市.

[その他]

ホームページ等

<http://hapmap-scanner.fujita-hu.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

赤塚 美樹 (AKATSUKA YOSHIKI)

愛知県がんセンター研究所・腫瘍免疫学部  
・客員研究員

研究者番号：70333391

### (2) 研究分担者

葛島 清隆 (KUZUSHIMA KIYOTAKA)

愛知県がんセンター研究所・腫瘍免疫学部  
・部長

研究者番号：30 311442

### (3) 研究協力者

小川 誠司 (OGAWA SEISHI)

東京大学医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：60292900