

「テラーメイド医療を目指したゲノム情報活用基盤技術」  
平成16年度採択研究代表者

小川 誠司

(東京大学造血再生医療寄付講座 客員助教授)

## 「Whole Genome Association解析によるGVHDの原因遺伝子の探索」

### 1. 研究実施の概要

同種造血幹細胞移植術は難治性白血病やリンパ腫、重症再生不良性貧血に対して根治を期待できる優れた治療手段である一方、移植に伴ってドナーの免疫担当細胞が宿主の正常組織を攻撃することにより惹起される移植片対宿主病(GVHD)が重篤な副作用として治療成績向上のための大きな障壁となっている。GVHDはドナー・レシピエント間で多型を示す組織適合性抗原の相違(通常のHLA適合移植では、マイナー抗原の相違)によって生ずるが、これまでGVHDの発症に関与する臨床的に意味のあるマイナー抗原は少数の例外を除いてほとんど明らかにされていない。本研究事業は、同種造血幹細胞の治療率向上を目的として、全ゲノム関連解析の手法によりこれらマイナー抗原を同定するとともに、GVHDの発症に関与する遺伝的背景を網羅的に同定することにより、オーダーメイドの移植医療の確立に資することである。具体的には、Affmetrix GeneChip 500kアレイを用いて約1500ペアのドナー・レシピエントについて大規模SNPタイピングを行い、GVHD発症の有無に関する大規模関連解析を行うことにより、GVHDの発症に関与する遺伝子の同定を行う。

平成16年度については、平成17年度からの本格的な大規模SNPタイピングの事前検討および試料の準備として、

- (1) 大規模SNPタイピングに用いるGeneChip platformの性能評価
- (2) (1)に基づく日本人の連鎖不平衡に関する基礎データの収集
- (3) 本研究デザインが有する統計的解析力の数学的評価
- (4) HLA DNAタイピング未施行の試料に関するDNAタイピング
- (5) 骨髄バンク試料の使用に関する倫理的基盤整備、を行った。

GeneChip platformの性能評価では、100人の健常ボランティアより採取したゲノムDNAについて、現行の100Kアレイを用いて12万SNP座のタイピングを行った。平均Call rateは94.7%、タイピングの再現率は99.97%、男性におけるX染色体座のヘテロcall rateは0.3%で、SNPタイピングとして十分な精度を有すると考えられた。また、これらのデータを用いた日本人の連鎖不平衡の解析では、次世代アレイにおける標的・マーカー間の平均距離である~1.5kbにおける平均 $|D^*| > 0.95$ と、高い連鎖不平衡が期待できることが判明する一方、現行の100Kアレイでは全LDブロックの1/3程度が解析不能であることが示唆され、次

世代の500Kアレイを用いることの妥当性が支持された。本研究で行われるGVHDの関連解析は、ドナー・レシピエントの遺伝子型の組み合わせについて関連解析を行うという例のない関連解析であることから、その解析力に対する統計的評価を行った結果、近似的には他の多因子疾患に関する関連解析と比較しても解析力の低下は顕著ではないこと、予測されるパラメータを仮定した場合の解析力は比較的良好であることが示された。～5200試料のHLA DNAタイピング未施行DNAについてのタイピングはHLA DQの一部を除いてすべて完了したが、HLA10座完全一致の移植は1091例にとどまり、解析力を確保するための今後の試料の集積が重要であることが判明した。これに基づいて、試料のLCL化を含む骨髄バンクの試料利用検討委員会における試料利用のための基盤整備を進めている。以上に基づいて、平成17年度については、9月に予定される500Kアレイのリリースを待って、大規模タイピングの実施を行うとともに、試料のLCL化も平行して進めることを計画している。データの具体的な解析は、平成18年度以降の予定となる。

## 2. 研究実施体制

### 東京大学グループ

- ① 研究分担グループ長：小川 誠司（東京大学医学部、助教授）
- ② 研究項目：1500ペアの非血縁ドナー・レシピエント対についての大規模SNPsタイピングとGVHD発症に関する関連解析、およびその他の多角的な関連解析。健常日本人集団における大規模SNPデータベースの構築。バンク検体を用いた不死化リンパ球(LCL)の樹立。

### 名古屋第一赤十字病院グループ

- ① 研究分担グループ長：小寺良尚（名古屋第一赤十字病院、部長）
- ② 研究項目：研究デザインの構築と対象症例の選定、難治性造血器疾患、その他の移植合併症に関わる遺伝子多型に関する関連解析

### 愛知県がんセンターグループ

- ① 研究分担グループ長：森島泰雄（名古屋第一赤十字病院、部長）
- ② 研究項目：対象症例の選定、バンク検体を用いた不死化リンパ球(LCL)の樹立。

### 九州大学グループ

- ① 研究分担グループ長：山本健（九州大学生体防御機能研究所、助教授）
- ② 研究項目：HLAの遺伝子タイピング、GVHDおよびGVLの発現に関する関連解析。

### 日本赤十字東京血液センターグループ

- ① 研究分担グループ長：佐竹正博（日本赤十字社東京血液センター、副所長）
- ② 研究項目：HLAの遺伝子タイピング、GVHDおよびGVLの発現に関する関連解析。

## 3. 主な研究成果の発表

### (1) 論文発表

- Horii A, Kanda Y, Goyama S, Onishi Y, Komeno Y, Mitani K, Kishi Y, Ogawa S,

- Imataki O, Chiba S, Kojima R, Hamaki T, Sakiyama M, Kami M, Makimoto A, Tanosaki R, Takaue Y, Hirai H. A Prospective Trial to Evaluate the Safety and Efficacy of Pravastatin for the Treatment of Refractory Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Transplantation*. 2005;79:372-374.
- Sakata-Yanagimoto M, Kanda Y, Nakagawa M, Asano-Mori Y, Kandabashi K, Izutsu K, Imai Y, Hangaishi A, Kurokawa M, Tsujino S, Ogawa S, Chiba S, Motokura T, Hirai H. Predictors for severe cardiac complications after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2004;33:1043-1047.
- Ogawa N, Kanda Y, Matsubara M, Asano Y, Nakagawa M, Sakata-Yanagimoto M, Kandabashi K, Izutsu K, Imai Y, Hangaishi A, Kurokawa M, Tsujino S, Ogawa S, Aoki K, Chiba S, Motokura T, Hirai H. Increased incidence of acute graft-versus-host disease with the continuous infusion of cyclosporine A compared to twice-daily infusion. *Bone Marrow Transplant*. 2004;33:549-552.
- Hosoya N, Qiao Y, Hangaishi A, Wang L, Nannya Y, Sanada M, Kurokawa M, Chiba S, Hirai H, Ogawa S. Identification of a SRC-like tyrosine kinase gene, FRK, fused with ETV6 in a patient with acute myelogenous leukemia carrying a t(6;12)(q21;p13) translocation. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005;42:269-279.
- Kawazu M, Kanda Y, Nannya Y, Aoki K, Kurokawa M, Chiba S, Motokura T, Hirai H, Ogawa S. Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for galactomannan, and a (1→3)-beta-D-glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol*. 2004;42:2733-2741.
- Goyama S, Kanda Y, Nannya Y, Ogawa S, Asano-Moki Y, Ogawa N, Nakagawa M, Sakata-Yanagimoto M, Kawazu M, Komeno Y, Imai Y, Hangaishi A, Kurokawa M, Tsujino S, Aoki K, Chiba S, Motokura T, Hirai H. Clinical significance of peripheral blood erythroblastosis after hematopoietic stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma*. 2004;45:2439-2443.
- Kunisato A, Ogawa S, Chiba S. Dominant-negative activity of stem cell leukemia (SCL) lacking bHLH domain. *Blood*. 2005;106:1365-1366.
- Yamaguchi Y, Kurokawa M, Imai Y, Izutsu K, Asai T, Ichikawa M, Yamamoto G, Nitta E, Yamagata T, Sasaki K, Mitani K, Ogawa S, Chiba S, Hirai H. AML1 is functionally regulated through p300-mediated acetylation on specific lysine residues. *J Biol Chem*. 2004;279:15630-15638.
- Ogawa S. Molecular genetics of Myelodysplastic syndrome. *Educational*

Program Book: Japanese Society of Hematology and Japanese Society of Clinical Hematology; 2004:10-25.

- Ichikawa M, Asai T, Chiba S, Kurokawa M, Ogawa S. Runx1/AML-1 ranks as a master regulator of adult hematopoiesis. *Cell Cycle*. 2004;3:722-724.
- Ichikawa M, Asai T, Saito T, Yamamoto G, Seo S, Yamazaki I, Yamagata T, Mitani K, Chiba S, Hirai H, Ogawa S, Kurokawa M. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat Med*. 2004;10:299-304.
- Haraguchi K, Takahashi T, Hiruma K, Kanda Y, Tanaka Y, Ogawa S, Chiba S, Miura O, Sakamaki H, Hirai H. Recovery of V $\alpha$ 24<sup>+</sup> NKT cells after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2004;34:595-602.
- Goyama S, Yamaguchi Y, Imai Y, Kawazu M, Nakagawa M, Asai T, Kumano K, Mitani K, Ogawa S, Chiba S, Kurokawa M, Hirai H. The transcriptionally active form of AML1 is required for hematopoietic rescue of the AML1-deficient embryonic para-aortic splanchnopleural (P-Sp) region. *Blood*. 2004;104:3558-3564.
- Endo-Matsubara M, Ogawa S, Sasaki K, Takahashi T, Chiba S, Hirai H. Immature granulocyte fraction in the peripheral blood is a practical indicator for mobilization of CD34(+) cells. *Am J Hematol*. 2004;77:223-228.