

「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

(東京大学大学院医学研究科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(allo-HSC)は難治性造血器疾患に対する現時点で最も強力な治療手段であるが、移植片の免疫担当細胞によって惹起される移植片対宿主病(GVHD)は、HSC の最大の合併症であって、GVHD の制御は移植成績の向上を図る上で最も重要な課題の一つである。GVHD はドナーとレシピエント間における遺伝学的背景の相違、すなわち、マイナー組織適合性抗原の不適合によって生ずると考えられるが、現時点ではGVHD の標的となる臨床的に重要なマイナー組織適合性抗原はほとんど同定されていない。本プロジェクトでは、非血縁移植に関する大規模 SNP タイピングと全ゲノム関連解析により、(1)GVHD の発症に関わるマイナー組織適合性抗原およびその他の遺伝的背景(サイトカイン多型など)を明らかにすることにより、オーダーメイドなドナー選択システムを確立することが究極の目的である。研究初年度である平成 16 年度の研究では、(1)全ゲノム関連解析によるマイナー組織適合性抗原同定の理論的可能性の算定、(2)JMDP で移植された 5200 試料の HLA DNA タイピングによる 1912 例の解析対象性能評価を行い、研究の基礎検討を行った。そこで、本年度は、GeneChip500K アレイを用いて、560 移植 1120 例の JMDP 試料について、50 万 SNPs のタイピングを行った。また、移植患者より樹立された CTL と健常 LCL 細胞を用いた CTL アッセイによる、マイナー抗原同定システムの基礎検討を行った。平成 18 年度については、タイピングの高速化のための解析システムの増強を行い、また新たに解析の承諾が得られた症例から HLA 完全一致の移植を新たに選定し計 2000 移植について 50 万 SNPs のタイピングを行い、関連解析を行う。また、SNP タイピングを行うバンク試料の LCL 化を進めることにより、CTL を用いた新規マイナー抗原同定システムの確立を図る。

2. 研究実施内容

研究目的:同種造血幹細胞移植(HSC)は現在、難治性造血器疾患に対する最強の治療手段となっており、我が国においても年間 3000 例を越える移植が行われているが、一方で、移植に伴う重篤な副作用が移植成績向上の大きな障壁となっている。これらの移植副作用のなかで、最も重要と考えられているのは移植片対宿主病(GVHD)であって、移植成績向上のためには GVHD のコン

トロールが極めて重要な課題である。GVHD は基本的には、ドナー/レシピエントにおける組織適合性抗原の相違に基づくアロ免疫反応であって、組織適合性抗原の不適合が最も重要な要因となるが、これに加えて免疫応答性などを規定する遺伝的な背景と移植前処置や感染などの環境的要因が相互作用することにより成立する。従って、GVHD の予防・治療の観点からは、GVHD の原因となる組織適合性抗原(とくに標準的な HLA 適合移植で問題となるマイナー組織適合性抗原)およびその他の遺伝的背景を規定する遺伝子多型を明らかにし、各患者に適したドナーの選択、あるいは指摘な GVHD 予防を行うことが重要である。一方、同じ移植片によるアロ免疫反応である GVL は腫瘍細胞の免疫学的排除をになっており、GVL に関わるマイナー抗原の同定は、GVHD を伴わない腫瘍特異的な免疫療法の確立に必須である。そこで、本プロジェクトでは、近年のゲノム科学の進歩を背景として、大規模 SNP タイピングと全ゲノム関連解析により、これら GVHD の発症に関わる組織適合性抗原その他の遺伝的背景、さらには移植における治療効果の主体をなす GVL の標的抗原を網羅的に同定することにより、オーダーメイド移植技術の確立を目指す。

方法: 対象とするのは、日本骨髄バンクを通じておこなわれた 2000 件の HLA 適合移植で、JMDP に保存されているドナーおよびレシピエントの保存 DNA 試料を解析に用いる。具体的には、昨年度の研究で HLA の DNA タイピングを完了した 2600 移植のうち、HLA-A, B, C, DR, DQ 計 10 座が DNA レベルで完全一致し、シクロスポリンおよびメトトレキサートを用いた GVHD 予防が行われた 956 移植のドナー・レシピエントの DNA 1912 試料が対象となる。保存資料の研究への使用に関しては、政府の定めるところのヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づいて、日本骨髄バンクおよび東京大学医学部倫理委員会の審査による承認を経て行われている。

上記 DNA に関して、Affymetrix GeneChip 500K アレイを用いて、50 万 SNP 座の SNP タイピングを行った。一方、移植の治療効果の主体をなす GVL 効果において標的となるマイナー抗原の同定を行う目的で、全ゲノム関連解析を用いた CTL の標的マイナー抗原の同定を試みた。すなわち、移植患者より樹立された CTL 株を用いて、HLA の一致した正常ヒト LCL のパネルをスクリーニングすることにより、抗原陽性 LCL および陰性 LCL を同定し、両群でプールされたゲノム DNA を Affymetrix 100K アレイを用いて解析することにより、標的マイナー抗原座の同定を試みた。

昨年度に全ゲノム関連解析における解析力の検討を行ったが、国際 HapMap 計画による 110 万 SNP 座に関する多型情報の公開をうけて、これらの計測値を用た、より現実的な関連解析の検出力の算定を行った。

結果・考察:

(1) SNP タイピング Affymetrix® GeneChip® 500K アレイを用いた JMDP 試料の解析については、現時点で 520 移植、計 1040 試料のタイピングが終了した。一方、残りの 432 移植試料については、ドナー/レシピエントの一方ないし両者の DNA 試料の品質不良ないし量的問題があり、今後の解析には DNA の再抽出作業が必要である。一方、平成 17 年度に新たに研究への保存資料の使用に関する許諾のえられた 3600 移植分(7200DNA 試料)に関しては、現時点で HLA の DNA タイピングによる確認がほぼ終了した。そこで、これらの中から、HLA10 座適合移植について、引き続き 500K アレイによるタイピングを進める予定である。

(2)HapMap データを用いた全ゲノム関連解析における検出力の解析では HapMap で公開された 110 万 SNP 座の遺伝型情報に基づいて、関連解析における種々のパラメータについて検出力の算出を行った。検出力は、多重解析の効果を考慮した上でも、極端に effect size の小さな領域を除いて、マーカーSNP 数の単調増加関数となるが、30～50 万 SNP でほぼプラトーに達し、これ以上の SNP 数の増加によって著しい検出力の増加は得られないこと、タグ SNP の使用はマーカー数を減らす上では、有効であるが、その効果は異なる民族で tagging された SNP では減弱すること、さらに、(とくに effect サイズの小さい場合)マーカーSNP 数よりも、むしろサンプルサイズが検出力に遙かに大きな影響を与えることが明らかとなった。Affymetrix 500K アレイは、1 枚あたり 25 万 SNPs の解析が可能な 2 枚のアレイで構成されるが、以上の結果は、今回のように研究資源の限られた解析においては、2 枚のアレイで 1000 移植のタイピングを行うよりは、1 枚のアレイで 2000 移植のタイピングを行う方が、遙かに高い解析力をうることを示しており、プロジェクトの慎重な設計が必要と考えられた。

(3)関連解析による CTL の標的抗原の同定 標的抗原が既知の CTL を用いて健常人より樹立された LCL パネルをスクリーニングすることにより得られた抗原陽性 LCL40 例および陰性 LCL40 例についてプールされた DNA を Affymetrix 100K アレイで解析した。得られたアレイシグナル強度分布を独自のプログラムにより解析することにより、最も高いピークを有する遺伝子座として標的抗原座が同定された。このことから、プール DNA を用いた CTL 標的抗原の同定は十分可能であると考えられた。本プロジェクトでは、最終的に 4000 例の 50 万 SNP 座に関する SNP 情報が得られるとともに、現在進めているバンク試料の LCL 化作業によって genotyping された数百例の LCL が樹立されることから、これらの LCL パネルを用いたより高感度な in silico のマイナー抗原同定システムが確立可能と考えられる。

結論:

- (1) JMDP における HLA 適合 520 移植、計 1040 試料について affymetrix 500K アレイを用いた genotyping を完了した。
- (2) HapMap の SNP 情報を用いた全ゲノム関連解析における検出力の詳細な検討を行った。
- (3) CTL アッセイとプール DNA のマイクロアレイ解析を用いた、全ゲノム関連解析による新たなマイナー抗原同定システムを構築した。

3. 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、客員助教授）

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。CTL アッセイを用いたハイスループットな腫瘍抗原同定システムの構築。全ゲノム関連解析における検出力の解析。

「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（愛知県がんセンター、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。CTL アッセイと SNP タイピングデータを用いた腫瘍抗原同定システムの確立。

「東海大学グループ」グループ

①研究分担グループ長：岡 晃（東海大学、助手）

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。試料管理。

「九州大学グループ」グループ

①研究分担グループ長：山本 健（九州大学、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。

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文（原著論文）発表

- Crcareva A, Saito T, Kunisato A, Kumano K, Suzuki T, Sakata-Yanagimoto M, Kawazu M, Stojanovic A, Kurokawa M, Ogawa S, Hirai H, Chiba S: Hematopoietic stem cells expanded by fibroblast growth factor-1 are excellent targets for retrovirus-mediated gene delivery. Exp Hematol.33. (12):1459-1469,2005.
- Haraguchi K, Takahashi T, Matsumoto A, Asai T, Kanda Y, Kurokawa M, Ogawa S, Oda H, Taniguchi M, Hirai H, Chiba S: Host-residual invariant NK T cells attenuate graft-versus-host immunity. J Immunol.175. (2):1320-1328,2005.
- Hosoya N, Sanada M, Nannya Y, Nakazaki K, Wang L, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, Ogawa S: Genomewide screening of DNA copy number changes in chronic myelogenous leukemia with the use of high-resolution array-based comparative genomic hybridization. Genes Chromosomes Cancer.45. (5):482-494,2006.

- Kanda Y, Komatsu Y, Akahane M, Kojima S, Asano-Mori Y, Tada M, Oshima K, Isayama H, Ogawa S, Motokura T, Chiba S, Ohtomo K, Omata M, Hirai H: Graft-versus-tumor effect against advanced pancreatic cancer after allogeneic reduced-intensity stem cell transplantation. *Transplantation*.79. (7):821-827,2005.
- Kanda Y, Oshima K, Asano-Mori Y, Kandabashi K, Nakagawa M, Sakata-Yanagimoto M, Izutsu K, Hangaishi A, Tsujino S, Ogawa S, Motokura T, Chiba S, Hirai H: In vivo alemtuzumab enables haploidentical human leukocyte antigen-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation without ex vivo graft manipulation. *Transplantation*.79. (10):1351-1357,2005.
- Kawazu M, Asai T, Ichikawa M, Yamamoto G, Saito T, Goyama S, Mitani K, Miyazono K, Chiba S, Ogawa S, Kurokawa M, Hirai H: Functional domains of Runx1 are differentially required for CD4 repression, TCRbeta expression, and CD4/8 double-negative to CD4/8 double-positive transition in thymocyte development. *J Immunol*.174. (6): 3526-3533, 2005.
- Lee SY, Kumano K, Masuda S, Hangaishi A, Takita J, Nakazaki K, Kurokawa M, Hayashi Y, Ogawa S, Chiba S: Mutations of the Notch1 gene in T-cell acute lymphoblastic leukemia: analysis in adults and children. *Leukemia*.19. (10):1841-1843,2005.
- Masuda S, Kumano K, Shimizu K, Imai Y, Kurokawa M, Ogawa S, Miyagishi M, Taira K, Hirai H, Chiba S: Notch1 oncoprotein antagonizes TGF-beta/Smad-mediated cell growth suppression via sequestration of coactivator p300. *Cancer Sci*.96. (5):274-282,2005.
- Nannya Y, Sanada M, Nakazaki K, Hosoya N, Wang L, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, Bailey DK, Kennedy GC, Ogawa S: A robust algorithm for copy number detection using high-density oligonucleotide single nucleotide polymorphism genotyping arrays. *Cancer Res*.65. (14):6071-6079,2005.
- Nitta E, Izutsu K, Yamaguchi Y, Imai Y, Ogawa S, Chiba S, Kurokawa M, Hirai H: Oligomerization of Evi-1 regulated by the PR domain contributes to recruitment of corepressor CtBP. *Oncogene*.24. (40):6165-6173,2005.
- Oshima K, Sakata-Yanagimoto M, Asano-Mori Y, Izutsu K, Watanabe T, Shoda E, Ogawa S, Motokura T, Chiba S, Kurokawa M, Hirai H, Kanda Y: Cardiac complications after haploidentical HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation using in vivo alemtuzumab. *Bone Marrow Transplant*.36. (9):821-824,2005.
- Seo S, Asai T, Saito T, Suzuki T, Morishita Y, Nakamoto T, Ichikawa M, Yamamoto G, Kawazu M, Yamagata T, Sakai R, Mitani K, Ogawa S, Kurokawa M, Chiba S, Hirai H: Crk-associated substrate lymphocyte type is required for lymphocyte trafficking and marginal zone B cell maintenance. *J Immunol*.175. (6):3492-3501,2005.