

「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系研究科 特任助教授)

「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

本プロジェクトでは、大規模 SNP タイピング技術を用いた先端的な遺伝疫学的手法により、同種造血幹細胞移植(allo-HSCT)における最大の合併症である移植片対宿主病(GVHD)およびその治療効果の主体となる移植片対白血病効果(GVL)の発現に関わるマイナー組織適合性抗原(mHA)およびその他の多型を網羅的に同定することにより、GVHD の有効な予防手段・治療法ならびに白血病に対する特異的なアロ免疫療法を開発するための基盤を構築する。すなわち、(1)日本骨髄バンク(JMDP)を通じて移植が行われたGVHD陽性移植1000ペアと陰性移植1000ペアについて、Affymetrix社の高密度SNPアレイを用いて50万SNP座のgenotypingを行い、全ゲノム関連解析により、GVHDおよびGVLに関わるmHAその他の関連多型を同定すること、さらに、(2)全ゲノム関連解析の手法を用いた独自のマイナー抗原同定システムにより白血病特異的なアロ免疫療法の標的となるmHAの同定を行うことを目指している。

平成17年度までの研究においては日本骨髄バンクを通じて移植された5200例を超える移植についてドナー/レシピエントのHLA DNA タイピングを行い、DNA レベルでHLAが完全一致した移植例について、Affymetrix GeneChip 500Kアレイを用いて50万SNPsのタイピングを行った。平成18年度については、平成13年度から16年までに行われた移植例約2600移植についてもHLAのDNAタイピングを進め、新たな解析可能症例の集積を図るとともに、500KアレイによるSNPタイピング作業を継続し、平成19年3月までに目的の60%に相当する2400試料のタイピングを終了した。ドナー/レシピエント両者についてタイピングの終了した約600移植の中間解析では、GVHDに関わる多型の候補SNP座が複数同定された。

一方、平成17年度の研究において、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が、平成18年度は、このシステムさらに発展させた方法としてHapMapパネルを用いたマイナー抗原同定システムを開発し、これらのシステムを用いて3つの新たなmHAを同定した。

平成19年度については、日本骨髄バンク試料のタイピングの完遂と得られたデータに基

づいた関連解析を実施すること、および新規 mHA 同定システムによる、さらなるマイナー抗原の同定を進める予定である。

2. 研究実施内容

研究目的: 同種造血幹細胞移植 (allo-HSCT) 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り、我が国においても年間 2000 例を超える allo-HSCT が行われているが、現在 allo-HSCT による移植成績を低下させる大きな要因となっているのが、GVHD および移植後再発である。allo-HSCT の治療効果は、移植片の白血病細胞に対するアロ免疫反応であるが、前者はこの反応が宿主の正常組織に対して発現することに、また、後者は白血病に対するアロ免疫反応 (GVL) が有効に発揮されないことに起因している。現在の HLA 一致移植では、これらのアロ免疫反応は、ドナーとレシピエントで異なる mHA がドナー由来の免疫担当細胞によって認識されることにより発現すると考えられることから、GVHD の低減と特異的な GVL の誘導を図り、移植成績の改善を図るためには、これらの mHA を同定することが極めて重要である。そこで、本プロジェクトの目的は、最先端の遺伝疫学的手法を駆使して、GVHD および GVL に関わる mHA およびその他の多型を可能な限り同定することにより、個々の患者に応じた最適なドナー選択、GVHD 予防法の確立と、白血病細胞特異的なアロ免疫療法を開発するための知的基盤を構築することである。具体的には、日本骨髄バンクを通じて行われた 2000 件の HLA 完全一致非血縁移植のドナー・レシピエントについて、Affymetrix GeneChip 500K アレイを用いた大規模 SNP タイピングを行い、全ゲノム関連解析により、目的の mHA その他の GVHD/GVL に関わる多型の網羅的な探索を行う。また、移植後患者より樹立した CTL を用いた CTL アッセイと全ゲノム関連解析の手法を組み合わせた新たな mHA 同定システムを構築し、これにより GVL に関わる mHA の網羅的な同定を行う。これらの基盤構築により、オーダーメイドなドナー選択システムおよび造血器腫瘍に対する特異的なアロ免疫療法を確立することが究極の目的である。

方法: 日本骨髄バンクを通じて H16 年までに行われた約 7800 件の非血縁者間骨髄移植のドナー/レシピエントの保存試料について HLA の DNA タイピングを行い、HLA A, B, C, DR, DQ 座が DNA レベルで完全に一致した移植試料を解析に用いる。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 タイピングを行ない、GVHD 陽性群および陰性群を Case/Control として全ゲノム関連解析を行う。関連解析は、SNP の適合/不適合の有無、およびドナーおよびレシピエントにおける genotype について行う。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、移植後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。また、HapMap パネルのLCLを同様にCTLアッセイにより抗原陽性群/陰性群を同定し、HapMap PhaseII dataに基づいて全ゲノム関連解析により、標的マイナー抗原の遺伝子座の同定を行った。

結果・考察:

- (1) 平成17年度までにHLAのDNAタイピングを行った5200例に加えて2600例のHLA DNAタイピングを追加し、HLA 10座一致の移植症例を同定した。7800例の移植のうち、10座一致の移植は2656例で、GVHD予防としてCyA+MTXないしFK506+MTXが用いられ、かつGVHDに関するデータの存在する2058例が同定され、うち、2058移植について最終的にDNAが保存されている移植1856例をSNPタイピングの対象とした(うち35%にGradeII以上のGVHDが認められている)。
- (2) 上記試料のうち平成19年度末までに計1200移植に相当する約2400例についてAffymetrix® GeneChip® 500K アレイによる50万SNPのタイピングが終了した。Call rate およびHardy-Weinberg平衡によるQualityチェックを通過した試料で、ドナー/レシピエントともにタイピングの完了した約600移植について全ゲノム関連解析による中間解析を行った。統計検定の閾値は、全症例の10000回のpermutationによりgenome-wide $p=0.05$ となるように決定した。アレル不適合およびドナー/レシピエントに関する全ゲノム関連解析では、複数のSNP座が陽性と判定されたが、統計値と連鎖不平衡の相関は必ずしも良好ではなく、SNPタイピングにおける系統的エラーがバイアスとなっている可能性を否定しえなかった。
- (2) CTLアッセイと全ゲノム関連解析を用いたmHAの同定では、プールDNAを用いた解析により、2つのCTLクローンについて標的mHA抗原を同定することに成功し、これらの抗原についてエピトープの同定を行った。一方、HapMapを用いたin silicoの解析においても、1つのmHA座の候補が同定された。これは、以前に村田らにより報告されたmHA遺伝子座に一致したことから、本システムが有効に機能していることが示された。

結論:

- (1) JMDPにおけるHLA適合移植例のドナー/レシピエントに由来する2400DNA試料についてaffymetrix 500Kアレイを用いたgenotypingを完了した。中間解析では、複数のGVHDに関わる多型が抽出された。
- (2) 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用いたmHAの同定を行った。また、HapMap PhaseIIデータセットと同LCLパネルを用いた効率的なmHA同定システムを開発し、そのパフォーマンスの検証を行った。これらのシステムを用いることにより、今後ハイスループットなmHAの同定が期待される。

3. 研究実施体制

(1)「東京大学(小川誠司)」グループ

①研究者名

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。

(2)「名古屋第一赤十字病院(小寺 良尚)」グループ

①研究者名

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。

(3)「愛知県がんセンター(森島泰雄)」グループ

①研究者名

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。

(4)「東海大学(岡晃)」グループ

①研究者名

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。

(5)「九州大学(山本健)」グループ

①研究者名

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。

(6)「日本赤十字東京血液センター(佐竹正博)」グループ

①研究者名

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. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- Haraguchi K, Takahashi T, Nakahara F, Matsumoto A, Kurokawa M, Ogawa S, Oda H, Hirai H, Chiba S (2006) CD1d expression level in tumor cells is an important determinant for anti-tumor immunity by natural killer T cells. *Leukemia & lymphoma* 47:2218-2223
- Jacobs S, Thompson ER, Nannya Y, Yamamoto G, Pillai R, Ogawa S, Bailey DK, Campbell IG (2007) Genome-wide, high-resolution detection of copy number, loss of heterozygosity, and genotypes from formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue using microarrays. *Cancer research* 67:2544-2551
- Morishima Y, Yabe T, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, Yamamoto K, Maruya E, Akatsuka Y, Onizuka M, Sakamaki H, Sao H, Ogawa S, Kato S, Juji T, Sasazuki T, Kodera Y (2007) Effects of HLA allele and killer immunoglobulin-like receptor ligand matching on clinical outcome in leukemia patients undergoing transplantation with T-cell-replete marrow from an unrelated donor. *Biol Blood Marrow Transplant* 13:315-328
- Nakagawa M, Ichikawa M, Kumano K, Goyama S, Kawazu M, Asai T, Ogawa S, Kurokawa M, Chiba S (2006) AML1/Runx1 rescues Notch1-null mutation-induced deficiency of para-aortic splanchnopleural hematopoiesis. *Blood* 108:3329-3334
- Nishiyama U, Yoshino T, Ozai M, Yoshioka R, Fujisawa M, Ogasawara Y, Kitahori M, Yoshioka E, Kubo K, Komeno Y, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S, Osawa T, Kuwaki T, Hirai H, Miwa A (2006) Antineoplastic effect of a single oral dose of the novel Flt3 inhibitor KRN383 on xenografted human leukemic cells harboring Flt3-activating mutations. *Leukemia research* 30:1541-1546
- Oshima K, Kanda Y, Nakahara F, Shoda E, Suzuki T, Imai Y, Watanabe T, Asai T, Izutsu K, Ogawa S, Motokura T, Chiba S, Kurokawa M (2006) Pharmacokinetics of alemtuzumab after haploidentical HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation using in vivo alemtuzumab with or without CD52-positive malignancies. *American journal of hematology* 81:875-879
- Sanada M, Uike N, Ohyashiki K, Ozawa K, Lili W, Hangaishi A, Kanda Y, Chiba S,

Kurokawa M, Omine M, Mitani K, Ogawa S (2007) Unbalanced translocation der(1;7)(q10;p10) defines a unique clinicopathological subgroup of myeloid neoplasms. Leukemia in press

- Suzuki T, Yokoyama Y, Kumano K, Takanashi M, Kozuma S, Takato T, Nakahata T, Nishikawa M, Sakano S, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S (2006) Highly efficient ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells using Delta1-Fc chimeric protein. Stem cells (Dayton, Ohio) 24:2456-2465