

「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・特任准教授

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-SCT) 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の構築を目指している。

平成 16 年以前に日本骨髄バンクを通じて移植された 7800 例を超える移植症例について HLA DNA タイピング解析を推進し、解析対象とする「DNA レベルで HLA が完全一致した移植試料」の集積を進めるとともに、平成 18 年度までに、2600 ドナー・レシピエント試料 (1300 移植症例) 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。マイクロアレイによる genotyping と平行して、全ゲノム関連解析の検出力に及ぼす因子の詳細な解析を行うとともに (Nannya Y et al HMG 2008)、愛知県がんセンターの赤塚らと共同で、pool DNA の高密度 SNP アレイ解析を用いた効率的な新規マイナー抗原の同定技術を確立した (Kawase T, et al. Blood in press)。

以上を踏まえて、平成 19 年度については、平成 18 年度までに集積した HLA 完全一致移植計 1646 移植について、Affymetrix 500K アレイによる genotyping を完遂した。使用可能な保存 DNA 試料は当初の予定症例数の 80%にとどまったが、これら 1646 移植の解析データに基づいて、全ゲノム関連解析による GVHD 関連遺伝子座の検討を行った。ドナー・レシピエント間で定義される SNP のミスマッチと GVHD の発症に関するゲノムワイドな関連解析を行った。ゲノムワイド関連解析の手法の妥当性は、全症例での解析で不一致を含む HLA-DPB1 座が極めて高い統計値をもって検出されたことから明確に検証されたが、HLA 拘束性を考慮した標的遺伝子座の解析においても、B52 拘束性を示す 12 番長腕の遺伝子座を

ふくめ、複数の候補遺伝子座が同定された。一方、腫瘍特異的なアロ免疫療法を念頭においたマイナー抗原の探索については、近年公開された HapMap PhaseII データに基づいた極めて高感度なマイナー抗原同定法を構築し(HapMap 法)、複数の新規マイナー抗原の同定を進めている。次年度については、ゲノムワイド関連解析で同定した候補遺伝子座について、今回認められた関連を、新たな検証セットを用いて確認し、最終的な GVHD 関連標的 SNP の同定を行うこと、および HapMap 法を用いた新規マイナー抗原の探索を進める予定である。

2. 研究実施内容

研究目的

本研究の目的は、(1)日本骨髄バンク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、また、(2)全ゲノム関連解析の手法を用いた新規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 の同定を行うことにより、個々の遺伝的相違に立脚した安全かつ有効な造血幹細胞移植療法開発のための分子学的基盤を構築することである。

研究方法

(1)平成 16 年以前に日本骨髄バンクを通じて施行された同種造血幹細胞移植 7800 例のうち、① HLA A, B, C, DR, DQ が DNA レベルで完全適合し、②GVHD に関する臨床データが存在し、かつ③高品質なゲノム DNA が入手可能であった 1646 移植について、ドナー・レシピエント両者のゲノム DNA を Affymetrix GeneChip 500K アレイを用いて約 50 万 SNP の genotyping を行った。HapMapPhaseII JPT+CHB パネルのデータに基づいて未測定 of SNPs について遺伝子型の Imputation を行ったのち、マイナーアレル頻度 5%以上の SNP について、GVHD との関連を検討した。

(2)移植後患者より樹立した細胞傷害性 T 細胞株を用いて、HapMap 細胞パネルについて細胞傷害性アッセイを行い、細胞傷害性と相関する HapMap SNP を同定することにより、当該 T 細胞株の認識するマイナー組織適合性抗原遺伝子座の同定を行った。また、その検出力について、大規模シミュレーションによる検討を行った。

結果

(1) 全ゲノム関連解析による GVHD 関連遺伝子座の探索

SNP 解析では、99.6%のアレイで 90%以上の call rate が達成された。平均 call rate は Affymetrix 標準のアルゴリズム (DM algorithm) で 96.1%, 改善アルゴリズム (BRLLM) で

98.1%であった。これらの SNP のうち、症例レベルで 95%以上の call rate を示し、Hardy Weinberg 平衡 ($c^2 < 10.38$, $p = 0.001$) が確認され、かつマイナーアレル頻度が 5%以上の SNP を対象として解析を行った。解析は、急性および慢性 GVHD の発症の有無と程度について、ドナー側の SNP、レシピエント側の SNP および、ドナー・レシピエント間におけるアレル不適合の有無と数について行った。

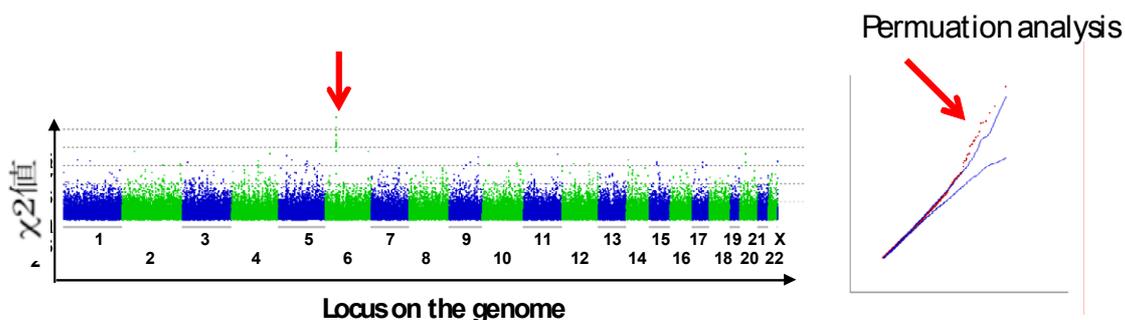


図 1. 全ゲノム関連解析による HLA DPB1 遺伝子座の同定

まず、全症例を含む、aGVHD とアレル不適合の関連に関する検討では、上記に示すように、帰無仮説の元で permutation によって得られる経験的な統計量の 95%信頼区間から逸脱するピークが観察されたが、これは HLA DPB1 遺伝子座に一致し、別解析で明らかとなった HLA DPB1 不適合の急性 GVHD 発症への関与が確認された。

その他の解析においても、急性および慢性 GVHD と相関する複数の遺伝子座が同定された。一例を示すと、重症の急性 GVHD (grade III-IV) と有意に相関する HLA B52 拘束性のアレルミスマッチを示す遺伝子座として 12 番染色体長腕の遺伝子座が同定された。本遺伝子座を含む連鎖不平衡ブロックには 4 つの遺伝子がコードされているが、そのうちのひとつ CASC1 は急性 GVHD の標的臓器である肝および皮膚に高発現しており、HLA B52 上に提示されるマイナー組織適合性抗原をコードしている可能性が示唆された。

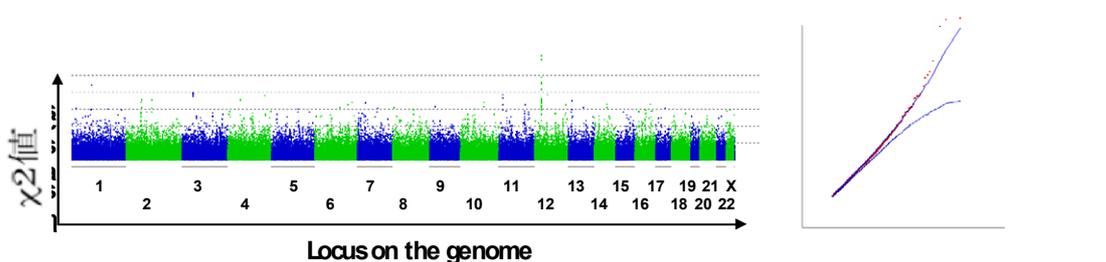


図 2. HLA B52 を有する症例におけるアレルミスマッチと aGVHD の相関 Permutation による q-q プロット

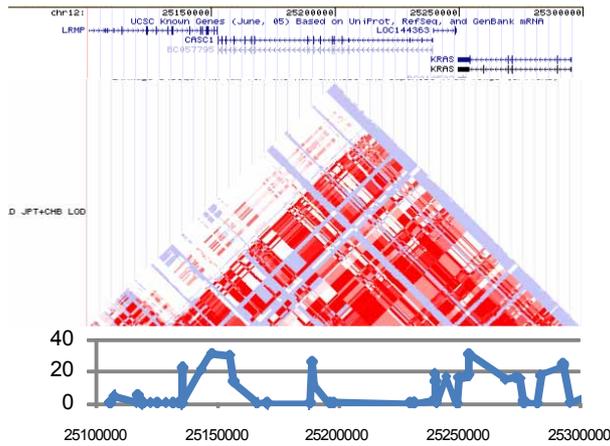


図 3. 12 番染色体長腕のピークを含む LD ブロックと遺伝子構造

今後、これらの候補遺伝子座について観察された相関について、確認症例セットを用いて相関の検証を行うとともに、標的となる SNP の同定を行う予定である。

(2) HapMap データに基づくマイナー抗原遺伝子座の探索

HapMap PhaseII データは、4 民族パネル 270 人に関する 310 万個を超える高精度な SNP タイピングデータであり、ヒト多型について現在入手可能な最も完全なデータセットである。本セットを用いた理論的予測によれば、比較的マイナーアレル頻度の大きい SNP の 90%以上が本 SNP セットで捕らえられていることが知られている。そこで、本データを直接関連解析に用いることにより、高精度な遺伝素因を同定することが理論的には可能である。移植後患者より樹立した細胞傷害性 T 細胞によって認識されるマイナー組織適合性抗原遺伝子を同定する目的で、赤塚らの樹立した細胞傷害性 T 細胞を用いて HapMap JPT+CHB パネルにおける抗原発現の有無を検討し、抗原発現の状態に基づいて HapMap PhaseII データを用いた関連解析を行った。以下にその一例を示したが、390 万個の SNP の解析から、19 番染色体上に明瞭な統計値のピークが確認され、有意な相関が見いだされた。本解析結果にもとづいて、SLC15A 遺伝子にコードされる HLA B 拘束性の新規マイナー抗原が同定された。

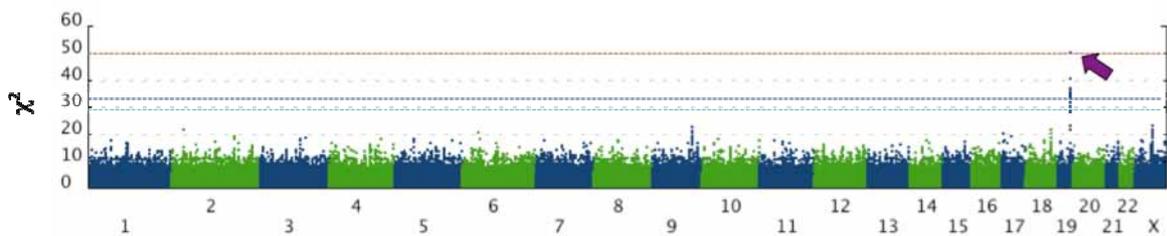


図 4 全ゲノム関連解析による CTL3B6 の認識するマイナー抗原遺伝子座の同定

コンピュータによる理論的なシミュレーションの結果から、比較的マイナーアレル頻度の高い SNP については本法によりほぼ 100%に近い確率でマイナー組織適合性抗原遺伝子座の同定が可能であることが明らかとなった。今後、本法を用いたハイスループットなマイナー抗原の同定を進める予定である。

結論

- (1) 日本骨髄バンクの移植例 1646 移植試料を用いた大規模 SNP 解析によるゲノムワイド関連解析により、GVHD の発症と関与する可能性のある複数の新規遺伝子座を同定した。
- (2) HapMap データに基づいたハイスループットなマイナー抗原同定法を確立し、これを用いて新規マイナー抗原の同定を行った。

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)

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)

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)

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)

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」グループ

① 研究者名: 山本 健(九州大学)

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)

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)

- 1.Yabe T, Matsuo K, Hirayasu K, Kashiwase K, Kawamura-Ishii K, Tanaka H, Ogawa A, Takanashi M, Satake M, Nakajima K, Tokunaga K, Inoko H, Saji H, Ogawa S, Juji J, Sasazuki T, Koderu Y, Morishima Y. Donor killer immunoglobulin-like receptor (KIR) genotype-patient cognate KIR ligand combination and anti-thymocyte globulin pre-administration are critical factors in outcome of HLA-C-KIR ligand mismatched T cell-replete unrelated bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 14:75-87, 2008.
- 2.Takeshita M, Ichikawa M, Nitta E, Goyama S, Asai T, Ogawa S, Chiba S, Kurokawa M. AML1-Evi-1 specifically transforms hematopoietic stem cells through fusion of the entire Evi-1 sequence to AML1. *Leukemia.* (in press).
- 3.Suzuki M, Kato M, Yuyan C, Takita J, Sanada M, Nannya Y, Yamamoto G, Takahashi A, Ikeda H, Kuwano H, Ogawa S, Hayashi Y. Whole-genome profiling of chromosomal aberrations in hepatoblastoma using high-density single-nucleotide polymorphism genotyping microarrays. *Cancer Sci.* 99:564-570, 2008.
- 4.Lehmann S, Ogawa S, Raynaud SD, Sanada M, Nannya Y, Ticchioni M, Bastard C, Kawamata N, Koeffler HP. Molecular allelokaryotyping of early-stage, untreated chronic lymphocytic leukemia. *Cancer.* 112:1296-1305, 2008.
- 5.Kumano K, Masuda S, Sata M, Saito T, Lee SY, Sakata-Yanagimoto M, Tomita T, Iwatsubo T, Natsugari H, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S. Both Notch1 and Notch2 contribute to the regulation of melanocyte homeostasis. *Pigment Cell Research* (in press).

6. Kawase T, Nanya Y, Torikai H, Yamamoto G, Onizuka M, Morishima S, Tsujimura K, Miyamura K, Kodera Y, Morishima Y, Takahashi T, Kuzushima K, Ogawa S, Akatsuka Y. Identification of human minor histocompatibility antigens based on genetic association with highly parallel genotyping of pooled DNA. *Blood* (in press).
7. Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, Kato M, Sanada M, Hemminki K, Yamamoto G, Nanya Y, Koehler R, Flohr T, Miller CW, Harbott J, Ludwig WD, Stanulla M, Schrappe M, Bartram CR, Koefler HP. Molecular allelokaryotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemias by high-resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide genomic microarray. *Blood*. 111:776–784, 2008.
8. Ichikawa M, Goyama S, Asai T, Kawazu M, Nakagawa M, Takeshita M, Chiba S, Ogawa S, Kurokawa M. AML1/Runx1 Negatively Regulates Quiescent Hematopoietic Stem Cells in Adult Hematopoiesis. *J Immunol*. 180:4402–4408, 2008.
9. Yamamoto G, Nanya Y, Kato M, Sanada M, Levine RL, Kawamata N, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, Gilliland DG, Koefler HP, Ogawa S. Highly sensitive method for genomewide detection of allelic composition in nonpaired, primary tumor specimens by use of affymetrix single-nucleotide-polymorphism genotyping microarrays. *Am J Hum Genet*. 81:114–126, 2007.
10. Nanya Y, Taura K, Kurokawa M, Chiba S, Ogawa S. Evaluation of genome-wide power of genetic association studies based on empirical data from the HapMap project. *Hum Mol Genet*. 16:3494–3505, 2007.
11. Matsumoto A, Haraguchi K, Takahashi T, Azuma T, Kanda Y, Tomita K, Kurokawa M, Ogawa S, Takahashi K, Chiba S, Kitamura T. Immunotherapy against metastatic renal cell carcinoma with mature dendritic cells. *Int J Urol*. 14:277–283, 2007.
12. Lips EH, de Graaf EJ, Tollenaar RA, van Eijk R, Oosting J, Szuhai K, Karsten T, Nanya Y, Ogawa S, van de Velde CJ, Eilers PH, van Wezel T, Morreau H. Single nucleotide polymorphism array analysis of chromosomal instability patterns discriminates rectal adenomas from carcinomas. *J Pathol*. 212:269–277, 2007.
13. Kawazu M, Yamamoto G, Yoshimi M, Yamamoto K, Asai T, Ichikawa M, Seo S, Nakagawa M, Chiba S, Kurokawa M, Ogawa S. Expression profiling of immature thymocytes revealed a novel homeobox gene that regulates double-negative thymocyte development. *J Immunol*. 179:5335–5345, 2007.
14. Kawase T, Akatsuka Y, Torikai H, Morishima S, Oka A, Tsujimura A, Miyazaki M, Tsujimura K, Miyamura K, Ogawa S, Inoko H, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Takahashi T. Alternative splicing due to an intronic SNP in HMSD generates a novel minor histocompatibility antigen. *Blood*. 110:1055–1063, 2007.