

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、全ゲノム関連解析の手法により、同種造血幹細胞移植における最大の合併症である移植片対宿主病(GVHD)および移植における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およびその他の多型を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 19 年度までの研究においては、日本骨髄バンク(JMDP)を通じて行われた非血縁骨髄移植 1646 移植について、Affymetrix GeneChip 500K アレイを用いてドナー・レシピエントそれぞれについて 50 万 SNPs のタイピングを完了し、予備的な関連解析を行った。また、移植後に樹立された細胞障害性 T 細胞を用いた HapMap 細胞パネルの細胞傷害性アッセイと近年公開された HapMap PhaseII データを利用した mHA 同定のための新たな手法(HapMap 法)を開発し、GVL の標的となりうる新規マイナー抗原の同定を行った。

以上を踏まえて、平成 20 年度については、JMDP 試料の SNP タイピングデータに基づいた標的 SNP の詳細な解析と独立な症例セットによる候補 SNPs の確認タイピングを進めるとともに、HapMap 法については、新規解析プログラムの開発による検出力の改善とこれを用いた新規マイナー抗原の同定を試みた。JMDP 試料の大規模 SNP タイピングによる関連解析では、genome-wide $p < 0.05$ を示す 10 カ所の有望な SNP が検出された。これらのうち 2 つの SNP 座について、2004 年以降の独立な移植セットを用いた確認タイピングを行ったが、現時点では当該 SNP の関連性の傾向は認められるものの、サンプル数の不足から、統計的検証には至らなかった。一方、改良 HapMap 法は非常に高い検出力を有することが示され、今後極めて有効な mHA 同定法となることが期待された。

今後同定された候補 SNP に関して、独立な移植セットを用いた確認タイピングを進めるとともに、同定された GVHD の標的 mHA 候補については、免疫学的な妥当性の検証が必要である。また、改良 HapMap 法を用いた新たな GVL 関連 mHA の同定を進める予定である。

2. 研究実施内容(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

(1) JMDP 試料の大規模 SNP タイピングと全ゲノム関連解析による GVHD 関連 SNP の探索

本研究では、2004 年以前に JMDP を通じて行われた非血縁骨髄移植のうち、HLA A, B, C, DR, DQ 座が DNA レベルで完全一致し、GVHD 予防としてメトトレキサートおよびシクロスポリンないしタクロリムスが用いられ、かつ、急性 GVHD に関するデータとゲノム DNA が利用可能な 1646 移植について、Affymetrix GeneChip 500K アレイを用いた 50 万遺伝子座の SNP タイピングを行った。急性 GVHD(aGVHD)の重症度別の割合では、grade II-IV の aGVHD を 40%に、また III-IV の aGVHD を 14.9%に認めた。また、1033 移植(63%)において、当初一致させなかった HLA DPB1 の不一致が認められた。Call rate 不良の試料については、再タイピングを繰り返すことにより、最終的には Ciamo アルゴリズムによる高感度 call により、ドナー・レシピエントともに 98%を超える call rate が得られた。HapMap PhaseII データに基づいた未観測 SNP の Imputation を行ったのち、call rate 95%未満、minor allele 頻度 5%未満、Hardy-Weinberg 平衡からの逸脱、ないし、ドナー・レシピエント間の call rate の差が 3%を超える SNP を除外した計 1,276,699 SNP について関連解析を行った。

検定統計量としては、event の発症時間を考慮した logrank 統計量を用いることとし、各 SNP 座について同統計量を算出し、有意なピークを検出した。極端な(>1,000,000)多重検定による false positive findingをコントロールする目的で、各解析について 1,000 回の random permutation を行うことにより genome-wide $p=0.05$ を示す統計量を算出し、これを経験的な閾値として検定を行った。また、関連解析は単純なドナーないしレシピエントにおける SNP 型に基づいた関連解析に加えて、mHA を念頭においたドナー・レシピエントの SNP で定義される GVHD 方向のアレル不適合に基づいた解析を行った。後者については、mHA の認識における HLA 拘束を考慮し、日本人における主要な HLA サブタイプについて、HLA サブタイプ毎に関連解析を行った。

HLA 拘束を仮定しないアレル不適合と II 度以上の aGVHD の発症の解析においては、全ゲノムで唯一の有意なピークとして DPB1 遺伝子座に一致する rs6937034 周囲の SNPs が同定され($P=1.81 \times 10^{-9}$)、DPB1 不適合と急性 GVHD の既知の関連($HR=1.91$, $P=2.88 \times 10^{-13}$) が確認されたことから(Figure 1a および 2a)、本解析手法の有用性が確認された。また、本 SNP セットの genome coverage を考慮にいと、HLA より強く aGVHD に影響を及ぼす HLA 非拘束性の組織適合性抗原はおそらく存在しないであろうことが推察された。一方、日本人の主要な HLA サブタイプによる解析においては、日本人で最も頻度の高い二つのハプロタイプである A*2402/B*5201/C*1201/DRB1*1501/DQB1*0601 および A*3303/B*4403/C*1403 アレルに拘束される SNP 座として rs17473423(12 番染色体、 $P=3.99 \times 10^{-13}$)(Figure 1b および 2b)および rs9657655(9 番染色体、 $P=8.56 \times 10^{-10}$) (Figure 1c および 2c)周囲の SNPs と grade III-IV の aGVHD との相関がそれぞれ検出されたが、これらのハプロタイプに認められる強い連鎖不平衡のため、拘束される HLA を遺伝学的に精確に確定することは困難であった。これらの他にも 3 つの SNP 座における HLA 拘束性のアレル不適合と aGVHD との有意な関連(genome-wide $P<0.05$)が同定された他、慢性 GVHD に関連する HLA 拘束性 SNP 座としては、A2402 アレルに拘束される rs4784508 周囲の SNP が同定された。

aGVHD の発症と関連するドナーないしレシピエントの SNP の探索では、レシピエントにおける 2

つの遺伝子座、rs5998746 周辺および rs5998746 が検出されたが、ドナー側の SNP は検出にからなかった。慢性 GVHD の解析では、ドナー側の SNP として rs204919 が同定された(文献 14)。

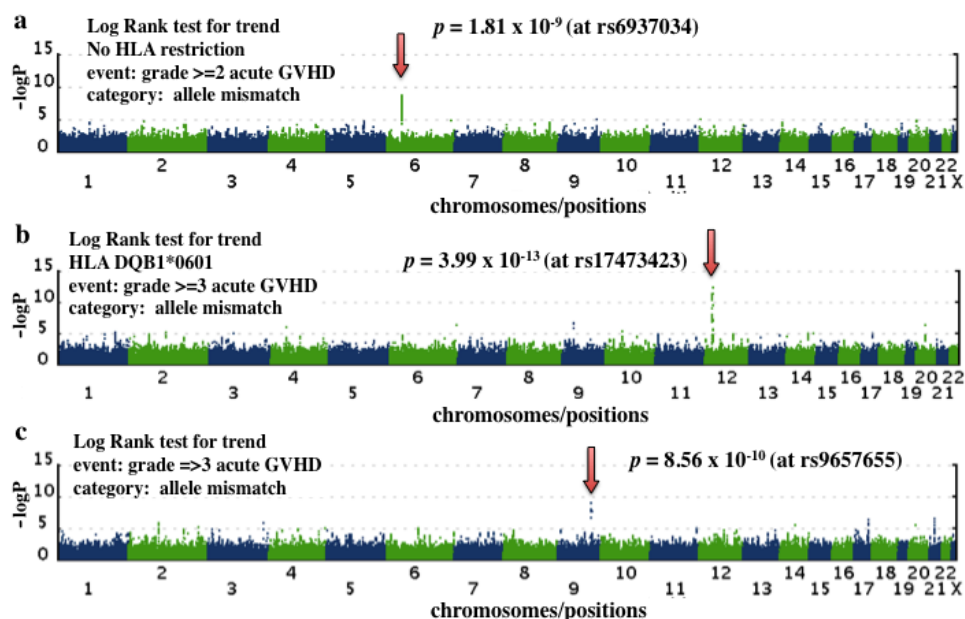


Figure 1. Representative results of GWAS based on genotype mismatch

$-\log_{10}P$ values are plotted in genetic order. Results are presented for association tests for genotype mismatch under no HLA restriction (a), and under the restriction to HLA DQB1*0601 (b) and HLA B*4403 (c).

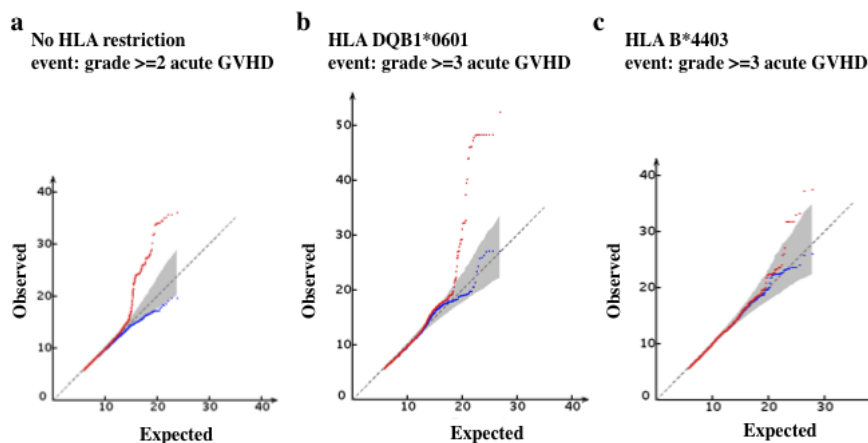


Figure 2. QQ-plots of the statistics

QQ-plots of the analysis for genotype mismatch under no restriction on HLA (a), and restriction to HLA DQB1*0601 (b) and HLA B*4403 (c), where observed test statistics values are plotted against expected value from 1,000 random permutations (red). 95% confidential intervals are also provided by shadows. Only the plots for top 20,000 results are presented. The QQ-plots excluding the SNPs that belong to the positive peak are also depicted in blue.

ゲノムワイド関連解析で同定されたこれらの SNP については、独立な移植セットを用いた確認タイピングによる関連性の検証が必要である。本年度は、上記の SNP のうち、A*2402/B*5201/C*1201/DRB1*1501/DQB1*0601 アレルに拘束される rs17473423 および

A*3303/B*4403/C*1403 アレルに拘束される rs9657655 に関して、独立な移植シリーズを用いた確認タイピングを行った。これらの移植セットにおいても、当該 SNP 座におけるアレル不適合移植において grade III-IV の aGVHD の発症が増加する傾向が観察され、rs17473423 については、統計上は有意差が確認されたが($p=0.0347$)、解析移植数がいずれの場合も小さいことから($N=99$ および 76)、今後さらに移植数を増やした解析による確認を要する。また、他の候補 SNP についても検証タイピングを行う予定である。

(2) 改良 HapMap 法の検出力の検討と新規 mHA の同定

我々が独自に開発した HapMap 法においては、移植後患者より樹立された細胞障害性 T 細胞 (CTL) の HLA 拘束の元での HapMap 細胞パネルに対する細胞障害性をアッセイし、各細胞パネルに該当する HapMap データを用いて細胞障害性の有無によりゲノムワイドな関連解析を行うことにより、CTL が認識する mHA を同定する。我々は、各 HapMap パネルについて詳細なシミュレーションを行うことにより、高々 60-90 個の独立な細胞セットを用いて標的遺伝子座を高い確率でユニークに同定することが可能であることを示し、2 つの新たな mHA を同定した(文献 10)。現在、新たな CTL を用いてその標的 mHA 遺伝子座の同定を進めている。

(3) SNP アレイ解析プログラムのがんゲノミクスへの応用

我々は平成 16 年度の研究において、SNP タイピングにおける call rate アルゴリズムの改良を試みたが、この過程で SNP アレイを用いた高精度なゲノムコピー数解析プログラム CNAG を開発した。CNAG の開発自体は本研究の副産物であるが、web 公開している同プログラム (<http://www.genome.umin.jp>) は、SNP アレイを用いたがんゲノム解析における defact standard として世界的に広く利用されるに至っている。我々自身も、CNAG を用いた種々のがんゲノムの解析研究を、東京大学より申請した運営費交付金による「大規模ゲノミクスを用いたオーダーメイドがん診療技術の開発」において推進し、同研究成果は、難治性神経芽腫における ALK 遺伝子変異の同定とその神経芽腫発症における役割の解明に至っている(文献 12)。

3. 研究実施体制

(1)「東京大学(小川誠司)」グループ

①研究分担グループ長：小川 誠司(東京大学 特任准教授)

②研究項目：約 1700 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。遺伝疫学の手法と 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。

(2)「名古屋第一赤十字病院(小寺良尚)」グループ

①研究分担グループ長：小寺 良尚(愛知医科大学 教授)

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研究分担グループ長：森島 泰雄(愛知県がんセンター 副院長)
- 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。移植データ管理。

(4)「東海大学(岡晃)」グループ

- ①研究分担グループ長：岡 晃(東海大学 講師)
- 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研究分担グループ長：山本 健(九州大学 准教授)
- ②研究項目：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研究分担グループ長：佐竹 正博(東京都西赤十字血液センター 所長)
- ②研究項目：HLA の遺伝子タイピング。バンク試料のアーカイブ化。抗補 SNP の確認タイピング。

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

1. Walsh CS, Ogawa S, Scoles DR, Miller CW, Kawamata N, Narod SA, Koeffler HP, Karlan BY. Genome-wide loss of heterozygosity and uniparental disomy in BRCA1/2-associated ovarian carcinomas. Clin Cancer Res. 14:7645-7651,2008.
2. Walsh CS, Ogawa S, Karahashi H, Scoles DR, Pavelka JC, Tran H, Miller CW, Kawamata N, Ginther C, Dering J, Sanada M, Nannya Y, Slamon DJ, Koeffler HP, Karlan BY. ERCC5 is a novel biomarker of ovarian cancer prognosis. J Clin Oncol. 26:2952-2958,2008.
3. Tanaka Y, Kanai F, Tada M, Tateishi R, Sanada M, Nannya Y, Ohta M, Asaoka Y, Seto M, Shiina S, Yoshida H, Kawabe T, Yokosuka O, Ogawa S, Omata M. Gain of GRHL2 is associated with early recurrence of hepatocellular carcinoma. J Hepatol. 49:746-57,2008.
4. Sakata-Yanagimoto M, Nakagami-Yamaguchi E, Saito T, Kumano K, Yasutomo K, Ogawa S, Kurokawa M, Chiba S. Coordinated regulation of transcription factors through Notch2 is an important mediator of mast cell fate. Proc Natl Acad Sci U S A. 105:7839-7844,2008.
5. Lin LJ, Asaoka Y, Tada M, Sanada M, Nannya Y, Tanaka Y, Tateishi K, Ohta M, Seto M, Sasahira N, Kawabe T, Zheng CQ, Kanai F, Ogawa S, Omata M. Integrated analysis of copy number alterations and loss of heterozygosity in human pancreatic cancer using a high-resolution, single nucleotide polymorphism array. Oncology. 75:102-112,2008.
6. Kawamata N, Zhang L, Ogawa S, Nannya Y, Dashti A, Lu D, Lim S, Schreck R, Koeffler HP. Double minute chromosomes containing MYB gene and NUP214-ABL1 fusion gene in T-cell leukemia detected by single nucleotide polymorphism DNA microarray and

- fluorescence in situ hybridization. *Leuk Res*, 33:569-71, 2009.
7. Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, Niebuhr B, Stocking C, Sanada M, Hemminki K, Yamamoto G, Nannya Y, Koehler R, Flohr T, Miller CW, Harbott J, Ludwig WD, Stanulla M, Schrappe M, Bartram CR, Koefler HP. Cloning of genes involved in chromosomal translocations by high-resolution single nucleotide polymorphism genomic microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105:11921-11926, 2008.
 8. Kawamata N, Ogawa S, Yamamoto G, Lehmann S, Levine RL, Pikman Y, Nannya Y, Sanada M, Miller CW, Gilliland DG, Koefler HP. Genetic profiling of myeloproliferative disorders by single-nucleotide polymorphism oligonucleotide microarray. *Exp Hematol*, 36:1471-9, 2008.
 9. Kawamata N, Dashti A, Lu D, Miller B, Koefler HP, Schreck R, Moore S, Ogawa S. Chronic phase of ETV6-ABL1 positive CML responds to imatinib. *Genes Chromosomes Cancer*. 47:919-921,2008.
 10. Kamei M, Nannya Y, Torikai H, Kawase T, Taura K, Inamoto Y, Takahashi T, Yazaki M, Morishima S, Tsujimura K, Miyamura K, Ito T, Togari H, Riddell SR, Koda Y, Morisima Y, Takahashi T, Kuzushima K, Ogawa S, Akatsuka Y. HapMap scanning of novel human minor histocompatibility antigens. *Blood*, 111:776-84, 2008.
 11. Goyama S, Yamamoto G, Shimabe M, Sato T, Ichikawa M, Ogawa S, Chiba S, M K. Evi-1 Is a Critical Regulator for Hematopoietic Stem Cells and Transformed Leukemic Cells. *Cell Stem Cell*. 3:207-220,2008.
 12. Chen Y, Takita J, Choi YL, Kato M, Ohira M, Sanada M, Wang L, Soda M, Kikuchi A, Igarashi T, Nakagawara A, Hayashi Y, Mano H, Ogawa S. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature*. 455:971-974,2008.
 13. Akagi T, Shih LY, Kato M, Kawamata N, Yamamoto G, Sanada M, Okamoto R, Miller CW, Liang DC, Ogawa S, Koefler HP. Hidden abnormalities and novel classification of t(15;17) APL based on genomic alterations. *Blood*, 113:1741-8, 2008.
 14. 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, Koda Y, Takehiko S. Exploration of the genetic basis of GVHD by genetic association studies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 15:39-41, 2008.

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 0 件)