

第 12 回日本組織適合性学会近畿地方会 抄 録 集

会 期 : 2014 年 2 月 1 日 (土)

会 場 : 大阪府赤十字血液センター 7 階会議室
大阪市城東区森之宮 2 丁目 4 番 43 号

TEL: 06-6962-7001

世話人 : 木村 貴文

京都大学 iPS 研究所 基盤技術研究部門

〒 606-8507 京都市左京区聖護院川原町 53

TEL: 075-366-7051

E-mail: t.kimura@cira.kyoto-u.ac.jp

共 催 : 財団法人 大阪腎臓バンク

【参加費】

1. 正会員：2,000 円
2. 学 生：1,000 円
3. 世話人：3,000 円

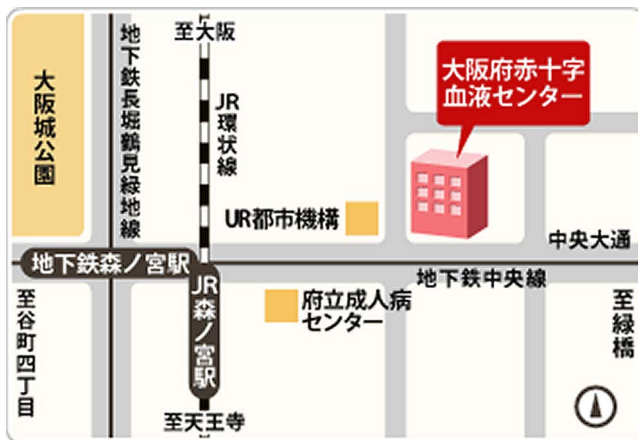
【会議等】

1. 総 会：2月1日（土）13:50～14:00
2. 世 話 人 会：2月1日（土）12:30～13:50
3. 意見交換会：2月1日（土）17:00～

【会場地図】

大阪府赤十字血液センター 7階会議室

大阪市城東区森之宮2丁目4番43号 TEL 06-6962-7001



JR 環状線・地下鉄中央線・地下鉄長堀鶴見緑地線，森ノ宮駅下車東へ 350 m

プログラム

9 時 30 分

受付開始

【午前の部】

10 時～ 11 時

オープニングセミナー

座長：芦田隆司（近畿大学 血液・膠原病内科）

1) 赤血球抗原の遺伝子検査

田中光信（日本赤十字社 近畿ブロック血液センター 検査開発課）

2) HLA-F と古典的クラス I の新しい側面

石谷昭子（奈良県立医科大学法医学教室）

11 時～ 12 時 30 分

一般演題 (1)

11 時 00 分～ 11 時 50 分

座長：荒木延夫（兵庫県赤十字血液センター）

1) NAIT 症例より検出された抗 HPA-15b 抗体の性状とその検出に関する問題点及び文献的考察

○荒木延夫, 西村千恵, 秋田真哉, 坊池義浩, 三木 均
兵庫県赤十字血液センター

2) ドナー特異的 HLA-DPB1 抗体陽性患者に対する臍帯血移植（第二報）

○佐藤 壯¹⁾, 佐藤蘭子¹⁾, 小林直樹²⁾
社会医療法人北楡会 札幌北楡病院 臨床検査科¹⁾, 同 血液内科²⁾

3) FlowPRA Screening による HLA 抗体検査：プロゾーン様現象を呈した一例

○高山智美¹⁾, 久山芳文¹⁾, 扇谷恵里花¹⁾, 岡田倫之¹⁾, 矢澤浩治²⁾, 市丸直嗣³⁾, 高原史郎³⁾
大阪府立急性期・総合医療センター移植支援検査センター¹⁾, 大阪府立母子保健総合医療センター泌尿器科²⁾, 大阪
大学大学院医学系研究科先端移植基盤医療学³⁾

4) 抗体同定試薬 WAKFlowHLA 抗体クラス I (HR) のエピトープ既知検体における反応性

○黒田ゆかり, 中村仁美, 山口恵津子, 田原大志, 井上純子, 永吉裕二, 中村 功, 久田正直, 清川博之
日本赤十字社九州ブロック血液センター 品質部

5) 抗体検査における Single Antigen と PRA の相関について

○池田奈未¹⁾, 小島裕人¹⁾, 二神貴臣¹⁾, 辻野貴史¹⁾, 林 晃司¹⁾, 楠木靖史¹⁾, 藤井直樹¹⁾, 末上伸二¹⁾, 宮崎有紀¹⁾,
西川美年子¹⁾, 小川公明²⁾, 赤座達也¹⁾, 佐治博夫¹⁾
公益財団法人 HLA 研究所¹⁾, NPO 法人 白血病研究基金を育てる会²⁾

一般演題 (2)

11 時 50 分～12 時 30 分

座長：二神貴臣（公益財団法人 HLA 研究所）

6) iPS 細胞樹立前後の同一性確認のための NGS を用いた第 4 区域までの HLA アリルタイピング

○末上伸二¹⁾，小島裕人¹⁾，鈴木進悟²⁾，尾崎有紀²⁾，椎名 隆²⁾，光永滋樹²⁾，猪子英俊²⁾，佐治博夫¹⁾，木村貴文³⁾公益財団法人 HLA 研究所¹⁾，東海大医学部 基礎医学系 分子生命科学²⁾，京都大学 iPS 細胞研究所 基盤技術
研究部門³⁾

7) Miseq を用いた HLA タイピング

○小島裕人¹⁾，末上伸二¹⁾，Wyatt Nelson²⁾³⁾，石谷昭子³⁾⁴⁾，二神貴臣¹⁾，辻野貴史¹⁾，林 晃司¹⁾，楠木靖史¹⁾，藤井直樹¹⁾，
池田奈未¹⁾，宮崎有紀¹⁾，Daniel E. Geraghty²⁾³⁾，佐治博夫¹⁾公益財団法人 HLA 研究所¹⁾，Fred Hutchinson Cancer Research Center²⁾，Scisco Genetics, Inc.³⁾，奈良県立医科大学 法
医学教室⁴⁾

8) 日本列島人における A, B, DR, DQ, DP のハプロタイプ頻度解析

～ファミリーデータからの直接カウント法による～

○宮崎有紀¹⁾，小島裕人¹⁾，二神貴臣¹⁾，辻野貴史¹⁾，林 晃司¹⁾，楠木靖史¹⁾，藤井直樹¹⁾，末上伸二¹⁾，池田奈未¹⁾，
西川美年子¹⁾，小川公明²⁾，赤座達也¹⁾，佐治博夫¹⁾公益財団法人 HLA 研究所¹⁾，NPO 法人 白血病研究基金を育てる会²⁾

9) HLA-8/8 アリル適合非血縁者間造血細胞移植における HLA-DPB1 disparity の検討

○佐藤 壯¹⁾，佐藤蘭子¹⁾，小林直樹²⁾，小林良二³⁾社会医療法人北楡会 札幌北楡病院 臨床検査科¹⁾，同 血液内科²⁾，同 小児思春期科³⁾

12 時 30 分～13 時 50 分

昼食・世話人会

13 時 50 分～14 時 00 分

総会

【午後の部】

14 時 00 分～ 14 時 20 分

ブリーフ・セッション

座長：木村貴文（京都大学 iPS 研究所 基盤技術研究部門）

ASHI（American Society for Histocompatibility and Immunogenetics）39th Annual Meeting に出席して
楠木靖史（公益財団法人 HLA 研究所）

14 時 20 分～ 15 時 50 分

シンポジウム

「iPS 細胞にとっての組織適合性」

座長：谷 慶彦（近畿ブロック血液センター 研究部）

木村貴文（京都大学 iPS 研究所 基盤技術研究部門）

- 1) 「iPS 細胞を用いた腎疾患治療法の開発」
長船健二（京都大学 iPS 細胞研究所 増殖分化機構研究部門）
- 2) 「iPS 細胞を用いた脳内細胞移植治療における免疫原性の検討」
森実飛鳥（京都大学 iPS 細胞研究所 臨床応用研究部門）
- 3) 「iPS 細胞を用いた細胞治療と組織適合性」
木村貴文（京都大学 iPS 細胞研究所 基盤技術研究部門）

16 時 00 分～ 17 時 00 分

特別講演

座長：椿 和央（近畿大学医学部奈良病院 血液内科）

「造血幹細胞移植と HLA」

森島泰雄（愛知県がんセンター 研究所 疫学・予防部）

17 時～

懇親会

(10:00 ~ 11:00)

オープニングセミナー

座長：芦田隆司（近畿大学 血液・膠原病内科）

- 1) 赤血球抗原の遺伝子検査
田中光信（日本赤十字社 近畿ブロック血液センター 検査開発課）

- 2) HLA-F と古典的クラス I の新しい側面
石谷昭子（奈良県立医科大学法医学教室）

1) 赤血球抗原の遺伝子検査

田中光信

日本赤十字社 近畿ブロック血液センター 検査開発課

血液細胞のひとつである赤血球の役割は、体内で酸素を効率よく細胞に運ぶことである。しかし、その赤血球の表面には、未だ役割が明確になされていない数百種類も抗原、血液型が存在している。現在、血液型の責任遺伝子が単離され、国際輸血学会 (ISBT) に登録されている血液型は、33 システム 297 抗原、遺伝子が未だ単離されていない低頻度抗原、高頻度抗原、未分類などの抗原を含めると 339 抗原ある (2012 年現在)。これら血液型の検査方法は、Landsteiner が ABO 血液型を発見した 20 世紀の当時から変わらぬ血清 (抗体) と赤血球を用いて凝集の有無を見る血球凝集反応法で、現在も標準的な血液型検査の手法となっている。血球凝集反応には、血液型を決めるための抗体が必要で、これまでヒト由来の血清が多く用いられ、市販試薬としても入手可能であった。しかし、諸般の事情から、年々入手が難しくなり、代わりに血液型検査用としてモノクローナル抗体が作製され、試薬として数多く市販されるようになった。ただし、すべての血液型検査に対応するモノクローナル抗体が作製されたかと言うと、そうではなく、輸血検査の現場では、複数回輸血患者、DAT 陽性患者や検査用の抗体が手に入らず、血液型の判定に苦慮する検体に遭

遇し、遺伝子型による検査が求められるケースも多くなってきている。

一方、1990 年ごろからはじまった国際ヒトゲノム計画は、当初の予定よりも早く全ゲノムが解読され、その全容解明が進むにつれ、ヒトの血液型に係わる責任遺伝子も次々と単離されてきた。そして、血液型と遺伝子型の関係が明らかとなり、赤血球抗原も遺伝子検査ができるようになってきた。ISBT では「Blood Group Allele Terminology」として、これら血液型遺伝子とその遺伝子変異を整理、共有するために情報を公開している。欧米では、これらの情報を元にして、BLOODChipTM や IDCORE^{XT} (GRIFOLS), BioArrayTM (IMMUCOR) など赤血球血液型の遺伝子検査を目的とした試薬が市販され、すでに血液センターなど多くの施設で使用されている。また、国内でも ABO 血液型の遺伝子検査用試薬のジェノサーチ ABOTM (MBL) が発売され、赤血球血液型も遺伝子を検査する時代が始まったといえる。そこで、本学会では、国内外の赤血球抗原に関する遺伝子検査の現状を紹介し、赤血球血液型だけにとどまらず、血液型遺伝子検査の可能性と将来の方向性を展望してみたい。

2) HLA-F と古典的クラス I の新しい側面

石谷昭子

奈良県立医科大学法医学教室

HLA-F は, Geraghty らにより同定された非古典的 HLA class I, HLA-E, -F, -G の一つである。これら非古典的 HLA class I はいずれも, ①多型性が著しく乏しいこと, ②特異的な発現様式, ③特異的なペプチド結合様式が特徴である。これまでに HLA-E と -G についてはその機能が多く解明されてきたが, HLA-F についてはいまだ解明されていない。しかし, HLA-F の塩基配列は霊長類にもよく保存されており, 何らかの重要な機能を持っていることが推測される。

HLA-F の発現については, リンパ球等免疫細胞やある種の組織には発現しているが定常状態では細胞表面には発現せず, 細胞が活性化された時のみに細胞表面には発現する¹⁾。ただしこのとき, B, T, NK, monocyte 等すべての免疫細胞には発現するが, Treg のみには発現しない。また, ある種のがん組織には強く発現している場合がある²⁾³⁾。ただ一つ, 正常組織で発現しているものがある。それは, 胎盤において母体脱着膜組織に侵入している胎児の extravillous trophoblast には妊娠後期に HLA-F が細胞膜表面に強く発現する⁴⁾⁵⁾。このように HLA-F は何らかの活性化状態において表面に発現すると考えられる。

この HLA-F の機能を解析するなかで, これが古典的 HLA class I (HLA-I) による cross-presentation に関わっていることを見いだした⁶⁾⁷⁾。

本来, HLA-I は内因性抗原を CD8 T 細胞に提示するものであって, 細胞外に存在する外来抗原の提示は HLA class II (HLA-II) が行うというのは確立された事実であるが, HLA-I はまた一方で, 外来抗原を T 細胞に提示することも知られている。これを HLA-I の cross-presentation と呼ぶ⁸⁾。この cross-presentation の細胞内での詳しいメカニズムはまだ解明されていない。また, HLA-I 分子は, 活性化状況において, ペプチドや $\beta 2m$ を結合していない配位異性体としても存在する。これは open conformer とよばれ, 同一細胞上の他の分子と結合したり, 同じ HLA 分子と結合して homodimer をつくったりもすることが報告されている。これは cis interaction

と呼ばれ⁹⁾, 何らかの機能があると考えられている。

HLA-F は, 細胞が活性化されたとき細胞膜上に発現するのであるが, これはペプチドや $\beta 2m$ を結合していない open conformer として発現し, HLA-I の open conformer と結合して存在する。そして HLA-I の open conformer が細胞外の抗原 (比較的大きい, 50 アミノ酸程度のポリペプチド) を結合して細胞内に取り込む時, HLA-F も一緒に細胞内の初期エンドソームに取り込まれる。その後, HLA-F と HLA-I は lysosome に運ばれ, 結合した抗原は小さく分解されて, HLA-I とともに Golgi 装置に運ばれ, HLA-I 分子にペプチドとして結合され, $\beta 2m$ と会合して細胞膜に運ばれ T 細胞に抗原提示を行うというモデルが我々の実験結果から推論される。すなわち, HLA-F は細胞活性化において, HLA-I の open conformer を安定化させ, 細胞内への抗原の取り込みを助ける機能をもっていると推測される。

また, 我々は, この HLA-F と HLA-I の 2 つの open conformer の heterodimer は NK レセプターの Killer Ig-like receptor (KIR) のリガンドとなることも明らかにした¹⁰⁾。

今回の発表においては, HLA-F と HLA-I の open conformer や KIR との相互作用についてのデータを示し, これらの相互作用が妊娠免疫やがん免疫, 感染症免疫にどのように関わるかについて考察したい。

- 1) Lee N, Ishitani A, and Geraghty DE. (2010). HLA-F is a surface marker on activated lymphocytes. *Eur J Immunol* 40: 2308–2318.
- 2) Zhang X, Lin A, Zhang JG, Bao WG, Xu DP, Ruan YY, Yan WH. (2013) Alteration of HLA-F and HLA I antigen expression in the tumor is associated with survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 132(1): 82–89.
- 3) Sageshima N, Ishitani A, et al. HLA-F expression on tumor tissue. in submission.
- 4) Ishitani A, Sageshima N, Lee N, Dorofeeva N, Hatake K, Marquardt H, Geraghty, DE. (2003) Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition.

- J Immunol 171: 1376–1384.
- 5) Shobu T, Sageshima N, Tokui H, Omura M, Saito K, Nagatsuka Y, Nakanishi M, Hayashi Y, Hatake K, Ishitani A. (2006) The surface expression of HLA-F on decidual trophoblasts increases from mid to term gestation. *J Reprod Immunol* 72(1–2): 18–32.
 - 6) Goodridge JP, Burian A, Lee N, Geraghty DE. (2010). HLA-F complex without peptide binds to MHC class I protein in the open conformer form. *J Immunol* 184: 6199–6208.
 - 7) Goodridge JP, Lee N, Burian A, Pyo CW, Tykodi SS, Warren EH, Yee C, Riddell SR, Geraghty, DE. (2013) HLA-F and MHC-I open conformers cooperate in an MHC-I antigen cross presentation pathway. *J Immunol* 191: 167–177.
 - 8) Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. (2012) Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 12: 557–569.
 - 9) Arosa FA, Santos SG, Powis SJ. (2007) Open conformers: the hidden face of MHC-1 molecules. *Trends in Immunol* 28: 115–123.
 - 10) Goodridge, JP, Burian A, Lee N, Geraghty DE. (2013) HLA-F and MHC-I open conformers are ligands for natural killer cell receptors. *J Immunol* 191(7): 3553–3562.

(11:00 ~ 11:50)

一般演題 (1)

座長：荒木延夫（兵庫県赤十字血液センター）

演題番号 1) ~ 5)

1) NAIT 症例より検出された抗 HPA-15b 抗体の性状と その検出に関する問題点及び文献的考察

○荒木延夫, 西村千恵, 秋田真哉, 坊池義浩, 三木 均

兵庫県赤十字血液センター

【目的】我々は、第1子目のNAIT (neonatal alloimmune thrombocytopenia: 新生児同種免疫性血小板減少症) の発症原因と推察された特異性不明の血小板特異抗体について「母親血清がインタクト血小板MPHA法においてプロゾーン現象を示したNAIT症例について: 日輸血細胞治療会誌, 55: 386-391, 2009」を報告した。そして2013年、第61回日本輸血・細胞治療学会・日本血小板・顆粒球型ワークショップにおいて当該familyの第3子目のNAIT症例が近畿大学医学部奈良病院の八木により「HPA-15b抗体保有妊婦の臨床」として報告された(第2子はHPA-15適合)。そこで、我々が経験した第1子目の抗HPA-15b抗体の性状とその検出に関する問題点及び文献的考察を実施したので報告する。

【症例】患児は初産で、出生時の血小板数は11,000/ μ L。抗HLA抗体は陰性(LABScreen法)、血小板交差試験(IP-MPHA: intact platelet-MPHA)は母親の原血清で陰性、2倍~8倍希釈で1+, 16倍~64倍希釈で2+を示し、プロゾーン現象を観察した(Fig. 1)。母親の抗HPA-15bはEP-MPHA (extracted platelet antigen solution-MPHA: EP-MPHA)法(n=8)とMACE (modified antigen capture ELISA)法(GTI社, PAKPLUS)で陰性。母親血清の18種のIP-MPHA法によるpopulation studyは、18種中16種が陽性でプロゾーン現象を観察し、これらの陽性反応はクロロキン処理により、減弱または消失した(Table 1)。また、患児familyのHLA, HPA型をFig. 2に示した。

【考察】HPA-15抗原のエピトープは、GPIアンカー型

糖タンパクであるCD109上に局在するが、CD109は活性化血小板膜上のみ存在し、その発現量は非常に少なく、また、個人差もみられる。それ故に、本症例は抗体価が高かったため、プロゾーン現象を示したと考える。また、EPパネルとの反応は陰性のため、EP中のCD109抗原は自己融解酵素のcalpainによって分解された可能性があり、EPパネルを用いた市販の抗HPA検出MPHAキット(Beckman Coulter社)では抗HPA-15は検出されにくいと考える。また、GTI社の抗HPA検出キット(MACE法, Luminex法)はCD109が含まれないため、検出不可となる。よって、抗体検出にはIP-MPHA法を用い、検体を希釈する必要がある。また、HPA-15抗原はHLA抗原同様にクロロキン処理によって陽性反応の減弱もしくは消失することが確認されたため、これまでの報告例の多くが抗HLAと抗HPA-15の複合例であるような症例では、クロロキン処理により抗HPA-15の存在が見逃されるため注意を要する。

我々は、クロロキン処理により、HLAクラスI抗原以外に顆粒球膜抗原のCD11bも不活化されることを既に報告したが、血小板膜上のCD109については、クロロキンは血小板膜からCD109を解離させる作用があるのではないかと考える。

また、Berryらは、患者がHLA-DRB1*13を有すると抗体価が高い傾向を示したと報告しているが、本症例は高力価を示したが、患児の母はHLA-DRB1*15:01, 14:01でHLA-DRB1*13は有していなかった。

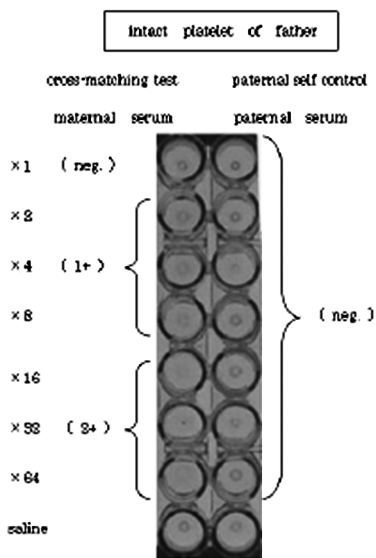


Fig.1 Result of cross-matching testing of the father and mother by the chloroquine untreated IP-MPHA method at birth ※

father
a. A*02:06 B*51:01 C*14:02 DRB*13:02
b. A*24:02 B*52:01 C*12:02 DRB*15:02
e. 1a 2a 3a 4a 5a 6a2 15b Nak*
f. 1a 2a 3a 4a 5a 6a2 15a Nak*

mother
c. A*02:06 B*13:01 C*03:04 DRB*15:01
d. A*28:05 B*51:01 C*15:02 DRB*14:01
g. 1a 2a 3b 4a 5a 6a2 15a Nak*
h. 1a 2a 3b 4a 5a 6a2 15a Nak*

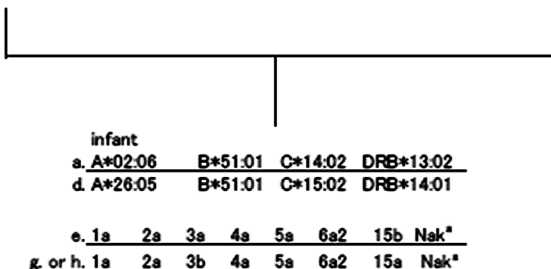


Fig.2 HLA and HPA type of the case family ※ ¶

※Data from Nishimura C, et al (2009) :Jap J Transfusion and Cell Therapy 55 : 386-391

¶ HPA-15 type data from Yagi H (2013) :Platelet Granulocyte Workshop of the Japanese Society of Blood Transfusion and Cell Therapy

| Panel | HPA | | | | | | | | | | Nak* | maternal serum | | | |
|-------|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|------|----------------|----|-----------------------|---------------------|
| | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | | | 6 | | chloroquine untreated | chloroquine treated |
| | a | b | a | b | a | b | a | b | a | b | | a | b | | |
| ① | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ② | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ③ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ④ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ⑤ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ⑥ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ⑦ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ⑧ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ⑨ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ⑩ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ⑪ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ⑫ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ⑬ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ⑭ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ⑮ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ⑯ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ⑰ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ⑱ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ⑲ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ⑳ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ㉑ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ㉒ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ㉓ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ㉔ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ㉕ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ㉖ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ㉗ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ㉘ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ㉙ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ㉚ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ㉛ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ㉜ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ㉝ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ㉞ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ㉟ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ㊱ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ㊲ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ㊳ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ㊴ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ㊵ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ㊶ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ㊷ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ㊸ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ㊹ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ㊺ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ㊻ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ㊼ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ㊽ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ㊾ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| ㊿ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |

Table1 Anti HPA antibody examination of the mother by the IP-MPHA method at birth (n=18) ※

2) ドナー特異的 HLA-DPB1 抗体陽性患者に対する臍帯血移植 (第二報)

○佐藤 壯¹⁾, 佐藤蘭子¹⁾, 小林直樹²⁾

社会医療法人北楡会 札幌北楡病院 臨床検査科¹⁾, 同 血液内科²⁾

【緒言】HLA ミスマッチ造血幹細胞移植において、患者が保有するドナー特異的 HLA-A, B, DR 抗体は移植源の生着に影響することがすでに多数報告されている。また、ドナー特異的 HLA-DP 抗体も生着に影響すると報告されているが、一方で生着例も報告されている。さらに、造血幹細胞や血液細胞における各 HLA 抗原の発現について、HLA-A, B, DR 抗原については明確であるが HLA-DP 抗原については少数例の報告しかない。今回我々はドナー特異的 HLA-DP 抗体陽性患者に対する臍帯血移植 2 例を経験した。その経過及び血液細胞、造血細胞における各 HLA 抗原の発現について検討したので報告する。

【症例】症例 1 は 41 歳女性。原疾患は MDS-u, 汎血球減少でアザシチジンに対して治療不応で造血細胞移植の適応と判断された。HLA は A*24:02, - B*27:05, 59:01 DRB1*12:01, 14:02。出産によると考えられる広範な HLA 抗体 (HLA-B, DRB1, DPB1) を保有しており有核細胞数 = $2.16 \times 10^7/\text{kg}$, CD34 陽性細胞数 = $0.58 \times 10^5/\text{kg}$ の臍帯血しか選択できなかった。症例 2 は 61 歳女性。原疾患は MDS/MPD。HLA は A*24:02, - B*15:01, 44:03 DRB1*13:02, 14:06。この症例も出産によると考えられる広範な HLA 抗体を保有していたため有核細胞数 = $2.10 \times 10^7/\text{kg}$, CD34 陽性細胞数 = $0.64 \times 10^5/\text{kg}$ の 8/8 一致の臍帯血しか選択できなかった。

【臨床経過】症例 1 は day29, 症例 2 は day21 で生着

した。症例 1 は移植後速やかに DSA が減少し生着時にはほぼ陰性化, それ以外の HLA 抗体も減少し移植 3 ヶ月後には random PC で輸血効果が得られるようになった。症例 2 も移植 1 ヶ月後に DSA はほぼ陰性化した。

【考察】造血細胞における DP 抗原の発現は中程度と報告されている。当院での検討では CD34 陽性末梢血幹細胞における DP 抗原の発現は個人差があるものの比較的微弱で、生着には影響しない可能性が示唆される。また、症例 1 や症例 2 においてはドナー細胞が患者の HLA 抗体産生細胞に対して何らかの免疫学的反応を起こしていることが示唆される。

HLA-DP 抗体陽性患者に対して DSA 陰性 CB ドナーを選択することは、日本さい帯血バンクネットワークが HLA-DP タイピングに対応していないことから現時点では不可能である。ただ、本症例のように広範な HLA 抗体陽性のためにドナー選択が限られる場合には、生着不全の可能性のあることを理解した上で抗体陽性移植も許容されうるものと考えられる。

もちろん、HLA 抗体が生着不全の大きなリスクファクターであることは事実であり、HLA-DP 抗体陽性患者で複数のドナー選択が可能な場合には、どちらのドナーを選ぶか考慮できる体制作りが望まれる。同時に、臍帯血幹細胞における DP 抗原の発現ははまだ明らかではなく、DP 抗体の DSA 陽性症例については今後更なる症例の蓄積と予後についての検討が必要である。

3) FlowPRA Screening による抗 HLA 抗体検査： プロゾーン様現象を呈した一例

○高山智美¹⁾, 久山芳文¹⁾, 扇谷恵里花¹⁾, 岡田倫之¹⁾, 矢澤浩治²⁾, 市丸直嗣³⁾, 高原史郎³⁾

大阪府立急性期・総合医療センター移植支援検査センター¹⁾, 大阪府立母子保健総合医療センター泌尿器科²⁾,
大阪大学大学院医学系研究科先端移植基盤医療学³⁾

【はじめに】抗 HLA 抗体検査のうち、LABScreen Single Antigen 検査においてはマイクロビーズ上の HLA 抗原の密度が高いことによるプロゾーン様現象が多数報告されている。今回、我々は LABScreen Single Antigen 検査と比べ、抗原の密度が低い FlowPRA Screening 検査でプロゾーン様現象と考えられる症例を経験したので報告する。

【症例】二次移植予定の女性。1984 年 10 月に生体腎移植を施行したが、2008 年血液透析再導入となった。2012 年 5 月に二次移植を目的として検査を実施し、FlowPRA Screening 検査は Class I (陽性：65.1%)、Class II (陽性：48.9%) であった。その後、2012 年 12 月に再度検査を実施し、未治療にも関わらず、FlowPRA Screening Class I・II 共に陰性となったため、プロゾーン様現象を疑い、非働化処理、DTT 処理を行った血清で FlowPRA Screening 検査を実施した。

【方法】血清は凍結保存後に解凍し、14000 rpm で 20 分遠心した。また、非働化処理、DTT 処理については以下のように行った。

- ・非働化処理：血清を 56°C で 30 分インキュベートした。
- ・DTT 処理：終濃度が 0.005M となるように DTT を加え、37°C で 30 分インキュベートした。

【結果と考察】非働化処理の血清では Class I (陽性：61.9%)、Class II (陽性：51.8%)、DTT 処理の血清では Class I (陽性：63.3%)、Class II (陽性：33.3%) となった。

未処理の血清では Class I・II 共に陰性であったが、非働化処理、DTT 処理では Class I・II 共に陽性となった。補体を不活化した血清で結果が陽性となったことから、未処理の血清は補体が関与したプロゾーン様現象による偽陰性と考えられた。

FlowPRA Screening 検査は LABScreen Single Antigen 検査と比べて安価であることから、移植前後の抗体スクリーニング検査として広く利用されている。今回、我々は二次移植目的の患者血清で FlowPRA Screening 検査でのプロゾーン様現象と考えられる症例を経験した。今後、プロゾーン様現象の報告が多数ある LABScreen Single Antigen 検査だけでなく、FlowPRA Screening 検査でも補体を不活化した血清の使用が必要と考える。

4) 抗体同定試薬 WAKFlowHLA 抗体クラス I (HR) の エピトープ既知検体における反応性

○黒田ゆかり, 中村仁美, 山口恵津子, 田原大志, 井上純子,
永吉裕二, 中村 功, 久田正直, 清川博之

日本赤十字社九州ブロック血液センター 品質部

【はじめに】当施設では, HLA 抗体同定試薬として通常 LABScreen Single Antigen (以下, LSSA) を使用している。2013 年 12 月, 湧永製薬株式会社から同目的の試薬 WAKFlowHLA クラス I 抗体 HR (以下, HR) が発売されたため, エピトープ既知の血清検体を用い HR の反応性について検討した。

【対象】検討には, 輸血歴がなく, 妊娠免疫により産生された HLA 抗体を保有する血清検体を用いた。また, IgM 抗体陰性, 抗体検出に補体の影響を受けないことを確認したものである。本人の HLA 型は A24/33 B44/52 Cw12/14, 夫は A24/26 B52/62 Cw9/12, 子供は A26/33 B44/62 Cw9/14 である。検体は, エピトープを解析するためにリンパ球による LSSA 吸収試験を実施し, A26 に対し 149T (+144Q) および 90D (+91-97GSHTIQR) の 2 種類, B62 に対して 46A および 76-80ESLRN (=Bw6) の 2 種類, 計 4 種類のエピトープそれぞれに反応を呈す

る 4 種類の抗体を保有していると推定されている。

【方法】エピトープ解析および LSSA の結果から, 陽性反応が予測される抗原に対し, HR における蛍光値を補正した Calmed 値および Score について確認した。

【結果】エピトープ解析および LSSA の結果から, 4 種類のエピトープのうち 76-80ESLRN (=Bw6) のみが該当する抗原の蛍光値が一番低くなると予測されたが, ほとんどの Bw6 抗原が Calmed 値 1,000 ~ 5,000 (Score6) を示したなかで, B*54:01 のみが Calmed 値 639.4 (Score4: 500 ~ 1,000) とやや低い数値を示した (表 1)。

【考察】今回用いた血清では, HR における Threshold は, メーカー設定の Score6 で妥当であると思われた。ただし, Score4 はグレーゾーンであると考えられ, 他の HLA 抗体検査と同様に注意が必要である。また, 今後とも検討検体数を増やし HR の反応性について確認していきたい。

5) 抗体検査における Single Antigen と PRA の相関解析

○池田奈未¹⁾, 小島裕人¹⁾, 二神貴臣¹⁾, 辻野貴史¹⁾, 林 晃司¹⁾, 楠木靖史¹⁾, 藤井直樹¹⁾,
末上伸二¹⁾, 宮崎有紀¹⁾, 西川美年子¹⁾, 小川公明²⁾, 赤座達也¹⁾, 佐治博夫¹⁾

公益財団法人 HLA 研究所¹⁾, NPO 法人 白血病研究基金を育てる会²⁾

【目的】 リコンビナントの HLA 抗原がコートされている LABScreen Single Antigen beads (以下, Single) と精製 HLA 抗原がコートされている LABScreen PRA beads (以下, PRA) を用いた HLA 抗体検査においては, その反応性が相関しない例が多く存在する。この原因のひとつとされる自然抗体は, Single において偽陽性の結果を引き起こすが, PRA での挙動は不明である。自然抗体を含めた反応性の違いを検証することで臨床的意義のある HLA 抗体を推測する参考としたい。

実際の解析においては, Single 陽性で PRA 陰性の不一致に焦点をあてた。PRA beads は複数抗原がコートされているので, PRA 陽性で Single 陰性の不一致は解析が困難なためである。

【材料】 当研究所に検査依頼があり Luminex 法を用いて PRA と Single の両検査を実施した Class I : 217 検体, Class II : 150 検体を対象とした。検体は, 血漿または血清を用い, 血清の場合は EDTA を加えた(終濃度 0.05M)。

【方法】 両製品に存在する allele 対象とし, Single Class I : 86 種類, Single Class II : 80 種類の beads に対して解析を行った。Single で陽性 (MFI \geq 1,000) であった beads の allele が PRA でひとつでも陰性 (MFI < 500) の場合を不一致とし, その割合を算出した。

【結果】 不一致率上位 5 位の allele は, Class I において C*17:01 (12.4%), B*45:01 (11.5%), A*68:02 (9.7%), B*15:16 (8.8%), B*44:02 (8.8%), Class II において DQB1*03:01 (22.7%), DQB1*03:02 (14.7%), DQB1*03:03 (14.0%), DRB3*03:01 (12.7%),

DRB1*09:01 (11.3%) であった。Class I, Class II における不一致率上位 10 位をそれぞれ表 1, 2 に示す。

【考察】 PRA が陰性だが Single が陽性で検出された抗体は, 精製 HLA 抗原と反応していないことから生体 HLA とエピトープを共有しない non HLA 抗体 (=自然抗体) と考えられる。今回検出された抗体の検出頻度は, allo 免疫機会のない健常人男性から検出された自然抗体頻度の報告と相関しない部分があった。具体例を挙げると, 過去の自然抗体の報告では 18.9% の高頻度で検出された HLA-A*30:02 抗体が, 今回の結果では 1.4% と低頻度で相関しない場合である。この場合, HLA-A*30:02 抗体は PRA と Single の両方の beads に反応するので精製 HLA 抗原にも結合していると考えられることから, 生体 HLA と交差反応をする自然抗体と考えることができる。逆に, HLA-C*17:01 抗体のように過去の自然抗体の報告と相関して高頻度検出された抗体は, 生体 HLA と交差反応しない検査法特異的に検出される自然抗体と考えることができる。

自然抗体は, 生体 HLA と交差反応するものと, 生体 HLA には結合せず検査法特異的に検出されるものがあると示唆され, PRA を併用することは, 後者のような non-allo HLA 自然抗体を見極める重要な手段の一つと考えられる。また, PRA と Single の一致率は少なくとも Class I : 87%, Class II : 79% であるため, 相関の観点からは Single と PRA の cut off 値の設定は妥当と考えられる。

表1: Class I における不一致率の順位

N=217

| 順位 | allele | MFI別不一致数* | | | 不一致率 | 自然抗体検出頻度** |
|----|---------|-----------|--------|--------|-------|------------|
| | | >1,000 | >2,000 | >5,000 | | |
| 1 | C*17:01 | 27 | 17 | 9 | 12.4% | 11.3 |
| 2 | B*45:01 | 25 | 10 | 0 | 11.5% | 5.9 |
| 3 | A*68:02 | 21 | 5 | 0 | 9.7% | - |
| 4 | B*15:16 | 19 | 5 | 0 | 8.8% | 9.9 |
| | B*44:02 | 19 | 9 | 1 | 8.8% | 6.1 |
| 6 | B*82:01 | 17 | 9 | 1 | 7.8% | 10.4 |
| 7 | A*23:01 | 16 | 5 | 1 | 7.4% | - |
| | A*24:02 | 16 | 9 | 2 | 7.4% | 4 |
| | B*08:01 | 16 | 6 | 2 | 7.4% | 4.5 |
| | B*51:01 | 16 | 5 | 0 | 7.4% | - |

表2: Class II における不一致率の順位

N=150

| 順位 | allele | MFI別不一致数* | | | 不一致率 | 自然抗体検出頻度** | |
|----|------------|------------|--------|--------|-------|------------|------|
| | | >1,000 | >2,000 | >5,000 | | | |
| 1 | DQB1*03:01 | DQA1*05:03 | 34 | 18 | 10 | 22.7% | 10.6 |
| | | DQA1*05:05 | | | | | - |
| | | DQA1*02:01 | | | | | 10.8 |
| | | DQA1*06:01 | | | | | 6.1 |
| | | DQA1*03:01 | | | | | 8.3 |
| 2 | DQB1*03:02 | DQA1*03:02 | 22 | 11 | 5 | 14.7% | - |
| | | DQA1*02:01 | | | | | - |
| | | DQA1*03:01 | | | | | - |
| | | DQA1*01:01 | | | | | - |
| 3 | DQB1*03:03 | DQA1*02:01 | 21 | 13 | 7 | 14.0% | - |
| | | DQA1*03:01 | | | | | - |
| | | DQA1*03:02 | | | | | - |
| 4 | DRB3*03:01 | 19 | 6 | 1 | 12.7% | - | |
| 5 | DRB1*09:01 | 17 | 1 | 0 | 11.3% | - | |
| 6 | DRB4*01:01 | 16 | 7 | 2 | 10.7% | - | |
| 7 | DRB4*01:03 | 14 | 10 | 3 | 9.3% | - | |
| 8 | DQB1*02:01 | DQA1*05:01 | 13 | 10 | 3 | 8.7% | - |
| | | DQA1*03:01 | | | | | - |
| | | DQA1*04:01 | | | | | - |
| | | DQA1*02:01 | | | | | 3.5 |
| 9 | DRB1*04:04 | 11 | 3 | 0 | 7.3% | 5.4 | |
| 10 | DQB1*04:01 | DQA1*02:01 | 10 | 6 | 1 | 6.7% | - |
| | | DQA1*03:03 | | | | | - |
| | DQB1*04:02 | DQA1*02:01 | 10 | 6 | 2 | 6.7% | - |
| | | DQA1*04:01 | | | | | - |
| | DRB1*03:02 | 10 | 2 | 0 | 6.7% | - | |

*Singleが陽性でPRAが陰性であった不一致の件数を、SingleのMFI別に示した。
DQB1*03:01のような複数beadsに存在するalleleは、MFIの平均値で分類した。
尚、>2000には>5000の数を含み、>1000には>2000の数を含む。

**Luis E. Morales-Buenrostro, Paul I. Terasaki, et al. "Natural" Human Leukocyte Antigen Antibodies Found in Non alloimmunized Healthy Males. Transplantation 2008; 86: 1111-1115

(11:50 ~ 12:30)

一般演題 (2)

座長：二神貴臣 (公益財団法人 HLA 研究所)

演題番号 6) ~ 9)

6) iPS 細胞樹立前後の同一性確認のための NGS を用いた 第 4 区域までの HLA アリルタイピング

○末上伸二¹⁾, 小島裕人¹⁾, 鈴木進悟²⁾, 尾崎有紀²⁾, 椎名 隆²⁾,
光永滋樹²⁾, 猪子英俊²⁾, 佐治博夫¹⁾, 木村貴文³⁾

公益財団法人 HLA 研究所¹⁾, 東海大医学部基礎医学系分子生命科学²⁾,
京都大学 iPS 細胞研究所基盤技術研究部門³⁾

【目的】iPS 細胞のドナーバンクにおいては 1 塩基の *de novo* 変異や挿入・欠失を見逃さない細胞樹立前後の同一性確認も必要となる。このためには、解像度が極めて高い NGS (Next Generation Sequencing) による HLA タイピング技術が有用と考えられる。今回は Ion PGM (Life Technologies) を用いて検査を施行したので報告する。

【材料・方法】Luminex 法 (A, B, C, DRB1 : WAKFlow, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1 : LABType) にて検査した患者とその両親を 3 家族。1 家族 3 名 (No. 1-3) は Buccal, 2 家族 6 名 (No. 4-9) は血液由来を用い、東海大学で施行されている方法を基に実施した。得られた塩基配列の解析については、各 locus の全 exon 領域における BLAT 解析から類似性の高いアリル候補を IMGT-HLA から選抜し、それをコンピューター上で検証することによりアリル判定を行うスズキ法にてデータ解析を行った。

【結果・考察】NGS によるタイピング結果は検体種類に依存することなく、一部を除いて Luminex 法との整合性が得られた。結果を表 1 に示す。

C 座のタイピング結果が Luminex 法と異なった直接的な原因は、Long PCR 産物の存在を確認したもののアリル判定に用いた有効リード数がほぼ 0 であったことから、Long PCR 後の濃度調製に問題があったと考えられる。また、No.7 の DRB1, DRB3/4/5, DQB1 および DPA1 にて出現が期待されるアリルについても他検体にて問題なく判定されていることから、これも前述と同様の理由と考えられる。特に C 座は有効リード数がほぼ 0

にもかかわらず、片方のアリルのみ homozygote として判定されたことから、今後、NGS がルーチン化されるにあたっては locus ごとに depth, coverage のような NGS 情報に、多施設とのコンセンサスが得られた、もしくは自施設で妥当性のとれた基準を設ける必要がある。そのために現状では自動判定ソフトウェアよりも、それぞれの NGS 情報が確認できるスズキ法が有用である。また、日本列島人に珍しいアリルに関しては NGS の方が効率よく判定できると考えるが、複数回行う PCR の過程がミス判定を引き起こす可能性がある。これを解消する方法として、Luminex 法などの従来法との併用が良策であるが、今回のように家族検体を用いることも有効な手段であると考えられる。

最後に、NGS による HLA タイピングは他にも Ambiguity を解消できるという利点がある。さらには、コストパフォーマンス、スループット性ともに Luminex 法と大差ないことから、第 2 区域までの HLA タイピングが Luminex 法に代わる、もしくは第 2 の方法として確立されつつある。一方、第 4 区域までのタイピングは、決定されている第 4 区域までのアリル配列が乏しいことから、現時点では未だ難しい技術である。東海大学らはこの問題を解決するために、日本列島人の 99.5% 以上を網羅する第 4 区域までのアリル配列の収集を進めており、近い将来にプロモーター領域から 3' 側非翻訳領域までを網羅する HLA 遺伝子全領域における HLA タイピングの実用化が期待される。

<表1>Luminex法とNGSによるHLAタイピング結果

| Sample ID | 検体種類 | HLA-A | | HLA-B | | HLA-C | | |
|-----------|--------|----------|-----------|---------------|-----------|---------------|-----------|----------------|
| | | Luminex法 | NGS(スズキ法) | Luminex法 | NGS(スズキ法) | Luminex法 | NGS(スズキ法) | |
| 家族①-子 | Buccal | Allele 1 | A*31:01 | A*31:01:02 | B*51:01 | B*51:01:01 | C*14:02 | C*14:02:01 |
| | | Allele 2 | A*31:11 | A*31:11 | - | - | - | - |
| 家族①-父 | Buccal | Allele 1 | A*26:03 | A*26:03:01 | B*40:01 | B*40:01:02 | C*03:04 | (not assigned) |
| | | Allele 2 | A*31:11 | A*31:11 | B*51:01 | B*51:01:01 | C*14:02 | C*14:02:01 |
| 家族①-母 | Buccal | Allele 1 | A*02:06 | A*02:06:01 | B*40:02 | B*40:02:01 | C*03:04 | (not assigned) |
| | | Allele 2 | A*31:01 | A*31:01:02 | B*51:01 | B*51:01:01 | C*14:02 | C*14:02:01 |
| 家族②-子 | PB | Allele 1 | A*24:02 | A*24:02:01:01 | B*40:50 | B*40:50 | C*01:02 | C*01:02:01 |
| | | Allele 2 | - | - | B*54:01 | B*54:01:01 | C*03:04 | (not assigned) |
| 家族②-父 | PB | Allele 1 | A*24:02 | A*24:02:01:01 | B*40:01 | B*40:01:02 | C*01:02 | C*01:02:01 |
| | | Allele 2 | - | - | B*54:01 | B*54:01:01 | C*03:04 | (not assigned) |
| 家族②-母 | PB | Allele 1 | A*24:02 | A*24:02:01:01 | B*40:50 | B*40:50 | C*03:04 | (not assigned) |
| | | Allele 2 | A*33:03 | A*33:03:01 | B*44:03 | B*44:03:01 | C*14:03 | C*14:03 |
| 家族③-母 | PB | Allele 1 | A*02:15N | A*02:15N | B*15:18 | B*15:18:01 | C*01:02 | C*01:02:01 |
| | | Allele 2 | A*24:02 | A*24:02:01:01 | B*46:01 | B*46:01:01 | C*07:04 | (not assigned) |
| 家族③-子 | PB | Allele 1 | A*02:01 | A*02:01:01:01 | B*40:02 | B*40:02:01 | C*01:02 | C*01:02:01 |
| | | Allele 2 | A*24:02 | A*24:02:01:01 | B*46:01 | B*46:01:01 | C*03:04 | C*03:04:01:02 |
| 家族③-子 | PB | Allele 1 | A*02:06 | A*02:06:01 | B*15:18 | B*15:18:01 | C*03:03 | C*03:03:01 |
| | | Allele 2 | A*24:02 | A*24:02:01:01 | B*35:01 | B*35:01:01:02 | C*07:04 | (not assigned) |

| Sample ID | 検体種類 | HLA-DRB1 | | HLA-DRB3,4,5 | | HLA-DQA1 | | |
|-----------|--------|----------|------------|---------------------|-----------|---------------------|------------------|---------------------|
| | | Luminex法 | NGS(スズキ法) | Luminex法 | NGS(スズキ法) | Luminex法 | NGS(スズキ法) | |
| 家族①-子 | Buccal | Allele 1 | DRB1*04:05 | DRB1*04:05:01:01 | n.t | DRB4*01:01:01:01 | DQA1*03:01:01 | DQA1*03:01/02/03 |
| | | Allele 2 | DRB1*04:07 | DRB1*04:07:01 | n.t | DRB4*01:03:01/ | - | - |
| 家族①-父 | Buccal | Allele 1 | DRB1*04:05 | DRB1*04:05:01:01 | n.t | DRB4*01:01:01:01 | DQA1*03:01:01 | DQA1*03:01/02/03 |
| | | Allele 2 | DRB1*04:07 | DRB1*04:07:01 | n.t | DRB4*01:03:01/ | - | - |
| 家族①-母 | Buccal | Allele 1 | DRB1*04:05 | DRB1*04:05:01:01 | n.t | DRB4*01:03:01:01/ | DQA1*03:01:01 | DQA1*03:01/02/03 |
| | | Allele 2 | DRB1*08:02 | DRB1*08:02:01 | n.t | DRB4*01:03:01:01/ | DQA1*04:01:01 | DQA1*04:01:01 |
| 家族②-子 | PB | Allele 1 | DRB1*08:02 | DRB1*08:02:01 | n.t | DRB5*01:02 | DQA1*01:03:01:01 | DQA1*01:03:01:01/02 |
| | | Allele 2 | DRB1*15:02 | DRB1*15:02:01 | n.t | - | DQA1*03:01:01 | DQA1*03:01/02/03 |
| 家族②-父 | PB | Allele 1 | DRB1*14:54 | DRB1*14:54:01:02 | n.t | DRB3*02:02:01:01/02 | DQA1*01:01(/04) | DQA1*01:03:01:01/02 |
| | | Allele 2 | DRB1*15:02 | DRB1*15:02:01 | n.t | DRB5*01:02 | DQA1*01:03:01:01 | DQA1*01:04:01:01/02 |
| 家族②-母 | PB | Allele 1 | DRB1*08:02 | DRB1*08:02:01 | n.t | DRB3*03:01:01/03 | DQA1*01:02:01:01 | DQA1*01:02:01/02 |
| | | Allele 2 | DRB1*13:02 | DRB1*13:02:01:02 | n.t | - | DQA1*03:01:01 | DQA1*03:01/02/03 |
| 家族③-母 | PB | Allele 1 | DRB1*04:01 | - | n.t | - | DQA1*01:03:01:01 | DQA1*01:03:01:01/02 |
| | | Allele 2 | DRB1*08:03 | - | n.t | - | DQA1*03:01:01 | DQA1*03:01/02/03 |
| 家族③-子 | PB | Allele 1 | DRB1*08:03 | DRB1*08:03:02:02 | n.t | DRB4*01:03:01/ | DQA1*01:03:01:01 | DQA1*01:03:01:01/02 |
| | | Allele 2 | DRB1*09:01 | DRB1*09:01:02:01:02 | n.t | DRB4*01:02 | DQA1*03:01:01 | DQA1*03:01/02/03 |
| 家族③-子 | PB | Allele 1 | DRB1*04:01 | DRB1*04:01:01 | n.t | DRB5*01:01:01 | DQA1*01:02:01:01 | DQA1*01:02:01:01/ |
| | | Allele 2 | DRB1*15:01 | DRB1*15:01:01:01/ | n.t | - | DQA1*03:01:01 | DQA1*03:01/02/03 |

| Sample ID | 検体種類 | HLA-DQB1 | | HLA-DPA1 | | HLA-DPB1 | | |
|-----------|--------|----------|------------------|---------------------|------------------|-------------------|------------------|---------------------|
| | | Luminex法 | NGS(スズキ法) | Luminex法 | NGS(スズキ法) | Luminex法 | NGS(スズキ法) | |
| 家族①-子 | Buccal | Allele 1 | DQB1*03:02:01 | DQB1*03:02:01 | DPA1*01:03:01:01 | DPA1*01:03:01:01/ | DPB1*03:01:01 | DPB1*03:01:01 |
| | | Allele 2 | DQB1*04:01:01 | DQB1*04:01:01:01 | DPA1*02:02:01 | DPA1*02:02:02 | - | - |
| 家族①-父 | Buccal | Allele 1 | DQB1*03:02:01 | DQB1*03:02:01 | DPA1*02:02:01 | DPA1*02:02:02 | DPB1*03:01:01 | DPB1*03:01:01 |
| | | Allele 2 | DQB1*04:01:01 | DQB1*04:01:01:01 | - | - | DPB1*05:01:01 | DPB1*05:01:01 |
| 家族①-母 | Buccal | Allele 1 | DQB1*03:02:01 | DQB1*03:02:01 | DPA1*01:03:01:01 | DPA1*01:03:01:01/ | DPB1*02:01:02 | DPB1*02:01:02 |
| | | Allele 2 | DQB1*04:01:01 | DQB1*04:01:01:01 | - | - | DPB1*03:01:01 | DPB1*03:01:01 |
| 家族②-子 | PB | Allele 1 | DQB1*03:02:01 | DQB1*03:02:01 | DPA1*01:03:01:01 | DPA1*01:03:01:01/ | DPB1*02:01:02 | DPB1*02:01:02 |
| | | Allele 2 | DQB1*06:01:01 | DQB1*06:01:01 | DPA1*02:02:01 | DPA1*02:02:02 | DPB1*05:01:01 | DPB1*05:01:01 |
| 家族②-父 | PB | Allele 1 | DQB1*05:03:01:01 | DQB1*05:03:01:01/02 | DPA1*01:03:01:01 | DPA1*01:03:01:01/ | DPB1*02:01:02 | DPB1*02:01:02 |
| | | Allele 2 | DQB1*06:01:01 | DQB1*06:01:01 | DPA1*02:02:01 | DPA1*02:02:02 | DPB1*03:01:01 | DPB1*03:01:01 |
| 家族②-母 | PB | Allele 1 | DQB1*03:02:01 | DQB1*03:02:01 | DPA1*01:03:01:01 | DPA1*01:03:01:01/ | DPB1*04:01:01:01 | DPB1*04:01:01:01/02 |
| | | Allele 2 | DQB1*06:04:01 | DQB1*06:04:01:01 | DPA1*02:02:01 | DPA1*02:02:02 | DPB1*05:01:01 | DPB1*05:01:01 |
| 家族③-母 | PB | Allele 1 | DQB1*03:01:01:01 | - | DPA1*02:02:01 | - | DPB1*05:01:01 | DPB1*05:01:01 |
| | | Allele 2 | DQB1*06:01:01 | - | DPA1*02:02:01 | - | - | - |
| 家族③-子 | PB | Allele 1 | DQB1*03:03:02:01 | DQB1*03:03:02:01/ | DPA1*02:02:01 | DPA1*02:02:02 | DPB1*05:01:01 | DPB1*05:01:01 |
| | | Allele 2 | DQB1*06:01:01 | DQB1*06:01:01/03 | - | - | - | - |
| 家族③-子 | PB | Allele 1 | DQB1*03:01:01:01 | DQB1*03:01:01:01/ | DPA1*02:02:01 | DPA1*02:02:02 | DPB1*05:01:01 | DPB1*05:01:01 |
| | | Allele 2 | DQB1*06:02:01 | DQB1*06:02:01 | - | - | - | - |

◎グレーの塗りつぶしは判定不能を示す。

◎Luminex法の結果はみなし判定であるために多くのAmbiguity、つまり多くの他の候補がある。

◎黒枠は、日本列島人に稀なアリル。

7) MiSeq を用いた HLA タイピング

○小島裕人¹⁾, 末上伸二¹⁾, Wyatt Nelson²⁾³⁾, 石谷昭子³⁾⁴⁾, 二神貴臣¹⁾, 辻野貴史¹⁾, 林 晃司¹⁾, 楠木靖史¹⁾, 藤井直樹¹⁾, 池田奈未¹⁾, 宮崎有紀¹⁾, Daniel E. Geraghty²⁾³⁾, 佐治博夫¹⁾

公益財団法人 HLA 研究所¹⁾, Fred Hutchinson Cancer Research Center²⁾,
 Scisco Genetics, Inc.³⁾, 奈良県立医科大学 法医学教室⁴⁾

【目的】 現在, HLA 遺伝子型検査の主流は Luminex 法, Sanger 法であるが, 新技術として NGS (Next generation Sequencing) が登場し, これは Ambiguity の問題を解消できる。今回, プラットフォームのひとつである MiSeq (Illumina 社) を用いた HLA タイピングを試み, Luminex 法との整合性も含めて報告する。

【材料・方法】 合計 32 検体 (1 検体は negative control), 検体種類は Buccal と末梢血で, 当研究所に依頼のあった検体が 13 検体, 当研究所職員検体が 9 検体, UCLA (University of California, Los Angeles) Immunogenetics Center のコントロール検体 (<http://www.hla.ucla.edu/cellDNA/DNA/summaryDNA.htm> 参照) が 8 検体である。なお, 1 検体は Buccal と末梢血の 2 種類を用いた。

Luminex 法においては, HLA-A, B, C, DRB1 遺伝子型 (WAKFlow, 湧永製薬), HLA-DQA1, DQB1, DPA1, DPB1 遺伝子型 (LABtype, Onelambda) を実施した。

MiSeq では HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, 4, 5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1 遺伝子型のタイピングを Scisco Genetics 社の方法に基づいて行った。つまり, exon 領域をカバーする PCR を実施後, 検体識別と読み始め位置識別のための特異的配列 (Barcode, Adaptor) を結合させた産物を MiSeq に供試した。MiSeq は Bridge PCR によって単一断片のクラスターを形成し, そこへ蛍光ラベルした塩基 (A, T, C, G) を反応させてその蛍光を CCD カメラで撮影することを原理とする。解析については IMGT データを参照とし, 完全マッチの断片数, 断片同士の連続性, Q 値などを考慮に入れた。

【結果】 Luminex 法と MiSeq による HLA タイピングの結果を別表に示す。

【考察】 MiSeq による HLA タイピングは検体種類 (PB, Buccal) に依存せず, 一部を除いて Luminex 法との整合性が得られた。判定不能検体は, 最初の PCR の増幅不良が原因と考えられる。該当検体は PCR トレイの外側の列に集中し, PCR 機器の温度校正やトレイの相性などをケアする必要がある。ASHI ではこの点に加えて, 校正されたピペットを使用するよう注意を促している。

family4- 子の C 座は Luminex 法では C*08:03/ と判定したが, MiSeq では C*08:06 と判定された。これは Luminex 法がみなし 4 桁であるのに対し MiSeq は確定 4 桁であり, このようにより正確な判定を行えることが大きな特徴である。

スループットについては, 現実的な数字を考えて 48 検体くらいの検査を一度に行った場合, 所要時間, 人員は今回実施した 32 検体の検査実績から, サンプル調製 2 名で 2.5 日, その後の MiSeq 読み込みに 1.5 日程度, 解析に 1 日かかっても合計 1 週間で検査結果を得ることができる。

より正確な判定, 高いスループットの特徴から, 諸外国ではすでにルーチン化が始動しており, 昨年 11 月の ASHI では Luminex 法に変わる検査法の位置づけとして多くの報告がなされている。今後は, MiSeq による HLA タイピング結果を臨床現場に提供することを目標として, 検査母数を増やして検査費用, 時間, 検体種類などの検討を重ねていくつもりである。

8) 日本列島人における A, B, DR, DQ, DP のハプロタイプ頻度解析 ～ファミリーデータからの直接カウント法による～

○宮崎有紀¹⁾, 小島裕人¹⁾, 二神貴臣¹⁾, 辻野貴史¹⁾, 林 晃司¹⁾, 楠木靖史¹⁾, 藤井直樹¹⁾,
末上伸二¹⁾, 池田奈未¹⁾, 西川美年子¹⁾, 小川公明²⁾, 赤座達也¹⁾, 佐治博夫¹⁾

公益財団法人 HLA 研究所¹⁾, NPO 法人白血病研究基金を育てる会²⁾

【目的】造血幹細胞移植において、ドナーの HLA-A, B, DR 遺伝子型を一致させても、GVH/HVG 反応が起こっている症例が多い。マイナー抗原の違いの影響も考えられるが、C 座や DQ 座, DP 座のミスマッチの影響も否定できない。そこで今回は、DQA1, DPA1 を含めた日本列島人における HLA-A, B, DR, DQ, DP のハプロタイプ頻度解析を行い、DQ 座, DP 座の隠れミスマッチについても検討した。

これらのデータが人類遺伝学的な観点からも利用できることを望む。

【材料・方法】当研究所に依頼のあった、394 家族 1,904 検体を Luminex 法 (WAKFlow, LABType) を用いて HLA 遺伝子型検査を行い、直接カウント法により解析を行った。

【結果】DQA1-DQB1, DPA1-DPB1 のハプロタイプ頻度 (HF) と DQA1, DPA1 を含めた HLA-A, B, DR, DQ, DP の HF を連鎖不平衡値 (LD 値), 相対連鎖不平衡値 (RD 値) と共にそれぞれ表 1, 表 2 に示す。また、その中から HLA-A, B, DR ハプロタイプ上位 5 位について DQ 座, DP 座の相違を表 3 に示す。なお、Luminex 法で Ambiguity が決められなかったものは表 4 の通り上 2 ケタでの表記とした。

【考察】DQA1-DQB1, DPA1-DPB1 の HF, LD 値, RD 値が明らかとなった (表 1) が、DQA1, DPA1 について

は Ambiguity の問題から一部のタイプについては第 2 区域のみなし判定が困難であったため、今後 NGS (Next Generation Sequencing) によるデータ蓄積が必要と考える。

HLA-A, B, DR, DQ, DP の HF に着目すると、HLA-A, B, DR 同様に上位 3 位において強い連鎖不平衡が見られたが、4 位以下ではあまり連鎖不平衡は見られなかった (表 2)。このことから、上位ハプロタイプは進化的に強く保存されており、移植医療におけるドナー探索ではこれらのハプロタイプを合わせる事が推奨される。隠れミスマッチの解析はこのことを裏付ける結果となり (表 3), HLA-A, B, DR 座一致ドナーからの移植でも、そのハプロタイプ頻度が上位であるほど HLA-DQ, DP 座がミスマッチになる可能性が低くなる事が示唆された。ただし、この場合でも DQ, DP 座が完全にマッチするわけではないので、細胞性免疫の観点のみならず液性免疫による拒絶の危険性は意外に高いといえる。HLA-A, B, C, DR マッチの非血縁間移植においても抗体検査が必要といえる。移植前検査で特に DP 座 (DQ 座は造血幹細胞に低表現) の抗体が陽性でかつ遺伝子型検査をする余裕がない場合は、今回のデータがミスマッチを予測するひとつの手段となることを望む。なお、今後は母数を増やし、さらには C 座も含めた解析も行っていく予定である。

表1 DQA1-DQB1, DPA1-DPB1ハプロタイプ頻度(HF)上位15位の連鎖不平衡値(LD値)、相対連鎖不平衡値(RD値)

| DQA1-DQB1 (n=1540) | ハプロタイプ数 | HF (%) | LD値 | RD値 | DPA1-DPB1 (n=1500) | ハプロタイプ数 | HF (%) | LD値 | RD値 |
|-----------------------|---------|--------|--------|--------|-----------------------|---------|--------|--------|--------|
| *01:03-*06:01 | 287 | 18.64 | 0.150 | 0.983 | *02:02-*05:01 | 499 | 33.27 | 0.174 | 0.832 |
| *03-*03:03 | 230 | 14.94 | 0.086 | 0.984 | *01:03-*02:01 | 311 | 20.73 | 0.112 | 0.798 |
| *03-*04:01 | 199 | 12.92 | 0.074 | 0.976 | *01:03-*04:02 | 154 | 10.27 | 0.060 | 0.957 |
| *03-*03:02 | 170 | 11.04 | 0.060 | 0.858 | *02:01-*09:01 | 150 | 10 | 0.084 | 1.022 |
| *01-*05:01 | 105 | 6.82 | 0.060 | 1.013 | *01:03-*04:01 | 76 | 5.07 | 0.030 | 0.966 |
| *01:02-*06:02 | 102 | 6.62 | 0.057 | 1.013 | *02:02-*03:01 | 52 | 3.47 | 0.012 | 0.391 |
| *05-*03:01 | 97 | 6.3 | 0.056 | 0.945 | *02:01-*05:01 | 42 | 2.8 | -0.032 | -0.530 |
| *01:02-*06:04 | 86 | 5.58 | 0.048 | 1.010 | *02:02-*02:01 | 41 | 2.73 | -0.075 | -0.732 |
| *01-*05:03 | 50 | 3.25 | 0.029 | 0.979 | *02:02-*02:02 | 36 | 2.4 | 0.008 | 0.352 |
| *06:01-*03:01 | 40 | 2.6 | 0.023 | 1.000 | *01:03-*03:01 | 27 | 1.8 | -0.003 | -0.161 |
| *03-*04:02 | 38 | 2.47 | 0.006 | 0.215 | *02:01-*13:01 | 25 | 1.67 | 0.014 | 0.932 |
| *04:01-*04:02 | 33 | 2.14 | 0.020 | 0.776 | *02:01-*14:01 | 24 | 1.6 | 0.013 | 0.929 |
| *01-*05:02 | 22 | 1.43 | 0.012 | 0.639 | *01:03-*02:02 | 22 | 1.47 | -0.001 | -0.045 |
| *03-*03:01 | 12 | 0.78 | -0.036 | -0.823 | *01:03-*06:01 | 9 | 0.6 | 0.004 | 1.031 |
| *01:03-*06:03 | 11 | 0.71 | 0.006 | 0.920 | *01:03-*05:01 | 9 | 0.6 | -0.143 | -0.960 |

表2 HLA-A,B,DR,DQ,DPハプロタイプ頻度(HF)、連鎖不平衡値(LD値)、相対連鎖不平衡値(RD値) (n=1464)

| A-B-DRB1-DQA1-DQB1-DPA1-DPB1 | ハプロタイプ数 | HF (%) | LD値 | RD値 | 順位 |
|--|---------|--------|-------|-------|----|
| *24:02-*52:01-*15:02-*01:03-*06:01-*02:01-*09:01 | 101 | 6.9 | 0.069 | 0.703 | 1 |
| *33:03-*44:03-*13:02-*01:02-*06:04-*01:03-*04:01 | 47 | 3.2 | 0.032 | 0.621 | 2 |
| *24:02-*07:02-*01:01-*01-*05:01-*01:03-*04:02 | 45 | 3.1 | 0.031 | 0.521 | 3 |
| *24:02-*54:01-*04:05-*03-*04:01-*02:02-*05:01 | 29 | 2 | 0.020 | 0.284 | 4 |
| *11:01-*15:01-*04:06-*03-*03:02-*01:03-*02:01 | 17 | 1.2 | 0.012 | 0.265 | 5 |

表3 HLA-A,B,DRハプロタイプ頻度(HF)上位5位における隠れミスマッチ存在率(%)

| A-B-DR | DQA1-DQB1-DPA1-DPB1 | ハプロタイプ数 | 存在率 (%) |
|-----------------------------|-------------------------------|---------|---------|
| *24:02-*52:01-*15:02(n=122) | *02:01-*09:01 | 101 | 82.79 |
| | *01:03-*02:01 | 7 | 5.74 |
| | *02:02-*05:01 | 6 | 4.92 |
| | *01:03-*04:02 | 2 | 1.64 |
| | *02:01-*13:01 | 2 | 1.64 |
| | *02:01-*14:01 | 2 | 1.64 |
| | *01:03-*02:02 | 1 | 0.82 |
| | *01:02-*06:01 - *02:02-*05:01 | 1 | 0.82 |
| *33:03-*44:03-*13:02(n=66) | *01:03-*04:01 | 47 | 71.21 |
| | *02:02-*02:01 | 7 | 10.61 |
| | *01:03-*02:01 | 3 | 4.55 |
| | *02:01-*13:01 | 2 | 3.03 |
| | *02:02-*05:01 | 2 | 3.03 |
| | *01:03-*03:01 | 1 | 1.52 |
| | *01:03-*04:02 | 1 | 1.52 |
| | *01:03-*05:01 | 1 | 1.52 |
| | *01:03-*06:01 | 1 | 1.52 |
| | *02:02-*03:01 | 1 | 1.52 |
| *24:02-*07:02-*01:01(n=54) | *01:03-*04:02 | 45 | 83.33 |
| | *01:03-*02:01 | 5 | 9.26 |
| | *02:01-*09:01 | 2 | 3.7 |
| | *02:01-*14:01 | 1 | 1.85 |
| | *01-*05:07 - *02:01-*14:01 | 1 | 1.85 |
| *24:02-*54:01-*04:05(n=38) | *02:02-*05:01 | 29 | 76.32 |
| | *01:03-*02:01 | 3 | 7.89 |
| | *01:03-*04:02 | 3 | 7.89 |
| | *02:02-*19:01 | 2 | 5.26 |
| | *02:01-*09:01 | 1 | 2.63 |
| *11:01-*15:01-*04:06(n=29) | *01:03-*02:01 | 17 | 58.62 |
| | *02:02-*05:01 | 8 | 27.59 |
| | *01:03-*04:02 | 2 | 6.9 |
| | *01:03-*04:01 | 1 | 3.45 |
| | *02:02-*02:01 | 1 | 3.45 |

表4 Ambiguityが決められなかったタイプの表記方法

DQA1*01:01/04/05→DQA1*01
 DQA1*03:01,*03:02/03,*03:01/02/03→DQA1*03
 DQA1*05:03/07,*05:05/09,*05:05/09/11→DQA1*05
 DPA1*02:02/05→DPA1*02:02

9) HLA-8/8 アリル適合非血縁者間造血細胞移植における HLA-DPB1 disparity の検討

○佐藤 壯¹⁾, 佐藤蘭子¹⁾, 小林直樹²⁾, 小林良二³⁾

社会医療法人北楡会 札幌北楡病院 臨床検査科¹⁾, 同 血液内科²⁾, 同 小児思春期科³⁾

【背景】一昨年の16thIHIWでも報告されたが, HLA-A, B, C, DRB1 抗原一致 8/8 matched HSCT における日本の成績と比較して海外の成績が悪いため, DQB1 も一致させた 10/10 matched HSCT や DPB1 も合わせた 12/12 matched HSCT を指向する動きがある。実際, Fleishhauer や Zino らによれば, permissive 群 (P 群) に対して non-permissive 群 (NP 群) では有意に GvHD 及び nonrelapse mortality の頻度が高いと報告されている。これは HLA-DPB1 の特定のアリルの抗原構造が T cell epitope (TCE) として T 細胞のアロ反応を惹起し, ミスマッチの組合せによって患者の予後に影響するためである。そこで当院における 10/10 matched HSCT 患者とドナー両者の HLA-DPB1 タイピングを行い, 患者を match 群 (M 群), P 群と NP 群に分けて各々の予後について検討したので報告する。

【対象と方法】対象は, 当院で HLA フルマッチ移植を行った症例の内 2009 年から 2013 年 5 月までの非血縁者間移植患者 38 例 (U 群) で, 対照群として 2010 年から 2013 年 5 月までの血縁者間移植患者 32 例 (R 群) の計 70 例。

HLA タイピングには HLA-C, DQA1/DQB1, DPA1/DPB1 (LABType, One Lambda), HLA-A, B, C, DRB1, DPB1 (WAKFlow, 湧永製薬) を用いた。この結果から TCE3 と TCE4 の組み合わせを検討し match (M) 群, permis-

sive (P) 群と non-permissive (NP) 群に分け, 予後について検討した。

【結果】R 群はすべて HLA-DQA1/DQB1, DPA1/DPB1 抗原は一致していた (8/8 matched HSCT=12/12 matched HSCT)。U 群は全例 HLA-DQA1/DQB1 抗原は一致していた (8/8 matched HSCT=10/10 matched HSCT)。このうち DPA1/DPB1-M 群が 11 例 (28.9%), DPA1/DPB1-P 群が 13 例 (34.2%), DPA1/DPB1-NP (TCE3) 群が 3 例 (7.9%), DPA1/DPB1-NP (TCE4) 群が 11 例 (28.9%) だった。

各群の予後は, DPA1/DPB1-M 群及び P 群が生存 10 例, 死亡 14 例 (TRM 1 例, NRM 9 例, Re 4 例)。DPA1/DPB1-NP 群は生存 8 例, 死亡 6 例 (TRM 2 例, NRM 3 例, Re 1 例) であった。

【考察】症例が少なかったためか, M 群, P 群と NP 群において, 予後に明らかな有意差は認められなかった。

ただ, 他の報告と比較して M 群の割合が高く, 逆に NP 群の割合が低い傾向が認められた。あるいはこれが日本における 8/8 matched HSCT が他国と比較して良好な成績となっている理由かもしれない。

今後, 少数ではあるが NP 群となる症例があることを考慮して, プロスペクティブに HLA-DP タイピング検査を行い, 更に検討していきたい。

(14:00 ~ 14:20)

ブリーフ・セッション

座長：木村貴文（京都大学 iPS 研究所 基盤技術研究部門）

ASHI (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics) 39th Annual Meeting に出席して

○楠木靖史¹⁾，小島裕人¹⁾，木村貴文²⁾

公益財団法人 HLA 研究所¹⁾，京都大学 iPS 細胞研究所基盤技術研究部門²⁾

ASHI (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics) 39th Annual Meeting に出席して

○楠木靖史¹⁾, 小島裕人¹⁾, 木村貴文²⁾

公益財団法人 HLA 研究所¹⁾, 京都大学 iPS 細胞研究所基盤技術研究部門²⁾

第 39 回 ASHI が 2013 年 11 月 17 日から 5 日間, Chicago の Sheraton Chicago Hotel and Towers で開催された。学会会場はアメリカ型都市発祥の地と言われる摩天楼がそびえ立つ区画に位置していた。美しい景観の中で行われた学会で学んだ内容の一部を紹介したい。

プログラムは Poster Session 188 題, Keynote address (iPS cells) 1 題, Plenary lecture (NK, Tolerance, Award, Complement) 9 題, Symposium 9 題, Affiliate Meeting 6 題, Workshop 28 題, Abstract Session 46 題, Hot Topics (C1q) 2 題, 出展企業のブースも 39 社あり, 多くの刺激を受けることができた。参加人数は 500 人以上と思われるが, 残念ながら日本人研究者はほとんどいなかった。

今回私が最も興味をひかれたのは NGS (Next Generation Sequencing) を用いたタイピングで, HLA だけでなく KIR (killer immunoglobulin like receptors) のアレルタイピングまで行っている施設も多く見られた。KIR は最近日本でも注目されているが, 本会においても, KIR ハプロタイプ A/B についての遺伝的背景, レセプター/リガンドの多型について焦点があてられていた。

抗 HLA 抗体では, 臓器移植におけるバーチャル・クロスマッチや補体結合性抗体の検出キット (製品名 C1qScreen) についての話題が中心であった。C1qScreen はまだまだ非特異反応が存在するが, これを改善するため検査方法の検討が行われ, CDC (complement-dependent

cytotoxicity) とほぼ同等の結果が得られるようになった。ドナーリンパ球を必要とする CDC よりも本法の方が抗体関連拒絶のモニタリング方法としては簡便といえよう。

造血幹細胞移植のマッチングについては, NMDP/CIBMTR よりドナー年齢, ABO 型, 抗原マッチ<アレルマッチ, 性別などの予後因子をもとにドナー選択の指針が示された。EMBT からは移植成績やドナーの続柄の内訳は日本と変わらないが, 移植ソースについては BM 22%, PB 72%, CB 6%, と CB の多い日本と比べ PB が圧倒的に多く, HLA 一致ドナーの中でも同胞と非血縁で移植成績に 10% の差異があり, これは日本人のそれよりも数% 高いことが示された。原因として Caucasian におけるマイナー抗原の多型が日本列島人より多いことを挙げていた。

最後に, 次年度の 40th ASHI 記念大会は 2014 年 10 月 20 日から 24 日まで, Denver, Colorado で開催される予定である。ASHI は JSHI に比べ, より臨床側に近い印象を受け, JSHI とは違う観点から組織適合性について見直すことができた。スライドも十分に理解の手助けをしてくれるので特に問題はなかった。また, 学会期間は 5 日間あるがスケジュールは余裕を持って組まれており, 学術枠を超えた国際交流も可能であるため, 日本からの参加が増えれば, JSHI のさらなる活性化にも寄与すると考えられる。

(14:20 ~ 15:50)

シンポジウム

「iPS 細胞にとっての組織適合性」

座長：谷 慶彦（近畿ブロック血液センター 研究部）

木村貴文（京都大学 iPS 研究所 基盤技術研究部門）

1) 「iPS 細胞を用いた腎疾患治療法の開発」

長船健二（京都大学 iPS 細胞研究所 増殖分化機構研究部門）

2) 「iPS 細胞を用いた脳内細胞移植治療における免疫原性の検討」

森実飛鳥（京都大学 iPS 細胞研究所 臨床応用研究部門）

3) 「iPS 細胞を用いた細胞治療と組織適合性」

木村貴文（京都大学 iPS 細胞研究所 基盤技術研究部門）

1) iPS 細胞を用いた腎疾患治療法の開発

長船健二

京都大学 iPS 細胞研究所 増殖分化機構研究部門

近年、無限の増殖能と全身の細胞種への多分化能を有する ES 細胞（胚性幹細胞）や iPS 細胞（人工多能性幹細胞）から特定細胞種への分化誘導を行い、細胞移植によって機能不全からの臓器機能回復を図る再生医療の開発研究が盛んに行われている。しかし、神経や心筋など他の臓器の再生研究から大きく遅れ、ES 細胞や iPS 細胞から腎細胞を分化誘導する方法は未だに確立されていない。現在、演者らは、腎発生過程を再現し、ヒト iPS 細胞から「中間中胚葉」、「腎前駆細胞」、「分化腎細胞」の順に多段階の腎細胞分化誘導法開発を行っている。そして、増殖因子の組み合わせ処理を用いて最初のステップであるヒト iPS 細胞から腎臓を派生させる胎生初期組織「中間中胚葉」を 90% 以上の高効率で分化誘導する方法を開発した。これらのヒト iPS 細胞由来の中間中胚葉細胞は、*in vitro* と *in vivo* で成体腎構成細胞に分化可能であり、器官培養の系において三次元の尿細管様構造を形成する能力を有することが分かった (Mae S. et al., 2013)。

一方、近年、化学と生物学を融合させた「ケミカルバイオロジー」と呼ばれる学問分野が発展し、合成化合物や生物由来の天然物の高速スクリーニングによって様々な生命現象を制御する化合物が同定されている。現在、演者らは化合物スクリーニングシステムを立ち上げ、ヒト iPS 細胞から腎系譜への分化を誘導する化合物の探索

も行っている。そして、ヒト iPS 細胞から中間中胚葉を高効率に誘導する 2 種の化合物 TTNPB, AM580 を同定し、化合物を用いた低コストかつ高効率な分化誘導法を開発した (Araoka T. et al., 2014)。現在、次のステップとしての胎児期の腎前駆細胞を経て、成体腎を構成する分化腎細胞への高効率分化誘導法の開発を行っている。

細胞移植療法に加えて iPS 細胞技術を用いた臨床応用研究として、「疾患モデル作製研究 (disease modeling)」が盛んに行われている。それは、難治性疾患の患者体細胞より疾患の発症に関与する遺伝情報を有する「疾患特異的 iPS 細胞」を樹立し、試験管内で罹患細胞種へ分化誘導することにより病態を模倣する疾患モデルを作製し、病態解析や治療薬探索を行う研究のことである。演者らは、既に「常染色体優性多発性嚢胞腎 (ADPKD)」や「Alport 症候群」をはじめとする末期慢性腎不全に進行しうる複数の難治性腎疾患から疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。ヒト iPS 細胞から腎細胞への分化誘導法を確立し、疾患モデルを作製する予定である。

本発表においては、ケミカルバイオロジーの活用をはじめとしてヒト iPS 細胞から腎細胞を分化誘導する研究の成果について提示する。さらに、iPS 細胞技術を用いた細胞療法および難治性疾患に対する新規疾患モデル作製、治療薬探索の展望についても述べてみたい。

2) iPS 細胞を用いた脳内細胞移植治療における免疫原性の検討

森実飛鳥¹⁾, 土井大輔¹⁾, 菊地哲広¹⁾, 沖田圭介¹⁾, 水間 広²⁾, 尾上浩隆²⁾,
林 拓也²⁾, 椎名 隆³⁾, 小笠原一誠⁴⁾, 山中伸弥¹⁾, 高橋 淳¹⁾⁵⁾⁶⁾

京都大学 iPS 細胞研究所¹⁾, 理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター²⁾,
東海大学医学部 基礎医学系分子生命科学³⁾, 滋賀医科大学 病理学講座⁴⁾,
京都大学 再生医科学研究所⁵⁾, 京都大学 医学部脳神経外科⁶⁾

【背景】 パーキンソン病に対する細胞移植治療として、1980 年代から欧米を中心にヒト中絶胎児の中脳組織を用いた移植が試験的に行われた。この胎児移植は一部の症例では著効が認められたが、幾つかの問題のために一般的な治療オプションとはならなかった。その 1 つの問題として、移植したドパミン神経の生着率が低い事が挙げられる。この胎児移植では 1 回の移植につき、4-10 体の胎児組織が必要で、通常は HLA の適合は行われていなかった。胎児移植の問題を克服できる可能性があるということで、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を用いた再生医療がこの分野でも注目されている。我々の研究室では自己細胞由来の iPS 細胞を用いた自家移植、および iPS 細胞ストックを用いた HLA 適合移植の臨床応用を目指して研究を行っている。

【方法】 カニクイザルから iPS 細胞を樹立し、ドパミン神経誘導後に元のサル脳へ移植した (自家移植: autograft)。本研究では免疫抑制剤は使用していない。遺伝学的に個々のカニクイザルの MHC タイピングを行い、MHC 型の一致しないサルへの移植 (同種移植: allograft) をコントロールとした。術後、画像検査として MRI, PET を定期的に行った。血液、及び髄液検査も定期的に行った。移植後 3-4 ヶ月で還流固定を行い脳の組織学的検索を行った。

【結果】 移植後 3 ヶ月の時点でいずれの群でもドパミン細胞の生着が確認できた。PET による解析、血清学的検査、病理学的検索により免疫・炎症反応は自家移植ではほとんど起きていなかったが、allograft ではマイクログリアの活性化、リンパ球の移植片への浸潤、そして組織への IgG の沈着が認められた。最も炎症が強かった 1 匹では活性化したマイクログリアと反応するリガンドである PK11195 を用いた PET で画像イメージとして炎症反応を捉える事ができた。

【考察】 脳は免疫疎界と言われるが、autograft, allograft の比較では免疫・炎症反応に明らかな違いが見られた。また、画像検査で移植後の炎症が捕えられた事は、臨床現場において免疫抑制剤の使用法などを調整する上でも意義深い。免疫学的観点からは、臨床応用にあたり自家移植が有用と考えられる。しかし、自己 iPS 細胞を個々の症例で樹立し、分化誘導を行い、ドナー細胞の安全性と有効性を一つ一つ確認するには高いコストがかかる。また自己細胞の疾患感受性の問題も残る。そこで、HLA ホモ型健常人ドナー由来の iPS 細胞ストックを用いた HLA 適合移植も期待されている。今後は MHC のホモ接合体をもつカニクイザルおよび、そのヘテロ型のサルを用いて、iPS 細胞を利用した HLA 適合移植の有効性も検討していく予定である。

3) iPS 細胞を用いた細胞治療と組織適合性

木村貴文

京都大学 iPS 細胞研究所

ノーベル医学・生理学賞の受賞以来、iPS 細胞の臨床応用への期待はますます膨らみつつある。患者から樹立した疾患特異的 iPS 細胞を用いた難治性疾患の病態解明や新たな治療薬の開発は今や熾烈な国際競争の場となっている。しかし、それにも増して注目を集めているのは「細胞治療への応用」である。

細胞治療に用いる細胞・組織（あるいはその加工製品）の安全性や有効性の担保には、製造および品質試験の徹底的な管理が求められる。このプロセスを経た移植片は、安全かつ有効な方法で患者に移植されることになる。「安全かつ有効な方法」には、当然のことながら「組織適合性抗原の一致」が含まれる。

2011 年から米国で始まっている、ES 細胞由来網膜色素上皮を用いた黄斑変性症に対する同種移植は、すでに 30 名以上の患者に実施されたが、急性および亜急性拒

絶反応は報告されていない。これは、神経などの外胚葉器官の免疫原性が低いことに起因すると考えられる。しかし、iPS 細胞は T 細胞、血小板、血管内皮細胞などの同種抗原性がきわめて強い細胞種へも分化誘導可能であり、それらを用いた細胞治療も実現に向けて研究意欲は旺盛である。臨床応用可能な細胞分化誘導技術の開発に伴って iPS 細胞の用途はますます多様化すると考えられる。したがって、医療用 iPS 細胞バンクの構築に必要なドナー要件については、ドナー・ソースの規模、組織適合性抗原の解析技術の現状と開発状況、これまでの造血細胞移植および臓器移植の成績などを考慮のうえ決定する必要がある。とくに、iPS 細胞ストックのユーザーであり患者にもっとも近い臨床医との情報共有は、今後もっとも推進すべき課題と考えられる。

(16:00 ~ 17:00)

特別講演

座長：椿 和央（近畿大学医学部奈良病院 血液内科）

「造血幹細胞移植と HLA」

森島泰雄（愛知県がんセンター 研究所 疫学・予防部）

「造血幹細胞移植と HLA」

森島泰雄

愛知県がんセンター 研究所 疫学・予防部

わが国において 1970 年代中ごろに開始された同胞間 HLA 適合骨髄移植は、1990 年代に入り骨髄バンクドナーからの非血縁者間 HLA 適合骨髄移植、引き続いてのさい帯血バンクからの非血縁者間さい帯血移植が可能になり、さらに末梢血幹細胞移植や非骨髄破壊的移植法も開発されるなど移植は多様化し広がりを見せ、年間 4000 例以上の移植が実施されている。最良の成績を得るために多様化した移植の中からどの移植法・ドナー（HLA 適合度）の移植をどの病期に実施すればよいかの選択・決断を患者・主治医はしなければならない。

同種造血幹細胞移植（HSCT）患者の成績向上のためには、重症な急性移植片対宿主病（GVHD）や慢性 GVHD の発症、移植片の拒絶を抑制し、移植片対白血病反応（GVL）を生じさせることが重要であるが、これら移植免疫反応にはドナーと患者の主要組織適合性抗原（HLA）の違いが大きく関わっていることが、わが国や海外における HSCT の臨床成績と HLA との関連解析により明らかにされてきた。HSCT に関与する HLA

の影響はドナーや移植細胞源を異にする移植法により違っているが、例えば急性 GVHD の重症度と発症頻度は、HLA 不適合非血縁者間移植、HLA 不適合同胞間移植、HLA 適合非血縁者間移植 HLA 適合同胞間移植の順に高くなり、HLA 不適合さい帯血移植では HLA のバリアーが低く HLA 2 座不適合移植も可能になっている。

ここでは HSCT に関わる HLA につき、以下に示す最新の知見を中心に提示したい。

1. HLA 領域の multi-SNPs 解析で見出された HLA 領域の LD ブロックと HLA アリルとの関連
2. HLA 座（アリルレベル）適合度とくに HLA-DPB1 の移植免疫反応への影響
3. HLA アリル不適合組み合わせの移植免疫反応への影響
4. NK 細胞受容体（KIR）リガンド適合度の移植免疫反応への影響
5. 国際組織適合性ワークショップ（HSCT 部会）での global な解析
6. 移植選択アルゴリズムの現状