

第1回 東海北陸 HLA 研究会記録

日 時： 2017年7月9日（日）

会 場： 名古屋第一赤十字病院 内ヶ島講堂

世話人： 森島 泰雄

愛知医科大学 造血細胞移植振興寄附講座

中部さい帯血バンク

同一抗原型でアリのの違いにより産生された HLA 抗体について

池田 孝子¹⁾, 橋本 真紀¹⁾, 金柁 麻衣¹⁾, 杉浦 良樹¹⁾, 竹内奈由美¹⁾, 浅野 信康¹⁾, 石田 昌子¹⁾,
高橋 泰子¹⁾, 高松 純樹¹⁾, 宮下 博之²⁾, 加藤 道³⁾

¹⁾ 日本赤十字社東海北陸ブロック血液センター

²⁾ 市立四日市病院血液内科

³⁾ 愛知県赤十字血液センター

【はじめに】東海北陸ブロック血液センターでは、血小板製剤を輸血しても期待する輸血効果が得られない状態「血小板輸血不応状態」の患者に対して、濃厚血小板 HLA-LR「日赤」(以下、PC-HLA)の供給を目的に HLA 抗体検査を実施している。その中で同一抗原型ではあるが、アリのの違いを認識してアリの特異的な HLA 抗体を産生したと考えられる症例を経験したので報告する。

【検査方法】PC-HLA 供給依頼のあった患者検体について、HLA 型 (アリ) は、WAKFlow HLA タイピング試薬 HLA-A (B, C) (湧永製薬社)、アリでの HLA 抗体の特異性検査は、LABScreen Single Antigen HLA Class I-Combi (ワンラムダ社) 及び WAKFlow HLA 抗体クラス I (ICFA) (湧永製薬社) を実施した。

【結果】患者の HLA 型 (アリ) は A*11:01, A*24:08, B*51:01, B*54:01, C*01:02, C*15:02 であった。HLA 抗体は HLA 抗原に対する広範囲な HLA 抗体及び A24 抗原型の A*24:02 のアリの特異的な抗体が確認された。ICFA にて患者血清と A*24:02 の2パネルとのクロスマッチは陽性であった。

【考察】患者のアリは A*24:08 であったが、同一抗原型のアリ A*24:02 に対する HLA 抗体を産生していた。PC-HLA は HLA 抗原型で患者とドナーのマッチングを行うため、通常患者の HLA 型である A24 のドナーが選択される。しかし、今回は日本人の A24 のアリ頻度がほぼ A*24:02 であることから A24 を除外し、輸血に対して有効なドナーを選択することができた。

臍帯血移植時のクラス II 抗 HLA 抗体検査結果の取り扱いについて (問題提起)

—バーチャルクロスとダイレクトクロスマッチ試験結果の乖離—

松本加代子¹⁾²⁾, 田中 秀則³⁾, 中村 文明²⁾⁴⁾, 畑中 一生²⁾⁵⁾, 藤村 吉博²⁾⁶⁾, 加藤 剛二¹⁾, 森島 泰雄¹⁾

¹⁾ 中部さい帯血バンク

²⁾ 近畿さい帯血バンク

³⁾ HLA 研究所

⁴⁾ 国立循環器病研究センター

⁵⁾ 大阪赤十字病院

⁶⁾ 近畿ブロック血液センター

臍帯血移植に際し、患者抗 HLA 抗体の確認ならびに DSA を回避した臍帯血の選択が一般化してきた。しかしながら、患者がクラス II 抗体を有する場合の臍帯血選択については、臍帯血の DP, DQ 抗原のタイピング

が通常行われていないこと、直接クロスマッチ試験の実施可能なバンクも限られていることから、難しい局面がある。さらに、我々は、直接クロスマッチ試験陰性にもかかわらず、臍帯血 DQ 抗原に対する DSA が陽性 (バー

チャルクロス) となる乖離事例を経験した。

今後、次世代シーケンサーの導入に伴って臍帯血の DP, DQ 抗原のタイピングが一般化すると、前述の乖離事例の増加が予想されることから、バーチャルクロスで

陽性となる臍帯血は移植源として避けるべきか、それとも直接クロスマッチ試験で陰性ならば当該臍帯血は使用可能なのか、臍帯血移植時のクラス II 抗 HLA 抗体検査結果の取り扱いについて問題提起をさせて頂く。

HLA-DPB1 ミスマッチドナーからの UR-BMT 後に重症急性 GVHD を発症した 1 例

若松 学, 奥山美沙恵, 前村 遼, 山森 彩子, 坂口 大俊, 吉田 奈央, 加藤 剛二

名古屋第一赤十字病院 小児科

症例は 15 歳, 女子。MLL/AF6 陽性 AML に対し, 第 1 寛解期に HLA-A, B, C, DRB1 8/8 アリル一致ドナーより非血縁者間骨髄移植を施行した。前処置は BU 12.8 mg/kg+MEL 180 mg/m², GVHD 予防は TAC+MTX を用い, 移植後 21 日目に生着を認めた。grade 3 の急性 GVHD (skin 2, gut 3, liver 2) を発症し, ステロイド抵抗性のためヒト骨髄由来間葉系幹細胞を投与し, 皮疹と下痢は改

善した。肝臓 GVHD は stage 3 に増悪し, 現在もステロイド治療中であるが, 患者は移植後 2 年後も無病生存中である。GVHD 発症後に HLA-DQB1, DPB1 を検査した結果, GVH 方向に DPB1 の 1 アリル不適合を確認した。現行では骨髄バンク登録時に HLA-A, B, C, DRB1 の適合が確認されるが, HLA-DPB1 も登録後早期に確認できる体制が望まれる。

HLA6 座 (A ~ DPB1) 抗原レベルおよびアリルレベル適合性の臍帯血移植成績への影響

東 史啓¹⁾³⁾, 屋部登志雄¹⁾³⁾, 折原 武³⁾, 矢部 普正³⁾, 加藤 俊一³⁾, 加藤 剛二³⁾, 小川 篤子¹⁾³⁾, 松本加代子³⁾, 甲斐 俊朗³⁾, 森 鉄男³⁾, 加藤 剛二³⁾, 森島 聡子³⁾, 高梨美乃子²⁾³⁾, 佐竹 正博²⁾³⁾, 中島 一格¹⁾, 森島 泰雄³⁾

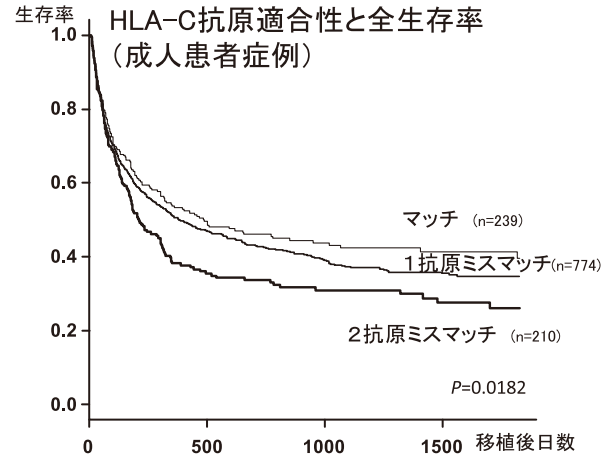
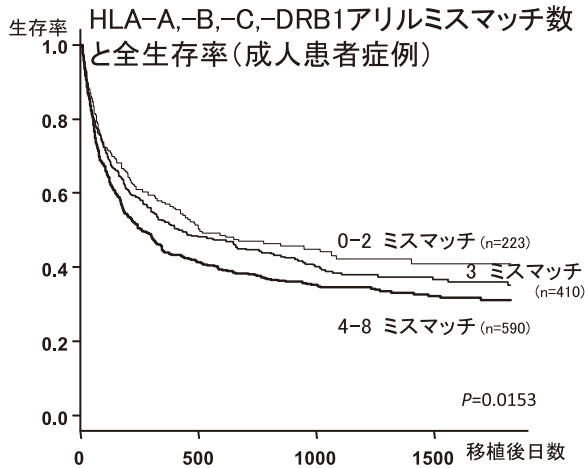
¹⁾ 日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター

²⁾ 日本赤十字社血液事業本部

³⁾ 日本医療研究開発機構 (AMED) 研究班臍帯血移植組織適合性共同研究グループ

臍帯血移植において HLA-A, -B, -DRB1 の 3 座中 2 抗原ミスマッチまでの臍帯血が選択可能であるが, HLA-C, -DQB1, -DPB1 座適合性やアリルレベルミスマッチの効果はまだ不明な点が多い。そこで全国 6 つのバンクより収集した初回, 単一臍帯血移植, 日本人, 造血系悪性疾患 1419 移植症例の患者, 臍帯血 DNA 検体について HLA 6 座アリルタイピングを実施し HLA 適合性と移植成績との関連解析を行った。HLA-C 座の 2 抗原不適合

症例では, C 座適合症例と比較して生存率が有意に低下していた。また HLA ミスマッチ数の増加に伴い成績が悪化していたが, HLA 座によっては抗原レベル, アリルレベルでミスマッチ効果が異なるものがあった。HLA-A, -B, -DRB1 座に HLA-C 座を加え, さらにアリルレベルでの適合度も考慮した臍帯血の選択により移植成績をさらに向上させられる可能性が示唆された。



HLA-DPB1 ミスマッチの臍帯血移植における GVL (移植片対白血病) 効果

屋部登志雄¹⁾³⁾, 東 史啓¹⁾³⁾, 折原 武³⁾, 矢部 普正³⁾, 加藤 俊一³⁾, 加藤 剛二³⁾, 小川 篤子¹⁾³⁾,
松本加代子³⁾, 甲斐 俊朗³⁾, 森 鉄男³⁾, 加藤 剛二³⁾, 森島 聡子³⁾, 高梨美乃子²⁾³⁾,
佐竹 正博²⁾³⁾, 中島 一格¹⁾, 森島 泰雄³⁾

¹⁾ 日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター

²⁾ 日本赤十字社血液事業本部

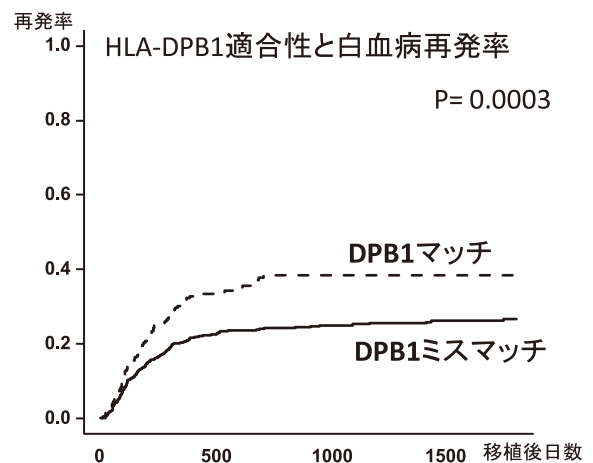
³⁾ 日本医療研究開発機構 (AMED) 研究班臍帯血移植組織適合性共同研究グループ

骨髄移植において HLA-DPB1 ミスマッチは再発率を低下させ GVL 効果を示すが、臍帯血移植の HLA-DPB1 適合性効果はまだ報告されていない。今回全国 6 つのバンクを経由した初回、単一臍帯血移植、白血病疾患、日本人患者移植症例 1157 ペアについて患者と臍帯血の

DNA 検体を収集し HLA アリルタイピングを行い HLA-DP アリル適合性と移植成績との関連解析を行った。HLA-DPB1 ミスマッチ (GVH 方向) 群 748 症例ではマッチ群 240 症例と比較して再発率が有意に低下していた (HR 0.61, 95%CI (0.47-0.80), $P < 0.001$)。一方 HLA-

HLA アリル適合性と白血病再発率 (多変量解析)

HLA 座	適合性	N	白血病再発			P-value
			HR	95% CI		
				lower	upper	
A	マッチ	522	1.00			.13
	ミスマッチ	635	0.82	0.63	1.06	
B	マッチ	349	1.00			.65
	ミスマッチ	808	1.07	0.80	1.44	
C	マッチ	288	1.00			.84
	ミスマッチ	869	0.97	0.72	1.31	
DRB1	マッチ	316	1.00			.83
	ミスマッチ	841	0.96	0.64	1.44	
DQB1	マッチ	367	1.00			.54
	ミスマッチ	790	0.89	0.60	1.30	
DPB1	マッチ	278	1.00			<.001
	ミスマッチ	879	0.61	0.47	0.80	



DPB1 適合性はGVHD 発症率, 生着率, 生存率には有意な影響を示さなかった。HLA-DPB1 ミスマッチのGVL 効果が見られたことから, 臍帯血移植において

HLA-DPB1 ミスマッチドナーの選択を考慮することで移植成績を向上させる可能性が示された。

ヒト急性 GVHD における組織浸潤アロ反応性 T 細胞レパトアの定量的評価

小山 大輔, 村田 誠, 葉名 尻良, 奥野 真吾, 鴨下 園子, 高木えり奈, Jakrawadee Julamane, 宮尾康太郎, 後藤 辰徳, 酒村玲央奈, 寺倉精太郎, 西田 徹也, 清井 仁

名古屋大学大学院 医学系研究科 血液・腫瘍内科学

ヒト GVHD 組織からの T 細胞分離は困難で, GVHD 組織浸潤 T 細胞の解析は充分でない。急性 GVHD 患者 8 例の GVHD 組織を用い, 組織浸潤 T 細胞のアロ反応性の検討及び TCR β 鎖の Target deep sequence による組織浸潤 T 細胞レパトアの定量的評価を行った。症例 1 の皮膚から得た, 患者細胞を傷害しドナー細胞は傷害しない 2 つの T 細胞クローンは, 組織浸潤 T 細胞全体のそれぞれ 75% (頻度第 1 位) 及び 23% (頻度第 2 位) を占めた。症例 2 の皮膚, 胃, 大腸 GVHD では, 組織中の頻度第 1 位の T 細胞クローンはそれぞれ異なり,

組織浸潤 T 細胞全体のそれぞれ 93%, 64%, 99% を占めた。Simpson の多様性指数で評価した組織浸潤 T 細胞の多様性の度合いは, Grade I-II の GVHD より Grade III-IV の GVHD で低く, ステロイド感受性 GVHD よりステロイド抵抗性 GVHD で低かった。本研究から, ヒト GVHD が極めて限られた T 細胞クローンにより発症し, それらクローンが組織ごとに異なること, 組織浸潤 T 細胞の多様性が GVHD の予後と相関する可能性があることが示唆された。

グラフト内皮細胞発現 HLA に対するアロ反応性 T 細胞は, DSA の種類により増減する

岩崎 研太¹⁾, 三輪 祐子¹⁾, 打田 和治¹⁾, 堀見 孔星²⁾, 松岡 裕²⁾, 村口 篤³⁾, 岸 裕幸³⁾, 浜名 洋³⁾, 小林 孝彰²⁾

¹⁾ 愛知医科大学医学部腎疾患・移植免疫学寄附講座

²⁾ 同腎移植外科

³⁾ 富山大学医学部免疫学講座

【目的】内皮細胞 MHC class II に対する CD4T 細胞のアロ応答は拒絶反応と関連があるかどうかは明確ではない。今回, 内皮細胞 HLA class II DR に対する CD4T 細胞のアロ応答が, 内皮細胞に結合する抗体の種類によって増減することを見出したのでここに報告する。

【方法】内皮細胞を IFN γ で刺激し MHC class II は誘導した。CD4T 細胞増殖は CFSE-FCM 法で評価した。

CD4+CD25+foxp3+ 細胞を Regulatory T-cell (Treg), CD4+CXCR5+foxp3- 細胞を Follicular helper T-cell (Tfh), CD4+CXCR5+foxp3+ 細胞を Follicular regulatory helper T-cell (Tfr) と定義した。TCR β は OX40 をマーカーにシングルセルより CDR3 領域を同定した。

【結果】IFN γ で刺激したヒト内皮細胞に対して, CD4 T 細胞アロ応答は上昇した。HLA class I・A/B に対する

抗体存在下で培養したところ、HLA class I 抗体存在下ではアロ応答が上昇、A/B 抗体接着内皮細胞ではアロ応答は減弱した。また、同定したアロ応答 T 細胞クローンは DA の種類により同様の変化を認めた。Treg・Tfh・Tfr の存在比を調べたところ、各反応群において大きな変化は認めなかった。

【考察】ドナー臓器に対する T 細胞の direct recognition の制御は、重要であることが考えられた。また、ドナー特異的抗体接着が、補体・凝固活性化非依存性に T 細胞応答を亢進させ拒絶反応へと導く可能性が示唆された。

HLA-C 座のドナー特異的 HLA 抗体陽性に行われた生体腎移植症例

長坂 隆治¹⁾, 田中 秀則²⁾, 小林 孝彰³⁾

¹⁾豊橋市民病院 移植外科

²⁾公益財団法人 HLA 研究所

³⁾愛知医科大学 腎移植外科学

52 歳女性（糖尿病性腎症）、夫をドナーとして生体腎移植を計画した。免疫学的リスクとして輸血歴なし移植歴なし妊娠歴あり（G7P4）、リンパ球クロスマッチにて FCXM-T（ratio）陽性（MFI 比 4.2 倍）、flow PRA にて class I 陽性（44%）、ドナー特異的抗体（DSA）として HLA-C 座のドナー抗原（C*08:01, C*03:03）に対する抗体が検出された（MFI にて各々、10950, 9441）。2 週間

前よりステロイド・代謝拮抗薬を開始し、リツキシマブ 2 回、血漿交換 4 回実施後に腎移植を行った。術直前 DSA は各々、2300, 1400 と前値の 1/3 ~ 1/4 に減少し、移植後もさらに減少した。移植前後で減少したのは、Cw9 抗原と交差反応を示すと思われる Cw10, Cw14 だけでなく、Cw1, Cw5, Cw12, Cw16 に対しても認められた。HLA-C 陽性移植につき考察する。

Rituximab 脱感作療法による既存抗ドナー抗体陽性肝移植の経験

小倉 靖弘, 倉田 信彦, 小木曾 聡, 亀井 秀弥, 大西 康晴

名古屋大学医学部附属病院 移植外科

【背景】肝移植における既存抗ドナー抗体（DSA）の重要性が、近年、認識されてきた。

【方法】術前 HLA 抗体検査を実施し、陽性の場合には同定検査を追加した。DSA 陽性症例には rituximab 脱感作療法を実施し、術前血漿交換、免疫抑制剤投与は行わずに、肝移植を実施した。

【結果】9 例（8.6%）で DSA が確認され、rituximab 脱感作療法を術前 1 ~ 21 日に行った。肝移植後に抗体関連拒絶反応の発症はなく、全例生存。経時的 DSA 変化を見ると、術後 class-I DSA は急速に消失するのに対して、

class-II DSA は緩徐に減少。Non-DSA に関しては、DSA ほど顕著でないものの、やや低下傾向を示した。また、class-II DSA に対する 3 例の術後肝生検 C4d 染色では術後早期では陽性、その後、陰性化の傾向が見られた。

【結論】Rituximab 脱感作療法は、既存 DSA の肝移植に有効であった。

血液型抗体がもたらす、HLA 抗体関連拒絶に対する防御効果の可能性

岡田 学¹⁾, 二村 健太¹⁾, 辻田 誠¹⁾, 平光 高久¹⁾, 後藤 憲彦¹⁾, 鳴海 俊治¹⁾,
渡井 至彦¹⁾, 小林 孝彰²⁾

¹⁾名古屋第二赤十字病院

²⁾愛知医科大学

抗ドナー抗体による抗体関連型拒絶の制御は臓器の長期生着に不可欠である。現在、血液型不適合腎移植の成績は適合移植に遜色なく良好であり、背景に抗ドナー血液型抗体の存在下でも拒絶反応が起こらない、Accommodation と呼ばれる状態が存在する。このことから、抗血液型抗体が腎グラフトの内皮保護作用を誘導する可能性が示唆されてきた。

一方で、抗ドナー HLA 抗体 (DSA) による抗体関連型拒絶は十分に制御できていない状況であり、HLA 不適合移植の成績は適合移植よりも有意に劣っている。特

に、DSA による慢性抗体関連型拒絶に対しては有効な治療法が未だ確立されていない。

近年、我々は血液型抗体による内皮保護作用が、DSA による内皮細胞障害が減弱することを in vitro の実験において示してきた。

今回、血液型不適合腎移植の臨床データを調査し、抗血液型抗体が移植後の DSA の発生と DSA による慢性抗体関連型拒絶の発生に与える影響について解析を行った。

HLA-A ミスマッチは腎移植後膵移植と膵単独移植のグラフト生着に影響する

伊藤 泰平, 剣持 敬, 栗原 啓, 會田 直弘

藤田保健衛生大学医学部 移植・再生医学講座

【背景】膵腎同時移植を除く、腎移植後膵臓と膵単独移植 (PT) における膵グラフト 5 年生着率は 36.1% と不良である。膵グラフト生着に影響する因子を検討した。

【方法】2016 年 12 月末までに施行された本邦 PT49 例を後方視的に検討した。

【結果】Cox 比例ハザード回帰 (多変量解析) では、ドナーの HbA1c (P=0.04), HLA-A のミスマッチ数 (P=0.036) が独立して膵グラフト生着に影響した。HLA-A ミスマッ

チ数が多いほど膵グラフトの予後は不良で、HLA-A ミスマッチが無いと拒絶は 23.1% であるのに対し、ミスマッチを有すると 38.9% であった。また、T-cell depleting 抗体の導入により拒絶合併の減少、膵グラフト生着率の改善する傾向が認められた。

【結論】PT ではレシピエント選択における HLA-A のマッチングの考慮や、T-cell depleting 抗体での導入が成績改善につながると考えられた。

特別講演

次世代シーケンサーを用いた HLA DNA タイピング法の特徴と臨床への応用

椎名 隆

東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

HLA アリルを判定する DNA タイピング検査は、移植の際のドナーとレシピエントの組織適合性の一致、生活習慣病や自己免疫疾患との関連、がん患者へのペプチドワクチン投与における HLA 拘束、造血幹細胞移植に伴う移植片対宿主病 (graft versus host disease; GVHD)、感染症における防御と重症化、薬剤感受性などとの関連解析に不可欠な検査技術である。1990 年代前半に開発された PCR 法に基づく PCR-SSP 法、PCR-SSOP 法および SBT 法などの DNA タイピング法が開発され、いずれの方法とも中～高解像度を有する。ところが、これら方法の問題点として、2つの多型部位が同一の染色体上 (*cis*) か、異なる染色体上 (*trans*) に位置するのかの位置情報が得られない、いわゆる phase ambiguity が生じること、PCR-SSP 法や PCR-SSO 法では、年々増加している新規 HLA アレルに対応するための塩基配列特異的プライマーやオリゴヌクレオチドプローブがそれぞれ不足していることが挙げられる。よって、これら方法による DNA タイピング結果の多くは、通常 100～1000 のアレル候補が出現し、単一のアレルに絞り込むことができないため、日本人における HLA 遺伝子頻度を参照して頻度の高いアレルを最も可能性の高いアレルと判定する推定 (みなし) タイピングが行われているのが現状である。さらには、これら方法の多くは、多型に富む特定のエキソンのみのアレル判定が行われていることから、HLA 分子の発現が抑制される null アレルの原因となるエンハンサー・プロモーター領域や他エキソンやイントロン領域における多型や変異の検出が不可能である。したがって、プロモーター領域から 3' 側の非翻訳領域までを含む HLA 遺伝子全領域における高解像度 DNA タイピングこそが将来の目指すべき理想的な DNA タイピング法であろう。

近年、次世代シーケンサーを活用した HLA 遺伝子の DNA タイピング法 (NGS-SBT 法) が注目を浴びている。次世代シーケンサーの原理から DNA 断片 1 分子

ずつの塩基配列を大量に且つ並列的に決定することから、現行の高解像度 DNA タイピング法 (現行法) では不可能である phase ambiguity 問題がほぼ解消され、候補アレルを絞り込むこと無しで正確なタイピング結果が得られる優れた HLA 検査技術である。NGS-SBT 法は、国内をはじめ国内外の研究機関や企業にて開発が進められており、いずれも (1) PCR, (2) 次世代シーケンシング (NGS), (3) アリル判定の 3つの主な工程から構成される。(1) PCR の工程では、HLA 遺伝子を増幅させる長さから、Short-range 法と Long-range 法に大別される。Short-range 系は、多型に富む個々のエキソンを増幅させる方法であり、PCR 産物の長さが 250～900 bp 程度と比較的短いことから多検体処理に適する。その一方、イントロンで組み換えが生じているアレルの組み合わせの場合、phase ambiguity を解消することが困難であり、みなしタイピングをせざるを得ない場合がある。これに対して Long-range 系は、多型に富むエキソンとその間のイントロンを含む遺伝子領域を増幅させる方法であり、多型に富むエキソンの他にイントロンの塩基配列情報も得られることから、前述のイントロンで組み換えが生じている場合でも phase ambiguity を解消することができる利点を有する。(2) NGS の工程では、Ion Torrent system (Thermo Fisher Scientific 社) および MiSeq (Illumina 社) などのベンチトップ型次世代シーケンサー (NGS) が NGS-SBT 法に使用されている。また、サンプルそれぞれに異なる index や barcode 配列を NGS ライブラリー作製時に付加させることにより、多検体のリード配列が並列的に得られることも利点である。(3) アリル判定の工程では、アリル判定ソフトウェアが国内外で開発されているが、エキソンレベル (6 桁レベル) におけるタイピング精度は、99% 以上と年々改善されている。

この画期的な NGS-SBT 法は、造血幹細胞移植や疾患研究などに既に応用されており、造血幹細胞移植では、

正確なアレル判定に基づく移植の実施やコーディネートの期間短縮と効率向上が、また疾患研究では、これまで不可能であった遺伝子全領域における疾患関連多型の検出が期待されている。現行法よりも劣る点として、NGS-SBT法は、PCRからアレル判定まで最低でも2~3日間を要し、その殆どの時間は、煩雑で正確な操作を要

求される点挙げられる。そこで本法の迅速化や自動化を図る取り組みがなされており、将来的に解析費用の軽減につながるものと考えられる。本講演では、NGS-SBT法の原理、実施例および臨床応用に向けた利点と解決すべき今後の課題について国際状況を踏まえて講演する。