

MHC

日本組織適合性学会誌

Major Histocompatibility Complex

Vol. 15 No. 1, 2008

Contents

日本組織適合性学会からのお知らせ

内藤説也 先生 追悼文	1
事務所移転のお知らせ	2
第 17 回日本組織適合性学会大会のご案内	3
平成 20 年度認定 HLA 検査技術者講演会のお知らせ	7
組織適合性技術者認定制度委員会・部会名簿 (2008 年)	8

[シリーズ: 移植医療と組織適合性]

第 4 回

GVHD 制御と移植免疫寛容誘導の展望	豊嶋崇徳 9
献腎移植の現場での HLA 検査とクロスマッチ	杉谷 篤, 北田秀久, 岡部安博, 土井 篤, 錦 建宏, 西岡泰信, 劉 勇, 田中雅夫 27

[シリーズ: 疾患と組織適合性]

第 1 回

HIV / AIDS 感受性とゲノム多様性	中島敏晶, 木村彰方 39
HLA 分子による癌特異抗原の提示を利用した癌免疫療法の開発	千住 覚, 西村泰治 51

[トピックス]

既存抗体陽性腎移植症例に対する免疫グロブリン静注療法	小林孝彰 61
----------------------------------	---------

第 6 回日本組織適合性学会・近畿地方会 抄録	75
日本組織適合性学会誌 MHC 投稿規定	97
編集後記	100

● Contents ●

日本組織適合性学会誌 第15巻第1号 平成20年4月20日発行

日本組織適合性学会からのお知らせ

内藤説也 先生 追悼文	1
事務所移転のお知らせ	2
第17回日本組織適合性学会大会のご案内	3
平成20年度認定HLA検査技術者講演会のお知らせ	7
組織適合性技術者認定制度委員会・部会名簿(2008年)	8

[シリーズ: 移植医療と組織適合性]

第4回

GVHD制御と移植免疫寛容誘導の展望	豊嶋崇徳	9
献腎移植の現場でのHLA検査とクロスマッチ	杉谷 篤, 北田秀久, 岡部安博, 土井 篤, 錦 建宏, 西岡泰信, 劉 勇, 田中雅夫	27

[シリーズ: 疾患と組織適合性]

第1回

HIV/AIDS感受性とゲノム多様性	中島敏晶, 木村彰方	39
HLA分子による癌特異抗原の提示を利用した癌免疫療法の開発	千住 覚, 西村泰治	51

[トピックス]

既存抗体陽性腎移植症例に対する免疫グロブリン静注療法	小林孝彰	61
----------------------------------	------	----

第6回日本組織適合性学会・近畿地方会 抄録		75
日本組織適合性学会誌MHC投稿規定		97
編集後記		100

Major Histocompatibility Complex

Official Journal of Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics

JSHI

日本組織適合性学会誌 MHC 編集委員会

編集委員長

高原 史郎 大阪大学大学院医学系研究科先端移植基盤医療学

編集委員

赤座 達也 特定非営利活動法人 HLA 研究所
一戸 辰夫 京都大学医学部附属病院血液腫瘍内科
江川 裕人 京都大学医学部附属病院臓器移植医療部
木村 彰方 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野
佐治 博夫 特定非営利活動法人 HLA 研究所
佐田 正晴 国立循環器病センター研究所再生医療部移植外科
下嶋 典子 奈良県立医科大学細菌学教室
椿 和央 近畿大学医学部奈良病院血液免疫内科
成瀬 妙子 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野
難波 行臣 兵庫県立西宮病院泌尿器科

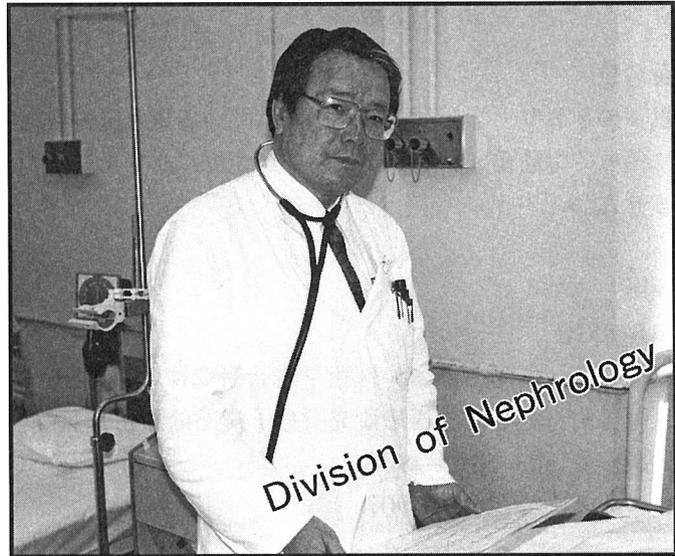
編集協力者

安藤 麻子 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学
石川 善英 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所研究開発部
石谷 昭子 奈良県立医科大学法医学教室
猪子 英俊 東海大学医学部分子生命科学系遺伝情報部門
太田 正穂 信州大学医学部法医学教室
大谷 文雄 北里大学医学部免疫学講座
小河原 悟 福岡大学病院腎臓・膠原病内科
小幡 文弥 北里大学医療衛生学部免疫学
柏瀬 貢一 東京都赤十字血液センター検査部
小林 賢 日本薬科大学 生物学研究室
酒巻 建夫 国立病院機構千葉東病院 HLA 検査室
杉谷 篤 九州大学大学院医学系研究科臨床腫瘍外科学分野
千住 覚 熊本大学大学院医学薬学研究部免疫識別学分野
田中 秀則 東京都赤十字血液センター検査部
田邊 一成 東京女子医科大学泌尿器科
徳永 勝士 東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野
中島 文明 日本赤十字社中央血液研究所研究開発部
永尾 暢夫 神戸常盤短期大学衛生技術科
西村 泰治 熊本大学大学院医学薬学研究部免疫識別学講座
平山 謙二 長崎大学熱帯医学研究所環境医学部門疾病生態分野
森島 泰雄 愛知県がんセンター中央病院
安波 道郎 長崎大学熱帯医学研究所国際連携研究戦略本部
屋部登志雄 東京都赤十字血液センター製剤部

追悼文 故 内藤 説也 先生

略 歴

生年月日 昭和 10 年 4 月 8 日生
 昭和 35 年 九州大学医学部医学科卒業
 昭和 36 年 九州大学医学部第一内科入局
 昭和 37 年 東京医科歯科大学遺伝病研究施設助手
 昭和 39 年 九州大学医学部第一内科副手
 昭和 44 年 Postdoctoral Scholar, Division of Transplantation Immunology, Department of Surgery, University of California, Los Angeles, Prof. P. Terasaki 留学
 昭和 46 年 九州大学医学部第一内科講師
 昭和 48 年 福岡大学病院助教授
 平成 2 年 福岡大学病院教授(腎センター)
 平成 7 年 日本組織適合性学会主催(福岡)
 平成 13 年 福岡大学医学部名誉教授
 平成 19 年 12 月 9 日 永眠



内藤説也先生は退任後も地域の病院に非常勤医師として週3回ほど診療をされていました。持病の糖尿病もしっかりコントロールされて我々の会合にも元気に出席されていました。ところが、去年、膀胱腫瘍が見つかり、膀胱全摘術を受けられましたが、肺に転移し、最後は呼吸不全でお亡くなりになりました。本当にあつという間に逝ってしまわれました。

私は卒業してすぐに内藤先生の下に師事し、以来23年間お世話になりっぱなしでした。思い起こせば内藤先生とはアメリカに2回、ヨーロッパに1回、オーストラリアに1回、アジアに3回もお供させていただき、本当に楽しい思い出ばかりです。病院では厳しい指導を受け、時には憎らしいと思うこともありましたが、旅先ではいろんな経験をさせていただきました。内藤先生は皆様ご存知のTerasaki先生に師事された日本人第1号と聞いております。ロサンゼルスでのTerasaki先生のご自宅にお邪魔したときも内藤先生からTerasaki先生のルーツは久留米らしいよと聞いていたので、地図を持っていったところたいそう喜んでいただきました。

平成7年には日本組織適合性学会を福岡で開催しました。ちょうど博多山笠の時期でしたので皆様もご記憶にあると思います。Terasaki先生を始めとして多くの会員の皆様に来ていただきました。内藤先生もサービス精神が旺盛でしたので今では考えられないことですが、毎晩宴会をしたのを覚えています。

12月11日ご葬儀がおこなわれました。会員の皆様よりたくさんのご弔電をいただき、内藤先生も喜んでおられると思います。本当にありがとうございました。

内藤先生、本当にお世話になりました。これからも高いところから私たちをお見守りください。

福岡大学医学部腎臓・膠原病内科
小河原 悟

事務所移転のお知らせ

日本組織適合性学会事務局が移転しました。

会員各位

以下のとおり、学会事務局が置かれている東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野が移転しました。移転に伴って電話番号、ファクス番号が変更になりましたのでお知らせします。なお、メールアドレスには変更ありません。

新住所

〒113-8510

東京都文京区湯島 1-5-45 医歯学総合研究棟 (II) 22F

東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野内

電話番号：03-5803-4906

ファックス：03-5803-4907

日本組織適合性学会

事務局担当理事 木村彰方

第17回 日本組織適合性学会大会のご案内

第17回 日本組織適合性学会大会
大会長 佐田 正晴

皆様におかれましては益々ご清祥のこととお慶び申し上げます。

第17回日本組織適合性学会大会を下記要領にて開催いたします。本大会は「MHCの臨床応用：移植医療から再生医療へ」をメインテーマに第44回日本移植学会総会(会長：高原 史郎・大阪大学大学院医学系研究科先端移植基盤医療学講座)との同時開催とすると共に、両学会会員の相互理解を深めるため共同シンポジウムの企画や学術発表の相互聴講を可能にしました。また「4th World for Organ Donation and Transplantation (世界移植デー)」(WHO, 日本移植学会, 厚生労働省主催), 「Osaka Kidney Transplantation Forum 2008」や市民公開講座も同時開催されます。多くの皆様の参加をお待ちしております。

会 期： 2008年9月19日(金)～9月21日(日)

会 場： 大阪国際会議場(グランキューブ大阪)
〒530-0005 大阪市北区中之島5-3-51
Tel. 06-4803-5555 Fax. 06-4803-5620
<http://www.gco.co.jp/japanese.html>

大会内容

以下の学術プログラムを予定しています。

1. 特別講演
山中 伸弥 教授(京都大学・再生医科学研究所)
「iPS細胞—その作成から臨床応用へのストラテジー」(仮題)
2. 招待講演
Siamak Bahram 教授 (Strasbourg, France)
「MIC genes: from bench to bedside」
3. JSHI/JST 合同シンポジウム
「臓器移植と既存抗体—その検出と臨床応用」(仮題)
4. 教育セミナー
5. シンポジウム
「医用ミニプター—移植医療から再生医療へ」(仮題)
6. ワークショップ
7. 一般演題, 2008年度学術奨励賞発表
8. QC ワークショップ
9. ランチョンセミナー, その他

一般演題募集要項

1. 発表形式

発表形式は口演またはポスターにより行います。演者は本学会員であることが必要です。発表形式(口演またはポスター)に関しましてはプログラム委員会に一任下さい。

2. 申し込み方法

1) 演題の申し込みは E-mail でのみ受付けます。

・件名は「17JSHI 演題」として下さい。

・① 演題申込書, ② 抄録の2つのファイルを添付書類とし, sada@ri.ncvc.go.jp 宛に送って下さい。

2) 演題申込書ファイルの作成(下記見本を参照下さい)

・抄録とは異なるファイルを作成下さい。

・演題カテゴリ番号, 演題名, 演者, 所属, 代表者の連絡先住所, 電話番号, FAX, E-mail アドレスを必ず記載下さい。

・演題カテゴリ(それぞれ基礎および臨床を含みます)

番号	カテゴリ
1	臓器移植
2	造血幹細胞移植
3	細胞・組織移植
4	再生医療
5	疾患
6	免疫
7	技術・方法
8	疫学・統計解析
9	動物 MHC
10	その他

演題カテゴリ番号: 1

演題名: 腎移植後の抗体関連型拒絶反応に対する IVIG 療法

演者: ○角田洋一¹⁾, 佐田正晴²⁾, ○○○○²⁾, ○○○○³⁾, 高原史郎³⁾

¹⁾ 市立池田病院・腎センター, ²⁾ 国立循環病センター・再生医療部, ³⁾ 大阪大学・先端移植基盤医療学

連絡代表者の氏名: 佐田 正晴

代表者の連絡先住所: 〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1

国立循環器病センター・再生医療部

電話番号: 06-6833-5012 (内線 2516) FAX 番号: 06-6835-5496

E-mail: sada@ri.ncvc.go.jp

3) 抄録形式(下記見本を参照下さい)

- ・抄録は Microsoft Office Word のテキストファイルを用い作成下さい。
- ・フォントは MS 明朝 で作成下さい。
- ・演題名, 演者(発表者に○印), 所属(正式名称が長い場合には省略所属名), 本文の順で作成下さい。
- ・本文は MS 明朝 11 ポイント で作成, 800 字以内 を厳守し, 目的, 方法, 結果, 考察などに分類し記載下さい。英数字は半角文字を使用し, 2 文字で 1 字とします。

腎移植後の抗体関連型拒絶反応に対する IVIG 療法

○角田 洋一¹⁾, 佐田 正晴²⁾, ○○○○²⁾, ○○○○³⁾, 高原 史郎³⁾

1) 市立池田病院・腎センター, 2) 国立循環病センター・再生医療部, 3) 大阪大学・先端移植基盤医療学

- 【目的】 Flow cytometry crossmatch (FCXM) や FlowPRA を腎移植・・・
- 【方法】 移植前に FCXM, FlowPRA により既存抗体陽性症例に・・・・・・
- 【結果】 HLA-DP 抗体症例を機能廃絶群と機能維持群にわけ・・・・・・
- 【考察】 IVIG または Rituximab を移植前に投与すれば AMR を・・・・・・

3. 演題申し込み締め切り

2008 年 5 月 31 日(土)必着

締め切り延長などは日本組織適合性学会 HP で随時更新します。

4. 演題受理通知および採択通知

- ・演題受付後 7 日以内に, E-mail または FAX にて演題受理を通知いたします。
- ・演題発表形式(口演 / ポスター)および発表日時につきましては, 2008 年 8 月上旬頃までに, E-mail または FAX にて連絡代表者へ通知いたします。

参加登録費

理事・評議員	会員
¥ 12,000	¥ 10,000

本年度は事前登録を行いませんが, 本参加登録により同時開催される第 44 回日本移植学会総会, 4th World for Organ Donation and Transplantation (世界移植デー), Osaka Kidney Transplantation Forum 2008 や市民公開講座へ全て無料で参加・聴講が出来ます。

懇親会

2008 年 9 月 20 日(土) 19:00 より学会会場隣接のリーガロイヤルホテルにて懇親会を開催いたします。
懇親会は日本移植学会と合同で行い, 参加費は無料です。

宿泊・交通のご案内

本大会の宿泊・交通に関しましては, 各自ご手配お願いいたします。9 月, 大阪市内では多くの学会や研究会

が予定されていますので、お早めに予約されることをお勧め致します。

2008 年度学術奨励賞の募集

第 17 回日本組織適合性学会大会に応募された一般演題の中から、特に優秀と認められた演題の筆頭演者に学術奨励賞が授与されます。詳細は JSHI ホームページおよび MHC 誌 Vol. 14, No. 3 に掲載されている「2008 年度学術奨励賞の募集について」をご参照ください。

大会事務局

- 本大会の企画および一般演題に関するお問い合わせは、下記にお願い致します。

〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1

国立循環器病センター・先進医工学センター 再生医療部 内

第 17 回日本組織適合性学会大会事務局

担当：島本 ひとみ，高岸 貴子

TEL. 06-6833-5012 Ext. 2516 FAX. 06-6835-5496 E-mail: sada@ri.ncvc.go.jp

- 本大会の運営，展示などに関するお問い合わせは，下記にお願い致します。

〒541-0047 大阪市中央区淡路町 3-6-13 コングレビル

株式会社コングレ

第 17 回日本組織適合性学会大会

担当：伊藤 隆文

TEL. 06-6229-2555 FAX. 06-6229-2556 E-mail: tak-ito@congre.co.jp

その他

大会情報は今後刊行される MHC 誌上，および日本組織適合性学会ホームページで随時更新致します。

組織適合性検査技術者認定制度 平成 20 年度・認定 HLA 検査技術者講習会のお知らせ

組織適合性検査技術者認定制度委員会

委員長 佐田 正晴

組織適合性検査技術者認定制度委員会教育部会

部会長 西村 泰治

日 時：平成 20 年 9 月 20 日(土)あるいは 21 日(日)の予定(詳細は次号ならびに学会ホームページにて御案内いたします。)

場 所：大阪国際会議場(グランキューブ大阪)

参加費：2,000 円(テキスト代を含む)

内 容：各講習とも質疑応答を含めて、35 分を予定しています。なお講習のタイトルは、今後、若干変更される可能性があります。

- (1) HLA-DNA タイピングから個人の全ゲノム情報解読の時代へ
安波 道郎(長崎大学・国際連携研究戦略本部)
- (2) HLA 抗体検出テクニックについて
中島 文明(日赤中央血液研究所・研究開発部)
- (3) 腎移植とクロスマッチ・HLA 抗体検査：臨床側からの要望
小林 孝彰(名古屋大学医学部免疫機能制御学寄附講座)

この講習会は、今後 HLA 検査技術者認定を取得、あるいは更新しようとする者を対象に実施されますが、それ以外の者であっても自由に参加することができます。受講希望者には、以下の申込書に必要事項を記入し、熊本大学大学院医学薬学研究部・免疫識別学分野宛に FAX (096-373-5314) で平成 20 年 7 月 31 日(月)までに送付してください。あるいは、E メールで件名を「HLA 講習会」とし、申込書の必要事項を書き込んで「midorifu@kumamoto-u.ac.jp」宛に、上記締め切り日までに送信してください。テキストは、申込数に応じて作成し、申込者に優先して配布します。そのため当日の申し込み者については、テキストの配布を受けられない場合がありますことを、あらかじめご了承ください。なお参加費は平成 20 年 8 月 31 日(木)までに、指定の郵便振替口座(口座番号：00160-7-482142、口座名称：組織適合性技術者認定制度委員会)に振込んでください。振替用紙の通信欄に、受講(予定)者の所属、氏名とともに、「平成 20 年度認定 HLA 検査技術者講習会受講料」と記載してください。参加費前納者には、事前に講習会資料を送付させていただきます。なお受講申し込みをされ参加費を振り込まれた方で、当日欠席された方には返金できませんことを御了承ください。

平成 20 年度・認定 HLA 検査技術者講習会 受講申込書

(書き込み可能な申込書を、学会ホームページからダウンロードできますので、そちらも御利用ください。)

FAX 送信先：096-373-5314, E メール送信先：midorifu@kumamoto-u.ac.jp

氏 名：

所 属：

住 所：〒

電 話 番 号：

FAX 番 号：

E メールアドレス：

HLA 検査技術者認定取得予定 なし あり → 平成 年度を予定

組織適合性技術者認定制度委員会・部会名簿 (2008年)

組織適合性技術者認定制度委員会

委員長：佐田 正晴

副委員長：小林 賢

委員：赤座 達也，石川 善英，猪子 英俊，太田 正穂，木村 彰方，酒巻 建夫，佐治 博夫，
田中 秀則，中島 文明，成瀬 妙子，西村 泰治，徳永 勝士

資格審査部会

部会長：小林 賢

副部会長：田中 秀則

部員：柏瀬 貢一，中島 文明，成瀬 妙子

教育部会

部会長：西村 泰治

副部会長：成瀬 妙子

部員：太田 正穂，小河原 悟，木村 彰方，小林 賢，酒巻 建夫，佐治 博夫，佐田 正晴，
徳永 勝士，中島 文明，平山 謙二，丸屋 悦子

試験問題検討部会

部会長：太田 正穂

副部会長：石川 善英

部員：石谷 昭子，大橋 順，小河原 悟，柏瀬 貢一，木村 彰方，小林 賢，高原 史郎，
田中 秀則，徳永 勝士，中島 文明，西村 泰治，平山 謙二，丸屋 悦子，屋部 登志雄

QC ワークショップ部会

部会長：木村 彰方

副部会長：成瀬 妙子

DNA 部門長：酒巻 建夫

DNA 副部門長：安波 道郎

抗体部門長：赤座 達也

抗体副部門長：中島 文明

部員：太田 正穂，柏瀬 貢一，小林 賢，田中 秀則，佐田 正晴，丸屋 悦子

● 総 説 ●

[シリーズ: 移植医療と組織適合性]

第 4 回

GVHD 制御と移植免疫寛容誘導の展望

豊嶋 崇徳

九州大学病院 遺伝子・細胞療法部

要約: 同種造血幹細胞移植後では、免疫系がドナー由来で置換されるにもかかわらず、移植後に免疫抑制を中止できる症例がまれではなく、このような例では免疫寛容が成立していると考えられる。寛容が成立しない症例では慢性 GVHD が発症する。この慢性 GVHD は、急性 GVHD による中枢性・末梢性寛容機構の破綻に関連して発症するのではないかと考えられるようになってきた。すなわち、移植免疫寛容は、ドナー由来の免疫系がレシピエントの体内で再構築される過程で、中枢性・末梢性寛容機構が正常に再構築することで達成されるものと考えられる。

キーワード: Graft-versus-host disease, Hematopoietic stem cell transplantation, Graft-versus-leukemia, Immune reconstitution, Tolerance

I. 造血幹細胞移植の歴史

1. 造血幹細胞移植の黎明期

1950年代に、致死量の放射線照射を受けたマウスが骨髄細胞の投与により救命されることが発見され、さっそく1957年には白血病患者に対し最初の骨髄移植が実施された。翌年、ユーゴスラビアで原子炉事故が発生し、その被爆者に対し骨髄移植が実施された。しかしこれらの症例では生着はみられず、ことごとく失敗に終わっている。その後、ヒト主要組織適合抗原 (HLA) が同定され、全身放射線療法などによる移植前処置法の開発、無菌室の導入などによって、造血幹細胞移植医療は次第に現在の形を整えるようになり、1968年に最初の生着例が報告された。わが国においても1970年代より同種骨髄移植が開始されたが、この頃は最大の合併症である移植片対宿主病 (Graft-versus-host disease: GVHD) の予

防が不十分で長期生存は困難であった。1980年代に入り cyclosporine (CSP) が GVHD 予防薬として導入され、移植成績が向上し、本治療法は急速に拡大していった。

2. 多様化する造血幹細胞移植

このように HLA 適合同胞(兄弟姉妹)間の造血幹細胞移植が普及していく間に、先進国ではすでに少子化時代に突入しており、同胞以外の HLA 適合ドナーを確保する必要性が生じてきた。このような中で、ボランティアドナーによる骨髄バンクが世界各国につくられ、現在では非血縁者間移植は血縁者間移植に匹敵するまで増加している。その後、骨髄以外の新たな造血幹細胞ソースとして末梢血幹細胞 (peripheral blood stem cells: PBSC) と臍帯血の臨床応用が始まり、産科医の協力によって臍帯血バンクも広がっていった。さらに、HLA 不適合骨髄移植

代表者連絡先 〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1
九州大学病院 遺伝子・細胞療法部
豊嶋 崇徳

電話 092-642-5947
F A X 092-642-5951
E-mail tteshima@cancer.med.kyushu-u.ac.jp

も試みられるようになり、1980年に最初の成功例が報告された。これには、移植片からT細胞が除去されたが、これにより重症GVHDが抑制された代償に拒絶が増加することが明らかになった。これに対し、1990年代より、大量の造血幹細胞・前駆細胞を含むPBSCを用いることによって、生着率の改善がみられるようになった。このような造血幹細胞の生着には骨髄破壊の前処置によって骨髄にスペースをつくる必要があると長い間信じられてきた。しかし基礎研究の進歩によって、生着と拒絶は、ドナー・レシピエント間でのT細胞競合と幹細胞競合によって規定されることが明らかにされ、移植前処置の目的はレシピエントT細胞の抑制であって、必ずしも骨髄破壊的である必要はないことがわかった。このようにして骨髄非破壊的前処置法が開発され、これを用いた移植 (reduced intensity conditioning stem cell transplantation: RIST) が、通常の骨髄破壊的移植の適応外であった高齢者、臓器障害を有する患者にも造血幹細胞移植が実施可能となった。このように造血幹細胞移植は、移植片拒絶とGVHD克服の歴史の中で多様化がすすんできており、今後もさらに多様化していくものと考えられる。

II. GVHD

1. GVHDとは

GVHDとはドナー由来のT細胞がレシピエントの細胞に発現する非自己抗原を認識し、活性化し、レシピエントを攻撃する疾患である。GVHDは従来、その発症時期により急性および慢性GVHDに分類され、移植後100日以内に発症するものを急性GVHD、それ以降に発症するものを慢性GVHDと定義されてきた(図1)。しかし、移植方法の多様化、とくにRISTの普及とともに、早期発症の慢性GVHDや、晩期発症の急性GVHDがみられるようになったこともあり、臨床像に重点をおいた分類に変更された¹⁾(表1)。急性GVHDは古典的(classical)急性GVHDと、100日以降に発症する非典型的急性GVHDに分類される。古典的急性GVHDは、斑丘疹状の皮疹、嘔気、嘔吐、るいそう、水様下痢、イレウス、胆汁うっ滞性肝炎などの典型的な臨床症状を呈する群で、非典型的急性GVHDは、古典的急性GVHDの臨床病態が100日以降も持続する持続型(persistent)、いったん軽快した急性GVHDが100日以降に再燃する再燃型(recurrent)、100日以降にあらたに発症する遅発性(late-onset)急性

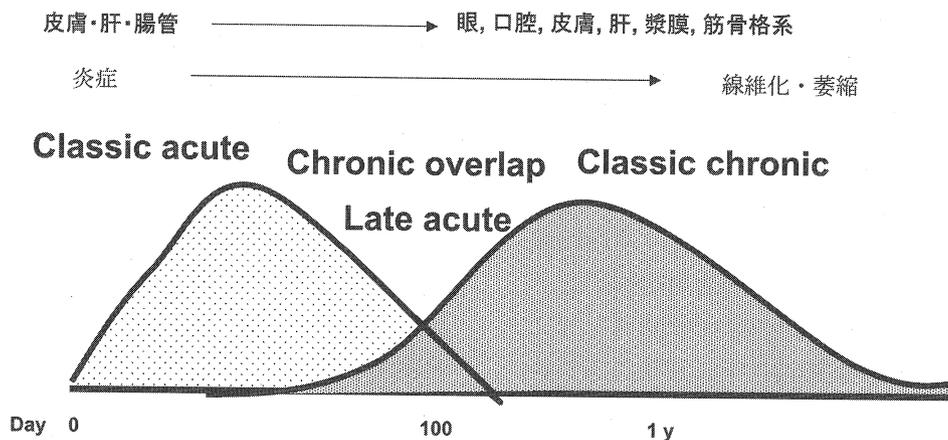


図1 急性GVHDと慢性GVHD

急性GVHDは100日以内に発症する古典的(classical)急性GVHDと、それ以降に発症する遅発性(late-onset)急性GVHDに分類される。慢性GVHDの診断には発症時期は問わず、従来型の古典的(classical)慢性GVHDと、急性GVHDと混在する重複型GVHD(overlap syndrome)に分類される。急性GVHDは皮膚・肝・腸管を中心とした炎症であるが、慢性GVHDではさまざまな臓器に萎縮・線維性変化がみられる。

表1 GVHD の分類

分類	亜分類	発症時期*	急性 GVHD 症状	慢性 GVHD 症状
急性 GVHD				
	古典的	100 日以内	あり	なし
	持続型, 再燃型, 遅発型	100 日以降	あり	なし
慢性 GVHD				
	古典的	規定なし	なし	あり
	重複型	規定なし	あり	あり

* 移植後あるいはドナーリンパ球輸注後

GVHD が含まれる。慢性 GVHD の診断には発症時期は問わず、従来型の古典的 (classical) 慢性 GVHD と、急性 GVHD と混在する重複型 GVHD (overlap syndrome) に分類される。

2. GVHD の標的抗原: HLA とマイナー組織適合性抗原

HLA 不適合移植においては、HLA 適合度と GVHD の発症率に相関がみられ、HLA 分子がマイナー組織適合性抗原 (minor histocompatibility antigen: mHA) とともに標的抗原となる。わが国ではとくに、HLA class I 分子の不適合が重症急性 GVHD の発症に関連する²⁾。日本骨髄移植財団では、非血縁者間骨髄移植の膨大なデータを解析し、HLA-A、-B、-C、-DRB1 の適合度に基づいたドナー選択の優先順位を推奨している (表 2)。さらに、HLA 遺伝的不適合の組み合わせによっても T 細胞応答の強度が異なるため、GVHD の発症に影響することが明らかになった³⁾。このように許容できる不適合の組み合わせと許容できない組み合わせが明らかになれば、今後のドナー選択のあらたな基準となっていくものと期待される。

一方、HLA 適合者間造血幹細胞移植では、アロ免疫反応は複数の mHA の相違により引き起こされていると考えられ、わが国においても臨床成績との関連が研究されてきた⁴⁾。mHA の多くはゲノム上に多数存在する一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) 由来のペプチドで、HLA 分子上に提示される⁵⁾。このような mHA はヒトでは数十個程

度が同定されているが、SNP が 100 万個以上存在すると想定されることから、さらに多数の mHA が存在すると考えられる。そのうち実際、GVHD を引き起こせる mHA の数は限られて、これらは “major minor” HA と呼ばれる。mHA は白血病細胞にも発現されうるため、GVHD のみならず、GVL 反応の格好の標的にもなる⁶⁾。

このような遺伝的相違のほかに、生体の免疫・炎症反応のパターンに関連するサイトカイン遺伝子などの多型性も注目されている。プロモーター領域の多型性は、遺伝子の発現量が変化しうるため、アロ抗原や感染の刺激に対するサイトカイン産生量の差異をもたらし、移植成績に影響しうる。もともと臓器移植において、tumor necrosis factor (TNF)-a 高産生型と、interleukin (IL)-10 低産生型が拒絶と相関することが報告されてきた経緯があり、両遺伝子の多型と GVHD や移植成績に関して多くの報告がなされている。とくに、日本人には IL-10 高産生型が多く、GVHD が少ない機序の一つではないかと考えられている⁷⁾。

3. 急性 GVHD の病態生理

急性 GVHD は同種造血幹細胞移植後早期にみられる皮疹・黄疸・下痢を特徴とする症候群で、移植片の宿主に対する免疫学的反応によるものと定義される。移植片から T 細胞を除去することで GVHD の発症が予防できることから、移植片に混入したドナー T 細胞、とくにナイーブ T 細胞が GVHD 発症の責任細胞であることが明らかにされている⁸⁾。この

表 2 HLA 適合度に基づく非血縁ドナー選択の優先順位(日本骨髄移植推進財団)

	A	B	C	DRB1	n	3年生存	急性 GVHD (grade3,4)
1	○	○	○	○	1,128	58%	13%
2	○	○	○	×	219	55	14
3	○	○	×	○	371	54	20
4	○	○	×	×	172	49	28
5a	×	○	○	○	155	42	22
5b	○	×	○	○	22	34	28
6a	○	×	×	○	84	37	31
6b	×	○	×	○	100	31	31
6c	×	○	○	×	30	35	15
6d	○	×	○	×	19	26	28
6e	×	×	○	○	7	ne	ne
7a	○	×	×	×	28	42	38
7b	×	○	×	×	47	31	35
7c	×	×	○	×	6	ne	ne
7d	×	×	×	○	34	30	41
8	×	×	×	×	19	24	28

ne: 症例が少なく解析せず. a, b, c, d, e は順位ではない.

ドナー T 細胞の主な活性化の部位はリンパ節・パウル板などの二次リンパ組織であることがマウスでの研究から示唆されている⁹⁾。さて、ドナー T 細胞にアロ抗原を提示し、活性化するのは抗原提示細胞 (antigen-presenting cell: APC) であるが、同種造血幹細胞移植後にはレシピエント由来、ドナー由来の APC が混在する非生理的な状態にある。レシピエント由来 APC はアロ抗原を MHC 上に直接提示し、ドナー由来 APC はレシピエント細胞から獲得したアロ抗原由来のペプチドを MHC 上に間接提示する。Shlomchik らはキメラマウスを用いて、このうちレシピエント由来 APC が GVHD の発症に重要であることを証明した¹⁰⁾。われわれはさらに APC サブセットのうち、樹状細胞 (dendritic cell: DC) がドナー T 細胞活性化の主役であることを証明した¹¹⁾。さらに、MHC 不適合移植においては、レシピエント由来の APC がアロ抗原を提示さえすれば、レシピ

エントの標的細胞にアロ抗原の発現はなくとも急性 GVHD は発症し、レシピエント由来の APC の存在が急性 GVHD 発症の必要十分条件であることを示した¹²⁾。造血幹細胞移植では移植前処置によって、レシピエント由来 DC の大多数は移植後すみやかに消失する。しかし、GVHD の維持には APC の持続的な存在が必要であると考えられ¹²⁾、放射線抵抗性の皮膚ランゲルハンス細胞やドナー由来 APC が GVHD の維持や重症化に関与するものと考えられている¹³⁾。

レシピエント由来 APC によって活性化されたドナー T 細胞は、IL-2 や interferon (IFN)- γ を産生する T_H1 細胞へと分化する。さらに急性 GVHD のエフェクターである cytotoxic T lymphocyte (CTL) と炎症性サイトカインが産生され、組織障害がおこる¹²⁾。CTL の主なエフェクター分子は Fas ligand と perforin/granzyme であり、肝細胞は Fas 依存性 CTL

に高感受性を示し、一方、腸管 GVHD では TNF- α が主要なエフェクターと考えられている¹⁴⁾。炎症性サイトカインの主な産生細胞は、ドナー由来の単球・マクロファージ系細胞と T 細胞の両者であると考えられる。前者はドナー T_H1 細胞によって産生される IFN- γ によってプライムされ、エンドトキシンなどの微生物由来成分などによる toll-like receptor (TLR) を介した刺激によって容易に TNF- α などの炎症性サイトカインを産生する。このような炎症性サイトカインの産生と関連する nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2) / caspase recruitment domain 15 (CARD15) 遺伝子の多型性と GVHD の発症、移植成績の関連性も報告されている¹⁵⁾。

4. 移植前処置と GVHD の関連

造血幹細胞移植が、他の臓器移植と異なる点として、移植前に強力な移植前処置(化学・放射線療法)が実施される点がある。実はこの移植前処置が、その後の GVHD の発症に大きく関わっている。シアトルでは骨髄移植を受ける第一寛解期の急性骨髄性白血病患者において、全身放射線照射 (total body irradiation: TBI) 12Gy と 15.75Gy のランダム化比較試験が実施され、後方で重症急性 GVHD の頻度が

有意に高かった¹⁶⁾。そのメカニズムの解析がマウスモデルで行われた。移植前処置、とくに TBI は組織に強い炎症をおこし、TNF- α 、IL-1、IL-6 などの炎症性サイトカインや熱ショック蛋白などの産生・放出を促す。これらいわゆる“danger signals”は、TLRなどを介して DC を活性化し、ドナー T 細胞活性化を促進する。また、移植前処置は腸管粘膜障害を惹起し、腸管内細菌が産生するエンドトキシン (lipopolysaccharide: LPS) などの血中流入がおこり、GVH 反応がさらに増幅される。このように、移植前にすでにドナー T 細胞を活性化する生体環境が整えられているわけで、GVHD 発症のプロセスは移植前に始まっているといえる¹⁷⁾。

5. 慢性 GVHD

CSP などによる GVHD 予防法の進歩に伴って、重症急性 GVHD の発症頻度の低下がみられているが、慢性 GVHD の減少は必ずしも達成されていない(表3)。このことは、カルシニューリン阻害剤を中心とした GVHD 予防法の限界を示している可能性も考えられる。さらに、移植医療技術の進歩に伴う長期生存例の増加、高齢者への移植適応の拡大、HLA 一致同胞以外のドナーの使用、末梢血幹細胞移

表3 GVHD 予防法の進歩が慢性 GVHD 発症に及ぼす影響

テスト群	コントロール群	急性GVHD	慢性GVHD	著者, 年
MTX+CSP	MTX	↓	→	Storb 89
CSP+mPSL	CSP	↓	↑	Deeg 97
CSP+MTX	CSP	↓	→	Storb 89
CSP+MTX+mPSL	CSP+MTX	↑	↑	Storb 90
CSP+mPSL+MTX	CSP+mPSL	NE	→	Ross 99
CSP+MTX	CSP+MTX	NE	↑	Chao 96
+thalidomide				
Tac+MTX	CSP+MTX	↓	→	Nash 00
5mg/kg CSP	2mg/kg CSP	↓	→	Bacigalupo 91
24mo CSP	6mo CSP	NE	→	Kansu 01

NE: 比較なし

植の普及，ドナーリンパ球輸注の増加，といった医療情勢の変化によって，さらなる慢性 GVHD の増加がみられるようになってきた。わが国では血縁者間・非血縁者間骨髄移植の約 50% に慢性 GVHD が発症し，慢性 GVHD の発症例では白血病再発は低下するものの，重症例では生命予後や quality of life に悪影響を及ぼしている^{18,19)}。

慢性 GVHD では涙腺，唾液腺といった腺組織や皮膚，粘膜，漿膜，肝，肺などが標的となるが，皮膚，肝臓，消化管，造血・リンパ組織が選択的に障害される急性 GVHD と異なる組織群が標的となる機序は明らかではない。慢性 GVHD では強皮症に類似した皮膚症状，食道狭窄，シェーグレン症候群に類似した涙腺，唾液腺炎，原発性胆汁性肝硬変に類似した肝障害，特発性血小板減少性紫斑病様の血小板減少症などを示し，自己免疫疾患との類似が指摘されている。

III. 免疫寛容

1. GVHD と免疫寛容

造血幹細胞移植後の長期生存例は，慢性 GVHD を発症し，免疫抑制剤の長期投与を受けているか，GVHD が発症しなかったか，いったん発症したもののその後終息し，免疫抑制剤が中止されているかのどちらかである。後者ではドナー・レシピエント間で免疫寛容が成立しているものと考えられる(図 2)。造血幹細胞移植では，免疫系もドナー型で置換される点で，他の臓器移植と大きく異なる点である。にもかかわらず，造血幹細胞移植後にはこのような免疫寛容がえられる例があり，基本的に終生免疫抑制剤を必要とする臓器移植と異なる。この免疫寛容の機序を考えるには，急性 GVHD がなぜ慢性 GVHD に移行していくのかを考えてみる必要がある。

移植片から厳格に T 細胞除去が行われた場合には，たとえ HLA 不適合間移植であっても，急性，慢性 GVHD の発症がきわめて低頻度であることから，急性 GVHD 同様に，移植片中に含まれるドナー T 細胞が慢性 GVHD の発症に関与するものと考えられる⁸⁾。従来，慢性 GVHD は，その発症の最大の危険因子が先行する急性 GVHD であることから，急性 GVHD の終末像であると考えられてきた。しかし，

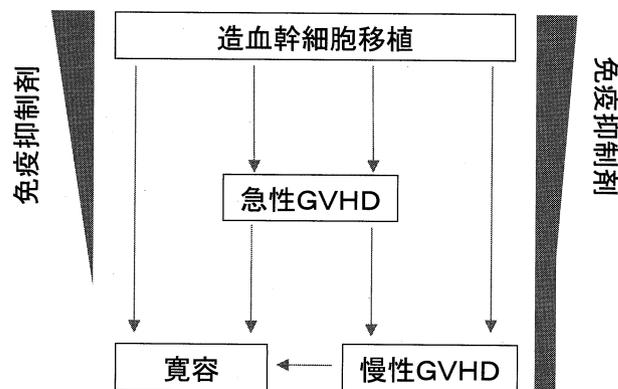


図 2 造血幹細胞移植後のドナー・ホスト寛容の成立

造血幹細胞移植後に GVHD を発症しない例，GVHD を発症するが，やがて終息し，免疫抑制剤を中止できる例があり，これらにはドナー・レシピエント間で免疫寛容が成立しているものと考えられる。一方，慢性 GVHD が発症し，免疫抑制剤の中止ができない例も多くみられる。

急性 GVHD のすべてが慢性 GVHD に移行するわけではないこと，急性 GVHD の先行なしに慢性 GVHD が発症しうること (de novo 慢性 GVHD)，CSP の導入以降の有効な GVHD 予防法の開発によって，急性 GVHD は着実に減少したものの，慢性 GVHD の減少が達成されていないこと(表 3)，標的臓器分布の違いなどから，最近では慢性 GVHD は急性 GVHD とは異なった病態に基づく疾患であると考えられるようになってきた。

2. 慢性 GVHD と自己免疫寛容の破綻

慢性 GVHD の臨床像が膠原病に類似することから，慢性 GVHD は同種(アロ)応答性と自己応答性の性格を有する疾患であるとも考えられている。アロ応答性 T 細胞が，HLA や mHA を標的とするのに対し，自己応答性 T 細胞は，非多型性 (non-polymorphic) 自己抗原を標的とする。女性ドナーから男性患者への移植では慢性 GVHD の頻度が高く，治療も遷延することが報告されている²⁰⁾。このような例では，mHA である H-Y 抗原に対する CTL 反応や抗体の産生がみられる場合がある^{21,22)}。Miklos らは，H-Y 抗体陰性の 11/36 例で慢性 GVHD が発症していたのに対し，陽性例では 34/39 例が慢性 GVHD を発症していたと報告した²²⁾。一方，慢性 GVHD 患者ではしばしば抗核抗体などの自己抗原が

検出される。Rouquette-Gally らは 53 例の長期生存例で抗核抗体が 62% に、抗平滑筋抗体が 49% に検出されたと報告している²³⁾。強皮症の患者では platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) に対する自己抗体が検出され、線維化に関連すると報告されているが、興味深いことに、この抗体が慢性 GVHD 患者でも検出されることが報告された²⁴⁾。また、同種造血幹細胞移植後にはしばしば proteinase (PR)—あるいは Wilms tumor 1 (WT1)—特異的 T 細胞が検出され、graft-versus-leukemia (GVL) 効果と関連することが示唆されている^{25, 26)}。この PR や WT1 は白血病細胞に高発現するが正常組織でも少量ながら発現あり、いわゆる自己抗原の一種であり、通常の個体では免疫寛容が成立していると考えられる。

以上の臨床的観察から、移植後、とくに慢性 GVHD を発症した患者では、自己免疫寛容が破綻している可能性が示唆される。また、マウスモデルに

おいては、急性 GVHD 発症が引き金となって自己応答性 T 細胞が出現することが示されている²⁷⁾。では、なぜ、アロ免疫反応である急性 GVHD によって、このような自己免疫の破綻がおこるのであるのか？ 最近の研究によれば、胸腺における negative selection は完全ではなく、一部自己応答性 T 細胞が健常人にも存在するらしい²⁸⁾。しかし、これらは通常、末梢性制御機構によって抑制されており、健常人では自己免疫疾患が発症しないとされる。移植片に含まれる自己応答性 T 細胞や、移植前処置や急性 GVHD によって傷害された胸腺から産生された自己応答性 T 細胞が²⁹⁻³¹⁾、移植後の末梢性制御機構が破綻した状態で活性化される可能性も考えられる(図 3)。実際、成人では胸腺が退縮しているものの、造血幹細胞移植後にも胸腺由来ナイーブ T 細胞が産生されることが明らかにされている^{32, 33)}。最近、われわれは、マウスモデルにおいて胸腺の negative se-

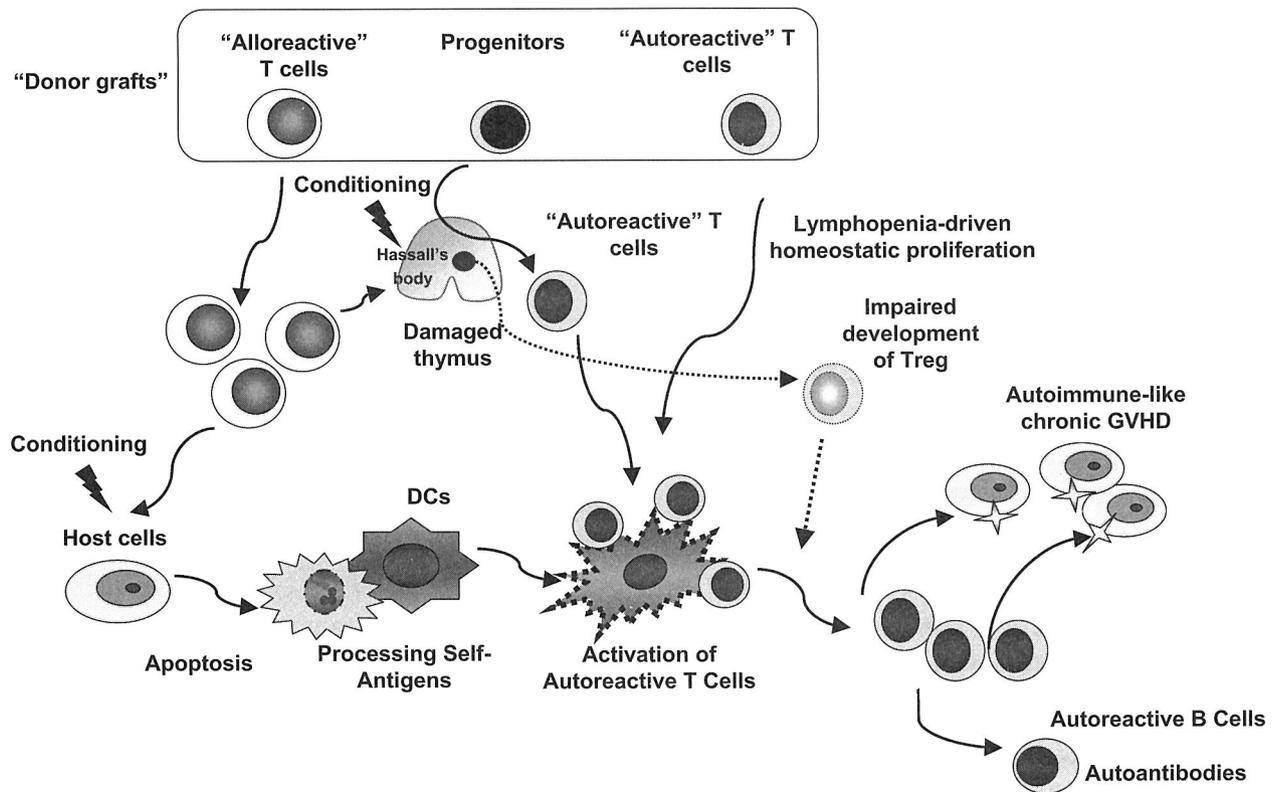


図 3 慢性 GVHD にみられる自己応答性の機序に関する仮説

ドナー由来あるいは移植前処置や急性 GVHD によって傷害された胸腺由来の自己応答性 T 細胞は、リンパ球減少環境にあって非特異的に活性化すると同時に、アポトーシスに陥った細胞から自己抗原が提示され、抗原特異的に活性化される。さらに、末梢性制御機構の破綻した状況ではこのような反応が抑制されない。

lection の機構に異常がある場合に、自己応答性 T 細胞が出現し³⁴⁾、慢性 GVHD の発症に関与しうることを証明した³⁵⁾。

このような自己応答性 T 細胞が活性化される機序としていくつかの可能性が考えられる(図 3)。1) 移植前処置によるリンパ球減少環境による、T 細胞の抗原非特異的活性化・増殖 (lymphopenia-driven proliferation: LIP)、2) 移植前処置や急性 GVHD によってホストの細胞がアポトーシスに陥り、自己抗原が提示されることによる自己応答性 T 細胞の活性化。このような現象は“epitope spreading”とよばれ、自己免疫疾患において複数の自己抗体が検出される機序の一つとされている。3) 胸腺障害や免疫抑制剤投与による制御性 T 細胞の産生・活性化の阻害、4) 移植後の GVHD や感染症などによる全身性炎症環境による、いわゆる“danger signal”による T 細胞活性化の促進、などが想定される。このように、アロ免疫反応である急性 GVHD と自己免疫寛容機構の破綻との関連性が示唆される。

3. 制御性 T 細胞

1980 年代に、慢性 GVHD を発症せず、ドナー・ホスト寛容が成立していると考えられる患者の末梢血中にアロ応答性を抑制しうる T 細胞が存在することが示された。その後、重症免疫不全症患児よりドナー由来の IL-10 産生性制御性 T 細胞 (Tr1) が同定され、GVHD の終息にはこのような“能動的”な抑制機序が関与している可能性が示唆された。現在ではこのような制御機構の主体は CD4+ CD25+ 制御性 T 細胞 (Treg) であると考えられている。移植片には Treg がアロ応答性 T 細胞とともに含まれており、両者のバランスによって GVHD の発症・寛容が規定される可能性が示唆されている³⁶⁾。Treg の活性化・増殖には IL-2 が必要であり、これを抑制するカルシニューリン阻害剤の投与下では Treg 再構築が障害される可能性がある³⁷⁾。また、Treg の新規産生には、胸腺の Hassall 小体が必要であるが、急性 GVHD による胸腺障害ではこの Hassall 小体はほぼ消失し、Treg の産生が阻害される^{31, 38, 39)}。最近、米国において抗 CD25 抗体 (daclizumab) の急性 GVHD に対する臨床試験が行われたが、期待に反し

て GVHD の重症化がみられた。その機序として、本抗体による Treg 抑制効果が示唆されている⁴⁰⁾。

4. HLA 適合度と免疫寛容

造血幹細胞移植後に免疫抑制剤中止できる症例のほとんどは HLA 適合移植を受けた例である。一方、HLA 不適合移植は慢性 GVHD 発症の危険因子であり、治療も遷延する²⁰⁾。とくに HLA 二座以上不適合の HLA 半合致移植では、免疫抑制剤を中止できないケースが多い。おそらく唯一の例外は、イタリアのグループからの報告であろう。彼らは、HLA 半合致移植を強力な T 細胞除去 (CD34 positive selection + ATG 投与) を実施することによって、移植後の免疫抑制剤なしに急性 GVHD 8%、慢性 GVHD 7% という驚くべき成績を報告した⁸⁾。長期生存者では、免疫系は十分に再構築され、T 細胞除去により急性 GVHD が発症しなければ、HLA 不適合であっても胸腺による免疫寛容機構と末梢寛容機構が良好に再構築される可能性を示唆する結果として興味深い。このグループは移植後にカルシニューリン阻害剤を全く投与しておらず、免疫再構築とドナー・ホスト寛容成立の観点から注目される。比較的均一な集団で、GVHD の頻度も低い日本人集団では、T 細胞除去なしに HLA 半合致移植が実施可能であることが明らかになり、今後の展開が期待される^{41, 42)}。

5. 母子間免疫寛容理論と造血幹細胞移植

同種免疫の観点から、妊娠寛容は大変興味深い現象である。母と胎児はお互いが HLA 半合致の「非自己」であるが、妊娠中は互いを拒絶しない。この妊娠時に成立する母子間免疫寛容を、現代の同種造血幹細胞移植に応用しようとする試みがなされている。母子間免疫寛容理論に基づく造血幹細胞移植は、昨今の少子化傾向の中で、新たなドナーソースを供給するものとして期待されている。

母の HLA ハプロタイプを a/b、父を c/d とするとき、同胞には a/c, a/d, b/c, b/d の 4 種類のハプロタイプが同確率で出現する。母親の HLA のうち、子供に遺伝しなかった HLA を、非遺伝母由来 HLA 抗原 (Non-Inherited Maternal Antigens; NIMA)、父親の HLA のうち、子供に遺伝した HLA を、遺伝

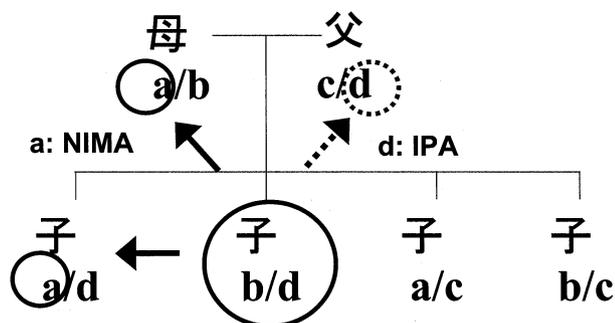


図4 NIMA と IPA の関係

HLA ハプロタイプを a/b の母, c/d の父から生まれた子 b/d からみて, 母や同胞の a 抗原は NIMA, 父の d 抗原は IPA である。妊娠中に互いに曝露される結果, 子は NIMA に対して, 母は IPA に対して, 寛容を獲得する可能性がある。

父由来 HLA 抗原 (Inherited Paternal Antigens; IPA) と呼ぶ^{43, 44)}。例えば, 子 b/d からみて, 母や同胞の a 抗原は NIMA, 父の d 抗原は IPA である (図 4)。NIMA, IPA は, それぞれ子, 母の免疫系にとって, 拒絶や GVHD の標的となるはずの同種抗原であるが, 妊娠中に互いに曝露される結果, 子は NIMA に対して, 母は IPA に対して, 寛容を獲得する可能性がある。

マウスモデルにおいては, 皮膚, 心移植において NIMA 効果による生着延長効果が認められている^{45, 46)}。われわれは, NIMA 骨髄移植モデルを作成し, その効果を検証した⁴⁷⁾。その結果, NIMA 曝露マウスからの子母間骨髄移植は, 急性 GVHD が軽症で生存率の改善がみられた。妊娠中の母体では Treg プールが増加しており, 対胎児寛容に関与しており⁴⁸⁾, NIMA 寛容にも Treg の関与が示唆されている⁴⁷⁾。

移植臨床においても, 1990 年代後半以降 NIMA 寛容を支持する報告が相次いだ。腎移植では, 不適合 HLA が NIMA である場合は生着率が高いことが報告された⁴⁹⁾。ただし, この NIMA 効果は CSP 導入以前のもので, CSP 導入後にはその差はみられていない。van Rood らは, NIMA 不適合同胞間移植では, 急性 GVHD, 慢性 GVHD や移植関連死の発症率が低いことを報告している⁵⁰⁾。わが国においても, このような IPA/NIMA コンセプトに基づく

HLA 不適合造血幹細胞移植が実施可能であることが報告された^{51, 52)}。ただし, ミクロキメリズムの有無と移植成績の関連性はあきらかでない⁵³⁾。現在, 前向き研究が進行中であり, その進展が期待されるが, 動物モデルでみられるような劇的な GVHD 抑制はみられておらず, さらなる工夫が必要なようである。

IV. GVHD の制御

1. GVHD 予防・治療法の現状とその問題点

現在の標準的 GVHD 予防法はカルシニューリン阻害剤である CSP あるいは tacrolimus (TAC) と methotrexate (MTX) の併用療法である。これにより, 重症急性 GVHD の発症頻度は低下したが, 長期予後に影響する慢性 GVHD の抑制は達成できていない (表 3)。第二の GVHD 予防法として T 細胞除去があり, ex vivo で移植片から除去する方法と, 抗体によって in vivo で除去する方法とがある。除去効率が 2 log 程度では GVHD の発症は抑制できず, 移植後の免疫抑制剤による GVHD 予防の追加が必要である。4 log 以上の除去効率が達成された場合には, 移植後の免疫抑制剤投与を省略可能である⁸⁾。しかし, T 細胞除去移植では高度の免疫不全を起こし, 移植後の日和見感染症や Epstein-Barr virus (EBV) 関連リンパ腫などの発症が問題となっている。急性 GVHD 治療の第一選択は methylprednisolone (mPSL) などのステロイド剤で, これに反応しない例の非再発死亡率は欧米では 50% をこえる⁵⁴⁾。ステロイド不応例に対する二次治療として ATG やステロイド・パルス療法などが行われたが, その有効率はおおむね約 40% 程度で, 無効例の 1 年生存率は約 10% と惨憺たるものである⁵⁵⁾。わが国では, GVHD 治療薬剤の多くは保険適応となっておらず, ステロイド不応例に対する二次治療の選択肢が限られている。このように, 現在の予防・治療法は免疫系, とくに T 細胞系を非特異的に抑制し, GVHD 自体による免疫抑制と相俟って, 感染症の増加は不可避であり, 生存率の向上までは達成されにくい状況にある。

2. アロ応答性ドナー T 細胞の選択的抑制

理想的な方法は, アロ応答性 T 細胞の選択的抑制

であり、大きく2つの方法が考えられている。一つはナイーブT細胞の除去で、これはGVHDの発症に関与するナイーブT細胞を選択的に除去することで、日和見感染症などに対するメモリーT細胞を温存する方法である。もう一は、アロ抗原の存在下に、ドナーT細胞を培養し、活性化したアロ応答性T細胞を選択的に除去する方法である。この方法は、すでに1990年代に、CTLA-4 Igの存在下に、ドナー骨髄を放射線照射したレシピエントの末梢血単核球と培養し、レシピエント応答性ドナーT細胞に対するアナジを誘導し、移植する臨床試験として実施された⁵⁶⁾。しかし、その効果は不十分でその後追試されていない。最近では、まず移植片を幹細胞分画とT細胞分画に分離し、T細胞分画を放射線照射したレシピエント細胞と培養し、活性化したT細胞、すなわちアロ応答性T細胞を除去する方法が考えられている⁵⁷⁾。活性化T細胞を除去する方法には細胞表面マーカーに対する抗体を用いて免疫学的に除去する方法や、光線療法を用いた photodepletion 法がある。これらの方法では、ドナー・レシピエント両者でのアフエレーシスによる白血球採取、good manufacturing practice (GMP) グレードの抗体、培養系を必要とする難点がある⁵⁷⁾。

このようなアロ応答性T細胞の選択的な除去は、理論的には *in vivo* においても達成可能である。活

性化されたドナーT細胞は生体内では最終的にアポトーシスに陥り、炎症の終息に関与する。これは活性化細胞死 (activation-induced cell death: AICD) と呼ばれ、生体におけるネガティブ・フィードバック機構の一つで、GVHDの終息に関与している可能性も指摘されている(図5)。たとえば、ドナーT細胞がAICDに必要な分子である perforin と Fas リガンドの両者を欠損している場合、アロ応答性T細胞プールは拡大を続け、GVHDが増悪する⁵⁸⁾。AICDにはIL-2が必要で、これを阻害するカルシニューリン阻害剤はAICDを抑制する可能性もある。抗CD3抗体である visilizumab は活性化されたT細胞にAICDを誘導する効果があり、現在その有効性が米国における臨床試験で検討されており、期待できる成績が報告されている⁵⁹⁾。われわれはリンパ節内におけるドナーT細胞と宿主APCの過剰な接触により、アロ応答性ドナーT細胞の過剰活性がおり、AICDが誘導されることによって、アロ応答性T細胞の選択的除去が達成できるのではないかと考えた。そこで、リンパ組織からのT細胞の遊走を阻害する作用を有するFTY720をマウスに投与し検討した。その結果、ドナーT細胞はリンパ節内で早期に活性化され、AICDによってその数を急速に減じ、アロ応答性の低下がみられ、GVHDの軽減がみられた⁶⁰⁾。

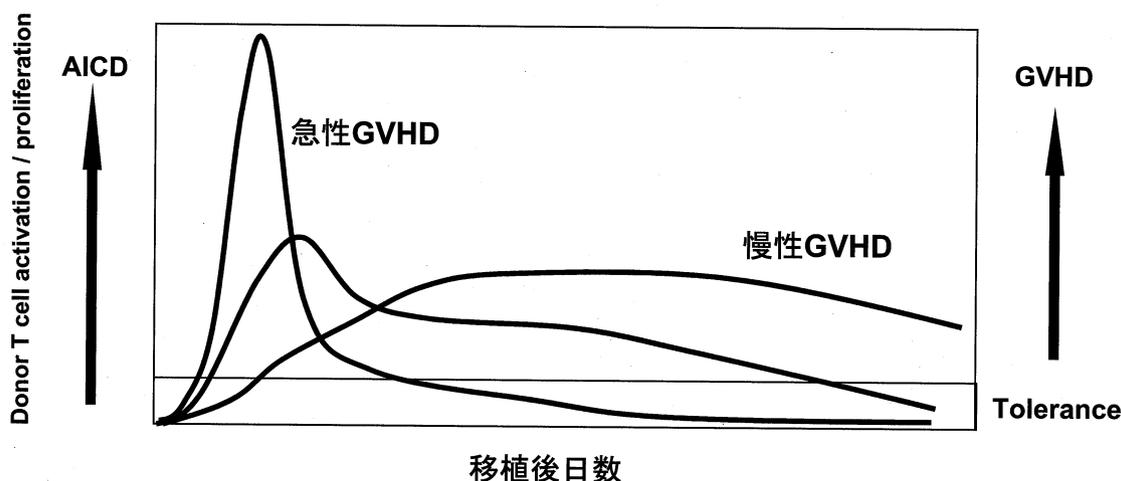


図5 GVHD, AICD と免疫寛容の関係

移植後にはドナーT細胞が活性化して急性GVHDが発症するが、のちにAICDの機序により、アロ応答性T細胞プールの縮小がおり、ある閾値以下になれば寛容へと向かう。一方、AICDが十分におこらない状況では、アロ応答性T細胞プールの十分な縮小がおきず、GVHDが遷延する。

3. DC を標的とした治療法

もっぱらドナー T 細胞を標的とした現在の GVHD 予防に対し、レシピエント DC も GVHD 予防の格好の標的細胞となりうるということが明らかとなった。有効な DC 特異的標的療法はまだ開発されていないが、T 細胞、B 細胞以外にも DC を標的としうる Campath-1H (抗 CD52 抗体) が臨床応用されており、その DC 標的作用が注目される。一方、DC による T 細胞活性化を抑制するには、副刺激系路の阻害が有効である。さまざまな副刺激系路の阻害がマウスモデルにおいて研究されている。ただ、T 細胞サブセットによってその効果は異なり、多くの TNF superfamily 経路の阻害は CD4 依存性 GVHD に有効であるが、CD8 依存性 GVHD に有効なものは限られている。CD11b^{hi}Gr1^{lo} の形質を持つ APC も免疫抑制作用を示し、最近注目されている⁶¹⁾。Progenipointin-1 は G-CSF と Flt3 ligand の受容体に対する合成アゴニストであるが、本細胞を劇的に増加させ、IL-10 産生性抑制性 T 細胞の増加を介して GVHD を抑制可能なことがマウスモデルで示されている。Histone deacetylase 阻害剤は抗腫瘍剤として開発されたが、DC 機能を修飾することによって GVHD 抑制効果があることが示され、さらなる作用機序の解明が待たれる⁶²⁾。Extracorporeal photopheresis は慢性 GVHD の、とくに皮膚病変に対して有効性が報告されているが、この作用機序として、光線療法によって末梢血白血球のアポトーシスが誘導され、DC を介して T 細胞性を抑制するとされる。

4. サイトカイン阻害

急性 GVHD のエフェクターである炎症性サイトカインを阻害する試みが臨床試験において検討された。TNF- α 抗体である infliximab は標準的治療法である mPSL を上回る効果はみられなかったが⁶³⁾、etanercept は有用性を示唆する成績が報告されている⁶⁴⁾。また IL-1 を中和する IL-1 レセプター・アンタゴニストの有用性も示されなかった。興味深いことに、IL-1 阻害例では TNF- α の血中濃度が上昇しており、複雑なサイトカインネットワークを考えると、単独のサイトカインの阻害では十分な効果が期待しにくいものと考えられる。炎症性サイトカイン

の産生を間接的に抑制する IL-11, keratinocyte growth factor (KGF) の GVHD 予防効果も検討されたが、明らかな効果は示されなかった。このような結果から、多様な GVHD のエフェクター機能の一部を抑制する方法では、劇的な効果は期待できないということが明らかになった。しかし、このような方法は全否定されるものではなく、たとえば難治性腸管急性 GVHD に対して TNF 阻害が有効な例があり、罹患臓器などによっては治療選択肢として考慮されている。最近、プロテアーゼ阻害剤である bortezomib は多発性骨髄腫に対する新たな抗腫瘍剤として知られているが、炎症性サイトカイン産生を抑制し、GVHD 抑制効果があることがマウスモデルで示され注目されたが、投与時期によっては、GVHD を増悪させる可能性も示されており、さらなる検討が必要である⁶⁵⁾。

前述したように、腸管は GVHD の発症に密接に関与する。移植前処置による腸管傷害によって血中に流入する LPS の関与が GVHD の重症化に関与し、LPS 阻害剤の投与により GVHD の軽症化が可能であることがマウスモデルにおける研究によって示されている⁶⁶⁾。また、マウスに Probiotic 細菌である乳酸菌を投与することで、GVHD の軽減が図れるとする報告があり、このような腸内細菌、その菌体成分を標的とした予防法も、臨床応用へと進みつつある⁶⁷⁾。

5. B 細胞標的療法

リンパ組織は GVHD の標的組織であるため、免疫不全は急性・慢性 GVHD に一貫してみられる。慢性 GVHD ではこれにさらに免疫異常が加わり、しばしば IgG, IgM の増加や、M 蛋白、自己抗体の出現がみられる²³⁾。マウスモデルにおいては以前より慢性 GVHD における B 細胞・液性免疫異常が示唆されてきたが、最近、移植片から B 細胞を除去することで慢性 GVHD の発症を予防できることが示された⁶⁸⁾。ヒトでも急性リンパ性白血病に対する移植前処置に B 細胞を標的とする抗 CD20 抗体 (rituximab) を加えることで GVHD が軽減する可能性も示唆されており興味深い⁶⁹⁾。また、rituximab は慢性 GVHD の治療にも有効であることが示され、慢

性 GVHD の病態における B 細胞の関与が証明された⁷⁰⁾。

6. 細胞療法

Treg の移植後の再構築は免疫抑制剤の投与や急性 GVHD の発症によって阻害される。新たな免疫抑制剤である sirolimus や mycophenolate mofetil (MMF) は IL-2 産生を阻害しないため Treg 再構築を阻害せず、移植免疫寛容導入に適した薬剤である可能性が示唆されている³⁷⁾。また Treg 細胞療法の臨床応用のために、Treg を分離し増殖する方法も検討されている。とくに、Treg はその非特異性から、生体全体の免疫機能を抑制する可能性があり、その臨床応用にあたり、移植後の免疫再構築に及ぼす悪影響が危惧されている。そこで、ex vivo で増幅する際にレシピエントの細胞と共培養することによってアロ抗原特異的 Treg を増幅しようという試みもなされ、このような方法で増幅された Treg の抗原特異性はある程度みられている⁷¹⁾。今後は感染モデルとの組み合わせにより、機能的な免疫再構築に対する影響を検討する必要があるだろう。一方、GVL 効果の標的抗原も腫瘍抗原ではなくアロ抗原であり⁷²⁾、Treg の投与によって GVL 効果も抑制される可能性がある。また、IL-10 存在下にレシピエント抗原特異的 Tr1 を誘導する方法も臨床応用にむけ、検討されている。

DC を利用して in vivo で Treg を誘導する方法も検討されている。Sato らは、マウスモデルにおいて GM-CSF, IL-10, TGF- β の存在下で骨髓細胞を培養して得られるレシピエント由来制御性 DC を骨髓移植後に投与すると、Treg が誘導され、GVHD が軽減することを報告した⁷³⁾。

NK 細胞は killer immunoglobulin-like receptors (KIR) によって、細胞表面上の自己 HLA class I 発現を監視している。抑制性 KIR リガンドの多くは HLA-C 分子であり、KIR2D が認識する。従って、HLA-C 抗原不適合移植では、ドナー由来アロ応答性 NK 細胞がレシピエントを攻撃しうるため、KIR とリガンド間不適合による NK 細胞アロ応答性が造血幹細胞移植成績に影響することが報告されている。造血幹細胞移植医療の最終目標は、拒絶と GVHD の抑制と GVL 効果の増強であるが、最近、イタリア

のグループによって、このアロ応答性 NK 細胞によってこれらが達成できる可能性が示され注目されている⁷⁴⁾。すなわち、HLA 不適合移植において、GVH 方向の KIR リガンド不適合がある場合、拒絶、GVHD が少なく、白血病再発率が低率であることが報告されたわけである。マウスモデルにおける検討によって、アロ応答性 NK 細胞が拒絶をおこすレシピエント T 細胞と、GVHD 発症に必須であるレシピエント DC を標的とことが示され、これらによって拒絶と GVHD が抑制する可能性が示された⁷⁴⁾。しかし、一見、万能であるかにみえるアロ応答性 NK 細胞に関して以下の点について注意する必要がある。第一にこのような NK 細胞の効果は、T 細胞除去によってアロ応答性ドナー T 細胞の影響が排除された場合にのみ観察され、通常の移植では認められていない。たとえば、わが国における非血縁者間骨髓移植 1790 例の解析においては、KIR リガンド GVH 方向不適合で、逆に急性 GVHD 発症率、死亡率が高かった⁷⁵⁾。すなわち KIR リガンド不適合の多くは HLA-C 不適合であり、これを認識した T 細胞によって GVHD が発症するからだと考えられる。次に、ATG 投与を受けた例のみで解析したところ、逆に KIR リガンド GVH 方向不適合で GVHD の低下がみられた⁷⁶⁾。このような結果から、将来的に NK 細胞療法を考慮する際には、T 細胞除去との併用を考慮する必要があるのかもしれない。第二に、HLA 適合移植における NK 細胞の意義はよくわかっていない。第三に、白血病再発率の低下は急性骨髄性白血病のみでみられ、リンパ性白血病ではその効果は観察されていない。白血病細胞上に発現する接着因子の相違などが関連する可能性も示唆されている。

NKT 細胞は IL-4 産生を介して GVHD 抑制作用を有することがマウスモデルで示されてきた。そこで、拒絶に関与するレシピエント T 細胞を抑制しながら、NKT 細胞を温存しうる新たな移植前処置法である、ATG + total lymphoid irradiation (TLI) が開発された⁷⁷⁾。NKT 細胞が実際関与しているかどうかは明らかではないものの、本法によって劇的な急性 GVHD の発症抑制が達成された。しかし、TLI の実施は手技的に煩雑であるため、われわれは NKT 細胞を活性化する合成リガンドである α -galactosyl-

ceramide を移植前処置に組み込むことで、GVHD 抑制効果が達成できることをマウスモデルで示した⁷⁸⁾。その効果はレシピエント NKT 細胞の IL-4 産生とドナーの Th2 応答性に依存性であった。一方、この NKT 細胞リガンドを用いて、NKT 細胞を増幅し、細胞療法に応用しようという研究も行われている。

間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) は骨髄に存在し、線維芽細胞、脂肪細胞、骨芽細胞、内皮細胞などの多彩な細胞に分化し、骨髄微細環境を構成する。この MSC は骨髄採取片には含まれるが、末梢血幹細胞移植片には含まれていないとされる。もともとこの MSC は混合リンパ球培養の反応を抑制することでも知られていた。最近、非血縁者間移植後の IV 度の急性 GVHD に対し、母親の骨髄を培養してえた MSC を投与し、その劇的な効果が報告された⁷⁹⁾。その後欧州の多施設で重症急性 GVHD に対する臨床試験が進行中である。一方、米国では、ボランティアドナーから採取した骨髄より、MSC を培養で大量に増幅し、これを第三者である多数の患者に投与する臨床試験が実施されている。また、脂肪細胞由来の MSC も臨床応用が開始されている。この MSC の作用機序として、IL-10 産生、免疫担当細胞のサイトカイン産生能修飾、indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) 活性によるもの、細胞回転停止など多彩なものが報告されている。また治療効果の発現が早い例があることがしられ、組織の修復に関与している可能性も示唆されている。この場合、修復された組織は MSC 由来ではなく、患者由来であることから、MSC がレシピエント組織の再生を補助しているのではと考えられている。Ikehara らは骨髄細胞とともに MSC を効率よく採取するため、長管骨還流法による骨髄採取法を開発した⁸⁰⁾。さらに、これを経静脈的でなく、直接骨髄内に骨髄移植することによって、生着の促進効果もみられると報告しており、臨床応用の結果がまたれる⁸⁰⁾。

おわりに

造血幹細胞移植は長い試行錯誤の歴史の中で、移植免疫寛容に関する重要な知見が蓄積されてきた。とくに他の臓器移植と異なり、ドナー由来の免疫再構築がおこり、その過程で GVHD・寛容が決定づけ

られていくものと考えられる。最近では、移植から免疫・細胞療法への展開がみられるようになり、他の医療分野に先駆けたパイオニア的な臨床研究が展開されつつある。今後も基礎・臨床の一体となった研究の展開が望まれる。

文 献

1. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005; 11: 945–956.
2. Morishima Y, Sasazuki T, Inoko H, et al. The clinical significance of human leukocyte antigen (HLA) allele compatibility in patients receiving a marrow transplant from serologically HLA-A, HLA-B, and HLA-DR matched unrelated donors. *Blood.* 2002; 99: 4200–4206.
3. Kawase T, Morishima Y, Matsuo K, et al. High-risk HLA allele mismatch combinations responsible for severe acute graft-versus-host disease and implication for its molecular mechanism. *Blood.* 2007; 110: 2235–2241.
4. Maruya E, Saji H, Seki S, et al. Evidence that CD31, CD49b, and CD62L are immunodominant minor histocompatibility antigens in HLA identical sibling bone marrow transplants. *Blood.* 1998; 92: 2169–2176.
5. Kawase T, Nanya Y, Torikai H, et al. Identification of human minor histocompatibility antigens based on genetic association with highly parallel genotyping of pooled DNA. *Blood.* 2008.
6. Katagiri T, Shiobara S, Nakao S, et al. Mismatch of minor histocompatibility antigen contributes to a graft-versus-leukemia effect rather than to acute GVHD, resulting in long-term survival after HLA-identical stem cell transplantation in Japan. *Bone Marrow Transplant.* 2006; 38: 681–686.
7. Lin MT, Storer B, Martin PJ, et al. Relation of an

- interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2003; 349: 2201–2210.
8. Aversa F, Terenzi A, Tabilio A, et al. Full haplo-type-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukemia at high risk of relapse. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 3447–3454.
 9. Murai M, Yoneyama H, Ezaki T, et al. Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction. *Nat Immunol.* 2003; 4: 154–160.
 10. Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, et al. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science.* 1999; 285: 412–415.
 11. Duffner UA, Maeda Y, Cooke KR, et al. Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease. *J Immunol.* 2004; 172: 7393–7398.
 12. Teshima T, Ordemann R, Reddy P, et al. Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat Med.* 2002; 8: 575–581.
 13. Merad M, Hoffmann P, Ranheim E, et al. Depletion of host Langerhans cells before transplantation of donor alloreactive T cells prevents skin graft-versus-host disease. *Nat Med.* 2004; 10: 510–517.
 14. van den Brink MR, Burakoff SJ. Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2: 273–281.
 15. Holler E, Rogler G, Brenmoehl J, et al. Prognostic significance of NOD2/CARD15 variants in HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation: effect on long-term outcome is confirmed in 2 independent cohorts and may be modulated by the type of gastrointestinal decontamination. *Blood.* 2006; 107: 4189–4193.
 16. Clift RA, Buckner CD, Appelbaum FR, et al. Allogeneic marrow transplantation in patients with acute myeloid leukemia in first remission: a randomized trial of two irradiation regimens. *Blood.* 1990; 76: 1867–1871.
 17. Ferrara JL, Cooke KR, Teshima T. The pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Int J Hematol.* 2003; 78: 181–187.
 18. Atsuta Y, Suzuki R, Yamamoto K, et al. Risk and prognostic factors for Japanese patients with chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2006; 37: 289–296.
 19. Ozawa S, Nakaseko C, Nishimura M, et al. Chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation from an unrelated donor: incidence, risk factors and association with relapse. A report from the Japan Marrow Donor Program. *Br J Haematol.* 2007; 137: 142–151.
 20. Stewart BL, Storer B, Storek J, et al. Duration of immunosuppressive treatment for chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 2004; 104: 3501–3506.
 21. Zorn E, Miklos DB, Floyd BH, et al. Minor histocompatibility antigen DBY elicits a coordinated B and T cell response after allogeneic stem cell transplantation. *J Exp Med.* 2004; 199: 1133–1142.
 22. Miklos DB, Kim HT, Miller KH, et al. Antibody responses to H-Y minor histocompatibility antigens correlate with chronic graft-versus-host disease and disease remission. *Blood.* 2005; 105: 2973–2978.
 23. Rouquette-Gally AM, Boyeldieu D, Prost AC, Gluckman E. Autoimmunity after allogeneic bone marrow transplantation. A study of 53 long-term-surviving patients. *Transplantation.* 1988; 46: 238–240.
 24. Svegliati S, Olivieri A, Campelli N, et al. Stimulatory autoantibodies to PDGF receptor in patients with extensive chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 2007; 110: 237–241.

25. Molldrem JJ, Lee PP, Wang C, et al. Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nat Med.* 2000; 6: 1018–1023.
26. Rezvani K, Yong AS, Savani BN, et al. Graft-versus-leukemia effects associated with detectable Wilms tumor-1 specific T lymphocytes following allogeneic stem cell transplantation for acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood.* 2007; 110: 1924–1932.
27. Tivol E, Komorowski R, Drobyski WR. Emergent autoimmunity in graft-versus-host disease. *Blood.* 2005; 105: 4885–4891.
28. Danke NA, Koelle DM, Yee C, Beheray S, Kwok WW. Autoreactive T cells in healthy individuals. *J Immunol.* 2004; 172: 5967–5972.
29. Fukushi N, Arase H, Wang B, et al. Thymus: a direct target tissue in graft-versus-host reaction after allogeneic bone marrow transplantation that results in abrogation of induction of self-tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87: 6301–6305.
30. Hollander GA, Widmer B, Burakoff SJ. Loss of normal thymic repertoire selection and persistence of autoreactive T cells in graft vs. host disease. *J Immunol.* 1994; 152: 1609–1617.
31. Desbarats J, Lapp WS. Thymic selection and thymic major histocompatibility complex class II expression are abnormal in mice undergoing graft-versus-host reactions. *J Exp Med.* 1993; 178: 805–814.
32. Douek DC, Vescio RA, Betts MR, et al. Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. *Lancet.* 2000; 355: 1875–1881.
33. Lewin SR, Heller G, Zhang L, et al. Direct evidence for new T-cell generation by patients after either T-cell-depleted or unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantations. *Blood.* 2002; 100: 2235–2242.
34. Teshima T, Reddy P, Liu C, Williams D, Cooke KR, Ferrara JL. Impaired thymic negative selection causes autoimmune graft-versus-host disease. *Blood.* 2003; 102: 429–435.
35. Sakoda Y, Hashimoto D, Asakura S, et al. Donor-derived thymic-dependent T cells cause chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 2007; 109: 1756–1764.
36. Cohen JL, Trenado A, Vasey D, Klatzmann D, Salomon BL. CD4(+) CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J Exp Med.* 2002; 196: 401–406.
37. Zeiser R, Nguyen VH, Beilhack A, et al. Inhibition of CD4+ CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. *Blood.* 2006; 108: 390–399.
38. Gartner JG. Thymic involution with loss of Hassall's corpuscles mimicking thymic dysplasia in a child with transfusion-associated graft-versus-host disease. *Pediatr Pathol.* 1991; 11: 449–456.
39. Watanabe N, Wang YH, Lee HK, et al. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+ CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature.* 2005; 436: 1181–1185.
40. Lee SJ, Zahrieh D, Agura E, et al. Effect of upfront daclizumab when combined with steroids for the treatment of acute graft-versus-host disease: results of a randomized trial. *Blood.* 2004; 104: 1559–1564.
41. Oh H, Loberiza FR, Jr., Zhang MJ, et al. Comparison of graft-versus-host-disease and survival after HLA-identical sibling bone marrow transplantation in ethnic populations. *Blood.* 2005; 105: 1408–1416.
42. Ikegame K, Tanji Y, Kitai N, et al. Successful treatment of refractory T-cell acute lymphoblastic leukemia by unmanipulated stem cell transplantation from an HLA 3-loci mismatched (haploidentical) sibling. *Bone Marrow Trans-*

- plant. 2003; 31: 507–510.
43. Ichinohe T, Teshima T, Matsuoka K, Maruya E, Saji H. Fetal-maternal microchimerism: impact on hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Immunol.* 2005; 17: 546–552.
 44. Teshima T, Matsuoka K, Ichinohe T. Impact of fetal-maternal tolerance in hematopoietic stem cell transplantation. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2006; 54: 165–172.
 45. Zhang L, Miller RG. The correlation of prolonged survival of maternal skin grafts with the presence of naturally transferred maternal T cells. *Transplantation.* 1993; 56: 918–921.
 46. Andrassy J, Kusaka S, Jankowska-Gan E, et al. Tolerance to noninherited maternal MHC antigens in mice. *J Immunol.* 2003; 171: 5554–5561.
 47. Matsuoka K, Ichinohe T, Hashimoto D, Asakura S, Tanimoto M, Teshima T. Fetal tolerance to maternal antigens improves the outcome of allogeneic bone marrow transplantation by a CD4+ CD25+ T-cell-dependent mechanism. *Blood.* 2006; 107: 404–409.
 48. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol.* 2004; 5: 266–271.
 49. Burlingham WJ, Grailer AP, Heisey DM, et al. The effect of tolerance to noninherited maternal HLA antigens on the survival of renal transplants from sibling donors. *N Engl J Med.* 1998; 339: 1657–1664.
 50. van Rood JJ, Loberiza FR, Jr., Zhang MJ, et al. Effect of tolerance to noninherited maternal antigens on the occurrence of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation from a parent or an HLA-haploidentical sibling. *Blood.* 2002; 99: 1572–1577.
 51. Shimazaki C, Ochiai N, Uchida R, et al. Non-T-cell-depleted HLA haploidentical stem cell transplantation in advanced hematologic malignancies based on the fetomaternal microchimerism. *Blood.* 2003; 101: 3334–3336.
 52. Ichinohe T, Uchiyama T, Shimazaki C, et al. Feasibility of HLA-haploidentical hematopoietic stem cell transplantation between noninherited maternal antigen (NIMA)-mismatched family members linked with long-term fetomaternal microchimerism. *Blood.* 2004; 104: 3821–3828.
 53. Ochiai N, Inaba T, Maruya E, Saji H, Nakagawa M, Shimazaki C. Feto-maternal microchimerism does not indicate the existence of fetomaternal immunological tolerance in human leucocyte antigen haploidentical haematopoietic stem cell transplantation from mother to offspring. *Br J Haematol.* 2003; 122: 869–870.
 54. Martin PJ, Schoch G, Fisher L, et al. A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. *Blood.* 1990; 76: 1464–1472.
 55. Martin PJ, Schoch G, Fisher L, et al. A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: secondary treatment. *Blood.* 1991; 77: 1821–1828.
 56. Guinan EC, Boussiotis VA, Neuberg D, et al. Transplantation of anergic histoincompatible bone marrow allografts. *N Engl J Med.* 1999; 340: 1704–1714.
 57. Mielke S, Nunes R, Rezvani K, et al. A clinical scale selective allodepletion approach for the treatment of HLA-mismatched and matched donor-recipient pairs using expanded T lymphocytes as antigen-presenting cells and a TH9402-based photodepletion technique. *Blood.* 2007; online.
 58. Maeda Y, Levy RB, Reddy P, et al. Both perforin and Fas ligand are required for the regulation of alloreactive CD8+ T cells during acute graft-versus-host disease. *Blood.* 2005; 105: 2023–2027.
 59. Carpenter PA, Lowder J, Johnston L, et al. A phase II multicenter study of visilizumab, humanized anti-CD3 antibody, to treat steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005; 11: 465–471.
 60. Hashimoto D, Asakura S, Matsuoka K, et al.

- FTY720 enhances the activation-induced apoptosis of donor T cells and modulates graft-versus-host disease. *Eur J Immunol.* 2007; 37: 271–281.
61. MacDonald KP, Rowe V, Clouston AD, et al. Cytokine expanded myeloid precursors function as regulatory antigen-presenting cells and promote tolerance through IL-10-producing regulatory T cells. *J Immunol.* 2005; 174: 1841–1850.
 62. Reddy P, Maeda Y, Hotary K, et al. Histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid reduces acute graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia effect. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 3921–3926.
 63. Couriel D, Saliba R, Hicks K, et al. Tumor necrosis factor-alpha blockade for the treatment of acute GVHD. *Blood.* 2004; 104: 649–654.
 64. Levine JE, Paczesny S, Mineishi S, et al. Etanercept plus methylprednisolone as initial therapy for acute GVHD. *Blood.* 2007.
 65. Sun K, Wilkins DE, Anver MR, et al. Differential effects of proteasome inhibition by bortezomib on murine acute graft-versus-host disease (GVHD): delayed administration of bortezomib results in increased GVHD-dependent gastrointestinal toxicity. *Blood.* 2005; 106: 3293–3299.
 66. Cooke KR, Gerbitz A, Crawford JM, et al. LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation. *J Clin Invest.* 2001; 107: 1581–1589.
 67. Gerbitz A, Schultz M, Wilke A, et al. Probiotic effects on experimental graft-versus-host disease: let them eat yogurt. *Blood.* 2004; 103: 4365–4367.
 68. Zhang C, Todorov I, Zhang Z, et al. Donor CD4+ T and B cells in transplants induce chronic graft-versus-host disease with autoimmune manifestations. *Blood.* 2006; 107: 2993–3001.
 69. Kebriaei P, Saliba RM, Ma C, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation after rituximab-containing myeloablative preparative regimen for acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2006; 38: 203–209.
 70. Cutler C, Miklos D, Kim HT, et al. Rituximab for steroid-refractory chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 2006; 108: 756–762.
 71. Trenado A, Charlotte F, Fisson S, et al. Recipient-type specific CD4+ CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. *J Clin Invest.* 2003; 112: 1688–1696.
 72. Reddy P, Maeda Y, Liu C, Krijanovski OI, Korngold R, Ferrara JL. A crucial role for antigen-presenting cells and alloantigen expression in graft-versus-leukemia responses. *Nat Med.* 2005; 11: 1244–1249.
 73. Sato K, Yamashita N, Baba M, Matsuyama T. Regulatory dendritic cells protect mice from murine acute graft-versus-host disease and leukemia relapse. *Immunity.* 2003; 18: 367–379.
 74. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of Donor Natural Killer Cell Alloreactivity in Mismatched Hematopoietic Transplants. *Science.* 2002; 295: 2097–2100.
 75. Morishima Y, Yabe T, Matsuo K, et al. 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.* 2007; 13: 315–328.
 76. Yabe T, Matsuo K, Hirayasu K, et al. Donor killer immunoglobulin-like receptor (KIR) genotype-patient cognate KIR ligand combination and antithymocyte globulin preadministration are critical factors in outcome of HLA-C-KIR ligand-mismatched T cell-replete unrelated bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008; 14: 75–87.

77. Lowsky R, Takahashi T, Liu YP, et al. Protective conditioning for acute graft-versus-host disease. *N Engl J Med.* 2005; 353: 1321–1331.
78. Hashimoto D, Asakura S, Miyake S, et al. Stimulation of host NKT cells by synthetic glycolipid regulates acute graft-versus-host disease by inducing Th2 polarization of donor T cells. *J Immunol.* 2005; 174: 551–556.
79. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet.* 2004; 363: 1439–1441.
80. Ikehara S. Innovative BMT methods for intractable diseases. *Immunol Res.* 2007; 38: 251–260.

● 総 説 ●

[シリーズ：移植医療と組織適合性]

第 4 回

献腎移植の現場での HLA 検査とクロスマッチ

杉谷 篤*, 北田 秀久, 岡部 安博, 土井 篤, 錦 建宏, 西岡 泰信, 劉 勇, 田中 雅夫

九州大学臨床・腫瘍外科

(*現：藤田保健衛生大学 臓器移植再生医学講座)

要約：本邦で献腎移植を希望する患者は、初回3万円、毎年更新時5千円をネットワークに納入して、平均14年間の待機期間の後に、ようやく献腎移植が受けられる状況である。その選定と優先順位は厳格に規定されており、ドナー血液とのクロスマッチテストが陰性でなければ最終的に受けることはできない。待機患者のHLAタイピングも現在は血清学的方法が用いられているが、精度の向上と選定時のマッチ数判定に今後はDNAタイピングによる4桁アレルの採用が望まれる。クロスマッチテストの判定も現行は血清学的方法で行われているが、より敏感なFlowcyteの普及とともにFlow-PRA, Flowcytometric crossmatch陽性率も上昇している。移植後の抗体生成による慢性拒絶に対する方策も必要である。より良い移植成績を残すためにも、移植医と組織適合性検査を担うスタッフが相互の現状、問題点を真摯に理解、相互協力しようとする努力が欠かせない。

キーワード：腎移植、組織適合性検査、クロスマッチ、HLA、PRA、フローサイト、抗体拒絶

はじめに

2007年末現在、本邦における透析患者は26万人を超え透析医療費は国民医療費を圧迫しているが、献腎移植、臓器提供は遅々としてすすまない。ネットワークに登録して献腎移植が受けられるまでの平均待機期間が14年と延長しており、移植に対する患者の期待感も薄らぎ、登録患者数も増えてこない。最終的にレシピエントとして献腎を受けるためには、ネットワークが管理する国内各地に設置されたHLAセンターでTリンパ球に対するダイレクトクロスマッチが陰性でなければならない。本稿では、実例のいくつかを提示して、本邦における献腎移植と

HLA検査の現状と問題点を述べる。

献腎移植の登録待機患者と組織適合性検査

献腎移植の待機患者として日本臓器移植ネットワーク(JOTN)に登録されると、図1のような「腎臓移植希望者情報」が移植希望施設に送られてくる。これは、登録患者の名前、住所、年齢などの「個人情報」、連絡先、移植実施希望病院、登録歴などの「基本情報」、原疾患、病歴、合併症などの「病歴情報」とともに、血液型、感染症、HLA型抗原、前感染抗体を記入する「組織適合情報」(図2)という項目がある。HLAタイピングはアレルが2桁で表示さ

代表者連絡先 〒470-1192 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪1-98
藤田保健衛生大学 臓器移植再生医学講座
杉谷 篤

T E L 0562-93-9257
F A X 0562-93-7863
E-mail sugitani@surgl.med.kyushu-u.ac.jp

組織適合情報				赤血球の検査		
血液型	A B O型	A	R h型	+	サイズ	身長 156.0 cm
感染症	HBSAg	-	HCVAb	-	HIVAb	体重 52.2 kg
検査日	HCVAb	2004/01/19				HTLV-1Ab
HLA型				コメント： 保存血清No. 03-025		
抗原名	A	B	DR	リンパ球の検査		
	26	35	4			
	33	55	14			
方法	class1	DNA	検査日	2004/02/12	検査施設	福岡赤十字病院
	class2	DNA		2004/02/12		福岡赤十字病院
DNA	A	B	DRB1	DRB3/4/5		
	2601/02/03/+	3501/03/07/+	0401/02/03/+			
	3301/03/04/+	5502/12	1401/02/05/+			
コメント： Micro SSP						
方法	class1	DNA	検査日	2004/02/12	検査施設	福岡赤十字病院
	class2	DNA		2002/02/12		福岡赤十字病院
前感作抗体 (PRA)	年月日	TW	BW	抗体特異性	検査施設	
最新値データ	/ /					
最高値データ	/ /					
コメント：						
				既存抗体の検査		

図2 組織適合性検査

サギ血清の補体を加えて反応の起こったリンパ球を死滅させ、色素で染色してその割合をカウントする。抗 HLA 血清は分娩血から精製され、WHO で認められた約 130 種類が用いられるが、日本ではネットワークの発足に伴い、全国共通の抗 HLA キット (JNOS トレー) が用いられている。これまでの抗 HLA 血清を用いる試験管法では、より細かな HLA 抗原の違いがわからないが、DNA タイピングでは、HLA の多型性を示す DNA を PCR で 10 万倍に増幅して判定している。

献腎移植の場合、HLA classI 抗原のうち A ローカス、B ローカス、HLA classII 抗原のうち DR ローカスの 3 座位、6 個の抗原番号が、ドナーとどれだけ一致しているかがレシピエント選定の際の優先順位に関与してくる。移植施設は患者血清を初回登録時と毎年 1 回の登録更新時に各都道府県単位に設置されている HLA 検査センターに送付し、その内容は更新、変更されている。

原疾患や自然経過に加え、以前に移植、輸血、妊娠の既往歴がある患者ではさまざまな抗 HLA 抗体

や非特異的抗体が産生されることがある。このうち献腎移植を受ける際にドナーに対する抗 HLA 抗体で、クロスマッチテストを行うと陽性になる可能性があるものを前感作抗体と呼んでおり、この数値が高い患者は移植が困難であったり、なんらかの脱感作療法が必要になる場合がある。これは米国の Terasaki らによって提唱されたもので、100 人の被験者から集められた抗原に対して反応する割合で示しており、PRA (Panel Reactive Antibody) ともいわれている。試験管を用いて血清学的に行う方法と後述する Flowcytometer を用いて調べる方法があるが、これもコストと時間がかかるのですべての HLA 検査センターでできるわけではなく、現実的には空欄になっている場合が多い。

献腎ドナーが発生したとき

献腎ドナーが発生し、コーディネータが提供病院に赴いてドナー家族から承諾を得ると、ドナーの血清は最寄りの HLA 検査センターに送られ、ドナーの血液型、HLA タイピング、感染症が調べられる。

'04-10-23 16:15 宛先 926425458 院 達信元 日本臓器移植ネットワーク P02/03 T-710 U-04
ダイレクトクロスマッチ検査依頼書 NO. /

依頼先	ダイレクトクロスマッチ施設名 福岡赤十字病院	依頼日時 2004年10月23日 10時 分
ドナー情報	氏名 血液型 (O 型) Rh(+) 移植野の個数 (1, 2)	検査担当番号 (西) 7 10 (西) HLA Locus A (24) : (26) HLA Locus B (60) : (62) HLA Locus DR (8) : (15)
候補者情報	① 候補 1 位 氏名 登録ID 血清ID 血液型 (O 型) Rh() HLA Locus A () : () HLA Locus B () : () HLA Locus DR () : () 妊娠歴: 輸血歴: 移植施設:	結果 LCT wash AH3 T-cold () T-RT () () () T-warm () B-cold (原) B-warm ()
	② 候補 2 位 氏名 登録ID 0198294 血清ID 血液型 () 型 Rh() HLA Locus A () : () HLA Locus B () : () HLA Locus DR () : () 妊娠歴: 輸血歴: 移植施設:	結果 LCT wash AH3 T-cold () T-RT () () () T-warm () B-cold () B-warm ()
	③ 候補 3 位 氏名 登録ID 血清ID 血液型 (O 型) Rh() HLA Locus A () : () HLA Locus B () : () HLA Locus DR () : () 妊娠歴: 輸血歴: 移植施設:	結果 LCT wash AH3 T-cold () T-RT () () () T-warm () B-cold () B-warm ()
	④ 候補 4 位 氏名 登録ID 0192678 血清ID 血液型 (O 型) Rh(+) 2 Agmdd HLA Locus A (2) : (24) HLA Locus B (46) : (54) HLA Locus DR (8) : (9) 4 Ag micmdd 妊娠歴: 輸血歴: 丹波 2723 14P 10 移植施設: カサス 病院	結果 LCT wash AH3 T-cold () T-RT () () () T-warm () B-cold () B-warm ()
依頼先	(社) 日本臓器移植ネットワーク 連絡先: TEL (06-6455-0504)	担当者: (西) 7 10 (西) 印 FAX (06-6455-2841)
検査結果報告	検査結果報告日時	依頼日時 2004年10月23日 10時 17分
返信先: FAX 06-6455-2841 (社) 日本臓器移植ネットワーク 西日本支部		

図3 ダイレクトクロスマッチ検査

その間に、臓器移植ネットワークは、ABO血液型が一致して最終的にダイレクトクロスマッチテストが陰性となる登録待機患者を条件として、① HLA 適合度、② 待機期間、③ 地理的条件、④ 医学的条件を点数化して総合得点の高い順に優先順位を付け、

待機患者の移植希望施設に連絡をとる。「移植を受ける意思がある」と答えた、5~10人ぐらいの待機患者の保存血清を用いてドナーとの間でダイレクトクロスマッチテスト(リンパ球交差試験: DCM)を行う。図3にその実例を示した。第1列目に HLA セ

ンターと検査責任者の名前、第2列目にドナーの血液型、提供腎の個数、HLA タイピングが記載されている。第5候補として選定された当科の待機患者は、事前に調べている血液型、HLA 型抗原、妊娠歴、最終の輸血歴が左欄に、このドナーとのダイレクトクロスマッチの結果が右欄に記載されている。LCT (Lymphocyte Cytotoxicity Test) とはダイレクトクロスマッチテストの別名で、ドナーから採取分離した T リンパ球と B リンパ球をレシピエント候補の保存血清と試験管のなかで混合して反応が起こるかどうかを調べている。T-cold は 4°C、T-RT は 20°C、T-warm は 37°C と温度条件を変えたり、非特異的抗体や IgM 抗体を除くために T リンパ球を洗浄 (wash) したり、中和抗体 (Anti-Human globulin) を加えたりして反応の有無をチェックする。このとき、T リンパ球との反応が陽性であれば、このまま移植するとレシピエントの血中に存在する既存抗体がドナー腎と反応して超急性拒絶を起こしてしまう可能性が高いので、ダイレクトクロスマッチ陽性という判定で、腎臓はもらえないことになる。

クロスマッチテストとは

前項で述べたダイレクトクロスマッチテスト (DCM) は、試験管の中で抗ドナー抗体が存在していると思われるレシピエント血清をドナーリンパ球と反応させ、さらにその抗体に補体を結合させてドナーリンパ球を死滅させ、その個数を肉眼的に判断するという古典的な方法である。献腎移植、生体腎移植ともに移植前に行う標準検査法であるが、熟練した専門の人員が必要、結果判定まで約4時間かかるという欠点があり、さらに検出される IgG は 1, 2, 3 型に限定されるので感度が低いため、近年はフローサイトを用いたクロスマッチ (FCXM: Flowcytometric crossmatch) が多用されるようになった。レシピエント血清とドナーリンパ球を反応させ、FITC でラベルした抗ドナー IgG に対するヤギ血清抗体を加え、さらに T リンパ球の表面マーカーである CD3 抗体、B リンパ球の表面マーカーである CD19 抗体を加えてフローサイトかけると、リンパ球の分布図が得られる。これが negative control よりも 10% 以上増加していれば FCXM は陽性と判定

している。補体を反応させる必要が無いので検査時間が短縮し、IgG は 1, 2, 3, 4 型が検出できるので感度も上昇するが、器械購入と維持費のコストがかかるので、多くの HLA 検査センターでは施行されていない。

Panel-Reactive Antibody (PRA) 検査

これは前述の LCT や FCXM と異なり、ドナーリンパ球を用いなくて、抗ドナー抗体やさらに抗 HLA 抗体も検出しようという方法である。大きく、試験管を用いる ELISA 法、Flowcyte を用いる Flow-PRA、Luminex ビーズを用いる LAB-Screen の 3 種類があるが、現在、腎移植に関連して汎用されているのは、Flow-PRA 法である。これは、人工的に作製した小さなビーズの表面に HLA classI 抗原あるいは classII 抗原が付着させてあり、付着した抗原の組み合わせによって、ドナー特異的抗体や非特異的抗体を持っている割合 (Flow-PRA screening test)、1 種類の HLA 抗原に対する抗体の存在 (Flow-PRA single antigen test) なども調べることができ、ドナーリンパ球が無くてもできるのでメリットは大きい。Flowcytometer の器械に加え測定試薬が非常に高価なので、あまり普及はしておらず抗ドナー抗体検査法として確立されているわけではない。

既存抗体陽性例に対する脱感作療法

前述したように、献腎移植の場合、ダイレクトクロスマッチテストで Tcell crossmatch が陽性となれば、その腎臓はもらえないわけであるが、Tcell crossmatch は陰性だが Bcell crossmatch は陽性という場合、自施設で行った FCXM は陽性であった場合、Flow-PRA が陽性の場合もある。これは、抗ドナー抗体が微量、低力価であったり、検査の感度が悪いために検出されなかった場合に起こりうる。我々は、当科の献腎移植患者で移植前にこのような情報がわかったり、二次移植、原疾患が自己免疫疾患、妊娠歴、輸血歴があるといった、所謂「免疫学的ハイリスク」である場合には、時間的、経済的余裕がある限り、何らかの脱感作療法を行うようにしている。具体的には、ドナーの心停止まで時間があれば、3 回の血漿交換、インフォームド・コンセン

トを得た上でリツキサン 200 mg 単回投与, Tacrolimus 0.15 mg/kg/day または CyclosporineA 8 mg/kg/day, Mycophenolate mofetil 2 g/day, Medrol 4 mg/day の免疫抑制剤の内服を開始し, 時間がない場合は血漿交換 1 回, リツキサン単回投与, 免疫抑制 3 剤単回投与を行って献腎移植を施行している。

興味深いクロスマッチテストを呈した献腎移植の実例

当科における献腎移植の待機患者で, 3 回レシピエント候補にあがって興味深いクロスマッチテストを示した実例を紹介する。患者は移植時 42 歳女性(コード K.I.), 血液型 B 型, Rh(+), 身長 163 cm, 体重 41 kg, 原疾患が 19 歳発症の SLE で, 22 歳時に透析導入となっていた。輸血歴, 妊娠歴, 移植歴はないが, 高血圧, 上皮小体機能亢進で全摘・自家移植, ステロイドパルス療法の既往があり, プレド

ニン 2.5 mg/day 内服中であった。2003 年 3 月 1 日, 北九州市内の病院で心停止ドナー発生, 第 2 候補として連絡をうけ当院に入院したが, その後ドナーとのクロスマッチ (LCT) が陽性ということで却下となった。2003 年 3 月 21 日, 福岡市内の病院で心停止ドナー発生, 第 6 候補として電話があった。今回はドナーとの LCT は陰性と判明しており, 移植準備のために当院救急外来受診したが, 上位候補に配分された。この 2 回のダイレクトクロスマッチの結果を図 4 に示した。2003 年 3 月 1 日の結果は, Tcell crossmatch, Bcell crossmatch とともに陽性であって, ネットワークの配分ルールではもらうことはできない。しかし, T リンパ球を wash か AHg 処理をすると陰性になっているので, 非特異的抗体か IgM 抗体があって陽性に反応し, IgG 抗体はないのではないかという懸念があった。2003 年 3 月 21 日の結果は, Tcell crossmatch, Bcell crossmatch とともに陰性

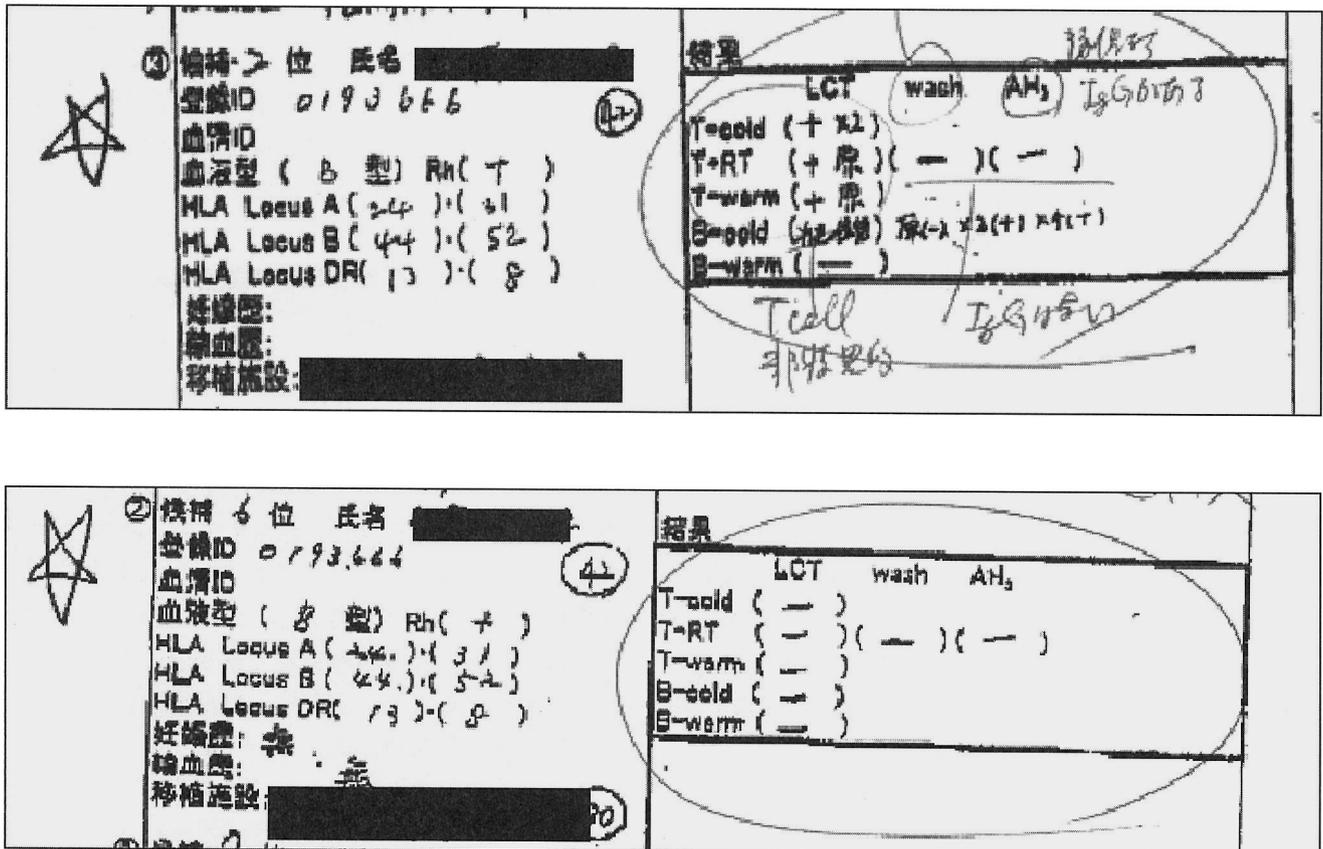


図 4 上: 2003 年 3 月 1 日の DCM 報告書
下: 2003 年 3 月 21 日の DCM 報告書

でもらうことは可能であった。このとき、3月1日の血清は本当に抗ドナー抗体が存在していたのだろうかという疑問が生じたので、以前の保存血清と3月31日にあらためて採取した血清を他の施設に送り、Flow-PRA と LCT を再検してもらうことにした。その結果、3月1日以前の血清も3月31日のものも、Flow-PRA の HLA classI, classII ともに1%と陰性で、LCT 法によるリンパ球自己抗体も陰性であった。つまり、2003年3月1日の検査は、False Positive となって、この患者は移植を受けるチャンスを逃したかもしれないという懸念が筆者の胸中に強く残った。

その後、2006年2月24日、宮崎県内で発生した心停止ドナーからの1腎に対して、この患者が第2候補として選定された。図5中段に LCT の結果を

示したが、奇しくも2003年3月1日の結果と同様に Tcell crossmatch が陽性となり、wash と AHg 処理をすると陰性という結果となって、非特異的反応が考えられるため「判定保留」という報告であった。このとき、図5上段に示したドナーの HLA 型抗原を見ると、B ローカスに51というアリルがあって、実は2003年3月1日のドナーも同じ抗原型を持っていたので、患者 K.I はこの抗原型に対する抗体を持っている可能性が示唆された。したがって、LCT 法ではなく FCXM で最終判断を行うことになり、2005年3月3日と2006年2月24日の血清を急遽、兵庫県立西宮病院へ送付し結果を待った。図5下段に示すように、Flowcytometry 法の Tcell, Bcell crossmatch ともに陰性、さらに Flow PRA の classI, classII も (+/-) あるいは (-) という結果であった

ドナー情報	氏名: 血液型:(B 型) Rh(+) 移植腎の個数:(1・2)	HLA: LocusA (24)-(26) LocusB (57)-(60) LocusDR (8)-(9)
受贈者情報	氏名: 血液型:(B 型) Rh(+) HLA: LocusA (24)-(31) LocusB (44)-(52) LocusDR (13)-(18) 移植腎:(有) 輸血歴:(有)	結果 判定 検査 日 LCT wash + AHg T-cold (X) T-RT (X) () () T-warm (原) B-cold () B-warm (二) Wash, AHg 処理 () 時 非特異的反応も存在しない

HLA抗体検査			兵庫県立西宮病院・腎移植センター					
小中 節子 先生			〒662-0918 西宮市大湛寺町13-9					
臓器移植ネットワーク西日本支部			TEL: 0798-34-5151					
			FAX: 0798-36-3745					
採血日 (年月日)	Recipient Typ. No. 氏名	Donor Typ. No. 氏名	Cross match (%)		PRA (%)			
			LCT法		Flowcytometry法			
			PDL	Bw Tw	PCM-T	FCM-B	class I	class II
2005/03/03					5.05 (-)	2.94	7.75(+/-)	0.88 (-)
2006/02/24					5.62 (-)	2.94	8.92(+/-)	1.7 (-)

図5 上: 2006年2月24日のDCM報告書
下: 2006年2月25日のFCXM, Flow-PRA報告書

ので、「Tcellクロスマッチ陰性」という判断で、1腎は患者 K.I に配分された。しかし、当科ではこの患者を「免疫学的ハイリスク」として扱い、移植前に血漿交換1回、リツキサン 200 mg 投与、免疫抑制剤 2 回内服をしておいて手術に臨んだ。移植直後から良好な排尿がみられたが、翌 2 月 25 日夕方、急に尿量が減少したので抗体拒絶を疑い直ちに血漿交換を行った。その後、尿量は増加し良好な経過をたどっている。このときの保存血清で Flow-PRA screening test を行うと、HLA class I 抗体価は移植直前 2 月 24 日は 9.1% と陰性であるが、2 月 25 日夕方は 23.4% と陽性化し、血漿交換後の 2 月 27 日は再び 9.5% に復していた(図 6)。以上より、この患

者 K.I は自己免疫疾患に関連して、HLA B51 に対する IgM 抗体を産生しており過去の LCT 検査で False Positive に導いたことが推察されるが、現実の HLA 検査では限界であろう。

膵腎同時移植におけるクロスマッチテストから考えること

心停止ドナーからの献腎移植では、上述のように都道府県単位でレシピエント選定がなされる場合がほとんどであるが、脳死ドナーが中心となる膵腎同時移植や膵移植の場合にはドナーとレシピエント候補の組み合わせが全国にまたがることが多い。図 7 に当科における膵腎同時移植待機患者 (M.T) で 3 回

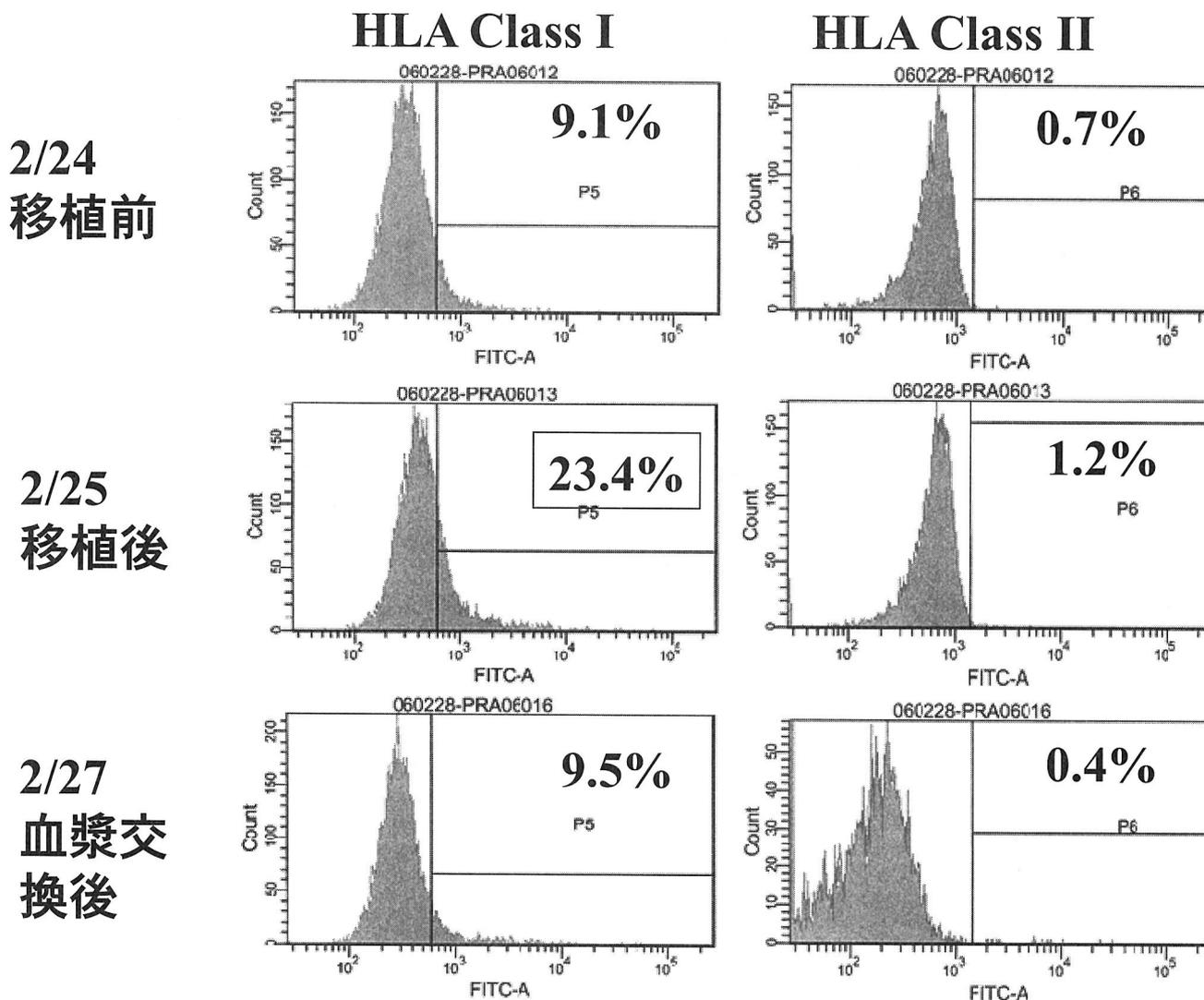


図 6 Flow-PRA screening

本人のHLA-A(2,24), B(54,35), DR(4,9)

1) 2000-3-28 1回目ドナー情報(東京都内のHLAセンター)

ドナー: 関東地方の20代女性

HLA-A(24,-), B(52,-), DR(15,-)

1Ag match, 2Ag mismatch

DCM: Tcell (-), Bcell warm (80%)

陰性

2) 2000-6-7 2回目ドナー情報(愛知県内のHLAセンター)

ドナー: 東海北陸地方の40代女性

HLA-A(2,24), B(52,61), DR(4,16)

3Ag match, 3 Ag mismatch

DCM: Whole (x6), AHG-LCT (x8)

陽性

3) 2002-11-13 3回目ドナー情報(兵庫県内のHLAセンター)

ドナー: 和歌山県内の30代男性

HLA-A(2,24), B(52,35), DR(4,15)

4Ag match, 2Ag mismatch

DCM: Whole (-), Bw(-), Bc(-), Tw(-)

陰性

図7 ある臓器同時移植患者(M.T)のDCM

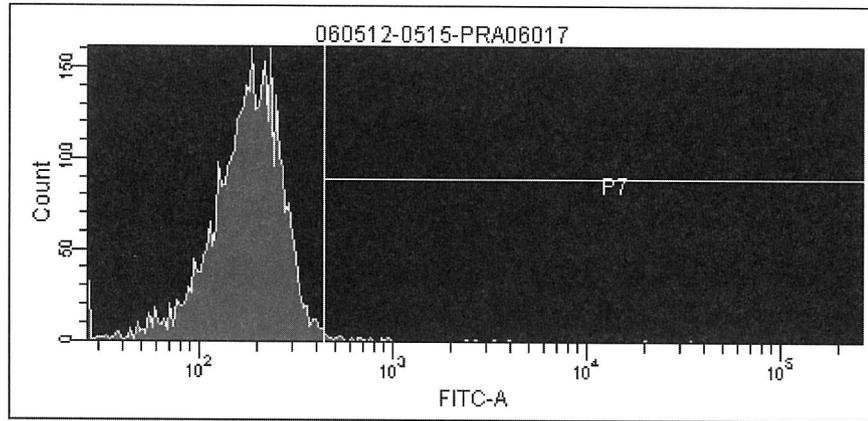
にわたりレシピエント候補に選定された実例を示す。第1回目は2000年3月28日、関東地方で発生した20代女性のドナー情報で、HLA抗原型は1Ag match, 2Ag mismatchであった。東京都内のHLAセンターでダイレクトクロスマッチ(DCM)が施行され、Tcell(-), Bcell warm(80%), 陰性というFAXを受けとったが、最終的に他の上位候補に移植された。このとき、Bcell crossmatchは強陽性であるから、このまま移植していれば急性拒絶、抗体拒絶を起こしていた可能性がある。第2回目は2000年6月7日、東海北陸地方で発生した40代女性のドナー情報で、HLA抗原型は3Ag match, 3Ag mismatchであった。愛知県内のHLAセンターでDCMが施行され、Whole(x6), AHG-LCT(x8), 陽性という報告で却下された。この報告はTcell, Bcellに分離して行われた検査ではなく、全リンパ球に対して6倍、AHGでIgMを除去してみると8倍の抗体価が得られたと述べている。第3回目は2002年11月13日、和歌山県内で発生した30代男性のドナー情報で、HLA抗原型は4Ag match, 2Ag mismatchであった。兵庫県内のHLAセンターでDCMが施行され、Whole(-), Bw(-), Bc(-), Tw(-), 陰性という報告を受けて臓器同時移植を施行した。このときは全リンパ球、Tcell, Bcellに分離しても結果は

陰性であったことを示している。このように、HLA検査センターによって報告方法が様々で、最終的な移植可否の判断は当該移植施設に任されている。1回目、2回目のDCMは部分的にも陽性と思われるが、この患者は輸血歴、妊娠歴、移植歴はなく、Flow-PRAも陰性で、我々は「免疫学的ハイリスク」ではないと考えていたので、術前に脱感作療法は行うことなく臓器同時移植を行ったが、目立った拒絶反応もなく、移植腎、移植脾ともに良好に機能している。したがって、1回目、2回目の結果は本当に陽性であったのか、HLAセンターが異なっていれば違った結果になった可能性もあるのかなどの懸念がぬぐいきれない。

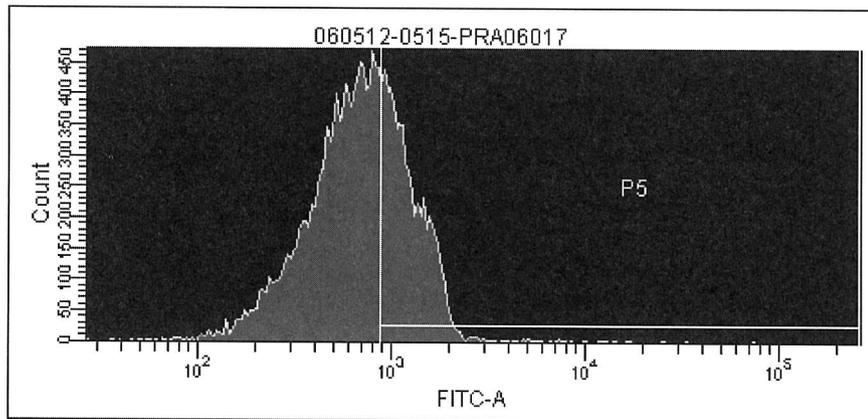
「免疫学的ハイリスク」な献腎待機患者のFlow-PRA検査

献腎移植の登録待機患者は、1年ごとの更新時に移植希望施設を訪ねて移植医の診察や検査を受けて更新書類をネットワークに送付することになっている。以前に生体腎移植を受けたが慢性拒絶のために機能廃絶して、二次移植を希望して移植希望施設を当科に変更した患者があった。我々は、このような「免疫学的ハイリスク」と考えられる患者に対しては、Flow-PRA screening testを行って陽性であれば、

Cont.



Class I
陽性



Class II
陽性

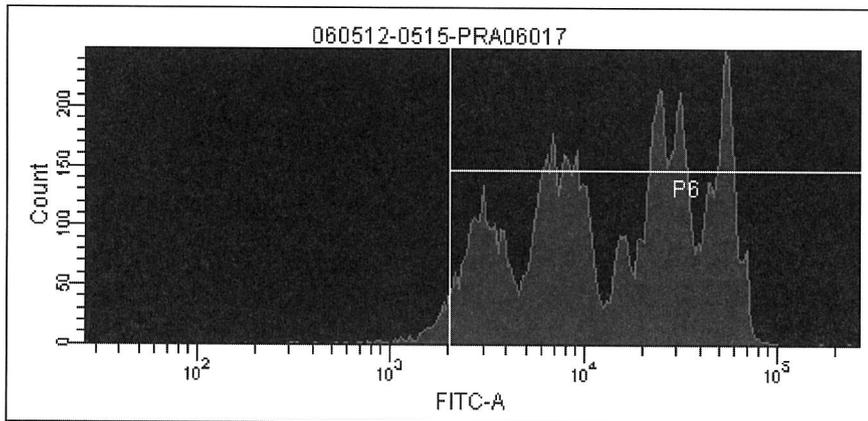
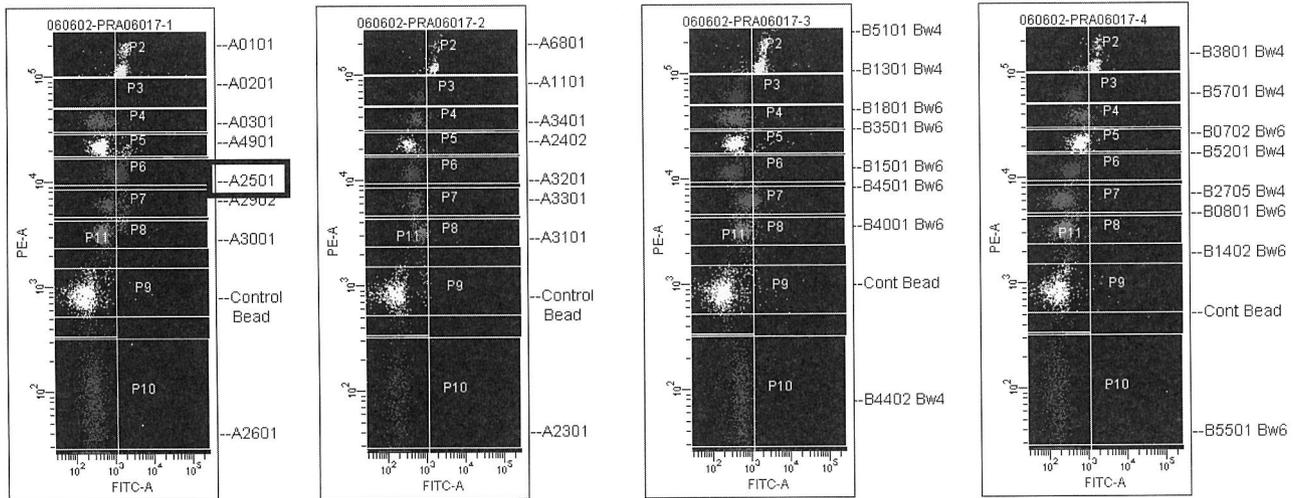


図 8(1) 免疫学的ハイリスク患者の Flow-PRA screening

さらに Flow-PRA single antigen test を行い、保有している抗 HLA 抗体を調べるようにしている。図 8 にその結果を提示する。Flow-PRA screening test では class I, II 抗体ともに強陽性で、single antigen test では class I の A25, class II の DR 7, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 51, さらに DQ 4, 6 に対して抗体を持っていることがわかる。複数回の輸血歴もあるので、このパネルで判明した以外の抗 HLA 抗体や非特異的

抗体を持っているかもしれない。したがって、この患者はたとえ献腎ドナーが現れてネットワークの点数からレシピエント候補に挙げたとしても、最終段階のクロスマッチテストで陽性となって腎配分は受けられない可能性が高い。すでに登録待機期間が 10 年を超えており、今まで毎年 5000 円の登録更新料を払いながら、献腎移植を期待して日々を過ごしてきたと本人は言う。Informed consent を行った上

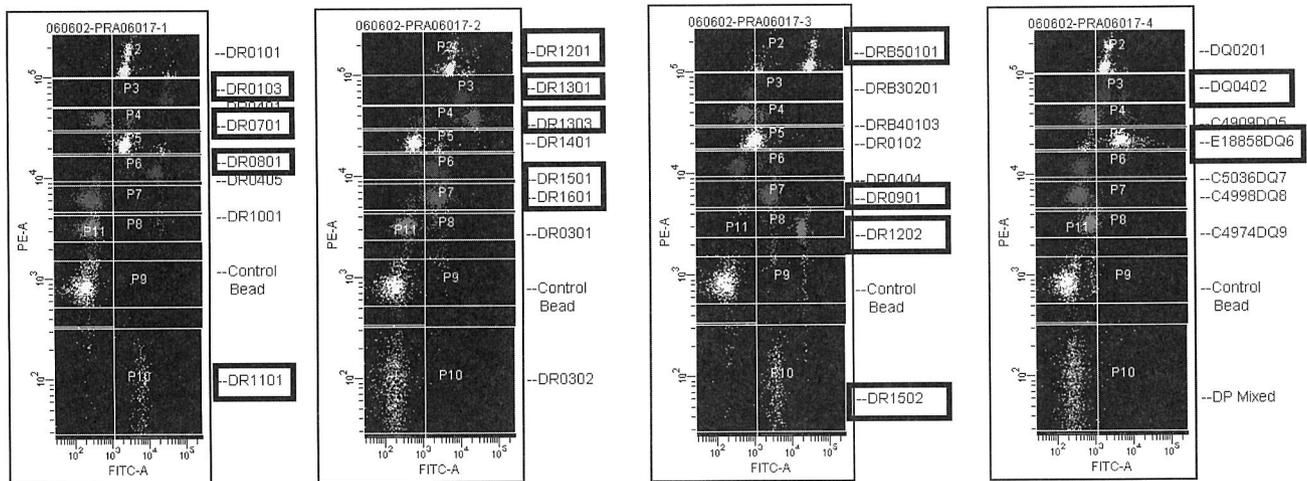
Class I抗体の存在



A:25 陽性

図 8(2) Flow-PRA screening の結果

Class II抗体の存在



DR:7,8,9,11,12,13,15,16,51 陽性

DQ:4,6 陽性

図 8(3) Flow-PRA single antigen の結果

で、血漿交換、リツキサン投与、短期免疫抑制などの脱感作療法で抗HLA抗体の陰性化を試みるか、現実的な可能性を述べて、このまま献腎移植を継続するか本人に決めてもらうしか方策はないであろう。

おわりに

本邦における献腎移植にまつわるクロスマッチ検査について述べてきた。時間的、経済的にも制約されたなかでの医療行為であることは間違いないが、腎移植医は技術研鑽を積んで最終結果を良くすると

ともに、前提となる HLA 検査，クロスマッチの意味，現行での問題点を認識しなければならない。いっぽう，制度面からみて HLA 検査施設の集約化，

コスト軽減が担保されると同時に，HLA 検査施設，検査スタッフと移植医の相互理解，協力がよりいっそう望まれる。

● 総 説 ●

[シリーズ: 疾患と組織適合性]

第 1 回

HIV/AIDS 感受性とゲノム多様性

中島 敏晶^{1,2)}, 木村 彰方^{1,2)}

1 東京医科歯科大学 疾患生命科学研究部 ゲノム多様性

2 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子病態

キーワード: HIV1, AIDS, 遺伝子多型

はじめに

後天性免疫不全症候群 (Acquired Immune Deficiency Syndrome: AIDS) は, レトロウイルスに属するヒト免疫不全ウイルス (Human Immunodeficiency Virus: HIV) が免疫細胞に感染し, 後天的に免疫不全を起こす免疫不全症候群である。1981年に米国において第1例が報告され, 1983年にフランス・パスツール研究所の Montanier らのグループによって, HIV が病原体として分離・同定された。その後急速に患者数が拡大し, これまでに全世界で 5,000 万人以上が感染, すでにその約 3 分の 1 が死亡したと推測され, 全世界に深刻な健康被害をもたらしている¹⁾。一方, 国連合同エイズ計画 (UNAIDS) と世界保健機関 (WHO) の 2007 年の最新推計によれば, アジア, アフリカ諸国を中心とした感染者数の増加は頭打ちになったとの見方が示されている。さらに, 最近のエイズ治療薬の進歩に伴いその生命予後は大幅に改善していることを考えると, HIV 感染症, AIDS をとりまく環境はここ 10 年の間に大きく改善してきていると言える。しかし, 依然として大きな社会問題であることに変わりはなく, 我が国では 10~20 歳代の若年層の感染者の増加傾向が問題となっており, 新たな予防法や治療法の

開発が急務である。

HIV 感染, AIDS の発症, 進展には宿主の遺伝要因が密接に関わっていることが知られている。男性同性愛者や売春婦の中で, HIV に暴露しているにもかかわらず, HIV 感染を免れている人々が存在することや, ウイルスに感染しているにもかかわらず, 長期間にわたって AIDS の発症を免れている, いわゆる長期未発症者 (long-term non-progressor, LTNP) が存在することが知られており, 遺伝要因の関わりが強く示唆されてきた²⁾。これら LTNP の遺伝要因を明らかにすることは, これまでの HIV/AIDS 研究の大きなテーマのひとつであり, 精力的な研究により多くの知見が得られてきている。また, 分子疫学的なアプローチ以外に, 生物種や細胞の種類の違いによる HIV 感染感受性を研究することにより, HIV の感染機序あるいは宿主の防御機構を明らかにしようとする試みもなされており, 本稿ではこれらの遺伝子も HIV 感受性に関わる遺伝子として紹介させていただく。

これまでに明らかにされてきた HIV 感受性および抵抗性に関わる遺伝子は, 非常に数多くの遺伝子の関与が報告されており, 本稿では興味深い遺伝子のいくつかを紹介するにとどめさせていただく。その

他の遺伝子については NCBI Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) の HIV 感受性に関わる遺伝子 (OMIM #609423) の項目, あるいはいくつかのすぐれた総説^{3,4)}を参照していただきたい。また, HIV 感受性および抵抗性に関わる遺伝子の一部は HIV の免疫細胞への感染機序にかかわるレセプターやそのリガンドをコードしており, HIV の免疫細胞への感染機序の概略を最初に加えさせていた。

HIV/AIDS 感受性遺伝子研究は感受性に関わる遺伝子多型を明らかにするといった疫学研究にとどまらず, 感受性を規定するメカニズムまで明らかにされている例が多く, 遺伝子疫学研究の手法となるような研究が多い。また, ヒトおよび霊長類の HIV 感受性の違いといった視点から遺伝子研究に取り組むなど, 様々な視点から HIV 感染を制御する遺伝子の解明に取り組んでいる研究が多く, 興味を持っていただければ幸いである。

1. HIV 粒子の構造と免疫細胞への感染機序

HIV は直径約 100 nm の RNA 型エンベロープウ

イルスで, 約 9,000 塩基対からなる 2 コピーの RNA ゲノム, 逆転写酵素などのウイルス酵素群を含むキャプシドと, それを取り囲む球状エンベロープによって構成される(図 1)。ウイルス粒子の外側を構成するエンベロープには, 外側に突き出している糖タンパク質 gp120 と脂質二重膜を貫通する糖タンパク質 gp41 からなるスパイクがある。エンベロープタンパク質は, ヘルパー T 細胞やマクロファージ表面膜に存在する CD4 分子に対する特異的な結合能をもち, ウイルスが標的細胞に感染・侵入する過程で重要な役割を果たす。HIV 遺伝子は, マトリックスやキャプシドといったウイルスの構造蛋白をコードする gag, プロテアーゼや逆転写酵素などのウイルス酵素群をコードする pol, エンベロープタンパク質 gp120 と gp41 をコードする env の 3 個の主要な構造遺伝子と vif, vpr, vpu, vpx, tat, rev, nef といった調節遺伝子から構成され, vpu は HIV-1 と SIVCPZ に, vpx は HIV-2 と SIVSM にのみに存在する⁵⁾(図 2)。

HIV が細胞内へ侵入する際には細胞表面に発現する宿主の CD4 がレセプターとしての役割を果たす

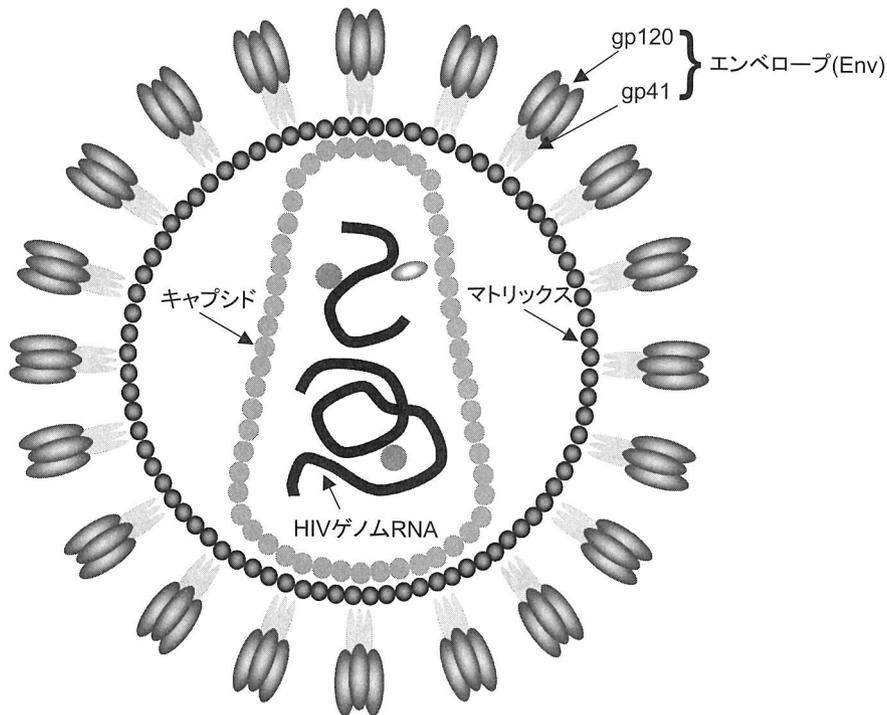
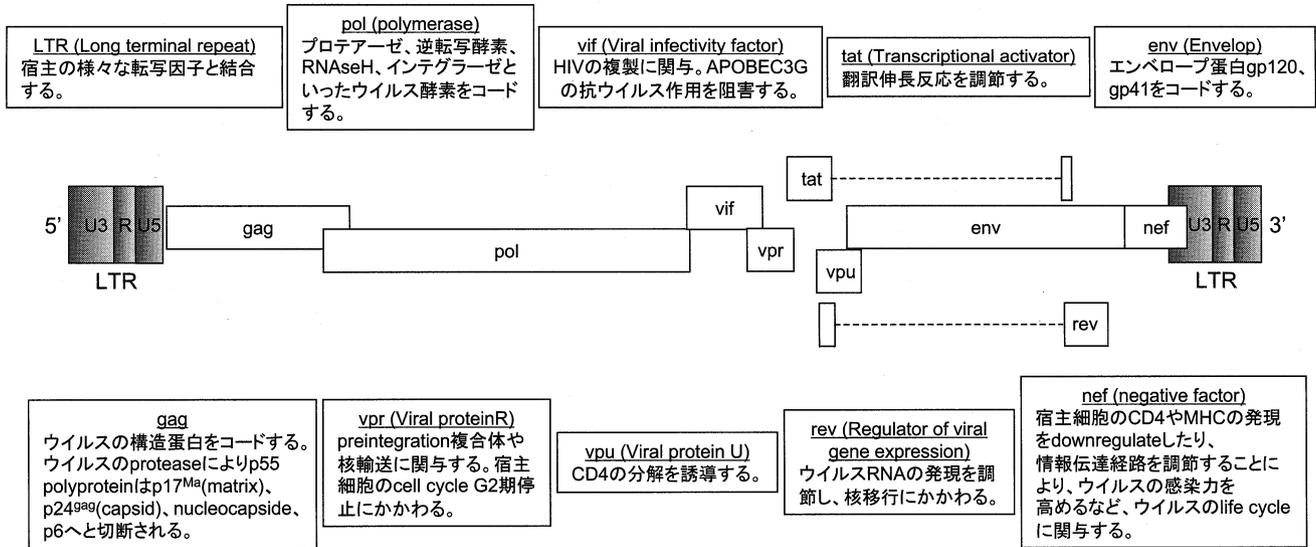


図 1 HIV 粒子の構造



Trkola A. Current Opinion in Microbiology 2004, 7:555–559より(一部改変)。

図2 HIV 遺伝子とその機能

が、CD4 の他に CD4 と協同してウイルスの細胞内侵入を促進するコレセプターが必要であり、ケモカイン受容体の CCR5, CCR2, CXCR4, CX3CR1 がコレセプターとして同定されており、CCR5, CXCR4 がその主たるものである(図3)。HIV は、CD4 および CXCR4, CCR5 などのコレセプターを受容体として、それらを発現しているマクロファージや CD4 + T 細胞に感染し、その結果として細胞性免疫機構を破綻に至らせるのである。また、樹状細胞で発現する DCSIGN や内皮細胞で発現する SDC2 と gp120 との相互作用が報告されているが、細胞内へのウイルス侵入における役割については明らかではない。

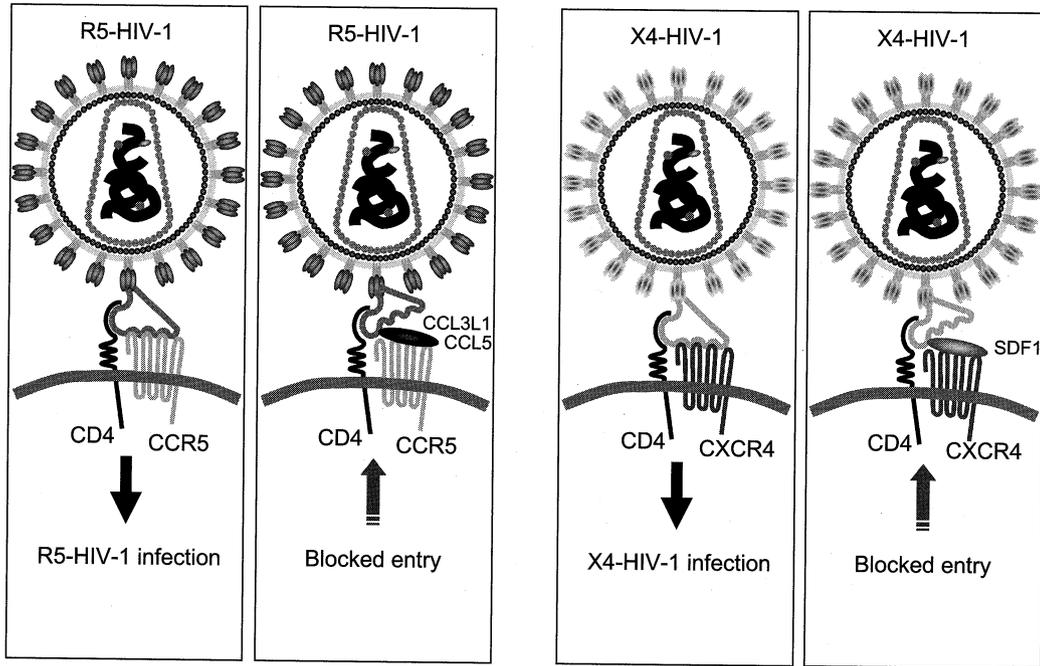
細胞内への HIV 侵入後、1) ウイルスキャプシドの脱核、2) 遺伝子 RNA から DNA への逆転写、3) ウイルス DNA の宿主細胞 DNA への組み込み、4) ウイルス DNA から mRNA への転写、および翻訳、5) ウイルスタンパク質前駆体のプロテアーゼなどによる修飾、6) ウイルス粒子の組み立てと感染細胞からの出芽などのステップを経て増殖していく。

2. HIV の多様性と HIV/AIDS 感受性

HIV は多様性に富んだウイルスであり、HIV の細胞指向性に基づいて、マクロファージ指向性と T 細

胞指向性の HIV に分類される。これはコレセプターの使用の違いによるものと説明されており、CCR5 コレセプターを使用する R5 型はマクロファージ指向性が強く、CXCR4 コレセプターを使用する X4 型は T 細胞指向性が強いとされている(図3)。CCR5 と CXCR4 の両者をコレセプターとして使用する R5X4 型も存在する。R5 型は、ヒトからヒトへの感染と感染個体内での持続感染の成立に関与する最も重要なウイルスと考えられており、X4 型や R5X4 型は感染後期に出現し、急速な CD4 陽性 T 細胞数の低下の原因の一つではないかと考えられている。R5X4 型は細胞障害性の強いウイルスで、CCR5 と CXCR4 以外にも CCR3 や CCR2 など他のケモカイン受容体もコレセプターとして利用する能力をもつ場合がある。後述するように、HIV のコレセプターおよびその生体内リガンドをコードする遺伝子の多くは、HIV/AIDS 感受性を決定する遺伝子であり、HIV の型により遺伝子多型の影響が異なることは容易に想像できる。

また、HIV の塩基配列に基づいた遺伝学的系統樹解析による分類もある。HIV は HIV-1 と HIV-2 に大別され、HIV-2 は HIV-1 に比べて感染性や病原性が低いとされている。HIV-1 は、さらにグループ M (Major), O (Outlier) および N (non-M/non-O)



CCR5コレセプターを使用するR5-HIV-1はマクロファージ指向性が強く、CXCR4コレセプターを使用するX4-HIV-1はT細胞指向性が強いとされている。CCR5の生体内リガンドとしてCCL5、CCL3L1、CXCR4の生体内リガンドとしてSDF1などが知られているが、これらのケモカインはHIVの標的細胞への侵入を阻害する。
 (この図はO'Brien SJ, Nelson, GW. Nature Genet. 36: 565-574,2004.を参考に作成した。)

図3 HIVの細胞指向性とコレセプター生体内リガンドによる侵入阻害

の3グループに分類され、グループMに属するウイルスは、さらにA, B, C, D, F, G, H, J, Kの9つのサブタイプに分けられるが、これらのサブタイプは互いに遺伝子組換えを起こすことによって、新たなサブタイプとも呼ばれる多くの組換え型ウイルスを生み出している。グループMのサブタイプBがHIV-1の最も主要なグループで、世界的規模の流行の主な型となっている。我が国では、HIV感染者の約75%がサブタイプBで、約20%がCRF01_AEである。このようなHIVの多様性がHIV/AIDS感受性・抵抗性に密接に関わっていることが推測されるが、サブタイプの違いが、病原性や感染効率の差異などにどのように関連するかは今後の研究課題である。

3. 免疫細胞への感染機序にかかわる遺伝子とHIV/AIDS感受性

1) HIVコレセプターとHIV/AIDS感受性

1996年2つの研究グループよりコレセプター

CCR5遺伝子(OMIM*601373)の32bp欠失多型がHIV抵抗性患者において報告された^{6,7)}。32bp欠失によりframe shiftがおり、アミノ酸コードの読み枠がずれ、その結果出現する終止コドンにより不完全な短い $\Delta 32$ -CCR5が産生される(翻訳の中途停止—premature termination—)。この不完全な $\Delta 32$ -CCR5は細胞表面に発現されず、この多型をホモ接合で有する場合は、コレセプターとしてHIV感染に重要な役割を果たすCCR5が細胞表面に存在せず、HIVは細胞に感染することができない。また、 $\Delta 32$ -CCR5多型をヘテロ接合で有する場合でも、HIVの細胞への感染が低下することが実験で証明されている。これらは大規模な疫学研究によっても確認されており、 $\Delta 32$ -CCR5ホモ接合体はHIV感染に抵抗性を示す群でおおく観察され、 $\Delta 32$ -CCR5ヘテロ接合体は野生型CCR5ホモ接合体に比し、長期生命予後がよく10年以上生存する症例が多いことが報告されている。この $\Delta 32$ -CCR5多型は欧米人にのみ観察され、その頻度は約10%(欧米人の約1%が $\Delta 32$ -

CCR5 ホモ接合体)であるが、アフリカ人や日本人を含めたアジア人には観察されない。CCR5 遺伝子のプロモーター領域をふくむ発現調節領域の遺伝子多型の関わりについても報告がある。欧米人集団では、4つの頻度の高い CCR5 遺伝子プロモーターハプロタイプが観察され、その中のひとつ CCR5P1 では CCR5 の発現が亢進し、AIDS の早期発症と関連するとされている⁸⁾。感染後3年半以内の早期に AIDS を発症した症例の 10~17% が CCR5P1 のホモ接合体であったとの報告がある。

コレセプターのひとつである CCR2 (OMIM*601267) V64I 多型と HIV/AIDS 感受性も報告されており、CCR2 64I 多型は AIDS の発症を遅くするとされている^{9,10)}。CCR2 は CCR5 とおなじ chromosome 3 に位置し、約 10 kb の間隔で隣接している。そのため、これらの2つの遺伝子に存在する遺伝子多型は連鎖不平衡の関係にあり、データの解釈には注意が必要である。

2) HIV コレセプターの生体内リガンドと HIV/AIDS 感受性

ウイルスの細胞内侵入を促進するコレセプター CCR5 の生体内リガンドである CCL5 (RANTES)

(OMIM*187011)、およびコレセプター CXCR4 の生体内リガンドである SDF1 (OMIM*600835) といったケモカインには HIV の細胞内への侵入を阻害する作用があるが(図3)、これらの遺伝子の多型と HIV/AIDS 感受性については多くの関連が報告されている^{11,12)}。本稿ではコレセプターである CCR5 の生体内リガンド CCL3L1 遺伝子 (OMIM*601395) コピー数多型と HIV/AIDS 感受性の関連について紹介する。通常、ヒトのゲノムには父親由来、母親由来の2コピーの遺伝子が存在する。これまでコピー数に多様性のある遺伝子の存在は知られていたが、そのような遺伝子はヒトのゲノムではそれほど多いものではないと考えられていた。しかし、ヒトのゲノムの約 12% の領域でコピー数の多様性が認められ、数百をこえる遺伝子にコピー数多型があることが報告され¹³⁾、コピー数多型と様々な疾患感受性の関わりが報告されている。CCL3L1 遺伝子もコピー数多型を有する遺伝子であり(図4A)、CCL3L1 コピー数の少ない者は、集団内において HIV-1 感染のリスクが高く、AIDS を発症するまでの期間が短く、予後が良くないことが報告されている¹⁴⁾。我々も血液製剤によって HIV に感染した血友病患者の

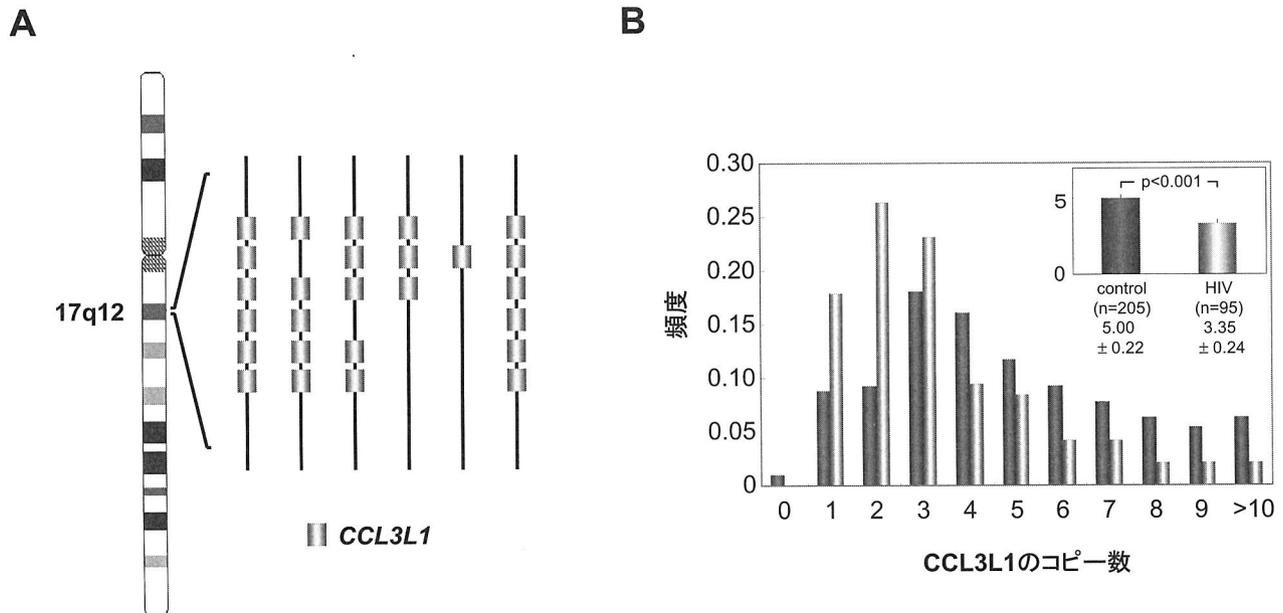


図4

A CCL3L1 遺伝子のコピー数多型(模式図)

B 一般健常者 (n = 205), 血友病 HIV 感染者 (n = 95) における CCL3L1 コピー数多型の頻度分布。血友病 HIV 感染者ではコピー数が少ない傾向がある。¹⁵⁾

CCL3L1 遺伝子のコピー数を検討し、コピー数の少ない者が HIV 感染患者に多く観察され、CCL3L1 遺伝子のコピー数が感染のリスクを規定する遺伝要因のひとつであることを確認した(図 4B)。しかし、感染後長期経過した症例の予後との関わりは見出すことができなかった¹⁵⁾。CCL3L1 は CC ケモカインの一種であり、遺伝子のコピー数が多い場合、活性化された白血球からの CCL3L1 の発現量が増加することが報告されている。また、CCL3L1 は HIV の T 細胞への侵入を阻害することが知られており、その作用が増強することが、HIV 感染に対する感受性に影響するものと予想される。

3) TRIM5 α と HIV 感染感受性—霊長類の種間における HIV 感染感受性の違いより—

HIV の起源はアフリカに生息している旧世界ザルを宿主とするサル免疫不全ウイルス (SIV) であると考えられている。SIV の変異体がチンパンジーに感染する能力を獲得し、さらにはその変異体がヒトに感染する能力を獲得することにより HIV へと進化したものと考えられている。興味深いことに、SIV から進化したと考えられる HIV は旧世界ザル由来の細胞では増殖できない。この種特異的な感染性の違いは、HIV 細胞内侵入後の細胞内複製の過程が阻害されていることに由来することが明らかにされている。Stremlau らは、アカゲザル由来 cDNA ライブラリーをヒト Hela 細胞に導入し、種特異的な感受性を規定する遺伝子として TRIM5 α (OMIM*608487) を同定した¹⁶⁾。TRIM5 α は RING finger, B-box, coiled-coil と呼ばれる 3 つのドメインを有する Tripartite ファミリーに属しており、その C 末端に SPRY と呼ばれるドメイン構造を有する。霊長類間の配列比較や遺伝子導入実験により、SPRY ドメイン配列の違いが種特異的な感受性を規定することが明らかにされている。

また、新世界ザル由来細胞では HIV 細胞内侵入後の細胞内複製がおこるが、新世界ザルの一種である owl monkey では細胞内複製が阻害されることが報告されている。この owl monkey 特異的な HIV 感染抵抗性を規定する要因も TRIM5 α にあるとされている¹⁷⁾。owl monkey の TRIM5 α 遺伝子には、exon 7 と exon8 の間にレトロトランスポゾンによりサイ

クロフィリン A 遺伝子が挿入されており、owl monkey の TRIM5 α はサイクロフィリン A との融合蛋白として合成される。サイクロフィリン A は HIV のキャプシド蛋白質と結合することが知られているが、結合を阻害するサイクロスポリンの投与により owl monkey における HIV 感染抵抗性が減弱することが報告されている。以上の点より TRIM5 α の SPRY ドメインと HIV-1 のキャプシド蛋白質との相互作用が抗ウイルス活性に重要であると想定されているが、直接的な結合は確認されておらず、詳細な感染阻害機構についてはよくわかっていない点が多い。また、サル TRIM5 α は HIV-1 の脱殻を促進しているとの報告があり、ウイルス複製の様々な過程で TRIM5 α が関与している可能性が指摘されている。

ヒトの TRIM5 α 遺伝子多型と疾患感受性の関連について、SPRY ドメイン多型の関与は報告されていないが、RING finger ドメインの H43Y 多型の関わりが報告されている¹⁸⁾。しかし、今のところ一定の見解が得られておらず、さらなる追試、解析が必要である。

4) APOBEC3G と HIV 感染感受性

—HIV 感染感受性細胞と非感受性細胞の違いより—

ウイルス感染に対する防御機構として、宿主の細胞は免疫システム以外の多様な戦略を発達させている。前項で紹介した TRIM5 α による抗ウイルス作用もそのひとつであるが、APOBEC3G (OMIM*607113) も細胞の HIV 感染感受性を規定する非免疫性因子のひとつであり、*vif* を欠失した HIV (HIV Δvif) の細胞の種類による感染感受性の違いを解明することにより明らかにされた。Vif タンパク質は、HIV-1 をはじめとする霊長類の免疫不全ウイルスがコードしているが、このタンパク質はウイルス感染及び複製の強力な調節因子である。ウイルス複製の後期において、ヒト T リンパ球に存在する抗ウイルス防御機構に対抗するために必要なタンパク質であり、*vif* を欠失した HIV (HIV Δvif) は非感染性となる。ところがある種の細胞では、*vif* を欠失した HIV Δvif であっても感染性が保持されることが知られており、感染における Vif の役割、そして Vif により制御される宿主の抗ウイルス防御機構が注目さ

れていた。Sheehy らは、HIV Δ vif 感染感受性細胞と感染非感受性細胞の発現 mRNA を解析することにより、Vif の標的蛋白として APOBEC3G (Sheehy らの論文では CEM15 と報告されている) を同定した¹⁹⁾。HIV Δ vif 感染感受性細胞では APOBEC3G mRNA の発現が低下しており、これらの細胞に APOBEC3G 遺伝子を強制発現させると、感染非感受性細胞に変化することを明らかにした。APOBEC3G はウイルス粒子と結合し、ウイルス RNA から複製された DNA のマイナス鎖中でシチジン残基をウラシルに変換し、レトロウイルスゲノムを破壊する細胞内因子であることが明らかにされた。さらなる解析により Vif は宿主細胞自身のユビキチンタンパク質リガーゼと複合体を形成し、APOBEC3G をタンパク質分解酵素の標的にすることにより、APOBEC3G による抗ウイルス防御機構を回避していると考えられている^{20, 21)}。

ヒトの APOBEC3G 遺伝子多型と HIV/AIDS 感受性のついては、exon 4 の H184R 多型との関連が報告されているが、多型による抗ウイルス作用の違いが実験的に確認できないこともあり、さらなる追試が必要である²²⁾。

4. 宿主の免疫応答に関わる遺伝子多型と HIV/AIDS 感受性

1) 主要組織適合抗原系と HIV/AIDS 感受性

ウイルス感染防御機構における主要組織適合抗原系の役割については紹介するまでもないが、主要組織適合抗原系 class I 遺伝子の HLA-B 遺伝子と、HIV/AIDS 感受性および抵抗性の関連が報告されている。初期の研究では HLA-C Cw*04 の関与も示唆されたが、この allele は HLA-B B*35 subtype (B*35-Px) と連鎖不平衡の関係にあることが明らかとなり、HLA-B 遺伝子の関連を示唆する研究が多い。しかし、後述するゲノムワイド関連解析では、HLA-C 遺伝子の関与も示唆されており、さらなる追試が必要である。Gao らの 5 つのコホートからなる 2,627 人の HIV 感染患者の疫学調査によれば²³⁾、HLA-B B*57 および B*27 は AIDS の発症、進行を遅らせることが報告されており、B*57 は感染初期の進行と、B*27 は CD4 が低下した感染後期の病状の

進行と関与することが報告されている。一方、B*35 subtype (B*35-Px) は CD4 数の減少を加速し AIDS の早期発症に関与すると報告されている。HLA-B B*57 は HIV gag 蛋白の ISPRTLNAW (gag 147-155) ペプチドと、B*27 は KRWILGLNK (gag 263-272) ペプチドと結合し抗原提示することが知られており、HIV 感染に対して宿主の免疫機構が効率よく対応できることが予想される。興味深いことに HIV 感染に対して抵抗性を示すチンパンジーでは、HLA-B 遺伝子の多様性が低下しており、Patr-B*02 および Patr-B*03 の 2 つの allele の頻度が高いことが報告されているが、これら 2 つのチンパンジー allele は、HIV 感染に抵抗性を示す HLA-B B*57 および B*27 との機能的な類似性が報告されている²⁴⁾。つまり、Patr-B*02 は HQAISPRTL (Gag 144-152) ペプチドと、Patr-B*03 は KRWILGLN (Gag 263-271) ペプチドと結合し抗原提示をするのである。チンパンジーは HIV 感染に対して抵抗性を示すことが知られており、HIV に感染しても AIDS を発症することは稀であるとされている。この詳細な機序は明らかではないが、HLA-B 遺伝子の関与が示唆され、ヒトで抵抗性を示す allele との機能的な共通性は大変興味深い。HLA-B 遺伝子の多様性の低下から判断すると、チンパンジーの進化の過程で HIV 感染による自然淘汰がおこったことが考えられ、霊長類の進化に HIV 感染症が密接に関わってきたことが推測できる。

2) KIR3DL1/S1 と HIV/AIDS 感受性

Natural killer (NK) 細胞はウイルス感染に対する自然免疫機構において重要な役割を担っている。NK 細胞の表面に発現する killer immunoglobulin-like レセプター (KIR) は、標的細胞に提示される HLA class I 分子と相互作用することにより、NK 細胞の活性を調節することが知られている。KIR そして HLA は非常に多様性に富んだ分子であり、特定の allele の組み合わせにより NK 細胞の活性に大きな影響を与えるが、KIR3DL1/S1 (OMIM*604946) のリガンドは HLA-B Bw4-80Ile であることが報告されている (KIR3DS1 と HLA-B Bw4-80Ile の結合については諸説ある^{25, 26)})。従来、KIR3DS1 と KIR3DL1 は別々の遺伝子にコードされる KIR レセプ

ターであるとされていたが、詳細な解析により KIR3DS1 と KIR3DL1 は allelic な関係にあり、ひとつの遺伝子の多型であることが明らかにされた。KIR3DL1 は NK 細胞の活性を抑制し、KIR3DS1 はその活性を促進する KIR レセプターであることから、KIR3DL1/S1 のリガンドである HLA-B Bw4-80Ile が標的細胞に発現している場合は、KIR3DL1 あるいは KIR3DS1 の発現により NK 細胞の活性が全く逆の方向に働くことになる。つまり、KIR3DL1 と HLA-B Bw4-80Ile の組み合わせでは NK 細胞の活性が抑制され、KIR3DS1 と HLA-B Bw4-80Ile の組み合わせでは促進されることになる。NK 細胞の抗ウイルス作用から考えると、これらの allele の組み合わせが HIV 感染症の感受性・抵抗性に関与することが予想される。KIR3DS1 と HLA-B Bw4-80Ile の組み合わせでは、AIDS の発症、進行が遅くなることが欧米人において報告され、KIR3DS1 と HLA-B Bw4-80Ile 以外の allele の組み合わせでは、急速に AIDS を発症するとしている²⁷⁾。しかし、アフリカ系アメリカ人やアフリカ人では KIR3DS1 の頻度が低いこともあり、KIR3DS1 と HLA-B Bw4-80Ile の組み合わせ効果は報告されていない²⁸⁾。

また、NK 細胞の活性を抑制する KIR3DL1 は、NK 細胞での発現パターンに基づき、高発現の KIR3DL1**h* (*001, *002, *008, *015, *009)、低発現の KIR3DL1**l* (*005, *007)、そして細胞表面への発現が認められない KIR3DL1*004 の 3 つの allotype グループに分類されるが、この allotype グループと HLA-B Bw4 の組み合わせによっても予後が変わることが報告されている。Martin らは (KIR3DS1 と HLA-B Bw4 の組み合わせにより AIDS の発症、進行が遅くなることを報告した研究グループ)、KIR3DS1 と HLA-B Bw4-80Ile の組み合わせを持つ HIV 感染患者を除外した集団の解析により、KIR3DL1*004 と HLA-B Bw4、そして KIR3DL1**h*/**h* あるいは **h*/*004 と HLA-B Bw4-80Ile の組み合わせをもつ患者は、Bw6/Bw6 にくらべて AIDS の発症が遅かったと報告している²⁹⁾。高発現の KIR3DL1**h* と発現しない KIR3DL1*004 が、HLA-B Bw4 との組み合わせにより予後に同じような影響を示しており、興味深いところである。

このように、KIR 遺伝子座と HLA 遺伝子座のエピスタティックな相互作用が宿主の感染防御に密接に関わっていることは、大変興味深い。その一方で、HLA-B Bw4 には AIDS の発症、進行を遅らせる HLA-B B*57 および B*27 が含まれており、HLA-B 遺伝子そのものによる予防効果と、KIR3DL1/S1 と HLA-B Bw4 とのエピスタティックな相互作用による予防効果を、注意深く区別して検討する必要があることを忘れてはならない。

3) サイトカイン IL10, IFN- γ 遺伝子多型と HIV/AIDS 感受性

Shin らは IL10 (OMIM*124092) などの 17 の候補遺伝子を選出し、その遺伝子座近傍のマイクロサテライト多型と HIV 感染後の臨床経過を検討することにより、IL10 遺伝子の関与を明らかにし、プロモーター領域の -592A/C 多型と予後の関連を報告している³⁰⁾。-592A 多型を有するものは -592C ホモ接合体に比べ AIDS を急速に発症する例が多く、予後の良い LTNP 患者群では -592C/C の割合が高いとしている。このプロモーター多型により転写因子の結合能が変化し、IL10 遺伝子の発現量が変ることにより、HIV 感染の予後に関わると推測している。

また、An らは IFN- γ (OMIM*147570) のプロモーター多型 G-173T と HIV/AIDS 感受性との関連を報告し、-173T allele は CD4 + T 細胞の減少、AIDS の発症を加速するとしている³¹⁾。-173T allele の遺伝子多型頻度はアフリカ系アメリカ人で約 4% と頻度はそれほど高くないが、-173G/T ヘテロ接合体は -173G/G ホモ接合体に比べ予後不良である。このプロモーター多型により TNF によるプロモーター活性に差が生じ、-173T allele では TNF による IFN- γ の産生が亢進するが、IFN- γ の産生亢進によるアポトーシスの誘発が CD4 + T 細胞の減少を加速すると推測している。

5. ゲノムワイド関連解析と HIV/AIDS 感受性

最後に Fellay らによるゲノムワイド関連解析の結果について紹介する³²⁾。マイクロアレイ技術を基盤とした近年の technology の進歩により、高速かつ大量に遺伝子タイピングを行うことが可能となり、

様々なありふれた病気と遺伝子多型との関わりを網羅的に明らかにしようとする試みがなされている。本研究もそのような試みのひとつである。9つのコホートからなる30,000人のHIV-1感染患者より詳細な評価が可能な486名の患者を選出し、血中ウイルス量(viral load)と予後(治療開始までの期間、あるいはCD4が350以下になるまでの期間)について555,352個のSNPとの関連について報告している。HIV感染後の血中ウイルス量は個人差が大きいことが知られているが、FellayらによればHLA complex P5 (HCP5) 遺伝子の多型 rs2395029 が血中ウイルス量の多様度(variation)の9.6%を、HLA-C 遺伝子多型 rs9264942 がその6.5%を説明するとしている。HCP5 遺伝子は chromosome 6 の HLA-B 遺伝子の 100 kb セントロメア側に位置し、レトロウイルスの pol 遺伝子に homology のある human endogenous retroviral element (HERV) を持つ遺伝子である。HERV のアンチセンス機序により、HIV-1 の細胞内複製を制御する可能性も示唆されているが、rs2395029 は前述した HLA-B B*5701 と強い連鎖不平衡の関係にあり、rs2395029 は HLA-B B*5701 の関与を反映している可能性は否定できない。一方、HLA-C 遺伝子多型 rs9264942 は HLA-C 遺伝子の発現調節に影響する遺伝子多型であることが報告されているが、viral load の個人差にどのような機序で関わっているのか、今後の解析が待たれる。

また、予後に関連する遺伝子として ZNRD1 (OMIM*607525) と RNF39 (OMIM*607524) の2つの遺伝子をFellayらは報告している。RNF39の機能については明らかにされていない点が多く、さらなる解析が必要である。一方、ZNRD1はRNA polymeraseのsubunitをコードする遺伝子であり、HIV-1の転写との関連が示唆されるが、明確な証拠はない。ZNRD1 遺伝子多型によりその発現量が変換ることが示されている。

本稿では分子疫学研究により明らかにされた宿主のHIV/AIDS感受性・抵抗性に関わる遺伝子とともに、霊長類の種間におけるHIV感染感受性、および細胞の種類によるHIV感染感受性に関わる遺伝子を紹介した。HIV/AIDS感受性・抵抗性遺伝子疫学研

究は1000人前後から数千人規模の患者を対象とした研究が多く、信頼性の高い結果であると考えられるが、多くの追試を重ねることにより、はじめてその関与が確実であると言えるようになる。そのため著名なJournalに発表されたからといって必ずしも真実ではない場合(偽陽性の可能性)があり、注意深い判断が必要である。また、本稿で紹介した遺伝子疫学研究のほとんどが欧米人、アフリカ系アメリカ人を対象としたものであり、我々日本人、アジア人においても同様の結果があてはまるかについては遺伝的背景がことなることもあり、さらなる検証が必要である。さらなる研究により、HIV/AIDS感受性・抵抗性に関わる遺伝子の解明が進み、新たな予防法、治療法の開発へと繋がることを期待する。

引用文献

1. UNAIDS (2006) 2006 Report on the global HIV/AIDS epidemic. Geneva: Joint United Nations Program on HIV/AIDS.
2. Pantaleo G, Menzo S, Vaccarezza M, Graziosi C, Cohen OJ, Demarest JF, Montefiori D, Orenstein JM, Fox C, Schragger LK, Margolick JB, Buchbinder S, Giorgi JV, Fauci AS (1995) Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 332(4): 209–216.
3. O'Brien SJ, Nelson, GW (2004) Human genes that limit AIDS. *Nature Genet.* 36: 565–574.
4. Kaslow RA, Dorak T, Tang J (2005) Influence of host genetic variation on susceptibility to HIV type 1 infection. *J. Infect. Dis.* 191: S68-S77.
5. Trkola A (2004) HIV-host interactions: vital to the virus and key to its inhibition. *Curr. Opin. Microbiol.* 7: 555–559.
6. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR (1996) Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 86: 367–377.
7. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J,

- Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cogniaux J, Forceille C, Muyldermans G, Verhofstede C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Doms RW, Vassart G, Parmentier M (1996) Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382: 722–725.
8. Martin MP, Dean M, Smith MW, Winkler C, Gerrard B, Michael NL, Lee B, Doms RW, Margolick J, Buchbinder S, Goedert JJ, O'Brien TR, Hilgartner MW, Vlahov D, O'Brien SJ, Carrington M (1998) Genetic acceleration of AIDS progression by a promoter variant of CCR5. *Science* 282: 1907–1911.
 9. Smith MW, Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Lomb DA, Goedert JJ, O'Brien TR, Jacobson LP, Kaslow R, Buchbinder S, Vittinghoff E, Vlahov D, Hoots K, Hilgartner MW, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS); Multicenter AIDS Cohort Study (MACS); Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS); San Francisco City Cohort (SFCC); ALIVE Study; O'Brien SJ (1997) Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. *Science* 277: 959–965.
 10. Mummidi S, Ahuja SS, Gonzalez E, Anderson SA, Santiago EN, Stephan KT, Craig FE, O'Connell P, Tryon V, Clark RA, Dolan MJ, Ahuja SK (1998) Genealogy of the CCR5 locus and chemokine system gene variants associated with altered rates of HIV-1 disease progression. *Nature Med.* 4: 786–793.
 11. Liu H, Chao D, Nakayama EE, Taguchi H, Goto M, Xin X, Takamatsu J, Saito H, Ishikawa Y, Akaza T, Juji T, Takebe Y, Ohishi T, Fukutake K, Maruyama Y, Yashiki S, Sonoda S, Nakamura T, Nagai Y, Iwamoto A, Shioda T (1999) Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 96: 4581–4585.
 12. An P, Nelson GW, Wang L, Donfield S, Goedert JJ, Phair J, Vlahov D, Buchbinder S, Farrar WL, Modi W, O'Brien SJ, Winkler CA (2002) Modulating influence on HIV/AIDS by interacting RANTES gene variants. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 99: 10002–10007.
 13. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, Gonzalez JR, Gratacos M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME. (2006) Global variation in copy number in the human genome. *Nature.* 444(7118): 444–454.
 14. Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, Mangano A, Sanchez R, Catano G, Nibbs RJ, Freedman BI, Quinones MP, Bamshad MJ, Murthy KK, Rovin BH, Bradley W, Clark RA, Anderson SA, O'Connell RJ, Agan BK, Ahuja SS, Bologna R, Sen L, Dolan MJ, Ahuja SK (2005) The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science* 307: 1434–1440.
 15. Nakajima T, Ohtani H, Naruse T, Shibata H, Mimaya JI, Terunuma H, Kimura A (2007) Copy number variations of CCL3L1 and long-term prognosis of HIV-1 infection in asymptomatic HIV-infected Japanese with hemophilia. *Immunogenetics.* 59(10): 793–798.
 16. Stremlau M, Owens CW, Perron MJ, Kiessling M, Autissier P, Sodroski J (2004) The cytoplasmic body component TRIM5- α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 427: 848–853.
 17. Sayah DM, Sokolskaja E, Berthouix L, Luban J

- (2004) Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1. *Nature*. 430(6999): 569–573.
18. Sawyer SL, Wu LI, Akey JM, Emerman M, Malik HS (2006) High-frequency persistence of an impaired allele of the retroviral defense gene TRIM5 α in humans. *Curr Biol*. 16(1): 95–100.
 19. Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH (2002) Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418: 646–650.
 20. Marin M, Rose KM, Kozak SL, Kabat D (2003) HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nature Med*. 9: 1398–1403.
 21. Sheehy AM, Gaddis NC, Malim MH (2003) The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nature Med*. 9: 1404–1407.
 22. An P, Bleiber G, Duggal P, Nelson G, May M, Mangeat B, Alobwede I, Trono D, Vlahov D, Donfield S, Goedert JJ, Phair J, Buchbinder S, O'Brien SJ, Telenti A, Winkler CA (2004) APOBEC3G genetic variants and their influence on the progression to AIDS. *J Virol*. 78(20): 11070–6.
 23. Gao X, Bashirova A, Iversen AKN, Phair J, Goedert JJ, Buchbinder S, Hoots K, Vlahov D, Altfeld M, O'Brien SJ, Carrington M (2005) AIDS restriction HLA allotypes target distinct intervals of HIV-1 pathogenesis. *Nature Med*. 11: 1290–1292.
 24. Balla-Jhagjhoorsingh SS, Koopman G, Mooij P, Haakma TG, Teeuwesen VJ, Bontrop RE, Heeney JL (1999) Conserved CTL epitopes shared between HIV-infected human long-term survivors and chimpanzees. *J Immunol*. 162(4): 2308–14.
 25. Gillespie GM, Bashirova A, Dong T, McVicar DW, Rowland-Jones SL, Carrington M (2007) Lack of KIR3DS1 binding to MHC class I Bw4 tetramers in complex with CD8+ T cell epitopes. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 23(3): 451–5.
 26. Alter G, Martin MP, Teigen N, Carr WH, Suscovich TJ, Schneidewind A, Streeck H, Waring M, Meier A, Brander C, Lifson JD, Allen TM, Carrington M, Altfeld M (2007) Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes. *J Exp Med*. 204(12): 3027–36.
 27. Martin MP, Gao X, Lee JH, Nelson GW, Detels R, Goedert JJ, Buchbinder S, Hoots K, Vlahov D, Trowsdale J, Wilson M, O'Brien SJ, Carrington M (2002) Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nature Genet*. 31: 429–434.
 28. Lopez-Vazquez A, Mina-Blanco A, Martinez-Borra J, Njobvu PD, Suarez-Alvarez B, Blanco-Gelaz MA, Gonzalez S, Rodrigo L, Lopez-Larrea C (2005) Interaction between KIR3DL1 and HLA-B*57 supertype alleles influences the progression of HIV-1 infection in a Zambian population. *Hum Immunol*. 66(3): 285–9.
 29. Martin MP, Qi Y, Gao X, Yamada E, Martin JN, Pereyra F, Colombo S, Brown EE, Shupert WL, Phair J, Goedert JJ, Buchbinder S, Kirk GD, Telenti A, Connors M, O'Brien SJ, Walker BD, Parham P, Deeks SG, McVicar DW, Carrington M (2007) Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat Genet*. 39(6): 733–40.
 30. Shin HD, Winkler C, Stephens JC, Bream J, Young H, Goedert JJ, O'Brien TR, Vlahov D, Buchbinder S, Giorgi J, Rinaldo C, Donfield S, Willoughby A, O'Brien SJ, Smith MW (2000) Genetic restriction of HIV-1 pathogenesis to AIDS by promoter alleles of IL10. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 97: 14467–14472.
 31. An P, Vlahov D, Margolick JB, Phair J, O'Brien TR, Lautenberger J, O'Brien SJ, Winkler CA (2003) A tumor necrosis factor- α -inducible promoter variant of interferon- γ accelerates

- ates CD4-positive T cell depletion in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. *J. Infect. Dis.* 188: 228–231.
32. Fellay J, Shianna KV, Ge D, Colombo S, Ledergerber B, Weale M, Zhang K, Gumbs C, Castagna A, Cossarizza A, Cozzi-Lepri A, De Luca A, Easterbrook P, Francioli P, Mallal S, Martinez-Picado J, Miro JM, Obel N, Smith JP, Wyniger J, Descombes P, Antonarakis SE, Letvin NL, McMichael AJ, Haynes BF, Telenti A, Goldstein DB (2007) A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1. *Science* 317: 944–947.

● 総 説 ●

[シリーズ：疾患と組織適合性] 第 1 回 HLA 分子による癌特異抗原の提示を 利用した癌免疫療法の開発

千住 覚, 西村 泰治

熊本大学大学院医学薬学研究部・免疫識別学分野

キーワード：癌特異抗原, Glypican-3 (GPC3), 肝細胞癌 (HCC), 癌免疫療法, ペプチドワクチン, 腫瘍マーカー, ES 細胞, 樹状細胞, ES-DC, 細胞ワクチン

はじめに

癌細胞にのみ発現する抗原を免疫することにより、癌細胞を攻撃して破壊する T 細胞を誘導する免疫療法を確立するために、様々な癌抗原ワクチンの開発が試みられている。従来、正常組織に発現を認めず癌細胞に特異的に高発現する癌抗原を同定することは困難であったが、cDNA マイクロアレイ解析による癌組織と正常組織におけるゲノムワイドの遺伝子発現プロファイル解析により、癌特異抗原の同定が飛躍的に進んだ。我々は、この手法を用いて多数の癌特異抗原を同定し、これを用いた癌免疫療法の臨床試験を開始している。本稿では、肝細胞癌に高発現する新規癌胎児性抗原である Glypican-3 (GPC3) の発見と、GPC3 由来の HLA-A2 および HLA-A24 により細胞傷害性(キラー) T 細胞に提示されるペプチドを用いた、癌免疫療法の開発について紹介する。

樹状細胞は、T 細胞の活性化において必須の役割を果たしているプロフェッショナル抗原提示細胞である。そこで、生体外で培養した樹状細胞に何らかの方法で腫瘍抗原を負荷し生体に移入する細胞ワクチン療法が、抗腫瘍免疫応答を効果的に誘導する手

段として期待されている。筆者らは、細胞ワクチンとして用いる樹状細胞の供給源として胚性幹 (ES) 細胞に着目し、ES 細胞由来の樹状細胞を用いた免疫療法の開発に関する基礎研究を行っている。本稿では、マウスの腫瘍モデルを用いた、ES 細胞から分化誘導した樹状細胞 (ES-DC) による効率良い腫瘍免疫の誘導に関する研究成果、ならびに、最近開発したヒトの ES 細胞から樹状細胞を分化誘導する培養法について紹介する。

このような癌免疫療法の臨床応用において、どの癌抗原ペプチドあるいは、どの ES 細胞から誘導した ES-DC を、どの患者に投与するのかについて、癌患者および ES 細胞の HLA タイピングが重要であることは言うまでもない。

1. 肝細胞癌 (HCC) に対する免疫療法の現況

HCC の患者数は、欧米およびアジア諸国において依然として増加している。HCC は治療後も高頻度に再発を繰り返すため予後不良な癌であり、B 型および C 型肝炎と、それに引き続いて発症する肝硬変から発生する、ごく初期の癌に対する早期治療法や、

代表者連絡先 〒860-8556 熊本市本庄 1-1-1
熊本大学大学院医学薬学研究部・免疫識別学分野
西村 泰治

T E L 096-373-5310
F A X 096-373-5314
E-mail mxnishim@gpo.kumamoto-u.ac.jp

治療後の再発予防のために有効な補助療法の確立が望まれている。

慢性肝炎、肝硬変患者における HCC の発症予防や、HCC 術後における術後化学療法は、いまだ開発途上にある。HCC に対する免疫療法についても、1990 年代より lymphokine-activated killer (LAK) cells, tumor-infiltrating lymphocytes (TIL), peripheral blood mononuclear cell (PBMC) を用いた養子免疫療法、DC ワクチン療法、 α フェト蛋白質由来のペプチドワクチン療法などが試みられている。また HCC において高発現する癌特異的抗原も複数報

告されており、各施設でその有用性が検討されている¹⁾。

2. 新規癌胎児性抗原 Glypican-3 (GPC3) の発見

1) cDNA マイクロアレイ解析による HCC 特異的な癌胎児性抗原の発見

我々は、東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターの中村祐輔博士らとの共同研究により、癌部と非癌部における cDNA マイクロアレイ解析データ²⁾を用いて、HCC 特異的に高発現する遺伝子として GPC3 を同定した³⁾ (図 1A)。図に示すように、

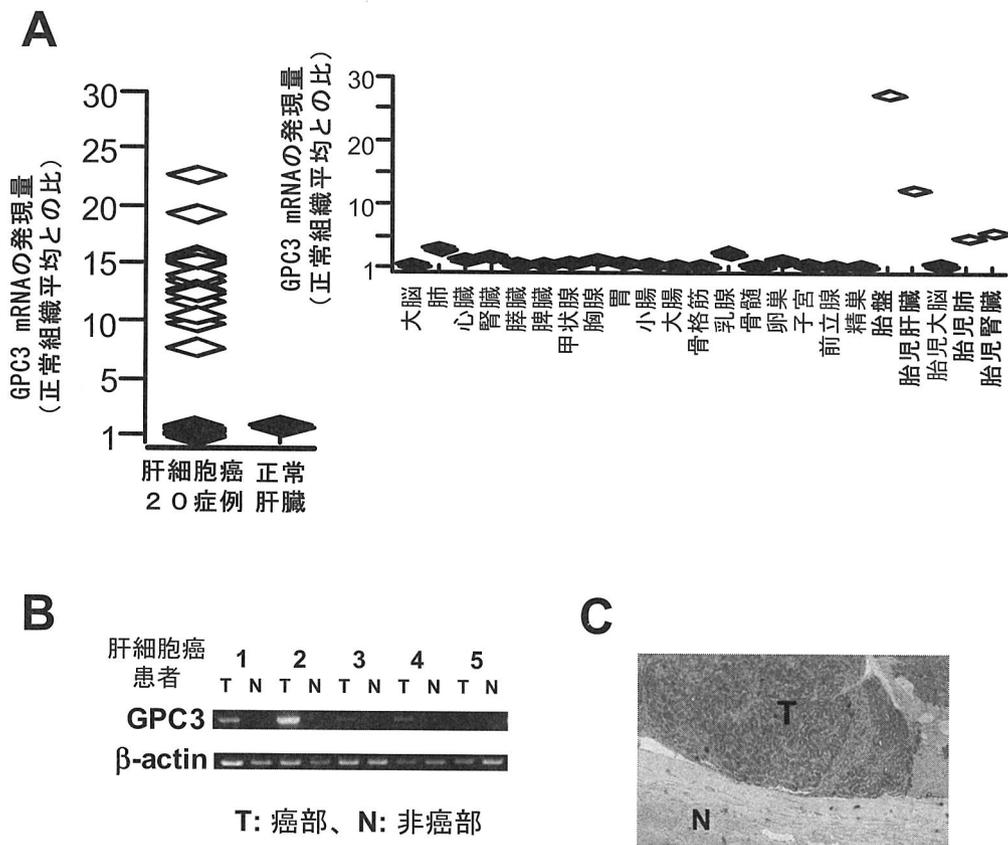


図 1 HCC 20 例の癌部、非癌部および多様な正常臓器における GPC3 遺伝子発現の cDNA マイクロアレイ解析データ²⁾と HCC 組織における GPC3 mRNA および蛋白質の発現

A: HCC 患者 20 例の癌部と非癌部における 23,040 種類の遺伝子の発現を比較検討し、さらに胎生期の 4 臓器を含む 23 臓器の正常組織において、各遺伝子の発現プロファイルを解析した。GPC3 は、肝臓癌患者 20 例中 16 例で癌部/非癌部の発現の比が 5 以上(平均 396.2)で、胎盤や胎生期の肝臓および腎臓に発現する以外は、ほとんどの成人の正常臓器に発現を認めない、癌胎児性抗原をコードする遺伝子であった。B: HCC 組織の癌部 (T) と非癌部 (N) における GPC3 mRNA の発現の有無を RT-PCR 法にて検討したところ、癌部においてのみ GPC3 の発現を認めた。C: HCC 組織切片における GPC3 蛋白質の発現を、抗 GPC3 抗体を用いた免疫組織学的解析により確認した。

GPC3 は正常な肝細胞と比較して HCC の約 80% の症例の HCC 組織において高発現していたが、成人の正常組織には、ほとんど発現していなかった。いっぽう GPC3 は胎盤や胎児期の肝臓、肺あるいは腎臓に高発現しており、いわゆる癌胎児性抗原 (Carcinoembryonic antigen あるいは Oncofetal antigen) の範疇に入る蛋白質である。

2) GPC3 の構造と機能

膜結合型糖蛋白質である Glypican ファミリーは、現在までのところ 6 種類が報告されている⁴⁾。GPC3 は、580 アミノ酸からなる 60 kD のコア蛋白質にヘパラン硫酸糖鎖修飾が加わった膜蛋白質で、C 末端が GPI アンカーにより形質膜に結合している。Pilia らは、X 染色体 (Xq26) 連鎖疾患である巨人症の一つである、Simpson-Golabi-Behmel 症候群において、GPC3 の遺伝子変異を報告している。また、GPC3 ノックアウトマウスでも、Simpson-Golabi-Behmel 症候群と同様に体の巨大化などの表現型を示すことが報告されている。

GPC3 は、ある種の腫瘍細胞では増殖を抑制したり、あるいはアポトーシスの誘導に関連があると報告されている⁵⁾。近年、GPC3 コア蛋白質が直接 Wnt と結合することにより、Wnt シグナルを活性化し、肝細胞癌の増殖を促進することが報告されている⁶⁾。

3. HCC 癌組織における GPC3 の発現と腫瘍マーカーとしての有用性

我々は、GPC3 遺伝子の発現量の差が、その遺伝子産物である蛋白質量の差として反映されているか否かについて RT-PCR 法、ならびに組織切片における免疫組織化学的解析を用いて確認した(図 1B, C)。その結果、GPC3 は蛋白質レベルにおいても、胎児期の肝臓組織に発現するが出生後発現しなくなり、HCC において再び発現することを確認した。

さらに HCC 患者の約 40% の血清中に可溶性 GPC3 が検出されるが、健常人、慢性肝炎、その他の肝疾患では全く検出されず、HCC の血清腫瘍マーカーとして有用であることを発見した³⁾。また HCC の外科的な治療後に、血清 GPC3 が消失あるいは減少することから、治療効果の判定などの臨床への応

用が期待される。

4. 癌免疫療法のターゲットとしての GPC3 の有用性

1) マウスにおける抗腫瘍免疫の解析

発現の組織特異性が優れていることから、我々は癌胎児性抗原 GPC3 が、理想的な腫瘍拒絶抗原になり得るかどうかについてマウスを用いて検討した。日本人の約 60% が所有する HLA-A24 と、BALB/c マウスのクラス I 分子の K^d に結合するペプチドの構造モチーフは、非常に類似していることがわかっている。さらに、ヒトとマウスの GPC3 では、アミノ酸配列のレベルで 95% 以上のホモロジーを認めることから、ヒトとマウスの GPC3 でアミノ酸配列が完全に一致し、HLA-A24 および K^d のいずれにも結合すると予測される GPC3 由来のペプチドを合成した。このペプチドを骨髄由来樹状細胞に負荷し、BALB/c マウスに免疫して解析することにより、K^d 分子に結合して細胞傷害性 T 細胞 (CTL) に提示される K^d 拘束性 CTL エピトープペプチドを同定した⁷⁾。

このエピトープペプチドを負荷した骨髄由来樹状細胞ワクチンを腹腔内に予防的に投与した BALB/c マウスでは、コントロール群に比べマウス GPC3 遺伝子を強制発現させたマウス大腸癌細胞株の増殖は著明に抑制され、さらにマウスの生存期間の延長が確認された⁷⁾。このエピトープペプチドは HLA-A24 によっても提示され、ヒトでも同様に CTL エピトープとなる可能性があると思われる。

2) HCC 患者における GPC3 特異的 CTL の誘導

日本人の HLA-クラス I 対立遺伝子のうち、HLA-A24 (A*2402) は日本人の約 60% が所有し、HLA-A2 (A*0201) は約 20% が所有する、ありふれた対立遺伝子である。そこでヒトとマウスの GPC3 に保存されたアミノ酸配列をもつペプチドで、HLA-A2 (A*0201) に結合すると推定される GPC3 由来の 9~10 個のアミノ酸からなるペプチドを 9 種類選択した。これらのペプチドを HLA-A2 トランスジェニックマウス (HLA-A2 Tgm) に免疫した後に、ELISPOT アッセイにより最も強く GPC3 特異的

CTL を誘導出来るエピトープペプチドを探索することにより、ペプチド A2-3; GPC3₁₄₄₋₁₅₂ を同定した⁸⁾。さらに、この GPC3 A2-3 ペプチドを負荷した BM-DC にて 2 回免疫した HLA-A2Tgm では、重要臓器(脳, 皮膚, 心, 肺, 肝, 腎)において自己免疫反応は生じておらず, その安全性が示唆された。

HLA-A2 拘束性 CTL エピトープペプチド GPC3₁₄₄₋₁₅₂ と, H-2K^d (≡HLA-A24) 拘束性 CTL エピトープペプチド GPC3₂₉₈₋₃₀₆ を用いて, HLA-A2 または HLA-A24 陽性の HCC 患者の末梢血単核細胞 (PBMC) を刺激して, ペプチド特異的 CTL の誘導を試みた。その結果, GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドを用いて HLA-A2 陽性 GPC3 陽性 HCC 患者 8 名中 5 名の PBMC より, また, GPC3₂₉₈₋₃₀₆ ペプチドを用いて HLA-A24 陽性 GPC3 陽性 HCC 患者 6 名中 4 名の PBMC より, 各 CTL エピトープに特異的な CTL を誘導できた⁸⁾ (表 1)。

表 1 HLA-A2 あるいは -A24 陽性 HCC 患者(それぞれ Pt-A2, Pt-A24) の約 50% において, GPC3 特異的な CTL が誘導された。

患者	年齢	性別	癌の進行度 ¹⁾	GPC3 の発現 ²⁾	HLA の発現 ³⁾	CTL の誘導 ⁴⁾
Pt-A2- 1	80	F	IIa	+	+	+
Pt-A2- 2	72	M	II	+	+	+
Pt-A2- 3	67	F	II	ND	ND	+
Pt-A2- 4	54	M	I	+	+	+
Pt-A2- 5	57	M	I	ND	ND	-
Pt-A2- 6	66	M	I	-	-	-
Pt-A2- 7	54	M	IIa	+	+	+
Pt-A2- 8	73	M	II	ND	ND	+
Pt-A2- 9	68	F	IIIa	+	+	-
Pt-A2-10	54	M	II	+	+	-

患者	年齢	性別	癌の進行度 ¹⁾	GPC3 の発現 ²⁾	HLA の発現 ³⁾	CTL の誘導 ⁴⁾
Pt-A24- 1	60	M	IVa	+	+	+
Pt-A24- 2	57	M	IVa	+	+	-
Pt-A24- 3	75	F	IIIa	+	+	+
Pt-A24- 4	59	M	IIIa	ND	ND	+
Pt-A24- 5	52	M	IVb	-	+	-
Pt-A24- 6	65	M	I	ND	ND	+
Pt-A24- 7	61	M	I	ND	ND	+
Pt-A24- 8	74	M	II	ND	ND	-
Pt-A24- 9	59	M	IVb	-	-	-
Pt-A24-10	69	M	IVa	+	+	-
Pt-A24-11	72	M	II	-	+	-
Pt-A24-12	61	M	IIIa	+	+	+

¹⁾ TNM 分類を用いた。

²⁾ 免疫染色を用いて、腫瘍周囲の正常組織と比較して発現を確認した。

³⁾ 免疫染色により膜が染色された場合に、発現ありと判断した。

⁴⁾ GPC3 発現 HCC 細胞株 HepG2 に対する細胞傷害活性が、E/T 比 20 で 20% 以上観察された場合に、CTL を誘導できたと判断した。

さらに、重症混合型免疫不全をもつことより、ヒトの細胞を拒絶できない NOD/SCID マウスに、GPC3 遺伝子を強制発現させたヒト HCC 細胞株 SK-Hep1/GPC3 を皮下移植して生着させた。その後、HLA-A2 拘束性エピトープペプチド GPC3₁₄₄₋₁₅₂ あるいは HLA-A24 拘束性エピトープペプチド GPC3₂₉₈₋₃₀₆ で刺激することにより、HCC 患者の PBMC より誘導されたヒト GPC3 特異的 CTL 株を静脈注射により養子免疫した。GPC3 エピトープペプチドで誘導した CTL 株を投与した NOD/SCID マウスでは、コントロールの T 細胞株あるいは生理食塩水のみを投与した群と比較して、有意差をもって腫瘍の増殖抑制が観察された⁸⁾ (図 2)。

現在、国立癌センター東病院にて HLA-A2 あるいは -A24 陽性の HCC 患者を対象にして、これらのペプチドを用いた癌免疫療法の臨床第 1 相試験を展開中である。

5. 樹状細胞ワクチンを作製するための材料としての ES 細胞の有用性

有効な抗腫瘍免疫療法の確立には、抗腫瘍免疫応答の標的となる腫瘍抗原の同定とともに、標的腫瘍抗原に対する免疫応答を強力に活性化するための免疫法の開発が不可欠である。また、医療技術としての普及を考慮すると、有効性はもちろん安全性や経済性をも考慮した技術の開発が必要である。

現在、樹状細胞を用いた抗腫瘍免疫療法には、アフレーシス(成分採血)により分離した末梢血白血球中の単球を、GM-CSF 等のサイトカインを加えて培養し分化誘導することにより作製された樹状細胞が用いられている。しかしながら、この方法には、アフレーシス操作に伴う患者への負荷、さらに、末梢血白血球から分離される単球の数や、単球から樹状細胞への分化誘導効率に個人差があるため、樹状細胞の収量が不安定であることなど、医療技術として広く普及するにはいくつかの問題がある。

ES 細胞は、血液細胞、神経細胞、あるいは内分泌細胞など様々な細胞へ分化する能力を備えている代表的な多能性幹細胞である。現在、ES 細胞からの分化誘導により作製した各種細胞を移植する、再生医療の実用化をめざした研究が国内外において盛んに

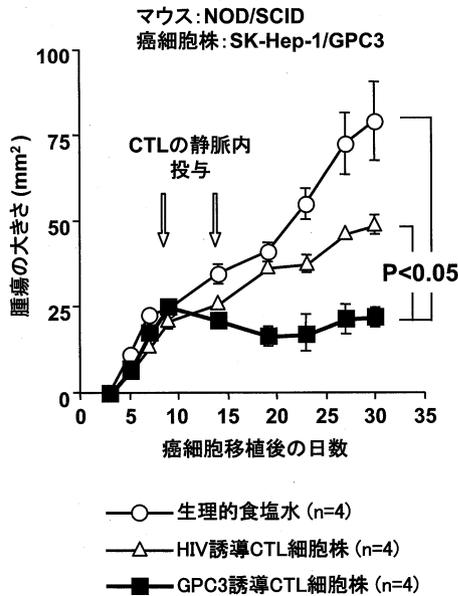


図2 免疫不全マウスに移植したGPC3発現ヒトHCC細胞株に対するヒトCTL養子免疫療法の有効性

NOD/SCIDマウスの背部の皮下に、ヒトHCC細胞株SK-Hep-1にGPC3遺伝子を強制発現させたSK-Hep-1/GPC3を 1×10^7 個移植し、移植後9日目に 5×5 mmの大きさになった時点と、その5日後(移植後14日目)にCTLを 8×10^7 個、計2回静脈内に投与した。HCC患者のPBMCをGPC3エピトープペプチドで刺激して誘導したCTL投与群(■)と、コントロールとしてHIVエピトープペプチドで誘導したCTL投与群(△)、生理食塩水のみを投与した群(○)の間で比較すると、GPC3特異的CTL投与群ではコントロール群に比べ、有意に腫瘍の増殖が抑制されていた。

行われている。筆者らは、ES細胞を材料にして細胞ワクチンとして用いる樹状細胞を作製することを考え、数年前に研究を開始した。

ES細胞は、適切な条件の下で培養することにより、未分化な状態を保ったまま無限に増殖させることが可能である。したがって、樹状細胞の材料としてES細胞を用いることが可能になれば、材料をいくらかでも増やすことができることになり、細胞ドナーへ新たな負担をかけることなく大量の樹状細胞を作製できる。

また、ES細胞は、電気穿孔法あるいはリポフェクション等により、ウイルスベクターを使用することなく、遺伝子導入を行うことが可能であり、さらに、遺伝子導入細胞のクローンを作製することも可能である。そこで、ES細胞の段階で遺伝的改変を行い、適切な遺伝子改変ES細胞クローンを選択し、これを樹状細胞に分化誘導すれば、樹状細胞の遺伝的改変を容易に行うことができる。これにより、抗原分子あるいは各種の免疫制御分子を人為的に発現させるなど、機能を様々に修飾した樹状細胞を作製することができるという利点もある。

6. マウスES細胞からの樹状細胞の作製法

筆者らは、まず、マウスのES細胞から樹状細胞を分化誘導する方法の開発に取り組んだ。そして、OP9細胞(正常なM-CSF遺伝子を欠損したop/opマウスに由来する骨髓ストローマ細胞株)と共培養することにより、マウスES細胞から血液細胞への分化誘導を行う仲野らの方法⁹⁾を参考にして、マウスES細胞から樹状細胞を作製する培養プロトコルを確立した¹⁰⁾。

まず、ES細胞の中胚葉性細胞への分化を促すために、ES細胞を単層培養しているOP9細胞とともに5-6日間培養する。この結果、ほとんどのES細胞が、中胚葉系細胞へ分化する。次に、分化した細胞をトリプシン/EDTAを用いて培養プレートから回収し、新たに準備したOP9細胞上でGM-CSFの存在下で5-6日間培養する。この結果誘導されるES細胞由来のミエロイド系の細胞を細菌培養用のペトリディッシュに移し、さらにGM-CSFの存在下で培養を続けると7-10日目頃より不規則な樹状突起を有する浮遊性の細胞が出現する。この細胞は、マウスの骨髓細胞からGM-CSFを用いて分化誘導した樹状細胞と同等の抗原提示機能とT細胞刺激活性を有しており、また、形態および表面マーカー等から、ミエロイド系樹状細胞に相当すると考えられる。これをさらにTNF- α 、IL-4、抗CD40抗体、LPS等で刺激すると、著明な樹状突起を有し、より強力なT細胞刺激活性を有する成熟樹状細胞が誘導される。このES細胞由来の樹状細胞を、ES-DCと名付けた。図3にOP9細胞の上に出現したES細胞由来の浮

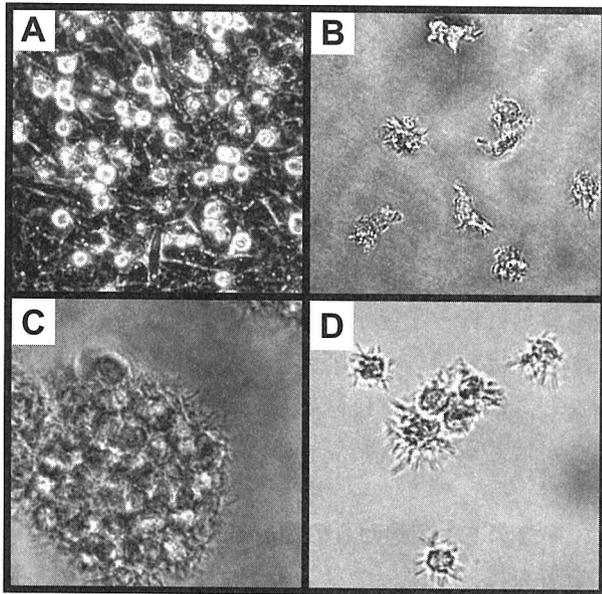


図3 マウス ES-DC の分化にともなう細胞形態の変化
A: OP9 細胞上で ES 細胞から分化した血球系細胞, B: 分化細胞をペトリディッシュへ植え継いだ後に出現した ES-DC, C: IL-4, TNF- α , 抗 CD40 抗体を同時に加えて成熟した ES-DC, D: IL-4, LPS, 抗 CD40 抗体を同時に加えて成熟した ES-DC

遊細胞から, ES-DC への分化に伴う細胞形態の変化を示す。

7. 遺伝的改変を行ったマウス ES 細胞由来の樹状細胞による抗腫瘍免疫の誘導

細胞ワクチンとして生体に投与するために樹状細胞に腫瘍抗原を負荷する方法として, 樹状細胞に腫瘍細胞の分解産物を貪食させる方法, あるいは, 腫瘍抗原に由来し T 細胞から認識されるエピトープに相当する合成ペプチドをパルスする方法などがある。一方, 腫瘍抗原の遺伝子を樹状細胞に導入し, 樹状細胞自身に腫瘍抗原を発現させることにより, 生体投与後も持続的な抗原提示がおこり, より効率良く T 細胞を刺激できると期待される。

筆者らは, 図4に示す遺伝子導入 ES-DC を作製する手順により, モデル腫瘍抗原として OVA (卵白アルブミン) 抗原を発現する ES-DC を作製した。この OVA 発現 ES-DC をマウス個体に移入することにより, OVA 抗原に特異的な細胞傷害性 T 細胞を感作することができた。また, この ES-DC を in

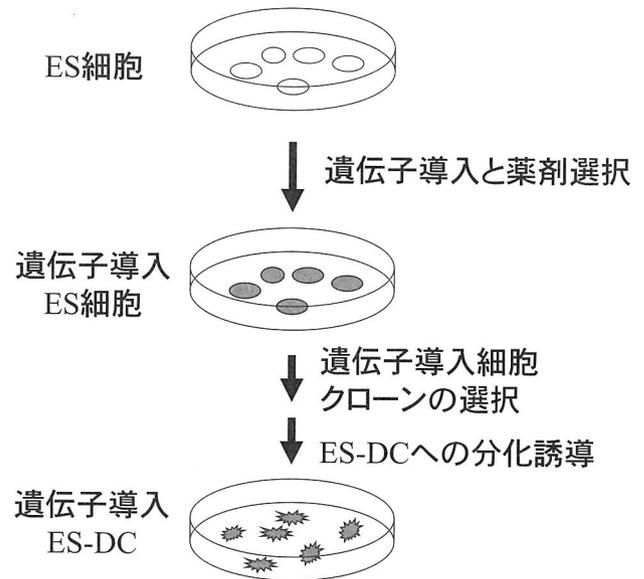


図4 遺伝子導入 ES-DC の作製手順

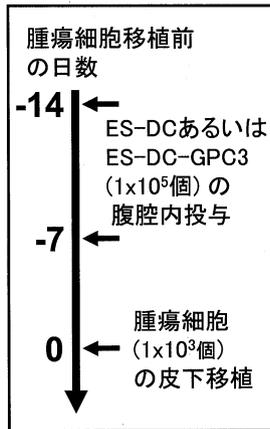
まず, リポフェクションあるいは電気穿孔法により, 未分化状態にある ES 細胞へ, 抗原あるいは免疫制御分子等の遺伝子発現ベクターを導入する。ベクターに付加している薬剤耐性遺伝子に合わせて G418 あるいはピューロマイシン等の薬剤を加えて培養すると, ベクターが導入された ES 細胞のクローンがコロニーとして出現する。複数の ES 細胞クローンを単離し, その中から適切な遺伝子改変 ES 細胞クローンを選択して増殖させる。樹立した遺伝子導入 ES 細胞クローンを ES-DC に分化誘導することにより, 遺伝子導入 ES-DC をいくらかでも作製することができる。

in vitro でマウスの脾臓由来の T 細胞と共培養して刺激した場合も, OVA 抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞を活性化することができた。さらに, この樹状細胞を投与することにより OVA 抗原に対して感作されたマウスは, OVA を発現するマウス腫瘍細胞 (MO4) を移植した場合に, これを拒絶することができた¹¹⁾。

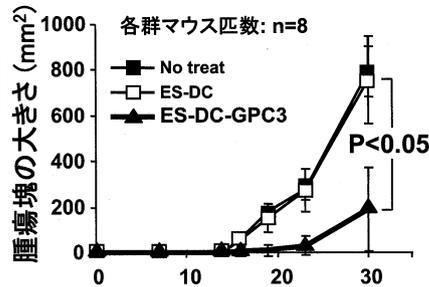
ES-DC による免疫療法では, モデル抗原である OVA を用いた場合だけでなく, 腫瘍細胞に自然に発現している腫瘍抗原を標的とした抗腫瘍免疫応答の誘導も可能である。筆者らは, GPC3 がヒトの HCC のみならず, メラノーマにも高発現する新規癌胎児性抗原であることを発見している¹²⁾。前述の方法を用いて ES-DC に GPC3 を強制発現させたもの (ES-DC-GPC3) をマウス個体に予防的に投与することにより, 図5に示すように, マウスの皮下に移植され

皮下移植されたB16-F10メラノーマ細胞株を用いた予防実験

A 実験プロトコール



B 腫瘍の増殖



C 腫瘍移植後のマウスの生存率

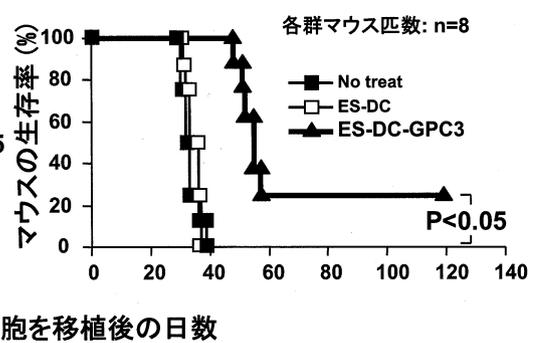


図5 HCC およびメラノーマの新規癌胎児性抗原 GPC3 を発現する ES-DC による抗腫瘍効果の誘導
マウス ES 細胞にマウス GPC3 遺伝子を導入して発現させ、ES-DC (ES-DC-GPC3) を分化誘導した。A; 遺伝子
改変を加える前の ES-DC (□), あるいは ES-DC-GPC3 (▲) をマウスの腹腔内に 7 日間隔で 2 回投与した。そし
て、2 回目の投与から 7 日後に、これらのマウスと未処置対照群マウス (■) の皮下に、GPC3 遺伝子を自然に発
現するメラノーマ細胞 (B16-F10) を移植し、B; その後の腫瘍の大きさの変化と、C; マウスの生存期間を観察し
た。

た、GPC3 を自然に発現するマウスメラノーマ細胞 B16-F10 の増殖を著明に抑制し、さらにマウスの生
存期間を延長することが可能であった¹³⁾。

8. 抗原とケモカインを同時に発現するマウス ES-DC を用いた抗腫瘍免疫応答の誘導

抗原に暴露されていないナイーブ T 細胞は、リン
パ節などの T 細胞領域において樹状細胞から抗原を
提示され、エフェクター T 細胞やメモリー T 細胞
となる。しかしながら、樹状細胞を体外から投与し
た場合、所属リンパ節へ到達するのは投与した樹状
細胞のうちの 1% 以下であると報告されている。し
たがって、抗原特異的な T 細胞と遭遇し T 細胞を
感作するという役目を果たせるものは、移入した樹
状細胞のうちごく一部であると考えられる。

筆者らは、この効率を改善することにより、抗原
を負荷した樹状細胞による免疫効果を、さらに増強
できると考えた。そして、ES-DC に T 細胞の遊走
を促すケモカインを発現させる方法を考案した。生
体移入した ES-DC がリンパ組織へ遊走できなく
ても、ES-DC に T 細胞の遊走を促すケモカインを強
制発現させておけば、ES-DC が存在する場所へ T 細

胞が集まり、その場所で ES-DC から T 細胞へ抗原
刺激が伝えられる事により、抗原特異的な T 細胞を
活性化する効果を高めることができるのではないかと
考えた。

前述した OVA 遺伝子を導入したマウス ES 細胞
に、さらに、T 細胞に対する遊走活性を有するケモ
カインの遺伝子を導入し、この ES 細胞から OVA と
ケモカインを同時に発現する ES-DC を作製した。T
細胞に対する遊走活性を有するケモカインとして、
生理的に存在する樹状細胞からは産生されない、
SLC (CCL21), Mig (CXCL9), および Lymphotactin
(XCL1) の遺伝子をそれぞれ導入し、各々の効果を
比較した。その結果、この 3 種類のケモカインのい
ずれについても、OVA を単独で発現する ES-DC より
も、OVA とケモカインを同時に発現する ES-DC
の方が、より効果的に T 細胞を活性化できることが
わかった¹¹⁾。さらに、SLC あるいは Mig を OVA と
同時に発現する ES-DC は、OVA 単独発現の ES-DC
よりも、抗腫瘍効果の誘導においても優れていた(図
6)。特に SLC の共発現により、最も強い抗腫瘍免
疫の増強効果が得られた。

皮下移植されたMO4メラノーマ細胞株を用いた予防実験

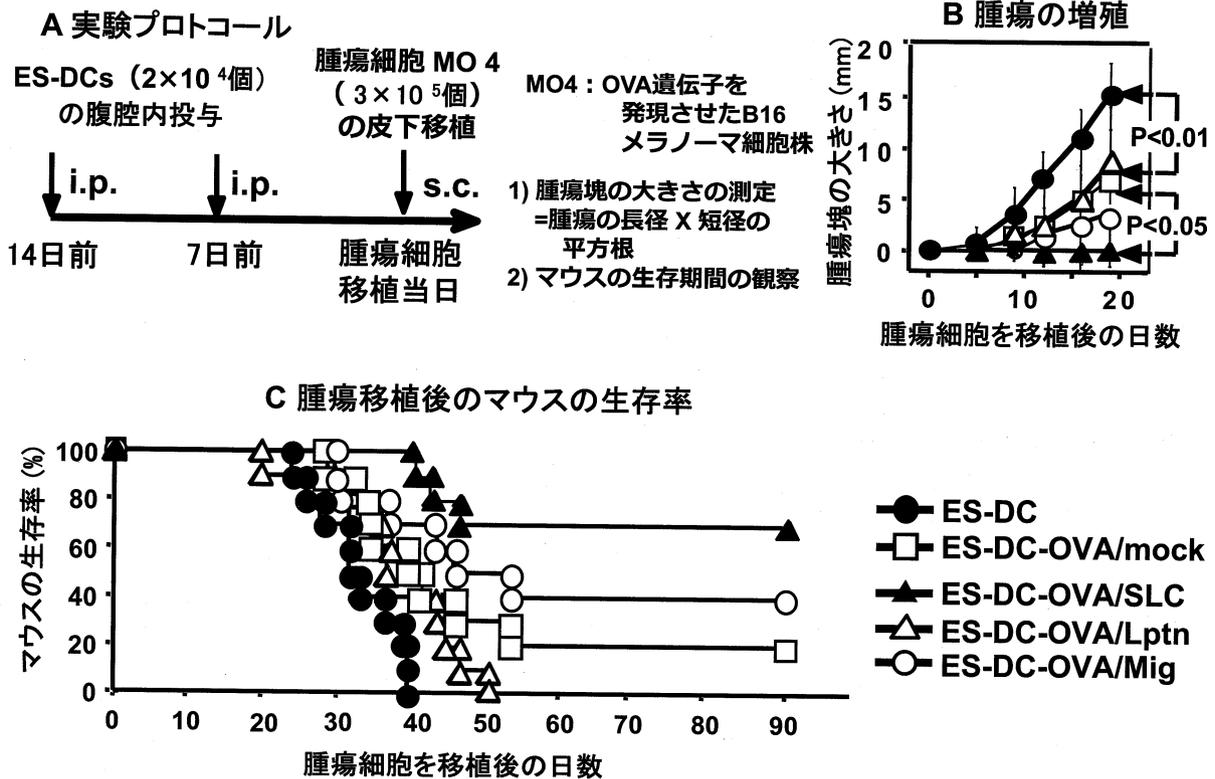


図6 導入遺伝子由来のケモカインとモデル腫瘍抗原 OVA を同時に発現する ES-DC による抗腫瘍効果の増強
 マウス ES 細胞への遺伝子導入とクローンの選択を2回繰り返すことにより、モデル腫瘍抗原として OVA 抗原と、T 細胞の遊走を誘導するケモカイン (SLC, Lymphotoxin, あるいは Mig) の遺伝子を同時に発現する ES-DC (それぞれ ES-DC-OVA/SLC ▲, ES-DC-OVA/Lptn △, ES-DC-OVA/Mig ○) を作製した。A; これらの遺伝的改変 ES-DC (▲, △, ○), 遺伝子改変を加える前の ES-DC (●), あるいは OVA のみを発現する ES-DC (ES-DC-OVA/mock □) をマウス腹腔内に7日間隔で2回投与した。そして、2回目の投与から7日後に、OVA 遺伝子を強制発現させた腫瘍細胞 (MO4) を皮下に移植し、B; その後の腫瘍の大きさの変化と、C; マウスの生存期間を観察した。

9. アロマウス ES-DC を利用した腫瘍免疫の誘導および ES-DC の自己免疫疾患予防への応用

ES-DC を臨床応用しようとする場合、ES 細胞ドナーとレシピエントの間の HLA を初めとする遺伝的多型の差異に起因する組織不適合性の問題を解決する必要がある。しかしながら、マウスを用いた実験では、ES 細胞ドナーとレシピエントが同系でなくとも、MHC のアリルを一部共有していれば、共有された MHC クラス I 分子に提示された抗原により、抗原特異的な T 細胞を活性化し、抗腫瘍免疫効果も得られることを観察している¹⁴⁾。

筆者らは、ES-DC 技術の応用として、抗腫瘍免疫

療法だけでなく、免疫抑制分子と自己免疫疾患の標的となる自己抗原を同時に強制発現させた ES-DC による、自己免疫疾患の予防にも成功している^{15, 16)}。

10. ヒト ES 細胞からの樹状細胞の作製

以上のように、遺伝子導入により腫瘍抗原を発現させたマウス ES-DC をマウス個体に移入することにより、抗原特異的な CTL を活性化し、抗腫瘍免疫効果を誘導できることが示された。これらの結果は、ES-DC を用いた抗腫瘍免疫療法が臨床的にも有用ではないかと期待させるものである。筆者らは、ES-DC の臨床応用をめざして、ヒトの ES 細胞から

ES-DC を作製する分化誘導法の開発を行った。

ヒトの ES 細胞は、マウスの ES 細胞に比べて上皮性の細胞に分化しやすい傾向があるが、マウスの場合と同様に OP9 細胞をフィーダー細胞として用いることにより、血液細胞を含む中胚葉系細胞への分化を誘導することが可能であった¹⁷⁾。筆者らのヒトの ES-DC 分化誘導法では、培養系へ GM-CSF, M-CSF, および IL-4 を添加することにより効率良い分化誘導が可能であった。ヒト ES-DC もマウス ES-DC と同様に蛋白質抗原をプロセスして T 細胞へ提示する活性やアロ MLR 刺激活性など、樹状細胞としての機能を備えていた。また、マウス ES-DC の場合と同様の手法で、ヒトの遺伝子改変 ES-DC を作製することも可能であった。

おわりに

GPC3 由来の CTL エピトープは、HCC の免疫療法のアラたなターゲットとして、その臨床試験の結果が期待される。癌の免疫逃避に対抗するためには、多様な癌拒絶抗原のレパートリーを確立することが望まれる。GPC3 がその 1 つとして、HCC の再発および発症防止に寄与することを期待したい。

最近、ES 細胞で発現している数種類の遺伝子をマウスあるいはヒトの線維芽細胞等の体細胞に導入することにより、ES 細胞と同等の多分化能を有する iPS (induced Pluripotent Stem) 細胞を作製できることが報告された^{18, 19)}。iPS 細胞の作製には、ES 細胞の場合とは異なりヒト胚の滅失を必要としないという利点がある。さらに、iPS 細胞は、皮膚線維芽細胞など、比較的侵襲性の低い方法で採取できる細胞からも作製できるため、治療の対象となる患者自身など任意のドナーから作製することが可能である。ES 細胞から樹状細胞を作製する技術を iPS 細胞へ適用できれば、倫理的な問題を回避し、かつ、患者本人への負担を大幅に軽減しつつ治療に必要な樹状細胞を作製することが可能となる。著者らは、現在 iPS 細胞から樹状細胞を作製する研究も開始している。

文 献

1. Butterfield LH. Immunotherapeutic strategies for

hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 127: S232–241, 2004.

2. Okabe H, Satoh S, Kato T, et al. Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res*. 61: 2129–2137, 2001.
3. Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, et al. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 306: 16–25, 2003.
4. Veugelers M, De Cat B, Ceulemans H, et al. Glypican-6, a new member of the glypican family of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem*. 274: 26968–26977, 1999.
5. Gonzalez AD, Kaya M, Shi W, et al. OCI-5/GPC3, a glypican encoded by a gene that is mutated in the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome, induces apoptosis in a cell line-specific manner. *J. Cell. Biol*. 141: 1407–1414, 1998.
6. Capurro MI, Xiang YY, Lobe C, et al. Glypican-3 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by stimulating canonical Wnt signaling. *Cancer Res*. 65: 6245–6254, 2005.
7. Nakatsura T, Komori H, Kubo T, et al. Mouse homologue of a novel human oncofetal antigen, glypican-3, evokes T-cell-mediated tumor rejection without autoimmune reactions in mice. *Clin. Cancer Res*. 10: 8630–8640, 2004.
8. Komori H, Nakatsura T, Senju S, et al. Identification of HLA-A2- or -A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res*. 12: 2689–2697, 2006.
9. Nakano T, Kodama H, Honjo T. Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* 265: 1098–1101, 1994.
10. Senju S, Hirata S, Matsuyoshi H, et al. Generation and genetic modification of dendritic cells

- derived from mouse embryonic stem cells. *Blood* 101: 3501–3508, 2003.
11. Matsuyoshi H, Senju S, Hirata S, et al. Enhanced priming of antigen-specific CTL in vivo by transfer of ES cell-derived dendritic cells expressing chemokine along with antigenic protein. *J. Immunol.* 172: 776–786, 2004.
 12. Nakatsura T, Kageshita T, Ito S, et al. Identification of glypican-3 as a novel tumor marker for melanoma. *Clin. Cancer Res.* 10: 6612–6621, 2004.
 13. Motomura Y, Senju S, Nakatsura T, et al. Embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing glypican-3, a recently identified oncofetal antigen, induce protective immunity against highly metastatic mouse melanoma, B16-F10. *Cancer Res.* 66: 2414–2422, 2006.
 14. Fukuma D, Matsuyoshi H, Hirata S, et al. Cancer prevention with semi-allogeneic ES cell-derived dendritic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335: 5–13, 2005.
 15. Hirata S, Senju S, Matsuyoshi H, et al. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by ES cell-derived dendritic cells expressing MOG peptide along with TRAIL or PD-L1. *J. Immunol.* 174: 1888–1897, 2005.
 16. Hirata S, Matsuyoshi H, Fukuma D, et al. Involvement of regulatory t cells in the experimental autoimmune encephalomyelitis-preventive effect of dendritic cells expressing myelin oligodendrocyte glycoprotein plus TRAIL. *J. Immunol.* 178: 918–925, 2007.
 17. Senju S, Suemori H, Zembutsu H, et al. Genetically manipulated human embryonic stem cell-derived dendritic cells with immune regulatory function. *Stem Cells* 25: 2720–2729, 2007.
 18. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 1–12, 2007.
 19. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917–1920, 2007.

●トピックス●

既存抗体陽性腎移植症例に対する 免疫グロブリン静注療法

小林 孝彰

名古屋大学医学部 免疫機能制御学

要約: 免疫抑制療法の進歩に伴い、厳しい拒絶反応を引き起こし予後が不良とされるクロスマッチ陽性 (HLA 抗体陽性) 移植に対して、種々の試みが積極的に行われている。有効な対策の1つとして免疫グロブリン静注療法が報告されている。免疫グロブリンは自己免疫疾患や全身性炎症性疾患の治療薬として用いられてきたが、移植領域にも応用され効果を発揮している。その作用機序と腎移植での現状(クロスマッチ陽性腎移植待機患者に対する HLA 抗体産生抑制, 移植後の抗体関連型拒絶反応の予防と治療)について解説する。

キーワード: 免疫グロブリン静注療法, クロスマッチ陽性移植, HLA 抗体, 脱感作療法, 抗体関連型拒絶反応治療

1. はじめ

最近の腎移植医療は着実に進歩している。効果的な免疫抑制剤の開発, 組織適合性 (HLA タイピング, クロスマッチ・HLA 抗体検査) に関する高精度検査の導入, 感染症の早期診断・治療, 合併症に対するきめ細かい対応など移植前・後の患者管理における医療技術が向上し, 極めて良好な移植成績が得られるようになった。このように総合的な免疫抑制療法の進歩により, 拒絶反応発現率は激減し, 細胞性拒絶反応はほぼ克服され, 抗体の関連する拒絶反応が課題として残されている。

生体ドナーに対する低侵襲の鏡視下手術が導入され, 移植数は増加している一方, ドナー(臓器提供)不足問題は解決されず, 従来は禁忌であった抗ドナー抗体陽性移植を克服する積極的な試みが行われてきた。既存抗体陽性移植の1つである ABO 血液型不適合腎移植は, 抗体除去処置, 免疫抑制療法の工夫により, 適合・一致症例と遜色ない成績を残す

ようになった。しかし, クロスマッチ陽性 (HLA 抗体陽性) 移植は, ABO 血液型不適合移植に比べてハードルは高く, 良好な成績を得ることは困難であった。脳死移植数の多い海外でも, 過去の輸血, 妊娠, 移植などで幅広く HLA 抗体が存在する患者では, 適合するドナーが現れず, 移植を受けられない状況が問題となっている。

ELISA, フローサイトメトリーを用いた高感度の HLA 抗体検査法の開発により, 既存抗体陽性例に対する対策が明らかになりつつある。本稿では, 有効な方法の1つとして考えられている免疫グロブリン大量療法について紹介する。

2. 免疫グロブリンの作用機序

免疫グロブリン静注療法 (IVIG) は, 古くから抗体が欠乏する免疫不全患者の治療として用いられた。そして, 1980 年代には, このような補充療法以外に自己免疫疾患や全身性炎症性疾患にも効果的である

連絡先 〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町 65
名古屋大学医学部免疫機能制御学
小林 孝彰

T E L 052-744-2303
F A X 052-744-2305
E-mail takakoba@med.nagoya-u.ac.jp

ことが明らかにされた^{1,2)}。免疫グロブリン静注療法が有効とされている疾患は、特発性血小板減少性紫斑病、ギラン・バレー症候群・慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、重症筋無力症、皮膚筋炎、川崎病、骨髄移植後の移植片対宿主病 (GVHD: Graft Versus Host Disease) などである(表1)。

免疫グロブリンは、様々な病原、異物などの抗原に対する抗体が含まれており、主としてIgGで構成されている。可溶性のCD4, CD8, HLA分子もわず

表1 免疫グロブリン静注療法が有効であると考えられている疾患(文献2 Table 1より引用)

原発性免疫不全症
特発性血小板減少性紫斑病
血小板輸血に抵抗性の血小板減少症
輸血後紫斑病
免疫性好中球減少症
自己免疫性溶血性貧血
自己免疫性赤芽球癆
パルボウイルスB-19関連赤芽球癆
第8(凝固)因子自己抗体症例
後天性フォンウィルブランド病
ギラン・バレー症候群
慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー
重症筋無力症
多巣性ニューロパチー
皮膚筋炎、多発筋炎
川崎病
抗好中球細胞質抗体(ANCA)関連多発血管炎
抗リン脂質抗体症候群
習慣性流産
慢性関節リウマチ(RA)、若年性関節リウマチ(JRA)
全身性エリテマトーデス(SLE)
甲状腺眼症
自己免疫性ブドウ膜炎
移植片対宿主病(GVHD)
多発性硬化症
インスリン抵抗性糖尿病
ステロイド依存性喘息
ステロイド依存性重症アトピー性皮膚炎
クローン病

かではあるが含まれている。半減期は約3週である。作用機序として、第一に自己抗体に対する中和作用がある。イデオタイプ(免疫グロブリンの可変領域に存在する抗原決定基)に反応する抗体(抗イデオタイプ抗体)だけでなく可溶性の自己抗原、サイトカイン、レセプター、DNA、リン脂質、好中球細胞質、神経、内皮細胞などに反応する自己抗体の中和作用が報告されている^{1,2)}。その他にも、Fcレセプターを介した反応、補体やサイトカインの制御、抗炎症作用、T細胞、B細胞に対する影響が考えられている(表2)。図1にはB細胞、T細胞に及ぼす免疫グロブリンの免疫調節作用を、図2にはIgG抗体の構造と補体、Fcγレセプター結合部位を示す。

3. 免疫グロブリンの副作用

臨床での多くの経験から安全性については、ほぼ確認されているが、頭痛、悪寒、吐き気、疲労感、

表2 免疫グロブリンの免疫調節作用(文献2, Table 2より引用)

(1) Fcレセプターを介した作用
マクロファージ、B細胞などFcレセプターの阻害
抗体依存性細胞傷害の阻害
抑制性FcγレセプターIIIBの誘導
(2) 抗炎症作用
補体による傷害の軽減
免疫複合体による炎症の軽減
抗炎症性サイトカインの誘導
内皮細胞活性化の抑制
微生物トキシンの中和
ステロイド所要量の減少
(3) B細胞、抗体に対する作用
骨髄B細胞の制御
Fcγレセプターを介したネガティブシグナル
抗体産生の選択的ダウン/アップレギュレーション
抗イデオタイプ抗体による自己抗体の中和
(4) T細胞に対する作用
ヘルパーT細胞、サイトカイン産生の調節
T細胞スーパー抗原の中和
(5) 細胞増殖・死
リンパ球増殖の阻害
アポトーシスの制御
(6) 樹状細胞に対する作用
分化、成熟の阻害
炎症性サイトカイン産生の調節
(7) 再髄鞘化

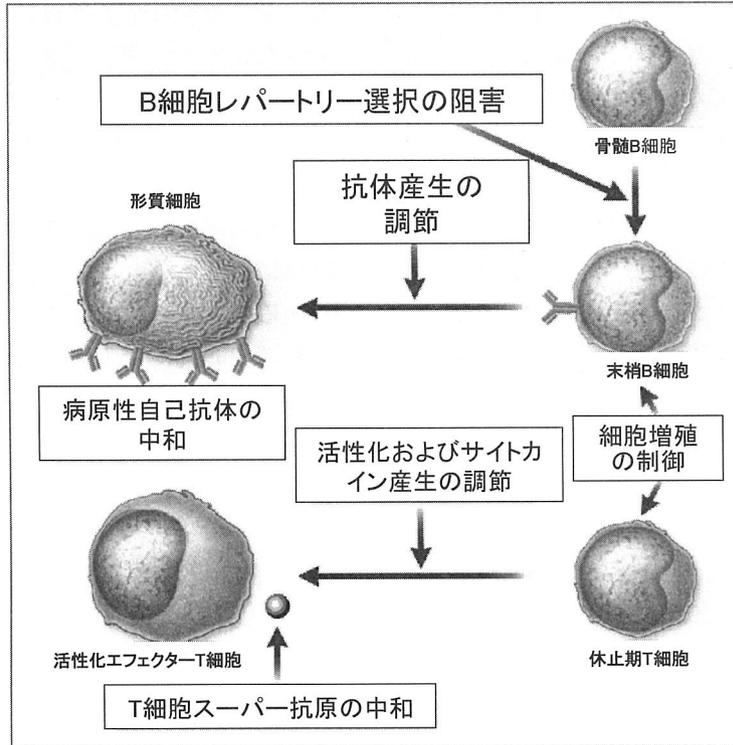


図1 B細胞, T細胞に及ぼす免疫グロブリンの免疫調節作用(文献1, Figure 1より引用)

矢印は, 免疫グロブリンの作用部位を示す。B, T細胞に対して様々な影響を与えている。

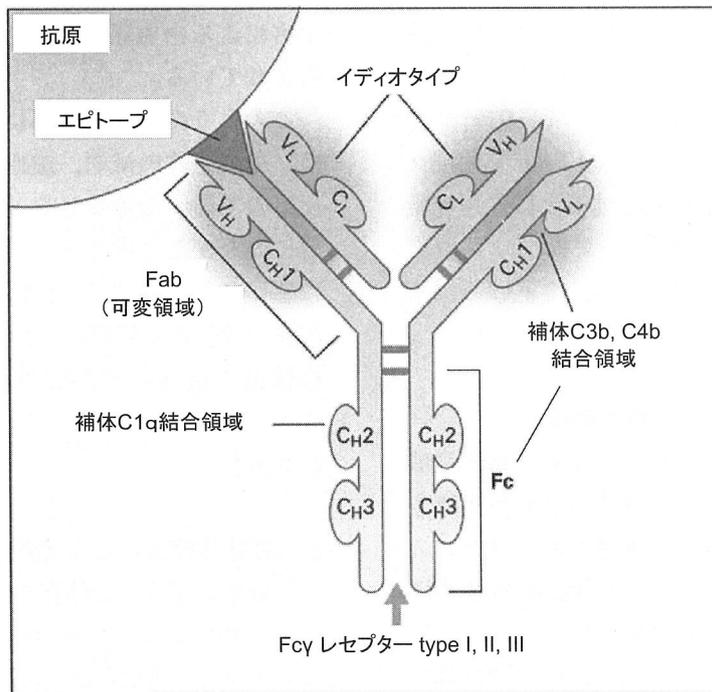


図2 免疫グロブリン (IgG) の構造(文献1, Figure 2より引用)
補体, Fcγレセプターの結合部位を示す。

筋肉痛、関節痛、背部痛、血圧上昇などの副作用が報告されており、投与開始 30 分～1 時間以内に生じている^{1,3)}。これらは重篤でないことが多く、投与速度減少または中止することにより改善する。極めて稀であるが、急性無菌性髄膜炎、アナフィラキシー反応が起きることがある。また、高齢者、糖尿病など腎機能低下している患者には急性腎不全に陥る危険性もある^{1,4-6)}。免疫グロブリンの大量投与の場合には、血栓症を引き起こすこともあり、注意を要する⁶⁻⁸⁾。血栓予防のためヘパリン (100 IU/kg/日) を投与する場合もある。

同一施設内で、免疫グロブリン静注療法の副作用を調査した報告がある⁹⁾。頭痛、搔痒感、発疹などの軽度のものから、心筋梗塞、腎不全という重度のものまで報告されており、副作用は、製剤の違い(浸透圧, pH, 糖, 塩濃度, グロブリン濃度), 総投与量, 投与速度によると考えられている。実際には、3-12% のグロブリン製剤を 0.5-2 g/kg (多くは 1-2 g/kg) を 4-6 時間から 12 時間以上かけて静脈内投与している(数回に分けて 2-3 日かけて投与している施設もある)。最初 30 分は低速度で、副作用なければ徐々に投与速度を増加していく。一般的に、余分な糖, 塩類の除去が容易で、ヘパリン投与が自動的にされる透析患者への投与は安全とされている³⁾。抗血小板剤, ジフェンヒドラミン(抗ヒスタミン), アセトアミノフェンまたはアスピリン(消炎鎮痛剤), メチルプレドニソロン(ステロイド) 40 mg を免疫グロブリン静注療法の 30 分前に投与すると副作用発現は軽減されるようである。また、グロブリン濃度 10% を 5% にするのも、浸透圧, Na を下げるため有効であると考えられている。

4. 腎移植での免疫グロブリン静注療法

自己免疫疾患, 炎症性疾患だけでなく、移植領域においても免疫グロブリン静注療法の効果が期待され、1990 年代から臓器移植に応用された。フランスで、免疫グロブリン大量投与により HLA 抗体陽性の腎移植待機患者の PRA を抑制したことが報告され¹⁰⁾、アメリカでも同様に高度に感作された腎移植, 心移植待機患者の PRA を減少させ、移植に成功した¹¹⁾。各施設でも同様の結果が報告された¹²⁻¹⁴⁾。ま

た、液性拒絶反応の治療においても、その有効性が示された^{15,16)}。同じく既存抗体が問題となる異種移植領域においても、免疫グロブリン静注療法により超急性拒絶反応を抑制できることが報告された¹⁷⁻¹⁹⁾。

数多くの提供者からの血漿由来である免疫グロブリン製剤は、様々な抗体レパートリーを含み、同種抗原に対する免疫反応を修飾する多様なメカニズムがあると考えられている。

移植での抗体産生, 拒絶反応の制御に関するメカニズムとして、(A) 抗イディオタイプ抗体による自己, 同種抗体の修飾^{1,20)}, (B) サイトカイン遺伝子発現の抑制, 抗サイトカイン作用^{1,20)}, (C) 抗 T cell receptor 作用^{1,20,21)}, (D) Fc receptor (FcR) を介した抗原提示細胞との相互作用による T 細胞活性化の阻害²²⁾, (E) 抗原提示細胞の CD40, CD19, ICAM-1, CD86, class II 発現抑制²³⁾, (F) IL-10 産生による樹状細胞の成熟, 機能の抑制²⁴⁾, (G) 補体活性の阻害 (C1q, C3b, C4b, C3a, C5a の吸着)^{19,25,26)}, (G) Fc receptor を介した B cell apoptosis の誘導²³⁾, (H) B 細胞での抑制性 FcγRIIB の発現増加^{22,27-29)}, (I) 内皮細胞活性化抑制 (NFκB 抑制, IL-1β, TNFα などサイトカインで誘導される接着分子, ケモカインの発現抑制)^{30,31)}, (J) セレクチン, インテグリン機能阻害による白血球の動員と集積の抑制³²⁾, などが報告されている。

このように様々な作用により、移植領域においては、免疫感作の減弱, 虚血再灌流傷害の軽減, 拒絶反応の予防・治療効果を通して、グラフトの長期生着につながると考えられる。具体的には、(1) 高度に感作された (HLA 抗体陽性) 患者に対して抗体を減少させるため移植前に行う治療(脱感作療法), (2) 移植後の抗体関連型拒絶反応に対する治療(レスキューおよびハイリスクに対する予防投与)の 2 つに分けられる。

5. 脱感作療法として免疫グロブリン大量療法

免疫グロブリン静注療法の効果を判定するために、1997-2000 にかけて米国 NIH により無作為化(二重盲検プラセボ対照)比較試験が行なわれた (NIH IG02 trial)³⁾。101 人の、PRA50% 以上の末期腎不全患者に対して免疫グロブリン静注療法 (IVIG) 群 (10% 免

疫グロブリンを、2 g/kg、血液透析中に4時間以上かけて月1回計4回投与する。移植未施行の場合は、追加で12ヶ月、24ヶ月後にも投与する。)とプラセボ群(0.1%アルブミン、IVIG群と同様の投与スケジュール)に分けて調査した。IVIG群は、プラセボ群と比較して、有意にPRAレベルを減少させ、35%に移植を行うことができた。拒絶反応は53%に認められたが、2年のグラフト生着率は80%であった。免疫グロブリン静注療法は、従来は不可能であったHLA抗体陽性患者の移植を可能にし、その成績も許容範囲内であった。副作用は軽度のもが多く、ほとんどが頭痛であった。透析患者に対しては比較的安全に行えると報告している。費用対効果解析においても、使用する免疫グロブリン費用(例:70kgの人に2g/kgを4ヶ月投与すると計560gとなり、免疫グロブリンは35ドル/gであるため総計19600ドル必要となる)を考慮しても、血液透析費用(80000ドル/年)を軽減できるため、クロスマッチ陽性待機患者の半分に移植を施行できるならば、3年間で14億ドルの経費削減になると報告している。

Cedars-Sinai Medical Center の実際の使用例を紹介する^{20,33)}。免疫グロブリン静注療法(IVIG)の効果を判定するために、まず、患者血清を用いて *in vitro* テストを行う。標準のT細胞、B細胞を用いた細胞傷害テストにてPRA検査を行い、患者血清に1:1の割合で免疫グロブリンを添加して、PRAが抑制されるかどうか判定する。このIVIG-PRAテストが、患者への免疫グロブリン静注療法の効果を反映すると考えられている。図3Aでは、感作された患者血清の細胞傷害性PRA検査の1例を示している。血清と蛍光染色した50種のパネルリンパ球を反応させ、次に補体を添加して細胞傷害性を検査する。この図では、50のうち34(68%)に細胞傷害がみられている(PRA 68%)。図3Bでは、同じ検体を用い免疫グロブリン存在下での細胞傷害抑制を示している。ここでは、ほぼ100%細胞傷害は抑制され、PRAは0%となっている。

このように *in vitro* で免疫グロブリン添加によるダイレクトクロスマッチテスト、PRAテストを行い、抑制効果が見られるならば、移植のための脱感作療法を実施する。生体腎移植の場合には、図4A

で示すように、2 g/kg(最大140 g)の免疫グロブリンを毎月投与する。これは、クロスマッチテストが陰性または許容範囲内(リンパ球細胞傷害テストは陰性であり、フローサイトメトリーではchannel shiftが200以下の陽性も可)に減少するまで継続する。通常は4回(4ヶ月)以内の投与で移植可能となる。移植後1ヶ月経過時に、1回のみ2 g/kgの免疫グロブリンを予防的に投与する。PRAが50%以上あり、クロスマッチ陽性のため5年以上移植を施行できずに経過している死体腎移植待機患者にも、同様に2 g/kgを計4回投与する。そして、PRAが陰性化または許容範囲内に減少することを期待し、移植を待つことになる(図4B)。

2002-2005年の間に、クロスマッチ陽性患者89例に免疫グロブリン添加PRA test および免疫グロブリン静注療法を行い、79人(89%)に移植(生体腎移植46例、死体腎移植33例)を実施できたことを報告している。拒絶反応は28%に見られただけで、3年間で移植腎機能廃絶は5例、生着率は87.1%となっている⁶⁾。

6. 血漿交換と低用量免疫グロブリン静注療法

Johns Hopkins University では、血漿交換と併用した低用量の免疫グロブリン静注療法(100 mg/kg:抗サイトメガロウイルス免疫グロブリン)を採用している³⁴⁾。AHG CDCクロスマッチによるドナー特異的抗体価と血漿交換の回数のガイドライン(表3)に従い、移植前の回数を決定し、移植手術の予定を立てる。これは、HLAの免疫原性の強さ、繰り返すミスマッチ数、抗体産生期間、移植回数、移植後早期のグラフト廃絶の有無などにより変わりうる。例えば、5回血漿交換が必要な場合には、移植予定の10日前から血漿交換と低用量免疫グロブリン投与を開始する(図5)。血漿交換は5%アルブミンで置換し、24時間以内に移植手術や生検が計画されている場合には、FFPを用いる。凝固系のモニタリングを注意深く施行する。タクロリムス、ミコフェノール酸モフェチルも血漿交換開始時から投与を始める。抗体価が高い場合には、リツキシマブ(抗CD20モノクローナル抗体、375 mg/m² 週1回、4回を越えない)を血漿交換開始の1ヶ月前に投与する。抗体価

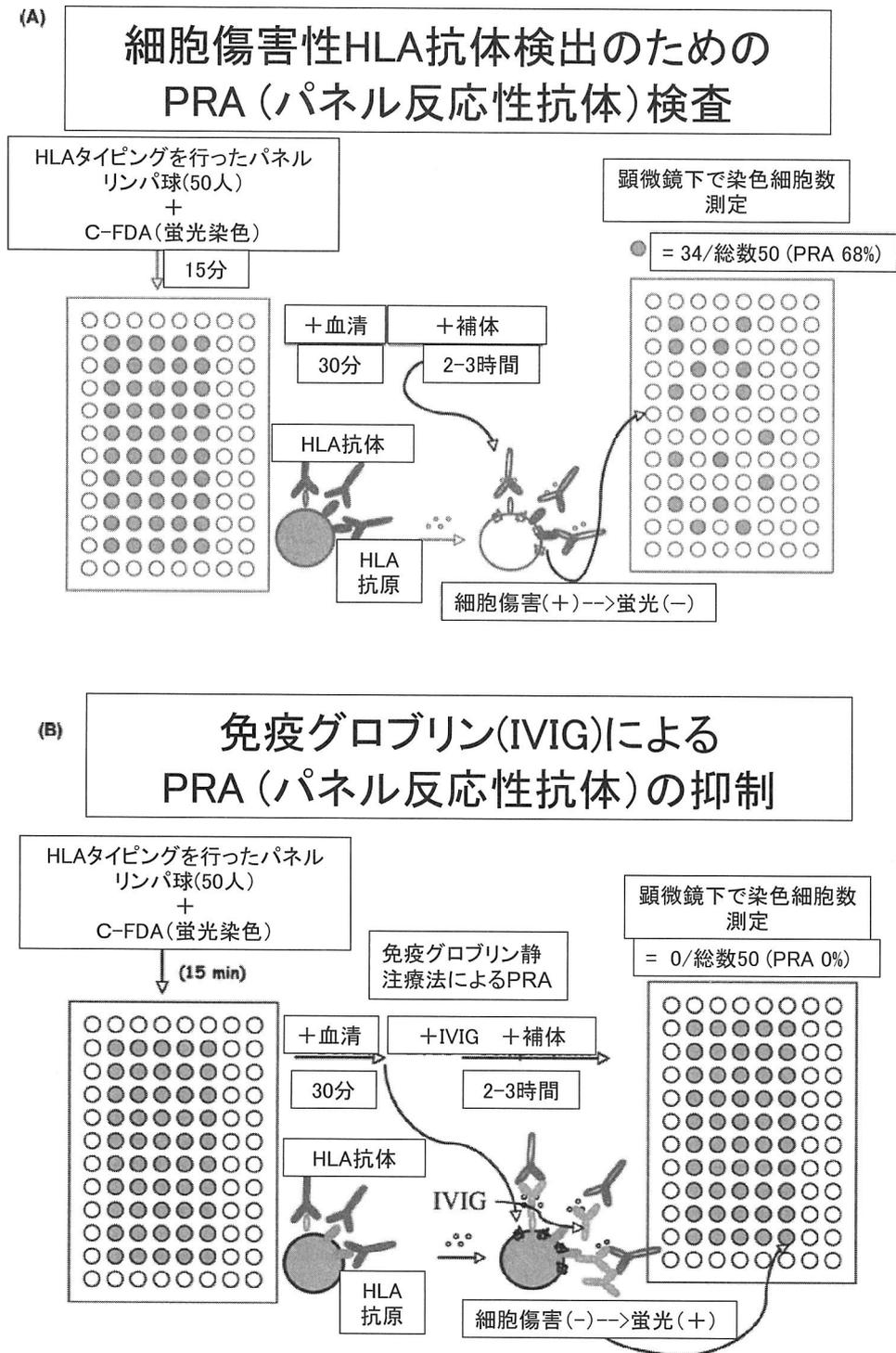


図3 (A) 感作された患者のPRA検査, (B) 免疫グロブリン存在下でのPRA検査(文献20 Figure1より引用)

(A) 感作された患者血清のPRAテストの1例を示す。細胞傷害は34/50(68%)に見られる。(B) 免疫グロブリン添加により、細胞傷害が完全に抑制され、PRAは0%である。このようにin vitroテストで、免疫グロブリンの効果が確認される場合に、移植に向けての脱感作療法を施行する。

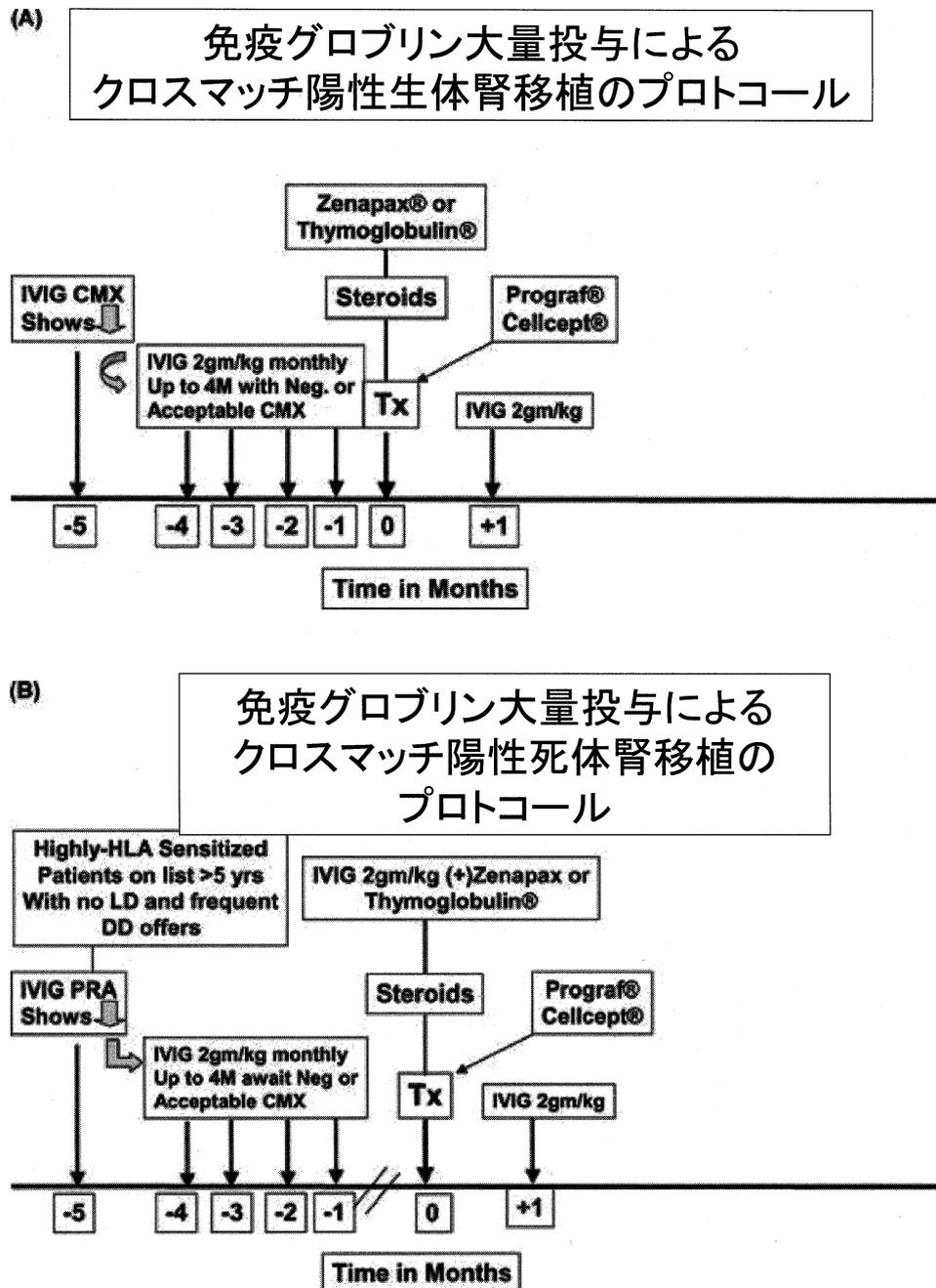


図4 (A) 生体腎移植における免疫グロブリン大量療法, (B) 死体腎移植における免疫グロブリン大量療法(文献 20, Figure2 より引用)

(A) 生体腎移植では, 免疫グロブリン添加クロスマッチテストにより抑制効果を判定し, 免疫グロブリン静注療法を施行する。2 g/kg を毎月, 4 回投与し, クロスマッチテストが陰性化または許容範囲内に抑制されれば, 移植を行う。移植 1 ヶ月後にも, 予防のため 2 g/kg 投与する。(B) 死体腎移植でも, 同様に免疫グロブリン添加 PRA テストにより, 抑制効果が認められた待機患者に, 免疫グロブリン静注療法を施行する。プロトコールは生体腎移植の場合とほぼ同じであり, 移植時および移植 1 ヶ月後にも 2 g/kg 追加投与する。

IVIIG CMX: 免疫グロブリン添加クロスマッチ, IVIG PRA: 免疫グロブリン添加 PRA, Zenapax: ダクリツマブ(抗 IL-2 レセプター抗体), Thymoglobulin: 抗胸腺細胞グロブリン, Prograf: タクロリムス, Cellcept: ミコフェノール酸モフェチル, Tx: 移植

表3 AHG-CDC クロスマッチにより判定したドナー特異的抗体価により推奨される移植前、後の血漿交換・低用量免疫グロブリン静注療法の回数(文献 34, Table 3 より引用)

AHG-CDCクロスマッチによる抗体価	移植前の処置回数	移植後の処置回数
(+) flow, (-) AHG	2	2
1:1-1:4	3	2
1:8-1:16	4	3
1:32-1:64	5	3
1:128	6-7	4
1:256	8-10	4
1:512	11-15	5
>1:512	≥20	5

flow(+): フローサイトメトリッククロスマッチ陽性, AHG(-): AHG-CDCテスト 陰性

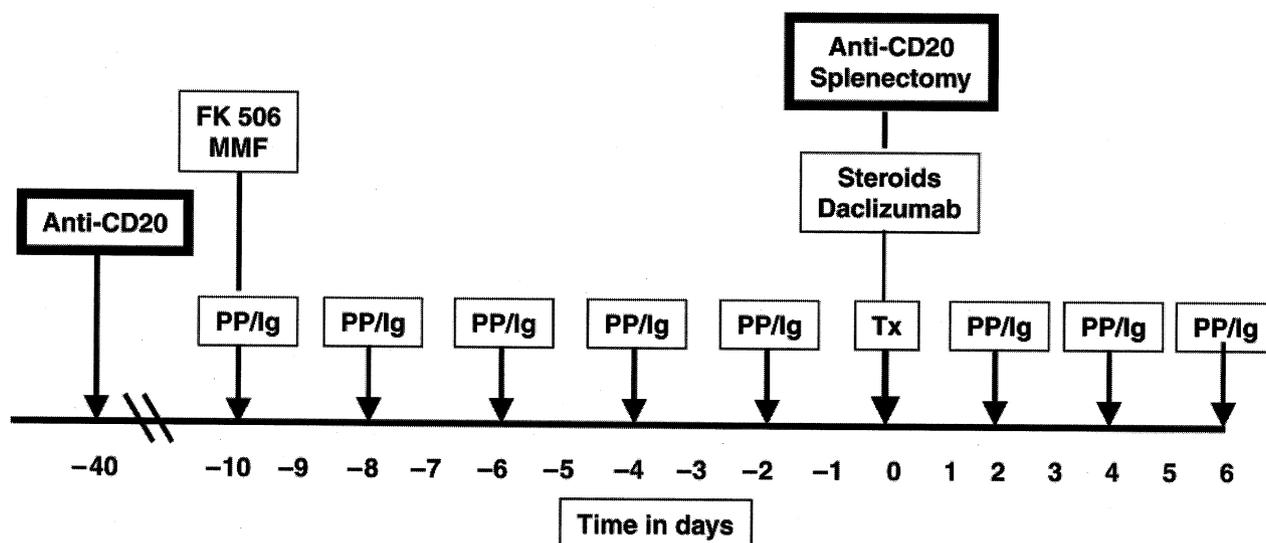


図5 ドナー特異的抗体が32倍から64倍存在する場合の血漿交換を併用した低用量免疫グロブリン静注療法の1例(文献 34, Figure 1 より引用)

32-64倍の抗体価が存在する場合に必要とされる血漿交換および免疫グロブリン静注療法の回数は、移植前5回、移植後は3回である(表3参照)。この場合、移植10日前から、隔日で血漿交換と低用量免疫グロブリン静注療法を施行する。移植後も隔日で3回施行する。PP/Ig: 血漿交換+低用量免疫グロブリン静注, anti-CD20: リツキシマブ, FK506: タクロリムス, MMF: ミコフェノール酸モフェチル, Splenectomy: 脾臓摘出, Daclizumab: ダクリツマブ(抗IL-2レセプター抗体)

が低い場合には、最後の血漿交換終了後または脾臓摘出時(移植手術時)に投与する。ダクリツマブ(抗IL-2レセプター抗体)は移植後、2週間隔で4回投与

する。移植後も、数回血漿交換と低用量免疫グロブリンを投与することが重要である。こちらも、先ほどのガイドラインに推奨される回数が記されている。

抗体価が高い場合 (256 倍以上), リバウンドが見られたり, 抗体価の減少が見られない場合には, 無理に治療を行わないことも重要である。100 例以上に施行した最近の成績は, 抗体関連型拒絶反応が 31% にみられ, 3 年生着率は 92% である⁶⁾。

7. 免疫グロブリン静注療法の限界: 大量投与と低用量投与の比較

Mayo Clinic では, 従来の免疫グロブリン大量療法と血漿交換と併用した低用量の免疫グロブリン療法との比較検討を行った³⁵⁾。ドナー特異的抗体によるクロスマッチ陽性生体腎移植を, (i) 血漿交換と低用量 (100 mg/kg) 免疫グロブリンとリツキシマブ使用群 (n = 32), (ii) 免疫グロブリン大量 (2 mg/kg) 投与群 (n = 13), (iii) 血漿交換, 低用量 (100 mg/kg) 免疫グロブリン, リツキシマブ, サイモグロブリン (抗胸腺細胞グロブリン) 投与と移植後のドナー特異的抗体モニタリングを行った群 (n = 16) に分けて予後を比較した (表 4)。

ほぼ全ての症例でドナー特異的抗体は減少したが, AHG クロスマッチが陰性化したのは, (ii) 群では 38% (5/13) のみであった (表 5)。(ii) 群では, 陰性化しない 8 例に追加で血漿交換, 低用量免疫グロ

ブリン, リツキシマブを投与し 3 例が陰性化した。一方, (i) 群では, 84% (27/32), (iii) 群では, 88% (14/16) が陰性化した。(iii) 群の 2 例は, 反応が悪く移植を断念した。

陰性化せずに移植に踏み切った 10 例のうち 7 例に液性拒絶反応がみられ, 5 例は腎機能廃絶 (超急性拒絶反応 2 例を含む) となった。クロスマッチが陰性化しても拒絶反応発現率は高く, (i) 群は 80% (4/5), (ii) 群は 37% (11/30), (iii) 群は 29% (4/14) に認められた。全ての症例の 1 年生着率は 82% であった。1 回の免疫グロブリン大量投与よりも, 血漿交換 + 低用量免疫グロブリン投与を数回繰り返す方が, 脱感作療法の効率がよく, 移植後の拒絶反応発現率が低かったことを示した。とくに移植前に 8 倍から 16 倍の AHG クロスマッチ陽性であれば, 陰性化が可能であるとしている。注意すべき点は, (ii) 群の免疫グロブリン大量投与は移植前の 1 回だけであり, 上述の Cedars-Sinai Medical Center のプロコール (平均 4 回施行) とは異なることである。また, 血漿交換は多数回行っており, (i) 群では, 移植前平均 4.0 回, 移植後 3.5 回, (iii) 群では, 移植前 9.8 回, 移植後 9.4 回施行している。

免疫グロブリン静注療法による脱感作療法として

表 4 高度に感作された腎移植患者の脱感作療法 (文献 35, Table 1 より引用)

グループ	N=61	治療内容
(i) 血漿交換 + 低用量免疫グロブリン + リツキシマブ (2000.4-2003.7)	32	血漿交換 + 免疫グロブリン (100mg/kg) 移植前 4.0 回、移植後 3.5 回 (平均) リツキシマブ (375mg/m ²) 脾臓摘出 (19/32)
(ii) 大量免疫グロブリン (2003.8-2004.7)	13	免疫グロブリン (2g/kg) 移植前 1 回のみ (2例のみ 3g/kg)
(iii) 血漿交換 + 低用量免疫グロブリン + リツキシマブ + モニタリング (2004.8-2005.5)	16 (2*)	血漿交換 + 免疫グロブリン (100mg/kg) 移植前 9.8 回、移植後 9.4 回 (平均) リツキシマブ (375mg/m ²) ドナー特異的抗体のモニタリング

*2例は、脱感作療法の効果がみられず移植を施行せず

表5 移植前の AHG クロスマッチ抗体価と脱感作療法の効果(文献 35, Table 2 より引用)

AHGクロスマッチ 抗体価 (希釈倍率)	(ii)群 免疫グロブリン 大量	(i)群 血漿交換+低用量 免疫グロブリン	(iii)群 血漿交換+低用量免疫 グロブリン+モニタリング
1:2	X	XXXXXXXXXX	XXXXX
1:4	XX	XXXXXXXXXX	X
1:8	XOO	XX	X
1:16	XOO	XXXXXOO	XXX
1:32	OO		X
1:64			
1:128	O	OOO	
1:256	O		O*O*

X = クロスマッチ陰性化

O = 脱感作療法により、抗体価の減少はみられたが、陰性化せず

* 脱感作療法の効果が見られず(移植未実施例)

は他の施設からも多くの報告があり、大量投与か低用量投与のいずれかを採用している³⁶⁻⁴⁰⁾。

8. 抗体関連型拒絶反応の治療

抗体関連型拒絶反応の治療においても、多くの成功例が報告されている。ステロイドや抗リンパ球抗体に抵抗性の拒絶反応や予後不良とされる形質細胞が豊富に浸潤する拒絶反応に対して、免疫グロブリンを2-10日かけて総計2 g/kg投与⁴¹⁾、0.5 g/kgを4日投与⁴²⁾、5日投与⁴³⁾、7日投与⁴⁴⁾、0.4 g/kgを5日投与⁴⁵⁾、血漿交換併用で0.25-0.5 g/kgを数回投与⁴⁶⁾、0.1 g/kgを数回投与⁴⁷⁾、数回の血漿交換後に1回2 g/kg投与⁴⁸⁾により、レスキューを成功させている。その他に、リツキシマブ、脾臓摘出を併用することもある。

9. おわりに

免疫グロブリン静注療法は、大量療法でも血漿交換と併用した低用量療法でも、効果は期待できる。しかし、HLA抗体産生の抑制に失敗した報告も認められる⁴⁹⁻⁵¹⁾。現在では、B cellをターゲットとしたリツキシマブの併用も一般的であるが、メモリーB細胞、形質細胞に影響を与えないことが指摘されている⁵²⁾。現状では、どのようなレジメを用いても完

全に抗ドナー HLA 抗体産生を抑制し、抗体関連型拒絶反応を予防また治療することは不可能である。

短期成績をみると、確かに、拒絶反応抑制率、移植腎機能、生着率では、比較的良好な成績が報告されている。しかし、病理所見をあわせた結果では、無症候性の組織障害(慢性拒絶反応に関連する chronic allograft nephropathy, transplant glomerulopathy)は着実に進行しているようである⁵³⁻⁵⁵⁾。同じ抗ドナー既存抗体陽性移植でも、良好な成績が得られている ABO 血液型不適合移植とは異なる^{56,57)}。長期成績についての詳細な検討が必要であり、クロスマッチ陽性移植に対しては、慎重な対応が望まれる。

参考文献

1. Kazatchkine MD, Kaveri SV. Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immune globulin. *N Engl J Med*, 345: 747-55, 2001.
2. Ephrem A, Misra N, Hassan G, et al. Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immunoglobulin. *Clin Exp Med*, 5: 135-40, 2005.
3. Evaluation of intravenous immunoglobulin as an agent to lower allosensitization and improve

- transplantation in highly sensitized adult patients with end-stage renal disease: report of the NIH IG02 trial. *J Am Soc Nephrol*, 15: 3256–62, 2004.
4. Cantú TG, Hoehn-Saric EW, Burgess KM, Racusen L, Scheel PJ. Acute renal failure associated with immunoglobulin therapy. *Am J Kidney Dis*, 25: 228–34, 1995.
 5. John R, Lietz K, Burke E, Ankersmit J, Mancini D, Suciú-Foca N, Edwards N, Rose E, Oz M, Itescu S. Intravenous immunoglobulin reduces anti-HLA alloreactivity and shortens waiting time to cardiac transplantation in highly sensitized left ventricular assist device recipients. *Circulation*, 100 (19 Suppl): II-229–35, 1999.
 6. Zachary AA, Montgomery RA, Jordan SC, Reinsmoen NL, Claas FH, Reed EF. 14th International HLA and Immunogenetics Workshop: report on understanding antibodies in transplantation. *Tissue Antigens*, 69 Suppl 1: 160–73, 2007.
 7. Duronio A, Bajjoka I, Hsaiky L, Parasuraman R. Proposed relationship between intravenous immunoglobulin and thrombosis in renal transplant recipients. *Ann Pharmacother*, 41: 354–8, 2007.
 8. Anglicheau D, Loupy A, Suberbielle C, et al. Posttransplant prophylactic intravenous immunoglobulin in kidney transplant patients at high immunological risk: a pilot study. *Am J Transplant*, 7: 1185–92, 2007.
 9. Vo AA, Cam V, Toyoda M, Puliyanda DP, Lukovsky M, Bunnapradist S, Peng A, Yang K, Jordan SC. Safety and adverse events profiles of intravenous gammaglobulin products used for immunomodulation: a single-center experience. *Clin J Am Soc Nephrol*, 1: 844–52, 2006.
 10. Glotz D, Haymann JP, Sansonetti N, Francois A, Menoyo-Calonge V, Bariety J, Druet P. Suppression of HLA-specific alloantibodies by high-dose intravenous immunoglobulins (IVIg). A potential tool for transplantation of immunized patients. *Transplantation*, 56: 335–7, 1993.
 11. Tyan DB, Li VA, Czer L, Trento A, Jordan SC. Intravenous immunoglobulin suppression of HLA alloantibody in highly sensitized transplant candidates and transplantation with a histoincompatible organ. *Transplantation*, 57: 553–62, 1994.
 12. Glotz D, Haymann JP, Niaudet P, Lang P, Druet P, Bariety J. Successful kidney transplantation of immunized patients after desensitization with normal human polyclonal immunoglobulins. *Transplant Proc*, 27: 1038–9, 1995.
 13. Wadström J; Gannedahl G; Bersztel A; Bengtsson M; Nattorp K; Mulec H. Successful kidney transplantation after suppression of HLA alloantibodies with intravenous immunoglobulin in a highly sensitized patient. *Transplant Proc*, 27: 3463–4, 1995.
 14. McIntyre JA, Higgins N, Britton R, Faucett S, Johnson S, Beckman D, Hormuth D, Fehrenbacher J, Halbrook H. Utilization of intravenous immunoglobulin to ameliorate alloantibodies in a highly sensitized patient with a cardiac assist device awaiting heart transplantation. Fluorescence-activated cell sorter analysis. *Transplantation*, 62: 691–3, 1996.
 15. Jordan SC, Quartel AW, Czer LS, Admon D, Chen G, Fishbein MC, Schwieger J, Steiner RW, Davis C, Tyan DB. Posttransplant therapy using high-dose human immunoglobulin (intravenous gammaglobulin) to control acute humoral rejection in renal and cardiac allograft recipients and potential mechanism of action. *Transplantation*, 66: 800–5, 1998.
 16. Furth S, Neu AM, Hart J, Zachary A, Colombani P, Fivush BA. Plasmapheresis, intravenous cytomegalovirus-specific immunoglobulin and reversal of antibody-mediated rejection in a pediatric renal transplant recipient: a case report. *Pediatr Transplant*, 3: 146–9, 1999.
 17. Latremouille C, Genevaz D, Hu MC, et al. Normal human immunoglobulins for intravenous use (IVIg) delay hyperacute xenograft rejection

- through F(ab')₂-mediated anti-complement activity. *Clin Exp Immunol*, 110: 122–6, 1997.
18. Gautreau C, Kojima T, Woimant G, Cardoso J, Devillier P, Houssin D. Use of intravenous immunoglobulin to delay xenogeneic hyperacute rejection. An in vivo and in vitro evaluation. *Transplantation*, 60: 903–7, 1995.
 19. Magee JC, Collins BH, Harland RC et al. Immunoglobulin prevents complement-mediated hyperacute rejection in swine-to-primate xenotransplantation. *J Clin Invest*, 96: 2404–12, 1995.
 20. Jordan SC, Vo AA, Peng A, Toyoda M, Tyan D. Intravenous gammaglobulin (IVIG): a novel approach to improve transplant rates and outcomes in highly HLA-sensitized patients. *Am J Transplant*, 6: 459–66, 2006.
 21. Schluter SF, Adelman MK, Taneja V, David C, Yocum DE, Marchalonis JJ. Natural autoantibodies to TCR public idiotopes: potential roles in immunomodulation. *Cell Mol Biol*, 49: 193–207, 2003.
 22. Sameulsson A, Towers TL, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor. *Science*, 29: 484–6, 2001.
 23. Toyoda M, Pao A, Petrosian A, Jordan SC. Pooled human gammaglobulin modulates surface molecule expression and induces apoptosis in human B cells. *Am J Transplant*, 3: 156–66, 2003.
 24. Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Carbonneil C et al. Inhibition of maturation and function of dendritic cells by intravenous immunoglobulin. *Blood*, 101: 758–65, 2003.
 25. Bohmig GA, Exner M, Habicht A et al. Capillary C4d deposition in kidney allografts: a specific marker of alloantibody-dependent graft injury. *J Am Soc Nephrol*, 13: 1091–9, 2002.
 26. Hautanen A. Binding of fragments of human IgG to solid-phase C3b measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Scand J Immunol*, 13: 245–54, 1981.
 27. Jin F, Balthasar JP. Mechanisms of intravenous immunoglobulin action in immune thrombocytopenic purpura. *Hum Immunol*, 66: 403–10, 2005.
 28. Bussel JB. Another interaction of the FcR system with IVIG. *Thromb Haemost*, 88: 890–1, 2002.
 29. Kaneko Y, Nimmerjahn F, Madaio M, Ravetch J. Pathology and protection in nephrotoxic nephritis is determined by selective engagement of specific Fc receptors. *J Exp Med*, 203: 789–97, 2006.
 30. Ichiyama T, Ueno Y, Isumi H, Niimi A, Matsubara T, Furukawa S. An immunoglobulin agent (IVIG) inhibits NF-kappaB activation in cultured endothelial cells of coronary arteries in vitro. *Inflamm Res*, 53: 253–6, 2004.
 31. Xu C, Poirier B, Van Huyen JP, Lucchiari N, Michel O, Chevalier J, Kaveri S. Modulation of endothelial cell function by normal polyspecific human intravenous immunoglobulins: a possible mechanism of action in vascular diseases. *Am J Pathol*, 153: 1257–66, 1998.
 32. Gill V, Doig C, Knight D, Love E, Kubes P. Targeting adhesion molecules as a potential mechanism of action for intravenous immunoglobulin. *Circulation*, 112: 2031–9, 2005.
 33. Jordan SC, Vo A, Bunnapradist S, Toyoda M, Peng A, Puliyaanda D, Kamil E, Tyan D. Intravenous immune globulin treatment inhibits crossmatch positivity and allows for successful transplantation of incompatible organs in living-donor and cadaver recipients. *Transplantation*, 76: 631–6, 2003.
 34. Montgomery RA, Zachary AA. Transplanting patients with a positive donor-specific crossmatch: a single center's perspective. *Pediatr Transplant*, 8: 535–42, 2004.
 35. Stegall MD, Gloor J, Winters JL, Moore SB, Degoey S. A comparison of plasmapheresis versus high-dose IVIG desensitization in renal allograft recipients with high levels of donor spe-

- cific alloantibody. *Am J Transplant*, 6: 346–51, 2006.
36. Schweitzer EJ, Wilson JS, Fernandez-Vina M, et al. A high panel-reactive antibody rescue protocol for cross-match-positive live donor kidney transplants. *Transplantation*, 70: 1531–6, 2000.
 37. Glotz D, Antoine C, Julia P, Suberbielle-Boissel C, Boudjeltia S, Fraoui R, Hacen C, Duboust A, Bariety J. Desensitization and subsequent kidney transplantation of patients using intravenous immunoglobulins (IVIg). *Am J Transplant*, 2: 758–60, 2002.
 38. Sammartino C, Pham T, Panaro F, et al. Successful simultaneous pancreas kidney transplantation from living-related donor against positive cross-match. *Am J Transplant*, 4: 140–3, 2004.
 39. Akalin E, Ames S, Sehgal V, Fotino M, Daly L, Murphy B, Bromberg JS. Intravenous immunoglobulin and thymoglobulin facilitate kidney transplantation in complement-dependent cytotoxicity B-cell and flow cytometry T- or B-cell crossmatch-positive patients. *Transplantation*, 76: 1444–7, 2003.
 40. Valentini RP, Nehlsen-Cannarella SL, Gruber SA, Mattoo TK, West MS, Lang C, Imam AA. Intravenous immunoglobulin, HLA allele typing and HLAMatchmaker facilitate successful transplantation in highly sensitized pediatric renal allograft recipients. *Pediatr Transplant*, 11: 77–81, 2007.
 41. Luke PP, Scantlebury VP, Jordan ML, Vivas CA, Hakala TR, Jain A, Somani A, Fedorek S, Randhawa P, Shapiro R. Reversal of steroid- and anti-lymphocyte antibody-resistant rejection using intravenous immunoglobulin (IVIg) in renal transplant recipients. *Transplantation*, 72: 419–22, 2001.
 42. Adroge HE, Soltero L, Land GA, Ramanathan V, Truong LD, Suki WN. Immunoglobulin therapy for plasma cell-rich rejection in the renal allograft. *Transplantation*, 82: 567–9, 2006.
 43. Melcher ML, Olson JL, Baxter-Lowe LA, Stock PG, Posselt AM. Antibody-mediated rejection of a pancreas allograft. *Am J Transplant*, 6: 423–8, 2006.
 44. Casadei DH, del C Rial M, Opelz G, Golberg JC, Argento JA, Greco G, Guardia OE, Haas E, Raimondi EH. A randomized and prospective study comparing treatment with high-dose intravenous immunoglobulin with monoclonal antibodies for rescue of kidney grafts with steroid-resistant rejection. *Transplantation*, 71: 53–8, 2001.
 45. Moger V, Ravishankar MS, Sakhuja V, Kohli HS, Sud K, Gupta KL, Jha V. Intravenous immunoglobulin: a safe option for treatment of steroid-resistant rejection in the presence of infection. *Transplantation*, 77: 1455–6, 2004.
 46. White NB, Greenstein SM, Cantafio AW, Schechner R, Glicklich D, McDonough P, Pullman J, Mohandas K, Boctor F, Uehlinger J, Tellis V. Successful rescue therapy with plasmapheresis and intravenous immunoglobulin for acute humoral renal transplant rejection. *Transplantation*, 78: 772–4, 2004.
 47. Montgomery RA, Zachary AA, Racusen LC, Leffell MS, King KE, Burdick J, Maley WR, Ratner LE. Plasmapheresis and intravenous immune globulin provides effective rescue therapy for refractory humoral rejection and allows kidneys to be successfully transplanted into cross-match-positive recipients. *Transplantation*, 70: 887–95, 2000.
 48. Lehrich RW, Rocha PN, Reinsmoen N, Greenberg A, Butterly DW, Howell DN, Smith SR. Intravenous immunoglobulin and plasma-pheresis in acute humoral rejection: experience in renal allograft transplantation. *Hum Immunol*, 66: 350–8, 2005.
 49. Ferrari-Lacraz S, Aubert V, Buhler L, et al. Anti-HLA antibody repertoire after IVIg infusion in highly sensitized patients waiting for kidney transplantation. *Swiss Med Wkly*, 136: 696–702,

- 2006.
50. Drakos SG, Kfoury AG, Long JW, et al. Low-dose prophylactic intravenous immunoglobulin does not prevent HLA sensitization in left ventricular assist device recipients. *Ann Thorac Surg*, 82: 889–93, 2006.
 51. Meyer SR, Ross DB, Forbes K, et al. Failure of prophylactic intravenous immunoglobulin to prevent sensitization to cryopreserved allograft tissue used in congenital cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 133: 1517–23, 2007.
 52. Ramos EJ, Pollinger HS, Stegall MD, Gloor JM, Dogan A, Grande JP. The effect of desensitization protocols on human splenic B-cell populations in vivo. *Am J Transplant*, 7: 402–7, 2007.
 53. Gloor JM, Sethi S, Stegall MD, et al. Transplant glomerulopathy: subclinical incidence and association with alloantibody. *Am J Transplant*, 7: 2124–32, 2007.
 54. Lefaucheur C, Nochy D, Hill GS, Suberbielle-Boissel C, Antoine C, Charron D, Glotz D. Determinants of poor graft outcome in patients with antibody-mediated acute rejection. *Am J Transplant*, 7: 832–41, 2007.
 55. Haas M, Montgomery RA, Segev DL, et al. Subclinical acute antibody-mediated rejection in positive crossmatch renal allografts. *Am J Transplant*, 7: 576–85, 2007.
 56. Haas M, Rahman MH, Racusen LC, et al. C4d and C3d staining in biopsies of ABO- and HLA-incompatible renal allografts: correlation with histologic findings. *Am J Transplant*, 6: 1829–40, 2006.
 57. Gloor JM, Cosio FG, Rea DJ, et al. Histologic findings one year after positive crossmatch or ABO blood group incompatible living donor kidney transplantation. *Am J Transplant*, 6: 1841–7, 2006.

第6回日本組織適合性学会・近畿地方会 抄録

会 期： 2008年2月2日(土)
 会 場： 参天製薬株式会社本社
 大阪市東淀川区下新庄3-9-19
 世話人： 石谷 昭子
 奈良県立医科大学 法医学教室
 共 催： 財団法人 大阪腎臓バンク

● オープニングセミナー ●

「HNA (顆粒球抗原)の種類と検査方法, その臨床的意義について」

荒木 延夫

兵庫県赤十字血液センター

顆粒球膜表面には、顆粒球抗原(好中球のみに発現している抗原または、好中球と他の細胞にも発現している抗原)、HLAclassI 抗原、血液型 I 式、P 式抗原が存在している。なお、好中球には血液型 ABH 抗原、Lewis 式抗原の存在は証明されていない。顆粒球抗原は 1960 年、Lalezari らによって同種免疫新生児好中球減少症 (alloimmune neonatal neutropenia; ANN) から発見された NA1(現在の HNA-1a) 以来、表に示す抗原系が ANN、自己免疫性好中球減少症 (autoimmune neutropenia; AIN)、輸血副作用 (非溶血性発熱性輸血反応や輸血関連急性肺障害 (transfusion-related acute lung injury; TRALI) などの症例の研究によって発見されてきた。表中に抗原

系(抗原名)、オリジナル名の 2 通りの名称があるのは、たとえば、1995 年に Bux らは、NA2 と NC1 は同じ特異性であることを証明し、このような名称の混乱を避けるため、1998 年、国際輸血学会の The Granulocyte Antigen Working Party のメンバーによって HNA (human neutrophil antigen) という新しい命名法が採用された。

表中にそれぞれの顆粒球抗原の白人、日本人、韓国人、中国人、アフリカ黒人の抗原頻度および、抗原部位である糖タンパクを示した。

これらの抗原の種類と検査方法、その臨床的意義について解説したい。

顆粒球抗原の分類

HNA抗原系	HNA抗原	抗原部位	オリジナル名	抗原頻度(%)			アレル
				白人	日本人	アフリカ黒人	
HNA-1	HNA-1a	CD16b(FcRⅢb)	NA1	58	86.9	68	<i>FCGR3B*1</i>
HNA-1	HNA-1b	CD16b(FcRⅢb)	NA2, NC1	88	68.3	78	<i>FCGR3B*2</i>
HNA-1	HNA-1c	CD16b(FcRⅢb)	SH	5	0	38	<i>FCGR3B*3</i>
HNA-2	HNA-2a	CD177	NB1	97	98.1	95	<i>CD177*1</i>
HNA-3	HNA-3a	gp70-95kD	5b	97	87.2		不明
HNA-4	HNA-4a	CD11b	Mart ^a	99	70.6		<i>CD11B*1</i>
HNA-5	HNA-5a	CD11a	Ond ^a	96			<i>CD11A*1</i>
		gp45-56kD	NB2	32	20.3		
		CD16b(FcRⅢb)	ND1	98.5			
		CD16b(FcRⅢb)	Lan	>99			
		CD16b(FcRⅢb)	Sar ^a	>99			
		gp70-95kD	5 ^a	33			
			9 ^a	58			
			9 ^b	81			
			SL ^a	66			

HNA: human neutrophil antigen(s)

● 教育講演 ●

「HLA はおもしろい」

佐治 博夫

特定非営利活動法人 HLA 研究所

●免疫以外

HLA は免疫の他に、生殖や神経伝達にも関わっているらしい。哺乳類のメスは非自己 MHC をもつオスを選んでメーティングをし、結果として heterozygote (進化的に super dominant) の子孫を得ている。非自己 MHC は主として鋤鼻器官によって感知されるフェロモン様物質で見分けられ、その物質は「運び屋」HLA がもつ抗原ペプチドとされる。抗原ペプチド・モチーフは HLA 多様性に規定されるから、結果として自己/非自己 MHC を峻別することができる。メーティング後の sperm selection にも MHC が関わっていて、メスの非自己 MHC をもつ haploid の精子が選択的に卵子に到達しやすいという。

古い HLA 学を学んだわれわれは、中枢神経には HLA は分布しないか希薄であると考えてきた。しかしながら、脳の海馬錐体領域には HLA が dynamic に検出され、HLA の発現が中枢シナプスどうしの伝

達や神経/神経膠間伝達に必須かもしれないことがわかってきた。神経伝達に HLA 多様性がどう関わるか興味あるところである。

●免疫

獲得免疫の発動と各免疫担当細胞の連携仲介に必須の役割を果たしていることは良く知られていて、NK 免疫の KIR リガンドとして働く。免疫は「Danger signal」によって発動され、自然免疫系を介して獲得免疫や NK 免疫が活性化される。Danger signal の候補は HLA の前身とされる Heat Shock Protein (HSP)-Peptide 複合体が有名である。ストレスを受けた感染細胞や腫瘍細胞から分泌され、TLR や HSP レセプターを介して抗原提示機構が活性化される。HSP と HLA の構造の類似から HLA-peptide 複合体が Danger signal にもなりうるのではないかと考えている。

●組織適合性

移植医療におけるアロ免疫の制御は最重要点の一つである。二つの方法論がある。ひとつは組織適合性のバリアを超えることであり、もうひとつは組織適合性をフィットさせる努力である。臓器移植では細胞性免疫に関する限り前者の方法論が趨勢を占めた。残るは液性免疫の制御である。造血幹細胞移植は後者の方法論を重視する。超バリアの方法論を一部に導入可能ではあるが、移植片がその後の免疫を担当するので、Recipient 体細胞と移植免疫担当細胞間の効果的な免疫を維持するには、最低限の組織適

合性を図ることが絶対条件になる。最低限の組織適合性は「haploidentical」であると考えている。臓器移植でもその後の移植片の免疫監視(感染と腫瘍化)を考えると、haploidentical が理想である。

●HLA マッチング

非血縁間の HLA マッチング戦略には、ハプロタイプ、HLA の遺伝子構造 (DR 領域には構造的多様性)、allele の個性、座位間連鎖、Taboo Mismatch か Permissible Mismatch か、Ethnicity などが Key であり、性別・年齢・病態・腫瘍/非腫瘍などが考慮される。

●シンポジウム●

シンポジウム「造血幹細胞移植における組織適合性を見直す」

1. HLA アリル型適合性の立場から

一戸 辰夫

京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科

ヒトゲノムの解読、国際 HapMap プロジェクトの進展などを背景として、HLA 領域以外に存在する免疫応答制御関連遺伝子の多型が、同種造血幹細胞移植後の移植片対宿主病 (GVHD) や感染性合併症の発症リスクに強く関連している可能性を示唆する報告が続々と行なわれるに至っている。それにもかかわらず、造血幹細胞移植の一般の臨床現場においては、依然として、HLA ができる限り適合していることがドナー選択時の“*sine qua non* (必要条件)”と看做されており、HLA 以外の遺伝子多型が HLA 適合性を差し置いて優先的に考慮されることはまれである。実際、最近では、HLA-C や HLA-DP の移植抗原としての重要性も知られるようになり、非血縁者間で実施される造血幹細胞移植においても、これらを含めて、より多くの HLA 遺伝子座がアリル型のレベルで適合したドナーを選択することにより、

GVHD の発症率や生存率の比較において、HLA 一致同胞間移植にほぼ匹敵する成績を得られることが明らかにされつつある。

一方、HLA 適合基準の厳密化はドナー選択可能性の狭小化と常に裏腹の関係にあることから、造血幹細胞移植の黎明期から今日に至るまで、「許容可能な HLA の不適合」を同定するためのさまざまな試みがなされてきている。また、最近ではさらに積極的な立場から、再発率の低下などを指標として、「移植成績の向上に関与する不適合」を見出そうとする研究成果も報告されている。このように HLA アリル型適合性は、造血幹細胞移植のドナー選択における“golden standard”であり続けており、これまでに得られている研究成果に基づき、その臨床的意義を再検討したい。

2. KIR 適合性の立場から

○屋部 登志雄¹⁾, 平安 恒幸¹⁾, 三好 佳名子¹⁾, 柏瀬 貢一¹⁾, 松尾 恵太郎²⁾, 森島 泰雄²⁾

1) 東京都赤十字血液センター

2) 愛知県がんセンター

造血幹細胞移植における組織適合性については主として HLA 抗原と認識アロ抗体, アロ反応性 T 細胞および HLA 一致ペア移植におけるマイナー抗原と認識 T 細胞の反応性が解析されてきた。以前よりナチュラルキラー (NK) 細胞のアロ反応性が知られていたが, 最近 NK 受容体の大部分が HLA クラス I およびクラス I 関連分子を認識することが明らかとなり, NK 受容体リガンドの観点から組織適合抗原系が見直されており, 造血幹細胞移植における HLA 適合性もアロ NK との反応性の視点から再考して見ることは重要であろう。NK 受容体には NK や T 細胞で発現する Killer Ig-like Receptor (KIR) ファミリーと NKG2 ファミリー, 抗原提示細胞群にも発現する Leukocyte Ig-like Receptor (LILR) ファミリーなどがある。リガンドとして KIR が主に HLA-C, -B, -A を LILR が HLA-G, -F, -A, -B を, NKG2A/C が HLA-E を, NKG2D が MICA/B, ULBP (RAET) を認識する。KIR によるクラス I 認識の特徴はアレルを個々に識別するのではなく, アロ抗体の CREG (Cross-reactive Group) のように複数のアレルに共通する抗原エピートープ特異性を認識することである。これまでに HLA-C 抗原では $\alpha 1$ ドメイン 80 番目のアミノ酸残基の差異により C1 と C2 の特異性(それぞれ KIR2DL2 と 2DL3, 2DL1 のリガンド), Bw4 特異性 (KIR3DL1 のリガンド), HLA-A3, -A11, -B27 特異性 (KIR3DL2 のリガンド)が報告されているが, 特異性不明の KIR が数種類あり, さらに各 KIR 遺伝子座には複数のアレルが存在するので上記以外の HLA 抗原がそれらのリガ

ンドである可能性が考えられる。さらに KIR のクラス I 認識の強弱が結合ペプチドの違いで大きく変化することや LILR や NKG2A 認識もペプチド依存性であることも報告されている。こうした NK 受容体の認識機構は自己の生体恒常性維持のために発達してきたと考えられる。感染, 腫瘍化やストレスを受けた細胞では古典的クラス I の表面発現低下や結合ペプチドの変化, あるいは正常細胞では未発現のクラス I 関連分子の発現誘導を起こすが, これらは細胞の出す危険信号の一種と考えられる。こうした標的細胞の状況変化を NK の活性化型と抑制型の受容体がモニターし, それぞれの出す正負のシグナルのバランスにより, 正常な細胞とは反応せずに生体にとって危険な細胞をうまく排除するのであろう。この認識機構は一方ではアロ細胞にも向けられ, クラス I リガンド特異性の相違や特定のペプチドの存在を受容体が認識して NK のアロ反応性が引き起こされると考えられる。造血幹細胞移植の場合, 患者・ドナー間でクラス I の KIR リガンド特異性が異なるために抑制型 KIR が機能しない場合 (Missing Self) や活性化型 KIR が刺激を受け NK が反応し, GVHD, 拒絶, 再発 (GVL 効果), 移植後感染症罹患などに影響を及ぼすと思われる。我々は非血縁者間骨髄移植において従来の HLA 適合性解析に加えて, クラス I の KIR リガンド特異性と NK 受容体レパートリーの患者・ドナー間組み合わせの各種移植成績への効果について統計学的な解析を行っている。本シンポジウムでは得られた結果をもとに組織適合性と NK 認識の関連について議論したい。

3. ABO 血液型適合性の立場から

○諫田 淳也, 一戸 辰夫

京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科

固形臓器移植において、ABO 血液型は移植片の拒絶に関与する重要な移植抗原として機能することが知られている。一方、同種造血幹細胞移植においては、必ずしも血液型を一致させることがドナー選択の重要な条件とはされておらず、実際、ABO 血液型不適合ドナーからの移植が全体の約 3-4 割を占めるに至っている。しかし、血液型主不適合あるいは主/副不適合造血幹細胞移植においては、一定の頻度で、移植後赤芽球癆や溶血性貧血などの合併症が出現することが知られており、これらが重篤化した場合には予後にも影響が及び得る。前者は、ABO 血液型の主不適合が存在する移植において、前処置後もレシピエントの形質細胞が一定期間残存し、ドナーの不適合 A 抗原あるいは B 抗原に対する抗体を産生するために、赤芽球系の回復が起こらず長期間の赤血球輸血が必要となる合併症であり、後者は ABO 血液型副不適合が存在する移植において、移植されたドナー由来の B 細胞が、移植後早期より抗 A 抗体あるいは抗 B 抗体を産生することにより発症する合併症であり、移植後急性期に出現するものは“passenger lymphocyte syndrome”としても知られている。

ABO 血液型の適合性は、上記のように移植後合併症の発症リスクを増加させると考えられるが、その移植片対宿主病 (GVHD) の発症頻度あるいは再発率・生存率に及ぼす影響に関しては一貫した結論は得られていない。そのため近年では多施設が登録し

ているデータベースを利用して、後方視的研究による ABO 血液型適合性の意義の再検討が試みられている。CIBMTR (Center for International Blood and Marrow Transplant Research) における HLA 一致同胞からの骨髄移植を受けた急性あるいは慢性白血病 3103 例の後方視的研究では、主/副不適合移植は適合移植と比較し重症の急性 GVHD の発症頻度が高いものの、生存には影響を及ぼさず、HLA 一致同胞間移植におけるドナー選択において ABO 血液型不適合は問題とならないことが示唆された (Seebach et al, Biol Blood Marrow Transplant. 2005; 11(12): 1006-13)。しかし JMDP (Japan Marrow Donor Program) における 4970 例の後方視的解析では、主不適合群、副不適合群において 5 年生存率が有意に低かったことが報告されている (2006 年米国血液学会)。また、緩和的前処置を用いた移植においては赤芽球癆等の合併症が増加する可能性が懸念されており、臍帯血移植なども含め比較的新しい移植方法に限ってみた場合、ABO 血液型不適合が生存率に及ぼす影響に関しては、今後検討されるべき重要な課題と考えられる。本シンポジウムでは、今まで行われた報告をもとに、造血幹細胞移植における ABO 血液型適合の意義を振り返るとともに、1990 年 11 月から 2007 年 3 月まで京都大学医学部附属病院血液・腫瘍内科において造血器腫瘍に対して行われた初回の造血幹細胞移植 242 例を対象とする解析結果を提示し、ABO 血液型適合性の意義を再検討したい。

追加発言, 「ABO 血液型主不適合ミニ移植に みられた赤芽球癆」

○谷口 享子・島崎 千尋

京都府立医科大学 血液・腫瘍内科

赤芽球癆 (pure red cell aplasia: PRCA) とは, 種々の原因によっておこる選択的赤血球生成障害の総称である。血液型主不適合や主/副不適合の同種造血幹細胞移植では, レシピエントの形質細胞が残存するとドナー不適合抗原 (A 抗原や B 抗原) に対する抗体が長期にわたって産生され赤芽球の産生低下をひき起こすと考えられている。骨髄非破壊的前処置による移植は, その前処置の軽さから形質細胞が残存しこれらの合併症の増加が懸念されている。

症例は 60 歳男性。原疾患は, MDS/RA。輸血依存による肝ヘモクロマトーシスと糖尿病を合併していたため, 骨髄バンクドナーより同種骨髄移植を施行した。高齢者であることより前処置は Flu/iv BU/TBI 4Gy, GVHD 予防は FK + short term MTX とし, 2007 年 6 月 8 日に骨髄バンクドナーより同種骨髄移植を実施。血液型が主不適合 (ドナー A 型 レシピエント O 型) であったため輸注前に赤血球除去を行い, 処理後の輸注細胞数は ANC $0.6 \times 10^8/\text{kg}$ であった (処理前 ANC $2.7 \times 10^8/\text{kg}$)。生着は好中球 \geq

500 day17, 血小板 \geq 2 万 day19 であり速やかであったが, 移植後赤血球の回復は遅延し day30, day60, day90 いずれの骨髄穿刺においても赤血球系の回復は認めず移植後 PRCA と判断した。day60 の血清では抗 A 抗体 IgG 1024 倍と高値。rituximab など含めた治療なども検討したが, day110 には抗 A 抗体 IgG 128 倍と抗体の低下を認めたため経過観察とした。day121 には抗 A 抗体 IgG 2 倍未満まで低下し末梢血中も A 型血球 82% と増加を認め, day 119 には reticulocyte の回復も認めた。

移植後 PRCA の治療法は, 残存した形質細胞を駆逐するために, ドナー T 細胞による graft-versus-plasma cell 効果を期待した移植片対宿主病の誘発やドナーリンパ球輸注, rituximab の投与などが行われるが, 移植後のレシピエントに対してはどれも侵襲が高くその生命予後に影響を与える可能性がある。今後, ミニ移植における, ABO 不適合移植においては抗形質細胞効果のある前処置を加える必要性についても検討していきたい。

4. 臍帯血移植の立場から

甲斐 俊朗

兵庫医科大学輸血部

臍帯血中の T 細胞の未熟性の故, 臍帯血移植ではその多くが HLA 不一致ドナーからの移植であるに

もかわらず, GVHD の発症頻度, 重症度とも低く, GVHD の制御も容易であるといわれている。し

かし、臍帯血移植における HLA 適合度とその成績に関しては十分解析されてはいないのが現状である。今回、日本さい帯血バンクネットワークに集積されたデータをもとに臍帯血移植における HLA 適合度の意義について解析したので報告する。

〈対象〉 対象は 2713 例(成人/小児: 1905/808, 悪性疾患/非悪性疾患: 2489/224, 初回移植/再移植例: 2091/622), 骨髄破壊の移植が 1475 例, RIST 1113 例, ミニ移植 87 例, 前処置なしの移植が 27 例あった。HLA 不一致数と好中球, 血小板生着, 2 度以上 AGVHD 発症率, TRM, EFS の関連を単変量および多変量解析で解析した。

〈結果〉 1) HLA-A, B, DR 血清学的タイピングおよび HLA-AB; 血清学的, DRB1; DNA タイピングとも, HVG, GVH 両方向不一致数が少ない程 EFS, TRM は良好で AGVHD II = < の発症頻度は低かった(単変量解析)。しかし, 多変量解析では GVHD 方向の不一致が AGVHD II = < 発症に有意な影響を及ぼすものの, EFS, TRM には有意な影響を及ぼしてはいない。2) 生着に関しては, 単変量解析で A, B, DR 血清学的 (GVH 方向), AB; 血清学的, DRB1; DNA high (両方向)不一致と好中球, 血小板生着との間に有意な関連を認めたが, 多変量解析では有意な影響を及ぼしてはいなかった。3) 小児急性白血病 (n = 373) においては, HLA-HVG 方向の不一致と好中球や血小板生着, TRM の間に有意な関連が認められ(単変量解析), TRM に関しては多変量解析においても HLA 不一致数が少ない程好影響を与え

ていた。4) 成人 AML 初回移植フル移植症例 (n = 284) では, HLA2 抗原不一致例の EFS が良好 (p = 0.0105) であり, 不一致数が少ない程再発率が高い傾向にあった。また, AGVHD II 合併例の EFS が AGVHD 0-I 合併例に比べ EFS が良好かつ再発率が低い傾向にあり臍帯血移植における GVL 効果を示唆する結果が得られた。5) 成人 ALL 初回移植フル移植症例 (n = 199) では AML にみられたような成績は得られなかった。6) 小児非腫瘍性疾患では HLA HVG 方向不一致数が少ない程 EFS が有意に良好であった。

〈考察〉 HLA 不一致が移植成績, 特に生存率に及ぼすインパクトに関しては患者年齢や, 疾患, 移植病期, 移植細胞数等他の因子の影響も考慮する必要がある。Eurocord の 1000 例以上の解析では HLA-A, B, DR 血清学的および HLA-AB; 血清学的, DRB1; DNA タイピングとも, HLA 不一致数が増す程生存率は低くなるが 1 不一致と 2 不一致では有意差がないと報告されている。今回, わが国の多数例の解析から全体では Eurocord と同様の結果が得られているが, 年齢, 疾患により HLA 適合度の生存率に及ぼす影響は異なっており, 臍帯血の選択に際しては患者背景と HLA 適合度を考慮した臍帯血の選択をする必要性がある。

(この報告は, 日本さい帯血バンクネットワークデータ管理委員会において解析された成績をもとに発表した。)

● 特別講演 ●

「KIR gene Typing」

Daniel E. Geraghty

Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle WA

Towards identifying causal genetic variants in complex disease: application of state of the art resequencing methods to the human KIR locus.

Our current work addresses two central challenges in genomics, one biological and the other technical. The biological challenge is to identify “causal sequence variants” within a candidate region that has been implicated in disease susceptibility by linkage or association. The technical challenge is to find a path forward from current practice (*i.e.*, PCR amplification of the recognizable functional elements in the candidate region, from cases and controls, followed by sequencing of the PCR products on conventional sequencing instruments). This technical challenge includes the development of high throughput methods for fosmid isolation and sequencing. As an initial application of these tools to a biologically important locus, we examined the human-killer-cell-inhibitory receptors (KIRs), a group of highly homologous genes with 8–14 KIR genes on any one haplotype. Each gene is ~17 kbp in length and the sets of genes are arranged in nearly precise tandem arrays over a region of 140–200 kbp. The emergence of KIR as a potentially important locus relevant to the genetics of transplantation and infectious disease has made resequencing of this region, in sufficient numbers of individuals to capture the overall popula-

tion diversity at KIR, an important goal. Towards that end, we resequenced 23 KIR haplotypes to completion using fosmid libraries and shotgun sequencing to obtain complete, phased, high quality sequence data. Two noteworthy features are emerging from the KIR data set. First, it appears that, in previous work, the number of common haplotypes in the population was overestimated on the basis of apparent differences in gene content. In the current study, based on STS content and sequence data, we were expecting the 23 chromosomes sampled to contain 12 distinct patterns of gene content. Instead, upon complete resequencing we found 7, one of which had not been predicted previously. In addition to addressing basic evolutionary and functional issues about KIR, these data are amenable to the development of typing methods that will facilitate the acquisition of accurate, and far more complete, KIR genotypes for disease-association studies. Derivative methods for resequencing KIR at the gene content haplotype level and allelic content levels in conjunction with the development of advanced software for data acquisition, storage, and analysis will be described.

● 特別講演 ●

「造血幹細胞移植における免疫寛容」

豊嶋 崇徳

九州大学病院 遺伝子・細胞療法部

同種造血幹細胞移植は、免疫系そのものも移植されるにもかかわらず、やがて免疫抑制を中止できる症例がまれではなく、臓器移植ではみられない大きな特徴である。このような例では免疫寛容が成立していると考えられ、この免疫寛容は若年者、HLA 適合同胞間移植、末梢血幹細胞以外の移植などで成立しやすいことが知られている。免疫寛容が成立しない症例は慢性 GVHD を発症する。かつて慢性 GVHD は急性 GVHD が経時的に移行したものと考えられていたが、最近では異なる病態であると考えられるようになった。慢性 GVHD は膠原病に類似し、自己抗体も検出される例があることから、自

己免疫疾患の側面をもった同種免疫疾患であるとする仮説も提唱されている。最近の研究によって、急性 GVHD の発症がきっかけとなってドナー由来自己応答性 T 細胞が出現する可能性が示されている。このように考えると、ドナー個体の発生・成長の過程で、いったんは中枢性、末梢性に抑制されていた自己応答性 T 細胞が、造血幹細胞移植後にレシピエントの体内で再構築されてくる過程で出現してくることになる。このような現象を基礎的、臨床的観察から考察し、造血幹細胞移植における免疫寛容について考えてみたい。

● 一般演題 (1) ●

1. 可溶性 HLA-G 測定法の問題点と体外受精分野への影響

○下嶋 典子¹⁾、中西 真理²⁾、大村 素子²⁾、川井 信太郎³⁾、永田 のぞみ³⁾、喜多 英二¹⁾、Daniel E Geraghty⁴⁾、羽竹 勝彦²⁾、石谷 昭子²⁾

1) 奈良県立医科大学細菌学

2) 奈良県立医科大学法医学

3) 湧永製薬バイオ事業開発部

4) Fred Hutchinson Cancer Research Center

【目的】

非古典的 HLA クラス I 分子の一つである HLA-G は、その発現が胎盤特異的であり、また NK, T, 樹状細胞などに発現する抑制性レセプターの

LILRB1 や LILRB2 のリガンドであることから、母児免疫寛容に重要な分子であると考えられている。特に alternative splicing により産生される可溶性 HLA-G 抗原 (sHLA-G) は、2002 年 Fuzzi らが、

体外受精卵培養上清中に sHLA-G を検出できなかった体外受精卵の着床率が 0% であったのに対し、sHLA-G が検出された体外受精卵の着床率が 24% であったと報告した。このことから、体外受精の分野において、確実に着床・妊娠する良好胚の選別に sHLA-G の検出が非常に有用であると注目された。そこで我々も同様に体外受精卵培養上清 109 例中の sHLA-G の有無を検討したが、体外受精卵培養上清中に sHLA-G は検出されず、またその着床率との関連も見出せなかった。我々と、Fuzzi らの結果の違いは測定方法の違い、またその問題点にあると考え、体外受精卵培養上清中に存在すると推測される可溶性 HLA class Ia 抗原 (sHLA-Ia) と、トロホプラストが産生するホルモンの一つである hCG (ヒト絨毛性ゴナドトロピン) が、sHLA-G 測定に与える影響について検討した。

【方法】

sHLA-Ia は IHW の HLA homozygous cell line 09075, 09044, 09031, 09084 から、sHLA-G は 221-Gs からアフィニティー精製したものを使用した。また ELISA には抗 HLA-G 抗体 MEMG/9, 抗 HLA クラス I 抗体 W6/32, 抗 β_2m 抗体のそれぞれを用

いた。

【結果】

sHLA-Ia が、sHLA-G 検出に与える影響をみたところ、sHLA-Ia 添加により、サンプル中の sHLA-G 検出が擬陽性となることがわかった。しかし、この結果は ELISA を行う際のプロッキングの条件により異なっていた。hCG が sHLA-G 検出系に与える影響は認められなかった。

【考察】

sHLA-G の存在は、胎盤・体外受精卵培養上清中のみならず、健常人男子血清、移植免疫成立患者血清中などにも検出されているが、いまだその存在は疑問視されている。我々はこのことが、一つには sHLA-G の ELISA 測定法にあると考えている。今回の結果から、サンプル中の sHLA-Ia の存在が、サンプル中の sHLA-G を擬陽性とする可能性の一つとして考えられたが、今後さらに詳細な検討を重ね、サンプル中の生体成分に影響をうけず sHLA-G を検出する系を確立し、体外受精卵培養上清中の sHLA-G の存在をはじめ、sHLA-G を検出したとする多くの報告を検証していく予定である。

2. 妊娠後期における HLA・HPA 抗体スクリーニングの有用性

○井手 大輔¹⁾, 山田 枝里佳¹⁾, 菅野 知恵美¹⁾, 伊藤 志保¹⁾, 峯 佳子¹⁾, 藤田 往子¹⁾, 金光 靖¹⁾, 芦田 隆司¹⁾²⁾, 金丸 昭久¹⁾²⁾, 椿 和央³⁾, 釣谷 充弘⁴⁾, 塩田 充⁴⁾

1) 近畿大学医学部附属病院 輸血部

2) 近畿大学医学部 血液内科

3) 近畿大学医学部奈良病院 血液内科

4) 近畿大学医学部 産科婦人科

【はじめに】

妊婦の保有する HLA・HPA 抗体は新生児血小板減少症 (NAIT) の原因になる事が知られている。こ

れらの抗体のスクリーニングは臨床的に重要であり、当院においても妊娠 28 週前後の妊婦に対して抗体スクリーニングを行っている。今回は、抗体の検出頻

度および経験した NAIT 症例について報告する。

【対象・方法】

1991年8月～2007年8月の間に近畿大学附属病院輸血部にて検査を実施した4580例を対象とした。HLA抗体およびHPA抗体の検査はMPHA法を用いた。

【結果】

HLA抗体は4580例中596例(13.0%)で陽性であった。HPA抗体は4580例中26例(0.6%)で陽性であった。また、3例ではHLA抗体とHPA抗体の両方を認めた。陽性症例中、HLA抗体によると思われるNAITを6例認めた。また、HPA-4bによるNAIT発症例を2例認めた。NAIT発症例は同じ母親からの出産例であった。第1子妊娠時のスクリーニング検査においてHPA-4b抗体(抗体価2000～

3000倍)を検出した。出生後の検査で児の血小板数は1.8万/ μ lと著明に減少していた。紫斑・出血斑は認めず、頭部エコーによる異常も認めなかった。児にはHPA-4(a+b+)、HPA-4b抗体(+)を認め、NAITと診断した。HPA適合血小板を準備したが使用せず、 γ グロブリンの投与で血小板は増加した。第2子は出生直後の血小板数が10.6万/ μ lと軽度の減少であったが、HPA-4(a+b+)を認め、NAITと診断した。治療は行わず経過観察したところ、血小板は徐々に増加した。

【考察】

妊婦のHLA・HPA抗体スクリーニングは、NAITの危険性を予知し、発症後の迅速な対応が可能となり、臨床上有用であると考えられた。

3. 分娩後長期経過を追及したサルコイドーシス症例の HLA Class I

○立花 暉夫¹⁾、石井 博之²⁾、福森 泰雄²⁾、谷 慶彦²⁾

1) 愛染橋病院 内科

2) 大阪府赤十字血液センター

【研究目的, 方法】

分娩後悪化はサルコイドーシスの経過不良要因として重要課題であるが、分娩後10年以上の長期経過を追及し得たサルコイドーシス症例の報告は稀であり、免疫遺伝学的に検討した報告はない。

今回分娩後10-34年間の長期経過を追及したサルコイドーシス13症例のHLA Class I DNA typingを実施し分娩後長期経過とHLA Class Iとの関連性を検討した。

【研究対象と分娩後の長期臨床経過】

A群：分娩後長期経過中悪化なく、経過良好11例(その内1例は妊娠中、胸部画像で両側性肺門リンパ節腫脹(BHL)+肺野病変が改善し、分娩直

後一時悪化のみで、その後の長期経過は良好、病変著明改善し悪化なく、肺門リンパ節も石灰化し、分娩後29年後も胸部画像正常化を維持している)

B群：分娩後悪化を繰り返す、経過不良2例、

a) 発見時BHLのみ、最初の分娩後、病変悪化、肺野病変、皮膚病変が新出現し、2,3回目分娩後も同様悪化、分娩後34年経過中も悪化改善を繰り返し、病変が長期持続中。

b) 発見時BHLのみ、経過中、肺野病変、皮膚病変新出現、分娩後両病変悪化、分娩後29年経過中も悪化改善を繰り返し、病変が長期持続中。

【成績】

1. A 群 11 例では、前回、サルコイドーシス症例で高頻度と報告した HLA-B*1301, 5502, 6701 が同様高頻度で、HLA-A*0201, HLA-B*5101, HLA-C*0304 も高頻度傾向であった。しかし、既に報告してきたサルコイドーシスの経過不良と相関を示す HLADRB1*0803, HLADQB1*0601 は何れも陰性であった。
2. B 群 2 例ではそれぞれ HLA-B*1301, 6701 が陽性で、その内 1 例は経過不良と相関を示す

HLADRB1*0803-DQB1*0601 が陽性であった。

【結論】

分娩後の長期経過中悪化なし 11 例では、前回報告の HLA Class I 検討成績とほぼ同様の傾向を示し、HLA-A*0201, HLA-B*5101, HLA-C*0304 も高頻度傾向であった。今後、さらに両群症例数を追加して、分娩後長期経過と HLA Class I との関連性を検討する必要がある。

4. 献血者における HLA 抗体陽性者の頻度分布

○福森 泰雄, 小野 明子, 池田 通代, 高陽淑, 石井 博之, 谷上 純子, 谷 慶彦, 柴田 弘俊

大阪府赤十字血液センター

【はじめに】

血液センターでは 2002 年度まで、HLA タイピング用抗血清の収集を目的として献血者の約 5% に対して HLA 抗体スクリーニングを実施していた。抗血清収集を目的とした場合、25 歳以上の女性献血者を対象にスクリーニングした方が検出効率が高いが、大阪センターにおいては性別や年齢を特に限定せず、献血者の約 5% に対し、ランダムにスクリーニングを実施した。そこで、HLA 抗体スクリーニング陽性献血者から、同時期の年齢・性別献血者数を基に頻度分布を求め、またその抗体特異性について解析した。

【材料・方法】

1998 年 4 月から 2002 年 3 月までの間で実施した献血者の HLA 抗体スクリーニング(一次抗体スクリーニング)を対象とした。一次抗体スクリーニングはランダムに選んだ 5-6 パネルリンパ球に対し LCT 法で陽性となるドナーを選択した。うち血漿 Bag が得られた検体に対し、さらに二次抗体スクリーニングを実施した。二次抗体スクリーニングは、HLA 型

既知の約 200 パネルリンパ球を用いてセログラムを作成し、HLA 抗血清として有効性の可否、さらに詳細な解析の必要性の有無等を総合的に判定した。さらに今回、その抗体スクリーニング対象者の性別、年齢を調査し、解析結果との照合を行った。

【結果】

上記の 4 年間の総ドナー数は 1,831,317 人で、うち計 97,476 人のドナー (5.3%) のスクリーニングを実施した。一次スクリーニング陽性者は 2,038 人で、2.1% の抗体陽性率であった。そのうち血漿 Bag が得られた 703 人 (34.5%) の年齢・性別分布を基に 4 年間の総ドナーの年齢・性別分布から抗体陽性率を推定した。その内訳を表 1 に示す。二次抗体スクリーニング陽性者は女性 124 人 (0.84%)、男性 36 人 (0.19%) であり、その内訳を表 2 に示す。二次抗体スクリーニング陽性者の抗体特異性解析結果から、抗体特異性には男女差が見られ、男性では A ローカスで、A3, A11, A26, A19, B ローカスでは B8, B13, B17, B27, B44 等の特異性を保有していた。

表1 一次スクリーニング陽性率

年齢	16-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	平均
女性 (%)	0.32	1.57	4.8	3.64	2.28	3.26	2.57
男性 (%)	0.82	1.76	1.85	1.67	2.19	2.57	1.81

表2 二次スクリーニング陽性率

年齢	16-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	平均
女性 (%)	0.06	0.35	2.11	1.11	0.66	0.54	0.84
男性 (%)	0.08	0.18	0.21	0.13	0.29	0.24	0.19

【まとめ】

女性の陽性率は一次スクリーニング、二次スクリーニング陽性率において、30代に急激な上昇があり、その後序々に低下した。男性は10代を除いて、一次で約2%、二次でほぼ0.2%の陽性率で大きな変

化は見られなかった。また陽性者中、女性の割合は一次スクリーニングで52.8%、二次スクリーニングで77.5%であった。さらに、HLA抗体特異性は男女差が見られ、男性の持つ抗体に特徴のあるエピトープが推測された。

5. マルチプレックス PCR を利用した 生着確認検査法について

○二神 貴臣, 林 晃司, Ju Ruiqing¹⁾, 小島 裕人, 辻野 貴史,
大沼 豪, 丸屋 悦子, 赤座 達也, 佐治 博夫

特定非営利活動法人 HLA 研究所

1) Chonchun Blood Center

【はじめに】

我々はマイクロサテライト (MS) の多型性を利用し、造血幹細胞移植後の生着確認検査をおこなっている。今回検査の精度と効率の向上をめざしマルチプレックス PCR を用い、14種の MS を4本のチューブで増幅させポリアクリルアミド電気泳動法 (PAGE) による検出方法を検討したので報告する。

【材料・方法】

- 造血幹細胞移植ペア (同胞・親子・非血縁) 100 例の DNA.
- Multiplex PCR Assay Kit (タカラバイオ), 14 種の MS 増幅用プライマー

14種の MS について多型分子量に重複のない最適なグループ化をおこなった。全 MS を包含する4本の Multiplex PCR をドナーとレシピエントにつきおこない、MS allele を PAGE, サイバーゴールド染色後分子量を測定し決定した。

【結果・考察】

- マルチプレックス PCR で MS 多型の分子量に重複のない最大の組み合わせ数は4種であり、プライマーの組み合わせおよびプライマー量の調整により PCR の最適化が可能であった。
- 14種の MS について、移植ドナーの種類により Chimerism に informative である頻度を調べた結

果を以下の表に示す。

	informative%	informativeなMSの数				
		80%以上	70%以上	60%以上	50%以上	50%以下
ドナー の種類	同胞	0	1	2	4	7
	親子	3	4	3	1	3
	非血縁	10	1	1	0	2

- 14種のMSのうち7種のMSにおいて, Cauca-

sian には検出されない MS 多型が 11 種検出された。

- 従来 42 本必要とされた PCR チューブがマルチプレックス PCR により 12 本にまとめられ, PCR 及び電気泳動の所要時間が大幅に短縮された。
- マルチプレックス PCR は同一検体で複数の増幅産物を用いる検査の省力化に有用な方法である。

6. Whole Genome Amplification の検討

○辻野 貴史, 大沼 豪, 二神 貴臣, 林 晃司, 小島 裕人, 丸屋 悦子, 赤座 達也, 佐治 博夫

特定非営利活動法人 HLA 研究所

【はじめに】

Whole Genome Amplification (WGA) は貴重な DNA sample を半永久的に利用できる。さらに DNA の抽出が困難な試料から得られる極微量な DNA 検体も WGA を使用することで種々の検査・研究に使用可能となる。DNA が研究・検査の基盤となっている分野では夢の方法(試薬)である。WGA のキットとして QIAGEN 社から REPLI-gKit が発売されている。我々はこの Kit を使用し, 効率の良い WGA の条件設定および WGA 後の増幅 DNA が正しく復元されているかの検証を目的とし検討したので報告する。

【検討目的】

- キットプロトコールでの到達収量を達成するための効率的な増幅条件
- WGA に使用する template DNA 量と genome 復元の精度の検証

【材料・方法】

DNA 増幅キット: REPLI-g Mini Kit (QIAGEN)

DNA sample: 血液・口腔内粘膜細胞・爪由来 DNA

Genome 復元の精度の検証法として, HLA-class I,

II, 各遺伝子座に存在する 14 種のマイクロサテライト, マイナー抗原遺伝子群, 免疫応答遺伝子群に存在する多型性のマッチング法を用いた。

【結論・考察】

- REPLI-g Kit で変性時間, アニール温度について検討した結果, キットプロトコール通りの条件が最適であった。
- 増幅収量について, 使用する template 量で増幅倍率を比較すると, 少ない template 量 (1 ng) の増幅倍率が高く, 収量はほぼ同一であった (2 μ g)。
- Template の濃度別, 由来別で WGA 後の検体を使用し HLA Typing をおこなった結果, 血液や口腔内粘膜, Dried blood 由来の DNA については DNA 濃度に関わらず, HLA-Class I・II の復元が安定的に得ることが確認された。しかし, 爪由来の DNA については DNA 濃度の影響を受け, HLA typing では特に B 座, C 座で復元が不安定であった。Template DNA の質が WGA 後の genome の良い復元性を得るためのキーポイントであることが確認された。

7. Analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes encoding molecules with immune functions - possible clinical relevance and ethnic difference.

○Milena Ivanova^{1) 3)}, Ju Ruiqing^{2) 3)}, Masaki Matushita⁴⁾, Shintaro Kawai⁴⁾,
Naoya Ochiai³⁾, Etsuko Maruya³⁾, Hiroh Saji³⁾

-
- 1) Central Laboratory of Clinical Immunology University Hospital "Alexandrovskaya", Sofia, Bulgaria
2) Chonchun Blood Center
3) HLA Laboratory NPO
4) Wakunaga Pharmaceutical Co., Ltd.

The level of immune response is associated with genes regulating immune functions and diversity of these genes modulates an individual's response to life-threatening disorders. **The aim** of this study was to analyze functional polymorphisms of immune response (IR) genes in different ethnic groups and to develop a rapid, cost-effective, and high-throughput method for genotyping using multiplexed microsphere-based suspension array platform — Luminex^R xMAPTM. Polymorphic SNPs, previously shown to determine the level of gene expression were analyzed in immunoregulatory IL-6, associated with different diseases and transplant outcome and MBL-2, involved in innate immunity and associated with severe infections and transplant-related complications. Two SNPs in the promoter region of IL-6 gene — 174 (G/C) and -572 (G/C) and 6 SNPs in MBL2 gene — three of them in the promoter region -619 (C/G); -290 (G/C); -66 (C/T) and 3 coding SNPs in the exon 1 — cdn 52 (C/T); cdn 54 (G/A); cdn 57 (A/G) were selected. PCR-SSOP method using Luminex^R xMAPTM technology that we developed for IL-6 genotyping included amplification of two fragments containing SNPs of interest by multiplex

PCR, direct hybridization with capture probes, specific for the each allele of -174 and -572 SNPs, followed by analysis on Luminex 100. SNPs in the promoter region of MBL-2 were assessed by amplification of 690bp region, containing 3 SNPs of interest, followed by direct hybridization with allele-specific capture probe and analysis on Luminex 100. Haplotypes determined by the 3 coding SNPs in the exon 1 were analyzed by Preferential Homoduplex Formation Assay (PHFA) adapted for Luminex^R xMAPTM platform. The methods developed were applied on a DNA panel of healthy Japanese and Caucasians controls. We detected no C allele for -174 IL-6 SNP in the Japanese, and this position seems to be monomorphic with only G allele present. Significant polymorphism with prevalence C allele (frequency 0.69), possibly associated with high IL-6 level, over G allele (frequency 0.31) was observed in the Japanese population. In contrast, for Caucasians -572 SNP was characterized by limited polymorphism compared to highly variable -174 SNP. Analysis of MBL2 showed limited degree of polymorphism in the exon1 in Japanese compared to Caucasians. The highest degree of variability was observed for cdn 54, while for cdns

52 and 57 minor alleles were not detected in Japanese in contrast to Caucasians. While genotype frequencies of -619 SNPs were similar in both of ethnic groups studied, -290 and -66 SNPs were characterized with increased frequency of wild type genotypes (GG and CC respectively) in Japanese compared to Caucasians. Haplotype analysis including all 6 SNPs was also performed in both groups in order to estimate variants associated with different MBL level.

In conclusion we have developed a rapid and sensitive method for simultaneous detection of functionally important SNPs in two IR genes IL-6 and MBL2. Considering the important role of these genes in the acquired and innate immune response respectively, knowledge of their polymorphism in different ethnic groups is important for future medical genetic studies.

8. 当院における献腎移植希望登録者 HLA 型 10 年の変遷

○大西 民子, 岡村 康子, 飯田 好江, 酒巻 建夫, 剣持 敬¹⁾, 倉山 英昭²⁾

1) 国立病院機構千葉東病院研究検査科 HLA 検査室 臨床研究センター

2) 小児科

【目的】

献腎移植希望登録患者の HLA 型は以前から健常人 HLA 型とは異なることが知られている。一方, 学校検尿, 職場検診, 住民検診などが導入され早期発見, 治療追跡などが進んでいるが, これにより登録患者の HLA 型が変化してきているかどうかを解析した。

【方法】

当 HLA 検査室で検査を実施した献腎希望者 751 名と現在も移植希望を更新している 361 名を対象とした。対照としては病院職員および実習生 619 名である。また日本組織適合性学会 WS データも参照した。末梢血リンパ球による抗血清法タイピング, 及び末梢白血球由来 DNA によるタイピングを実施した。DNA 法は 11 回国際 HLAWSSO セットと自家製 SSP キット, Dynal-Reli キット, ペルフリーズキット, 自家製 SSP キットを使用した。対象および対照全例で DNA 法による DRB1 タイピングを実施している。また希望登録者の群を 1997 年までの

317 名と 1998 年からの 434 名の 2 群に分けて HLA 頻度を比較した。

【結果】

HLA-DR 抗原は患者群では DR4 が健常人頻度よりも 10% 程度多く, DR15, DR12, DR9 が数 % ずつ少ない傾向が認められた(カイ二乗検定で 5% 以下)。B 座では B35, B62 と B71 抗原が多い傾向が認められた。1997 年までの登録希望者と 1998 年以降の登録希望では共通して DR4 が多く, DR15 などが少ないという傾向が続き, 2 群間では有意な差(変化)が認められなかった。

【考察】

10 年程度の短期間では HLA 抗原変化が認められなかったことは, 生活環境や食生活, 腎疾患に対する治療の進歩以上に HLA 関連の影響が続いていることを示している。登録患者の原疾患についても漠然と慢性糸球体腎炎という記載が多い。11 年前の腎生検による確定診断例の小児 IgA 腎症研究では今回の登録患者と同様の DR 頻度傾向を示していた。登

録患者の原疾患の中に IgA 腎症が占める割合は高いものと考えられる。一方、日本人の中で地域的に HLA 抗原頻度が微妙に異なることから地域ごとに登

録患者 HLA 頻度を調べることで、同じアジア地域での比較検討することの意義は大きいと思われる。

9. 心移植における既存抗体陽性症例に対する FlowPRA を用いた HLA 抗体のモニタリングの有用性について

○大久保 美里¹⁾, 山本 賢¹⁾, 古田 賢二¹⁾, 佐藤 清¹⁾, 東 晴彦²⁾,
加藤 倫子³⁾, 佐田 正晴⁴⁾, 永谷 憲歳⁴⁾, 中谷 武嗣³⁾

- 1) 国立循環器病センター 臨床検査部
- 2) 同 心臓血管内科
- 3) 同 臓器移植部
- 4) 同 再生医療部

【目的】

心移植前に HLA 抗体を保有し %PRA が高値を示す症例は、移植後に抗体関連型拒絶反応 (antibody mediated rejection; AMR) の発症ハイリスク群である。心移植待機中の患者の多くが左室補助人工心臓 (left ventricular assist system; LVAS) を装着しているため、HLA 抗体を保有するリスクが高いとされている。しかしながら、移植前の脱感作療法はドナー発生時期の予測が困難であり不可能である。そのため既存抗体の推移や特異性を把握することは必須と考えられる。今回、ダイレクトクロスマッチが陰性のため心移植を施行した HLA 抗体陽性 2 症例において、FlowPRA により HLA 抗体のモニタリングを行い液性免疫能の評価を行ったので報告する。

【症例と方法】

症例 1 は DCM の 38 歳女性、14 ヶ月間の LVAS 装着。妊娠歴と輸血歴あり。移植時の %PRA classI は 13% (DSA 陰性) で陽性を示した。症例 2 は DCM の 43 歳女性、23 ヶ月間の LVAS 装着。出産歴と輸血歴あり。移植時の %PRA classI は 42% (DSA 陽性) で陽性を示した。免疫抑制療法はタクロリムス (Tac), ミコフェノール酸モフェチル (MMF), プレ

ドニゾロンの 3 剤併用で開始した。HLA 抗体の有無および特異性の解析はそれぞれ FlowPRA Screening Test と FlowPRA Single Antigen で行った。心筋生検により細胞性拒絶反応は国際心肺移植学会 (International Society for Heart&Lung Transplantation; ISHLT) に従った。また AMR については免疫組織学的染色 (IgG, IgM, IgA, C3d, C4d, C1q) にて行った。

【結果】

症例 1 は移植後 3 日目から、%PRA classI が徐々に上昇し IVIG を開始したが %PRA classI は低下せず、7 日目に 82% となった。6 日目の HLA 抗体特異性でも DSA(-) であったが 7 日目の心筋生検の免疫組織学的染色で IgM, C3d, C4d の沈着が認められた。このため AMR 発生を懸念し血漿交換 (plasma exchange; PE) を併用した結果、%PRA classI は低下し免疫組織学的染色も陰性化し治療効果を得た。症例 2 は移植前に DSA が認められたため、二重膜濾過血漿分離交換法 (filtration plasma pheresis; DFPP) を実施した。さらにバシリキシマブの induction therapy を併用したが DSA は 5 日目に陰性化し細胞性拒絶反応及び AMR も認めず経過も良好で

ある。

【考察】

HLA 抗体保有患者の移植において AMR を回避し抑制することは重要であり、このような症例への対応策を確立しておくことが必要と考えられる。こ

のため Flow PRA により既存抗体の存在や特異性を把握することは、AMR の早期診断を行うための心筋生検実施の決定や脱感作療法 (PE, IVIG, DFPP など) の治療効果を判定するうえで重要な情報を提供しえる。

10. ドナー HLA 抗原に対する抗体の減弱を試みた 児母間末梢血幹細胞移植における抗体価の推移 —Luminex 法と AHG-LCT 法の相関について—

○峯 佳子¹⁾, 山田 枝里佳¹⁾, 井手 大輔¹⁾, 菅野 智恵美¹⁾, 伊藤 志保¹⁾, 藤田 往子¹⁾,
金光 靖¹⁾, 山口 晃史²⁾, 芦田 隆司¹⁾²⁾, 金丸 昭久¹⁾²⁾

1) 近畿大学医学部附属病院輸血部

2) 近畿大学医学部血液内科

【はじめに】

造血幹細胞移植において患者がドナー HLA 抗原に対する抗体を保有している場合、急性の拒絶反応を引き起こすと考えられており、移植を困難にしている。しかし近年、rituximab の投与やドナー由来の血小板輸血により、抗体価を減弱、吸収し生着したという報告がされている。今回、我々は HLA 抗体陽性の児母間末梢血幹細胞移植 (PBSCT) において HLA 抗体価の推移を Luminex 法と AHG-LCT 法にて測定した。また Luminex 法と AHG-LCT 法の相関について検討をおこなったので報告する。

【症例】

65 歳女性、急性骨髄性白血病。他院にて頻回輸血が行われ、血小板輸血不応のため HLA-PC 適応患者であった。移植目的で当院に転院した。HLA 抗体の検査で、広範囲に特異性の強い HLA クラス I 抗体が検出された。HLA 抗原型は Recipient A11, A24, B46, B62, DR4, DR8, Donor (次女) A24, —, B7, B62, DR4, DR1 であり、GVHD 方向 3 座ミスマッチ、HVG 方向 2 座ミスマッチであった。HLA-B7 に対する HLA 抗体価は AHG-LCT 法で 16 倍、

Luminex 法 Single antigen の蛍光強度で 15353 であった。拒絶予防として day-10 に rituximab 375mg/m², day-3 に HLA-7 を有する長女より PC35u, day-2 に移植 Donor から PC30u が輸血された。また day-2, -1, 0 にそれぞれ血漿交換 2700 ml が行われた。輸注 CD34 + 細胞数は 2.2 × 10⁶/kg, 前処置は Flu/L-PAM, GVHD 予防は FK506 + shortMTX であった。AHG-LCT 法, Luminex 法で経時的に抗体価の測定をおこなった。

【結果】

HLA 抗体は rituximab の投与、血漿交換、PC 輸血により AHG-LCT 法 1 倍、Luminex 法で 10037 まで減少した。また、PBSCT 施行後の AHG-LCT 法は陰性、Luminex 法 8640 であった。しかし生着不全のため、day27 に HGV 方向マッチドナーよりの臍帯血移植がおこなわれ生着した。また両方法の相関について、AHG-LCT 法の抗体価を Y 軸、Luminex 法の蛍光強度を X 軸にとりプロットすると、その近似曲線は指数関数で表すことができた。AHG-LCT 抗体価 2ⁿ の指数 n と Luminex 法の蛍光強度は正比例し、相関係数は 0.991, P < 0.01 であり

強い相関が認められた。

【考察】

Luminex 法は AHG-LCT の検出限度以下の抗体

を検出でき、また抗体の詳細な特異性やドナーリンパ球がなくても抗体価の推移を測定できる点で優れた方法であると考えられた。

11. ドナー非特異的 HLA 抗体陽性腎移植患者における Rituximab の効果について

○佐藤 壯¹⁾, 玉置 透²⁾, 山田 理大²⁾, 安部 美寛²⁾, 小林 直樹³⁾,
笠井 正晴³⁾, 米川 元樹²⁾, 川村 明夫²⁾

1) 特定医療法人北楡会 札幌北楡病院 臨床検査科

2) 同 外科

3) 同 血液内科

【はじめに】

Rituximab は抗 CD20 ヒト・マウスキメラ抗体で、本来 CD20 抗原陽性悪性リンパ腫に対する治療薬として保険適応を受けている。しかし、近年臓器移植においても ABO 不適合腎移植やクロスマッチ陽性患者に対する脱感作療法的手段として使用されている。その効果についてはすでに多くの報告がなされ広く認められているところであるが、その用量や併用する治療法の組み合わせについては明確な基準やエビデンスがないのが現状である。当院で三次腎移植を受けたドナー非特異的 HLA 抗体陽性患者が悪性リンパ腫を発症し、Rituximab を含む化学療法を受けた。この患者の治療前後における HLA 抗体を測定し、Rituximab 単剤の HLA 抗体産生抑制効果について検討したので報告する。

【症例と方法】

患者は、脾摘をした上で母親をドナーとする ABO 不適合腎移植を受けたが約 2 年で拒絶された。次いで妻をドナーとする ABO 適合腎移植を受けたがこれも拒絶され、移植腎に対する class I, II 両方の HLA 抗体を保有している。3 年前に長男をドナーとして三次移植を受け、腎機能は安定し順調に経過していたが、昨年 6 月 diffuse large B cell lymphoma を発症した。これに対して CHOP 療法を 1 回行い、その

後 R-CHOP 療法を 5 回施行した。この治療前後の HLA 抗体の推移を FlowPRA screening test にて検討した。

【結果】

この患者における Rituximab 使用量は標準量の 375 mg/m² で一回に 650 mg、合計 3,250 mg 投与された。5 回の治療の前後で血清中の HLA 抗体を FlowPRA 法で測定したが、class I, II 両方の HLA 抗体の明らかな減弱化は認められなかった。

【考察】

HLA 抗体が減少しない理由については、過去に産生された抗体の残存も考えられるが 5 ヶ月にもわたって残存しているとは考えづらい。休止期の memory B cell がどこに存在しているのかは未だ明確とはなっていないが、今回の症例は Rituximab 単剤では HLA 抗体産生に関わる memory B cell の排除が難しい可能性を示唆している。Rituximab を有効に作用させるためには、血漿交換などによって抗体を減少させ休止期の memory B cell を幼若化、分裂期に導き出し、これに代謝拮抗剤を併用するなどの操作が必要なのかもしれない。今後、さらに経過を観察していくとともに、同様の症例を増やして検討していきたい。

12. SLE における IgG 型 HLA クラス I 抗体産生に関する解析

Analysis of IgG type HLA class I antibody production in patient with SLE

○周 博¹⁾, 斉藤 敏²⁾

1) 信州大学医学部小児医学研究科

2) 信州大学医学部法医学教室

【はじめに】

SLE は自己抗体などの出現に基づく多臓器障害を主徴とする疾患である。圧倒的に女性、特に 20~30 歳代の女性に好発し、血球減少がよくみられ、近年習慣流産との関連についても注目されている。今回、SLE 患者が、HLA に対する自己抗体を保有するか

調べるため、SLE 患者の HLA クラス I 抗体スクリーニング、特異性解析を行った。また、対照として、健常男性の HLA クラス I 抗体スクリーニング、特異性についても解析を行った。

【方法】

輸血、移植歴がない SLE 患者 38 名及び健常者

HLA type of patients with SLE and healthy males carried HLA class I antibodies

No.	Gender	HLA								Specificity Antibodies
		A*		B*		Cw*		DRB1*		
Pt.1	M	0201	1101	1501	4801	0401	0803	0802	1501	B8, B45
Pt.2	M	0201	0206	1301	4006	0304	0801	0405	0901	A3
Pt.3	M	0207	2402	4601	5502	0102	—	0803	0901	B8
Pt.4	M	0206	2601	4002	5101	0304	1402	0802	1201	B45
Pt.5	M	1101	—	1501	4001	0401	0702	0406	0803	B45, B18, B35, B51
Pt.6	F	2402	—	5201	—	1202	—	1502	—	B45, B13, B60, B44, B49
1	M	2402	3303	5101	4403	1402	1403	—	—	B8, B7
2	M	2402	3101	5901	0702	0102	0702	—	—	A68, A34, A25, A26
3	M	0101	0210	5504	4006	0801	0303	—	—	B45, B35, B44, B51, B52
4	M	2602	3303	4002	4006	0801	0304	—	—	B8, B35
5	M	0201	2402	4601	5201	0102	1202	—	—	B44, A68, A34, A3, A31
6	M	0207	—	4601	—	0102	—	—	—	B45, B35
7	M	2402	3101	5201	4001	0304	1201	—	—	B35
8	M	2402	1101	4801	1501	0401	0803	—	—	B45
9	M	2402	—	5201	—	1202	—	—	—	B8
10	M	0206	2601	3501	4002	0303	0304	—	—	A68
11	M	2402	3101	5401	4002	0102	0304	—	—	B8
12	M	2402	2601	5101	1501	0303	1402	—	—	B8
13	M	0207	—	4601	4801	0101	0801	—	—	B45, A23, A24
14	M	2402	3303	5201	1502	0801	1202	—	—	B18, A2, B7, B55, B57
15	M	0207	3101	3501	4601	0102	0401	—	—	B45, B44
16	M	0201	0206	4801	4006	0801	0803	—	—	B8, B45, A1, A3, A11, A23, A24, A25, A26, A29, A30, A31, A32, A33, A34, A68, B7, B13, B14, B18, B27, B35, B38, B44, B49, B51, B52, B55, B57, B60, B62

149名を対象に、HLAクラスIタイピングをPCR-SSOP (Luminex LABScreening), HLAクラスI抗体スクリーニングをFlowPRA法, HLAクラスI抗体の同定をFlowPRA® Single法により実施した。

【結果】

男性患者のHLAクラスI抗体保有率は45.5%, 男性健常者より高頻度に存在していることがわかった($P=0.01$)。患者群と健常者群両群から検出したHLAクラスI抗体に自己抗体は確認されなかった。妊娠歴も輸血歴もない患者及び健常者に多く見られたHLAクラスI抗体の特異性は、日本人にはほとんど存在しないB8, B45抗原に対する抗体であった。B8抗体保有者では80%の人がA24を持っていたが、A2を持つ人は一人もいなかった。逆にB45抗

体保有者では80%がA2抗原を持っており、A24を持つ人は一人であった。患者群では例数が少ないが、健常群で見られた傾向は認められていない。また、患者抗体非保有者ではA2抗原を持つ人が少なく、A11とCw7を持つ人が多く、逆に健常抗体保有者ではA11とCw7を持つ人が少ない傾向を示した。

【考察】

これまでにHLA-B8に対するIgM型自然抗体の報告例がある。今回、HLA-B8IgG型自然抗体も存在することが示唆された。また抗体の特異性と抗体保有者のHLAタイプには相関がある可能性がある。一方、抗体特異性及び抗体頻度については、SLE患者群と健常者群の差が認められなかった。

日本組織適合性学会誌 MHC の投稿規定

I. 投稿について

内容: MHC に関する基礎研究から臨床研究まで全てを対象にし、未発表の論文、他誌に投稿中でないものに限る。

資格: 著者(共著者を含む)は原則として本学会会員に限る。

倫理: ヒトおよびヒトの試料を用いた臨床研究・基礎研究の場合、1980年ヘルシンキ宣言(第18回 World Medical Assembly にて採択)に基づくと共に、当該施設の倫理委員会の承諾を得たものでなければならない。また動物を用いた研究については「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」(1980年日本学術会議決議)などを遵守し行われた研究でなければならない。

種類: 原著、総説、シリーズ、短報(研究速報、技術速報などを含む)、症例報告などとし、日本語、英語を問わない。

審査: 投稿論文掲載の採否は当誌編集委員会において決定し、審査は複数の査読制で行う。審査の結果を踏まえ修正、削除、加筆などをお願いする場合がある。

著作権: 本誌に掲載された論文などの著作権は日本組織適合性学会が有し、インターネットを通じて電子配信されることがある。

掲載料: 掲載は無料であるが、カラー写真など特別印刷に関わる経費は著者の実費負担とする(カラー印刷を希望の場合にはその旨明記)。

別冊: 別冊は有料とし、その経費は別冊部数やページ数による(別冊希望の場合は著者校正の際にその旨明記)。

II. 原著執筆書式

1. 執筆要項

400字詰め原稿用紙30枚(刷り上がり12頁程度)以内とする。図、表、写真は1個につき原稿用紙1枚分に該当しタイトルを必ず記載し挿入箇所を本文に明記する。本文は Microsoft Word で作成し、図、

表、写真は Microsoft PowerPoint を使用する。原稿は全て CD-ROM に保存し、CD-ROM に A4 サイズで プリントアウトした原稿1部 を添えて編集長宛に送付する。

2. 第1頁目

表紙とし「原著」を明記し、日本語と英語でタイトル、著者全員の氏名と所属を記し、脚注として連絡責任者の住所、氏名、電話、FAX、E-mail アドレスを記載する。タイトル、著者名、所属は下記の形式に従う。

Susceptibility gene for non-obstructive azoospermia in the HLA class II region: correlations with Y chromosome microdeletion and spermatogenesis. Tetsuya Takao¹⁾, Akira Tsujimura¹⁾, Masaharu Sada²⁾, Reiko Goto²⁾, Minoru Koga³⁾, Yasushi Miyagawa¹⁾, Kiyomi Matsumiya¹⁾, Kazuhiko Yamada²⁾, Shiro Takahara¹⁾

- 1) Department of Urology, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka, Japan
- 2) Department of Regenerative Medicine, National Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan
- 3) Department of Urology, Osaka Central Hospital, Osaka, Japan

心移植における FlowPRA 法を用いた HLA 抗体検出の意義

山本 賢¹⁾, 佐藤 清¹⁾, 佐田 正晴²⁾, 永谷 憲歳²⁾, 中谷 武嗣³⁾

- 1) 国立循環器病センター臨床検査部
- 2) 国立循環器病センター再生医療部
- 3) 国立循環器病センター臓器移植部

3. 本文—1: 日本語での投稿

• 2頁目に400字以内の英文要旨、日本語および英語のキーワード(5語以内)を記載する。尚、英文要旨作成については編集委員会による対応も可能(希望の

場合、400字以内の日本語要旨を記載しその旨明記)。

• 3頁目より、「はじめに」、「材料と方法」、「結果」、「考察」、「引用文献」の順に記載する。

- ① 専門用語以外は常用漢字、新かなづかいに従い記述する。
- ② 本文中の英単語は固有名詞を除き全て小文字で統一する。
- ③ 地名、人名、学名は原語のまま用い、薬品名は一般名を用い商品名は括弧内に記す。
- ④ 単位、数量は国際単位 (cm, ml, g, Kg, pg, μ l, %, °C など) を、数字はアラビア文字を用いる。

4. 本文—2: 英語での投稿

• 2頁目に400字以内の要旨、キーワード(5語以内)を記載する。

• 3頁目より、「Introduction」、「Materials and Methods」、「Results」、「Discussion」、「References」の順に記載する。

- ① 地名、人名、学名は原語のまま用い、薬品名は一般名を用い商品名は括弧内に記す。
- ② 単位、数量は国際単位 (cm, ml, g, Kg, pg, μ l, %, °C など) を、数字はアラビア文字を用いる。

5. 引用文献

引用文献は本文中の引用箇所の右肩に片カッコ付きで番号を付し、引用順に一括し記載する。著者名、編集者名は筆頭者から3名まで列記し、他または *et al.* とする。

1. Shi Y, Yoshihara F, Nakahama H, *et al.*: A novel immunosuppressant FTY720 ameliorates proteinuria and alterations of intrarenal adrenomedullin in rats with autoimmune glomerulonephritis. *Regulatory Peptides* (127): 233–238, 2005.
2. Tongio M, Abbal M, Bignon JD, *et al.*: ASH#18: HLA-DPB1. *Genetic diversity of HLA Functional and Medical Implication* (ed. Charron D), Medical and Scientific International Publisher, p. 134–

136, 1997.

3. 難波行臣, 今尾哲也, 石黒 伸 他: 既存抗体陽性生体腎移植後に生じた抗体関連型拒絶反応に対して血漿交換および免疫グロブリン大量療法 (IVIG) が奏効した1例. *腎移植・血管外科* 17: 36–40, 2005
4. 佐田正晴, 高原史郎: 腎移植—組織適合と拒絶反応. 新図説泌尿器科学講座6「腎疾患, 神経泌尿器科, 老年泌尿器科」(吉田 修 監), Medical View社, p. 120–125, 2000.

III. 短報(研究速報, 技術速報などを含む), 症例報告執筆書式

1. 執筆要項

400字詰め原稿用紙15枚(刷り上がり6頁程度)以内とする。図, 表, 写真は1個につき原稿用紙1枚分に該当しタイトルを必ず記載し挿入箇所を本文に明記する。本文は Microsoft Word で作成し, 図, 表, 写真は Microsoft PowerPoint を使用する。原稿は全てCD-ROMに保存し, CD-ROMにA4サイズでプリントアウトした原稿1部を添えて編集長宛に送付する。

2. 第1頁目

表紙とし「短報」「症例報告」を明記し, 日本語と英語でタイトル, 著者全員の氏名と所属を記し, 脚注として連絡責任者の住所, 氏名, 電話, FAX, E-mailアドレスを記載する。タイトル, 著者名, 所属は「原著」の形式に従う。

3. 本文(日本語および英語での投稿)

- 短報, 症例報告には要旨は不要。
- 2頁目以降は, 原著執筆書式3.の3頁目以降に準じる。

IV. 総説, シリーズその他

編集委員会からの依頼を原則とするが, 会員からの投稿も大いに歓迎する。日本語を原則とする。総原稿枚数は編集委員会で指定し, 原則的に原著執筆書式に準じる。

V. 原稿送付先

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2
 大阪大学大学院医学系研究科 J8
 先端移植基盤医療学
 日本組織適合性学会誌 MHC
 編集長 高原 史郎
 担当 谷本 佳澄 〈E-mail: tanimoto@att.med.osaka-u.ac.jp〉
 Tel: 06-6879-3746 Fax: 06-6879-3749

	総原稿枚数 (図表, 文献含む)	図表数	文献数	要旨	原稿タイトル 所属, 著者	キーワード数	査読	著者校正
原著	30 枚以内	5~10 個以内	20 個以内	英文 400 字以内	和英併記	5 個	有り	1 回
短報, 症例報告	15 枚以内	5 個以内	10 個以内	なし	和英併記	なし	有り	1 回
総説, その他	その都度指定	適宜	20~30 個前後	和文 400 字以内	和英併記	5 個	なし	なし

編集後記

本年2月、本学会事務局でもある私の所属教室が移転しました。川向にある新しい教室は、完成ホヤホヤの26階建て高層ビルの22階。夜には秋葉原や東京ドームの夜景が美しい、近代的な環境ですが、神戸出身だけに地震の時にはどうしようか?などと考えたりしています。高層ビルといえば、子供の頃父に連れられ、当時超高層ビルとして神戸に出現した、26階建ての貿易センタービルへ見学に行ったことを思い出します。その後この地域は阪神淡路大震災で大きな被害に遭いましたが、設計、基礎施工がしっかりしていた貿易センタービルはほとんど被害を受けず、現在も健在でうれしい限りです。ホンモノのすばらしさ、建築に携わった方々の心意気を感じます。

世界の動向はめまぐるしく変化し、残念ながら世の中にはスピード社会、便利社会で生き抜くための手抜きがあふれています。建物や食品の偽装など、溢れるほどのニセモノの中で私たちが安全に生きてゆくには、ホンモノを見抜く力を養わなくてはなりません。そして同時に、自分がホンモノであるように研鑽しなくてはなりません。楽なことではないですが。

医学の分野にはiPS(人工多能性幹)細胞が登場し、今後の移植、再生医療も大きく変わることが予想されます。組織適合性研究やHLA検査は決して派手な仕事ではありませんが、移植、再生医療が進化してもその重要性は変わりません。患者さんや社会にホンモノを提供するためには、地道な積み重ねが大切。と自戒しつつ、今日も新しい仕事場でQCワークショップや認定制度のお仕事に励みます。

成瀬 妙子

「MHC」バックナンバー

一冊¥2,000にて購入できます。学会事務局までお問い合わせ下さい。なお在庫僅少の号もありますので、万一品切れの際にはご容赦ください。

入・退会、所属・住所・連絡メールアドレス変更

各種の申請は、学会事務局で受け付けます。

日本組織適合性学会事務局

〒113-8510

東京都文京区湯島 1-5-45

医歯学総合研究棟 (II) 22F

東京医科歯科大学 難治疾患研究所

分子病態分野 内

電話 03(5803)4906

FAX 03(5803)4907

電子メール jshijimu.tis@mri.tmd.ac.jp

日本組織適合性学会ホームページ

学会活動に関する情報やHLA遺伝子の塩基配列情報が利用できます。

<http://square.umin.ac.jp/JSHI/mhc.html>

<http://jshi.umin.ac.jp/mhc.html>

MHC

Major Histocompatibility Complex

Official Journal of Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics

2008年4月20日発行 15巻1号, 2008

定価 2,000円

発行 日本組織適合性学会(会長 木村 彰方)

編集 日本組織適合性学会編集委員会(編集担当理事 高原 史郎)

平成8年7月24日 学術刊行物認可

日本組織適合性学会(事務局担当理事 木村 彰方)

〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45 医歯学総合研究棟 (II) 22F

東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野内

印刷・研究社印刷株式会社

〒352-0011 埼玉県新座市野火止 7-14-8