

第 13 回日本組織適合性学会近畿地方会 抄録集

会 期 : 2015 年 2 月 7 日 (土)

会 場 : 大阪府赤十字血液センター 7 階会議室

大阪市城東区森之宮 2 丁目 4 番 43 号

TEL: 06-6962-7001

世話人 : 金光 靖

近畿大学医学部附属病院 輸血・細胞治療センター

〒 589-8511 大阪府大阪狭山市大野東 377-2

TEL: 072-366-0221

E-mail: yuketsu@med.kindai.ac.jp

共 催 : 財団法人 大阪腎臓バンク

【参加費】

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

【会議等】

1. 総 会：2月7日（土）12:50～13:00
2. 世話人会：2月7日（土）11:30～12:50
3. 意見交換会：2月7日（土）17:00～

【会場地図】

大阪府赤十字血液センター 7階会議室
大阪市城東区森之宮2丁目4番43号 TEL 06-6962-7001



♥ 施設の詳しい地図



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

プログラム

9 時 30 分

受付開始

【午前の部】

10 時～10 時 30 分

モーニングセミナー

座長：椿 和央（近畿大学医学部奈良病院 血液内科）

「幹細胞治療の現状と展望：iPS 細胞の臨床応用を中心に」

木村貴文（京都大学 iPS 細胞研究所 基盤技術研究部門）

10 時 30 分～11 時 30 分

一般演題 (1)

10 時 30 分～11 時

座長：荒木延夫（兵庫県赤十字血液センター）

1) WAKFlow[®] HLA 抗体 クラス I&II (ICFA) の改良報告

○白水隆喜¹⁾, 直原 寛¹⁾, 河野幸太¹⁾, 川井信太郎¹⁾, 中島文明²⁾

湧永製薬株式会社 試薬・診断薬事業部¹⁾, 日本赤十字社 血液事業本部 中央研究所²⁾

2) HLA-C 抗体と血小板輸血効果について

○山本ゆかり, 高 陽淑, 西海真弓, 原 祐子, 西宮紘子, 下北希美, 石井博之, 松倉晴道, 谷 慶彦, 河 敬世

日本赤十字社 近畿ブロック血液センター

3) HPA-7new および HPA-21bw の遺伝子頻度について

○中村仁美¹⁾, 岸 友子²⁾, 中野 学³⁾, 黒田ゆかり¹⁾, 山口恵津子¹⁾, 田原大志¹⁾, 井上純子¹⁾, 宮本 彰¹⁾, 迫田岩根¹⁾, 入田和男^{1a)}, 清川博之¹⁾

日本赤十字社九州ブロック血液センター¹⁾, 日本赤十字社東北ブロック血液センター²⁾, 日本赤十字社北海道ブロック血液センター³⁾, 佐賀県赤十字血液センター⁴⁾

一般演題 (2)

11 時～11 時 30 分

座長：石井博之（日本赤十字社 近畿ブロック血液センター）

4) 次世代シーケンシング (NGS) で検出された新規アレルについて

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

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

5) MiSeq による HLA タイピング (その 2)

○末上伸二¹⁾, 小島裕人¹⁾, Wyatt Nelson^{2b)}, 石谷昭子^{3a)}, 林 晃司¹⁾, 二神貴臣¹⁾, 辻野貴史¹⁾, 楠木靖史¹⁾, 藤井直樹¹⁾, 池田奈未¹⁾, 宮崎有紀¹⁾, Daniel E. Geraghty^{2b)}, 西川美年子¹⁾, 小川公明⁵⁾, 赤座達也¹⁾, 田中秀則¹⁾, 佐治博夫¹⁾

公益財団法人 HLA 研究所¹⁾, Fred Hutchinson Cancer Research Center²⁾, Cisco Genetics, Inc.³⁾, 奈良県立医科大学法医学教室⁴⁾, NPO 法人 白血病研究基金を育てる会⁵⁾

6) iPS 細胞ストック構築に必要な HLA ホモ接合体について

○楠木靖史¹⁾, 赤座達也¹⁾, 二神貴臣¹⁾, 小島裕人¹⁾, 辻野貴史¹⁾, 林 晃司¹⁾, 藤井直樹¹⁾, 末上伸二¹⁾, 池田奈未¹⁾, 宮崎有紀¹⁾, 西川美年子¹⁾, 小川公明²⁾, 木村貴文³⁾, 田中秀則¹⁾, 佐治博夫¹⁾

公益財団法人 HLA 研究所¹⁾, 特定非営利活動法人 白血病研究基金を育てる会²⁾, 京都大学 iPS 細胞研究所基盤技術研究部門³⁾

11 時 30 分～12 時 50 分

昼食・世話人会

12 時 50 分～13 時 00 分

総会

【午後の部】

13 時 00 分～13 時 30 分

テクニカルセミナー

座長：小島裕人（公益財団法人 HLA 研究所）

次世代シーケンシング（NGS）による HLA タイピング：SS-SBT 法の開発状況と今後の展望

尾崎有紀，鈴木進悟，重成敦子，伊藤さやか，榊屋安里，光永滋樹，猪子英俊，椎名 隆

（東海大学医学部基礎医学系分子生命科学）

13 時 30 分～15 時 30 分

シンポジウム

「HLA 抗体と移植」

座長：谷 慶彦（日本赤十字社近畿ブロック血液センター）

芦田隆司（近畿大学医学部 血液膠原病内科）

1) DSA 陽性症例の腎移植について

西村憲二（兵庫県立西宮病院腎疾患総合医療センター）

2) HLA 抗体と肝臓移植

○井手健太郎，大段秀樹

（広島大学大学院医歯薬保健学研究院 応用生命科学部門 消化器・移植外科学）

3) HLA 抗体と造血幹細胞移植

○佐藤 壯¹⁾, 佐藤蘭子¹⁾, 小林直樹²⁾, 小林良二³⁾

（社会医療法人北楡会 札幌北楡病院 臨床検査科¹⁾, 同 血液内科²⁾）

（同 小児思春期科³⁾）

15 時 40 分～16 時 40 分

特別講演

座長：木村貴文（京都大学 iPS 細胞研究所 基盤技術研究部門）

WT1 ペプチドを用いたがんワクチン療法

岡 芳弘（大阪大学大学院医学系研究科）（癌免疫学（大塚製薬）共同研究講座 特任教授）

17 時～ **懇親会**

(10:00 ~ 10:30)

モーニングセミナー

座長：椿 和央（近畿大学医学部奈良病院 血液内科）

幹細胞治療の現状と展望：iPS 細胞の臨床応用を中心に

木村貴文（京都大学 iPS 細胞研究所 基盤技術研究部門）

幹細胞治療の現状と展望：iPS 細胞の臨床応用を中心に

木村貴文

京都大学 iPS 細胞研究所 基盤技術研究部門

人工多能性幹細胞（以下、iPS 細胞）創出に関する山中らの報告（Cell, 2006）から 9 年目を迎えている。基礎生命科学にとどまらず、医療とくに細胞移植を基軸とする再生・細胞治療領域でのパラダイムの転換に内外から至高の期待が寄せられてきた。

iPS 細胞に触発されるように、体性幹細胞や免疫担当細胞を用いたがん免疫療法の特異性と有効性はここ数年間で格段に改善しつつある。とくに構造解析やバイオイメージングなどの技術革新がもたらした分子間相互作用の再評価などによって、特異的抗原をターゲットとする免疫治療が可能ながん種と HLA ハプロタイプは急速に拡張しており、今後 HLA ハプロタイプの人工的改変などが可能になれば、高頻度 HLA ハプロタイプを持つがん特異的 T 細胞株や樹状細胞株のバンク化も有用ながん治療戦略となる可能性がある。すでに HLA 分子の発現を抑制した universal (HLA Class-I-null, β 2MG-null) 血小板の大量調製が可能となっている（参考文献 1）。

多能性幹細胞を用いた再生・細胞治療の分野においても、胚性幹細胞（以下、ES 細胞）を用いた網膜変性疾患に対する米英での臨床試験成績がすでに報告された（参考文献 2）。

加齢および先天性黄斑変性症に対する ES 細胞由来人工網膜シートの同種移植治療は、HLA 不一致移植でも

急性拒絶反応なく、安全かつ有効な治療になりうることが示されている。いっぽう、iPS 細胞を用いた再生・細胞治療として、加齢黄斑変性症の患者に対する自家 iPS 細胞由来網膜シート移植が、理化学研究所の高橋らによって 2014 年に世界で初めて実施された。移植後に憂慮すべき有害事象は報告されておらず、第 2 例目の移植に期待が寄せられている。その他にもパーキンソン病、心疾患、軟骨変性疾患、脊髄損傷、血小板輸血、がん特異的 T 細胞治療などは近い将来に実施が予想されるシーズとして iPS 細胞を用いた基礎研究が進行中であり、多様化する細胞治療の早期実現と活性化を推進するため世界に先駆けて整備されたさまざまな医療規制を身方につけ、わが国の再生・細胞治療は発展をしていくものと考えられる。

参考文献

- 1) Scalable generation of universal platelets from human induced pluripotent stem cells. Feng Q, et al. *Stem Cell Reports* 3: 817–831, 2014.
- 2) Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. Schwartz SD, et al. *Lancet*. published online October 15, 2014. doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61376-3.

(10:30 ~ 11:00)

一般演題 (1)

座長：荒木延夫（兵庫県赤十字血液センター）

演題番号 1) ~ 3)

1) WAKFlow[®] HLA 抗体 クラス I&II (ICFA) の改良報告

○白水隆喜¹⁾, 直原 寛¹⁾, 河野幸太¹⁾, 川井信太郎¹⁾, 中島文明²⁾

湧永製薬株式会社 試薬・診断薬事業部¹⁾, 日本赤十字社 血液事業本部 中央研究所²⁾

【背景】HLA 交差適合性試験試薬である WAKFlow HLA 抗体 クラス I & II (ICFA) [以下, ICFA (I&II)] は, HLA 抗体を特異的に検出する試薬である。今回, ICFA (I&II) について, クラス II 抗体の検出感度向上及び移植後 HLA 抗体検出のモニタリングへの適応検討を行ったので, その結果について報告する。

〈クラス II 抗体感度向上検討〉

使用する血液量を増やすことで, HLA クラス II 抗体の検出感度向上が可能であるか検討した。

〈移植後のモニタリング適応検討〉

移植後に *de novo* DSA が産生されているかどうかをモニタリングすることは, 抗体関連拒絶反応を予測するために重要である。ドナー血液の保存方法の検討を行い, 移植後 HLA 抗体検出のモニタリング検査が可能であるか検討した。

【結果】〈クラス II 抗体感度向上検討〉

クラス II 感度向上のため, 使用するドナー血液量の検討を行った。その結果, 現在の使用血液量 (全血) である 100 uL から 500 uL に血液量を増加させることで感度が向上することが明らかとなった。

使用する細胞上の HLA に対する抗体陽性の検体 [WAKFlow HLA 抗体クラス II (MR) で MFI : 2000 以上の 21 検体] について, 100 uL 及び, 500 uL 使用時の

検出感度を比較したところ, 100 uL 使用時では抗体陽性率 57.1% (12 検体 / 21 検体) であったのに対し, 500 uL 使用時では 95.2% (20 検体 / 21 検体) に検出率が上昇した。また, 血液量を増加させたことによる, クラス I の検出感度への影響や陰性反応の非特異的な上昇は確認されなかった。これらの結果から, 使用血液量を 500 uL に増加する方法は, 感度向上のために有効な手段であると考えられる。

〈移植後のモニタリング適応検討〉

まず, ドナー血液から通常のアッセイ方法により得られた白血球を凍結保存し, アッセイが可能であるか検討した。しかし, バックグラウンドビーズへの非特異的な蛍光シグナルの上昇が確認されたため, 抗体検査を行うことは不可能であった。

そこで次に, 血球分離試薬を用いて, ドナー血液から単核球 (リンパ球・単球) の画分を分離し, この画分を凍結保存後にアッセイを行った。その結果, 保存 6 ヶ月後の細胞を使用しても, バックグラウンドビーズに蛍光シグナルの非特異的な上昇は見られず, 保存前の通常アッセイ時と同等の検出感度で抗体検出が可能であることが明らかとなった。

今後, より長期間 (1 年以上) 保存した細胞でもモニタリングが可能であるか, 検討を続ける予定である。

2) HLA-C 抗体と血小板輸血効果について

○山本ゆかり, 高 陽淑, 西海真弓, 原 祐子, 西宮紘子,
下北希美, 石井博之, 松倉晴道, 谷 慶彦, 河 敬世

日本赤十字社 近畿ブロック血液センター

【はじめに】濃厚血小板 HLA-LR「日赤」は患者とドナーの HLA 型を適合させた血小板製剤であるが、供給する際、HLA-A, B 抗原の適合度を考慮してドナーを選択するため HLA-C 抗原不適合の製剤を供給する場合がある。HLA-C 抗体については、HLA-C 抗原の発現が弱いため考慮不要¹⁾とされているが、輸血不応例の症例報告²⁾もあり、不透明な部分が多い。今回、最近の症例を対象に HLA-C 抗体と血小板輸血効果の関連性について調査を行ったので報告する。

【対象と判定基準】平成 24 年 10 月 1 日～平成 26 年 10 月 31 日に実施した PC-HLA 交差適合試験 10,393 件中、199 件（患者 52 名）が陽性であった。そのうち LAB-Screen single antigen を用いた HLA 抗体検査により陽性の原因が HLA-C 抗体と判断できたのが 102 件（20 名）であった。これらの製剤は、HLA-C 抗体が原因で交差適合試験陽性であることを主治医が了承した場合のみ、患者指定の血小板製剤として供給しており、このうち、CCI（補正血小板増加数）を計算するための情報が得られた 8 件（6 名）について解析を行った。

輸血効果の判定基準として、CCI が 1 時間値で 7,500/ μ L 以上、または 24 時間値が 4,500/ μ L 以上を輸血効果ありとした。

【結果】対象となった 8 件（6 名）のうち 5 件（4 名）は輸血効果が認められたが、3 件（3 名）は効果が認められなかった（1 名は重複）。

この 8 件の PC-HLA 交差適合試験について、ドナーの HLA-C 抗原に反応すると考えられる抗体特異性を比較したところ、輸血効果のあった症例では、HLA-Cw1, Cw4, Cw8, Cw9、輸血効果のなかった症例の特異性は、HLA-Cw1, Cw9 であった。さらに、輸血効果があった症例の中には抗体検査時の LABScreen single antigen での BNV（補正蛍光値）が 20,000 近くと高値を示したのもあった。

【考察】今回対象とした症例の中では、患者が保有する HLA-C 抗体の特異性と輸血効果には関連性を認めなかったことや、抗体検査時に強陽性となった抗体を保有していても輸血効果が得られた例を認めたことから、HLA-C 抗体は輸血効果に影響しないことが示唆された。さらに、輸血効果のなかった 3 件は血小板減少を引き起こす非免疫性の要因もあることから、HLA-C 抗体が輸血不応の原因と断定することはできなかった。

今回の検討において、HLA-C 抗体と輸血効果の直接的な因果関係は認められなかった。しかし、症例数が少ないことや、データ不足のため CCI の 1 時間値での比較ができなかったことが影響していることも否定できないため、引き続きデータ収集を行う予定である。

【参考文献】

- 1) Transplantation Proceedings, 4: 1977
- 2) 日本輸血細胞治療学会 Vol. 53 No. 2 日本血液事業学会 第 32 巻 Vol. 2

3) HPA-7new および HPA-21bw の遺伝子頻度について

○中村仁美¹⁾, 岸 友子²⁾, 中野 学³⁾, 黒田ゆかり¹⁾, 山口恵津子¹⁾, 田原大志¹⁾,
井上純子¹⁾, 宮本 彰¹⁾, 迫田岩根¹⁾, 入田和男^{1,4)}, 清川博之¹⁾

日本赤十字社九州ブロック血液センター¹⁾, 日本赤十字社東北ブロック血液センター²⁾,
日本赤十字社北海道ブロック血液センター³⁾, 佐賀県赤十字血液センター⁴⁾

【はじめに】血小板特異抗原（以下，HPA）に対する同種抗体は，血小板輸血不応や新生児血小板減少性紫斑病（NAIT）の一因となる。HPA は，人種により遺伝子頻度に差が認められ，現在までに 28 抗原系が報告されている。低頻度 HPA のすべてが，NAIT 症例における同種抗体の存在で発見され，HPA-7new および HPA-21bw は大阪で検出報告された。日本では，HPA-1 から HPA-6 の遺伝子頻度は明らかになっているが，HPA-7 以降の HPA について全国的な遺伝子頻度は明らかになっていない。今回 HPA-7new および HPA-21bw の遺伝子頻度を明らかにし，さらに遺伝子頻度に地域差が認められるかを検討した。

【対象・方法】対象は，日本赤十字社九州ブロック血液センター（以下，九州），北海道ブロック血液センター（以下，北海道）および東北ブロック血液センター（以下，東北）における PC-HLA 登録献血者とし，検査済の HPA DNA タイピングデータをもとに集計した。対象数は，HPA-7 が 17,287 名（九州 10,540 名，北海道 1,951 名，東北 4,795 名），HPA-21 が 4,473 名（九州 1,494 名，北

海道 177 名，東北 2,802 名）である。HPA-7 および HPA-21 遺伝子型の決定は，PCR-SSO 法で用い，HPA-7new および HPA-21bw の遺伝子頻度を求めた。

【結果】HPA-7new の遺伝子頻度は，全体で 0.03% であり，地域別の遺伝子頻度は，九州 0.04%，北海道 0.08%，東北 0% であった。また，HPA-21bw の遺伝子頻度は 0.48% であり，地域別では，九州 0.57%，北海道 0.28%，東北 0.45% であった。

【まとめ】HPA-7new および HPA-21bw の遺伝子頻度は，大阪での高らによる報告では 0.077%（7/4536 名），0.53%（10/944 名）とされている。今回集計した結果と併せて，HPA-7new は東北では検出されておらず，大阪及び北海道で遺伝子頻度が高いことから地域差があるのではないかと推測される。HPA-21bw は，対象数が少ない北海道の集計を除いた九州，東北および大阪を比較すると頻度に差は認められなかった。今回の結果から，HPA-21bw は日本全国での存在が推定され，その頻度からも NAIT 発症要因となる可能性が高く，検査時には稀な抗体を検出可能な交差試験が重要であると思われる。

(11:00 ~ 11:30)

一般演題 (2)

座長：石井博之（日本赤十字社 近畿ブロック血液センター）

演題番号 4) ~ 6)

4) 次世代シーケンシング (NGS) で検出された新規アレルについて

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

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

【目的】Luminex 法では検出できなかったが NGS による HLA 遺伝子型検査により見つかった 3 例の新規アレルを紹介する。

【材料・方法】造血幹細胞移植を考慮し Luminex 法 (WAKFlow HLA Typing kit) により HLA 遺伝子型検査をした 12 家族 54 人を, Scisco Genetics 社のタイピング試薬で Class I の exon 2, 3, 4, Class II の exon 2, 3 を増幅し illumina 社の Miseq で塩基配列を決定した。

【結果】3 家族に見つかった新規アレルの塩基配列の変異箇所, アミノ酸置換, およびハプロタイプを以下に示す。

1) C*04:01V

C*04:01 の 132 番目のコドン TCC が TCT に変異。同義置換でありアミノ酸置換はない。

A*11:01:01 - C*04:01V - B*15:01:01G - DRB4*01:01:01G - DRB1*04:06:01 - DQA1*03:01:01 - DQB1*03:02:01 - DPA1*02:02:02 - DPB1*03:01:01G

2) C*12:02:02V

C*12:02:02 の 136 番目のコドン GCG が GTG に変異し, アラニン (非極性) がバリン (非極性) に置換。136 番目は Class I $\alpha 2$ ドメインの α ヘリックスと β シートのルー

プアウト部分にあたる。

A*24:02:01G - C*12:02:02V - B*52:01:01G - DRB5*01:02 - DRB1*15:02:01 - DQA1*01:03:01G - DQB1*06:01:01 - DPA1*02:01:01 - DPB1*09:01:01

3) DPB1*02:01:02V

DPB1*02:01:02 の 99 番目のコドン GTT が GAT に変異し, バリン (非極性) がアスパラギン酸 (酸性) に置換。99 番目は Class II の $\beta 2$ ドメインにあたる。

A*24:02:01G - C*15:02:01G - B*40:02:01 - DRB3*02:02:01G - DRB1*14:06:01 - DQA1*05:01:01G - DQB1*03:01:01G - DPA1*02:02:02 - DPB1*02:01:02V

(G 表記は IMGT ホームページ参照。)

【考察】C*12:02:02V と DPB1*02:01:02V のアミノ酸置換は, TCR 結合部位でも CD4 や CD8 接触部位でもないことから, これらが T 細胞応答に与える影響は低いと考えられる。特に, C*12:02:02V は exon3 のルーブアウト部分の変異であり, 他の HLA-C アレルでは多型性が乏しい箇所であることから, プローブが設計されていなかったため Luminex 法 (WAKFlow HLA Typing kit) で検出されなかったと考えられる。

5) MiSeq による HLA タイピング (その 2)

○末上伸二¹⁾, 小島裕人¹⁾, Wyatt Nelson²⁾³⁾, 石谷昭子³⁾⁴⁾, 林 晃司¹⁾, 二神貴臣¹⁾, 辻野貴史¹⁾, 楠木靖史¹⁾, 藤井直樹¹⁾, 池田奈未¹⁾, 宮崎有紀¹⁾, Daniel E. Geraghty²⁾³⁾, 西川美年子¹⁾, 小川公明⁵⁾, 赤座達也¹⁾, 田中秀則¹⁾, 佐治博夫¹⁾

公益財団法人 HLA 研究所¹⁾, Fred Hutchinson Cancer Research Center²⁾, Scisco Genetics, Inc.³⁾, 奈良県立医科大学 法医学教室⁴⁾, NPO 法人 白血病研究基金を育てる会⁵⁾

〔目的〕 NGS (Next Generation Sequencing) による HLA 全領域の塩基配列の決定は, 従来の Luminex 法に代わる新たなタイピング法として注目されている。しかし, exon 領域を標的とした方法に比べ多くの工程を必要とするため, ルーチン検査で行うことは難しいとされている。

我々は前回の当地方会でルーチン検査を目的として Class I の exon2, 3, 4, Class II の exon2, 3 を標的としたタイピングでは, Ambiguity を完全に解消できないことを報告した。

今回は, Ambiguity を解消するために Class I (A, B, C) の exon1-7, Class II (DRB1, DRB3, 4, 5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1) の exon1-4 を標的としたタイピングを試みたので報告する。

〔材料・方法〕 当研究所に依頼があり, Luminex 法で HLA-A, B, C, DRB1 遺伝子型 (WAKFlow, 湧永製薬) タ

イピング検査済みの 47 検体 (濾紙血痕 4 検体, Buccal 20 検体, 末梢血 23 検体) について Scisco Genetics 社の試薬キットを用いて PCR で増幅し, MiSeq を用い HLA 領域の塩基配列の決定を行った。

〔結果〕 47 検体 (Class I 3 座, Class II 6 座) で 4 座の genotype が決定できなかったものの 423 座の genotype 中, 419 座の genotype が決定され Luminex 法と一致した。

〔考察〕 今回の検討で標的となる遺伝子領域を拡大することで, これまで第 2 区域で決められなかった HLA-A 座 1 種, HLA-B 座 2 種, HLA-C 座 4 種, HLA-DRB1 座 2 種, HLA-DQA1 座 6 種, HLA-DPB1 座 3 種の Ambiguity が解消でき, より正確な HLA タイピングが可能となった。

今回の結果, 99% 以上 (419 座 / 423 座) で対象とした HLA 遺伝子座が決定でき, ルーチン検査で使用していく検査キットとして有用であることが分かった。

6) iPS 細胞ストック構築に必要な HLA ホモ接合体について

○楠木靖史¹⁾, 赤座達也¹⁾, 二神貴臣¹⁾, 小島裕人¹⁾, 辻野貴史¹⁾, 林 晃司¹⁾, 藤井直樹¹⁾, 末上伸二¹⁾, 池田奈未¹⁾, 宮崎有紀¹⁾, 西川美年子¹⁾, 小川公明²⁾, 木村貴文³⁾, 田中秀則¹⁾, 佐治博夫¹⁾

公益財団法人 HLA 研究所¹⁾, 特定非営利活動法人 白血病研究基金を育てる会²⁾,
京都大学 iPS 細胞研究所基盤技術研究部門³⁾

【はじめに】iPS 細胞は人工的な多能性幹細胞として今後の再生医療において非常に有効であると考えられる。しかし、患者本人から iPS 細胞を作製し、治療に用いる場合は膨大な時間やコストがかかることから、HLA ホモ接合体の iPS 細胞をバンクキングすることで、免疫的反応、作成時間、コストなどの問題を解消することが可能となる。

今回、我々は当研究所で行った HLA タイピング結果に基づき算出したハプロタイプデータにより iPS 細胞ストック構築に必要な HLA ホモ接合体の種類、適合率、および必要とするドナー母集団について算出した。

【材料・方法】2005 年から 2013 年までにタイピングを行った日本人 8,138 家系、31,410 人の HLA タイプから算出された HLA-A, B, DR, 3 座、2,796 ハプロタイプの頻度、および、日本人 4,992 家系、19,183 人の HLA タイプから算出された HLA-A, B, C, DR, 4 座、3,361 ハプロタイプの頻度を用いてそれぞれの適合率などを算出した。

【結果】HLA-A, B, DR, 3 座では HLA ホモ接合体 68 種類で日本人の 70% をカバーし、ドナー母集団として約 21 万人が必要であった。また、124 種類で日本人 80% をカバーし、ドナー母集団として約 46 万人が必要であった。

HLA-A, B, C, DR, 4 座では 79 種類で日本人の 70% をカバーし、ドナー母集団として約 30 万人が必要であった。また、154 種類で日本人の 80% をカバーし、ドナー母集団として約 95 万人が必要と推計できた。

【考察】今回の算出結果では、2013 年の中島の報告[※]と同程度の推定となった。

現在、東アジア地域における各国のハプロタイプ頻度から各国が iPS 細胞ストックを構築した際の相互の適合率検証を進めている。

※：参考文献

「iPS 細胞バンクと HLA」, 中島文明：血液フロンティア, Vol.23, No.8, 2013

(11:30 ~ 12:50)

昼食・世話人会

(12:50 ~ 13:00)

総会

(13:00 ~ 13:30)

テクニカルセミナー

座長：小島裕人（公益財団法人 HLA 研究所）

次世代シーケンシング（NGS）による HLA タイピング：SS-SBT 法の開発状況と今後の展望

尾崎有紀，鈴木進悟，重成敦子，伊藤さやか，榎屋安里，光永滋樹，猪子英俊，椎名 隆

東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

次世代シーケンシング (NGS) による HLA タイピング： SS-SBT 法の開発状況と今後の展望

尾崎有紀, 鈴木進悟, 重成敦子, 伊藤さやか, 榊屋安里, 光永滋樹, 猪子英俊, 椎名 隆

東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

現在の高精度 HLA タイピング法として、主に PCR-SSOP 法 (主に Luminex 法) や PCR-SBT 法が使用されている。しかし、これらの方法を用いた場合、2 つの多型部位が同一の染色体上 (*cis*) か異なる染色体上 (*trans*) に位置するのかが情報が得られない、いわゆる phase ambiguity が生じること、PCR-Luminex 法では年々増加している新規 HLA アリルに対応するためのオリゴヌクレオチドプローブが不足していることから、多くの場合はいくつかのアリル候補が存在し、単一のアリルに絞り込むことができない。これらに代わる方法として、近年、次世代シーケンシング (NGS) による HLA 遺伝子の DNA タイピング法が注目を浴びている。NGS では 1 分子の DNA より塩基配列決定が可能のため、*cis-trans* 情報が得られ、その結果 phase ambiguity 無しにアリルを正確に判定できる。そこで我々は、従来の高精度 HLA タイピング法の後継法として、超高解像度 DNA タイピング (Super high resolution Single molecule-Sequence Based Typing; SS-SBT) 法を開発した。

SS-SBT 法は (1) PCR, (2) NGS, (3) アリル判定の 3 つの過程で成り立っている。我々はまず HLA 遺伝子 11 座 (*A, B, C, DRB1/3/4/5, DQA1, DQB1, DPA1* および *DPB1*) について、遺伝子全領域をそれぞれ特異的に増幅させる PCR プライマーの設計 (4.6 ~ 11.2 kb) および PCR 条件の設定を行った。また、特定の HLA 遺伝子座では一方のアリル由来のリード数が他方よりも少ない現象 (allelic imbalance) が観察されたため、この allelic

imbalance をプライマー配列や PCR 条件の変更により解消する工夫も施した。

これまでに解析した日本人を含む計 157 検体では、いずれも目的とする PCR 産物が得られている。また、普及しているベンチトップ型次世代シーケンサー 3 機種間における SS-SBT 法の評価を行った結果、いずれも既知アリル情報と矛盾なく良好なタイピング結果が得られている。さらに、我々独自に開発した超高精度次世代シーケンス用アリル判定プログラム (SeaBass) や市販のアリル判定ソフト Omixon Target, GeneDX などを使用してタイピング結果の精度を比較した結果、市販のアリル判定ソフト Omixon Target では 74.1 ~ 96.3%, GeneDX では 53.7 ~ 94.4% の正解率であったのに対して、SeaBass では 99.8% 以上の高い正解率が得られた。よって、我々が開発した PCR システムは HLA 遺伝子の DNA 増幅に最適なこと、次世代シーケンサーの機種を問わずアリル判定がなされたこと、SeaBass は極めて精度の高いアリル判定を実現することが確認された。

今後の課題として、NGS がルーチンタイピングに普及するためには、操作全体の簡易化・迅速化・コストダウン化が不可欠であり、我々も従来法からの replacement model として、第 3 区域までのルーチンタイピングのための Multiplex PCR 法の開発に取り組んでいる。本講演では、海外の最新情報を含めて NGS による HLA タイピングの利点、開発現状および今後の展望について概説したい。

(13:30 ~ 15:30)

シンポジウム

「HLA 抗体と移植」

座長：谷 慶彦（日本赤十字社近畿ブロック血液センター）

芦田隆司（近畿大学医学部 血液膠原病内科）

- 1) DSA 陽性症例の腎移植について
西村憲二（兵庫県立西宮病院腎疾患総合医療センター）
- 2) HLA 抗体と肝臓移植
井手健太郎（広島大学大学院医歯薬保健学研究院 応用生命科学部門 消化器・移植外科学）
- 3) HLA 抗体と造血幹細胞移植
佐藤 壯（社会医療法人北楡会 札幌北楡病院 臨床検査科）

1) DSA 陽性症例の腎移植について

○西村憲二

兵庫県立西宮病院腎疾患総合医療センター

【はじめに】妊娠、輸血、臓器移植などに感作されたことにより産生される HLA 抗体 (Donor specific antibody; DSA) を保有している患者に対する腎移植は陰性症例と比較してその移植腎生着率は低いとされている。しかしながら、昨今の献腎移植数の低下によるドナー不足からこのようなハイリスク腎移植が増加しているのが現状である。また移植後に出現する de novo DSA も急性抗体関連型拒絶反応 (Antibody-mediated rejection; AMR) を発症するリスクが高く、予後不良とされている。今回はこの様な DSA 陽性症例の腎移植について自験例を踏まえて検討する。

【術前 DSA 陽性症例】 DSA 陽性症例は早期に AMR を起こし graft loss に陥る可能性があるので十分な脱感作療法を行う必要がある。脱感作療法のコンセプトは、1. T 細胞系の反応の抑制、2. 既存抗体の除去、3. 残存する抗体の抑制と補体活性化の抑制、4. 抗体産生細胞あるいはその前駆細胞の除去、であり、その方法には、免疫抑制剤の早期使用、血漿交換、抗 CD20 抗体 (リツキシマブ)、免疫グロブリン大量静注療法 (IVIG 療法) などがある。また AMR 発症時の治療としては血漿交換、IVIG 療法、リツキシマブ、ステロイドパルスなどがあり、患者の状況をみながら治療を行う。

【当院における術前 DSA 陽性腎移植の検討】 対象は 2008 年 5 月以降の生体腎移植症例のうち術前の DSA が陽性であった 9 症例。性別は男性 2 例、女性 7 例。平均年齢は 55.9 歳 (25-68 歳)。平均観察期間 3 年 1 ヶ月 (4 ヶ月-6 年 7 ヶ月)。原疾患は慢性糸球体腎炎 5 例、糖尿病 2 例、IgA 腎症 1 例、多発性嚢胞腎 1 例。感作歴は移植 2 例、輸血 3 例、妊娠 7 例 (女性すべて) (重複例含む)。Flowcytometry crossmatch は T のみ陽性 5 例、B のみ陽性 1 例、T, B 共に陽性 4 例。DSA は class I のみ陽性 5 例、II のみ陽性 2 例、I, II 共に陽性 2 例。脱感作療法：免疫抑制剤は全例で MMF 1000 mg (1-8 週前から：平均 3.9

週)、ステロイド 10 mg (1-8 週前から：平均 3.6 週)、7 例でタクロリムス 1-5 mg (原則 0.1 mg/kg) (2-4 週前から：平均 3.1 週) を術前より開始した。リツキシマブ投与 5 例、脾摘 4 例。血漿交換は全例で行い、IVIG 療法 (400 mg/kg) は 6 例に投与した。結果：経過観察期間で全例生着、生存している。術前最高の平均 DSA 値 (MESF) は 12,041 (351-56,532) で、脱感作療法により移植前日で 2,172 と下降し、移植後も 1 日目 952, 7 日目 547, 1 年目 273 と上昇なく推移している。腎機能に関しては平均 Cr, eGFR 値は移植後 3 ヶ月：1.01 mg/dl, 52.7 ml/min/1.73 m², 1 年 1.09, 55.6, 2 年 1.05, 59, 3 年 1.1, 53.4 と良好に経過している。拒絶反応は急性細胞性拒絶反応 3 例、AMR 1 例を発症したが、治療にて改善した。術前 DSA 陽性であっても十分な脱感作療法により、たとえ拒絶反応を起こしても短期の予後は良好である。

【de novo DSA 陽性症例】 約 20% の患者に腎移植後、de novo DSA が発症すると考えられており、そのターゲットは主に HLA class II とされている。また発症後しばらく経過してから移植腎不全へつながらとされているので、早期発見は移植腎予後にも重要である。

【当院における de novo DSA 陽性腎移植の検討】 対象は 2005 年 1 月以降に当院で施行された腎移植症例 171 例 (生体腎 129 例、献腎 42 例) のうち何らかの原因で DSA 検査を行い、de novo DSA が確認された 17 症例。DSA 出現時期は平均 2 年 10 ヶ月 (0 ヶ月-6 年 9 ヶ月)。DSA は class I のみ陽性 4 例、II のみ陽性 10 例、I, II 共に陽性 3 例。そのうち腎機能悪化の精査のために DSA 検査を行った症例は 10 例であり、episode biopsy 全例に AMR が発症していた。血漿交換、リツキシマブ投与、ステロイドパルス、IVIG 療法などを施行したが、腎機能が改善した症例は 2 例のみで、3 例は悪化しうち 2 例は graft loss となった。

2) HLA 抗体と肝臓移植

○井手健太郎, 大段秀樹

広島大学大学院医歯薬保健学研究院 応用生命科学部門 消化器・移植外科学

心臓移植や腎臓移植などと異なり肝臓移植における抗ドナー特異的 HLA 抗体 (DSA) の臨床的意義は確立されていない。これは本邦のみならず海外においても脳死移植のレシピエント選択基準においてリンパ球直接交差試験陰性が必要条件となっていないことが物語っている。

しかし近年の抗 HLA 抗体検査法の進歩により, DSA の解析が可能となり, 肝臓移植においても DSA の存在が予後不良の原因となる抗体関連型拒絶反応の発症に関与している可能性が示唆されている。

このような背景のもと当院では生体肝移植希望患者に対して, まず DSA 検索目的で ICFA を施行すると同時に, 抗 HLA 抗体検索目的で LABScreen Mixed を施行し, 陽性の場合には Single Antigen を追加している。ICFA が陽性

の場合は FCXM および CDC を行い, その結果に応じて減感作療法を計画する。T-cell FCXM 陽性のみ場合は, 血液型不適合移植症例に準じリツキシマブ+カルシニューリン阻害薬+ミコフェノール酸モフェチル投与後に血漿交換を施行し, クロスマッチ陰性化を確認した後に移植に臨んでいる。脳死肝移植希望患者においても登録時に LABScreen Mixed を施行, 陽性の場合には Single Antigen を追加しておき, レシピエント候補となった際にはバーチャルクロスマッチの結果をもとに, 移植適応か否かを判定している。術後も定期的に HLA 抗体検査を行い, その結果に応じた免疫抑制療法を実践している。

本シンポジウムでは当院での肝臓移植における HLA 抗体に対するマネージメントについて紹介する。

3) HLA 抗体と造血幹細胞移植

○佐藤 壯¹⁾, 佐藤蘭子¹⁾, 小林直樹²⁾, 小林良二³⁾

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

HLA 抗体が造血幹細胞移植, 特に HLA 不一致移植において生着不全の原因となりうることは, 今ではよく知られているが, HLA 抗体が造血幹細胞移植の分野で注目を集めるようになったのは, 今世紀に入ってからである。1970 年代, 造血幹細胞移植が急性白血病に対する根治療法として臨床応用されるようになった当初は血縁 HLA 一致ドナーからの移植であり, その後非血縁者間移植がスタートしても HLA 一致ドナーからの移植が原則であった。そのため, 臓器移植と異なり造血幹細胞移植においては HLA 抗体の有無は, 血小板輸血不応の問題を除けば移植における危険因子とはみなされなかった。

それが, HLA2 抗原不一致まで可能な臍帯血移植の発展と再発難治性疾患に対するハプロ移植を始めとする HLA 不一致移植の発展によって, 造血幹細胞移植でも HLA 抗体がスポットライト浴びることとなった。高梨らは臍帯血移植を受けた患者が HLA 抗体の有無によっ

て好中球生着に有意差があり, さらにミスマッチ抗原に対する抗体を保有していた場合, より生着率が低下することを示した。そのため, 2012 年からは造血幹細胞移植時の HLA 抗体検査が保険適応となっている。

とはいえ, 造血幹細胞移植におけるドナーの第一選択は現在でもなお HLA 一致ドナーであり, 骨髄バンク, 臍帯血バンクにおけるドナー数の増加により, HLA 不一致ドナーを選択する場合でも, 事前に HLA 抗体検査を行うことにより, ドナーを得られる可能性は高い。

問題となるとすれば, HLA 不一致の対象とされる HLA-A, B, DR 以外の HLA-C, DQ, DP に対する抗体をどう評価するかであろう。

本講演では, 造血幹細胞移植におけるドナー選択の変遷も踏まえつつ, 文献学的考察や症例検討を行いながら, HLA 抗体をどう評価するか, 今後の方向性についても論議していきたい。

(15:40 ~ 16:40)

特別講演

座長：木村貴文（京都大学 iPS 細胞研究所 基盤技術研究部門）

WT1 ペプチドを用いたがんワクチン療法

岡 芳弘（大阪大学大学院医学系研究科，癌免疫学（大塚製薬）共同研究講座 特任教授）

WT1 ペプチドを用いたがんワクチン療法

岡 芳弘

大阪大学大学院医学系研究科, 癌免疫学 (大塚製薬) 共同研究講座 特任教授

Wilms' tumor gene (*WT1*) は、がん細胞のがんとしての機能維持に重要な働きを有しており、また、多くの種類の造血器腫瘍や固形がんを発現している。これらの特徴は、*WT1* の遺伝子産物である WT1 タンパクががん免疫療法のすぐれた標的抗原であることを示唆している。我々は、2000 年に、世界に先駆けて、ヒトならびにマウスの WT1 特異的 cytotoxic T lymphocytes (CTLs) を誘導できる WT1-CTL ペプチドの同定を報告し、また、マウスモデルを用いて WT1 は *in vivo* でがん免疫療法の標的抗原として機能し得ることを示した。

これらの基礎研究の成果に基づき、2001 年に WT1 ペプチドを用いたがんワクチン療法の臨床試験を開始した。初期の症例において、WT1 ペプチドワクチンの投与による白血病細胞の減少や固形がんの縮小を経験でき、その治療的ポテンシャルを実感した。また、同時に、WT1 ペプチドワクチンの投与により誘導される「WT1 特異的免疫反応」と「腫瘍量の減少などの臨床反応」との間の相関が観察され、「WT1 ペプチドワクチン投与→WT1 特異的免疫反応の誘導→臨床反応の出現」という一連の流れ、つまり、WT1 ペプチドワクチンの Proof of Concept が確立されたと考えてよい。

現在では、他施設との共同研究も含めて 600 例以上の WT1 ペプチドワクチン治療の経験を蓄積した。臨床的に特筆すべきことのひとつに、WT1 ペプチドワクチン単剤投与 (他薬剤の併用なし) で、腫瘍量の減少や長期の病勢の安定化だけでなく、治癒に導けたと考えられる症例も存在することがあげられる。

臨床試験開始当初は、安全性の検証を最優先する必要から、上記のように、ワクチン単剤での治療を行っていたが、最近では、抗癌剤や分子標的薬との併用治療も行っており、promising な結果を得ている。また、ペプ

チドに関しても、WT1-CTL ペプチドだけでなく WT1-helper ペプチド (WT1 特異的 CD4⁺ ヘルパー T リンパ球を誘導できる) との併用がより有効と考えられ、その臨床試験もすでに開始している。さらに、興味深い臨床セッティングとしては、造血幹細胞移植 (HSCT) 後があげられる。HSCT 後は、通常、残存腫瘍量が少なく、つまり、minimal residual disease (MRD) の状態であり、したがって、その状況で WT1 特異的 CTL が誘導できれば effector (CTL) /target (tumor or leukemia) ratio (E/T ratio) は大きく、抗腫瘍効果が発揮されやすい。さらに、HSCT 後のリンパ系細胞の再構築期に WT1 ペプチドワクチンを投与することになり、WT1 特異的 CTL が効率よく誘導され、そしてそれが expand することが予想される。また、HSCT 後の WT1 ペプチドワクチンは、「HSCT という allo 免疫反応による免疫療法」と「WT1 ペプチドワクチンというがん抗原に対する免疫療法」との併用療法とも考えられる。これらの有利な点を期待し、HSCT 後になお再発ハイリスクの造血器腫瘍に WT1 ペプチドワクチンを投与する臨床試験を構築・実施し、それにより、HSCT 後に WT1 ペプチドワクチンを投与することは再発抑制・長期完全寛解維持 (治癒の可能性が考えられる) に寄与できることを示した。現在、さらなる症例を蓄積中である。

上記のように、我々独自の基礎研究の成果をもとに translational research として WT1 ペプチドワクチン臨床試験を開始し、種々のポジティブな結果を得、さらに症例を蓄積しつつある。また、一方では、それらの症例から得られた検体を詳細に解析 (reverse translational research) することにより、生体におけるがん抗原に対する免疫応答のより深い理解が得られることも期待される。