

## 第1回 関東HLA研究会記録

会 期：2017年5月13日（土曜日）

会 場：東京大学 本郷キャンパス

世話人：湯沢 賢治

国立病院機構水戸医療センター

## HLA と臓器移植のかかわり

湯沢 賢治<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 国立病院機構水戸医療センター 臓器移植外科

臓器移植が行われるようになった1960年代には強力な免疫抑制剤はなく、その成績は散々なものであった。1964年にHLAの検査法が確立し、1967年にHLAが一致した方が腎移植成績が良いことを報告され、臓器移植とHLAの深い関係が始まった。臓器移植の成績向上のためにHLA研究も進み、多くの移植医はHLAに大いに関心を持っていた。

その後、1980年代に強力な免疫抑制剤が現れ臓器移植は一般臨床となった。これに伴い、臓器移植成績とHLAの関係は薄れ、全くHLAの一致しない夫婦間での

腎移植が良好な成績を収め、従来禁忌であったABO血液型不適合のハードルさえ越え、リンパ球クロスマッチ陽性でも移植が可能となった。このため、移植医はHLAに関心を持たなくなった。

しかし、2000年代後半に高感度な抗HLA抗体検査が開発され、ドナー特異的抗体DSAが長期成績に関与することが明らかになり、2010年代に移植医は一挙にHLAへ回帰した。

この流れからHLAの原点とも言える臓器移植におけるHLAの重要性を示す。

## HLAの基礎

藤原 孝記<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 帝京大学医学部附属病院 輸血・細胞治療センター

HLAは、免疫において自己と非自己を識別することにより、細菌やウイルスなどの感染病原体やがん細胞に対する反応（排除）および、同種移植における移植免疫反応（拒絶）など、免疫応答の誘導に深く関与している。HLA分子には膨大な数のアリルが存在し、集団レベルで著しい多型性が認められている。

医療分野ではHLAの機能である自己決定をHLAの多様性に応じてコントロールすることが重要であり、臓器移植では拒絶反応や移植片の生着率とHLA適合性が

密接に関係している。また、造血幹細胞移植では移植する造血幹細胞に免疫担当細胞が含まれるため、拒絶反応とGVHDの制御を重視する必要がある、臓器移植よりもHLA適合性が重要視される。

HLA検査および適合ドナーの選択を行うためにはHLAに関する基礎的な情報（分子構造、発現、機能、遺伝子およびアミノ酸配列等）について知っておくことが有用となる。本セッションではHLAに関する基礎的な情報について概説する。

## QCWS と認定制度

中島 文明<sup>1)2)</sup>

<sup>1)</sup> 日本組織適合性学会認定制度委員会 QCWS 部会長

<sup>2)</sup> 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所

日本組織適合性学会では、MHCに関する専門知識や精度の高い検査の施行を通じて、医療及び社会へ貢献できる認定制度を実施している。認定制度委員会では、認定HLA検査技術者及び認定組織適合性指導者、並びに認定組織適合性検査登録施設の認定を目的とした教育部会、試験問題検討部会、資格審査部会、QCワークショップ部会を設置し運営にあたっている。QCワークショップ部会では、HLA検査技術の向上をめざしてQuality

Control Workshop (QCWS)を開催し、DNA検査部門と抗体検査部門を設け、学会員であればどちらも参加可能としている。DNA検査部門は1997年から、抗体検査部門は2004年から大会長主催で開始され、その後、認定制度委員会に移管し、毎年開催している。QCWSの評価結果は、平成29年度から施行される認定組織適合性検査登録施設認定制度(施設認定)の重要な要件となっている。本項では、QCWSの活動状況を中心に概説する。

## 臓器移植とHLA (臨床)

江川 裕人<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 東京女子医科大学 消化器外科

拒絶反応は移植された臓器に対する宿主の免疫応答による臓器障害である。この際、免疫担当細胞が認識する主たる抗原が、HLAである。一卵性双生児では拒絶反応が起こらない一方でドナーとレシピエントの間のHLAのミスマッチが多いほど拒絶反応が多くなる報告もある。拒絶には、Tリンパ球が主役の細胞性拒絶反応と抗体が主役の抗体関連拒絶(antibody mediated rejection: ABMR)がある。1980年代にカルシニューリン阻害薬や代謝拮抗薬が開発され細胞性拒絶はほぼ制御できる

ようになったが、細胞性免疫反応の正確なモニタリング法は確立されていない。一方でABMRは、組織適合性検査の開発が進歩し、感作状態やドナー特異抗体(donor specific antibody: DSA)量のモニタリングが可能になったが有効な治療法がなかった。近年ようやく、術前の感作状態を軽減して抗体価を下げ、移植を安全に行う方法や術後新たに産生されるde novo DSAによるABMRの治療が開発されている。

## 我が国の造血幹細胞移植における HLA 適合度と成績

高橋 聡<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 東京大学医科学研究所 分子療法分野

同種造血幹細胞移植におけるドナーとレシピエントとの HLA 適合度は、移植成績を規定する重要な因子である。一般的には HLA の適合度が高いほど GVHD など移植関連免疫反応が減弱し移植関連合併症・死亡率が下がるものの、悪性疾患では HLA 適合度が低い場合に比べて移植後再発率が高くなる場合もある。ただし、これは移植細胞ソース（骨髄、末梢血、臍帯血、血縁/非血縁ドナー）あるいは前処置や移植後免疫制御法などの違い、さらには患者の疾患（良性/悪性、進行程度）等によって複雑に影響を受け、これらの要因・状況によって HLA 適合度が移植成績に与える影響は異なる。また、HLA 抗原不適合移植の場合は、抗 HLA 抗体の有無、陽性の場合それはドナー特異的抗体（DSA）であるか、という点は生着に影響する。ただし移植成績全体を通して言えることであるが、HLA 適合度についても欧米での解析結果がそのまま我が国ではあてはまらない場合が多々ある点は留意すべきである。

血縁ドナーの骨髄あるいは末梢血を移植ソースとして

用いる場合は、HLA1 抗原不適合までを許容することが最近では一般的になっている。非血縁骨髄移植の場合はアロ反応が血縁間移植に比べて強く影響されることが予想されたため、アリルレベルも含めてより HLA 適合度の高いドナーが求められてきたが、以前に比べて HLA 完全一致以外の場合でも適合移植との成績比較において差がなくなってきた。さらには、移植後エンドキサン投与方法（PT/Cy）等の新しい免疫調整法の導入により、HLA 半合致血縁ドナーからの移植も可能となってきた。一方で、臍帯血は様々な観点から成人由来の造血幹細胞とは異なる移植細胞ソースであり、我が国の成人患者を対象とした解析データでは、HLA-A、-B、-DRB1 の 6 抗原のうち、2 抗原が異なる場合でも一致した臍帯血移植と比べて成績に差がないことが明らかになっている。

我が国では同種移植が必要なほぼ全ての患者に移植ドナー・ソースが得られる時代となり、これらの情報を基に個々の患者にとってより良い結果を求めた移植法が選択されている。

## HLA 抗体スクリーニング検査において他施設の結果と乖離を認めた 1 例

小山 暁史<sup>1)</sup>, 杉本 達哉<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 東海大学医学部附属病院 輸血室

【はじめに】移植領域における HLA 抗体検査は不可欠な検査となっている。ドナー特異的抗体（DSA）の確認にはシングルアンチゲンビーズ（SAB）を用いるが、高価な試薬のため全例に用いることは困難である。そのため当院では SAB による特異性確認の前に LABSreen-Mixed（Mixed）を HLA 抗体スクリーニング検査（以下、Scr 検査）として実施している。今回我々は同一時期に採取された検体において他施設で実施された LABSreen-

PRA（PRA）Scr 検査と結果が乖離した症例を経験したので報告する。

【症例】患者は 67 歳男性。MDSRAEB II と診断され、臍帯血移植目的で当院に入院した。移植前の HLA 抗体は陰性であった。本年 3 月に移植を実施したが、白血球の立ち上がりが悪く移植後 17 日目のキメリズム解析において生着不全と診断された。再移植のドナー候補として、子と臍帯血が候補となり Scr 検査が依頼された。

【結果】移植後、院内で実施した Scr 検査 (Mixed) では Class I 陰性 (Ratio : 1.29 ~ 1.84), Class II 陽性 (Ratio : 0.72 ~ 3.86) (当院の Cut Off 値 Ratio 3.0 以上で陽性と判断)。SAB による特異性 (当院の Cut Off 値 nMFI 1000 以上を陽性と判断) は DQ 抗原に対する抗体 (nMFI : 3000 ~ 14000) を認めた。

後日、他施設から報告された Scr 検査 (PRA) では Class I 陽性, Class II 陽性となり, SAB による Class I 抗体の特異性は A2 抗原に対する抗体 (nMFI : 3000 ~ 5000), Class II 抗体の特異性は院内検査と同様の DQ 抗原に対する抗体 (nMFI : 3000 ~ 15000) を認めた。

この結果を受け当院でも Class I SAB での再検査を

行ったところ、他施設の結果と同様に A2 抗原に対する抗体 (nMFI : 1700 ~ 4000) を認めた。

【考察】Mixed では Cut Off 値として Ratio 1.5 以上が推奨されているが、当院では過去の検討結果から Ratio 3.0 以上している。今回の乖離は当院の Cut Off 値の設定が原因の一つであるが、SAB の高額な試薬代を考慮すると安易な Cut Off 値の引き下げは困難である。しかし Scr 検査の本来の目的は臨床的意義のある抗体の有無を確認することであるため、依頼される検体の患者背景 (目的・免疫感作歴等) を考慮しつつ Cut Off 値等の見直しを検討する予定である。

## ドナー特異的 HLA 抗体を保有する臍帯血移植患者に対する HLA 抗体モニタリング

前島理恵子<sup>1)</sup>, 藤原 孝記<sup>1)</sup>, 蟹井はるか<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 帝京大学医学部附属病院 輸血・細胞治療センター

臍帯血移植の多くは HLA 不一致移植であり、患者が DSA を保有している場合、移植後の生着に影響することが報告されている。本症例は移植に適した臍帯血が DSA 陽性のため、抗体関連生着不全予防処置を行い、その評価を目的として HLA 抗体モニタリングを行った。

【方法】DSA による生着不全予防処置として DSA と反応する血小板を輸血後、rituximab を 4 回投与した。処置の評価として、Single Antigen により抗体モニタリングを行い、移植後も継続した。

【結果】当初、DSA に対する nMFI : 7814 であったが

次第に弱くなり、rituximab 投与後の反応は全て 1000 未満で予定通り移植を行った。移植前日は 396 で、DSA と反応する血小板輸血により抗体を脱感作後、移植を行った。移植後、1 週間毎にモニタリングを実施したが全て 300 未満で 3 週間後に DSA は検出されなかった。

【考察】予防処置後、抗体の低下を nMFI で確認することにより予防処置の評価が可能であった。移植後、DSA も認められず患者は現在、外来通院にて対応している。

## HIGH-RESOLUTION HLA TYPING BY NXTYPE™ NGS HLA TYPING KIT

Seik-Soon Khor<sup>1)</sup>, Yuki Hitomi<sup>1)</sup>, Yuko Okudaira<sup>2)</sup>, Anri Masuya<sup>2)</sup>, Yuki Ozaki<sup>3)</sup>, Mayumi Ueta<sup>4)</sup>, Ken Nakatani<sup>1)</sup>, Masaki Nagato<sup>5)</sup>, Takahiro Ogawa<sup>5)</sup>, Chie Sotozono<sup>4)</sup>, Shigeru Kinoshita<sup>4)</sup>, Hidetoshi Inoko<sup>2)</sup>, Katsushi Tokunaga<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Human Genetics, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

<sup>2)</sup> GenoDive Pharma Inc., Honatsugi, Kanagawa, Japan

<sup>3)</sup> The Center of Medical Innovation and Translational Research, Graduate School of Medicine, Osaka University, Osaka, Japan

<sup>4)</sup> Department of Frontier Medical Science and Technology for Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan

<sup>5)</sup> Research and Development Section, Wakunaga Pharmaceutical Co., Takata, Hiroshima, Japan

The human MHC region has been shown to be associated with a wide range of diseases. The recent advancement in the next generation sequencing (NGS) technology has definitely helped in increasing the resolution (up to 4-field) of HLA genotyping. However, it remains a challenge in interpreting the results from NGS platform due to biases including systematic sequencing error by sequencing platform, difference in the sensitivity and specificity of HLA calling algorithm, ability to resolve HLA alleles ambiguity by incorporating phasing information, and more importantly incompleteness of the current IMGT database. In order to access the sensitivity and specificity of the NXType™ NGS HLA typing kit (One Lambda), a

total of 105 Japanese samples were sequenced for HLA class I genes using the Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) following the NXType protocol. HLA calling was performed using the HLATypeStream v1.0.0.86 with IMGT/HLA databases of 3.21.0. Concordance rates were evaluated by comparing HLATypeStream results with Luminex-based HLA typing result for up to 2-field result. With the default setting of HLATypeStream and without manual interpretation of the results, the allelic concordance is more than 98% for HLA-A, HLA-B and HLA-C. Careful inspection of the final results and occasionally manual interpretations of results are necessary especially for rare or novel HLA alleles.

## Long-range と Short-range PCR 法の特徴

椎名 隆<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 東海大学医学部 基礎医学系分子生命科学

次世代シーケンサー (NGS) を用いた HLA タイピング法は、国内外の研究機関や企業にて開発されており、主に PCR、次世代シーケンシング、アレル判定の3つの工程から構成される。PCR の工程では、HLA 遺伝子を増幅させる長さから、short-range 法と long-range 法に大別される。short-range 法は、多型に富む個々のエクソンや部分的なイントロンを増幅させる方法であり、PCR 産物の長さが 250 ~ 900 bp 程度と比較的短いことから多検体処理に適する。一方、Long-range 法は、エクソンとその間のイントロンを含む遺伝子領域を増幅させ

る方法であり、新規多型や変異を効率よく、かつ染色体ごとに分けて検出する利点を持つ。究極の Long-range 法は、エンハンサー・プロモーター領域から 3' 側非翻訳領域までの遺伝子全領域を網羅する方法であり、多型に富む特定のエクソンの HLA 多型に基づいて進められてきたこれまでの移植研究や疾患関連解析に新たなブレークスルーを与えるものと期待されている。

## 各 NGS プラットホームの性状

椎名 隆<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 東海大学医学部 基礎医学系分子生命科学

Ion Torrent system (ThermoFisher Scientific 社) および MiSeq (illumina 社) などのベンチトップ型次世代シーケンサー (NGS) に共通する HLA タイピングへの利点は、DNA 1 分子からのリード配列を大量に得ることができる点にある。即ち、リード配列を染色体ごとに分けてアレル判定を行うことにより現行の高解像度 DNA タイピング法 (現行法) では不可能である phase ambiguity 問題が解消される。また、サンプルそれぞれに異なる index や barcode 配列を NGS ライブラリー作製時に

付加させることにより、多検体のリード配列を並列的に得ることも利点である。一方、現行法と比して NGS 法では PCR からアレル判定まで最低でも 2~3 日間が必要であり、その殆どの時間は、NGS に関する操作に費やされる。PCR 法が確立されてきた現在では、この過程を如何に簡略化、迅速化および自動化させるか、が大きな鍵であり、臨床検査の現場におけるルーチンタイピングのためにはこれらの技術的問題を解決する必要がある。

## キャプチャー法の特徴

細道 一善<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 金沢大学 医薬保健研究域医学系 革新ゲノム情報学分野

次世代シーケンサー (NGS) の技術により、大規模なゲノム配列決定が可能となったが、一方で、ゲノム上の特定の領域や遺伝子にターゲットを絞り、多検体を迅速にリシーケンスする需要も多い。実際に、がんや特定の疾患にフォーカスし、NGS を使って関連する遺伝子群を効率よく解析する遺伝子パネルスクリーニングを目的

とした製品がすでに数多く販売されている。エクソーム解析で知られるシーケンスキャプチャー法は HLA タイピングにも応用可能であり、簡便、迅速かつ安価なゲノム解析技術として、多検体をより簡便に解析可能である。本セッションではこのキャプチャー法の原理について紹介する。

## KIR タイピング

細道 一善<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 金沢大学 医薬保健研究域医学系 革新ゲノム情報学分野

ナチュラルキラー細胞 (NK 細胞) に発現し、HLA を認識する受容体であるキラー細胞免疫グロブリン様受容体 (KIR) は約 150 kb ほどの領域に遺伝子クラスター (15

遺伝子、2 偽遺伝子) を形成し、各遺伝子の機能は活性型と抑制型に大別される。遺伝子座の有無としての多型も存在することから、個人ごとに各ハプロタイプのもつ

活性型と抑制型の KIR の遺伝子数は異なり、そのバランスによって各人の NK 細胞活性が調節される。近年 HLA 型に加え KIR 型を適合させることが移植の成功の

鍵であることが明らかとなっている。本セッションでは次世代シーケンサーを使った KIR ハプロタイプのタイピングの可能性について議論したい。