

2017年5月29日

非血縁者間造血幹細胞移植における患者およびドナー登録者の
今後の適切な HLA タイピング法にかかわる提言

日本赤十字社 (造血幹細胞提供支援機関) HLA 委員会
一戸辰夫 (委員長) 猪子英俊 神田善伸 木村彰方 椎名 隆
田中秀則 中島文明 村田 誠 森島泰雄
(委員名・五十音順)

I. はじめに

同種造血幹細胞移植は、難治性の造血器疾患・先天性免疫不全症・一部の先天性代謝性疾患等の治療に不可欠の医療技術であり、最近の我が国におけるその実施数は年間 3,500 件以上に及んでいる¹⁾。近年、少子高齢化の進行により健康な血縁ドナーを得られる機会が減少する一方、臍帯血を含む非血縁者間造血幹細胞移植の実施機会はますます増加しており、我が国の骨髄バンクでは 1992 年の事業開始から 2016 年 8 月末日まで、のべ 19,834 件の移植の機会を提供してきた。また臍帯血移植は世界で類を見ない程に増加した。このような背景から、2014 年 1 月に「移植に用いる造血幹細胞の適切な提供の推進に関する法律」（以下、造血幹細胞移植推進法）が施行され、非血縁者に由来する骨髄・末梢血幹細胞提供あっせん事業者および臍帯血供給事業者には、移植の円滑かつ適正な実施を行う体制を整備することが義務付けられている。

周知のように非血縁者間造血幹細胞移植、特に非血縁者間骨髄移植の成績は、患者とドナーの間における HLA の適合性に大きく依存している²⁻⁵⁾。実際、これまでも、骨髄バンクでは患者とドナーの HLA 確認検査に、常に各時代においてもっとも精度の高い HLA タイピング技術を導入してきた。現在は、*HLA-A, -B, -C, -DRB1* の 4 座位を対象として、それぞれのローカスに存在するアリルを第 2 区域まで決定するために、患者登録時検査およびドナーの確認検査には多色蛍光ビーズを用いた reverse SSO 法(以下、ルミネックス法)、患者の確認検査時にはサンガー法による PCR-SBT 法 (以下、SBT 法) を利用してタイピングが行われている。これらの方法は、既存の HLA タイピング技術としては正確性・効率

性・経済性のいずれも優れているが、その一方で、以下のように原理的に解決不能な問題が内在していることが大きな課題である。

(1) 多型が集中する特定のエクソンのみを対象にタイピングを行うため、それぞれの HLA 遺伝子のコード領域すべてを決定することができず、一意的なアリル判定ができない。また、HLA 分子の発現量に影響を及ぼす他のエクソン、エンハンサー・プロモーター領域、イントロン、3'側非翻訳領域などの多型を検出することができず、一部の非発現アリル (Null アリル) や低発現アリル (Low アリル) を同定できていない可能性がある (「部分タイピング問題」)。

(2) HLA 遺伝子の一本鎖 DNA としての配列を決定できず、2 つ以上の多型部位が同じ染色体上に位置するのか (*cis* 位)、異なる染色体上に位置するのか (*trans* 位) を区別できないため、それらの多型によって決定される複数種類のアリルのペアが生じる場合がある (「phase ambiguity 問題」)。

(1)については、複数個存在する候補アリルの中から、日本列島においてもっとも高頻度に存在するアリルを代表アリル (「高頻度アリル」、「参考アリル」、「みなしアリル」) として用いているため、低頻度ではあるが、実際には患者・ドナー間で不適合となっているアリルの組み合わせを適合と誤判定してしまうリスクを回避することができない。また、従来の HLA タイピング法で同定可能なものに限っても、骨髄バンクにおけるドナー登録者 5,000 名あたり 1 名以上の割合で Null アリルが検出されていることから⁶⁾、まだ検出できていない Null アリル、Low アリルを保有する登録者がさらに存在し得るという問題がある。特にドナ

一側の HLA アリルが実際には Null アリルであるにもかかわらず、発現アリルとして判定された場合、そのドナーから移植が行われる患者に対しては移植片対宿主病 (GVHD) の発症リスクを高める危険性を生じるため、Null アリルの正確な同定技術の開発は喫緊の課題である。

(2)については、良く知られているように患者側あるいはドナー側のいずれにおいても一定の頻度で誤判定または判定不能事例が生じる原因となっており、ambiguity を生じている HLA 遺伝子座のクローニングを行わない限り、既存のタイピング技術による解決は原理的に困難である。

このような従来の HLA タイピング技術の欠点の克服を目指して、近年、次世代 DNA シーケンサーを用いた新規の HLA タイピング技術が開発され、その移植医療への導入に大きな期待が寄せられている⁷⁻⁹⁾。NGS を用いた HLA タイピング法は、(i) 標的遺伝子配列の PCR 増幅、(ii) PCR 産物の大量並行シーケンシング、(iii) シーケンシングデータに基づくアリル判定の 3 つのプロセスによって構成されており、PCR 産物の長さの違いによって、Long-range 系あるいは Short-range/Middle-range 系タイピング法に大別される。Long-range 系は、エンハンサー・プロモーター領域からすべてのエクソン・イントロン・3'側非翻訳領域を含む遺伝子全領域を増幅させる方法であり、従来は知られていなかった多型や変異の検出を可能とするとともに、DNA 一本鎖の遺伝子配列の情報からアリルを決定することができるため、ほとんどの phase ambiguity の解消を可能とする究極的なタイピング法である¹⁰⁾¹¹⁾。一方、Short-range/Middle-range 系は、おおむね長さが 1 kb 以内の PCR 産物を用いて、従来のように多型が集中する特定の

エクソンを組み合わせることで増幅する方法であり、大量・多検体・多遺伝子座のタイピングに適しているとともに、多型が集中するエクソン間のイントロンを含む遺伝子領域も増幅させることにより（Middle-range 系）、phase ambiguity の解消も可能である¹²⁻¹⁴⁾。

このように NGS 法による HLA タイピング技術は多くの利点を有しているため、現在、米国の NMDP、ドイツの DKMS、イギリスの BBMR、中国の CMDP など海外の主要な骨髄バンクにおいて、ドナー登録や患者の確認検査を行うために NGS 法の積極的な導入が進められており¹⁵⁻¹⁸⁾、すでに臨床検体を用いた NGS 法によるタイピングによって、ルミネックス法や従来の SBT 法では同定されていなかった非同義塩基置換を伴う新規アリル（Null アリルを含む）が多数見出されることが報告されている¹⁸⁾。また、最近の研究により、我が国の非血縁者間造血幹細胞移植では、従来は一般的な適合性の判定に用いられてこなかった *HLA-DQB1* や *HLA-DRB3/4/5* 座におけるアリル不適合や、HLA 遺伝子の非翻訳領域における遺伝子多型が非血縁者間造血幹細胞移植の成績に有意な影響を与えていることが報告されている⁵⁾¹⁹⁾²⁰⁾。NGS 法はこれらのマイナーな HLA 遺伝子座や非翻訳領域の多型の情報も網羅的に決定することが可能であり、今後のさらなる移植成績の向上のため、きわめて高い費用対効果を有する技術と考えられる。

このような観点から、日本赤十字社 HLA 委員会（以下「HLA 委員会」）では、本年の 3 月下旬から 8 月上旬までの期間にわたり、国内ですでに NGS 法による HLA タイピングを実施している民間 HLA 検査機関 2 施設を訪問し、使用しているシーケンサーの性能、データの保存方法、タイピングキットの特性、アリル

判定プログラムの精度等にかかわる実地調査を行うとともに、実際の検体を用いて両機関における NGS 法タイピングの精度を検定するための模擬的な認証試験を行った（別添資料）。このたび、HLA 委員会ではそれらの結果を踏まえた審議を行い、今後の我が国における非血縁者間造血幹細胞移植の患者およびドナーの HLA 確認検査は NGS 法を用いて行うことが強く推奨されるという結論に到達したので、下記の通り提言する。

II. 提 言

上記の検討結果を踏まえ、HLA 委員会は今後の我が国における非血縁者間造血幹細胞移植の患者・ドナー候補者の適切な HLA タイピング法に関して、以下の提言を行う。

提言 1：

今後の骨髄バンクにおける患者 HLA 確認検査およびドナーの HLA オプション検査は現在のサンガー法による SBT 検査から、*HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3/4/5, -DQB1, -DPB1* の 7 座位を含む NGS 法によって実施することを強く推奨する。

（理由） 現在用いられている SBT 法に対する NGS 法の有益性は今回の検討から明らかであり、我が国における非血縁者間造血幹細胞移植のさらなる成績の向上のため、骨髄バンクの患者 HLA 確認検査およびドナーの HLA オプション検査として可及的早期に NGS 法を導入することが必要と考える。また、今後、

NMDP を含む海外の骨髄バンクにおける HLA タイピングの標準法は NGS 法と
なっていく可能性が高く、骨髄バンクの国際協調・国際連携の観点からも NGS
法を早期に導入することは有益である。また、NGS 法を導入することによって、
HLA 遺伝子 1 座あたりのタイピング費用を減少させることが可能であり、確認
検査の対象とする HLA 遺伝子座に関しては、現在の *HLA-A, -B, -C, -DRB1* に加
え、すでに国内外の研究により、非血縁者間骨髄移植後の GVHD 発症率・生存
率に有意な影響を与えることが報告されている *HLA-DRB3/4/5, HLA-DQB1, HLA-
DPB1* も含めることが合理的である⁵⁾²¹⁾²²⁾。

(付言) 採用する NGS 法の条件としては、(i) *HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3/4/5, -DQB1, -DPB1* の 7 座位を第 3 区域まで決定できること、(ii) phase ambiguity の
解消を可能とするために、多型が集中するエクソンの間に存在するイントロン
領域の配列も決定できることを必須とし、可能であれば、(iii) HLA 遺伝子の発
現量に影響を与える非翻訳領域の多型を同定できること、(iv) 1 検体あたりの検
査費用が現在の骨髄バンクにおける HLA 確認検査の費用を超えないこと、が望
ましい。

また、今回の認証模擬試験に参加した 2 機関で実施された NGS 法によるタイ
ピングは、いずれも上記の(i)(ii)の条件を満たしており、今後、この 2 機関にお
いて実施されたタイピング結果が患者登録データとして用いられた場合には、
従来の SBT 法による確認検査は省略してよい。

提言 2:

今後の骨髄バンクにおける新規ドナー登録者の HLA 検査は、NGS 法によっ

て実施することを強く推奨する。

(理由) すでに述べてきたように NGS 法の導入によって、ドナー側の Null アリルや Low アリルの検出頻度が高まり、患者とのより正確な適合性の評価を行うことが可能となる。また、現在、患者登録後のドナー選定にあたってはドナー候補者の HLA 確認検査および確認検査後にミスマッチが判明し新規の候補者を選定する過程に一定の期間を要しているが、あらかじめドナー登録者が精度の高い HLA アリルのデータを所有することにより、不要なコーディネート回避することが可能となるとともに、コーディネート期間の短縮が実現することが期待される。さらに、NGS 法の利点である高い多検体処理能によってドナー登録者の HLA タイピングコストの減少に寄与することも期待される。実際、NMDP ではリクルート時のタイピングとして *HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3/4/5, -DQB1, -DPB1* の 7 座が対象とされており、今後の我が国におけるドナー登録時にタイピングの対象とする HLA 遺伝子座に関しても、患者との効率的なコーディネートを促進させる観点から、患者確認検査と同様に 7 座位とすることが合理的である。

提言 3:

臍帯血バンクにおける公開臍帯血ユニットの HLA 検査に関しても、今後は NGS 法を導入することを推奨する。

(理由) 今後、非血縁者間造血幹細胞移植の実施を検討する患者が NGS 法による HLA データを保有する機会が増加した場合、患者との HLA 適合性を評価する上で、公開臍帯血ユニットも NGS 法による HLA データを所有していること

が合理的である。また、骨髄バンクのドナーと同様に、臍帯血ユニットについても、従来の HLA タイピング法では判明していない Null アリルや Low アリルの正確な同定が移植成績の向上に寄与する可能性がある。

提言 4:

非血縁者間造血幹細胞移植にかかわる患者・ドナー登録者・臍帯血ユニットの NGS 法を含む HLA タイピング結果を保存・管理する組織が必要である。

(理由) NGS 法によって得られた膨大な HLA 遺伝子配列の管理方法については、現在国際的な検討が進められており、Histoimmunogenetics Markup Language など、取り扱いに高度な生命情報科学の知識を要する共通言語の使用が提案されている²³⁾。これらの国際標準に対応し、国内における NGS 法による HLA タイピングデータの的確な管理を実現すべきである。

なお、以上のように造血幹細胞移植にかかわる HLA タイピング法をすべて NGS 法で実施することは、検査費用の増大につながる可能性を内包しているため、新規の Null アリルが見つかる頻度や、NGS 法タイピングの導入によって実際の移植成績にどの程度の影響が及ぶか等については、リスクとベネフィットのバランスをできうるかぎり正しく評価するために、さらに多数の検体を用いた NGS 法タイピングデータの蓄積とそれらの科学的分析を継続していくことが必要である。

参考文献

- 1) 日本における造血細胞移植 平成 27 年度全国調査 日本造血細胞移植データセンター/日本造血細胞移植学会
- 2) Sasazuki T, *et al.* Effect of matching of class I HLA alleles on clinical outcome after transplantation of hematopoietic cells from an unrelated donor. Japan Marrow Donor Program. *N Engl J Med.* 1998; 339:1177-85.
- 3) Morishima Y, *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; 99:4200-6.
- 4) Kanda Y, *et al.* Impact of a single human leukocyte antigen (HLA) allele mismatch on the outcome of unrelated bone marrow transplantation over two time periods. A retrospective analysis of 3003 patients from the HLA Working Group of the Japan Society for Blood and Marrow Transplantation. *Br J Haematol.* 2013; 161:566-77.
- 5) Morishima Y, *et al.* Biological significance of HLA locus matching in unrelated donor bone marrow transplantation. *Blood.* 2015; 125:1189-97.
- 6) 造血幹細胞移植情報サービス・骨髄バンク統計資料(<http://www.bmdc.jrc.or.jp>)
- 7) 椎名 隆. HLA DNA タイピング法におけるパラダイムシフト. *医学のあゆみ* 2014; 251:273-8.
- 8) Gabriel C, *et al.* HLA typing by next-generation sequencing - getting closer to reality. *Tissue Antigens.* 2014; 83:65-75.
- 9) Hosomichi K, *et al.* The impact of next-generation sequencing technologies on HLA research. *J Hum Genet.* 2015; 60:665-73.
- 10) Shiina T, *et al.* Super high resolution for single molecule-sequence-based typing of classical HLA loci at the 8-digit level using next generation sequencers. *Tissue Antigens.* 2012; 80:305-16.
- 11) Ozaki Y, *et al.* Cost-efficient multiplex PCR for routine genotyping of up to nine classical HLA loci in a single analytical run of multiple samples by next generation sequencing. *BMC Genomics.* 2015; 16:318.
- 12) Gabriel C, *et al.* Rapid high-throughput human leukocyte antigen typing by massively parallel pyrosequencing for high-resolution allele identification. *Hum Immunol.* 2009; 70:960-4.
- 13) Bentley G, *et al.* High-resolution, high-throughput HLA genotyping by next-

- generation sequencing. *Tissue Antigens*. 2009; 74:393-403.
- 14) Holcomb CL, *et al*. A multi-site study using high-resolution HLA genotyping by next generation sequencing. *Tissue Antigens*. 2011; 77:206-17.
 - 15) Zhou M, *et al*. Application of high-throughput, high-resolution and cost-effective next-generation sequencing-based large-scale HLA typing in donor registry. *Tissue Antigens*. 2015; 85:20-8.
 - 16) Paunic V, *et al*. Charting improvements in US registry HLA typing ambiguity using a typing resolution score. *Hum Immunol*. 2016; 77:542-9.
 - 17) <http://hospital.blood.co.uk/diagnostic-services/hi/next-generation-sequencing/>
 - 18) Hernández-Frederick CJ, *et al*. Detection of 549 new alleles in potential stem cell donors from the United States, Poland, and Germany. *HLA*. 2016; 87:31-5.
 - 19) Fernández-Viña MA, *et al*. Multiple mismatches at the low expression HLA loci DP, DQ, and DRB3/4/5 associate with adverse outcomes in hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2013; 121:4603-10.
 - 20) Petersdorf E, *et al*. High HLA-DP expression and graft-versus-host disease. *N Engl J Med*. 2015; 373:599-609.
 - 21) Detrait M, *et al*. Suggestive evidence of a role of HLA-DRB4 mismatches in the outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with HLA-10/10-matched unrelated donors: a French-Swiss retrospective study. *Bone Marrow Transplant*. 2015;50:1316-20.
 - 22) Kawase T, *et al*. HLA mismatch combinations associated with decreased risk of relapse: implications for the molecular mechanism. *Blood*. 2009; 113:2851-8.
 - 23) Milius RP, *et al*. Histoimmunogenetics Markup Language 1.0: Reporting next generation sequencing-based HLA and KIR genotyping. *Hum Immunol*. 2015; 76:963-74.