

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19588

研究課題名(和文)次世代シーケンシングによる造血幹細胞移植後再発腫瘍のHLAアリル欠損解析

研究課題名(英文)An analysis of HLA-LOH in relapsed tumor by using NGS after allogeneic stem cell transplantation

研究代表者

青山 泰之(AOYAMA, Yasuyuki)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：50648475

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):白血病に対して行われるHLA不一致の同種造血幹細胞移植(Allo-HSCT)後の再発時に、レシピエント固有のHLA消失(LOH: loss of heterozygosity)症例が報告されている。移植後再発症例が予後不良であるため、LOHを早期に検出できることが再発の予測に寄与すると考える。新たなLOH検索法となり得る次世代シーケンサーを用いたSS-SBT法によりLOHを検出する方法を、マイクロサテライト解析(MS)と比較検討した。この結果LOH有無の特定率は、MS解析では33%であるのに対し、SS-SBT法では100%であり、従来法に比べ、より高確率でLOHの検出が可能である。

研究成果の概要(英文):The loss of heterozygosity in HLA lesion has been reported in relapsed leukemic cell after allogeneic stem cell transplantation (Allo-HSCT). Because the patients who had relapsed their disease after Allo-HSCT were apparently worth prognosis, we investigated whether new method used SS-SBT method could detect the LOH or not and compared the conventional micro-satellite sequencing (MS) method. The detection rates were 33% in MS method, however, 100% in SS-SBT method. It seems that next generation sequencing method has high power of detection for HLA-LOH.

研究分野：血液内科学

キーワード：HLA-LOH 次世代シーケンサー 同種移植後再発 HLA不一致移植

1. 研究開始当初の背景

Allo-HSCT はドナー・レシピエント間の免疫応答に起因する移植後合併症による移植関連死亡率が高率であることが問題点である。このため、悪性疾患に対しては化学療法での治癒が難しい、悪性度の高い症例が移植の対象となる。一般的に、ドナー・レシピエント間で HLA 不一致が存在する場合、移植片対宿主病 (GVHD) のリスクが高くなるものの、同時に再発率が低下する。これは、不一致の HLA に対するドナーからの同種免疫応答によると理解されている。しかし、不一致 HLA を有する移植後再発症例において、再発腫瘍細胞にレシピエント由来の HLA で、ドナーが有していないアリルを欠損している症例が報告されている (Cancer Science 2007, N Engl J Med 2009, Blood 2010)。

我々はこれまで、Allo-HSCT の治療成績と HLA の関わりについて、HLA タイピングの分担者として共同研究に参加し、予後に影響する重要な報告してきている (Morishima et al, BBMT 2007, Kawase et al, Blood 2008)。一方、分担研究者の椎名は HLA 遺伝子全領域における高精度多型解析と LOH を同時に検出できる方法 (SS-SBT 法) を開発している (Shiina et al, Tissue Antigens 2012)。我々は、すでに同手法を用いた再生不良性貧血症 1 症例における予備実験から、HLA 遺伝子の LOH の推移を臨床経過とともに経時的に解析することに成功している (2014 年 MHC 学会)。HLA 遺伝子の LOH 解析を HLA アリルレベルで解析した例はこれまでになく、当施設で経験した移植症例を用いたレトロスペクティブな解析をおこなうことを着想した。

Allo-HSCT 後再発症例の予後は極めて悪く、再発を防ぐための戦略が必要である。再発症例の一部で腫瘍細胞の HLA が欠損することが SS-SBT 法で検出されれば、従来の塩基多型 (SNP) を用いた解析方法と比較し、定量性が得られるために、微量な LOH クローン測定することが可能となる。すなわち、LOH の存在を動的にとらえることが可能になり、HLA 領域の LOH を起こす症例と、起こさずに再発する症例との違いを明らかにすることで、移植後再発の予防法の開発に布石を打つ研究成果が期待できる。

2. 研究の目的

同種造血幹細胞移植 (Allo-HSCT) は血液悪性疾患に対して治癒が望める有力な治療法であるが、一部の症例では移植後再発し、再発症例の予後はきわめて不良である。Allo-HSCT は、ドナーからの免疫反応が抗腫瘍効果を有することから、ドナー・レシピエント間での HLA 不一致は再発を抑制すると考えられる。ところが、近年レシピエ

ント側の不一致 HLA が欠損し、ドナーからの免疫応答を回避し再発につながる症例が報告されている。一方、申請者らは HLA 型判定のみならず HLA 片側アリル欠損 (LOH; Loss of heterozygosity) も定量的に検出する NGS による HLA DNA タイピング法を開発した。本研究では、HLA 不一致 allo-HSCT 後の再発症例における LOH の変化を経時的に定量することにより、腫瘍が免疫応答を回避する分子機序を明確にすることを目的とする。

具体的には以下の項目を評価する事を目的とする。

(1) SS-SBT 法により、HLA 不一致移植における再発時の HLA 領域 LOH が検出可能かどうかを検討する。

(2) SS-SBT 法では LOH を定量することが可能であることから、再発に至るまでの経時的な変化で LOH の程度がどのように変化するかを明らかにする。

(3) HLA 一致症例における LOH の検出が SS-SBT 法により可能かどうか検討する。

3. 研究の方法

東海大学血液腫瘍内科において Allo-HSCT が施行された症例で、研究同意が得られている症例を後方視的に解析対象として、1) 移植前ドナー・レシピエントにおける HLA をタイピングする。2) 移植後再発症例で再発時の HLA を SS-SBT 法によりタイピングする。3) 再発時の HLA 以外の遺伝子についてマイクロサテライト多型によりキメリズムを計測する。4) LOH が検出された症例について、再発前後の LOH の状況を評価する。5) 移植前の白血病細胞において LOH の有無を確認し、LOH が移植後に獲得されるのか、そもそも LOH を起こしている腫瘍が存在し再発してくるのかを解明する。

Allo-HSCT 後の再発腫瘍細胞における HLA 領域の LOH はこれまで SNP およびマイクロサテライト多型を用いて解析されてきた。それぞれ一長一短があり、SNP 結果は定性的に LOH の存在を示すにとどまるが、マイクロアレイを用いることにより比較的簡便に確認することが可能である。マイクロサテライト多型では LOH が存在する範囲を正確に捉えることが困難である点が短所といえるが、一方で 6 番染色体全体のどの領域に LOH が存在するか広く捉えるのに利点がある。一方、申請者らが開発した次世代シーケンシング (NGS) による HLA DNA タイピング法 (SS-SBT 法) では、HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 遺伝子全領域 (プロモーター・エンハンサー領域から 3' 側非翻訳領域) を PCR 法で DNA 増幅させ、その後次世代シーケンサーにより塩基配列を解読し、その情報からアリル判定を行うものである。この手法では、HLA アリルごとに塩基配列を高解像度で決定することから、LOH を起こしている HLA 遺伝子を定

性的に特定することができ、さらに両アリル間の塩基配列量の比較から、LOH クローンを定量的に検出することから、経過中のLOH クローンの変遷が確認できる。本課題では、このようなLOHを定量的に明確にする手法を用いる点に斬新性があり、これまで不可能であったallo-HSCT後の再発症例に対するLOHの定量に挑戦する試みである。この手法が今後の血液悪性疾患研究やそれに基づく治療戦略にパラダイムシフトをもたらすことが期待される。

4. 研究成果

当初HLA不一致移植のみの解析を予定していたが、HLA一致・不一致移植における再発時のHLA領域LOHがSS-SBT法で検出可能かを検証した。複数再発18症例の移植前および再発時のDNAを用いた。方法は、(1)HLA領域内の8マーカーによるMS解析で、LOH症例を特定し、(2)LOHおよび非LOHの計5症例に対しSS-SBT解析を実施した。

結果、MS解析によりLOHが認められた2症例は、SS-SBT解析においてもLOHが確認され、同時に消失したレシピエント固有アリルを特定した。

HLA一致症例においては、ヘテロにおけるアリルリード数の比率に偏りが認められ、片側アリルがLOHを生じた可能性が示唆された。また、LOH有無の特定率は、MS解析では33%であるのに対し、SS-SBT法では100%であった。

以上により、本法がAllo-HSCTのHLA不一致のみならず一致症例においても新規LOH解析ツールとして有用であることが明らかになった。従来法においてはHLA一致症例のLOHを評価する事は非常に困難であること、からして、本手法は、従来法に比べ、より高確率でLOHの検出が可能である。

また、再発時のHLA領域のLOHがHLAの一致・不一致に関わらず広く出現している反応である事もうかがえた。このことを確認するために、さらなる症例の解析を現在行っており、論文として報告予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

(1)Hara Ryujiro, Onizuka Makoto, Matsusita Erika, Kikkawa Eri, Nakamura Yoshihiko, Matsushita Hiromichi, Ohgiya Daisuke, Murayama Hiromichi, Machida Shinichiro, Ohmachi Ken, Shirasugi Yukari, Ogawa Yoshiaki, Kawada Hiroshi, Ando Kiyoshi. NKG2D gene polymorphisms are associated with disease control of chronic myeloid leukemia by dasatinib. Int J Hematol 2017;106(5) 666-674.

(2) Machida S, Onizuka M, Toyosaki M, Aoyama Y, Kawai H, Amaki J, Hara R, Ichiki A, Ogawa Y, Kawada H, Ando K. Danaparoid reduces the incidence of hematopoietic stem cell transplantation-associated thrombotic microangiopathy. Bone Marrow Transplantation 2017;52(2) 307-309. 3

(3) Onizuka Makoto, Matsushita Hiromichi, Machida Shinichiro, Toyosaki Masako, Amaki Jun, Aoyama Yasuyuki, Miyamoto Mitsuki, Ando Kiyoshi. Bacterial Pneumonia-induced Persistent Remission of Severe Immune Thrombocytopenia after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Internal Medicine 2016;55(2) 179-18

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
該当無し

6. 研究組織

(1)研究代表者
青山 泰之 (AOYAMA, Yasuyuki)
東海大学・医学部・助教
研究者番号：50648475

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者
鬼塚 真仁 (ONIZUKA, Makoto)

東海大学・医学部・准教授
研究者番号：80366012
椎名 隆 (SHINA, Takashi)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：00317744
吉川 枝里 (KIKKAWA, Eri)
東海大学・医学部・特定研究員
鈴木 進悟 (SUZUKI, shingo)
東海大学・医学部・特定研究員