

令和 2 年 12 月 14 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16129

研究課題名（和文）本邦の血液疾患におけるKIR genotypeの意義の検討

研究課題名（英文）Clinical implication of KIR genotype in Japanese patients with hematological disorders

研究代表者

田中 紀奈（Tanaka, Norina）

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：90621475

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：80人のMDS患者のKIR genotypeを分析し、活性型KIR（aKIR）遺伝子数がAMLへの進行と生存に及ぼす関係を調べた。aKIRの数が低値（0または1）の患者は30人（37.5%）、高値（2以上）は50人（62.5%）だった。IPSS低リスクMDS患者において、2つ以上のaKIR遺伝子の存在は、AMLへの移行のリスク（HR 4.38 [1.63-15.21]；P = 0.0022）、全生存率（HR3.91 [1.45-13.66]；P = 0.0057）の独立した予測因子であった。KIR genotypeがMDS患者の臨床転帰に影響を与え、予後因子となりうることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NK細胞の調節に関わるKiller immunoglobulin-like receptor (KIR)の遺伝学的多型が血液疾患の予後に及ぼす影響はまだ十分に解明されていない。また人種差も想定される中で本邦の報告は極めて少ない。今回、活性型KIRの数が本邦の骨髄異形成症候群患者における予後因子となりうることを解明した。

研究成果の概要（英文）：KIR genotype was analyzed in 80 MDS patients using the KIR genotyping sequence-specific primers kit. We investigated the variation of activated KIR (aKIR) gene content and haplotype in MDS and their relationship with progression to AML and survival. Low (0 or 1) and high (2 or more) aKIR contents were shown in 30 patients (37.5%) and, 50 patients (62.5%). We investigated impact of variations of KIR on survival and leukemic transformation by using Cox proportional hazards model. In patients with IPSS low-risk group, the presence of high aKIR content independently predicted a higher risk of progression to AML (HR 4.38 [1.63- 15.21]；P = 0.0022) and worse overall survival (HR3.91 [1.45-13.66]；P = 0.0057), compared with low aKIR content. Our present results demonstrated that KIR genotype affects clinical outcomes in MDS patients, suggesting its usefulness as a prognostic factor.

研究分野：血液内科学

キーワード：KIR genotype Myelodysplastic syndrome Natural killer cell IPSS

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究当初の背景

Natural Killer (NK)細胞は抗腫瘍免疫を担うが、その機能調節には多様な分子が関与する。その中で重要な役割を果たす Killer immunoglobulin-like receptor (KIR)と HLA は、遺伝学的多型に基づいた機能の多様性があることが知られている。さらに、それぞれの多型の組み合わせにもとづきシグナル伝達の強度に差が生じ、各種癌の治療効果や予後と関連することが報告されている。一方、KIR genotype が各血液腫瘍の治療効果や予後に及ぼす影響については一定の結論には至っていない。また、人種差が想定される中で、日本人に関するデータは極めて少ない。血液疾患の中で腫瘍免疫の関与する病態において KIR 遺伝学的多型を解析し、活性化シグナルの強い KIR の組み合わせと、抑制性シグナルの強い組み合わせの間では予後や治療効果に差が生じるのか、最適な治療を組み合わせにより選択できるかという問いに取り組んだ。

2. 研究の目的

本研究の目的は、本邦の血液疾患において KIR genotype を解析し、治療効果や生存との関連を解明することであり、最適な治療法選択のための手がかりとなるかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

【患者】 東京女子医科大学病院血液内科に通院または入院中の血液疾患患者を対象とする。すでに治療を受けている患者、これから受ける患者いずれでも検査可能である。新規に採取が困難な患者は保存検体を用いることとする。選択基準は 年齢が 16 歳以上の患者 臨床的に血液疾患と診断されている患者 本研究の参加にあたり十分な説明を受けた後、患者本人または代諾者による文書同意が得られた患者とする。除外基準は 精神症状を有する患者 その他、研究責任者が被験者として不適当と判断した患者とする。

(1) 主要評価項目：疾患別の KIR genotype の頻度

(2) 副次的評価項目：KIR genotype と治療成績の関連性(治療反応率、無病生存率、全生存率、治療経過)

(3) 検体の採取

- ・ 全血 10ml：通常の診療に必要な血液検査と同時に 1 回 10ml の血液採取を行った。
- ・ 生検時残検体：上記検体の採取が困難な場合は通常の診療で行われた生検（リンパ節生検や骨髓生検・吸引生検）検査時の残検体を用いた。

【KIR genotyping】

EDTA2K 容器を使用し全血 10ml 採取し、LymphoPrep™ (Alere Technologies AS)を用いて単核球分離、QIAamp Blood mini kit (QIAGEN)を用いて DNA の抽出をおこなった。NanoDROP2000c™ (Thermo Fisher Scientific) をもちいて DNA 濃度を測定し、最終濃度 75-125ng/μL となるよう調整した。PCR 解析は KIR Typing Kit(miltenyibiotec)を使用した。Resuspension Buffer をゲノム DNA と混合し、96 ウェル KIR Typing PCR プレートのウェルに分注した(1 検体 22well)。Thermal cycler は BIO RAD T100 を使用した。

<profile> Step 1:1 cycle 95 60s , Step 2:28 cycles for genomic DNA (94 20s, 63 20s, 72 90s) , HOLD 4 Mupid-2plus (Mupid)を用いて 2%アガロースゲルに電気泳動を行い UV 撮影した。ゲル電気泳動結果の解釈はキットの評価表を用い、予想サイズの KIR 特異的 PCR 産物について、下記の各レーン(1~19)を調べ、陽性判定をおこなった。1)2DL1, 2) 2DL2, 3) 2DL3, 4) 2DL4, 5) 2DL5aII (2DL5A,2DL5B),6)2DL5A, 7) 2DL5B, 8) 2DS1, 9)

2DS2, 10) 2DS3, 11) 2DS4del, 12) 2DS4ins, 13) 2DS5, 14) 3DL1, 15) 3DL2, 16) 3DL3, 17) 3DS1, 18) 2DP1, 19) 3DP1, 20) Genomic DNA control, 21) β actin, 22) Negative Control
 下記の common haplotypes を参考に haplotype group を分類した。また、aKIR の数が 2 以上を high aKIR content とし、1 以下を low aKIR content として解析をおこなった。

Haplo type group	Motif		Centeromeric resion									Telomeric region					
	Cen	Tel	3DL 3	2DS 2	2DL 2/3	2DL 5B	2DS 3/5	2DP 1	2DL 1	3DP 1	2DL 4	3DL1/ S1	2DL 5A	2DS 3/5	2DS 1	2DS 4	3DL 2
A	A1	A1															
	B2	A1															
B	B1	A1															
	A1	B1															
	B2	B1															
	B1	B1															
	B1	B1															

 haplotypeA
 haplotypeB

<臨床情報> 電子カルテと当科データベースを用いて情報を収集した。

【統計解析】 生存解析においては、 Kaplan-Meier 法にて生存曲線を作成し、統計学的比較は Log-rank 検定にて行った。さらに、コックス比例ハザードモデルを用いた単変量解析と多変量解析をおこない、ハザード比を算出した。診断から理由に関わらず死亡までの期間を Overall survival (OS)、診断から白血病への移行までを期間を Progression free survival (PFS) と定義した。

4. 研究成果

当初 骨髄異形成症候群 (MDS)、 Methotrexate-associated lymphoproliferative disorders (MTX-LPD)、 B 細胞性リンパ腫、 多発性骨髄腫の 4 疾患を KIR の解析の候補とし、最終的に骨髄異形成症候群 (MDS) と、Methotrexate-associated lymphoproliferative disorders (MTX-LPD) について症例の蓄積と解析を行った。MDS の結果について報告する。

【骨髄異形成症候群】

当院で 1999 年 5 月から 2016 年 6 月までに当院で診断された骨髄異形成症候群患者 80 人について、保存細胞から DNA を抽出し、KIR 遺伝子の typing をおこなった。患者の背景は Table 1. に示す。

IPSS low と Int-1 を低リスク群 (n=58) と定義し、Int-2 と高リスク群 (n=22) と定義して解析した。また、aKIR の数が 2 以上の症例を High aKIR content (n=50)、0 または 1 の症例を Low aKIR content (n=30) と定義した。

KIR phenotype の頻度は table2 に示しており、日本人の一般的な頻度 (Miyashita et al. Arthritis Rheum 54(3): 992-997. 2006) と比較してほぼ同様であった。

Table1. Patients characteristics

		N=80
Age,y	<70	48
	>70	32
Sex	Female	31
	Male	49
WHO	RCUD-RA	9
	RARS	7
	RCMD	41
	RAEB-1	7
	RAEB-2	8
	therapy-related MDS	2
	MDS with isolated del(5q)	2
	AML transformed from MDS	3
IPSS	MDS/MPN	1
	Low	25
	Int-1	33
	Int-2	17
No.of aKIR	High	5
	0 or 1	30
	≥2	50

Table2. KIR phenotype frequency

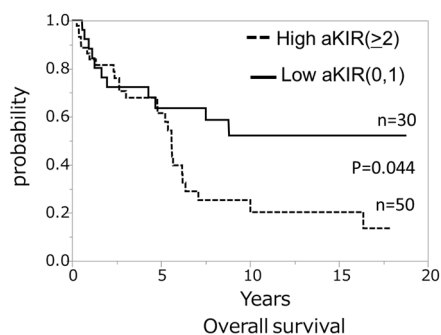
allele	phenotype frequency(%)
2DL1	98.8
2DL2	17.3
2DL3	98.8
2DL4	100
2DL5a11	39.5
2DL5A	23.5
2DL5B	28.4
2DS1	38.3
2DS2	18.5
2DS3	17.3
2DS4del	34.6
2DSins	77.8
2DS5	24.7
3DL1	67.9
3DL2	98.8
3DL3	100
3DS1	35.8
2DP1	98.8
3DP1	100

aKIR 数が 0S に及ぼす影響についてカプラン-マイヤー曲線を Fig1a に示す。High aKIR content 群は Low aKIR content 群と比較して、有意に 0S の低下がみられた ($P=0.044$)。次に PFS (診断から白血病への移行または死亡まで) においても、0S と同様に aKIR の数で解析をおこない、有意差を認めた ($P=0.022$, Fig2a)。

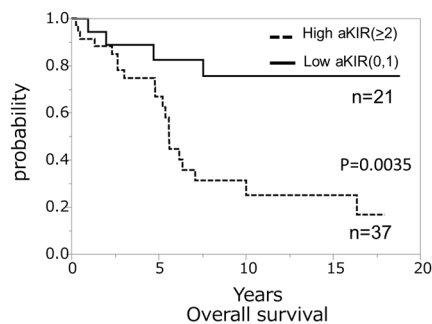
さらに aKIR の影響を正確に把握するため、IPSS の低リスク群と高リスク群に分けてサブ解析を行った。IPSS 低リスク群において $P=0.0035$ と、aKIR による 0S の影響はさらに強くみられた (Fig1b)。それに対して、IPSS 高リスク群は差がみられなかった (Fig1c)。PFS においても同様の結果であった (Fig 2b,c)。

Fig 1. Overall survival, High aKIR group vs. Low aKIR group

a.All patients



b. Patients in IPSS Low risk group



c. Patients in IPSS High risk group

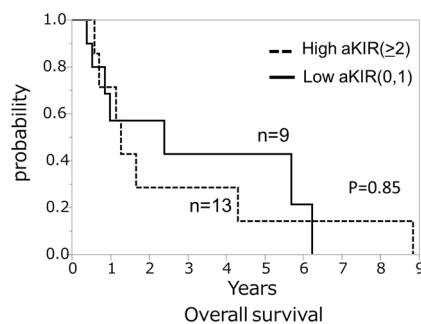
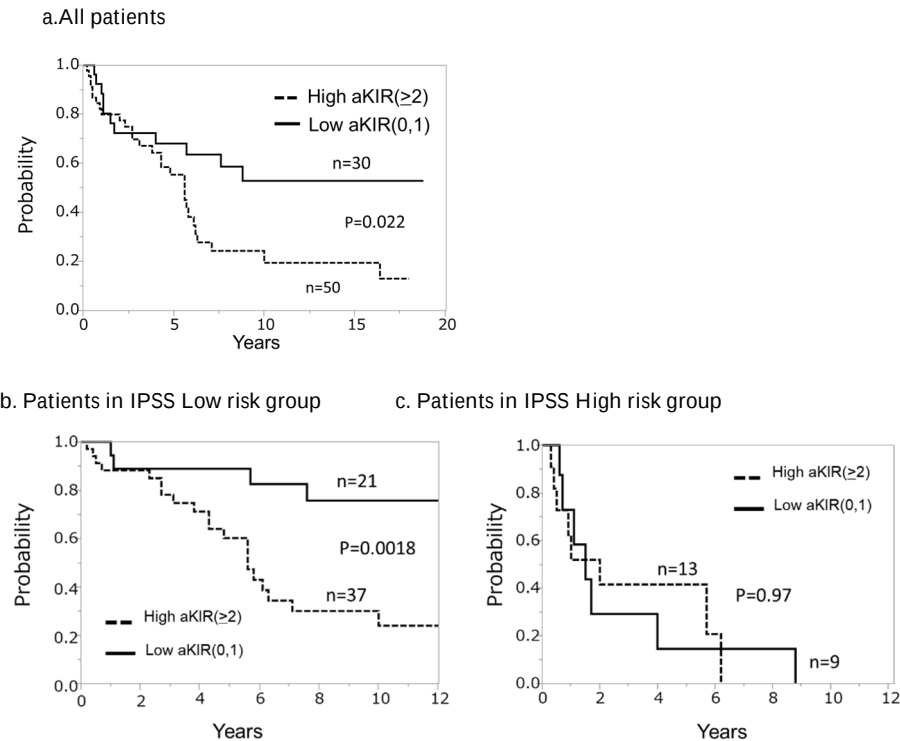


Fig2. Progression free survival, High aKIR group vs. Low aKIR group



また、OS・PFSに影響を及ぼす可能性のある4つの項目(年齢、性別、IPSS、aKIRの数)についてコックス比例ハザードモデルを用いて単変量解析と多変量解析をおこなった。

OSについては単変量解析において年齢(70歳以上)(HR, 2.12; 95%CI, 1.09-4.19; $P = 0.03$)、IPSS 高リスク群(HR, 4.26; 95%CI, 2.08-8.43; $P = 0.0001$)、High aKIR content (HR, 2.04; 95%CI, 1.03-4.34; $P = 0.04$)が有意にOS低下に影響した。多変量解析では年齢(70歳以上)(HR, 2.12; 95%CI, 1.07-4.29; $P = 0.0306$)とIPSS 高リスク群(HR, 4.62; 95%CI, 2.25-9.28; $P < 0.0001$)で有意差がみられ、High aKIR content (HR, 1.78; 95%CI, 0.88-3.85; $P = 0.11$)には統計学的有意差は認められないもののOS低下と関連する傾向がみられた。

PFSについては単変量解析において年齢(70歳以上)(HR, 1.99; 95%CI, 1.5-3.84; $P = 0.036$)、IPSS 高リスク群(HR, 4.18; 95%CI, 2.09-8.14; $P < 0.0001$)、High aKIR (HR, 2.22; 95%CI, 1.13-4.68; $P = 0.02$)が有意にPFS低下と関連することが示された。多変量解析においても年齢(70歳以上)(HR, 1.97; 95%CI, 1.02-3.87; $P = 0.043$)、IPSS 高リスク群(HR, 4.5; 95%CI, 2.24-8.9; $P < 0.0001$)、High aKIR (HR, 2.0; 95%CI, 1.0-4.29; $P = 0.049$)が有意にPFS低下と関連することが示された。

さらにIPSSのリスク別に評価した結果、IPSS 低リスク骨髓異形成症候群患者において、2つ以上のaKIR遺伝子の存在は、単変量解析においてOS(HR4.41 [1.65-15.28]; $P = 0.0021$)、PFS(HR 4.75 [1.78~16.41]; $P = 0.0011$)、多変量解析においてもOS(HR3.91 [1.45-13.76]; $P = 0.0057$)、PFS(HR 4.38 [1.63~15.21]; $P = 0.0022$)と独立した予測因子であることがわかり、IPSS 低リスク患者の中でもaKIR数によって層別化することで予後不良な患者が抽出されることが示唆された。MDSの病態は幹細胞の異常のみならず、免疫学的機序が関わっていると考えられている。芽球の増加や予後不良な染色体異常のない、低リスクのMDS患者にとって、活性型KIRを多く持つことがMDSの進行に関与する可能性がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1 . 発表者名 Norina Tanaka, Yan-Hua Wang, Masayuki Shiseki, Junji Tanaka
2 . 発表標題 CLINICAL SIGNIFICANCE OF KIR GENOTYPE IN JAPANESE PATIENTS WITH MYELODYSPLASTIC SYNDROME
3 . 学会等名 24th Congress of European Hematology Association(EHA) (国際学会)
4 . 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----