

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17406

研究課題名(和文) 同種移植後、液性免疫回復の評価と適切な指標の構築

研究課題名(英文) Construction of Appropriate Indicators for Evaluating Humoral Immune Recovery After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation

研究代表者

木村 俊一 (Kimura, Shun-ichi)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70623031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：同種移植後の液性免疫回復の指標である免疫グロブリン(IgG) B細胞受容体の多様性(レパトア)を解析し、莢膜を有する細菌(肺炎球菌、インフルエンザ桿菌など)による感染症との関連を検討した。患者群ではB細胞受容体の多様性を規定するVariable遺伝子(IGHV)においてIGHV3-11とIGHV4-59といった特定の遺伝子の使用の減少がみられた。また、患者群と対照群で抗原ペプチドと結合する部分(IGHV-CDR3)のアミノ酸長や多様性に違いがみられた。IGHVの遺伝子の使用頻度やIGHV-CDR3でのアミノ酸長の変化や多様性の低下が感染症発症に関連している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同種移植後の液性免疫の回復と感染性合併症、特に液性免疫不全がリスクとなる肺炎球菌、インフルエンザ桿菌などの莢膜を有する細菌との関連について、B細胞受容体レパトアを解析して検証した。本研究の結果が、これらの莢膜を有する細菌に対する易感染性のメカニズムを明らかにする重要なデータとなるとともに、この研究内容をさらに発展させていくことで、これらの感染症に有効な特定の免疫グロブリン製剤の製造やワクチンの開発などにつながる可能性がある。さらに同種移植後の液性免疫の状態を正確に評価する指標の構築にもつながる結果になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The objective was to clarify the features of IgG B-cell receptor (BCR) repertoire diversity among patients with and without infections caused by encapsulated bacteria such as *S. pneumoniae* and *H. influenzae* after allogeneic HCT. The frequency of the usage of IGHV3-11 ( $P = 0.012$ ) and IGHV4-59 ( $P = 0.04$ ) were significantly lower in Pt. The length of amino acids (AA) in IGHV-CDR3 of all clones seemed to be symmetrically distributed, and the most frequently observed AA length was 16 (13.7%) followed by 17 (11.2%). In Rep, 17AA (17.7%) and 21AA (16.7%) were mainly used while the frequency of 16AA was low (4.4%). Apparently, the decreased diversity in the AA motifs in 17AA and 21AA in Rep was observed. The decreased usage of IGHV3-11 and IGHV4-59, and the change in frequency of AA length and its decreased diversity in IGHV-CDR3 might be associated with the increased vulnerability to encapsulated bacteria.

研究分野：造血細胞移植

キーワード：IgG B細胞受容体レパトア 肺炎球菌 インフルエンザ桿菌 莢膜を有する細菌 IGHV IGHV-CDR3 液性免疫

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

同種移植後の B 細胞、液性免疫の再構築は感染防御や慢性 GVHD に関与することが知られている。一般診療においては液性免疫の指標として免疫グロブリン定量、B 細胞数、特異的な病原体に対する抗体価やワクチンに対する反応などが用いられている。より最近では、B リンパ球のサブセット解析、KREC (kappa-deleting recombination excision circle)、B 細胞受容体レパトアなどを用いた研究も報告されているが、同種移植後の免疫再構築における臨床的な意義に関する研究の数は少ない。さらに、日常診療で用いられるパラメーターとこれらの新しいパラメーターが相互にどのように関連しているかを詳細に検証した研究は限られている。同種移植後の液性免疫の再構築を B 細胞受容体レパトアを含む、さまざまなパラメーターを用いて評価し、相互の関連を検証するとともに、感染症や慢性 GVHD などの臨床経過との関連を検証することで、よりの確な液性免疫能の評価方法を構築するための基礎データを打ち立てることができると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では同種移植後の液性免疫の再構築に焦点をあて、特に液性免疫不全がリスクとなる肺炎球菌やインフルエンザ桿菌による感染症の発症と、B 細胞受容体の多様性をみる BCR レパトアとの関連について明らかにすることを研究目的とした。

## 3. 研究の方法

同種移植後の IgG B 細胞受容体レパトアと肺炎球菌、インフルエンザ桿菌などの莢膜を有する細菌感染症との関連について、患者同意のもと同種移植後に定期的に保存を行っている末梢血単核球の保存検体を用いて研究を実施した。B 細胞受容体レパトア解析は、レパトアジェネシス社と共同で、次世代シーケンサーを用いて、IgG 重鎖の解析を実施した。B 細胞受容体遺伝子において Variable (IGHV)、Diversity (IGHD)、Joining (IGHJ)、Constant (IGHC) および相補性決定領域 (complementarity determining region 3; CDR3) シークエンスの使用状況を検討した。

当科で同種移植後に莢膜を有する細菌による感染症を発症した 10 例を患者群に設定、疾患、ドナーソース、移植方法などの背景を合わせた対照群 10 例を選定した (表 1)。10 例のうち 7 例が肺炎球菌による感染症、3 例がインフルエンザ桿菌による感染症であった。患者群における感染症の発症は移植後の中央値で 385 日 (範囲、169-1007 日) でみられた。患者群はさらに、繰り返し感染症を起こした 5 症例 (Repeated 群) と 1 回のみ 5 症例 (One-episode 群) に分類した。B 細胞受容体レパトア解析は対照群では移植後半年、1 年の 2 回、患者群では感染症発症時の検体を用いて実施した。

## 4. 研究成果

B 細胞受容体レパトアの多様性指数であるシャノン指数は対照群 [6 か月]、One-episode 群、Repeated 群で有意差はみられなかった ( $7.94 \pm 1.31$  vs.  $8.31 \pm 1.06$  vs.  $6.17 \pm 2.95$ ,  $P = 0.16$ )。しかし、6 か月頃に発症した 2 例 (P2、P3) ではシャノン指数が非常に低値であった (P2  $3.602$ 、P3  $2.531$ )。これらの症例はいずれも繰り返し感染症群であった。対照群において移植後半年と 1 年で比較検討したが、有意差はみられなかった (6 か月  $7.94 \pm 13.1$  vs. 1 年  $8.44 \pm 0.45$ ,  $P = 0.42$ )。

IGHV に着目すると、IGHV3-11 (0.7% vs. 1.53%,  $P = 0.012$ )、IGHV4-59 (2.73% vs. 4.78%,  $P = 0.04$ ) の使用が対照群と比較して患者群で有意に少なく、さらに Repeated 群、One-episode 群、対照群の順で増加した (IGHV3-11, 0.43 vs. 0.97 vs. 1.53%,  $P=0.02$ ; IGHV4-59, 2.17 vs. 3.28 vs. 4.78%,  $P=0.092$ ) (図 1)。P2 と P3 では IGHV3-11 (P2 0.01%、P3 0.02%)、IGHV4-59 (P2 1.12%、P3 0.01%) はとりわけ低値であった。IGHD では 1%以上の頻度で使用されている遺伝子の中で患者群、対照群の比較で有意差のある遺伝子はみられなかった。IGHC においても両群間で使用頻度に差のある遺伝子はみられなかった。IGHJ では、IGHJ2 の使用が対照群と比較して患者群で有意に少なく (2.74% vs. 5.14%,  $P = 0.017$ )、Repeated 群、One-episode 群、対照群の順で増加した (1.67% vs. 3.81% vs. 5.14%,  $P = 0.041$ )。P2 と P3 ではとりわけ低値であった (P2 0.03%、P3 0.03%)。

IGHV-CDR3 のアミノ酸長に着目すると、全体のクローンは正規分布しており、最も多いのがアミノ酸長 16 (16AA) (13.7%) で、17AA (11.2%)、14AA (11.1%) がそれに続いた (図 2)。対照群、One-episode 群とも 16AA の頻度が最も高かったが、Repeated 群では 17AA (17.7%) と 21AA (16.7%) の頻度が高く、16AA (4.4%) は極端に低いという特徴がみられた。Repeated 群で使用頻度の高い 17AA、21AA の AA モチーフを確認すると、Repeated 群で多様性の低下がみられた (図 3、図 4)。

これまでの結果をまとめると、患者群、対照群の全体の比較では B 細胞受容体レパトアの多様性指数に有意差はみられなかったが、6 か月と比較的早期に発症した患者群で多様性指数が非常

に低値の症例が 2 例 (P2、P3) みられた。IGHV の遺伝子プロファイルにおいて、IGHV3-11 と IGHV4-59 の使用頻度が Repeated 群 < One-episode 群 < 対照群の順で増加し、特に P2、P3 でとりわけ低値であった。IGHV-CDR3 のアミノ酸配列の解析では全体では 16AA が最多であったが、Repeated infection 群で 16AA の割合が割合が非常に低く、割合の多かった 17AA、21AA では多様性の低下がみられた。

以上の結果から、移植後半年までに BCR repertoire 多様性指数の乏しい群では、莢膜を有する細菌の感染症に罹患しやすくなる可能性はあるが、回復していても発症する症例はみられており、それ以外のリスク因子も存在することが考えられる。IGHV3-11 や IGHV4-59 は抗原結合能、免疫グロブリン受容体結合能を活性化する働きがあり、免疫反応、生体防御反応の活性化におけるいくつかのプロセスで作用していると想定されており、その発現が低下することは、莢膜を有する細菌による感染症のリスクを高める可能性がある。Repeated infection 群の IGHV-CDR3 のアミノ酸配列では Control 群、One-episode 群と比較してアミノ酸長の分布が異なり、16AA が少なく、頻度の多い 17AA、21AA での多様性の低下がみられることから、これらの変化が易感染性につながっている可能性がある。

本研究の結果は、肺炎球菌やインフルエンザ桿菌などの莢膜を有する細菌に対する易感染性のメカニズムを明らかにする重要なデータとなるとともに、この研究内容をさらに発展させていくことで、これらの感染症に有効な特定の免疫グロブリン製剤の製造やワクチンの開発などにつながる可能性がある。さらに同種移植後の液性免疫の状態を正確に評価する指標の構築にもつながる結果になると考えられる。

図 1

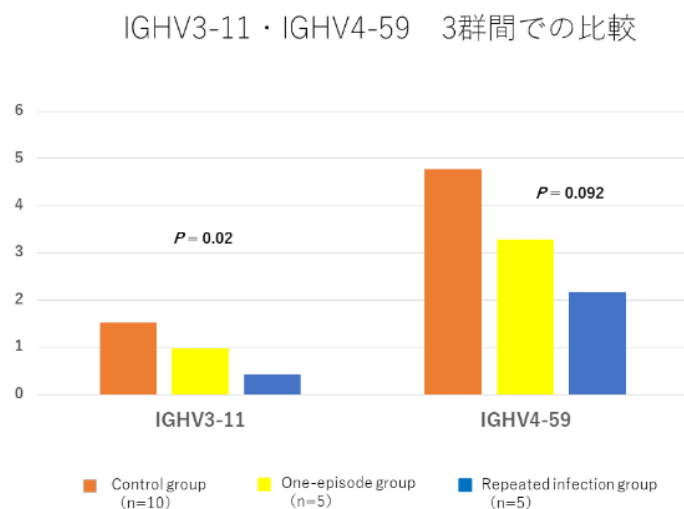


図 2

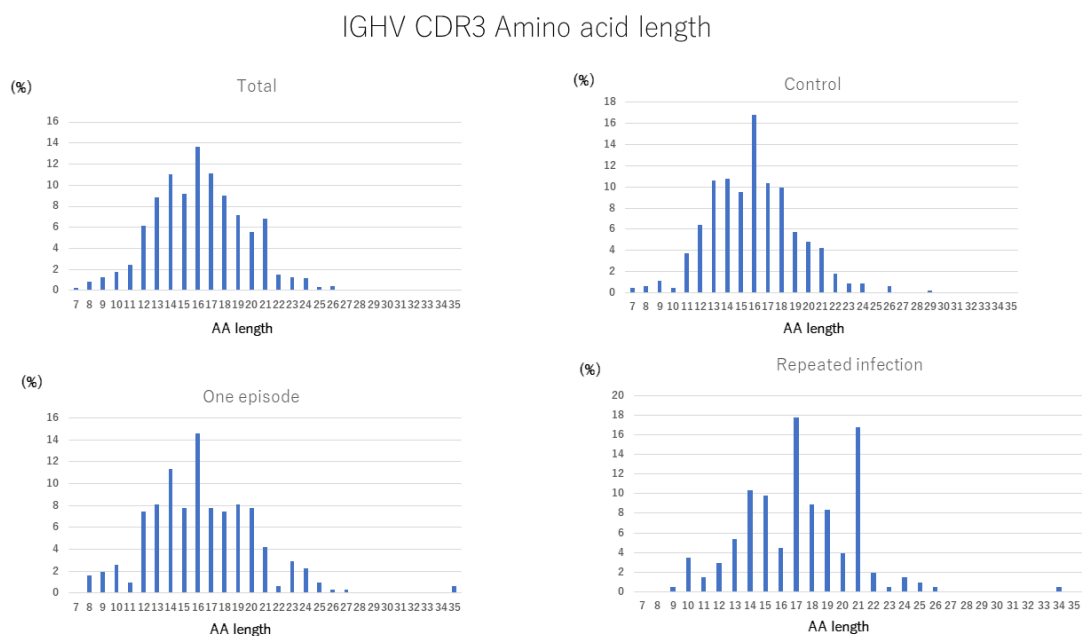


図 3

IGHV-CDR3のアミノ酸長と感染症発症状況に応じたアミノ酸モチーフ (同一クローン削除)

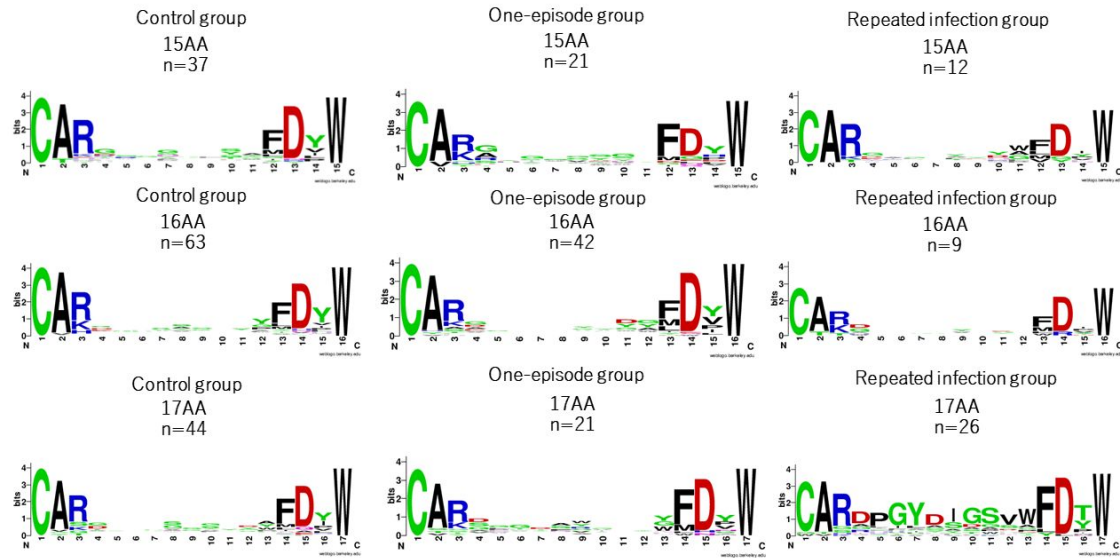


図 4

14AA、21AAでの検討 (同一クローン削除)

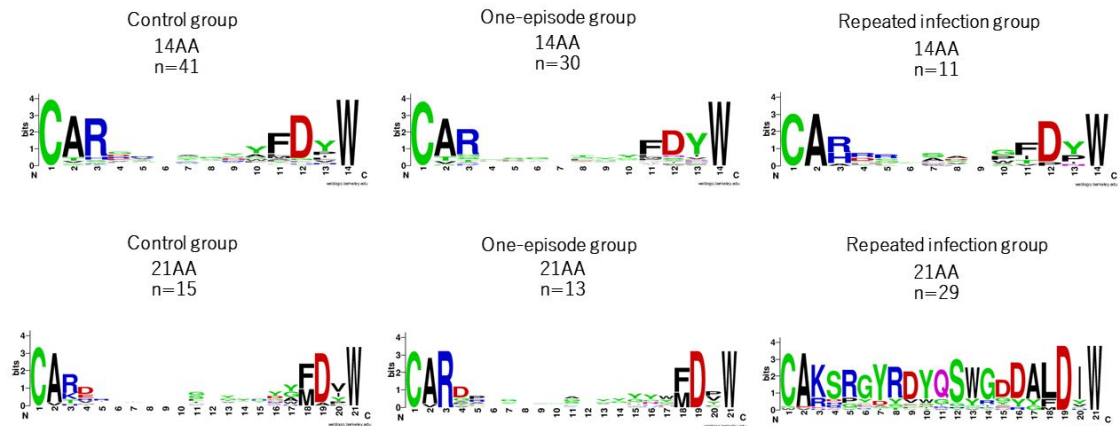


表 1 症例一覽

Patients with infection caused by encapsulated bacteria										Control group without infection caused by encapsulated bacteria						
No.	Age	Sex	Disease	Disease Risk	Donor	MAC/RI C	Pathogens	Days after HCT	Repeated infection	No.	Age	Sex	Disease	Disease Risk	Donor	MAC/RI C
P1	64	M	ALL	Standard	MUD	RIC	<i>S. pneumoniae</i>	385	Yes	C1	60	M	ALL	Standard	MUD	RIC
P2	35	F	ALL	Standard	MUD	MAC	<i>S. pneumoniae</i>	210	Yes	C2	38	M	AML	Standard	MMUD	MAC
P3	40	F	CML	Standard	MMUD	MAC	<i>S. pneumoniae</i>	169	Yes	C3	58	M	MDS	Standard	MMUD	RIC
P4	40	F	ALL	Standard	MUD	MAC	<i>S. pneumoniae</i>	691	Yes	C4	47	F	ALL	Standard	MUD	MAC
P5	55	M	AML	High	MUD	MAC	<i>S. pneumoniae</i>	405	No	C5	48	M	AML	High	MUD	MAC
P6	43	M	AML	Standard	MUD	MAC	<i>H. influenzae</i>	502	No	C6	42	F	AML	Standard	MUD	MAC
P7	44	M	AML	Standard	MUD	MAC	<i>H. influenzae</i>	196	No	C7	38	F	AML	Standard	MUD	MAC
P8	33	F	AML	Standard	MRD	MAC	<i>S. pneumoniae</i>	609	No	C8	28	F	AML	Standard	MRD	MAC
P9	66	M	AML	Standard	MMRD	RIC	<i>H. influenzae</i>	187	No	C9	45	M	AML	Standard	MMRD	MAC
P10	53	F	NHL	High	CB	MAC	<i>S. pneumoniae</i>	1007	Yes	C10	56	M	NHL	High	CB	MAC

No., number; MAC, myeloablative conditioning; RIC, reduced-intensity conditioning; M, male; ALL, acute lymphoblastic leukemia; MUD, matched unrelated donor; F, female; AML, acute myeloid leukemia; MMUD, mismatched unrelated donor; CML, chronic myeloid leukemia; MDS, myelodysplastic syndrome; MRD, matched related donor; MMRD, mismatched related donor; NHL, non-Hodgkin lymphoma; CBT, cord blood.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究成果の発表のため、第86回日本血液学会学術集会（2024年10月）に演題登録しています（採択通知は未着）。

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------