

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 4 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591236

研究課題名（和文） 免疫関連遺伝子多型解析に基づく最適な造血幹細胞移植ドナー選択法の確立

研究課題名（英文） Establishment of optimal hematopoietic stem cell transplantation donor selection based on analysis of immune-related gene polymorphism

研究代表者

高見 昭良（TAKAMI AKIYOSHI）

金沢大学・附属病院・准教授

研究者番号：80324078

研究成果の概要（和文）：免疫関連遺伝子多型を臨床的に検討し、NKG2D、Granzyme B、HO-1、CXCL10、NLRP3、FCGR3A、IL-17、PTPN22 各遺伝子多型が、非血縁者間骨髄移植後転帰に影響することを明らかにした。さらに、実験的検討により、NKG2D、IL-17、CXCL10 が機能的多型であることを示した。このような情報は、同種造血幹細胞移植成績向上に大きく役立つと期待される。

研究成果の概要（英文）：When the impact of immune-related gene polymorphisms was examined in patients and their donors of unrelated hematopoietic stem cell transplantation, genetic variations in the NKG2D, Granzyme B, CXCL10, NLRP3, FCGR3A, IL-17, and PTPN22 genes were associated with transplant outcomes. Experimental investigation revealed that the gene polymorphisms of NKG2D, IL-17 and CXCL10 play functionally important roles in the regulation of their production. These findings suggest that determination of such gene polymorphisms prior to transplantation offer clinical benefits in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：造血細胞移植

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：遺伝子多型、免疫関連遺伝子、移植片対宿主病

## 1. 研究開始当初の背景

同種造血幹細胞移植は、白血病や再生不良性貧血・先天性免疫不全症など血液難病の根治を期待して、他人の造血幹細胞を移植する治療法である。利点として、患者自身の造血

幹細胞を移植する自家造血幹細胞移植より再発率が低い。一方、ドナーリンパ球による患者臓器への拒絶反応（移植片対宿主病 = GVHD）や重症感染症、造血幹細胞拒絶・生着不全など移植関連合併症が起こりやすい。

そのため、実際に無病生存を果たせるのは、同種移植患者の約半数である。

サイトカインや先天免疫、ガンマグロブリンレセプターなど免疫関連遺伝子には、免疫誘導能の強弱に影響する1塩基多型(SNP)が多い。そのような遺伝子多型は、自己免疫疾患やがん・重症感染症の疾患感受性や治療感受性、臓器移植の成否に影響する。同種造血幹細胞移植は、ドナー由来免疫担当細胞が、抗腫瘍効果・感染免疫・GVHDに関与する。移植後早期は、患者由来免疫担当細胞の一部も造血幹細胞拒絶・生着不全や感染免疫、急性GVHD誘導に関与する。以上から、ドナーと患者の免疫関連遺伝子多型が、同種造血幹細胞移植の成否に影響する可能性は十分に考えられる。患者・ドナーの免疫関連遺伝子多型の情報をもとに、移植関連合併症や拒絶・生着不全、再発が起こりにくいドナーを選べる、または有害事象を予測し適切に対処できるようになれば、移植成績の向上が期待できると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、同種造血幹細胞移植における免疫関連遺伝子多型の影響を検討することである。患者とそのドナーの試料を用いて、免疫関連遺伝子の多型を決定し、GVHD、再発、非再発死亡、感染症、生着不全との関連を検討する。さらに、健常人のリンパ球を用い、免疫関連遺伝子多型の機能を解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象

日本骨髄バンクを通じ実施されたHLA-A/B/C/DRB1/DPB1/DQB1 アリル一致非血縁者間同種骨髄移植患者・ドナー。1995年から2000年血液腫瘍に対する非T細胞除去初回移植652例を対象とした。

### (2) 患者・ドナー試料(DNA)と臨床情報

日本骨髄バンク検体・データ保存事業で収集された非血縁者間同種骨髄移植患者・ドナーのDNAおよび臨床情報を使用した。

### (3) SNP解析

SNP genotyping probe (Applied Biosystems)とTaqMan genotyping master mix (Applied Biosystems)を用い、TaqMan PCR法により、患者・ドナーのSNPを決定した。対象遺伝子は、NKG2D、Granzyme B、HO-1、CXCL10、NLRP3、FCGR3A、IL-17、PTPN22。PCR増幅と解析はStepOne Plus (Applied Biosystems)を使用した。PCR条件は、pre-denaturation 60℃、30秒、denaturation 95℃、10分、annealing 92℃、15秒、elongation 60℃、1分、post-elongation 60℃、30秒で行った。

### (4) 細胞準備

健常人54名(20-62歳)のヘパリン加血液からLymphoprep (AXIS-SHIELD)で末梢血単核細胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)を分離し、使用まで-80℃保存した。

### (5) 細胞培養

培養は、65℃、30分加温で非働化後の10%ウシ胎児血清(fetal bovine serum, FBS; NICHIREI BIOSCIENCES)と1% penicillin streptomycin (GIBCO) 5.5 mlを加えたRPMI (GIBCO)を用いた。植物性血球凝集素(phytohemagglutinin, PHA) 1 µg/ml存在・非存在下で、PBMCsを37℃、5% CO<sub>2</sub>で28時間培養した。

培養液を1.5 ml tubeで2,000 rpm、15 min遠心後、上清と遠沈細胞(ペレット)を分離し、解析まで-80℃保存した。

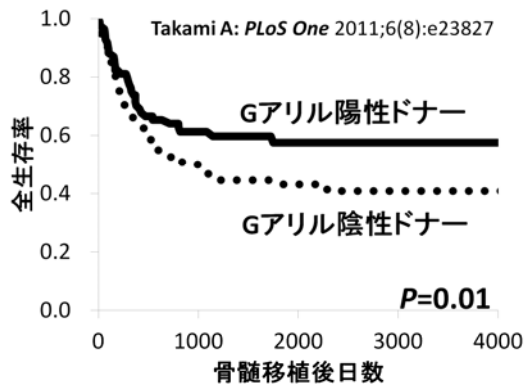


図1. ドナーグランザイムB遺伝子多型と生存率  
Gアリアル陽性ドナーの方が移植成績は良好。

#### (6) RNA抽出とcDNA作成

ペレットから、QIAGEN RNeasy Mini Kit (QIAGEN)でRNAを抽出した。さらに、SuperScriptase II RNaseH<sup>-</sup> Reverse transcriptase (Invitrogen)でcDNAを作成し、解析まで-20℃保存した。

#### (7) 遺伝子機能解析

StepOne Plus (Applied Biosystems)で定量PCRを行い、mRNA発現を定量した。試薬は Quantifast probe assay (product number: QF00288659, QIAGEN)を用いた。PCR条件は、pre-heating 95℃、3分、denaturation 95℃、3秒、annealing/extension 60℃、30秒で45サイクル行った。mRNA量補正用内部コントロールはGAPDHを用いた。培養上清の遺伝子産物を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法で定量した。試薬は Human IP-10 ELISA Kit (Ray Bio)を用いた。吸光度測定はマイクロプレートリーダー (Thermo Labsystems Multiskan JX: フナコシ)を用い、450 nmの吸光度を測定した。一部遺伝子は、ゲルシフトアッセイ、レポーター遺伝子解析を実施した。

#### (8) 統計解析

統計解析は Microsoft Office Excel 2007 と EZR を用いた。2群間比較は t 検定とウィルコクソンの符号順位検定で行った。多変量解析は Fine-Gray 比例ハザード法と Cox 比例ハザード法を用いた。単変量解析で P 値が 0.1 以下の項目を、多変量解析の項目に選んだ。両側 P 値が 0.05 以下を有意差ありとした。P 値 0.05-0.1 は有意傾向ありとした。再発低リスク疾患(低リスク群)は急性骨髄性白血病(acute myelogenous leukemia, AML)第1寛解期、急性リンパ性白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)第1寛解期、骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndrome s, MDS)、慢性骨髄性白血病(chronic myeloid leukemia, CML)慢性期、悪性リンパ腫寛解期とした。これらを除く疾患を再発高リスク疾患(高リスク群)とした。

#### (9) 倫理的事項

本研究は、日本骨髄バンクと金沢大学の倫理委員会で審査・承認を受け、実施された。

#### 4. 研究成果

以下の 8 SNP が臨床的・機能的に有用であることを明らかにした。全て国際学会や英文誌に発表し、高い評価を得た。非血縁者間骨髄移植以外の移植へ対象を上げるとともに、30-50 SNP について同様の検討を行い、同種造血幹細胞移植における免疫関連多型の影響を包括的に検討したい。

(1) NKG2D: 下流非翻訳領域の SNP 解析により、ドナー型遺伝子多型が、同種骨髄移植後生存率、移植関連死亡率に影響することがわかった。さらに、遺伝子多型が NKG2D 遺伝子発現に影響することを示した (*Haematologica* 2009 Oct;94(10):1427-34; *Blood* 2010;116(21):221a)。

(2) Granzyme B : コード領域の SNP 解析

により、ドナー型遺伝子多型が、全生存率、移植関連死亡率に影響することがわかった(*PLoS One* 2011;6(8):e23827) (図 1)。

- (3) HO-1: プロモーター領域の SNP 解析により、ドナー型遺伝子多型が、全生存率、移植関連死亡率に影響することがわかった(2011 年米国血液学会発表)。
- (4) CXCL10: 下流非翻訳領域の SNP 解析により、患者側 SNP が全生存率に影響することがわかった。さらに遺伝子多型が CXCL10 遺伝子発現に影響することを示した(2011 年米国血液学会発表)。
- (5) NLRP3: プロモーター領域の SNP 解析により、ドナー側遺伝子多型が急性 GVHD 発症に影響することがわかった(2011 年米国血液学会発表)。
- (6) FCGR3A: コード領域の SNP 解析により、患者側遺伝子多型が急性 GVHD、移植関連死亡率に影響することがわかった(*Bone Marrow Transplant* 2011 Feb;46(2):238-43)。
- (7) IL-17: プロモーター領域の SNP 解析により、患者・ドナー側遺伝子多型が、急性 GVHD 発症に影響することがわかった。さらに、遺伝子多型が IL-17 遺伝子発現に影響することを明らかにした(*Bone Marrow Transplant* 2011;46(11):1455-63; *PLoS One* 2011;6(10):e26229)。
- (8) PTPN22: プロモーター領域の SNP 解析により、ドナー側遺伝子多型が、移植後再発率に影響することがわかった(2011 年米国血液学会発表)。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 23 件)

- ① Espinoza JL, Takami A, (他 5 名). Human microRNA-1245

downregulates the NKG2D receptor in NK cells and impairs NKG2D-mediated functions.

*Haematologica*. 2012, in press, 査読有り, DOI:10.3324/haematol.2011.058529

- ② Ishiyama K, Takami A, (他 11 名). Prognostic factors for acute myeloid leukemia patients with t(6;9)(p23;q34) who underwent an allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Leukemia*. 2012, in press, 査読有り, DOI:10.1038/leu.2011.350
- ③ Ishiyama K, Takami A, (他 10 名). Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia with t(6;9)(p23;q34) dramatically improves the patient prognosis: a matched-pair analysis. *Leukemia*. 2012, in press, 査読有り, DOI:10.1038/leu.2011.229
- ④ Espinoza JL, Takami A, (他 13 名). A single nucleotide polymorphism of IL-17 gene in the recipient is associated with acute GVHD after HLA-matched unrelated BMT. *Bone Marrow Transplant*. 2011 Nov;46(11):1455-63, 査読有り, DOI:10.1038/bmt.2010.325
- ⑤ Espinoza JL, Takami A, (他 9 名). A genetic variant in the IL-17 promoter is functionally associated with acute graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation. *PLoS One*. 2011;6(10):e26229, 査読有り, DOI:10.1371/journal.pone.0026229
- ⑥ Espinoza LJ, Takami A, (他 13 名). Genetic variants of human granzyme

B predict transplant outcomes after HLA matched unrelated bone marrow transplantation for myeloid malignancies. PLoS One. 2011;6(8):e23827, 査読有り, DOI:10.1371/journal.pone.0023827

- ⑦ Takami A, (他 15 名). A single-nucleotide polymorphism of the Fcγ receptor type IIIA gene in the recipient predicts transplant outcomes after HLA fully matched unrelated BMT for myeloid malignancies. Bone Marrow Transplant. 2011 Feb;46(2):238-43, 査読有り, DOI:10.1038/bmt.2010.88
- ⑧ Espinoza JL, Takami A, (他 12 名). NKG2D gene polymorphism has a significant impact on transplant outcomes after HLA-fully-matched unrelated bone marrow transplantation for standard risk hematologic malignancies. Haematologica. 2009 Oct;94(10):1427-34, 査読有り, DOI:10.3324/haematol.2009.008318

[学会発表] (計 13 件)

- ① Espinoza L, Takami A. Resveratrol Enhances NKG2D-Mediated Cytotoxicity Against Leukemia Cells by Upregulating Both NKG2D Receptor on NK Cells As Well As NKG2D Ligands on Target Cells. 米国血液学会. 2011 年 12 月 12 日. 国際会議場 (米国)
- ② Takami A, Espinoza L. A Single Nucleotide Polymorphism in the NLRP3 Gene Is Associated with Acute Graft-Versus-Host Disease After HLA-Matched Unrelated Bone Marrow Transplantation. 米国血液学会. 2011 年 12 月 12 日. 国際会議場 (米国)
- ③ Espinoza L, Takami A. A Sequence Variation in the Promoter Region of PTPN22 Gene Predicts Relapse After HLA-Fully-Matched Unrelated Bone Marrow Transplantation for Hematologic Malignancies. 米国血液学会. 2011 年 12 月 11 日. 国際会議場 (米国)
- ④ Yano S, Takami A. Prognostic Factors of Reducing Relapse in Patients Undergoing Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation From Related Donor for Acute Myeloid Leukemia: The Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation (JSHCT) AML Working Group. 米国血液学会. 2011 年 12 月 11 日. 国際会議場 (米国)
- ⑤ Nakata K, Takami A. The Association of a Single Nucleotide Polymorphism in the Chemokine CXCL10 Gene with Transplant Outcomes After HLA-Matched Unrelated Bone Marrow Transplantation for Low Risk Hematologic Malignancies. 米国血液学会. 2011 年 12 月 10 日. 国際会議場 (米国)
- ⑥ Espinoza JL, Takami A. A minor genetic variation in the Granzyme B gene predicts relapse after HLA-fully-matched unrelated bone marrow transplantation for hematologic malignancies. 米国血液学会. 2010 年 12 月 6 日. 国際会議場 (米

国)

- ⑦ Takami A. Significant Impact of IL-17A Gene Polymorphism On Transplant Outcomes After HLA-Fully-Matched Unrelated Bone Marrow Transplantation. 米国血液学会. 2009年12月7日. コンベンションセンター (米国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高見 昭良 (TAKAMI AKIYOSHI)  
金沢大学・附属病院・准教授  
研究者番号：80324078