

令和 6 年 4 月 11 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08363

研究課題名(和文) 同種臍帯血移植後に生じる抗白血病NK細胞の解明とその生体外誘導法の検討

研究課題名(英文) Elucidation of anti-leukemic NK cells arising after cord blood transplantation and examination of their ex vivo induction methods

研究代表者

横山 寿行 (Yokoyama, Hisayuki)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：10396476

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：臍帯血移植移植(CBT)におけるKIRリガンド不適合の影響はGVHD予防薬剤によって異なることが示された。KIR2DL1リガンド不適合の生存率、再発率改善効果はカルシニューリン阻害薬とメソトレキセートを用いた場合にのみ認められ、その効果は急性骨髄性白血病に対する移植で明らかであった。また、CBT後NK細胞の遺伝子発現変化の解析では、KIR3DL1リガンド不適合かつサイトメガロウイルス再活性化を認めた例におけるNK細胞とその他のNK細胞では遺伝子発現形質が異なっていた。さらにKIRリガンド不適合の有無のみでもCBT後NK細胞発現遺伝子は変化することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は臍帯血移植の治療成績の向上に有用である。また、同種造血幹細胞移植における最大の課題である移植後再発の克服に向けた、NK細胞の利用にも活用できる知見が得られた。さらに、将来的に細胞療法としてNK細胞を活用していくにあたり、効率的なNK細胞の培養、増幅に必要な知見となり得る。今後、NK細胞による養子免疫細胞療法等の開発にも貢献できると考えられる

研究成果の概要(英文)：This study demonstrated that the impact of KIR ligand mismatch on cord blood transplantation (CBT) varies according to the GVHD prophylaxis method. Specifically, the beneficial effects on overall survival and relapse rates attributed to KIR2DL1-ligand mismatch were observed exclusively with the use of calcineurin inhibitors and methotrexate for GVHD prophylaxis. This impact was especially significant in CBTs performed for acute myeloid leukemia (AML). Furthermore, gene expression analysis in NK cells post-CBT indicated that the NK cell gene expression in CBT with KIR3DL1 ligand mismatch and cytomegalovirus reactivation were distinct from the other CBT. Additionally, the presence or absence of KIR ligand mismatch in CBT was found to be associated with changes in NK cell gene expression.

研究分野：血液内科

キーワード：臍帯血移植 NK細胞 KIRリガンド不適合 急性骨髄性白血病 移植後再発

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

同種帯血移植(CBT)は再発・難治性急性骨髄性白血病(AML)に対して広く用いられる治療法である。我々は、CBT後のサイトメガロウイルス再活性化によってAMLの再発率が低下すること、再発の減少はドナーと患者間にKiller cell Immunoglobulin-like Receptor(KIR)リガンド不適合を有するCBTのみで認められることを報告した。これらの結果は、NK細胞がCBT後の再発抑制に機能していることを示唆している。しかし、実際の検体を用い、CBT後の生体内でKIRリガンド不適合の有無によりNK細胞の状態が異なるのかについて検討を行った報告はない。

### 2. 研究の目的

KIRリガンド不適合の有無によるCBT後のNK細胞形質の違いを検討し、再発抑制に関与するNK細胞の持つ特徴を明らかにする。

### 3. 研究の方法

東北大学病院において急性骨髄性白血病(AML)、骨髄異形成症候群、急性リンパ性白血病に対し初回CBTを実施された症例を抽出し、KIRリガンド不適合の有無など臨床情報を収集する。これらの症例の内、移植後3か月目に骨髄検査を実施し、単核球の分離、凍結保存された検体から磁気ビーズ法(NK Cell Isolation Kit human, Miltenyi Biotec)を用いてNK細胞を分離し、RNA抽出(RNA purification kit, Norgen)を行う。nCounter Human Immunology V2 Panelを用いて抽出したRNAにおける免疫に関連した遺伝子の発現を測定する。KIRリガンド不適合の有無などと遺伝子発現プロファイルの関連を検討する。

### 4. 研究成果

(1) KIRリガンド不適合を有するCBTではGVHD予防にメソトレキセート(MTX)を用いた場合にのみ再発抑制効果が認められる。

CBTにおけるKIRリガンド不適合など臨床情報を収集する過程で、移植片対宿主病(GVHD)予防に用いる薬剤の種類によって、KIRリガンド不適合の影響が異なる可能性を見出した。東北大学病院での症例数では十分な評価が困難であったことから、日本造血幹細胞移植データセンターの移植登録一元管理プログラムに登録されたデータを用いて解析を進めた。その結果、KIR2DL1リガンド不適合(HLA-C2 mismatch)を有するCBTではGVHD予防にメソトレキセート(MTX)を用いた場合のみ全生存率、再発率が改善していた。一方、ミコフェノール酸(MMF)を用いた場合はその効果は認められず、その他のKIRリガンド不適合タイプにおいても生存率、再発率の改善効果は認められなかった。この効果はAMLに疾患を限定した解析でも同様であり、AML疾患リスクなどで補正を行った場合においてもMTX使用下のKIR2DL1不適合は全生存率、再発率を有意に改善させる因子であった他(図1)、非再発死亡低下させる傾向も認められた。(図2)

図1 GVHD予防法別HLA-C2不適合が全生存率に及ぼす影響

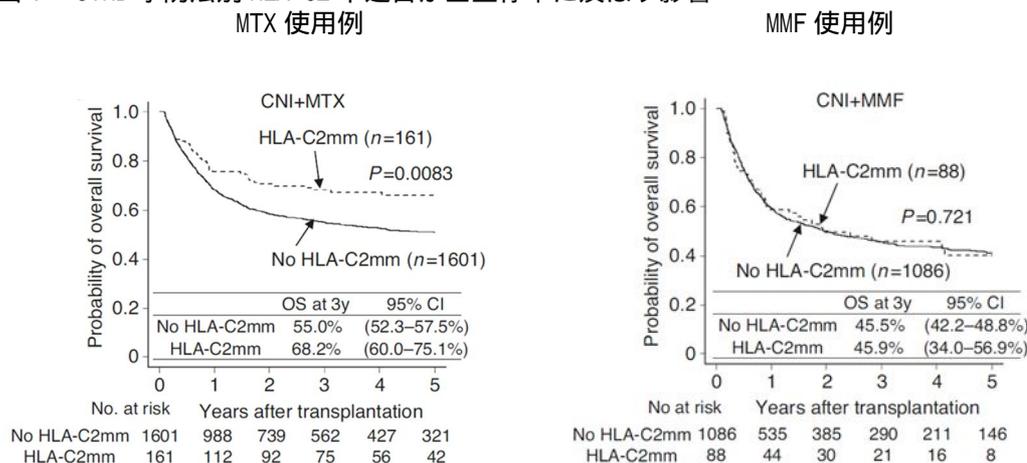
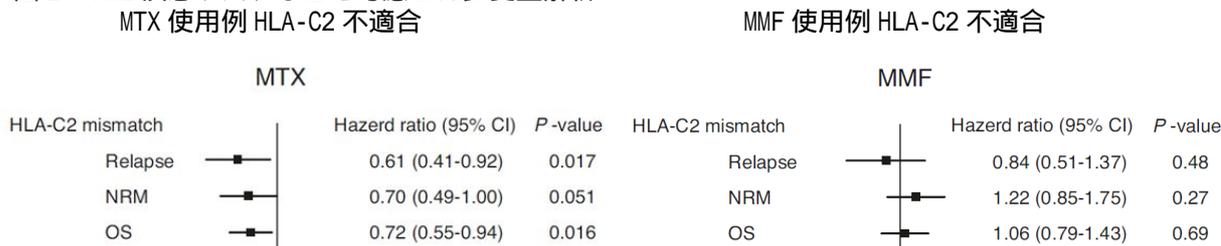


図2 AML疾患リスクなどを考慮した多変量解析



(2) KIR3DL1 リガンド不適合かつ CMV 再活性化を認めた例における NK 細胞遺伝子発現変化  
 移植後 3 か月以内に CMV 再活性化を認めた例の内、KIR3DL1 リガンド不適合を認めた例は 6 例であった。この 6 例と、その他 30 例の移植後 3 か月 NK 細胞遺伝子発現の比較を行ったところ、多重検定を調整した P 値では有意とはならなかったものの LEF1、IL-18、CCR1、TNFRSF11A、NCAM1 といった遺伝子発現が亢進し、HLA-DRB1、TFRC といった遺伝子の発現は低下していることが示唆された(図3)。新たに見出した、KIR2DL1 リガンド不適合と MTX 予防後の NK 細胞遺伝子発現についても解析を試みたが、検体が残っている移植例が少なく十分な解析ができなかった。また、KIR2DL1 リガンド不適合、KIR3DL1 不適合の有無による NK 細胞遺伝子発現プロファイルと比較したところ図4のように NK 細胞遺伝子発現変化を認め、特に KIR3DL1 リガンド不適合では有意に TCF4、HLA-DR、GPR183 などの遺伝子が変動していることが示された。

図3 CMV 再活性化かつ KIR3DL1 リガンド不適合ありの例における NK 細胞遺伝子発現変化

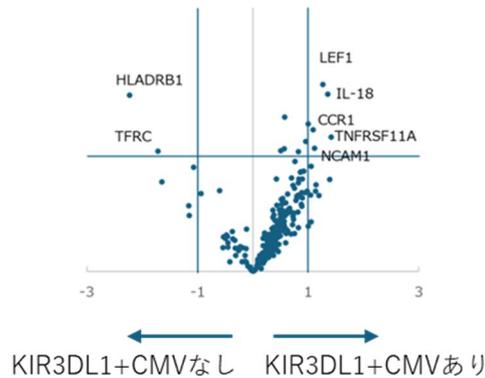
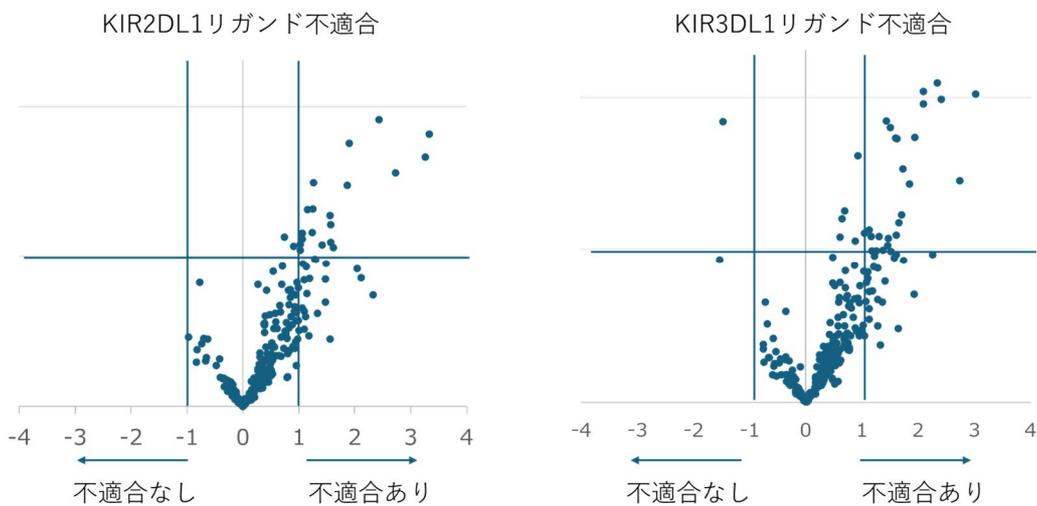


図4 KIR リガンド不適合の有無と NK 細胞遺伝子発現変化



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yokoyama Hisayuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Role of NK cells in cord blood transplantation and their enhancement by the missing ligand effect of the killer-immunoglobulin like receptor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fgene.2022.1041468	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yokoyama H, Kanaya M, Iemura T, Hirayama M, Yamasaki S, Kondo T, Uchida N, Takahashi S, Tanaka M, Onizuka M, Ozawa Y, Kozai Y, Eto T, Sugio Y, Hamamura A, Kawakita T, Aotsuka N, Takada S, Wake A, Kimura T, Ichinohe T, Atsuta Y, Yanada M, Morishima S	4. 巻 57
2. 論文標題 Improved outcomes of single-unit cord blood transplantation for acute myeloid leukemia by killer immunoglobulin-like receptor 2DL1-ligand mismatch	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bone Marrow Transplantation	6. 最初と最後の頁 1171 ~ 1179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41409-022-01700-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokoyama H, Hirayama M, Takahashi Y, Uchida N, Tanaka M, Onizuka M, Ozawa Y, Onai D, Katsuoka Y, Wake A, Sawa M, Kobayashi H, Maruyama Y, Ozeki K, Kimura T, Kanda J, Fukuda T, Atsuta Y, Terakura S, Morishima	4. 巻 56
2. 論文標題 Altered effect of killer immunoglobulin-like receptor-ligand mismatch by graft versus host disease prophylaxis in cord blood transplantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bone Marrow Transplant	6. 最初と最後の頁 3059-3067
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41409-021-01469-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 櫻井一貴、横山寿行、小松弘香、鳴海善洋、竹中 健太、渡邊 樹也、中村 嘉詞、橋本 和貴、内堀 雄介、猪倉 恭子、市川 聡、小野寺 晃一、福原 規子、大西 康、齋藤 慧、八田 俊介、勝岡 優奈、齋藤 陽、鎌田 真弓、原崎 頼子、遠宮 靖雄、和泉 透、佐々木 治、張替 秀郎
2. 発表標題 AML with RNUX1::RUNX1T1における血縁者間HLA一致同種移植と非血縁臍帯血移植成績の比較
3. 学会等名 第85回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 横山寿行
2. 発表標題 CMV 感染が移植成績に与える影響 -CMV と再発
3. 学会等名 第44回日本造血細胞移植学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横山寿行
2. 発表標題 大規模レジストリーデータ解析から示唆される同種造血幹細胞移植における NK 細胞の 役割
3. 学会等名 第45回日本造血細胞移植学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 横山寿行
2. 発表標題 臍帯血移植における KIR リガンド不適合が GVHD 発症と NK 細胞遺伝子発現プロファイルに及ぼす影響
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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