

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24701031

研究課題名(和文) 難治性白血病に対する同種造血幹細胞移植後の再発と感染症発症抑制に関する研究

研究課題名(英文) Improvement of relapse or infection incidence in patients with refractory leukemia receiving allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

研究代表者

康 秀男 (KOH, HIDEO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：90419698

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)：難治性血液疾患患者とそのドナー121組の移植前保存DNAサンプルを用いて、KIR遺伝子型、NKG2D、TLR4、TLR9、CTLA-4、HMGB-1の各SNPsがrelapse-free survival(RFS)に与える影響を検討した。移植後大量シクロフォスファミドを用いたHLA半合致移植例において、RFSはKIRハプロタイプBxドナーからAA患者への移植で48%、AAドナーからAA患者への移植で9%であり(Log-rank P=0.088)、BxドナーからAA患者への移植例で予後が改善する可能性が示唆された。他の移植例において、有意にRFSへ影響するKIR遺伝子型、SNPsは認めなかった。

研究成果の概要(英文)：We examined the impact of killer immunoglobulin-like receptor (KIR) genotype/haplotype and single nucleotide polymorphisms (SNPs) of NKG2D, Toll-like receptor (TLR) 4, TLR9, CTLA-4 and HMGB-1 on relapse-free survival (RFS) of 121 patients with refractory hematological disorders who received related-donor hematopoietic cell transplantation (HCT). In analysis of the patients receiving HLA haploidentical peripheral blood stem cell transplantation using posttransplantation cyclophosphamide, KIR haplotype AA recipients from KIR Bx donors showed marginally significantly higher RFS than those from KIR AA donors (48% vs 9%, Log-rank P=0.088). There seemed to be no significant associations between RFS and KIR haplotype or the above-mentioned SNPs in the patients receiving HLA matched/mismatched related-donor HCT.

研究分野：臨床腫瘍学、血液学

キーワード：分子疫学 同種造血幹細胞移植 腫瘍再発抑制

### 1. 研究開始当初の背景

近年の治療の進歩により血液疾患患者の予後は飛躍的に向上してきているが、現在においても治療抵抗例や化学療法後の再発例の予後は極めて不良であり、同種造血幹細胞移植療法によってのみ治療の可能性があると考えられている。移植後死亡原因の内訳は約 50%が再発、25%が急性移植片対宿主病、25%が感染症を含む移植関連合併症となっており、これら各々の発症を抑制することは、大きな生存率の向上につながる事が期待される。

同種造血幹細胞移植により血液悪性疾患が治療できる機序として、移植前処置に使用される抗癌剤による抗腫瘍効果に加え、移植片対白血病 (graft-versus-leukemia; GVL) 効果の存在が重要であることが知られている。GVL 効果を増強させる治療法の開発は移植後再発率の低下に寄与する可能性がある。

近年、ドナー由来の Natural Killer (NK) 受容体発現細胞が GVL 効果において重要な働きを果していることが報告されてきている。NK 受容体は、Immunoglobulin superfamily と C-type lectin superfamily に分類され、前者には Killer immunoglobulin-like receptor (KIR)、後者には NKG2D などがあり、各受容体遺伝子の polymorphism が報告されており、抑制型、活性型または非抑制型の異なる機能を有する。NK 細胞の機能は、Human leucocyte antigen (HLA) class I を認識する NK 細胞受容体を介してコントロールされ、これらのリガンドと受容体の相互作用によって決まり、HLA-A、B、C の多型性に富む各エpitep (KIR リガンド) を認識する KIR が存在している。これらの遺伝的多様性は、同種移植におけるドナー由来の NK 細胞の働きに大きく影響する可能性がある。

Ruggeri らは、T 細胞除去を用いた HLA 半合致移植の系において、HLA class I に基づくドナー患者間の KIR リガンドの違いによって起こる NK 細胞の同種反応性の有益性が初めて示された (Science, 2002)。原理としては、ドナーの抑制性 KIR とそのリガンドである HLA class I を持たない患者白血病細胞は、抑制性シグナルがドナー NK 細胞に伝達されないため、NK 細胞が活性化され白血病細胞を障害する仮説が考えられている。上記の報告では、HLA class I の多型性に焦点が当てられ、KIR 遺伝子の多型性の役割については明らかにされていなかった。

KIR 遺伝子に関しては、これまでに 2DL1、2DL2、2DL3、2DL4、2DL5、2DS1、2DS2、2DS3、2DS4、2DS5、3DL1、3DL2、3DL3、3DS1、2DP1、3DP1 の 16 遺伝子が同定されており、日本人では、2DL1、2DL2、2DL3、2DL4、2DS4、3DL1、3DL2、3DS1 の各遺伝子において、一つの allele が高頻度に認められ、他の多くの人種とは異なることが報告されている。KIR ハプロタイプは含まれる遺伝子により A と B に分類され、ともに 2DL4、3DL2、3DL3、3DP1 の 4

つの構成遺伝子を持ち、加えて A ハプロタイプは 2DL1、2DL3、2DS4、3DL1 の 4 つの定まった遺伝子から構成されるのに対し、B ハプロタイプは 2DL2、2DL5、2DS1、2DS2、2DS3、2DS5 の B 特異的な遺伝子を一つ以上含む様々な遺伝子から構成され、すべての個人は A/A または B/x に分類される。

現在まで、ドナーと患者の KIR ミスマッチが生存に与える影響について報告が集積されつつあるが、必ずしも結果は一致せず、移植条件や解析手法の違いなどが影響している可能性があり、その知見が臨床応用されるまでに至っていない。また、近年、世界で急速に広まっている移植片輸注後に大量シクロフォスファミドを用いた新規の HLA 半合致移植における KIR 遺伝子の多様性の意義についても不明である。

一方、KIR 遺伝子の多様性以外にも、レシピエント側の IL-10 遺伝子のプロモーター領域の single nucleotide polymorphism (SNP) と急性移植片対宿主病の発症低下との関連 (Lin MT, et al. NEJM, 2003) など、免疫関連遺伝子の多様性が同種移植後アウトカムに与える影響についても報告が増えつつある。同種移植前の患者とドナーのもつ遺伝情報と移植後アウトカムとの関連が解明できれば、複数ドナーが存在する場合の最適なドナー選択ならびに原病の再発などの予後不良な移植後アウトカム発症リスクを有する患者を同定し、厳重なモニタリングや積極的な予防・治療介入につながる事が期待される。しかしながら、遺伝子多型と移植後アウトカム研究結果は、人種差や疾患、治療を含む患者背景の違いなどにより異なる可能性があり、本邦において、新たに検討する必要がある。

### 2. 研究の目的

同種移植前の患者とドナーのもつ以下の遺伝情報と再発などの移植後アウトカムとの関連の検討を行う。

: KIR 遺伝子型、NKG2D、Toll-like receptor (TLR) 4、TLR9、CTLA-4、HMGB-1 の各 SNP

### 3. 研究の方法

本研究は、当施設倫理委員会で承認を受けたヒトゲノム遺伝子解析研究 (承認 No. 2450) プロトコルに従って行った。同種移植前に保存したドナー・レシピエント双方の DNA サンプルを用いて遺伝情報を同定した。KIR 遺伝子型は 2DL1、2DL2、2DL3、2DL4、2DL5、2DS1、2DS2、2DS3、2DS4、2DS5、3DL1、3DL2、3DL3、3DS1、2DP1、3DP1 の 16 遺伝子を KIR SSO Genotyping Test (ONE LAMBDA, INC.) により同定を行った。NKG2D、TLR4、TLR9、CTLA-4、HMGB-1 の各 SNP については、それぞれ米国バイオテクノロジーセンター SNP データベース番号の情報に基づき、Taqman SNP Genotyping Assays により同定を行った。同定を行った 9 つの SNP の番号と context sequence は以下

の通り (SNP8 のみ Custom 作成)

SNP ID	Gene	NCBI SNP Reference
1	NKG2D	rs1049174
TGTGGAGGGTGGGGTTGCACTCTCA[G/C]TGATCTGCTGGCCTTCTCTTCCTTC		
2	TLR4	rs4986790
GCATACTTAGACTACTACCTCGATG[A/G]TATTATGACTTATTTAATTGTTG		
3	TLR9	rs187084
TCCCCTGCTGGAATGTCAGCTTCTT[A/G]AGGGCAGTGATCTTTTATCTGCATC		
4	CTLA4	rs4553808
CAGGAACATTTGTTTTTCACTTTTT[A/G]AAAAACCTCTGTTGCCAGTCTGGC		
5	CTLA4	rs3087243
TCTTCACTACTATTTGGGATATAAC[G/A]TGGGTTAACACAGACATAGCAGTCC		
6	CTLA4	rs231775
GCACAAGGCTCAGCTGAACCTGGCT[A/G]CCAGGACCTGGCCCTGCACTCTCCT		
7	CTLA4	rs5742909
GTCTCCACTTAGTTATCCAGATCCT[C/T]AAAGTG AACATGAAGCTTCAGTTTC		
8	HMGB1	rs41369348
CACGATGTAGGTGATTTATCCAAATTTGACCTGTTACATTTGGAGGAATTGGTTGTCGGATTTAGAAGTGTACAAAATACCATTAGAGAGTGAAAAAAA[A/-]GGGAAGTCTGTTATAACTGAATAGGGGCGTGGTCTGCTCAGGCTAAAAGGAATAGATAGTAGTTTCATAAAGCAC TGATATAACTGTAGAGTCTTCAGAA		
9	HMGB1	rs2249825
TATAAGACCTTAAAGTACTTAGTAA[G/C]GGAATGAAAACCAAAGTACTGGTTA		

以上の得られた遺伝情報と移植後アウトカムとの関連について統計学的に解析を行った。

#### 4. 研究成果

研究期間内に解析された検体は、最終的に KIR 遺伝子型の同定については患者とドナー各 121 検体の計 242 検体、各 SNP に関しては患者とドナー各 96 検体の計 192 検体について同定を行った。また、上記の遺伝情報と臨床データを結合させ、KIR 遺伝子型については患者 121 名、各 SNP については患者 96 名においてアウトカム関連解析を施行した。

##### (1) 患者背景

解析対象患者 121 名の年齢は 16-67 (中央値 44) 歳、性別は男性 64 名、女性 57 名、疾患は急性骨髄性白血病 (AML) 56 名 (46.2%)、急性リンパ性白血病 (ALL) 17 名 (14%)、骨髄異形成症候群 11 名 (9.0%)、非ホジキンリンパ腫 (NHL) 24 名 (19.8%)、慢性骨髄性白血病 7 名 (5.8%)、再生不良性貧血 3 名 (2.4%)、その他 3 名 (2.4%)。また、病期は寛解例 50 名 (41.4%)、非寛解例 62 名 (51.2%)、その

他 9 名 (7.4%: CML 慢性期 5 例含む) であり、予後不良例が半数以上を占めていた。移植方法は、血縁者間 HLA 半合致移植が 54 例 (44.6%)、血縁者間 HLA 一致移植が 54 例 (44.6%)、血縁者間 HLA 不一致移植が 13 例 (10.8%)、複数回幹細胞移植は 34 例 (28.1%)。

##### (2) 患者とドナーの遺伝情報

KIR 遺伝子型、KIR ハプロタイプ [n=239 (同定不可の 3 例は除外)]

2DL1: 239 例 (100%)、2DL2: 36 例 (15%)、2DL3: 239 例 (100%)、2DL4: 239 例 (100%)、2DL5: 96 例 (40%)、2DS1: 92 例 (38%)、2DS2: 36 例 (15%)、2DS3: 36 例 (15%)、2DS4: 231 例 (96%)、2DS5: 64 例 (27%)、3DL1: 231 例 (96%)、3DL2: 239 例 (100%)、3DL3: 239 例 (100%)、3DS1: 89 例 (37%)、2DP1: 239 例 (100%)、3DP1: 239 例 (100%)。ハプロタイプ AA は 126 例 (53%)、Bx は 113 例 (47%) であり、組み合わせが評価可能な 118 組については、AA ドナーから AA 患者への移植 (AA to AA) が 43 組 (36%)、AA ドナーから Bx 患者への移植 (AA to Bx) が 19 組 (16%)、Bx ドナーから AA 患者への移植 (Bx to AA) が 20 組 (17%)、Bx ドナーから Bx 患者への移植 (Bx to Bx) が 36 組 (31%) であった。

##### SNP1 (NKG2D)

[n=190 (同定不可の 2 例は除外)]  
GG: 33 例 (17%)、GC: 91 例 (48%)、CC: 66 例 (35%)。

##### SNP2 (TLR4)

[n=191 (同定不可の 1 例は除外)]  
AA: 191 例 (100%)

##### SNP3 (TLR9)

[n=191 (同定不可の 1 例は除外)]  
AA: 54 例 (28%)、AG: 90 例 (47%)、GG: 47 例 (25%)。

##### SNP4 (CTLA4)

[n=191 (同定不可の 1 例は除外)]  
AA: 161 例 (84%)、AG: 28 例 (15%)、GG: 2 例 (1%)。

##### SNP5 (CTLA4)

[n=191 (同定不可の 1 例は除外)]  
GG: 102 例 (53%)、GA: 76 例 (40%)、AA: 13 例 (7%)。

##### SNP6 (CTLA4)

[n=191 (同定不可の 1 例は除外)]  
AA: 22 例 (12%)、AG: 87 例 (46%)、GG: 82 例 (43%)。

##### SNP7 (CTLA4)

CC: 163 例 (85%)、CT: 27 例 (14%)、TT: 1 例 (1%)。

SNP8 (HMGB1) については同定困難のため評価できなかった

#### SNP9 (HMGB1)

[n=191 (同定不可の1例は除外)]  
GG: 147例 (77%)、GC: 43例 (23%)、CC: 1例 (1%)

#### (3) 移植後再発との関連解析

得られた遺伝情報と relapse-free survival (RFS) との関連を Log-rank 検定により検討を行った。RFS は再発または再発以外の死亡をイベントと定義した。

#### HLA 半合致移植例における解析

解析対象数は n=54、生存者 (n=23) の観察期間の中央値は 458 (135-1,864) 日。

(i) AA 患者への移植 31 例において、RFS は Bx to AA (n=7) で 48%、AA to AA (n=24) で 9% であり、Bx ドナーからの移植例で予後良好となる可能性が示唆された (P=0.088)。

(ii) Bx 患者への移植 23 例において、RFS は AA to Bx (n=8) で 25%、Bx to Bx (n=15) で 20% であり、両群間に明らかな差は認めなかった (P=0.253)。

#### HLA 半合致移植以外の血縁移植例における解析

解析対象数は n=67、生存者 (n=40) の観察期間の中央値は 1,814 (203-4,179) 日であり、5yRFS での比較を行った。

(i) AA 患者への移植 32 例において、5yRFS は Bx to AA (n=13) で 73%、AA to AA (n=19) で 51% であった (P=0.175)。

(ii) Bx 患者への移植 32 例において、RFS は AA to Bx (n=11) で 33%、Bx to Bx (n=21) で 51% であった (P=0.288)。

(iii) 上記 (2) ~ の結果より、SNP2、SNP8 を除くドナー側の各 SNP の 5yRFS への影響について解析を行った。

#### (a) SNP1 について

5yRFS は GG または GC (n=48) で 50%、CC (n=19) で 52% であった (P=0.719)。

#### (b) SNP3 について

5yRFS は AA または AG (n=50) で 51%、GG (n=17) で 52% であった (P=0.855)。

#### (c) SNP4 について (GG 例は除外)

5yRFS は AA (n=54) で 52%、AG (n=12) で 50% であった (P=0.720)。

#### (d) SNP5、SNP6、SNP7 について

既報告 (Murase M, et al. Bone Marrow Transplant. 2011;46:1444-9) を参考に、CTLA-4 (-318, +49, CT60) のハプロタイプに従って解析を行った。本検討では、CGG/CGG: 29例 (43%)、CGG/CAA: 21例 (31%)、CGG/TAG: 7例 (10%)、CAA/CAA: 5例 (8%)、CAA/TAG: 5例 (8%) の5つのハプロタイプに分類された。5yRFS は CAA を有するドナーからの移植例 (n=31) で 41%、それ以外の移植例 (n=36) で 59% であり (P=0.091) 有意傾向であったが、既報告に一致しない結果となった。

#### (e) SNP9 について (CC 例は除外)

5yRFS は GG (n=51) で 52%、GC (n=15) で 51% であった (P=0.803)。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

Hirohisa Nakamae, HLA haplo-identical allogeneic hematopoietic cell transplantation using reduced dose post-transplantation cyclophosphamide (PT/CY)、第 77 回日本血液学会、2015 年 10 月 16 日 ~ 2015 年 10 月 18 日、石川県立音楽堂 (石川県金沢市)

康 秀男、患者とドナーの KIR 遺伝子型が移植後 CY 大量療法を用いたハプロ移植後の再発、第 36 回日本造血細胞移植学会総会、2014 年 3 月 7 日 ~ 2014 年 3 月 9 日、沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

康 秀男 (KOH, Hideo)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号: 90419698

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

中前 博久 (NAKAMAE, Hirohisa)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 30364003