

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461464

研究課題名(和文) ドナー由来白血病を含む造血幹細胞移植後の白血病再発に潜在する分子生物学的発症基盤

研究課題名(英文) Molecular analysis of donor cells of pre- and post- bone marrow transplantation for the analysis of the underlying mechanism of leukemia of donor cell origin

研究代表者

長藤 宏司 (Nagafuji, Koji)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：60343323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞移植にはドナー由来白血病が知られている。ドナー由来白血病の存在は、白血病再発を含め移植後の同種免疫反応による特殊な骨髄環境が白血病発症に関与している可能性を示唆する。われわれは、(1)移植前後のドナー細胞の全エキソーム解析による遺伝子変異の探索、(2)ドナー・レシピエントに遺伝学的に規定される免疫反応分子の同定を行った。現時点ではドナー細胞への遺伝子変異の誘導は認められていないが、一方でマイナー組織抗原候補を多数同定できており同種免疫反応への関連が推測される。さらに、移植療法において個別に同定され得るマイナー組織抗原には免疫療法の標的としての可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：The presence of leukemia that derived from donor cell origin, could support the possibility that recipient's microenvironment of bone marrow under allogeneic immune reactions can be harmful to transplanted donor cells. To investigate the possible effects of recipient's microenvironment for donor cells, we performed whole exome sequencing on donor cells of pre- and post- bone marrow transplantation. In addition, to find out targets of allogeneic immune response, we searched minor antigens by analyzing neo-peptides derived from non-synonymous SNPs. Although, we did not find out any acquired somatic mutations in donor cells after transplantation so far, we could detect around 200 SNPs that can be candidates for minor antigens in examined cases, and those minor antigens identification by each exome sequencing will be good targets for immunotherapy after bone marrow transplantation.

研究分野：血液内科学

キーワード：造血幹細胞移植 ドナー由来白血病 白血病再発

### 1. 研究開始当初の背景

1999年の東海村での臨界放射線事故に際し、造血障害の治療目的で同種末梢血幹細胞移植が行われたが、生着したドナー細胞には新たな染色体異常が認められた。一方、造血幹細胞移植後には、ドナー細胞に由来する白血病が報告されているが、その発症頻度は0.1%から高いものでは5%に昇る。おそらく移植後の骨髓環境は、そこに同種免疫反応が加わってくることから炎症をベースとした通常化学療法とは区別されるべき特殊環境であり、高率に遺伝子変異を誘導し得る可能性があることが推測される。これらは移植医療において看過できない問題であるが、十分な研究はなされていない。そこで、われわれは移植前後のドナー由来細胞の遺伝子に注目し、(1)エキソーム・シーケンスによる遺伝子塩基変異の解析、(2)ドナー・レシピエントに規定される免疫反応分子の同定を行う。これらの遺伝子解析により、造血幹細胞移植に潜在するドナー由来白血病を含む白血病再発の発症基盤の分子生物学的機構を解明する。

### 2. 研究の目的

造血幹細胞移植後の白血病再発は治療上の大きな障害であるが、次に挙げるような報告から、同種免疫反応の加わる移植後の骨髓環境は、通常化学療法とは区別されるべき特殊環境であり、ドナー細胞あるいは残存レシピエント白血病細胞に何らかの影響を与えている可能性がある。

・1999年東海村臨界事故において、被曝後6日後に血縁者間末梢血幹細胞移植が行われたが、染色体解析では5% (3/60)の生着ドナー細胞に染色体異常が認められた (Chiba et al, 2002)。

・造血幹細胞移植後には、ドナー細胞由来の白血病の発症が報告されてきているが、その発症頻度は0.12%から高いものでは5%にまでに昇っており、通常の白血病発症頻度と比較して極めて高い (European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT), 2005)。

・マウスGVHD発症モデルにおいて高率にドナー由来細胞のDNA損傷 (micronucleus reticulocytes) が観察されている (放射線影響研究所, Kusunoki et al, 2010)。

おそらく、移植後の特殊な骨髓環境が高率に遺伝子変異を誘導しドナー由来白血病を引き起こしているのではないかと予想している。同様に移植後の白血病再発においても、移植後の環境要因が、共通したメカニズムとして残存クローンの形質をさらに変化させ再発を促進している可能性が推測されるであろう。

これらの問題は移植内科医に懸念されてきた問題であり、また移植件数や長期生存者も年々増加しており無視できない問題であ

るが、ドナー由来白血病は散発的で症例の蓄積による解析は困難である。さらに、移植後骨髓において微量で且つ不特定の遺伝子変異を高い精度で検出する方法が存在しなかったため、具体的な研究アプローチがなされないまま研究が見送られてきた。そのため、様々な機序 (Bystander 効果、骨髓微小環境変化、残存化学療法、ドナー細胞での前白血病状態、ウイルス感染、免疫抑制効果、等) が推測されてきてはいるが、実際の遺伝子解析がなされていないため、分子生物学的機序は不明のままである。

そこでわれわれは次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子解析技術を導入することにより、ドナー由来細胞における遺伝子変異獲得の可能性および同種免疫反応の存在に基づく主要因と考えている骨髓微小環境での炎症に關与するドナー・レシピエントに規定される免疫反応分子の同定を試み、造血幹細胞移植後の再発問題への分子生物学的機序にアプローチする。

### 3. 研究の方法

そこで、われわれは(1)造血幹細胞移植ドナー細胞の移植前後における遺伝子変異の解析、(2)ドナー・レシピエントに規定される免疫反応分子の同定、を次世代シーケンサーによる全エキソーム・シーケンス法 (whole exome sequencing) で解析する。これらの遺伝子解析により、造血幹細胞移植に潜在するドナー由来白血病を含む白血病再発の発症基盤の分子生物学的機構を解明する。

(1)造血幹細胞移植前後のドナー細胞における遺伝子変異の解析

ドナー由来細胞を解析対象とし、移植後の骨髓環境がドナー細胞の遺伝子へ及ぼす影響を探索する。

まずエキソーム解析として SureSelect Human All Exon V5 (Agilent) をもちいて exon 領域を濃縮し、ライブラリーを作成後に HiSeq1500 (illumina) により high-throughput 遺伝子解析を行う。この時、x50以上の被覆率の解析を行う。得られたデータは、UCSC human genome 19をレファレンス配列とし Bowtie2 でマッピングを行う。一方、SNP/indelの抽出には SAMtools を使用し、ANNOVAにより annotationを行う。

本解析により造血幹細胞移植前後におけるドナー細胞に誘導された遺伝子変異の頻度および種類を比較することで、造血幹細胞移植に潜在するドナー由来白血病を含む白血病再発の発症基盤の分子生物学的機構を探索する。

また、造血幹細胞移植に潜在するドナー由来白血病を含む白血病再発の発症要因としては、このようなドナー細胞に影響をおよぼす可能性としての原疾患 (白血病) 制御および移植前処置法をはじめとする人為的 (医療

的)側面が存在すると同時に、一方でドナー・レシピエントの組合せそのものに規定されている遺伝学的側面が存在している。そこでわれわれは、ドナー・レシピエントの組合せに規定されている遺伝学的側面にも注目し解析を行う。

(2)ドナー・レシピエントに規定される免疫反応分子の同定

ドナー由来白血病を含む造血幹細胞移植後の白血病再発の発症要因としては様々な可能性が考えられる。例えば、Bystander効果、骨髓微小環境変化、残存化学療法、ドナー細胞での前白血病状態、ウイルス感染、免疫抑制効果、等がある。

われわれは特に同種免疫反応の存在に基づいた骨髓微小環境での炎症反応の惹起が主要因であるのではないかと考えており、次の2つのポイントに焦点を合わせている。ひとつはドナー・レシピエントにおける免疫関連遺伝子の多型の組合せであり、もうひとつは遺伝子多型そのものが互いの認識抗原となり得るマイナー組織適合性抗原の可能性である。

特に造血幹細胞移植では、主要組織適合性抗原であるHLA適合移植例においても個々人のゲノムに存在する遺伝子多型の一部が抗原として認識され移植免疫反応が誘導され得る。これらの抗原はマイナー組織適合性抗原(マイナー組織抗原)と総称され、同種免疫反応を惹起し、GVHDや生着不全に関与するとともに、一方では移植片対白血病(GVL)効果の標的分子としても重要である。マイナー組織抗原の同定は、骨髓微小環境での異種免疫による炎症の惹起に関与することで白血病再発に関与している可能性があるだろう。

研究方法としては、遺伝子変異解析と同様に、exon領域を濃縮しHiseq1500(illumina)解析を行いBowtie2でマッピング、ANNOVAによりannotationを行う。解析データをGVH方向とHVG方向に区別してドナー・レシピエントにおける非同義的(non-synonymous)な一塩基多型(SNP)およびindel多型を同定する。遺伝子多型に由来するアミノ酸変化の当該HLA結合性の評価にはNetMHCpan(Center of Biological Sequence Analysis, Denmark)解析システムにより行い、IC50において500uM以下のものを結合性があると評価し、50uM以下のものを強結合性と判定する。これにより、非同義的遺伝子多型群の中で当該HLAに提示され免疫学的に認識されるマイナー組織抗原の候補遺伝子群の絞り込みを行うことができる。

#### 4. 研究成果

(1)造血幹細胞移植前後のドナー細胞における遺伝子変異の解析

エキソーム解析により、造血幹細胞移植後環境による遺伝子変異誘導の可能性を探索

した。しかし、これまで5症例の検討ではエキソーム領域に明らかな新規遺伝子変異の出現を確認するには至っていない。研究開始時の仮説としては、移植後特殊環境によりドナー細胞には何らかの遺伝子変異が誘導され、それらの遺伝子変異においてある一定の頻度で白血病発症に直接関わる遺伝子に変異が起こるのではないかというものであった。これまでの結果の解釈としては、この結果が実際の造血幹細胞移植前後の遺伝子変異獲得の確率の低さを表しており、ドナー細胞由来の白血病の頻度の低さはその事実から説明できる可能性、造血幹細胞移植後環境のドナー細胞への影響は遺伝子変異誘導よりもエピジェネティックな変化が主である可能性、があると思われる。後者の可能性の検討のためには、ゲノムDNAのメチル化あるいはヒストン修飾の変化を解析する必要があり解析準備を始めている。特にヒストン修飾においては、エンハンサー活性の変化を主体として解析し移植環境のドナー細胞へ与える影響を明らかにしていきたいと考えている。

(2)ドナー・レシピエントに規定される免疫反応分子の同定

一方、ドナー・レシピエントに規定される免疫反応の解析として、SNPの内でもアミノ酸変化を伴う非同義的遺伝子多型から、GVLおよびGVHD方向に認識され得るマイナー組織抗原候補を同定し、免疫反応を誘導する抗原を確認している。HLA合致血縁者間同種骨髓移植例においてドナー・レシピエント間にはGVH方向として約5000箇所のSNPが観察される。これらのマイナー組織抗原候補の内でも当該HLA class I(HLA-A, B, C)に結合性が予測されるものが約200箇所に認められる。これらのマイナー組織抗原の候補は、同種反応を誘導する標的抗原となり得るため、本研究における同種免疫反応の存在に基づく骨髓微小環境での炎症反応における責任分子と位置づけることができる。現在、骨髓環境での実際に遺伝子発現が想定されるマイナー組織抗原の候補遺伝子を絞り込み、その存在と同種免疫反応(GVHD)との相関の解析を行っている。

一方、本研究テーマである白血病再発の発症機序の解明から発展した課題として、白血病再発制御としてのマイナー組織抗原の重要性にも着目し解析を行っている。つまり、造血幹細胞移植症例におけるマイナー組織抗原の総合的な網羅解析は、GVHD・GVL効果予測からの適切なドナー選択を可能とし、同時に同定されたマイナー組織抗原をターゲットとするワクチンや養子免疫による個別化免疫療法へと応用されていくことが期待される。

造血幹細胞移植は血液系腫瘍の治療法として一定の効果を挙げているが、約半数の患者は救命されておらず未だ完成した治療法とは言えない。GVHD抑制とGVL誘導とい

う互いに相反する免疫反応はこれまで人為的な制御が困難であったが、移植前の段階から、次世代シーケンサーによるゲノム解析により、マイナー組織抗原を網羅的に評価することで、GVHD抑制とGVL誘導を選択的に人為制御する可能性が生まれるであろう。特にGVLの選択的誘導は移植後の白血病制御に重要な役割を果たすことが期待され本研究からさらに追求すべき内容と思われる。現在、HLA合致血縁者間移植症例においてマイナー組織抗原候補の探索を継続するとともに、抗原機能解析のために各組織におけるマイナー組織抗原の発現レベルおよびT細胞認識を解析しており、今後は解析データと臨床情報(GVHDや白血病再発)との関連性を解析していく。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計 15 件)

Kanda J, Brazauskas R, Hu ZH, Kuwatsuka Y, Nagafuji K, Hahn T, Atsuta Y, Saber W. (計 25名、5番目)

Graft-versus-Host Disease after HLA-Matched Sibling Bone Marrow or Peripheral Blood Stem Cell Transplantation: Comparison of North American Caucasian and Japanese Populations.

Biol Blood Marrow Transplant. (査読有) 4, 744-51, 2016

doi: 10.1016/j.bbmt.2015.12.027.

Takashima S, Miyamoto T, Kamimura T, Yoshimoto G, Yoshida S, Henzan H, Takase K, Kato K, Ohno Y, Nagafuji K, Eto T, Teshima T, Akashi K.

Effects of conditioning intensity in allogeneic stem cell transplantation for Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia.

Int J Hematol. (査読有) 6, 689-96, 2015  
doi: 10.1007/s12185-015-1883-0.

Kiyasu J, Miyoshi H, Hirata A, Arakawa F, Ichikawa A, Niino D, Sugita Y, Yufu Y, Choi I, Abe Y, Uike N, Nagafuji K, Okamura T, Akashi K, Takayanagi R, Shiratsuchi M, Ohshima K.

Expression of programmed cell death ligand 1 is associated with poor overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. Blood. (査読有) 126, 2193-2201, 2015  
doi: 10.1182/blood-2015-02-629600.

Ito Y, Miyamoto T, Kamimura T, Aoki K, Henzan H, Aoki T, Shiratsuchi M, Kato K, Nagafuji K, Ogawa R, Eto T, Iwasaki H, Akashi K.

Characteristics of patients with

development of large granular lymphocyte expansion among dasatinib-treated patients with relapsed Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia after allogeneic stem cell transplantation.

Clin Lymphoma Myeloma Leuk. (査読有) 15, e47-54, 2015

doi: 10.1016/j.clml.2014.09.006

Takata Y, Seki R, Kanajii T, Nohara M, Koteda S, Kawaguchi K, Nagafuji K, Okamura T. (計 16名、15番目)

Association between thromboembolic events and the JAK2 V617F mutation in myeloproliferative neoplasms.

Kurume Med J. (査読有) 60, 89-97, 2014.  
doi: <http://doi.org/10.2739/kurumemedj.MS63001>

Koyama M, Hashimoto D, Nagafuji K, Eto T, Miyamoto T, Hill GR, Akashi K, Teshima T. (計 11名、3番目)

Expansion of donor-reactive host T cells in primary graft failure after allogeneic hematopoietic SCT following reduced-intensity conditioning.

Bone Marrow Transplant. (査読有) 49, 110-115, 2014.

doi: 10.1038/bmt.2013.134.

Kodera Y, Yamamoto K, Harada M, Nagafuji K, Tamakoshi A, Japan Society for Hematopoietic Cell T, Halter J, Schmitz N, Niederwieser D, Gratwohl A, European B, Marrow Transplant G. (計 23名、17番目)

PBSC collection from family donors in Japan: a prospective survey.

Bone Marrow Transplant. (査読有) 49, 195-200, 2014.

doi: 10.1038/bmt.2013.147.

Shima T, Miyamoto T, Kikushige Y, Yuda J, Tochigi T, Mizuno S, Goto N, Akashi K. (計 12名、10番目)

The ordered acquisition of Class II and Class I mutations directs formation of human t(8;21) acute myelogenous leukemia stem cell.

Exp Hematol. (査読有) 42, 955-65, 2014.  
doi: 10.1016/j.exphem.2014.07.267.

Yanada M, Kurosawa S, Nagafuji K, Yano S, Nawa Y, Tomiyama J, Tashiro H, NakaFukuda T. (計 20名、10番目)

Effect of related donor availability on outcome of AML in the context of related and unrelated hematopoietic cell transplantation.

Bone Marrow Transplant. (査読有) 48, 390-395, 2013.

doi: 10.1038/bmt.2012.159.

Shima T, Miyamoto T, Kikushige Y, Mori Y, Nagafuji K, Teshima T, Kato K, Akashi K. (計17名、14番目)  
Quantitation of hematogones at the time of engraftment is a useful prognostic indicator in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.  
Blood. (査読有) 121, 840-848, 2013.  
doi: 10.1182/blood-2012-02-409607.

Ogata M, Satou T, Kadota J, Nagafuji K, Kako S, Uoshima N, Tsudo M, Itamura H, Fukuda T. (計13名、8番目)  
Human herpesvirus 6 (HHV-6) reactivation and HHV-6 encephalitis after allogeneic hematopoietic cell transplantation: a multicenter, prospective study.  
Clin Infect Dis. (査読有) 57, 671-681, 2013.  
doi: 10.1093/cid/cit358.

Nagafuji K, Miyamoto T, Eto T, Kamimura T, Taniguchi S, Yokota S, Akashi K, Harada M. (計16名、ファーストオーサー)  
Monitoring of minimal residual disease (MRD) is useful to predict prognosis of adult patients with Ph-negative ALL: results of a prospective study (ALL MRD2002 Study).  
J Hematol Oncol. (査読有) 6, 14, 2013.  
doi: 10.1186/1756-8722-6-14.

Kanda Y, Oshima K, Nagafuji K, Miyamoto T, Kurokawa M, Ohashi Y, Takae Y, Taniguchi S. (計16名、9番目)  
In vivo T-cell depletion with alemtuzumab in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Combined results of two studies on aplastic anemia and HLA-mismatched haploidentical transplantation.  
Am J Hematol. (査読有) 88, 294-300, 2013.  
doi: 10.1002/ajh.23392.

Eto T, Takase K, Nagafuji K, Takamatsu Y, Teshima T, Taniguchi S, Akashi K, Harada M. (計12名、6番目)  
Autologous peripheral blood stem cell transplantation with granulocyte colony-stimulating factor combined conditioning regimen as a postremission therapy for acute myelogenous leukemia in first complete remission.  
Int J Hematol. (査読有) 98, 186-196, 2013.  
doi: 10.1007/s12185-013-1378-9.

Kim SW, Yoon SS, Suzuki R, Matsuno Y,

Yi HG, Nagafuji K, Suzumiya J, Harada M, Kim CS. (計27、24番目)  
Comparison of outcomes between autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for peripheral T-cell lymphomas with central review of pathology.  
Leukemia. (査読有); 6, 1394-7, 2013.  
doi: 10.1038/leu.2012.321.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 1 件)

名称: METHOD FOR PRODUCING CIRCULAR DNA FORMED FROM SINGLE-MOLECULE DNA  
発明者: MIZUNO Shinichi, NAGAFUJI Koji, OKAMURA Takashi  
権利者: KURUME UNIVERSITY  
種類: 特許  
番号: US 8,962,245 B2  
取得年月日: 2015年02月24日  
国内外の別: 外国

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長藤 宏司 (NAGAFUJI, Koji)  
久留米大学・医学部・教授  
研究者番号: 60343323

### (2) 研究分担者

水野 晋一 (MIZUNO, Shinichi)  
九州大学・先端医療イノベーションセンター・准教授  
研究者番号: 40569430