

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25860408

研究課題名(和文) 骨髄移植後合併症の新規予防・治療法開発：炎症関連因子の遺伝子解析と活性制御

研究課題名(英文) Development of novel preventive and therapeutic methods for complications after bone marrow transplantation: Genetic analysis and regulation of inflammation-related factors

研究代表者

山口 奈津 (YAMAGUCHI, Natsu)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40450671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：インフラマソームは多くの炎症性疾患に関与する自然免疫因子である。本研究ではヒトのインフラマソーム遺伝子NLRP1-3の多型と非血縁者間骨髄移植の予後との関連を調べた。その結果、ドナー患者間のHLAミスマッチと患者NLRP3遺伝子多型の交互作用が、2級以上急性移植片対宿主病(GVHD)と統計的に有意に関連していた。また、ドナー患者間のHLA-CのミスマッチとドナーNLRP3遺伝子多型の交互作用が、広範性慢性GVHDと統計的に有意に関連していた。さらに、サイトメガロウイルスの有無と患者NLRP3遺伝子多型の交互作用が全生存率と統計的に有意に関連していた。これらの結果はより大きな集団で再確認すべきである。

研究成果の概要(英文)：The NLRP inflammasomes are key regulators of innate immunity. We investigated the relationship between the single nucleotide polymorphisms (SNPs) of human NLRP1-3 genes and the prognosis of unrelated bone marrow transplantation. As a result, the interactions between the donor-recipient HLA mismatches and a recipient NLRP3 SNP were associated with grade 2-4 acute graft versus host disease (GVHD) with statistical significance. Moreover, the interaction between the donor-recipient HLA-C mismatch and a donor NLRP3 SNP were statistically significantly associated with extensive chronic GVHD. We also found that the interaction between donor cytomegalovirus serostatus and recipient NLRP3 SNP were statistically significantly associated with overall survival. These results should be validated in larger populations.

研究分野：分子疫学

キーワード：骨髄移植 遺伝子多型 炎症関連因子

1. 研究開始当初の背景

骨髄移植において良好な治療成績を得るには、レシピエント・ドナー間の主要組織適合抗原 HLA 遺伝子の適合度が高いことが必要条件である。しかし、HLA が完全に一致したドナーからの移植でも移植片対宿主病 (GVHD) や移植片拒絶は起こりえることから、非 HLA 遺伝子も移植成否に大きく関わっていると考えられる。そのような遺伝子多型について、これまでも国内外で探索されているが、移植成績に強く影響する多型は未だ見つかっていない。

炎症関連因子インフラマソームは3種の因子 (細胞質受容体、アダプター因子 ASC、インターロイキン変換酵素 caspase-1) から成る複合体であり、病原体や内因性の活性酸素、コレステロール結晶などの危険シグナルに応答して、炎症性サイトカイン IL-1 β や IL-18 を活性化し、炎症を誘導する。近年、インフラマソームが移植臓器に対する拒絶反応や、自己免疫疾患の中心的機構であることが明らかになってきている。骨髄移植に関しては、細胞質受容体である Nod 様受容体ファミリー NLRP2 と NLRP3 の遺伝子多型が移植予後と関連することが欧米人集団で報告されているが、詳細な分子機構は不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、インフラマソーム構成分子の遺伝子変異と骨髄移植予後との関連を明らかにし、移植予後不良群の予測法を確立することである。具体的には、非血縁者間骨髄移植例約1000ペアについて、NLRP1、2、3の一塩基多型 (SNP) と臨床データとの関連を解析し、予後と有意に相関する SNP を同定する。予後に影響する SNP 情報を基盤として予後予測法を確立できれば、これを移植ドナー選択に利用することにより移植後合併症の予防にも応用できる。さらに、イン

フラマソーム活性制御機構の異常により移植後合併症が発症する機序の解明を目指す。

3. 研究の方法

骨髄移植推進財団から提供された約1000ペアのドナー・レシピエントの DNA 検体について、NLRP1・NLRP2・NLRP3 の SNP を解読した。NLRP1 と 2 については、アミノ酸置換を生じる多型を1つずつ解読した。NLRP3 については、発現量を変化させるという報告のあるものなど2つの SNP を選択した。SNP 解読には TaqMan Genotyping Assay (Applied Biosystems 社) を用いた。TaqMan Assay で解読できなかった検体については、PCR で増幅して DNA 直接シーケンスで解読した。

悪性疾患を有し初回移植レシピエントである患者とそのドナー822 ペアを、主要な統計解析の対象とした。統計解析については、当初はオッズ比等を用いた解析を行ったが、最終的には以下のような生存分析による解析を行った。全生存率の解析においては、単変量解析には生存曲線とログランク検定を用い、多変量解析にはコックス比例ハザード回帰を用いた。全生存率以外の移植後のアウトカム (GVHD・再発・非再発死など) の解析においては、単変量解析には累積発生曲線とグレイ検定を用い、多変量解析にはファインとグレイの比例サブハザード回帰を用いた。

4. 研究成果

レシピエント側の NLRP1 の SNP はハーディー・ワインベルグの平衡を満たしていなかったため統計解析から除外し、その他の SNP について統計解析を行った。なお、解析当初は $P < 0.05$ を統計的有意な変化としていたが、最終的には多重比較を考慮して有意水準に 0.005 を用いた。その結果、NLRP1 と NLRP2 の SNP については、移植後のアウト

カムと統計的有意な関連は示さなかった。一方、NLRP3のSNPであるrs10925027については、3つの調整因子との交互作用（組み合わせ）がそれぞれ2級以上急性GVHD・広範性慢性GVHD・全生存率と統計的有意に関連していた。これらの結果について以下に詳述する。

(1) 2級以上急性GVHD

多変量回帰分析を行ったところ、表1に示す結果が得られた。結果を要約すると、レシピエントNLRP3と全HLAミスマッチの交互作用が2級以上急性GVHDと統計的有意に関連していた（P=0.002）。

表1 2級以上急性GVHDの多変量回帰分析.

| 変数名 | 危険度 | P値 |
|-----------------------------|------|-------|
| 全HLAミスマッチ数 | 1.06 | 0.432 |
| レシピエントNLRP3 | 0.55 | 0.010 |
| レシピエントNLRP3と全HLAミスマッチ数の交互作用 | 1.50 | 0.002 |

この表における「レシピエントNLRP3」とは、レシピエントrs10925027のCT+TT型の危険度を1としたときのCC型の危険度を指す。表に示していないその他の調整因子：シクロスポリンA使用。

この結果をより分かりやすく理解するために2級以上急性GVHDを単変量解析したのが図1の累積発症率曲線である。

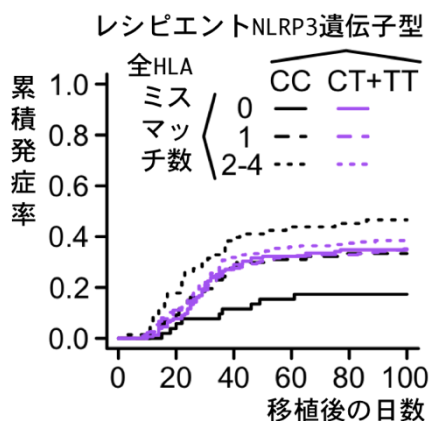


図1 2級以上急性GVHDの単変量解析.

レシピエントNLRP3がCC型かそれ以外かでHLAのミスマッチの効果が異なっていた。培養細胞などでの研究によるとCアリルはTアリルよりもNLRP3の量が多い可能性がある（Hitomi et al., J Allergy Clin Immunol. 2009 124:779-85）ので、CC型ではCT型やTT型よりもNLRP3の量が多い可能性がある。したがって、この結果はNLRP3の量が多い場合にHLAミスマッチの効果が顕著であることを示唆する。

(2) 広範性慢性GVHD

多変量回帰分析の結果を表2に示す。ドナーNLRP3とHLA-Cミスマッチ数の交互作用が広範性慢性GVHDと統計的有意に関連していた（P=0.002）。

表2 広範性慢性GVHDの多変量回帰分析.

| 変数名 | 危険度 | P値 |
|---------------------------|------|-------|
| HLA-Cミスマッチ数 | 0.89 | 0.723 |
| ドナーNLRP3 | 1.02 | 0.914 |
| ドナーNLRP3とHLA-Cミスマッチ数の交互作用 | 2.02 | 0.002 |

この表における「ドナーNLRP3」とは、ドナーrs10925027の遺伝子型が含むTアリル1つあたりの危険度を指す。その他の調整因子：レシピエントBody Mass Index (BMI)。

この結果を定性的に理解するために、広範性慢性GVHDを単変量解析した（図2）。

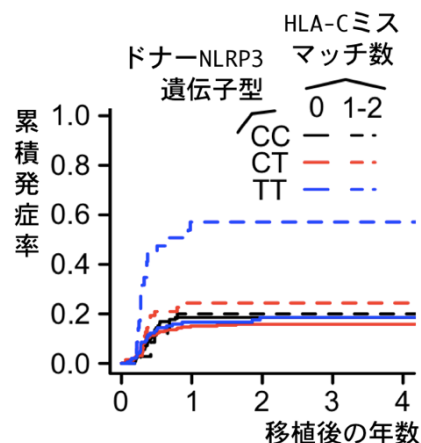


図2 広範性慢性GVHDの単変量解析.

その結果、ドナーNLRP3 が TT 型で HLA-C のミスマッチが加わった場合に広範性慢性 GVHD の発症率が大きく上昇した。上述した通り、TT 型では NLRP3 の量が CC 型や CT 型よりも低い可能性がある。したがって、ドナーNLRP3 の量が低く HLA-C のミスマッチが存在すると広範性慢性 GVHD が起こりやすい可能性がある。ただし、その生物学的機序は既存の文献等の知見からは簡単には説明できない。

(3) 全生存率

全死亡の多変量回帰分析の結果は表 3 の通りである。

表 3 全死亡の多変量回帰分析.

| 変数名 | 危険度 | P 値 |
|------------------------------------|------|------|
| サイトメガロウイルス陽性ドナー | 0.91 | .635 |
| レシピエント NLRP3 | 0.60 | .001 |
| レシピエント NLRP3 とサイトメガロウイルス陽性ドナーの交互作用 | 1.66 | .005 |

この表における「レシピエント NLRP3」とは、レシピエント rs10925027 の遺伝子型を含む C アリル 1 つあたりの危険度を指す。その他の調整因子：非寛解期移植、高齢レシピエント、レシピエントのパフォーマンスステータス。

全生存率の単変量解析の結果である生存曲線を図 3 に示す。ドナーのサイトメガロウイルスが陰性の場合、レシピエントの NLRP3 の CC 型で全生存率が高かった。

本研究の結果は、より大きい症例数の集団で再確認されれば、骨髄移植後の予後の予測やドナー選択に有用と考えられる。

より大きい集団での生存率の解析においては、レシピエントのサイトメガロウイルスの有無も調整因子に入れて再度確認されるべきである。

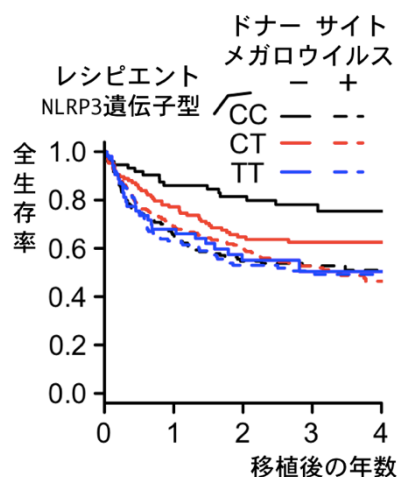


図 3 全生存率の単変量解析.

同様に、2 級以上急性 GVHD や広範性慢性 GVHD における NLRP3 遺伝子型と HLA ミスマッチの組み合わせの結果も、より大きな集団で HLA の個々のアリルの違いなども考慮して再度確認することが望ましい。

本研究の主なその他の限界として、後ろ向き研究であることが挙げられる。特にレシピエント側の遺伝子多型については、骨髄移植に至る前の疾患の発症・進行・治療等の段階において何らかの選択を受ける可能性がある。本研究の結果において、レシピエント NLRP3 の遺伝子多型の頻度から明らかな選択を受けた証拠は見つからなかったが、臨床応用に向けては留意すべき点の一つと言える。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Takahashi H, Okayama N, Yamaguchi N, Miyahara Y, Morishima Y, Suehiro Y, Yamasaki T, Tamada K, Takahashi S, Tojo A, Asano S, Tanabe T. Associations of interactions between NLRP3 SNPs and HLA mismatch with acute and extensive chronic graft-versus-host diseases. 査読有. Scientific Reports. 2017;7(1):13097. DOI: 10.1038/s41598-017-13506-w

[学会発表] (計 2件)

- ① 高橋秀和、岡山直子、山口奈津、宮原悠太、MH Mahbub、長谷亮佑、森島泰雄、末廣寛、山崎隆弘、玉田耕治、高橋聡、東條有伸、浅野茂隆、田邊剛. 非血縁骨髓移植の予後とインフラマソーム遺伝子多型との関連. 第40回日本造血細胞移植学会総会. 2018年2月2日. ホテルさっぽろ芸文館 (北海道札幌市)
- ② 田邊剛、高橋秀和、山口奈津、長谷亮佑、Hossain Mahbub. 自然免疫関連疾患の発症機構. 第16回分子予防環境医学研究会 2017年2月3日～2月4日. 熊本市国際交流会館 (熊本県熊本市)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2件)

- ① 名称: 同種造血幹細胞移植後の予後の予測を補助する方法
発明者: 高橋秀和、田邊剛
権利者: 山口大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2017/038227
出願年月日: 2017年10月24日
国内外の別: 国外
- ② 名称: 同種造血幹細胞移植後の予後の予測を補助する方法
発明者: 高橋秀和、田邊剛.
権利者: 山口大学
種類: 特許
番号: 特願 2016-208263
出願年月日: 2016年10月25日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~dphpm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 奈津 (YAMAGUCHI, Natsu)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 40450671

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

田辺 剛 (TANABE, Tsuyoshi)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 80260678

高橋 秀和 (TAKAHASHI, Hidekazu)
山口大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 90450402