

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460802

研究課題名(和文) 骨髄移植後合併症の新規予防法開発：新しいバイオマーカーとしての免疫抑制因子

研究課題名(英文) Inhibitory co-receptors as new biomarkers for bone marrow transplantation

研究代表者

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

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)：骨髄移植は白血病等の血液疾患に対する根治療法である。非血縁骨髄移植においてはドナーとレシピエントの間におけるHLA遺伝子のマッチングが行われているが、HLA以外の遺伝的因子の重要性は不明な点が多い。最近、免疫抑制因子やエピゲノムのがん化やがん治療における役割が注目されている。本研究では、非血縁骨髄移植を受けたドナー・レシピエントの免疫抑制因子遺伝子やエピゲノム関連遺伝子(メチル化酵素遺伝子)等の多型を解読し、移植後との関連を統計的に解析した。その結果解読した遺伝子は移植後と統計的有意には関連していなかった。今後は患者背景がより均一な大規模な集団での解析が必要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Bone marrow transplantation is a curative therapy for hematological disorders such as leukemia. In unrelated marrow transplantation, matching of HLA genes between donors and recipients has been performed, but the importance of genetic factors other than HLA remains unclear. Recently, the roles of co-receptors and epigenomes in cancer are drawing attention. In this study, polymorphisms of inhibitory co-receptor genes and epigenome related genes (methyltransferase genes) of donors and recipients who received unrelated bone marrow transplantation were genotyped and tested for association with transplantation outcomes. As a result, no genes were significantly associated the outcomes. A large population with a more homogeneous patient background may be necessary for a definitive conclusion to be made.

研究分野：疫学

キーワード：分子疫学 免疫学

1. 研究開始当初の背景

骨髄移植は白血病などの血液疾患に対する根治療法である。しかしながら骨髄移植後の5年生存率は約50%程度にとどまっている。移植片対宿主病(GVHD)などの骨髄移植後の合併症は、生存率や生活の質を低下させる深刻な問題である。また原疾患の再発も移植後の生存率を低下させる大きな要因である。GVHDや原疾患の再発を防ぐ方法は十分に確立されていない。

骨髄移植後の予後を改善するためには、ドナー・レシピエント間の遺伝的要因の良好な組み合わせを見つけることが有望な方法と考えられる。ドナー・レシピエント間で合致させる遺伝的因子としてはHLAがよく知られており、実際に利用されている。非血縁骨髄移植においてはHLA-A、HLA-B、HLA-DRB1遺伝子の型をドナー・レシピエント間で合致させることが多く、さらに可能な場合HLA-Cについても合致させる。HLA以外の遺伝的因子については、移植時には考慮されていない。これはそもそもHLA以外の遺伝的多型のヒトにおける移植予後への影響に関してまだまだ不明な点が多いためである。

最近新しいがん治療法として免疫チェックポイント阻害剤が着目されている。これは癌細胞の免疫抑制因子を介して免疫の働きを弱めることを防ぐ方法である。BTLAなどの免疫抑制因子は骨髄移植のマウスモデルにおいても重要な役割を果たすことが知られている。また、がんにおけるエピゲノムの変化についても最近注目が集まっている。代表的なエピゲノム修飾であるDNAのメチル化やヒストンメチル化も骨髄移植のマウスモデル等において重要であると示唆されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨髄移植後の予後の予測あるいはドナー選択に免疫抑制遺伝子の一塩基多型が有用かどうかを調べることである。免疫抑制遺伝子の中で、動物GVHDモデル等で重要性が示唆されているBTLA(B and T lymphocyte associated)・PD-1(programmed cell death 1)・LAG3(lymphocyte activating 3)等の遺伝子の多型と骨髄移植後の予後との関連を分子疫学的手法で明らかにする。また、最近DNAやヒストンのメチル化修飾がGVHDに影響する事が動物モデル等で強く示唆されている。その中で、最も顕著な効果を示すヒストン・DNAのメチル化酵素であるEZH2(Enhancer of zeste 2)・DNMT1(DNA methyltransferase 1)の一塩基多型が骨髄移植予後に及ぼす影響を解明することを第2の目的とする。その他CARD8(caspase recruitment domain family member 8)など

の一部の免疫関連遺伝子についても解析対象とした。

3. 研究の方法

2006-2009年に日本骨髄バンクを介して非血縁骨髄移植を受けたドナーとレシピエント約1000組について各遺伝子あたり一塩基多型1つまたは2つについて遺伝子型の解析を行った。DNA検体は日本骨髄バンクから分離された。遺伝子解析はTaqMan PCR法を用いて、Applied Biosystems社の定量PCR解析装置で行った。TaqMan法で解析できなかった検体についてはSanger法による塩基配列直接決定により遺伝子型を決定した。主要評価項目として2-4級急性GVHD、副評価項目として3-4級急性GVHD、慢性GVHD、広範性慢性GVHD、好中球生着、非再発死亡、再発、全死亡(全生存率)を設定した。統計解析にはCoxの比例ハザード回帰やFine-Grayの比例サブハザード回帰を用いた。一部の単変量解析にはKaplan-Meier曲線や累積発生率曲線を用いた。統計解析ソフトには主にRを用いた。調べた遺伝子多型の数を考慮して、最終的な有意水準は0.005とした。

4. 研究成果

(1) 結果の概要

まず結論を要約すると、悪性疾患を有し初回移植を受けたレシピエントとそのドナーのペアにおいて、解析した遺伝子多型と評価項目(移植後の予後)との間に統計的有意($P < 0.005$)な関連は見られなかった。例として、レシピエント側CARD8遺伝子の一塩基多型であるrs2043211のマイナーアリル(Tアリル)の数との多変量解析の結果を評価項目ごとに分けて以下に示す。

(2) 2-4級急性GVHD

変数名	ハザード比	P値
レシピエントCARD8	0.99	0.867
シクロスポリンA使用	1.43	0.005
全HLAミスマッチ数	1.19	0.005
ドナー高年齢	1.28	0.044
骨髄破壊の移植	1.12	0.476
レシピエント高年齢	0.78	0.051
レシピエント高BMI	0.86	0.212
非寛解期移植	1.27	0.056
女性ドナー 男性レシピエント	1.12	0.460

N = 787. シクロスポリンAやHLAミスマッチ数という既知の危険因子は関連していた

(P = 0.005) が、レシピエント CARD8 は統計的有意に関連していなかった。他の遺伝子も結果は同様であり、有意な関連は認められなかった。

(3) 全死亡

変数名	ハザード比	P 値
レシピエント CARD8	1.21	0.011
HLA-C ミスマッチ数	1.16	0.188
ドナー高年齢	1.01	0.939
レシピエント高年齢	1.70	<0.001
レシピエントのパフォーマンスステータス	1.46	0.001
ドナーのサイトメガロウイルス	1.50	0.001
血液型ミスマッチ	1.10	0.388
非寛解期移植	1.81	<0.001
女性ドナー 男性レシピエント	1.03	0.832

N = 822. 既知の危険因子であるレシピエントの高年齢・悪パフォーマンスステータス・非寛解期移植・ドナーのサイトメガロウイルス陽性は予想通り全死亡と関連していたが、レシピエント CARD8 は統計的有意に関連していなかった。他の遺伝子の多型についても結果は同様であった（有意な関連は認められなかった）。

(4) 慢性 GVHD

変数名	ハザード比	P 値
レシピエント CARD8	0.97	0.776
HLA-C ミスマッチ数	1.76	<0.001
ドナー高年齢	0.83	0.152
骨髄破壊的移植	1.05	0.776
レシピエント高年齢	0.97	0.818
レシピエント高 BMI	1.40	0.012
非寛解期移植	0.79	0.085
女性ドナー 男性レシピエント	1.11	0.526

N = 677. HLA-C ミスマッチ数は予想通り関連していたが、レシピエント CARD8 は統計的有意に関連していなかった。他の遺伝子の多型も結果は同様であり、関連は認められなかった。

(5) 広範性慢性 GVHD

変数名	ハザード比	P 値
レシピエント CARD8	1.02	0.863
HLA-C ミスマッチ数	1.80	<0.001
ドナー高年齢	0.94	0.751
骨髄破壊的移植	1.48	0.106
レシピエント高年齢	0.98	0.898
レシピエント高 BMI	1.82	0.001
非寛解期移植	0.95	0.765
女性ドナー 男性レシピエント	1.55	0.032

N = 677. レシピエント CARD8 遺伝子は統計的有意に関連していなかった。他の遺伝子の多型も結果は同様であり、統計的有意な関連は認められなかった。

(6) その他の評価項目

3-4 級急性 GVHD、広範性慢性 GVHD、好中球生着、非再発死亡、再発についても初回移植悪性疾患患者全体で P < 0.005 となった遺伝子多型はなかった（データ略）。

(7) 考察と展望

本研究で調べた遺伝子は動物 GVHD モデル等で何らかの役割が確認されたものばかりであったが、有意水準 0.005 において骨髄移植後の予後の評価項目と統計的有意に関連しているものはなかった。本研究で調べた遺伝子多型の多くは何らかの疾患との関連が示されていることから、調べた遺伝子多型の効果が弱いという可能性は低いと考えられる。

ヒトの患者背景は動物モデルとちがいが均一でないということは理由の一つと考えられる。可能であれば将来的にはより均一な背景の患者をより多く集めて研究を行うことが望ましい。また、現在使用されている動物モデルの多くは HLA に相当する遺伝子が完全にミスマッチの状態で解析しているが、多くのドナー・患者間では部分的にミスマッチであり、その影響も考えられる。実際に、我々は CARD8 と機能的に関係しているインフラマソーム遺伝子の多型と HLA の組み合わせが GVHD 等に重要であるという結果を報告している。

本研究の結果から推察すると、骨髄移植の予後に影響を及ぼすような HLA 以外の遺伝子多型は必ずしも多くない可能性がある。現時点では引き続き予後に影響を及ぼすような HLA 以外の遺伝子多型を探索することが大切と考えられる。

尚、本研究の結果の一部は下記の発表論文

等に記載した論文等で報告済みである。論文で未発表の内容についてもできるだけ早く論文化したいと考えている。

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1件)

(1)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.

Scientific Reports. 2017;7(1):13097.

DOI: 10.1038/s41598-017-13506-w

査読有

〔学会発表〕(計1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. 非血縁骨髄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.

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

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

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

〔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

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

(2)研究分担者

田邊 剛 (TANABE, Tsuyoshi)

山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 80260678

玉田 耕治 (TAMADA, Koji)

山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 00615841

(3)連携研究者

東條 有伸 (TOJO, Arinobu)

東京大学・医科学研究所・教授
研究者番号: 00211681