

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09513

研究課題名(和文)造血幹細胞移植関連遺伝子多型の機能解析とゲノム標的治療の探索

研究課題名(英文) Functional analysis of genetic polymorphism associated with hematopoietic stem cell transplantation, and exploration for genome target therapy

研究代表者

高見 昭良 (Takami, Akiyoshi)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：80324078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：同種骨髄移植を受けた患者とドナーの免疫調整遺伝子多型解析を行い、臨床意義を有する機能性遺伝子の多型部位(NKG2D、CXCL10、NLRP3、THBD/BDCA3、TLR1、TLR4、CCL2)が、下流非翻訳領域に集中することを明らかにした。さらに、活性化NKレセプター遺伝子NKG2D下流非翻訳領域の多型部位にmiRNA-1245が結合し、NK活性を抑制すること、血液がん患者の血中エクソソーム内のmiRNA-1245が増加していることを明らかにした。しかも、miRNA-1245の結合能は、高NK活性遺伝子多型と比べ、低NK活性遺伝子多型で優位であった。

研究成果の概要(英文)：The immunomodulation-related gene polymorphism analysis of patients who received allogeneic bone marrow transplantation and their donor showed that the polymorphic sites of functional genes with clinical significance, including NKG 2D, CXCL10, NLRP 3, THBD/BDCA3, TLR1, TLR4, CCL2, were concentrated in the 5'-untranslated region. It was also revealed that miRNA-1245 binds to the polymorphic site of the 5'-untranslated region of the activated NK receptor gene NKG2D, leading to suppress NK activity, and that miRNA-1245 in serum exosomes obtained from patients with hematologic malignancies is increased. Moreover, the binding ability of miRNA-1245 with the low NK cytotoxicity genotype was superior to that with the high NK cytotoxicity genotype.

研究分野：血液学

キーワード：造血幹細胞移植 遺伝子多型

## 1. 研究開始当初の背景

同種造血幹細胞移植は白血病など血液難病の根治を期待して行われる。しかし、ドナーリンパ球による拒絶反応(移植片対宿主病)や重症感染症、再発のため、長期生存率は50%にとどまる。サイトカインや先天免疫など免疫調整遺伝子は多型があり、自己免疫疾患や感染免疫、がん監視機構、臓器移植後拒絶との関連が知られている。研究代表者は、同種造血細胞移植の成否に関わる免疫調整遺伝子多型を同定してきた(1-16)。移植前のドナー関連遺伝子多型解析により、移植成功率が最も高いと予想されるドナーが選択できると期待される。また、患者関連遺伝子多型解析により、移植片対宿主病や重症感染症など合併症を予測し、予防あるいは早期治療介入ができるはずである。これらが確立すれば、同種造血幹細胞移植成績は大幅に向上するはずである。さらに、臨床解析で関連がみられた遺伝子多型の機能や分子基盤が解明できれば、ゲノム標的予防・治療法へと発展する可能性がある。

## 2. 研究の目的

免疫調整遺伝子多型解析をもとに最善のドナーを選び、移植後合併症予測し予防するため、免疫病態にかかわる遺伝子多型と同種造血幹細胞移植転帰との関連を明らかにする。さらに、臨床解析で関連がみられた遺伝子多型機能を実験的に解明する。

## 3. 研究の方法

臨床コホート研究として、解析用1塩基多型(SNP)の必要条件を、(1)コード蛋白が同種造血幹細胞移植の免疫病態に関与、(2)SNPが自己免疫疾患や感染免疫、臓器移植拒絶に関与、(3)研究室で臨床解析が済んでいるSNPは生存率や移植関連死亡率、再発率への影響が乏しかったものを除外とし、SNPを決定した。以上の条件から選択したSNPをTaqMan SNP遺伝子多型解析法で決定し、同種移植後臨床転帰との関連を後方視的に解析した。統計解析にはEZR(6)を用いた。多変量解析は交絡因子(血液型適合性、患者・ドナー年齢、前処置強度、疾患リスク、移植片対宿主病予防法、患者性別、性別適合性、全身放射線照射、患者体重あたり輸注細胞数、移植実施年)で補正し、連続変数は中央値で区分けした。生存率のみCox比例ハザード法を、それ以外はFine-Gray比例ハザード法を用いた。P値0.05以下を移植後転帰に関連するSNPと判定した。TLR4・NKG2D各遺伝子多型に関して、健常人血液を用いた機能解析を行った。

## 4. 研究成果

臨床コホート研究により、ドナーまたは患者または両者において、7種類(NKG2D、CXCL10、NLRP3、THBD/BDCA3、TLR1、TLR4、CCL2)のSNPが、同種造血幹細胞

移植の転帰に臨床的影響を及ぼすことがわかった。興味深いことに、これらの臨床的有意なSNPは全て下流非翻訳領域にあり、NK細胞やマクロファージ、顆粒球など自然免疫に深く関わる遺伝子であった。

ドナーTLR4 SNPが同種造血幹細胞移植後転帰に影響する(17)ことを明らかにしたのち、機能解析を行った。健常人の単球を用いて調べたところ、同種移植後高感染症死亡率に関連するTLR4遺伝子型は、TLR4発現能が高いとわかった。TLR4発現の多寡は自然免疫応答の強弱に影響することから、TLR4高発現遺伝子型を有するドナーから移植を受けると、最終的に炎症性サイトカイン産生能が高まる可能性が示唆された。すなわち、同種移植において、TLR4高発現遺伝子型に伴う過剰な炎症性サイトカイン産生が、重篤な臓器障害を来す可能性が考えられた。

ドナーNKG2D SNPが同種造血幹細胞移植後転帰に影響する(8, 16)ことを明らかにしたのち、機能解析を行った。活性化NKレセプター遺伝子NKG2D下流非翻訳領域の多型部位にmiRNA-1245が結合し、NK活性を抑制することを明らかにした(18)。しかも、miRNA-1245の結合能は、高NK活性遺伝子多型と比べ、低NK活性遺伝子多型で優位であった。IL-15やTGF- $\beta$ 1などNK活性調整因子の添加によりmiRNA-1245量が増減し、NK活性と負の相関を示すこともわかった。すなわち、NK活性の制御に、miRNA-1245は決定的な役割を担っていた。加えて、血液がん患者において、血中エクソソーム内のmiRNA-1245が著明に増加しているとの研究結果を得ている(8)。これは、血液がんがmiRNA-1245を介しNK活性を抑制し、免疫学的逃避や免疫不全をもたらすことを示唆している。

以上から、複数のSNP解析結果をもとに、最適ドナー選択や移植後転帰を予測し適切に対応する個別移植医療の実現に役立つ可能性が示唆された。さらに、造血幹細胞移植への寄与にとどまらず、自己免疫疾患や感染症、臓器移植診療、新規がん治療法開発への波及効果も期待される。

### <引用文献>

1. Nomoto H, Takami A, et al. Int J Hematol. 2015;102:460-70.
2. Espinoza JL, Takami A, et al. Blood. 2014;124:1244a.
3. Takami A. Int J Hematol. 2013;98:273-4.
4. Takami A. Int J Hematol. 2013;98:309-18.
5. Nakata K, Takami A, et al. Clin Immunol. 2013;146:104-11.
6. Kanda Y. Bone Marrow Transplant. 2013;48:452-8.
7. Espinoza JL, Takami A, et al. Biol Blood Marrow Transplant. 2013;19:240-6.

8. Espinoza JL, Takami A, et al. *Haematologica*. 2012;97:1295-303.
9. Takami A, et al. *Bone Marrow Transplant*. 2011;46:238-43.
10. Morishita E, Takami A, et al. *Blood*. 2011;118:862-.
11. Espinoza JL, Takami A, et al. *Blood*. 2011;118:1739-.
12. Espinoza JL, Takami A, et al. *Bone Marrow Transplant*. 2011;46:1455-63.
13. Espinoza JL, Takami A, et al. *PLoS One*. 2011;6:e23827.
14. Espinoza JL, Takami A, et al. *PLoS One*. 2011;6:e26229.
15. Espinoza JL, Takami A, et al. *Jpn J Clin Hematol*. 2010;51:291a.
16. Espinoza JL, Takami A, et al. *Haematologica*. 2009;94:1427-34.
17. Uchino K, Takami A, et al. *Oncotarget*. 2017;8:45670-86.
18. Espinoza JL, Takami A, et al. *Sci Rep*. 2016;6:39231.

## 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36件)全て査読有

1. Takami A. Hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Int J Hematol*. 2018;107(5):513-8.
2. Kurahashi H, Takami A, et al.. Decreased platelet count in children with epilepsy treated with valproate and its relationship to the immature platelet fraction. *Int J Hematol*. 2018;107(1):105-11.
3. Yanada M, Takami A, et al. Autologous hematopoietic cell transplantation for acute promyelocytic leukemia in second complete remission: outcomes before and after the introduction of arsenic trioxide. *Leuk Lymphoma*. 2017;58(5):1061-7.
4. Yamasaki S, Takami A, et al. Role of reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic cell transplantation in older patients with de novo acute myeloid leukemia. *Ann Hematol*. 2017;96(2):289-97.
5. Uchino K, Takami A, et al. Toll-like receptor genetic variations in bone marrow transplantation. *Oncotarget*. 2017;8(28):45670-86.
6. Nakayama T, Takami A, et al. Livedoid vasculopathy and popliteal artery occlusion in a patient with protein S deficiency. *J Dermatol*. 2017;44(2):198-201.
7. Nakane T, Takami A, et al. Use of mycophenolate mofetil and a calcineurin inhibitor in allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation from HLA-matched siblings or unrelated volunteer donors: Japanese multicenter phase II trials. *Int J Hematol*. 2017;105(4):485-96.
8. Mizutani M, Takami A, et al. Comparison of Autologous and Unrelated Transplants for Cytogenetically Normal Acute Myelogenous Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017;23(9):1447-54.
9. Konuma T, Takami A, et al. Outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adult patients with acute myeloid leukemia harboring trisomy 8. *Ann Hematol*. 2017;96(3):469-78.
10. Kasagi T, Takami A, et al. Light Chain Deposition Disease Diagnosed with Laser Micro-dissection, Liquid Chromatography, and Tandem Mass Spectrometry of Nodular Glomerular Lesions. *Intern Med*. 2017;56(1):61-6.
11. Horio T, Takami A, et al. The recipient CCR5 variation predicts survival outcomes after bone marrow transplantation. *Transpl Immunol*. 2017;42:34-9.
12. Espinoza JL, Takami A, et al. The Repeated Administration of Resveratrol Has Measurable Effects on Circulating T-Cell Subsets in Humans. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:6781872.
13. Espinoza JL, Takami A, et al. The simultaneous inhibition of the mTOR and MAPK pathways with Gnetin-C induces apoptosis in acute myeloid leukemia. *Cancer Lett*. 2017;400:127-36.
14. Yanada M, Takami A, et al. Unrelated bone marrow transplantation or immediate umbilical cord blood transplantation for patients with acute myeloid leukemia in first complete remission. *European journal of haematology*. 2016;97(3):278-87.
15. Uchino K, Takami A, et al. Toll-like receptor 1 variation increases the risk of transplant-related mortality in hematologic malignancies. *Transpl Immunol*. 2016;38:60-6.
16. Takagi S, Takami A, et al. Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Leukemic Transformation Preceded by Philadelphia Chromosome-Negative Myeloproliferative Neoplasms: A Nationwide Survey by the Adult Acute Myeloid Leukemia Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*.

2016;22(12):2208-13.

17. Sugimoto K, Takami A, et al. Fibroblast Growth Factor-2 facilitates the growth and chemo-resistance of leukemia cells in the bone marrow by modulating osteoblast functions. *Sci Rep*. 2016;6:30779.

18. Niwa R, Takami A, et al. Identification of a novel missense mutation (563G>a) in the ABO gene associated with a Bel phenotype. *Transfusion*. 2016;56(5):1242-3.

19. Mori J, Takami A, et al. Outcomes of allogeneic hematopoietic cell transplantation in patients with biphenotypic acute leukemia. *Ann Hematol*. 2016;95(2):295-300.

20. Mizutani M, Takami A, et al. Comparable outcomes between autologous and allogeneic transplant for adult acute myeloid leukemia in first CR. *Bone Marrow Transplant*. 2016;51(5):645-53.

21. Mizuno S, Takami A, et al. Establishment of a Novel DLBCL Cell Line: AMU-ML2, Derived from a Primary Refractory Patient Shows Homogeneous Staining Region of 8q24 Inducing High Expression of Long Non-Coding RNAs Encoded By PVT1 and Resistance to Vincristine. *Blood*. 2016;128(22):2950-.

22. Kotecha R, Takami A, Espinoza JL. Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: a review of the clinical evidence. *Oncotarget*. 2016;7(32):52517-29.

23. Ishiyama K, Takami A, et al. Acute megakaryoblastic leukemia, unlike acute erythroid leukemia, predicts an unfavorable outcome after allogeneic HSCT. *Leuk Res*. 2016;47:47-53.

24. Fuji S, Takami A, et al. A prospective multicenter study of unrelated bone marrow transplants using a reduced-intensity conditioning regimen with low-dose ATG-F. *Bone Marrow Transplant*. 2016;51(3):451-3.

25. Espinoza JL, Takami A, et al. A functional polymorphism in the NKG2D gene modulates NK-cell cytotoxicity and is associated with susceptibility to Human Papilloma Virus-related cancers. *Sci Rep*. 2016;6:39231.

26. Aoki J, Takami A, et al. Impact of low-dose TBI on outcomes of reduced intensity conditioning allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for AML. *Bone Marrow Transplant*. 2016;51(4):604-6.

27. Aoki J, Takami A, et al. Impact of age on outcomes of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

with reduced intensity conditioning in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Am J Hematol*. 2016;91(3):302-7.

28. Umeda K, Takami A, et al. Comparison of continuous and twice-daily infusions of cyclosporine A for graft-versus-host-disease prophylaxis in pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatric blood & cancer*. 2015;62(2):291-8.

29. Sugimori N, Takami A, et al. Paraptosis cell death induction by the thiamine analog benfotiamine in leukemia cells. *PLoS One*. 2015;10(4):e0120709.

30. Nomoto H, Takami A, et al. A donor thrombomodulin gene variation predicts graft-versus-host disease development and mortality after bone marrow transplantation. *Int J Hematol*. 2015;102(4):460-70.

31. Mizuno S, Takami A, et al. Overexpression of salivary-type amylase reduces the sensitivity to bortezomib in multiple myeloma cells. *Int J Hematol*. 2015;102(5):569-78.

32. Konuma T, Takami A, et al. Effect of Granulocyte Colony-Stimulating Factor-Combined Conditioning in Cord Blood Transplantation for Myelodysplastic Syndrome and Secondary Acute Myeloid Leukemia: A Retrospective Study in Japan. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(9):1632-40.

33. Kawano N, Takami A, et al. Successful Secondary Umbilical Cord Blood Transplantation for Graft Failure in Acute Myelogenous Leukemia, Treated with Modified One-Day Conditioning Regimen, and Graft-Versus-Host Disease Prophylaxis Consisting of Mycophenolate and Tacrolimus. *J Clin Exp Hematop*. 2015;55(2):89-96.

34. Hosokawa K, Takami A, et al. Increased glycosylphosphatidylinositol-anchored protein-deficient granulocytes define a benign subset of bone marrow failures in patients with trisomy 8. *European journal of haematology*. 2015;95(3):230-8.

35. Arai Y, Takami A, et al. Efficiency of high-dose cytarabine added to CY/TBI in cord blood transplantation for myeloid malignancy. *Blood*. 2015;126(3):415-22.

36. Arai Y, Takami A, et al. Clinical significance of high-dose cytarabine added to cyclophosphamide/total-body irradiation in bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation for myeloid malignancy. *J Hematol Oncol*. 2015;8:102.

〔学会発表〕(計 21 件)

1. Takami A, et al. A Higher Immature Platelet Fraction Predicts a Response to Corticosteroids in Adult Patients with Immune Thrombocytopenia. International Journal of Laboratory Hematology. 2017;39(Supplement S2):116. 国際血液学会総会 2017 年 5 月 9-12 日 ホノルル (米国)
2. Nakagami Y, Takami A, et al. Peripheral Blood Smear Tells: An Appraisal of the Howell-Jolly Bodies. International Journal of Laboratory Hematology. 2017;39(Supplement S2):83. 国際血液学会総会 2017 年 5 月 9-12 日 ホノルル (米国)
3. Hanamura I, Takami A, et al. Single-Nucleotide Polymorphism in the Pbk Gene Is Closely Associated with Myeloma Cell Proliferation. Haematologica. 2017;102(s2):497. 欧州血液学会総会 2017 年 6 月 22 日-25 日 マドリード (スペイン)
4. Uchino K, Takami A, et al. Donor and Recipient Toll-Like Receptor 1 Variations Comparably Predict Transplant-Related Mortality after Unrelated Bone Marrow Transplantation. Haematologica. 2016;101(s1):332-.
5. Mizutani M, Takami A, et al. A Comparison of the Outcomes of Autologous and Unrelated-Donor Transplantation in Adult Intermediate-Risk Acute Myeloid Leukemia Patients in First Complete Remission. Biology of Blood and Marrow Transplantation. 2016;22(3, Supplement):S30-S1. 欧州血液学会総会 2016 年 6 月 9 日-12 日 コペンハーゲン (デンマーク)
6. Horio T, Takami A, et al. Recipient Ccr5 Genetic Variation Predicts Transplant Outcomes after Hla-Matched Unrelated Donor Bone Marrow Transplantation. Haematologica. 2016;101(s1):284-5. 欧州血液学会総会 2016 年 6 月 9 日-12 日 コペンハーゲン (デンマーク)

他 15 件

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

高見 昭良 (TAKAMI AKIYOSHI)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 80324078