

令和元年5月21日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19190

研究課題名(和文) PD-1遺伝子多型解析に基づく多発性骨髄腫治療効果予測バイオマーカーの検討

研究課題名(英文) Examination of multiple myeloma prognosis predictive biomarkers based on analysis of PD-1 polymorphisms

研究代表者

笠松 哲光 (Kasamatsu, Tetsuhiro)

群馬大学・大学院保健学研究科・助教

研究者番号：60737542

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)：健康者と多発性骨髄腫(骨髄腫)患者の3つのPD-1一塩基多型(SNPs)、2つのPD-L1 SNPs、4つのCTLA-4 SNPs、およびIDO-1、IDO-2のそれぞれ1つのSNPsを決定し、比較検討を行った。PD-1とIDO-2の発現が高い遺伝子型および活性の高い遺伝子型が骨髄腫の発症に関与し、CTLA-4およびPD-L1の発現の高い遺伝子型をもつ骨髄腫患者はより悪性度の高い症状を持つ割合が高かった。しかしながら、いずれのSNPsも骨髄腫患者の予後への影響は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、当初期待したPD-1遺伝子多型の多発性骨髄腫患者の予後予測バイオマーカーとしての有効性を認められなかった。しかしながら、PD-1をはじめとした免疫チェックポイント分子の遺伝子多型が多発性骨髄腫の発症やより重症な症状への関係性することが認められ、腫瘍に対する免疫を抑制的に調節する分子の遺伝的な背景が、まだ明らかとされていない多発性骨髄腫の発症および進行のメカニズムに何らかの影響を与えることが解明された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the impact of PDCD1 (3 single nucleotide polymorphisms; SNPs), PDCD1LG1 (2 SNPs), CTLA4 (4 SNPs), IDO1 (1 SNPs) and IDO2 (1 SNPs) polymorphisms on susceptibility and clinical features of multiple myeloma (MM) patients.

The PDCD1 high-expression type and IDO2 high-activity type were associated with the susceptibility of MM. In addition, the higher frequencies of patients with CTLA4 and PDCDLG1 high-expression types were observed in more malignant clinical variables. However, there were no significant differences between all polymorphisms and overall survival.

研究分野：血液検査学

キーワード：多発性骨髄腫 PD-1 遺伝子多型

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫(以下、骨髄腫)は、自家造血幹細胞移植や新規薬剤が導入され、50%生存期間が3年から5年に改善してきている。しかしながら、ほとんどの患者は早晩化学療法に抵抗性となり、未だ治癒が望めない。我々は、骨髄腫の病態解明を中心に研究を進めているが、特に骨髄腫患者の腫瘍免疫に注目している。骨髄腫細胞はその周囲を取り巻く骨髄微小環境による影響が大きく、骨髄環境内では骨髄間質細胞に接着し、サイトカインのシグナルによって、生存・増殖、さらには薬剤耐性を獲得している。免疫調整薬(以下、IMiDs)やプロテアソーム阻害剤などの新規薬剤は、直接的殺細胞効果に加え、骨髄微小環境や腫瘍免疫に作用することで抗骨髄腫作用を生じている。

抑制性免疫補助受容体 Programmed cell death 1(以下、PD-1)は、活性化したT細胞、B細胞、ミエロイド系細胞上に発現し、抗原受容体刺激を負に制御する抑制性の補助受容体であり、「自己免疫寛容」を担う分子の一つである。PD-1のリガンドはこれまでにPD-1 ligand 1(以下、PD-L1)およびPD-1 ligand 2(以下、PD-L2) PD-L2の2種類が同定されており、抗原受容体刺激と同時にPD-1に刺激が入ると、細胞傷害からの回避・免疫非応答状態の誘導などにより免疫反応を抑制している。PD-1は「免疫のブレーキ」として過剰な免疫反応や自己反応性T細胞を負に制御しているが、PD-1の働きが過剰になると腫瘍および感染に対する免疫が抑制され無抵抗状態になってしまい、逆にPD-1の働きが抑えられると免疫が増強され腫瘍に対する耐性が得られるが、自己免疫疾患の発症リスクが増加する。また、骨髄腫細胞においてもPD-L1発現が誘導され、腫瘍増殖や薬剤耐性の誘導、さらには病勢の進行に関与していることが報告されている(Tamura H et al. Leukemia, 2013)。また、PD-1阻害抗体 Nivolumab は日本でも2014年に悪性黒色腫に対し認可され、多くのがんにおいて積極的に治験が行われ、高い有効性が報告されている。しかしながら、骨髄腫でのPD-1抗体の治験では、抗PD-1抗体単剤では十分な効果は認められず、他の免疫療法と併用することで効果が得られており、骨髄腫におけるPD-1と抗腫瘍免疫細胞との関連機構の解明が必要である。

我々はその発現や機能に関係するとされるPD-1、PD-L1およびPD-L2の6つの一塩基多型(以下、SNPs)に注目した。これらのSNPsは全身性エリテマトーデスや関節リウマチなどの自己免疫性疾患や乳がんなどの固形がんなどの発症に関与することが報告されており、PD-1は遺伝的要因として注目されている。我々は、これまで特発性血小板減少性紫斑病や骨髄異形成症候群等の血液疾患におけるサイトカインSNPsが疾患の重症度や予後に関与することを報告してきた(Saitoh T, Kasamatsu T et al. Int J Lab Hematol, 2011, Kasamatsu T et al. Eur J Haematol, 2015 10.1111/ejh.12577)。骨髄腫の検討では、サイトカインレセプターSNPsであるIL-10RBのK47E(rs2834167)およびIL-23R Q3H(rs1884444)が、特に新規薬剤である免疫調整薬(以下、IMiDs)やプロテアソーム阻害剤による治療を受けた骨髄腫患者の予後に関与することを見出した。しかしながら、骨髄腫におけるPD-1関連SNPs解析の報告はなく、これらSNPsと骨髄腫における発症や薬剤耐性との関連は不明のままである。

2. 研究の目的

PD-1は、「免疫のブレーキ」として働く分子であり、過剰なブレーキが腫瘍免疫応答の無効化に関与する。多発性骨髄腫(以下、骨髄腫)においても、骨髄腫細胞がPD-L1を発現し、悪性化が誘導されることが報告されている。骨髄腫新規薬剤治療は、直接的殺細胞効果に加え、骨髄微小環境や腫瘍免疫に作用することで抗骨髄腫作用を生じているが、活性化した免疫にブレーキをかけるPD-1との関連は明らかにされていない。本研究では、PD-1関連SNPs解析に基づき、骨髄腫におけるPD-1と抗腫瘍免疫細胞の関連を明らかにすることで、予後や治療効果予測のバイオマーカーへの臨床応用を目的とする。

3. 研究の方法

(1) PD-1関連SNPsの骨髄腫患者における病態や治療抵抗性への関与を明らかにし、骨髄腫における新たなバイオマーカーとしての臨床応用を目指す。基礎的研究として、PD-1・PD-L1・PD-L2遺伝子の一塩基多型、mRNA発現量、リンパ球表面発現についての解析を行う。

(2) 応用研究として、PD-1・PD-L1・PD-L2SNPs遺伝子型の決定した骨髄腫患者のPD-1・PD-L1・PD-L2の発現およびリンパ球サブセット、臨床検査値を測定する。同様に新規薬剤治療前後の骨髄腫患者におけるPD-1・PD-L1・PD-L2の発現およびリンパ球サブセットを測定し、PD-1関連SNPsの遺伝子型およびそれぞれの組み合わせによるハプロタイプ、リンパ球サブセットの変動における感受性パターンを多変量解析にて比較することで、骨髄腫治療効果予測バイオマーカーとしての有効性を検討する。

4. 研究成果

健常者と骨髄腫患者の3つのPD-1SNPs(-606G/A・+7209C/T・A215V)を決定し、比較検討を行った。健常者と多発性骨髄腫患者における、各SNPの遺伝子型頻度およびアレル頻度に有意差は認められなかった。多発性骨髄腫患者において遺伝子型により臨床背景を比較したところ、PD-1+7209低産生型は高産生型患者に比べ有意に形質細胞腫の割合が高く、PD-1A215VAA型はAV&VV型患者に比べ骨病変の患者が多く、PD-1SNPsが多発性骨髄腫の症状に影響すること

が示唆された。しかし、いずれの SNsP においても全生存期間には有意な差は認められなかった。また、免疫系に影響を与えるとされる新規薬剤治療群（サリドマイド・ボルテゾミブ）でも同様の解析を行ったが、いずれの項目においても有意な差は認められなかった。

決定された PD-1 SNPs を組み合わせたハプロタイプの解析と PD-L1 の 2SNPs (*93T/C, *395C/G)、さらに PD-1 と同様に免疫チェックポイント分子の一つである cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4) の 4SNPs (-1722A/G, -1577A/G, +49A/G, +6230A/G) を決定し、解析を行った。あわせて PD-1 SNPs と健常者のリンパ球表面 PD-1 発現量と mRNA 発現量の比較を行った。SNPs の解析では、MM 患者は健常者に比べ PD-1 GCC/GCC ハプロタイプの割合が有意に高かった。MM 患者を各遺伝子型によって 2 群に分け臨床背景・予後を比較すると CTLA-4 -1722 AG & GG 型で髄外病変合併の割合が有意に高かった。また、PD-L1 TT & TC 型では血清アルブミン値が低かった。CTLA-4 -1577 GG 型では国際病期分類 III 期の割合が有意に高かった。しかし、いずれの SNPs においても予後および新規薬剤（サリドマイド・ボルテゾミブ）の反応性には有意差は認められなかった。また、健常者においてリンパ球表面 PD-1 発現量と mRNA 発現量を比較したが、いずれも SNPs の遺伝子型においても有意な差は認められなかった。

さらに、PD-1 と同様に免疫を負に調節する因子 Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) およびそのホモログ IDO2 の SNPs (IDO1 -1849 G/T (rs3824259)・IDO2 R248W (rs10109853)) と MM の発症・病態への影響について解析を行った。健常者に比べ MM 患者では IDO2 R248W の高活性タイプの RR 型が有意に多かった。IDO1 では有意な差は認められなかった。IDO2 R248W RR 型（高活性タイプ）では低活性タイプと比べ、予後改善効果が高い免疫調節薬・プロテアソーム阻害薬といった新規薬剤治療率が高いにもかかわらず、両群の全生存期間に差はなく、IDO2 SNPs が MM 新規薬剤の予後改善効果に影響を与える可能性を考え、さらなる解析を行っている。

PD-1 は疲弊した T 細胞 (Tex 細胞) だけでなく老化した T 細胞 (Tsen 細胞) にも発現が認められる。MM 患者では Tsen 細胞が増加している報告もあり、今後 Tsen 細胞と PD-1 の関係を明らかとするべく、in vitro での T 細胞老化の誘導を検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

橋本菜央、笠松哲光 他、多発性骨髄腫における IDO1 および IDO2 の遺伝子多型の意義、第 20 回日本検査血液学会学術集会、2019

笠松哲光 他、多発性骨髄腫における PD-1、PD-L1 および CTLA-4 遺伝子多型解析、第 43 回日本骨髄腫学会学術集会、2018

金井敬海、笠松哲光 他、多発性骨髄腫患者における免疫チェックポイント遺伝子の多型解析、第 18 回 日本検査血液学会学術集会、2017

笠松哲光 他、PD-1 and PD-L1 gene polymorphisms associated with the clinical features of multiple myeloma、第 79 回 日本血液学会学術集会、2017

Tetsuhiro Kasamatsu et al. Programmed cell death 1 gene polymorphisms associated with the clinical features of multiple myeloma, XXXth International Symposium on Technical Innovations in Laboratory Hematology, 2017

〔図書〕(計 1 件)

笠松哲光 他、北隆館、BIO Clinica、2017、426

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<http://ketsuken-gunma.kenkyuukai.jp/special/index.asp?id=16646>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：村上博和

ローマ字氏名：MURAKAMI hirokazu

研究協力者氏名：齋藤貴之

ローマ字氏名：SAITOH takayuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。