

同種造血細胞移植関連免疫調整遺伝子多型の機能解明

愛知医科大学
血液内科 教授 高見昭良

研究要旨

同種造血幹細胞移植は血液難病の根治を期待して行われるが、拒絶反応や感染症など合併症も多く、長期生存率は50%にとどまる。造血幹細胞移植成功率を高めるため、1) 免疫調整遺伝子多型解析をもとに最善のドナーを選び、移植後合併症を予測し予防するテーラーメイド型移植法の確立、2) 免疫調整遺伝子多型の機能解析とゲノム機序解明、3) 免疫調整遺伝子多型へのゲノム標的予防・治療法の探索研究の3点を企図し、研究を開始した。今回はトロンボモジュリン (TM) 遺伝子多型の役割に注目し検討した。TMは主に血管内皮細胞上に発現し、抗凝固作用や抗炎症作用など様々な機能を有している。TM遺伝子の *THBD* の下流非翻訳領域には1塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) rs3176123 (2729A>C)があり、血管障害との関連が示唆されている。*THBD* SNPの造血幹細胞移植免疫における役割を明らかにするため、臨床的検討と機能解析を行った。日本骨髄バンクを通じHLAアリル一致非血縁者間同種骨髄移植を受けた血液腫瘍患者317例とドナーを対象に、*THBD* SNPと移植後転帰の関連を解析したところ、ドナーACまたはCC型はII度からIV度急性移植片対宿主病 (GVHD) 発症率が低いことがわかった。II度からIV度急性GVHD発症患者に限ると、ドナーACまたはCC型の場合全死亡率の低下がみられた。機能解析では、Aアリル mRNA 転写量亢進がみられた。以上から、*THBD* SNPは機能的SNPで、TM転写量を通じ、同種造血幹細胞移植予後に影響していると考えられた。

研究目的

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¹⁻¹⁴。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。研究代表者は主任研究者として、日本骨髄バンクの協力を得て国内の非血縁者間骨髄移植患者全例とドナー

の DNA・臨床データを解析し、免疫調整遺伝子多型が造血幹細胞移植後転帰に影響することを明らかにしてきた¹⁵⁻³⁷。さらに、造血幹細胞移植関連遺伝子多型の一部が、遺伝子発現やNK活性、炎症性サイトカイン誘導能への影響など機能的に作用することを実験的に証明した^{16,38-40}。今回はトロンボモジュリン(TM)遺伝子多型の役割に注目し検討した。TMは主に血管内皮細胞上に発現し、抗凝固作用や抗炎症作用など様々な機能を有している。TM遺伝子の *THBD* の下流非翻訳領域には1塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) rs3176123 (2729A>C)があり、血管障害との関連が示唆されている。HLAが一致した他人の造血幹細胞を移植する同種造血幹細胞移植は、血液難病の根治を期待して行われる。ただし、重症感染症や拒絶反応、移植片対宿主病 (graft-versus-host disease; GVHD) など合併症や再発による死亡も多く、長期生存率は約50%にとどまる。同種造血幹細胞移植後の感染症や拒絶反応、GVHDの発症や病態には、調整蛋白や遺伝子が関与している。今回、国内の非血縁者間骨髄移植患者およびドナーを対象に、*THBD* rs3176123 SNPと移植後転帰の関連を後方視的に検討した。さらに、*THBD* SNPの機能を検証するため、*THBD* SNPとmRNA発現量との関連を検討した。

研究方法

対象症例

日本骨髄バンクを通じ実施された HLA-A/B/C/DRB1/DPB1/DQB1 アリルー一致非血縁者間同種骨髄移植患者およびドナーを対象とし、2006年から2009年血液腫瘍に対する非T細胞除去初回移植317例について解析した。内訳は、急性骨髄性白血病153例、急性リンパ性白血病67例、慢性骨髄性白血病12例、骨髄異形成症候群53例、悪性リンパ腫32例。

患者・ドナー試料(DNA)と臨床情報

日本骨髄バンク検体・データ保存事業で収集された非血縁者間同種骨髄移植患者・ドナーのDNAおよび臨床情報を使用した。

遺伝子多型解析

THBD genotyping probe と、TaqMan genotyping master mix (Applied Biosystems)

を用い、TaqMan PCR 法により、患者・ドナーの *THBD* SNP を決定した。PCR 増幅と解析は Step One Plus (Applied Biosystems) を使用した。PCR 条件は、pre-denaturation 60°C、30 秒、denaturation 95°C、10 分、annealing 92°C、15 秒、elongation 60°C、1 分、post-elongation 60°C、30 秒で行った。

試料準備

健康人（日本居住のアジア人種）27 名(20-25 歳)より、ヘパリン加末梢血を採取した。

DNA・RNA 抽出と cDNA 作製

遠沈細胞から QIAamp RNA Blood Mini Kit (QIAGEN) で RNA を抽出した。さらに、High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) で cDNA を作製し、解析まで -20°C 保存した。別に genomic DNA も抽出した。

THBD 発現解析

THBD SNP と転写量の間係を明らかにするため、アリル特異的転写量測定法 (Allele-specific transcript quantification) を行った。健康人由来の *THBD* AC 型 genomic DNA、cDNA を Step One Plus (Applied Biosystems) を用いたアリル増幅解析を行い、G/C アリル比を算出した。

AA 型・CC 型の genomic DNA を 1:0、3:1、2:1、3:2、1:1、2:3、1:2、1:3、0:1 で混合後アリル増幅解析を行い、コントロールとした。

統計解析

統計解析は、Microsoft Office Excel 2013 と EZR を用いた。2 群間比較は t 検定とウィルコクソンの符号順位検定で行った。全生存率 (overall survival; OS) 算出・比較は Kaplan-Meier 解析・log-rank 解析、移植関連死亡率 (Transplant-related mortality; TRM)、再発率 (relapse)、急性 (acute)・慢性 (chronic) GVHD の算出・比較は累積発生率解析法・Gray 法を用いた。

研究結果

非血縁者間同種骨髄移植 317 例の *THBD* SNP を決定した。遺伝子型頻度は、ドナーが AA 51% AC 40% CC 9%、患者が AA 54% AC 36% CC 10%であった。これは、International HapMap Project による日本人データに一致すると考えられた。ドナー SNP と移植後転帰の関連を検討したところ、ドナー AC または CC 型は II 度から IV 度急性移植片対宿主病 (GVHD) 発症率が低いことがわかった (HR = 0.66; 95% CI = 0.44 – 0.99; P = 0.05)。II 度から IV 度急性 GVHD 発症患者に限ると、ドナー AC または CC 型の場合全死亡率の低下がみられた (HR = 0.45; 95% CI = 0.21 – 0.99; P = 0.05)。0 度から 1 度急性 GVHD 患者では、*THBD* SNP の影響はみられなかった。患者側の SNP に関しては、有意な影響はみられなかった。機能解析では、A アリル mRNA 転写量亢進がみられた。

考察

血液悪性腫瘍 317 例を対象に、*THBD* SNP と非血縁者間同種骨髄移植後転帰の関連を検討したところ、ドナー AA 型に比べドナー AC/CC 型は急性 GVHD の頻度が少なく、急性 GVHD 発症後の予後が良好であることがわかった。ドナー選択の最適化につながる可能性がある。健常人の末梢血を用い、C アリルの転写量は A アリルより高いことを示した。したがって、*THBD* C アリル保有者は、*THBD* 発現量亢進を通じ効率良く TM を産生する可能性が示唆された。この SNP は下流非翻訳領域に有り、microRNA など調整因子との結合に影響を与えている可能性がある。臨床解析、機能解析より、*THBD* AC/CC 型ドナーから移植を受けた場合、高 TM 発現により急性 GVHD 発症率および死亡率の低下がもたらされる可能性が示唆された。移植後の TM が GVHD 予防・治療や臓器障害改善に関与するという報告は、この仮説を支持する。TM は血管内皮に加え白血球も発現している。今回はドナー由来白血球の影響かもしれない。以上から、*THBD* SNP は機能的 SNP で、TM 転写量を通じ、同種造血幹細胞移植予後に影響していると考えられた。他の SNP 解析結果¹⁵⁻³⁷と組み合わせることにより、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。

文献

1. Aoki J, Ishiyama K, Taniguchi S, et al: Outcome of allogeneic

hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia patients with central nervous system involvement. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2014

2. Ishiyama K, Katagiri T, Ohata K, et al: Safety of pre-engraftment prophylactic foscarnet administration after allogeneic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis* 14:33-9, 2012

3. Ishiyama K, Okumura H, Yamazaki H, et al: Intensive chemotherapy for a relapsed ALL patient who received living-donor lobar lung transplantation. *Bone Marrow Transplant* 47:135-6, 2012

4. Ishiyama K, Takami A, Kanda Y, et al: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia with t(6;9)(p23;q34) dramatically improves the patient prognosis: a matched-pair analysis. *Leukemia* 26:461-4, 2012

5. Ishiyama K, Takami A, Kanda Y, et al: Prognostic factors for acute myeloid leukemia patients with t(6;9)(p23;q34) who underwent an allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Leukemia* 26:1416-9, 2012

6. Ishiyama K, Takami A, Okumura H, et al: Complete and durable remission of refractory mantle cell lymphoma with repeated rituximab monotherapy. *Int J Hematol* 81:319-22, 2005

7. Ishiyama K, Takami A, Shiobara S, et al: Graft-versus-leukemia effect of allogeneic stem cell transplantation; a Japanese single center study. *Haematologica* 89:887-9, 2004

8. Umeda K, Adachi S, Tanaka S, et al: Comparison of continuous and twice-daily infusions of cyclosporine A for graft-versus-host-disease prophylaxis in pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer*, 2014

9. Mochizuki K, Kondo Y, Hosokawa K, et al: Adenovirus pneumonia presenting with nodular shadows on chest X-ray in two unrelated allogeneic bone marrow transplant recipients. *Intern Med* 53:499-503, 2014

10. Kanda J, Fuji S, Kato S, et al: Decision analysis for donor selection in stem cell transplantation-HLA-8/8 allele-matched unrelated donor vs HLA-1 AG mismatched related donor. *Blood Cancer J* 4:e263, 2014

11. Hosokawa K, Yamazaki H, Nakamura T, et al: Successful hyperbaric oxygen therapy for refractory BK virus-associated hemorrhagic cystitis after cord blood transplantation. *Transpl Infect Dis* 16:843-6, 2014
12. Hosokawa K, Takami A, Tsuji M, et al: Relative incidences and outcomes of *Clostridium difficile* infection following transplantation of unrelated cord blood, unrelated bone marrow, and related peripheral blood in adult patients: a single institute study. *Transpl Infect Dis* 16:412-20, 2014
13. Hosokawa K, Sugimori N, Katagiri T, et al: Increased glycosylphosphatidylinositol-anchored protein-deficient granulocytes define a benign subset of bone marrow failures in patients with trisomy 8. *Eur J Haematol*, 2014
14. Zaimoku Y, Takami A, Sato H, et al: IgM anti-recipient ABO antibodies predict acute graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol* 98:96-101, 2013
15. Espinoza JL, Takami A, Nakata K, et al: Resveratrol, a Natural Antioxidant From Grapes and Red Wines, Prevents EBV-Associated Lymphoproliferation and Transformation through Inducing Apoptosis. *ASH Annual Meeting Abstracts* 116:2543-, 2010
16. Espinoza JL, Takami A, Nakata K, et al: A genetic variant in the IL-17 promoter is functionally associated with acute graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation. *PLoS One* 6:e26229, 2011
17. Espinoza JL, Takami A, Nakata K, et al: A Single Nucleotide Polymorphism in the NLRP3 Gene Is Associated with Acute Graft-Versus-Host Disease After HLA-Matched Unrelated Bone Marrow Transplantation. *ASH Annual Meeting Abstracts* 118:4073-, 2011
18. Espinoza JL, Takami A, Nakata K, et al: Genetic variants of human granzyme B predict transplant outcomes after HLA matched unrelated bone marrow transplantation for myeloid malignancies. *PLoS One* 6:e23827, 2011
19. Espinoza JL, Takami A, Onizuka M, et al: A single nucleotide polymorphism of IL-17 gene in the recipient is associated with acute GVHD after HLA-

matched unrelated BMT. Bone Marrow Transplant 46:1455-63, 2011

20. Espinoza JL, Takami A, Onizuka M, et al: The recipient PTPN22 -1123C/C genotype predicts acute graft-versus-host disease after HLA-fully-matched unrelated bone marrow transplantation for hematologic malignancies. Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation, 2012

21. Espinoza JL, Takami A, Onizuka M, et al: Recipient PTPN22 -1123 C/C genotype predicts acute graft-versus-host disease after HLA fully matched unrelated bone marrow transplantation for hematologic malignancies. Biol Blood Marrow Transplant 19:240-6, 2013

22. Espinoza JL, Takami A, Onizuka M, et al: NKG2D gene polymorphism has a significant impact on transplant outcomes after HLA-fully-matched unrelated bone marrow transplantation for standard risk hematologic malignancies. Haematologica 94:1427-34, 2009

23. Espinoza JL, Takami A, Trung LQ, et al: Resveratrol prevents EBV transformation and inhibits the outgrowth of EBV-immortalized human B cells. PLoS One 7:e51306, 2012

24. Espinoza JL, Takami A, Trung LQ, et al: Ataxia-telangiectasia mutated kinase-mediated upregulation of NKG2D ligands on leukemia cells by resveratrol results in enhanced natural killer cell susceptibility. Cancer Sci 104:657-62, 2013

25. Espinoza JL, Takami A, Trung LQ, et al: **Resveratrol prevents EBV transformation and inhibits the outgrowth of EBV-immortalized human B cells.** PLoS One 2012

26. Espinoza JL, Takami A, Yoshioka K, et al: A Functional Variation In the NKG2D Gene Regulates NKG2D Receptor Expression and Is Associated with Better Transplant Outcomes After Fully-HLA-Matched Unrelated Bone Marrow Transplantation. ASH Annual Meeting Abstracts 116:221-, 2010

27. Espinoza JL, Takami A, Yoshioka K, et al: Human microRNA-1245 downregulates the NKG2D receptor in NK cells and impairs NKG2D-mediated

functions. *Haematologica*, 2012

28. Espinoza JL, Takami A, Yoshioka K, et al: A functional polymorphism in the 3' untranslated region of the NKG2D gene regulates NKG2D receptor expression. *Jpn J Clin Hematol* 51:291a, 2010

29. Espinoza LJ, Takami A, Nakata K, et al: Genetic variants of human granzyme B predict transplant outcomes after HLA matched unrelated bone marrow transplantation for myeloid malignancies. *PLoS One* 6:e23827, 2011

30. Espinoza LJ, Takami A, Yoshioka K, et al: A Functional Variation In the NKG2D Gene Regulates NKG2D Receptor Expression and Is Associated with Better Transplant Outcomes After Fully-HLA-Matched Unrelated Bone Marrow Transplantation. *ASH Annual Meeting Abstracts* 116:221-, 2010

31. Luis Espinoza J, Takami A, Trung LQ, et al: Ataxia-telangiectasia mutated kinase-mediated upregulation of NKG2D ligands on leukemia cells by resveratrol results in enhanced natural killer cell susceptibility. *Cancer Sci* 104:657-62, 2013

32. Nakata K, Takami A, Espinoza JL, et al: The recipient CXCL10 + 1642C>G variation predicts survival outcomes after HLA fully matched unrelated bone marrow transplantation. *Clin Immunol* 146:104-11, 2013

33. Takami A: The role of non-HLA gene polymorphisms in graft-versus-host disease. *Int J Hematol* 98:309-18, 2013

34. Takami A: Guest editorial: new basic and clinical aspects of graft-versus-host disease: what can we do without "Doc" Brown's help? *Int J Hematol* 98:273-4, 2013

35. Takami A, Espinoza JL, Onizuka M, et al: A single-nucleotide polymorphism of the Fcγ receptor type IIIA gene in the recipient predicts transplant outcomes after HLA fully matched unrelated BMT for myeloid malignancies. *Bone Marrow Transplant* 46:238-43, 2011

36. Takami A, Espinoza JL, Onizuka M, et al: Significant Impact of IL-17A Gene Polymorphism On Transplant Outcomes After HLA-Fully-Matched Unrelated

Bone Marrow Transplantation. ASH Annual Meeting Abstracts 114:2305-, 2009

37. Takami A, Yano S, Yokoyama H, et al: Donor Lymphocyte Infusion for the Treatment of Relapsed Acute Myeloid Leukemia after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Retrospective Analysis by the Adult Acute Myeloid Leukemia Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant, 2014

38. Takami A, Espinoza JL, Matsuo K, et al: Association of Functional Single Nucleotide Variation in the NLRP3 Gene with Survival Outcomes After Unrelated Bone Marrow Transplantation. ASH Annual Meeting Abstracts 120, 2012

39. Espinoza JL, Takami A, Yoshioka K, et al: Human microRNA-1245 down-regulates the NKG2D receptor in natural killer cells and impairs NKG2D-mediated functions. Haematologica 97:1295-303, 2012

40. Quoc Trung L, Espinoza JL, Takami A, et al: Resveratrol induces cell cycle arrest and apoptosis in malignant NK cells via JAK2/STAT3 pathway inhibition. PLoS One 8:e55183, 2013