

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名: Whole Genome Association 解析による GVHD の原因遺伝子の探索

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点):

研究代表者

小川 誠司 (東京大学医学部附属病院 特任准教授)

主たる共同研究者

小寺 良尚 (愛知医科大学 教授)

森島 泰雄 (愛知県がんセンター中央病院 副院長)

岡 晃 (東海大学医学部 講師)

山本 健 (九州大学生体防御医学研究所 准教授)

佐竹 正博 (東京都西赤十字血液センター 所長)

3. 研究実施概要

同種造血幹細胞移植は、現時点で、難治性造血器腫瘍に対する最も強力な治療手段の一つである。その強力な抗腫瘍効果の主体を担うのは、腫瘍細胞を標的として、生着した移植片によって誘導されるアロ免疫反応(移植片対白血病効果;GVL)であると考えられているが、一方、同様のアロ免疫反応は患者の正常組織に対しても惹起され、移植片対宿主病(GvHD)として知られる重篤な副作用を誘発する。従って、移植成績の向上という観点からは、GVL 効果を温存しつつ、重篤な GvHD を回避する移植技術の開発が望まれる。そこで、本研究事業では、高密度 SNP アレイによる大規模 SNP タイピングとこれに基づいたゲノムワイド関連解析の手法を用いて、これらの免疫学的反応・病態に関わる遺伝学的背景の探索を行った。なお、本研究事業の技術的な中核となる SNP アレイの性能評価の研究からこれを用いた高精度なゲノムコピー数評価が可能であることが予測されたため、当初の研究計画には含まれていなかったものの、テーラーメイド医療技術の開発におけるその重要性和有用性に鑑み、SNP アレイを用いたゲノムコピー数解析技術とこれを用いた癌の新規標的分子の同定に関する研究を新たに計画し遂行した。

(1) 全ゲノム関連解析に基づく GvHD 関連遺伝子多型の同定

GvHD の発症に関わる遺伝子多型を同定する目的で、日本骨髄バンク(JMDP)を通じて行われた非血縁者間骨髄移植の保存試料について約 50 万 SNP の SNP タイピングを行い、全ゲノム関連解析により GvHD の発症に関与する遺伝子多型と不適合について網羅的な探索を行った。研究に用いたのは、HLA-A,B,C,DRB1,DQB1 が DNA レベルで適合(うち DPB1 不適合 1033 例)し、GvHD 予防として MTX+CyA/FK506 が用いられ、かつ急性 GvHD(aGvHD)に関する情報が得られた 1600 移植で、Affymetrix GeneChip 500K アレイを用いてドナー・レシピエント双方について約 50 万 SNP のタイピングを行い、HapMap PhaseII データに基づく未観測 SNP の推測を行った後、品質基準を満たす 1,276,699 SNP について、ドナー・レシピエントの遺伝子型、GvHD 不適合と、aGvHD、cGvHD(慢性 GvHD)、再発、全生存との関連解析を行った。全移植に対するアレル不適合の解析では、HLA-DPB1 遺伝子座周辺の SNP が II 度以上の aGvHD の発症と関連する唯一の有意な不適合遺伝子座として検出された(1.81×10^{-9})ことから、本方法論の有効性が確認された。一方、マイナー組織適合性抗原不適合における HLA 拘束を考慮にいれた HLA サブグループ解析では、12 番染色体短腕の rs17473423 ($P=3.99 \times 10^{-13}$)および 9 番染色体長腕の rs9657655 ($P=8.56 \times 10^{-10}$)を含む 6 SNP 座におけるアレル不適合が aGvHD の標的遺伝子座として同定された。またレシピエントの SNP において aGvHD と関連をもつ 2 つの候補が同定されたほか、cGvHD や再発と相関がある 4 SNP も同定された。独立な移植セットを用いた関連の確認作業と標的遺伝子の同定が今後の重要な課題であるが、これらの重症 GvHD 発症リスクに関わる多型に関する知見は、今後 JMDP におけるよりリスクの少ないドナー選択手段の構築に有用であると考えられる。

(2) 全ゲノム関連解析の手法に基づく GVL 関連マイナー抗原の同定

GVLの発現に関わるマイナー抗原は腫瘍特異的なアロ免疫療法を開発する上で基盤となる分子標的で、従来、移植後患者末梢血より樹立される細胞傷害性T細胞(CTL)クローンの認識する抗原として、主に分子生物学的手法により同定されてきたが、その同定には多くの時間と労力が必要であった。研究チームはこれらのCTLによるHapMap細胞パネルの細胞傷害性アッセイとHapMap PhaseIIデータに基づいて高感度かつ効率的に当該CTLの標的マイナー抗原遺伝子座を同定するHapMap法を開発し、これを用いて複数の新規マイナー抗原の同定を行った。HapMap法とこれに基づくマイナー抗原は、腫瘍特異的なアロ免疫療法の開発に有用であると考えられる。

(3) 高密度 SNP アレイ解析による高精度ゲノムコピー数定量プログラムの開発と発癌関連遺伝子変異の同定

本研究で用いた SNP アレイでは、アレイに搭載される数百万個の SNP 特異的なプローブにおけるハイブリダイゼーションシグナルの高い特異性と定量性に基づいて SNP タイピングが行われるが、SNP call 改善の研究の過程で、この特性を高精度なアレル特異的なゲノムコピー数の解析に応用できる可能性が示唆され、これらの特性を巧妙に利用したゲノムワイドなアレル定量プログラム CNAG/AsCNAR を開発した。本プログラムは無償で公開されており(<http://www.genome.umin.jp>)、SNP アレイを用いたアレル・コピー数の定量に広く用いられている。実際 SNP アレイを用いて癌の網羅的なアレル・ゲノムコピー数の解析を行った結果、神経芽腫における ALK キナーゼ変異、悪性リンパ腫における A20 遺伝子の不活化変異、さらに、骨髄系腫瘍における CBL 変異を始めとして、癌の原因となる標的分子を効率的に同定することに成功した。これらは、ALK 変異を有する難治性神経芽腫に対する ALK 阻害剤の有用性、また A20 変異を有する悪性リンパ腫に対する NF- κ B 阻害剤の有用性、ならびに、CBL 変異を有する骨髄系腫瘍に対する汎チロシンキナーゼ阻害剤の有用性を示唆するもので、今後癌の新たな治療戦略の開発に貢献すると期待される。

4. 事後評価結果

4-1. 研究の達成状況及び得られた研究成果(論文・口頭発表等の外部発表、特許の取得状況等を含む)

骨髄移植は、難治性造血器腫瘍に対する最強の治療手段であるが、同時に大きな副作用の危険を伴う治療法でもある。本研究では、患者とドナーの遺伝学的背景の違いによって引き起こされる GvHD(移植片対宿主病)の原因となる遺伝的相違を解明し、移植成績の向上に資することを目的とした。また、本研究で開発されたゲノムコピー数解析技術を用いて、癌の標的分子の同定を行った。

日本骨髄バンクを通じて行われた非血縁者間骨髄移植のうち、HLA-A、B、C、DRB1、DQB1 が DNA レベルで一致し、急性 GvHD(aGvHD)に関する情報の得られる 1600 移植で約 50 万 SNP のタイピングを行い、6SNP 座を aGvHD の標的遺伝子座として世界に先駆けて同定した。また、レシピエントの SNP において aGvHD と関連する 2 つの候補を同定し、慢性 GvHD や再発と関連する 4SNP を同定した。一方、骨髄移植の強力な抗腫瘍効果を担うのは GVL(移植片対白血病効果)である。GVL の発現に関わるマイナー抗原の同定法の開発も大きな成果として評価できる。

本研究では、SNP アレイを研究の手段として用いたが、研究の過程でゲノムワイドにアレルを定量できるプログラム(CNAG/AsCNAR)を開発した。SNP アレイを用いて行った各種の癌の網羅的なアレル・ゲノムコピー数の解析から、神経芽腫における ALK キナーゼ変異(Nature 2008)、悪性リンパ腫における A20 遺伝子の不活化変異(Nature 2009)、骨髄系腫瘍における CBL の変異(Nature 2009)が、癌の原因となる遺伝子変異であることを明らかにした。これらも特記されるべき成果である。

これらの質、量ともに優れた研究成果は、68 編の原著論文(及び 197 件の口頭及びポスター発表)として発表されている。GvHD の標的遺伝子座の同定、各種の癌の原因遺伝子の同定は世界に先駆けた研究成果であり、特筆に価する。

4-2. 研究成果の科学技術や社会へのインパクト、戦略目標への貢献

骨髄移植の移植成績の向上には、GVL 効果を保ちながら、重篤な GvHD を回避できる移植技術の開発が必要である。このため、本研究では、大規模 SNP タイピングを用いたゲノムワイド関連解析により、これらの免疫学的反応に関わる遺伝学的背景を探索した。

1600 移植を用いた解析からは重症 GvHD の発症リスクに関わる 10 余りの多型が同定された。独立した移植セットによる確認と標的遺伝子の同定が今後の検討課題として残されているものの、これらの知見は今後の骨髄移植におけるよりリスクの少ないドナー選択に道を拓いたものと高く評価できる。また、GVL の発現に関わるマイナー抗原の同定はこれまで数ヶ月の期間と労力が必要な分子生物学的手法で同定されてきたが、本研究で開発された HapMap 細胞パネルを用いたゲノムワイド関連解析法は、数週間で任意の CTL のマイナー抗原を同定できる画期的な方法である。同定されるマイナー抗原は腫瘍ワクチンなど、腫瘍特異的なアロ免疫療法の開発で重要な役割を果たすことになろう。

GvHD 研究の過程で開発された高精度なゲノムコピー数定量プログラムは公開され世界中で用いられている。本研究ではこのプログラムを各種の癌の原因遺伝子の同定に応用し、難治性神経芽腫、悪性リンパ腫、骨髄系腫瘍において新しい癌遺伝子を同定すると同時にこれらの癌に対する新たな治療戦略の構築に貢献する成果を得た。本領域の目的に沿った成果として高く評価する。

4-3. 総合的評価

本研究では、大規模 SNP タイピングを用いたゲノムワイド関連解析により、GvHD、GVL に関わる多型の同定を目指した。本研究で GvHD、GVL に関して得られた成果は、骨髄移植におけるドナーの選択、移植後の予後の改善など、骨髄移植医療の向上に大きく資する成果である。世界に類をみない成果であり、この分野の研究では、世界の先頭を走っているといっても過言ではない。HLA ハプロタイプ毎に同定された多型の機能解析研究など、今後の研究の進展に期待がもたれるところである。また、研究途上で開発されたゲノムコピー数定量プログラムを応用して得られた成果である、各種の癌の原因遺伝子の同定も本領域の目的に合致する特筆すべき成果である。これらの癌の治療成績向上への貢献と、ゲノムコピー数定量プログラムによるその他の疾患の原因遺伝子発見に期待したい。