

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2018年5月3日(03.05.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/079499 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2018.01) *G01N 33/53* (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/038227
- (22) 国際出願日: 2017年10月24日(24.10.2017)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2016-208263 2016年10月25日(25.10.2016) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人山口大学(YAMAGUCHI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7538511 山口県山口市吉田 1 6 7 7 - 1 Yamaguchi (JP).
- (72) 発明者: ▲高▼橋 秀和(TAKAHASHI Hidekazu); 〒7558505 山口県宇部市南小串 1 丁目 1 - 1 国立大学法人山口大学大学院医学系研究科内 Yamaguchi (JP). 田邊 剛(TANABE Tsuyoshi); 〒7558505 山口県宇部市南小串 1 丁目 1 - 1 国立大学法人山口大学大学院医学系研究科内 Yamaguchi (JP).
- (74) 代理人: 藤 本 昌 平 (FUJIMOTO Shohei); 〒7590211 山口県宇部市西宇部北 5 丁目 1 5 - 2 1 Yamaguchi (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,

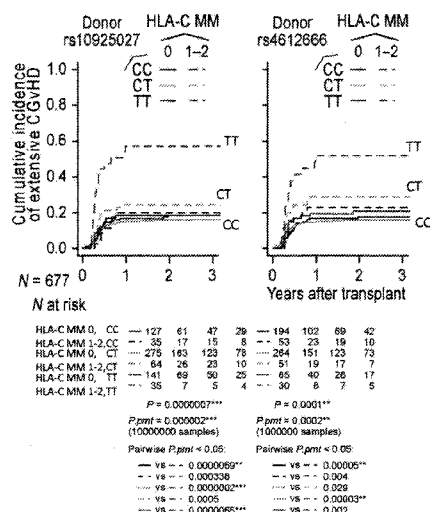
(54) Title: METHOD FOR ASSISTING IN PREDICTION OF PROGNOSIS OF ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

(54) 発明の名称: 同種造血幹細胞移植後の予後の予測を補助する方法

[図3]

AA

悪性疾患患者におけるドナーのNLRP3のSNPとHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく広範性CGvHD(ExCGvHD)の累積発生曲線解析結果



P = P determined by Gray's test.
P.pmt = P determined by a sampled permutation-based Gray's test.
*P < 0.005 and *P.pmt < 0.005 for overall tests.
*P.pmt < 0.005/15 in pairwise comparisons.
Descriptions and numbers of excluded pairs
CGvHD-unevaluable (N = 142) and day of CGvHD unknown (N = 3)

AA Results of analysis of cumulative incidence curves of extensive CGvHD (ExCGvHD) based on combinations of NLRP3 SNPs and HLA-C mismatches of donors with malignant disease

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a method for predicting prognosis of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation even in the case where there is a partial mismatch in HLA between a donor and a recipient. In the case where there is a mismatch in one or two of eight alleles in four loci, i.e., HLA-A, HLA-B, HLA-C, and HLA-DRB1, of the HLA gene between a donor and a recipient in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, and the recipient is a patient with a malignant hematological disease (excluding myelodysplastic syndromes (MDS)), the

[続葉有]



DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

method is used to assist in prediction of prognosis of the transplantation using, as indexes, the type of the recipient's primary disease, and a single-nucleotide polymorphism at the 26-th base (rs10925027, C or T) in the base sequence of SEQ ID NO. 1 of the NLRP3 gene of the donor or the recipient, or a single-nucleotide polymorphism at the 26-th base (rs4612666, C or T) in the base sequence of SEQ ID NO.2, or a single-nucleotide polymorphism which is in linkage disequilibrium with these polymorphisms.

(57) 要約: 本発明の課題は、同種造血幹細胞移植において、ドナーとレシピエントとのHLAが一部ミスマッチの場合においても移植後の予後を予測する方法を提供することにある。同種造血幹細胞移植におけるドナーとレシピエント間でHLA遺伝子のHLA-A、HLA-B、HLA-C、及びHLA-DRB1の4座における8アレルのうち、1アレル又は2アレルがミスマッチで、かつレシピエントが悪性血液疾患(骨髓異形形成症候群(MDS)を除く)の患者の場合において、ドナー若しくはレシピエントのNLRP3遺伝子の配列番号1に示す塩基配列の26番目の塩基(rs10925027, C又はT)における一塩基多型、若しくは配列番号2に示す塩基配列の26番目の塩基(rs4612666, C又はT)における一塩基多型又はこれらの連鎖不平衡の関係にある一塩基多型、及びレシピエントの原疾患の種類を指標として移植後の予後の予測を補助する。

明 細 書

発明の名称：同種造血幹細胞移植後の予後の予測を補助する方法
技術分野

[0001] 本発明は、同種造血幹細胞移植後の予後の予測を補助する方法や、かかる方法に使用する、同種造血幹細胞移植後の予後の予測用キットに関する。

背景技術

[0002] 同種造血幹細胞移植 (a l l o g e n e i c h e m a t o p o i e t i c s t e m c e l l t r a n s p l a n t a t i o n : 以下、「同種移植」ともいう) とは自分以外の細胞をドナーとする造血幹細胞移植のことである。同種移植後の生存率は以前より改善されてはいるものの、5年生存率は40－60%にとどまっている。また急性移植片対宿主病 (a c u t e g r a f t - v e r s u s - h o s t d i s e a s e : A G v H D) や慢性移植片対宿主病 (c h r o n i c g r a f t - v e r s u s - h o s t d i s e a s e : C G v H D) 等の移植後の合併症を防ぐ手段は依然限られている。

[0003] 同種移植においては、投薬治療よりも最適なドナーの選択法を確立することによって死亡や合併症を予防することが望ましい。同種移植後の予後に影響を与える遺伝学的因子としてドナーとレシピエント間のHLA座における対立遺伝子 (アリル) の適合度 (マッチ/ミスマッチ) は良く知られており、同種移植の際にドナーとレシピエント間のHLAアリルをマッチさせることが標準的に行われている。主要なHLA遺伝子はHLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DPB1、HLA-DQB1の6座からなり、2倍体であるヒトゲノムにおいて合計12アリル存在する。HLA遺伝子座は非常に多型的であるため、全てのレシピエントについて12/12アリルマッチするドナーを見つけることは極めて難しい。また、主要なHLAがある程度以上マッチしていれば、12/12アリル全マッチと移植後の予後に大きな差はないという報告もある。これらの理由で、非血縁

者間骨髄移植においては重要性の相対的に低いHLA-DPB1、HLA-DQB1は考慮せず、最低限HLA-A、HLA-B、HLA-DRB1の合計3座をマッチさせて、可能なレシピエントについてはさらにHLA-C座もマッチ（6／8－8／8アリルマッチ）させる方法が先進国では標準的である。

[0004] 同種移植後の予後をさらに改善する方法として、HLA以外の遺伝子の多型を利用することが考えられる。実際、同種移植後の予後に影響する一塩基多型（Single-nucleotide polymorphism: SNP）等の遺伝的多型の探索が世界中で行われてきた。しかし、再現性があり臨床に影響を与えるような強い効果を持つ多型は見出されていない。

[0005] 同種移植後の予後に影響を与える数少ない非HLAのSNPの候補としてはKIR (killer cell immunoglobulin like receptor) 遺伝子ファミリーが提案されている（特許文献1、非特許文献1参照）。KIRは細胞表面でHLAと直接物理的に結合する受容体タンパク質をコードする。しかし、かかる文献におけるKIR遺伝子とレシピエント側のHLA-Cアリル（ドナーとのミスマッチではない）の組み合わせが急性骨髄性白血病（Acute Myeloid Leukemia: AML）患者に対する同種移植後の再発に影響を与えるという主要な結果の解釈に疑問が呈され（非特許文献2参照）、対する非特許文献1の著者の返答で交互作用は有意でない（ $P=0.14$ ）ことが報告された（非特許文献3参照）。また、非特許文献1のFigure 3Cには、KIR遺伝子の再発予防効果がHLA-Cのミスマッチの存在に依存するという結果も報告されていたが、論文の遺伝子型解読結果が多く誤りを含んでいたことが著者から後に報告されて、修正後のFigure 3Cの解析結果は有意でない（ $P=0.24$ ）ことが判明した（非特許文献4参照）。さらに同じグループからの追加研究では元の結果は再現されなかった（非特許文献5参照）。上記からKIR遺伝子とHLAアリルの組み合わせの効果は世界的にも十分に確認されているとは言えない現状である。また、日本人等の集団

ではそもそもHLA-CのKIRタンパク質との結合に関与するアリの多型の頻度が非常に低いため、臨床応用は難しいと思われる。

[0006] 一方、細胞内のNOD-like receptor familyであるNLRP3は、インフラマソーム形成によりCaspase-1を活性化させるタンパク質である。かかるNLRP3の一塩基多型は、家族性感冒自己炎症性症候群の発症原因やアレルギー疾患の劇症化等と関係していること（特許文献2、非特許文献6参照）や、同種造血細胞移植において、マウスのレシピエントNLRP3遺伝子がMHCミスマッチ移植におけるAGvHDに関与すること（非特許文献7参照）や、HLAが完全に一致した兄弟姉妹間移植の同種造血細胞移植において、ドナーのNLRP3の一塩基多型が再発、全生存率、移植関連死亡率、又はGvHDに関与すること（非特許文献8-10参照）が開示されている。しかしながら、HLAミスマッチの同種造血細胞移植において、かかるNLRP3の一塩基多型と前記移植における予後との関係は記載されておらず、またレシピエントの原疾患（underlying disease）の種類も考慮されていない。

[0007] このように、HLAの適合度以外には同種移植後の予後を予測する手段は実用化されていない。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：特表2016-517088号公報

特許文献2：特開2011-24478号公報

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Venstrom et al., HLA-C-dependent prevention of leukemia relapse by donor activating KIR2DS1. N. Engl. J. Med. 367, 805-816 (2012)

非特許文献2：Fischer & Uhrberg. Prevention of leukemia relapse by donor activating KIR2DS1. N. Engl. J. Med. 367, 2054-2055(2012)

非特許文献3 : N. Engl. J. Med. 367, author reply 2055.(2012)

非特許文献4 : Venstrom et al., Donor activating KIR2DS1 in leukemia. N. Engl. J. Med. 371, 2042(2014)

非特許文献5 : Sobecks, R.M. et al. Impact of KIR and HLA Genotypes on Outcomes after Reduced-Intensity Conditioning Hematopoietic Cell Transplantation. Biol. Blood Marrow Transplant. 21, 1589-159(2015)

非特許文献6 : Hitomi, Y et al. Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. Journal of Allergy and Clinical Immunology Volume 124, Issue 4, Pages 779-785.e6(2009)

非特許文献7 : Jankovic, D. et al. The Nlrp3 inflammasome regulates acute graft-versus-host disease. J. Exp. Med. 210, 1899-1910(2013).

非特許文献8 : Granel M. et al. Common variants in NLRP2 and NLRP3 genes are strong prognostic factors for the outcome of HLA-identical sibling allogeneic stem cell transplantation. Blood 15:4337-4342(2008)

非特許文献9 : Takami, A. et al. Association of Functional Single Nucleotide Variation in the NLRP3 Gene with Survival Outcomes After Unrelated Bone Marrow Transplantation. Blood 120:3140(2012)

非特許文献10 : Takami, A. 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. Blood 118:4073(2011)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 上述のように、これまでは同種移植後の予後予測に関する研究において、HLAが12／12アリルマッチした同種移植を対象にして、レシピエントの原疾患を区別せずに解析している例が多かった。しかしながら、HLAが12／12アリルマッチした同種移植は現在の臨床現場では少数に限られており、実際には多数の実施例を占めるHLAが一部ミスマッチの場合において、原疾患ごとに移植後の予後を予測する方法が求められていた。そこで本発明の課題は、HLAが一部ミスマッチの場合においても原疾患ごとに移植後の予後を予測する方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、まず骨髄移植後の予後に影響を与えるドナーとレシピエント側両方のSNPの同定を試みた。対象者は、HLA-A、HLA-B、及びHLA-DRB1の合計3座6アリルを最低限マッチさせた非血縁骨髄移植を、日本骨髄バンクを介して2006年10月から2009年4月に受けた999ペアのドナーとレシピエントである。HLA-C座はマッチしているとは限らないので、HLA座6／8-8／8アリルマッチといえる。日本骨髄バンクから提供されたこれら計1998の被験者のDNA検体を用いて、NLRP1、NLRP2、NLRP3、及びCARD8の一塩基多型(SNP)を計5つ(NLRP3のみ2つずつで、他は1つずつ)の遺伝子型を決定した。そして、移植後の予後と、ドナー及び／又はレシピエントのSNPの遺伝子型との関連について、被験者の臨床データを用いて統計解析を行った。その結果、移植後の予後に関してHLAのミスマッチ(6／8、7／8アリルマッチ)とNLRP3の一塩基多型であるrs10925027又はrs4612666の発現型との間で統計的に有意な交互作用があることを見出し、本発明を完成した。

[0012] すなわち、本発明は、以下のとおりである。

(1) 同種造血幹細胞移植におけるドナーとレシピエント間でHLA遺伝子のHLA-A、HLA-B、HLA-C、及びHLA-DRB1の4座における8アリルのうち、1アリル又は2アリルがミスマッチで、かつレシピエ

ントの原疾患が悪性血液疾患（骨髄異形形成症候群（MDS）を除く）の場合において、ドナー若しくはレシピエントのNL RP 3 遺伝子の配列番号 1 に示す塩基配列の 26 番目の塩基（rs 10925027、C又はT）における一塩基多型、若しくは配列番号 2 に示す塩基配列の 26 番目の塩基（rs 4612666、C又はT）における一塩基多型又はこれらと連鎖不平衡の関係にある一塩基多型、及びレシピエントの原疾患の種類を指標として移植後の予後の予測を補助する方法。

（2）同種造血幹細胞移植におけるドナーとレシピエント間でHLA遺伝子のHLA-A、HLA-B、及びHLA-DRB1の3座における6アレルがマッチしていることを特徴とする上記（1）記載の方法。

（3）同種造血幹細胞移植が非血縁者間同種造血幹細胞移植であることを特徴とする上記（1）又は（2）記載の方法。

（4）予後が、2-4級急性移植片対宿主病（2-4 AGvHD）発症、慢性移植片対宿主病（CGvHD）発症、全生存率（OS）、又は非再発死亡（NRM）であることを特徴とする上記（1）～（3）のいずれか記載の方法。

（5）悪性血液疾患が、急性骨髄性白血病（AML）、急性リンパ性白血病（ALL）、慢性骨髄性白血病（CML）、リンパ系悪性腫瘍（LM）、骨髄増殖性疾患（MPD）、形質細胞性腫瘍（PCD）、又は固形腫瘍（ST）であることを特徴とする上記（1）～（4）のいずれか記載の方法。

（6）悪性血液疾患が、急性骨髄性白血病（AML）、又は急性リンパ性白血病（ALL）であることを特徴とする上記（5）記載の方法。

（7）上記（1）～（6）記載の方法に使用する、同種造血幹細胞移植後の予後の予測用キットであって、以下の〔1〕又は〔2〕記載のプローブを含むことを特徴とするキット。

〔1〕NL RP 3 遺伝子において、配列番号 1 に示す 26 番目の塩基（rs 10925027、C又はT）における一塩基多型、又は該一塩基多型と連鎖不平衡の関係にある一塩基多型を含む連続する 15～50 塩基からなる配

列、又はその相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチドからなるプローブ；

〔2〕NL RP 3 遺伝子において、配列番号 2 に示す 26 番目の塩基（rs 4612666、C 又は T）における一塩基多型、又は該一塩基多型と連鎖不平衡の関係にある一塩基多型を含む連続する 15～50 塩基からなる配列、又はその相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチドからなるプローブ；

（8）HLA を測定するための試薬を含むことを特徴とする上記（7）記載のキット。

発明の効果

[0013] 本発明により、HLA が一部ミスマッチ、すなわち HLA 遺伝子の HLA-A、HLA-B、HLA-C、及び HLA-DRB1 の 4 座における 8 アリルのうち、1 アリル又は 2 アリルがミスマッチの場合における同種移植後の予後を予測することが可能となる。かかる予後の予測を行うことで、ドナーを選択する際により合併症発症リスクや死亡リスクが少ないドナーを選択することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1] SNP 遺伝子型の同定における TaqMan アッセイのプローブ、PCR ダイレクトシーケンスに用いたプライマーの配列、及び SNP 近傍の配列を示す図である。

[図2A] 999 ペアのレシピエントの臨床データを示す図である。

[図2B] 999 ペアのドナーの臨床データ（上）及び移植のデータ（下）を示す図である。

[図2C] 999 ペアのドナーとレシピエントにおける HLA や血液型のマッチングを示す図である。

[図3] 実施例 1 において、ドナーの NL RP 3 の SNP（rs 10925027 又は rs 4612666）と HLA-C ミスマッチの組み合わせに基づく広範性 CGvHD（ExCGvHD）の累積発生曲線（cumulative

e i n c i d e n c e c u r v e s : C I C s) 解析 (未調整解析) 結果を示す図である。レシピエントは図 2 A のグループ 1 に示す悪性疾患 (M a l i g n a n t) 患者 (N = 8 2 2) である。初回移植症例のみを統計解析の対象とした (以下の図 4 A - 1 4 B において同様)。なお、図中、「H L A - C M M」は H L A - C ミスマッチを意味し、「H L A - C M M 0」は H L A - C ミスマッチ無し (実線: H L A - C のアリルマッチ)、「H L A - C M M 1 - 2」は H L A - C ミスマッチが 1 又は 2 (破線: H L A - C の 1 又は 2 アリルミスマッチ) を示す。また、N の数値は解析に用いたドナー・レシピエントのペアの数を示し (以下の図 4 A - 図 1 4 B において同様)、P . p m t はパーミュテーションを用いた G r a y のテストによる値を示す (以下の図 4 A、B、図 6 C、図 8 において同様)。P は通常の G r a y のテストにより求めた値で (以下の図 4 A ~ C、図 6 A ~ E、図 7 A、B、図 8、図 1 0、及び図 1 4 A、B の N R M と r e l a p s e において同様) ある。

[図 4A] 実施例 1 において、ドナーの N L R P 3 の S N P (r s 1 0 9 2 5 0 2 7 又は r s 4 6 1 2 6 6 6) と H L A - C ミスマッチの組み合わせに基づく E x C G v H D の累積発生曲線 (C I C s) 解析 (未調整解析) 結果 (A M L 患者) を示す図である。横軸は移植後の年数、縦軸は E x C G v H D の累積発生率 (以下の図 4 B、4 C も同様) である。

[図 4B] 実施例 1 において、ドナーの N L R P 3 の S N P (r s 1 0 9 2 5 0 2 7 又は r s 4 6 1 2 6 6 6) と H L A - C ミスマッチの組み合わせに基づく E x C G v H D の累積発生曲線 (C I C s) 解析 (未調整解析) 結果 (A L L 患者又は 6 o t h e r s 患者 (6 o t h e r s 患者: C M L、その他の (A M L ・ A L L ・ C M L 以外の) 白血病、L M、M P D、P C D、及び S T のいずれかの患者) を示す図である。

[図 4C] 実施例 1 において、ドナーの N L R P 3 の S N P (r s 1 0 9 2 5 0 2 7 又は r s 4 6 1 2 6 6 6) と H L A - C ミスマッチの組み合わせに基づく E x C G v H D の累積発生曲線 (C I C s) 解析 (未調整解析) 結果 (M

DS患者)を示す図である。

[図5]実施例1において、ドナーのNL RP 3のSNP (rs 10925027)とHLA-Cミスマッチの交互作用に基づくFine-Gray比例ハザード回帰による多変量解析(ExCGvHDの累積発生)結果を示す図である。また、HLA-C MMはHLA-C ミスマッチ(HLA-A、HLA-B、HLA-DRB1の合計3座6アリルがマッチで、HLA-Cの2アリルのうち少なくとも1アリルがミスマッチ)の数(0、1、又は2)に基づく効果を示し(以下の図9、12において同様)、Donor rs 10925027 (T-additive)はTアリルの数(0、1、又は2)に基づく効果を示し、HLA-C MM×Donor rs 10925027はこれら2つの数の積の効果を示す。P及びP_{xt}はWaldテストにより求めた値(以下の図9、12において同様)である。

[図6A]実施例2において、レシピエントのNL RP 3のSNP (rs 10925027又はrs 4612666)とHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく2-4AGvHDの累積発生曲線解析(未調整解析)結果(全悪性疾患(malignant)患者)を示す図である。横軸は移植後の日数、縦軸は2-4AGvHDの累積発生率(以下の図6B~6Eも同様)である。

[図6B]実施例2において、レシピエントのNL RP 3のSNP (rs 10925027又はrs 4612666)とHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく2-4AGvHDの累積発生曲線解析(未調整解析)結果(AML患者)を示す図である。

[図6C]実施例2において、レシピエントのNL RP 3のSNP (rs 10925027又はrs 4612666)とHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく2-4AGvHDの累積発生曲線解析(未調整解析)結果(ALL患者)を示す図である。

[図6D]実施例2において、レシピエントのNL RP 3のSNP (rs 10925027又はrs 4612666)とHLA-Cミスマッチの組み合わせ

に基づく2-4 AGvHDの累積発生曲線解析（未調整解析）結果（MDS患者）を示す図である。

[図6E]実施例2において、レシピエントのNL RP 3のSNP（rs 4 6 1 2 6 6 6）とHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく2-4 AGvHDの累積発生曲線解析（未調整解析）結果（6 o t h e r s患者）を示す図である。

[図7A]実施例3において、ドナーのNL RP 3のSNP（rs 1 0 9 2 5 0 2 7又はrs 4 6 1 2 6 6 6）とHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく非再発死亡（NRM）の累積発生曲線解析（未調整解析）結果（AML患者）を示す図である。P（T-domi）は、T優性モデルの下で、通常のGrayのテストにより求めた値（以下の図7Bも同様）である。

[図7B]実施例3において、ドナーのNL RP 3のSNP（rs 1 0 9 2 5 0 2 7又はrs 4 6 1 2 6 6 6）とHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく非再発死亡（NRM）の累積発生曲線解析（未調整解析）結果（ALL患者）を示す図である。

[図8]実施例3において、ドナーのNL RP 3のSNP（rs 4 6 1 2 6 6 6）とHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく非再発死亡（NRM）の累積発生曲線解析（未調整解析）結果を示す図である。図8（a）は6 o t h e r s患者、図8（b）はCML患者又はその他の白血病患者、図8（c）はLM、PCD、MPD、STのいずれかの患者である。横軸は移植後の年数、縦軸は非再発死亡の累積発生率である。

[図9]実施例3において、ドナーのNL RP 3のSNP（rs 1 0 9 2 5 0 2 7又はrs 4 6 1 2 6 6 6）とHLA-Cミスマッチの交互作用に基づく非再発死亡（NRM）のFine-Gray比例ハザード回帰による多変量解析結果を示す図である。図9（a）はHLA-C MMの場合であり、追跡期間全体にわたる非再発死亡（NRM）である。図9（b）はHLA-C/Q/P MM（HLA-A、HLA-B、HLA-DRB1の合計3座6アリルがマッチで、HLA-C、HLA-DPB1、HLA-DQB1の合計

3座6アレルのうち少なくとも1アレルがミスマッチ)の場合であり、かつ100以内の非再発死亡(NRM)である。

[図10]実施例4において、レシピエントのNL RP 3のSNPとHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく非再発死亡(NRM)の累積発生曲線解析(未調整解析)結果を示す図である。患者の原疾患はALLである。横軸は移植後の年数、縦軸は非再発死亡の累積発生率である。

[図11A]実施例5において、ドナーのNL RP 3のSNP(rs10925027又はrs4612666)とHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく全生存率(OS)の単変量Kaplan-Meier解析結果(AML患者)を示す図である。Pは通常のlog-rankテストにより求めた値である(以下の図11B、11C、図13A、13B、並びに図14A、14BのOSにおいて同様)。P(T-domi)は、T優性モデルの下で、通常のlog-rankテストにより求めた値である(以下の図13Aにおいて同様)。横軸は移植後の年数、縦軸は全生存率(OS)(以下の図11B、11Cも同様)である。

[図11B]実施例5において、ドナーのNL RP 3のSNP(rs10925027又はrs4612666)とHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく全生存率(OS)の単変量Kaplan-Meier解析結果(ALL患者)を示す図である。P.pmtはパーミュテーションを用いたlog-rankテストによる値(以下の図11Cも同様)を示す。

[図11C]実施例5において、ドナーのNL RP 3のSNP(rs4612666)とHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく全生存率(OS)の単変量Kaplan-Meier解析結果(6others患者)を示す図である。

[図12]実施例5において、ドナーのNL RP 3のSNP(rs10925027)とHLA-Cミスマッチの交互作用に基づく全生存率(OS)のCox比例ハザード回帰による多変量解析結果を示す図である。

[図13A]実施例6において、レシピエントのNL RP 3のSNP(rs109

25027又はrs4612666)とHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく全生存率(OS)の単変量Kaplan-Meier解析結果(AML患者)を示す図である。横軸は移植後の年数、縦軸は全生存率(OS)(以下の図13Bも同様)である。

[図13B]実施例6において、レシピエントのNLRP3のSNP(rs10925027又はrs4612666)とHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく全生存率(OS)の単変量Kaplan-Meier解析結果(ALL患者)を示す図である。

[図14A]実施例7において、CGvHDの発症と非再発死亡、再発(relapse)、及び全生存率との関係についての解析結果(原疾患がAML患者)を示す図である。図中、Limitedは限局的CGvHDを発症した場合、ExtensiveはExCGvHDを発症した場合を示す。

[図14B]実施例7において、CGvHDの発症と非再発死亡、再発(relapse)、及び全生存率との関係についての解析結果(原疾患が6others患者)を示す図である。

[図15]本発明を用いたドナー選択法の例を示す図である。

発明を実施するための形態

[0015] 本発明の移植後の予後の予測を補助する方法としては、同種造血幹細胞移植におけるドナーとレシピエント間でHLA遺伝子のHLA-A、HLA-B、HLA-C、及びHLA-DRB1の4座における8アレルのうち、1アレル又は2アレルがミスマッチで、かつレシピエントの原疾患が悪性血液疾患(骨髄異形形成症候群(MDS)を除く)の場合において、ドナー若しくはレシピエントのNLRP3遺伝子の配列番号1に示す塩基配列の26番目の塩基(rs10925027、C又はT)における一塩基多型、若しくは配列番号2に示す塩基配列の26番目の塩基(rs4612666、C又はT)における一塩基多型又はこれらの連鎖不平衡の関係にある一塩基多型、及びレシピエントの原疾患の種類を指標として移植後の予後の予測を補助する方法であれば特に制限されず、かかる方法は、医師による診断は含まれ

ない。

[0016] 同種造血幹細胞移植とは、自己以外の細胞をドナーとする造血幹細胞移植のことを意味する。かかる同種移植は悪性血液疾患の根治療法であり、幹細胞の由来組織によって骨髓移植、末梢血移植、又は臍帯血移植のいずれかに分類することができ、本発明の同種移植は上記いずれの移植でもよいが、骨髓移植であることが好ましい。また、同種造血幹細胞移植は、そのドナーによって血縁者間同種造血幹細胞移植と非血縁者間同種造血幹細胞移植に分類できるが、本発明においては非血縁者間同種造血幹細胞移植であることが好ましい。

[0017] 本発明のレシピエント及び／又はドナーの人種は特に制限されず、日本人、東アジア人、西アジア人、北アメリカ人、南アメリカ人、欧州人、アフリカ人のいずれでもよいが、好ましくは東アジア人、より好ましくは日本人である。また、本発明を用いるレシピエントとしては、初回移植の患者であることが好ましい。

[0018] ドナーとレシピエント間でHLA遺伝子のHLA-A、HLA-B、HLA-C、及びHLA-DRB1の4座における8アレルのうち、1アレル又は2アレルがミスマッチの場合とは、HLA-A、HLA-B、HLA-C、及びHLA-DRB1の4座における8アレル中1アレルがミスマッチで7アレルがマッチ（7／8）、又はHLA-A、HLA-B、HLA-C、及びHLA-DRB1の4座における8アレル中2アレルがミスマッチで6アレルがマッチする場合を意味し、マッチするアレルは特に限定されないが、少なくともHLA-A、HLA-B、及びHLA-DRB1の3座における6アレルがマッチしていることが好ましい。

[0019] 本発明において、悪性血液疾患（骨髓異形形成症候群（MDS）を除く）とは、悪性血液疾患のうち、MDS以外の疾患を意味する。かかるMDS以外の疾患としては、急性骨髓性白血病（AML）、急性リンパ性白血病（ALL）、又は慢性骨髓性白血病（CML）、その他（AML、ALL、CML以外）の白血病（OL）、リンパ系悪性腫瘍（LM）、骨髓増殖性疾患（

MPD)、形質細胞性腫瘍(PCD)、又は固形腫瘍(ST)を挙げることができ、ALL又はAMLを好適に挙げることができ、ALLをより好適に挙げることができる。

[0020] 本発明において、NLRP3遺伝子の配列番号1に示す塩基配列の26番目の塩基におけるSNP(rs4612666)は、日本人における食物誘因アナフィラキシーやアスピリン誘因喘息に対する感受性に関与するイントロンSNPである。また、NLRP3遺伝子の配列番号2に示す塩基配列の26番目の塩基におけるSNP(rs10925027)は、NLRP3とOR2B11遺伝子の両方の下流に位置しているSNPである。ここで、rs番号は米国バイオテクノロジー情報センター(NCBI)SNPデータベース(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>)におけるSNPのリファレンス番号(Reference SNP ID number)である。

[0021] 本発明において、上記連鎖不平衡の関係とは、生物の集団において、複数の遺伝子座の対立遺伝子又は遺伝的マーカー(多型)の間にランダムでない相関がみられる、すなわちそれらの特定の組合せ(ハプロタイプ)の頻度が有意に高くなる集団遺伝学的な現象にある関係を意味し、連鎖不平衡係数 $r^2 > 0.5$ 、好ましくは $r^2 > 0.6$ 、より好ましくは $r^2 > 0.64$ の関係を満たす塩基を挙げることができる。具体的には、rs10925027と連鎖不平衡($r^2 > 0.64$)の関係にあるSNPとしてはrs12143966、rs4925659、rs111307268、rs60823583、rs10159239、rs56383829、rs60831025、rs10754558、rs34691535、rs10802502、rs4925547、rs10754559、rs10733111、rs10733112、rs4925663を挙げることができ、rs4612666と連鎖不平衡($r^2 > 0.64$)の関係にあるSNPとしてはrs3806265、rs3835304を挙げることができる。連鎖不平衡係数は、VCFtoolsのバージョン0.1.11で算出することができる。

[0022] 本発明における予後としては、同種造血幹細胞移植後に生じる合併症、生存率又は死亡であれば特に制限されないが、2－4級急性移植片対宿主病（2－4 AGvHD）発症、広範性慢性移植片対宿主病（ExCGvHD）発症、全生存率（OS）、又は非再発死亡（原疾患の再発が起こっていない死亡：NRM）を挙げることができる。

[0023] 本発明により、移植後の予後の予測の補助は、1）ドナー若しくはレシピエントのNL RP 3遺伝子の配列番号1に示す塩基配列の26番目の塩基（rs10925027、C又はT）における一塩基多型、若しくは配列番号2に示す塩基配列の26番目の塩基（rs4612666、C又はT）における一塩基多型又はこれらの連鎖不平衡の関係にある一塩基多型、及び、2）レシピエントの原疾患、の1）及び2）の2種類を指標として行うことができる。従来、ドナーの選択については原疾患の種類が考慮されずにHLAのマッチ／ミスマッチのみが指標として用いられており、移植後の予後については、よりHLAがマッチした方がリスクが少ないという指標しかなく、HLAの一部ミスマッチの場合において、より詳細に予後のリスクを判断する指標はなかった。こうした中、本発明によりHLA-Cがミスマッチの場合において、レシピエントの原疾患の種類と、ドナー若しくはレシピエントのNL RP 3のSNPとの組み合わせによって移植後の予後のリスクが異なることが明らかとなった。そのため、かかる組み合わせに基づき様々な予後リスクを予測することが可能となる。具体的には、例えば以下の表1に示すようにそれぞれの指標に基づいて、予後の予測を補助することができる。

[0024]

[表1]

HLA-C MM	患者の原疾患	NLRP3 SNP	予後			
			ExCGvHD発症	2-4AGvHD発症	NRM	OS
1(7/8マッチ) 又は2(6/8マッチ)	AML	CC(donor)	同等	—	同等	同等
		CT(donor)	やや上昇	—	同等	同等
		TT(donor)	上昇	—	同等	同等
		CC(recipient)	—	やや上昇	—	同等
		CT(recipient)	—	同等	—	同等
		TT(recipient)	—	同等	—	同等
	ALL	CC(donor)	同等	—	下降	移植後1.5年以内やや上昇
		CT(donor)	同等	—	やや上昇	移植後1.5年以内やや下降
		TT(donor)	上昇	—	やや上昇	移植後1.5年以内やや下降
		CC(recipient)	—	上昇	移植後4か月以内上昇	移植後4か月以内下降
		CT(recipient)	—	同等	同等	同等
		TT(recipient)	—	同等	同等	同等
	CML/OL/LM MPD/PCD/S T (8others)	CC(donor)	同等	—	下降	同等
		CT(donor)	同等	—	上昇	やや下降
		TT(donor)	上昇	—	上昇	やや下降
		CC(recipient)	—	同等	—	—
		CT(recipient)	—	同等	—	—
		TT(recipient)	—	同等	—	—

* HLA8/8マッチの場合に対する相対的なリスク

[0025] 本発明の同種造血幹細胞移植後の予後の予測用キットとしては、上記本発明の同種造血幹細胞移植における移植後の予後の予測を補助する方法に使用する、同種造血幹細胞移植後の予後の予測用キットであって、以下の(1)又は(2)のプローブを含む限り特に制限されず、かかるプローブを用いることによってそれぞれのSNPを検出することが可能となる。

(1) NLRP3遺伝子において、配列番号1に示す塩基配列の26番目の塩基(rs10925027、T又はC)における一塩基多型、又は該一塩基多型と連鎖不平衡の関係にある一塩基多型を含む連続する15～50塩基からなる配列、又はその相補配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチドからなるプローブ；

(2) NLRP3遺伝子において、配列番号2に示す塩基配列の26番目の塩基(rs4612666、T又はC)における一塩基多型、又は該一塩基多型と連鎖不平衡の関係にある一塩基多型を含む連続する15～50塩基からなる配列、又はその相補配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチドからなるプローブ；

[0026] 上記プローブとしては、15～50塩基であればよいが、好ましくは10～40塩基、より好ましくは15～30塩基からなるプローブを挙げることができる。なお、プローブとしてLocked Nucleic Acid

(LNA)等の人工核酸を用いて合成したオリゴプローブを用いることで、短い塩基でも特異的にハイブリダイズするプローブとすることが可能となる。

[0027] 上記ストリンジントな条件下としては、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいい、具体的には、 $6\times\text{SSC}$ (1.5M NaCl 、 0.15M クエン酸三ナトリウムを含む溶液を $10\times\text{SSC}$ とする)、 50% フォルムアミドを含む溶液中で 45°C にてハイブリッドを形成させた後、 $2\times\text{SSC}$ で 50°C にて洗浄するような条件 (Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6) や、 $3\times\text{SSC}/0.3\times\text{SDS}$ を含む溶液中で 54°C にてハイブリッドを形成させた後、洗浄液A ($10\times\text{SSC}/1\%\text{SDS}$ 溶液)、洗浄液B ($20\times\text{SSC}$) 及び洗浄液C ($5\times\text{SSC}$) で順次洗浄するような条件 (特開2011-250726号公報参照) 等を挙げることができる。

[0028] SNPは、公知のSNPを分析する方法を用いることができ、リアルタイムPCR法、ダイレクトシーケンシング法、Taqman (登録商標) PCR法、インベダー (登録商標) 法、ルミネックス (登録商標) 法、クエンチングプライマー／プローブ (QP) 法、MALDI-TOF法、分子ビーコン法等を挙げることができる。具体的には、ドナー又はレシピエントから採取した生体試料のゲノムDNAを鋳型とする増幅反応によって測定対象のSNP部位を含む核酸断片を、プライマーを用いてPCRで増幅し、得られた核酸断片と、野生型及びバリエーション型に対応する一対のプローブとのハイブリダイゼーションを検出する方法や、上記PCR増幅過程において、当該SNP部位に特異的なプローブを用いることで、野生型及びバリエーション型を検出する方法を挙げることができる。

[0029] また、本発明のプローブは、担体上に固定して用いてもよく、担体としては、平面状の基板やビーズ状の球状担体を挙げることができ、具体的には、上記特開2011-250726号公報に記載された担体を挙げることがで

きる。また、野生型を検出するプローブとバリエーション型を検出するプローブとを同一の担体に固定してもよいし、異なる担体に固定してもよい。

[0030] 上記プローブは、例えば、核酸合成装置によって化学的に合成することで取得することができる。核酸合成装置としては、DNAシンセサイザー、全自動核酸合成装置等を使用することができる。

[0031] HLAを測定する方法としては特に制限されず、LCT法、DNAタイピング法、蛍光ビーズ法等を挙げることができる。また、上記同種造血幹細胞移植後の予後の予測用キットには、上記それぞれのHLAを測定する方法に応じたHLA測定用の試薬を含んでもよい。

実施例

[0032] 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。なお、本発明の実施例において、SNP遺伝子型の同定、ドナー・レシピエント、評価項目、統計解析については、次に示すとおりに行った。

[0033] (SNP遺伝子型の同定)

ドナー及びレシピエントそれぞれの末梢血200 μ LをQIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen社製)を用いてゲノムDNAを精製し、Illustra GenomiPhiHY kit (GE Healthcare社製)で増幅した。SNP遺伝子型の同定は、20ngの増幅したDNAを、TaqMan Genotyping Master Mix 及び TaqMan SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems社製)を用い、7900HT及び／又はViiA7 real-time PCR system (Applied Biosystems社製)装置でPCRし、かかる装置に付属のソフトウェアを用いて行った。デフォルト閾値 (quality = 95) を超えたシグナルだけを正しく遺伝子型判定されたものとした。遺伝子型判定されなかったサンプルや正しく遺伝子型判定されたサンプルの一部は、PCR及びダイレクトサンガーシーケンスによって遺伝子型を同

定した。

[0034] rs10925027、又はrs4612666のSNPをカバーする短鎖ゲノム領域は、それぞれ上記で得られた10ngのゲノムDNAをテンプレートとし、ExTaq HS (Takara社製)を用いたPCRによって増幅した。TaqManアッセイのプロブ、上記PCRダイレクトシーケンスに用いたプライマーの配列、及びSNP近傍の配列を図1に示す。

[0035] DNAシーケンス反応はプライマーとBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kitを用いて行い、3730xDNA Analyzer (Applied Biosystems社製)によって解析した。それぞれのSNP塩基において、それぞれのクロマトグラム目視検査の後、シグナルの最も強い塩基及び二番目に強い塩基のピークの高さの比を算出した。ピークの比が3未満の場合、遺伝子型はヘテロ接合と判断し、3以上の場合にはシグナルの最も強い塩基のホモ接合と判断した。

[0036] (ドナー・レシピエント)

被験者は、HLA-A、HLA-B、HLA-DRB1の合計3座6アリルを最低限マッチさせた非血縁骨髄移植を、公益財団法人日本骨髄バンクを介して2006年10月から2009年4月に受けた次の4つの条件を満たす999ペアのドナー及びレシピエントである。4つの条件とは、日本人ペアであること、ドナー年齢が20歳以上であること、患者の移植後の生存日数データが存在すること、HLA12座が遺伝子型再決定されて実際にHLA-A、HLA-B、HLA-DRB1の6アリルがマッチしていることが確認されたペアであること、である。HLA-C座はマッチしているとは限らないので、HLA座6/8、7/8、又は8/8アリルマッチといえる。上記ドナー及びレシピエントの臨床データ、移植のデータ及びマッチングを図2A～Cに示す。

[0037] (評価項目)

移植後の予後の主要評価項目は移植後100日以内の2-4級急性GvH

D (2-4 AGvHD)、全生存率 (OS)、慢性GvHD (CGvHD)、非再発死亡 (NRM)、再発である。慢性GvHD (CGvHD) としては、広範型慢性GvHD (extensive CGvHD: ExCGvHD)、限局的慢性GvHD (limited CGvHD)、広範型と限局型両方の慢性型GvHD (overall CGvHD) のいずれかの項目とした。OSとNRMに対する主要イベントは、それぞれすべての要因による死、再発歴なし (without prior relapse) による死と定義づけた。AGvHDは次の文献に記載の古典的な分類 (Glucksberg, H. et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. Transplantation 18, 295-304 (1974)、Przepiorka, D. et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. Bone Marrow Transplant. 15, 825-828 (1995)) に基づいて分類した。CGvHDは次の文献に記載のSeattle分類 (Shulman, H.M. et al. Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. Am. J. Med. 69, 204-217 (1980)) に基づき診断した。

[0038] (統計解析)

全生存率の分析方法は、未調整解析としてKaplan-Meier法とLog-rankテストを用い、多変量解析としてはCox比例ハザード回帰を用いた。全生存率以外の指標の分析方法は、未調整解析として累積発生率とGrayのテストを用い、多変量解析としてFine-Gray比例ハザード回帰を用いた。これらの解析には統計ソフトR (ver. 3.2.2) を用いた。多変量解析の調整因子は、HLA-C、HLA-DPB1、HLA-DQB1のアリルマッチ度、性別、年齢、レシピエントの病期や状態、移植時の処置等である。尚、本研究の多変量解析では、変数選択を行ったあとに残った変数間の交互作用の項についても変数選択を再度行った。最終モデルに残った変数と変数間交互作用の両方について、移植後成績と有意に

関連しているかどうかについてWaldテストを用いて検定した。

[0039] 統計解析ソフトとして、R言語環境（バージョン3.2.2）の以下のライブラリーを用いた。Kaplan-Meier曲線、Log-rankテスト、累積発生曲線、及びCox比例ハザード回帰にはsurvivalライブラリー（バージョン2.38）を、Grayのテスト、及びFine-Gray比例ハザード回帰にはcmprskライブラリー（バージョン2.2）を、変数選択にはMASSライブラリー（バージョン7.3）とcrrstep（バージョン2015-2）を、Waldテストにはaodライブラリー（バージョン1.3）を用いた。パーミュテーションを用いたLog-rankテストやGrayのテストは、clinfunライブラリー（バージョン1.0）に含まれるpermlogrank関数と同様の方法で行った。

[0040] <実施例1>広範性慢性GVHD（ExCGVHD）に対するドナーのNL RP3のSNPとHLA-Cミスマッチの交互作用（組み合わせ）

上記の方法でドナーのNL RP3のSNP（rs10925027又はrs4612666）とHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づくExCGVHDの累積発生曲線（cumulative incidence curves：CICs）解析を行った。結果を図3、図4A～Cに示す。さらに、ドナーのNL RP3のSNP（rs10925027）とHLA-Cミスマッチの交互作用に基づくFine-Gray比例ハザード回帰による多変量解析を行った。結果を図5に示す。

[0041] まず、図3に示すように、悪性（malignant）疾患全体において、HLA-Cがミスマッチであっても、ドナー側のNL RP3のSNP（rs10925027又はrs4612666）の遺伝子型が高発現型（CC）であれば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、及びHLA-DRB1の8／8アレルマッチと同等レベルにExCGVHDの累積発生率が低く、低発現型（TT）であれば、ExCGVHDの累積発生率が高いことが明らかになった。そこでさらにレシピエントの原疾患ごとに分類して解析したと

ころ、図4A～C、図5に示すように、MDS患者以外で上記傾向があり、特にALL患者において高値であることや、かかる傾向は、移植後4カ月以内の移植後初期に強く見られることが明らかとなった。すなわち、ExCGvHDはHLA-Cミスマッチ単独の存在でリスクが高くなるのではなく、ドナーのNLRP3のrs10925027又はrs4612666における低発現型(TT)と組み合わせた時に発症リスクが高くなること、上記傾向はすべての原疾患において同様ではなく、MDS患者以外においてみられることが明らかとなった。

[0042] <実施例2> 2-4級急性GvHD(2-4AGvHD)に対するレシピエントのNLRP3のSNPとHLA-Cミスマッチの交互作用

上記の方法でレシピエントのNLRP3のSNP(rs10925027又はrs4612666)とHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく2-4AGvHDの累積発生曲線解析を行った。結果を図6A～Eに示す。

[0043] 図6Aに示すように、悪性(malignant)疾患全体において、HLA-C MMが0(8アリルマッチ)の場合には、レシピエント側のNLRP3のSNPの遺伝子型が高発現型(CC)であれば2-4AGvHD累積発生率は低いが、HLA-Cが1-2アリルミスマッチの場合、2-4AGvHD累積発生率がむしろ高いことが明らかとなった。次に、図6B～Eに示すように、レシピエントの原疾患ごとのサブグループ解析を行った。その結果、HLA-Cが2アリルミスマッチかつレシピエント側のNLRP3のSNPの遺伝子型が高発現型(CC)の場合における上記2-4AGvHD累積発生率は、AML又はALL患者で高値であり、特にALL患者において高値であった。上記結果から、HLA-C座におけるアリルの適合度(マッチ/ミスマッチ)のみが2-4AGvHD累積発生率に影響を与えるのではなく、HLA-C座におけるアリルの適合度(マッチ/ミスマッチ)とNLRP3のSNPの遺伝子型の組み合わせが2-4AGvHD累積発生率に影響を与えることが明らかとなった。換言すれば、2-4AGvHD発症を予測する際には、HLA-C座におけるアリルの適合度(マッチ/ミスマ

ッチ)と共にNL RP 3のSNPの遺伝子型も考慮する必要があることが明らかとなった。

[0044] <実施例3>非再発死亡(NRM)に対するドナーのNL RP 3のSNPとHLA-Cミスマッチの組み合わせの影響

上記の方法でドナーのNL RP 3のSNP(rs10925027又はrs4612666)とHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づくNRMの累積発生曲線解析を行った。結果を図7A、B、図8に示す。さらに、ドナーのNL RP 3のSNP(rs10925027又はrs4612666)とHLA-Cミスマッチの交互作用に基づくFine-Gray比例ハザード回帰による多変量解析を行った。結果を図9に示す。

[0045] 図7A、B、図8に示すように、ALL患者、及び6 others患者では、HLA-Cがミスマッチでさらにドナー側のNL RP 3のSNPが低発現型(CT又はTT)であれば、NRMはHLA-A、HLA-B、HLA-C、及びHLA-DRB1の8/8アレルマッチよりも累積発生率が高く、かかるリスクの傾向は、移植後4カ月以内の移植後初期に強く見られた。さらに、ALL患者、及び6 others患者では、HLA-Cがミスマッチでドナー側のNL RP 3のSNPの遺伝子型が高発現型(CC)であれば予想外にもNRMはHLA 8/8アレルマッチよりも累積発生率はさらに低かった。上記結果から、HLA-Cミスマッチ単独の存在でNRMの発症リスクが高くなるのではなく、ドナーのNL RP 3のrs10925027又はrs4612666におけるSNPが低発現型(CT又はTT)と組み合わせた時に発症リスクが高くなることが明らかとなった。なお、このNRMの中で、移植後数か月以降の死についてはExGVHDによる死亡と解釈できる。しかし、図7A、B、図8、図9において、ドナー側のNL RP 3におけるSNPが低発現型(CT又はTT)であれば、移植後初期におけるNRM発症率の上昇が高いことから、数か月以降に加えて移植後初期のNRMにもドナーのNL RP 3におけるSNPとHLA-Cの交互作用が関与していることを示している。その詳細な機構は不明だが、例えば感染症による

死亡に対するドナーのNL RP 3におけるSNPとHLA-Cの特定の組み合わせによる防御作用等が考えられる。

[0046] <実施例4>非再発死亡(NRM)に対するレシピエントのNL RP 3のSNPとHLA-Cミスマッチの組み合わせの影響

上記の方法でレシピエントのNL RP 3のSNP(rs10925027又はrs4612666)とHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づくNRMの累積発生曲線解析を行った。結果を図10に示す。

[0047] 図10に示すように、ALL患者では、HLA-Cがミスマッチでさらにレシピエント側のNL RP 3のSNPが高発現型(CC)であればNRMはHLA8/8アリルマッチよりもNRMの累積発生リスクが高くなることが明らかとなった。かかるリスクの傾向は、移植後4カ月以内の移植後初期に見られたので、図6Cで示した急性GvHDの影響と考えられる。

[0048] <実施例5>全生存率(OS)に対するドナーのNL RP 3のSNPとHLA-Cミスマッチの組み合わせの影響

上記の方法でドナーのNL RP 3のSNP(rs10925027又はrs4612666)とHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく全生存率のKaplan-Meier曲線(KMCS)解析を行った。結果を図11A~Cに示す。さらに、ドナーのNL RP 3のSNP(rs10925027)とHLA-Cミスマッチの交互作用に基づくCox比例ハザード回帰による多変量解析を行った。結果を図12に示す。

[0049] 図11A~C、12に示すように、ALL及び6ptHERS患者では、HLA-A、HLA-B、HLA-C、及びHLA-DRB1の8/8アリルマッチした場合、ドナーのNL RP 3のSNPは低発現型(CT又はTT)の方が高発現型(CC)よりもOSが高かった。HLA-Cがミスマッチの場合では、移植後1.5年以内においてドナーのNL RP 3のSNPは高発現型(CC)の方が低発現型(CT又はTT)よりもOSが高かった。上記結果から、HLA-C座におけるアリルの適合度(マッチ/ミスマッチ)のみがOSに影響を与えるのではなく、HLA-C座におけるアリルの適合

度（マッチ／ミスマッチ）とNLRP3のSNPの遺伝子型の組み合わせがOSに影響を与えることが明らかとなった。換言すれば、OSを予測する際には、HLA-C座におけるアレルの適合度（マッチ／ミスマッチ）と共にNLRP3のSNPの遺伝子型も考慮する必要があることが明らかとなった。一方、MDS患者においてはHLA-C座におけるアレルの適合度（マッチ／ミスマッチ）とNLRP3のSNPの遺伝子型の組み合わせは全生存率に影響を与えなかった（図示せず）。なお、OSは、NRMの影響に再発（による死亡）の影響を足し合わせる複合効果となり、再発はNRMと反対の傾向を示したため（図示せず）、OSはNRMと比較して縦軸における差幅が小さくなった。

[0050] <実施例6>全生存率（OS）へのレシピエントのNLRP3のSNPとHLA-Cミスマッチの組み合わせの影響

上記の方法でレシピエントのNLRP3のSNP（rs10925027又はrs4612666）とHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づくOSのKaplan-Meier曲線（KMCS）解析を行った。結果を図13A、Bに示す。

[0051] 上述の実施例2で示したようにALLの患者ではレシピエントのNLRP3のSNPとHLA-Cミスマッチの組み合わせが2-4AGvHDに強く影響する。この結果と一致して、図13A、Bに示すように、レシピエントのNLRP3のSNPが高発現型（CC）でHLA-CがミスマッチであるALL患者は移植直後の数か月のOSが低下した。また、AML患者の場合、高発現型（CC）でAGvHDがやや上昇するが、OSは高発現型（CC）と低発現型（CT+TT）とで有意差は見られなかった。一方、MDS患者においてはレシピエントのNLRP3のSNPによる影響は見られなかった（図示せず）。

[0052] <実施例7>非再発死亡（NRM）、再発、及び全生存率（OS）に対するCGvHDの影響

移植後1年以内のCGvHDの発症の有無が、1年経過後のNRM、再発

、及びOSにどのような影響を及ぼすかについて単変量解析を行った。結果を図14A、Bに示す。

[0053] 図14Aに示すように、AML患者の場合にはCGvHDを発症した場合にはNRMが起こりにくく、また、OSが上昇していた。他方、図14Bに示すように、ALL又は6 o t h e r s患者の場合には、CGvHDが発症した方がNRMを起こしやすく、また、OSが低下していた。この結果から、原疾患の種類によって、CGvHD発症がその後のNRM、再発、及びOSへ及ぼす影響が異なることが明らかとなった。この結果は、ドナーのNL RP 3のSNPとHLA-Cミスマッチの交互作用（組み合わせ）がNRMやOSに対して有害な作用を示すのはALL及び6 o t h e r sでありAMLではないことをうまく説明する。

[0054] <実施例のまとめ>

現在、同種造血幹細胞移植のドナー選択法は、ドナーとレシピエント間のHLAのマッチングに基づいている。上記実施例により、MDS以外の悪性血液疾患ではHLAの適合度単独が重要なのではなく、HLAの適合度とNL RP 3のSNPとの交互作用が重要であることが新たに判明した。すなわち、HLA-CがミスマッチであってもNL RP 3のSNPの適切な遺伝子型と組み合わせれば、HLA-A、HLA-B、及びHLA-DRB1完全マッチと同等もしくはそれ以上の良好な生存率若しくは合併症予防効果が得られることが明らかとなった。これらの結果をまとめて新しいドナー選択法の一例を図15に示す。本発明の方法を用いて適切なドナーを選択することによって同種造血幹細胞移植における合併症が低減することが見込まれる。また、HLAの一部ミスマッチの場合でも適切なSNPと組み合わせれば生存率がむしろ高くなる可能性があるという結果は意外であり、HLAの6／8－8／8アリルマッチを行っていない国、若しくは行うことができない国等では、今後ドナーの選択肢が広がることが期待される。また、GvHDや死亡の起こる確率の高いHLAとNL RP 3のSNPの組み合わせをドナーとして選択せざると得ない場合においても、予後のハイリスク群として投薬等

による予防や治療を考慮することができる。

産業上の利用可能性

[0055] 本発明は、同種造血幹細胞移植におけるドナーの選択において利用可能である。

請求の範囲

- [請求項1] 同種造血幹細胞移植におけるドナーとレシピエント間でHLA遺伝子のHLA-A、HLA-B、HLA-C、及びHLA-DRB1の4座における8アレルのうち、1アレル又は2アレルがミスマッチで、かつレシピエントの原疾患が悪性血液疾患（骨髄異形形成症候群（MDS）を除く）の場合において、ドナー若しくはレシピエントのNLRP3遺伝子の配列番号1に示す塩基配列の26番目の塩基（rs10925027、C又はT）における一塩基多型、若しくは配列番号2に示す塩基配列の26番目の塩基（rs4612666、C又はT）における一塩基多型又はこれらと連鎖不平衡の関係にある一塩基多型、及びレシピエントの原疾患の種類を指標として移植後の予後の予測を補助する方法。
- [請求項2] 同種造血幹細胞移植におけるドナーとレシピエント間でHLA遺伝子のHLA-A、HLA-B、及びHLA-DRB1の3座における6アレルがマッチしていることを特徴とする請求項1記載の方法。
- [請求項3] 同種造血幹細胞移植が非血縁者間同種造血幹細胞移植であることを特徴とする請求項1又は2記載の方法。
- [請求項4] 予後が、2-4級急性移植片対宿主病（2-4AGvHD）発症、慢性移植片対宿主病（CGvHD）発症、全生存率（OS）、又は非再発死亡（NRM）であることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載の方法。
- [請求項5] 悪性血液疾患が、急性骨髄性白血病（AML）、急性リンパ性白血病（ALL）、慢性骨髄性白血病（CML）、リンパ系悪性腫瘍（LM）、骨髄増殖性疾患（MPD）、形質細胞性腫瘍（PCD）、又は固形腫瘍（ST）であることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の方法。
- [請求項6] 悪性血液疾患が、急性骨髄性白血病（AML）、又は急性リンパ性白血病（ALL）であることを特徴とする請求項5記載の方法。

[請求項7] 請求項1～6記載の方法に使用する、同種造血幹細胞移植後の予後の予測用キットであって、以下の〔1〕又は〔2〕記載のプロープを含むことを特徴とするキット。

〔1〕 NLRP3 遺伝子において、配列番号1に示す26番目の塩基（rs10925027、C又はT）における一塩基多型、又は該一塩基多型と連鎖不平衡の関係にある一塩基多型を含む連続する15～50塩基からなる配列、又はその相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチドからなるプロープ；

〔2〕 NLRP3 遺伝子において、配列番号2に示す26番目の塩基（rs4612666、C又はT）における一塩基多型、又は該一塩基多型と連鎖不平衡の関係にある一塩基多型を含む連続する15～50塩基からなる配列、又はその相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチドからなるプロープ；

[請求項8] HLAを測定するための試薬を含むことを特徴とする請求項7記載のキット。

[1]

SNP	Gene	DNA sequence around the SNP	TaqMan Assay ID (Applied Biosystems)	PCR primer A (5' → 3') used for direct sequencing	PCR primer B (5' → 3') used for direct sequencing
rs10925027	NLRP3/OR2B11	TCTAACTGTAA TGAGTGGAA TTTCAC[C/T] CTTTGATAGGA TAGGAGATTGAAAA 配列番号1	C_30713982_10	GTCAC TTGCGCAAA TGA TTCCATTGTAG 配列番号3	GCTCTGATAC TCTCAAACCTTTCCCTC 配列番号4
rs4812988	NLRP3	AGCTGAA TGTAGGAGGCTGGGAAGA[C/T] GTAGTA TTGGTGGAGGCTTGAGAA 配列番号2	C_29846029_10	ATGGTTGCACACAA TGTGAAGTG 配列番号5	ACAAAGTAAGCA TTCTCCAAGCTCC 配列番号6

[図2A]

Recipient characteristics	Group 1* (N = 822)	Group 2* (N = 65)	Group 3* (N = 112)
Sex			
Female	336	26	42
Male	486	39	70
Age (year)			
Low (1–44)	379	54	61
High (45–71)	443	11	51
Underlying disease			
<i>(Malignant)</i>	<i>(822)</i>	<i>(0)</i>	<i>(110)</i>
Acute myeloid leukemia (AML)	342	0	38
Acute lymphoblastic leukemia (ALL)	178	0	17
Myelodysplastic syndromes (MDS)	120	0	3
Chronic myeloid leukemia (CML)†	27	0	1
Other leukemia†	66	0	0
Lymphoid malignancy (LM)†	76	0	40
Myeloproliferative disorders (MPD)†	8	0	1
Plasma cell dyscrasias (PCD)†	3	0	10
Solid tumors (ST)†	2	0	0
<i>(Non-malignant)</i>	<i>(0)</i>	<i>(65)</i>	<i>(2)</i>
Hematopoietic disorder‡	0	48	1
Primary immunodeficiency	0	10	0
Epstein–Barr virus infection	0	4	0
Inborn error of metabolism	0	3	1
Disease stage			
Standard	450	N.A.	N.A.
Advanced§	365	N.A.	N.A.
Unknown§	7	N.A.	N.A.
Body mass index (BMI) (kg/m²)			
Unknown§	3	0	0
Low (12.0–22.0)§	466	49	68
High (22.0–38.6)	353	16	44
CMV serostatus before BMT			
Negative	141	15	24
Positive§	626	47	83
Unknown§	55	3	5
Performance status (PS) before BMT			
Low (0)	478	35	59
High (1–4)	344	30	53
Previous transplantation history			
No	822	65	0
Yes	0	0	112

[図2B]

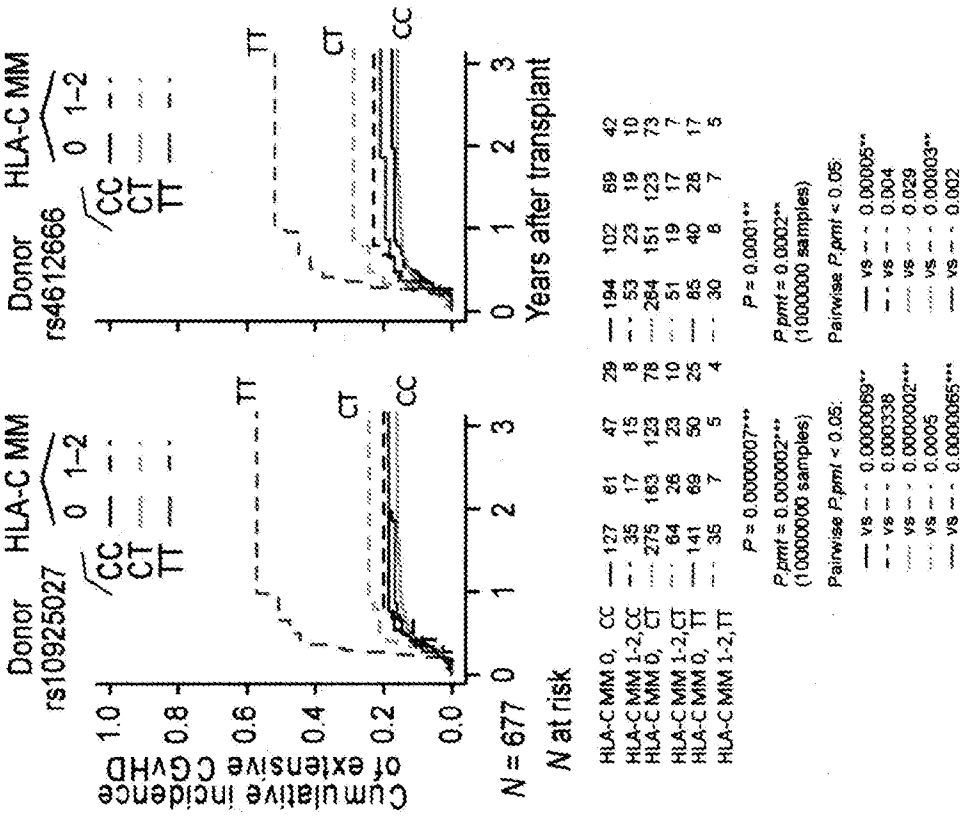
Donor characteristics	Group 1* (N = 822)	Group 2* (N = 65)	Group 3* (N = 112)
Sex			
Female	260	22	33
Male	562	43	79
Age			
Low (20–33 years)	396	38	56
High (34–68 years)	426	27	56
CMV serostatus before BMT			
Negative	253	15	26
Positive§	554	50	82
Unknown§	15	0	4
BMT characteristics	Group 1*	Group 2*	Group 3*
Myeloablative conditioning			
No	177	50	53
Yes	645	15	59
Cyclosporine A (CyA)¶			
Unknown§	1	0	0
No§	596	55	87
Yes	225	10	25
Ara-C			
No	731	65	101
Yes	91	0	11
Cyclophosphamide			
No	354	12	82
Yes	468	53	30
N of nucleated cells infused¶			
Unknown§	46	5	5
Low (0.01–2.50)§	384	28	61
High (≥2.50)	392	32	46
Days from diagnosis to BMT			
Low (9–269)	415	10	N.A.
High (270–10897)§	406	55	N.A.
Unknown§	1	0	N.A.

[図2C]

Matching characteristics	Group 1* (N = 822)	Group 2* (N = 65)	Group 3* (N = 112)
<i>ABO blood type</i>			
Match	464	38	65
Mismatch	358	27	47
<i>HLA-A, -B or -DRB1</i>			
0 mismatches	822	65	112
≥1 mismatch (either direction)	0	0	0
<i>HLA-C</i>			
0 mismatches	636	50	91
1 mismatch (both directions)	147	14	17
1 mismatch (GvH direction)	9	0	1
1 mismatch (rejection direction)	16	0	2
2 mismatches (both directions)	14	1	1
<i>HLA-DQB1</i>			
0 mismatches	758	55	107
1 mismatch (both directions)	52	8	4
1 mismatch (GvH direction)	5	0	0
1 mismatch (rejection direction)	7	1	1
2 mismatches (both directions)	0	1	0
<i>HLA-DPB1</i>			
0 mismatches	195	21	26
1 mismatch (both directions)	331	19	47
1 mismatch (GvH direction)	68	11	6
1 mismatch (rejection direction)	68	3	7
2 mismatches (both directions)	160	11	26
<i>HLA-C, -DQB1 or -DPB1 (GvH)</i>			
0 mismatches	214	19	28
1 mismatch (GvH direction)	330	23	46
2 mismatches (GvH direction)	211	16	32
3 mismatches (GvH direction)	60	5	5
4 mismatches (GvH direction)	7	2	1
<i>HLA-C, -DQB1 or -DPB1 (bi-directional)</i>			
0 mismatches	155	16	20
1 mismatch (either direction)	369	26	52
2 mismatches (either direction)	223	15	34
3 mismatches (either direction)	64	6	5
4 mismatches (either direction)	11	2	1

[図3]

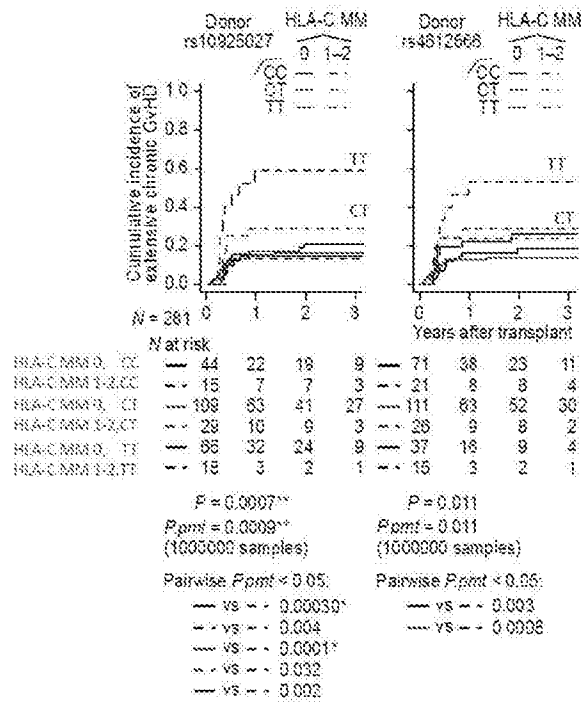
悪性疾患患者におけるドナーのNLRP3のSNPとHLA-Cミスマッチの
組み合わせに基づく広範性CGvHD (ExCGvHD)の累積発生曲線解析結果



$P = P$ determined by Gray's test.
 $P_{pmt} = P$ determined by a sampled permutation-based Gray's test.
 $*P < 0.005$ and $*P_{pmt} < 0.005$ for overall tests.
 $*P_{pmt} < 0.005/15$ in pairwise comparisons.
Descriptions and numbers of excluded pairs
CGvHD-unevaluable (N = 142) and day of CGvHD unknown (N = 3)

[図4A]

ドナーのNLRP3のSNPとHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく
広範性CGvHD (ExCGvHD) の累積発生曲線解析結果 (AML)



$P = P$ determined by Gray's test. $P_{pmt} = P$ determined by a sampled permutation-based Gray's test.

* $P < 0.005$ and * $P_{pmt} < 0.005$ for overall tests.

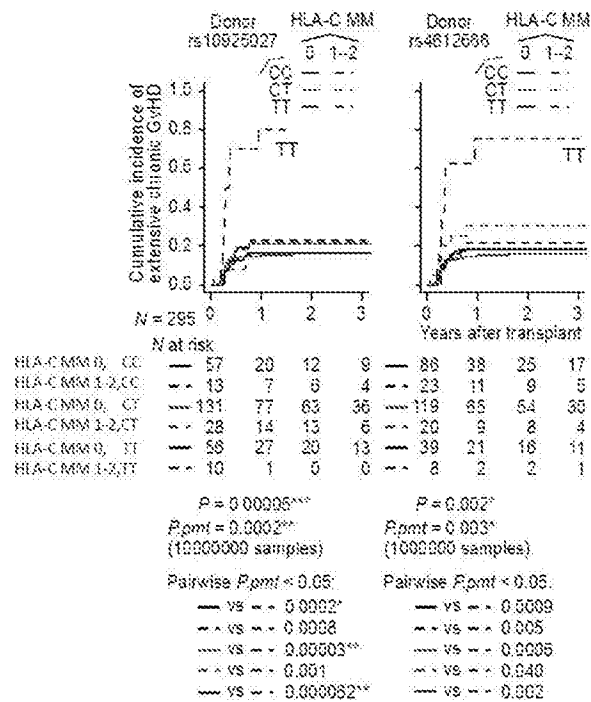
* $P < 0.005/15$ and * $P_{pmt} < 0.005/15$ in pairwise comparisons.

Descriptions and numbers of excluded pairs

CGvHD-unreleasable (N = 60) and day of CGvHD unknown (N = 1)

[図4B]

ドナーのNLRP3のSNPとHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく
広範性CGvHD (ExCGvHD)の累積発生曲線解析結果 (ALL+6others)



$P = P$ determined by Gray's test. $P_{pmt} = P$ determined by a sampled permutation-based Gray's test.

* $P < 0.005$ and * $P_{pmt} < 0.005$ for overall tests.

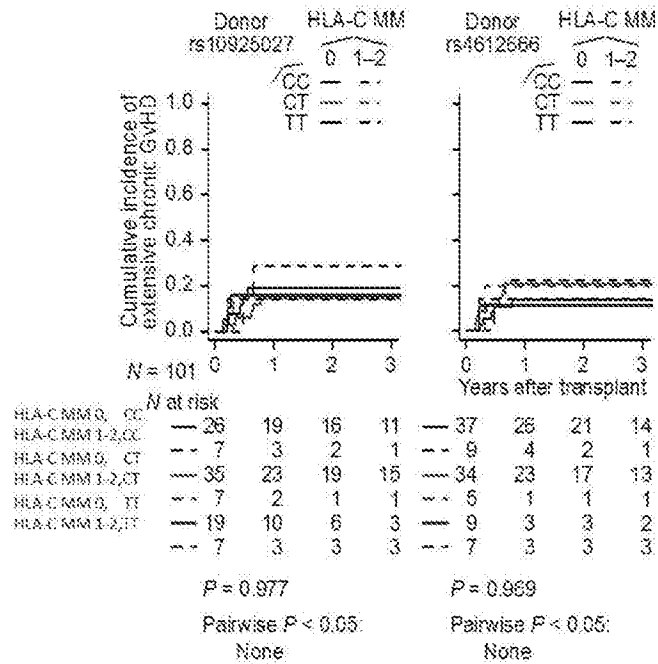
* $P < 0.005/15$ and * $P_{pmt} < 0.005/15$ in pairwise comparisons.

Descriptions and numbers of excluded pairs

CGvHD-unevaluable (N = 63) and day of CGvHD unknown (N = 2)

[図4C]

ドナーのNLRP3のSNPとHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく
広範性CGvHD(ExCGvHD)の累積発生曲線解析結果(MDS)



$P = P$ determined by Gray's test. $P_{pmt} = P$ determined by a sampled permutation-based Gray's test.

* $P < 0.005$ and * $P_{pmt} < 0.005$ for overall tests.

* $P < 0.005/15$ and * $P_{pmt} < 0.005/15$ in pairwise comparisons.

Descriptions and numbers of excluded pairs

CGvHD-unevaluable (N = 19)

[図5]

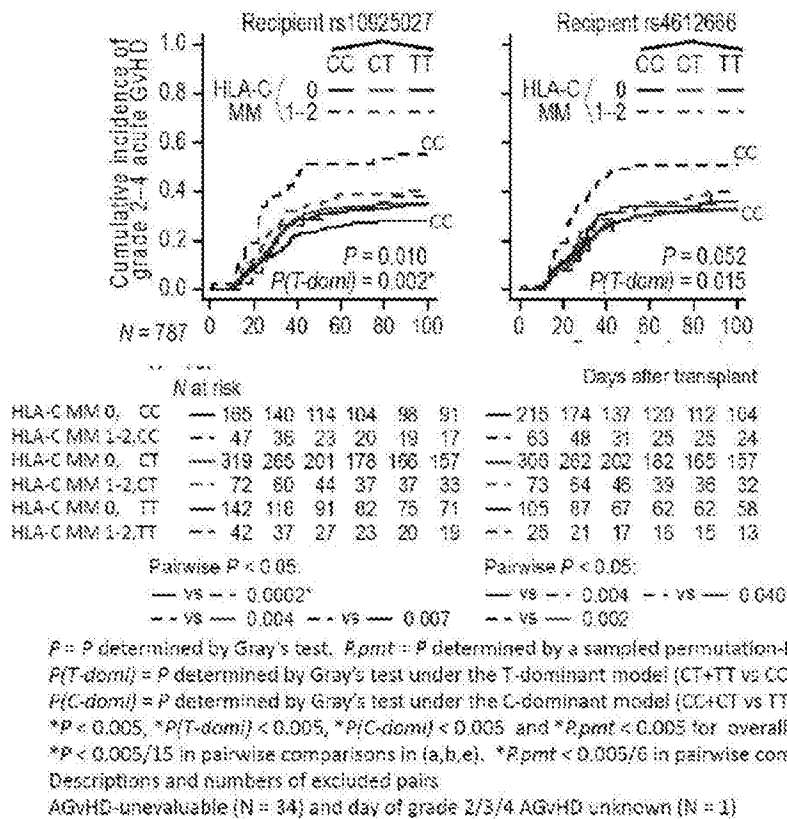
ドナーのNLPRP3のSNPとHLA-Cミスマッチの交互作用に基づく
Fine-Gray比例ハザード回帰によるExCGvHDの多変量解析結果

Underlying disease	AML (N = 28)		ALL (N = 50)		MDS (N = 101)		Six other malignant diseases (N = 145)	
	SHR (95% CI)	P	SHR (95% CI)	P	SHR (95% CI)	P	SHR (95% CI)	P
HLA-C MM	1.08 (0.39-2.99)	0.882	0.94 (0.33-2.66)	0.902	0.73 (0.14-3.77)	0.707	0.19 (0.02-1.59)	0.120
Donor rs10925027 (T-additive)	1.23 (0.77-1.95)	0.384	0.78 (0.42-1.38)	0.371	0.86 (0.25-1.75)	0.402	0.95 (0.52-1.71)	0.852
HLA-C MM × donor rs10925027	1.91 (0.93-3.93)	0.077	2.08 (1.10-3.85)	0.024	1.18 (0.23-6.11)	0.842	7.05 (1.93-25.8)	0.003*
	N _{ev} = 58; P _{int} = 0.592		N _{ev} = 27; P _{int} = 0.024		N _{ev} = 17; P _{int} = 0.077		N _{ev} = 32; P _{int} = 0.874	

SHR: subdistribution hazard ratio. P = P determined by Wald test. *P < 0.005.
N_{ev} = the number of the primary competing event (ECGvHD).
P_{int} = P for the interaction between the variable and time. T-additive model: CC = 0; CI = 1; TI = 2.
Descriptions and numbers of excluded pairs
AML: CGvHD-unevaluable (N = 60) and day of CGvHD unknown (N = 1)
ALL: CGvHD-unevaluable (N = 27) and day of CGvHD unknown (N = 1)
MDS: CGvHD-unevaluable (N = 19)
the six other malignant diseases(others): CGvHD-unevaluable (N = 36) and day of CGvHD unknown (N = 1)

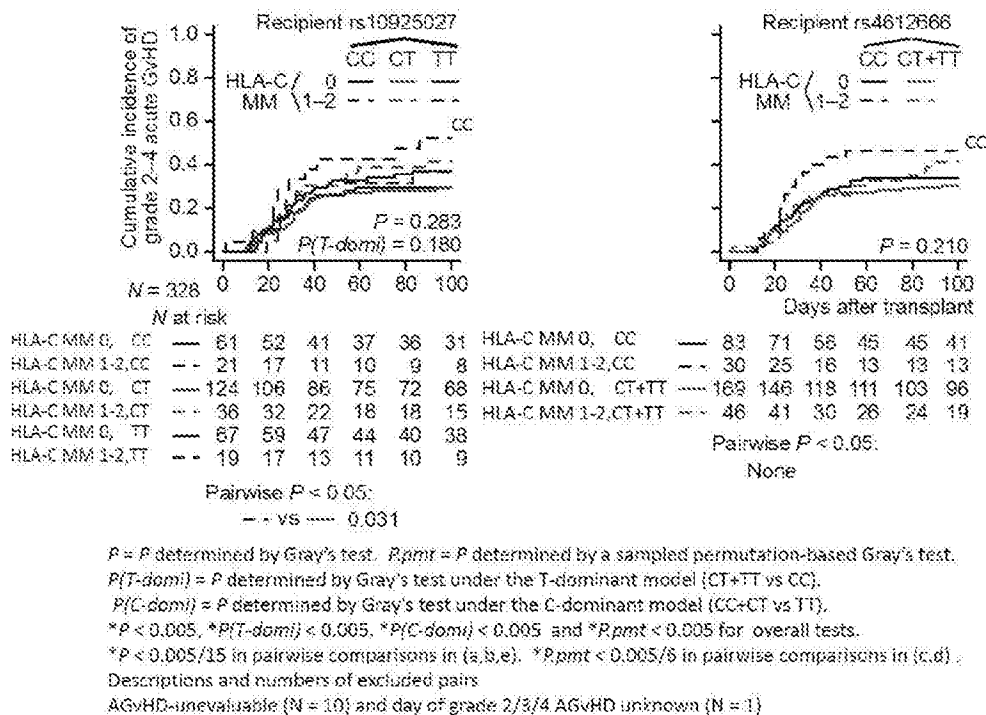
[図6A]

レシピエントのNLRP3のSNPとHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく
2-4AGvHDの累積発生曲線解析結果 (malignant)



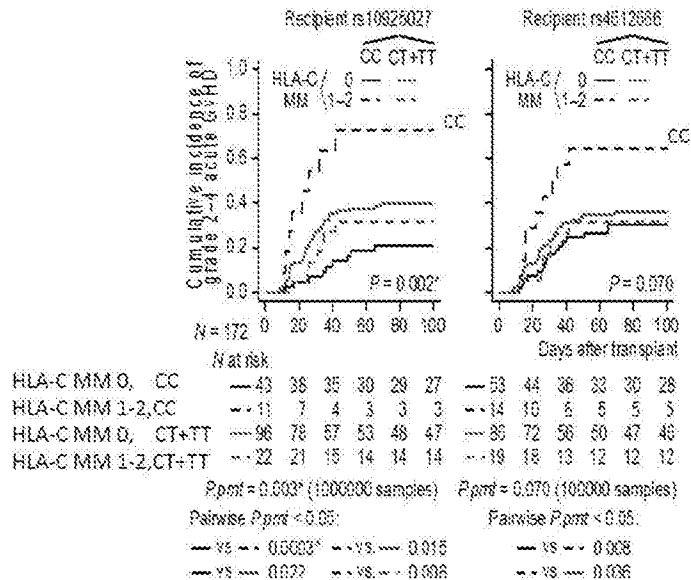
[図6B]

レシピエントのNLRP3のSNPとHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく
2-4AGvHDの累積発生曲線解析結果 (AML)



[図6C]

レシピエントのNLRP3のSNPとHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく
2-4AGvHDの累積発生曲線解析結果(ALL)



P = P determined by Gray's test. P_{pmt} = P determined by a sampled permutation-based Gray's test.

P(T-domi) = P determined by Gray's test under the T-dominant model (CT+TT vs CC).

P(C-domi) = P determined by Gray's test under the C-dominant model (CC+CT vs TT).

*P < 0.005, *P(T-domi) < 0.005, *P(C-domi) < 0.005 and *P_{pmt} < 0.005 for overall tests.

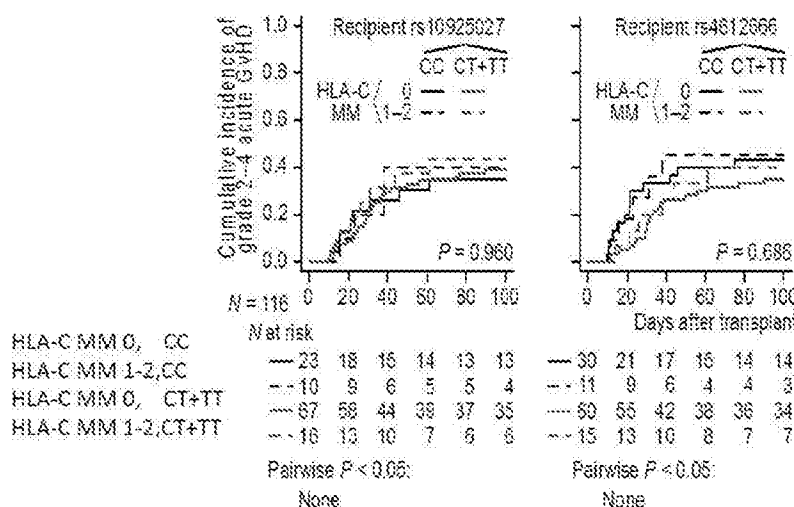
*P < 0.005/15 in pairwise comparisons in (a,b,e). *P_{pmt} < 0.005/6 in pairwise comparisons in (c,d).

Descriptions and numbers of excluded pairs

AGvHD-unevaluable (N = 14)

[図6D]

レシピエントのNLRP3のSNPとHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく
2-4AGvHDの累積発生曲線解析結果(MDS)



P = P determined by Gray's test. P_{pmt} = P determined by a sampled permutation-based Gray's test.

P(T-domi) = P determined by Gray's test under the T-dominant model (CT+TT vs CC).

P(C-domi) = P determined by Gray's test under the C-dominant model (CC+CT vs TT).

*P < 0.005, *P(T-domi) < 0.005, *P(C-domi) < 0.005 and *P_{pmt} < 0.005 for overall tests.

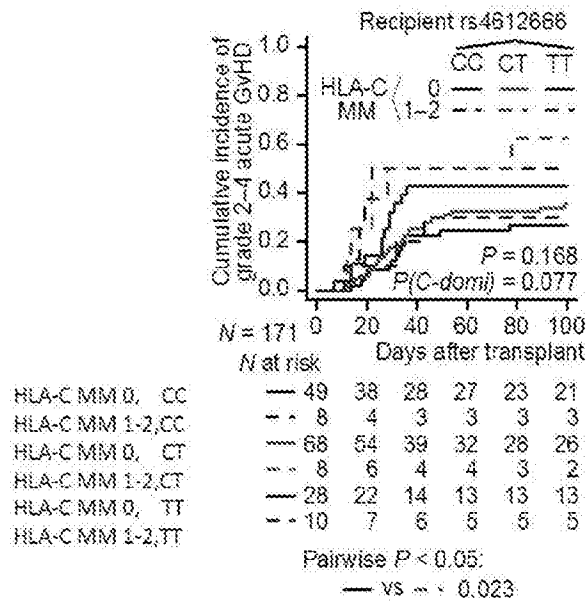
*P < 0.005/15 in pairwise comparisons in (a,b,e). *P_{pmt} < 0.005/6 in pairwise comparisons in (c,d).

Descriptions and numbers of excluded pairs

AGvHD-unevaluable (N = 6)

[図6E]

レシビエントのNLRP3のSNPとHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく
2-4AGvHDの累積発生曲線解析結果(6others)



$P = P$ determined by Gray's test. $P_{pmt} = P$ determined by a sampled permutation-based Gray's test.

$P(T\text{-domi}) = P$ determined by Gray's test under the T-dominant model (CT+TT vs CC).

$P(C\text{-domi}) = P$ determined by Gray's test under the C-dominant model (CC+CT vs TT).

* $P < 0.005$, * $P(T\text{-domi}) < 0.005$, * $P(C\text{-domi}) < 0.005$ and * $P_{pmt} < 0.005$ for overall tests.

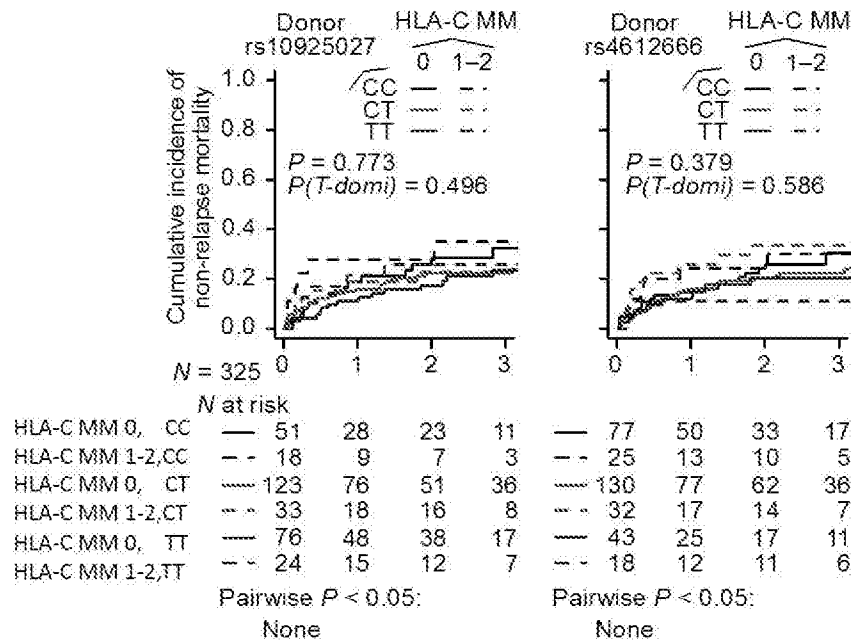
* $P < 0.005/15$ in pairwise comparisons in (a,b,e). * $P_{pmt} < 0.005/6$ in pairwise comparisons in (c,d).

Descriptions and numbers of excluded pairs

AGvHD-unevaluable (N = 4)

[図7A]

ドナーのNLRP3のSNPとHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく
非再発死亡(NRM)の累積発生曲線解析結果(AML)



$P = P$ determined by Gray's test.

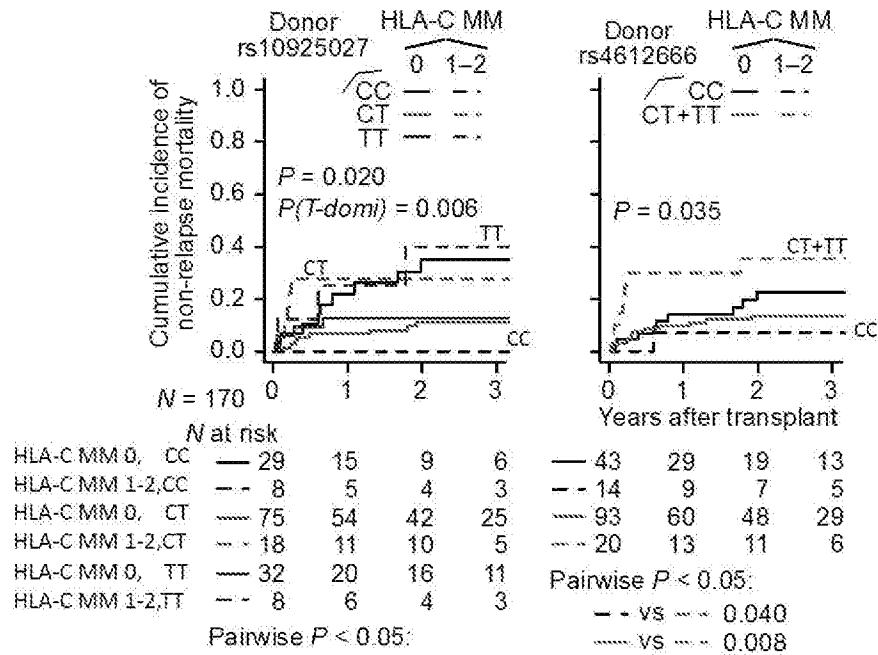
$P(T\text{-domi}) = P$ determined by Gray's test under the T-dominant model (CT+TT vs CC).

Descriptions and numbers of excluded pairs

No complete remission achieved after BMT ($N = 17$)

[図7B]

ドナーのNLRP3のSNPとHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく
非再発死亡(NRM)の累積発生曲線解析結果(ALL)



$P = P$ determined by Gray's test.

$P(T\text{-domi}) = P$ determined by Gray's test under the T-dominant model (CT+TT vs CC).

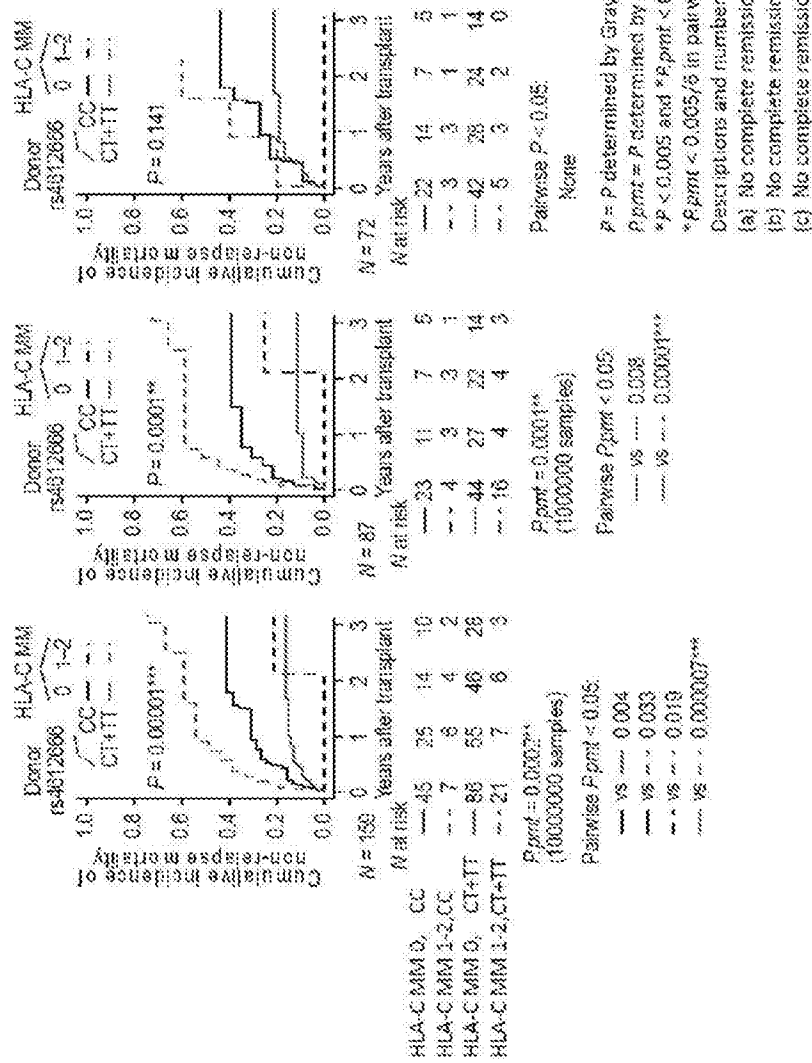
Descriptions and numbers of excluded pairs

No complete remission achieved after BMT (N = 8)

[図8]

ドナーのNLPRP3のSNPとHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく
非再発死亡(NRM)の累積発生曲線解析結果

(a) Bothers
(b) CML+
other leukemia
(c) LM+PCD+MPD+ST



[9]

ALL+60thers患者におけるドナーのNLRP3のSNPとHLA-Cミスマッチの交互作用に基づく非再発死亡(NRM)のFine-Gray比例ハザード回帰による多変量解析結果

(a) HLA-C MM

	SHR (95% CI)	P		SHR (95% CI)	P
HLA-C MM	0.54 (0.25-1.16)	0.116	HLA-C MM	0.27 (0.09-0.95)	0.041
Donor rs10925027 (T-additive)	0.77 (0.54-1.10)	0.152	Donor rs4612666 (T-dominant)	0.56 (0.34-0.90)	0.017
HLA-C MM × donor rs10925027	2.08 (1.26-3.43)	0.004*	HLA-C MM × donor rs4612666	1.75 (1.11-28.5)	0.002*
N = 329; N _{ev} = 79	BIC = 872; P _{AT} = 0.912		N = 328; N _{ev} = 79	BIC = 864; P _{AT} = 0.898	

SHR: subdistribution hazard ratio, CI: confidence interval, P = P determined by Wald test. *P < 0.005, N_{ev} = the number of the primary competing event (NRM).
 BIC: Bayesian information criterion, P_{AT} = P for the interaction between the variable and time, T-additive model: CC = 0; CT = 1; TT = 2, T-dominant model: CC = 0; CT = 1; TT = 1.
 The T-dominant model could not be used for rs10925027 because no NRM was observed for the HLA-C-mismatched CC genotype, and the additive model was used as a surrogate.

Descriptions and numbers of excluded pairs

rs19025027: No complete remission achieved after BMT (N = 31)

rs4612666: No complete remission achieved after BMT (N = 31)

(b) HLA-C/Q/P MM

Underlying disease	AML (N = 325)	ALL (N = 170)	MDS (N = 112)	Six other malignant diseases (N = 158)	ALL + six other malignant diseases (N = 329)
	SHR (95% CI) P	SHR (95% CI) P	SHR (95% CI) P	SHR (95% CI) P	SHR (95% CI) P
HLA-C/Q/P MM	1.36 (0.90-2.06) 0.458	0.71 (0.40-1.27) 0.251	3.98 (0.02-19.4) 0.007	0.45 (0.20-1.01) 0.053	0.46 (0.27-0.89) 0.020
rs4612666 Y1+rs10925027 Y1	1.08 (0.45-2.58) 0.870	0.75 (0.24-2.30) 0.614	2.27 (0.24-21.7) 0.475	0.58 (0.31-1.08) 0.065	0.53 (0.37-1.05) 0.079
HLA-C/Q/P MM × the last term	0.90 (0.54-1.50) 0.688	1.88 (1.22-2.90) 0.004*	0.68 (0.26-1.81) 0.450	1.55 (1.07-2.50) 0.025	1.71 (1.26-2.49) 0.001*
	N _{ev} = 27; P _{AT} = 0.011	N _{ev} = 12; P _{AT} = 0.521	N _{ev} = 10; P _{AT} = 0.048	N _{ev} = 22; P _{AT} = 0.706	N _{ev} = 34; P _{AT} = 0.657

Y1: CT or TT (see table at the right).

The last term: rs4612666 Y1+rs10925027 Y1.

Descriptions and numbers of excluded pairs

AML: No complete remission achieved after BMT (N = 17)

ALL: No complete remission achieved after BMT (N = 8)

MDS: No complete remission achieved after BMT (N = 8)

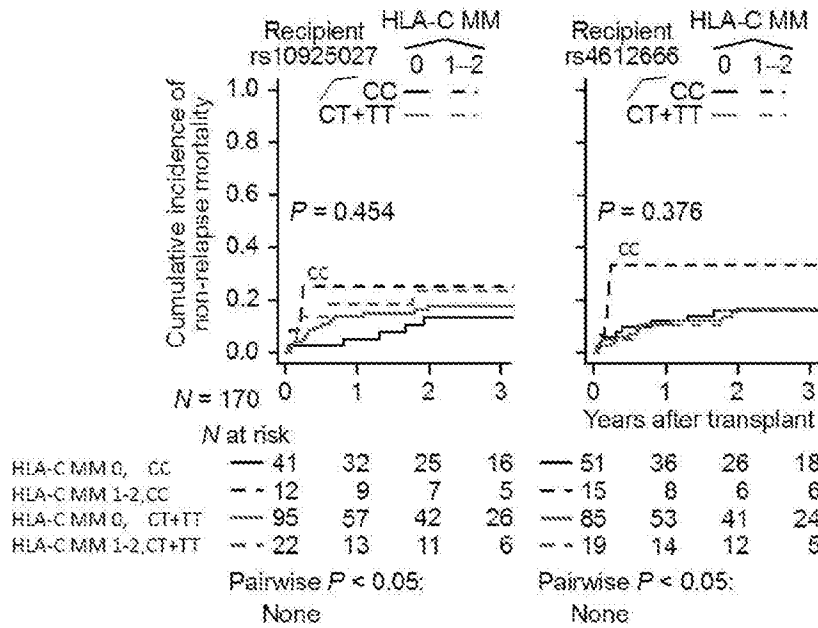
Six other malignant diseases: No complete remission achieved after BMT (N = 23)

ALL+ six other malignant diseases: No complete remission achieved after BMT (N = 31)

	rs4612666	rs10925027	rs4612666 Y1+rs10925027 Y1
CC	CC	CC	0
CC	CT	CT	1
CC	TT	TT	1
CT	CC	CC	1
CT	CT	CT	2
CT	TT	TT	2
TT	CC	CC	1
TT	CT	CT	2
TT	TT	TT	2

[図10]

ALL患者におけるレシピエントNLRP3のSNPとHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく
非再発死亡(NRM)の累積発生曲線解析結果



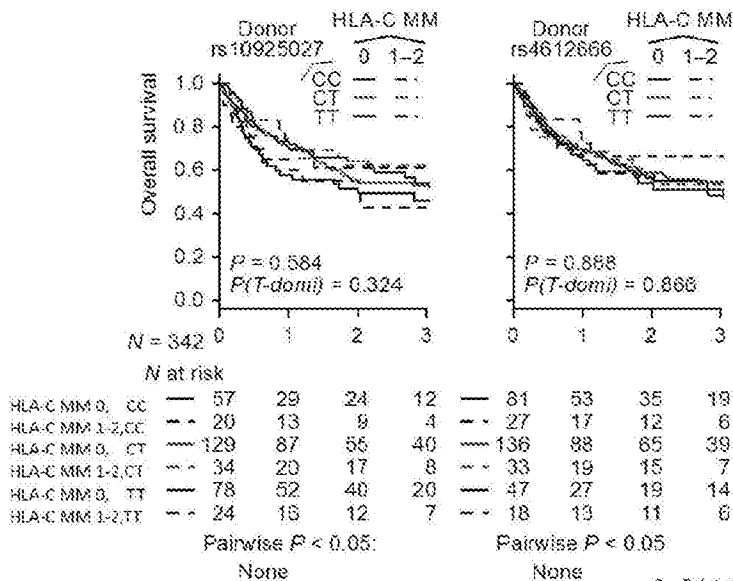
$P = P$ determined by Gray's test. * $P < 0.005$.

Descriptions and numbers of excluded pairs

No complete remission achieved after BMT ($N = 8$)

[図11A]

ドナーのNLRP3のSNPとHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく
全生存率(OS)の解析(単変量Kaplan-Meier解析)結果(AML)



$P = P$ determined by the log-rank test.

$P(T-dom) = P$ determined by the log-rank test under the T-dominant model.

$R_{pmt} = P$ determined by a sampled permutation-based log-rank test.

* $P < 0.005$, * $P(T-dom) < 0.005$ and * $R_{pmt} < 0.005$ for overall tests.

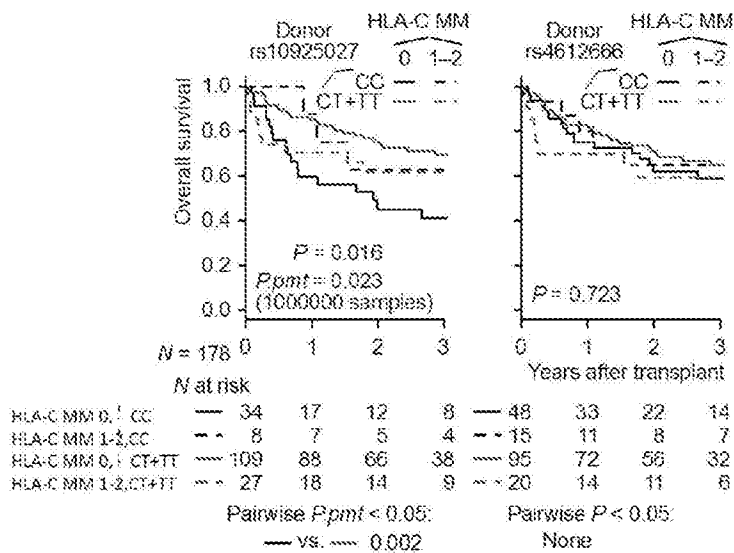
* $P < 0.005/25$ and * $R_{pmt} < 0.005/15$ in pairwise comparisons in (a,c).

* $R_{pmt} < 0.005/6$ in pairwise comparisons in (b).

Descriptions and numbers of excluded pairs: None

[図11B]

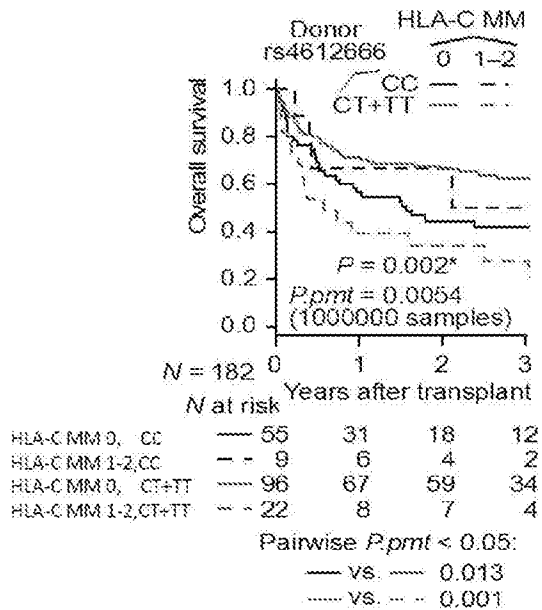
ドナーのNLPR3のSNPとHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく
全生存率(OS)の解析(単変量Kaplan-Meier解析)結果(ALL)



$P = P$ determined by the log-rank test.
 $P(T\text{-dom}) = P$ determined by the log-rank test under the T-dominant model.
 $P_{pmt} = P$ determined by a sampled permutation-based log-rank test.
 $*P < 0.005$, $*P(T\text{-dom}) < 0.005$ and $*P_{pmt} < 0.005$ for overall tests.
 $*P < 0.005/15$ and $*P_{pmt} < 0.005/15$ in pairwise comparisons in (a,c);
 $*P_{pmt} < 0.005/6$ in pairwise comparisons in (b).

[図11C]

ドナーのNLPR3のSNPとHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく
全生存率(OS)の解析(単変量Kaplan-Meier解析)結果(Gothers)



Descriptions and numbers of excluded pairs: None

$P = P$ determined by the log-rank test.
 $P(T\text{-dom}) = P$ determined by the log-rank test under the T-dominant model.
 $P_{pmt} = P$ determined by a sampled permutation-based log-rank test.
 $*P < 0.005$, $*P(T\text{-dom}) < 0.005$ and $*P_{pmt} < 0.005$ for overall tests.
 $*P < 0.005/15$ and $*P_{pmt} < 0.005/15$ in pairwise comparisons in (a,c);
 $*P_{pmt} < 0.005/5$ in pairwise comparisons in (b).

[図12]

ALL+6others患者におけるドナーのNLRP3のSNPとHLA-Cミスマッチの交互作用に基づく全生存率(OS)のCox比例ハザード回帰による多変量解析結果

Fixed donor SNP	rs10925027	
	HR (95% CI)	P
HLA-C MM	0.37 (0.13–1.04)	0.059
SNP (T-dominant)	0.56 (0.38–0.82)	0.003*
HLA-C MM × SNP	3.81 (1.31–11.1)	0.014
N = 360; N.ev = 154		P _{xt} = 0.256

P = P determined by Wald test. *P < 0.005. HR: hazard ratio. CI: confidence interval.

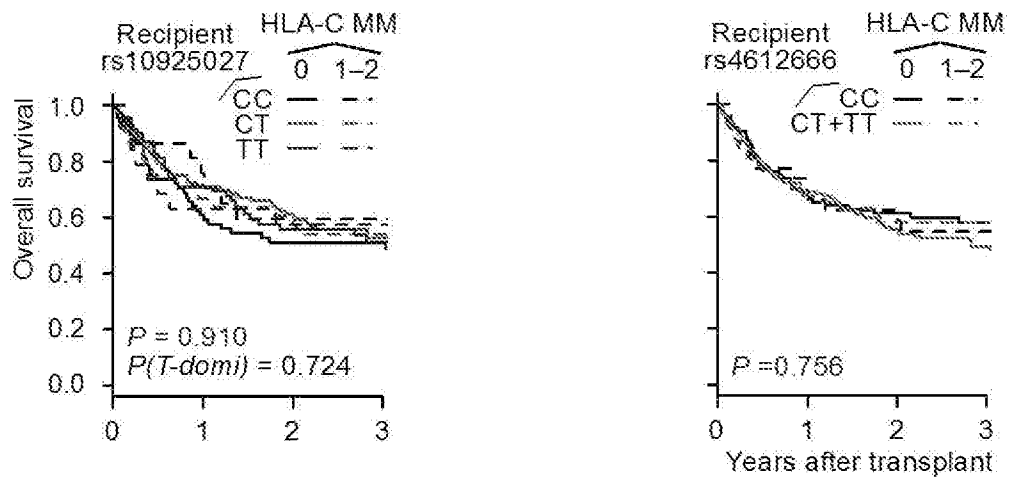
N.ev = the number of the event (death). P_{xt} = P for the interaction between the variable and time.

T-dominant model: CC = 0; CT = 1; TT = 1.

Descriptions and numbers of excluded pairs: None

[図13A]

レシピエントNLRP3のSNPとHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく全生存率(OS)の単変量Kaplan-Meier解析結果(AML)



HLA-C MM 0, CC	66	38	28	18	HLA-C MM 0, CC	85	55	41	25
HLA-C MM 1-2, CC	22	14	10	5	HLA-C MM 1-2, CC	31	19	16	5
HLA-C MM 0, CT	128	83	59	33	HLA-C MM 0, CT+TT	179	113	78	47
HLA-C MM 1-2, CT	37	23	18	10	HLA-C MM 1-2, CT+TT	47	30	22	14
HLA-C MM 0, TT	70	47	32	21					
HLA-C MM 1-2, TT	19	12	10	4					

Pairwise P < 0.05:

None

Pairwise P < 0.05:

None

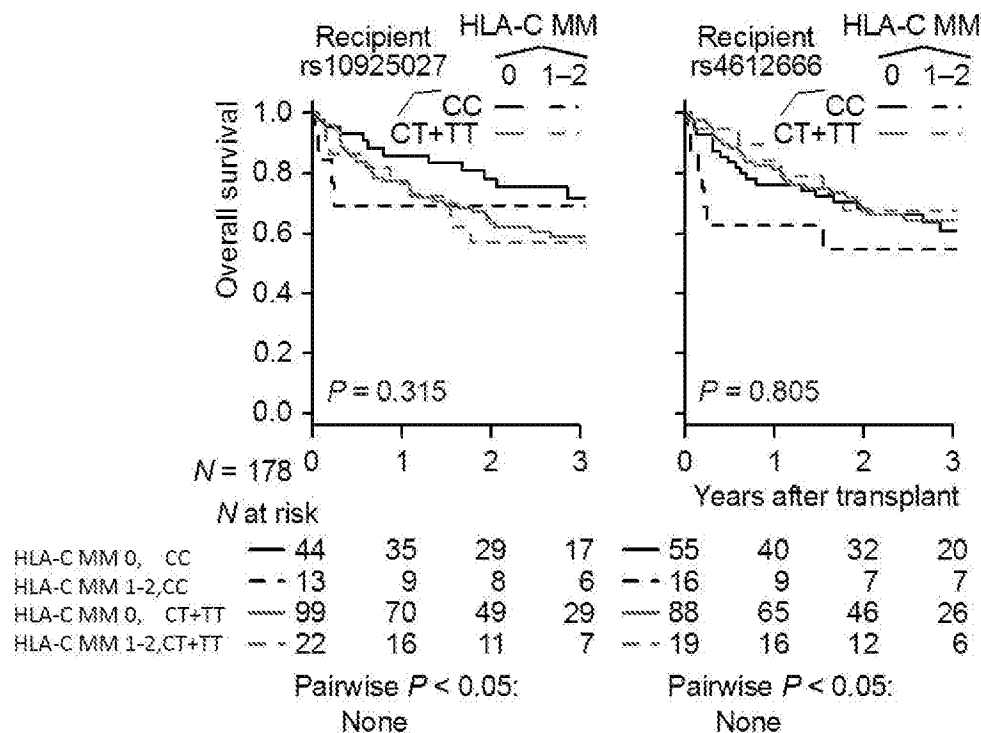
P = P determined by the log-rank test.

P(T-dom) = P determined by the log-rank test under the T-dominant model.

Descriptions and numbers of excluded pairs: None

[図13B]

レシピエントNLRP3のSNPとHLA-Cミスマッチの組み合わせに基づく
全生存率(OS)の単変量Kaplan-Meier解析結果(ALL)



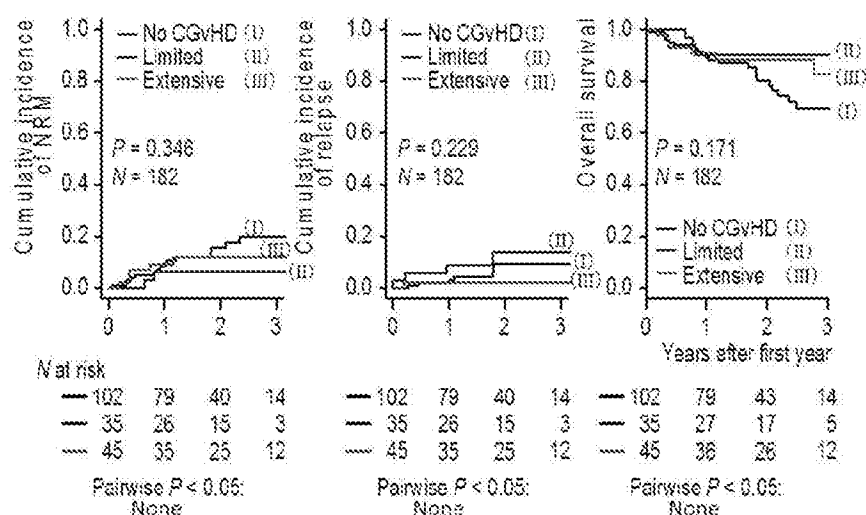
$P = P$ determined by the log-rank test.

$P(T\text{-domi}) = P$ determined by the log-rank test under the T-dominant model.

Descriptions and numbers of excluded pairs: None

[図14A]

移植後1年以内の限局性CGvHD・広範性CGvHDの発症の有無が、移植後1年以降の
非再発死亡・再発・全生存率に及ぼす影響についての単変量解析結果(AML)



$P = P$ determined by Gray's test for non-relapse mortality (NRM) and relapse;

$P = P$ determined by the log-rank test for overall survival (OS).

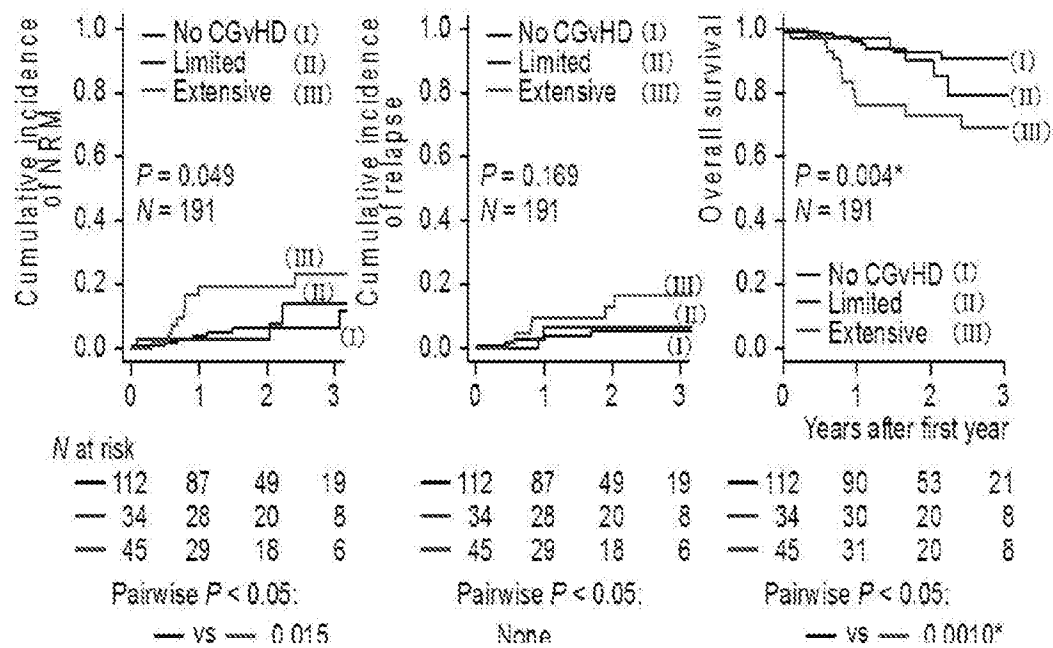
* $P < 0.005$.

Descriptions and numbers of excluded pairs

CGvHD unevaluable, day of CGvHD unknown, and/or day of survival and/or relapse ≤ 365 (N = 160)

[図14B]

移植後1年以内の限局性CGvHD・広範性CGvHDの発症の有無が、移植後1年以降の非再発死亡・再発・全生存率に及ぼす影響についての単変量解析結果(ALL+6others)



$P = P$ determined by Gray's test for non-relapse mortality (NRM) and relapse;

$P = P$ determined by the log-rank test for overall survival (OS).

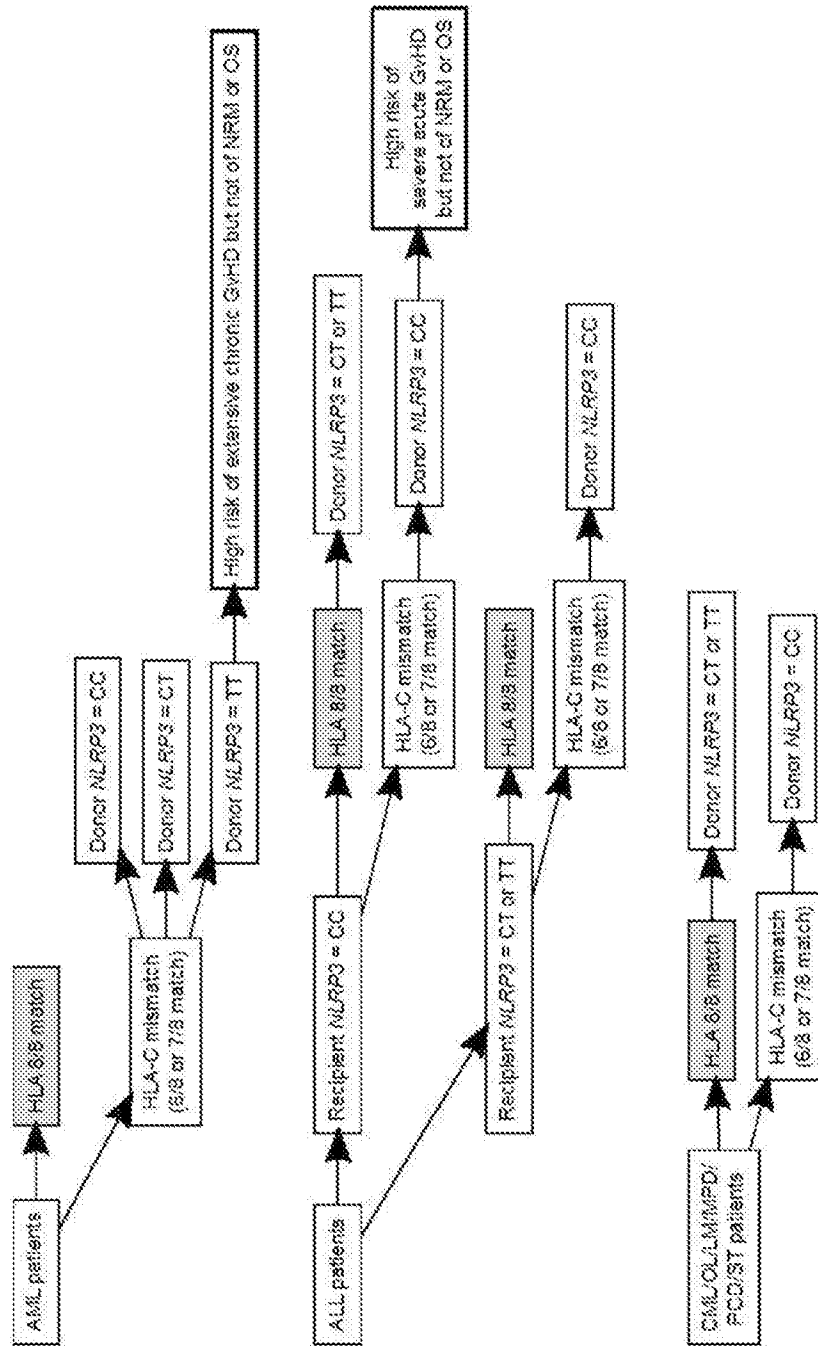
* $P < 0.005$.

Descriptions and numbers of excluded pairs

CGvHD-unevaluable, day of CGvHD unknown, and/or day of survival and/or relapse ≤ 365 ($N = 169$)

[図15]

本発明を用いたドナー選択法の例



AML = Acute Myeloid Leukemia (急性骨髄性白血病); ALL = acute lymphoblastic leukemia (急性リンパ性白血病); CM/L = chronic myeloid leukemia (慢性骨髄性白血病); OL = other leukemia (その他の白血病); LM = lymphoid malignancy (リンパ系悪性腫瘍); MPD = myeloproliferative disorders (骨髄増殖性疾患); PCD = plasma cell dyscrasias (形質細胞性腫瘍); ST = solid tumors (固形腫瘍)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/038227

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C12Q1/68 (2018.01) i, C12M1/00 (2006.01) i, G01N33/53 (2006.01) i,
C12N15/09 (2006.01) n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. C12Q1/68, C12M1/00, G01N33/53, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),
WPIDS/WPIX (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	GRANELL, M., et al., Common variants in NLRP2 and NLRP3 genes are strong prognostic factors for the outcome of HLA-identical sibling allogeneic stem cell transplantation, Blood, 2008, vol. 112, no. 10, pp. 4337-4342, enter. in particular, page 4339, table 3, page 4340, fig. 1	1-3, 5-8 4
Y A	神田 善伸, わが国の HLA 不適合血縁者間造血幹細胞移植の現状, 日本造血細胞移植学会雑誌, 2012, vol. 1, no. 3, pp. 66-75, enter. in particular, pp. 66-69, (KANDA, Yoshinobu, Current status of HLA-mismatched related hematopoietic stem cell transplantation in Japan, Journal of Hematopoietic Cell Transplantation)	1-3, 5-8 4



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18 January 2018 (18.01.2018)

Date of mailing of the international search report
30 January 2018 (30.01.2018)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/038227

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	高見 昭良, 造血細胞移植における非 HLA 遺伝子多型の臨床的意義, 第 22 回日本組織適合性学会大会抄録集, 2013, p. 49, enter, (22th Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics: abstracts), non-official translation (TAKAMI, Akiyoshi, "Clinical meaning of non-HLA gene polymorphism in hematopoietic cell transplantation")	1-3, 5-8 4
P, X	TAKAHASHI, H., et al., Associations of interactions between NLRP3 SNPs and HLA mismatch with acute and extensive chronic graft-versus-host diseases, Scientific Reports, July 2017: 13097, pp. 1-10, enter, published online: 12 October 2017	1-8
A	JANKOVIC, D., et al., The Nlrp3 inflammasome regulates acute graft-versus-host disease, The Journal of Experimental Medicine, 2013, vol. 210, no. 10, pp. 1899-1910	1-8
A	HITOMI, Y., et al., Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2009, vol. 124, no. 4, pp. 779-785. e6	1-8
A	JP 2011-24478 A (RIKEN, JAPAN) 10 February 2011 (Family: none)	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12Q1/68(2018.01)i, C12M1/00(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12Q1/68, C12M1/00, G01N33/53, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), WPIDS/WPIX (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y A	GRANELL, M. et al., Common variants in NLRP2 and NLRP3 genes are strong prognostic factors for the outcome of HLA-identical sibling allogeneic stem cell transplantation, Blood, 2008, Vol.112, No.10, p.4337-4342, 全体。特に、第4339頁Table 3、第4340頁Figure 1	1-3, 5-8 4
Y A	神田 善伸, わが国のHLA不適合血縁者間造血幹細胞移植の現状, 日本造血細胞移植学会雑誌, 2012, Vol.1, No.3, p.66-75, 全体。特に、第66頁～第69頁	1-3, 5-8 4

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.01.2018

国際調査報告の発送日

30.01.2018

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上村 直子

4 B

4508

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y A	高見 昭良, 造血細胞移植における非HLA遺伝子多型の臨床的意義, 第22回日本組織適合性学会大会抄録集, 2013, p.49, 全体	1-3, 5-8 4
P, X	TAKAHASHI, H. et al., Associations of interactions between NLRP3 SNPs and HLA mismatch with acute and extensive chronic graft-versus-host diseases, Scientific Reports, 2017, 7: 13097, p.1-10, 全体、Published online: 12 October 2017	1-8
A	JANKOVIC, D. et al., The Nlrp3 inflammasome regulates acute graft-versus-host disease, The Journal of Experimental Medicine, 2013, Vol.210, No.10, p.1899-1910	1-8
A	HITOMI, Y. et al., Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2009, Vol.124, No.4, p.779-785.e6	1-8
A	JP 2011-24478 A (独立行政法人理化学研究所) 2011.02.10, (ファミリーなし)	1-8