

Analysis of mechanisms responsible for clonal expansion of PNH-type hematopoietic stem cells mediated by autoreactive T cells in patients with bone marrow failure

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-06-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Nakao, Shinji メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00051107

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.





研究成果報告書

平成17年度～平成18年度 科学研究費補助金
(基盤研究 (B))

骨髄不全における自己抗原特異的T細胞を介した PNHクローン増幅メカニズムの解明

(研究課題番号：17390275)

平成 19 年 5 月

研究代表者 中 尾 眞 二

(金沢大学大学院医学系研究科 教授)

金沢大学附属図書館



0800-04261-1

はじめに

再生不良性貧血は、造血幹細胞の持続的な減少のために、すべての血球の減少と骨髄の低形成を来す難治性の血液疾患である。造血幹細胞に対する自己免疫的な攻撃によって発症すると想像されているが、長年の研究にもかかわらず免疫反応の引き金となる自己抗原は不明である。われわれは、発作性夜間血色素尿症 (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH) 形質の血球が末梢血中で増加していることが、再生不良性貧血の免疫病態を反映していることを見いだした。PNH 型血球の増加は、何らかの抗原に特異的な T 細胞によって正常造血幹細胞が傷害されていることを意味している。このような PNH 型血球陽性患者では、抗原特異的に患者の造血幹細胞を傷害する T 細胞が存在するだけでなく、T 細胞の認識する抗原蛋白に特異的な自己抗体が存在する可能性がある。さらに、このような自己抗体を検出することによって、PNH 型血球の増加を招く再生不良性貧血の自己抗原を同定できる可能性が考えられた。このような仮説に基づき、巨核球への分化能を持つ白血病細胞株 UT-7 由来 cDNA ライブラリーを PNH 型血球陽性患者の血清でスクリーニングしたところ、diazepam-binding inhibitor-related protein-1 (DRS-1) に対する抗体が検出された。DRS-1 は、ヒト血液細胞では CD34 陽性の未熟な造血前駆細胞が選択的に発現しており、HLA-DR15 によって提示される DRS-1 ペプチドに特異的な CD4 陽性細胞は、抗 DRS-1 抗体陽性でかつ PNH 型血球陽性患者の末梢血中に高頻度に認められた。これらの所見から、DRS-1 は、PNH 型血球の増加を招く自己抗原候補の一つと考えられた。

そこで本研究では、DRS-1 に対する特異的な T 細胞が、骨髄不全患者における PNH 形質血球の出現に関与しているか否かを明らかにするため、抗 DRS-1 抗体を持つ PNH 型血球陽性の再生不良性貧血患者から、まず *PIG-A* 遺伝子に異常を持つ PNH 型 lymphoblastoid cell line (LCL) を樹立した。次に正常形質の LCL と PNH 型 LCL に DRS-1 遺伝子を導入し、同じ患者の末梢血から誘導した DRS-1 特異的 T 細胞が、それぞれの LCL に対して異なる細胞傷害性を示すか否かを検討する *in vitro* 実験を計画した。しかし、レトロウイルスベクターや電気穿孔法などの種々の方法を用いて LCL に DRS-1 cDNA の導入を試みたが、インヒビターが存在しているためか、恒常的に DRS-1 を発現させることはできなかった。このためこの研究は、効率の良い遺伝子導入ベクターが開発されるまで中断することとした。

一方、抗 DRS-1 抗体とは別に、UT-7 細胞より分泌されるエクソゾーム分画を患者血清でスクリーニングすることにより、細胞膜の裏打ち蛋白であるモエ

シンに対する抗体を検出した。組換えモエシンを用いた ELISA を作製し 67 人の再不貧患者血清を調べたところ、25 人(37%)において高力価の抗モエシン抗体が検出された。PNH 型血球陽性再不貧患者 43 人と PNH 型血球陰性再不貧患者 24 人のそれぞれの抗体保有率は 47%、21%であり、PNH 型血球陽性患者で有意に高頻度に抗モエシン抗体が検出された。モエシンは UT-7 以外に、K562 などの骨髓系白血病細胞株と健常者由来 CD34⁺細胞からエクソゾームとして細胞外に分泌されていた。これまでに我々が同定した抗 DRS-1 抗体、PNH 型血球と、今回同定したが抗モエシン抗体の少なくとも一つを認めた再不貧患者では 26 例中 22 例(85%)が免疫抑制療法に反応して改善したのに対し、いずれも認めない再不貧患者 2 例では免疫抑制療法が無効であった。これらの所見から、再不貧患者では造血細胞由来のモエシンに対する B 細胞の反応が高頻度に起こっており、抗モエシン抗体、抗 DRS-1 抗体、PNH 型血球の検出を組み合わせることによって、免疫病態が関与する再不貧を診断できる可能性が示唆された。

研究組織

研究代表者： 中尾 眞二 (金沢大学大学院医学系研究科 教授)
 研究分担者： 高見 昭良 (金沢大学医学部附属病院 助手)
 山崎 宏人 (金沢大学医学部附属病院 助手)
 近藤 恭夫 (金沢大学医学部附属病院 助手)
 谷内江 昭弘 (金沢大学大学院医学系研究科 教授)

交付決定額 (配分額)

	直接経費
平成 17 年度	8,500 千円
平成 18 年度	6,800 千円
総計	15,300 千円

研究発表

(1) 学会誌など

1. Ishiyama K, Takami A, Okumura H, Ozaki J, Shimadoi S, Yamanaka S, Nakao S: Complete and durable remission of refractory mantle cell lymphoma with repeated rituximab monotherapy. Int J Hematol 81(4):319-322, 2005.
2. Takami A, Okumura H, Maeda Y, Kumano Y, Asakura H, Oda M, Omura K, Nakao S : Primary Tracheal Lymphoma:Case Report and Literature Review. Int J Hematol 82(4):338-342, 2005

3. Teshima T, Matsuo K, Matsue K, Kawano F, Taniguchi S, Hara M, Hatanaka K, Tanimoto M, Harada M, Nakao S, Abe Y, Wake A, Eto T, Takemoto Y, Imamura M, Takahashi S, Ishida Y, Kanda Y, Kasai M, Takaue Y: Impact of human leucocyte antigen mismatch on graft-versus-host disease and graft failure after reduced intensity conditioning allogeneic haematopoietic stem cell transplantation from related donors. *Br J Haematol.* 130(4):575-587,2005
4. Takami A, Mochizuki K, Asakura H, Yamazaki H, Okumura H, Nakao S: High incidence of cytomegalovirus reactivation in adult recipients of an unrelated cord blood transplant. *Haematologica* 90(9):1290-1292, 2005
5. Nakao S, Feng X, Sugimori C: Immune pathophysiology of aplastic anemia. *Int J Hematol* 82(3):196-200, 2005
6. Nakao S, Deeg HJ, Ishikawa T, Marsh J, List A, Tomonaga M: Myelodysplastic syndrome. *Int J Hematol* , 82(5):412-416,2005
7. Takami A, Okumura H, Yamazaki H, Kami M, Song-Wong Kim, Asakura H, Endo T, Nishio M, Minauchi K, Kumano K, Sugimori N, Mori S, Takemoto Y, Shimadoi S, Ozaki J, Takaue Y, Nakao S: Prospective Trial of High-Dose Chemotherapy Followed by Infusions of Peripheral Blood Stem Cells and Dose-Escalated Donor Lymphocytes for Relapsed Leukemia after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Int J Hematol* 82(5):449-455, 2005
8. Takami A, Asakura H, Takamatsu H, Yamazaki H, Arahata M, Hayashi T, Shibayama M, Orito M, Yoshida T, Namiki M, Nakao S: Isolated hyperkalemia associated with cyclosporine administration in allogeneic stem cell transplantation for renal cell carcinoma. *Int J Hematol* 81:159-161,2005
9. Takami A, Hayashi T, Kita D, Nishimura R, Asakura H, Nakao S: Treatment of primary central nervous system lymphoma with induction of complement-dependent cytotoxicity by intraventricular administration of autologous-serum-supplemented rituximab. *Cancer Sci* 97(1):80-83, 2006
10. Takami A, Mochizuki K, Okumura H, Ito S, Suga Y, Yamazaki H, Yamazaki M, Kondo Y, Asakura H, Nakao S: Mycophenolate Mofetil Is Effective and Well Tolerated in the Treatment of Refractory Acute and Chronic Graft-versus-Host Disease. *Int J Hematol* 83(1):80-85, 2006
11. Sugimori C, Chuhjo T, Feng X, Yamazaki H, Takami A, Teramura M, Mizoguchi H, Omine M, Nakao S: Minor population of CD55-CD59-blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. *BLOOD* 107(4):1308-1314, 2006

12. Takami A, Shimadoi S, Sugimori C, Takemoto K, Shibayama M, Yoshida T, Murayama T, Nagai K, Miyamura K, Asakura H, Nakao S: Successful treatment of minimal residual disease-positive Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia with imatinib followed by reduced-intensity unrelated cord blood transplantation after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Int J Hematol* 84(2):170-173, 2006
13. Takami A, Takamatsu H, Yamazaki H, Ishiyama K, Okumura H, Ohata K, Konaka H, Asakura H, Namiki M, Nakao S: Reduced-intensity unrelated cord blood transplantation for treatment of metastatic renal cell carcinoma: first evidence of cord-blood-versus-solid-tumor effect. *Bone Marrow Transplant* 38(11):729-732, 2006
14. Takami A, Mochizuki S, Ito S, Sugimori C, Yamasita T, Asakura H, Okumura H, Nakao S: Safety and Efficacy of Foscarnet for Preemptive Therapy Against Cytomegalovirus Reactivation After Unrelated Cord Blood Transplantation. *Transplantation Proceedings*. 39:237-239, 2006
15. Nakao S, Sugimori C, Yamazaki H: Clinical significance of a small population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells in the management of bone marrow failure. *Int J Hematol* 84:118-122, 2006
16. Sugimori C, Yamazaki H, Feng X, Mochizuki K, Kondo Y, Takami A, Chuhjo T, Kimura A, Teramura M, Mizoguchi H, Omine M, Nakao S: Roles of DRB1 *1501 and DRB1*1502 in the pathogenesis of aplastic anemia. *Exp Hematol* 35:13-20, 2006
17. Takamatsu H, Feng X, Chuhjo T, Lu X, Sugimori C, Okawa K, Yamamoto M, Iseki S, Nakao S: Specific antibodies to moesin, a membrane-cytoskeleton linker protein, are frequently detected in patients with acquired aplastic anemia. *Blood* 109(6):2514-2520, 2007

(2) 学会発表

1. 中尾眞二: Diagnosis of Immune PathoPhysiology in Patients with Myelodysplastic Syndrome・第8回国際MDSシンポジウム Immune suppressive therapy・2005年5月・長崎
2. 中尾眞二: 骨髄不全と免疫病態・骨髄不全症候群 学術集会・2005年6月・仙台
3. 中尾眞二: 再生不良性貧血と類縁疾患の治療: 造血幹細胞移植を中心として・第7回血液病セミナー・2005年6月・札幌
4. 高見昭良、朝倉英策、折戸三智子、柴山正美 島樋 茂、杉盛千春、吉田知孝、

- 中尾眞二：月経関連周期性血小板減少症・第6回日本検査血液学会学術集会・2005年7月・長崎
5. 中尾眞二：骨髄不全における免疫病態の診断・第12回八幡平造血セミナー・2005年9月・盛岡
 6. 高松博幸、馮 興民、廬 緒章、杉盛千春、中条達也、大川克也、中尾眞二：再生不良性貧血における新規自己抗原の検出・第67回日本血液学会、第47回臨床血液学会合同総会・2005年9月・横浜
 7. 山崎宏人、杉盛千春、中条達也、中尾眞二：再生不良性貧血に対するシクロスポリン単独療法の有用性・第67回日本血液学会、第47回臨床血液学会合同総会・2005年9月・横浜
 8. 小谷岳春、村田了一、中条達也、奥村廣和、中尾眞二：難治性多発性骨髄腫に対するサリドマイド療法の長期観察成績・第67回日本血液学会、第47回臨床血液学会合同総会・2005年9月・横浜
 9. 杉盛千春、中条達也、馮 興民、廬 緒章、望月果奈子、高松博幸 近藤恭夫、山崎宏人、高見昭良、中尾眞二：微小PNH型血球は再生不良貧血の長期予後を決定する・第67回日本血液学会、第47回臨床血液学会合同総会・2005年9月横浜
 10. 近藤恭夫、望月果奈子 熊野義久、中尾眞二：CDK2、CDK4タンパク由来の2つのHLA-A24拘束性ペプチドを標的とした抗白血病免疫の誘導・第67回日本血液学会、第47回臨床血液学会合同総会・2005年9月・横浜
 11. 廬 緒章、杉盛千春、馮 興民、中尾眞二：再生不良貧血患者の微少PNH形質顆粒球におけるアポトーシス耐性：PNHクローン拡大メカニズムとの関係・第67回日本血液学会、第47回臨床血液学会合同総会・2005年9月・横浜
 12. 馮 興民、中条達也、廬 緒章、杉盛千春、高松博幸、高見昭良、山崎宏人、近藤恭夫、中尾眞二：慢性骨髄性白血病患者における抗DRS-1抗体の存在：抗白血病免疫の可能性・第67回日本血液学会、第47回臨床血液学会合同総会・2005年9月・横浜
 13. 望月果奈子、高見昭良 山下剛史、大畑欣也、高松博幸、杉盛千春、近藤恭夫、山崎宏人、奥村廣和、塩原信太郎 中尾眞二：超短期間型緩和的前処置同種造血細胞移植・第67回日本血液学会、第47回臨床血液学会合同総会・2005年9月・横浜
 14. 高見昭良、杉盛千春、熊野義久、高松博幸、石山 謙、山崎宏人、山下剛史、奥村廣和、並木幹夫、中尾眞二：転移性腎細胞癌(RCC)に対する骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植(NST)・第43回日本癌治療学会総会・2005年10月・名古屋
 15. 中尾眞二：免疫療法としての同種造血幹細胞移植・第14回日本組織的合性

- 学会教育講演・2005年10月・熊本
16. 中尾眞二：Autoantigens in Marrow Failure Syndromes・Bone Marrow Failure Scientific Symposium・2005年10月・アメリカ ワシントンDC
 17. 中尾眞二：骨髄不全の臨床・第34回内科学会生涯教育講演会・2005年11月・札幌
 18. 中尾眞二：成人再生不良性貧血と骨髄異形成症候群の治療・再生つばさの会札幌 医療講演会・相談会・2005年11月・札幌
 19. 杉盛千春、大畑欣也、尾崎 淳、望月果奈子 高松博幸、近藤恭夫、山崎宏人、高見昭良、奥村廣和、中尾眞二：寛解導入が不能であった急性骨髄性白血病高齢患者に対する臍帯血移植・第16回日本老年医学会北陸地方会・2005年11月・金沢
 20. 熊野義久、山下剛史、山崎雅英、中尾眞二：抗 GPIIbIIIa 抗体、抗 HLA 抗体陽性の難治性 ITP に対しリツキシマブが奏効した1症例・第23回日本輸血学会北陸支部総会・2005年11月・金沢
 21. Takamatsu H, Feng X, Lu X, Sugimori C, Chuhjo T, Takami A, Okawa K, Nakao S: Specific antibodies to moesin, a membrane-cytoskeleton linker protein, are frequently detected in patients with immune-mediated aplastic anemia・第47回米国血液学会・2005年12月・アメリカ・アトランタ
 22. Kondo Y, Feng X, Lu X, Mochizuki K, Mldrem JJ, Nakao S: TwoCyclin-Dependent Kinase Derived Peptides Are Potential Leukemia-Associated-Antigens Able To Erodicate Acute Myeloid Leukemia Cells After Allogeneic Stem Cell Transplantation・第47回米国血液学会・2005年12月・アメリカ・アトランタ
 23. 高松博幸、近藤恭夫、山崎宏人、高見昭良、奥村廣和、中尾眞二、大竹茂樹、安江静香、塩原信太郎、多々見良三、山上正彦、小泉晶一：TBIを含む骨髄破壊的前処置による骨髄移植後に正常女兒を得た急性リンパ性白血病の2女性例・第28回日本造血細胞移植学会・2006年2月・東京
 24. 高松博幸、清水麻友、山野里恵、安江静香、佐藤英洋、中尾眞二、塩原信太郎：ABO 不適合臍帯血移植後の血液学的回復の解析・第54回日本輸血学会総会・2006年・6月
 25. 杉盛千春、高見昭良、近藤恭夫、山崎宏人、奥村廣和、中尾眞二、村田了一・同種末梢血幹細胞移植4年後にドナー型造血不全を呈し同じドナーからの幹細胞再輸注により改善した再生不良性貧血の一例・第199回日本内科学会北陸地方会・2006年6月・富山
 26. Nakao S, Sugimori C, Feng X, Takamatsu H, Yamazaki H: Laboratory Markers for Immune Pathophysiology in Aplastic Anemia (AA): Towards

- Identification of Autoantigens in AA・International symposium for Bone Marrow Failure Syndromes・2006年7月・東京
27. 中尾眞二:汎血球減少症の臨床病態と検査血液学的特徴・第7回日本検査血液学会学術集会教育講演・2006年7月・東京
 28. 高見昭良、柴山正美、表 美香、杉森尚美、杉盛千春、吉田知孝、朝倉英策、中尾眞二:同種造血細胞移植後幼若血小板比率測定の意義・第7回日本検査血液学会学術集会・2006年7月・東京
 29. 山下剛史、山崎宏人、近藤恭夫、高見昭良、奥村廣和、中尾眞二、塩原信太郎、熊走一郎:臍帯血移植後の拒絶に対し再度の臍帯血移植にて救命し得た治療抵抗性非ホジキンリンパ腫・第24回日本血液学会北陸地方会・2006年7月・金沢
 30. 山崎宏人、高見昭良、近藤恭夫、奥村廣和、中尾眞二:移植後再発・生着不全に対する再移植:ドナーを変えることの有用性・第68回日本血液学会・第48回日本臨床血液学会合同総会・2006年10月・福岡
 31. 高見昭良、谷内江昭宏 奥村廣和、近藤恭夫、山崎宏人、杉盛千春、御館靖雄、山下剛史、清木ゆう、中尾眞二:緩和的前処置臍帯血移植 (CBT) 後血球貧食症候群 (HPS) における単球活性化・サイトカインプロファイルの検討・第68回日本血液学会・第48回日本臨床血液学会合同総会・2006年10月・福岡
 32. 熊野義久、奥村廣和、中尾眞二、村田了一、澤崎愛子、中条達也、上山克史:難治性APLに対する亜ヒ酸による寛解後療法後中に発症した原因不明の心タンポナーデ・第68回日本血液学会・第48回日本臨床血液学会合同総会・2006年10月・福岡
 33. 高松博幸、中条達也、馮 興民、廬 緒章、杉盛千春、大川克也、中尾眞二:再生不良性貧血で高頻度に検出される抗モエシン抗体の機能解析・第68回日本血液学会・第48回日本臨床血液学会合同総会・2006年10月・福岡
 34. 中尾眞二:骨髓不全の病態診断・第86回近畿血液学会地方会シンポジウム・2006年11月・和歌山
 35. Mochizuki K, Sugimori C, Feng X, Lu X, Gudrun H Reed, Carl T. Wittwer, Nakao S: Small populations of PNH-type cells in aplastic anemia patients are derived from PIG-A mutant stem cell clones without proliferative advantage. ・第48回米国血液学会・2006年12月・アメリカ・オーランド
 36. Takamatsu H, Feng X, Lu X, Chuhjo T, Okawa K, Nakao S: Stimulation of TNF- α Production from Monocytes by Anti-Moesin Antibodies in the Serum of Patients with Aplastic Anemia: A Novel Mechanism of Myelosuppression by Autoantibodies. 第48回米国血液学会・2006年12月・アメリカ・オーランド

37. 山崎宏人、高見昭良、近藤恭夫、奥村廣和、中尾眞二:移植後再発・生着不全に対する臍帯血ミニ移植の有用性・第 29 回日本造血細胞移植学会総会・2007 年 2 月・福岡
38. 清木ゆう、近藤恭夫、大畑欣也、廬 緒章、石山 謙、杉盛千春、山崎宏人、高見昭良、奥村廣和、中尾眞二:非寛解期 CB-RIST 後に未熟(CD16+CD56-) NK 細胞の増加を認め、寛解を維持している AMLMO 例・第 29 回日本造血細胞移植学会総会・2007 年 2 月・福岡
39. 高見昭良、柴山正美、山下剛史、杉森尚美、奥村廣和、吉田知孝、朝倉英策、中尾眞二:同種造血幹細胞移植後幼若血小板比率測定の意義・第 29 回日本造血細胞移植学会総会・2007 年 2 月・福岡
40. 杉盛千春、望月果奈子 村田了一、清木ゆう、熊野義久、高松博幸、近藤恭夫、山崎宏人、杉森尚美、高見昭良、奥村廣和、中尾眞二:移植後 4 年目にドナー由来の PNH 型血球陽性再生不良性貧血を発症した最重症再生不良性貧血の 1 例・第 29 回日本造血細胞移植学会総会・2007 年 2 月・福岡
41. 高松博幸、近藤恭夫、山崎宏人、高見昭良、山崎雅英、奥村廣和、中尾眞二: CD20 陽性 T-CLL に対するリツキシマブの効果. 第 5 回日本臨床腫瘍学会. 2007 年 3 月・札幌
42. 杉盛千春、山下剛史、高見昭良、杉森尚美、山崎宏人、奥村廣和、大畑欣也、中条達也、中尾眞二:高齢血液疾患患者に対する臍帯血移植の当科の成績・第 5 回日本臨床腫瘍学会・2007 年 3 月・札幌
43. 中尾眞二:再生不良性貧血の病態と治療について・若手臨床血液学セミナー・2007 年 3 月・幕張

(3) 出版物

1. 高見昭良、中尾眞二.マイナー組織適合抗原を標的とした細胞療法.「分子標的療法の基礎と臨床」(今村雅寛、金倉讓、井上勝一 編)篠原出版新社. 東京:p205-218, 2005 年
2. 中尾眞二. 再生不良性貧血の免疫病態.「血液疾患」(坂田洋一、小澤敬也 編)医歯薬出版.東京:p210-212, 2005 年
3. 中尾眞二. 再生不良性貧血の自己抗原 DRS-1.「血液」(高久史麿、溝口秀昭、坂田洋一、金倉讓、小島勢二 編)中外医学社.東京:p73-79, 2005 年
4. 中条 達也、中尾 眞二.「内科外来診療実践ガイド個別診療を重視したこれからの診療のすべて-縮刷版-」(Medical Practice編集委員会 編). 文光堂.東京,p233-236, 2006年