

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 10 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860363

研究課題名(和文)発作性夜間血色素尿症(PNH)形質を利用したヒト造血幹細胞動態の解明

研究課題名(英文)Analysis of human haematopoietic stem cell movement with PNH-type cell.

研究代表者

片桐 孝和(KATAGIRI, Takamasa)

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号：60621159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄不全症例の約60%で検出されるPNH形質血球をマーカーとして、造血幹細胞の分化造血制御について考察した。患者の骨髄中に存在している様々な造血前駆細胞ごとにPNH形質血球の割合を調べたところ、CMPにおいては10%未満であったのに対して、以降の造血前駆細胞においては末梢血中の骨髄球系細胞とほぼ同等の割合でPNH形質血球が認められた。PNH形質血球の選択的増殖における付加的遺伝子変異を確認するための遺伝子解析では、特定のサイトカインの発現が亢進していることを明らかにした。以上より、ヒト造血の系列は個々の造血幹細胞または骨髄内のサイトカインを含む複合的な因子により規定されると結論付けた。

研究成果の概要(英文)：The regulation of HSC (Haematopoietic stem cell) differentiation was assessed by FCM (Flow cytometry) with a marker, PNH (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria)-type cell, which was detected in 60 percentage of bone marrow failure patients. As investigated the percentage of PNH-type cell in various lineages of HSPC (haematopoietic stem progenitor cell), PNH-type cells were detected only 10 percentage in CMP (common myeloid progenitors) fraction, however, the same percentage was detected in GMP and MEP as myeloid cells in peripheral blood. Additional genetic analysis to check driver mutation genes effect on the selective growth of PNH-type cell revealed the expression of a specific cytokine was enhanced. From the above, I concluded the differentiation of human HSC was regulated by some complicated factors including HSCs or some cytokines in bone marrow.

研究分野：血液内科学

キーワード：骨髄不全 ヒト造血幹細胞 PNH形質血球

### 1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞における PIG-A 変異の結果生じる GPI-AP 欠失血球は、発作性夜間血色素尿症 (PNH) 患者だけでなく、AA の約 50%、低リスク骨髄異形成症候群 (MDS) 患者の約 20% に検出される。我々は、570 例以上の骨髄不全患者についてこの GPI-AP 欠失血球 (PNH 型血球) の有無を検討した結果、250 例 (44%) で陽性であり、半年以上の期間を空けて再検した際にも同じ血球系統から構成される PNH 型血球が検出された。このため、PNH 型血球を産生している PIG-A 変異幹細胞自身は自己複製能をもち、正常の造血幹細胞と類似の分化能を維持していると考えられた。この PNH 形質を示す血球系統のパターンは個々の患者によって一定であり、そのパターンは、PIG-A 変異を起こした造血幹細胞が存在する造血の場によって決定されることが、*in silico* のモデルによって示された (Katagiri T. et al. Stem Cells 2013)。これは新しい造血モデルであるが、「造血幹細胞の分化能が、その幹細胞が位置する骨髄環境によって決定されている」ことを証明するためには、ヒト体内では限られた系統にしか見られなかった PNH 型血球が、別の生体に移植された際には異なる分化能を示すことを証明する必要がある。そこで、本研究では、免疫不全マウスに、患者から採取した PNH 型 CD34 陽性細胞を移植することにより、ヒト体内とは異なる血球系統への分化がみられるか否かを検討する。

### 2. 研究の目的

AA をはじめとする良性骨髄不全症例を対象として PNH 型血球の有無を検出し、PNH 型血球の系統に偏りのある例を同定する。患者骨髄造血幹細胞を採取し、CD34 陽性細胞分画をソーティングする。これらの細胞を SIRPA 変異型遺伝子導入免疫不全マウスに骨髄移植し、末梢に現れる PNH 型血球の形質を検討する。

本研究は、これまでのヒト検体の解析および *in silico* の解析から想像される「commitment sphere」(造血の維持と分化を決定する骨髄微少環境) の存在を、免疫不全マウスへの骨髄移植実験により実際に証明しようとするものである。これにより、ヒトの造血が PIG-A 変異幹細胞が骨髄不全という病的状態でのみ出現するという訳ではなく、健常者においても活性化され得る「正常幹細胞の一つ」であることが示唆される可能性がある。

### 3. 研究の方法

(1) 血球系統が偏っている PNH 型血球陽性例のうち、PNH 型血球の割合が多い例を同定する。具体的には、AA 症例をはじめとする骨髄不全症例を対象として、フローサイトメトリーにより PNH 型血球を検出した。

(2) (1) で検出される PNH 型血球陽性症例の骨髄細胞において、様々な造血前駆細胞ごと

に、PNH 型血球の割合をフローサイトメトリーにより検出した。

(3) PNH 型血球陽性症例の骨髄を免疫不全マウスに移植し、造血の動態を解析した。

(4) (2) で、造血前駆細胞ごとに PNH 型血球の割合に乖離が認められた場合、各分画をソーティングし、遺伝子発現解析により造血制御関連遺伝子を同定する。

### 4. 研究成果

骨髄不全症例の約 50% では、造血幹細胞において PIG-A 遺伝子変異の結果生じる GPI-AP 欠失血球 (PNH 型血球: Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria type cell) が検出される。

今回、1,132 例の骨髄不全症例を対象に PNH 型血球の有無について解析を行った。従来の解析結果では、PNH 型血球陽性例の約 80% が全ての血球系統で陽性、顆粒球と赤血球で陽性、+単球で陽性であったが、今年度の解析でも同様の傾向が得られた。つまり、検討症例のうち、99 例 (19.9%) では PNH 型血球陽性の血球系統パターンに明らかな偏りが認められた。

その中で、1 系統でも PNH 型血球が陽性となる例のうち、約 20% が PNH 型血球陽性パターンに何らかの偏りがあることを明らかにした。

また、PNH 型血球陽性例の骨髄細胞を用いて、骨髄中の造血前駆細胞ごとに PNH 型血球の分布について検討した。その結果、骨髄中の CMP、MEP、GMP ごとに PNH 血球の分布は異なっており、CMP においては 10% 未満であったのに対し、造血分化の過程で CMP から末梢方向へ一段階進んだ MEP と GMP では、末梢血中の骨髄系で認められる PNH 型血球の割合と一致していた。この、骨髄系前駆細胞で最も未分化な CMP という段階において、PNH 型血球の割合が低いという結果は大変驚くべき結果であり、CMP 以降の分化が進む過程で選択的に PNH 型血球が増殖していることが予測された。

このように、様々な造血前駆細胞ごとに PNH 形質血球の分布を解析することで、造血の進行に伴い PNH 形質血球の割合が増加することを明らかにし、このモデルを利用してヒト造血の動態を解明することを目的として、免疫不全マウスへの移植実験を行った。その結果、骨髄の生着効率が低く、患者で確認された血球系統と移植後の多様性について結論付けるに至らず、骨髄環境について、特定の血球集団の空間的集簇性を確認するために骨髄生検像を解析したが、骨髄内の特定空間へ特定血球の集簇は認められなかった。一方、PNH 形質血球の選択的増殖における付加的遺伝子変異を確認するための遺伝子解析を実施した結果、特定のサイトカインの発現が亢進していることを明らかにした。このサイトカインは、造血が進行するに従い発現が低下しており、造血を制御している分子の 1 つである可能性が考えられた。このサイトカイン受容体の発現について、造血分化経路を踏まえ

て各分画で確認したところ、非常に示唆に富むデータを得ることができた。従って、ヒト造血において、その系列決定は造血幹細胞が置かれた環境に依存する、という当初の予想とは異なる結果となったが、ヒト造血の系列は、個々の造血幹細胞または骨髄内のサイトカインを含む複合的な因子により規定されるという発展的な予測につながった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Zaimoku Yoshitaka, Takamatsu Hiroyuki, Hosomichi Kazuyoshi, Ozawa Tatsuhiko, Nakagawa Tatsuhiko, Imi Tatsuya, Maruyama Hiroyuki, Katagiri Takamasa, Kishi Hiroyuki, Tajima Atsushi, Muraguchi Atsushi, Kashiwase Koichi, Nakao Shinji. Identification of an HLA class I allele closely involved in the auto-antigen presentation in acquired aplastic anemia. *Blood*. 査読有り、2017 Feb 23. pii: blood-2016-11-752378. doi: 10.1182/blood-2016-11-752378.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28232583>.

Maruyama Hiroyuki†, Katagiri Takamasa† (†M.H. and K.T. were equally contributed to this work.), Kashiwase Koichi, Shiina Takashu, Sato-Otsubo Aiko, Zaimoku Yoshitaka, Maruyama Kana, Hosokawa Kohei, Ishiyama Ken, Yamazaki Hirohito, Inoko Hideki, Ogawa Seishi, Nakao Shinji. Clinical significance and origin of leukocytes that lack HLA-A allele expression in patients with acquired aplastic anemia. *Exp Hematol*. 査読有り、2016 Oct;44(10):931-939.e3. doi: 10.1016/j.exphem.2016.05.013.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27250585>

Dao An Tin, Yamazaki Hirohito, Takamatsu Hiroyuki, Sugimori Chiharu, Katagiri Takamasa, Maruyama Hiroyuki, Zaimoku Yoshitaka, Maruyama Kana, Ly Trung Q, Espinoza Luis, Nakao Shinji. Cyclosporine restores hematopoietic function by compensating for decreased Tregs in patients with pure red cell aplasia and acquired aplastic anemia. *Ann Hematol*. 査読有り、2016 Apr;95(5):771-81. doi: 10.1007/s00277-016-2629-7.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26968551>.

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria induced by the occurrence of BCR-ABL

in a PIGA mutant hematopoietic progenitor cell. Ryo Tominaga†, Takamasa Katagiri† (†R.T. and T.K. were equally contributed to this work.), Keisuke Kataoka, Rachel K.C. Wee, Akio Maeda, Hiroshi Gomyo, Ishikazu Mizuno, Tohru Murayama, Seishi Ogawa and Shinji Nakao. *Leukemia*. 査読有り 2016 May;30(5):1208-10. doi: 10.1038/leu.2015.268.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26437783>

Inaguma Youko, Akatsuka Yoshiki, Hosokawa Kohei, Maruyama Hiroyuki, Okamoto Akinao, Katagiri Takamasa, Shiraishi Keiko, Murayama Yuko, Tsuzuki-Iba Sachiko, Mizutani Yuuki, Nishii Chikako, Yamamoto Naoki, Demachi-Okamura Ayako, Kuzushima Kiyotaka, Ogawa Seishi, Emi Nobuhiko, Nakao Shinji. Induction of HLA-B\*40:02-restricted T cells possessing cytotoxic and suppressive functions against haematopoietic progenitor cells from a patient with severe aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 査読有り、2016 Jan;172(1):131-4. doi: 10.1111/bjh.13464.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25929998>.

Yoshizato Tetsuichi, Dumitriu Bogdan, Hosokawa Kohei, Makishima Hideki, Yoshida Kenichi, Townsley Danielle, Sato-Otsubo Aiko, Sato Yusuke, Liu Delong, Suzuki Hiromichi, Wu Colin, Shiraishi Yuichi, Clemente Michael, Kataoka Keisuke, Shiozawa Yusuke, Okuno Yusuke, Chiba Kenichi, Tanaka Hiroko, Nagata Yasunobu, Katagiri Takamasa, Kon Ayana, Sanada Masahi, Scheinberg Phillip, Miyano Satoru, Maciejewski Jaroslaw, Nakao Shinji, Young Neal, Ogawa Seishi. Somatic mutations and clonal hematopoiesis in aplastic anemia. *N Engl J Med*, 査読有り、2015 Jul 2;373(1):35-47. doi: 10.1056/NEJMoa1414799.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26132940>.

Hosokawa Kohei, Sugimori Naomi, Katagiri Takamasa, Sasaki Yumi, Saito Chizuru, Seiki Yu, Mochizuki Kanako, Yamazaki Hirohito, Takami Akiyoshi, Nakao Shinji. Increased glycosylphosphatidylinositol-anchored protein-deficient granulocytes define a benign subset of bone marrow failures in patients with trisomy 8.

査読有り、Eur J Haematol. 2015 Sep;95(3):230-8.doi: 10.1111/ejh.12484.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25404431>.

[学会発表](計 24 件)

Noriharu Nakagawa, Takamasa Katagiri, et al., Relatively Low Sensitivity of CD109(-) Hematopoietic Stem/Progenitor Cells (HSPCs) to TGF- $\beta$ : A Possible Mechanism Responsible for the Preferential Commitment of Piga Mutant HSPCs in Immune-Mediated Bone Marrow Failure. 57th American Society of Hematology Annual Meeting, 2015.12.3-2015.12.6, San Diego Convention Center (San Diego, USA).

Tatsuya Imi, Takamasa Katagiri, et al., HLA Class I Allele-Lacking Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Support Long-Term Clonal Hematopoiesis without Oncogenic Driver Mutations in Acquired Aplastic Anemia. 57th American Society of Hematology Annual Meeting, 2015.12.3-2015.12.6, San Diego Convention Center (San Diego, USA).

Luis Espinoza Takamasa Katagiri, et al., Generation of Ips Cell-Derived Hematopoietic Progenitor Cells from Patients with Acquired Aplastic Anemia Harboring Copy Number Neutral Loss of Heterozygosity of the Short Arm of Chromosome 6. 57th American Society of Hematology Annual Meeting, 2015.12.3-2015.12.6, Orange County Convention Center (Orland, USA).

Noriharu Nakagawa, Takamasa Katagiri, et al., Evidence for a Common Immune Pathophysiology in Acquired Aplastic Anemia and Ulcerative Colitis. 57th American Society of Hematology Annual Meeting, 2015.12.3-2015.12.6, Orange County Convention Center (Orland, USA).

Tatsuya Imi, Takamasa Katagiri, et al., Evidence That T Cells Specific for Non-Hematopoietic Cells Trigger the Development of Acquired Aplastic Anemia. 57th American Society of Hematology Annual Meeting, 2015.12.3-2015.12.6, Orange County Convention Center (Orland, USA).

Takamasa Katagiri, et al., A Cure for Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Using Molecular Targeted Therapy Specific to a Driver Mutation. 57th American Society of Hematology Annual

Meeting, 2015.12.3-2015.12.6, Orange County Convention Center (Orland, USA).

Yoshitaka Zaimoku, Takamasa Katagiri, et al., Evidence That HLA-B\*40:02 and HLA-B\*31:01 Are Strongly Involved in the Presentation of Autoantigens to CTLs Responsible for the Development of Acquired Aplastic Anemia. 56th American Society of Hematology Annual Meeting, 2014.12.6-2014.12.9, Moscone Center (San Francisco, USA).

Kana Maruyama, Takamasa Katagiri, et al., Donor-Type Aplastic Anemia after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Common Cause of Late Graft Failure in Patients with Complete Donor Chimerism. 56th American Society of Hematology Annual Meeting, 2014.12.6-2014.12.9, Moscone Center (San Francisco, USA).

Hiroyuki Maruyama, Takamasa Katagiri, et al., Resistance of Hematopoietic Stem Cells Lacking the KIR Ligand to Autologous NK Cell Attacks in Patients with Acquired Aplastic Anemia. 56th American Society of Hematology Annual Meeting, 2014.12.6-2014.12.9, Moscone Center (San Francisco, USA).

An T. T. Dao, Takamasa Katagiri, et al., Profound Decrease in FoxP3+Helios+CD4+ T Cells in a Subset of Patients with Acquired Aplastic Anemia and Pure Red Cell Aplasia: A Common Mechanism Underlying a Dependency on Cyclosporine. 56th American Society of Hematology Annual Meeting, 2014.12.6-2014.12.9, Moscone Center (San Francisco, USA).

Tetsuichi Yoshizato, Takamasa Katagiri, et al., Chronological Analysis of Clonal Evolution in Acquired Aplastic Anemia. 56th American Society of Hematology Annual Meeting, 2014.12.6-2014.12.9, Moscone Center (San Francisco, USA).

Takamasa Katagiri, et al., Hematopoiesis in Patients with Acquired Aplastic Anemia Is Supported By a Limited Number of CXCR4(-) Cells at the Common Myeloid Progenitor Level. 56th American Society of Hematology Annual Meeting, 2014.12.6-2014.12.9, Moscone Center (San Francisco, USA).

Yoshitaka Zaimoku, Takamasa Katagiri, et al., A simple method to detect copy number-neutral 6p-loh in patients with acquired aplastic anemia using duplex quantitative PCR. 19th European Hematology Association,

- 2014.6.12-2014.6.15, Milano Congressi (Milan, Italy).  
井美 達也、片桐 孝和、他、HLA-class I-lacking HSPCs support long-term clonal hematopoiesis without driver mutations in AA. 第 78 回日本血液学会 学術集会、2016.10.13-2016.10.15, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).  
中川 紀温、片桐 孝和、他、A GPI-AP deficiency does not confer resistance to CTL or NK cell killing on HSPCs in aplastic anemia. 第 78 回日本血液学会 学術集会、2016.10.13-2016.10.15, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).  
材木 義隆、片桐 孝和、他、6pLOH による HLA 欠失が再生不良性貧血の非血縁者 間同種造血幹細胞移植に及ぼす影響. 第 38 回日本造血細胞移植学会 総会、2016.3.3-2016.3.5. 名古屋国際会 議場 (愛知県名古屋市).  
材木 義隆、片桐 孝和、他、Whole blood transcriptional profiling for diagnosing autoimmune hematopoietic failure. 第 77 回日本血液学会学術集 会、2015.10.16-2015.10.18. 石川県立 音楽堂 (石川県金沢市).  
丸山 裕之、片桐 孝和、他、HLA-A allele-lacking leukocytes as a therapeutic response marker in patients with aplastic anemia. 第 77 回日本血液学会学術集 会、2015.10.16-2015.10.18. 石川県立 音楽堂 (石川県金沢市).  
片桐 孝和、他、Evidence that hematopoietic progenitor cells support long term hematopoiesis in humans. 第 77 回日本血液学会学術集 会、2015.10.16-2015.10.18. 石川県立 音楽堂 (石川県金沢市).  
材木 義隆、片桐 孝和、他、デジタル PCR を用いた 6pLOH による HLA 欠失血球 の検出、第 7 回血液疾患免疫療法研究会 学術集会、2015.9.26. 東京大学 (東京都 文京区).
- 21 富永 亮、片桐 孝和、他、Complete resolution of PNH induced by nilotinib in a patient complicated by CML. 第 76 回日本血液学会学術集 会、2014.10.31-2014.11.2. 大阪国際会 議場 (大阪府大阪市).
- 22 丸山 裕之、片桐 孝和、他、Evidence for a common immune pathophysiology in acquired aplastic anemia and ulcerative colitis. 第 76 回日本血液 学会学術集会、2014.10.31-2014.11.2. 大阪国際会議場 (大阪府大阪市).
- 23 材木 義隆、片桐 孝和、他、A simple method to detect 6pLOH in patients with aplastic anemia using duplex quantitative PCR. 第 76 回日本血液学

- 会学術集会、2014.10.31-2014.11.2. 大 阪国際会議場 (大阪府大阪市).
- 24 吉里 哲一、片桐 孝和、他、Complete chronological history of clonal evolution in sMDS from acquired aplastic anemia. 第 76 回日本血液学会 学術集会、2014.10.31-2014.11.2. 大阪 国際会議場 (大阪府大阪市).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

片桐 孝和 (KATAGIRI, Takamasa)  
金沢大学・保健学系・助教  
研究者番号：60621159

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

なし