

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18591050
 研究課題名（和文） 再生不良性貧血における免疫抑制療法の効果予測法の確立
 研究課題名（英文） Establishment of a method to predict the effects of immunosuppressive therapy for aplastic anemia
 研究代表者
 山崎 宏人（YAMAZAKI HIROHITO）
 金沢大学・附属病院・助教
 研究者番号：50361994

研究成果の概要：再生不良性貧血患者の治療前血液を用いて、PNH 型血球の増加、抗 DRS-1 抗体および抗モエシン抗体の有無を検索し、これらのマーカーと免疫抑制療法に対する反応性との関係を明らかにするための多施設共同臨床試験を実施した。PNH 型血球陽性例と陰性例で、治療開始から 6 ヶ月後の治療効果を比較したところ、両群に有意な差は認められなかったが、自己抗体陽性例では陰性例に比べて奏効率が高い傾向が得られた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	1,400,000	0	1,400,000
平成 19 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成 20 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	600,000	4,000,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：再生不良性貧血，免疫抑制療法，PNH 型血球，抗 DRS-1 抗体，抗モエシン抗体

1. 研究開始当初の背景

再生不良性貧血に対しては、欧米を中心としてこれまでに多くの治療研究が行われてきた。その結果として免疫抑制療法の効果が確立されたが、欧米では再生不良性貧血という曖昧な症候群を層別化して病態に応じた治療を行おうという動きはほとんど見られない。これは再生不良性貧血が欧米諸国では日本ほど多くないことが一つの要因と考えられる。

われわれは、発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）形質の血球が増加していることが、免疫抑制療法に対する反応性の重要な予測因子であることを後方視的な観察によって初

めて明らかにした（Sugimori C, Yamazaki H, Nakao S, et al, Blood, 2006）。また、再生不良性貧血患者の約 3 割では、diazepam-binding inhibitor-related protein (DRS-1) に対する抗体が存在することを見出した（Feng X, Yamazaki H, Nakao S, et al, Blood, 2004）。さらに、再生不良性貧血におけるもう一つの自己抗原候補としてモエシンを同定し、このモエシンに対する抗体が再生不良性貧血患者の約 3 割に検出されることを明らかにした（Takamatsu H, Nakao S, et al, Blood, 2007）。

PNH 型血球の増加は単独でも、免疫抑制療法に対する高反応性の予測因子であるが、そ

の意義は共通プロトコルを用いた前方視的な観察によって確認する必要がある。また、PNH 型血球の増加がない例であっても約 5 割が免疫抑制療法に反応して改善することから、PNH 型血球の増加のみが免疫病態の存在を反映しているわけではない。PNH 型血球に加えて、抗 DRS-1 抗体と抗モエシン抗体を検索することにより、免疫抑制療法に対する反応性をより正確に予測できる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

再生不良性貧血は原因不明の症候群であるが、実際には約 7 割が ATG とシクロスポリンの併用療法によって改善することから、多くの例の発症に免疫病態が関与していると考えられている。しかし、このような免疫病態を反映する良いマーカーが確立されていないため、再生不良性貧血と診断された骨髄移植適応のない患者に対しては無条件に免疫抑制療法が行われているのが実情である。そこで、再生不良性貧血患者の治療前の血液について、PNH 型血球の増加、抗 DRS-1 抗体および抗モエシン抗体の有無を検索し、免疫抑制療法の共通プロトコルによる治療反応性とこれらのマーカーとの関係を前方視的に観察することにより、免疫抑制療法に対する反応性の予測方法を確立することをめざした。

3. 研究の方法

(1) 臨床試験の実施と検体収集

平成 18 年 4 月より平成 21 年 3 月にかけて、「成人再生不良性貧血における免疫病態マーカーの意義を明らかにするための多施設共同前方視的臨床試験」(試験責任者：中尾眞二)を実施した。本臨床試験には、IRB の承認を得た 50 施設が参加した。

本試験への参加に文書で同意が得られた新規症例より血液検体を収集し、微少 PNH 型血球の検出、抗 DRS-1 抗体および抗モエシン抗体の検索を実施した。

(2) two-color フローサイトメトリ法による微少 PNH 型血球の検出

PE でラベルした抗 CD11b モノクローナル抗体 (赤血球に対しては抗 glycophorin-A (GP-A) 抗体を用いる) と、FITC でラベルした CD55、CD59 の各モノクローナル抗体を同時に用いた two-color フローサイトメトリ法により、CD11b⁺CD55⁺CD59⁻ 分画の顆粒球 (GP-A⁺CD55⁻CD59⁻ 分画の赤血球) を同定し、それらを PNH 型顆粒球 (PNH 型赤血球) と定義した。末梢血顆粒球 (赤血球) ゲート内の 10 万個の細胞を解析し、3 個 (5 個) 以上の PNH 型顆粒球 (PNH 型赤血球) が検出される場合を

PNH 型血球陽性と判定した。

(3) ELISA による抗 DRS-1 抗体および抗モエシン抗体の検索

DRS-1 またはモエシン 250 ~ 500 ng を炭酸緩衝液で希釈し、96 穴のイムノプレートに分注し、4 で一晩静置した。0.05% Tween 加リン酸緩衝液 (Phosphate-buffered saline, PBS) (PBST) で 3 回洗浄後、10% 子牛胎児血清加 PBST (PBST-FCS) を加え、4 で一晩ブロッキングしたものを ELISA 用プレートとした。200 倍に希釈した血清を 50 μ l 加え、室温で 60 分間インキュベートした。PBST で 5 回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG (1:5000) を加え、室温で 60 分間インキュベートし、PBST で 7 回洗浄後、3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) substrate による発色操作を行い、OD450 の吸光度を測定した。正常ヒト血清の吸光度の平均値 + 2SD を DRS-1 またはモエシンに対するカットオフ値とした。なお、ELISA による判定が困難な例に関しては、これらの自己抗原に対して患者血清を用いたウエスタンブロットを行った。

(4) 免疫抑制療法に対する効果と各マーカーとの関連性の検討

治療開始後 6 カ月が経過した時点で、本臨床試験登録症例の治療効果判定を行った。治療効果判定は Camitta が提唱した判定基準を用いた。各マーカーの有無に基づき、PR 以上の奏効率を算出し、免疫抑制療法に対する反応性の予測がそれぞれのマーカーによって可能であるか否かを検討した。治療開始時にマーカーが検出された例に対しては、治療効果判定時に再度マーカーの有無を検索し、治療効果とマーカーの推移との関連性についても検討した。

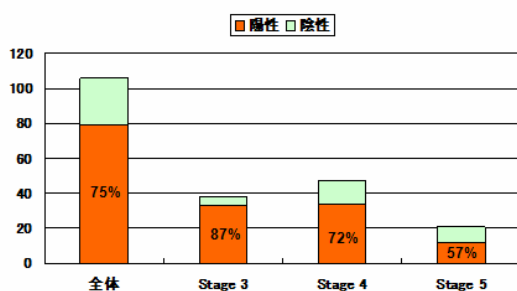
4. 研究成果

平成 18 年 4 月より平成 21 年 3 月にかけて、再生不良性貧血患者の治療前血液を用いて、PNH 型血球の増加、抗 DRS-1 抗体および抗モエシン抗体の有無を検索し、これらのマーカーと免疫抑制療法に対する反応性との関係を明らかにするための多施設共同臨床試験を実施した。

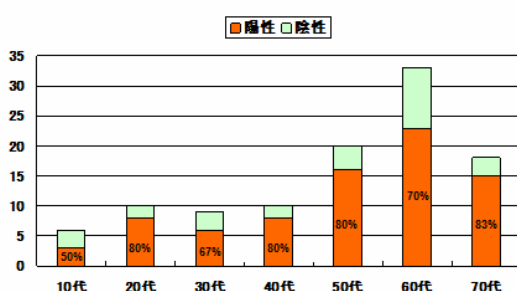
本臨床試験には 50 施設から 110 例の登録があった。男女比は 58 : 62、年齢の中央値は 58 才 (16 才 ~ 75 才) であった。

PNH 型血球陽性率は登録例全体で 75% であった。重症度別では stage 3 の 87%、stage 4 の 72%、stage 5 の 57% が PNH 型血球陽性であった。男女別では特に差は認めなかったものの、年齢別では 10 代の陽性率がやや低い傾向にあった。

重症度別のPNH型血球陽性率 (n=108)



年齢別のPNH型血球陽性率 (n=108)



登録例のうち、脱落例および症例調査票未提出例を除いた 99 例について、PNH 型血球検出の有無と免疫抑制療法に対する反応との関係について検討した。結果を表 1 に示す。

表 1 . PNH 型血球検出の有無と免疫抑制療法に対する奏効率

	PNH 型血球 (+) (N=73)	PNH 型血球 (-) (N=26)
CR	5 (6.8%)	2 (7.7%)
PR	42 (57.5%)	15 (57.7%)
CR+PR	49 (67.1%)	17 (65.4%)
NR	20 (27.4%)	7 (26.9%)
再発	3 (4.1%)	1 (3.8%)
早期死亡	1 (1.4%)	1 (3.8%)

PNH 型血球陽性例と陰性例で、治療開始から 6 ヶ月後の治療効果を比較したところ、両群に有意な差は認められなかった。

次に、登録例のうち、解析し得た 81 例について自己抗体の有無を検索したところ、抗 DRS-1 抗体は 26%(21/81)、抗モエシン抗体は 26%(21/81) が陽性であった。なお、その半数は両者とも陽性であった。

自己抗体を解析し得た例のうち、脱落例および症例調査票未提出例を除いた 76 例について、各種自己抗体検出の有無と免疫抑制療

法に対する反応性との関係について検討した。結果を表 2 に示す。

表 2 . 自己抗体検出の有無と免疫抑制療法に対する奏効率

	抗 DRS-1 抗体 (N=76)		抗モエシン抗体 (N=73)	
	(+)	(-)	(+)	(-)
CR+PR	13/19 (68%)	31/57 (54%)	16/19 (84%)	28/54 (52%)

自己抗体が検出される例の方が検出されない例に比べて、奏効率が高い傾向が認められた。

PNH 型血球陽性例と陰性例で、治療開始から 6 ヶ月後の治療効果を比較したところ、従来のレトロスペクティブな解析結果とは異なり、両群に有意な差は認められなかった。3 ヶ月の時点で反応がない例に対しては、metenolone が追加されるプロトコールのため、その影響の有無に関する検討が必要である。更に、今後、3 ヶ月の時点での反応性と 2~5 年時点での failure free survival に両群間で差がないかを検討する予定である。

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 11 件)

1. Yamashita T, Yamazaki H, Nakao S. (8 人・番目) 査読有 Cord blood transplantation using minimum conditioning regimens for patients with hematologic malignancies complicated by severe infections. Int J Hematol. 2009;89:238-42.
2. Sugimori N, Yamazaki H, Nakao S. (9 人・番目) 査読有 Aberrant increase in the immature platelet fraction in patients with myelodysplastic syndrome: a marker of karyotypic abnormalities associated with poor prognosis. Eur J Haematol 2009; 82:54-60.
3. Takamatsu H, Yamazaki H, Nakao S. (6 人・番目) 査読有 A marked increase in myeloblasts in the peripheral blood of a patient with Burkitt lymphoma following G-CSF administration. Acta Haematologica 2008;120:174-6.
4. Mochizuki K, Yamazaki H, Nakao S. (10 人・番目) 査読有 Expansion of donor-derived hematopoietic stem cells with PIGA mutation associated with late graft failure after allogeneic stem cell

- transplantation. Blood 2008;112:2160-21.
5. Lu X, Yamazaki H, Nakao S. (8人・⑤番目) 査読有 CD16+ CD56- NK cells in the peripheral blood of cord blood transplant recipients: a unique subset of NK cells possibly associated with graft-versus-leukemia effect. Eur J Haematol 2008;81:18-25.
6. Chuhjo T, Yamazaki H, Nakao S. (4人・②番目) 査読有 Danazol therapy for aplastic anemia refractory to immunosuppressive therapy. Am J Hematol 2008;83:387-389.
7. Yamazaki H, Nakao S. (4人・①番目) 査読有 Cyclosporine therapy for acquired aplastic anemia: predictive factors for the response and long-term prognosis. Int J Hematol 2007;85:186-190.
8. Sugimori C, Yamazaki H, Nakao S. (12人・②番目) 査読有 Roles of DRB1 *1501 and DRB1 *1502 in the pathogenesis of aplastic anemia. Exp Hematol 2007;35:13-20.
9. Takami A, Yamazaki H, Nakao S. (10人・③番目) 査読有 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 2006;38:729-732.
10. Nakao S, Yamazaki H. (3人・③番目) 査読有 Clinical significance of a small population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells in the management of bone marrow failure. Int J Hematol 2006;84:118-122. 2.
11. Sugimori C, Yamazaki H, Nakao S. (9人・④番目) 査読有 Minor population of CD55-CD59- blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. Blood 2006;107:1308-1314.

[学会発表] (計6件)

1. 山崎宏人, 日野雅之, 古川達雄, 森下剛久, 宇都宮與, 今村雅寛, 鬼塚真仁, 新津洋司郎, 笠井正晴, 田嶋克史, 梅原久範, 島崎千尋, 谷口修一, 今村豊, 中尾眞二: C3を指標としたシクロスポリンによる急性 GVHD 予防法の検討: 多施設共同臨床試験の成績. 第31回日本造血細胞移植学会総会, 2009. 2. 5, 札幌.
2. 山崎宏人, 中尾眞二: 蛋白同化ステロイド二次不応再生不良性貧血におけるシクロスポリン追加投与の有用性. 第70回日本血液学会総会, 2008. 10. 10, 京都
3. 杉森尚美, 山崎宏人, 杉盛千春, 石山謙, 片桐孝和, 中尾眞二: 骨髄不全患者における

染色体異常: PNH 型血球の増加からみた各種染色体異常の臨床的意義. 第70回日本血液学会総会, 2008. 10. 10, 京都

4. 石山謙, 杉森尚美, 片桐孝和, 山崎宏人, 杉盛千春, 中尾眞二: 血小板減少患者における PNH 型血球検出の臨床的意義. 第70回日本血液学会総会, 2008. 10. 10, 京都

5. 望月果奈子, 杉盛千春, 山崎宏人, 高見昭良, 中尾眞二: 再生不良性貧血患者にみられる微小 PNH 型顆粒球は単一の PIG-A 変異クローンに由来する. 第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会合同総会, 2007. 10. 11, 横浜

6. 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. 2. 16, 福岡

[図書] (計1件)

1. 山崎宏人: 造血幹細胞移植後の EBV 関連リンパ増殖性疾患の治療. 正岡徹 (編集): 血液疾患合併感染症. 最新医学社、大阪. P210-217, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 宏人 (YAMAZAKI HIROHITO)
金沢大学・附属病院・助教
研究者番号: 50361994

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

中尾 眞二 (NAKAO SHINJI)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号: 70217660

高松 博幸 (TAKAMATSU HIROYUKI)
金沢大学・医学系・協力研究員
研究者番号: 70401932