

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19390283

研究課題名（和文） 小児再生不良性貧血の造血障害メカニズム - 骨髄間葉系細胞の関与 -

研究課題名（英文） Mechanism of bone marrow failure in aplastic anemia -Role of mesenchymal stem cell-

研究代表者

小島 勢二 (KOJIMA SEIJI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20313992

研究成果の概要：再生不良性貧血（再不貧）患者由来の骨髄間葉系幹細胞（MSC）における、T細胞機能抑制能の低下はみられない。一方再不貧では、骨髄微小環境におけるIFN- γ が増加していることから、血液幹細胞（HSC）におけるGATA-2の発現が低下している。GATA-2の発現低下は、HSCの分化増殖を障害して造血能を低下させるとともに、脂肪細胞特異的遺伝子であるPPAR γ の発現を増強し、骨髄の脂肪化をもたらすものと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
年度			
総計	6,400,000	1,920,000	8,320,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：再生不良性貧血、GATA-2、骨髄間葉系幹細胞、PPAR γ

1. 研究開始当初の背景

再生不良性貧血（再不貧）は、末梢における汎血球減少と骨髄の低形成および脂肪細胞の増加で特徴づけられる。再不貧の病因として、従来から造血を支持する骨髄微小環境の異常が想定されているが、その分子メカニズムは不明である。

2. 研究の目的

骨髄間質細胞の前駆細胞である骨髄間葉系幹細胞（MSC）は、T細胞機能を抑制し免疫抑制作用を示す。再不貧患者由来のMSCにお

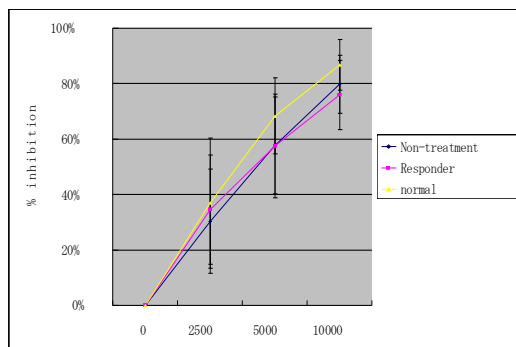
いてT細胞を抑制する機能が欠落しておれば、T細胞が活性化し、造血幹細胞（HSC）の障害をひきおこすことが考えられる。再不貧患者のHSCではGATA-2の発現が低下しているが、GATA-2はMSCから脂肪細胞への分化を促進する。このことから、MSCにおけるGATA-2の発現低下は骨髄の脂肪化に関与している可能性がある。再不貧患者の骨髄微小環境ではIFN- γ の産生が増加しているが、IFN- γ がMSCにおけるGATA-2の発現低下に関与している可能性についても検討する。

3. 研究の方法

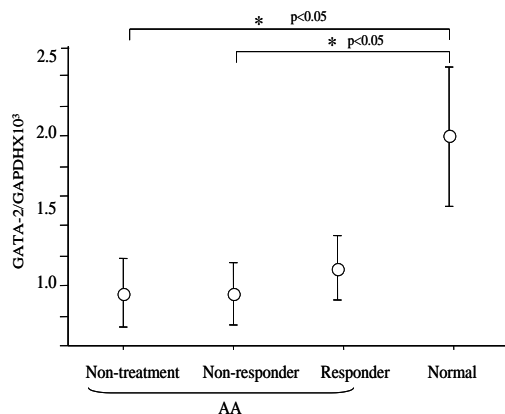
再不貧患者 34 人（末治療：15 人、治療反応例：11 人、治療不反応：8 人）と健常人 15 人を対象とした。MSC の培養には Mesen Cult (Stem cell technologies) を用い、実験には 3-4 代継代した細胞を用いた。T 細胞機能の抑制能は、健常人末梢血から単核球を分離し、PHA を添加した後にサイミジンの取り込み能を測定し、この系に MSC を添加して T 細胞の増殖抑制効果を検討した。GATA-2 と脂肪細胞特異的遺伝子である PPAR γ の発現は、MSC から RNA を抽出し、Real time PCR 法で定量した。また、培養系に IFN- γ を添加し GATA-2 の発現を定量するとともに、ウェスタンブロット法で蛋白レベルでの変化についても検討した。

4. 研究成果

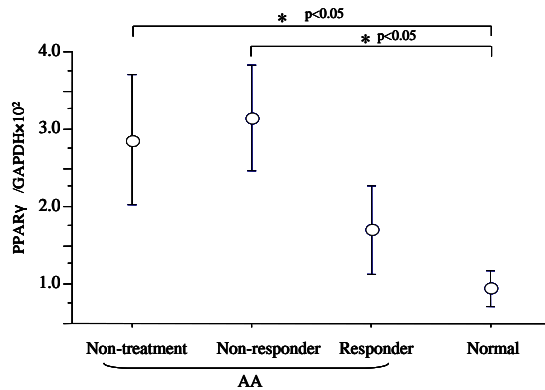
(1) 末治療および、免疫抑制療法に反応がみられた再不貧患者骨髄由来の MSC は、添加細胞数に比例して T 細胞の増殖機能を抑制した。3 群間における T 細胞機能の抑制能に差はみられず、再不貧患者にみられる活性化 T 細胞が増加する機序として、MSC の免疫抑制能が減少している可能性は考えにくい。



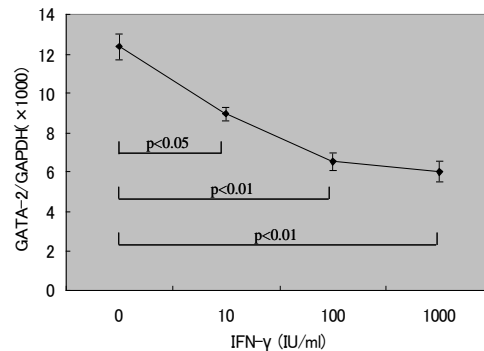
(2) 末治療再不貧患者の骨髄由来 MSC における GATA-2 の発現は、健常人と比較して統計学的に有意に減少していた。GATA-2 の発現レベルは、健常人と比較して統計学的に有意に減少していた。GATA-2 の発現レベルは健常人と治療反応例では統計学的に有意な差はみられなかったが、治療不反応例では健常人と比較して統計学的に有意に減少していた。



(3) 一方、脂肪細胞特異的遺伝子である PPAR の発現は、健常人と比較して末治療および治療不反応例では統計学的に有意に高く、治療反応例では減少した。



(4) GATA-2 の発現が減少するメカニズムを検討するために健常人由来 MSC の培養系に各種濃度の IFN- γ を添加し GATA-2 の発現を定量した。GATA-2 の発現は IFN- γ の濃度依存性に減少がみられた。



上記の検討結果から、再不貧患者骨髄微小環境における IFN- γ 濃度の増加が、血液幹細胞や MSC における GATA-2 の発現低下をもたらし、造血能の低下とともに、脂肪細胞特異的遺伝子である PPAR γ を活性化し、骨髄の脂肪化を促進すると考えられた。

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 20 件 全て査読有り)

- Xu Y, Takahashi Y, Yoshimi A, Tanaka M, Yagasaki H, Kojima S. Immunosuppressive activity of mesenchymal stem cells is not decreased in children with aplastic anemia. Int J Hematol. 2009; 89: 126-127
- Kudo K, Kojima S, Tabuchi K, Yabe H, Tawa A, Imaizumi M, Hanada R, Hamamoto

- K, Kobayashi R, Morimoto A, Nakayama H, Tsuchida M, Horibe K, Kigasawa H, Tsukimoto I; Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. Prospective multicenter trial comparing repeated immunosuppressive therapy with stem-cell transplantation from an alternative donor as second-line treatment for children with severe and very severe aplastic anemia. *Blood*. 2008; 111: 1054-1059
- ③ Tanaka M, Takahashi Y, Xu Y, Yoshida N, Yoshimi A, Villalobos IB, Hama A, Nishio N, Hidaka H, Wang Y, Yagasaki H, Kojima S. Quantification of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor hypersensitivity in juvenile myelomonocytic leukemia by 3H-thymidine assay. *Leuk Res*. 2008; 32: 1036-1042
- ④ Hama A, Yagasaki H, Takahashi Y, Nishio N, Muramatsu H, Yoshida N, Tanaka M, Hidaka H, Watanabe N, Yoshimi A, Matsumoto K, Kudo K, Kato K, Horibe K, Kojima S. Acute megakaryoblastic leukaemia (AMKL) in children: a comparison of AMKL with and without Down syndrome. *Br J Haematol*. 2008; 140: 552-561
- ⑤ Yabe M, Sako M, Yabe H, Osugi Y, Kurosawa H, Nara T, Tokuyama M, Adachi S, Kobayashi C, Yanagimachi M, Ohtsuka Y, Nakazawa Y, Ogawa C, Manabe A, Kojima S, Nakahata T; Japanese Childhood MDS Study Group. A conditioning regimen of busulfan, fludarabine, and melphalan for allogeneic stem cell transplantation in children with juvenile myelomonocytic leukemia. *Pediatr Transplant*. 2008; 12: 862-867
- ⑥ Muramatsu H, Kato K, Watanabe N, Matsumoto K, Nakamura T, Horikoshi Y, Mimaya J, Suzuki C, Hayakawa M, Kojima S. Risk factors for early death in neonates with Down syndrome and transient leukaemia. *Br J Haematol*. 2008; 142: 610-615
- ⑦ Yoshida N, Yagasaki H, Takahashi Y, Yamamoto T, Liang J, Wang Y, Tanaka M, Hama A, Nishio N, Kobayashi R, Hotta N, Asami K, Kikuta A, Fukushima T, Hirano N, Kojima S. Clinical impact of HLA-DR15, a minor population of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria-type cells, and an aplastic anaemia-associated autoantibody in children with acquired aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 2008 Jun 3. [Epub ahead of print]
- ⑧ Suzuki T, Tomonaga M, Miyazaki Y, Nakao S, Ohyashiki K, Matsumura I, Kohogo Y, Niitsu Y, Kojima S, Ozawa K. Japanese epidemiological survey with consensus statement on Japanese guidelines for treatment of iron overload in bone marrow failure syndromes. *Int J Hematol*. 2008; 88: 30-35
- ⑨ Yoshimi A, Kojima S, Tanigushi S, Hara J, Matsui T, Takahashi Y, Azuma H, Kato K, Nagamura-Inoue T, Kai S, Kato S; Japan Cord Blood Bank Network. Unrelated cord blood transplantation for severe aplastic anemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008; 14: 1057-1063
- ⑩ Nishio N, Yagasaki Y, Takahashi Y, Muramatsu H, Hama A, Zu Y, Villalobos IB, Kojima S. Congenital erythroid and myeloid hypoplasia terminating myelodysplastic syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2008; 30: 692-695
- ⑪ Watanabe N, Matsumoto K, Yoshimi A, Horibe K, Matsuyama T, Kojima S, Kato K. Outcome of bone marrow transplantation from HLA-identical sibling donor in children with hematological malignancies using methotrexate alone as prophylaxis for graft-versus-host disease. *Int J Hematol*. 2008; 88: 575-582
- ⑫ Yoshida N, Yagasaki H, Xu Y, Matsuda K, Yoshimi A, Takahashi Y, Hama A, Nishio N, Muramatsu H, Watanabe N, Matsumoto K, Kato K, Ueyama J, Inada H, Goto H, Yabe M, Kudo K, Miyama J, Kikushi A, Manabe A, Koike K, Kojima S. Correlation of clinical features with the mutational status of GM-CSF signaling pathway-related genes in juvenile myelomonocytic leukemia. *Pediatr Res*. 2008 Nov 26. [Epub ahead of print]
- ⑬ Nishio N, Yagasaki H, Takahashi Y, Hama A, Muramatsu H, Tanaka M, Yoshida N, Yoshimi A, Kudo K, Ito M, Kojima S. Engraftment syndrome following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children. *Pediatr Transplant*. 2008 Nov 26. [Epub ahead of print]
- ⑭ Hidaka M, Yagasaki H, Takahashi Y, Hama A, Nishio N, Tanaka M, Yoshida N,

- Villalobos IB, Wang Y, Xu Y, Horibe K, Dhen S, Kadomatsu K, Kojima S. Increased midkine gene expression in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 2007; 83: 535-540
- ⑮ Matsuda K, Shimada A, Yoshida N, Ogawa A, Watanabe A, Yajima S, Iizuka S, Koike K, Yanai F, Kawasaki K, Yanagimachi M, Kikushi A, Ohtsuka Y, Hidaka E, Yamaguchi K, Tanaka M, Yanagisawa R, Nakazawa Y, Shiohara M, Manabe A, Kojima S. Spontaneous improvement of hematologic abnormalities in patients having juvenile myelomonocytic leukemia with specific RAS mutations. *Blood* 2007; 109: 5477
- ⑯ Yagasaki H, Takahashi Y, Kudo K, Ohashi H, Hama A, Yamamoto T, Tanaka M, Yoshida N, Hidaka H, Nishio N, Kojima S. Feasibility and results of bone marrow transplantation from an HLA-mismatched unrelated donor for children and young adults with acquired severe aplastic anemia. *Int J Haematol*. 2007 Jun; 85: 437-442
- ⑰ Wang Y, Yagasaki H, Hama A, Nishio N, Takahashi Y, Kojima S. Mutation of SBDS and SH2D1A is not associated with aplastic anemia in Japanese children. *Haematologica*. 2007; 92: 1573
- ⑱ Kudo K, Kojima S, Tabuchi K, Yabe H, Tawa A, Imaizumi M, Hanada R, Hamamoto K, Kobayashi R, Morimoto A, Nakayama H, Tsuchida M, Horibe K, Kigasawa H, Tsukimoto I; Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. Prospective study of a pirarubicin, intermediate-dose cytarabine, and etoposide regimen in children with Down syndrome and acute myeloid leukemia: the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *J Clin Oncol*. 2007; 25: 5442-5447
- ⑲ Osugi Y, Yagasaki H, Sako M, Kosaka Y, Taga T, Ito T, Yamamoto M, Ohara A, Sato T, Mimaya J, Tsukimoto I, Kojima S; Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. Antithymocyte globulin and cyclosporine for treatment of 44 children with hepatitis associated aplastic anemia. *Haematologica*. 2007; 92: 1687-1690]
- [学会発表] (計 13 件)
- ① Muramatsu H, Kojima S, et al. Bone Marrow Transplantation for Children with chronic myeloid leukemia (CML): A Report from the Japan Marrow Donor Program (JMDDP). 50th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta USA, 2008. 12. 8-11
- ② Yoshida N, Kojima S, et al. Predicting response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. 50th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta USA, 2008. 12. 8-11
- ③ Hama A, Kojima S, et al. Gene alterations and expression of hematopoietic transcription factors in pediatric acute megakaryoblastic leukemia (AMKL): A Comparison of Down Syndrome (DS)-associated AMKL with Non-DS-AMKL. 50th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta USA, 2008. 12. 8-11
- ④ Manabe A, Kojima S, et al. Myelodysplastic Syndrome (MDS) and myeloproliferative disease (MPD) in children: A Prospective registration of 222 Cases. 50th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta USA, 2008. 12. 8-11
- ⑤ Yagasaki H, Kojima S, et al. Mismatching at HLA-DPB1 is Not associated with survival in patients with acquired aplastic anemia who receive unrelated bone marrow transplantation. 50th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta USA, 2008. 12. 8-11
- ⑥ Kamati Y, Kojima S, et al. Relapse of children with aplastic anemia after immunosuppressive therapy. 50th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta USA, 2008. 12. 8-11
- ⑦ Yagasaki H, Kojima S, et al. Improved outcome of unrelated bone marrow transplantation for severe aplastic anemia. 49th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta USA, 2007. 12. 8-11
- ⑧ Muramatsu H, Kojima S, et al. Should hematopoietic stem cell transplantation in first complete remission be restricted to high-risk patients in childhood acute myeloid leukemia? 49th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta USA, 2007. 12. 8-11
- ⑨ Hama A, Kojima S, et al. JAK3, JAK2 and

GATA1 mutations in childhood acute megakaryoblastic leukemia with and without down syndrom. 49th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta USA, 2007. 12. 8-11

- ⑩ Takahashi Y, Kojima S, et al. Decreased incidence of clonal evolution to myelodysplastic syndrome/ acute myeloid leukemia with monosomy7 in children with aplastic anemia following reduced use of G-CSF. 49th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta USA, 2007. 12. 8-11
- ⑪ Nishio N, Kojima S, et al. Natural History of Transfusion-independent non-Severe Aplastic Anemia in Children. 49th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta USA, 2007. 12. 8-11
- ⑫ Yoshida N, Kojima S, et al. Correlation of clinical features with the mutational status of GM-CSF signaling Pathway-related genes in children with juvenile myelomonocytic leukemia. 49th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta USA, 2007. 12. 8-11
- ⑬ Kojima S. Therapeutic strategies and clinical results in JMML-Update on Japanese trial. 2nd JMMLsymposium, Atlanta, USA, 2007. 12. 6-7

[図書] (計2件)

- ① 小島勢二他、医学書院、小児科第3版、2008、1277-1281
- ② 小島勢二他、総合医学社、小児科診療ガイドライン - 最新の診療指針 - 、2007、230-233

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 勢二 (KOJIMA SEIJI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20313992

(2) 研究分担者

高橋 義行 (TAKAHASHI YOSHIYUKI)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40432273

谷ヶ崎 博 (YAGASAKI HIROSI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：90378141