

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月21日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591237

研究課題名（和文） サイトカイン産生を誘導する自己抗体を用いた骨髄不全モデルマウスの作成

研究課題名（英文） Generation of bone marrow failure model mice by autoantibodies inducing cytokine production

研究代表者

高松 博幸 (TAKAMATSU HIROYUKI)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：70401932

研究成果の概要（和文）：

モエシンKOマウスは以下の表現型異常が認められた。末梢血白血球減少、貧血、体重減少と脾腫大、骨髄造血幹細胞の減少、骨髄・脾臓のB細胞・形質細胞の減少とT細胞の増加、脾臓の濾胞構造の不明瞭化である。一方、モエシンKOマウスにモエシン蛋白質を免疫したところ、抗モエシン抗体が産生された。前処置後の野生型マウスに抗モエシン抗体を産生する脾臓・骨髄細胞を骨髄内移植したところ、野生型マウスに抗モエシン抗体産生、TNF α とIFN γ 濃度の上昇、白血球減少がみとめられたが、血小板減少と貧血は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：

Moesin KO mice grew normally. However, the body weight of moesin KO mice was lower than that of WT mice. Complete blood counts of moesin KO mice revealed leukocytopenia and macrocytic anemia; platelet counts were comparable. Moesin KO mouse spleens were heavier than those of WT mice and follicle formation in spleens of moesin KO mice were obscure with increased CD3⁺ lymphocytes and reduced CD19⁺ lymphocytes as compared with WT mice. BM of moesin KO mice was normocellular and characterized by increased CD3⁺ lymphocytes and reduced CD19⁺ lymphocytes as seen in spleens of moesin KO mice. The number of lineage negative, Sca-1⁺, and c-Kit⁺ (LSK) mouse HSCs in moesin KO BM tended to be lower than that of WT mice. Moesin KO spleen/BM cells capable of producing anti-moesin antibodies were infused into BM of WT B6 male mice. Transplanted mice showed leukocytopenia and increase of TNF α and IFN γ in plasma compared to WT B6 male mice transplanted with WT spleen/BM cells, but anemia and thrombocytopenia were not observed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：ノックアウトマウス、ポリクローナル抗体、モエシン、自己抗体、骨髄不全

1. 研究開始当初の背景

再生不良性貧血（再不貧）は、T 細胞が自己の造血幹細胞を傷害することによって発症する骨髄特異的な自己免疫疾患である。再不貧においても、造血幹細胞での発現レベルが高い kinectin や DRS-1 (Feng X, Takamatsu H, Nakao S, et al. Blood 2004) に対する抗体が同定された。しかし、これらは細胞内蛋白に対する抗体であるため、骨髄不全の発症に直接関わっている可能性は低い。

われわれは、細胞骨格関連タンパク質であるモエシンに対する抗体が再生不良性貧血患者の約 3 割、慢性関節リウマチ患者の約 3 割に検出されることを見いだした (Takamatsu H, Nakao S, et al. Blood 2007, 日本特許：中尾眞二、高松博幸ら 特許第 3735676 号 2006 年)。

モエシンは表面マーカー解析や RNAi 実験によって T リンパ球やマクロファージ、単球系白血病細胞株の細胞表面に発現していることを確認した。また、骨髄不全患者血清由来抗モエシンポリクローナル抗体を骨髄不全患者の末梢血単核球に加えたところ、その他の刺激なしに TNF- α や IFN- γ が分泌誘導された。

以上の所見から、造血不全や慢性関節リウマチ患者で高頻度に検出される抗モエシン抗体は免疫担当細胞からのサイトカイン産生を介して各々の病態に関与している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

標的臓器とは別の免疫担当細胞によるサイトカイン産生誘導という、自己抗体（抗モエシン抗体）の新しい機能や病態形成におけるその役割を明らかにするために、骨髄不全モデルマウスの作製を試みた。

3. 研究の方法

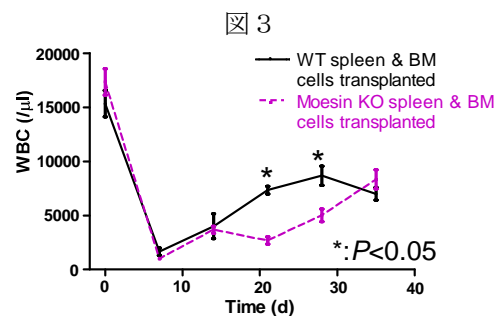
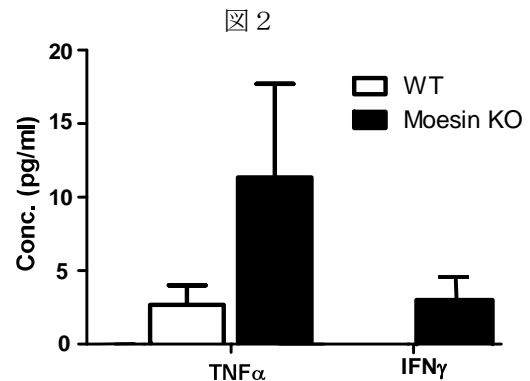
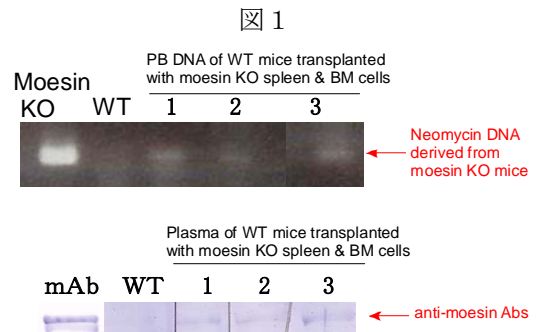
モエシン K0 マウスを B6 マウスの遺伝背景にするために 8 世代以上、B6 マウスと交配した。その B6 モエシン K0 マウスの表現型を野生型マウスと比較した。

モエシンノックアウトマウスにマウスモエシンタンパク質を免疫して抗モエシンポリクローナル抗体を産生させた。その抗体を野生型マウスに投与することにより、骨髄不全が発症するか否かをみる。また、モエシンタンパク質で免役したモエシンノックアウトマウス骨髄には、モエシンを標的とする T 細胞や、抗モエシン抗体を産生する B 細胞が含まれるため、前処置を行った野生型マウスにこの骨髄を移植することにより骨髄不全マウスの作製を試みた。作製した骨髄不全マウスを検討することにより、サイトカインプロファイルを含めた造血不全のメカニズムを解析した。

4. 研究成果

これまでの報告ではモエシンノックアウトマウスと野生型マウスでは表現型は同じとさ

れていた(J Biol Chem 1999)が、血算を調べてみたところ統計学的有意差をもってモエシンノックアウトマウスでは白血球減少や貧血が認められた。その原因について精査したところ、モエシンノックアウトマウスでは加齢とともに体重減少や脾腫大が顕在化し、骨髄は正形成であったがLin-Sca-1+c-kit+マウス造血幹細胞が減少し、免疫染色にてCD79 α 陽性、Ig κ 陽性のB細胞、形質細胞の減少とCD3陽性細胞の増加が認められた。さらに、モエシンKOマウスでは脾臓の濾胞構造が不明瞭化し、骨髄同様にCD79 α 陽性のB細胞の減少とCD3陽性細胞の増加が認められた。前述の論文(J Biol Chem 1999)と異なり、今回実験に使用したモエシンKOマウスは8代以上B6マウスと交配したB6マウスのバックグラウンドを有するマウスであるために、このようなKOマウスでの表現型の違いが生じたと推定した。一方、モエシンKOマウスにモエシン蛋白質を免疫したところ、予想通り抗モエシン抗体の産生が確認された。次に3GyのTBIで前処置した野生型マウスに抗モエシン抗体を産生する脾臓細胞と骨髄細胞を骨髄内移植したところ、野生型マウスに抗モエシン抗体産生が認められた(図1)。さらに、その野生型マウスのTNF α とIFN γ 濃度が上昇し(図2)、白血球減少がみとめられた(図3)が、血小板減少と貧血は認められなかった。以上から、モエシンはマウス造血で重要な役割があると考えられた。このような知見はこれまでわかっておらず、今後造血不全モデルマウス作製に向けて更に検討を進めていく予定である。



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4件)

- ① Takamatsu, H., Yagasaki, H., Takahashi, Y., Hama, A., Saikawa, Y., Yachie, A., Koizumi, S., Kojima, S. & Nakao, S. Aplastic anemia successfully treated with rituximab: the possible role of aplastic anemia-associated autoantibodies as a marker for response. *Eur J Haematol*, 2011 86, 541-545. 査読有
- ② Qi Z., Takamatsu H., Espinoza JL., Lu X., Sugimori N., Yamazaki H., Okawa K., Nakao S. Autoantibodies specific to

hnRNP K: a new diagnostic marker for immune pathophysiology in aplastic anemia. Ann Hematol. 2010 Dec;89(12):1255-63. 査読有

- ③ 高松 博幸, 中尾 眞二. 骨髄不全における免疫病態の診断：自己抗体検出の意義. 臨床血液, Vol. 51 (2010) No. 8 pp. 654-663. 査読有
- ④ J. Luis Espinoza, Hiroyuki Takamatsu, Xuzhang Lu, Zhirong Qi and Shinji Nakao. Anti-moesin antibodies derived from patients with aplastic anemia stimulate monocytic cells to secrete TNF- α through an ERK1/2 dependent pathway. Int Immunol 2009 Aug;21(8):913-23. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 高松博幸, 中尾眞二：' 骨髄不全における免疫病態の診断：自己抗体検出の意義' . 第 71 回日本血液学会学術集会. 2009 年 10 月 25 日. 国立京都会館 (京都府) .
- ② 高松博幸, 中尾眞二ら：' Anti-HSP72 Abs are frequently detectable in serum of hepatitis-associated aplastic anemia pts' . 第 71 回日本血液学会学術集会. 2009 年 10 月 24 日. 国立京都会館 (京都府) .
- ③ Hiroyuki Takamatsu, Shinji Nakao et al.：' Identification of a Novel Auto-Antibody Highly Prevalent in Patients with Hepatitis-Associated and Idiopathic Aplastic Anemia' . 第 51 回米国血液学会. 2009 年 12 月 7 日. Ernest N. Morial Convention Center, (USA)
- ④ Hiroyuki Takamatsu, Shinji Nakao et al.：' Role of Moesin in Murine Hematopoiesis' . 第 53 回米国血液学会. 2011 年 12 月 10 日. San Diego Convention Center, (USA).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

該当なし

(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

近藤 恭夫 (KONDO YUKIO)
金沢大学・医学系・助教
研究者番号：10322116