

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：24701
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791087
 研究課題名（和文） 特発性造血障害における NKG2D 免疫の臨床的意義の確立
 研究課題名（英文） NKG2D-mediated immunity in bone marrow failure syndromes
 研究代表者 花岡 伸佳（HANAOKA NOBUYOSHI）
 和歌山県立医科大学・医学部・講師
 研究者番号：40433370

研究成果の概要（和文）：特発性造血障害を伴う患者に免疫抑制療法が奏功するが、適正治療にはその免疫分子病態の把握が必要である。本研究では、発作性夜間ヘモグロビン尿症患者にみられる特発性造血障害に NKG2D 免疫の関与を確認した。この免疫は、造血幹細胞を反映する顆粒球上のリガンド発現（診断）や免疫治療効果の作動から、特発性造血障害の免疫病態を直接反映する指標と考えられた。今後、治療中止の指標としての有用性も引き続き検証していく。

研究成果の概要（英文）： Acquired idiopathic bone marrow failure responds to immunosuppressive therapy (IST), indicating that marrow failure is immune-mediated. However, molecular pathogenesis of the immune, including on hematopoietic progenitor cells, is unknown. In the present study, we show that NKG2D-mediated immunity closely links with marrow injury in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. We found both that NKG2D ligands including ULBP and MICA/B were pathologically expressed on granulocytes, whereas NKG2D receptor on lymphocytes of the patient, and that IST was effective for the marrow failure. We then propose that NKG2D-mediated immunity could directly visualize immune condition of the marrow failure. Currently, we are confirming the NKG2D-associated immunity decides the timing of discontinuation of IST in the patient.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：特発性造血障害、NKG2D 免疫、PNH

1. 研究開始当初の背景

特発性造血障害は、自己免疫の関与が指摘される骨髄不全症候群の致死的病態の一つであり、日本人に比較的多いことからその対策は急務である。これまで、特定 HLA ハプロタイプとの関連、細胞傷害性 T 細胞や造血抑制サイトカイン (INF- γ 、TNF- α) の関与など、免疫の関与が示唆される間接的な知見が散

見られるも、直接造血障害を導く免疫分子病態は未解明である。その中でも、この造血障害に対して造血幹細胞移植や広範な免疫抑制療法が行われており、60-80%の患者に効果を認めているものの、無効例や長期投与による日和見感染や腫瘍発生という新たな臨床上の問題が生じている。そのため、劇的な変化をもたらしているこれらの治療法も必ずしも安全で万能な治療とは言えない

(Tisdale JF, *Lancet* 2000; Maciejewski JP, *Blood* 2002)。

治療効率を高めるために、免疫抑制療法前に無効例と有効例を識別する試みがなされている。最近では、HLA-DRB1*1501 (Shichichima T, *Blood* 2002) や高感度フローサイトメトリー法で検出される微少発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) 型血球 (Sugimori C, *Blood* 2006) が免疫病態の指標として臨床の現場で用いられている。しかし、これらは間接的で時間蓄積が必要な指標であるため、以下の問題が残っている。

①微少 PNH 型血球検出を指標に治療した症例においても治療無効例が約 10%、5 年以内の再発例も約 40%存在する (Sugimori C, *Blood* 2006)

②治療効果があっても治療減量や中止により再燃することがある。

③微少 PNH 型血球陰性でも免疫抑制療法が有効な例を認める。

これらの問題点を理解し解決するためには、特発性造血障害の分子病態解明が待望される。

2. 研究の目的

我々はこれまでの PNH 研究の蓄積により特発性造血障害の発生に NKG2D 免疫が関与する可能性を見出ししていた (Hanaoka N, et al. *Blood* 2006 & *Br J Haematol* 2009)。NKG2D 免疫を誘発するリガンドとしては、Cytomegalovirus UL16 binding protein (ULBP) や MHC class I chain-related molecule A and B (MICA/B) がある。これらは正常細胞には発現せず、細胞が腫瘍化やウイルス感染などのストレスを受けたときに膜発現するストレス蛋白である。ともに NKG2D を受容体とし、その結合により NKG2D 陽性リンパ球 (NK 細胞、CD8 陽性 T 細胞や一部の CD4 陽性 T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、NKT 細胞) は活性化され、その結果 NKG2D リガンド発現細胞は、これらのリンパ球により免疫攻撃を受け排除される (Groh V, *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; Cosman D, *Immunity* 2001)。興味深いことに、PNH 患者血球でも NKG2D リガンドが膜発現し、このリガンド発現細胞は確かに NKG2D 陽性の自己リンパ球により傷害された (Hanaoka N, *Blood* 2006)。さらに、再生不良性貧血患者の骨髄細胞による *in vitro* コロニー形成能が NKG2D 免疫抑制により回復した (Hanaoka N, *Br J Haematol* 2009)。そこで本研究では、PNH などの特発性造血障害患者血球のストレス誘導型膜蛋白 NKG2D リガンド膜発現を解析し、このリガンドが特発性造血障害の免疫病態を直接反映する指標 (早期診断や治療開始の指標)、特に免疫抑制治

療中止の指標になるかを確認し、その臨床的意義の確立を狙った。さらに、微少 PNH 型血球との比較により NKG2D 免疫が免疫病態の指標として優れているかどうかの検証も計画した。研究の成果は、新しい特発性造血障害も免疫分子マーカーの確立のみならず、分子病態の解明や副作用の少ない分子標的療法の開発が期待できる。さらに、生活の質の改善や免疫抑制剤の適正使用 (治療費削減) など患者への福音も期待して本研究に取り組んだ。

3. 研究の方法

NKG2D 免疫の評価に適する検査法を確立し、臨床病態 (汎血球減少の進行や免疫抑制療法の効果) との関連性を検討した。

1) 血球分離法の選定

同意の得られた特発性造血障害患者から血液を採取し、デキストラン生食、溶血剤、Ficoll などを用いて白血球層の分離やリンパ球や顆粒球の精製分離を行った。可能な限り簡便な方法を探索し臨床応用可能な状態まで洗練を試みた。

2) フローサイトメトリー法に用いる NKG2D リガンドおよび NKG2D 受容体抗体の選定

NKG2D リガンドは、現在 GPI アンカー型蛋白である ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5 とペプチドアンカー型蛋白である MICA、MIB6 の 7 種類が知られている。入手可能なタンクローン抗体の中から最も感度よく NKG2D リガンドを検出できる抗体を選定した。NKG2D 受容体抗体についても、最も感度よく検出できる抗体を選定した。

3) フローサイトメトリー法

血球を標準的な抗体染色法で染色した後、BD Bioscience 社の FACSCalibur で解析した。得られたデータは TreeStar 社の Flowjo ソフトウェアを用いて解析した。

4. 研究成果

1) NKG2D リガンド発現解析法の確立

末梢血を 6% デキストラン生食により白血球層を分離後、顆粒球の表面マーカー CD11b と NKG2D リガンド (ULBP1, ULBP2, ULBP3, MICA/B) の 2 カラーフローサイトメトリー法を確立した。使用抗体は市販の

phycoerythrin (PE)標識の抗体が最適であった。この方法で得られた結果は、従来のFicollで顆粒球を純化した後にNKG2Dリガンド単独の間接蛍光抗体を用いた方法と比較すると、NKG2D リガンド検出感度が格段に向上した。さらに、顆粒球まで純化しない one ステップ法であるため、解析時間が大幅に短縮された。この成果によりNKG2D リガンドの病的膜発現を簡便で高感度に評価できるようになった。

2) NKG2D リガンド病的発現の解析

特発性造血障害を伴う発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) 患者の顆粒球を用いて、上記のNKG2D リガンド2カラーフローサイトメトリー法を行った。顆粒球は細胞周期が短く、造血前駆細胞と挙動や性質が酷似する。結果、glycosylphosphatidylinositol (GPI) 蛋白であるULBP1やULBP2は検出できず、ペプチドアンカー型のMICA/B 病的発現は確認できた (図1)。このULBP欠損は、本症例の全ての顆粒球がGPI欠損であることを支持するものであり、得られたデータの信頼性を示す所見と考えられた。

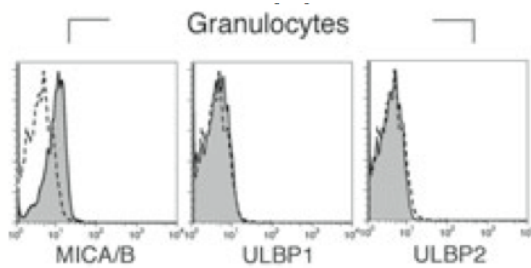


図1. 特発性造血障害患者の顆粒球上におけるNKG2D リガンド膜発現

3) 免疫細胞上のNKG2D 発現解析

NKG2D 受容体はCD8⁺T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、NK細胞の全てと一部のCD4⁺細胞上に発現する。これらに共通する表面抗原CD2をNKG2D関連リンパ球の同定目的に用いた。1)の方法で分離した白血球を標的にして、抗CD2抗体と抗NKG2D抗体を用いた2カラーフローサイトメトリー解析法を確立した。抗NKG2D抗体は市販のphycoerythrin (PE)標識の抗体が最適であった。上記の患者白血球でこの解析を行ったところ、CD2陽性リンパ球上にNKG2D受容体発現が定量的に確認できる方法を見い

だした (図2)。

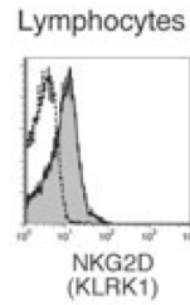


図2. 特発性造血障害患者のCD2陽性リンパ球におけるNKG2D受容体(KLRK1)の膜発現

4) NKG2D 免疫の臨床的意義の確立

本例では、顆粒球上のNKG2Dリガンドとリンパ球上のNKG2D受容体が共存し、さらに、造血障害も存在していた。そして、少量の免疫抑制療法(メテノロン 10mg/日)により、20年以上も造血障害が良好にコントロールされている(図3)。つまり、NKG2D免疫の存在と免疫治療効果の発現により、NKG2D免疫が特発性造血障害の免疫病態を直接反映する指標であることが示唆された。

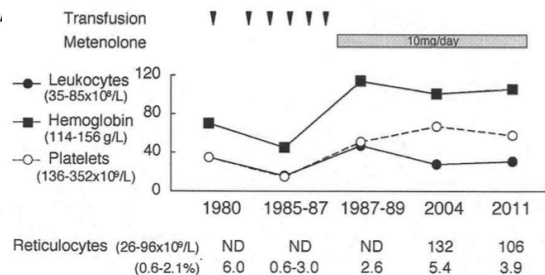


図3. NKG2D リガンドとNKG2D受容体が検出された特発性造血障害患者の臨床経過
少量のステロイド治療で造血の回復と維持が見られた。

5) 今後の展開

これまで我々の少数例での検討では、NKG2D免疫の作動が確認不能になった場合は、免疫抑制剤減量によっても造血障害の程度に悪化は見られない(Hanaoka N, *Br J Haematol* 2009)。また、PNH型血球の出現も造血障害が発生後しばらく経って検出される例も経験

する (Hanaoka N, *Br J Haematol* 2009)。このような治療の中止指標や他の指標との優位性についての検証は、症例数の確保が必要な課題であるため、今後も継続して行っていく。

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 2 件)

(1) Hanaoka N, Murakami Y, Nagata M, Horikawa K, Nagakura S, Yonemura Y, Murata S, Sonoki T, Kinoshita T, Nakakuma H. Occupancy of whole blood cells by a single PIGA-mutant clone with HMGA2 amplification in a paroxysmal nocturnal haemoglobinuria patient having blood cells with NKG2D ligands. *Br J Haematol* (査読あり) 2013;160(1):114-116. DOI: 10.1111/bjh.12093.

(2) Hanaoka N, Murakami Y, Nagata M, Nagakura S, Yonemura Y, Sonoki T, Kinoshita T, Nakakuma H. Persistently high quality of life conferred by coexisting congenital deficiency of terminal complement C9 in a paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patient. *Blood* (査読あり) 2012;119(16):3866-3868. DOI: 10.1182/blood-2012-02-408161.

[学会発表] (計 1 件)

Hanaoka N, Murakami Y, Nagata M, Nagakura S, Yonemura Y, Sonoki T, Kinoshita T, Nakakuma H. Pathophysiology of extravascular hemolysis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. 第 74 回日本血液学会学術集会、2012 年 10 月 19 日～2012 年 10 月 21 日、京都

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 0 件)

○ 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等：
<http://www.wakayama-med.ac.jp/med/ketunai/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花岡 伸佳 (HANAOKA NOBUYOSHI)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：40433370