

令和 3 年 6 月 27 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07419

研究課題名(和文) ヒストンを標的とする移植後合併症の早期診断マーカーと治療法の開発

研究課題名(英文) Intracellular protein as a marker for early diagnosis of TA-TMA/SOS

研究代表者

原田 佳代 (Harada, Kayo)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00722521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞移植後には、血管内皮細胞障害に起因する血栓性微小血管症(TMA)や肝類洞閉塞症候群(SOS)の発症を10-30%の頻度で認める。これらに対する有効な治療法や早期診断方法は現段階で確立しておらず、重篤化すれば致命的転帰もとり得る。近年、核内蛋白のヒストンが、血管内皮細胞障害と血液凝固異常を惹起することが示唆され、SOSやTMAの診断マーカーとして期待される。我々は造血器腫瘍に合併した播種性血管内凝固患者血清中でヒストンをはじめとする核内タンパクが増加していることを見出した。さらにSOSやTMAを発症した患者血清中でこれらの核内タンパクが上昇していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内皮症候群は極めて死亡率の高い移植後合併症で、早期診断により、その原因を除去することが重要である。TA-TMAやSOSの診断がついた時点では既に病態が完成していることも少なくなく、救命は困難となる。このため、核内蛋白とこれらの移植後血栓性合併症との関連を明らかにし、治療標的マーカーとなり得た暁には、移植患者の治療関連死亡率の低下に寄与することが可能となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Thrombotic microangiopathy (TMA) and hepatic sinusoidal obstruction syndrome (SOS), which are thrombotic disorder, developing in associated with vascular endothelial cell damage, are noted in 10-30% of patients who receive hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Early diagnosis of TMA and SOS have not been established, and the outcome can be fatal in severe cases. Recently, it has been suggested that histones, a nuclear protein, cause vascular endothelial cell damage and coagulopathy, and are expected to be a diagnostic marker for SOS and TMA. We found that histones and other nuclear proteins were increased in the sera isolated from patients with disseminated intravascular coagulation associated with hematological malignancies. In addition, we found that nuclear proteins were elevated in sera isolated from some patients with SOS and TMA.

研究分野：凝固

キーワード：ヒストン 造血幹細胞移植 TMA SOS 内皮障害

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞移植は造血器腫瘍に対する根治療法であるが、約 20-30%の頻度で血栓性微小血管症 (thrombotic microangiopathy: TMA) や肝類洞閉塞症候群 (sinusoidal obstruction syndrome: SOS) を発症するといわれる。いずれも血管内皮障害に起因するとされる血栓性の疾患で (Carreras E, Diaz-Ricart M. Bone Marrow Transplant 2011)、現在有効な治療法や早期診断方法は確立しておらず、重篤化すれば多臓器不全で致命的転帰をとり得る極めて予後不良の移植関連合併症の一つである。

近年、核内蛋白のひとつであるヒストンが、敗血症の際、血中に放出され血管内皮障害と血液凝固異常を惹起させることが示された (Xu J, Nat Med 2009)。ヒストンは、通常好中球から放出されるが、移植後に TMA を発症した患者においては好中球の生着前でも DNA 量が増加していることが報告された (Arai Y, et al. Biol Blood Marrow Transplant 2013)。これらのことから血漿中のヒストンは、障害された血管内皮由来である可能性が示唆された。

### 2. 研究の目的

本研究では、ヒストンが移植後 TMA や SOS の内皮症候群の診断マーカーや移植片対宿主病 (graft-versus host disease: GVHD) の要因になり得るのか、また、ヒストンを標的とする内皮症候群や GVHD の治療になり得るのか、これらの可能性について検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) まず、予備研究として造血器腫瘍患者における化学療法の際の凝固異常と核内蛋白との関連を検証することとした。寛解導入療法の前後において末梢血を採血し、白血球数や凝固関連項目を確認するとともに日本血栓止血学会 2017 年版 DIC 基準を用いて DIC の有無を判定した。また、検体を (株) シノテストに送付し、HMGB-1 およびヒストン H3 の値を測定し、これら測定結果と DIC スコアとの関連について解析した。

(2) 次に、移植後患者における血清中ヒストン H3 の濃度と TMA や SOS 発症との関連について、移植前処置開始前から退院まで週 1 回採血を施行し、血漿中のヒストン濃度を ELISA 法で測定した。また、移植後臨床経過を観察し、TA-TMA および SOS などの内皮症候群の発症や GVHD の発症を適切に同定し、核内蛋白濃度との相関を検討することで早期診断マーカーになり得るかを考察した。

### 4. 研究成果

(1) 症例は急性骨髄性白血病 (AML) が 12 症例、急性リンパ性白血病 (ALL) が 8 症例、急性前骨髄球性白血病 (APL) が 5 症例、バーキット白血病が 1 症例、成人 T 細胞性白血病が 1 症例と合わせて 27 症例で、これらから計 93 サンプルのデータが得られた。化学療法による治療開始前に DIC と判断されたのは、26 例中 12 例 (46.2%) で、AML では 8 例中 3 例 (37.5%) だったのに対して、ALL では 9 例中 4 例 (44.4%) だった。APL は 5 例中全例で DIC が認められた。治療開始後も含めて入院期間中に DIC と診断されたか否かで 93 サンプルの HMGB-1 の値を DIC の有無別に 2 群で比較すると、DIC を有する群 (n=24) では中央値が 14.5 ng/dL、DIC なし群 (n=38) では 6.7 ng/dL (p=0.0416) と、DIC を有する群で血漿中 HMGB1 濃度が有意に高かった。同様にヒストン H3 の値は 3.7 ng/dL、1.6 ng/dL (p=0.0232) と DIC 有群で有意に高かった (Fig.1)。化学療法施行後には腫瘍崩壊から白血球数は減少し、凝固異常をきたして DIC を発症することが認められる。寛解導入療法後に核内蛋白濃度の上昇が認められた症例が複数あり、腫瘍崩壊に伴う凝固異常により核内蛋白が上昇する可能性が示唆された (Harada-Shirado K, Int J Hematol. 2020) (Fig.2)。白血球数と核内蛋白の相関を検討すると、HMGB1 の方がヒストンより白血球数との相関が高かった (Fig.3)。このため、移植後、生着までの骨髄抑制期間における血栓性疾患発症においては、ヒストンがより寄与している可能性が疑われた。

(2) 造血移植患者に関して、30 症例から検体が得られた。SOS、TA-TMA の発症率とともに 10% で、既報告による発症率 (10-15%) とほぼ同様であった (Carreras E, Biol Blood Marrow Transplant. 2011)。危険因子として前処置レジメンや 2 回目の移植などが考えられた。SOS、TA-TMA 発症例で、核内蛋白のヒストン H3 が高値をとっていた症例が認められた。Late onset SOS が認められた症例では、同時期に溶血性貧血や血小板減少から TA-TMA の合併が疑われ、内皮障害が複合化することが示唆された (日本血栓止血学会 SSC, 2021) (Fig.4)。ヒストン H3 の中央値は移植前から day28 までいずれも 0 ng/dL であったが、血縁 HLA 半合致末梢血幹細胞移植施行の症例では、生着時に TA-TMA が疑われ、その後ヒストン H3 の増加を認めた。また、GVHD

疑いの下痢の症状が認められた症例でヒストンが高値をとった例があったが、同時期 CD トキシン陽性であったことから、感染により核内蛋白が好中球から放出された可能性も推察された。血清中の核内蛋白（ヒストン H3）と SOS や TA-TMA などの移植関連血栓性疾患との関連については、本研究では明らかな関連性は指摘できなかったが、少数例ではあるものの移植後ヒストン H3 が高値となる症例が認められており、今後更に症例を蓄積して移植関連血栓性疾患と核内蛋白との関連について研究を進めてゆく必要があると考えられた。

Figure 1.

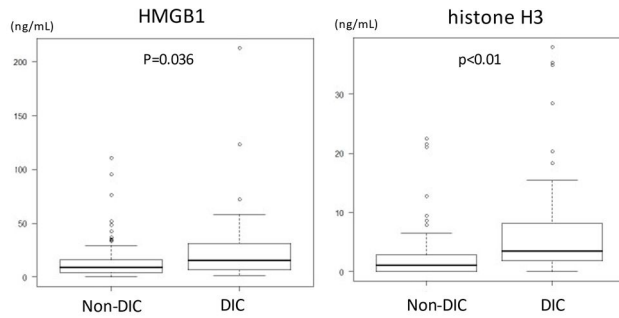


Figure 2.

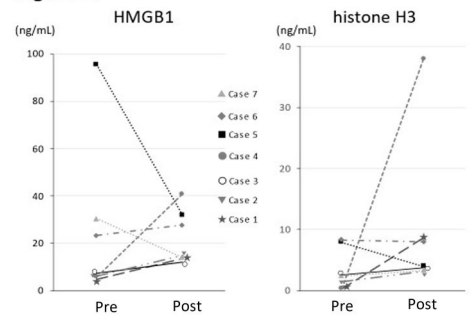


Figure 3.

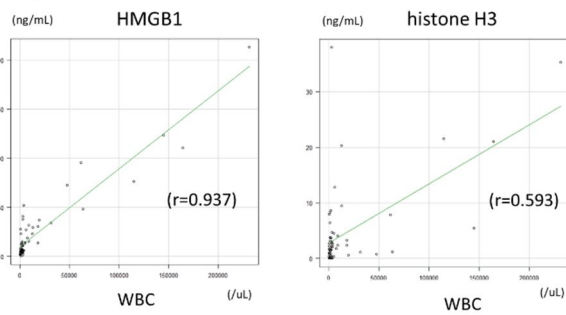


Figure 4.

#### SOSを発症した治療関連骨髄線維症

- 大腸癌でtope+化学療法歴あり。遺伝子変異はtriple negative. CBT後、day26で生着。
- day54, 右季肋部痛、体重増加、TB上昇あり、HokUSでは5点と高値であったため、臨床的にSOSと判断し、DF開始。
- 開始後、体重減少、右季肋部痛は改善したが、血小板減少は遷延し、ハプトグロビン低下よりday56, TA-TMAが疑われ、免疫抑制剤を漸減。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Harada-Shirado K, Wang X, Mori H, Fukatsu M, Takahashi H, Shichishima-Nakamura A, Kimura S, Ohkawara H, Yamada S, Ito T, Ikezoe T.	4. 巻 111 (3)
2. 論文標題 Circulating intranuclear proteins may play a role in development of disseminated intravascular coagulation in individuals with acute leukemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Hematol.	6. 最初と最後の頁 378-387
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-019-02798-5. Epub 2019 Dec 17.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mori H, Sukegawa M, Fukatsu M, Sano T, Takahashi H, Harada-Shirado K, Kimura S, Ohkawara H, Nakamura K, Mita M, Saito T, Hamazaki Y, Ohta M, Ikezoe T.	4. 巻 99 (2)
2. 論文標題 The link between interleukin-1 and acute myocardial infarction in chronic myeloid leukemia patients treated with nilotinib: cross-sectional study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann Hematol.	6. 最初と最後の頁 359-361
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00277-019-03896-4.Epub 2019 Dec 23.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Furukawa M, Xintao W, Ohkawara H, Fukatsu M, Alkebsi L, Takahashi H, Harada-Shirado K, Shichishima-Nakamura A, Kimura S, Ogawa K, Ikezoe T.	4. 巻 3 (14)
2. 論文標題 A critical role of the Gas6-Mer axis in endothelial dysfunction contributing to TA-TMA associated with GVHD.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood Adv.	6. 最初と最後の頁 2128-2143
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2019000222.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Harada-Shirado K, Wang K, Fukatsu M, Takahashi H, Shichishima-Nakamura A, Kimura S, Ohkawara H, Yamada S, Ito T, Ikezoe T.
2. 発表標題 Circulating intranuclear proteins may play a role in development of disseminated intravascular coagulation in individuals with acute leukemia.
3. 学会等名 International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH)2019, Melbourne (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Harada-Shirado K, Xintao W, Mori H, Fukatsu M, Takahashi H, Shichishima A, Kimura S, Ohkawara H, Ikezoe T.
2. 発表標題 The utility of revised diagnostic criteria for DIC in development of coagulopathy with hematological malignancies.
3. 学会等名 The 10th JSH International Symposium 2019, Ise-Shima (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田佳代, 柳沼真維, 深津真彦, 木村哲, 遠藤麻美子, 森博隆, 佐野隆浩, 高橋裕志, 大河原浩, 山田晋吾, 池添隆之
2. 発表標題 造血幹細胞移植後の血液凝固異常と核内蛋白の関連
3. 学会等名 第15回日本血栓止血学会学術標準化委員会 (SSC), オンライン開催, 2021 (シンポジウム)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田佳代, 森博隆, 深津真彦, 佐野隆浩, 高橋裕志, 木村哲, 大河原浩, 山田晋吾, 池添隆之
2. 発表標題 Circulating intranuclear proteins may be a useful marker to diagnose intravascular coagulation accompanied by acute leukemia
3. 学会等名 第82回 日本血液学会学術集会, 京都, 2020 (シンポジウム)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原田佳代, 森博隆, 深津真彦, 佐野隆浩, 高橋裕志, 木村哲, 大河原浩, 山田晋吾, 池添隆之
2. 発表標題 血液腫瘍に合併するDICの診断における核内蛋白の有用性について
3. 学会等名 第20日本血液検査学会, 金沢, 2020 (シンポジウム)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原田佳代, 王新涛, 森博隆, 深津真彦, 高橋裕志, 七島晶子, 木村哲, 大河原浩, 山田晋吾, 伊藤隆史, 池添隆之
2. 発表標題 造血器腫瘍に合併するDICへの核内蛋白の関与
3. 学会等名 第14回日本血栓止血学会学術標準化委員会 (SSC) 東京, 2020 (シンポジウム)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原田佳代, 王新涛, 深津真彦, 高橋裕志, 七島晶子, 木村哲, 大河原浩, 山田晋吾, 伊藤隆史, 池添隆之
2. 発表標題 Involvement of intranuclear proteins in the pathogenesis of DIC developing in patients with hematological malignancies following chemotherapy
3. 学会等名 第81回 日本血液学会学術集会, 東京, 2019 (シンポジウム)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田佳代, 王新涛, 深津真彦, 高橋裕志, 七島晶子, 木村哲, 大河原浩, 山田晋吾, 伊藤隆史, 池添隆之
2. 発表標題 腫瘍崩壊症候群に合併するDICにおける核内タンパクの関与
3. 学会等名 第13回 日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田佳代, 王新涛, 深津真彦, 高橋裕志, 七島晶子, 木村哲, 大河原浩, 山田晋吾, 伊藤隆史, 池添隆之
2. 発表標題 腫瘍崩壊症候群にDICを合併し、核内タンパクのHMGB-1やhistoneH3が高値を示した急性白血病症例についての検討
3. 学会等名 第41回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田佳代, 王新涛, 深津真彦, 高橋裕志, 七島晶子, 木村哲, 大河原浩, 山田晋吾, 伊藤隆史, 池添隆之
2. 発表標題 腫瘍崩壊症候群にDICを合併し、核内タンパクのHMGB-1やhistoneH3が高値を示した 急性白血病症例についての検討
3. 学会等名 第41回日本血栓止血学会学術集会, 三重, 2019 (シンポジウム)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田佳代, 王新涛, 深津真彦, 高橋裕志, 七島晶子, 木村哲, 大河原浩, 山田晋吾, 伊藤隆史, 池添隆之
2. 発表標題 腫瘍崩壊症候群に合併するDICにおける核内タンパクの関与
3. 学会等名 第13回日本血栓止血学会学術標準化委員会 (SSC) シンポジウム, 東京, 2019 (シンポジウム)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田佳代, 王新涛, 森博隆, 深津真彦, 高橋裕志, 七島晶子, 木村哲, 大河原浩, 山田晋吾, 伊藤隆史, 池添隆之
2. 発表標題 抗がん化学療法に発症する凝固異常症への核内蛋白の関与
3. 学会等名 第81回 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	池添 隆之 (Ikezoe Takayuki)  (80294833)	福島県立医科大学・医学部・教授   (21601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------