

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591541

研究課題名(和文)凝固異常および酸化ストレスの視点からGVHD・慢性炎症を捉えなおす基礎研究

研究課題名(英文)Fundamental study that review GVHD and chronic inflammation from a view point of coagulation disorder and the oxidative stress

研究代表者

長澤 正之(NAGASAWA, Masayuki)

東京医科歯科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：90262196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：GVHDでは炎症反応および酸化ストレスの進行に伴い、赤血球連鎖形成の亢進、band3の減少、PRDX2のダイマー化、PRDX2の断片化が経時的に認められた。ネフローゼ症候群、慢性活動性EBV感染症や敗血症では赤血球連鎖形成亢進以外は認められず、移植後GVHDでは慢性的に強い炎症・酸化ストレスが起きていると考えられた。ヒトの造血幹細胞移植では、早期の凝固異常が合併症関連死亡に関係し、トロンボモジュリンの投与により予後が改善した。マウスモデル系でトロンボモジュリンが慢性GVHDの皮膚病変を改善することが示された。以上より、GVHDでは凝固異常・炎症・酸化ストレスは密接に関連していることが示された。

研究成果の概要(英文)：With inflammatory reaction and progress of the oxidative stress, we observed the red blood cell rouleaux formation, decrease of band3, a dimer formation and fragmentation of PRDX2 sequentially in order by analyzing patient blood after the allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (H-SCT). Because these were not detected in nephrotic syndrome, chronic active EBV infection and sepsis other than red blood cell rouleaux formation, it was thought that persistent chronic inflammation and oxidative stress occurred in GVHD after the transplant. In H-SCT, early coagulation disorder was associated with complications-related death, and the likelihood that a prognosis improved by early administration of thrombomodulin was shown. It was shown that thrombomodulin improved skin lesions of chronic GVHD in the mouse model. Based upon the foregoing, coagulation disorder, inflammation, and the oxidative stress are closely associated, and it is necessary to manage GVHD from these viewpoints.

研究分野：小児血液

キーワード：慢性炎症 酸化ストレス 移植免疫 血栓凝固 GVHD

1. 研究開始当初の背景

申請者は造血幹細胞移植の治療関連合併症改善に何が重要であるかについて検討を重ねてきた。その結果、アロ免疫反応だけでなく、移植における凝固異常の制御が臨床的結果にきわめて重要であることが示された。一方、慢性炎症に関する最近の知見では、酸化ストレス反応との関連が注目を集めてきている。

2. 研究の目的

造血幹細胞移植の経過中に起こる GVHD を含めたさまざまな移植関連合併症について、今までの研究を通じて血栓・凝固の制御異常が根底に大きく関わっている可能性を明らかにしてきた。血栓・凝固制御という新たな視点から GVHD を含めた移植免疫の病態を捉えなおし、移植モデルマウスおよび臨床検体の解析を通じて新規の治療戦略・治療法の開発を行い、移植治療成績の向上に貢献することを目指す。これらの研究は慢性炎症と凝固異常が背景にあるとされる動脈硬化症などの病態解明・治療法開発にも将来的に役立つと考える。

3. 研究の方法

血液の誘電特性の変化を指標に全血を用いた凝固機能測定法の可能性が報告されているが(Anal Chem 2010; 82: 9769-9774)、その意味づけは不明な点が多い。同種造血幹細胞移植における炎症や酸化ストレス条件下の血液誘電特性の変化を解析し、その原理と臨床的意義を検討する。また、マウスの移植モデルを用いて、GVHD 存在下で生ずる赤血球膜蛋白の変化の機序の解明を行い。さらに、凝固因子制御投与による治療効果を検討し、臨床検体の解析結果と比較して、GVHD 制御・慢性炎症制御を目指した実際の治療にどのようにつながってゆくかについて研究を行う。

4. 研究成果

【移植後の血液緩和強度分析と赤血球膜蛋

白変化の解析】

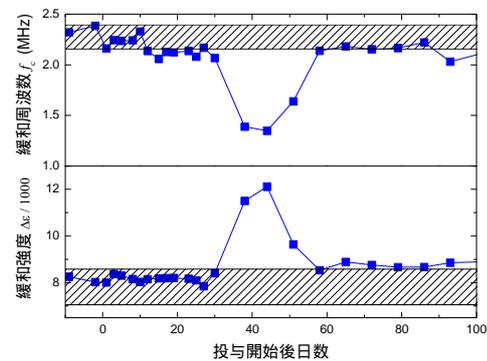


図1: 緩和強度の変化

造血幹細胞移植における GVHD・酸化ストレス・慢性炎症の関連を調べるために、移植後の患者血液の誘電緩和測定の変化と各種臨床血液データを比較するとともに、赤血球膜蛋白の解析を経時的に (day0-100) 行った。(東京医科歯科大学臨床研究倫理規定に則り、研究計画書作成し、許可を得た後、患者さんに説明同意を得て、臨床データ・サンプルの解析を行った。)

【結果】

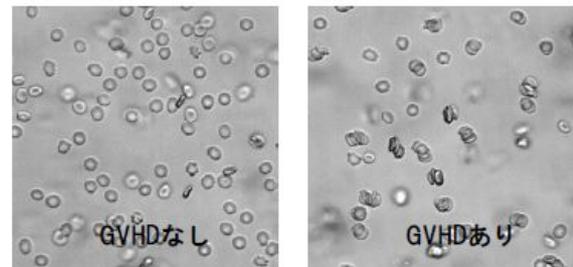


図2: 赤血球連鎖形成

造血幹細胞移植患者 14 名および慢性活動性 EBV 患者(CAEBV)3 名、ネフローゼ症候群 1 名、急性リンパ性白血病 2 名の患者さんを対象とした。

移植後に急性 GVHDgrade2 以上を呈した 10 名全例に急性期に誘電緩和強度の上昇 (緩和周波数の低下) が確認された (図 1)。GVHDgrade0-1 の 4 名中 2 名では誘電緩和強度の上昇は認められなかった。非移植例では化学療法後の敗血症を呈した CAEBV2 例で

誘電緩和強度の上昇が確認された。誘電緩和強度の上昇は臨床検査データの内、軽微な CRP の変化と連動していることが示された。*In vitro* の解析で誘電緩和強度の上昇は赤血球の連鎖形成を反映していることが示された(図2)。また、それは赤血球自体の変化ではなく、液性因子(血漿)に原因があることが示された。

赤血球膜蛋白解析(SDS-PAGE および Western blot 解析)では GVHDgrade3 以上を呈した 7 例中 6 例で band3 の減少が観察された(図3)。

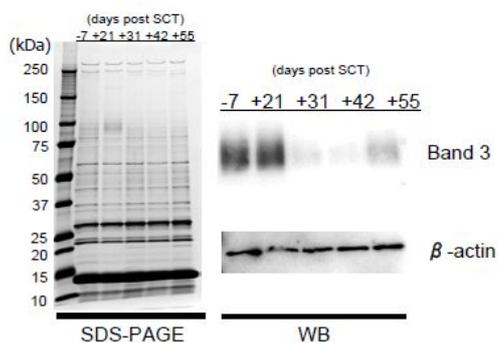


図3: band3 発現の減少

Band3 の減少が認められなかった 1 例は移植後 1 年後の白血病再発に対して DLI を施行した後の GVHDgrade4 症例であった。grade0-2 症例 7 例で膜蛋白変化は観察されなかった。誘電緩和強度の上昇が認められた CAEBV 例でも band3 の減少は認められなかった。Band3 の発現減少が認められた 6 例中 5 例で、後半に 20KDa のバンドが新たに共通して観察された。TOF-MS 解析をおこなったところ 22KDa の PRDX2 の C 末端がなくなった断片であることが判明し、Western blot 解析で確認された。しかし、切断点の同定はできなかった。プロテアーゼ・データベースからの検討でも 20KDa 付近で特異的に切断される配列は同定されなかった(図4)。

細胞質内蛋白であり、生体内で重要な酸化還元緩衝能を担う PRDX2 は酸化されるとダイ

マーを形成し、ヘモグロビンと結合して細胞膜近傍に異動することが報告されている。非還元条件で SDS-PAGE を行うと、band3 の減少に引き続き PRDX2 のダイマー化が観察さ

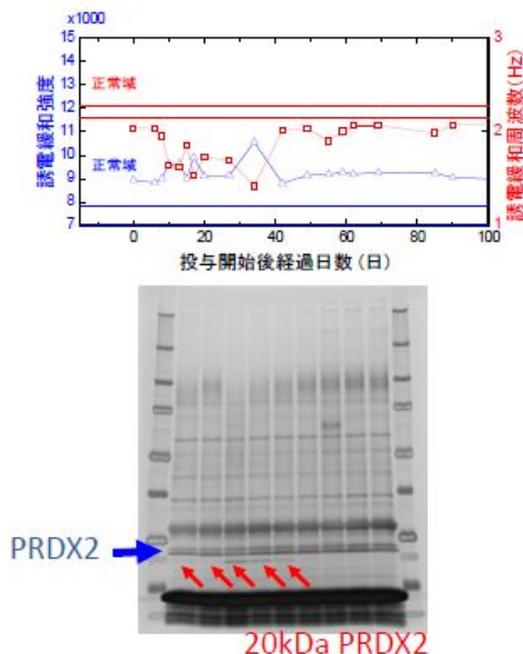


図4: 断片化 PRDX2 の出現

れ、さらに 20KDa-PRDX2 出現が見られることが経時的に観察された(図5)。

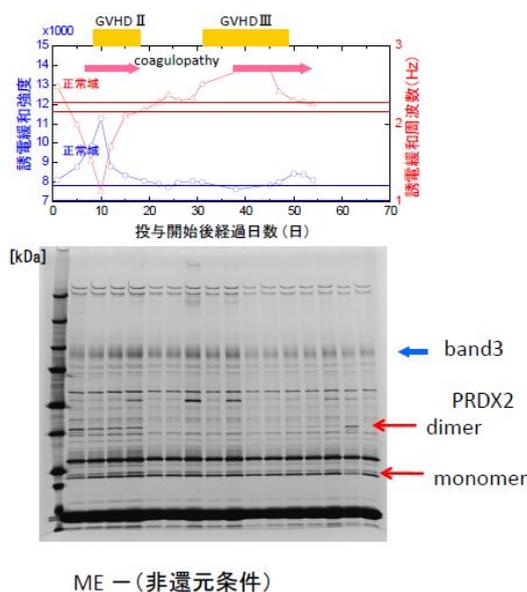


図5: band3 減少と PRDX2 ダイマー化

赤血球を *in vitro* で H₂O₂ 処理した場合、誘電緩和強度の変化はなく、また赤血球形態変化を認めなかったが、高濃度 H₂O₂ 処理で band3

の発現が軽度減少することが観察されたが、PRDX2の断片化は再現されなかった。

次に K562 を hemin 処理して赤血球系に分化させ、H2O2 処理やアポトーシス誘導したが PRDX2 断片化は見られなかった。(この系では K562 に band3 発現を誘導することはできないため、band3 に関する検討はできなかった。)

【移植後の早期 DIC/凝固異常に対するトロンボモジュリン製剤介入による予後改善に関する検討】

2000-2008 年の間に東京医科歯科大学小児科で同種造血幹細胞移植を施行した 60 例について後方視的に解析し、早期 DIC/凝固異常が予後因子になることを示し、リスク要因分析を行い、暫定予後スコア・システムを作成した。そのスコア・システムを用いて早期 DIC/凝固異常に対して 2009-2011 年に同種造血幹細胞移植を行った 30 症例に対してトロンボモジュリン製剤による介入を practice として行い、その臨床経過について、2000-2008 年の 60 例と比較を行った。

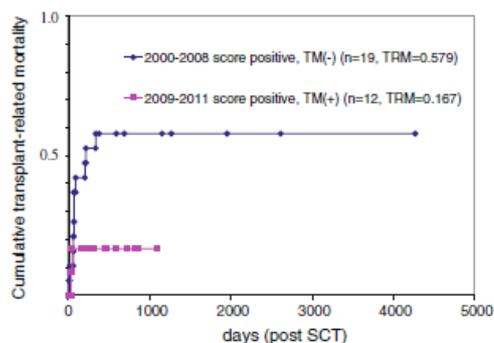


図 6：トロンボモジュリンによる予後改善

詳細については論文化を行った (IJH 2013 ; 98: 533-42) ので参照していただくが、暫定予後スコア・システムによるトロンボモジュリン治療介入を行うことにより、移植関連合併症死を減少できる可能性が示唆された (図 6)。臨床所見・検査の検討では、移植関連合併症の改善は凝固異常の改善に依存する

ことが示されたが、トロンボモジュリンによる抗炎症作用の関与については不明であった。

【慢性 GVHD マウスモデルを用いたリコンビナント・トロンボモジュリン(rTM)の抗炎症作用の検討】

方法

レシピエントマウス(Balb/c wild type)に全身放射線照射(9Gy)を施行し、ドナーマウス(B10D2)の骨髄細胞を輸注する。この系に、脾細胞を輸注すると線維化を伴った慢性 GVHD が移植後 25 日目ごろから誘導されてくる。骨髄移植 8 週目で安楽死させ、血液を採取しリンパ球亜群分析を施行、および GVHD の標的臓器である皮膚、肝臓、肺、消化管について、病理学的に GVHD の進展度をスコア化し、重症度を比較する。

結果

rTM の投与量を 3 段階(0.3、1、3mg/kg)に振り、さらに、投与開始時期を移植日および移植 3 週目の 2 段階とした。移植日から 3mg/kg を投与した群の生存率は有意に低く、高容量の投与は移植成績に悪影響を及ぼす可能性が考えられた。

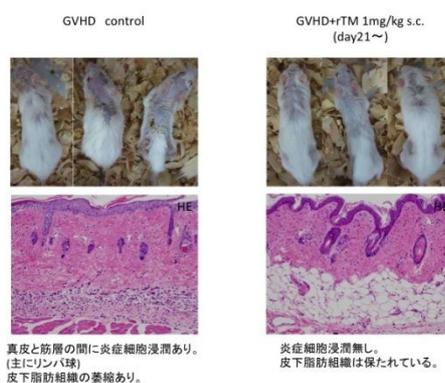


図 7：皮膚病変の改善

一方、1mg/kg を移植 3 週目から投与した群は、GVHD コントロール群と比較して、皮膚 GVHD が軽度であり、病理組織でも皮膚の正常構造が保たれていた (図 7)。生存率に関しては、rTM1、0.3mg/kg 投与群の方が、

GVHD コントロール群と比較して、統計学的有意差は認められないものの良い傾向にあった。

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 12 件)

1:Mitsui-Sekinaka K, Imai K, Sato H, Tomizawa D, Kajiwara M, Nagasawa M, Morio T, Nonoyama S. Clinical features and hematopoietic stem cell transplantation for CD40 ligand deficiency in Japan. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 査読有 2015 (in press)

doi: 10.1016/j.jaci.2015.02.020

2:Ohkawa T, Sugie M, Tomizawa D, Imai K, Nagasawa M, Morio T, Mizutani S, Takagi M. Transient abnormal myelopoiesis in non-Down syndrome neonate. *Pediatrics International* 査読有 2015; 57: e14-17 doi: 10.1111/ped.12500.

3:Okada H, Maru M, Maeda R, Iwasaki F, Masayuki Nagasawa, Takahashi M. Impact of childhood cancer on maternal employment in Japan. *Cancer Nursing* 査読有 2015; 38(1): 23-30 doi: 10.1097/NCC.000000000000123

4:Nakatani K, Imai K, Shigeno M, Sato H, Tezuka M, Okawa T, Mitsuiki N, Isoda T, Tomizawa D, Takagi M, Nagasawa M, Kajiwara M, Yamamoto M, Arai A, Miura O, Kamae C, Nakagawa N, Honma K, Nonoyama S, Mizutani S, Morio T. Cord blood transplantation is associated with rapid B cell neogenesis compared with bone marrow transplantation *Bone Marrow Transplantation* 査読有 2014, 49: 1155-1161 doi: 10.1038/bmt.2014.123

5:Masayuki Nagasawa Ogawa K, Nagata K, Shimizu N. Granulysin and its clinical significance as a biomarker of immune response and NK-cell related neoplasms. *World Journal of Hematology*. 査読有 2014 ; 3(4): 128-137 DOI: 10.5315/wjh.v3.i4.128

6:Okawa T, Ono T, Endo A, Takagi M, Masayuki Nagasawa. Chronic disseminated candidiasis complicated with a ruptured intracranial fungal aneurysm in ALL. *World Journal of Hematology*. 査読有 2014, 3(2):44-48 DOI: <http://dx.doi.org/10.5315/wjh.v3.i2.44>

7:Udagawa T, Motoyoshi Y, Matsumura Y, Takei A, Ariji S, Ito E, ChigaM, Masayuki Nagasawa, Morio T, Mizutani S. Effect of eculizumab and recombinant human soluble thrombomodulin combination therapy in a 7-year-old girl with atypical hemolytic uremic syndrome due to anti-factor H autoantibodies

CEN Case Report 査読有 2014; 3: 110-117 doi:10.1007/s13730-013-0097-7

8:Masayuki Nagasawa , Ohkawa T, Endo A, Mitsuiki N, Ono T, Aoki Y, Isoda T, Tomizawa D, Takagi M, Kajiwara M, Morio T, Mizutani S. Early coagulation disorder after allogeneic stem cell transplantation is a strong prognostic factor for transplantation-related mortality, and intervention with recombinant human thrombomodulin improves the outcome: a single-center experience. *International Journal of Hematology* 査読有 2013 ;98(5):533-42

doi: 10.1007/s12185-013-1443-4.

9:Machida S, Tomizawa D, Tamaichi H, Okawa T, Endo A, Imai K, Nagasawa M, Morio T, Mizutani S, Takagi M. Successful Treatment of Diffuse Large B-Cell Lymphoma in a Patient With Ataxia Telangiectasia Using Rituximab. *Journal of Pediatric Hematology and Oncology* 査読有 2013; 35(6), 482-485 doi : 10.1097/MPH.0b013e3182804d59

10:Isoda T, Mitsuiki N, Ohkawa T, Kaneko S, Endo A, Ono T, Aoki Y, Tomizawa D, Kajiwara M, Araki S, Nagasawa M, Morio T, Takagi M, Mizutani S. Irreversible Leukoencephalopathy After Reduced-intensity Stem Cell

Transplantation in a Dyskeratosis Congenita Patient With TINF2 Mutation. *Journal of Pediatric Hematology and Oncology* 査読有 2013;35(4):e178-82 doi:

[10.1097/MPH.0b013e318279e5ca](https://doi.org/10.1097/MPH.0b013e318279e5ca)

11: Masayuki Nagasawa, Yuki Aoki

A Pediatric Case of Systemic Lupus Erythematosus Developed 10 Years after Cord Blood Transplantation for Juvenile Myelomonocytic Leukemia *Case Reports in*

Transplantation, 査読有. 2012, Article ID

619126, 4 pages, 2012. doi:10.115

[5/2012/619126](https://doi.org/10.1155/2012/619126).

12: Masayuki Nagasawa Epstein-Barr virus associated B cell lymphoma of recipient origin during the elimination of clonally infected T cells by allogeneic stem cell transplantation *Case Reports in Transplantation* 査読有 2012 doi:10.1155/2012/164824

〔学会発表〕(計 5 件)

1: 長澤 正之、水谷 修紀 「誘電率測定に基づく新しい血液凝固検査法」2015 年 5 月 22 日 第 37 回日本血栓止血学会 (甲府)

2: 長澤 正之、宮武浩子 「誘電サイトメトリによる末梢血液細胞および細胞死過程の誘電特性評価」 2014 年 11 月 28 日 第 56 回日本小児血液・がん学会 (岡山)

3: 長澤 正之、宮武 浩子、水谷 修紀 「血液の誘電パラメータ測定を利用した新たな血栓・凝固機能検査の検討」

2012 年 12 月 2 日 第 54 回日本小児血液・がん学会 (横浜)

4: 長澤正之、大川哲平、遠藤明史、満生紀子、小野敏明、青木由貴、磯田健志、富澤大輔、高木正稔、今井耕輔、梶原道子、森尾友宏、水谷修紀 「トロンボモジュリン- α は早期の凝固関連移植合併症死を改善する」

2012 年 11 月 30 日 第 54 回日本小児血液・がん学会 (横浜)

5: 長澤正之、大川哲平、遠藤明史、満生紀子、青木由貴、小野敏明、磯田健志、富澤大輔、

今井耕輔、高木正稔、梶原道子、森尾友宏、水谷修紀、Thrombomodulin- α improves the coagulation disorder associated transplantation-related mortality after allogeneic SCT 2012 年 10 月 21 日 第 74 回日本血液学会 (京都国際会議場)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長澤 正之 (NAGASAWA, Masayuki)
東京医科歯科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：90262196

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：