

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591119
 研究課題名（和文） 骨髄不全症候群における自己免疫性造血障害の新規指標 NKG2D リガンドの臨床的意義
 研究課題名（英文） Clinical significance of NKG2D ligands as a pathognomonic marker for immune-mediated marrow injury in bone marrow failure syndromes
 研究代表者
 川口 辰哉（KAWAGUCHI TATSUYA）
 熊本大学・医学部附属病院・准教授
 研究者番号：50244116

研究成果の概要：再生不良性貧血、発作性夜間ヘモグロビン尿症および不応性貧血は、自己免疫による造血障害を共通の病態発生基盤に持つ難病（骨髄不全症候群とも呼ぶ）であるが、その分子機序の詳細は不明である。本研究では、骨髄不全症候群患者において、我々が提唱する NKG2D 介在性免疫による造血障害機序の実証を試みた。その結果、約半数の患者で血球膜への NKG2D リガンドが発現し、さらに自己 NKG2D 陽性リンパ球により傷害を受けることが判明した。本成果は、NKG2D リガンド発現が自己免疫性造血障害の臨床マーカーとして有用であるのみならず、治療の標的としての可能性を示唆している。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬系

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：骨髄不全症候群、PNH、再生不良性貧血

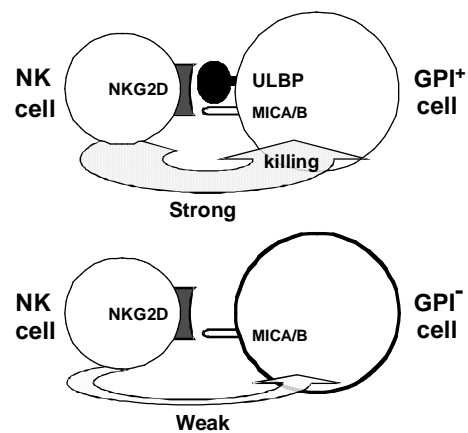
1. 研究開始当初の背景

特発性再生不良性貧血(AA)では、約7～8割の患者に対して抗胸腺細胞グロブリンおよびシクロスポリンを併用した強力な免疫抑制療法が有効であることから、自己免疫による造血障害が指摘されている。その障害機序として、これまで細胞傷害性リンパ球の活性化やタイプIサイトカイン(IFN- γ 、TNF- α)の産生亢進あるいは造血前駆細胞の Fas

発現亢進とアポトーシス誘導などが指摘されてきたが (Young N, N Engl J Med 336:1365-72, 1997)、エフェクター細胞やその標的分子(抗原)の実態をはじめ、未だ不明な点も多い。また、免疫抑制療法により AA 患者は長期生存が可能となったが、シクロスポリン中止による再発や長期投与による日和見感染あるいは腫瘍の合併など臨床上の新たな問題が生じており、免疫抑制剤の

適応の有無あるいは減量・中止を適切に判断できるような、病態を反映した臨床マーカーの探索が望まれる。一方、発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) は造血幹細胞の後天性 *PIG-A* 変異に起因するクローン性疾患であり、変異細胞は GPI アンカー膜蛋白欠損を特徴とする。PNH 患者は汎血球減少を伴い易く、造血不全が本邦での主死因であることや (Nishimura J et al, *Medicine* 83:193-207, 2004)、血球減少が顕著でなくても骨髓 CD34⁺細胞は著減していることから (Iwamoto N, Kawaguchi T et al, *Blood* 87:4944-8, 1996)、多くの患者が潜在的造血不全状態にあると考えられる。しかも免疫抑制療法の有効症例の存在 (Horikawa K et al, *Int J Hematol* 63:165-6, 1996) や造血障害へのアポトーシス関与 (Horikawa K et al, *Blood* 90:2716-22, 1997) などからも、AA と共通した自己免疫による造血障害機序が示唆される。またフローサイトメトリーを用いると、AA や不応性貧血-骨髓異形成症候群 (MDS) の患者でしばしば GPI 蛋白欠損の PNH 細胞が検出されることから (前者で 15~52%, 平均 32%; 後者で 10~23%)、三者のより緊密な関係が確認され、これらはまとめて骨髓不全症候 (BFS) と呼ばれている (Bone Marrow Failure Syndromes. Young N (ed), 2000, W.B. Saunders)。このように BFS では、自己免疫による造血細胞傷害という‘圧力’にもかかわらず PNH 細胞が検出されやすいことから、PNH 細胞は GPI 蛋白欠損という膜特性を利用した免疫回避機構を有することが予測される。我々は、この回避機構が明らかになれば、正常造血細胞が自己免疫の攻撃を回避できない理由(すなわち BFS に共通する特徴的な造血障害機序)も自ずと明らかになると考え、その回避機構解明に取り組んできた。具体的には、これまで GPI 欠損 (PNH 型) 株細胞は正常対照株細胞に比ベナチュラルキラー細胞 (NK) 感受性が低下していることを見だし (Nagakura S et al, *Blood* 100:1031-37, 2002)、その責任分子が GPI 蛋白である UL16 結合蛋白 (ULBP) であること

を実証した (Hanaoka N, Kawaguchi T et al, *Blood* 107:1184-91, 2006)。ULBP は、NKG2D を受容体とする NK 活性化リガンドであり、ペプチドアンカー型の NK 活性化リガンド MICA/B とは受容体を共有する。両リガンド共に、通常では発現せず、感染や腫瘍化などのストレスで発現が誘導されるストレス蛋白とされている。図に示すように、我々が用いた両標的細胞には MICA/B が同程度に発現するのに対し、GPI 欠損細胞は ULBP を発現できないために NK 攻撃を受けにくいことが判明した。



2. 研究の目的

興味深いことに、ULBP や MICA/B は NKG2D を発現した CD8 陽性 T リンパ球 (CTL) や一部の CD4 陽性 T リンパ球の活性化を促すことや、MHC class I の抑制を凌駕して NK を活性化することから (Cosman et al, *Immunity* 14:123-33, 2001)、これら NKG2D リガンドが何らかのストレスにより骨髓不全患者の造血細胞に発現すれば、細胞傷害性リンパ球の標的となりうるということが容易に想像される。事実、一部の PNH 患者血球では NKG2D リガンドが発現することを既に我々は確認している (Hanaoka N, Kawaguchi T et al, *Blood* 107:1184-91, 2006)。そこで本研究では、同様の発現解析を PNH を含めた AA や MDS など BFS 患者に広げ、さらに発現分子が実際に細胞障害に関与するかどうか機能解析を行い、

NKG2D リガンドの病的意義の確立をめざす。次に NKG2D リガンド発現と免疫抑制療法による治療効果との関連を経時的に多症例で観察し、病態を反映した臨床マーカーとしての可能性を追求する。

3. 研究の方法

NKG2D リガンドの発現解析

(1) 血球膜発現解析： 患者およびコントロールドナー(健康人や欠乏性貧血など造血不全以外の原因による貧血患者)より、インフォームドコンセントにより同意を得たのち、ヘパリン添加末梢血または骨髓穿刺液を採取する。前者からデキストラン沈降 / Ficoll 比重遠心法にて末梢血単核球および顆粒球画分を、後者からは Ficoll 比重遠心法にて骨髓単核球画分を得る。これら血球における NKG2D リガンド膜発現を、ULBP (3 種類のサブタイプ ULBP1,2,3) および MICA, MICB に対する単クローン抗体を用いてフローサイトメトリー法で解析する。再生不良性貧血では PNH 型血球が出現しやすいことから、顆粒球に関しては抗 CD59 抗体を用いた 2 色フローサイトメトリーにて GPI 陰性および陽性細胞に分けて、それぞれの NKG2D リガンド発現を解析する。また骨髓単核球に関しては、CD34 陽性細胞における NKG2D リガンド発現を検討する。陽性例に関しては、その発現を経時的に観察する。

(2) 遺伝子発現解析： 上記で得られた血球からグアニジン法により RNA を抽出し、ランダムプライマー存在下に MMLV 由来の逆転写酵素を用いて cDNA に変換する。この cDNA を鋳型に、ULBP1-3 または MICA/B cDNA に相補的なプライマーを用いて半定量的 PCR を実施し、これら遺伝子発現と膜発現との相関の有無を検討する。

NKG2D リガンドの機能解析

NKG2D リガンド発現血球に対する自己の

NKG2D (受容体) 陽性細胞傷害リンパ球 (NK, NKT, CD8⁺T) の傷害作用を、細胞傷害活性測定やコロニー形成阻止能により評価し、NKG2D リガンド発現の造血不全病態への関与を実証する。

(1) 細胞傷害活性測定： NKG2D リガンドが血球膜上に発現すれば、自己の細胞障害性リンパ球による細胞傷害を直接受ける可能性が想定される。そこで、まず NKG2D リガンド発現が確認された患者顆粒球を標的に、自己末梢血リンパ球 (PBMC) による細胞傷害活性を ⁵¹Cr 放出法で測定する。

(2) エフェクター細胞によるコロニー形成阻止作用：

患者骨髓液から分離した骨髓単核細胞(骨髓前駆細胞と自己 NKG2D 陽性リンパ球を含む)を、抗 NKG2D 単クローン抗体存在下および非存在下で一定時間共培養した後に、各種造血サイトカインを含む完全メチルセルロース半流動培地 (MthoCult H4431, Stem Cell technology) に移す。出現したコロニーの種類や数を両者で比較することで、エフェクター細胞による NKG2D-NKG2D リガンド系を介したコロニー形成阻止作用を評価する。

4. 研究成果

(1) 患者血球には NKG2D リガンドが発現する

PNH 患者 19 人における NKG2D リガンド (ULBP1, ULBP2, ULBP3, MICA) の膜発現解析では、各分子がそれぞれ 8 人(42%)、9 人(47%)、10 人(53%)、11 人(58%)に検出された。一方、健康人コントロール 17 人では、MICA のみわずかに発現していた 1 例を除き、他は全く検出されなかった。なお、ULBP2 の膜発現は、同遺伝子の発現亢進によっても裏付けられた。一方、AA や MDS-RA でも同様の解析を行い、NKG2D リガンドのいずれかが発現している割合は、前者で 47 人中 28 人(60%)、後者で 22 人中 8 人(36%)であった。まとめると、88 人の骨髓不全症候群患者の、実に 47 人(53%)で NKG2D リガンド陽性であった。ま

た、12人の患者では、骨髄細胞(一部はCD34細胞)でもNKG2Dリガンド発現が確認された。このように、PNH, AA, MDS-RAなどの骨髄不全症候群では、何らかのストレスにより、造血細胞にNKG2Dリガンドの病的発現が誘導されることが明らかとなった。

(2) NKG2D リガンド発現顆粒球は自己リンパ球による細胞傷害を受ける

健常人および患者より分離した顆粒球を⁵¹Crでラベルし、自己リンパ球(主にNK細胞)と4時間共培養したのち、遊離した⁵¹Crの放射活性を測定した(細胞傷害活性測定)。NKG2Dリガンド発現顆粒球(PNH7例)は自己リンパ球の傷害を受けたが、非発現顆粒球(PNH7例および健常人)は傷害を受けなかった。このex vivoでの結果は、in vivoにおいても、何らかのストレスにより血球にNKG2Dリガンドが発現すれば、NKG2D陽性自己リンパ球の接触により細胞障害を受けることを示唆している。

(3) NKG2D リガンド発現は、コロニー形成を阻害する

末梢血同様に、骨髄でもNKG2Dリガンド発現による細胞傷害が誘導されるかどうか、コロニー形成能を指標に検討した。NKG2Dリガンド発現が確認された患者骨髄単核球(AA1例、PNH2例)を用いたコロニー形成能は、NKG2Dリガンド非発現の健常人コントロールに比べて低下していた。そこで、骨髄単核球を抗NKG2D抗体で前処置した後にコロニー形成能を調べたところ、3例の患者全員で著しく回復していたが、健常人コントロールは影響を受けなかった。以上より、NKG2Dリガンドを発現している骨髄前駆細胞は、骨髄内のNKG2D陽性自己リンパ球により傷害を受けることが示唆された。

このように、少なくとも一部のPNH, AA, MDS-RAの患者では、NKG2D介在性免疫が造血障害発生に深く関与する可能性が示された。
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4件)

1. Hanaoka H, Nakakuma H, Horikawa K, Nagakura S, Tsuzuki Y, Shimanuki M, Kojima K, Yonemura Y and Kawaguchi K. NKG2D-mediated immunity underlying paroxysmal nocturnal haemoglobinuria and related bone marrow failure syndromes. **British Journal of Haematology**, (in press) **2009**.
2. 川口辰哉, 中熊秀喜. 発作性夜間血色素尿症の病態研究と治療の進歩.(特集:骨髄不全症をめぐる最近の進歩)血液・腫瘍科. 56:189-197, 2008. (査読無)
3. Kawaguchi T and Nakakuma H: New insights into molecular pathogenesis of bone marrow failure in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **International Journal of Hematology**, **86: 27-32, 2007**. (査読有)
4. 中熊秀喜, 花岡伸佳, 堀川健太郎, 川口辰哉. 発作性夜間血色素尿症(PNH)の病態、診断と治療. 日本医事新報. No. 4333: 57-62, 2007. (査読無)

[学会発表](計3件)

1. Y. Kanakura, K. Ohyashiki, T. Shichishima, S. Okamoto, K. Ando, H. Ninomiya, T. Kawaguchi, S. Nakao, H. Nakakuma, J. Nishimura, T. Kinoshita, C. Bedrosian, M. Ellen Valentine, K. Ozawa, and M. Omine. Safety and Efficacy of the Terminal Complement Inhibitor Eculizumab in Japanese Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: AEGIS Phase II Clinical Study Results. **50th Annual Meeting of the American Society of Hematology**. Dec 6-9, 2008 San Francisco, California, USA.
2. 中熊秀喜, 花岡伸佳, 川口辰哉, 島貫栄弥, 小島研介, 米村雄士, 堀川健太郎. PNHや再生不良性貧血ではNKG2D介在性免疫による造血障害が発生する. **第70回日本血液学会**, 2008.10.10-12. 京都
3. Nobuyoshi Hanaoka, Tatsuya Kawaguchi, Kentaro Horikawa, Shoichi Nagakura,

Sonoko Ishihara, Yasuchika Tsuzuki,
Yuji Yonemura, Hideki Nakakuma:
NKG2D-mediated marrow injury in
paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and
its related disorders. **49th Annual
Meeting of the American Society of
Hematology.**

Dec 9-12, 2007 Atlanta, Georgia, USA.

[その他]

1. 川口辰哉. 「難治性造血障害におけるヒト
CMV 糖蛋白 UL16 結合蛋白(ULBP)発現
の病的意義」 第5回感染病態研究会.
2007年9月1~2日 熊本

6 . 研究組織

(1)研究代表者

川口 辰哉 (KAWAGUCHI TATSUYA)
熊本大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号 : 50244116

(2)研究分担者

(3)連携研究者

堀川 健太郎 (HORIKAWA KENTARO) (2007
年度は研究分担者)
熊本大学・大学院医学薬学研究部・助教
研究者番号 : 40322309