

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08821

研究課題名(和文) 骨髄異形成症候群の造血障害・遺伝子変異細胞クローン性拡大とNKG2D免疫との関連

研究課題名(英文) Role of NKG2D immunity in myelodysplastic syndrome

研究代表者

園木 孝志 (Sonoki, Takashi)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30382336

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)：(1) 骨髄異形成症候群(MDS)患者と健常者の血清sNKG2DLs値を測定した。健常者と比較しMDS患者では血清sNKG2DL値は低値であった。既報によると、MDSと同様の骨髄不全を呈する再生不良性貧血(AA)患者や発作性夜間血色素尿症(PNH)患者の血清sNKG2DLは健常者より高値であることが示されている。この結果から、血清sNKG2DL値はMDSとAAおよびPNHの鑑別に有用であることが示唆された。(2) MDS患者に新たな遺伝子変異を同定しモデルマウスを作成した。このマウスは造血不全と腸炎を発症した。異常血球が腸炎発症に重要であることを確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄異形成症候群(MDS)は、高齢者に好発する難治性血液疾患で、血球数低下をきたし、時に自己炎症性疾患を併発する。MDSの血球数低下には免疫介在性細胞障害が関与している。私達はMDSにおけるNK免疫の関与を調べるために、患者血清のNKG2Dリガンド値を調べた。その結果、MDS患者の血清NKG2Dリガンド値は健常人よりも低値であることがわかった。この結果は血球数低下をきたす類似疾患(再生不良性貧血や発作性夜間血色素尿症)と異なっており、鑑別診断に有用である。また、MDSのモデルマウスを作成したところ、血球数低下の他、自己炎症性腸炎を発症した。このマウスはMDSの免疫病態を調べる上で有用である。

研究成果の概要(英文)：(1) Serum sNKG2DLs levels were measured in patients with myelodysplastic syndrome (MDS) and healthy subjects. Serum sNKG2DLs levels were lower in MDS patients than in healthy subjects. Previous reports have shown that serum sNKG2DLs were higher in aplastic anemia (AA) and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) patients with bone marrow failure than in normal subjects. These results suggest that serum sNKG2DL levels may be useful in differentiating MDS from AA and PNH. (2) We identified a new genetic mutation in a patient with MDS and created a mouse model. These mice developed hematopoietic failure and enteritis. We confirmed that abnormal blood cells are important in the development of enteritis.

研究分野：血液内科

キーワード：骨髄異形成症候群 NKG2D免疫 自己炎症性腸疾患

1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群 (Myelodysplastic syndrome; MDS) は造血前駆細胞に生じた後天性遺伝子異常を背景に、造血障害による血球減少と遺伝子変異細胞のクローン性拡大による腫瘍化を特徴とする。また、時にスイート症候群のような免疫異常を伴う。高齢者や抗がん剤・放射線に暴露歴のある者に好発し患者数は増加している。先行研究により MDS を含む骨髄不全症候群 (Bone marrow failure syndrome; BFS) の造血障害には種々の免疫介在性細胞傷害に関わることが明らかとなった。BFS 病態形成に関わる免疫介在性細胞障害のうち、私達は NKG2D (Natural Killer Group 2D) 介在性免疫の関与に着目した。NKG2D 介在性免疫は、何らかの異常をきたした細胞の膜表面に出現する NKG2D ligands (NKG2DLs) に NK 細胞の NKG2D が結合して、異常細胞を傷害する免疫機構である。異常細胞が傷害されると、異常細胞膜上の NKG2D ligands (NKG2DLs) は一部剥がれ落ちて血液などの体液中に流出する (soluble NKG2DLs, sNKG2DLs)。これまでに私達は 15 名の MDS 患者を含む 79 名の BFS 患者を対象に血清中の sNKG2DL を測定した。そのうち約 5 割の患者が sNKG2DL 陽性で (右上図) sNKG2DL 陽性と血球減少に相関があることを見つけた (Murata S, Sonoki T. 他、日本血液学会, 2015 年、金沢)。この研究で MDS の血球減少と sNKG2DL との関連が示唆されたが、検討数が少なく sNKG2DL と既存の MDS リスク分類や治療反応性・予後との検討は不十分であった。

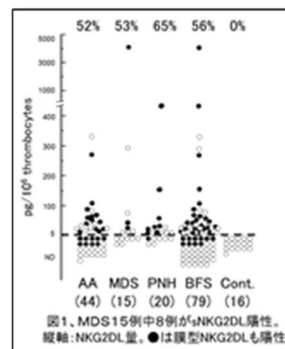


図1. MDS 15例中8例がsNKG2DL陽性。縦軸: NKG2DL量。●は異型NKG2DLも陽性

一方、私達は若年発症 MDS 患者に LIG4 (DNA ligase IV) 遺伝子の新規変異を報告した (Tamura S, Sonoki T. 他、Int Med. 2017)。LIG4 は二重鎖 DNA 切断修復酵素で、本酵素機能低下は様々な遺伝子変異を惹起する。本患者の LIG4 変異を模した lig4 変異マウスを作成したところ、骨髄細胞密度低下・白血球数低下・MDS 類似形態異常を示す白血球を生じた (左図)。lig4 変異マウスは免疫グロブリン遺伝子および T 細胞受容体遺伝子の遺伝子再構成に障害があるため、B 細胞や T 細胞は成熟せず、B 細胞が関与する液性免疫や T 細胞が関与する細胞性免疫に機能不全がある。しかし、NK 細胞が関与する NKG2D 介在性免疫は維持されている。したがって、私達は lig4 変異マウスにおける MDS 病態形成には NKG2D 介在性免疫が深く関与していると考えた。

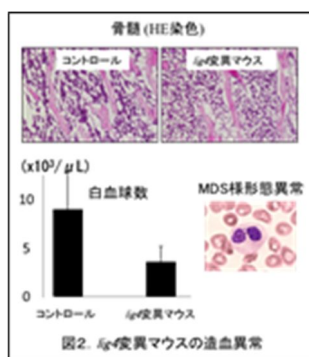


図2. lig4変異マウスの造血異常

図2. lig4変異マウスの造血異常 (x10⁴/μL) 白血球数 MDS 様形態異常

2. 研究の目的

- (1) MDS 診療における sNKG2DL の臨床的意義を確立し、MDS の新たな病勢診断や NKG2D を標的とした治療へむすびつける。
- (2) lig4 変異マウスにおける造血障害および遺伝子変異細胞のクローン性拡大と NKG2D 免疫との関連性をとらえ、実地臨床に応用する。

3. 研究の方法

(1) MDS における患者 sNKG2DL 値と臨床像

本学倫理委員会の承認後、患者や健康人に十分なインフォームドコンセントを行って本研究を開始した。MDS 患者 65 名と健康者 10 名の血清 sNKG2DLs (sULBP-1,3, sMICA/B) 値を Enzyme linked immunoassay (ELISA) 法で調べた。また MDS 患者 10 名では骨髄液中の sULBP-1 値を ELISA 法にて測定した。MDS 患者については、診療記録をもとに、血球数・芽球数・核型異常・生命予後を後方視的に調べた。MDS における造血障害への関与を検討した。

(2) lig4 変異マウス

Lig4 変異マウスはゲノム編集法を用いて、変異を片方のアレルに入れたマウス (ヘテロ変異マウス) 両方のアレルに入れたマウス (ホモ変異マウス) を作成した。経時的に白血球数、ヘモグロビン値、血小板数を測定した。骨髄細胞、腸管細胞を採取しフローサイトメトリーで細胞の表面抗原を調べた。8 週齢のマウスから骨髄細胞を採取して、放射線照射して自己造血系を破壊した同系マウスに輸注し骨髄移植モデルマウスを作成した。

4. 研究成果

(1) MDS における患者 sNKG2DL 値と臨床像

健常者と比較し、MDS 患者では血清 sNKG2DL (sULBP-1,3, sMICA/B) の発現量は有意に低値であった ($P < 0.01$)。また、MDS 患者 10 名の骨髄 sULBP-1 の発現量は血清 sULBP-1 と比較し、有意に高値であった ($P < 0.01$)。芽球増加を伴う excess blasts group (EB-1, 2) とその他の群で sNKG2DLs の発現量に差は認めなかった。MDS 患者では血清中の sNKG2DL 発現が有意に低下していた。AA, PNH 患者での sNKG2DLs 陽性率と異なる結果であり、今後、分子メカニズムを解明し、MDS と他の BFS の鑑別に応用したい。

(2) lig4 変異マウスにおける造血障害と免疫異常

ホモマウスでは白血球数の低下が観察された。また、ホモマウスの骨髄細胞では造血幹細胞や骨髄球・単球系前駆細胞を含んだ Lin-/Sca-1+/c-Kit+ 分画 (右上図、P 4 分画) は増加し、骨髄球・赤芽球系細胞や顆粒球・単球系前駆細胞を含んだ Lin-/Sca-1-/c-Kit+ 分画 (右下図、P 3 分画) は減少していた。このことは lig4 変異マウスでは骨髄における好中球への分化が阻害されていることが推測された。

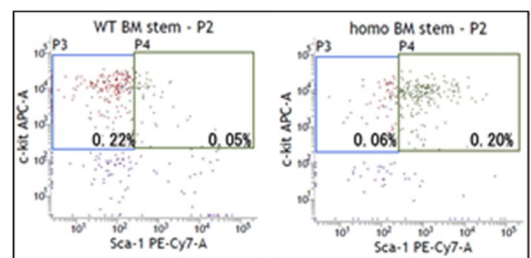
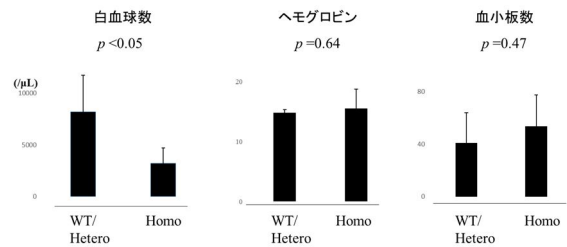
Lig4 変異マウスにみられた造血障害における NKG2D 介在性免疫機構の関与を調べるために NKG2D に対する抗体を添加した培地を用いたコロニーアッセイを行った。しかし、現時点で有意なコロニー造成の見所は得られなかった。

Lig4 変異ホモマウスは 3 週齢を過ぎるころから早期に死亡することがわかった (下図左)。この時期に血球異常は顕著ではなく、造血不全による死亡ではなかった。

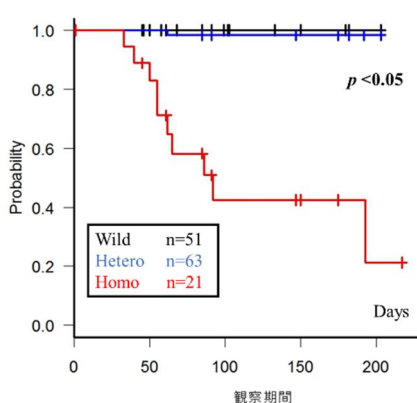
死亡マウスを剖検すると、大腸に粘膜浮腫、腸管組織に炎症性細胞の浸潤、等の炎症性腸疾患に類似した所見があり (下図右)、lig4 変異ホモマウスの死因は腸炎であることが判明した。Lig4 変異ホモマウスの骨髄細胞を放射線照射した同系野生型マウスに骨髄移植をおこなうと、同様の炎症性腸疾患を発症した。このことから当該変異マウスにみられる炎症性腸疾患は異常血球に由来するものと考えられた。現在、腸炎を引き起こしている責任細胞の同定を試みている。

最近になって、再発性軟骨炎が骨髄異形成症候群由来の異常血球によるものが明らかにされ、VEXAS 症候群 (vacuoles, E1 enzyme, X-linked, autoinflammatory, somatic syndrome) と命名された。またクローナル造血は心血管系の炎症を惹起し心血管イベントの有意な危険因子であることが判明している。私達のモデルマウスは骨髄異形成症候群と自己炎症の関連を解析するうえでも有用である。

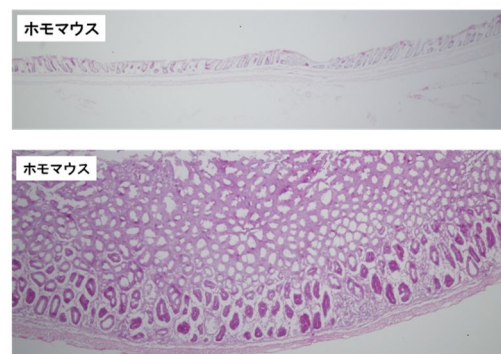
20週齢の末梢血の血球数の比較



Lig4変異マウス 生存曲線



高齢のLig4変異ホモマウスマウスにおける腸管病変



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yamashita Y, Morita S, Hosoi H, Kobata H, Kishimoto S, Ishibashi T, Mishima H, Kinoshita A, Backes BJ, Yoshiura KI, Papa FR, Sonoki T, Tamura S	4. 巻 Aug 31;21(17)
2. 論文標題 Targeting Adaptive IRE1 Signaling and PLK2 in Multiple Myeloma: Possible Anti-Tumor Mechanisms of KIRA8 and Nilotinib.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 E6314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21176314	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 該当する

1. 著者名 Hosoi H, Niibori-Nambu Akiko, Nah GSS, Bahirvani AG, Mok MMH, Sanda T, Kumar AP, Tenen DG, Ito Y, Sonoki T, Osato M.	4. 巻 774
2. 論文標題 Super-enhancers for RUNX3 are required for cell proliferation in EBV-infected B cell lines.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 145421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gene.2021.145421.	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 該当する

1. 著者名 Murata S, Mushino T, Hosoi H, Kuriyama K, Nishikawa A, Nagakura S, Horikawa K, Yonemura Y, Nakakuma H, Sonoki T, Hanaoka N.	4. 巻 143(1)
2. 論文標題 Soluble NKG2D Ligands Are Potential Biomarkers and Sentinels of Immune-Mediated Bone Marrow Injury in Bone Marrow Failure Syndromes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Haematol.	6. 最初と最後の頁 33-39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000500657	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 Siddique SM, Kubouchi K, Shinmichi Y, Sawada N, Sugiura R, Itoh Y, Uehara S, Nishimura K, Okamura S, Ohsaki H, Kamoshida S, Yamashita Y, Tamura S, Sonoki T, Matsuoka H, Itoh T, Mukai H.	4. 巻 27;9(1)
2. 論文標題 PKN1 kinase-negative knock-in mice develop splenomegaly and leukopenia at advanced age without obvious autoimmune-like phenotypes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 13977-13993
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-50419-2.	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 Yamashita Y, Nishikawa A, Iwahashi Y, Fujimoto M, Sasaki I, Mishima H, Kinoshita A, Hemmi H, Kanazawa N, Ohshima K, Imadome KI, Murata SI, Yoshiura KI, Kaisho T, Sonoki T, Tamura S.	4. 巻 109(6)
2. 論文標題 Identification of a novel CCDC22 mutation in a patient with severe Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis and aggressive natural killer cell leukemia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Hematol.	6. 最初と最後の頁 744-750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-019-02595-0	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3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Tamura S, Yamashita Y, Orimo T, Iwabuchi S, Nakashima K, Sasaki I, Hemmi H, Hashimoto S, Ohshima K, Kaisho T, Sonoki T
2. 発表標題 Pathological characterization of Th1-mediated colitis based on primary immunodeficiency
3. 学会等名 日本血液学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下友佑、森田修平、細井裕樹、赤水尚史、園木孝志、田村志宣
2. 発表標題 ERストレスセンサー新規阻害薬KIRA8はIRE1 XBP1/PLK2 axisを制御することで抗骨髄腫作用を誘導する
3. 学会等名 日本血液学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田村志宣, 山下友佑, 折茂貴是, 福田有里, 小笹俊哉, 中嶋一貴, 金澤伸雄, 邊見弘明, 大島孝一, 改正恒康, 園木孝志
2. 発表標題 DNA損傷修復障害モデルマウスを用いた腸管免疫寛容破綻の病態解明
3. 学会等名 第47回日本臨床免疫学会総会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------