

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390309

研究課題名（和文）小児再生不良性貧血の造血障害メカニズム—制御性T細胞の関与

研究課題名（英文）Association of regulatory T cells to etiology of children with aplastic anemia

研究代表者

小島 勢二 (Seiji Kojima)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20313992

研究成果の概要（和文）：

再生不良性貧血患児および健常人末梢血単核球を分離し CD4, CD25, Foxp3 抗体をもちいたフローサイトメトリー法によって、治療前、IST 後、移植後の Treg 変化を検討した。小児再不貧血者における治療前末消血中の CD4+/CD25+/FOXP3+制御性 T 細胞は正常対象者と比較して有意に低く、また IST6 ヶ月後、SCT100 日以後において Treg は有意に回復していた。再生不良性貧血患者における病態において Treg の関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the number of Tregs in children with aplastic anemia before and after IST or SCT. Fifty children with severe and very severe AA were enrolled in this study from 2007 to 2010. Surface CD4, CD25 and intracellular FOXP3 expression were examined in peripheral blood mononuclear cells by 3-color flow cytometry. The number of CD4+CD25+FOXP3+ Tregs is significantly decreased in patients at diagnosis as compared with normal control. The number of Tregs were significantly increased either after IST or after SCT.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2010 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
総計	10,600,000	3,180,000	13,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：Aplastic anemia, regulatory T cell, antithymocyte globulin

## 1. 研究開始当初の背景

再不貧はその重篤な生命予後から、小児においては白血病と並ぶ代表的な血液難病である。家族内に HLA 適合ドナーが得られない患児に対しては、ATG による免疫抑制療法がおこなわれている。わが国では、申請者が中心となり、日本小児再生不良性治療研究会が組織され、1992 年から、全国規模の前方視的多施設共同研究がおこなわれている。

(Kojima S et al, Blood96:2049, 2000 ; Kojima S et al, Blood100:786, 2002 ; Kosaka

Y, Kojima S et al, Blood 111: 2008:1054, 2008) . 小児再不貧患者においては、その 60-70%が免疫抑制療法に反応することから造血障害に免疫機序が関与すると考えられる。しかし、申請者等が発見した再不貧患者に特異的な自己抗体 (Hirano N, Kojima S et al, Blood102:4567, 2003, Hirano S, Kojima S et al, Br J Haematol128, 221, 2005) が、治療反応性を予測できるか前方視的に検討したが予測因子

にはなりえなかった。(Yoshida N, Kojima S et al, Br J Haematol 2008). 免疫機序を介した再不貧は、造血幹細胞を標的とした自己免疫疾患と考えられ、活性化した細胞障害性 T 細胞クローンの存在も証明されているが、なぜ活性化 T 細胞クローンが出現するかについてはあきらかでない。骨髄間葉系幹細胞 (MSC) に T 細胞機能を抑制する作用があることから、MSC の機能低下は T 細胞を活性化する可能性が考えられる。そこで、再不貧患者由来の MSC の T 細胞機能の抑制効果を検討したが健康人由来の骨髄 MSC と比較して免疫抑制効果には差がみられなかった。(Xu Y, Kojima S et al, Int J Hematol 89, 126, 2009).

Treg は生体のホメオスタシスを担っており、その減少や機能の低下は自己免疫疾患を惹起すると考えられている。マウスでは CD8+CD122+細胞に Treg 機能があることが報告され、(Rifa' I M, Suzuki H et al, J Exp Med 200, 1123, 2004; Endharti AT, Suzuki H et al, J Immunol 175, 7093, 2005; Shi Z, Suzuki H et al. J Immunol 175, 7093, 2005; Shi Z, Suzuki H et al 124, 121, 2008). マウス CD8+CD122+Treg に相当するヒト Treg は不明であるが、ヒト CD8T 細胞に IL-10 産生能を有する制御性 T 細胞分画が存在する。

Treg の ex vivo での増幅方法は、すでに開発されており、その減少や機能障害が再不貧の病因に関与することが判明すれば、治療への応用の道は開けている。

また、抗胸腺免疫グロブリン (ATG) は免疫抑制剤として再不貧の治療における Key drug であるが、T 細胞を傷害するほか in vitro で Treg を誘導することが報告され (Feng X, et al, Blood 111, 3675, 2008; Ruzek MC et al, Blood 111, 1726, 2008)、生体においても ATG の効果を発揮するのに Treg が関与している可能性がある。

## 2. 研究の目的

免疫機序を介した再生不良性貧血 (再不貧) は、造血幹細胞を標的とした自己免疫疾患と考えられ、活性化した細胞傷害性 T 細胞クローンの存在も証明されているが、なぜ活性化 T 細胞クローンが出現するかについては明かでない。

制御性 T 細胞 (Treg) は生体のホメオスタシスを担っており、その減少や機能の低下は自己免疫疾患を惹起すると考えられている。CD4+CD25+Foxp3Treg について、いくつかの自己免疫疾患において、数の減少や低下が報告されている。Tr1 は Treg とは異なり、末梢における suboptimal な抗原刺激や IL10 等のサイトカイン存在下で誘導され、特定の抗原を認識して免疫抑制作用を発揮する。最近、CD8 陽性細胞にも CD4 陽性細胞に相当する Treg

が存在することが明らかになった。これら Treg の ex vivo での増幅方法はすでに開発されており、その減少や機能障害が再不貧の原因に関与することが判明すれば、治療への応用の道が開ける。本研究では、治療前後の再不貧患者における Treg の動態を検討することで、Treg が再不貧の原因に関与しているかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 再不貧患者および健康人コントロールにおける Treg 数の検討: CD4+CD25+Foxp3+T 細胞: 末梢血単核球を分離し CD4, CD25, Foxp3 抗体で 3 重染色しフローサイトメトリーで測定する。

(2) サイトカイン産生能: CD8Treg については各種サイトカインの産生がその指標になることから、抗 CD3/CD28 イムノビーズ

(Invitrogen) で 4 日間刺激した後に、抗 IL10, INF- $\gamma$  抗体を用いて細胞内サイトカインを染色し、フローサイトメトリーで測定する。

(3) 抗胸腺免疫グロブリン (ATG) を含む免疫抑制療法の前後において Treg の数、サイトカイン産生能の変化を測定し、治療効果との相関について検討する。

## 4. 研究成果

(1) 小児再生不良性貧血患者における、治療前、免疫抑制療法 (IST) 後、骨髄移植 (SCT) 後における Treg の検討:

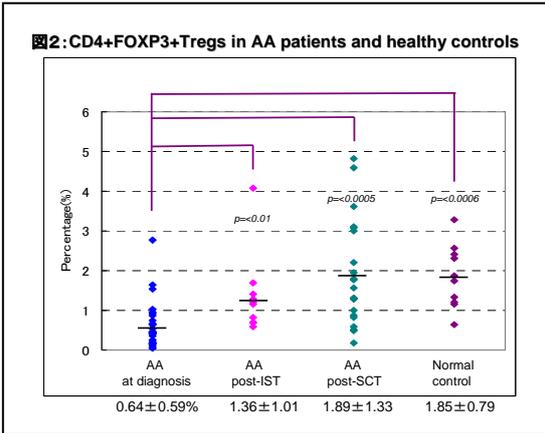
名古屋大学小児科で 2007 年から 2010 年に治療を行なった小児再生不良性貧血 50 人を対象として治療前およびウマ由来 ATG (Lymphoglobulin®, Genzyme) による IST6 ヶ月後、SCT100 日以後の末梢血における CD4+/CD25+/FOXP3+T 細胞の測定を行なった (図 1)。

図 1: 患者背景

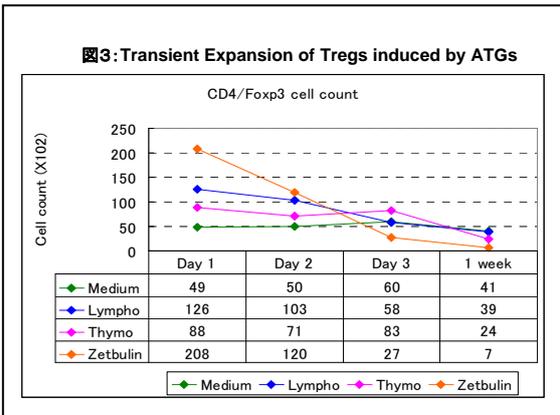
<b>AA at diagnosis:</b>		<b>n=21</b>
F/M		10/11
Median of age		9 (1-14)
VSAA		10
SAA		6
Moderate		4
Post-hepatitis		1
Idiopathic		20
<b>AA post-IST:</b>		<b>n=10</b>
F/M		3/7
Median of age		19 (6-22)
Post-hepatitis		1
Idiopathic		9
Period between treatment and study		15 months (6-29)
<b>AA post-transplanted group:</b>		<b>n=19</b>
F/M		7/12
Median of age		12 (4-23)
Idiopathic		19
Period between transplant and study		33 months (11-52)

小児再不貧患者における治療前末梢血中の CD4+/CD25+/FOXP3+ 制御性 T 細胞は  $0.64 \pm 0.59\%$  と正常対象者の  $1.85 \pm 0.79\%$  と比較して有意に低かった ( $p=0.0006$ )。また IST6 ヶ月後、SCT100 日以後において Treg は  $1.36 \pm 1.01\%$  ( $p=0.01$ ),  $1.89 \pm 1.33\%$

( $p=0.0005$ ) と有意に回復していた。(図2)



(2) 研究期間中にわが国における再不貧の治療に用いられていたウマ由来 ATG (Lymphoglobulin®, Genzyme) の製造・供給が中止され、代わりにウサギ由来 (Thymoglobulin®, Genzyme, Zetbulin®, Fresenius) が 1st ライン治療に使用されることとなった。ウマ ATG およびウサギ ATG が Treg に及ぼす影響の差を検討する目的で、in vitro におけるウマ由来 ATG, ウサギ由来 ATG のリンパ球における Treg の影響を検討した。(図3)

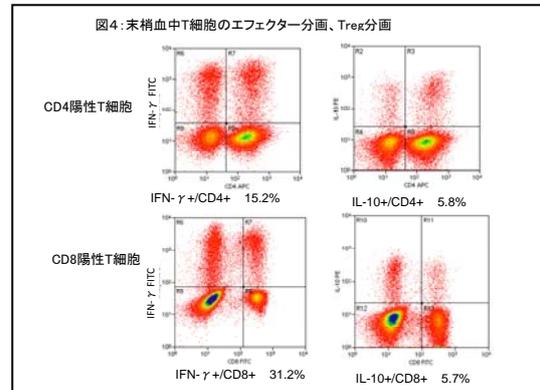


それぞれの製剤において Treg 増幅効果を認める至適濃度 (Lymphoglobulin: 2.5  $\mu$ g/ml, Thymoglobulin: 0.05  $\mu$ g/ml, Zetbulin: 50  $\mu$ g/ml) で検討したところ、いずれの製剤においても 1 日目に最大の Treg 数の増加を認めた。しかし、その効果は一過性で 1 週間以内に消失した。

(3) IL-10 産生 CD8T 細胞測定法の検討:

マウスとヒトの両方で CD8Treg が IL-10 を産生すること、IL-10 ノックアウトマウスにおいては、CD8Treg による免疫抑制効果が失われることから、CD8 陽性 T 細胞中の内在性 IL-10 陽性細胞の数は CD8Treg の数と相関することが推測される。我々は、CD8Treg 数の測定法として、末梢血単核球を CD3/CD28 磁

気ビーズを用いて刺激し、フローサイトメトリ法を用いて内在性 IL-10 陽性 CD8 T 細胞を同定する手技を確立した (図4)。正常健康成人においては IL-10 陽性 CD8 T 細胞は中央値 5.1% (1.2-6.8%) であった。また IL-10 産生 CD8T 細胞の他に、IL-10 産生 CD4T 細胞、IFN $\gamma$  産生エフェクター CD8T 細胞、IFN $\gamma$  産生エフェクター CD4T 細胞も同時に測定が可能である。



(4) ウサギ ATG による国際無作為割付前向き臨床試験試験:

製薬会社の供給中止により、わが国における再不貧に対する IST はウマ由来からウサギ由来 ATG が使用されることとなったが、1st ライン治療としての適正量は明らかでない。

小島が研究責任者として、重症および最重症再生不良性貧血患者に対するウサギ抗胸腺細胞グロブリン (サイモグロブリン®, Genzyme) 前方視的ランダム化用量比較多施設共同研究を日本、中国、韓国の血液内科、小児血液腫瘍科との国際共同臨床試験として倫理委員会で承認され平成 24 年度より開始する。名古屋大学小児科は、事務局、中央診断施設、ウイルス定量および Treg 同定の中央検査施設として AA 患者における Treg の関与に関して附随研究を行う。

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 33 件) 全て査読有り

- 1) Kimura H, Takahashi Y (13 人中 5 番目), Kojima S (13 人中 6 番目), et al. Epstein - Barr virus (EBV)-associated T/NK lymphoproliferative diseases in non - immunocompromised hosts : prospective analysis of 108 cases. Blood. 2012 ;119(3):673-86.
- 2) Yagasaki H, Kojima S (11 人中 2 番目), et al. Acceptable HLA-mismatching in unrelated donor bone marrow transplantation for patients with

- acquired severe aplastic anemia. Blood. 2011;118(11):3186-3190.
- 3) Kojima S (12人中1番目), et al. The Third Consensus Conference on the treatment of aplastic anemia. Int J Hematol. 2011;93(6):832-7.
  - 4) Nishio N, Takahashi Y (11人中2番目), Kojima S (11人中11番目), et al. Aberrant phosphorylation of STAT5 by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in infant cytomegalovirus infection mimicking juvenile myelomonocytic leukemia. Leuk Res. 2011;35(9):1261-4.
  - 5) Kamio T, Kojima S (21人中20番目), et al. Relapse of aplastic anemia in children after immunosuppressive therapy: a report from the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. Haematologica. 2011;96(6):814-9.
  - 6) Yoshida N, Takahashi Y (12人中4番目), Kojima S (12人中12番目), et al. Predicting response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. Haematologica. 2011;96(5):771-4.
  - 7) Nishio N, Takahashi Y (9人中2番目), Kojima S (9人中9番目), et al. Reduced-intensity conditioning for alternative donor hematopoietic stem cell transplantation in patients with dyskeratosis congenita. Pediatr Transplant. 2011;15(2):161-6.
  - 8) Takagi M, Kojima S (15人中13番目), et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease with somatic KRAS mutation. Blood. 2011;117(10):2887-90.
  - 9) Pulsipher MA, Kojima S (17人中8番目), et al. Optimization of Therapy for Severe Aplastic Anemia Based on Clinical, Biological and Treatment Response Parameters: Conclusions of an International Working Group on Severe Aplastic Anemia Convened by the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network, March 2010. Biol Blood Marrow Transplant. 2011;17(3):291-9.
  - 10) Nishio N, Kojima S. Recent progress in dyskeratosis congenita. Int J Hematol. 2010;92(3):419-24.
  - 11) Kanazaki R, Kojima S (20人中18番目), et al. Down syndrome and GATA1 mutations in transient abnormal myeloproliferative disorder: mutation classes correlate with progression to myeloid leukemia. Blood. 2010;116(22):4631-4638.
  - 12) Yagasaki H, Takahashi Y (13人中2番目), Kojima S (13人中13番目), et al. Comparison of matched-sibling donor BMT and unrelated donor BMT in children and adolescent with acquired severe aplastic anemia. Bone Marrow Transplant. 2010;45(10):1508-13.
  - 13) Konno Y, Kojima S (20人中10番目), et al. Mutations in the ribosomal protein genes in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. Haematologica. 2010;95(8):1293-9.
  - 14) Villalobos IB, Takahashi Y (11人中2番目), Kojima S (11人中11番目), et al. Relapse of leukemia with loss of mismatched HLA resulting from uniparental disomy after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. Blood. 2010;115(15):3158-61.
  - 15) Muramatsu H, Takahashi Y (14人中10番目), Kojima S (14人中13番目), et al. Mutations of E3 ubiquitin ligase Cbl family members but not TET2 mutations are pathogenic in juvenile myelomonocytic leukemia. Blood. 2010;115(10):1969-75.
  - 16) Xu Y, Takahashi Y (11人中2番目), Kojima S (11人中11番目), et al. Downregulation of GATA-2 and Overexpression of Adipogenic Gene-PPARGamma in Mesenchymal Stem Cells from Patients with Aplastic Anaemia. Exp Hematol. 2009;37(12):1393-9.
  - 17) Nishio N, Takahashi Y (8人中3番目), Kojima S (8人中8番目), et al. Natural history of transfusion-independent non-severe aplastic anemia in children. Int J Hematol. 2009;89(4):409-13.
  - 18) Xu Y, Takahashi Y (2番目), Kojima S (6人中6番目), et al. Immunosuppressive activity of mesenchymal stem cells is not decreased in children with aplastic anemia. Int J Hematol. 2009;89(1):126-7.
- [学会発表] (計 32 件)
- 1) Muramatsu H. Allogeneic bone marrow transplantation from HLA mismatched family donors in children

- with aplastic anemia. The 53rd ASH Annual Meeting. Dec. 12, 2011. San Diego, USA.
- 2) Hama A. Comparison of clinical outcome between children with aplastic anemia and refractory cytopenia of childhood who received immunosuppressive therapy with antithymocyte globulin and cyclosporine. The 53rd ASH Annual Meeting. Dec. 11, 2011. San Diego, USA.
  - 3) Takahashi Y. Immunosuppressive therapy with rabbit antithymocyte globulin for acquired aplastic anemia. シンポジウム 10、Treatment of Bone Marrow Failure Syndrome、第 73 回日本血液学会学術集会、2011.10.14、名古屋国際会議場、名古屋（英語）
  - 4) Takahashi Y. Pediatric Aplastic Anemia - Immunosuppressive Therapy. 2011.05.20. The 2011 Asia-Pacific transplant and hematology forum, The Westin Bund Center, Shanghai, China
  - 5) Kojima S (招待演者). Advances in Pediatric Leukemia, Bone Marrow Failure and Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Japan: Past, Present and Future. Texas Children's Cancer Center weekly research seminar series. Dec. 9, 2010. Texas Children's Cancer Center (Houston, USA)
  - 6) Kojima S (招待演者). Unmanipulated haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. Haploidentical Transplantation-Asia Pacific Meeting Seminar 2010. Sep. 23, 2010. Asan Medical Center (Seoul, Korea)
  - 7) Kojima S (招待演者). 小児再生不良性貧血の診断と治療。小児血液病教育セミナー、天津、中国、2009年9月
  - 8) Kojima S (招待演者). The role of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with severe aplastic anemia. 14th congress of the APBMT. Seoul, Korea, 2009.8.27-29.
  - 9) Kojima S (招待演者). Future step in the treatment of SAA. 5th international congress on Pediatric MDS and Bone Marrow Failure Syndromes 2009. Rotterdam, Netherlands, 2009.4.21-24.

- 1) 小島勢二、他. 血液専門医テキスト：小児特発性再生不良性貧血. p181-184, 南江堂. 2011.
- 2) 小島勢二、他. 難治性貧血の診療ガイド：先天性骨髄不全症候群. P195-236, 南江堂. 2011.
- 3) 小澤敬也、小島勢二、他. 最新医学別冊 新しい診断と治療の ABC72 血液 8 再生不良性貧血. 全 28 ページ, 最新医学. 2011.
- 4) 高橋義行、小島勢二. 血液フロンティア：小児骨髄不全に対する免疫抑制療法の役割. 2010年 Vol. 20 No5, p23-31. 医薬ジャーナル社.
- 5) 高橋義行、小島勢二. 再生不良性貧血と制御性T細胞 Annual review 2010 血液, p50-55, 中外医学社. 2010.
- 6) 高橋義行、小島勢二. 特集：これでわかる！病態からみた免疫抑制剤の使い方 II 各論 2 再生不良性貧血. 小児内科 2009年 Vol. 41 No.11 p1569-1573, 東京医学社.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小島 勢二 (KOJIMA SEIJI)  
名古屋大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：20313992

##### (2) 研究分担者

高橋 義行 (TAKAHASHI YOSHIYUKI)  
名古屋大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：40432273

##### (3) 連携研究者

鈴木 治彦 (SUZUKI HARUHIKO)  
名古屋大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：90283431