

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 25 年 4 月 30 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590515

研究課題名（和文） 骨髄異形成症候群における Toll-like receptor 発現解析

研究課題名（英文） The expression of Toll-like receptor in myelodysplastic syndrome

研究代表者

村上 博和 (MURAKAMI HIROKAZU)

群馬大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：40166260

研究成果の概要（和文）：骨髄異形成症候群(MDS)は、造血幹細胞の apoptosis による無効造血、白血病化、自己免疫疾患の高頻度合併を特徴とする。Toll-like receptor (TLR)は、apoptosis、腫瘍免疫、および自己免疫疾患の発症に関与している。MDS の3つの特徴には TLR の関与が強く示唆されるため、その造血幹細胞および末梢血細胞を対象とし TLR family の発現を検討した。その結果、MDS 高リスク群における血球アポトーシスには TLR が関与していたが、MDS の進展および白血病化における関与は少ないと考えられた。

研究成果の概要（英文）：Myelodysplastic syndrome (MDS) is a clonal disease, characterized by ineffective hematopoiesis due to apoptosis of blood cells, progression to acute leukemia, and high frequency of autoimmune disease complications. Toll-like receptors (TLR) is reported to be involved in apoptosis, tumor immunity, and autoimmune disease. According to these, it is suspected that TLRs are associated with the pathogenesis of MDS. Twenty-one patients with MDS are included in this study. TLRs may be associated with the apoptosis of blood cells in high-risk MDS patients; however not be involved in the progression of MDS to leukemia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：骨髄異形成症候群、Toll-like receptor、apoptosis

1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群 (MDS) は造血幹細胞のクローナルな増殖を来す疾患であり、主に無

能造血による汎血球減少を示す。その多くは急性白血病へ進展するため、前白血病状態とも考えられている。また、その発症には自己

免疫的機序の関与を示唆する報告が多々ある。更に、低リスク群の MDS では、しばしば間質性肺炎、血管炎、腎炎、皮疹などの自己免疫疾患を合併するため、免疫系の異常が強く示唆されている。

Toll-like Receptor(TLR)は、1980 年代にシヨウジョウバエの初期発生の間に背腹軸パターンを正常に決定するために働く遺伝子として同定された。その後、真菌、細菌、ウイルスなどの感染に対する自然免疫担当細胞を活性化させる受容体であることが報告された。ヒトでは 11 種類知られており、それぞれ細菌、真菌、ウイルスなどの成分に特異性を持っている。

TLR の機能としては、炎症反応の惹起(自然免疫)、樹状細胞への情報伝達(獲得免疫)、そして、apoptosis の誘導などが確認されている。構造はロイシンリッチリピートと呼ばれる一連の蛋白からなる細胞外ドメイン、膜貫通は 1 回、そして細胞内は球状の TIR ドメインからなっている。TLR は TLR2+TLR1、TLR2+6 のように、ヘテロ 2 量体で存在するものと、TLR3、4、5 などのようにホモ 2 量体として存在するものがある。

TLR が認識するものは、細菌細胞壁成分や核酸である。TLR に対するリガンドは、TLR2+TLR1 の細菌リポタンパク質、TLR2+TLR6 のリポテイコプラニン酸、酵母細胞マンナン、TLR3 の dsRNA、TLR4 の Lipopolysaccharide(LPS) 、 heat shock protein(HSP) 、 high mobility group 1(HMGB1)、TLR7 の ssRNA、TLR9 の CpG 含有 DNA などがある。また、IFN - γ 、TNF - α 、IL-1 β 、IL-2、IL-5 は TLR 発現のコントロールに関係している。

TLR と MDS との関係を示唆する報告がいくつかある。細菌性リポ蛋白により TLR が活性化すると、MyD88 経路を介して unclear

factor-kappaB(NF- κ B) が活性化し、apoptosis 抑制に働くが、それと同時に、MyD88/FADD 複合体が形成され、Fas シグナルが活性化し、NF- κ B 活性化による抗 apoptosis よりも強い apoptosis 促進が起こり、結果的に TLR が活性化すると apoptosis 促進作用が起こる。同様の条件で、TLR2、4 が過剰発現している細胞は、コントロール細胞と比較して有意に apoptosis が増加しており、また、TLR4 が欠損している、apoptosis が起こらないという報告もある。以上より、MDS の無効造血は幹細胞や各血球のアポトーシスによるので、この病態に TLR が関与している可能性が示唆される。

また、各種腫瘍(前立腺がん、卵巣がん、消化器がん)では TLR7、TLR8、TLR9 などの発現異常が報告され、これががん発症に関与するという報告もある。

以上より、TLR は、MDS の発症や白血病への進展と関連していることが示唆される。

2. 研究の目的

MDS は、1) 造血幹細胞の apoptosis による無効造血、2) 白血病化、3) 自己免疫疾患の高頻度合併を特徴とする。一方、Toll-like receptor (TLR)は、type I transmembrane receptor のひとつで、感染に対する自然免疫担当細胞の活性化に重要な役割を担っている。近年、TLR は apoptosis、腫瘍免疫、および自己免疫疾患の発症に関与していると報告されている。よって MDS の 3 つの特徴には TLR の関与が強く示唆されるため、その造血幹細胞および末梢血樹状細胞を対象とし TLR family の発現を検討した。

3. 研究の方法

1. 対象

群馬大学医学部付属病院を受診した MDS 患者 21 名、MDS 以外の貧血患者 9 名からへ

パリン加骨髓液を採取し、単核球を分離して使用した。また、骨髓に異常の無い対象群として、群馬大学医学部附属病院を受診した悪性リンパ腫 (ML) 患者 7 名、形質細胞腫患者 1 名からへパリン加骨髓液を採取し、単核球を分離したものを使用した。

2. 方法

1) TLR の蛍光抗体染色法

骨髓から分離した単核球をそれぞれチューブに分け、Phosphate Buffered Saline(PBS) で洗浄した。TLR1、2、4、7、9 それぞれに陰性コントロールを作るため、チューブを各 2 本ずつ用意し、コントロールには TLR1-IgG、TLR2、4IgG2b (共通)、TLR7-IgG2a、TLR9-IgM を用いた。洗浄は全て 1600rpm、5 分間という条件で行った。TLR1、2、4 に蛍光標識抗体 (CD34、CD45、TLR1、2、4) を入れ、冷暗所で 30 分置いた。蛍光標識抗体は CD34-FITC、CD45-PerCP-Cy5-5、TLR1、2、4、7、9-PE の組み合わせを用い、抗体の濃度は全て 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調節し、5 μL ずつ使用した。PBS で洗浄後、TLR1、2、4 標識済み細胞を PBS300 μL に浮遊させて染色終了とした。TLR7、9 に蛍光標識抗体 (CD34、CD45) を入れ、冷暗所で 30 分置いた。TLR1、2、4 は標識抗原だが、TLR7、9 は内部抗原であるため、透過処理をしてから TLR の蛍光標識抗体をつけた。蛍光標識抗体は TLR7-PE、TLR9 は 1 次抗体として TLR9、IgM(無標識)そして 2 次抗体として Goat anti mouse IgG-PE を使用した。TLR7、9 に透過処理として BD Cytofix/Cytoperm を 50 μL 入れ、冷暗所で 20 分置いた。BDperm/Wash の蒸留水 10 倍希釈液で洗浄し、蛍光標識抗体 (TLR7、TLR9 の 1 次抗体) を入れ、冷暗所で 30 分置いた。BDperm/Wash の蒸留水 10 倍希釈液で洗浄後、TLR7 標識済み細胞は

PBS300 μL に浮遊させて染色を終了とした。TLR9 に蛍光標識抗体 (TLR9 の 2 次抗体) を入れ、冷暗所で 30 分置いた。BD perm/Wash の蒸留水 10 倍希釈液で洗浄後、TLR9 標識済み細胞を PBS300 μL に浮遊させ、全ての染色を終了とした。

2) flow cytometry での TLR 測定法

PBS300 μL に浮遊させた TLR 蛍光抗体標識済みの細胞を BD FACSCanto™ II フローサイトメトリーにより測定した。横軸に Forward scatter(FSC)、縦軸に Side scatter(SSC)を設定し、細胞数 10,000 個を測定した。その中から生細胞と考えられる分画にゲートをかけ、その中の分画を解析した (Figure1)。P1 の中で横軸に CD45-PerCP-Cy5-5、縦軸に SSC を設定し、SSC が低い分画の中で CD45 弱陽性の分画を P2 (骨髓芽球)、強陽性の分画を P3(リンパ球)、そして SSC が高い分画を P4 (顆粒球)とした(Figure2)。P2 の芽球分画については、横軸に CD34-FITC、縦軸に各 TLR-PE を設定し、CD34+、CD34-分画に分けて TLR の発現率を解析した (Figure3)。P2 分画の CD34 陽性と陰性のボーダーラインは、P3 のリンパ球分画が CD34 陰性であることを利用し、P3 分画で横軸に CD34-FITC、横軸に TLR-PE を設定し、そのボーダーラインをそのまま使用した。P3 のリンパ球、P4 の顆粒球分画については、横軸に各 TLR-PE、縦軸に Count を設定し、TLR の発現率を解析した(Figure4、5)。

Figure1.P1 分画

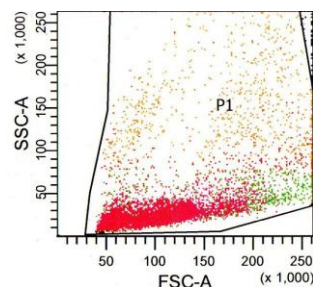


Figure2.P2(芽球)、3(リンパ球)、P4(顆粒球)

分画

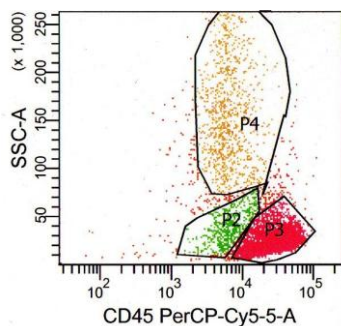


Figure3.芽球分画の TLR 発現解析

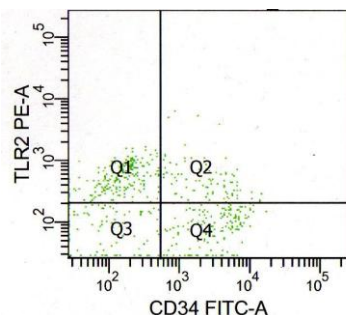


Figure4.リンパ球分画の TLR 発現解析

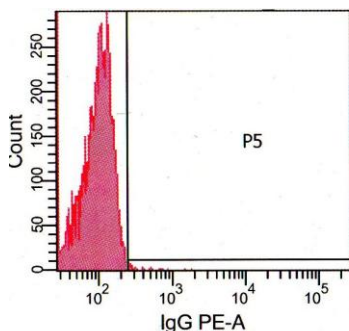
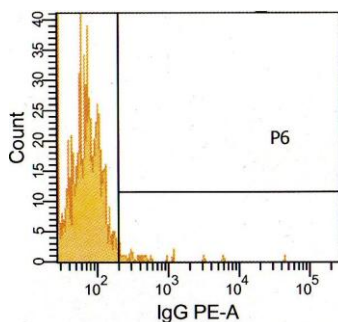


Figure5.顆粒球分画の TLR 発現解析



4. 研究成果

1.骨髄に異常のない群における TLR 発現

TLR1、2 の発現はリンパ球、顆粒球に比べ、芽球において明らかに高かった。芽球を CD34 発現の有無で分けて、TLR 発現を検討したがすべて差を認めなかった。TLR7、9 の発現は芽球、顆粒球に比べリンパ球において低い結果となった。

2.MDS 以外の貧血における TLR 発現

TLR1、2 の発現はリンパ球、顆粒球に比べ、芽球において明らかに高かった。特に TLR2 の発現率の差が大きかった。TLR4、7、9 の発現率はリンパ球、顆粒球に比べ、芽球において明らかな差は認められなかった。「骨髄に異常のない群」と比べ TLR9 の発現が低下していたが、その他で明らかな差は認められなかった。

3.MDS における TLR 発現

全般的に芽球において CD34(-)と CD34(+) の TLR 発現を比較すると、CD34(+)の芽球における発現が高い傾向が認められた。

1) TLR1 の発現

芽球において検討したところ、「骨髄に異常のない群」(平均 16.0%)に比し、RA+RCMD(14.8%)は低下していたが、RAEB1+2(平均 22.2%)では発現が高くなっていた。リンパ球においては RA+RCMD において高い値が認められたが、その他には明らかな差は認められなかった。

2) TLR2 の発現

最も高い値の発現がみられた。「骨髄に異常のない群」と比し、RA+RCMD で低値であった。

3) TLR4 の発現

芽球において、「骨髄に異常のない群」と比べ MDS 群は CD34(-)の芽球における発現が高かった。また RA+RCMD のリンパ球における発現が高値であった。

4) TLR7 の発現

芽球、リンパ球、および顆粒球のすべてにおいて、「骨髄に異常のない群」と MDS 群の間に差は認められなかった。

5) TLR9 の発現

芽球、リンパ球、および顆粒球のすべてにおいて、「骨髄に異常のない群」と比し低値であった。

考察

MDS における TLR 発現を検討するため、まず骨髄に異常のない検体において、その発現を検討した。骨髄単核細胞を CD34(-)芽球、CD34(+)芽球、リンパ球、顆粒球に分画して、それぞれ TLR1、2、4、7、9 の発現を検討した。芽球においては、TLR1、2 がリンパ球、顆粒球に比し高発現していた。CD34(-)芽球は CD34(+)芽球に比しやや分化した芽球であるが、TLR 発現には差はなかった。

MDS では、CD34(-)芽球に比し CD34(+)の芽球に TLR が高発現する傾向がみられた。RA+RCMD の低リスク群の芽球では、アポトーシスを促進すると考えられる TLR1,2 の発現は正常に比し低く、RAEB1+2 の高リスク群では TLR1 の発現が高値であった。また、顆粒球の TLR1,2,4 の発現は正常に比し RAEB1+2 の高リスク群で高値であった。これより高リスク群では血球のアポトーシスが TLR の高発現を介して亢進している可能性が示唆された。細胞の増殖に関与すると考えられる TLR7,9 の芽球における発現は、正常に比し低値ないし差を認めなかった。また低リスク群と高リスク群の間にも差を認めなかった。これより、MDS の進展および白血病化には TLR の関与は少ないと考えられた。

今後、症例を追加し、MDS を各病型毎に分類して検討していく予定である。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

1. Akio Saitoh, Hiroshi Handa, Hirokazu Murakami et al. Azacitidine therapy for patients with MDS and AML following MDS in our institute. 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Kyoto, October 19-21, 2012.

2. 井上まどか、神山知沙子、村上博和、他. 骨髄不全症での多項目自動血球分析装置 XE-5000 の末梢血球解析パラメーターとフローサイトメトリーによる骨髄造血細胞解析の検討. 第 12 回日本検査血液学会, 2011 年 7 月 17 日～18 日, 倉敷.

3. Handa H, Murakami H, et al. Human telomerase reverse transcriptase expression (HTERT) detected by flow cytometry in CD34 positive progenitor fraction in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. 15th Congress of the European Hematology Association, Barcelona, Jun 10-13, 2010.

[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：
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

村上 博和 (MURAKAMI HIROKAZU)
群馬大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号：40166260

(2) 研究分担者

齋藤 貴之 (SAITO TAKAYUKI)
群馬大学・大学院保健学研究科・准教授
研究者番号：80375542
半田 寛 (HANDA HIROSHI)
群馬大学・医学部・講師
研究者番号：90282409

(3) 連携研究者

()

研究者番号：90282409