

## 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 6月 3日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591024

研究課題名（和文）自己免疫性骨髄不全症候群における疾患特異的 $\gamma\delta$ T細胞の同定と機能解析研究課題名（英文） Role for  $\gamma\delta$ T lymphocytes in autoimmune bone marrow failure syndrome

研究代表者

廣川 誠 (HIROKAWA MAKOTO)

秋田大学・医学部・准教授

研究者番号：50241667

研究成果の概要（和文）：

自己免疫性骨髄不全症候群のひとつである後天性慢性赤芽球癆の病因と病態を明らかにするために、 $\gamma\delta$ T細胞抗原受容体のレパートリー解析を行った。赤芽球癆患者においてはV $\delta$ 1+ $\gamma\delta$ T細胞の増加、V $\delta$ 2+ $\gamma\delta$ T細胞の減少が認められた。再生不良性貧血においてはV $\delta$ 1+ $\gamma\delta$ T細胞の増加は認められなかった。赤芽球癆患者におけるCDR3 $\delta$ 1のサイズ分布は解析した13例中9例で偏りが認められたが、健康人10例中7例においてもCDR3 $\delta$ 1のサイズ分布に偏りが認められた。異なった慢性赤芽球癆の症例間で共通のCDR3 $\delta$ 1アミノ酸モチーフは認められなかった。以上より、V $\delta$ 1+ $\gamma\delta$ T細胞の増加は後天性慢性赤芽球癆における特徴的なT細胞レパートリーの変化であるが、その増殖はCDR3を介した抗原認識によるものではないことを示唆するものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We examined the  $\gamma\delta$ T cell receptor repertoire in 19 pure red cell aplasia (PRCA) patients and found that there was a difference in  $\gamma\delta$ T-cell repertoires between PRCA patients and healthy donors. We observed an increase in V $\delta$ 1  $\gamma\delta$ T cells and a decrease in V $\delta$ 2 T cells in PRCA patients. An increase of V $\delta$ 1  $\gamma\delta$ T cells was not found in aplastic anemia patients. CDR3 $\delta$ 1 size distribution patterns were skewed in 9 out of 13 PRCA patients examined, although the skewing was also observed in 7 out of 10 healthy individuals. No significant changes were present in CDR3 $\delta$ 1 size distribution between PRCA patients and healthy donors. Moreover, no apparent consensus amino acid motifs were identified in PRCA patients. Expansion of V $\delta$ 1 T cells and depletion of V $\delta$ 2 T cells are unique features for chronic acquired PRCA but expansion of V $\delta$ 1 T cells does not seem to be the consequence of CDR3-dependent selection. We conclude that clonal expansion of V $\delta$ 1 T cells is not a general feature for chronic acquired PRCA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：赤芽球癆、後天性、慢性、 $\gamma\delta$ T細胞、CDR3

## 1. 研究開始当初の背景

骨髄不全症候群は造血幹細胞の減少や質的異常のために血球減少をきたす造血障害であり、再生不良性貧血、骨髄異形成症候群、発作性夜間血色素尿症および赤芽球癆を包含する。いずれの疾患においても、その病態形成の一部に自己免疫学的機序が関与していることがコンセンサスとして得られつつある。前3者が汎血球減少症を来すのに対して、赤芽球癆は赤血球系の選択的減少を呈することは、両者において自己免疫現象のメカニズムが異なっていることを強く示唆している。

## 2. 研究の目的

自己免疫性骨髄不全症候群における T リンパ球の抗原受容体の差異に基づく病因論的意義、特に疾患特異的 $\gamma\delta T$ 細胞の存在と機能を明らかにし、免疫病態と診断およびその治療効果判定における新たな指標を同定することを主たる目的とする。また、 $\gamma\delta T$ 細胞の生体内における役割を明らかにすることを副次的目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 骨髄不全症候群の各病型における $\gamma\delta T$ 細胞サブセットの動態

フローサイトメトリー法により末梢血中における TCR $\alpha\beta$ +T 細胞、V $\delta 1$ + $\gamma\delta T$ 細胞、V $\delta 2$ + $\gamma\delta T$ 細胞を定量した。健常人 107 名をコントロールとし、後天性慢性赤芽球癆 19 名における T 細胞サブセットの動態を解析した。

(2)  $\gamma\delta T$ 細胞のクロナリティと表面形質

T 細胞抗原受容体のクロナリティ解析は教室で既に樹立している CDR3 サイズスペクトラタイプングにて、また構造の決定は DNA シークエンシングにて行った。

(3) 統計学的解析

パラメトリック解析およびノンパラメトリック解析は PASW Statistics 18 (SPSS Inc.) を用いて行った。

(4) 倫理的事項

本研究は秋田大学倫理委員会の承認のもとに行われ、採血前に本人の同意を得た。

## 4. 研究成果

(1) 後天性慢性赤芽球癆における $\gamma\delta T$ 細胞レパートリー

慢性赤芽球癆患者においては $\gamma\delta T$ 細胞レパートリーの変化があり、V $\delta 1$ + $\gamma\delta T$ 細胞の増加、V $\delta 2$ + $\gamma\delta T$ 細胞の減少が認められた。再生不良性貧血においてはV $\delta 1$ + $\gamma\delta T$ 細胞の増加は認められなかった(図1)。

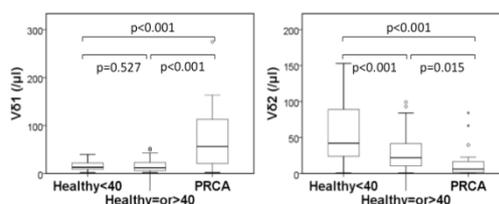


図1. 慢性赤芽球癆および健常人におけるV $\delta 1$ + $\gamma\delta T$ 細胞およびV $\delta 2$ + $\gamma\delta T$ 細胞数

(2) 後天性慢性赤芽球癆におけるV $\delta 1$ + $\gamma\delta T$ 細胞のクロナリティ

赤芽球癆患者における CDR3  $\delta 1$  のサイズ分布は解析した 13 例中 9 例で偏りが認められたが、健常人 10 例中 7 例においても CDR3  $\delta 1$  のサイズ分布に偏りが認められ、V $\delta 1$ + $\gamma\delta T$ 細胞のオリゴクローナルな反応は赤芽球癆に特徴的とは言えなかった(図2)。

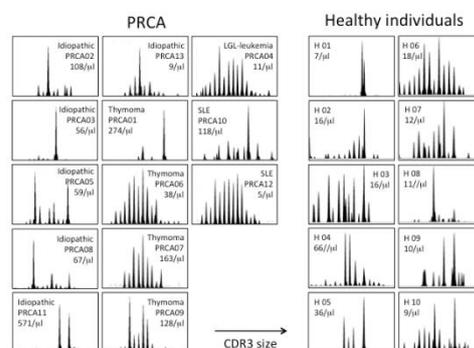


図2. V $\delta 1$ + $\gamma\delta T$ 細胞のクロナリティ

(3) 赤芽球癆における CDR3 $\delta 1$ 鎖長の特徴  
赤芽球癆において特定の CDR3 $\delta 1$ 鎖が選択的に増加しているかどうかを知るために、赤芽球癆患者より得た 78 クローンと健常人より得た 69 クローンの CDR3 $\delta 1$ 鎖の長さを比較した。両者の間においてサイズ分布の差は見られなかった ( $p=0.88$ ) (図3)

(4) 赤芽球癆において増加しているV $\delta 1$ + $\gamma\delta T$ 細胞の CDR3 $\delta 1$ シーケンス

異なった慢性赤芽球癆の症例間で共通の CDR3 $\delta 1$  アミノ酸モチーフは認められな

かった。

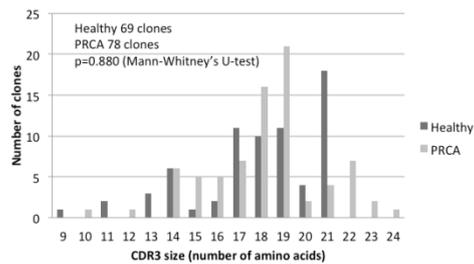


図 3. 慢性赤芽球癆における Vδ1+γδ T 細胞クローンの CDR3 サイズ分布

#### 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 5 件)

- ① Guo YM, Ishii K, Hirokawa M, Tagawa H, Ohyagi H, Michishita Y, Ubukawa K, Yamashita J, Ohteki T, Onai N, Kawakami K, Xiao W, Sawada K. CpG-ODN 2006 and human parvovirus B19 genome consensus sequences selectively inhibit growth and development of erythroid progenitor cells. *Blood*. 査読有、115, 2010, 4569-4579.
- ② Guo YM, Hirokawa M, Takahashi N, Fujishima M, Fujishima N, Komatsuda A, Tagawa H, Ohyagi H, Michishita Y, Ubukawa K, Hebiguchi M, Xiao W, Sawada K. Delayed addition of tumor necrosis factor (TNF) antagonists inhibits the generation of CD11c<sup>+</sup> dendritic cells derived from CD34<sup>+</sup> cells exposed to TNF-α. *Int J Hematol*. 査読有、91, 2010, 61-68.
- ③ Michishita Y, Hirokawa M, Guo YM, Abe Y, Liu J, Ubukawa K, Fujishima N, Fujishima M, Yoshioka T, Kameoka Y, Saito H, Tagawa H, Takahashi N, Sawada K. Age-associated alteration of γδ T cell repertoire and different profiles of activation-induced death of Vδ1 and Vδ2 T cells. *Int J Hematol*. 査読有、94, 2011, 230-240.
- ④ Ubukawa K, Guo YM, Takahashi M, Hirokawa M, Michishita Y, Nara M, Tagawa H, Takahashi N, Komatsuda A, Nunomura W, Takakuwa Y, Sawada K. Eucleation of human erythroblasts involves nonmuscle myosin IIB. *Blood*. 査読有、119,

2012, 1036-1044.

- ⑤ Michishita Y, Hirokawa M, Fujisima N, Abe Y, Fujishima M, Guo Y-M, Ubukawa K, Liu J, Yoshioka T, Kameoka Y, Saitoh H, Tagawa H, Takahashi N, Sawada K. CDR3-independent expansion of Vδ1 T lymphocytes in acquired chronic pure red cell aplasia. *Immunol Lett*. 査読有、150, 2013, 23-29.

[学会発表] (計 6 件)

- ① Hirokawa M, Michishita Y, Fujishima N, Fujishima M, Guo YM, Kameoka Y, Saitoh H, Tagawa H, Takahashi N, Sawada K. Alteration of γδ T-cell repertoire in acquired chronic pure red cell aplasia. 1<sup>st</sup> JSH International Symposium 2010, Akita, Japan, July 16-17, 2010
- ② Guo Y-M, Ishii K, Hirokawa M, Tagawa H, Ohyagi H, Michishita Y, Ubukawa K, Yamashita J, Ohteki T, Onai N, Kawakami K, Xiao WG, Sawada K. CpG-ODN 2006 and human parvovirus B19 genome consensus sequences selectively inhibit growth and development of erythroid progenitor cells. 15<sup>th</sup> Congress of the European Hematology Association, Barcelona, June 10-13, 2010
- ③ Onai N, Oyagi H, Hirokawa M, Sawada K, Ohteki T. Combined challenge of TLR9- and Nod1-ligands induces hemophagocytic syndrome in mice. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, Kobe, August 22-27, 2010
- ④ 道下吉広、安倍由紀子、藤島直仁、藤島眞澄、奈良美保、郭永梅、鶴生川久美、斎藤宏文、高橋直人、廣川、澤田賢一. 後天性慢性赤芽球癆におけるγδT 細胞レパートリーの変化とそのメカニズム. 第 72 回日本血液学会学術集会. 2010 年 9 月 24-26 日横浜
- ⑤ Hirokawa M, Sawada K, Fujishima N, Fukuda T, Akiyama H, Imamura M, Adachi S, Urabe A, Okamoto S, Suzuki R, Tanimoto M, Nakao S, Uegita M, Morishima Y, Sakamaki H, Ozawa K. Efficacy and long-term outcome of intervention for pure red cell aplasia (PRCA) following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from major ABO-incompatible donors. 16<sup>th</sup> Congress of European Hematology Association, London, June 9-12, 2011

- ⑥ Michishita Y, Hirokawa M, Fujishima N, Abe Y, Fujishima M, Guo Y-M, Ubukawa K, Liu J, Yoshioka T, Kameoka Y, Saitoh H, Tagawa H, Takahashi N, Sawada K. CDR3-independent expansion of V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T lymphocytes and depletion of V $\delta$ 2 T cells are unique features in acquired pure red cell aplasia. 53rd American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, San Diego, December 10-13, 2011

[図書] (計 4 件)

- ① 廣川 誠、医学書院、今日の治療指針 2010 : 赤芽球癆、2010、2 ページ (p. 538-539)
- ② 廣川 誠、中外医学社、血液診療エキスパート : 赤芽球癆 (後天性)、2010、2 ページ (p. 154-160)
- ③ 廣川 誠、澤田賢一、中外医学社、専門医のための薬物療法 Q&A 血液 (改訂第 2 版) : 赤芽球癆、2011、14 ページ (p.22-35)
- ④ 廣川 誠、澤田賢一、南江堂、難治性貧血の参照ガイド : 赤芽球癆、2011、22 ページ (p.31-52)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣川 誠 (HIROKAWA MAKOTO)  
秋田大学・医学部・准教授  
研究者番号 : 50241667

(2) 研究分担者

澤田 賢一 (SAWADA KENICHI)  
秋田大学・医学部・教授  
研究者番号 : 90226069

藤島 直仁 (FUJISHIMA NAOHITO)  
秋田大学・医学部・講師  
研究者番号 : 70422152

藤島 眞澄 (FUJISHIMA MASUMI)  
秋田大学・医学部・臨床系医員  
研究者番号 : 80422153