

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5月31日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591067

研究課題名（和文） PNHにおけるペプチドワクチンによる免疫療法の可能性

研究課題名（英文） Basic study of immunotherapy with peptide vaccine in PNH

研究代表者

野地 秀義（NOJI HIDEYOSHI）

福島県立医科大学 医学部 講師

研究者番号：20347214

研究成果の概要（和文）：我々は発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）に対するペプチドワクチンを用いた免疫療法を開発にむけて以下の基礎的研究を行った。1）マイクロアレイ法による PNH クローンの増殖・拡大に関与する遺伝子（群）を検討した。2）PNH 由来骨髄造血幹細胞を NOG マウスに移植し、モデル動物の作成に努めた。今後は、WT1 ペプチドワクチンを用いて、PNH のワクチン療法の可能性を検討する予定である。

研究成果の概要（英文）：We planned this study in order to develop immunotherapy with peptide vaccine for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). 1) We investigated gene(s) associated with the expansion of PNH clones by microarray methods to clarify target for the therapy. 2) We tried to prepare a xenogeneic model of PNH resulting from the adoptive transfer of BM ACC133⁺ cells from PNH patients into NOG mice. We have a next step such as assessment of effects for PNH clone and reactions of immune system in PNH patients by WT1 peptide vaccine.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2013年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2014年度	900,000	270,000	1,170,000
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：血液内科学

キーワード：血液免疫学

1. 研究開始当初の背景

PNH 症例における PNH クローンは、再生不良性貧血や骨髄異形成症候群症例に存在する PNH クローンと異なり、造血幹細胞レベルで発生しモノクローナルに増殖し、つまり腫瘍性に増殖することを我々は明らかにした（Blood, 100, 3812-3818, 2002; Leukemia, 20, 627-634, 2006）。しかし、PNH クローンにおける PNH クローンの増殖・拡大に関与する遺

伝子（群）は未だに結論がついていない。

また、我々は HLA-A*2402 アリルを有する PNH 症例における *in vitro* の系を用いて、PNH 症例において WT1 が PNH クローンの拡大機序に関与し、PNH における免疫療法の標的抗原となりうる可能性を報告した（Blood, 100, 22-28, 2002; Exp Hematol, 35, 618-626, 2007）。しかし、PNH のモデルマウスがないことから *in vivo* での WT1 ペプチドワクチンの

有効性、安全性の検討は不十分である。

2. 研究の目的

今回我々は Mano H ら (Blood, 98, 422-427, 2001) が MDS と急性白血病症例を対象として行った AC133 細胞での DNA マイクロアレイ法を用いてペプチドワクチンの対象遺伝子を検索する。

また、PNH 由来骨髓造血幹細胞を NOG マウスに移植することで PNH の病態を再現し、モデル動物となり得るかを検討する。その上で、これまでに白血病・MDS 症例において十分検討された HLA-A*2402 アリル拘束性 WT1 ペプチドワクチンを用いて、PNH のワクチン療法の可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 造血幹細胞 (AC133 細胞) の遺伝子解析: PNH 症例から骨髓血を採取し、単核球を分離後、AC133、CD45 および CD59 モノクローナル抗体を用いて免疫染色を行なう。セルソーターを用いて、AC133⁺CD59⁺細胞と AC133⁺CD59⁻細胞とに分離し、RNA を抽出する。サンプルを DNA マイクロアレイ法による解析およびデータ解析を行い、PNH clone 由来の特異的な遺伝子 (RNA) 発現のプロファイルを決定する。次に、Real-time PCR 法を用いて各遺伝子の発現を定量化・遺伝子塩基配列の解析を行う。

(2) 健常人および患者骨髓由来 ACC133⁺細胞の NOG マウスへの移植: 健常人および PNH 症例の骨髓血から単核球を分離後、セルソーターを用いて AC133⁺細胞、AC133⁺CD59⁺細胞、AC133⁺CD59⁻細胞とに分離し、分離した細胞の全てあるいはいずれかを NOG マウスへ移植する。被移植マウスより末梢血および骨髓血の両者あるいは一方を採取し、有核細胞を CD34、CD33、GPA、CD41、CD3 あるいは CD19 mAb、CD45 mAb (gating 用)、および CD59 mAb を用いた 3 重免疫染色を行い、フローサイトメトリー法より phenotype を検討する。

(3) NOG マウスへの HLA-A*2402 アリル拘束性 WT1 ペプチドワクチンの投与およびその影響の解析: (2) にて PNH クローン の生着を確認後、WT1 ペプチドワクチンを接種する。(2) で得られた細胞の GPI アンカー膜蛋白の発現の検討を行うとともに T リンパ球細胞に対してテトラマー解析を行う。

4. 研究成果

(1) PNH11 症例の骨髓細胞より CD59⁺AC133⁺細胞および CD59⁻AC133⁺細胞の分離を行った。これらの細胞より Total RNA を抽出し、>14,000 human genes に相当する >22,000 プローベセットを用いた、Mano H ら (Blood, 98, 422-427, 2001) が MDS と急性白血病症例を対象として行った AC133 細胞での DNA マイクロ

アレイ法にて遺伝子発現の異常性を検索した。

(2) (3) 現在、健常人骨髓由来 ACC133⁺細胞をセルソーターを用いて分離し、NOG マウスへ移植実験を行っている。また、被移植マウスより末梢血および骨髓血の両者あるいは一方を採取し、有核細胞を CD34、CD33、GPA、CD41、CD3 あるいは CD19 mAb、CD45 mAb (gating 用)、および CD59 mAb を用いた 3 重免疫染色を行い、フローサイトメトリー法より phenotype を検討している。今後、PNH 患者由来の細胞での実験を行う予定である。

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 11 件)

(1) Harada K, Ikeda K, Matsumoto H, Furukawa M, Takahashi H, Ohkawara H, Noji H, Tasaki K, Abe M, Ogawa K, Takeishi Y: A Japanese case of chronic lymphocytic leukemia with t(1;6). *Exp Hematol Oncol* 1 (1), 28, 2012, DOI: 10.1186/2162-3619-1-28

(2) Murakami Y, Inoue N, Shichishima T, Ohta R, Noji H, Maeda Y, Nishimura J, Kanakura Y, Kinoshita T, haemoglobinuria D: Deregulated expression of HMGA2 is implicated in clonal expansion of PIGA deficient cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 156 (3), 383-387, 2012, DOI: 10.1111/j.1365-2141.2011.08914.x

(3) Ngoma A, Ikeda K, Hashimoto Y, Mochizuki K, Takahashi H, Sano H, Matsumoto H, Noji H, Saito S, Kikuta A, Ogawa K, Ohtsuka M, Abe M, Nollet K, Ohto H: Impaired regulatory T cell reconstitution in patients with acute graft-versus-host disease and cytomegalovirus infection after allogeneic bone marrow transplantation. *Int J Hematol* 95 (1), 86-94, 2012, DOI: 10.1007/s12185-011-0976-7

(4) Hu H, Shikama Y, Shichishima T, Ikeda K, Akutsu K, Ono T, Kimura H, Ogawa K, Noji H, Takeishi Y, Kimura J: Maturity-dependent fractionation of neutrophil progenitors: A new method to examine in vivo expression profiles of differentiation-regulating genes. *Exp Hematol* 40 (8), 675-681, 2012, DOI: 10.1016/j.exphem.2012.03.003

(5) Kameoka Y, Takahashi N, Ishizawa K, Kato Y, Ito J, Sasaki O, Murai K, Noji H, Hirokawa M, Tajima K, Shichishima T,

Ishida Y, Harigae H, Sawada K: Safety and feasibility of high-dose ranimustine (MCNU), carboplatin, etoposide, and cyclophosphamide (MVCV) therapy followed by autologous stem cell transplantation for malignant lymphoma. *Int J Hematol* 96 (5), 624-630, 2012, DIO: 10.1007/s12185-012-1186-7

(6) Kameoka J, Takahashi N, Noji H, Murai K, Tajima K, Kameoka Y, Sato S, Shichishima T, Ishida Y, Harigae H, Sawada K: T-cell prolymphocytic leukemia in Japan: is it a variant?. *Int J Hematol* 95 (6), 660-667, 2012, DIO: 10.1007/s12185-012-1077-y

(7) Akagi T, Takahashi N, Yamaguchi K, Ishizawa K, Murai K, Tajima K, Ikeda K, Kameoka Y, Kameoka J, Ito S, Kato Y, Noji H, Shichishima T, Itoh J, Ichinohasama R, Harigae H, Ishida Y, Sawada K: Comparison of long-term clinical outcomes of CHOP chemotherapy between Japanese patients with nodal peripheral T-cell lymphomas and those with diffuse large B-cell lymphoma in the study group of the Tohoku Hematology Forum. *J Clin Exp Hematopathol* 51 (1), 29-35, 2011, DIO: 10.3960/jslrt.51.29

(8) Shikama Y, Xiaomin F, Shichishima T, Ono T, Noji H, Ikeda K, Ogawa K, Takeishi Y, Kimura J: Impairment of FOS mRNA induction by a translation inhibitor puromycin in granulocytes from myelodysplastic syndrome patients. *Br J Haematol* 154 (4), 525-527, 2011, DIO: 10.1111/j.1365-2141.2010.08504.x

(9) Ogawa K, Ikeda K, Furukawa M, Harada-Shirado K, Mashimo Y, Takahashi H, Matsumoto H, Kimura S, Shichishima-Nakamura A, Ohkawara H, Hashimoto Y, Asahi K, Noji H, Ohto H, Takeishi Y: A long-term remission of renal amyloidosis with nephrotic syndrome after autologous peripheral blood stem-cell transplantation. *Fukushima J Med Sci* 56 (2), 151-156, 2010, DIO: 10.5387/fms.56.151

(10) Ogawa K, Noji H, Furukawa M, Harada-Shirado K, Mashimo Y, Takahashi H, Matsumoto H, Kimura S, Shichishima-Nakamura A, Ohkawara H, Ikeda K, Ohto H, Takeishi Y: Hematopoietic stem cell transplantation in the department of hematology, Fukushima Medical University. *Fukushima J Med Sci* 56 (2), 107-114, 2010, DIO: 10.5387/fms.56.107

(11) Shichishima T, Ikeda K, Takahashi N, Kameoka J, Tajima K, Murai K, Tamai Y,

Shichishima-Nakamura A, Akutsu K, Noji H, Okamoto M, Kimura H, Harigae H, Oyamada T, Kamesaki T, Takeishi Y, Sawada K: Low concentration of serum haptoglobin has impact on understanding complex pathophysiology in patients with acquired bone marrow failure syndromes. *Int J Hematol* 91 (4), 602-610, 2010, DIO: 10.1007/s12185-010-0559-z

[学会発表] (計 33 件)

(1) Xiaomin F, Yayoi S, Shichishima T, Noji H, Ikeda K, Ogawa K, Takeishi Y, Kimura J: Impairment of HuR-mediated FOS mRNA stabilization in granulocytes from myelodysplastic syndrome patients. 2012 American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting and Exposition

(2012.12.8-12.11, Atlanta, Georgia, USA)

(2) Nishimura J, Yamamoto M, Hayashi S, Ohyashiki K, Ando K, Noji H, Kitamura K, Eto T, Ando T, Masuko M, Shibayama H, Hase M, Lan L, Tamburini P, Inazawa J, Kinoshita T, Kanakura Y: A rare genetic polymorphism in C5 confers poor response to the anti-C5 monoclonal antibody eculizumab by nine Japanese patients with PNH. 2012 American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting and Exposition

(2012.12.8-12.11, Atlanta, Georgia, USA)

(3) Noji H, Hamanaka S, Yamaguchi K, Ogawa K, Murai K, Kimura H, Mita M, Suzuki I, Kohno K, Kimura S, Saitoh Y, Hatta S, Michishita Y, Kanbayashi H, Ishida Y, Harigae H, Sawada K, Takeishi Y, Shichishima T: Morphologic and cytogenetic examinations with bone marrow cells in PNH patients. 第74回 日本血液学会学術集会 (2012.10.19-10.21, 京都)

(4) Hosokawa K, Sugimori C, Yamamoto M, Nishimura J, Yonemura Y, Obara N, Noji H, Nakamura Y, Ando K, Shichishima T, Ninomiya H, Chiba S, Kawaguchi T, Nakao S, Kanakura Y: Detection of PNH-type cells using high-resolution flow cytometry: Interim analysis of OPTIMA study. 第74回 日本血液学会学術集会 (2012.10.19-10.21, 京都)

(5) Feng X, Shikama Y, Noji H, Shichishima T, Ikeda K, Ogawa K, Takeishi Y, Kimura J: Mechanism of impaired FOS mRNA induction by emetine in myelodysplastic syndrome granulocytes. 第74回 日本血液学会学術集会 (2012.10.19-10.21, 京都)

(6) Takahashi H, Noji H, Takeishi Y, Shichishima T: A preliminary study on telomere length of granulocytes and

mononuclear cells in PNH patients. 第74回 日本血液学会学術集会

(2012.10.19-10.21, 京都)

(7) Noji H, Usuki K, Otsuka M, Horiuchi H, Yamamoto T, Takahashi H, Takeishi Y, Shichishima T: Erythema annulare centrifugum in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. 第74回 日本血液学会学術集会

(2012.10.19-10.21, 京都)

(8) Mita M, Nakamura K, Takahashi H, Noji H, Takeishi Y, Shichishima T: Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in a patient with del(5q)(q23q32) myelodysplastic syndromes. 第74回 日本血液学会学術集会

(2012.10.19-10.21, 京都)

(9) Kimura S, Saitou Y, Kanbayashi H, Matuda S, Odajima H, Takahashi H, Noji H, Takeishi Y, Shichishima T: Del(13q) myelodysplastic syndromes in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). 第74回 日本血液学会学術集会

(2012.10.19-10.21, 京都)

(10) 野地秀義: 特別講演: PNHの病態と治療戦略について. 函館PNHセミナー

(2012.10.5, 函館)

(11) 山本正樹, 西村純一, 細川晃平, 杉盛千春, 米村雄士, 小原直, 中村嘉彦, 野地秀義, 七島勉, 安藤潔, 二宮治彦, 千葉滋, 川口辰哉, 中尾眞二, 金倉讓: OPTIMA試験:高精度フローサイトメトリー法によるGPIアンカー膜蛋白欠損血球の検出. 第49回 補体シンポジウム(2012.8.24-8.25, 大阪)

(12) 野地秀義, 亀崎豊実, 濱中純子, 山口公平, 神林裕行, 竹石恭知, 七島勉, 東北PNH研究会: Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH)症例におけるEculizumab治療の赤血球結合IgGおよびC3に対する影響. 第4回 造血器腫瘍免疫療法研究会(2012.8.18, 金沢)

(13) 野地秀義, 七島勉, 竹石恭知: 骨髄低形成を伴うPNH症例に対するEculizumab使用経験. 2012 Japan PNH Masters(2012.7.28, 東京)

(14) 山本正樹, 西村純一, 細川晃平, 杉盛千春, 米村雄士, 小原直, 野地秀義, 中村嘉彦, 安藤潔, 七島勉, 二宮治彦, 千葉滋, 川口辰哉, 中尾眞二, 金倉讓: OPTIMA試験:高精度フローサイトメトリー法によるGPIアンカー型蛋白欠損血球の検出. 第22回 サイトメトリー学会

(2012.6.29-6.30, 豊中)

(15) 原田佳代, 池田和彦, 松本勇人, 高橋裕志, 七島晶子, 大河原浩, 野地秀義, 田崎和洋, 小川一英, 阿部正文, 竹石恭知:

IRF4に関連した染色体転座T(1;6)を有した慢性リンパ性白血病の一例. 第52回 日本リンパ網内系学会総会(2012.6.14-6.16, 福島)

(16) 野地秀義: 講演:OPTIMAの概要と進捗. 北海道PNH研究会(2012.1.20, 札幌)

(17) Akagi T, Murai K, Shimosegawa K, Ishizawa K, Sugawara T, Yokoyama H, Noji H, Ogawa K, Tajima K, Miyashita Y, Ooba K, Sakamoto J, Kubo K, Harigae H, Ishida Y: Phase I Study of Dasatinib safety and efficacy for CP-CML at Tohoku. 第73回 日本血液学会学術集会(2011.10.14-10.16, 名古屋)

(18) Takahashi H, Shichishima T, Noji H, Ogawa K, Takeishi Y: PNH-type cells by flow cytometric methods with a monoclonal antibody and FLAER in BMFS patients. 第73回 日本血液学会学術集会

(2011.10.14-10.16, 名古屋)

(19) 村上良子, 井上徳光, 七島勉, 太田里永子, 野地秀義, 前田裕輔, 西村純一, 木下タロウ: 補体研究:基礎から臨床へ:発作性夜間血色素尿症をはじめとするGPI欠損症について. 第48回 補体シンポジウム(2011.9.2-9.3, 名古屋)

(20) 野地秀義: デフェラシロクス長期投与後に著明に造血能が改善した重症型再生不良性貧血の一例. Iron Overload Case Study Forum 2011(2011.8.27, 東京)

(21) 野地秀義, 七島勉, 高橋裕志, 小川一英, 竹石恭知: Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) 8症例におけるEculizumabの効果および安全性. 第3回 造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会(2011.8.20-8.21, 別府)

(22) 松本勇人, 古川未希, 原田佳代, 真下由美子, 高橋裕志, 木村哲, 七島晶子, 大河原浩, 野地秀義, 小川一英, 大戸斉, 竹石恭知: 自家末梢血幹細胞移植後にサイトメガロウイルス感染が原因と考えられた血球貪食症候群の2例

(Cytomegalovirus caused hemophagocytic syndrome after autologous peripheral blood stem cell transplantation). 第33回 日本造血細胞移植学会総会(2011.3.9-3.10, 松山)

(23) Murakami Y, Inoue N, Shichishima T, Noji H, Nishimura J, Kanakura Y, Kinoshita T: Expression of HMGA2 in blood cells from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. 52nd American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting and Exposition(2010.12.4-12.7, Orlando, FL, USA)

(24) 野地秀義, 七島勉, 岡本正俊, 池田和彦, 七島晶子, 阿久津和子, 竹石恭

知：急性骨髄性白血病（AML）症例における CD59 陰性白血病細胞の出現

Appearance of CD59-negative leukemic cells in patients with acute myeloid leukemia. 第 72 回 日本血液学会学術集会 (2010.9.24-9.26, 横浜)

(25) 高橋裕志, 七島 勉, 野地秀義, 古川未希, 七島晶子, 竹石恭知: 後天性骨髄不全症候群 (BMFS) 症例における FLAER による GPI アンカー発現の検討

Studies on GPI-anchor expressions by flow cytometry using FLAER in patients with acquired BMFS. 第 72 回 日本血液学会学術集会 (2010.9.24-9.26, 横浜)

(26) Kameoka Y, Takahashi N, Hirokawa M, Aoki Y, Yamamoto J, Kato Y, Hiroshima Y, Ito J, Noji H, Ishizawa K, Shichishima T, Ishida Y, Harigae H, Sawada K: Safety, feasibility and efficacy of MCV therapy followed by auto-PBSCT for malignant lymphoma. 第 72 回 日本血液学会学術集会 (2010.9.24-9.26, 横浜)

(27) Feng X, Shikama Y, Shichishima T, Noji H, Ogawa K, Takeishi Y: Impaired c-fos induction by emetin in granulocytes from myelodysplastic syndrome patients. 第 72 回 日本血液学会学術集会 (2010.9.24-9.26, 横浜)

(28) 古川未希, 野地秀義, 七島 勉, 原田佳代, 眞下由美子, 高橋裕志, 松本勇人, 木村 哲, 七島晶子, 大河原浩, 小川一英, 竹石恭知: 血液学のおよびクローン性寛解に至った発作性夜間ヘモグロビン尿症の 2 症例

Two paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients reached hematological and clonal remission. 第 72 回 日本血液学会学術集会 (2010.9.24-9.26, 横浜)

(29) Kameoka J, Takahashi N, Noji H, Murai K, Tajima K, Kameoka Y, Shichishima T, Ishida Y, Harigae H, Sawada K: Clinical and biological features of T-cell prolymphocytic leukemia in Japan. 第 72 回 日本血液学会学術集会 (2010.9.24-9.26, 横浜)

(30) Ogawa K, Kimura S, Furukawa M, Harada K, Mashimo Y, Takahashi H, Matsumoto H, Shichishima-Nakamura A, Ohkawara H, Noji H, Shichishima T, Ohto H, Takeishi Y: Analysis of autologous PBSCT in four patients with cardiac amyloidosis. 第 72 回 日本血液学会学術集会 (2010.9.24-9.26, 横浜)

(31) 木村 哲, 野地秀義, 七島 勉, 大河原浩, 古川未希, 原田佳代, 眞下由美子, 高橋裕志, 松本勇人, 七島晶子, 小川一英, 竹石恭知: 急性骨髄性白血病へ移行

した骨髄異形成症候群を合併した発作性夜間ヘモグロビン尿症の一例

A PNH patient complained of MDS and developed AML. 第 72 回 日本血液学会学術集会 (2010.9.24-9.26, 横浜)

(32) 野地秀義, 七島 勉, 高橋裕志, 小川一英, 竹石恭知: 発作性夜間ヘモグロビン尿症 4 症例におけるヒト化モノクローナル抗 C5 抗体 (Eculizumab) の効果および安全性の検討. 第 47 回 補体シンポジウム (2010.9.10-9.11, 福島)

(33) 野地秀義, 七島 勉, 高橋裕志, 小川一英, 竹石恭知: 発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) 4 症例における Eculizumab の効果および安全性. 第 2 回 造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会 (2010.8.28-8.29, 松山)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野地 秀義 (NOJI HIDEYOSHI)
福島県立医科大学 医学部 講師
研究者番号: 20347214

(2) 研究分担者

七島 勉 (SHICHISHIMA TSUTOMU)
福島県立医科大学 医学部 研究員
研究者番号: 10192105

(3) 連携研究者

藤田 貞三 (FUJITA TEIZO)
福島県立医科大学 医学部 教授
研究者番号: 20134223

間野 博行 (MANO HIROYUKI)
自治医科大学 医学部 教授
研究者番号: 90240704