

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791079

研究課題名（和文） 白血病発症に伴って出現する抗原不応答性 CD4 陽性 T 細胞の解析

研究課題名（英文） Anergic CD4+ T cells underlying impaired immune system in leukemia

研究代表者

中嶋 康博（NAKASHIMA YASUHIRO）

大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師

研究者番号：40548567

研究成果の概要（和文）：若年の B6 マウスに白血病細胞を移植すると、通常では認められない PD-1+ CD4+ T 細胞が急速に増加してくる事が確認された。これらの CD4+ T 細胞は CD3 抗体による刺激に対し反応性が明らかに低下していた。PD-1+ CD4+ T 細胞は白血病細胞の浸潤が認められるリンパ組織において主に確認され、組織における宿主免疫の主たる構成因子である事が唆された。この細胞は通常骨髄系細胞に発現する C/EBP $\alpha$  を高発現するなど、既知の CD4+ T 細胞とは明らかに異なった遺伝子発現を示していた。TCR 遺伝子発現マウスを用い、PD-1+ CD4+ T 細胞はナイーブ分画ではなく、メモリー形質を持つ細胞群から出現する事を明らかとした。

研究成果の概要（英文）：When normal young B6 mice were transplanted with leukemia cell lines, PD-1+ CD4+ T cells, which are hardly seen in young mice, were rapidly and robustly increased, and the response of CD4+ T cells to anti-CD3 mAb was profoundly depressed. PD-1+ CD4+ T cells were preferentially detected in the lymphoid tissues with leukemia involvement, suggesting that these T cells constituted a significant host component in leukemic tissues. They exhibited a genetic signature distinct from regular CD4+ T cells including the high expression of C/EBP $\alpha$ , which is normally expressed in myeloid lineage cells. Using TCR transgenic mice as recipients of leukemia, we confirmed that the PD-1+ CD4+ T cells were derived from memory phenotype, but not naïve, population.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：PD-1・白血病・免疫不全

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの白血病患者は極度の免疫不全状態にあり、感染や微少残存病変の再発の大きな原因となっているが、その免疫不全の分子メカニズムは未だ不明のままである。一方、様々な臨床的経験則により、患者の免疫システムが白血病の増殖・進行に対して大きな関わりを持っていることが知られている。この事は、T細胞を除去した骨髄を用いて骨髄移植を行った際に、より高い白血病再発が認められること、さらには骨髄移植後の再発に対して、ドナーT細胞輸注が有効である症例が存在することなどから明らかである。また、骨髄移植を受けた後に移植片対宿主病 (graft versus host disease ; GVHD) を発症しない患者は、GVHD を発症した患者よりも高い白血病再発が認められることも知られている。申請者はヒトの慢性骨髄性白血病の原因遺伝子である bcr-abl 融合遺伝子を導入する事により BA-1 白血病細胞を作成し、B6 マウスに移植を行った。その結果、白血病細胞の増殖に伴う形で、宿主 T 細胞の抗原応答性の低下を認めた。この白血病発症モデルマウスの解析を詳細に行うことにより、宿主の免疫不全と白血病発症との相関関係、さらには宿主の悪性腫瘍に対する免疫監視システムを解明したい。

## 2. 研究の目的

白血病株を若年齢の B6 マウスに移植すると白血病を発症し、2週間という極めて早い期間で宿主T細胞の抗原応答性の低下を認めた。その際、対照群には存在しない抗原不応答性 PD-1<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞の出現を確認した。この T 細胞は通常の T 細胞とは全く異なった特徴的な遺伝子発現パターンを示しており、Th 1・Th 2 のいずれの型のサイトカ

インの産生も低下していることを明らかとした。この白血病モデルマウスを用いることで、白血病による T 細胞免疫不全の分子機構を解明することが目的である。

## 3. 研究の方法

白血病発症に伴って急激に進行する宿主の免疫不全のメカニズム、とりわけ白血病の増殖と共に出現する抗原不応答性 PD-1<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞の生成機構について明かとする事である。具体的には

(I) T細胞の抗原不応答性の原因となるマスター遺伝子の特定

(II) 白血病による T細胞の抗原不応答への形質転換機序の解明

(III) 抗原不応答性 T細胞の存在と白血病宿主の生存期間との関連

(IV) ヒトの造血器腫瘍患者における PD-1<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞の存在の有無

を明らかとし、白血病発症による免疫抑制を阻止しうる手段を見出したい。抗原不応答性 T細胞の原因遺伝子を探索するため、その候補と考えられる C/EBP  $\alpha$  や OPN の発現を抑制したマウスにおいて、白血病発症時の T細胞群の抗原応答能の変化、及びコントロール群との腫瘍の増殖に差が生じるかどうかを検討する。さらに白血病細胞がどのような機序で T細胞の抗原応答性を低下させるかを明らかとするため、in vitro の系で白血病細胞由来の液性因子の影響や、白血病細胞と T細胞の直接的な接着の関与の有無を確かめる。また生体内での白血病細胞と抗原不応答 T細胞の解剖学的な位置関係を調べるために免疫組織染色を行う。さらに白血病の増殖に伴って出現する抗原不応答性 T細胞を特異抗体により除去行った場合、白血病の進行、また宿主の生存にどのような影響が与えられるか

を検討し、最終的にヒト白血病患者における PD-1<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞存在の有無と白血病微小残存病変及び再発との関連を明らかにする。

#### 4. 研究成果

白血病発症時に急激に増加する PD-1<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞について解析を行った。PD-1<sup>+</sup>T 細胞は若年齢のマウスにはほとんど認められないが、白血病株を注射後、白血病の進行と共に出現する。この PD-1<sup>+</sup>T 細胞は T 細胞受容体刺激に対する増殖能が極度に低下していた。この T 細胞は通常の T 細胞とは全く異なった特徴的な遺伝子発現を示しており、通常顆粒球系で発現が認められる C/EBP $\alpha$  遺伝子の転写が亢進していた。また産生するケモカインも既存のものとは大きく異なっており、Th 1・Th 2 のいずれの型のサイトカインの産生も低く、非常に高用量の osteopontin (OPN) を産生していることが明らかとなった。一方 IL-15 に対する反応性はコントロール群に対し 5 倍以上も上昇しており、PD-1<sup>+</sup>T 細胞を放射線照射マウスに移植すると、PD-1<sup>-</sup>細胞と同等に増殖することが分かった。つまり PD-1<sup>+</sup>T 細胞は T 細胞受容体を介したクローン増殖 (clonal expansion) の能力を欠いているが、生体内での恒常的増殖 (homeostatic proliferation) は行うことの出来るユニークな細胞と言える。さらにオステオポンチンなどの向炎症性タンパクを過剰に分泌している事が確認された。また生体内の 2 次リンパ組織においては B 細胞領域に局在していた。表面マーカー、局在などは近年同定された Follicular helper T 細胞 (Tfh) と類似しているが、その増殖能・サイトカイン産生能において明らかに Tfh とは異なる細胞であり、その形質を誘導する特定の遺伝子同定に取り組んでいる。

またヒトの白血病患者は重度の免疫不全状態にあり、感染リスク増大や再発が治療の大きな妨げとなっている。PD-1<sup>+</sup>T 細胞はマウスの白血病発症と同時に増加しており、免疫システム全体の機能不全の一端を担っている可能性が示唆された。ヒトの白血病患者における、PD-1<sup>+</sup>T 細胞の動態と微小残存病変および再発との関連について、現在精査を行っている。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

① 中嶋 康博, 湊 長博 : 白血病における PD-1 陽性 T 細胞. 臨床血液 53(5), 515-520 (2012)、査読なし

② 中嶋 康博, 湊 長博 : 白血病における免疫不全と PD-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T 細胞. 臨床免疫・アレルギー科 55(6), 681-686 (2011)、査読なし

[学会発表] (計 2 件)

① 中前美佳、中前博久、康 秀男、中根孝彦、廣瀬朝生、中嶋康博、日野雅之  
同種造血幹細胞移植前および、移植後の血清フェリチン値が予後に与える影響の包括的検討。第 59 回日本臨床検査医学会、2012.11.30、京都

② Sato K., Tahir S., Fukusima Y., Nakashima Y., Hamazaki Y., Minato N.  
A novel CD4<sup>+</sup> T cell population preferentially producing osteopontin steers altered immune function in senescence and malignancy.  
第 40 回免疫学会総会、2011. 11. 28、千葉

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中嶋 康博 (NAKASHIMA YASUHIRO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講  
師

研究者番号：40548567