

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 9 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461457

研究課題名(和文) 特発性造血障害におけるNKG2Dリガンド発現の臨床的意義の確立

研究課題名(英文) NKG2D ligands in bone marrow failure syndromes

研究代表者

花岡 伸佳 (Hanaoka, Nobuyoshi)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：40433370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：再生不良性貧血などの骨髓不全症候群(BFS)における特発性造血障害の発生に免疫機序の関与が想定されているが実体は不明であった。今回BFS患者の血漿中に遊離型NKG2Dリガンドの病的発現を見出し、解析したBFS患者の約半数にこのリガンド発現亢進が見られ、血球減少を伴っていた。また、遊離型NKG2Dリガンドは、NKG2Dリガンドを発現する腫瘍細胞へのNKG2D発現免疫細胞による傷害を抑制した。つまり、遊離型NKG2Dリガンドは特発性造血障害の免疫病態を直接反映する指標であり免疫介在性造血障害を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have previously proposed association of NKG2D immunity and BFS. However, NKG2D ligands were hardly detected on blood cells where expressed small amount of the ligands that probably induce marrow injury. In this study, we analyzed the relationship between soluble NKG2DLs (sNKG2DLs) in plasma and clinical characteristics. Approximately half of the BFS patients were positive for sNKG2DLs detected by conventional enzyme-linked immune sorbent assay, and these patients were accompanied by cytopenia. Exogenous sNKG2DLs down-regulated NKG2D receptors on peripheral blood mononuclear cells and weakened cytotoxic effect by the altered cells to leukemic Jurkat cells harboring membranous NKG2D ligands. Our results indicate that sNKG2DLs should be useful biomarkers for monitoring cytopenia of BFS, and that exogenous sNKG2DLs might protect hematopoiesis from NKG2D-mediated cytotoxicity in BFS.

研究分野：血液内科学

キーワード：特発性造血障害 NKG2D免疫 再生不良性貧血

1. 研究開始当初の背景

再生不良性貧血 (AA)、発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH)、骨髄異形成症候群 (MDS) などの骨髄不全症候群 (BFS) は、日本人に比較的多く発生し、特発性造血障害が主死因となる (Young N, *Bone marrow failure syndromes* 2000; Nishimura J, et al. *Medicine* 2006)。いずれの疾患も特発性造血障害に対して免疫抑制療法が奏効することから、共通の自己免疫を介する病態が想定される。事実、特定 HLA ハプロタイプとの関連、細胞傷害性 T 細胞や造血抑制サイトカイン (IFN- γ , TNF- α) の関与など、免疫の関与を示唆する間接的な知見が蓄積されている (Young N, *Bone marrow failure syndromes* 2000)。免疫抑制療法は、一般に重篤な感染症や癌などを誘発する。そのため、BFS における造血障害を導く免疫分子病態を解明し、副作用が少なく且つ効果的な分子標的療法の開発が切望されている。

最近、我々は BFS の一つである PNH の分子病態研究の中で、NKG2D 免疫が特発性造血障害の発生に関与することを提唱した (Hanaoka N, et al. *Blood* 2006 & 2012; Hanaoka N, et al. *Br J Haematol* 2009)。NKG2D 免疫を誘発するリガンドとしては、Cytomegalovirus UL16 binding protein (ULBP) や MHC class I chain-related molecule A and B (MICA/B) がある。これらは正常細胞には発現せず、細胞が腫瘍化やウイルス感染などのストレスを受けたときに細胞膜に病的発現するストレス誘導型蛋白である。いずれも NKG2D を受容体とし、その結合により NKG2D 陽性リンパ球 (NK 細胞、NKT 細胞、CD8 陽性 T 細胞や一部の CD4 陽性 T 細胞、T 細胞) が活性化され、その結果、NKG2D リガンド発現細胞は、これらのリンパ球により免疫攻撃を受け排除される (Groh V, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; Cosman D, et al. *Immunity* 2001)。興味深いことに、PNH 患者血球でもこれら NKG2D リガンドが膜発現し、発現血球は確かに NKG2D 陽性の自己リンパ球により傷害された (Hanaoka N, et al. *Blood* 2006)。さらに、AA 患者の骨髄細胞による *in vitro* コロニー形成能は、NKG2D 免疫の抑制により回復した (Hanaoka N, et al. *Br J Haematol* 2009)。実際の AA 患者においても、造血障害進行時に NKG2D リガンドの血球膜発現が検出され、それらの患者では造血障害に免疫抑制剤が奏効した (Hanaoka N, et al. *Br J Haematol* 2009)。さらに、この患者の NKG2D リガンド膜発現が消失すると、免疫抑制薬を減量しても造血障害の増悪は見られなかった (Hanaoka N, et al. *Br J Haematol* 2009)。つまり、NKG2D リガンド発現は特発性造血障害

の免疫病態の把握 (診断、経過観察など) に役立つ指標と考えられた。

一方、強力な細胞傷害活性を有する NKG2D 免疫の影響下でも、一部の NKG2D リガンド発現血球が残存することは不可解である。同様に、多くの進行性担癌患者においても NKG2D リガンド発現癌細胞が検出され (Groh V, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; Das H, et al. *Immunity* 2001)、生体内での NKG2D 免疫の機能不全が疑われている。この疑問に対して、私の留学中の上司であった Groh らは、担癌患者血清中に遊離型 NKG2D リガンドを見出し、さらにこのリガンドによる NKG2D 陽性リンパ球の機能低下が誘導された結果、NKG2D リガンド発現癌細胞が生存しうる (免疫エスケープ説) と説明した (Groh V, et al. *Nature* 2002)。その後、この説を支持する報告も散見されており、我々の BFS 患者の血液にも遊離型 NKG2D リガンドが存在する可能性がある。

2. 研究の目的

我々は、これまでに多くの BFS 患者の造血細胞膜上に NKG2D リガンドが病的発現していることを見出し、このリガンドが血球傷害性リンパ球の標的となることを確認した (*Blood* 2006; *Br J Haematol* 2009 & 2012)。さらに最近、BFS 患者の血漿中にも NKG2D リガンド (遊離型) の病的発現を見出した。そこで、本研究では、血液難病の死因となる特発性造血障害における膜発現型および遊離型 NKG2D リガンドの病態生理学的意義を追究し、NKG2D リガンド発現の臨床的意義の確立を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

患者白血球や骨髄細胞における NKG2D リガンドの血球膜発現および遺伝子発現は、フローサイトメトリー法で、患者血漿中に放出された遊離型 NKG2D リガンド発現は ELISA 法で測定した。得られた結果をもとに、NKG2D リガンド発現の特徴付 (発現動態など) を試み、NKG2D リガンド発現が特発性造血障害の免疫病態を直接反映する指標であることを確認した。次に、遊離型 NKG2D リガンド (患者血漿および精製ペプチド) が免疫細胞上の NKG2D 膜発現に与える影響をフローサイトメトリーで、NKG2D 介在性血球傷害に与える影響について細胞傷害実験で検証した。さらに、NKG2D リガンド発現と臨床病態との関連性を比較検討し、臨床的意義の確立を試みた。

(1) 血球膜発現型および血漿中遊離型 NKG2D リガンド発現の解析

同意の得られた特発性造血障害患者から血

液を採取し、デキストラン生食、溶血剤、Ficoll などを用いて白血球層の分離やリンパ球や顆粒球の精製分離を行った。BFS 患者の NKG2D リガンド 発現を複数の方法を用いて解析した。同時に、臨床応用可能な簡便で高感度の検査法も検討した。

ELISA 法による血漿中の遊離型リガンドの検出：

市販のキットを用いて BFS 患者血漿中の遊離型 NKG2D リガンド の定量を行った。

フローサイトメトリー法による膜発現型リガンド の検出：

BFS 患者の末梢白血球と骨髓細胞を NKG2D リガンド 特異抗体と分化抗原マーカー（顆粒球は CD11b, 骨髓単核細胞は CD34）との併用により NKG2D リガンド の血球膜発現を検索した。

(2) 血球膜発現型および血漿中遊離型の NKG2D リガンド 発現と造血障害の関連検証

NKG2D リガンド 発現が特発性造血障害の免疫病態を直接反映する指標となるか検証した。

膜発現型および遊離型 NKG2D リガンド 発現の特徴解析：

BFS における各々の NKG2D リガンド 発現の動態を健常人コントロールと比較検討した。

NKG2D リガンド 発現と造血障害の関連解析：NKG2D リガンド 膜発現による血球傷害誘導と遊離型 NKG2D リガンド による血球傷害防止に関して、臨床データを用いて検証した。

(3) 血漿中遊離型 NKG2D リガンド の NKG2D 免疫抑制活性の検討

遊離型 NKG2D リガンド の免疫細胞に与える NKG2D 膜発現や細胞傷害活性の変化などを検討した。

免疫細胞上の NKG2D 発現解析：

血漿中遊離型 NKG2D リガンド による BFS 患者リンパ球上の NKG2D 受容体発現量や発現程度の変化についてフローサイトメトリーで解析した。まず、遊離型 NKG2D リガンド 濃度が高い BFS 患者の血漿と共培養し、リンパ球上の NKG2D 発現変化を観察した。また、同定された NKG2D リガンド の精製ペプチドをリンパ球と共培養し、ペプチドの濃度依存性に NKG2D 膜発現が変化することも確かめた。

血球傷害解析：

血球傷害の程度は血球から放出される乳酸脱水素酵素 (LDH) を高感度に測定することにより判断できる (LDH 測定法)。NKG2D リガンド 膜発現血球を標的にして、遊離型 NKG2D リガンド を含む患者血漿または精製 NKG2D リガンド ペプチドで処理したリンパ球を用いて血球傷害実験を行う。抗 NKG2D 抗体を用いて NKG2D 免疫の関与を確認した。

4. 研究成果

(1) BFS 患者の NKG2D リガンド病的発現

BFS 患者の血漿中に、健常コントロール平均の 2 SD 以上のペプチド結合型蛋白である MICA (sMICA) と GPI 結合型蛋白である ULBP1 (sULBP1) および ULBP2 (sULBP2) を検出した (図 1A)。測定値の血小板数あたりへの換算は、遊離型 NKG2D リガンド (sNKG2DL) の検出をより容易にした (図 1)。これは、随時血解析であるため治療や感染などの影響が反映されているのかもしれない。sMICA は AA, PNH, RA 患者の 52%, 65%, 53% と疾患に差がなかったが、sULBP1 はそれぞれ 67%, 25%, 60% で GPI 欠損血球を有する PNH 患者において検出が乏しかった。一方、sULBP2 はいずれの疾患も 20% 程度であった。また、この約 60% の BFS 患者は、好中球膜上の ULBP2 も含めた NKG2D リガンド 発現も同時に認めていた (図 1: 黒丸)。これらの結果より、ULBP2 のヒト血球における細胞傷害活性の発動を勘案すると (Hanaoka Blood 2006)、ULBP2 は NKG2D 受容体陽性細胞傷害性細胞に完全に捕捉され遊離化しない、つまり傷害活性を誘発する強いトリガー分子であることが示唆された。

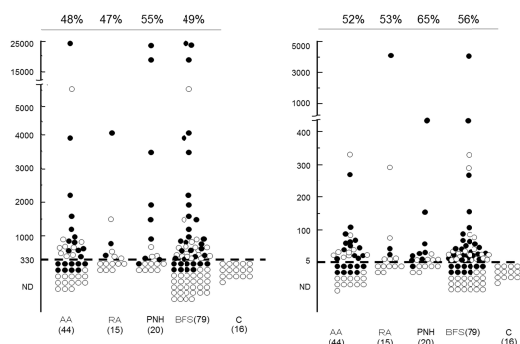


図 1. BFS 患者における NKG2D リガンド 発現 100 万血球 (左: 顆粒球、右: 血小板) あたりに換算。破線は健常人の平均値 + 2 SD

(2) NKG2D リガンド発現と造血障害の関係

血球膜型および血漿遊離型 MICA および ULBP1 リガンド が検出された BFS 患者の血球数は、リガンド が検出されない患者よりも少ない傾向が見られた。sULBP1 が最も良い関連性を示しており、膜型+遊離型あり <遊離型のみ <膜型のみ <両者なしの順に血球減少が見られた (図 2)。ULBP2 の有無は造血障害とは無関係であった。これまでに、BFS 患者の細胞傷害性細胞 (CTL や NK 細胞など) 上の NKG2D

受容体発現に異常はなく、NKG2D 介在性細胞傷害も確認されている (Hanaoka N. et al. Blood 2006 & BJH 2009)。NKG2D 介在性免疫が BFS の造血障害発生に関与していることがさらに強まった。さらに、sMICA と sULBP1 は (特に ULBP1 は感度も分離度も良好) 造血障害の分子マーカーとして有用であることが示唆された。また、膜型 ULBP2 は出現した途端に捕縛と傷害により喪失している可能性があり、残存する僅かな NKG2D リガンドには病的意義が乏しいことが示唆された。これまで、造血障害の標的分子として有力な NKG2D の膜型リガンドは血球膜上の発現量が乏しく陽性判定が困難であった。今回見出した遊離型リガンドは少量の血漿が入手できれば、通常の ELISA 法で検出が可能であるため、すぐにも臨床に寄与できる可能性がある。

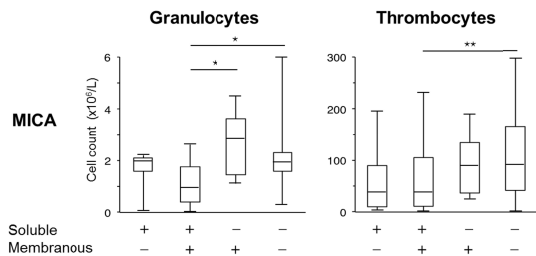


図 2 . BFS 患者の NKG2D リガンド発現と血球数の関係

* $p < 0.01$; ** $p < 0.05$

(3) 血漿遊離型 NKG2D リガンドの機能解析

sULBP1 存在下で末梢血単核球 (PBMNC) と培養すると PBMNC 上の NKG2D 受容体は downregulation された (図 3A)。さらに、この PBMNC を用いて NKG2D リガンドを有するリンパ性白血病株細胞 Jurkat 細胞に対する傷害実験を行うと、何も処理していない PBMNC に比して Jurkat 細胞への傷害は減弱した (図 3B)。

つまり、sNKG2D リガンドは細胞傷害性細胞の NKG2D 受容体と結合し、NKG2D 受容体の downregulation を介して NKG2D リガンド陽性標的細胞 (例: Jurkat 細胞) への細胞傷害を阻害することがわかった。

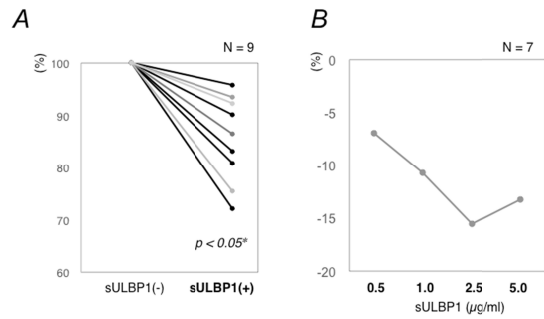


図 3 . sNKG2D リガンド存在下での細胞傷害 sULBP1 存在下では細胞傷害細胞膜上の NKG2D 受容体は downregulation され (A), 標的細胞 (Jurkat 細胞) への傷害活性は低下する (B)

(4) 今後の展開

本研究より、遊離型 NKG2D リガンドが NKG2D 介在性造血障害を抑制し、造血能の維持に貢献している可能性がある。特発性造血障害に対するペプシド医薬品の有力な候補であるが、NKG2D を介した腫瘍排除機構をも抑制し得るため慎重に検討を進めたい。

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 6 件)

(1) Mushino T, Hanaoka N, Murata S, Kuriyama K, Hosoi H, Nishikawa A, Tamura S, Nakakuma H, and Sonoki T. An Optimal Approach for Fluoroquinolone Garenoxacin Prophylaxis in Patients with Hematological Malignancies and Chemotherapy-induced Neutropenia. *J Blood Lymph.* (査読有り) 2017; 7:161.

(2) Murata S, Mushino T, Hosoi H, Kuriyama K, Nishikawa A, Nakakuma H, Sonoki T, Hanaoka N. Extracorporeal antimicrobial elimination enables antimicrobial mixing and affects resident bacteria. *J Antimicrob Chemother.* (査読有り) 2016; 71:1430-2. DOI: 10.1093/jac/dkv464

(3) Hanaoka N, Mushino T, Murata S, Nagakura S, Horikawa K, Kawaguchi T, Sonoki T, and Nakakuma H. Racial differences in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria thrombosis and glycosylphosphatidylinositol-deficient granulocytes. *J Hematol Thromb.* (査読有

り) 2016; 2:2. DOI: 10.13188/2380-6842.1000016.

(4) Hanaoka N. Cold haemagglutination in bone marrow. *BloodMed.com.* (査読あり) 2015. Case study Images 411

(5) Murata S, Mushino T, Hosoi H, Kuriyama K, Kurimoto M, Watanuki J, Nishikawa A, Sonoki T, Nakakuma H, Hanaoka N. Real-time monitoring of antimicrobial use density to reduce antimicrobial resistance through the promotion of antimicrobial heterogeneity in a haematology/oncology unit. *J Antimicrob Chemother.* (査読あり) 2015; 70:5661-4. DOI: 10.1093/jac/dkv151

(6) Hanaoka N, Murata S, Hosoi H, Shimokado A, Mushino T, Kuriyama K, Hatanaka K, Nishikawa A, Kurimoto M, Sonoki T, Muragaki Y, and Nakakuma H. B-cell-rich T-cell lymphoma associated with Epstein-Barr virus-reactivation and T-cell suppression following antithymocyte globulin therapy in a patient with severe aplastic anemia. *Hematology Reports.* (査読あり) 2015; 7:5906. DOI: 10.4081/hr.2015.5906

〔学会発表〕(計1件)

村田祥吾, 花岡伸佳, 大岩健洋, 小畑裕史, 山下友祐, 栗山幸大, 細井裕樹, 蒸野寿紀, 西川彰則, 中熊秀喜, 園木孝志. 特発性造血障害における可溶性NKG2Dリガンドの病的意義. 第77回日本血液学会学術集会、2015年10月16日~2015年10月18日、石川

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホ - ム ペ - ジ 等 :
<http://www.wakayama-med.ac.jp/med/ketunai/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

花岡 伸佳 (HANAOKA NOBUYOSHI)
和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員
研究者番号: 40433370

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

和歌山県立医科大学医学部血液内科学講座:
村田祥吾(MURATA SHOGO), 蒸野寿紀(MUSHINO TOSHIKI), 大岩健洋(OIWA TAKEHIRO), 小畑裕史(KOBATA HIROSHI), 山下友祐(YAMASHITA YUSUKE), 栗山幸大(KURIYAMA KODAI), 細井裕樹(HOSOI HIROKI), 西川彰則(NISHIKAWA AKINORI), 中熊秀喜(NAKAKUMA HIDEKI), 園木孝志(SONOKI TAKASHI)