

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
分担研究報告書

発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）造血障害における免疫分子病態の解明

研究分担者 花岡 伸佳 和歌山県立医科大学医学部血液内科学講座 准教授

研究要旨

造血障害は日本人 PNH 患者の主死因であり、造血障害の発生には免疫機序の関与が想定されている。我々は、NKG2D 免疫が造血障害を誘導する有力な分子病態と捉えており、これまでに PNH や特発性造血障害を共有する再生不良性貧血患者血球膜上の NKG2D リガンド（ULBPs, MICs）発現およびこのリガンドを標的とする自己リンパ球傷害を見出した。本年度は、研究参加の同意が得られた 2 名の PNH 患者を対象に iPS 細胞の作成を開始した。また、基礎研究として PNH 患者血漿中の遊離型 ULBP を MICA 同様に高率に検出することができた。この結果は NKG2D 免疫による PNH 造血障害の発生を示唆する所見であり、NKG2D 免疫が治療標的の候補として有力と考えられた。

A . 研究目的

PNHは溶血、血栓症、造血障害を主病態とする。PNH造血障害の発生機序は未確立であり早期の解明が望まれる。しかし、PNHが稀少疾患であること、解析血球を十分に確保できないことなどから造血障害の研究は進展していない。そこで、本研究は病的細胞の量的確保を可能とするiPS細胞技術を用いてモデル細胞を作成し、PNH造血障害発生に関与する免疫分子機序の解明や治療薬選定を目的とする。特に、我々が提唱しているNKG2D免疫と造血障害発生との関係を強化するエビデンスの集積も同時に行う。これまでMICAが血球膜以外に血漿中遊離型も存在していることを見出しており、今回は、もう一つのNKG2Dリガンドで血球表面に発現するGPI結合型のUL16-binding proteins (ULBPs) が血漿中で検出できることを遊離型ULBPs検出法の確立とともに検証することも目的とした。

B . 研究方法

(1) PNH-iPS細胞樹立

和歌山県立医科大学附属病院に定期通院している5名のPNH患者のうち、昨年度種々の情報により選定した患者に研究参加の同意を求めた。承諾の得られた2名の患者（PNH2（67歳女性）とAA-PNH1（74歳女性））に対してiPS細胞樹立を試みた（九州大学にて実施）。

(2) 患者血漿中の遊離型ULBP1濃度測定

遊離型ULBP1の血漿中濃度測定法（サンドイッチELISA法：Human ULBP-1 DuoSet, R&D systems, Minneapolis, MN）を確立し、これまでに確保している20名のPNH患者血漿を解析した。

(倫理面への配慮)

iPS樹立にあたり、学内ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会への研究概要説明と承認を得る手続きを行った。今後、iPS研究はこの承認された同意書をもとに参加者の同意（インフォームドコンセント）を得て実施する。本研究はPNH患者登録研究に対する学内疫学研究に関する倫理審査委員会での承認および参加者の同意を得て実施した。

C . 研究結果

(1) PNH-iPS細胞樹立

検体提供に同意の得られた患者2名のプロフィールを図1に示す。

図1. 患者背景

	Age (yo)	Sex	Duration (yr)	IS	Transfusion (単位/mo)
PNH2	68	F	3	x	x
AA-PNH1	75	F	26	CyA	0.5

IS, immunosuppressive therapy; CyA, ciclosporin; ATG, anti-thymocyte globulin; x, not applicant

図2 . 顆粒球膜上のNKG2D リガンド発現状況

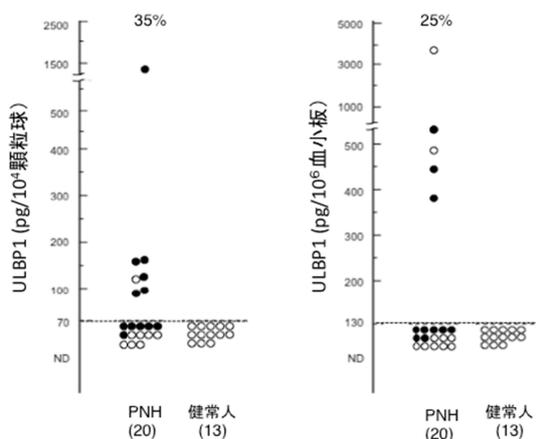
	ULBP1	ULBP2	ULBP3	MICA/B
PNH2	-	-	-	+
AA-PNH1	+	+	+	±

古典的PNHと再生不良性貧血-PNH症候群（AA-PNH）各1名であった。造血障害の程度はそれぞれgrade 1とgrade 3であった。顆粒球膜上のNKG2Dリガンド発現を両者で認められた（図2）。PNH2からは末梢血液、AA-PNH1からは末梢血液と骨髄液の提供を受けた。採取時の健康状態は良好であった。九州大学生体防御医学研究所でiPS細胞樹立を進めている。

(2) 患者血漿中の遊離型ULBP1濃度測定

単クローン抗体2種類を利用したELISA法の最適条件を決定後に、PNH患者血漿を解析した。健常人13名のULBP1濃度の平均+2SDをカットオフ値（破線）としたところ顆粒球数換算で35%、血小板数換算で25%のPNH患者血漿中に遊離型ULBP1発現が認められた（図3）。膜発現を欠く患者（ ）より有する患者（ ）に遊離型リガンドも検出される傾向が見られた（図3）。

図3．血漿中の遊離型 ULBP1 濃度



D．考察

NKG2Dリガンド膜発現血球と造血障害の両者を有するPNH患者からiPS細胞が樹立出来れば、NKG2D免疫と造血障害の関係を解析することが可能となる。一方、PNHは同一患者（遺伝背景が同じ）で表現型のみが異なる正常型血球とPNH型血球が混在しており、両型のiPS細胞の樹立によりPNH発症機序にも迫れる。今回試みた症例から、これら全てを満たすiPS細胞が樹立されるかもしれない。また、遊離型ULBP1がMICAと同様に患者血漿中に検出された。膜型または遊離型のいずれかのリガンドを有する患者が約7割認められたことから、PNH造血

障害発生へのNKG2D免疫の関与が強く示唆された。遊離型リガンドの造血障害への影響は、今後も解析を続ける必要がある。

E．結論

PNH造血障害にNKG2D免疫が関与しているエビデンスが集積できた。iPS細胞樹立によるPNH造血障害モデル作成が、今後の研究の発展に重要な役割を果たすと考える。

F．健康危険情報

総括研究報告書へ記載

G．研究発表

1．論文発表

Hanaoka N. Cold haemagglutination in bone marrow. BloodMed.com. Images 411, 2015.

2．学会発表

村田祥吾、花岡伸佳、畑中一生、栗山幸大、細井裕樹、蒸野寿紀、西川彰則、田村志宣、園木孝志、中熊秀喜:造血器疾患治療におけるReal-time AUD monitoring systemを用いた耐性菌抑制効果の検討, 第76回日本血液学会学術集会, 10月31~11月2日, 大阪.

H．知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1．特許取得

「該当なし」

2．実用新案登録

「該当なし」

3．その他

「該当なし」