

Identification of an HLA class I allele closely involved in the auto-antigen presentation in acquired aplastic anemia

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-11-08 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Zaimoku, Yoshitaka メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00052710

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



【総説】

第16回 高安賞優秀論文賞受賞

論文 「Identification of an HLA class I allele closely involved
in the auto-antigen presentation in acquired aplastic anemia
Blood 129巻21号2908-2916頁 2017年5月掲載
Yoshitaka Zaimoku

「再生不良性貧血の自己抗原提示に関与するHLAクラスIアレルの同定」

材木 義隆 (ざいもく よしたか)

背景

再生不良性貧血 (aplastic anemia, AA) は、骨髄の造血幹・前駆細胞 (hematopoietic stem and progenitor cell, HSPC) が枯渇した結果、汎血球減少を来す症候群である。T細胞を選択的に抑制する免疫抑制療法が奏効することなどから、T細胞による自己免疫疾患であると考えられているが、標的になっている自己抗原など詳細な免疫病態は明らかになっていない。

近年、single nucleotide polymorphism (SNP) アレイ解析の結果、コピー数変化を伴わない6番染色体短腕のヘテロ接合性の喪失 (loss of heterozygosity, 6pLOH) によって、片親から遺伝したHLAクラスIアレルすべてを欠失した血球がAA症例の約13%から検出されることが明らかになった (図1A)。これは細胞傷害性Tリンパ球 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) がAAの発症に関与していることを示唆する重要な所見である。すなわち、6pLOHによりHLA

クラスIアレルを欠失したHSPCは、標的となる自己抗原をCTLへ提示できなくなるため、自己反応性CTLの攻撃から免れて増殖するものと考えられている。さらに、*HLA-B*40:02*, *HLA-A*31:01*, *HLA-A*02:06*, *HLA-A*02:01*の4つのクラスIアレルは、6pLOHによって欠失するハプロタイプに含まれやすく、AA症例におけるアレル保有率が高かったことから、AAの自己抗原提示に関与している可能性があると考えられた¹⁾。しかし、6pLOHは膨大な多型のある3種類のHLAクラスI遺伝子 (*HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*) だけでなく、6番染色体短腕に存在する多くの遺伝子に影響するため、少数例の解析では実際にどのアレルがAAの病態に関与しているのかを決めることは困難であった。

本研究では、AAの自己抗原提示に関与しているHLAクラスIアレルを同定するために、HLAアレル特異的デジタルPCR法およびHLAアレル特異的モノクローナル抗体の作製法を新たに開発し、さらなる多数例において

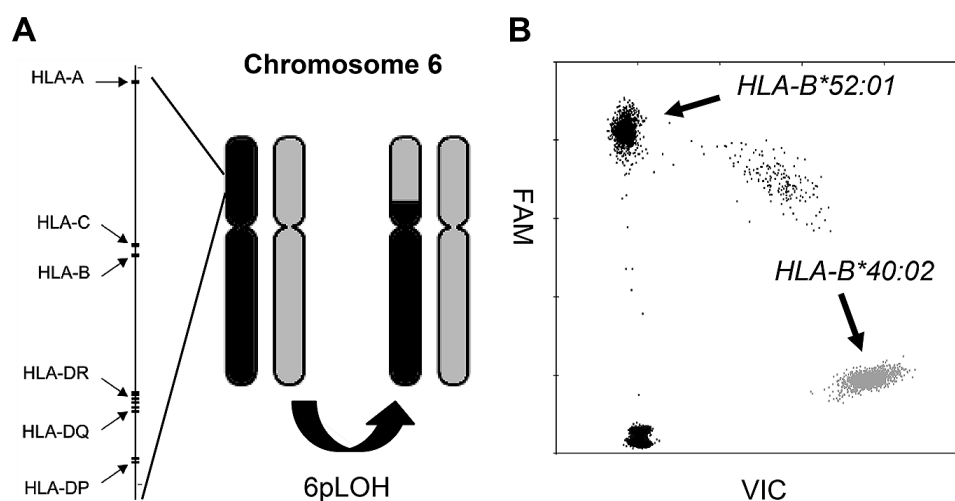


図1. 6pLOHの検出。(A) 6pLOHによる染色体構造の変化。片親由来の6番染色体短腕がもう一方の6番染色体短腕に置換されている。片親由来のHLAアレルをすべて欠失するが、通常の染色体検査では検出することができない。(B) デジタルPCRによる6pLOHの検出。HLAアレル特異的SNPを利用し、HLA遺伝子1コピーにつき1ドットとしてアレル毎に別の位置に描出されるため、ヘテロ接合のHLAアレルのコピー数を同時に正確に定量することができる。通常ヘテロ接合アレルのコピー数は等しいが、6pLOH血球が存在すると比率に偏りが生じる。

HLAアレル欠失血球の検索を行った。その結果、*HLA-B*40:02*は6pLOHによって欠失する確率が最も高いだけでなく、*HLA-B*40:02*遺伝子内の体細胞変異によって*HLA-B4002*のみ欠失した血球が6pLOH血球以上に高頻度に検出されることを見出し、*HLA-B4002*によるHSPCの自己抗原提示がAAの免疫病態において極めて重要な役割を担っていることを示した。

デジタルPCRによる6pLOHの検出

SNPアレイによる6pLOHの検出は感度が低く、欠失しているアレルを直接検出できないという欠点があった。そこで我々は、簡便かつ高感度に6pLOHを検出し、欠失しているアレルを直接判定できるHLAアレル特異的デジタルPCR法を開発した(図1B)。このデジタルPCR法を用いて、312例のAA症例末梢血DNAをスクリーニングしたところ、新たに43例から6pLOHが検出された。その中で最も欠失しやすいHLAアレルは、*HLA-B*40:02*であった(*HLA-B*40:02*を保有する74例のうち25例[38%]が6pLOH陽性で、その全例が*HLA-B*40:02*を含むハプロタイプを欠失)。一方で、*HLA-A*31:01*、*HLA-A*02:01*、*HLA-A*02:06*は欠失しやすいアレルとして抽出されなかった。同様に、解析したAA症例のHLAアレルの保有率を日本の一般人口のデータベースと比較したところ、*HLA-B*40:02*はAA例に高頻度に見られた(13% vs 7.9%, $P = 9.3 \times 10^{-6}$)のに対し、*HLA-A*31:01*、*HLA-A*02:01*、*HLA-A*02:06*の保有率には有意な差を認めなかった。

HLA-B4002 単独欠失血球の検出

2013年に*HLA-B*40:02*にナンセンス変異を有する小児重症AA例が初めて報告された²⁾。6番染色体短腕のアレルすべてを欠失する6pLOHと違い、*HLA-B4002*を単独で欠失した血球が普遍的に認められるのであれば、*HLA-B*40:02*こそがAAの病態に関与しているアレルといえる。しかし、その後に行われた大規模なエクソーム解析では、6pLOH以外のHLAアレルの体細胞変異は報告されなかった³⁾。

最近我々は、高力価な抗HLA抗体を保有するドナーの末梢血リンパ球を用いて、HLAアレル特異的モノクローナル抗体を作製できることを見出し、抗*HLA-B4002*抗体を新たに作製した⁴⁾。この抗*HLA-B4002*抗体と*HLA-A*アレル特異的抗体を用いて白血球を二重染色することにより、同じハプロタイプにある*HLA-A*アレルと*HLA-B4002*とを同時に欠失する6pLOH血球と、6pLOH以外の体細胞変異によって*HLA-B4002*のみ欠失する血球とを区別して検出することができる(図2A)。*HLA-B*40:02*を保有するAA 28例において*HLA-B4002*欠失血球をスクリーニングしたところ、21例(75%)で*HLA-B4002*欠失血球を認めた。そのうち、*HLA-B4002*を単独で欠失した血球は19例(68%)から検出され、12例(43%)から検出された6pLOH血球よりも多くの症例に認めた(図2B)。この結果から、*HLA-B*40:02*を保有するAA例の多くでは、HSPCがCTLから逃避するには*HLA-B4002*を欠失するだけで十分であることが分かった。*HLA-B4002*による抗原提示は、AAの病態に極めて重要な役割を担っていると考えられる。

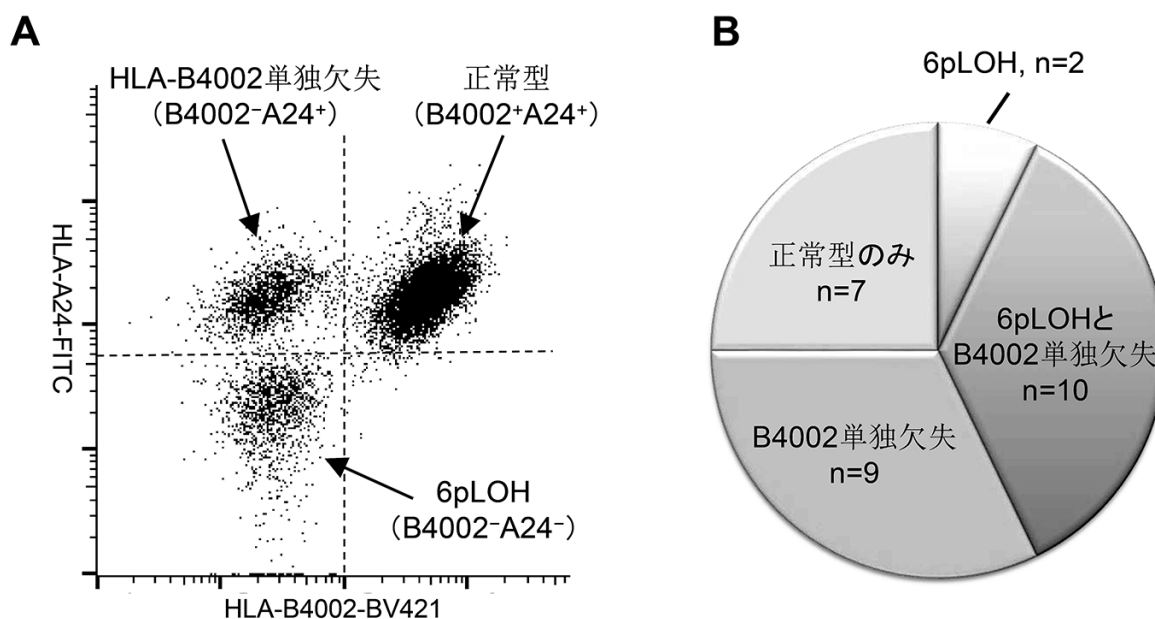


図2. 抗*HLA-B4002*抗体を用いた*HLA-B4002*欠失顆粒球の検出。(A) 6pLOH血球と*HLA-B4002*単独欠失血球が検出された症例。同じハプロタイプにある*HLA-A24*と*HLA-B4002*を保持する正常血球(*B4002+A24+*)、*HLA-A24*と*HLA-B4002*をともに欠失する6pLOH血球(*B4002-A24-*)、*HLA-B4002*を欠失し*HLA-A24*を保持する*HLA-B4002*単独欠失血球(*B4002-A24+*) が共存している。(B) *HLA-B*40:02*陽性AA症例28例から検出された*HLA-B4002*欠失血球の組み合わせとその比率。

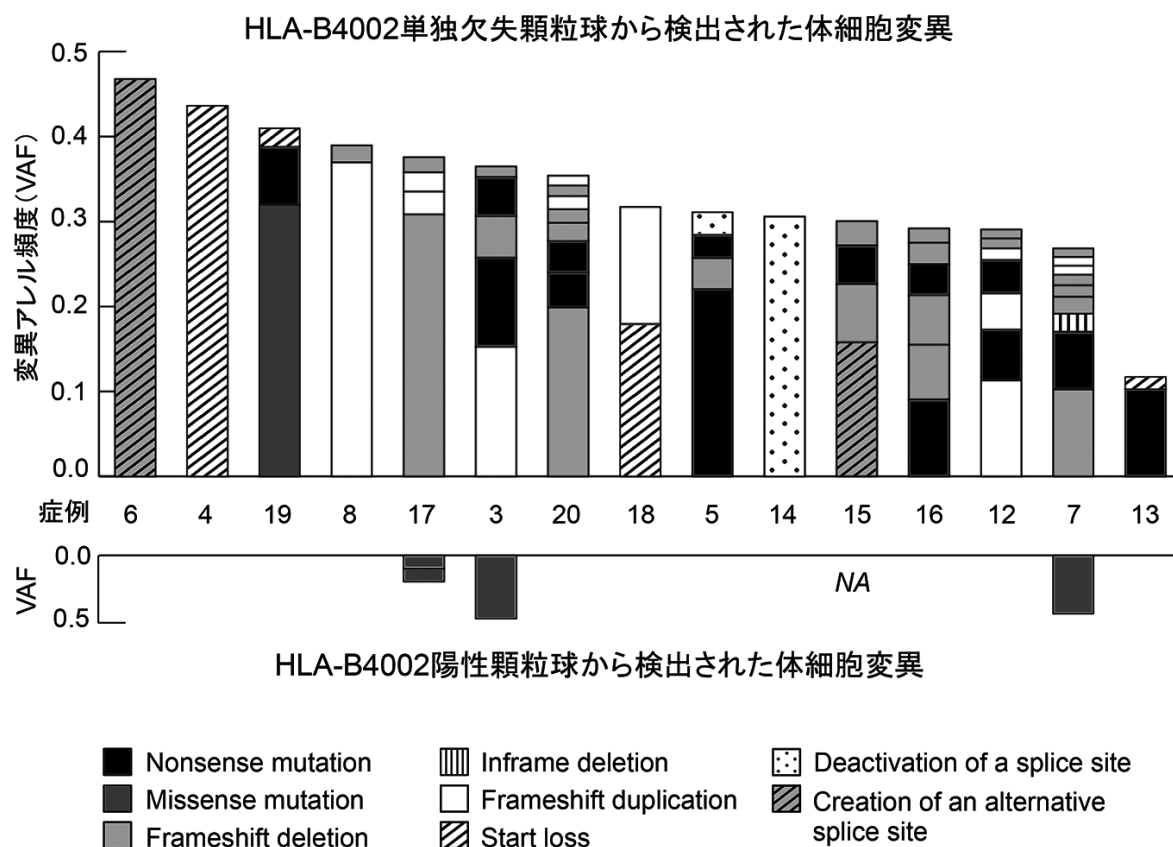


図3. *HLA-B*40:02*に検出された体細胞変異の種類と変異アレル頻度。(上) *HLA-B4002*単独欠失血球を保有するAA 15例の*HLA-B4002*単独欠失顆粒球に認めた体細胞変異。(下) 同じ症例の*HLA-B4002*陽性顆粒球に認めた体細胞変異。

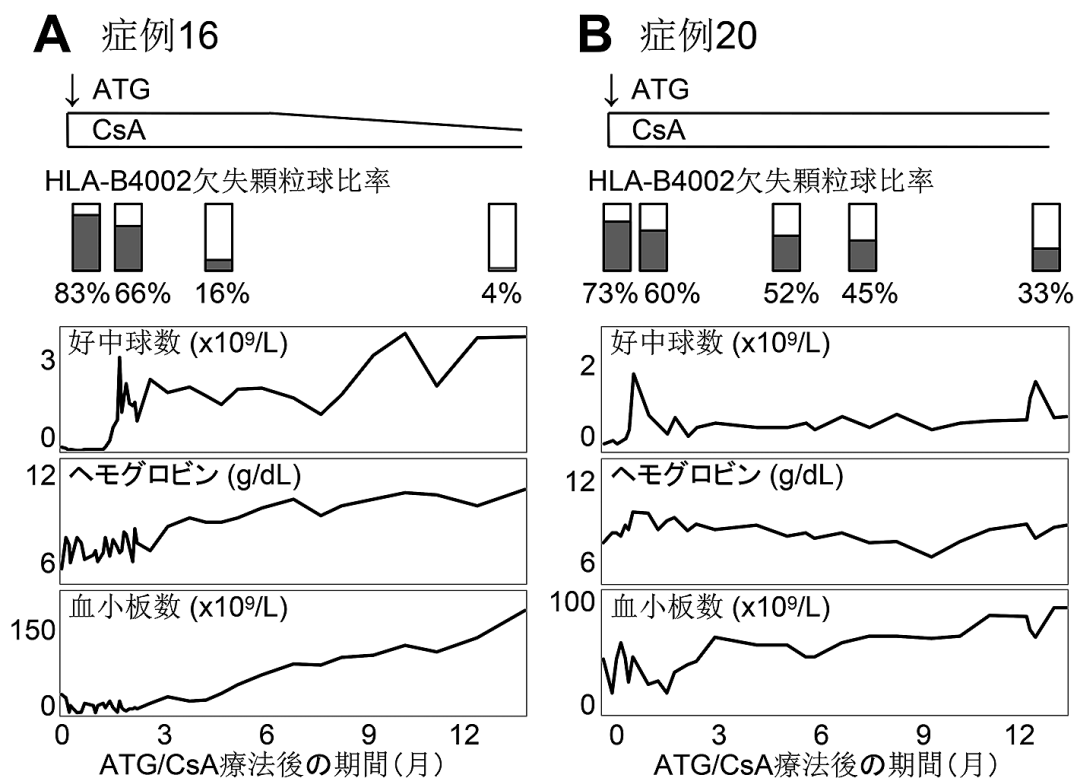


図4. *HLA-B4002*欠失顆粒球比率の経時変化. *HLA-B4002*欠失血球比率を免疫抑制療法時から複数回測定できた2例の経過を示す. いずれの症例も免疫抑制療法が奏効し, 血球の回復とともに*HLA-B4002*欠失顆粒球比率は徐々に減少した.

オリゴクローナルな HLA-B4002 欠失血球

6pLOH 血球よりも高率に存在する HLA-B4002 単独欠失血球は、これまでのゲノム解析ではなぜほとんど検出されなかったのであろうか？ HLA-B4002 単独欠失顆粒球をソーティングして HLA 遺伝子の deep sequencing を行ったところ、検索した 15 例のすべてで、HLA-B4002 欠失を来しうる *HLA-B*40:02* の体細胞変異が検出された (図 3 上)。多くの症例からは複数の変異が検出され (1 – 9 種類, 中央値 4 種類), HLA-B4002 欠失血球はオリゴクローナルな *HLA-B*40:02* 変異 HSPC に支持されていると考えられた。その結果、それぞれの変異アレル頻度は低く、中央値は 4% (範囲, 1 – 47%) であった。解析した HLA-B4002 単独欠失顆粒球の比率が、0.5 – 60% (中央値, 17%) であったことを考慮すると、全顆粒球における変異アレル頻度は 0.1 – 18% (中央値, 0.9%) まで低下することになる。膨大な多型と複数の遺伝子座のために HLA 遺伝子のシーケンス自体が難しいことも重なり、HLA アレル単独欠失血球分画をソーティングせずに行っていたこれまでの解析では、HLA アレルの体細胞変異を見出すことは困難であったと考えられる。

興味深いことに、陰性コントロールとして使用した HLA-B4002 陽性血球からも 4 種類のミスセンス変異が検出された (図 3 下)。これらのミスセンス変異はすべて、抗原提示に直接は関与しない α -3 ドメインの限局した部分に位置していた。HLA クラス I 分子の α -3 ドメインは、CTL の T 細胞受容体の共受容体である CD8 分子との結合に重要な部位であり、 α -3 ドメイン内の 1 アミノ酸が置換されるだけで CTL の認識から免れうることが知られている。したがって、この HLA-B4002 陽性血球から検出された *HLA-B*40:02* のミスセンス変異も、CD8 陽性 CTL が HLA-B4002 を介して HSPC を認識し、攻撃していることを示唆している。

HLA-B40:02 陽性例の免疫抑制療法への反応性

HLA-B4002 欠失血球を保有する 21 例のうち 15 例には抗胸腺グロブリン (anti-thymocyte globulin, ATG)・シクロスポリン (cyclosporine, CsA) 併用免疫抑制療法が実施された。そのうち HLA-B4002 欠失血球を保有する 11 例の全例で寛解が得られた (完全寛解 5 例, 部分寛解 6 例)。HLA-B4002 欠失血球を認めなかった 4 例のうち 3 例で寛解が得られた (完全寛解 2 例, 部分寛解 1 例)。

HLA アレル欠失血球比率の経時変化

HLA-B4002 欠失血球比率を発症時から経時的に測定できた 2 例では、いずれも発症時の HLA-B4002 欠失血球

比率は非常に高く、免疫抑制療法後、造血の回復に伴い徐々に減少した (図 4)。一方で、免疫抑制療法によって寛解を得て 6 – 23 年経過した 4 例では、6 – 10 か月の観察期間のあいだ HLA-B4002 欠失血球は同じ比率で検出され続けた。免疫抑制療法によって CTL の攻撃が解除されると、生き残った正常な HSPC も造血に寄与できるようになり、正常血球比率が一旦増加するが、最終的には HLA アレル変異 HSPC と正常 HSPC のそれぞれの造血支持能に応じて、HLA アレル欠失血球比率が一定になるのではないと思われる。

結 論

*HLA-B*40:02* を保有する AA では、HLA-B4002 による抗原提示を妨げる様々な体細胞変異が高頻度に検出されることから、HLA-B4002 を介した HSPC の CTL への自己抗原提示は、AA の免疫病態において極めて重要な役割を担っていること示唆された。今後、欠失アレルに提示されている自己抗原や、それを認識する CTL を解析することによって AA の免疫病態の解析が進み、特異的な治療法の開発につながることが期待される。

文 献

- 1) Katagiri T, Sato-Otsubo A, Kashiwase K, et al. Frequent loss of HLA alleles associated with copy number-neutral 6pLOH in acquired aplastic anemia. *Blood*. 2011; 118(25): 6601-6609.
- 2) Osumi T, Miharu M, Saji H, et al. Nonsense mutation in *HLA-B*40:02* in a case with acquired aplastic anaemia: a possible origin of clonal escape from autoimmune insult. *Br J Haematol*. 2013; 162(5): 706-707.
- 3) Yoshizato T, Dumitriu B, Hosokawa K, et al. Somatic Mutations and Clonal Hematopoiesis in Aplastic Anemia. *N Engl J Med*. 2015; 373(1): 35-47.
- 4) Takamatsu H, Zaimoku Y, Ozawa T, et al. Development of Novel Human Anti-HLA-Monoclonal Antibodies for Clinical Applications Using Peripheral Blood B Cells Derived from Anti-HLA Antibody-Positive Donors [abstract]. *Blood*. 2016; 128: 4723.

Profile



2009年 3月 金沢大学医学部医学科卒業
 2011年 4月 金沢大学血液呼吸器内科入局
 2017年 6月 金沢大学医学系研究科細胞移植学博士課程修了
 2017年 10月～アメリカ国立衛生研究所客員研究員