様式Ｃ－１９

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２４年５月２２日現在

機関番号：１３３０１
研究種目：基盤研究（Ｂ）
研究期間：2009～2011
課題番号：21390291
研究課題名（和文）　自己免疫性骨髄不全発症の引き金となる自己抗原の同定

研究課題名（英文）　Identification of auto-antigens which trigger the development of immune-mediated bone marrow failure

研究代表者
中尾　眞二（NAKAO SHINJI）
金沢大学・医学系・教授
研究者番号：70217660

研究成果の概要（和文）：再生不良性貧血（再不貧）患者のゲノム解析により、HLA 遺伝子領域を含む第 6 染色体短腕の uniparental disomy（6pUPD）のため片側の HLA 発現を欠失した白血球が、再不貧全体の 13%に検出されることを見出した。この 6pUPD によって失われる HLA ハプロタイプには HLA-A*02:01, A*02:06, A*31:01, and B*40:02 の 4 種類のクラス I アレルが高頻度に含まれており、これらは再不貧の疾患感受性にも関与していた。再不貧は、これらの HLA 分子によって提示される自己抗原に特異的な細胞傷害性 T 細胞が、造血幹細胞を攻撃することによって発症することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Genomic analyses of patients with acquired aplastic anemia (AA) revealed the presence of leukocytes lacking an HLA haplotype as a result of uniparental disomy of chromosome 6p in 13% of patients. The missing HLA haplotypes were strongly biased to HLA-A*02:01, A*02:06, A*31:01, and B*40:02, which were over-represented in Japanese AA cases. Cytotoxic T lymphocytes specific to hematopoietic stem cell-derived auto-antigens presented by the particular HLAs was thought to trigger the development of AA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2009 年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2010 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2011 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総　計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：細胞移植学
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：再生不良性貧血、6pUPD、HLA、細胞傷害性 T 細胞、自己抗原

１．研究開始当初の背景

再不貧は、造血幹細胞に対する免疫学的な攻撃によって発症すると考えられている。しかし、再不貧では動物モデルが存在せず、またヒト造血幹細胞の良いアッセイ方法も確立されていないため、その免疫学的攻撃の実態は不明であった。われわれは、平成 21 年までの研究により、再不貧の発症には抗原特異的な T 細胞が関与していることや、特定の HLA クラス II 遺伝子（DRB1*1501）や発作

性夜間血色素尿症（paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: PNH）形質の血球の出現が免疫病態に強く関与していることなどを明らかにしてきた。ただし、発症の引き金となる造血幹細胞の自己抗原や、造血抑制に関わるサイトカインは明らかにすることができなかった。

一部の再不貧患者では、明らかに免疫病態によって起こっていると考えらえる例であっても、PNH 型形質の血球を産生する *PIG-A* 変異幹細胞や、del(13q)などによるクローン性造血がしばしば観察される。これらの異常造血幹細胞クローンは、それ自身の増殖能力が高いために造血に寄与するようになった訳ではなく、正常造血幹細胞に対する免疫学的なプレッシャーがきっかけとなって、生存優位性を獲得したと考えられる。したがって、再不貧患者の白血球におけるゲノム異常をスクリーニングすれば、免疫病態の解明につながるゲノム異常が検出される可能性があると考えられた。

２．研究の目的

再不貧における免疫病態を明らかにするため、再不貧患者の白血球におけるゲノムのコピー数異常・不均衡の有無をスクリーニングした。

３．研究の方法

再不貧患者から同意を得て末梢血を採取し、DNA を抽出後、Affymetrix 社製の GeneChip® 500K arrays を用いた single nucleotide polymorphism (SNP)アレイ解析により、ゲノムコピー数の異常と不均衡の有無を検索するとともに、全例の HLA アレルを決定した。第 6 染色体短腕の uniparental disomy (6pUPD) が陽性であった例のうち、HLA-A がヘテロ接合体の例に対しては、HLA-A アレル特異的なモノクローナル抗体を用いて HLA-A 抗原欠失の有無を調べた。

４．研究成果

(1)6pUPD の検出

306 例中 46 例（15%）において、50 か所の遺伝子領域に何らかの遺伝子コピー数異常・不均衡変異を認めた。そのうち最も顕著であったのは、40 例（13%）で認められた 6pUPD による loss of heterozygosity (LOH)であった（図 1）。6pUPD は、全例においてHLA クラス I 遺伝子領域を含んでいた。6pUPD 陽性例の約半数において UPD の起点は単一ではないことから、6pUPD クローンは複数存在することが示唆された。それにも関わらず、欠失しているハプロタイプは常に同側であったことから、6pUPD 陽性クローンが選択されているのは、片親由来のハプロタイプが有する特定の HLA 分子が原因と考えられた。6pUPD 陽性例における SNP パターンは、正常細胞との間のモザイクパターンであり、さらに患者末梢血における CD3 陽性 T 細胞の DNA では明瞭な 6pUPD は認められなかった。したがって、再不貧症例で認められた 6pUPD は先天的なものではなく、後天的に生じた 6pUPD クローンが、特定の HLA を持つがゆえに選択的されたものと考えられた。

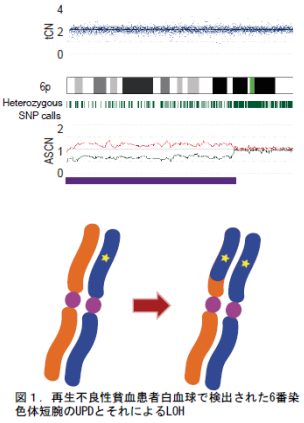


図１．再生不良性貧血患者白血球で検出された6番染色体短腕のUPDとそれによるLOH

(2)6pUPD 陽性例の白血球における HLA 分子の欠失

SNP アレイ解析により、6p 領域の HLA 遺伝子に UPD が起こっていることが判明したことから、どの血球レベルで HLA 欠失が起こって

いるかをフローサイトメトリーで検討した。6pUPD は全 HLA クラス I 領域に及んでいるため、HLA-A 抗原に特異的な抗体を用いれば、6pUPD を来している血球を検出することができる。そこで、患者末梢血中の白血球および骨髄中の CD34 陽性細胞を対象として、異なる血球系統における HLA-A 発現を解析した。HLA タイピングの結果、HLA-A 抗原がヘテロ接合体であった 19 例を対象として検索したところ、HLA-A 抗原が欠失している白血球が全例で検出された。この HLA-A 欠失血球は、発症直後または治療開始前の例においても認められ、1-16 カ月（中央値 6 カ月）間持続していることが、経時的検討により確認された。片側の HLA-A 抗原の発現欠失は、顆粒球、単球、B 細胞、T 細胞を含む患者末梢血中の全白血球で認められた（図 2）。さらに、5 例において骨髄の CD34 陽性細胞を対象にその発現を確認したところ、全例で末梢血と同じ HLA-A 抗原の発現欠失が認められた。このうち 1 例では、免疫抑制療法により寛解を得た後の約 2 年間、ほぼ一定の割合で HLA-A 抗原の発現欠失が認められた。これらの結果から、6pUPD は長期造血支持能力をもつ未分化な造血幹細胞に起こっていると考えられた。

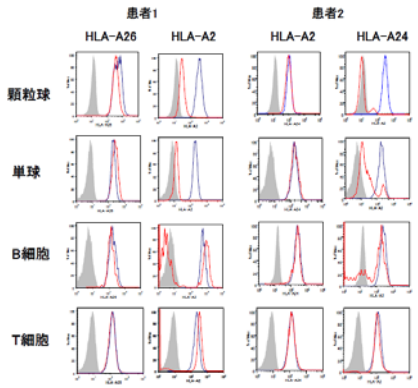


図2. 免疫抑制療法後の寛解例にみられるHLA-A抗原欠失血球

(3)6pUPD によって欠失しやすい HLA 遺伝子

再不貧患者の造血幹細胞における 6pUPD の標的が HLA 遺伝子であることから、6pUPD 陽性例で欠失している HLA アレルは、細胞傷害性 T 細胞（cytotoxic T cell: CTL）への自己抗原提示に関わっている可能性がある。我々は、HLA SNP haplotype table を基に、日本骨髄バンクから提供を受けた 1800 組のドナー・患者の HLA データと、その 500K SNP データを統計的に解析することにより、6pLOH 陽性 40 例における HLA 欠失ハプロタイプを決定した。その結果、HLA 欠失ハプロタイプに含まれている HLA クラス I アレルには大きな偏りがあり、特に HLA-A*31:01、B*40:02、 C*03:04、A*0201、A*02:06 の 5 アレルの頻度が高いことが示された。HLA 遺伝子連鎖不平衡の影響を加味した多変量解析を行ったところ、HLA-A*31:01、 B*40:02、A*02:01、A*02:06 の 4 つのアレルが、ハプロタイプの欠失を決定する高頻度アレルであった。これらの 4HLA アレルが再不貧の自己抗原提示に関与しているとすれば、これらは 6pUPD 陽性例のみならず、再不貧の発症そのものに関与している可能性がある。そこで、日本骨髄バンクに登録されている 6,613 例の血液疾患症例を対象に、再不貧症例（407 例）とそれ以外の血液疾患症例（6,206 例）との間で、これら 4HLA アレルの保有率を比較した。その結果、発症リスクに関する各 HLA 遺伝子のオッズ比は、1.87 （A*02:01)、2.22 （A*02:06)、1.37 （A*31:01)、1.95 （B*40:02）と高値であった。したがって、これら 4HLA アレルは再不貧の発症自身に深く関与している（疾患感受性遺伝子である）ことが明らかになった。

(4)再不貧の免疫学的病態における 6pUPD の意義

6pUPD 陽性例において、欠失ハプロタイプに高頻度に含まれる HLA アレルが再不貧の疾患感受性遺伝子であったことから、6pUPD 陽性クローンの出現は再不貧の免疫病態に関連していることが示唆される。すなわち、ある HLA 分子によって提示される造血幹細胞の

標的抗原に対する免疫寛容が破綻し、この抗原を認識する CTL が造血幹細胞を攻撃することによって再不貧が発症する。元々 6pUPD 陽性造血幹細胞を有する個体では、その抗原提示に必要な特異的 HLA 分子を欠く造血幹細胞が、CTL による攻撃を免れて造血に寄与するようになる（図 3)。近年、HLA ハプロタイプ半合致造血幹移植後に再発した白血病においても 6pUPD が起こっており、白血病細胞は不適合 HLA 抗原を失うことによりドナー由来 T 細胞の攻撃を回避していることが報告されている。我々の観察結果は、HLA 欠失による CTL からのエスケープが、同種抗原だけでなく、自己抗原を提示する造血幹細胞においても起こっていることを示している。

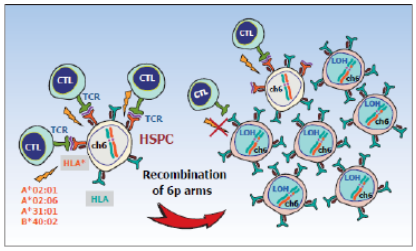


図3　6pUPD陽性造血幹細胞は細胞傷害性T細胞の攻撃を免れてHLA欠失血球を産生する。

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９件）

1.Takamatsu,H.,Yagasaki,H.,Takahashi,Y.,Hama,A.,Saikawa,Y.,Yachie,A.,Koizumi,S.,Kojima,S.,Nakao,S.,Aplastic anemia successfully treated with rituximab: the possible role of aplastic anemia-associated autoantibodies as a marker for response.,Eur J Haematol.,査読有,86,2011,541-545
2. Katagiri,T.,Sato-Otsubo,A.,Kashiwase,K.,Morishima,S.,Sato,Y.,Mori,Y.,Kato,M.,Sanada,M.,Morishima,Y.,Hosokawa,K.,Sasaki,Y.,Ohtake,S.,Ogawa,S.,Nakao,S.,Frequent loss of HLA alleles associated with copy number-neutral 6pLOH in acquired aplastic anemia., Blood.,査読有,118,2011,6601-6609
3. Ohata,K.,Iwaki,N.,Kotani,T.,Kondo,Y.,Yamazaki,H.,Nakao,S.,An Epstein-Barr virus-associated leukemic lymphoma in a patient treated with rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine for hepatitis-associated aplastic anemia., Acta Haematol.,査読有,127,2011,96-99
4.Takamatsu,H.,Yagasaki,H.,Takahashi,Y.,Hama,A.,Saikawa,Y.,Yachie,A.,Koizumi,S.,Kojima,S.,Nakao,S. Aplastic anemia successfully treated with rituximab: The possible role of aplastic anemia-associated autoantibodies as a marker for response., Eur J Haematol,査読有,86,2011,541-55
5.Katagiri,T.,Qi,Z.,Ohtake,S.,Nakao,S.,GPI-anchored protein-deficient T cells in patients with aplastic anemia and low-risk myelodysplastic syndrome: implications for the immunopathophysiology of bone marrow failure., Eur J Haematol,査読有,86,2011,226-36
6.Qi,Z.,Takamatsu,H.,Espinoza,J,L.,Lu,X.,Sugimori,N.,Yamazaki,H.,Okawa,K.,Nakao,S. Autoantibodies specific to hnRNP K: a new diagnostic marker for immune pathophysiology in aplastic anemia.,Ann Hematol., 査読有,89,2010,1255-63
7.Takamatsu,H.,Espinoza,J,L.,Lu,X.,Qi,Z.,Okawa,K.,Nakao,S.,Anti-moesin antibodies in the serum of patients with aplastic anemia stimulate peripheral blood mononuclear cells to secrete TNF-alpha and IFN-gamma., J Immunol,査読有,182,2009,703-710
8.Espinoza,J,L.,Takamatsu,H.,Lu,X.,Qi,Z.,Nakao,S., Anti-moesin antibodies derived from patients with aplastic anemia stimulate monocytic cells to secrete TNF-alpha through an ERK1/2-dependent pathway., Int Immunol.,査読有,21,2009,913-923
9.Sugimori,C.,Mochizuki,K.,Qi,Z.,Sugimori,N.,Ishiyama,K.,Kondo,Y.,Yamazaki,H.,Takami,A.,Okumura,H.,Nakao,S.,Origin and fate of blood cells deficient in glycosylphosphatidylinositol-anchored protein among patients with bone marrow failure., Br J Haematol,査読有,147,2009,102-112

〔学会発表〕（計４件）

1.Hosokawa,K.,Katagir,T.,Sugimori,N.,Ishiyama,K.,Sasaki,Y.,Seiki,Y.,Sato-Otsubo,A.,Sanada,M.,MD,Ogawa,S.,Nakao,S.,Bone marrow failure with 13q deletion: A distinct clinicopathological entity with immune pathophysiology., The American Society of Hematology 53rd Annual Meeting, 2011年12月12日,San Diego Convention Center,(California,USA.)
2.J,Luis,Espinoza.,Takami,A.,Yoshioka,K.,Nakata,K.,Nakao,S., A Functional variation in the NKG2D gene regulates NKG2D receptor expression and is associated with better transplant outcomes after fully-HLA-macthed unrelated bone marrow transplantation.,The American Society of Hematology 52th Annual Meeting.,2010年12月6日, ORANGE

COUNTY CONVENTION CENTER.(USA)
3.Katagiri,T.,Matsubara,A.,Kashiwase,K.,Kato,M.,Morishima,Y.,Hosokawa,K.,Ohtake,S.,Ogawa,S.,Nakao,S.,Immunologically-Selected Hematopoiesis Caused by HLA Allelic Loss In Patients with Aplastic Anemia.,The American Society of Hematology 52th Annual Meeting.,2010 年 12 月 6 日, ORANGE COUNTY CONVENTION CENTER.(USA)
4.Katagiri,T.,Qi,Z.,Seiki,Y.,Sugimori,N.,Espinoza,J,L.,Takami,A.,Ohtake,S.,Nakao,S.,GPI-AP deficient cells detected exclusively in T cells in patients with aplastic anemia: Evidence against an escape mechanism for the initial proliferation of *PIGA* mutant hematopoietic stem cells.,The American Society of Hematology 51th Annual Meeting., 2009年12月9日,Ernest N.Morial Convention Center.(New Orleans,LA America.)

〔産業財産権〕
○出願状況（計１件）
名称：PNH 型白血球の検出方法
発明者：中尾眞二、杉盛千春、片桐孝和、清木ゆう、杉森尚美、山崎宏人、細川晃平
権利者：同上
種類：特許権
番号：2010-275878
出願年月日：2010 年 12 月 10 日
国内外の別：国内外

６．研究組織
(1)研究代表者
中尾　眞二（NAKAO SHINJI）
金沢大学・医学系・教授
研究者番号：70217660

(3)連携研究者
山崎　宏人（YAMAZAKI HIROHITO）
金沢大学・大学病院・講師
研究者番号：50361994
（H21）

近藤　恭夫（KONDO YUKIO）
金沢大学・大学病院・助教
研究者番号：10322116
（H21）

石山　謙（ISHIYAMA KEN）
金沢大学・医学系・協力研究員
研究者番号：60377380
（H21）

高松　博幸（TAKAMATSU HIROYUKI）
金沢大学・医学系・助教
研究者番号：70401932
（H21）