

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 20 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659486

研究課題名（和文）造血幹細胞における HLA アレル欠失現象を利用した再生不良性貧血自己抗原の同定

研究課題名（英文）Identification of auto-antigens in acquired aplastic anemia associated with clonal hematopoiesis by hematopoietic stem cells with uniparental disomy of chromosome 6p.

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（AA）症例における HLA-A アレル欠失血球陽性例の頻度を明らかにするため、抗 HLA-A アレル特異的抗体による検出感度を改良し、診断後間もない例を検索したところ、21 症例中 6 例（28.6%）が陽性であり、欠失血球の全顆粒球中の割合は 3.9% - 61.1%（中央値 8.4%）と、既治療よりも低比率であった。一方、HLA-A アレル欠失血球陽性 AA 患者の末梢血 CD8 陽性細胞を、HLA-B*40:02 遺伝子導入 K562 陽性細胞で刺激することにより、HLA-B*40:02 導入 K562 のみを特異的に傷害する細胞傷害性 T 細胞（CTL）クローン（A6）を樹立した。

研究成果の概要（英文）：To determine the exact prevalence of HLA-A allele-lacking leukocytes (HLA-LLs) in patients with acquired aplastic anemia (AA), we improved the sensitivity of flow cytometry and examined peripheral blood leukocytes of patients with newly-diagnosed AA patients. HLA-LLs were detectable in 6 (28.6%) of 21 patients who were heterozygous with the HLA-A allele. The percentage of HLA-A allele-lacking granulocytes in the total granulocytes ranged from 3.9% to 61.1% (median 8.4%), which was lower than that in patients in remission after immunosuppressive therapy. Cytotoxic T cell (CTL) clones (A6) were successfully established from one of the patients possessing HLA-LLs by stimulating patient's CD8⁺ T cells with K562 cells transfected with HLA-B*40:02 gene. A6 CTL killed K562 in B*40:02 restricted manner but did not kill other cells including EB virus-transformed lymphoblastoid cell line and Jurkat T cell line transduced with B*40:02.

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	2,900,000	870,000	3,770,000

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、6pLOH、自己抗原、CLT、HLA-B*40:02

1. 研究開始当初の背景

再生不良性貧血（aplastic anemia; AA）患者の約 13% では、6 番染色体短腕の uniparental disomy (UPD) によって特定

の HLA アレルを欠失した造血幹細胞由来の血球が造血を支持している。この 6pUPD を来した造血幹細胞は、特定の HLA クラス I を欠失させることによって、

その HLA が提示する自己抗原に特異的な細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocytes; CTL) の攻撃を免れて造血に寄与するようになったと考えられる。このような 6pUPD 陽性 AA 患者のリンパ球を利用すれば、長年謎であった AA の自己抗原を同定できる可能性がある。ただし、そのためには、CTL 前駆細胞の頻度が高い発症して間もない AA 例の中に、6pUPD 陽性例を見出し、患者の協力を得て CTL を樹立する必要がある。

一方、標的となる造血幹細胞は、本来は患者自身の CD34 陽性細胞を用いることが望ましいが、患者の CD34 陽性細胞は健常者に比べて著しく減少しているため、標的として十分な細胞を確保するのは困難である。6pUPD 陽性患者において欠失する頻度が特に高い HLA-B*40:02 は AA 患者全体においても高頻度に認められることから、AA の自己抗原提示に関与している可能性が高い。HLA を発現していない白血病細胞株 K562 に、この HLA-B*40:02 遺伝子を導入した B*40:02-K562 細胞では、未分化な造血幹細胞由来の自己抗原ペプチドが HLA-B*40:02 (HLA-B61) によって提示されている可能性が高い。

2. 研究の目的

(1) 発症して間もない HLA-A アレルヘテロ接合体の AA 患者を対象として、HLA-A アレル欠失細胞 (HLA-allele-lacking leukocytes; HLA-LLs) の陽性頻度を決定する。

(2) HLA-B*40:02 陽性 AA 患者の末梢血 CD8 陽性 T リンパ球を、B*40:02-K562 細胞で刺激することにより、造血幹細胞を特異的に傷害する CTL クローンを単離する。

3. 研究の方法

(1) 新規発症 AA 患者の白血球 DNA を用いて HLA-A アレルを決定し、このアレルがヘテロ接合体の患者末梢血顆粒球、単球、B 細胞、T 細胞を対象として、HLA-A24、A2、A26、A31、A11、のそれぞれに対するモノクローナル抗体により、HLA-LLs の有無を検討した。当初のスクリーニングは凍結保存した末梢血単核細胞中の単球を対象として行い、陽性が疑われた症例については新鮮血を入手し、顆粒球における HLA-A アレル欠失顆粒球

(HLA-allele-lacking leukocytes; HLA-LGs) の割合を決定した。

(2) HLA-B*40:02 陽性 AA 患者の末梢血単核細胞からビーズ法で CD8 陽性細胞を単離し、60Gy を照射した B*40:02-K562 細胞で 7~10 日間刺激後、同じ細胞に対する細胞傷害活性を ⁵¹Cr 放出アッセイにより測定した。陽性細胞から、限界希釈法により CD8 陽性 CTL クローンを単離した。

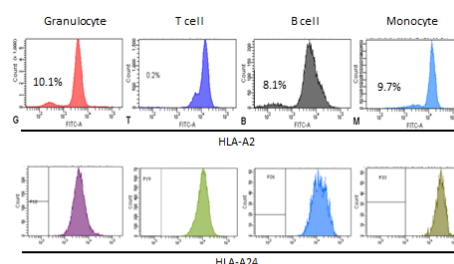


図1. 改良フローサイトメトリー法を用いた HLA-A アレル欠失の検出。A24 は正常に発現しているが、A2 発現を欠く細胞が全血球系統に少数認められる。

4. 研究成果

抗 HLA-A アレル特異的抗体による HLA-LLs の検出感度を改良し、診断後間もない新規発症 AA 例 34 症例を検索した。その結果、全患者のうち、HLA-A アレルがヘテロ接合体であったのは 21 例 (61.8%) であり、そのうち 6 例 (28.6%、全患者中 19.4%) に HLA-LLs が検出された。これらの陽性症例における HLA-LGs の全顆粒球中の割合は 3.9% - 61.1% (中央値 8.4%) と、既治療における割合 (10.3% - 99.4%、中央値 52.3%) に比べて低比率であった (図 1)。

SNP アレイを用いたわれわれの以前の解析では、AA における 6pUPD の頻度は 13% であった。今回用いた改良フローサイトメトリーは SNP アレイよりも HLA-LLs の検出感度が高く、また免疫抑制療法前の AA では白血球数は少ないものの、CTL による造血幹細胞に対する攻撃が強く起こっていると考えられることから、さらに高い頻度で HLA-LLs が検出されることが予想された。しかし、実際には陽性率は約 20% とそれほど高くはなく、またそのクローンサイズも中央値で 21.8% と、治療後の寛解例に比較して低率であった。

6pUPD 陽性幹細胞が造血を支持するメカニズムには CTL からのエスケープ現象が関与しているが、CTL によるこの異常クローンの選択は、AA 発症のごく初期のみ起こっており、その後の骨髄不全の進展には CTL ではなく造血抑制性のサイトカインが主に関与しているため、HLA-LLs の割合は治療の前後で変化しないことを、我々は以前の検討で明らかにした。今回の検討で明らかになった診断時 AA における HLA-LLs 検出率や、陽性例におけるクローンの割合は、今回の感度が高いフローサイトメトリーを用いて検討した場合の免疫抑制療法後寛解例における割合よりも低いことが予想される。これは、6pUPD 陽性幹細胞の生存優位性が、AA の発症時のみに関与しているという、以前の仮説を支持する所見と考えられる。

この仮説が正しいとすれば、治療前の検索で HLA-LLs が陰性であった例であっても、IST 後の改善時に、現在の FCM の感度では同定できなかったわずかな 6pUPD クローンが拡大するため、HLA-LLs が陽性化する可能性がある。この可能性は今後の再検により検証する予

定である。

現在のフローサイトメトリーを用いた場合、初診時 AA 患者における HLA-LLs の検出頻度は 20%前後であることから、HLA-LLs の検出は、免疫抑制療法に対する反応性を予測する上で必ずしも有用とは言えない。しかし、PNH 型血球陽性並みに微少の 6pUPD クローンを検出できるアッセイが開発できれば、有用なマーカーとなる可能性がある。検出感度をあげれば、もっと高頻度に HLA-A

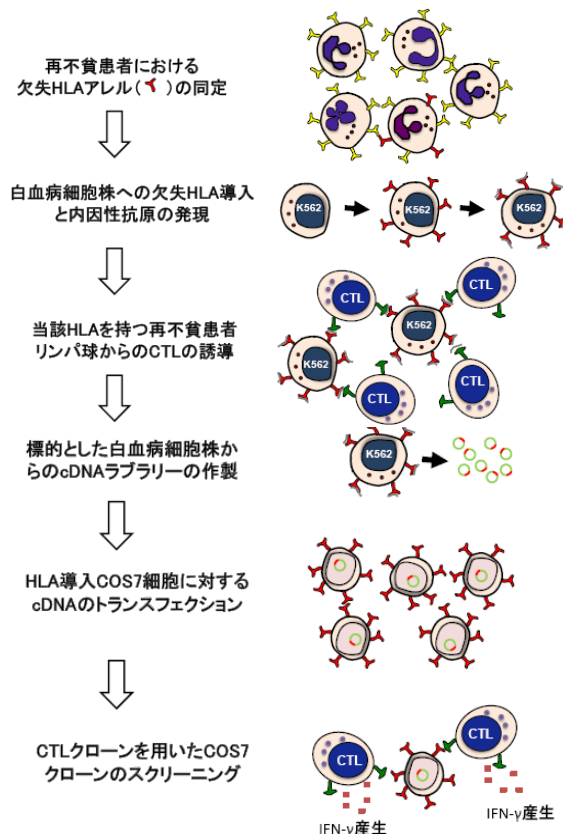


図2. 6pUPD 陽性患者からの CTL の単離

アレル欠失血球を検出できる可能性がある。このため、現在、peptide nucleic acid probe を用いた FISH 法による HLA-A アレル欠失血球の検出を計画している。

一方、HLA-A アレル欠失血球細胞を持つ HLA-B*40:02 陽性 AA 患者の末梢血 CD8 陽性細胞から、図2の方法により、HLA-B*40:02 導入 K562 細胞のみを特異的に傷害する CTL クローン (A6) を樹立した。この CTL は、同じ HLA-B*40:02 を導入した B-lymphoblastoid cell line や T 細胞株の Jurkat、ヒト胎児腎細胞株 293T 細胞などは傷害しなかった。したがって、A6 は、HLA-B*61 によって提示される造血幹細胞由来のペプチドを認識していると考えられた。現在、K562 由来の cDNA ライブラリーを用いた発現クローニングを用いて、A6 の標的ペプチドの同定を試みている。

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 6 件)

1. Seiki Y., Sasaki Y., Hosokawa K., Saito C., Sugimori N., Yamazaki H., Takami A., Nakao S., Increased plasma thrombopoietin levels in patients with myelodysplastic syndrome: a reliable marker for a benign subset of bone marrow failure., *Haematologica*, 査読有、98、2013、in press

DOI:10.3324/haematol.2012.066217.

2. Katagiri T., Kawamoto H., Nakakuki T., Ishiyama K., Okada-Hatakeyama M., Ohtake S., Seiki Y., Hosokawa K., Nakao S., Individual hematopoietic stem cells in human bone marrow of patients with aplastic anemia or myelodysplastic syndrome stably give rise to limited cell lineages., *Stem Cells*, 査読有、31、2013、536~46

DOI: 10.1002/stem.1301.

3. Hosokawa K., Katagiri T., Sugimori N., Ishiyama K., Sasaki Y., Seiki Y., Sato-Otsubo A., Sanada M., Ogawa S., Nakao S., Favorable outcome of patients who have 13q deletion: a suggestion for revision of the WHO 'MDS- U' designation., *Haematologica*, 査読有、97、2012、1845~9

DOI:10.3324/haematol.2011.061127.

4. 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
DOI:10.1159/000333609.
5. 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
DOI:10.1182/blood-2011-07-365189.
6. 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
DOI:10.1111/j.1600-0609.2011.01612.x.

[学会発表] (計 2 件)

1. Chizuru Saito., SLIT1 mutation in patients with acquired aplastic anemia: Its relevance in immune pathophysiology., *The American Society of Hematology 54th Annual Meeting*, December 10,2012, GEORGIA

WORLD CONGRESS CENTER Atlanta, Georgia, USA.

2. Takamasa Katagiri., Frequent loss of HLA alleles from hematopoietic stem cells in patients with hepatitis-associated aplastic anemia., *The American Society of Hematology 53rd Annual Meeting*, December 12, 2011, San Diego Convention Center, California, USA.

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

(2) 研究分担者

赤塚 美樹 (AKATSUKA YOSHIKI)
藤田保健衛生大学・医学部・准教授
研究者番号：70333391

(3) 連携研究者

該当なし