

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790968

研究課題名(和文)HLAアレル欠失現象を利用したヒト造血幹細胞制御分子の同定

研究課題名(英文)Identification of human hematopoietic stem cell regulators with HLA allele deficient cells behavior

研究代表者

片桐 孝和 (KATAGIRI, Takamasa)

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号：60621159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：6pLOHの割合は、造血の分化段階で異なり、末梢血中の白血球と同等の6pLOHを示すMEP、GMPと比較して、それらの前駆細胞であるCMPにおいては6pLOHの割合が明らかに低下していた。また、マイクロアレイ解析の結果、CMPにおけるHLA欠失分画では、増殖を促進するCXCL12の発現が正常分画と比較して約30倍低下しており、このCXCL12のレセプターであるCXCR4の発現も、HLA欠失側で低下していた。その結果、セルサイクルが促進されず、CMPにおいてはHLA欠失分画の割合が著しく低下していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The percentage of 6pLOH was different among hematopoiesis stages in human bone marrow, and the progenitor cells showed much lower percentage of 6pLOH than that of MEP and GMP. I found approximately 30 times lower expression of CXCL12 which promotes the cell growth and proliferation cytokine than that of normal fraction with microarray analysis. As a result, I demonstrated the percentage of HLA deficient was significantly decreased, since the cell cycle was not promoted in the 6pLOH of CMP fraction with low CXCL12 and CXCR4 expression.

研究分野：血液内科学

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：Loss of heterogeneity Aplastic anemia Human Leukocyte Antigen

## 1. 研究開始当初の背景

特発性再生不良性貧血においては患者の多くが免疫抑制療法により改善することから、造血幹細胞に対する免疫学的な攻撃がその原因と考えられているが、実際の病態についてはほとんど分かっていない。これまでの SNP アレイとフローサイトメトリー (FCM) を用いた我々の研究により、再生不良性貧血患者の約 15% では、LOH により HLA の片側が欠失した白血球が存在することが明らかになった (Katagiri T. et al. *Blood*. 2011.)。このような HLA 発現の欠失は、患者末梢血液中の全系統の白血球に加えて、骨髄 CD34 陽性細胞においてもみられることから、これらは 6pLOH を起こした造血幹細胞由来と考えられた。

この 6pLOH がどの段階の幹細胞で起こっているかを明らかにするため、骨髄 CD34 陽性細胞を common myeloid progenitor (CMP), granulocytic macrophage progenitor (GMP), megakaryo-erythroid progenitor (MEP) の 3 分画に分けて、HLA 欠失細胞の割合をみたところ、GMP と MEP における HLA 欠失細胞の割合は、末梢血の単球および顆粒球とほぼ同じ割合であったのに対して、GMP と MEP に共通する前駆細胞の CMP においては、HLA 欠失細胞の割合が明らかに低いことが分かった。本所見の解釈には以下の二通りが考えられる。(1) このような CMP と MEP、GMP における HLA 欠失細胞の割合に乖離が認められる 6pLOH 陽性再生不良性貧血症例の多くは、免疫抑制療法後の長期寛解 (免疫病態が持続しているとは考えにくい) 例である。従って、HLA 欠失幹細胞は外的因子 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) によってセレクションされているのではなく、HLA 欠失 CMP が本来持っている増殖能力が HLA 非欠失細胞より高いために、造血を支持している可能性がある。この場合には、HLA 欠失 CMP と HLA 非欠失 CMP との間に、造血の支持能力を決定する何らかの遺伝子発現の差がみられるはずである。

(2) 寛解例であっても「CTL による幹細胞のセレクション」は持続しており、このために HLA 欠失を起こした一部の CMP が主として造血を支持している。この場合には、CTL の標的となる自己抗原が、MEP、GMP よりも CMP において高発現しているはずである。

## 2. 研究の目的

血液細胞上には、父方と母方由来の HLA が本来発現されているが、特発性再生不良性貧血患者の約 15% では、父方または母方のどちらかの HLA 発現を欠失した白血球が存在する。この驚くべき現象は、HLA 領域を含む 6 番染色体に loss of heterogeneity, (LOH) を起こした造血幹細胞が、T 細胞の攻撃を免れて造血を支持するようになったためと考えられた (Katagiri T. et al. *Blood*. 2011)。この HLA 欠失を認める細胞の割合が、幹細胞の分化段階により異なることを利用して、ヒト

造血幹細胞の増殖を調節している分子を同定し、同時に再生不良性貧血において細胞傷害性 T 細胞の標的となる自己抗原を同定することが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

上記二つの仮説を検証するため、以下の手順で実験を行い、ヒト造血幹細胞の分化・増殖を支配している遺伝子・蛋白または再生不良性貧血の自己抗原を同定する。

(1) 6pLOH 陽性再生不良性貧血症例において、骨髄中の 3 分画で HLA 欠失細胞の割合が乖離を認める例を集積する。

(2) HLA 発現欠失 CMP 分画と正常 CMP 分画および MEP, GMP 分画を FACS Aria II によりソーティングし、RNA を抽出する。

(3) cDNA マイクロアレイにより、各分画における遺伝子発現のプロファイルを比較し、Heat-map において発現に差がみられた遺伝子を抽出し、細胞増殖やアポトーシスに関連した分子を同定する。

(4) CMP または CD34 陽性細胞における HLA 欠失分画と正常分画を、それぞれ免疫不全マウス (SIRPA 変異型遺伝子導入マウス) に移植し、*in vivo* における両分画の造血支持能力を評価する。(3) で同定された遺伝子を、健常ボランティアドナーの CD34 陽性細胞にノックインまたはノックアウトした後に移植することにより、同定した遺伝子の機能を明らかにする。

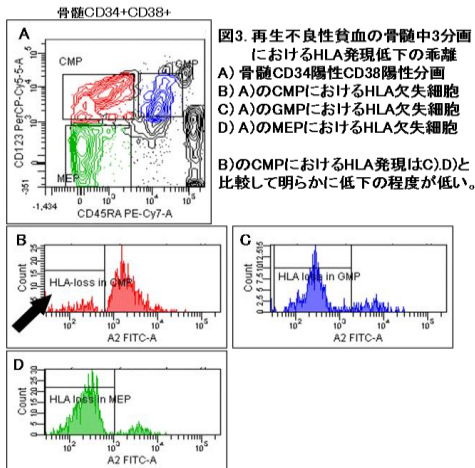
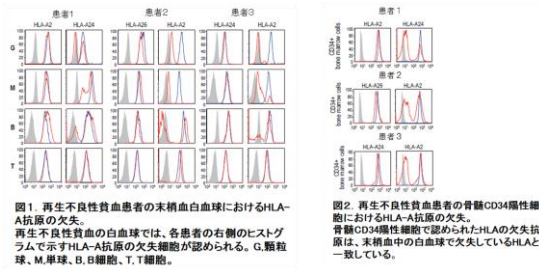
(5) 仮説 (2) を検証するため、CMP において MEP、GMP よりも強発現している遺伝子を抽出し、それらの蛋白のうち、我々が同定した再生不良性貧血のハイリスクアレル (HLA-A\*0201, A\*0206, A\*3101, B\*4002) によって提示されやすいペプチドを BIMAS により決定する。これらのペプチドに対する CTL 前駆細胞が当該患者の末梢血に存在するか否かを ELISPOT アッセイで検証する。

## 4. 研究成果

(1) ハイリスク HLA アレルを有する再生不良性貧血症例のスクリーニングの結果、306 例中 40 例 (13%) で、末梢血中の白血球 (顆粒球、単球、B 細胞、T 細胞) で 6pLOH が確認された (図 1)。また、このような HLA 発現の欠失は、患者末梢血液中の全白血球系統に加えて、骨髄 CD34 陽性細胞においても見られることから、これらは 6pLOH を起こした造血幹細胞由来と考えられた (図 2)。

(2) この 6pLOH がどの段階の幹細胞で起こっているかを明らかにするため、骨髄 CD34 陽性細胞を common myeloid progenitor (CMP), granulocytic macrophage progenitor (GMP), megakaryo-erythroid progenitor (MEP) の 3 分画に分けて、HLA 欠失細胞の割合をみたところ、GMP と MEP における HLA 欠失細胞の割合は、末梢血の単球および顆粒球とほぼ同じ割合であったのに対して、GMP と MEP に共通する前駆細胞の CMP においては、HLA 欠失細

胞の割合が明らかに低いことが分かった(図3)。



(3)CMP, GMP, MEP における HLA 欠失分画および非欠失分画をソーティングし、RNA 抽出の後 cDNA を作製し、マイクロアレイ解析を実施した(図4)。

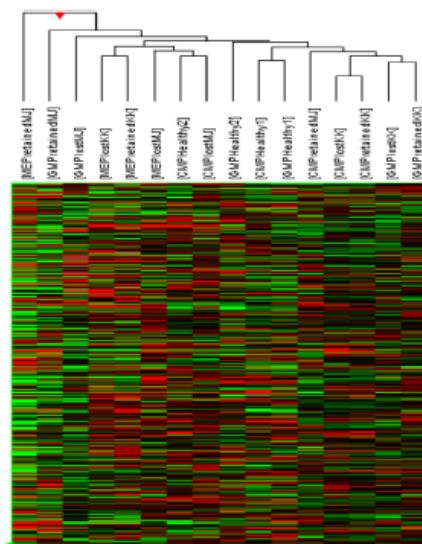


図4 マイクロアレイ解析によるHeat-Mapおよびclustering解析

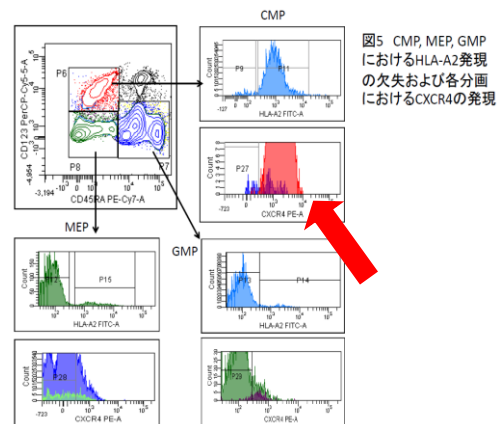
その結果、HLA 発現を欠失している CMP 分画では、HLA 発現が正常な CMP 分画と比較してCXCL12 の発現が 30 倍以上、低下していることが明らかになった。

(4)CXCL12(SDF-1)は、骨髄において、長い突起を持ったユニークな細胞(CAR 細胞)によって分泌されることが報告されている。

さらに最近、CAR 細胞が脂肪・骨芽細胞前駆細胞であり、造血幹細胞やBリンパ球、赤芽球前駆細胞の niche として必須の役割を果たすことが報告されている (Y Omatsu, et al. Nature. 2014)。一方で、CD34 陽性細胞自身がCXCL12を自ら発現し、造血前駆細胞の増殖および分化に autocrine または paracrine に作用するという報告もあるため更に追加解析が必要である (Majka M, et al. Blood. 2001)。ただ、CXCL12 の受容体としては CXCR4 が知られており、このシグナルは、臓器特異的な血管形成、心形成、生殖細胞幹細胞へのホーミングなどに必須であることが明らかとなっている。

(5)そこで、HLA 発現が低下または正常な CMP における CXCR4 の発現を FCM で確認した。その結果、

CMP においては、HLA 欠失分画では HLA 正常分画と比較して、CXCR4 の発現が低下していた(図5)。(4)で、CXCL12 と CXCR4 のシグナルが造血前駆細胞の増殖・分化に必要であるという考えを元に、今回のデータを解釈すると、CMP のような造血前駆細胞において、HLA の発現を欠失している分画ではCXCL12-CXCR4 シグナルが誘導されず、その結果、セルサイクルに入らないために、CMP では HLA 欠失分画の割合が低いものと考えられた。



(6)マウスへの移植実験については、MTA が期間内に締結されず、本期間中には実施しなかった。

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 3 件)

① Takamasa Katagiri, Hiroshi Kawamoto, Takashi Nakakuki, Ken Ishiyama, Mariko Okada-Hatakeyama, Shigeki Ohtake, Yu Seiki, Kohei Hosokawa, Shinji Nakao. Individual hematopoietic stem cells in bone marrow of patients with aplastic anemia or myelodysplastic syndrome stably

give rise to limited cell lineages. *Stem Cells*, 査読有, 31(3), 2013, pp536-546.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23316019>.

② Kohei Hosokawa, Takamasa Katagiri, Naomi Sugimori, Ken Ishiyama, Yumi Sasaki, Yu Seiki, Aiko Sato-Otsubo, Masashi Sanada, Seishi Ogawa, Shinji Nakao.

Favorable outcome of patients who have 13q deletion: a suggestion for revision of the WHO 'MDS-U' designation. *Haematologica*, 査読有, 97(12), 2012, pp1845-1849.

Doi: 10.3324/haematol2011.061127

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22689682>.

③ Takamasa Katagiri, Shinji Nakao. Immunologically escaped hematopoiesis caused by HLA allelic loss in patients with aplastic anemia. *Rinsho Ketsueki*, 査読有, 53(7), 2012, pp. 651-657.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22975765>.

[学会発表] (計 19 件)

①丸山 裕之, Hematopoietic stem cells deficient of inhibitory KIR ligands due to uniparental disomy in the short arm of chromosome 6 escape from the autologous NK cell attack in humans, 第 38 回日本造血幹細胞移植学会, 2014. 3. 8.-2014. 3. 9, 沖縄コンベンションセンター (沖縄).

② Takamasa Katagiri, Evidence That GPI-AP-Specific Are Not Involved In The "escape" Of Piga mutant Hematopoietic Stem Cells in Aplastic Anemia, 55<sup>th</sup> American Society of hematology Annual Meeting, 2013. 12. 7-2013. 12. 10, Ernest N. Morial Convention Center (New Orleans. USA).

③ Kohei Hosokawa, Increased Gene Expression Of the Nr4A Family In Bone Marrow T Cells Of Patients With Early Stage Acquired Aplastic Anemia, 55<sup>th</sup> American Society of hematology Annual Meeting, 2013. 12. 7-2013. 12. 10, Ernest N. Morial Convention Center (New Orleans. USA).

④ Hiroyuki Maruyama, Prevalence, Clone Size and Lineage Diversity Of HLA-A Allele-Lacking Leukocytes In Patients With Acquired Aplastic Anemia, 55<sup>th</sup> American Society of hematology Annual Meeting, 2013. 12. 7-2013. 12. 10, Ernest N. Morial Convention Center (New Orleans. USA).

⑤ Tetsuichi Yoshizato, Spectrum Of Genetic Alterations In Acquired Aplastic Anemia, 55<sup>th</sup> American Society of hematology Annual Meeting, 2013. 12. 7-2013. 12. 10, Ernest N. Morial Convention Center (New Orleans. USA).

⑥ Takamasa Katagiri, Evidence that HSCs

are redundant and only a limited number of HSCs support hematopoiesis in humans, 第 75 回日本血液学会学術集会, 2013. 10. 11-2013. 10. 13, ロイトン札幌、札幌芸人館、札幌市教育文化会館 (北海道).

⑦ Yoshiki Akatsuka, Isolation of a HLA-B\*4002-restricted CTL to HPCs from a patient with aplastic anemia with 6pLOH, 第 75 回日本血液学会学術集会, 2013. 10. 11-2013. 10. 13, ロイトン札幌、札幌芸人館、札幌市教育文化会館 (北海道).

⑧ Chizuru Saito, Escape hematopoiesis by HSC with somatic SLIT1 mutations in patients with acquired aplastic anemia, 第 75 回日本血液学会学術集会, 2013. 10. 11-2013. 10. 13, ロイトン札幌、札幌芸人館、札幌市教育文化会館 (北海道).

⑨ Tetsuichi Yoshizato, Spectrum of alterations in acquired aplastic anemia, 第 75 回日本血液学会学術集会, 2013. 10. 11-2013. 10. 13, ロイトン札幌、札幌芸人館、札幌市教育文化会館 (北海道).

⑩ Hiroyuki Maruyama, Prevalence of HLA-A allele lacking leukocytes in patients with aplastic anemia at diagnosis, 第 75 回日本血液学会学術集会, 2013. 10. 11-2013. 10. 13, ロイトン札幌、札幌芸人館、札幌市教育文化会館 (北海道).

⑪丸山 裕之, The CTL attack specific for non-HSC in bone marrow induces aplastic anemia, 第 5 回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会, 2013. 8. 24-2013. 8. 25, ウィンク愛知 (愛知).

⑫ Tetsuichi Yoshizato, SPECTRUM OF GENETIC ALTERATIONS IN ACQUIRED APLASTIC ANEMIA, 18<sup>th</sup> EUROPEAN HEMATOLOGY ASSOCIATION, 2013. 6. 13-2013. 6. 16, Stockholm International Fairs & Congress Centre (スウェーデン).

⑬ Hiroyuki Maruyama, Detection of leukocytes lacking HLA-A alleles by flow cytometry predicts a response to immunosuppressive therapy in patients with aplastic anemia. 39<sup>th</sup> Annual meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, 2013. 4. 7-2013. 4. 10, Excel London (England).

⑭ Chizuru Saito, SLIT1 Mutation in Patients with Acquired Aplastic Anemia: Its Relevance in Immune Pathophysiology. 54<sup>th</sup> American society of Hematology Annual meeting, 2012. 12. 8-2012. 12. 11. Georgia World Congress (Atlanta).

⑮ Takamasa Katagiri, GPI-AP specific CTL are not involved in the escape of PIGA mutant stem cells in aplastic anemia. 第 74 回日本血液学会学術集会, 2012. 10. 19-2012. 10. 21, 京都国際会館 (京都).

⑯ Tetsuichi Yoshizato, Spectrum of

genetic alterations in aplastic anemia.  
第 74 回日本血液学会学術集会,  
2012. 10. 19-2012. 10. 21, 京都国際会館(京  
都).

⑰ Kohei Hosokawa, CD109 deficiency  
induces preferential proliferation of  
PIGA mutant hematopoietic stem cell. 第  
74 回日本血液学会学術集会,  
2012. 10. 19-2012. 10. 21, 京都国際会館(京  
都).

⑱ Chizuru Saito, Clinical significance of  
plasma thrombopoietin levels in the  
management of bone marrow failure. 第 74  
回日本血液学会学術集会,  
2012. 10. 19-2012. 10. 21, 京都国際会館(京  
都).

⑲ Hiroyuki Maruyama, Minimum PNH clone  
size associated with clinical hemolysis in  
patients with bone marrow failure, 第 74  
回日本血液学会学術集会,  
2012. 10. 19-2012. 10. 21, 京都国際会館(京  
都).

[図書] (計 1 件)

① 片桐 孝和、再生不良性貧血における 6 番  
染色体短腕 CNN-LOH による HLA アレル欠失血  
球の出現とその臨床的意義、臨床免疫・アレ  
ルギー科 (Clinical Immunology &  
Allergology), 59(6), 2013, 8 ペー  
ジ, pp658-665.

[その他]

ホームページ等

[http://research-er.jp/researchers/view/  
60621159/](http://research-er.jp/researchers/view/60621159/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

片桐 孝和 (KATAGIRI, Takamasa)

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号 : 60621159

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし