

令和元年5月21日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05335

研究課題名(和文)再生不良性貧血におけるクローン性造血機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanisms underlying clonal hematopoiesis in patients with acquired aplastic anemia

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：再生不良性貧血(再不貧)は、造血幹細胞が自分自身のTリンパ球に傷害されることによって起こる自己免疫疾患であるが、病気の成り立ちはよく分かっていない。再不貧は良性的の病気でありながら、一部の患者では少数の造血幹細胞だけが、がん細胞のようにクローン性に増殖・分化して造血を支持している。本研究では、そのような「クローン性造血」のメカニズムを検討したところ、HLA-B*40:02、A*02:06、B*54:01などの遺伝子変異によって、HLAを欠失した白血球が高頻度に検出されることが明らかになった。さらに33%の例では、HLA遺伝子エクソン1の共通領域に変異を持つ白血球が検出されることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再不貧では、第6染色体短腕のloss of heterozygosity (6pLOH)によってHLAクラスIアレルを欠失した白血球が検出されることが我々の研究によって分かっていたが、欠失するハプロタイプ中のどのHLAが自己抗原を提示しているかは不明であった。本研究により、再不貧はHLA-B*40:02、B*54:01などの限られたHLAアレルが造血幹細胞抗原をTリンパ球に提示することによって起こる自己免疫疾患であることが明らかになった。これらの特定のアレルを持つ例のTリンパ球を調べれば、自己抗原が明らかになる可能性が高い。また、HLAの共通変異の検出は免疫病態の証明に非常に有用である。

研究成果の概要(英文)：Acquired aplastic anemia (AA) is a kind of autoimmune disease that is induced by the cytotoxic T lymphocyte attack against hematopoietic stem progenitor cells (HSPCs) although its exact pathogenesis remains unclear. In some patients with AA, a limited number of HSPCs clonally proliferate and support hematopoiesis without showing a tendency toward the development of hematologic malignancies. We investigated the mechanisms underlying such clonal hematopoiesis in AA patients, and found that abnormal leukocytes that lack HLA class I alleles due to loss-of-function mutations in limited HLA class I genes such as B*40:02, A*02:06 and B*54:01 are often detectable. Of particular interest, 33% of the patients shared a common nonsense mutation across different HLA alleles, that also causes the loss of corresponding HLA alleles and is therefore thought to serve as a reliable marker of immune pathophysiology of AA.

研究分野：血液内科学

キーワード：再生不良性貧血 クローン性造血 HLA 細胞傷害性T細胞 自己抗原

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

再生不良性貧血(再不貧)患者や一部の低リスク骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndrome: MDS)患者では抗胸腺細胞グロブリン(anti-thymocyte globulin: ATG)やシクロスポリン(CsA)などの免疫抑制療法によって造血が回復するが、その中には *PIGA* 遺伝子変異幹細胞や、第6染色体短腕の片親性ダイソミーによる loss of heterozygosity (6pLOH) によって特定の HLA を欠失した幹細胞によるクローン性造血を呈する例が全体の70%近く存在する。この中には、造血が完全なクローン性に置き換わる例もあるが、*PIGA* 変異陽性幹細胞や6pLOH 陽性幹細胞のような増殖優位性を持たない変異幹細胞が、どのようにしてクローン性造血を来すかは不明である。また、骨髄における6pLOH 幹細胞の免疫学的選択が、どのような抗原を認識するCTLによって起こっているのかも不明である。

2. 研究の目的

クローン性造血を有する再不貧患者のクローン性白血球集団と、骨髄中の細胞傷害性Tリンパ球(cytotoxic T lymphocyte: CTL)を解析することにより、自己免疫性造血不全におけるクローン性造血のメカニズムを明らかにし、新たな治療標的を見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

- 1) HLAクラスIアレル欠失血球陽性の再不貧患者を対象として、HLA欠失顆粒球とHLA非欠失顆粒球との間で体細胞変異を比較することにより、HLA欠失クローンの増殖またはその長期維持に関与するゲノム異常を明らかにする。
- 2) 6pLOHが陰性でありながら、HLAクラスIアレル欠失血球集団を持つ例を対象として遺伝子発現調節領域を含めた遺伝子解析を行い、第2、第3のHLAクラスI欠失メカニズムを同定する。
- 3) 免疫学的な造血幹細胞の選択に関わっていると考えられる骨髄T細胞のT細胞レセプター(T-cell receptor: TCR)鎖、鎖遺伝子をsingle cell解析で同定し、これらを健常者のT細胞にトランスフェクトすることによって、iPS細胞由来の自己CD34陽性細胞に特異的に反応するTCRを同定する。
- 4) CTLからの攻撃を免れるために造血幹細胞が持っている「HLAクラスIアレル欠失」とは異なるCTL抵抗性機序を、HLAを保有しているながら造血幹細胞が残存しているHLAクラスIアレル欠失血球陽性患者を対象として解析する

4. 研究成果

- 1) 長期寛解状態(発症後経過年数中央値13年[2-30])にあるHLA欠失白血球陽性患者15例を対象として、骨髄不全との関連が報告されている61遺伝子のターゲットシーケンシングを行った。12例(80%)において遺伝子変異は全く認められなかったが、65歳以降に発症した高齢患者3例では*DNMT3A*、*ZRSR2*、*TET2*、*CBL*の変異を認めた。このうち1例では*DNMT3A*変異を背景に6pLOHを生じたことが、継時的な6pLOHクローンの拡大や*TET2*、*ZRSR2*変異の獲得につながったことが示唆された。変異が陰性であった12例のうち、末梢血中HLA欠失顆粒球の割合が高い5例のHLA欠失顆粒球を対象に全エクソンシーケンシング(WES)を行ったところ、複数のnonsynonymous変異が認められたものの、造血器悪性腫瘍関連の遺伝子変異は全く認められなかった。これらの結果から、6pLOHやHLA遺伝子変異を生じた造血幹前駆細胞(hematopoietic stem progenitor cells: HSPCs)は、その拡大に、ドライバー遺伝子変異を必要とせず、それらの変異HSPCクローンが持つ固有の増殖能力に

よって、長期間安定した造血を支持していると考えられた。ただし、高齢に伴って生じていた変異クローンに 6pLOH が生じた場合には、そのクローンにさらに別の変異が誘発し、それが異常クローンを拡大させる可能性が示唆された。

- 2) 独自に作製した抗 HLA-B4002 抗体を用いることにより、このクラス I 抗原を欠失した顆粒球では、6pLOH とは別に、*B*40:02* の構造遺伝子に様々な異常が検出されることを見出した。また、*HLA-B*40:02* 以外に、単独のクラス I アレル変異によって HLA 欠失を来している例があるかどうかを明らかにするため、*B40:02* を保有しない 6pLOH 陽性再生不良性貧血 43 例を対象として、欠失しているハプロタイプのクラス I アレルを次世代シーケンサーで調べたところ、*A*02:06*、*A*31:01*、*B*40:02*、*B*40:01*、*B*54:01* の 5 アレルに inactivating mutations が同定された。従って、これらのアレルは、*B40:02* と共に、再不貧における自己抗原提示に深く関与していると考えられた。さらに、再不貧患者 549 例のうち 6pLOH が陽性であった 91 例 (16.6%) を対象として、欠失ハプロタイプに含まれる高頻度アレルを調べたところ、*HLA-B*40:02* (47%) について頻度が高いのは *B*54:01* (12%) であった。また、このアレル欠失白血球を持つ例のほとんどは男性患者であった。

平成 30 年度の研究により、これらとは別に、異なる HLA クラス I アレル間で共通するエクソン 1 領域のナンセンス変異 (X 変異) が 6pLOH 陽性例の 65%、6pLOH 陰性例の 21% に検出されることを明らかにした。この X 変異 DNA を 0.07% までの高感度で検出する droplet digital PCR (ddPCR) アッセイを確立し、293 例の再不貧患者検体を調べたところ、33% に、アレル頻度で中央値 0.59% (範囲 0.074% から 8.70%) の X 変異が検出された。この ddPCR 法を用いれば、患者の HLA が不明であっても 24 時間以内に、HLA(-) 血球の原因となる X 変異を検出することができるため、臨床検査としての価値が非常に高い。

- 3) 6pLOH による HLA 欠失血球陽性再不貧患者から、野生型、6pLOH(+), B4002 単独欠失のそれぞれの iPS 細胞を樹立し、野生型 iPS 細胞から誘導した HSPC のみを選択的に傷害する CTL 株を樹立した。この CTL 株から CTL クローンを樹立することが困難であったため、CTL 株の T 細胞レセプター (TCR) レパトアを解析し、頻度の高い TCR 鎖陽性 T 細胞から cDNA を作製した。この cDNA による Jurkat 細胞のトランスフェクタントを作製し、現在、自己の野生型 HSPC に対して選択的に反応するトランスフェクタントの同定を試みている。

*B*54:01* 陽性例のうち 1 例では、6pLOH に加えて *B*54:01* の構造遺伝子変異による単独欠失血球が認められた。この 1 例の単球から iPS 細胞作製を試みたところ、野生型、6pLOH 型に加えて、*B*54:01* 変異型 iPS 細胞クローンが樹立された。それぞれの iPS 細胞から誘導した HSPC を免疫不全マウスの骨髄内に移植したところ、B リンパ球を含むすべての血球系統に同じ HLA 形質のヒト血球が確認された。この患者の骨髄中で抗原特異的に増殖している T 細胞の T 細胞レセプター (TCR) を単離し、Jurkat 細胞にトランスフェクトしたところ、一部の TCR トランスフェクタントは野生型 HSPC を選択的に認識し、*B*54:01* 欠失 HSPC には反応しないことが示された。

- 4) 特定の HLA クラス I アレルを欠失した細胞が末梢血顆粒球のほぼ 100% を占める再不貧患者においても、HSPC レベルでは、HLA 非欠失 (HLA[+]) 細胞が 50% 以上を占めている例がある。このような例では、CTL からの攻撃を回避するために、インターフェロン 受容体シグナル伝達分子発現の低下のような「HLA(-) 以外のメカニズム」を獲得している可能性が高い。これを明らかにするため、患者末梢血 HSPC が HLA(+) 細胞と HLA(-) 細胞とのモザイ

ク状態にある患者を同定し、純化した HSPC の RNA シーケンシングを計画した。長期寛解中の 14 例の HLA(-)血球陽性再不貧患者において、末梢血 HSPC がモザイク状態である例を 9 例同定した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 9 件）

*Corresponding author

1. Hino T, Imi T, Hangaishi A, Kamoda Y, Iizuka H, Hirao M, Kida M, Tojo A, Nakao S*, Usuki K: Escape hematopoiesis by donor-derived 6pLOH(+) hematopoietic stem cells in a marrow transplant recipient with late graft failure. **Bone Marrow Transplant**, 2019, in press.
2. Elbadry MI, Mizumaki H, Hosokawa K, Espinoza JL, Nakagawa N, Chonabayashi K, Yoshida Y, Katagiri T, Hosomichi K, Zaimoku Y, Imi T, Nguyen MAT, Fujii Y, Tajima A, Ogawa S, Takenaka K, Akashi K, Nakao S*: Escape hematopoiesis by HLA-B5401-lacking hematopoietic stem progenitor cells in men with acquired aplastic anemia. **Haematologica**, 2019, in press.
3. Elbadry MI, Espinoza JL, Nakao S*: Disease modeling of bone marrow failure syndromes using iPSC-derived hematopoietic stem progenitor cells. **Exp Hematol** 71:32-42, 2019
4. Maruyama K, Aotsuka N, Kumano Y, Sato N, Kawashima N, Onda Y, Maruyama H, Katagiri T, Zaimoku Y, Nakagawa N, Hosomichi K, Ogawa S, Nakao S*: Immune-Mediated Hematopoietic Failure after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Common Cause of Late Graft Failure in Patients with Complete Donor Chimerism. **Biol Blood Marrow Transplant** 24:43-49, 2018
5. Kawakami T, Sekiguchi N, Kobayashi J, Imi T, Matsuda K, Yamane T, Nishina S, Senoo Y, Sakai H, Ito T, Koizumi T, Hirokawa M, Nakao S*, Nakazawa H, Ishida F: Frequent STAT3 mutations in CD8(+) T cells from patients with pure red cell aplasia. **Blood Adv** 2:2704-2712, 2018
6. Imi T, Katagiri T, Hosomichi K, Zaimoku Y, Hoang Nguyen V, Nakagawa N, Tajima A, Yoshizato T, Ogawa S, Nakao S*: Sustained clonal hematopoiesis by HLA-lacking hematopoietic stem cells without driver mutations in aplastic anemia. **Blood Adv** 2:1000-1012, 2018
7. Hosokawa K, Sugimori C, Ishiyama K, Takamatsu H, Noji H, Shichishima T, Obara N, Chiba S, Ninomiya H, Shirasugi Y, Nakamura Y, Ando K, Ueda Y, Yonemura Y, Kawaguchi T, Nishimura JI, Kanakura Y, Nakao S*: Establishment of a flow cytometry assay for detecting paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells specific to patients with bone marrow failure. **Ann Hematol** 97:2289-2297, 2018
8. Espinoza JL, Elbadry MI, Chonabayashi K, Yoshida Y, Katagiri T, Harada K, Nakagawa N, Zaimoku Y, Imi T, Hassanein HA, Khalifa ANA, Takenaka K, Akashi K, Hamana H, Kishi H, Akatsuka Y, Nakao S*: Hematopoiesis by iPSC-derived hematopoietic stem cells of aplastic anemia that escape cytotoxic T-cell attack. **Blood Adv** 2:390-400, 2018

9. Zaimoku Y, Takamatsu H, Hosomichi K, Ozawa T, Nakagawa N, Imi T, Maruyama H, Katagiri T, Kishi H, Tajima A, Muraguchi A, Kashiwase K, Nakao S*: Identification of an HLA class I allele closely involved in the autoantigen presentation in acquired aplastic anemia. **Blood** 129:2908-2916, 2017

〔学会発表〕（計 5 件）

1. Mizumaki H, Loss-of-Function Mutations in HLA-Class I Alleles in Acquire Aplastic Anemia: Evidence for the Involvement of Limited Class I Alleles in the Auto-Antigen Presentation of Aplastic Anemia, The 60th ASH Annual Meeting & Exposition, 2018
2. Tanabe M, The Depletion of TGF-β Co-Receptor CD109 Induces Erythroid Differentiation of TF-1 Cells: A Model of Preferential Commitment of PIGA-Mutated Hematopoietic Stem Cells in Immune-Mediated Bone Marrow Failure, The 60th ASH Annual Meeting & Exposition, 2018
3. Mizumaki H, PNH-Phenotype Cells and HLA Class I Allele-Lacking Leukocytes Shared By Family Members Who Developed Acquire Aplastic Anemia: Studies on Six Pairs of Patients in Different Families, The 59th ASH Annual Meeting & Exposition, 2017
4. Nakagawa N, Identification of T Cell Receptors Specific to Antigens Presented By HLA-B5401 on IPS Cell-Derived Hematopoietic Stem Cells in a Patient with Acquired Aplastic Anemia Carrying B5401-Lacking Leukocytes, The 59th ASH Annual Meeting & Exposition, 2017
5. Imi T, HLA Class I Allele-Lacking Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Support Long-Term Clonal Hematopoiesis without Oncogenic Driver Mutations in Acquired Aplastic Anemia, The 58th ASH Annual Meeting & Exposition, 2016

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

連携研究者

連携研究者氏名：吉田 善紀

ローマ字氏名：Yoshida Yoshinori

所属研究機関名：京都大学

部局名：iPS細胞研究所

職名：准教授

研究者番号（8桁）：20447965

連携研究者氏名：岸 裕幸

ローマ字氏名：Kishi Hiroyuki

所属研究機関名：富山大学

部局名：大学院医学薬学研究部

職名：教授

研究者番号（8桁）：60186210

連携研究者氏名：細道 一善

ローマ字氏名：Hosomichi Kazuyoshi

所属研究機関名：金沢大学

部局名：医学系

職名：准教授

研究者番号（8桁）：50420948