

令和元年6月17日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09883

研究課題名(和文)造血幹細胞移植への応用に向けた次世代シーケンサーによる新規マイナー組織抗原の解析

研究課題名(英文) Identification of novel minor histocompatibility antigens by next-generation sequencing in allogeneic stem cell transplantation patients

研究代表者

長藤 宏司 (Koji, Nagafuji)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：60343323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞移植では、遺伝子多型の一部が抗原として認識され移植免疫反応が誘導され得る。これらの抗原はマイナー組織適合性抗原(マイナー組織抗原)と総称されており、移植片対宿主病(GVHD)や生着不全に関与するとともに、移植片対白血病(GVL)効果のターゲット分子として重要な役割を果たしている。本研究では、次世代シーケンサーによる全エキソーム遺伝子解析の応用により、新たなマイナー組織抗原を同定する方法を作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

次世代シーケンサーによる新たなマイナー組織抗原の同定は、移植片対宿主病(GVHD)や移植片対白血病効果(GVL)の予測に基づいた適切なドナー選択や、マイナー組織抗原を標的としたワクチンや養子免疫療法による個別化免疫療法につながるであろう。また、血液系腫瘍のみならず固形腫瘍においても選択的にGVT(Graft versus tumor)効果を誘導することで抗腫瘍効果を誘導し得る可能性があり、臨床への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In allogeneic stem cell transplantation, the amino acid differences in proteins by SNPs (single nucleotide polymorphism) can cause immune responses, such as graft versus host disease (GVHD) and graft versus leukemia (GVL) effect. These minor histocompatibility antigens (mHAs) play an important role in eradicating leukemia cells after transplantation. However, only a small number of mHAs have been discovered and the identification of novel mHAs has been required. In this study, we developed a novel method for identification of mHAs by using next-generation sequencer. We applied whole exome sequencing for a donor and recipient, and extracted SNPs to each other. To narrow down the candidate genes of mHAs, non-synonymous SNPs are subject to be evaluated by HLA binding prediction algorithm. This study will enable us to identify novel mHAs in each pair of donor and recipient of transplantation, and will be useful for the development of an individualized immunotherapy based on mHAs.

研究分野：血液内科

キーワード：造血幹細胞移植 組織適合抗原

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

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 造血幹細胞移植では、主要組織適合性抗原である HLA 適合例においても個々人のゲノムに存在する遺伝子多型の一部が抗原として認識され移植免疫反応が誘導され得る。これらの抗原はマイナー組織適合性抗原 (マイナー組織抗原) と総称されており、移植片対宿主病 (GVHD) や生着不全に関与するとともに、移植片対白血病 (GVL) 効果のターゲット分子として重要な役割を果たしている。

(2) これらのマイナー組織抗原の発見は、Goulmy らによって HA-2 が同定されたことには始まり、わが国では赤塚らにより BCL2A1 が同定されている。現在では約 20 種類のマイナー組織抗原が知られており、GVHD の予測や GVL 効果による免疫療法への応用が期待されている。一方で、マイナー組織抗原には HLA 拘束性があり、またその免疫反応はドナー・レシピエントの抗原タイプの組合せに依存するため、現在同定されているマイナー組織抗原の数と種類では臨床における免疫療法への応用には対象症例が大幅に制限されるため十分ではない。臨床応用のためには、さらに多くのマイナー組織抗原の発見・同定が求められている。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、HLA 適合造血幹細胞におけるドナー・レシピエントの血縁者ペアにおいて遺伝子多型の網羅的解析を行い当該ペアにおける新たなマイナー組織抗原群を同定することにある。これまでに、約 20 種類のマイナー組織抗原が発見されてきているが、従来の方法ではマイナー組織抗原を認識すると推定される T 細胞クローン (CTL クローン) の樹立が必要であり、その T 細胞の CTL 活性を指標として、(i) HLA に結合している抗原ペプチド群の分離・生成を行う方法 (例: HA1, HA2 等) (ii) 対象細胞に発現している遺伝子の cDNA ライブラリーをもちいる発現クローニング法 (HB1, UGT2B17 等) (iii) 家系における遺伝子連鎖解析法を導入した方法 (BCL2A1) などにより、マイナー組織抗原が同定されてきた。しかし、これらの方法論では多くの労力が必要でありマイナー組織抗原の探索には限界があった。さらに、マイナー組織抗原の臨床への応用には、HLA 拘束性およびドナー・レシピエントの抗原系の組合せなど多くの制限が伴う。

(2) 本研究では、新たなマイナー組織抗原群を同定するため、HLA 適合造血幹細胞におけるドナー・レシピエントの血縁者ペアにおいて遺伝子多型の網羅的解析を行う。先ずドナー・レシピエントの骨髄移植ペアにおいて次世代シーケンサーにより全エキソーム解析遺伝子解析を行い、そこから非同義的な遺伝子多型を網羅的に抽出する。その中から HLA 結合予測および遺伝子の組織発現をベースにマイナー組織抗原の候補遺伝子を選択し、最終的に T 細胞認識による抗原同定を行う。本方法では CTL クローンの樹立を前提としないため、全てのドナー・レシピエントのペアからマイナー組織抗原の候補遺伝子群を選択することが可能となる。新たなマイナー組織抗原の同定により、GVHD・GVL 効果の予測に基づいた適切なドナー選択や、マイナー組織抗原をターゲットとしたワクチンや養子免疫療法による個別化免疫療法への応用が期待される。

### 3. 研究の方法

(1) 次世代シーケンサーによるマイナー組織抗原の網羅的探索として、HLA 適合血縁者間移植症例におけるドナー・レシピエントペアの遺伝子多型解析を行う。ドナーとレシピエントから遺伝子解析の同意を取得後、ドナー末梢血単核球およびレシピエント T 細胞より DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた全エキソーム解析により網羅的な遺伝子多型解析を行う。全エキソーム解析は、SureSelect Human All Exon V5 (Agilent) により exon 領域を濃縮し、HiSeq1500 (illumina) で遺伝子解析を行う。データ解析は UCSC human genome 19 をレファレンス配列とし Bowtie2 でマッピングを行う。SNP/indel の抽出には SAMtools を使用し、ANNOVA により annotation を行った。GVH 方向と HVG 方向に区別してドナー・レシピエントにおける非同義的 (non-synonymous) な一塩基多型 (SNP) および indel 多型の解析を行う。

(2) 遺伝子多型に由来するアミノ酸の変化による HLA 結合性の評価として、NetMHCpan4 (Center of Biological Sequence Analysis, Denmark) 解析システムにより行い、IC50 において 500uM 以下のものを結合性ありとし、50uM 以下のものを強結合性と評価した。この解析により、非同義的遺伝子多型群の中で当該 HLA 提示され免疫学的に認識され得る候補遺伝子群の抽出を行う。

(3) 組織発現パターンの検証によるマイナー組織抗原の候補遺伝子群の同定として、遺伝子発現データベースである理化学研究所により公開されている CAGE 法による FANTOM5 データベースを使用する。FANTOM5 データベースに、血液系幹細胞分画での遺伝子発現プロファイルを重ねることでマイナー組織抗原候補の組織発現パターンを血液系においてより詳細に評価する。発現パターンの検証において、抗原セットが GVH 方向であり且つ血液系にその発現が限定される遺伝子群を GVL ターゲットとなり得るマイナー組織抗原の候補遺伝子群と評価する。

(4) マイナー組織抗原を認識する T 細胞クローンの樹立により、マイナー組織抗原の同定および臨床応用の可能性を検証する。各症例から選択された GVL のターゲットとして期待できるマイナー組織抗原の遺伝子多型部位を発現ベクターにクローニングし免疫誘導に用い、CTL クローンの樹立および機能解析を行う。さらに、マイナー組織抗原の *in vivo* での検証として動物実験系を導入する。HLA 合致近交系マウス (Balb/c, DBA2:H-2d) において、各々のマウス系統に由来する細胞株 (A20, P815) および融合遺伝子導入による人工的に誘導された白血病モデルを対象として、ゲノム解析データから遺伝子多型によるマイナー組織抗原候補を同定し抗白血病効果の検証を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) 次世代シーケンサーによるマイナー組織抗原候補の網羅的探索

マイナー組織抗原の網羅的探索として、HLA 適合血縁者間移植症例におけるドナー・レシピエントペアの全エクソーム解析を行った。【表 1】のドナー・レシピエント 5 ペアの解析を行い、

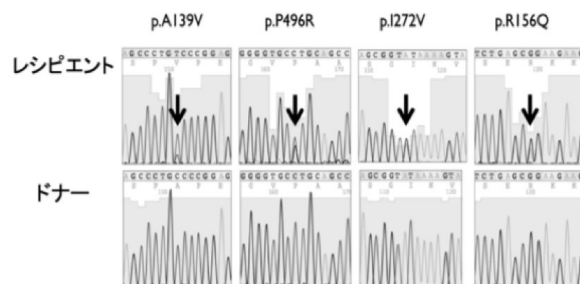
【表 1】 エクソーム解析症例

HLA 適合ドナー・レシピエント	疾患	非同義的な遺伝子多型 (GVH 方向)
P1 (pair 1)	B-ALL (Ph1)	5033 SNPs
P2	B-ALL (Ph1)	6285 SNPs
P3	B-ALL (Ph1)	5684 SNPs
P4	B-ALL (Ph1)	5427 SNPs
P5	AML (M1)	5512 SNPs

GVH 方向の非同義的遺伝子多型を選択した。例えば P1 症例において【図 1】のようにドナー側で homozygous な塩基がレシピエント側では heterozygous となりアミノ酸変化を伴っており、GVH 方向に認識され得る可能性があり、これらの非同義的遺伝子多型をベースとして、HLA 結合性予測の解析によりマイナー組織抗原の候補遺伝子群を絞り込むことで、マイ

ナー組織抗原の候補遺伝子群を抽出した。HLA タイピングは Luminex を用いた PCR-rSSO (reverse-Sequence Specific Oligonucleotide) 法により、さらにエクソーム・データを *in silico* で

【図 1】 非同義的な遺伝子多型 (non-synonymous SNPs)



解析し合致した結果を確認している。今回の解析では、HLA 結合性予測は NetMHCpan4 を導入し IC50 において 500uM 以下のものを結合性ありとした。これらの遺伝子多型はマイナー組織抗原の候補遺伝子であり、さらなる解析により HLA 適合移植における個別に同定されたマイナー組織抗原として臨床応用することができるであろう。一方、HLA 合致近交系マウス (Balb/c, DBA2:H-2d) においても同様の解析を行い、8967 ヶ所の非同義的な遺伝子多型を認めている。

##### (2) GVH 方向の非同義的遺伝子多型の候補遺伝子からのマイナー組織抗原の同定

全エクソーム解析からマイナー組織抗原の候補遺伝子多型の抽出後、当該候補の遺伝子多型がドナー由来の T 細胞による認識されるかどうかを検証することにより、候補遺伝子をマイナー組織抗原の可能ありと同定することができる。HLA タイプが合致した細胞において、その遺伝子多型による T 細胞反応の誘導の可能性を検証するため、まず混合リンパ球反応 (MLC: Mixed Lymphocyte Culture/ Reaction) を行った。GVH 方向の確認のためドナー末梢血単核球と放射線照射したレシピエント単核球を共培養し、5 ペアにおいて陽性反応を得た。次にレシピエント単核球から作成した cDNA ライブラリーをドナー由来単核球に導入しドナー由来 T 細胞と共培養したところ、2 ペアにおいて T 細胞の強い増殖反応を観察することができ、レシピエント由来の遺伝子をドナー T 細胞が認識している可能性が示された。GVH 方向のマイナー組織抗原を探索するため、レシピエントの複数の遺伝子多型部位を一括して導入できる遺伝子多型 (SNPs) 連結発現ベクターを構築しており、抗原提示細胞に導入しドナー T 細胞の反応を ELISpot アッセイで評価したところ、結果として 2 つの遺伝子多型をマイナー組織抗原の可能性ありと同定することができた。

##### (3) 本研究の問題点および今後の方針

今後は同定した遺伝子多型を認識する T 細胞クローン樹立および TCR クローニングを行う予定であるが、本研究の問題点として、全エクソーム解析によるマイナー組織抗原の候補遺伝子抽出と、T 細胞認識による実際のマイナー組織抗原同定との間にギャップがあり、必ずしも同定に至らないペアが多かったことが挙げられる。原因のひとつは、共培養系による免疫誘導反応の検出感度が高くないことがあり、絞り込みのはじめから候補となる遺伝子多型発現ベクターの構築および ELISpot アッセイによる反応ドナー T 細胞の検出を行うことが望ましいと考えられる。もうひとつの原因として、マイナー組織抗原の候補遺伝子抽出のパイプラインにおいて、NetMHCpan による HLA 結合性評価のステップの問題があり、真の遺伝子多型候補を失っている可能性があることが予想される。この問題点については、IC50 値のみならず Rank 指数あるい

は mass spectrometry を基盤とした新規の HLA 結合性プログラムを併用することにより再評価を試みる予定である。一方、動物実験においては、Balb/c 系の脾臓細胞による DBA2 系における免疫誘導で、Balb/c 由来の融合遺伝子導入による白血病細胞の生着阻害が確認できており、マイナー組織抗原が拒絶抗原である可能性が高く、HVG 方向のマイナー組織抗原遺伝子の同定を進めている。これらの研究を進めるためには、マイナー組織抗原の候補遺伝子抽出後の T 細胞認識による同定過程において、より簡便な方法の確立が必要であり、現在 HLA-peptide tetramer の導入による効率化を準備している。

また、本研究では血液系腫瘍に対する HLA 適合血縁者間移植症を中心に研究を行っているが、固形腫瘍においても同種移植による治療が応用され得る可能性がある。腎がん、大腸がん、膵がんなどの固形腫瘍において、造血幹細胞移植による抗腫瘍効果が報告されているものの、GVHD の免疫制御の問題点があるため従来の治療成績を越える利点は見出されていない。しかし、GVL 効果が期待できる適切なマイナー組織抗原を事前に同定することができれば、固形腫瘍においても選択的に GVT (Graft versus tumor) 効果を誘導することで治療にも活かせる可能性があるため研究を進めていく。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Nagafuji K, Miyamoto T, Eto T, Ogawa R, Okumura H, Takase K, Kawano N, Miyazaki Y, Fujisaki T, Wake A, Ohno Y, Kurokawa T, Kamimura T, Takamatsu Y, Yokota S, Akashi K. Prospective evaluation of Minimal Residual Disease (MRD) monitoring to Predict Prognosis of Adult Patients with Ph-negative ALL. Eur J Haematol. 査読有. 2019 [Epub ahead of print] doi: 10.1111/ejh.13268.

2. Sugita J, Kagaya Y, Miyamoto T, Shibasaki Y, Nagafuji K, Ota S, Furukawa T, Nara M, Akashi K, Taniguchi S, Harada M, Matsuo K, Teshima T; Japan Study Group for Cell Therapy and Transplantation (JSCT). Myeloablative and reduced-intensity conditioning in HLA-haploidentical peripheral blood stem cell transplantation using post-transplant cyclophosphamide. Bone Marrow Transplant. 査読有. 2019. 54:432-441. doi: 10.1038/s41409-018-0279-1.

3. Hayashi S, Moriyama T, Yamaguchi R, Mizuno S, Komura M, Miyano S, Nakagawa H, Imoto S. ALPHLARD-NT: Bayesian Method for Human Leukocyte Antigen Genotyping and Mutation Calling through Simultaneous Analysis of Normal and Tumor Whole-Genome Sequence Data. J Comput Biol. 査読有. 2019 [Epub ahead of print] doi: 10.1089/cmb.2018.0224.

4. Hayashi S, Yamaguchi R, Mizuno S, Komura M, Miyano S, Nakagawa H, Imoto S. ALPHLARD: a Bayesian method for analyzing HLA genes from whole genome sequence data. BMC Genomics. 査読有. 2018. 19:790. doi: 10.1186/s12864-018-5169-9.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：水野 晋一

ローマ字氏名：(MIZUNO, shinichi)

所属研究機関名：九州大学

部局名：医学研究院

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：40569430

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。