

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03686

研究課題名(和文)再生不良性貧血におけるHLAクラスIアレル拘束性自己抗原の同定

研究課題名(英文) Identification of autoantigens presented by specific HLA class I alleles in aplastic anemia

研究代表者

中尾 眞二 (NAKAO, Shinji)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：70217660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：再生不良性貧血(AA)の自己抗原提示にもっとも深く関わっているHLA-B*40:02陽性患者の骨髓中に同定したT細胞レセプターのcDNAを健常者のTリンパ球に導入することにより、AA患者の造血幹前駆細胞(HSPC)をHLA-B4002拘束性に傷害するT細胞トランスフェクタントを作製した。これを用いて、HLA-B4002を発現させた白血病細胞株(K562)のHLA-B4002結合ペプチドをスクリーニングしたところ、HSPCが高発現している蛋白Xに選択的に反応することが分かった。また、HLA-DR15陽性AA患者のHSPCでは、HLA-DR発現がエピジェネティックに低下していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AAは、HSPCに対する細胞傷害性T細胞の攻撃がきっかけとなって発症する自己免疫疾患である。しかし、細胞傷害性T細胞の標的となるHSPC上の自己抗原は不明であった。今回同定したX蛋白由来ペプチドに特異的なCD8+ T細胞が、HLA-B*40:02陽性AA患者の末梢血に検出され、さらにそのCD8+ T細胞の自己HSPCに対する細胞傷害性が証明されれば、X蛋白はAAにおける自己抗原であると考えられる。それが証明されれば、HLA-B4002-ペプチドテトラマーを用いたAAの特異的診断や、テトラマー陽性T細胞を標的とする選択的な治療法の開発などが可能となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：To identify an autoantigen presented by HLA-B4002 on hematopoietic stem progenitor cells (HSPCs) of patients with acquired aplastic anemia (AA), we established T-cell receptor (TCR) transfectants using T cells from healthy individuals and TCR cDNA derived from T cells that predominantly proliferated in the bone marrow of an AA patient carrying HLA-B*40:02, and examined specific response to peptides bound to HLA-B4002 on a leukemia cell line K562 that were transfected with HLA-B*40:02. Two kinds of TCR transfectants specifically recognized one of the HLA-B4002-bound peptides that are derived from a cytoplasmic protein (protein X), which is abundantly expressed by HSPCs. We prepared a peptide-HLA-B4002 tetramer and are now screening peripheral blood T cells of AA patients with HLA-B*40:02 for the presence of the peptide-specific CD8+ T cells.

In a separate experiment, we found that HSPCs of AA patients possessing HLA-DR15 frequently lacked HLA-DR through epigenetic mechanisms.

研究分野：血液内科学

キーワード：再生不良性貧血 自己抗原 HLA-B*40:02 T細胞レセプター 発作性夜間ヘモグロビン尿症 HLA-DR15

1. 研究開始当初の背景

再生不良性貧血(再不貧)は、造血幹前駆細胞(hematopoietic stem progenitor cell: HSPC)に対する細胞傷害性T細胞(cytotoxic T lymphocyte: CTL)の攻撃がきっかけとなって発症する自己免疫疾患である。しかし、CTLの標的となるHSPC上の自己抗原は未だに同定されていない。これまでの我々の研究により、再不貧患者の約30%では、6番染色体の片親性ダイソミーやHLAアレルの機能喪失型変異のために特定のHLAクラスIIアレルが欠失した白血球が検出されることが明らかになっている。中でもHLA-B*40:02は、欠失する頻度が最も高いHLAアレルであることから、このアレルによって提示されるHSPC由来の抗原が、再不貧の発症にもっとも重要な役割を担っていると考えられる。

そこで、B4002欠失白血球を保有する再不貧患者に着目し、シクロスポリン依存性の一症例から、単球由来のiPS細胞(iPSC)を複数樹立し、さらに表現型の異なるiPSC由来のHSPCを誘導した。その結果、この患者の末梢血中には、野生型のiPSC-HSPCは傷害するが、B4002欠失iPSC-HSPCは傷害しないCTL前駆細胞が存在することが明らかになった。また、このCTL株151230Aと、初診時の患者骨髄CD8⁺CD137⁺PD-1⁺T細胞のレセプター(TCR)レパトアを単一T細胞解析で調べたところ、両者において優勢なT細胞の一つは全く同じTCR を持っていた。このTCRを含む骨髄中の優勢なTCRのリガンドを決定できれば、それが、B4002が提示する再不貧の自己抗原である可能性が高いと考えた。

一方、再不貧患者ではHLA-DR15の保有例が非常に多いことから、CD8⁺T細胞だけでなく、CD4⁺T細胞も再不貧の発症に関与もしていると考えられてきたが、その役割は全く不明であった。また、再不貧患者でしばしば認められる発作性夜間ヘモグロビン尿症(paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: PNH)型血球の増加にも、HSPCに対するCD4陽性T細胞の攻撃が関与していることが*in vitro*では示されているが、PNH型のHSPCがどのような機序でその攻撃を免れているかも分かっていない。近年、同種造血幹細胞移植後に再発した急性骨髄性白血病細胞では、HLAクラスIIの発現低下がみられることが報告されている。治療によって改善したAA患者HSPCは、HSPCに対するCD4陽性T細胞の攻撃を免れて造血に寄与していることから、寛解状態にあるAA患者のHSPCにおいても、HLAクラスII発現が低下している可能性があると考えた。

2. 研究の目的

1. HLA-B*40:02 陽性 AA 患者の骨髄中でクローン性に増殖している T 細胞から同定した 2 種類の T 細胞レセプター 鎖(TCR15と TCR20)のリガンドを同定することにより、B4002 が提示する再不貧の自己抗原を同定する。
2. TCR15 および TCR20 が反応することが分かっている HLA-B*40:02 導入 K562 細胞の B4002 結合ペプチドを質量分析で解析することにより同定した複数のペプチドに対する患者 T 細胞の反応性をスクリーニングすることにより、どの蛋白が TCR トランスフェクタントの標的であるかを明らかにする。
3. 寛解状態にある再不貧症例の末梢血 HSPC を対象として、新たに確立したフローサイトメトリ法と RNA シーケンシングを用いて HLA クラス II 発現の低下の有無を明らかにする。

3. 研究の方法

1. TCR15とTCR20のそれぞれのcDNAを健常者由来のT細胞に導入したTCRトランスフ

ェクタントは、*HLA-B*40:02*・CD80・CD137-リガンド導入 K562 細胞に対して、B4002 依存性に選択的に反応することが分かっている。これらの TCR のリガンドを同定するため、K562 由来の cDNA ライブラリーをトランスフェクトした *HLA-B*40:02*・CD80・CD137 導入 COS 細胞または 293T 細胞と共培養することにより、TCR15 および TCR20 が反応する cDNA クローンを、インターフェロン 分泌を指標として ELISA により同定する。

2. *HLA-B*40:02* 導入 K562 細胞上の B4002 に結合しているペプチドを質量分析で解析することにより、複数の蛋白由来のペプチドが同定されている。TCR15 または TCR20 トランスフェクタントおよび患者末梢血の CD8⁺ 細胞が、これらのどのペプチドに反応するかを、*HLA-B*40:02*・CD80・CD137 導入 COS 細胞または *HLA-B*40:02*・CD80・CD137 導入 293T 細胞性を抗原提示細胞として用いることにより明らかにする。
3. 寛解状態の再不貧患者末梢血中で CD45^{dim}CD34⁺CD38⁺細胞を HSPC として同定し、これらの細胞集団における HLA クラス II 発現を抗 HLA-DR、DQ、DP 抗体を用いて検討する。HSPC から HLA-DR 陰性細胞と陽性細胞をソーティングし、それぞれの細胞集団における遺伝子発現レベルを RNA シーケンシングにより比較する。

4. 研究成果

1. TCRトランスフェクタントによるK562細胞由来cDNAライブラリースクリーニングは現在も続けているが今のところ、陽性反応を示す293Tクローンは同定されていない。
2. CD80/CD137Lを導入したHLA-B4002陽性K562細胞において、HLAクラスI分子に結合するペプチドを質量分析によりスクリーニングしたところ、HLA-B4002と親和性の高い複数のペプチドが同定された。その中の一つは、造血幹細胞の増殖を調節する転写因子X由来のペプチドであった。*HLA-B*40:02*陽性再不貧患者骨髄において、抗原特異的に優勢に増殖している2種類のT細胞レセプター(T-cell receptor: TCR) 鎖(TCR15、TCR20)のT細胞トランスフェクタントは、CD80/CD137L導入HLA-B4002陽性K562細胞に選択的に反応してインターフェロン(IFN)- を分泌したが、CRISPR-Cas9でこの蛋白XをロックアウトしたK562細胞に対してはIFN- を分泌しなかった。このため、この蛋白X由来ペプチドが、TCR15・TCR20のリガンドであると考えられた。そこで、精製HLA-B4002とこのペプチドを用いてテトラマーを作製した。現在、このテトラマーを用いて*HLA-B*40:02*陽性再不貧患者Tリンパ球のスクリーニングを行っている。標的抗原がXペプチドだけではない可能性があるため、CRISPR Genome-Wide sgRNA Library Systemを用いた抗原スクリーニングも同時に進めている。
3. 61例中7例(11.5%)のHSPCにおいて13.0-57.1%のHLAクラスII欠失細胞分画が検出された。7例全例が *HLA-DRB1*15:01* または *HLA-DRB1*15:02* を保有しており、それ以外のHLAクラスIIアレルでは、7例全例が共有しているものはなかった。HLAクラスII欠失HSPCを有する7例では、5例(71.4%)がシクロスポリン依存性であり、この頻度はHLAクラスII欠失HSPC陰性の29.6%に比べて有意に高かった。また、全例がHLAクラスI欠失血球は陰性であり、両者の関係は排他的であった。さらに、インターフェロン の存在下でHSPCを72時間培養したところHLAクラスII欠失は完全に回復した。また、HLAクラスII欠失HSPC陽性例でも、成熟Bリンパ球におけるHLAクラスII発現は正常であったことから、HSPCにおけるHLAクラスII欠失はエピジェネティックな機序によるものと考えられた。一方、7例のうちPNH型HSPCと非PNH型HSPCの両方を有する4例では、HLAクラスII欠失は非PNH型HSPC

のみに認められた。HLA-DR 陰性 HSPC と陽性 HSPC における遺伝子発現を網羅的に比較したところ、HLA クラス II 欠失 HSPC では CD48、CD86 などの共刺激分子の遺伝子発現が低下していた。このような共刺激分子の発現低下は HLA クラス I 欠失 HSPC では認められなかった。これらの結果から、HLA-DR15 が提示する自己抗原に特異的な CD4 陽性 T 細胞が、再不貧の発症に加えて、PNH 型 HSPC の免疫逃避にも関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Tsuji N, Hosokawa K, Urushihara R, Tanabe M, Katagiri T, Ozawa T, Takamatsu H, Ishiyama K, Yamazaki H, Kishi H, Ogawa S, Nakao S | 4. 巻 36 |
| 2. 論文標題 Frequent HLA-DR loss on hematopoietic stem progenitor cells in patients with cyclosporine-dependent aplastic anemia carrying HLA-DR15. Leukemia. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Leukemia | 6. 最初と最後の頁 1666-1675 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41375-022-01549-6 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Mizumaki H, Hosomichi K, Hosokawa K, Yoroidaka T, Imi T, Zaimoku Y, Katagiri T, Nguyen MAT, Tran DC, Elbadry MIY, Chonabayashi K, Yoshida Y, Takamatsu H, Ozawa T, Azuma F, Kishi H, Fujii Y, Ogawa S, Tajima A, Nakao S | 4. 巻 106 |
| 2. 論文標題 A frequent nonsense mutation in exon 1 across certain HLA-A and -B alleles in leukocytes of patients with acquired aplastic anemia | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Haematologica | 6. 最初と最後の頁 1581-1590 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3324/haematol.2020.247809 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Yoroidaka T, Hosokawa K, Imi T, Mizumaki H, Katagiri T, Ishiyama K, Yamazaki H, Azuma F, Nanya Y, Ogawa S, Nakao S | 4. 巻 35 |
| 2. 論文標題 Hematopoietic stem progenitor cells lacking HLA differ from those lacking GPI-anchored proteins in the hierarchical stage and sensitivity to immune attack in patients with acquired aplastic anemia | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Leukemia | 6. 最初と最後の頁 3257-3267 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41375-021-01202-8 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 2.Hosokawa K, Mizumaki H, Elbadry MI, Saito C, Espinoza JL, Thi Thanh Dao A, Katagiri T, Harashima A, Kikuchi A, Kanai A, Matsui H, Inaba T, Taniwaki M, Yamamoto Y, Nakao S | 4. 巻 33 |
| 2. 論文標題 Clonal hematopoiesis by SLIT1-mutated hematopoietic stem cells due to a breakdown of the autocrine loop involving Slit1 in acquired aplastic anemia | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Leukemia | 6. 最初と最後の頁 2732-2737 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41375-019-0510-0 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hosokawa K, Mizumaki H, Yoroidaka T, Maruyama H, Imi T, Tsuji N, Urushihara R, Tanabe M, Zaimoku Y, Nguyen MAT, Tran DC, Ishiyama K, Yamazaki H, Katagiri T, Takamatsu H, Hosomichi K, Tajima A, Azuma F, Ogawa S, Nakao S |
| 2. 発表標題 Clonal hematopoiesis by HLA class I allele-lacking hematopoietic stem cells and concomitant aberrant stem cells is rarely associated with clonal evolution to MDS/AML in patients with acquired aplastic anemia |
| 3. 学会等名 62nd Annual Meeting of American Society of Hematology (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hiroki Mizumaki |
| 2. 発表標題 A Common HLA Allelic Mutation of exon1 in Leukocytes Defines Class I Alleles Responsible for Autoantigen Presentation of Acquired Aplastic Anemia |
| 3. 学会等名 61st American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kohei Hosokawa |
| 2. 発表標題 Identification of T-Cell Receptors Specific to Antigens Presented By HLA-B4002 and B5401 in Acquired Aplastic Anemia |
| 3. 学会等名 61st American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 橋本 真一 (HASHIMOTO Shinichi) (00313099) | 和歌山県立医科大学・先端医学研究所・教授 (24701) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 細道 一善 (HOSOMICHI Kazuyoshi) (50420948) | 金沢大学・医学系・准教授 (13301) | |
| 研究分担者 | 岸 裕幸 (KISHI Hiroyuki) (60186210) | 富山大学・学術研究部医学系・教授 (13201) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |