

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17394

研究課題名（和文）造血幹細胞におけるHLA-C発現量と抗原抗体反応に関する検討

研究課題名（英文）Study of HLA-C expression and antigen-antibody response in hematopoietic stem cells

研究代表者

山下 鷹也 (Yamashita, Takaya)

秋田大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90793266

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：造血幹細胞のHLA抗原の発現をフローサイトメトリー法を用いて確認する手法を確立し、造血幹細胞のHLA-A、HLA-B、HLA-Cともにほぼ100%の発現を示していることを明らかにした。また、血球はその種類によってHLA型の違いでHLA-C抗原の発現率に差が見られることが知られているが、造血幹細胞はHLA型によってHLA-A、HLA-B、HLA-C抗原の発現率に差がないことも判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血幹細胞におけるHLA-A、HLA-B、HLA-Cはほぼ100%の発現を示し従来言われている通りのデータであったが、明確に記載した論文はこれまでに無く、結果を公表することによりこれまでの概念の裏付けとなるため学術的意義があることと考える。また、HLA型によって造血幹細胞のHLA発現量が異なっていないという結果は、これまでの造血幹細胞治療におけるドナー選択に問題はないということを支持しており、臨床的にも意義あることと考える。

研究成果の概要（英文）：We have developed a method to confirm the expression of HLA antigens in Hematopoietic stem cells (HSCs) using flow cytometry. HSCs were found to have almost 100% expression of HLA-A, HLA-B and HLA-C. It is also known that blood cells show differences in the expression rate of HLA-C antigens depending on their HLA type, but HSCs do not show differences in the expression rate of HLA-A, HLA-B and HLA-C antigens depending on their HLA type.

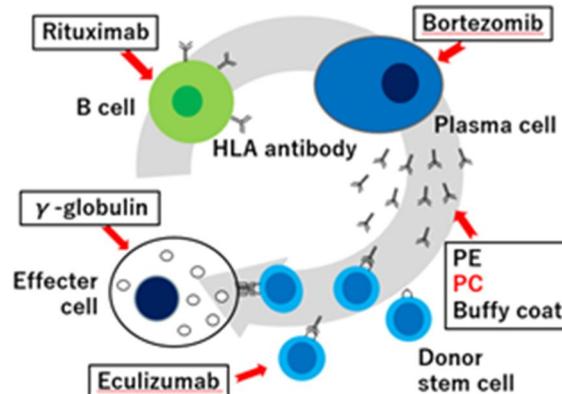
研究分野：血液内科、造血幹細胞移植

キーワード：造血幹細胞 HLA HLA-C 抗HLA抗体

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

HLA はヒトの組織適合性抗原であり、赤血球を除くほぼすべての細胞にみられる。その役割は自己と非自己を認識し、自然免疫の制御、獲得免疫における T 細胞への抗原提示などヒトの免疫系の根幹をなす。同種造血幹細胞移植時に重要視される HLA は HLA-A、B、C、DR、DQ、DP である。近年増加している HLA mismatch 移植の大きな問題点はレシピエントが保持する抗 HLA 抗体であり、抗 HLA 抗体の存在は臍帯血移植、HLA 半合致移植において生着不全のリスクを高める (Takanashi M, et al. Blood 2010;116:2839, Yoshihara S, et al. Bone Marrow Transplant 2012;47:508.)。抗 HLA 抗体を移植前に減弱させる手法は、B 細胞や形質細胞を傷害し抗体産生を低下させる、グロブリン投与で抗体結合を阻害する、そして血漿交換で直接的に抗 HLA 抗体を取り除く方法の 3 種類である (右図)。本研究者は抗 HLA 抗体直接除去法として血小板(PC)輸注による除去を実臨床で成功し報告している (Yamashita T, et al. Bone Marrow Transplant. 2017;52:794, Yoshihara S, et al. Bone Marrow Transplant 2012;47:508.)。この手法は欧州移植学会のガイドラインに効果的な抗 HLA 抗体直接除去法として記載されている (Ciurea SO, et al. Bone Marrow Transplant 2018;53:521)。一方、HLA は赤血球を除くほぼすべての細胞に発現するとされていたが、直接的に造血幹細胞の HLA-C 発現を調べた報告は未だ無い。さらに HLA-C の発現量は細胞によって差があることや、HLA の型によっても HLA-C の発現量に違いがあることは本研究者らを含め近年報告されているが (Yamashita T, et al. Bone Marrow Transplant. 2019;54:1713, Apps R, et al. Science 2013;340:87.)、造血幹細胞における HLA-C 抗原の発現や抗 HLA-C 抗体の生着不全に関する影響についてはほとんど知られていない。



2. 研究の目的

本研究の主目的は未解明である造血幹細胞の HLA-C 発現量を調べることである。これまで造血幹細胞の HLA-C 発現量に関する報告はない。同種移植の根幹となる造血幹細胞の HLA 発現量が検討されていないことは生着不全に関わる大きな問題であり、本研究者らがこれまでの研究で確立した手法を用いて造血幹細胞の HLA 発現量を明らかにする。

そして副次目的として、T リンパ球の様に造血幹細胞の HLA-C 発現量は HLA 型によって異なるのかを臨床検体を用いて調べることが目標とした。

3. 研究の方法

(1) 造血幹細胞の HLA-C 発現率について

前研究の際に確立したフローサイトメトリー法を用いて、造血幹細胞の HLA-A、HLA-B、HLA-C の発現率を調べた。前研究では各血球の HLA 発現量を見るために CD41、CD13、CD19、CD3 でゲーティングを行ったが、造血幹細胞では CD34 でゲーティングすることでこれまでの手法を応用した。臨床検体は、造血幹細胞を採取したものの移植に使用せず、研究利用の同意が得られているものを使用した。

(2) HLA 型と造血幹細胞の HLA-C 抗原の発現率について

同種造血幹細胞移植のためなどで既に HLA 型が判明しているものは、その HLA 型を用いた。自家造血幹細胞移植の検体や新規採取の検体で HLA が不明のものは当施設にある Luminex を用いて HLA 型を判定することとした。判明した HLA 型と 1) で調べた HLA-C 発現率に相関がないか検討した。

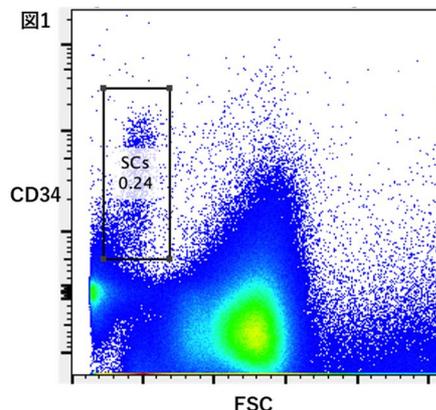
(3) 造血幹細胞と抗 HLA-A、HLA-B、HLA-C 抗体との反応性について

当施設で抗 HLA 抗体を含む血清を多数保管している。この抗 HLA 抗体と同じ HLA 抗原を発現した造血幹細胞を共培養して血清中の抗 HLA 抗体の強度 (mean fluorescence intensity; MFI) の低下を検討する。また、血清に混注する造血幹細胞数を変えることで MFI 減少量の変化も検討する。MFI は HLA 検査にも使用する Luminex で別試薬を用いることで検査を行う。

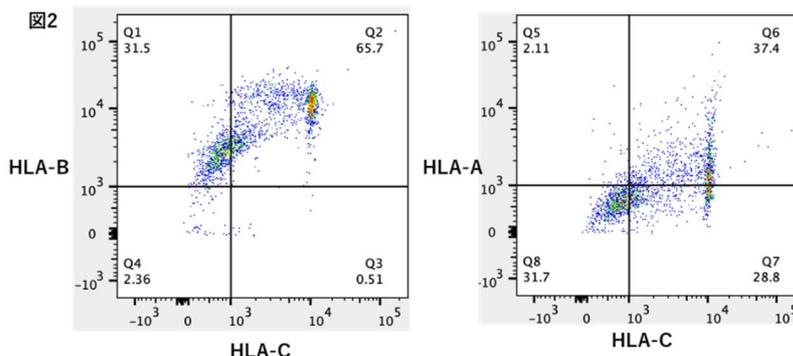
4. 研究成果

(1) 造血幹細胞の HLA-C 発現量について

同種造血幹細胞移植に用いられなかった末梢血幹細胞検体を用いて、造血幹細胞分画の検出を行った。健康人末梢血検体をネガティブコントロールとして、フローサイトメトリー法で CD34 陽性かつ健康者で見られない分画を造血幹細胞分画として同定した(図1)。いずれの検体も造血幹細胞分画は 1%未満であった。末梢血幹細胞採取直後の CD34 陽性細胞は採取した全細胞数の 1%程度と言われているため、長期間保存されていたことを考慮すると妥当な数値と考えられた。造血幹細胞分画を定めた後に、前研究で用いたフローサイトメトリー法を応用して、CD34、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DR、CD3、CD56、PI で染色



して造血幹細胞の HLA 発現について調べることができた。HLA-A、HLA-B、HLA-C で展開すると、いずれの HLA も高頻度に発現していることが判明した(図2)。



(2) HLA 型と造血幹細胞の HLA-C 抗原の発現率について

次に、HLA 型で造血幹細胞の HLA-C 抗原の発現量に差があるかを確認するため、すでに HLA 型が判明している検体を用いて、上記と同様にフローサイトメトリーを行った。結果は右表に示す通り、CD34 抗原の発現率は一様に 100%近く、造血幹細胞の HLA-A、HLA-B、HLA-C の発現率は HLA 型によらず高発現していることが判明した。これまでこの結果を明記した論文はなかったが、従来言われている通りの結果であった。

CD34%	#1	#2	#3	#4	#5
HLA-A	100	99.7	100	99.6	99.9
HLA-B	99.9	100	100	100	100
HLA-C	97.6	95.2	93.5	98.9	98.6

(3) 造血幹細胞と抗 HLA-A、HLA-B、HLA-C 抗体との反応性について

本研究では抗 HLA 抗体と造血幹細胞の反応性に関しても研究を行う予定であったが、新型コロナウイルスの流行拡大に伴う診療業務の大幅な増加のため、研究時間を取ることができなかった。

以上、本研究の成果として、HLA 抗原の発現をフローサイトメトリー法を用いて様々な細胞で確認する手法を確立し、これまで明記されていなかった造血幹細胞の HLA 抗原の発現率を HLA-A、HLA-B、HLA-C 毎に確認することが出来た。結果は、HLA-A、HLA-B、HLA-C ともにほぼ 100%の発現を示し従来言われている通りのデータであったが、結果を公表することにより、これまでの概念の裏付けとなるため意義あることと考える。また、血球はその種類によって HLA 型の違いで HLA-C 抗原の発現率に差が見られることが知られているが、造血幹細胞は HLA 型によって HLA-A、HLA-B、HLA-C 抗原の発現率に差がないことも判明した。この点も合わせて発表する予定である。

今後の展望としては、本研究で未施行である造血幹細胞と HLA-A、HLA-B、HLA-C 抗体との反応性をまず確認する。これまでは抗 HLA 抗体の強度と造血幹細胞の生着に関しては実臨床のデータのみで議論されていたが、基礎研究の側面からもデータを検討することにより、より安全に抗 HLA 抗体を保持する患者で造血幹細胞移植が可能になると考えられる。次に、本研究者が以前に確立した血小板輸注による抗 HLA 抗体の除去効果について検討する。この点についてもこれまでは実臨床のデータで血小板 20 単位の輸注で抗 HLA 抗体の除去を試みてきたが、これは裏付けされたデータの無い輸注量であったため、抗 HLA 抗体の強度とそれを消失させることができる血小板数を研究することで正確に必要な血小板数を割り出すことが可能になると考える。これらの研究を継続することで、造血幹細胞移植治療の発展につなげていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------