様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　５ 年　 ６ 月　 ３ 日現在

機関番号：１３３０１
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2022
課題番号：２０Ｋ１７３９７

研究課題名（和文）後天性の家族性造血不全における免疫病態の解明

研究課題名（英文）Immune pathology in acquired familial bone marrow failure syndrome.

研究代表者
井美　達也（Imi, Tatsuya）

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：１０８４７２３９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：再生不良性貧血(AA)において、その免疫の対象や機序は不明なままである。免疫的な背景を共有した家族内でAAを発症した6家系に共通する免疫学的背景を検討した。5家系でHLA-DRB1*1502を共有しており、HLAとの関連する抗原が推定される可能性が考えられた。また、HLA-A0206を欠失した血球を母と娘に共通して認めた家系があった。この母と娘の末梢血からCD8陽性T細胞のT細胞受容体(TCR)のα鎖とβ鎖のシークエンスを実施し、共通し特異的なTCRの遺伝子配列を数種類認めた。TCRαとβのTCRのCDR3領域と相補的な関係にあるペプチドを推定したところ数種類のペプチドに抽出することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
後天性再生不良性貧血患者の多くは、T細胞を選択的に抑制するシクロスポリン（CsA）や抗胸腺細胞グロブリンなどによって改善する標的となる自己抗原や、サイトカインは未だに同定されていない。AAの発症には様々な環境因子や遺伝的要因が関与しているため、それらの解明は容易ではなかった。今回の解析で共通するHLAをもとに抗原の候補となるペプチドが推定され、これらが真に自己抗原と関連するものと断定できれば、発症の機序の解明や治療法の開発に有効と考えられる。

研究成果の概要（英文）：In aplastic anemia (AA), the targets and mechanisms of immunity remain unclear. We investigated common immunological backgrounds in 6 families with AA. HLA-DRB1*1502 was shared in 5 families, suggesting the possibility of an antigen related to HLA-DRB1*1502. There was also a family in which HLA-A0206-deficient blood cells were common to mother and daughter. Sequencing of the T cell receptor (TCR) α and β chains of CD8+ T cells from the mother and daughter's revealed several common and specific TCR gene sequences. Peptides complementary to the CDR3 regions of TCRα and β were estimated.

研究分野：血液学

キーワード：骨髄不全

※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。

様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

後天性再生不良性貧血(Aplastic anemia: AA)患者の多くは、T 細胞を選択的に抑制するシクロスポリン（CsA）や抗胸腺細胞グロブリンなどによって改善することから、AA は、造血幹細胞(Hematopoietic stem cells: HSC)を抑制する T 細胞によって引き起こされると考えられている。しかし、細胞傷害性 T 細胞(Cytotoxic T lymphocytes: CTL)の標的となる HSC 上の自己抗原や、HSC を抑制する T 細胞由来のサイトカインは未だに同定されていない。我々がこれまでに同定してきた「HLA クラス I アレル欠失血球」や「発作性夜間ヘモグロビン尿症(Paroxysmal nocternal hematuria: PNH)型血球」を保有する AA 患者では、欠失した HLA クラス I アレルが提示する自己抗原に特異的な CTL や、発作夜間ヘモグロビン尿症(PNH)形質の HSC を選択的にエスケープさせる造血抑制性サイトカインが骨髄不全の発症に関与していると考えられる。また 6 番染色体短腕の片親性二倍体によるヘテロ接合体消失（copy number neutral loss of heterozygosity in the short arm of chromosome 6: 6pLOH）によって生じた HLA クラス 1 アレル欠失血球や PNH 型血球をバイオマーカーとして検索すれば、免疫病態の解明につながると考えられたが、AA の発症には様々な環境因子や遺伝的要因が関与しているため、それらの解明は容易ではなかった。

２．研究の目的

AA の発症機序を明らかにするため、環境因子や遺伝的要因を共有していると考えられる家系内で複数名の AA 発症を認めた 6 家系を対象として HLA クラス１アレル欠失血球や PNH 型血球におけるバイオマーカーの解析を行った。またこれらに関与した免疫学的な背景を明らかにすることを目的とした。

３．研究の方法

AA を発症した家系内を詳細に検討し、その発症の背景や共有する環境因子を検討する。免疫学的な異常の発症の背景や自己抗原との関連性を検索する。同時に CTL における T 細胞受容体(T-cell receptor: TCR)のレパトアを解析し、共通するものを抽出することで、その対象となる抗原を推定する。また共有する HLA に認められる連鎖不均衡について検討する。

４．研究成果

A. 家族内発症の AA の特徴について

1986 年から 2016 年までに認められた親子または兄弟・姉妹間に AA を発症した異なる 6 家系、12 症例の背景因子を詳細に検討した。家系 2,3 の 2 家系ではほぼ同時に AA の発症が認められたが、それ以外の家系では 5 年から 26 年発症に時間の差があった。自己免疫疾患の併存や感染症の関与は否定的であった。それぞれの HLA アレルでは、*HLA-B*40:02*（血清型 HLA-B61）や *HLA-DRB1*15:01* を共有していた。また免疫マーカーである。また PNH 型血球や HLA 欠失血球を解析したところ、家系内発

家系	症例	続柄	HLAアレル	PNH型顆粒球	PNH型赤血球
1	1	Mother	A*2/24, B*35/60, DRB1*15:01/04:05	NA	NA
	2	Son	A*2/2, B*35/61, DRB1*15:01/08:02	NA	NA
2	3	Mother	A*26/2, B*61/35, DRB1*15:01/08:02	+ (0.464%)	- (0.000%)
	4	Daughter	A*26/24, B*61/51, DRB1*15:01/12:01	- (0.000%)*	- (0.000%)
3	5	Elder sister	A*31/33, B*61/44, DRB1*15:01/01:01	- (0.000%)*	+ (0.718%)
	6	Younger sister	A*31/33, B*61/44, DRB1*15:01/01:01	- (0.000%)*	- (0.000%)
4	7	Mother	A*02:06/24:02, B*55:02/40:02, C*01:02/03:04, DRB1*09:01/08:03	+ (0.271%)	+ (0.009%)
	8	Daughter	A*02:06/24:02, B*55:02/40:02, C*01:02/03:04, DRB1*09:01/08:02	+ (30.381%)	+ (10.065%)
5	9	Elder sister	A*11:01/24:02, B*15:01/39:01, C*04:01/07:02, DRB1*11:01/15:01	+ (0.016%)	+ (0.005%)
	10	Younger sister	A*11:01/24:02, B*15:01/39:01, C*04:01/07:02, DRB1*11:01/15:01	+ (0.231%)	+ (0.119%)
6	11	Elder sister	A*02:01/02:07, B*07:02/15:01, C*03:03/07:02, DRB1*01:01/15:01	+ (0.113%)*	+ (0.086%)
	12	Younger brother	A*02:01/02:07, B*07:02/15:01, C*03:03/07:02, DRB1*01:01/15:01	+ (9.133%)	+ (0.311%)

表1: 家族内発症のAA例におけるHLAアレルとPNH型血球の有無

症の AA の多くで PNH 型血球が陽性であった(表１)。*HLA-B*40:02* は AA 患者で高頻度に欠失することが知られており、自己抗原定時に関わることが推定される。また *HLA-DRB1*15:01* は CsA 依存性 AA や PNH で高頻度にみられることが報告されており、免疫原性が強く疑われる。さらに一家系（家系 4）では、

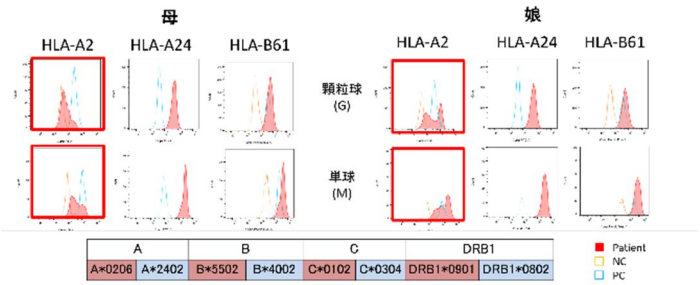

図1: 家系4の母・娘に検出されたHLA-A2欠失血球
A2には欠失血球がみられるが、A24,B61にはみられない。
下段に患者のHLAハプロタイプを示す。

6pLOH により *A*02:06-B*55:02-C*01:02-DRB1*09:01* ハプロタイプを欠失した白血球が親子に検出された（図 1）。家系 4 の親子は、HSC 上の自己抗原を CTL に提示する HLA-A0206 の欠失した血球を共有していることから、患者の活性化 T 細胞中に、同じ自己抗原を認識する共通の TCR モチーフが同定される可能性が高いと考えられた。さらに背景にある環境因子や遺伝的素因が近似しているため、TCR 解析や遺伝的解析を行えば、AA の自己抗原や、造血抑制に関与するサイトカインが同定できる可能性が高いと考えられた。

B. HLA-A2 欠失血球を有する家系における TCRα鎖、β鎖のレパトア解析

HLA-A0206 欠失を生じた血球を共有する家系 4 の母娘について治療後の末梢血から CD8 陽性 T 細胞をソーティングし、TCR のα鎖とβ鎖のシークエンスを実施し、共通し特異的な TCR の遺伝子配列を検索した。TCR α鎖では母において TRAV19/TRAJ47 に高いクロナリティが認められた。一方で娘において TRAV38-2/TRAJ23、TRAV21/TRAJ50 の 2 つが高頻度であった（図２）。TCR β鎖では母において TRB20-1/TRBJ2-1 のクローンが 89.8%と突出して認められた。娘においても同じ TRB20-1/TRBJ2-1 が 17.7%と最大頻度のクローンであった（図３）。

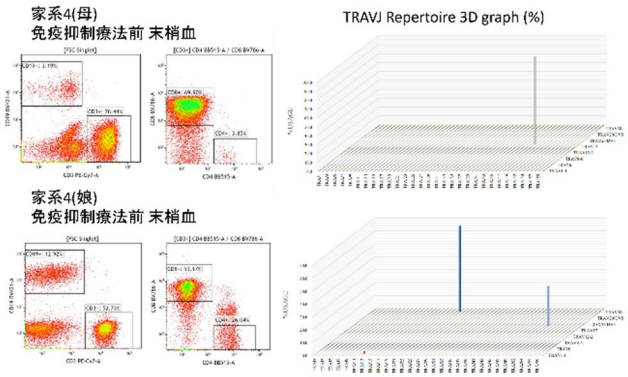

図2: 家系4の母・娘に検出されたTCRα鎖レパトア
TCRα鎖では母においてTRAV19/TRAJ47に高いクロナリティが認められた。一方、娘においてTRAV38-2/TRAJ23、TRAV21/TRAJ50の2つが高頻度であった。

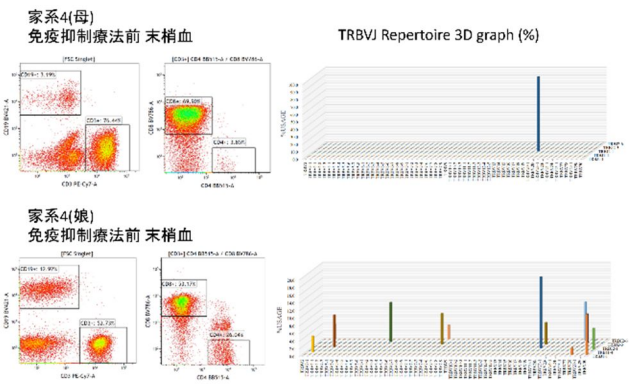

図3: 家系4の母・娘に検出されたTCRβ鎖レパトア
TCRβ鎖では母においてTRB20-1/TRBJ2-1のクローンが89.8%と突出して認められた。娘においても同じTRB20-1/TRBJ2-1が17.7%と最大頻度のクローンであった。

このTCRα鎖とβ鎖のTCRレパトアのCDR3領域と相補的な関係にあるペプチドを推定したところ数種類のペプチドを認め、このうち共通しているものを抽出した。またTCRα鎖、β鎖のレパトアで共通して推定されたペプチドとして1種類のペプチドが認められた（図４）。このペプチドが家系 4 における自己抗原であるかどうかの検証は今後の課題である。

家系4の母と娘で高い頻度認めた
TCRα鎖から推定されるCDR3配列

TRAV	TRAJ	CDR3
TRAV19	TRAJ47	CAQMEYGNKLVF
TRAV21	TRAJ50	CAVMKTSYDKVIF
TRAV38-2/DV8	TRAJ23	CAYNQGGKLIF

3つのCDR3配列より推定される
ペプチドで共通するもの

Epitope	Epitope organism
HLVEELYLVAGEEGC	Homo sapiens
VEALYLVAGEE	**NA**

家系4の母と娘で高い頻度認めた
TCRβ鎖から推定されるCDR3配列

TRBV	TRBJ	CDR3
TRBV20-1	TRBJ2-1	CSAVGKSYNEQFF
TRBV20-1	TRBJ2-1	CSAETGWGEQFF

2つのCDR3配列より推定される
ペプチドで共通するもの

Epitope	Epitope organism
VEALYLVAGGE	**NA**
VDSITAVECFLTPEM	JC polyomavirus
VDSIAEVECFLTPEM	JC polyomavirus

図4: 家系4の母・娘に検出されたTCRα鎖とβ鎖からの抗原の推定
TCRα鎖とβ鎖で高頻度に認められたレパトアから推定されるCDR3のモチーフを上段に示す。下段はCDR3モチーフより推定されるペプチドのうち、共通するものを抽出した。

C. *HLA-DRB1*1502* の連鎖不均衡

DRB1*15:01、DRB1*1502 については日本人の頻度において DQB1*0601、DQB1*0602 との間に強い相関がある。とくに当科にて報告を行った 6 家系中の 5 家系の家系内 AA において DRB1*1501 の保有が認められており、DQA1*0102-DQB1*0602 が連鎖してみとめられることがわかっている。ここにおいても HLA と相補的なペプチドの関連について推定して、自己免疫疾患との関連性のある分子、共通する分子について検索を進めたが、共通する分子の絞り込みはできていない。

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