

平成 30 年 5 月 26 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09512

研究課題名(和文) 再生不良性貧血発症に関わる細胞傷害性T細胞が標的とする自己抗原の同定

研究課題名(英文) Identification of autoantigens recognized by cytotoxic T-cells and responsible for the pathogenesis of aplastic anemia.

研究代表者

赤塚 美樹 (Akatsuka, Yoshiki)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：70333391

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)：再生不良性貧血の2患者において病態への関与が示唆された患者由来のHLA-B*40:02拘束性の細胞傷害性T細胞(CTL)が認識する抗原の同定を試みた。CTLがHLA-B*40:02導入K562を傷害したため、K562よりcDNAライブラリを作成、CTLからのIFNの発現を誘導できるcDNAクローンを単離したところ、1例から樹立したCTLが認識する抗原はOS9で、エピトープは11アミノ酸からなるMAAETLLSLLであった。OS9はERに局在し低酸素ストレスに関わるとされ、病態への関与が推測された。2例目から樹立されたCTLは11万クローンまでアッセイしたが同定に至らず更に検討を進めている。

研究成果の概要(英文)：We attempted to identify antigens recognized by HLA-B*40:02-restricted cytotoxic T lymphocytes (CTLs) that might be related to the pathogenesis of aplastic anemia. Because the CTLs exerted cytotoxic activity on K562 cells transduced with HLA-B*40:02, we prepared cDNA libraries from messenger RNA extracted from K562. After extensive screening, a cDNA clone that stimulated interferon-gamma release from one of the CTLs was found. The cDNA was encoded by OS9 whose protein is known to be located in the endoplasmic reticulum and also involved in the hypoxic stress, implicating the potential involvement in the pathogenesis of aplastic anemia. The minimum epitope sequence was composed of 11 amino acids: MAAETLLSLL. Using the peptide, functional analyses are ongoing. An antigen recognized by another CTL with suppressive function in hematopoietic cells has not been identified, even after screening more than 100,000 cDNA clones.

研究分野：血液免疫学

キーワード：再生不良性貧血 細胞傷害性T細胞 自己抗原

1. 研究開始当初の背景

再生不良性貧血(再不貧)は、造血幹細胞上の HLA 分子に提示される自己抗原ペプチドを認識する細胞傷害性 T 細胞(CTL)が誘導され、造血幹細胞を攻撃することで発症すると考えられている。再不貧の一部の症例では HLA アリルを欠失させて CTL からエスケープし造血が維持されていることが報告され、その感受性 HLA の 1 つは HLA-B*40:02 であった。我々はこの HLA 型を有する再不貧患者から CTL クロンの樹立に成功し、これが造血前駆細胞は傷害するが、成熟した血球細胞は傷害しないことを見いだした。そこでこの CTL が認識している HLA-B*40:02 分子上の抗原ペプチドをコードする遺伝子を同定し、再不貧発症の病態を解明しようと考えたこの CTL は HLA-B*40:02 を遺伝子導入した白血病細胞株である K562 を傷害したため、この細胞の mRNA から cDNA ライブラリを調整し、発現スクリーニング法にて CTL の認識する抗原を同定することとした。抗原ペプチドが決定されれば HLA 分子とのテトラマー試薬を作り、再不貧の診断や治療への反応性のモニタリングなどへの臨床応用も想定された。

2. 研究の目的

まず上述の CTL クロンをプローブとして、CTL が認識する造血前駆細胞に局限して発現している標的抗原遺伝子を同定、エピトープとなっているペプチド配列を決定する。方法としては cDNA ライブラリスクリーニングを用いるが、難航する場合には HLA-B*40:02 分子に結合している全ペプチドを Mass Spectrometry にて同定する方法を開発する。

抗原エピトープが同定できた場合、これを用いて患者末梢血リンパ球を刺激し、造血前駆細胞を傷害するか、またコロニーアッセイやマウスを用いた *in vivo* アッセイで造血が実際に抑制されるかを検討する。

さらに抗原ペプチドを組み込んだ HLA テトラマー試薬を作成し、過去もしくは今後集積する HLA-B*40:02 陽性の患者における病因となる CTL の存在やその動態を解析する。

さらに HLA-B*40:02 以外にも再不貧のリスク HLA アリル型があるため、これらの HLA 拘束性の CTL がないか検索を進め、同様に標的抗原遺伝子の同定を行う。さらに標的抗原の形成に一塩基多型などが関与していないかを検討する。

3. 研究の方法

再不貧患者より樹立した CTL クロンを用いた K562 由来 cDNA ライブラリの発現スクリーニング：まず K562 由来 cDNA ライブラリを HLA-B*40:02 導入 293T 細胞、もしくは HLA-B*40:02 導入 COS 細胞にトランスフェクションし、樹立した CTL クロンの共培養によって産生されるインター

フェロン(IFN-)量を指標に抗原をコードする cDNA クロンを同定する。造血幹細胞に発現する転写因子などが候補遺伝子であるが、転写因子は数 kb に及ぶ長いものが多いため、完全長 cDNA ライブラリの新規作成も実施する。

抗原エピトープの同定は候補 cDNA クロンの deletion mutant を作成し、大まかなエピトープ含有部位のマッピングを行う。絞り込んだ後で、HLA-B*40:02 のアンカームチーフを参考にエピトープ配列を推測する他、WEB で使用可能なエピトープ推測ソフトウェアを利用してエピトープ候補を検索し、人工合成にてペプチドを作成する。並行してその配列をコードするミニ遺伝子を組み込んだ哺乳類発現プラスミドを作成する。これらを HLA-B*40:02 導入 293T/COS 細胞や HLA-B*40:02 陽性者から得た血液細胞に添加もしくは遺伝子導入して CTL クロンの反応性を示すことを最終確認する。

エピトープペプチドが決定されたところで、患者末梢血リンパ球をペプチド添加 K562/HLA-B*40:02 もしくは患者の単球で刺激を繰り返し、CTL クロンの同じ特異性を持った T 細胞株が作成出来るか誘導実験を行う。患者由来の CTL クロンは増殖が悪いため、もしペプチド刺激 T 細胞が大量に調整できれば、超免疫不全 NOG マウスに HLA-B*40:02 陽性の造血幹細胞(健常人の骨髓移植ドナー由来もしくは臍帯血由来)を生着させた後に上記 T 細胞株を輸注し、再不貧と同じような病態が再現できるか検討する。

さらに決定されたエピトープを人工合成し HLA-B*40:02 分子に 2 ミクログロブリンとともに組み込んでテトラマー試薬を作成する。これは抗原エピトープを認識する T 細胞に特異的に反応するので、再不貧の経過中に治療や病状に伴い、病因となった T 細胞がどのように変動するかの動態解析に応用する。

なお、HLA-B*40:02 が最も再不貧のリスク HLA アリルと考えられているが、HLA-A*02:01, A*02:06, A*31:01 もリスクアリルと報告されているので、これらの HLA アリルを有する再不貧患者からも CTL の誘導を試みる。方法としては B*40:02 拘束性 CTL を樹立した際と同様に、これら HLA アリルをコードする cDNA を K562 に遺伝子導入し、CTL の刺激細胞とする。

4. 研究成果

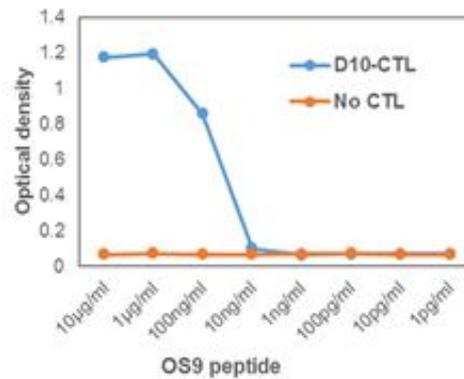
(1) cDNA ライブラリを用いた発現スクリーニングの条件の設定：まず増殖の良好な HLA-B*40:02 導入 293T 細胞を cDNA ライブラリ発現細胞としたが、非特異的な CTL 刺激によるバックグラウンドの IFN- の産生があり、増殖の遅い HLA-B*40:02 導入 COS 細胞をその後の実験で使うこととした。96 穴プレートを用いてアッセイを行ったが、

1 ウェルあたり 100 クローンの cDNA プールとしたが、10 万クローンのスクリーニングを行うために必要な CTL 数を算定した。その結果、白血病から再不貧を発症した 2 例目から樹立した CTL クローン (B10-CTL) は十分なストックが確保出来たためこちらを優先してアッセイを進めることとした。

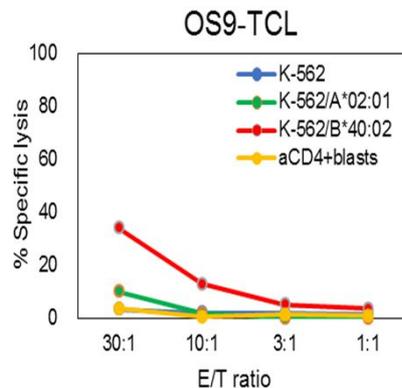
他方、免疫抑制療法後に長期生存している再不貧患者から得られた CTL クローン (A6-CTL) は機能解析が進んでおり重要なプローブとなり得たが増殖が不十分であった。この特異性を担保したまま増殖できる T 細胞株の作成を試みた。A6-CTL の RNA より cDNA を合成し、5'RACE にて T 細胞受容体 (TCR) の 鎖、鎖の全長を得た。これらを 2A 配列を介してタンデムに繋ぎ、レトロウイルスベクターに組み込んだ。ウイルス上清を CD8 導入・内在性 TCR⁻ 欠損 Jurkat T 細胞株に感染させた。TCR の発現は CD3 分子の陽性化で確認した。さらにこれに NFAT プロモーター下に IFN⁻ cDNA をコードしたプラスミドを導入し、TCR からのシグナルで IFN⁻ を産生できるように改変した。IFN⁻ の産生量は最大 30pg/mL 程度で、ELISA で検出可能なレンジであったが、感度は抗原量が低いと偽陰性になるリスクがあった (第 8 回血液疾患免疫療法学会学術集会で発表済)。このため、HLA-B*40:02 を有しない健常人の末梢血 CD8 陽性 T 細胞に A6-TCR の TCR を遺伝子導入したところ、十分な IFN⁻ の産生が得られるようになった。本 T 細胞株を用いた cDNA ライブラリの発現スクリーニングは進行中である。

(2) 抗原遺伝子の同定とエピートープペプチド配列の決定：上記のごとく B10-CTL が認識する抗原遺伝子の同定を先に実施した。cDNA ライブラリの発現スクリーニング中に最初に IFN⁻ 産生が認められた 1 ウェルの cDNA のサブライブラリ (5 クローン/ウェル) の IFN⁻ 陽性ウェルで共通に存在した ATP synthetase 6.2 が候補に浮上し、deletion mutant を作成して検討を行ったがエピートープは同定できなかった。このためさらにサブライブラリに別の候補 cDNA がないか検討したところ、osteosarcoma amplified 9, endoplasmic reticulum lectin (OS9), variant X3 が共通で存在していたため、同様にエピートープのマッピングを実施した。まず cDNA のミニ遺伝子を PCR 増幅にて作成し領域を絞り込んだ。Open reading frame は 1797bp であり、開始コドンから 221bp を最短とし、約 200bp ずつ長さを伸ばした OS9 のミニ遺伝子を合計で 9 種類作成し、COS/HLA-B*40:02 に遺伝子導入、B10-CTL と共培養し産生された IFN⁻ の測定を行った。その結果、全長 cDNA 含め 9 種類のミニ遺伝子導入細胞が全て認識され、エピートープは最初の 221bp 内にあると推定された。HLA-B*40:02 分子への結合ペプチド

配列を予測するアルゴリズムでは開始コドンから 11-mer の配列が上位の結合モチーフとして推定されたためこれをコードするミニ遺伝子を作成し同様にアッセイをしたところ B10-CTL からの IFN⁻ 産生が確認された。10 倍希釈を段階的に行った OS9₁₋₁₁ ペプチドをパルスした HLA-B*40:02 発現 K562 は 100ng/ml の濃度から B10-CTL で認識されたためエピートープ OS9₁₋₁₁ : MAAETLLSSLL と決定した (下図)。



(3) 抗原ペプチドを用いた抗原特異的 T 細胞株の誘導：次いで患者の体内にこの OS9₁₋₁₁ ペプチドを認識する CTL が実際に存在するかを検討した。OS9₁₋₁₁ ペプチドをパルスした患者樹状細胞 (2, 3 回目はマイトマイシン処理を行った自己活性化 T 細胞芽球) を用いて患者の末梢血 T 細胞を刺激したところ、3 回刺激後に急激な T 細胞の増殖を認めしたが、ELISA アッセイにおいて OS9₁₋₁₁ 抗原を提示する細胞に対して IFN⁻ 産生を示さなかった。これに対して再不貧の病態の場となっている患者の骨髄から採取した単核細胞 (T 細胞や骨髄球、単球等を含む) を OS9₁₋₁₁ ペプチド単独で刺激後、ペプチドパルス自己活性化 CD4⁺ T 細胞芽球で 2 回刺激後に得られた T 細胞株 (TCL) は、オリジナルの B10-CTL よりも弱いながら HLA-B*40:02 拘束性に K562 細胞を傷害できた。以上より、患者の骨髄には OS1-11 抗原を認識する CTL が存在し、病態を形成していた可能性が高いと考えられた (下図)。



(4) 患者 iPS 細胞より分化誘導した CD34 陽性造血幹細胞への反応性: A6-CTL の TCR 遺伝子導入正常 CD8 陽性 T 細胞株は、この CTL が樹立された患者の末梢白血球由来 iPS から誘導した CD34 陽性造血幹細胞と弱いながら反応した。これに対して、B10-CTL クローンはこの CD34 陽性造血幹細胞と反応しなかった。

<考察とまとめ>

今回同定された OS9 がコードする蛋白質は粗面小胞体 (ER) に局在し、低酸素下で誘導される HIF-1 に結合し、ER ストレスに関わるとの報告がある。また肉腫やその他の腫瘍で増幅が認められるとすると報告があるが、基本的に発現はユビキタスとされている。再不貧患者の骨髄で OS9 が過剰発現しているという報告は見当たらず、現在のところ病因との関係は不明である。

他方、B10-CTL より造血幹細胞抑制機能の解析が進んでいる A6-CTL は自己の iPS から誘導した CD34 陽性造血幹細胞を認識することが確認されており、より再不貧の病態に関わると推定されるので、今後も継続して抗原遺伝子の同定を続ける計画である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Espinoza JL, Elbadry MI, Chonabayashi K, Yoshida Y, Katagiri T, Harada K, Nakagawa N, Zaimoku Y, Imi T, Hassanein HA, Khalifa A Noreldin A, 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.* 2018; 2: 390-400. 査読有、doi: 10.1182/bloodadvances.2017013342.

Harada Y, Nishiwaki S, Sugimoto T, Onodera K, Goto T, Sato T, Kamoshita S, Kawashima N, Seto A, Okuno S, Yamamoto S, Iwasaki T, Ozawa Y, Miyamura K, Akatsuka Y, Sugiura I. Successful treatment with allogeneic stem cell transplantation followed by DLI and TKIs for e6a2 BCR-ABL-positive acute myeloid leukaemia: A case report and literature review. *Medicine (Baltimore).* 2017; 96: e9160. 査読有、doi: 10.1097/MD.00000000000009160.

Tawara I, Kageyama S, Miyahara Y, Fujiwara H, Nishida T, Akatsuka Y, Ikeda H, Tanimoto K, Terakura S, Murata M, Inaguma Y, Masuya M,

Inoue N, Kidokoro T, Okamoto S, Tomura D, Chono H, Nukaya I, Mineno J, Naoe T, Emi N, Yasukawa M, Katayama N, Shiku H. Safety and persistence of WT1-specific T-cell receptor gene-transduced lymphocytes in patients with AML and MDS. *Blood.* 2017; 130: 1985-1994. 査読有、doi: 10.1182/blood-2017-06-791202.

Inaguma Y, Akatsuka Y, Hosokawa K, Maruyama H, Okamoto A, Katagiri T, Shiraishi K, Murayama Y, Tsuzuki-Iba S, Mizutani Y, Nishii C, Yamamoto N, Demachi-Okamura A, Kuzushima K, Ogawa S, Emi N, Nakao S. Induction of HLA-B*40:02-restricted T cells possessing cytotoxic and suppressive functions against haematopoietic progenitor cells from a patient with severe aplastic anaemia. *Br J Haematol.* 2016; 172: 131-4. 査読有、doi: 10.1111/bjh.13464.

[学会発表](計 5 件)

稲熊容子、細川晃平、赤塚美樹、岡本晃直、片桐孝和、葛島清隆、中尾眞二、恵美宣彦. 再生不良性貧血患者の造血前駆細胞を HLA-B*40:02 拘束性に抑制する細胞傷害性 T 細胞の単離と機能解析. 第 7 回血液疾患免疫療法研究会学術集会. 2015 年 9 月 26 日、東京.

赤塚美樹、白石圭子、楯屋良子、岡村文子、太田里永子、藤原 弘、葛島清隆、恵美宣彦. 遺伝子導入 TCR/CAR への刺激でインターフェロン を産生する人工 T 細胞株の作成. 第 8 回血液疾患免疫療法学会. ポスター. 2016 年 9 月 3 日、北海道大学医学部学友会館「フラテ」(札幌市) 岡村文子、赤塚美樹、葛島清隆.

がん細胞では異常な TAP 分子によりエピトープを提示する. 第 8 回血液疾患免疫療法学会. 口演. 2016 年 9 月 3 日、北海道大学医学部学友会館「フラテ」(札幌市)

赤塚美樹、岡本晃直、岡村文子、楯屋良子、稲熊容子、白石圭子、葛島清隆、恵美宣彦. 再生不良性貧血発症に関わる抗原遺伝子同定の試み. 第 9 回血液疾患免疫療法学会、2017 年 9 月 30 日(東京)

鎧高健志、丸山裕之、Luis Espinoza、Nguyenthi Maianh、佐治博夫、赤塚美樹、中尾眞二. 再生不良性貧血患者の KIR リガンド欠失自己造血幹細胞に対する NK 細胞の寛容. 第 79 回日本血液学会総会、2017 年 10 月 21 日、東京.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

該当なし

取得状況(計 0 件)
該当なし

[その他]
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

赤塚 美樹 (AKATSUKA, Yoshiki)
藤田保健衛生大学医学部・血液内科・教授
研究者番号：70333391

(2)研究分担者

葛島 清隆 (KUZUSHIMA, Kiyotaka)
愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍免疫
学部・部長
研究者番号：30311442

(3)連携研究者

中尾 眞二 (NAKAO, Shiji)
金沢大学医薬保健研究域医学系・細胞移植
学・教授
研究者番号：70217660

(4)研究協力者

該当なし