

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17823

研究課題名(和文) HLA-B*54:01陽性造血不全患者における免疫病態の解明

研究課題名(英文) Understanding the immune pathophysiology in bone marrow failure patients with HLA-B*54:01

研究代表者

細川 晃平 (Hosokawa, Kohei)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：10786239

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)：本研究では、HLA-B5401欠失血球陽性の再生不良性貧血(再不貧)の免疫病態と、HLA-B5401が提示する自己抗原を明らかにすることを目的とした。HLA-B5401欠失血球陽性の再不貧患者から、抗原特異的に優勢に増殖しているT細胞レセプター(T-cell receptor: TCR)の配列を同定した。また、再不貧患者のHLA-Aアレル、Bアレルに共通してみられるexon1領域のミスセンス変異を同定し、この変異を高感度で検出できるdroplet digital PCRを開発した。HLA-Bアレルにおいて、HLA-B5401の変異はHLA-B4002について2番目に多いことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HLA-B*54:01を保有する再不貧例において、6pLOHを有する症例の頻度が高かったことや、HLA-B*54:01に体細胞変異を有する症例が認められたことから、HLA-B5401は造血幹細胞におけるT細胞への自己抗原提示に重要な役割をしている可能性が示唆された。HLA-B5401欠失血球を認める症例は高率に男性であり、アンドロゲン受容体(AR)のCAGリピート数が短縮していた。このため、ARがHLA-B5401欠失血球陽性例の再不貧発症に関与しており、男性に偏って発症する理由となっている可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the study is to understand pathophysiology in aplastic anemia (AA) patients with HLA-B*54:01 lacking cells and autoantigens presented by HLA-B5401. We identified T-cell receptor sequence in AA patients with HLA-B5401 lacking cells. We also identified a common nonsense mutation in exon 1 of different HLA-A and -B alleles in HLA-lacking granulocytes from AA patients. A droplet digital PCR (ddPCR) assay revealed that HLA-B*54:01 mutation was the second most frequent HLA-B allele in AA patients.

研究分野：血液内科学

キーワード：再生不良性貧血 HLA iPS細胞 造血不全 免疫学

1. 研究開始当初の背景

再生不良性貧血(再不貧)は血液中の白血球、赤血球、血小板のすべてが減少する汎血球減少症である。再不貧では、血液を産生する骨髄組織は多くの場合脂肪に置き換わっており、血球が十分作られなくなっている。大部分は後天性再生不良性貧血で、そのうち 90%以上が原因不明の特発性再不貧である。特発性再不貧の約 70%は、抗胸腺細胞グロブリンやシクロスポリンなどの免疫抑制療法によって改善することから、自己免疫的な機序によって造血幹細胞が傷害される結果発症すると考えられている。造血幹細胞移植によって再不貧が治癒するという事実は、再不貧が造血支持組織ではなく、造血幹細胞・免疫細胞の異常によって起こる疾患であることを示している。これまでに、再不貧の約 13%において、第 6 染色体短腕の片親性ダイソミーにより一側の HLA ハプロタイプを欠失した loss of heterozygosity 血球 (6pLOH 血球) が検出されることを世界で初めて明らかにした。この 6pLOH 白血球は、HLA を欠失させた HSPC が CTL からの攻撃を免れて産生することから、再不貧が CTL によって発症することを示すもっとも強い証拠と考えられる。

6pLOH によって欠失するハプロタイプにもっとも高頻度に含まれる HLA-B*40:02 に着目し、このアレルを持つ再不貧患者を詳細に検討したところ、全体の 75%が B4002 欠失血球を保有しており、その 80%に、B*40:02 の機能喪失型変異による B4002 単独欠失血球が検出されることを見出した。さらに、HLA-B*40:02 を保有しない患者においては、6pLOH を有する患者で最も高頻度に認められたのは HLA-B*54:01 であった。この HLA-B*5401 については、びまん性汎細気管支炎との相関が日本人において報告されているが、その他の炎症性疾患との関係は知られていない。

2. 研究の目的

本研究では、HLA-B5401 欠失血球陽性の再不貧の免疫病態と、HLA-B5401 が提示する再不貧の自己抗原を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1. HLA-B*5401 保有例における 6pLOH 陽性例の頻度を同定する。

2. HLA-B5401 単独欠失例の有無をフローサイトメトリーや deep sequence で検討する。

3. 正常細胞、6pLOH、HLA-B*5401 変異細胞から有する症例から iPS 細胞を樹立し、それぞれから誘導した造血幹細胞の造血再構築能を免疫不全マウスの移植モデルで検討する。

4. HLA-B*5401 欠失血球陽性例の患者骨髄で増殖している CD8⁺CD137⁺T 細胞の T 細胞受容体 (TCR) リガンド (自己抗原候補) を同定する。

4. 研究成果

HLA-B*40:02 を除く再不貧例において、最も HLA 欠失の頻度が高い HLA クラス I アレルは HLA-B*54:01 であった。

6pLOH により HLA-B5401 を欠失した再不貧例は高率に男性であり、そのうち一例では HLA-B*54:01 の機能喪失型変異による HLA-B5401 単独欠白血球を認めた。

その症例から正常細胞、6pLOH 細胞、HLA-B*54:01 変異細胞由来の単球から作成した iPS 細胞由来 HSC は BRGS マウスにおいて同等に造血を再構築した。(Elbadry, Hosokawa, et al. 2019, Haematologica)

アンドロゲン受容体遺伝子 (AR) の CAG repeat 数の短縮は AR の高発現と関連している。HLA-B*54:01 を保有する再不貧例では、男性に多い疾患である強直性脊椎炎と同様に repeat 数が短縮していた。

HLA-B5401 欠失血球陽性の AA 患者から、抗原特異的に優勢に増殖している T 細胞レセプター (T-cell receptor: TCR) の配列を同定した。そのうち特定の TCR を導入した T 細胞トランスフェクタントは、同一患者由来の iPS 細胞から誘導した野生型の造血幹細胞を傷害するが、HLA-B5401 の発現が低下した iPS 細胞由来の造血幹細胞を傷害しにくいことを確認した。(Hosokawa, et al 2019 ASH meeting) 現在、これらの TCR が反応する cDNA クローンを同定するための検証実験を続けている。

一方、再不貧患者の HLA-A アレル、B アレルに共通してみられる exon1 領域のミスセンス変異を同定し、この変異を高感度で検出できる droplet digital PCR を開発した。この技術を用いて AA における共通変異の頻度を検討したところ、HLA-B アレルにおいて、HLA-B*54:01 の変異は HLA-B*40:02 について 2 番目に多いことが明らかになった。(Mizumaki, Hosokawa, et al. Haematologica 2020)

HLA-B*54:01 を保有する再不貧例において、6pLOH を有する症例の頻度が高かったことや、HLA-B*54:01 に体細胞変異を有する症例が認められたことから、HLA-B5401 は造血幹細胞における T

細胞への自己抗原提示に重要な役割をしている可能性が示唆された。HLA-B5401 欠失血球を認める症例は高率に男性であり、AR の CAG repeat 数が短縮していた。このため、AR が HLA-B5401 欠失血球陽性例の再不貧発症に関与している可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hosokawa K, Nakao S	4. 巻 60(5)
2. 論文標題 Acquired aplastic anemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Rinsho Ketsueki	6. 最初と最後の頁 417-422
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11406/rinketsu.60.417	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 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(11)
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 2732-2766
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 -
1. 著者名 Elbadry Mahmoud I., Mizumaki Hiroki, Hosokawa Kohei, Espinoza J. Luis, Nakagawa Noriharu, Chonabayashi Kazuhisa, Yoshida Yoshinori, Katagiri Takamasa, Hosomichi Kazuyoshi, Zaimoku Yoshitaka, Imi Tatsuya, Nguyen Mai Anh Thi, Fujii Youichi, Tajima Atsushi, Ogawa Seishi, Takenaka Katsuto, Akashi Koichi, Nakao Shinji	4. 巻 104
2. 論文標題 Escape hematopoiesis by HLA-B5401-lacking hematopoietic stem progenitor cells in men with acquired aplastic anemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 e447 ~ e450
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3324/haematol.2018.210856	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 Nguyen MAT, Hosokawa K, Yoroidaka T, Maruyama H, Espinoza JL, Elbadry MI, Mohiuddin M, Tanabe M, Katagiri T, Nakagawa N, Chonabayashi K, Yoshida Y, Arima N, Kashiwase K, Saji H, Ogawa S, Nakao S	4. 巻 4
2. 論文標題 Resistance of KIR Ligand?Missing Leukocytes to NK Cells In Vivo in Patients with Acquired Aplastic Anemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ImmunoHorizons	6. 最初と最後の頁 430 ~ 441
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/immunohorizons.2000046	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 Hosokawa K, Yamazaki H, Tanabe M, Imi T, Sugimori N, Nakao S	4. 巻 35
2. 論文標題 High-dose romiplostim accelerates hematologic recovery in patients with aplastic anemia refractory to eltrombopag	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 906 ~ 909
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-020-0950-6	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 D, Elbadry MI, 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 2020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 Hosokawa K, Mizumaki H, Yoroidaka T, Maruyama H, Imi T, Tsuji N, Urushihara R, Tanabe M, Zaimoku Y, Nguyen MAT, Tran D, Ishiyama K, Yamazaki H, Katagiri T, Takamatsu H, Hosomichi K, Tajima A, Azuma F, Ogawa S, Nakao S	4. 巻 -
2. 論文標題 HLA class I allele-lacking leukocytes predict rare clonal evolution to MDS/AML in patients with acquired aplastic anemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2020010586	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 Yoroidaka T, Hosokawa K, Imi T, Mizumaki H, Katagiri T, Ishiyama K, Yamazaki H, Azuma F, Nanya Y, Ogawa S, Nakao S	4. 巻 -
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 -
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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Kohei Hosokawa, Eiji Kobayashi, Yoshiki Akatsuka, Luis Espinoza, Noriharu Nakagawa, Tanabe Mikoto, Noriaki Tsuji, Takeshi Yoroidaka, Hiroki Mizumaki, Thi Mai Anh Nguyen, Takamasa Katagiri, Kiyomi Shitaoka, Hiroshi Hamana, Hiroyuki Kishi, Shinji Nakao
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 2019 ASH annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroki Mizumaki, Kazuyoshi Hosomichi, Tatsuya Imi, Noriaki Tsuji, Tanabe Mikoto, Dung Cao Tran, Mai Anh Thi Nguyen, Yoshitaka Zaimoku, Kohei Hosokawa, Takamasa Katagiri, Fumihiko Azuma, Atsushi Tajima, Shinji Nakao
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 2019 ASH annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Noriaki Tsuji, Kohei Hosokawa, Takeshi Yoroidaka, Tanabe Mikoto, Hiroki Mizumaki, Shinji Nakao
2. 発表標題 Distinct Escape Mechanisms of HLA Class I Allele-Lacking Hematopoietic Stem Progenitor Cells (HSPCs) from GPI-Deficient HSPCs in Acquired Aplastic Anemia
3. 学会等名 2019 ASH annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tanabe Mikoto, Mai Anh Thi Nguyen, Kohei Hosokawa, Noriharu Nakagawa, Luis Espinoza, Hirohito Yamazaki, Shinji Nakao
2. 発表標題 A GPI-Anchored Protein, CD109, Protects Hematopoietic Progenitor Cells from Erythroid Differentiation Induced By TGF-
3. 学会等名 2019 ASH annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	Mai Anh Thi Nguyen, Kohei Hosokawa, Tanabe Mikoto, Md Mohiuddin, Takeshi Yoroidaka, Hiroki Mizumaki, Tatsuya Imi, Masaya Ueno, Atsushi Hirao, Shinji Nakao
2. 発表標題	Olfactomedin 4 Inhibits Erythroid Differentiation of Leukemic Cell Lines Induced By TGF-β : A Model of Preferential Commitment of Del(13q) Hematopoietic Stem Cells in Immune-Mediated Bone Marrow Failure
3. 学会等名	2019 ASH annual meeting (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Kohei Hosokawa, Hiroki Mizumaki, Takeshi Yoroidaka, Hiroyuki Maruyama, Tatsuya Imi, Noriaki Tsuji, Ryota Urushihara, Mikoto Tanabe, Yoshitaka Zaimoku, Mai Anh Nguyen, Dung Tran, Ken Ishiyama, Hirohito Yamazaki, Takamasa Katagiri, Kazuyoshi Hosomichi, Atsushi Tajima, Fumihiro Azuma, Seishi Ogawa, Shinji Nakao
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 Secondary Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia in Patients with Acquired Aplastic Anemia
3. 学会等名	2020 ASH annual meeting (国際学会)
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	Kohei Hosokawa, Hirohito Yamazaki, Mikoto Tanabe, Tatsuya Imi, Keiji Aoshima, Naomi Sugimori, Shinji Nakao
2. 発表標題	High-dose romiplostim accelerates hematologic recovery in patients with aplastic anemia refractory to eltrombopag.
3. 学会等名	25th Congress of European Hematology Association (国際学会)
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	Noriaki Tsuji, Kohei Hosokawa, Ryota Urushihara, Mikoto Tanabe, Hiroyuki Takamatsu, Ken Ishiyama, Hirohito Yamazaki, Shinji Nakao
2. 発表標題	Epigenetic Loss of the HLA-DR15 Expression on Hematopoietic Stem Progenitor Cells in Patients with Acquired Aplastic Anemia Characterized By Cyclosporine Dependency: A Novel Mechanism Underlying the Immune Escape of Hematopoietic Stem Progenitor Cells
3. 学会等名	2020 ASH annual meeting (国際学会)
4. 発表年	2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 HLAクラスIアレルにおける機能喪失型共通変異の検出方法	発明者 水牧裕希、中尾眞 二、細川晃平	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-090219	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------