

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17841

研究課題名(和文)慢性GVHDの発症機構—同種抗原/MHCクラスII複合体形成機序とCMVの関与

研究課題名(英文)DBY/HLA class II complex formation on the vascular endothelium leads to cGVHD in female-to-male HSCT

研究代表者

森田 薫 (Morita, Kaoru)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：20813223

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)：慢性GVHDの重要なリスク因子として、女性ドナーから男性患者への異性間移植があげられ、Y染色体上のDBYに対する抗体が病態に寄与することが報告されている。しかし、DBYは精巣に発現する細胞内蛋白であり、慢性GVHDの標的組織でどのように発現するかは不明である。本研究ではDBYがペプチドに分解されることなくHLA class IIによって血管内皮上に運ばれることで、抗体の標的になることを明らかにした。またDBYと結合性が高いHLA class IIアレルは発症リスク因子であった。以上より、血管内皮上のDBY/HLA class II複合体は慢性GVHDの疾患形成に重要である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

適切なマウスモデルがないこともあり、慢性GVHDの病態は不明な点が多く、新規薬剤でも寛解に達する人はほとんどいないのが現状である。本研究では慢性GVHDの初期の標的細胞を同定するために同種抗体に着目し、血管内皮細胞が重要な標的の一つであることを明らかにした。異常な同種・自己抗体の出現は異性間移植以外にも報告されており、本研究の成果は、今後の慢性GVHD全体の病態理解につながると確信する。

研究成果の概要(英文)：Development of effective treatments for cGVHD has been hindered by the complexities of its pathogenesis. Among several risk factors, the presence of allogeneic antibodies against DBY encoded on Y chromosome is well described and associated with NRM in female-to-male transplants. However, DBY is expressed exclusively in testis, and how DBY is emerged on the surface of the target organs remains unknown. Here we report that DBY/HLA class II complex formation on the vascular endothelium directly contribute to the pathogenesis. Full-length DBY is transported to the cell surface only via association with HLA class II. The seropositivity of IgG against this complex was significantly associated with cGVHD development. Moreover, DBY specifically colocalized with HLA class II on the dermal vascular endothelial cells in cGVHD. Finally, we revealed that the efficacy of DBY presentation by each HLA-DR allele was correlated with that allele on susceptibility to cGVHD using nationwide registry data.

研究分野：慢性GVHD

キーワード：慢性GVHD DBY HLA class II ネオセルフ 同種抗体

1. 研究開始当初の背景

同種造血幹細胞移植は造血器腫瘍に対する最も強力な治療法である。しかし、移植片対宿主病 (Graft Versus Host Disease: GVHD) や感染症などの重篤な合併症により命を落とす危険性があり、一部の患者にしか適応にならない現状がある。GVHD はドナー由来の免疫細胞が宿主を異物と見なすことによって生じる病態であり、移植後 100 日を境にして急性 GVHD と慢性 GVHD に大別される。慢性 GVHD は同種造血幹細胞移植を行なった患者のうち約 30-70% に発症するが、今後 HLA 不適合移植が増加するのに伴い、発症率の増加が懸念される。慢性 GVHD は有効な治療法に限られ、新規治療法の開発が強く求められており、そのためには病態解明が不可欠である。

慢性 GVHD のリスク因子として、HLA 不適合/異性間/非血縁者間移植、急性 GVHD、高齢ドナーなどが知られている(文献 1)。その中で女性ドナーから男性レシピエントへの異性間移植は慢性 GVHD に対する強力なリスク因子であり、Y 染色体の抗原(H-Y 抗原)に対する同種抗体(H-Y 抗体)が発症機序に強く関与していることが報告されている。移植後 3 ヶ月での H-Y 抗体の有無はその後の慢性 GVHD の発症率だけでなく、非再発死亡率、重症度にも相関する(文献 2)。さらに、H-Y 抗原の一部は男性の白血病細胞にも発現しており、移植後に H-Y 抗体が陽性になると再発率が低下することより、H-Y 抗体は移植片対白血病(Graft Versus Leukemia: GVL)効果にも寄与することが想定される(文献 3,4)。

H-Y 抗原は副組織適合抗原であり、通常はペプチドに断片化された形で HLA に結合し、細胞表面に出現し、T 細胞受容体との結合を介して H-Y 抗原特異的 T 細胞を活性化させる。しかし、H-Y 抗体産生 B 細胞の標的となる H-Y 抗原がどのように生じるかは不明である。H-Y 抗体が認識する H-Y 抗原のエピトープは、HLA に提示されるペプチド領域とは異なる。また、H-Y 抗原の多くは精巣を主体に発現しており、慢性 GVHD の標的組織のどの細胞に異所性に出現するかはわかっていない。

最近、関節リウマチを含めた複数の自己免疫疾患において、ミスフォールドタンパク質がペプチドに分解されることなく、疾患感受性 HLA class II アレルによって細胞表面に運ばれ、ネオセルフとして自己抗体の標的並びに自己抗体産生 B 細胞を誘導する新たな機序が報告された(文献 5,6)。慢性 GVHD は自己免疫疾患様の症状を呈することが特徴であり、H-Y 抗原は HLA class II との結合部位を有している点より、私たちは H-Y 抗原も同様の機序で細胞膜上に発現し、H-Y 抗体産生に関与していると仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、慢性 GVHD の治療開発を最終目標として、同種抗原(H-Y 抗原)の発現機構の解明に焦点を当て、(1) H-Y 蛋白質/HLA class II 複合体の形成、(2) H-Y 蛋白質/HLA class II 複合体に対する抗体と慢性 GVHD 発症リスクの関連、(3) H-Y 蛋白質/HLA class II 複合体形成に関与する HLA class II アレルと慢性 GVHD の発症リスク、(4) H-Y 蛋白質/HLA class II 複合体の発現細胞、について解析を行う。この研究により慢性 GVHD の標的細胞を明らかにすることができれば、その細胞の制御を介した慢性 GVHD の新たな治療戦略の開発に繋がる。

3. 研究の方法

(1) H-Y 蛋白質/HLA class II 複合体形成の分析

H-Y 蛋白質全体が HLA class II と複合体を形成するかを検証するために、ヒト細胞株(293T 細胞)に H-Y 抗原として代表的な DBY 蛋白質と HLA class II の遺伝子を導入し、フローサイトメトリー、免疫沈降法などにより、DBY/HLA class II 複合体の細胞上の発現を解析した。また、DBY 蛋白質の N 末端に Flag タグ、C 末端に Myc タグを付加し、タグ抗体を用いて蛋白質を検出することで、DBY 蛋白質全体が HLA class II と複合体を形成することを確認した。

(2) H-Y 蛋白質/HLA class II 複合体に対する同種抗体と発症リスクの分析

DBY/HLA class II 複合体を認識する抗体の出現が慢性 GVHD の発症を予測するかどうか検証した。移植後 3 ヶ月の患者血漿中に、上記で遺伝子導入した細胞株上の DBY/HLA class II 複合体に結合する抗体が含まれるかどうかフローサイトメトリーにて解析した。次に、複合体に対する抗体の有無がその後の慢性 GVHD の発症を予測するかどうか解析した。

(3) H-Y 蛋白質/HLA class II 複合体形成に関与する HLA class II アレルの分析

H-Y 蛋白質/HLA class II 複合体形成が HLA class II アレルに依存するかどうか、日本人に頻度の高い 22 個の HLA-DRB1 アレルと H-Y 蛋白質との複合体形成についてフローサイトメトリーについて解析した。次に、複合体に対する抗体の結合性と HLA-DRB1 アレルについても解析を行なった。

(4) 異性間移植において慢性 GVHD の発症リスクに關与する HLA class II アレルの分析

日本造血細胞移植学会が実施する全国規模の TRUMP(造血細胞移植登録一元管理プログラム) データベースを用いて、女性ドナーから男性レシピエントへの HLA 適合血縁者間造血幹細胞移植において、慢性 GVHD の発症に關与する HLA class II アレルを同定した。次に、これらの疾患感受性 HLA class II アレルが(3)で明らかになった HLA class II アレルと一致するかどうか解析した。

(5) 慢性 GVHD における H-Y 蛋白質/HLA class II 複合体を形成する細胞の同定

女性ドナーから男性レシピエントへの造血幹細胞移植後に慢性 GVHD による皮膚炎を發症した患者に対して、インフォームドコンセントを取得した後に、皮膚生検を実施した。次に、生検検体において H-Y 蛋白質と HLA class II 複合体が共局在しているかどうかを免疫染色 (PLA: Proximity Ligation Assay) にて検証した。

4. 研究成果

(1) H-Y 蛋白質/HLA class II 複合体形成の分析

DBY はペプチドとして HLA-DRB1*15:01、HLA-DQB1*05:01 に結合することが報告されているため、まずそれらの HLA-class II アレルを DBY と共に 293T 細胞にトランスフェクションし、解析を行なった。その結果、DBY は単独では細胞表面に出現しないが、HLA class II を遺伝子導入することで細胞表面に出現することがフローサイトメトリーにて明らかとなった(Figure. 1A,B)。次に DBY、HLA-class II に対する抗体でそれぞれ免疫沈降を行い、DBY が全長で HLA と結合しているかを解析した。DBY には N 末端に FLAG タグ、C 末端に Myc タグを付与した。DBY、HLA class II を共にトランスフェクションした細胞に対して HLA-DR に対する抗体で免疫沈降させた場合、両方のタグが検出された(Figure. 1C,D)。このことより、DBY はペプチドに断片されることなく、全長で HLA class II と結合していることが判明した。さらに、DBY の Myc タグに対する抗体と HLA class II に対する抗体を用いた PLA 法でも同様の結果が得られ、DBY は HLA class II によって全長のまま細胞膜上に提示されることが明らかとなった。

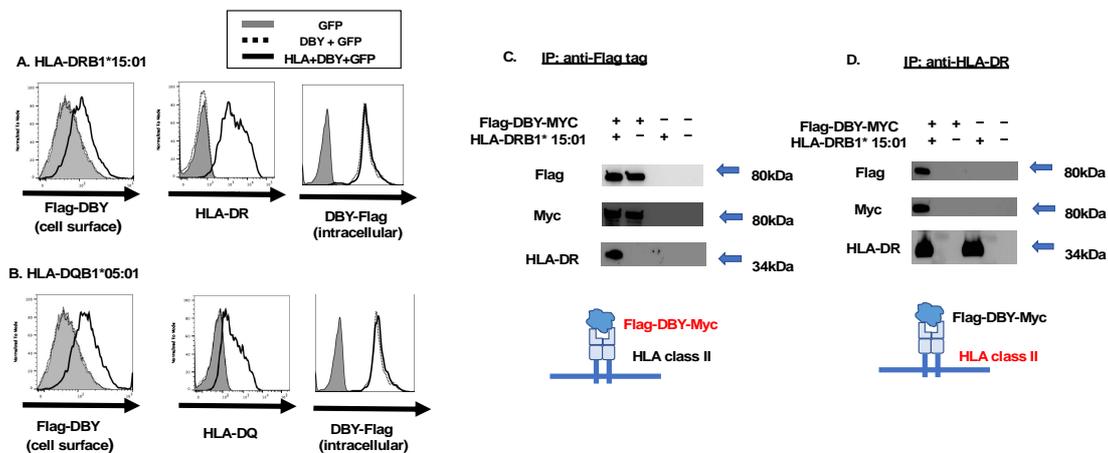


Fig.1 DBY/HLA class II複合体形成の分析

(2) H-Y 蛋白質/HLA class II 複合体に対する同種抗体と発症リスクの分析

H-Y 蛋白質/HLA class II 複合体に対する抗体が、既報の H-Y 抗体と同様に慢性 GVHD の発症リスクとなるかどうか、同種移植後の患者血漿を用いて解析した。女性ドナーから男性レシピエントに対する同種移植において、移植後 3 ヶ月で DBY/HLA class II 複合体に対する抗体を有する患者と有しない患者で慢性 GVHD の発症率が異なるか Fine&Gray モデルにて解析した。その結果、DBY/HLA class II 複合体に対する抗体を有する患者で有意に慢性 GVHD の発症率が高かった(Figure.2)。また DBY/HLA class II 複合体に対する抗体と DBY のみを認識する抗体では移植患者間で陽性率が異なり、DBY/HLA class II 複合体に対する抗体は単に DBY のみを認識する抗体ではないと考えられた。

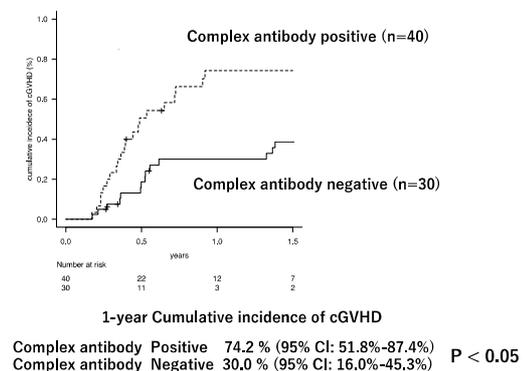
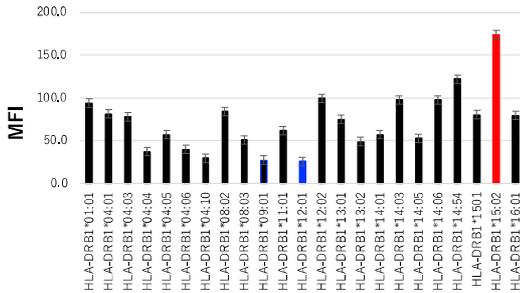


Fig.2 DBY/HLA class II 複合体に対する抗体と慢性GVHD発症リスクの分析

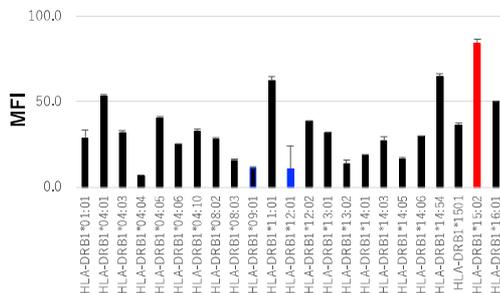
(3) H-Y 蛋白質/HLA class II 複合体形成に関する HLA class II アレルの分析

(1)(2)より DBY は HLA class II と全長で結合して複合体を形成すること、その複合体に対する抗体の存在は慢性 GVHD の発症予測となることがわかった。次に、この複合体形成が慢性 GVHD の発症機序にどれくらい重要性が高いか解析を行なった。まず、DBY/HLA class II 複合体の形成が HLA class II アレルに依存するかどうか解析した。HLA-class II は HLA-DR/DP/DQ に分けられるが、TRUMP データを解析することを想定し HLA-DR に注目した。日本人に頻度の高い 22 の HLA-DRB1 アレルを一つずつ DBY と共に 293T 細胞にトランスフェクションし、フローサイトメトリーにて解析した。その結果、DBY/HLA class II 複合体の発現量は HLA class II アレルに依存し、HLA-DRB1*15:02 が最も複合体を形成しやすく、HLA-DRB1*12:01 が最も複合体を形成しにくいことが明らかとなった(Figure.3A)。DBY/HLA class II 複合体に対する抗体の結合性に関しても HLA class II アレル依存性であり(Figure.3B)、複合体の形成量と抗体の結合性も相関係数 0.75 と強い相関を示した(Figure.3C)。

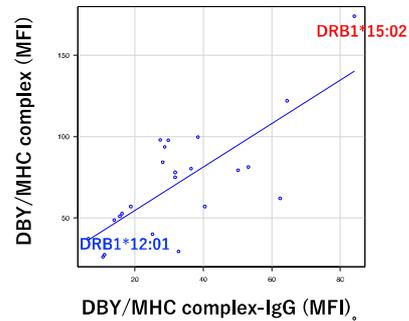
A. DBY/MHC class II複合体



B. DBY/MHC complex-IgG binding



C. DBY/HHC class II複合体の形成と血漿の結合量の関係



Pearson の積率相関係数
相関係数 0.75
P < 0.05

Fig.3 DBY/HLA class II 複合体形成に関する HLA class II アレルの分析

(4) 異性間移植において慢性 GVHD の発症リスクに関する HLA class II アレルの分析

自己免疫疾患では特定の HLA-class II アレルが発症に強く関与していることが報告されているが慢性 GVHD での報告はない。そこで、全国規模の TRUMP データを用いて解析を行なった。女性をドナーとする 18 歳以上の男性患者で、HLA の不一致を避けるため、血縁に限定した。その結果、慢性 GVHD の累積発症率は HLA-DRB1*15:02 で有意に高く、HLA-DRB1*12:01 で有意に低い結果が得られた。この傾向は男性ドナーから男性患者への移植では見られなかった。この結果は(3)の結果と一致しており、DBY/HLA class II 複合体の形成は慢性 GVHD の疾患形成に極めて重要な役割を果たしていることが示唆された。

(5) 慢性 GVHD における H-Y 蛋白質/HLA class II 複合体を形成する細胞の同定

最後に実際の患者の組織で H-Y 蛋白質/HLA class II 複合体が形成されているかどうか、慢性 GVHD の皮膚組織を用いて解析した。その結果、DBY/HLA class II 複合体は血管内皮において発現していることが判明した。複合体が発現している血管内皮周辺には線維化も見られ、血管内皮は同種抗体の標的細胞であると考えられた。

(6) まとめ

以上より、女性ドナーから男性レシピエントへの異性間移植において、血管内皮細胞上に発現する H-Y 蛋白質/HLA class II 複合体は同種抗体の標的抗原となり、慢性 GVHD の発症に関与していると考えられる。慢性 GVHD の病態解明は、ヒト検体のリソースが乏しいこともあり、マウスモデルを中心に解析が行われている。しかし、それらのマウスモデルは病態を正確に反映しているとは言い難く、ヒトにおける慢性 GVHD の病態は未知の部分が多い。本研究によって、慢性 GVHD の標的抗原・標的細胞が判明したことは、今後、慢性 GVHD の研究を加速させるのに重要な礎になると考えられる。

- 文献 1. Blood.2017;129(1):13-21.
- 文献 2. Blood.2015;125(20):3193-3201.
- 文献 3. Blood.2008;111:4817-4826.
- 文献 4. Blood.2005;105:2973-2978.
- 文献 5. Proc Natl Acad Sci USA.2014;111:3787-3792.
- 文献 6. Blood. 2015;125:2835-2844.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Morita Kaoru, Fujiwara Shin-ichiro, Ikeda Takashi, Kawaguchi Shin-ichiro, Toda Yumiko, Ito Shoko, Nagayama Takashi, Mashima Kiyomi, Umino Kento, Minakata Daisuke, Nakano Hirofumi, Yamasaki Ryoko, Ashizawa Masahiro, Yamamoto Chihiro, Hatano Kaoru, Sato Kazuya, Oh Iekuni, Ohmine Ken, Kanda Yoshinobu	4. 巻 56
2. 論文標題 Identification of endoscopic factors that predict poor responses to steroids in patients with gastrointestinal acute graft-versus-host disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone Marrow Transplantation	6. 最初と最後の頁 963 ~ 967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41409-020-01096-7	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森田 薫, 藤原 慎一郎, 中島 広大, 川口 慎一郎, 戸田 由美子, 伊藤 祥子, 越智 真一, 永山 隆史, 真島 清実, 海野 健斗, 皆方 大佑, 中野 裕史, 山崎 諒子, 蘆澤 正弘, 山本 千裕, 畑野 かおる, 佐藤 一也, 翁 家国, 大嶺 謙, 室井 一男, 神田 善伸
2. 発表標題 腸管GVHDにおけるステロイド抵抗性の内視鏡的予測因子の解明
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
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
---------------------------	-----------------------	----

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