

令和 5 年 4 月 24 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08707

研究課題名(和文)自己免疫性造血不全における新たな免疫回避機構による造血制御変容の基盤的解明

研究課題名(英文)Elucidation of the fundamental mechanism underlying hematopoietic control changes through a novel immune evasion mechanism in autoimmune bone marrow failure

研究代表者

片桐 孝和 (Katagiri, Takamasa)

金沢大学・保健学系・准教授

研究者番号：60621159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫性骨髄不全は、造血幹前駆細胞に対する自己の細胞傷害性T細胞の攻撃が発端となり発症する再生不良性貧血を代表とする造血不全である。恒常的な造血を目的とした造血幹前駆細胞の「免疫回避手段の多様性」と、それに伴う「造血制御の変容」は未だに解明されていない。本研究では、造血制御に關与するケモカインのひとつであるCXCR4の発現が、多様な免疫回避手段により異なる表現型を有する造血幹前駆細胞の間で乖離していることを見出した。さらに、患者iPS細胞から誘導した造血幹前駆細胞を用いた移植実験により、その発現がepigenetic memoryとして制御されている可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己免疫性骨髄不全は、造血幹前駆細胞に対する自己の細胞傷害性T細胞の攻撃が発端となり発症する造血不全である。本研究において、患者iPS細胞から誘導した造血幹前駆細胞を用いた実験により、造血制御関連ケモカインであるCXCR4の発現が多様な表現型を有する造血幹前駆細胞の間で乖離しているとともに、その発現がepigenetic memoryとして制御されている可能性を示した。本研究結果は、造血制御機構の解明に大きく貢献するとともに、骨髄不全患者の良性および前がん性クローン性造血の鑑別に役立つ可能性が考えられる。また、将来的には個別化医療の進展にも繋がること期待される。

研究成果の概要(英文)：Aplastic anemia is a disorder that results in hematopoietic failure due to T cells attacking hematopoietic progenitor cells (HSPCs). However, the mechanisms that regulate hematopoietic control and immune evasion in HSPCs are not yet fully understood. This study aimed to investigate the expression of CXCR4, a chemokine involved in hematopoietic control, in HSPCs with diverse phenotypes. The results suggest that diverse immune evasion mechanisms and changes in hematopoietic control are required for steady hematopoiesis among HSPCs. Transplantation experiments using HSPCs induced from patient iPS cells revealed that CXCR4 expression may be controlled as epigenetic memory, which explains the observed changes in hematopoietic control in autoimmune aplastic anemia. These findings provide insights into hematopoietic control and CXCR4 expression in HSPCs, as well as potential novel therapies for hematopoietic failure.

研究分野：免疫学

キーワード：iPS細胞 HLA 自己免疫疾患 造血幹細胞 骨髄移植 免疫不全マウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)自己免疫性骨髄不全は、造血幹前駆細胞(Hematopoietic Stem Progenitor Cell: HSPC)に対する自己の細胞傷害性T細胞(Cytotoxic T Lymphocyte: CTL)の攻撃が発端となって発症する再生不良性貧血を代表とする造血不全である。恒常的な造血を目的としたHSPCの「免疫回避手段の多様性」と、それに伴う「造血制御の変容」は、未だに解明されていない。これまでの研究で、患者の約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、それらの血球がクローン性に造血を支持していることが明らかになっている。

(2)6pLOHにより最も欠失しやすいHLA-B*40:02 遺伝子に着目し、シーケンシングによりこの領域を詳細に検討した結果、全体の75%がHLA-B*40:02 欠失血球陽性であり、その80%ではHLA-B*40:02 の機能喪失型変異によるHLA-B*40:02 単独欠失血球が検出されることを見出している。また、変異を起こしたHSPCの造血は、クローンサイズとともに経時的に変化していることを明らかにしている。ただし、HSPCがCTLからの免疫学的攻撃を回避する手段として、それらのメカニズム以外の機構が存在する可能性が考えられた。実際に、6pLOHのハプロタイプに含まれないHLA遺伝子を保有し、かつ、HLA-B*40:02の機能喪失型変異を保有しない例のHLAクラスI領域をシーケンシングしたところ、特定のHLA遺伝子で新たな変異を同定した。

(3)6pLOHまたは機能喪失型変異により特定の遺伝子を欠失したHSPCを有する再生不良性貧血患者において、上述以外の機序により、HLAクラスI遺伝子非欠失HSPCがCTLの異常免疫を回避して造血を支持している可能性が考えられた。その機序として、HSPCの体細胞変異によって生じたHLAクラスI遺伝子欠失HSPC固有の遺伝子変異が考えられたが、シーケンシングの結果、HLAクラスI遺伝子欠失顆粒球に固有の体細胞変異は検出されなかった。各々の表現型を持つiPS細胞由来HSPCは、マウス体内で同等のヒト造血構築能を有しているが、変異遺伝子の種類により各症例の臨床経過が異なっていることから、異常免疫の回避手段が造血の経時的様相に直接影響している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

多様な免疫回避手段により異なる表現型を有するHSPCにはそれぞれ特性がある。したがって、各HSPCを峻別するための分子を同定することができれば、その分の発現情報をもとに患者ごとの造血様態を予測し、造血予後に対する早期臨床的アプローチが可能となることが期待された。

3. 研究の方法

(1)患者HSPCにおいてHLA欠失とHLA非欠失分画を対象としてマイクロアレイ解析を行い、プロファイルに差がある分子を同定した。

(2)(1)で同定した分子または関連分子の発現を、再生不良性貧血患者のHSPCサブセットで解析するとともに、(他疾患も含む)多様な造血様態を示す造血クローンごとに解析した。

(3)再生不良性貧血患者から作製したWT、6pLOH(+)のiPS細胞から誘導したCD34陽性HSPCにおいて、(1)で同定した分子の発現を解析した。

(4)再生不良性貧血以外の血液疾患で(1)で同定した分子の発現を解析した。

(5)(3)で誘導した患者iPS細胞由来HSPCをBRGSマウスに骨髄移植し、造血支持能力の違いと、

(1)で同定した分子の発現の関係を解析した。

4. 研究成果

(1)HLA 欠失顆粒球が全顆粒球の 60.3%~99.4%を占め、骨髓細胞が利用可能な寛解状態の 3 人の再生不良性貧血患者の HSPC を用いて HLA 欠失血球の特性を解析した。HLA 欠失細胞の割合は Lin-CD34+ 細胞の総数に対して低く、各患者の MEP(megakaryocyte-erythroid progenitors)(69.9%~98.8%)と GMP(granulocyte/monocyte progenitor)(96.2%~97.8%)においては CMP(common myeloid progenitors)(4.5%~12.9%)よりもはるかに低いことから、一部の未分化な HSPC だけがこれらの患者の造血に寄与していると考えられた。

(2)HLA 欠失 CMPs と HLA 非欠失 CMPs のマイクロアレイ解析により、CXCL12 を含むいくつかのケモカイン遺伝子の発現が HLA 欠失 CMPs で低下していることが明らかとなった。HLA 欠失 CMPs の CXCL12 遺伝子の発現低下は、HSPCs が分泌する CXCL12 が単独で CXCR4 の発現を増加させることが報告されていたため、CMPs およびその他の HSPC について CXCR4 発現を解析した。その結果、3 人の患者で HLA 欠失 CMPs の CXCR4 発現が HLA 非欠失 CMPs に比べて有意に低下していた。また、CXCR4 非欠失細胞の割合(1.7%~3.6%)は、HLA 欠失 CMPs において HLA(+) CMPs(11.5%~24.6%)および健常者(コントロール)(n=11、28.5%~32.1%)と比較して有意に低下していた。さらに、HLA 欠失細胞がほぼ 100%であった MEPs および GMPs における CXCR4 発現も、コントロールと比較して有意に低下していた。

(3)HLA 欠失 HSPC において低下した CXCR4 発現をクローンレベルで確認するために、WT、6pLOH、機能喪失型変異を持つ iPSC 細胞から誘導した HSPC、及び HLA-B*5401 欠失血球を持つ別の患者において同様に解析を行った。6pLOH(+)/CD45+CD34+細胞及び機能喪失型変異陽性の CD45+CD34+細胞は、WT 細胞よりも CXCR4 の発現は有意に低下していた。多様な表現型ごとの iPSC クローンから誘導された CD34+細胞における CXCR4+細胞の割合を解析した結果、機能喪失型変異陽性 iPSC 由来 CD34+細胞の CXCR4 発現は、両患者の WT 細胞よりも有意に低下していた。一方、移植マウスの脾臓で同定された B リンパ球は、HLA の発現に関係なく CXCR4 を高発現していた。これらの結果から、iPSC 細胞由来 HSPC による CXCR4 発現の低下が何らかのエピジェネティックなメカニズムにより起きている可能性が示唆された。

(4)再生不良性貧血患者の B 細胞は、HLA 発現に関係なく CXCR4 を高発現していた。免疫学的攻撃を回避したクローン性造血において CXCR4 発現が低下する傾向があるかどうかを調べるために、PNH 患者の GPI(glycosylphosphatidylinositol)(-)および GPI(+)/CD34+ HSPC の CXCR4 の発現を解析した。GPI(-) HSPC の CXCR4(+)細胞の割合は、GPI(+)細胞よりも有意に低値であった。一方、同じ PNH 患者の B 細胞は、GPI 発現に関係なく CXCR4 を高発現していた。

(5)HLA(-)および GPI(-) HSPC において CXCR4 発現の低下が認められた。また、MDS 患者の HSPC では CXCR4 の発現が亢進することが報告されていたため、HSPC における CXCR4 の発現が、骨髓不全を有する患者において良性および悪性クローン性造血を鑑別するのに有用である可能性が考えられた。そこで、MDS を含むさまざまな骨髓不全の患者から採取した HSPC の CXCR4 発現をスクリーニングした。HLA 欠失血球を有する患者の HSPC 中の CXCR4+細胞の中央値は 8.8%であり。この割合は、HLA 欠失血球を有しない AA 患者やコントロールと比較して有意に低値であった。CXCR4(-)/CD34+細胞を有する PNH 患者 6 人の CXCR4(+)細胞の割合も、コントロールと比較して有意に低値であった。

(6)低リスク MDS 患者 4 人中、CXCR4(+)の HSPC 割合は有意に高値であった。HLA 欠失顆粒球を持つ 10 人の AA 患者の HSPC における CXCR4(+)細胞の割合は、HLA(-)顆粒球のない AA 患者またはコントロールと比較して有意に低値であった。6 人の PNH 患者の GPI(-) CD34+細胞における CXCR4(+)細胞の割合は、コントロールと比較して有意に低値であった。

(7)HLA(-)顆粒球を持たない 13 例の AA 患者のうち、c-kit 遺伝子変異、t(8;21)、ASXL1、モノ

ソミー7によるクローン性造血のある5例では、Variant allele frequency(VAF)が0.448、0.153、0.141、0.068、0.345であり、変異のない患者と比較してこれら5例の患者のCD34+細胞中のCXCR4(+)細胞の割合は有意に高値であった。

(8)寛解期のAA患者の造血はしばしばクローン性またはオリゴクローナル性であるが、臨床検査において体細胞変異を検出することは容易ではない。本研究により、HSPC上のCXCR4発現を解析することが、骨髄不全患者の良性および前がん性クローン性造血の鑑別に有用である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takamasa Katagiri, Jorge Luis Espinoza, Mizuho Uemori, Honoka Ikeda, Kohei Hosokawa, et al.	4. 巻 3
2. 論文標題 Hematopoietic stem progenitor cells with malignancy-related gene mutations in patients with acquired aplastic anemia are characterized by the increased expression of CXCR4.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 EJHaem	6. 最初と最後の頁 669 ~ 680
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jha2.515	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 該当する
1. 著者名 Noriaki Tsuji, Kohei Hosokawa, Ryota Urushihara, Mikoto Tanabe, Takamasa Katagiri, Tatsuhiko Ozawa, Hiroyuki Takamatsu, Ken Ishiyama, Hirohito Yamazaki, Hiroyuki Kishi, Seishi Ogawa, Shinji Nakao.	4. 巻 36
2. 論文標題 Frequent HLA-DR loss on hematopoietic stem progenitor cells in patients with cyclosporine-dependent aplastic anemia carrying HLA-DR15.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 1666 ~ 1675
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41375-022-01549-6	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 Mikoto Tanabe, Kohei Hosokawa, Nguyen Mai Anh Thi, Noriharu Nakagawa, Kana Maruyama, Noriaki Tsuji, Ryota Urushihara, Jorge Luis Espinoza, Mahmoud I Elbadry, Md Mohiuddin, Takamasa Katagiri, Masanori Ono, Hiroshi Fujiwara, Kazuhisa Chonabayashi, Yoshinori Yoshida, Hirohito Yamazaki, Atsushi Hirao, Shinji Nakao.	4. 巻 36
2. 論文標題 The GPI-anchored protein CD109 protects hematopoietic progenitor cells from undergoing erythroid differentiation induced by TGF- β .	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 847 ~ 855
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41375-021-01463-3	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 該当する
1. 著者名 Kohei Hosokawa, Hiroki Mizumaki, Takeshi Yoroidaka, Hiroyuki Maruyama, Tatsuya Imi, Noriaki Tsuji, Ryota Urushihara, Mikoto Tanabe, Yoshitaka Zaimoku, Mai Anh Thi Nguyen, Dung Cao Tran, Ken Ishiyama, Hirohito Yamazaki, Takamasa Katagiri, et al.	4. 巻 137
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 3576 ~ 3580
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 該当する

1. 著者名 Hiroki Mizumaki, Kazuyoshi Hosomichi, Kohei Hosokawa, Takeshi Yoroidaka, Tatsuya Imi, Yoshitaka Zaimoku, Takamasa Katagiri, et al.	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 2021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 Takeshi Yoroidaka, Kohei Hosokawa, Tatsuya Imi, Hiroki Mizumaki, Takamasa Katagiri, Ken Ishiyama, Hirohito Yamazaki, Fumihito Azuma, Yasuhito Nanya, Seishi Ogawa, Shinji Nakao.	4. 巻 35
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 3257 ~ 3267
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 -

1. 著者名 Mai Anh Thi Nguyen, Kohei Hosokawa, Takeshi Yoroidaka, Hiroyuki Maruyama, Jorge Luis Espinoza, Elbadry M Ibrahim, Md Mohiuddin, Mikoto Tanabe, Takamasa Katagiri, Noriharu Nakagawa, Kazuhisa Chonabayashi, Yoshinori Yoshida, Nobuyoshi Arima, Koichi Kashiwase, Hiroo Saji, Seishi Ogawa, Shinji Nakao.	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 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yoshitaka Zaimoku, Hiroki Mizumaki, Takeshi Yoroidaka, Noriharu Nakagawa, Tatsuya Imi, Hiroyuki Maruyama, Mikoto Tanabe, Noriaki Tsuji, Ryota Urushihara, Kohei Hosokawa, Takamasa Katagiri, Hiroyuki Takamatsu, Ken Ishiyama, Hirohito Yamazaki, Toshihiro Miyamoto, Shinji Nakao.
2. 発表標題 HLA Class I Allele-Specific Pathology Defines Clinical Manifestations of Immune Aplastic Anemia.
3. 学会等名 64th American Society of Hematology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 片桐孝和、Juis Espinoza、上森瑞穂、池田ほのか、細川晃平、石山謙、鎧高健志、井美達也、高松博幸、小澤龍彦、岸裕幸、山本靖彦、Mahmoud Elbadry、吉田善紀、蝶名林和久、竹中克斗、赤司浩一、南谷泰仁、小川誠司、中尾眞二。
2. 発表標題 HSPCs with MDS-related mutations in aplastic anemia are characterized by increased CXCR4 expression.
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 細川 晃平、水牧 裕希、鎧高 健志、丸山 裕之、井美 達也、辻 紀章、漆原 涼太、田辺 命、材木 義隆、Maianh Thinguyen、Dung Cao Tran Thi、石山 謙、山崎 宏人、片桐孝和、高松 博幸、細道 一善、田嶋 敦、東 史啓、小川 誠司、宮本 敏浩、中尾 眞二。
2. 発表標題 HLA class I allele-lacking leukocytes prevent the development of secondary PNH in aplastic anemia.
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長原里紗、内沢萌々、岩崎寛香、上森瑞穂、片桐孝和。
2. 発表標題 SCFおよびTNF- α による限局的造血制御。
3. 学会等名 第46回北陸臨床病理集談会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩崎寛香、内沢萌々、長原里紗、上森瑞穂、片桐孝和。
2. 発表標題 IFN- γ による広汎性造血制御。
3. 学会等名 第46回北陸臨床病理集談会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上森瑞穂、池田ほのか、岩崎寛香、片桐孝和。
2. 発表標題 再生不良性貧血における体細胞変異を有する造血幹前駆細胞の特性。
3. 学会等名 第46回北陸臨床病理集談会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshitaka Zaimoku, Hiroki Mizumaki, Tatsuya Imi, Kohei Hosokawa, Hiroyuki Maruyama, Takamasa Katagiri, Takeshi Yoroidaka, Noriharu Nakagawa, Mikoto Tanabe, Noriaki Tsuji, Ryota Urushihara, Hiroyuki Takamatsu, Hirohito Yamazaki, Ken Ishiyama, Shinji Nakao.
2. 発表標題 The Copy Number of Disease-Associated HLA Alleles Predicts the Response to Immunosuppressive Therapy in Acquired Aplastic Anemia.
3. 学会等名 63th American Society of Hematology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshitaka Zaimoku, Kohei Hosokawa, Takamasa Katagiri, Hiroyuki Maruyama, Tatsuya Imi, Hiroki Mizumaki, Takeshi Yoroidaka, Mikoto Tanabe, Ryota Urushihara, Noriaki Tsuji, Hiroyuki Takamatsu, Hirohito Yamazaki, Ken Ishiyama, Shinji Nakao.
2. 発表標題 Frequencies and clinical significance of HLA alleles in acquired aplastic anemia..
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

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 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 62th American Society of Hematology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢大学研究者情報 https://ridb.kanazawa-u.ac.jp/public/detail.php?id=4033
--

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
研究分担者	細川 晃平 (Hosokawa Kohei) (10786239)	金沢大学・附属病院・助教 (13301)	

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