

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07070

研究課題名(和文) 性別不一致造血幹細胞移植と抗Y染色体抗原特異的B細胞の獲得

研究課題名(英文) Sex-mismatched hematopoietic cell transplantation and acquisition of B-cells specific to antigens on Y-chromosome

研究代表者

仲宗根 秀樹 (Nakasone, Hideki)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：50757903

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、移植後患者検体を定期的に保存し、性別不一致移植(とくに女性ドナー・男性患者の組み合わせ)において、マイナー抗原であるY染色体抗原に対する免疫応答(HY免疫)に着目して研究を行ってきた。Y染色体抗原とカウンターパートであるX染色体抗原のアミノ酸配列に相違がある部分を、HY免疫の標的部として考え、カスタムペプチドとの蛍光色素複合体合成や、バイオデータベースを用いてHLA上に提示されやすい箇所を同定し、テトラマー合成などを行うことができた。また、臨床データを用いて、抗HY免疫による移植片対白血病効果の存在を示すことができた。今後も症例を蓄積しながら積極的にHY免疫の知見を発信する予定。

研究成果の学術的意義や社会的意義

期間を通じて、マイナー抗原であるY染色体抗原に対する免疫応答(HY免疫)が性別不一致後の抗腫瘍効果の減弱・腫瘍免疫回避に関わる可能性を臨床的に初めて示し、抗HY免疫による移植片対白血病効果の存在を示すことができた。本研究で得られた知見は、同種造血細胞移植のドナー選択における戦略を考える際の大きな助けとなる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have been periodically storing post-transplant patient specimens and focusing on immune responses to minor histocompatibility antigens, specifically targeting the Y chromosome antigen (HY antigen) in sex-mismatched transplants, especially combinations involving female donors and male recipients. We considered regions with amino acid sequence differences between the Y chromosome antigen and its counterpart, the X chromosome antigen, as target sites for HY immunity. We were able to synthesize fluorescent dye complexes with custom peptides, identify regions on HLA that are more likely to present, and perform tetramer synthesis. Additionally, using clinical data, we were able to demonstrate the presence of anti-HY immune effects on graft-versus-leukemia. We plan to continue actively disseminating knowledge of HY immunity while accumulating cases in the future.

研究分野：移植免疫

キーワード：性別不一致移植 HY免疫

## 1. 研究開始当初の背景

半世紀前に開発された造血細胞移植は、白血病やリンパ腫などの造血器腫瘍に対する根治的な治療法として発展してきた。一方で、移植後の同種免疫応答は移植片対宿主病 (GVHD) という新たな合併症を生み出してしまう危険性をはらんでいる。特に移植後 100 日以降に出現する慢性 GVHD は、線維化と炎症という自己免疫疾患のような症状が特徴で、口腔粘膜障害、眼乾燥、皮膚、肺、消化器系臓器の線維化、筋炎や関節障害など多岐にわたる。このため生活の質 (QOL) の低下だけでなく生命を脅かす最大の問題の一つである。様々な慢性 GVHD の危険因子の中でも、一貫して危険度が上がると考えられているものに性別不一致移植があげられる。女性をドナーとした男性の移植患者の場合、男性患者の Y 染色体上の蛋白抗原 (HY 抗原) に対する女性ドナー細胞による同種免疫応答が、慢性 GVHD の発症/増悪因子となると考えられるが、その免疫応答の獲得および寛容がどのような過程を通じてなされるか不明な点が多い。

申請者は慢性 GVHD における免疫再構築異常のネットワーク解明を中心に研究を続けてきたが、特に最近は性別不一致移植に着目し、6 つの HY 抗原に対する液性免疫 (HY 抗体) が、慢性 GVHD の発症および重症度のバイオマーカーとなることを報告した (Nakasone et al. Blood 2015, 図 1)。

しかし多様化する移植治療の中で抗 HY 反応の獲得および寛容に至る過程は不明のままである。そこで、抗体のみならず抗 HY 抗原特異的に反応する細胞の獲得過程と動態に着目することにより、性別不一致移植における同種応答を、よりシンプルに把握できるのではないかと考えている。慢性 GVHD 発症予測や重症度判断のバイオマーカーだけでなく、本研究を同種免疫応答の human model の一つとしてとらえることで、移植後免疫再構築ネットワークを探る糸口の一つにつながると期待される。

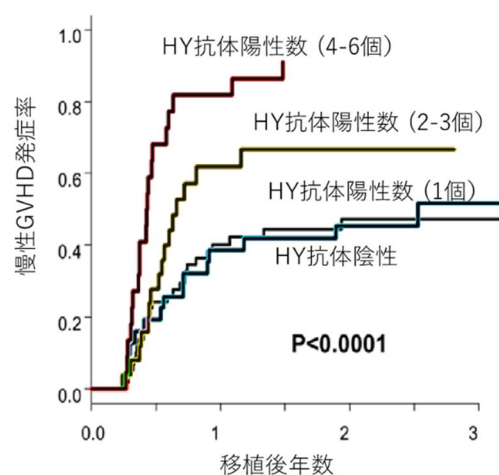


図 1. 6 種類の HY 抗体の陽性数で群別化した慢性 GVHD の累積発症率。陽性抗体数が多いほど発症率が高い。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、性別不一致移植 (特に女性ドナー・男性患者のペア) において、抗 HY 抗原同種反応を検出するシステムを開発し、抗 HY 反応が同種移植後どのように獲得され、制御され、移植後アウトカムに影響を与えるかを明らかにすることである。

- <HY 抗原特異的 B 細胞同定システムの開発>
- <微量免疫細胞の異性間キメリズム解析法の樹立>
- <HY 抗原特異的 B 細胞のレパトア動態解析>
- <HY 免疫における移植片対腫瘍効果の存在の確認>

## 3. 研究の方法

- <HY 抗原特異的 B 細胞同定システムの開発>

6 種類の HY 抗原 (UTY, DDX3Y, EIF1AY, ZFY, RPS4Y, SMCY) を主に検討する (Nakasone et al. Blood 2015)。ピオチン化 HY 抗原に反応する B 細胞や、ペプチドプール刺激に対し IFN を産出する T 細胞などを FACS で同定検出するシステムを構築する。

移植後 1-3 か月ごとの血漿中の HY 反応 B 細胞・T 細胞を経時的にモニタリングし、慢性 GVHD 発症、重症度、臓器特異性、その他合併症との相関について検証する。

(b) <微量血球細胞の異性間キメリズム解析法の樹立>

HY 抗原特異的 B 細胞だけでなく、同時にヘルパーT 細胞、制御性 T 細胞、樹状細胞等も測定し、その由来(キメリズム解析)を digital PCR 法をもちいて確認する。具体的には Y 染色体に固有である sex-determining region Y (SRY 遺伝子)の有無で確認する。特に HY 抗原特異的 B 細胞などは微量であることが推定されるため、50-1000 細胞からの異性間キメリズム解析を樹立することにより、HY 特異的免疫細胞の由来の確認をする。免疫細胞におけるキメリズムの違いにより、遺伝子発現変化、HY 抗原反応の程度の変化など RNA-seq によるオミクス解析を用いて検証する。

(c) <HY 抗原特異的 B 細胞のレパトア動態解析>

HY 抗原特異的 B 細胞をソーティングし、BCR を次世代シーケンスにより同定する。B 細胞クローンのレパトア動態と慢性 GVHD の発症前およびその増悪や改善に伴う変化を検証する。さらに BCR の超可変領域の特徴をあぶりだすことで発症リスク層別化や特徴のある BCR を標的とした治療法の開発につなげることを目標とする。

(d) <HY 免疫における移植片対腫瘍効果の存在の確認>

臨床データを用いて性別不一致移植時の HY 免疫による抗腫瘍効果について、再発率の違いや GVHD の発症などの観点から明らかにする。

マイナー抗原をモデルとして、同種免疫がどのように獲得にいたるか、その過程を明らかにする糸口の一つになると期待される。

#### 4. 研究成果

(1). HY 抗原の中から、UTY、SMCY、DBY、SRY を選択し、それぞれの X 染色体上の counterpart と比較し、相違部を同定し、20 - 30 アミノ酸配列による同種免疫標的抗原ペプチドを同定。これらペプチドに蛍光色素を修飾したものをカスタム合成した。現在、性別不一致移植検体を用いて、HY 抗原ペプチド反応 B 細胞の検出が可能かについて検討し、現在も症例を蓄積し検討を続けている。

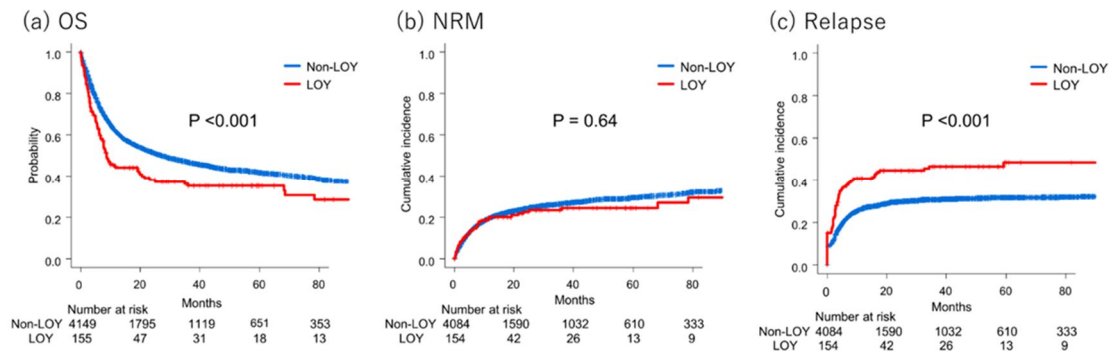
(2). 同様に、各 HLA と、HY 抗原ペプチドとの結合親和性予測を行い、HLA-A02 および HLA - A2402 における UTY、SMCY のペプチドを標的としたテトラマーを作製し、性別不一致移植検体を用いて、HY 抗原ペプチド反応 T 細胞の検出可能かについて検討し、現在も症例を蓄積し検討を続けている。

(3). digital PCR を用いた微量細胞におけるキメリズム解析について、性別不一致移植をモデルとして行った。TERT 遺伝子と SRY 遺伝子に着目して行い、TERT と SRY 遺伝子陽性の割合から、女性由来血球、男性由来血球の割合の算出が行える系が確率できた。

(4). 血液腫瘍患者で時折観察される Y 染色体の欠失と性別不一致移植患者における移植片対白血病効果について検証した。女性ドナー・男性レシピエントの同種造血細胞移植において、Y 染色体が欠損している症例と保たれている症例で予後の比較を行ったところ、Y 染色体欠損症例では再発リスクが増加し全生存率が不良となることが判明した(図 2)。マイナー抗原である Y 染

染色体抗原欠損が抗腫瘍L効果の減弱・腫瘍免疫回避に関わる可能性を臨床的に初めて示し Blood Advances に掲載された (2022 Mar 22;6(6):1895-1903). 論文タイトル: Deletion of Y-chromosome before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in male recipients with female donors.

(図2) 性別不一致移植男性患者における、Y染色体欠損の有無による成績



(5). 性別不一致造血細胞移植において、抗胸腺グロブリン抗体(ATG)の使用により、女性ドナー・男性レシピエントの予後への悪影響を克服することができるかを、多数例の症例で検証した。急性・慢性移植片対宿主病の発症頻度は男性ドナー・男性レシピエントではATGによる恩恵があるものの、女性ドナー・男性レシピエントではATGの有無でも発症率は変わらないことが判明した。一方、非再発死亡、生存は性別不一致の有無にかかわらずATG使用により改善傾向にあった。ただし、女性ドナー・男性レシピエントで発症頻度はATGで変わらなくても、重症度が低下することで生存をよくする機序が考えられた。本成果は、Scientific Reportsに掲載された(2023 10.1038/s41598-023-34442-y)。論文タイトル: Impact of anti-thymocyte globulin on survival outcomes in female-to-male allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

(6). 非血縁者間性別不一致移植と臍帯血移植での男性患者のアウトカムを比較した。たしかに臍帯血移植で慢性GVHDは発症が抑えられていたが、HLA一致非血縁者間性別不一致移植は、臍帯血よりも再発率や非再発死亡(が良好な傾向があり、結果として全生存が有意によいことが判明した。本結果は、Cytotherapyに掲載された(2023, 1220-28.)。論文タイトル: Unrelated female-to-male bone marrow transplantation would be preferred over cord blood transplantation in male patients.

期間を通じて、マイナー抗原であるY染色体抗原に対する免疫応答(HY免疫)が性別不一致後の抗腫瘍効果の減弱・腫瘍免疫回避に関わる可能性を臨床的に初めて示し、抗HY免疫による移植片対白血病効果の存在を示すことができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Masaharu Tamaki, Kazuaki Kameda, Shun-ichi Kimura, Naonori Harada, Naoyuki Uchida, Noriko Doki, Masatsugu Tanaka, Kazuhiro Ikegame, Masashi Sawa, Yuta Katayama, Shigesaburo Miyakoshi, Takahide Ara, Junya Kanda, Makoto Onizuka, Takahiro Fukuda, Yoshiko Atsuta, Yoshinobu Kanda, Kimukazu Yakushijin, Hideki Nakasone	4. 巻 6
2. 論文標題 Deletion of Y-chromosome before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in male recipients with female donors.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 1895-1903
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2021006456.	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 -

1. 著者名 Tamaki M, Akahoshi Y, Okada Y, Uchida N, Tanaka M, Doki N, Sawa M, Maruyama Y, Ueda Y, Miyakoshi S, Katayama Y, Kawakita T, Kimura T, Onizuka M, Fukuda T, Atsuta Y, Yanagisawa R, Yakushijin K, Kanda J, Nakasone H.	4. 巻 25
2. 論文標題 Unrelated female-to-male bone marrow transplantation would be preferred over cord blood transplantation in male patients	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cytotherapy	6. 最初と最後の頁 1220 ~ 1228
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcyt.2023.06.002	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 Tamaki Masaharu, Akahoshi Yu, Ashizawa Masahiro, Misaki Yukiko, Koi Satoshi, Kim Sung-Won, Ozawa Yukiyasu, Fujiwara Shin-ichiro, Kako Shinichi, Matsuoka Ken-ichi, Sawa Masashi, Katayama Yuta, Onizuka Makoto, Kanda Yoshinobu, Fukuda Takahiro, Atsuta Yoshiko, Yakushijin Kimikazu, Nakasone Hideki	4. 巻 13
2. 論文標題 Impact of anti-thymocyte globulin on survival outcomes in female-to-male allogeneic hematopoietic stem cell transplantation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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/s41598-023-34442-y	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
研究分担者	神田 善伸  (Kanda Yoshinobu)  (30334379)	自治医科大学・医学部・教授    (32202)	

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