

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591415

研究課題名(和文)HLA-DP分子特異的免疫応答の解析：新しい免疫療法開発に向けて

研究課題名(英文)Analysis of HLA-DP-specific immune responses to develop a novel immunotherapy

研究代表者

村田 誠(Murata, Makoto)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40378063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：患者白血病細胞の20～99%はHLA-DP陽性だった。HLA-DP不適合移植後の患者7名の末梢血単核球から24の細胞傷害性Tリンパ球(CTL)ラインを樹立しクローン化した。HLA-class IおよびDRに特異的なCTLは分離されたが、DP特異的CTLは1つも分離されなかった。頻回輸血患者8名の血清中抗HLA抗体を解析した。class I特異的抗体は検出されたが、DP分子を含めclass IIに対する抗体は1つも検出されなかった。DP以外のHLAを認識する抗HLA抗体を含む患者血清を用いて解析したところ、抗HLA抗体の発揮する細胞傷害活性には少なくともADCC活性が関与することが示された。

研究成果の概要(英文)：The 20-99% of leukemia cells was positive for HLA-DP expression. Twenty-four cytotoxic T cell (CTL) lines were isolated from blood obtained from seven patients who had received HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. All CTLs recognized HLA-class I or DR molecules but not DP molecule. Anti-HLA antibodies were detected in blood obtained from eight patients who had received multi-transfusion. All antibodies recognized HLA class I but not class II molecules. In vitro assay using patient serum containing anti-HLA antibody demonstrated that the hematopoietic stem cells were lysed by anti-HLA antibody through ADCC activity. Stimulation of T cells by .221 cells transfected with each HLA-DP cDNA construct is ongoing.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：造血幹細胞移植 HLA Tリンパ球 抗体

1. 研究開始当初の背景

我が国で実施される同種造血幹細胞移植の約7割は非血縁者をドナーとしている。原則として HLA-A, B, DR が一致したドナーを選択するが、他の HLA、特に DP が不一致となる頻度は高い。最近の日本人非血縁者間骨髄移植を対象とした統計解析で、DP 不一致ドナーからの移植は一致ドナーからのそれと比べて、白血病再発率が有意に低下し、一方 grade 3 以上の重症急性 GVHD 発症率は上昇しないことが確認された (*Blood*. 113:2851-8, 2009)。このことから、ドナー由来の T リンパ球や抗体は、不適合 DP を発現している残存患者白血球細胞を攻撃し、かつ患者上皮細胞は攻撃しないもしくは弱く攻撃する、との仮説を立てることができる。しかし DP に対する移植後免疫応答について詳細に検討した報告はほとんどない。

2. 研究の目的

不適合 HLA-DP に対する T リンパ球反応と抗体反応を、移植後患者検体を用いて主として *in vitro* で解析し、GVL 効果や GVHD などの同種免疫応答におけるそれらの意義を明らかにすることを目的とする。その成果は DP 特異的 T リンパ球による養子免疫療法や抗 DP 抗体療法などの開発基盤になると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 提供者に対し文書による説明を行い且つ文書による同意を得た上で、血液、骨髄、皮膚等を採取し、Ficoll 法にて単核球や血液腫瘍細胞を分離した。EBV を感作させて不死化 B リンパ球 (EBV-LCL) を作成した。CTL クローンの樹立は、末梢血単核球成分を Pan T cell Isolation kit II (Miltenyi) を用いて T リンパ球へ純化し、刺激細胞と共に 14 日間培養、次に増殖した T リンパ球ラインを 1 ウェルあたり 0.3 個となるよう U 底 96 ウェルプレートに撒き、IL-2 加培養液中で約 14 日間培養してクローン化した (限界希釈法)。

(2) 得られた T リンパ球クローンの HLA 拘束性は、様々な HLA を有する多数の EBV-LCL による刺激試験の結果により決定した。T リンパを 96 ウェルプレート上で刺激細胞と共に 16~24 時間培養し、培養液中へのインターフェロン (IFN) γ 産生量を測定した (ELISA 法)。また細胞傷害活性は Cr 遊離試験で評価した。

(3) HLA-DP の発現量は抗 DP 抗体を用いてフローサイトメトリー (FCM) で解析した。

(4) 血清中抗 HLA-DP 抗体の検出及び定量は、まず LABScreen PRA (One Lambda) を用いて一次スクリーニングを行い、陽性になった場合は LABScreen Single Antigen kit (One Lambda) を用いて各アレルに対する抗体を定

量的に測定した。

(5) CFU-GM コロニーアッセイは骨髄より分離した有核細胞を MethoCult H4034 (Stem Cell Technologies) で培養し、14 日後に顕微鏡下でカウントした。ADCC 活性は、骨髄有核細胞に、同一個体の血液から NK Cell Isolation kit (Miltenyi Biotech) を用いて分離した NK 細胞と、HLA 抗体を含む or 含まない血清を加え、その後上記同様のコロニー培養を行い 14 日後にカウントした。

(6) HLA-DPB1 および DPA1 の cDNA construct は、単核球より抽出した RNA から各 cDNA を RT-PCR で合成し pEAK10 ベクターに組み込んで作成した。

4. 研究成果

(1) EBV-LCL をコントロールとして、白血球/リンパ腫細胞株における HLA-DP の発現量を FCM で解析した。EBV-LCL における DP 陽性細胞の割合は 99% だったのに対し、Raji、Jurkat などの白血球/リンパ腫細胞株における DP 陽性細胞の割合は 84~99% だった。

(2) 急性骨髄性白血病 (AML) 患者および急性リンパ性白血病 (ALL) 患者から提供を受けた白血球細胞における HLA-DP の発現量を解析したところ、70~99% の細胞で DP を発現していた。また AML、ALL の白血球細胞のうち CD34 陽性/CD38 陰性の分面に着目して解析したところ DP の発現を明確に確認し得た。一方、成人 T 細胞性白血病/リンパ腫 (ATLL) の腫瘍細胞のうち DP 陽性細胞の占める割合は 20~30% だった。ただし ATLL 腫瘍細胞を CD3/CD28 ビーズで刺激すると DP 陽性細胞の割合は 50~60% まで上昇した。

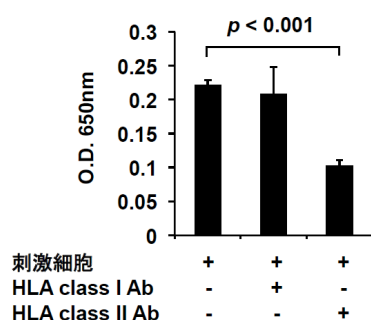
(3) 患者から提供を受けた皮膚組織由来の線維芽細胞では、IFN γ 等のサイトカインで刺激を加えない限り、HLA-DP の発現は認めなかった。

(4) HLA-DP が不適合の関係にある提供者 2 名の末梢血から PBMC を抽出し、試験管内で共培養 (刺激) することで、不適合 HLA を認識する CTL クローンの樹立を試みた。計 7 組の共培養を行い、24 の T リンパ球ラインを分離した。さらに刺激細胞に対してのみ特異的な細胞傷害活性を呈する 4 つの T リンパ球クローンについて詳細な解析を行った。

(5) CTL クローン #1 について。この CTL は HLA-DPB1*04:01/*05:01 を有する PBMC を、*02:01/*09:01 を有する PBMC で刺激して得られた。Cr 遊離試験で、非刺激細胞に対して細胞傷害活性を全く示さず、刺激細胞に対してのみ細胞傷害活性を示した。T 細胞受容体 V β 8 を使用していた。表面抗原は CD3 陽性/CD4 陽性/CD8 陰性で、HLA-class II を認識して

いる可能性が高いと考えられた。抗 HLA-class I 抗体および抗 HLA-class II 抗体を用いた blocking assay の結果から（上清中の IFN γ 産生量を ELISA で測定）、この CTL クローンは HLA-class II を認識することが示された（図 1）。次に様々な HLA-DRB1、DQB1、DPB1 を有する種々の EBV-LCL による CTL 刺激試験を行った結果（IFN γ 産生量、ELISA）、DP ではなく DRB1*15:02 を認識していることが示唆された（表 1）。さらに DRB1*15:02 cDNA を遺伝子導入した COS 細胞で CTL クローンを刺激することにより、DRB1*15:02 特異的であることを確認した。すなわち CTL クローン#1 は DP 分子を認識する CTL ではなかった。

(図 1)



(表 1)

	Characteristics of B-LCL						IFN
	HLA-DRB1		HLA-DQB1		HLA-DPB1		
R	09:01	04:05	03:03	04:01	04:01	05:01	-
S	09:01	<u>15:02</u>	<u>03:02</u>	<u>06:01</u>	<u>02:01</u>	<u>09:01</u>	+
L1	09:01	<u>15:02</u>	03:03	<u>06:01</u>	05:01	-	+
L2	<u>15:02</u>	-	<u>06:01</u>	-	05:01	<u>09:01</u>	+
L3	04:03	<u>15:02</u>	<u>03:02</u>	06:02	<u>02:01</u>	05:01	+
L4	09:01	<u>15:02</u>	03:03	<u>06:01</u>	<u>02:01</u>	<u>09:01</u>	+
L5	04:03	04:06	<u>03:02</u>	-	03:01	05:01	-
L6	01:01	08:03	05:01	<u>06:01</u>	05:01	-	-
L7	09:01	04:10	03:03	04:02	<u>02:01</u>	05:01	-
L8	03:01	13:01	06:03	02:01	04:02	<u>09:01</u>	-

R, responder; S, stimulator; L, EBV-LCL

(6) その他の CTL クローン#2~4 について。CTL クローン#1 と同様の解析を行ったところ、いずれも HLA-DP を認識するクローンではなかった。

(7) HLA-DP 分子を認識する抗体について。HLA 適合血小板製剤の輸血を必要としている血液疾患患者 8 名から血清の提供を受け、血清中抗 HLA 抗体が認識する HLA 分子の特定を

LABScreen Single Antigen kit を用いて解析した。しかし class I 特異的抗体は検出されたものの、DP 分子を含め class II 分子を認識する抗体は検出できなかった。

(8) 抗 HLA 抗体陽性の（抗 DP 抗体陽性ではない）患者から血清の提供を受け、造血細胞に対する細胞傷害活性を評価した。認識する HLA 分子を有する骨髓有核細胞を寒天培地で培養し形成された CFU-GM コロニー数を測定する系において、NK 細胞存在下でさらに抗体陽性血清を加えると CFU-GM コロニー数は有意に減少した（NK 細胞のみ加えた場合や、抗体陽性血清のみ加えた場合には減少しなかった）。すなわち抗 HLA 抗体による細胞傷害活性には少なくとも ADCC 活性が関与することが示された。なお補体を加えて CDC 活性による細胞傷害活性の有無も確認したが検出できなかった。

(9) HLA-DP アリルのうち比較的抗原性が高いとされる 02:01、04:01、04:02（いずれもアミノ酸 84~87 番が GGPM の配列を有する）を少なくとも片アリルに持つ患者に対し、比較的抗原性が低いとされる 05:01、09:01、13:01（いずれもアミノ酸 84~87 番が DEAV の配列を有する）を両アリルに持つドナーから移植が行われる頻度を、日本人間移植において算出した。森島、村田らは第 36 回日本造血細胞移植学会総会で非血縁者間造血幹細胞移植における HLA-DPB1 適合度の移植免疫反応への影響について報告した。その中で、日本骨髓バンクを介して行われた骨髓移植 7951 例を解析したところ、HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 の計 10 アリル全てが一致していたのは 2285 例、そのうちさらに DP が両アリルとも一致していたのは 740 例、DP が片アリル不一致だったのが 1181 例、DP が両アリルとも不一致だったのが 364 例だった。これに川瀬らの報告（Blood 2009; 113:2851-8）にある各 DP アリルの組み合わせ頻度のデータを加味すると、HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 の計 10 アリルが全て一致していた 2285 例中、DPB1 アリルが DEAV（ドナー）→GGPM（患者）となる組み合わせだった症例は約 150 例（約 6%）と推定された。当然 HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 の計 10 アリルのうち 1 アリル以上の HLA が不一致の症例の中にも、DPB1 アリルが DEAV→GGPM とする組み合わせは約 6%（あるいはそれ以上）含まれていたと推定される。しかし本研究の結果より、そのような組み合わせにおいては不適合 HLA-DP 特異的細胞性免疫応答（T リンパ球応答）および液性免疫応答（抗 HLA 抗体）よりも、他の HLA（特に class I）特異的な免疫応答が dominant になるものと推測される。

(10) ここまでの実験では、HLA-DP が不適合の関係にある提供者 2 名由来の PBMC を共培養しても、不適合 HLA-class I 分子からの刺

激が優位となり、class II 分子を認識する CTLは分離されなかった。また血清中class II 分子特異的抗体も分離されなかった。そこで現在はさらに各DPアレル分子のcDNAプラスミドを作成し、それをCOS細胞や、221細胞などHLA分子を発現していない細胞へ遺伝子導入し、Tリンパ球を刺激する実験を進めている。すでにDPB1*05:01, 02:01, 04:02, 09:01 (これらのアレルは日本人におけるDPB1アレル頻度上位4つであり、合わせて80%以上の日本人をカバーする)と、DPA1*01, 02:01, 02:02を作成済みである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計22件)

① Murata M, Nishida T, Taniguchi S, Ohashi K, Ogawa H, Fukuda T, Mori T, Kobayashi H, Nakaseko C, Yamagata N, Morishima Y, Nagamura-Inoue T, Sakamaki H, Atsuta Y, Suzuki R, Naoe T. Allogeneic transplantation for primary myelofibrosis with bone marrow, peripheral blood, or umbilical cord blood: An analysis of the JSHCT. *Bone Marrow Transplant.* 49: 355-60, 2014. doi: 10.1038/bmt.2013.180. 査読有.

② Yasuda T, Ueno T, Fukumura K, Yamato A, Ando M, Yamaguchi H, Soda M, Kawazu M, Sai E, Yamashita Y, Murata M, Kiyoi H, Naoe T, Mano H. Leukemic evolution of donor-derived cells harboring *IDH2* and *DNMT3A* mutations after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia.* 28: 426-8, 2014. doi: 10.1038/leu.2013.278. 査読有.

③ Kanda J, Nakasone H, Atsuta Y, Toubai T, Yokoyama H, Fukuda T, Taniguchi S, Ohashi K, Ogawa H, Eto T, Miyamura K, Morishima Y, Nagamura-Inoue T, Sakamaki H, Murata M. Risk factors and organ involvement of chronic graft-versus-host disease in Japan. *Bone Marrow Transplant.* 49: 228-35, 2014. doi: 10.1038/bmt.2013.151. 査読有.

④ Murata M, Nakasone H, Kanda J, Nakane T, Furukawa T, Fukuda T, Mori T, Taniguchi S, Eto T, Ohashi K, Hino M, Inoue M, Ogawa H, Atsuta Y, Nagamura-Inoue T, Yabe H, Morishima Y, Sakamaki H, Suzuki R. Clinical factors predicting the response of acute graft-versus-host disease to corticosteroid therapy: an analysis from the GVHD working group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 19: 1183-9, 2013. doi: 10.1016/j.bbmt.2013.05.003. 査読有.

⑤ Imahashi N, Nishida T, Ito Y, Kawada J, Nakazawa Y, Toji S, Suzuki S, Terakura S, Kato T, Murata M, Naoe T. Identification of a novel HLA-A*24:02-restricted adenovirus serotype 11-specific CD8⁺ T-cell epitope for adoptive immunotherapy. *Mol Immunol.* 56: 399-405, 2013. doi: 10.1016/j.molimm.2013.05.232. 査読有.

⑥ Nakasone H, Kurosawa S, Yakushijin K, Taniguchi S, Murata M, Ikegame K, Kobayashi T, Eto T, Miyamura K, Sakamaki H, Morishima Y, Nagamura T, Suzuki R, Fukuda T. Impact of hepatitis C virus infection on clinical outcome in recipients after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Am J Hematol.* 88: 477-84, 2013. doi: 10.1002/ajh.23436. 査読有.

⑦ Nakasone H, Kanda J, Yano S, Atsuta Y, Ago H, Fukuda T, Kakihana K, Adachi T, Yujiri T, Taniguchi S, Taguchi J, Morishima Y, Nagamura T, Sakamaki H, Mori T, Murata M. A case-control study of bronchiolitis obliterans syndrome following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Int.* 26: 631-9, 2013. doi: 10.1111/tri.12093. 査読有.

⑧ Kato T*, Terakura S*, Murata M, Sugimoto K, Murase M, Iriyama C, Tomita A, Abe A, Suzuki M, Nishida T, Naoe T. Escape of leukemia blasts from HLA-specific CTL pressure in a recipient of HLA one locus-mismatched bone marrow transplantation. *Cell Immunol.* 276: 75-82, 2012. (*equal contribution) doi: 10.1016/j.cellimm.2012.03.011. 査読有.

⑨ Kuwatsuka Y, Kohno A, Terakura S, Saito S, Shimada K, Yasuda T, Inamoto Y, Miyamura K, Sawa M, Murata M, Karasuno T, Taniguchi S, Nagafuji K, Atsuta Y, Suzuki R, Fukumoto M, Naoe T, Morishita Y. Phase II study of dose-modified busulfan by real-time targeting in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myeloid malignancy. *Cancer Sci.* 103: 1688-94, 2012. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02342.x. 査読有.

⑩ Nishiwaki S, Nakayama T, Murata M, Nishida T, Sugimoto K, Saito S, Kato T, Mizuno H, Imahashi N, Seto A, Ozawa Y, Goto T, Koyama D, Yokohata E, Kubota N, Kamoshita S, Miyamura K, Matsumoto K, Ito M, Naoe T. Dexamethasone palmitate successfully attenuates hemophagocytic syndrome after allogeneic stem cell transplantation: macrophage-targeted steroid therapy. *Int J Hematol.* 95: 428-33, 2012. doi: 10.1007/s12185-012-1023-z. 査読有.

⑪ Terakura S, Atsuta Y, Sawa M, Ohashi H, Kato T, Nishiwaki S, Imahashi N, Yasuda T, Murata M, Miyamura K, Suzuki R, Naoe T, Ito T, Morishita Y. A prospective dose-finding trial using a modified continual reassessment method for optimization of fludarabine plus melphalan conditioning for marrow transplantation from unrelated donors in patients with hematopoietic malignancies. *Ann Oncol.* 22: 1865-75, 2011. doi: 10.1093/annonc/mdq673. 査読有.

⑫ Waki F, Masuoka K, Fukuda T, Kanda Y, Nakamae M, Yakushijin K, Togami K, Nishiwaki K, Ueda Y, Kawano F, Kasai M, Nagafuji K, Hagihara M, Hatanaka K, Taniwaki M, Maeda Y, Shirafuji N, Mori T, Utsunomiya A, Eto T, Nakagawa H, Murata M, Uchida T, Iida H,

Yakushiji K, Yamashita T, Wake A, Takahashi S, Takaue Y, Taniguchi S. Feasibility of reduced-intensity cord blood transplantation as salvage therapy for graft failure: results of a nationwide survey of 80 adult patients. *Biol Blood Marrow Transplant*, 17: 841-51, 2011. doi: 10.1016/j.bbmt.2010.09.005. 査読有.

[学会発表] (計46件)

① 村田 誠, 西田徹也, 谷口修一, 大橋一輝, 小川啓恭, 福田隆浩, 森 毅彦, 小林 光, 中世古知昭, 山形 昇, 森島泰雄, 長村登紀子, 坂巻 壽, 熱田由子, 鈴木律朗, 直江知樹. 原発性骨髄線維症に対する幹細胞別の移植成績: JSHCTからの報告. 第36回日本造血細胞移植学会総会. 2014年3月7~9日, 沖縄コンベンションセンター, 宜野湾市.

② Murata M, Nishida T, Taniguchi S, Ohashi K, Ogawa H, Fukuda T, Morishima Y, Nagamura-Inoue T, Sakamaki H, Atsuta Y, Suzuki R, Naoe T. Transplantation for primary myelofibrosis using bone marrow, peripheral blood and umbilical cord blood: a retrospective analysis of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. The 39th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, in London, UK. Apr 7-10, 2013.

③ 村田 誠. 慢性GVHDのマネジメント. 第35回日本造血細胞移植学会総会. 2013年3月7~9日, 石川県立音楽堂, 金沢市. 教育講演.

④ Murata M, Nakasone H, Kanda J, Nakane T, Furukawa T, Fukuda T, Taniguchi S, Mori T, Eto T, Morishima Y, Nagamura-Inoue T, Yabe H, Atsuta Y, Sakamaki H, Suzuki R. Clinical factors predicting the response of acute graft-versus-host disease to corticosteroid therapy. The 54th Annual Meeting of the American Society of Hematology, in Atlanta, USA. Dec 8-11, 2012.

⑤ Murata M, Nishida T, Taniguchi S, Ohashi K, Ogawa H, Fukuda T, Morishima Y, Nagamura-Inoue T, Sakamaki H, Atsuta Y, Suzuki R, Naoe T. Outcome of transplantation for primary myelofibrosis: A retrospective study of the JSHCT. 第74回日本血液学会学術集会. 2012年10月19~21日, 京都国際会議場, 京都市.

⑥ 村田 誠. 日本の急性GVHD治療の現状. 第74回日本血液学会学術集会. 2012年10月19~21日, 京都国際会議場, 京都市. シンポジウム.

⑦ Murata M, Kato T, Terakura S, Sugimoto K, Nishida T, Naoe T. Leukaemia escape from HLA-specific T-lymphocyte pressure in a recipient of HLA one locus-mismatched BMT. The 38th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, in Geneva, Switzerland. Apr 1-4, 2012. Best Science Poster Award.

⑧ 村田 誠, 仲宗根秀樹, 諫田淳也, 中根孝彦, 古川達雄, 福田隆浩, 谷口修一, 森 毅

彦, 衛藤徹也, 森島泰雄, 長村登紀子, 矢部普正, 熱田由子, 鈴木律朗, 坂巻 壽. Grade II以上の急性GVHDに対する治療成績: TRUMPデータを用いた解析. 第34回日本造血細胞移植学会総会. 2012年2月24~25日, グランキューブ大阪, 大阪市.

[図書] (計1件)

① 村田 誠. 急性GVHDの一次治療. みんなに役立つGVHDの基礎と臨床 編集: 豊嶋崇徳, 医薬ジャーナル社 (東京) p216-226 (2013).

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/naika/outline/ketsueki-syuyou.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 誠 (MURATA, Makoto)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 40378063

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし