

【目的】 特発性再生不良性貧血 (acquired aplastic anemia : AA) は汎血球減少を特徴とする血液難病であり、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が奏功することから、T 細胞の異常によって起こる一種の自己免疫疾患であると考えられる。造血幹細胞上の自己抗原を認識する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が何らかの誘因によって誘導される結果、造血幹細胞が減少し発症すると考えられているが、CTL の標的となる自己抗原は不明である (下図)。我々のこれまでの研究から、HLA-B4002 が AA の自己抗原提示や CTL の誘導に最も強く関与していることが示唆されていた (Espinoza JL, et al. Blood advances, 2018)。本研究は AA 患者 iPS 細胞由来造血前駆細胞 (HSPC) を用いて CTL を誘導し、その標的抗原を同定することを目的とする。

【方法】 ①HLA-B4002 陽性で、HLA クラス I アレル欠失が検出される AA 患者の末梢血から単球と CD8 陽性 T 細胞を単離し、単球から iPS 細胞を作製のち、6pLOH 陽性・陰性のそれぞれから HSPC を誘導することとした。②上記 AA 患者の CD8 陽性 T 細胞から、6pLOH 陰性細胞は傷害するが、6pLOH 陽性細胞は傷害しない CTL クローンを単離する。細胞傷害活性を持つ CTL の TCR クロノタイプを決定し、健常者の T 細胞とレトロウイルスを用いて TCR 導入 T 細胞を作製した。③HLA-B4002、B5401 などの特定の HLA を発現させた K562 細胞に CD80・CD137L などの共刺激分子を導入した人工抗原提示細胞を作製し、TCR 導入 T 細胞の HLA 導入 K562 細胞や iPS 細胞由来造血幹細胞に対する細胞傷害活性を IFN γ の ELISA 法により決定した。④HLA 導入 K562 細胞から HLA クラス I 抗体を用いて免疫沈降を行い、HLA 結合ペプチドを精製したのち、酢酸バッファーを用いて nanoLC-MS/MS で解析することにより、HLA 分子により提示されるペプチドを同定した。⑤④により明らかとなった遺伝子を CRISPR/Cas9 によりノックアウトした K562 細胞を作製し、③で決定した TCR 導入 T 細胞との反応性を IFN γ の ELISA 法により評価した。

【結果】 HLA クラス I アレル欠失陽性 AA 患者の CD8 陽性 T 細胞から、野生型 HSPC は傷害するが、B4002 欠失 HSPC は傷害しない CTL クローンを単離することに成功した。これらの中で高頻度に検出された TCR のうちの一つは、同一症例の発症時の骨髄 PD-1 陽性 CD8 陽性 T 細胞からも検出された。CTL のうち、高頻度に認められた 2 種類の TCR を導入した TCR 導入 T 細胞は HLA-B4002 拘束性に HLA-B4002 導入 K562 細胞または野生型の iPS 細胞由来 HSPC を傷害した。HLA-B4002 導入 K562 細胞を HLA クラス I 抗体により免疫沈降を行い、nanoLC-MS/MS で解析したところ、15 個のペプチドが同定されたが、そのうち 10 個は HLA-B4002 によって抗原提示されやすいアミノ酸配列を有していた。それらのペプチドのうち、造血幹細胞の増殖に重要な役割を果たしている特定の遺伝子 X を CRISPR/Cas9 によりノックアウトした K562-B4002 細胞を作製し、上記 2 種類の TCR 導入 T 細胞の反応を評価したところ、コントロールと比較して有意に反応が減弱していた。

HLA クラス I アレルを欠失した造血幹細胞の細胞傷害性 T 細胞からのエスケープ

