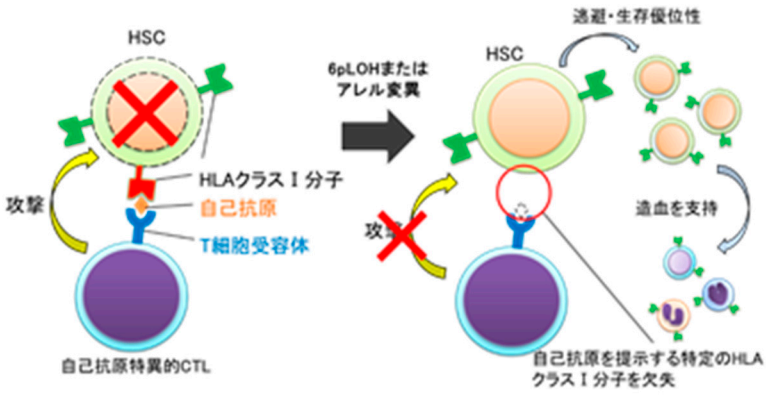
189　HLAにより提示される再生不良性貧血自己抗原の同定	細川　晃平

【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 IFNγ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 分子によりに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 IFNγ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



189. HLA により提示される再生不良性貧血自己抗原の同定

細川　晃平

金沢大学 附属病院 高密度無菌治療部

Key words：再生不良性貧血，HLA，iPS 細胞，自己免疫，細胞傷害性 T 細胞

緒　言

骨髄不全とは、骨髄機能の低下によってすべての血球が減少する状態で、その中には特発性再生不良性貧血（aplastic anemia：AA）、骨髄異形成症候群（MDS）、発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）などが含まれる。その中でも多くが自己免疫によって発症する AA は、末梢血でのすべての血球の減少（汎血球減少）と骨髄の細胞密度の低下（低形成）を特徴とする疾患である。病気の本態は「骨髄毒性を示す薬剤の影響がないにもかかわらず、造血幹細胞が持続的に減少した状態」ということができる。近年、わが国の人口の高齢化に伴い、AA を含む骨髄不全は患者数が増えている。AA に対しては免疫抑制療法や造血幹細胞移植が行われているが、いずれも原因療法ではないため、治療成績が良好とは言えないのが現状である。治療が奏効しなかった患者の多くは感染症や出血などで致死的な経過をたどる。

AA の約 70%は、抗胸腺細胞グロブリン（ATG）やシクロスポリンなどの T 細胞を標的とする免疫抑制療法によって改善する。これらの臨床的観察から、AA は、血液を生産する骨髄において、すべての血球の種にあたる「造血幹前駆細胞（hematopoietic stem progenitor cell：HSPC）」上の自己抗原を認識する細胞傷害性 T 細胞（cytotoxic T lymphocyte：CTL）が HSPC を破壊することによって発症する自己免疫疾患であると考えられている。しかし、発症時すでに骨髄が枯渇していることから、CTL が認識する自己抗原は全く分かっていない。CTL が認識する HSPC 上の自己抗原の同定は、AA を始めとする特発性骨髄不全の研究においてもっとも重要なテーマである。我々は、AA 患者の約 30%において、ヒト白血球抗原（HLA）遺伝子が位置する 6 番染色体短腕の片親性ダイソミーや HLA クラス I 遺伝子の機能喪失型変異によって、特定の HLA クラス I アレルを欠失させた白血球が検出されることを見出し、その中でも HLA-B4002 を欠失させる頻度が高いことを明らかにしてきた [1〜5]。以上より、AA 患者では、CTL が HLA-B4002 により提示されるペプチドを認識して HSPC を攻撃しており、HLA-B*40:02 変異 HSPC は CTL からの攻撃を免れることによって造血を支持していると考えられる。このため、CTL が認識する HLA-B4002 提示ペプチドを同定できれば、それが AA の自己抗原である可能性が高い。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

1. 6pLOH 陰性細胞は傷害するが、6pLOH 陽性細胞は傷害しない CTL クローンの単離

HLA-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。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 クローンを単離した。

2. CTL の TCR クロノタイプの決定と、健常者の T 細胞とレトロウイルスを用いた TCR 導入 T 細胞の作製

細胞傷害活性を持つ CTL の TCR クロノタイプを決定し、高頻度に認められた TCRVβ配列の cDNA を用いて健常者の 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。

3. HLA 発現 K562 細胞に共刺激分子を導入した人工抗原提示細胞の作製

HLA-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 IFNγの ELISA 法により決定した。

4. HLA 導入 K562 細胞における免疫沈降を行いた HLA 結合ペプチドの精製

HLA 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 分子によりに提示されるペプチドを同定した。

5. 候補遺伝子をノックアウトした K562 細胞の作製と TCR 導入 T 細胞との反応性の評価

4 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 IFNγの ELISA 法により評価した。

結　果

1.　6pLOH 陰性細胞は傷害するが、6pLOH 陽性細胞は傷害しない CTL クローンの単離

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。

2.　CTL の TCR クロノタイプの決定と、健常者の T 細胞とレトロウイルスを用いた TCR 導入 T 細胞の作製

CTL において高頻度に認められた TCRVβの配列を用いて、レトロウィルスベクターで TCR 導入 T 細胞を作製することに成功した（図 1）。

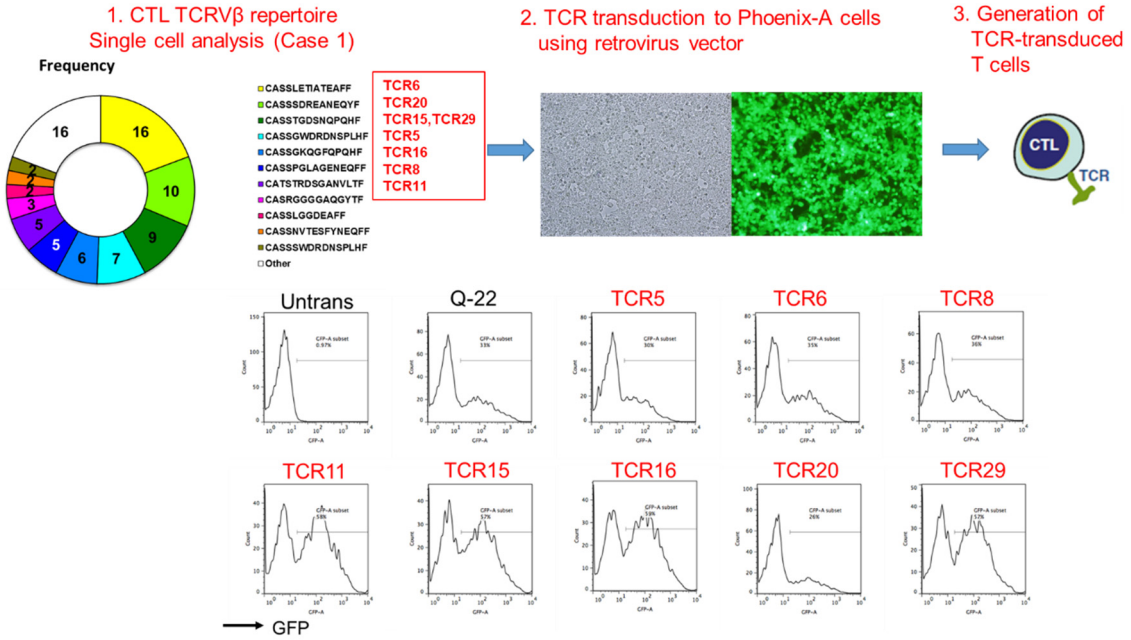


図 1.　レトロウィルスベクターを用いた TCR 導入 T 細胞の作製

上部は TCR 導入 T 細胞の作製過程を、下部はそれぞれの TCR の導入効率を示している。

3.　HLA 発現 K562 細胞に共刺激分子を導入した人工抗原提示細胞の作製

CTL のうち、高頻度に認められた 2 種類の TCR を導入した TCR トランスフェクタントは 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（図 2）

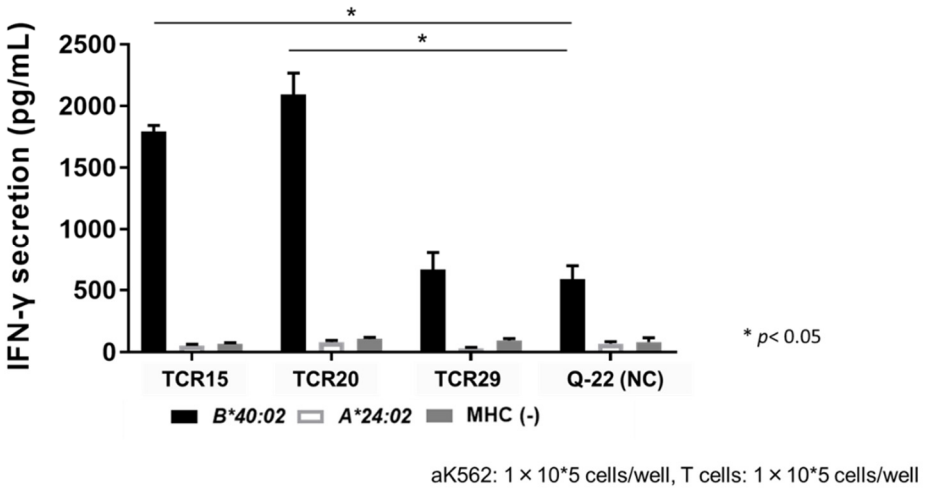


図 2. $CD80^{+}CD137L^{+}$ K562 細胞に対する TCR 導入 T 細胞の細胞傷害活性
HLAB4002 拘束性に細胞傷害活性を有する TCR を同定した。
Two-way ANOVA、*p<0.05。

4. HLA 導入 K562 細胞における免疫沈降を行いた HLA 結合ペプチドの精製

HLA-B4002 導入 K562 細胞を 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。

5. 候補遺伝子をノックアウトした K562 細胞の作製と TCR 導入 T 細胞との反応性の評価

それらのペプチドのなかから、造血幹細胞の増殖・制御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 トランスフェクタント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。

考　察

AA 研究において、造血幹細胞を攻撃している CTL の実態やその標的抗原は長年不明であった。その大きな理由として、発症時既に骨髄が枯渇していることから、十分な造血幹細胞が得られず、病態研究が困難であるという問題があった。そこで、iPS 細胞を用いることによってこれらの問題点を克服することを考えた。すなわち、iPS 細胞から誘導した造血幹細胞を標的細胞として使用し、また、HLA の発現を欠失している幹細胞は傷害しないが、正常な幹細胞は傷害するような CTL を単離することを考えた。

今回の研究によって同定された TCR 導入 T 細胞は発症時の骨髄 PD-1 陽性 CD8 陽性 T 細胞にも検出され、HLA-B4002 拘束性に iPS 細胞由来 HSPC や K562 細胞に対する細胞傷害活性を有していたことから、HLA-B4002 によって提示される自己抗原を認識していると考えられた。したがって、これらの TCR 導入 T 細胞は AA の自己抗原の同定に非常に有用なツールであると考えられた。

nanoLC-MS/MS により同定された HLA-B4002 に提示されるペプチドのなかから、造血幹細胞の増殖・制御に重要な役割を果たしている特定の遺伝子を CRISPR/Cas9 を用いてノックアウトしたところ、TCR 導入 T 細胞の細胞傷害活性が減弱したことから、AA の自己抗原となっている可能性がある。

今後、候補ペプチドと HLA-B4002 蛋白を用いて HLA テトラマーを作製し、HLA-B4002 を保有する AA 患者の末梢血に抗原特異的 T 細胞が高頻度に検出されるかを明らかにする予定である。

共同研究者・謝辞

上原記念生命科学財団からの本研究に対するご支援に深謝申し上げます。また、本研究の共同研究者である金沢大学の中尾眞二前教授をはじめとする血液内科研究分野の先生方、金沢大学免疫学教室の平安恒幸先生、華山力成先生、金沢大学保健学系病態検査学の Luis Espinoza 先生、片桐孝和先生、金沢大学学際科学実験センターの西内巧先生、名古屋大学免疫学の赤塚美樹先生、富山大学免疫学の小林栄治先生、下岡清美先生、浜名洋先生、岸裕幸先生、京都大学 iPS 細胞研究所の蝶名林和久先生、吉田善紀先生に感謝致します。

文　献

1） Katagiri T, Sato-Otsubo A, Kashiwase K, Morishima S, Sato Y, Mori Y, Kato M, Sanada M, Morishima Y, Hosokawa K, Sasaki Y, Ohtake S, Ogawa S, Nakao S. Frequent loss of HLA alleles associated with copy number-neutral 6pLOH in acquired aplastic anemia. Blood. 2011 Dec 15;118(25):6601-9. PMID: 21963603 DOI: 10.1182/blood-2011-07-365189

2） Inaguma Y, Akatsuka Y, Hosokawa K, Maruyama H, Okamoto A, Katagiri T, Shiraishi K, Murayama Y, Tsuzuki-Iba S, Mizutani Y, Nishii C, Yamamoto N, Demachi-Okamura A, Kuzushima K, Ogawa S, Emi N, Nakao S. Br J Haematol. 2016 Jan;172(1):131-4. PMID: 25929998　DOI: 10.1111/bjh.13464

3） Espinoza JL, Elbadry MI, Chonabayashi K, Yoshida Y, Katagiri T, Harada K, Nakagawa N, Zaimoku Y, Imi T, Takamatsu H, Ozawa T, Maruyama H, Hassanein HA, Khalifa A Noreldin A, Takenaka K, Akashi K, Hamana H, Kishi H, Akatsuka Y, Nakao S. Blood Adv. 2018 Feb 27;2(4):390-400. PMID: 29472446 DOI: 10.1182/bloodadvances.2017013342

4） Mizumaki H, Hosomichi K, Hosokawa K, Yoroidaka T, Imi T, Zaimoku Y, Katagiri T, Anh Thi Nguyen M, Cao Tran D, Ibrahim Yousef Elbadry M, Chonabayashi K, Yoshida Y, Takamatsu H, Ozawa T, Azuma F, Kishi H, Fujii Y, Ogawa S, Tajima A, Nakao S. Haematologica. 2021 Jun 1;106(6):1581-1590. PMID: 32439725 DOI: 10.3324/haematol.2020.247809

5） Hosokawa K, Mizumaki H, Yoroidaka T, Maruyama H, Imi T, Tsuji N, Urushihara R, Tanabe M, Zaimoku Y, Nguyen MAT, Tran DC, Ishiyama K, Yamazaki H, Katagiri T, Takamatsu H, Hosomichi K, Tajima A, Azuma F, Ogawa S, Nakao S. Blood. 2021 Jun 24;137(25):3576-3580. PMID: 33754630 DOI: 10.1182/blood.2020010586