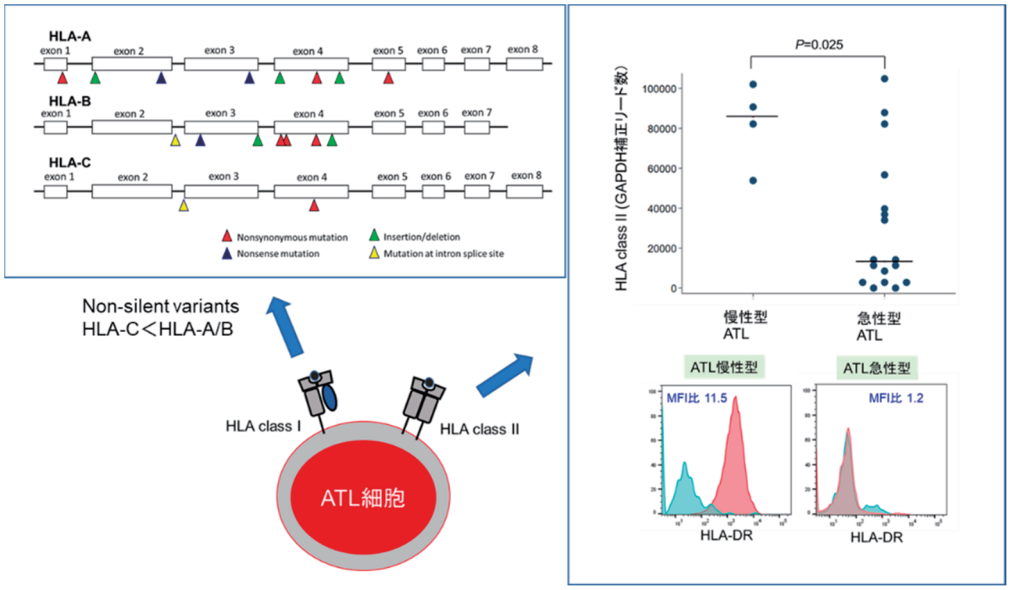
61　遺伝的に規定されるNK細胞免疫応答とATLの発症	森島　聡子

【目的】HLA は免疫応答を司る最も重要な分子である。HLA の個人差が免疫応答性を決定し、感染症や自己免疫疾患の疾患感受性に大きく影響する。HLA class I は CD8 陽性 T 細胞への抗原提示をするだけではなく、NK 細胞受容体のリガンドとなり NK 細胞の機能を制御する。ウイルスが持続感染した細胞やがん細胞では HLA class I 発現レベルの低下が認められ、T 細胞から認識されなくなり、NK 細胞の攻撃対象となる。抑制型受容体は HLA class I をリガンドとしており、個人の HLA class I アレルの組み合わせによってライセンシングを受ける NK 細胞の免疫応答性が異なる可能性が報告されている。我々は ATL が予後不良である要因として、ATL 細胞に生じる HLA 遺伝子異常が免疫回避機構に重要である可能性に着目して研究を進めてきた。特に、HLA の発現が低下した細胞を標的として応答をする NK 細胞が ATL 発症や病勢進展の制御に重要であるという作業仮説を検証することを目的に、ATL に生じる HLA の異常について基盤となるデータを解析し、さらに HTLV-1 キャリアから ATL の発症に特定の HLA が関与するか探索する。

【方法】1. ATL 細胞に生じるゲノムレベルの HLA 遺伝子全領域の解析は、long-range 法を用いた super high resolution for single molecule-sequence-based typing（SS-SBT）で実施した。ATL 細胞における HLA 遺伝子の発現解析については、Capture-RNA-Seq 法で行った。2. HTLV-1 感染 $CD4^{+}$T 細胞における HLA class I と HLA-DR の細胞表面上の発現はフローサイトメトリーで解析した。3. ATL 症例 110 例、HTLV-1 キャリア 70 例の DNA を用いて、Luminex 法による *HLA-A*、*-B*、*-C*、*-DRB1*、*-DQB1*、*-DPB1* のタイピングを実施し、ATL 発症に関連する HLA アレルの検索を行った。

【結果】ATL の急性型 20 症例中 8 症例に LOH（loss of heterozygosity：ヘテロ接合性喪失）を認め、2 例は *HLA-A*、2 例は *HLA-B*、*-C*；2 例は *HLA-A*、*-C*、*-B*；1 例は *HLA-DRB1*、*-DQA1*、*-DQB1*、*-DPA1*、*-DPB1*、1 例は *HLA-A* から *-DQB1* のすべての遺伝子に LOH を認めた。20 例中 8 例に 17 個の non-silent variants（NSVs）を認め、*HLA-A* に 8 個、*HLA-B* に 7 個、*HLA-C* に 2 個であった。HLA class II 遺伝子においてはゲノム異常をほとんど認めなかったが、HLA class II の RNA 及び細胞表面上の発現は慢性型よりも急性型において発現が低下していた。ATL と HTLV-1 キャリアの HLA アレル頻度の比較より、ATL のリスクとなる可能性のある HLA-C が検出された。

ATL 細胞に生じる HLA の変化



61. 遺伝的に規定されるNK細胞免疫応答とATLの発症

森島　聡子

琉球大学 大学院医学研究科 内分泌代謝・血液・膠原病内科学講座（第二内科）

Key words：成人T細胞白血病リンパ腫，HLA，NK細胞免疫応答

緒　言

HLAは免疫応答を司る最も重要な分子である。HLAの個人差が免疫応答性を決定し、感染症や自己免疫疾患の疾患感受性に大きく影響する。HLA class IはCD8陽性T細胞への抗原提示をするだけではなく、NK細胞受容体のリガンドとなりNK細胞の機能を制御する。ウイルスが持続感染した細胞やがん細胞ではHLA class I発現レベルの低下が認められ、T細胞から認識されなくなり、NK細胞の攻撃対象となる。NK細胞の機能は活性型受容体・抑制型受容体双方のシグナルバランスによって制御されており、抑制型受容体であるkiller cell immunoglobulin-like receptor（KIR）やNKG2A／CD94が標的細胞のHLAの発現低下を認識して正常と異常細胞を識別する機構はmissing-self応答と呼ばれている。NK細胞が強いmissing-self応答をするためには抑制型受容体からライセンシングを受ける必要がある［1］。抑制型受容体はHLA class Iをリガンドとしており、個人のHLA class Iアレルの組み合わせによってライセンシングを受けるNK細胞の免疫応答性が異なる可能性が報告されている。急性骨髄性白血病に対するIL-2投与による活性化NK細胞の効果を期待した免疫療法でも、患者の所有するHLA-BによるNK細胞のライセンシングが免疫療法の効果に影響する可能性が示されている［2］。我々は成人T細胞白血病リンパ腫（ATL）が予後不良である要因として、ATL細胞に生じるHLA遺伝子異常が免疫回避機構に重要である可能性に着目して研究を進めてきた［3］。特に、HLAの発現が低下した細胞を標的として応答をするNK細胞がATL発症や病勢進展の制御に重要であるという作業仮説を検証することを目的に、ATLに生じるHLAの異常について基盤となるデータを解析し、さらにHTLV-1キャリアからATLの発症に特定のHLAが関与するか探索した。

方　法

1. ATL細胞に生じるゲノムレベルのHLA異常とHLA遺伝子のRNA発現解析

急性型ATL 20例と慢性型ATL 5例の末梢血より、免疫磁気ビーズ法によりCADM1陽性（ATL細胞）と陰性（非ATL細胞）細胞に分離し、各分画よりDNAとRNAを抽出した。

ゲノムに生じるHLA異常の同定については、以下のように実施した。ATL細胞と非ATL細胞の*HLA-A*、*-B*、*-C*、*-DRB1*、*-DQB1*、*-DPB1*遺伝子の塩基配列をlong-range法を用いたsuper high resolution for single molecule-sequence-based typing（SS-SBT）［4］で決定し、非ATL細胞の塩基配列データでHLAアレル型を同定した。各遺伝子座の塩基配列、リード数の両アレル比をATL細胞と非ATL細胞で比較してATL細胞に生じる体細胞変異とLOH（loss of heterozygosity：ヘテロ接合性喪失）を検出した。

ATL細胞におけるHLA遺伝子の発現解析については、Capture-RNA-Seq法［5］により得られたNGSリードをHLAアレルリファレンス配列とマッピングし、HLAアレルのリード数をGAPDHのリード数で補正し、各症例のATL細胞におけるHLAアレルの発現量とした。

2. フローサイトメトリーによる HTLV-1 感染 $CD4^+$T 細胞における HLA の発現量の測定

ATL 患者末梢血単核球を用いてフローサイトメトリーで HLA class I 分子及び HLA-DR 分子の発現を解析し、HTLV-1 感染 $CADM1^+CD4^+$T 細胞の非感染 $CADM1^-CD4^+$T 細胞に対する mean fluorescence intensity（MFI）の比を算出した。HLA class I 及び class II 分子の発現がゲノムの異常や病型によって違いがあるかを検討した。

3. ATL 及び HTLV-1 キャリアの HLA タイピング

NK 細胞の抑制型受容体のリガンドとなっている HLA class I の多型によって規定される NK 細胞応答性が ATL 発症と関係する（HLA によって発症リスクが異なる）可能性を探るため、ATL の発症リスクとなる HLA アレルの検索を以下の方法で実施した。ATL 症例 110 例、HTLV-1 キャリア 70 例の DNA を用いて、Luminex 法による *HLA-A*、*-B*、*-C*、*-DRB1*、*-DQB1*、*-DPB1* のタイピングを実施した。頻度が 3%以上の HLA アレルについて、キャリアを control、ATL を case としてオッズ比を算出し ATL 発症リスクとなるアレルを探索した。

結　果

1.　ATL 細胞に生じるゲノムレベルの HLA 異常と HLA 遺伝子の RNA 発現解析

ATL の急性型 20 症例中 8 症例に LOH を認め、2 例は *HLA-A* ; 2 例は *HLA-B*、*-C* ; 2 例は *HLA-A*、*-C*、*-B* ; 1 例は *HLA-DRB1*、*-DQA1*、*-DQB1*、*-DPA1*、*-DPB1* ; 1 例は *HLA-A* から *-DQB1* のすべての遺伝子に LOH を認めた（図 1a）。20 例中 8 例に 17 個の non-silent variants（NSVs）を認め、*HLA-A* に 8 個、*HLA-B* に 7 個、*HLA-C* に 2 個であった。NSVs の 88%（15／17）が exon 2～4 の間に生じていた（図 1b）[3]。HLA class II 遺伝子には、体細胞変異は認めなかった。ゲノムの解析で HLA class I の LOH や体細胞変異を認めた症例は、RNA 発現も低下している傾向をしめしていた。HLA class II 遺伝子においてはゲノム異常をほとんど認めなかったが、慢性型よりも急性型において発現が低下していた（図 1c）

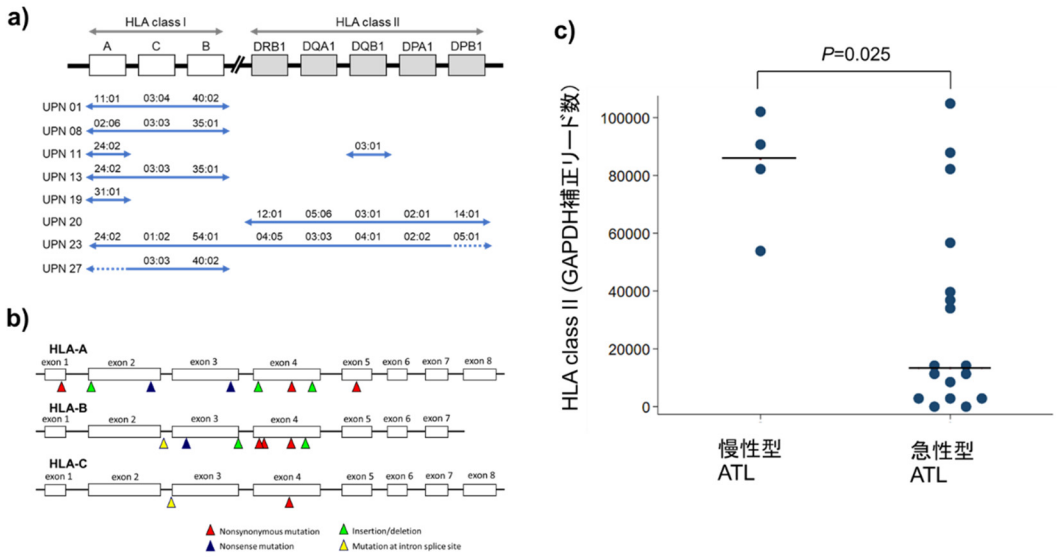


図 1.　ATL 細胞に生じるゲノムレベルの HLA 異常と HLA 遺伝子の RNA 発現

a）　ATL 症例に認めた HLA 遺伝子の LOH の概要。

b）　ATL 症例に認めた HLA 遺伝子の non-silent variants の概要。

c）　慢性型 ATL と急性型 ATL における HLA class II　RNA 発現。統計処理は Wilcoxon rank sum test で行った。

2. フローサイトメトリーによる HTLV-1 感染 CD4⁺T 細胞における HLA の発現量の測定

ゲノムで HLA class I 遺伝子に異常を認めた症例の CADM1⁺CD4⁺T 細胞における HLA class I 分子の発現は、異常を認めない症例と比較して有意に低下していた。

HLA class II（HLD-DR）の発現は、HTLV-1 キャリア 46 例、インドレント ATL 23 例、アグレッシブ ATL 16 例で解析を行なった。HTLV-1 感染 CD4⁺T 細胞は非感染 CD4⁺T 細胞に比べて HLA-DR の発現は高かった。アグレッシブ ATL は、HTLV-1 キャリアとインドレント ATL に比べて発現は有意に低かった（図 2a、b）。

フローサイトメトリーによる CADM1⁺CD4⁺T 細胞の HLA-DR の発現と HLA class II mRNA の発現量は相関していた（図 2c）。

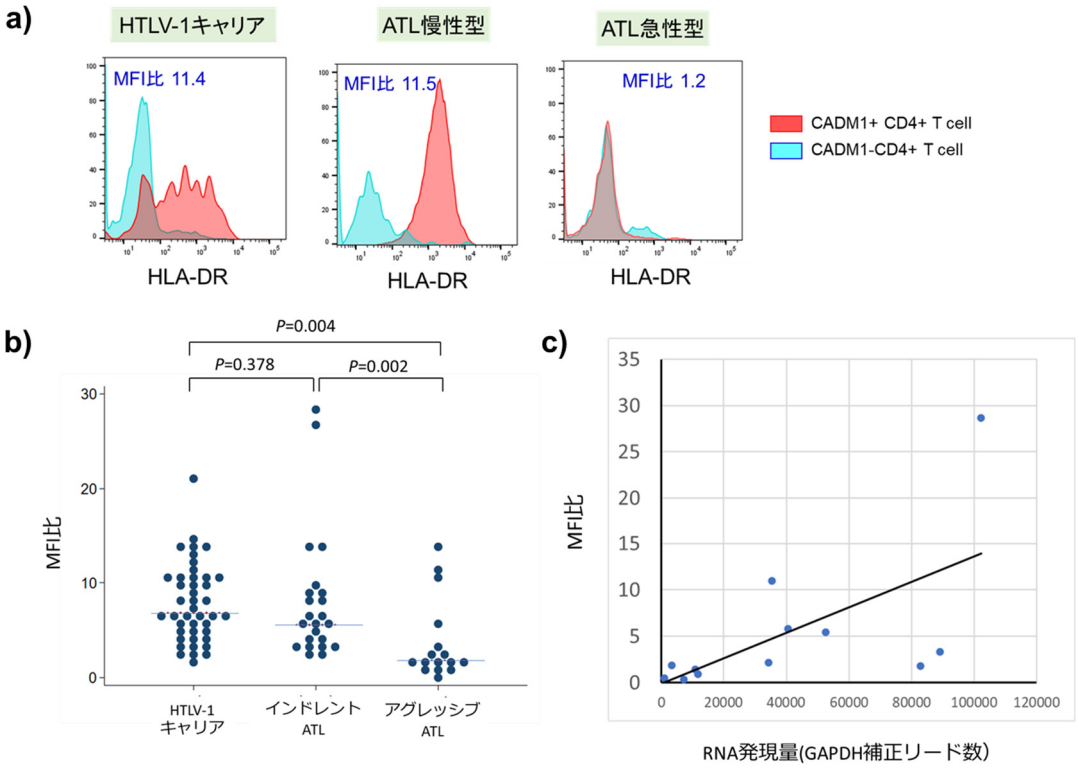


図2. HTLV-1感染CD4⁺T細胞におけるHLA class IIの発現

a) フローサイトメトリーによるCADM1⁺CD4⁺T細胞とCADM1⁻CD4⁺T細胞上のHLA-DR発現の比較。MFI比はCADM1⁻CD4⁺T細胞のMFI／CADM1⁺CD4⁺T細胞のMFIを示す。

b) HTLV-1キャリア、インドレントATL、アグレッシブATLにおけるMFI比の比較。P=0.0008（Kruskal-Wallis test）。各群の比較はWilcoxon rank sum testで実施。

c) フローサイトメトリーによるHLA-DRのMFI比とHLA class II RNAの相関（r=0.61、P=0.034）。

3. ATL 発症リスクとなる可能性のある HLA アレルの検索

検索した HLA の中で、オッズ比が 1.99（95%CI：1.09～3.63、P=0.024）と有意に高い特定の HLA class I アレルが検出された（HLA-C）。本アレルのヘテロ接合体のオッズ比が 1.81（95%CI：0.98～3.36、P=0.060）、ホモ接合体のオッズ比が 4.25（95%CI：0.87～20.61、P=0.073）と相加性を認めたことから、本アレルが ATL 発症のリスク因子となる可能性が示唆された。

考　察

本研究では long-range 法の HLA タイピングを実施して HLA 遺伝子全領域を解析したことで、ATL 細胞に生じる遺伝子異常の特徴を捉えることができた。NSVs は *HLA-A*、*-B* の多く認め、*HLA-C* には少数であった。他のがんでも同様な報告があり［6］、HLA-C は KIR を介して NK 細胞を抑制するため遺伝子異常が生じにくい可能性が示唆される。

HLA class Ⅱ遺伝子についてはゲノムレベルでの異常をほとんど認めなかったが、病期進行に伴い、HLA class Ⅱ遺伝子発現の低下が認められていることから、CIITA やエピゲノムの異常など他の因子が発現低下と関係している可能性が示唆された。

HTLV-1 キャリアと ATL の HLA アレル頻度の解析からは、特定の HLA-C が ATL 発症と関係している可能性が示唆されたことから、遺伝学的に規定される NK 細胞応答性が ATL の発症と関連している可能性があり、NK 細胞の機能解析も含めてさらに解析を進める予定である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東海大学医学部医学科基礎医学系分子生命科学ゲノム医科学研究室の椎名隆教授である。

文　献

1) Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, Lybarger L, Song YJ, Yang L, French AR, Sunwoo JB, Lemieux S, Hansen TH, Yokoyama WM. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. Nature. 2005 Aug 4;436(7051):709-13. doi: 10.1038/nature03847.

2) Hallner A, Bernson E, Hussein BA, Ewald Sander F, Brune M, Aurelius J, Martner A, Hellstrand K, Thoren FB. The HLA-B -21 dimorphism impacts on NK cell education and clinical outcome of immunotherapy in acute myeloid leukemia. Blood. 2019 Mar 28;133(13):1479-1488. doi: 10.1182/blood-2018-09-874990.

3) Tamaki K, Morishima S, Suzuki S, Shigenari A, Nomura I, Yokota Y, Morichika K, Nishi Y, Nakachi S, Okamoto S, Fukushima T, Shiina T, Masuzaki H. Full-length HLA sequencing in adult T cell leukemia-lymphoma uncovers multiple gene alterations. Leukemia. 2021 Oct;35(10):2998-3001. doi: 10.1038/s41375-021-01403-1.

4) Shiina T, Suzuki S, Ozaki Y, Taira H, Kikkawa E, Shigenari A, Oka A, Umemura T, Joshita S, Takahashi O, Hayashi Y, Paumen M, Katsuyama Y, Mitsunaga S, Ota M, Kulski JK, Inoko H. Super high resolution for single molecule-sequence-based typing of classical HLA loci at the 8-digit level using next generation sequencers. Tissue Antigens. 2012 Oct;80(4):305-16. doi: 10.1111/j.1399-0039.2012.01941.x.

5) Yamamoto F, Suzuki S, Mizutani A, Shigenari A, Ito S, Kametani Y, Kato S, Fernandez-Vina M, Murata M, Morishima S, Morishima Y, Tanaka M, Kulski JK, Bahram S, Shiina T. Capturing Differential Allele-Level Expression and Genotypes of All Classical HLA Loci and Haplotypes by a New Capture RNA-Seq Method. Front Immunol. 2020 May 29;11:941. doi: 10.3389/fimmu.2020.00941.

6) Shukla SA, Rooney MS, Rajasagi M, Tiao G, Dixon PM, Lawrence MS, Stevens J, Lane WJ, Dellagatta JL, Steelman S, Sougnez C, Cibulskis K, Kiezun A, Hacohen N, Brusic V, Wu CJ, Getz G. Comprehensive analysis of cancer-associated somatic mutations in class I HLA genes. Nat Biotechnol. 2015 Nov;33(11):1152-8. doi: 10.1038/nbt.3344.