

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

「特発性造血障害に関する調査研究」

分担研究報告書

再生不良性貧血の免疫病態における HLA-B4002 の重要性

研究分担者 中尾眞二 金沢大学医薬保健研究域医学系細胞移植学 教授

研究要旨：新規発症の特発性再生不良性貧血患者の約 25%では、6pLOH によって HLA ハプロタイプを欠失した白血球が検出されるが、そのハプロタイプに含まれるどのクラス I アレルが抗原提示に重要かは不明であった。6pLOH 陽性血球において欠失するハプロタイプに高頻度に含まれるクラス I アレルを検討したところ、HLA-B*40:02 が特に高頻度であった。B4002 に対する抗体を独自に作製し、HLA-B*40:02 再生不良性貧血患者 28 例を対象として B4002 欠失血球を検索したところ、21 例（75%）で B4002 欠失顆粒球が検出され、そのうち 17 例では、B4002 のみを欠失する顆粒球が単独あるいは 6pLOH 血球と共に認められた。B4002 欠失顆粒球の DNA を検索し得た 15 例全例で、HLA-B*40:02 遺伝子にナンセンス変異や frameshift などの変異が検出された。免疫抑制療法を受けた B4002 欠失顆粒球陽性 15 例全例で寛解が得られた。これらの結果から B4002 は、自己免疫性造血不全において、造血幹細胞による細胞傷害性 T 細胞への抗原提示に密接に関与していると考えられた。

A. 研究目的

新規発症の特発性再生不良性貧血患者（aplastic anemia: AA）の約 25%では、6pLOH によって HLA クラス I アレルを欠失した白血球が検出される。これは、特定のクラス I アレルによって提示される自己抗原に特異的な CTL の攻撃を免れた造血幹・前駆細胞が造血を支持しているためと考えられる。しかし、6pLOH では HLA-A、C、B の各アレルを含むハプロタイプが欠失するため、どのアレルが抗原提示に重要かは不明であった。

6pLOH 陽性血球において欠失するハプロタイプに高頻度に含まれるクラス I アレルを検討したところ、HLA-B*40:02 が特に高頻度であった。もし、このアレルが抗原提示に重要な役割を果たしているとすれば、ハプロタイプ欠失だけでなく、B4002 を単独で欠失する白血球が検出されるはずである。最近我々は、HLA-B*40:02(B61)に対す

るモノクローナル抗体の作成に成功した。今回、この抗 B61 抗体を用いて AA 患者における HLA-B*40:02 の欠失頻度を確認するとともに、欠失の原因となる遺伝子変異を検索した。

B. 研究方法

HLA-B*40:02 を有する AA 28 例（6pLOH 陽性 12 例、6pLOH 陰性 16 例）を対象とした。市販の抗 HLA-アレル抗体と、我々が作製した抗 B4002 抗体を用いて、患者末梢血顆粒球における HLA-A および HLA-B*40:02 の欠失の有無をフローサイトメトリーで検索した。HLA-B*40:02 の単独欠失を認めた症例では、欠失顆粒球と欠失のないコントロール顆粒球をソーティングし、HLA クラス I 遺伝子のターゲットシーケンスにより HLA-B*40:02 の遺伝子変異を検索した。

C. 研究結果

6pLOH 陽性の 12 例のうち 9 例（75%）では、

*B*40:02* と同じハプロタイプ上の HLA-A アレルを同時に欠失する 6pLOH 血球とは別に、B4002 のみを単独で欠失した血球が 0.5%から 60%の比率で検出された。6LOH 陰性の 16 例のうち 8 例 (50%)でも、B4002 の単独欠失血球が 0.5%から 99%検出された。結果的に *B*40:02* 陽性の 28 例のうち 21 例 (75%)で 6pLOH もしくは単独欠失による B4002 欠失顆粒球を認めた。*B*40:02* 単独欠失血球陽性の 17 例のうち、HLA 遺伝子のターゲットシーケンスを行えた 15 例全例で、B61 欠失血球に HLA-B*40:02 の体細胞性変異が検出された。HLA-B*40:02 の変異は1人あたり 1 - 7 か所 (中央値 4 か所)、計 49 か所に認め、変異アレル頻度は 0.6%-45% (中央値 4.2%)であった。内訳はナンセンス変異 n=6、ミスセンス変異 n=2、フレームシフト変異 n=39、スプライシング部位の変異 n=2 であった。

D. 考察

*B*40:02* を保有する AA 患者では、6pLOH の他にも複数の遺伝子変異によって B4002 を欠失した白血球が高頻度に検出された。この所見は、HLA-B4002 が提示する自己抗原に特異的な細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocytes: CTL) による造血幹細胞への攻撃が AA の発症に強く関わっており、その抗原を提示できない B4002 欠失造血幹細胞が CTL の攻撃を免れて生き残ったことを示唆している。変異 *B*40:02* アレルを持つクローンのサイズはいずれも小さく、多くの症例で全てを合わせても 50%に達しなかった。検出感度未満の変異クローンがポリクローナルに存在している可能性や、今回の系では検出できないエピゲノム変異による *B*40:02* 欠失を来している可能性がある。

E. 結論

様々なHLAクラスIアレルの中でもHLA-B4002は、AAにおける自己抗原提示に深く関わっていることが示された。B4002陽性AA例の

症例のT細胞や造血幹細胞を検索すれば、AAの自己抗原を同定できる可能性がある。

研究協力施設：北海道大学血液内科、NTT東日本関東病院、京都大学小児科、佐世保市立総合病院血液内科、恵寿総合病院内科、石川県立中央病院血液内科

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Zaimoku Y, Takamatsu H, Hosomichi K, Ozawa T, Nakagawa N, Imi T, Maruyama H, Katagiri T, Kishi H, Tajima A, Muraguchi A, Kashiwase K, Nakao S: Identification of an HLA class I allele closely involved in the autoantigen presentation in acquired aplastic anemia. *Blood* 129:2908-2916, 2017
2. Nakao S, Ishiyama K: Hypomegakaryocytic thrombocytopenia and increased number of PNH-phenotype cells - an emerging subgroup of myelodysplastic syndrome showing frequent response to immunosuppression - RESPONSE to Rafferty & Leach. *Br J Haematol*, 2017
3. Gargiulo L, Zaimoku Y, Scappini B, Maruyama H, Ohumi R, Luzzatto L, Nakao S, Notaro R: Glycosylphosphatidylinositol-specific T cells, IFN-gamma-producing T cells, and pathogenesis of idiopathic aplastic anemia. *Blood* 129:388-392, 2017
4. Espinoza JL, Kotecha R, Nakao S: Microbe-Induced Inflammatory Signals Triggering Acquired Bone Marrow Failure Syndromes. *Front Immunol* 8:186, 2017
5. Elbadry MI, Espinoza JL, Nakao S: Induced pluripotent stem cell technology: A window for studying the pathogenesis of acquired aplastic anemia and possible applications. *Exp Hematol* 49:9-18, 2017
6. Tominaga R, Katagiri T, Kataoka K, Kataoka K,

Wee RK, Maeda A, Gomyo H, Mizuno I, Murayama T, Ogawa S, Nakao S: Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria induced by the occurrence of BCR-ABL in a PIGA mutant hematopoietic progenitor cell. *Leukemia* 30:1208-10, 2016

7. Saito C, Ishiyama K, Yamazaki H, Zaimoku Y, Nakao S: Hypomegakaryocytic thrombocytopenia (HMT): an immune-mediated bone marrow failure characterized by an increased number of PNH-phenotype cells and high plasma thrombopoietin levels. *Br J Haematol* 175:246-251, 2016
8. Nakao S, Gale RP: Are mild/moderate acquired idiopathic aplastic anaemia and low-risk myelodysplastic syndrome one or two diseases or both and how should it/they be treated? *Leukemia* 30:2127-2130, 2016

2. 学会発表

1. Yoshitaka Zaimoku : Molecular and Clinical Advances in AAA and Stress Induced Marrow Dysfunction. The 58th ASH Annual Meeting & Exposition, December 5, 2016, San Diego USA.
2. Tatsuya Imi. HLA Class I Allele-Lacking Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Support Long-Term Clonal Hematopoiesis without Oncogenic Driver Mutations in Acquired Aplastic Anemia. The 58th ASH Annual Meeting & Exposition, December 5, 2016, San Diego USA.
3. Noriharu Nakagawa. Relatively Low Sensitivity of CD109(-) Hematopoietic Stem/Progenitor Cells (HSPCs) to TGF- β : A Possible Mechanism Responsible for the Preferential Commitment of *Piga* Mutant HSPCs in Immune-Mediated Bone Marrow Failure. The 58th ASH Annual Meeting & Exposition, December 5, 2016, San Diego USA.
4. Luis Espinoza: Generation of IPS Cell-Derived Hematopoietic Progenitor Cells from Patients with Acquired Aplastic Anemia Harboring Copy Number Neutral Loss of Heterozygosity of the Short Arm of Chromosome 6. The 57th ASH Annual Meeting & Exposition, December 6, 2015, Orlando, FL USA.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし