

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業）
「特発性造血障害に関する調査研究」
分担研究報告書

観察研究「骨髄不全症患者を対象とした HLA アレル欠失血球の検出」中間報告

研究分担者 中尾眞二 金沢大学医薬保健研究域医学系 血液・呼吸器内科学 教授

研究要旨

再生不良性貧血(再不貧)を始めとする骨髄不全を対象として、免疫病態の存在をもっとも強く反映する HLA クラスⅠアレル欠失血球(HLA-LLs)を検出する全国的な観察研究を、「特発性造血障害に関する調査研究班」参加施設を中心として 2016 年 2 月より開始した。2019 年 1 月現在、44 施設から 192 症例の登録があり、そのうち、154 例で HLA タイピングが終了し、HLA-A、B 座がホモ接合体の 20 例を除く 134 例を対象としてフローサイトメトリー、droplet digital PCR、および次世代シーケンサーを用いたシーケンシングにより HLA-LLs を検出した。その結果、HLA-A アレル欠失血球、6pLOH、HLA クラスⅠアレルの機能喪失型変異のいずれかを認める例は、35 例(26.2%)であった。このうち、8 例は PNH 型血球が陰性であった。HLA クラスⅠアレルのシーケンシングを行ったところ、*B*40:02* に加えて、新たに *HLA-A*02:06*、*A*31:01*、*B*13:01*、*B*40:01*、*B*40:03*、*B*54:01* に機能喪失型変異が同定された。

LLsの検出率は約 25%であったが、これらは治療後

A. 研究目的

再不貧のほとんど、低リスク骨髄異形成症候群(MDS)の一部では、細胞傷害性T細胞(CTL)による造血幹細胞の傷害が骨髄不全を引き起こしていると考えられている。その最も直接的な証拠は、特定の HLA クラスⅠアレルを欠失した白血球(HLA allele-lacking leukocytes: HLA-LLs)の存在である。これは、もともと骨髄中に存在していた HLA クラスⅠアレル欠失造血幹細胞が、自己抗原を提示できないために CTL からの攻撃を免れ、白血球を産生し続ける結果、末梢血に出現すると考えられている。実際に、HLA-LL 陽性再不貧患者のほとんどは免疫抑制療法によって改善することがこれまでの研究によって明らかになっている。

従来の SNP アレイを用いた場合、6pLOH の検出率は高々13%であった。一方、HLA クラスⅠに対するモノクローナル抗体を用いた我々の成績では、HLA-

長期間経過した例を含んでいたため、未治療例における HLA-LLs の陽性率は不明であった。これを明らかにするため、未治療骨髄不全例を対象とする観察研究「骨髄不全症患者を対象とした HLA アレル欠失血球の検出」を 2016 年から開始した。3 年を経過したため、今回は中間解析を実施した。

B. 研究方法

血小板 10 万未満を満たす再不貧、骨髄不全型 PNH、MDS(MDS-RA、MDS-RCMD、MDS-U)、移植後造血不全例を対象として、治療前の EDTA 血 7ml を採取した。HLA をタイピング後、HLA-A2、A24、A26、A31、B61 陽性者に対してはフローサイトメトリーによる HLA-LLs の検出、HLA-A・B のヘテロ接合体に対しては droplet digital PCR による 6pLOH の検出をそれぞれ実施した。一部の例に対しては、次世代

シーケンサーを用いて、6pLOH による欠失が起こりやすいアレルを対象とした変異検出を行った。

C. 研究結果

2019年1月18日現在、44施設から192症例が登録された。内訳は再不貧・骨髄不全型PNH 137例、MDS(MDS-RA、MDS-RCMD、MDS-U) 23例、移植後造血不全例 10例、分類が困難な骨髄不全例 22例であった。HLA タイピング済みの 154例から、HLA-A・B がホモ接合体であったため、解析できなかった 20例を除く 134例中 35例(26.2%)に HLA-LLs または 6pLOH が検出された。この陽性例のうち、8例はPNH型血球が陰性であった。

HLA-LLs または 6pLOH が陽性であった例のうち、*HLA-B*40:02* を保有しない 22例については、自己抗原提示の責任アレルを同定するため、HLA 遺伝子のシーケンシングを行った。その結果 12例に、1症例当たり 1-3種類(中央値 1種類)の機能喪失型変異が同定された。変異を認めた HLA クラス I アレルと症例数はそれぞれ *HLA-A*02:06*(5例)、*A*31:01*(1例)、*B*13:01*(1例)、*B*40:01*(2例)、*B*40:03*(1例)、*B*54:01*(2例)であった。興味深いことに、ナンセンス変異のほとんどは *HLA-A*, *B* exon 1 の特定の箇所に集中していた。

D. 考察

今回の中間解析により、治療前の造血不全例においても、約 30%弱の例に HLA-LLs が検出されることが確認された。これまでの研究で、再不貧における自己抗原提示にもっとも重要なクラス I アレルは B4002 であることが分かっていたが、今回の研究により、さらに、6種類のアレルが自己抗原提示に関わっていることが示唆された。症例登録と HLA 遺伝子変異検索を今後も続けることにより、再不貧の自己抗原に関わる全てのクラス I アレルが明らかになることが期待される。免疫抑制療法に対する反応性と HLA-LLs との関係は今後の解析で明らかにする予定である。

E. 結論

観察研究「骨髄不全症患者を対象としたHLAア

レル欠失血球の検出」の中間解析により、HLA-LLは血小板減少を伴う治療前骨髄不全患者の26.2%に検出されることが明らかになった。2021年3月31日まで本研究を継続する予定である、

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hino T, Imi T, Hangaishi A, Kamoda Y, Iizuka H, Hirao M, Kida M, Tojo A, Nakao S*, Usuki K: Escape hematopoiesis by donor-derived 6pLOH(+) hematopoietic stem cells in a marrow transplant recipient with late graft failure. Bone Marrow Transplant, 2019, in press
2. Elbadry MI, Mizumaki H, Hosokawa K, Espinoza JL, Nakagawa N, Chonabayashi K, Yoshida Y, Katagiri T, Hosomichi K, Zaimoku Y, Imi T, Nguyen MAT, Fujii Y, Tajima A, Ogawa S, Takenaka K, Akashi K, Nakao S*: Escape hematopoiesis by HLA-B5401-lacking hematopoietic stem progenitor cells in men with acquired aplastic anemia. Haematologica, 2019, in press
3. Elbadry MI, Espinoza JL, Nakao S*: Disease modeling of bone marrow failure syndromes using iPSC-derived hematopoietic stem progenitor cells. Exp Hematol 71:32-42, 2019
4. Maruyama K, Aotsuka N, Kumano Y, Sato N, Kawashima N, Onda Y, Maruyama H, Katagiri T, Zaimoku Y, Nakagawa N, Hosomichi K, Ogawa S, Nakao S*: Immune-Mediated Hematopoietic Failure after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Common Cause of Late Graft Failure in Patients with Complete Donor Chimerism. Biol Blood Marrow Transplant 24:43-49, 2018
5. Kawakami T, Sekiguchi N, Kobayashi J, Imi T, Matsuda K, Yamane T, Nishina S, Senoo Y,

Sakai H, Ito T, Koizumi T, Hirokawa M, Nakao S*, Nakazawa H, Ishida F*: Frequent STAT3 mutations in CD8(+) T cells from patients with pure red cell aplasia. Blood Adv 2:2704-2712, 2018

6. Imi T, Katagiri T, Hosomichi K, Zaimoku Y, Hoang Nguyen V, Nakagawa N, Tajima A, Yoshizato T, Ogawa S, Nakao S*: Sustained clonal hematopoiesis by HLA-lacking hematopoietic stem cells without driver mutations in aplastic anemia. Blood Adv 2:1000-1012, 2018
7. Hosokawa K, Sugimori C, Ishiyama K, Takamatsu H, Noji H, Shichishima T, Obara N, Chiba S, Ninomiya H, Shirasugi Y, Nakamura Y, Ando K, Ueda Y, Yonemura Y, Kawaguchi T, Nishimura JI, Kanakura Y, Nakao S*: Establishment of a flow cytometry assay for detecting paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells specific to patients with bone marrow failure. Ann Hematol 97:2289-2297, 2018
8. 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 ANA, Takenaka K, Akashi K, Hamana H, Kishi H, Akatsuka Y, Nakao S*: Hematopoiesis by iPSC-derived hematopoietic stem cells of aplastic anemia that escape cytotoxic T-cell attack. Blood Adv 2:390-400, 2018

2. 学会発表

Mizumaki H, Hosomichi K, Tanabe M, Yoroidaka T, Imi T, Takamatsu H, Zaimoku Y, Ozawa T, Kishi H, Tajima A and Nakao S. Loss-of-function mutations in HLA-class I alleles in acquire aplastic anemia: Evidence for the

involvement of limited class I alleles in the auto-antigen presentation of aplastic anemia. The 60th ASH Annual Meeting & Exposition, December 2, 2018, San Diego 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