

厚生労働科学研究費補助金(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

HLA-DR15 を保有するシクロスポリン依存性再生不良性貧血患者の造血幹前駆細胞では
HLA-DR 欠失が高頻度に行っている

研究分担者 山崎宏人 金沢大学附属病院輸血部・准教授

研究要旨

HLA-DR15 は、後天性再生不良性貧血(acquired aplastic anemia: AA)患者が最も高頻度に保有している HLA 抗原であるが、このクラス II 分子が AA の病態にどのように関与しているのかは不明である。そこで、HLA クラス I アレル欠失(HLA-クラス I[-])血球陽性 23 症例を含む 61 症例の寛解期 AA 患者を対象として、抗 HLA-DR 抗体を用いて末梢血中の造血幹前駆細胞(hematopoietic stem progenitor cell: HSPC)を調べたところ、HLA-DR15 を保有する 7 例(11.5%)において、13.0%-57.1%の HLA-DR 欠失(DR[-])HSPC が検出された。この 7 例は、全例が HLA-クラス I(-)血球陰性であり、また 1 例を除いて全例がシクロスポリン(cyclosporine: CsA)依存性であった。さらに、7 例が共有する DR アレルは *HLA-DRB1*15:01* と *DRB1*15:02* に限られていた。ソーティングで得た DR(-)HSPC をインターフェロンの存在下で 72 時間培養したところ、HLA-DR 発現は完全に回復した。遺伝子発現プロファイルを DR(-)HSPC と DR(+)HSPC 間で比較したところ、DR(-)HSPC では、CD48 や CD86 などの共刺激分子の遺伝子発現の低下がみられた。発作性夜間ヘモグロビン尿症(paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: PNH)形質と非 PNH 形質の両 HSPC が評価できた 4 例では、DR 欠失は非 PNH 形質の HSPC のみに認められた。以上の所見から、HLA-DR15 を保有する CsA 依存性 AA 患者では、HLA-DR15 が提示する自己抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞からの攻撃を免れるために HSPC が DR を低下させており、同じ T 細胞は、PNH 型 HSPC のエスケープ現象にも関与していることが示唆された。

A. 研究目的

HLA-DR15 をコードする *HLA-DRB1*15:01* と *DRB1*15:02* は、日本人 AA 患者において最も高頻度に検出される HLA アレルである。その中でも *HLA-DRB1*15:01* 陽性例は、CsA に反応して改善しやすいものの、高率に CsA 依存性となることから、AA の免疫病態に深く関与していることが想定されてきた。また、このアレルは PNH 患者でも高頻度に検出されることから、PNH への移行を促す免疫反応にも関わっていると考えられてきた。しかし、それらの機序は全く分かっていない。

一方、HLA 不適合ドナーからの造血幹細胞移植

後に再発した急性骨髄性白血病(acute myeloid leukemia: AML)細胞では、HLA クラス II の発現低下がしばしばみられることが近年報告された。これは、不適合 HLA クラス II を認識するドナー CD4 陽性 T 細胞が、AML 再発を防ぐうえで重要な役割を果たしていることを示している。AA においても、HSPC 上の HLA クラス II が提示する自己抗原特異的な CD4 陽性 T 細胞が AA の発症に関わっており、その結果として、HLA クラス II の発現を低下させた HSPC が存在している可能性がある。

この仮説を検証するため、本研究では、免疫抑制療法後に改善した AA 症例を対象として、HLA-DR

分子の発現を検討した。

B. 研究方法

寛解状態にある AA56 例、PNH5 例、健常者 20 例から同意を得て全血 7ml を採取し、単核細胞中の CD45^{dim}CD34⁺CD38⁺細胞における HLA-DR 発現を抗 HLA-DR モノクローナル抗体を用いて解析した。21 例は CsA 依存性で、そのうち 74%が PNH 型血球、38%が HLA クラス I(-)白血球を保有していた。一部の症例については、FACSソートした DR(-)HSPC と DR(+HSPC から RNA を抽出し、cDNA 合成後 NovaSeq 6000 を用いて両者間の遺伝子発現を比較した。

C. 研究結果

1. HLA-DR15 を保有する 7 例 (11.5%) において、13.0%-57.1%の HLA-DR 欠失 (DR[-]) HSPC が検出された。この 7 例は全例が HLA-クラス I(-)血球陰性であり、また 1 例を除いて全例が CsA 依存性であった。7 例が共有する DRB1 アレルは *HLA-DRB1*15:01* と *DRB1*15:02* に限られていたことから、発現低下の標的遺伝子は、これらの DR15 遺伝子であると考えられた。
2. ソーティングで得た DR(-)HSPC をインターフェロン γ の存在下で 72 時間培養したところ、HLA-DR の発現は完全に回復した。また、HLA-DR の発現低下は、同じ患者の B 細胞では全くみられなかった。このため、HSPC における DR 発現の低下はエピジェネティックな機序によるものと考えられた。
3. DR(-)HSPC と DR(+HSPC 間で遺伝子発現プロファイルを比較したところ、DR(-)HSPC では、CD48 や CD86 などの共刺激分子の遺伝子発現が、DR(+HSPC に比べて有意に低下していた。これらの蛋白発現の低下は、フローサイトメトリーでも確認された。この共刺激分子の遺伝子

発現低下は、同種造血幹細胞移植後に再発し、HLA クラス II 発現が低下した AML 細胞の報告と同様であった。

4. PNH 形質と非 PNH 形質の両 HSPC が評価できた 4 例では、DR 欠失は非 PNH 形質の HSPC のみに認められた。この所見は、PNH 型 HSPC が CD4 陽性 T 細胞からの攻撃を免れるためには、HLA-DR の発現を低下させる必要がないことを示唆している。

D. 考察

CsA 依存性の HLA-DR15 陽性 AA 患者において HLA-DR の欠失が高頻度に見られたことから、これらの患者においては、HLA-DR15 が提示する自己抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞によって HSPC が持続的に攻撃されていることが強く示唆された。したがって、このような症例の CD4 陽性 T 細胞を検索すれば、HLA-DR15 保有 AA における自己抗原を同定できる可能性が高いと考えられる。

PNH 型 HSPC において DR 発現低下が見られなかったことは、HSPC は GPI アンカー膜蛋白を欠失させるだけで CD4 陽性 T 細胞の攻撃から逃れられることを示している。*PIGA* 変異 HSPC が生存優位性を獲得する主な機序は、GPI アンカー型共刺激分子の欠失である可能性がある。

免疫抑制療法によって改善した AA 患者において CsA を中止できるか否かは主治医や患者にとって重大な問題である。*DRB1*15:01* を保有していることはそれ自身が CsA 依存性の危険因子であるが、その保有例すべてが CsA 依存性になる訳ではない。末梢血 HSPC における HLA-DR の発現を調べることは、CsA を中止できるか否かの判断に役立つ可能性がある。

E. 結論

HLA-DR15 を保有する CsA 依存性 AA 患者の HSPC では HLA-DR 欠失が高頻度に起こっている。

HSPC に DR 欠失を促す CD4 陽性 T 細胞は、*PIGA* 変異幹細胞のエスケープにも関与している可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoroidaka T, Hosokawa K, Imi T, Mizumaki H, Katagiri T, Ishiyama K, Yamazaki H, Azuma F, Nanya Y, Ogawa S, Nakao S. Hematopoietic stem progenitor cells lacking HLA differ from those lacking GPI-anchored proteins in the hierarchical stage and sensitivity to immune attack in patients with acquired aplastic anemia. *Leukemia*. 2021; 35: 3257-67.
2. Nakagawa N, Ishiyama K, Tanabe M, Yoroidaka T, Mizumaki H, Imi T, Zaimoku Y, Maruyama H, Hosokawa K, Yamazaki H, Nakao S. The effectiveness of immunosuppressive therapy in patients with aplastic anaemia secondary to chemoradiotherapy for cancers. *Br J Haematol*. 2021; 195: 770-80.
3. Tanabe M, Hosokawa K, Nguyen MAT, Nakagawa N, Maruyama K, Tsuji N, Urushihara R, Espinoza L, Elbadry MI, Mohiuddin M, Katagiri T, Ono M, Fujiwara H, Chonabayashi K, Yoshida Y, Yamazaki H, Hirao A, Nakao S: The GPI-anchored protein CD109 protects hematopoietic progenitor cells from undergoing erythroid differentiation induced by TGF-beta. *Leukemia*. 2022; 36: 847-55.
4. Tsuji N, Hosokawa K, Urushihara R, Tanabe M, Katagiri T, Ozawa T, Takamatsu H, Ishiyama K, Yamazaki H, Kishi H, Ogawa S, Nakao S: Frequent HLA-DR loss on hematopoietic stem progenitor cells in patients with cyclosporine-dependent aplastic anemia carrying HLA-DR15. *Leukemia*, 2022, in press.

2. 学会発表

1. Tsuji N, et al: Glycosylphosphatidylinositol-anchored protein deficiency confers resistance to antigen-specific T cells on hematopoietic stem progenitor cells in aplastic anemia patients with HLA-DR15. 26th Congress of EHA 1508, June 9, 2021. Vienna (virtual).

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許出願

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし