

## HLA クラス I アレル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

### 【研究の背景】

特発性再生不良性貧血(acquired aplastic anemia, AA)は 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。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。応募者ら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<sup>1)</sup>。

### 【目 的】

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 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<sup>+</sup> T 細胞を単離し、単球から iPS 細胞を作製し、6pLOH 陽性・陰性のそれぞれの HPSC を誘導する。
- ②上記 AA 患者の CD8<sup>+</sup> 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 トランスフェクタントを作製する。
- ③HLA-B4002、B5401 などの特定の HLA を発現させた K562 細胞に CD80・CD137L を導入した人工抗原提示細胞を作製し、TCR トランスフェクタントの 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 IFN $\gamma$  の ELISA 法により決定する。
- 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、nanoLC-MS/MS で解析することにより、特定の HLA 分子により提示されるペプチドを同定する。
- 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 トランスフェクタントとの反応性を評価する。

### 【結 果】

- HLA クラス I アレル欠失陽性 AA 患者の CD8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 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 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。
- 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、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。

- 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反応が減弱していた。

### 【考 察】

今回同定された TCR トランスフェクタントは発症時の骨髄 PD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞にも検出され、HLA-B4002 拘束性に iPSC 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可能性が高い。nanoLC-MS/MS により同定された HLA-B4002 に提示されるペプチドの一つを CRISPR/Cas9 を用いてノックアウトしたところ、TCR トランスフェクタントの反応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否かを明らかにする予定である。

### 【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究により AA の自己抗原が同定されれば、これまでの抗胸腺細胞グロブリン(ATG)やシクロスポリンなどの T 細胞を標的とする非特異的な免疫抑制療法とは異なる「特定の自己抗原に対する免疫反応を抑制する新規治療薬」という革新的な治療方法が開発できる可能性が高い。

また、臓器特異的自己免疫疾患において、自己抗原や自己抗原特異的 T 細胞を同定したという報告はこれまでにないことから、同様の方法を用いることにより、AA 以外の他の自己免疫疾患における自己抗原や、悪性腫瘍における腫瘍特異抗原の同定につながることを期待される。

### 【参考・引用文献】

1. Espinoza JL, Elbadry MI, Chonabayashi K, et al. Hematopoiesis by iPSC-derived hematopoietic stem cells of aplastic anemia that escape cytotoxic T-cell attack. *Blood Adv.* 2018;2(4):390-400.