

(甲種)

論 文 要 旨

学 位 論 文

表 題 慢性移植片対宿主病における、同種抗原の産生機構の解明

申 請 者 氏 名 海野 健斗

担当指導教員氏名 神田 善伸 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
専攻 地域医療学系
専攻分野 血液・免疫疾患学
専攻科 血液病学

使用文字数 3175 字

論 文 要 旨

氏名 海野 健斗

表題

慢性移植片対宿主病における、同種抗原の産生機構の解明

1 研究目的

同種造血幹細胞移植は、造血器疾患に対する根治的な治療法である。移植片対宿主病 (Graft-versus-host disease: GVHD) は、ドナー由来の免疫細胞がレシピエントを異物とみなすことにより生じる。慢性 GVHD は、同種移植後の晩期合併症の 1 つであり、自己免疫疾患と類似した臨床的特徴を有する。

慢性 GVHD 発症のリスクとして、女性ドナーから男性レシピエントへの同種移植 (female-to-male allogeneic hematopoietic stem cell transplantation : F-to-M 移植) があげられる。F-to-M 移植では、Y 染色体にコードされる H-Y 抗原に対する同種抗体 (抗 H-Y 抗体) が出現する。抗 H-Y 抗体の出現は、慢性 GVHD 発症のリスク因子となる。しかし、H-Y 抗原は一般に男性生殖器官の細胞内に局在するために、慢性 GVHD の標的組織において、どのように細胞表面に表出するかは解明されていない。

自己免疫疾患の領域では、特定のヒト白血球抗原 (Human leukocyte antigen : HLA) class II アレルが疾患発症のリスク因子となる。最近、自己免疫疾患の領域で、疾患感受性 HLA class II アレルがミスフォールド蛋白質と複合体を形成し、蛋白質を full-length で細胞表面上に提示することで、抗原特異的な B 細胞を活性化し、自己抗体産生を誘導することが報告された。この報告は、疾患感受性 HLA class II アレルと自己抗体産生との関係を説明する上で極めて重要である。

そこで、慢性 GVHD において、H-Y 抗原が full-length で HLA class II と複合体を形成し細胞表面に表出し、H-Y 抗体の産生に寄与するのではないかと仮説をたてた。

本研究では、慢性 GVHD の同種抗体産生における同種抗原 (H-Y 抗原) の産生機構の解明に焦点をあて、① F-to-M 移植において、慢性 GVHD 発症リスク HLA class II アレルが存在するか。② full-length H-Y 抗原は HLA class II と複合体を形成するか。③ H-Y 抗原/HLA class II 複合体が同種抗体に対する抗原に相当するか。④ 特定の HLA class II アレルが H-Y 抗原と複合体を形成しやすいことで慢性 GVHD の発症誘因となるか。⑤ 慢性 GVHD 標的組織における H-Y 抗原/HLA class II 複合体の発現部位はどこか。⑥ H-Y 抗原/HLA class II 複合体は移植片対白血病 (Graft-versus-leukemia : GVL) 効果の共通抗原となりうるかについて解明する。

本研究で、同種抗原である H-Y 抗原/HLA class II 複合体形成の発現機構を通して、慢性 GVHD の病態解明を目指した。

2 研究方法

造血細胞移植レジストリデータを用いて、特定の HLA class II アレルが F-to-M 移植において、慢性 GVHD 発症のリスク因子となるか解析した。

続いて、ヒト細胞株に、リスク因子として同定された HLA class II アレルと H-Y 抗原を遺伝子導入し、細胞表面に H-Y 抗原/HLA class II 複合体が形成されるか、フローサイトメトリー、共免疫沈降法、近接ライゲーシオンアッセイを用いて解析した。

作成した H-Y 抗原/HLA class II 複合体を発現したヒト細胞株を用いて、患者血漿中の H-Y 抗原/HLA class II 複合体を認識する抗体の有無と慢性 GVHD 発症の関連について解析した。

続いて、H-Y 抗原/HLA class II 複合体の形成が HLA class II 依存性であるかどうか検討するために、様々な HLA-DRB1 アレルと H-Y 抗原をヒト細胞株に遺伝子導入し、H-Y 抗原/HLA class II 複合体形成量を比較した。

H-Y 抗原/HLA class II 複合体が、実際の体内で形成されているか検討するために、慢性 GVHD を発症した症例の皮膚組織を用いて近接ライゲーシオンアッセイを用いて解析した。

最後に、白血病細胞株、男性白血病検体において H-Y 抗原/HLA class II 複合体が発現し、GVL 効果の標的抗原となりうるか、近接ライゲーシオンアッセイを用いて解析した。

3 研究成果

レジストリデータの解析より、F-to-M 移植において、慢性 GVHD 発症リスクを増加させる因子として HLA-DRB1*15:02、減少させる因子として HLA-DRB1*09:01、HLA-DRB1*12:01 が同定された。

フローサイトメトリーの解析より、HLA class II は、細胞内蛋白質である H-Y 抗原を細胞表面へ輸送するのに必須の役割を果たした。特に、H-Y 抗原の中でも、DEAD-box helicase 3 Y-linked (DBY) が最も細胞表面に表出した。共免疫沈降法、近接ライゲーシオンアッセイの解析より、full-length DBY が HLA class II と複合体を形成していることが示された。DBY/HLA class II 複合体を認識する抗体を有している F-to-M 移植症例は、有意に慢性 GVHD の発症率が高く、DBY/HLA class II 複合体は慢性 GVHD の標的抗原であった。

慢性 GVHD の標的抗原として同定された DBY/HLA class II 複合体の形成は、HLA-DRB1 アレル依存性であった。慢性 GVHD 発症のリスクを増加させる HLA-DRB1*15:02 では、複合体の形成量が最も多く、一方で、慢性 GVHD 発症のリスクを低下させる、HLA-DRB1*09:01、HLA-DRB1*12:01 では、複合体の形成量は少なく、複合体の形成と慢性 GVHD 発症に関連があった。

DBY/HLA class II 複合体は、慢性 GVHD 症例の皮膚組織の真皮の血管内皮に発現しており、血管内皮が慢性 GVHD の標的部位であった。さらに、DBY/HLA class II 複合体は、一部の白血病細胞株、白血病検体で発現しており、慢性 GVHD と GVL 効果の共通抗原となりうることを示された。

4 考察

DBY/HLA class II 複合体は、皮膚の血管内皮細胞に発現し、慢性 GVHD の標的抗原であった。複合体の形成は HLA class II アレル依存性であり、複合体の形成量と慢性 GVHD の発症に関連があった。これまで、慢性 GVHD の標的細胞は未解明であったが、DBY/HLA class II 複合体の解析により、血管内皮細胞が初期の慢性 GVHD の標的細胞であると示唆された。

慢性 GVHD と GVL 効果の標的抗原についても、今まで未解明であったが、DBY/HLA class II 複合体が白血病細胞の一部で発現していることより、慢性 GVHD における DBY/HLA class II 複合体が、GVL 効果の共通抗原である可能性が考えられた。

(甲種)

5 結論

本研究で、特定の HLA class II アレルが、皮膚の血管内皮細胞に DBY を表出させ、F-to-M 移植後の慢性 GVHD の重要なリスク因子となることを同定した。このことは、慢性 GVHD の病態において、HLA class II アレルと血管内皮細胞が重要な役割を果たすことを示した。さらに、白血病細胞で DBY/HLA class II 複合体が発現していることを解明し、DBY/HLA class II 複合体が慢性 GVHD と GVL 効果の共通の標的抗原として機能しうることが解明された。