

氏 名	海 野 健 斗
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	甲第 675 号
学位授与年月日	令和 5 年 3 月 23 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	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
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教 授 大 森 司 (委 員) 教 授 花 園 豊 准教授 大 西 康 晴

## 論文内容の要旨

### 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、近接ライゲーショ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ョ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、近接ライゲーショ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、近接ライゲーショ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が示された。

## 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。

## 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。

## 論文審査の結果の要旨

本研究において申請者は、女性から男性への同種造血幹細胞移植（F to M 移植）が Y 染色体にコードされる H-Y 抗原に対する同種抗体の発生によって、慢性移植片対宿主病（cGVHD）のリスクであることに着目した。実際の移植レジストリデータを用いた臨床研究、ならびに細胞を用いた基礎研究によって、H-Y 抗原が細胞表面に表出するメカニズム、及び cGVHD 発症との関連を論理的に明らかにした。論文の骨子は以下の通りである。

レジストリデータの解析から、F to M 移植の cGVHD 発症に特定の HLA-DRB アレルが関与することを明らかにした。また HLA class II は細胞内タンパク質である H-Y 抗原 DBY と複合体を形成して、全長で細胞表面に表出することを見出した。この DBY の細胞表面への発現には特定の HLA class II アレルに依存していた。この複合体の形成が cGVHD 発症と関係していた。臨床検体を用いた解析により、DBY/HLA class II 複合体は、真皮の内皮細胞に発現しており、これが cGVHD の標的であることが示唆された。

本研究は、cGVHD の発症リスクである F to M 移植に生じる同種抗体について、H-Y 抗原が全長のタンパク質のまま HLA class II に発現する、という興味深い知見を見出しただけでなく、特定の HLA アレルがタンパク質の表出に関与し、かつ臨床でも実際に cGVHD の危険因子となることを見出した。本研究は、基礎研究にとどまらず、臨床的に重要な知見を導き出した点においても価値が高い。

本学位論文は英文原著論文として投稿され、学位論文として十分な質を有しており、若干の文章の修正をもって合格とした。

## 最終試験の結果の要旨

申請者は学位論文にそって研究内容の発表を行った。背景から研究の必要性、その目的を明確に述べ、専門外の評価委員に十分に研究内容が理解できるように説明し、考察を適切に述べた。

発表の内容は論文審査の結果に述べた通りである。すべての審査員が基礎研究の内容が適切に行われていること、ならびに研究の臨床的な意義の高さを評価した。研究内容について疑義はなく、審査員からは以下のような質問や修正点が挙げられた。

- 1) 急性 GVHD のリスクとの違いについて。
- 2) 他の臓器移植との相違について。
- 3) 同性 (M to M) でも同様の抗原が GVHD の原因となりうるかについて。
- 4) 皮膚以外の組織における DBY/HLA class II 複合体の発現について。
- 5) その他、誤字脱字、略語の修正などの微修正。

申請者は審査委員からの質問についての的確に返答することができ、かつ指摘された点に対して、適切に論文を修正した。

以上より、発表、質疑応答の内容、及び修正された学位論文から研究者として十分な資質を有しており、医学博士号に値すると判断し、最終試験に合格とした。