

## 新規抗原同定法を用いた再生不良性貧血における自己抗原の探索



金沢大学附属病院高密度無菌治療部・助教 細川 晃平

### 背景・目的

特発性再生不良性貧血（acquired aplastic anemia, AA）は汎血球減少を特徴とする血液難病であり、抗胸腺細胞グロブリンやシクロスポリンなどの免疫抑制療法が奏効することから、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と考えられる。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、現時点でCTLの標的となる自己抗原は不明である。（図1）これまでの研究において、AAの自己抗原提示に最も重要な役割を果たすHLAクラスIアレル（HLA-B\*40:02）を同定するとともに、このアレルを有する患者由来の細胞傷害性T細胞株が、自己のiPS細胞由来造血幹前駆細胞（HSPC）をHLA-B4002拘束性に傷害することを明らかにしてきた。本研究の目的は、HLA-B4002が提示するAAの自己抗原を明らかにすることである。

### 方法

- ① 野生型HSPCは傷害するが、B4002欠失HSPCは傷害しないCTL クローンから細胞傷害活性を持つCTLのTCRクロナタイプを決定し、健常者のT細胞とレトロウイルスを用いてTCR導入T細胞を作製した。
- ② HLA-B4002、B5401などの特定のHLAを発現させたK562細胞にCD80・CD137Lなどの共刺激分子を導入した人工抗原提示細胞を作製し、TCR導入T細胞の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法により決定した。
- ③ HLA 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、酢酸バッファーを用いてnanoLC-MS/MSで解析することにより、HLA分子により提示されるペプチドを同定した。
- ④ ③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、②で決定したTCR導入T細胞との反応性をIFN $\gamma$ のELISA法により評価した。

### 結果

CTLクローンの中で、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陽性CD8陽性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導入T細胞は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HLAクラスI抗体により免疫沈降を行い、nanoLC-MS/MSで解析した

ところ、15個のペプチドが同定されたが、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。それらのペプチドのうち、造血幹細胞の増殖に重要な役割を果たしている特定の遺伝子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導入T細胞の反応を評価したところ、コントロールと比較して有意に反応が減弱していた。

## 考 察

AA研究において、造血幹細胞を攻撃しているCTLの実態やその標的抗原は長年不明であった。その大きな理由としては、発症時既に骨髄が枯渇していることから、十分な造血幹細胞が得られず、病態研究が困難であるという問題があった。今回同定されたTCR導入T細胞は発症時の骨髄PD-1陽性CD8陽性T細胞にも検出され、HLA-B4002拘束性にiPS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あると考えられた。nanoLC-MS/MSにより同定されたHLA-B4002に提示されるペプチドのなかから、特定の遺伝子をCRISPR/Cas9を用いてノックアウトしたところ、TCR導入T細胞の細胞傷害活性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り、さらに検証を進めていく必要がある。本研究をさらに継続・発展することにより、効果的かつ副作用の少ない新たな治療法開発につなげたい。

## 謝 辞

最後になりましたが、本研究に多大なるご支援を頂きました、難病医学研究財団の皆様、さらに、財団へご寄付くださいました方々に心よりお礼申し上げます。今後、難病の克服に向け、より一層研究に励んで参ります。

図1. HLA クラス I アレルを欠失した造血幹細胞の細胞傷害性 T 細胞からのエスケープ

