

主論文の要旨

**Integration of humoral and cellular HLA-specific
immune responses in cord blood allograft rejection**

〔 臍帯血移植片拒絶症例における HLA 特異的液性免疫と
細胞性免疫の協働作用 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 血液・腫瘍内科学分野

(指導：清井 仁 教授)

葉名尻 良

【背景】

同種造血幹細胞移植後の移植片拒絶は未だ重大かつ致死的な合併症であり、とくに HLA 不適合移植の一つである臍帯血移植では約 20%に認められる。移植片拒絶の正確な機序は完全には解明されていないが、ドナー造血幹細胞に対するレシピエント由来の細胞性免疫が最も重要な役割を果たしていると考えられている。一方、近年、レシピエントが保有するドナーHLA 特異的抗体 (DSA) の存在と移植片拒絶の関連が統計学的に示されている。しかしながら、抗体の直接的な細胞障害作用によるものか、または単に細胞性免疫の代替マーカーであるのか議論となっている。本研究では、臍帯血移植片拒絶症例において患者検体を用い、DSA とドナーHLA 特異的 T 細胞の拒絶に対する作用について検討した。

【方法】

臍帯血移植後の移植片拒絶症例において、移植前または拒絶時患者血清中に DSA が存在するかを Luminex 法にて検討した。DSA を含む患者血清を用い骨髄単核球のコロニー形成試験を行い、DSA の CDC 活性および ADCC 活性について検討した。拒絶時患者末梢血単核球より、限界希釈法にて T 細胞クローンを分離し、⁵¹Cr 放出試験により細胞傷害活性を評価した。T 細胞クローンの HLA 拘束性について HLA 阻害試験で、抗原特異性については HLA 分子を遺伝子導入した COS 細胞を刺激細胞とした IFN- γ ELISA 法にて検討した。T 細胞クローンの拒絶作用について、骨髄単核球のコロニー形成試験で確認した。移植前または拒絶時患者末梢血を用い、5' RACE PCR 法と次世代シーケンサーを組み合わせて T 細胞受容体 β 鎖レパトア解析を行った。

HLA 抗体陽性患者において、HLA 分子を遺伝子導入した 721.221 細胞にて患者 CD8 陽性細胞を刺激し、IFN- γ ELISPOT 法を行った。

【結果】

まず液性免疫の拒絶に対する関与について検討した。拒絶時の患者血清よりドナー不適合 HLA である HLA-B*54:01 に対する DSA が検出された。この DSA を含む患者血清とウサギ補体またはヒト補体を用いた CDC 活性は確認できなかったが、患者 NK 細胞を用いた ADCC 活性により、HLA-B*54:01 を有する骨髄単核球のコロニー形成能阻害が認められた。よって液性免疫の拒絶への直接的な関与が示唆された。次に細胞性免疫の拒絶に対する関与について検討した。拒絶時の患者末梢血より限界希釈法により 2 つの患者由来 T 細胞クローン、CD8 陽性 CTL#1 および CD4 陽性 CTL#2 が分離され、⁵¹Cr 放出試験によりドナー細胞に細胞障害活性を示し患者細胞には示さない CTL クローンであることが確認された (Figure 1a)。T 細胞受容体 β 鎖レパトア解析では、CTL#1 および CTL#2 はそれぞれ拒絶時に末梢血 T 細胞中の 9.9%および 1.3%を占めていた (Figure 1b)。CTL#1 は不適合ドナーHLA である HLA-B*54:01 を、CTL#2 は HLA-DRB1*15:02 を認識することが IFN- γ ELISA 法にて確認された (Figure 1c-f)。さらに CTL#1 および CTL#2 は HLA-B*54:01 または HLA-DRB1*15:02 を有する骨髄単核

球のコロニー形成能をそれぞれ阻害した (Figure 1g-h)。よって細胞性免疫も拒絶に関与したことが示唆された。

次に移植前に DSA およびドナーHLA 特異的 CTL が存在したかについて検討した。移植前患者血清からも HLA-B*54:01 に対する DSA が検出された。また移植前患者末梢血より CDR3 配列に特異的なプライマーを用いた PCR 法にて CTL#1 が検出可能であり、T 細胞受容体β鎖レパトア解析では末梢血 T 細胞中の 0.007%を占めていた。CTL#2 については検出できなかった。よってドナー不適合 HLA-B*54:01 に対する DSA および CTL#1 は移植前より存在していた。

最後に HLA 抗体の存在が同一 HLA を認識する T 細胞の存在を示すマーカーとなるか、HLA class I 分子を遺伝子導入した 721.221 細胞にて同一 HLA 抗体陽性患者 CD8 陽性細胞を刺激し、IFN-γ ELISPOT 法を行った。自己 HLA や無関係な HLA で刺激した場合と比較し、HLA 抗体と同一の HLA で刺激した場合に、より多くの IFN-γ スポット数が認められた (Figure 2a-c)。

【考察】

本研究では臍帯血移植片拒絶症例において、ドナー不適合 HLA-B*54:01 を認識する HLA 抗体と HLA 特異的 T 細胞の両者が移植片拒絶に関与していることを示した。さらに HLA-B*54:01 を認識する DSA と CTL は移植前より存在しており、移植前に輸血などで HLA-B*54:01 抗原に感作された際にヘルパーT 細胞を介して、同時期に産生された可能性が考えられた。また CTL が拒絶時にクローナルに増大し、拒絶を引き起こしていることがヒト検体で証明された。今回の検討では、HLA-DRB1*15:02 を認識する CTL は移植前に検出できなかったが、アッセイの感度不足によるもの、または移植後に新たに産生された可能性が考えられた。

移植前の HLA 抗体検査は簡便に行われている一方で、HLA 特異的 T 細胞の検出は一般的に困難である。本研究により、HLA 抗体保有患者では、同じ HLA を標的とする T 細胞も存在していると考えられた。しがたって、レシピエントが DSA を保有する場合には、血漿交換やリツキシマブなどの HLA 抗体を減量する処置だけでは生着には不十分であり、その機序として HLA 特異的 T 細胞の関与が考えられた。

【結語】

HLA 不適合移植では HLA 特異的な液性免疫と細胞性免疫の両者が移植片拒絶に関与していることが示唆された。また HLA 抗体の存在は、同一 HLA を標的とする特異的 T 細胞のマーカーとなる可能性がある。