

造血幹細胞による非自己抗原提示と免疫回避

東京大学医科学研究所
幹細胞治療研究センター幹細胞分子医学分野
山下 真幸

【背景および目的】

ヒトやマウスなどの成体哺乳動物において、すべての血球細胞は骨髄にごく少数存在する造血幹細胞によって供給・維持される。したがって、造血幹細胞の量・質の制御は血液の恒常性維持に極めて重要である。造血幹細胞はDNA損傷や炎症といった細胞内外の変化を鋭敏に感知し適応する能力を備えており、これは前駆細胞や成熟細胞では見られない。例えば、前駆細胞が死滅するような放射線照射を受けた場合でも、大部分の造血幹細胞はDNA損傷を速やかに修復し生存する一方、修復不能に陥ったものは積極的に細胞死を誘導し、変異の蓄積と白血病発症を防ぐ¹。また、炎症の重要なメディエーターであるTNF- α は前駆細胞にアポトーシスを誘導する一方、造血幹細胞にはNF- κ Bの活性化を介した生存と造血再生を促すが、造血器腫瘍ではこの作用が恒常的に活性化している²。このように、造血幹細胞の生死は厳密かつユニークに制御されており、その破綻は様々な造血異常を引き起こす。

近年、個体老化とともに造血幹細胞レベルでのゲノム異常が蓄積しクローン性の造血に至ることが明らかにされ、骨髄異形成症候群や白血病などの造血腫瘍が発症する素地として知られるようになった³。造血幹細胞は定常状態ではそのほとんどが細胞周期のG₀期、いわゆる静止状態に維持され、それゆえDNA2本鎖損傷が非相同末端結合によって不完全に修復されるなど、変異獲得に対する特有の脆弱性が指摘されている⁴。通常、変異した遺伝子産物は生来存在しなかった「非自己」抗原であり、MHC class-I (MHC-I) 分子上に提示されると抗原特異的な細胞障害性T細胞に認識され、変異細胞は排除される。しかし、MHC-Iを介した非自己抗原の提示機構が造血幹細胞レベルで機能するかを直接検討した研究はまだまだなく、そのため遺伝子変異が造血幹細胞にどのようにして固定され、クローン造血が生じるかについてはよくわかっていない。そこで本研究では、モデル抗原であるOVAを発現する造血幹細胞と、OVAに特異的な細胞障害性T細胞との相互作用を解析することにより、T細胞免疫系を介した非自己造血幹細胞の排除機構、およびそれが破綻するメカニズムを明らかにしようと試みた。

【方法】

骨髄キメラマウスの作製およびT細胞養子移植

Act-mOVAマウス (JAX: 005145) より得たOVA発現 (OVA⁺) 骨髄細胞を致死量放射線照射したレシピエントマウスに移植し、骨髄キメラマウスを作製した。移植後8週の時点で、MACSを用いてOT-Iマウス (JAX: 003831) 脾臓より単離したCD8⁺ T細胞を養子移植した。養子移植後の末梢血における各血球細胞数を全自動血球計数器 (MEK-6558) を用いて解析した。また、末梢血ドナー由来細胞の割合をフローサイトメトリーを用いて評価した。動物実験は東京大学医科学研究所の動物実験委員会より承認を受けて行われた。

フローサイトメトリー

マウス大腿骨、脛骨、骨盤骨、上腕骨および胸骨より骨髄を採取し、溶血剤およびFicoll液で単核球分離したのち、染色バッファー (2%FBS/PBS) で希釈された以下の標識抗体を用いて染色を行った。CD3e (145-2C11), CD4 (GK1.5), CD5 (53-7.3), CD8a (53-6.7), B220 (RA3-6B2), Mac1 (M1/70), Gr-1 (RB6-8C5), Ter119 (TER-119), c-Kit (2B8), Sca-1 (D7), CD150 (TC15-12F12.2), CD48 (HM48-1), Flk2 (A2F10), CD45.1 (A20), CD45.2 (104)。Lineage (Lin) マーカーにはCD3e, CD4, CD5, CD8a, B220, Mac1, Gr-1およびTer119を用いた。染色後の細胞をPropidium Iodideを含む染色バッファーに懸濁したのち、FACS CelestaおよびFACS Aria IIIu (BD Bioscience) を用いてデータ取得および標的細胞の分取を行った。

造血幹細胞とT細胞の共培養

野生型 (WT) マウスおよびUbc-GFP::Act-mOVAマウスよりFACSを用いて造血幹細胞 (Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺/Flk2⁻/CD48⁻/CD150⁺) を分取し、Cell Trace Violetで標識されたOT-IマウスCD8⁺ T細胞とともにTNF- α (1 μ g/ml) 添加・非添加培地で3日間培養した。培養後のGFP陽性細胞の割合およびT細胞の増殖をフローサイトメトリーを用いて評価した。

【結果】

1. 細胞障害性T細胞による非自己造血幹細胞の排除と慢性炎症による免疫回避能の獲得

Act-mOVAマウスでは膜結合型OVAがCAGプロモーターの制御下で恒常的に発現し、分解産物であるpOVAがMHC-I分子の一種H2-Kb上に提示される。従って、同マウス細胞におけるH2-Kb-pOVA複合体の量は細胞の抗原提示能を反映すると考えられる。そこで、H2-Kb およびH2-Kb-pOVA複合体を特異的に認識する抗体を用いて、Act-mOVAマウスにおける各種造血細胞の抗原提示能をフローサイトメトリーで評価したところ、H2-Kbの発現量は造血幹細胞と骨髄球系前駆細胞で差が見られないのに対し、H2-Kb-pOVA複合体の発現量は造血幹細胞で有意に高かった。さらに、造血幹細胞を含む造血細胞のMHC-Iを介した抗原提示能をin vivoで評価するために、Act-mOVAマウスより採取した骨髄細胞をWTマウス骨髄と1:9の比率で混合し、致死量放射線照射したレシピエントマウスに移植することによって骨髄キメラマウスを作成した。そして、OT-Iマウスより採取したCD8⁺T細胞を養子移植し、末梢血および骨髄中のOVA⁺細胞の割合をフローサイトメトリーで評価した。その結果、OVA⁺造血細胞はOT-I CD8⁺T細胞の養子移植後1週間で速やかに消失し、養子移植後4週の時点でも認められなかった (図1A, B)。さらに、OT-I CD8⁺細胞を十分量投与した場合には、骨髄中のOVA⁺造血幹細胞が完全に消失していた (図1C)。これらの結果から、造血幹細胞はMHC-Iを介した高い抗原提示能を有し、非自己抗原を有する造血幹細胞は抗原特異的な細胞障害性T細胞によって容易に除去されることが明らかになった。

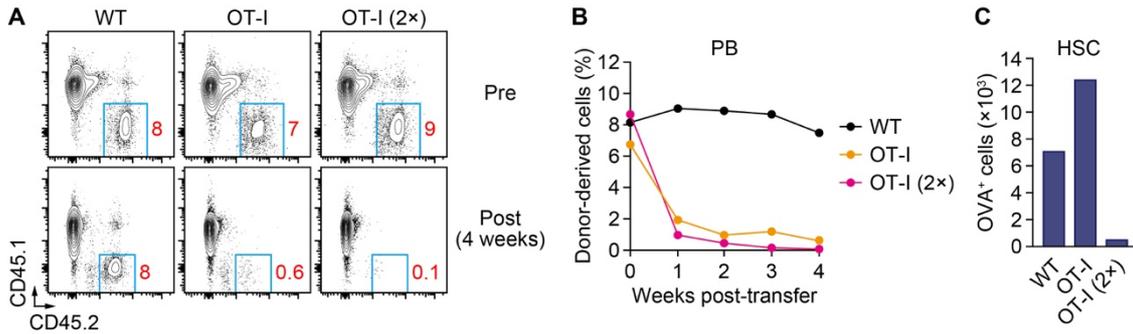


図1. 非自己抗原を発現する造血幹細胞は抗原特異的CD8⁺T細胞の養子移植によって除去される。(A) OVA⁺骨髄キメラマウス (1:9) における末梢血OVA⁺細胞 (CD45.2⁺) のフローサイトメトリー解析。(B) OT-I CD8⁺T細胞養子移植前後の末梢血OVA発現細胞の割合の経時的変化。(C) 養子移植後4週間での骨髄OVA⁺造血幹細胞数。

筆者らはこれまでの研究において、TNF-αをはじめとする炎症シグナルが造血幹細胞に様々なT細胞免疫関連遺伝子を誘導することを見出している。特に、PD-1のリガンドであるPD-L1およびPD-L2の発現はTNF-αやpoly I:Cによる炎症刺激で顕著に増加し、CD3/CD28刺激抗体によるCD8⁺T細胞の活性化を抑制しうることを示した²。そこで、TNF-αが抗原特異的T細胞による造血幹細胞の除去に及ぼす影響を調べるため、OVA⁺造血幹細胞をWT造血幹細胞と1:1で混合し、OT-I CD8⁺T細胞をTNF-α添加・非添加の条件で共培養することによって、造血幹細胞に対する抗原特異的な殺細胞効果を評価した (図2A)。その結果、OVA⁺造血幹細胞はOT-I CD8⁺T細胞を直接活性化し、活性化したOT-I CD8⁺T細胞はOVA⁺造血幹細胞を特異的かつほぼ完全に除去したが、TNF-αを添加した場合にはT細胞の活性化は同程度にもかかわらず一部

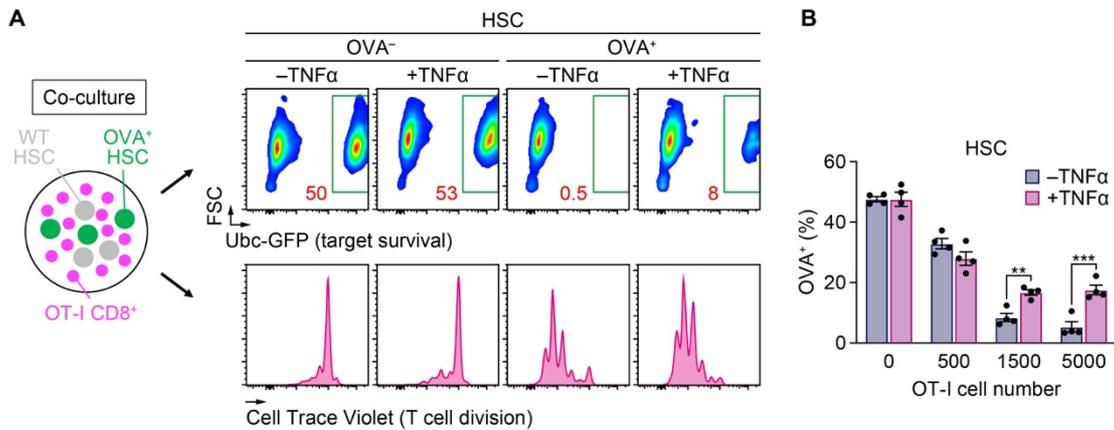


図2. TNF-α存在下では非自己抗原を有する造血幹細胞が抗原特異的T細胞からの免疫回避能を獲得する。(A) WT (GFP⁻) およびOVA⁺造血幹細胞 (GFP⁺) をOT-I CD8⁺T細胞 (Cell Trace Violet⁺) とともにTNF-α添加・非添加で3日間共培養した際のフローサイトメトリー解析結果。(B) TNF-α添加・非添加において様々な細胞数のOT-I CD8⁺T細胞と共培養した際のOVA⁺造血幹細胞の生存割合。
P < 0.01, * P < 0.001 (Student's t-test)

のOVA⁺造血幹細胞が殺細胞効果を免れていた(図2B)。従って、造血幹細胞は抗原特異的なT細胞を直接活性化しうるが、TNF- α は造血幹細胞に免疫回避能を誘導することが明らかとなった。

2. 非自己造血幹細胞の免疫回避を可能にする遺伝子変異の網羅的スクリーニング

Cas9⁺OVA⁺マウスについてはCas9発現マウスとAct-mOVAマウスの交配により予定通り得ることができた。一方、sgRNAライブラリーについては、造血幹細胞は導入効率が通常の細胞株より低く、導入できた細胞をFACSでソートできる方が移植実験に都合が良いことから、当初予定していたネオマイシン選択性のレンチウイルスベクター(Addgene 73633)ではなく、蛍光色素で識別できるレトロウイルスベクター(Addgene 67988)を採用したが、ウイルス産生条件を最適化したものの、力価の低いウイルス($\sim 9.0 \times 10^4$ cells/ μ L)しか得られず、高力価を必要とする造血幹細胞のスクリーニングに用いるのは困難であった。ライブラリープラスミドを電気泳動すると3.1kb程度のエクストラバンドが認められたため、増幅時にLTR間で生じた相当量の組換え産物がウイルス産生を妨げていると考えられた。

【考察】

変異細胞が「非自己」として免疫系に除去されうことはよく知られているが、非自己抗原を有する組織幹細胞と免疫系との関わりについては報告が少ない。近年、B10D2系統のMHC-I(H2-Kd)上に提示されたGFPペプチドに対する特異的な細胞障害性T細胞が開発され、腸管や卵巣上皮などの細胞周期回転型のGFP⁺組織幹細胞は細胞障害性T細胞によって除去されるが、皮膚や毛包など静止型のGFP⁺組織幹細胞はMHC-I分子の発現を抑制して殺細胞効果から逃れることが初めて示された⁵。しかし、同じく静止型の造血幹細胞では検討されておらず、それゆえ非自己抗原を発現する造血幹細胞がT細胞サーベイランスによって除去されるかは明らかにされていない。本研究によって、造血幹細胞がMHC-Iを介した高い抗原提示能を有し、非自己抗原を発現する造血幹細胞は抗原特異的なT細胞によって除去されやすいことが明らかになった。クローン性造血や骨髄球系腫瘍で見られる一部の遺伝子変異では、遺伝子産物が抗原性をもったいわゆるネオ抗原としてMHC-I上に提示され、抗原特異的なT細胞が誘導されることが明らかになっており⁶、本研究で示されたような炎症環境下における造血幹細胞レベルでの免疫回避がこれらの病態の発生に寄与している可能性がある。

今回予定していたCRISPR/Cas9スクリーニングは、sgRNAライブラリーウイルスの調製が難航したために実施できなかったが、蛍光標識された種々のsgRNAライブラリーベクターが近年開発され、造血幹細胞のようなレアな細胞集団にも適用しやすい、カテゴリー毎に標的を絞ったタイプも利用可能となってきた⁷。今後、そのようなサブライブラリーを用いたスクリーニングを行うことによって、TNF- α 以外の炎症性リガンドや他の遺伝子変異など、造血幹細胞の免疫回避を可能にする分子機構を明らかにできれば、それを標的としてクローン性造血や骨髄球系腫瘍に対する新たな治療戦略を開発できると期待される。また、遺伝子変異を持った造血幹細胞がクローン性に拡大し、急性骨髄性白血病の発症や再発の原因となっていることが示唆されている⁸。従って、抗原特異的な細胞障害性T細胞の養子移植によって変異した造血幹細胞を選択的に除去することができれば、白血病の発症や再発を未然に防げると期待される。

【参考文献】

- 1 Yamashita, M., Nitta, E. & Suda, T. Aspp1 Preserves Hematopoietic Stem Cell Pool Integrity and Prevents Malignant Transformation. *Cell Stem Cell* **17**, 23-34, doi:10.1016/j.stem.2015.05.013 (2015).
- 2 Yamashita, M. & Passegue, E. TNF-alpha Coordinates Hematopoietic Stem Cell Survival and Myeloid Regeneration. *Cell Stem Cell* **25**, 357-372 e357, doi:10.1016/j.stem.2019.05.019 (2019).
- 3 Yamashita, M., Dellorusso, P. V., Olson, O. C. & Passegue, E. Dysregulated haematopoietic stem cell behaviour in myeloid leukaemogenesis. *Nat Rev Cancer* **20**, 365-382, doi:10.1038/s41568-020-0260-3 (2020).
- 4 Mohrin, M. *et al.* Hematopoietic stem cell quiescence promotes error-prone DNA repair and mutagenesis. *Cell Stem Cell* **7**, 174-185, doi:10.1016/j.stem.2010.06.014 (2010).
- 5 Agudo, J. *et al.* Quiescent Tissue Stem Cells Evade Immune Surveillance. *Immunity* **48**, 271-285 e275, doi:10.1016/j.immuni.2018.02.001 (2018).
- 6 Holmstrom, M. O. *et al.* The JAK2V617F mutation is a target for specific T cells in the JAK2V617F-positive myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* **31**, 495-498, doi:10.1038/leu.2016.290 (2017).
- 7 Morgens, D. W. *et al.* Genome-scale measurement of off-target activity using Cas9 toxicity in high-throughput screens. *Nat Commun* **8**, 15178, doi:10.1038/ncomms15178 (2017).
- 8 Abelson, S. *et al.* Prediction of acute myeloid leukaemia risk in healthy individuals. *Nature* **559**, 400-404, doi:10.1038/s41586-018-0317-6 (2018).