

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591159

研究課題名（和文）

家族性血球貪食症候群の迅速診断法確立と細胞工学的手法を用いた病態解明

研究課題名（英文）

Establishing rapid diagnostic method and unraveling the pathogenesis of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis

研究代表者

八角 高裕（TAKAHIRO YASUMI）

京都大学大学院医学研究科・講師

研究者番号：00511891

研究成果の概要（和文）：

血小板を用いた家族性血球貪食性リンパ組織球症（FHL）3型～5型の迅速スクリーニング法を確立すると同時に、FHL3症例のスクリーニング検査として細胞障害性T細胞の脱顆粒機能検査とmunc13-4蛋白発現解析の組み合わせが有用である事を発見した。又、発症早期の臨床検査結果によりFHLと二次性血球貪食症候群の病形推定が可能である事を発見した。

研究成果の概要（英文）：

We established a new rapid screening test for FHL3/4/5 by detecting intra-platelet expression of munc13-4/syntaxin11/munc18-2 proteins and found that combination of CTL degranulation and munc13-4 expression assays is very useful for finding atypical, late-onset cases of FHL3. We also found that FHL can be clinically differentiated from certain types of secondary HLH cases by comparing levels of serum lactate dehydrogenase, sIL-2R, ferritin, and lymphocyte/neutrophil ratio in peripheral blood at early phase of the disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：原発性免疫不全症・家族性血球貪食性リンパ組織球症・迅速診断法

1. 研究開始当初の背景

血球貪食症候群/血球貪食性リンパ組織球症（hemophagocytic syndrome/hemophagocytic lymphohistiocytosis:HPS/HLH）は、発熱・血球減少・肝脾腫・多臓器障害を主徴候とし、組織球による血球貪食像を特徴とする疾患群であり、感染や膠原病などに続発する二次性的なもの、遺伝的素因による原発性的なものに大別される。原発性（家族性）の血球貪食性

リンパ組織球症（familial HLH:FHL）の原因として、perforin（FHL2）/munc13-4（FHL3）/syntaxin11（FHL4）/munc18-2（FHL5）が同定されているが、これらの分子は全てNK細胞や細胞障害性Tリンパ球（CTL）の細胞障害活性に関与する分子である。NK細胞やCTLは、標的細胞との間に免疫学的細胞間シナプスを形成した後perforinを用いて標的細胞の形質膜に小孔を形成し、この小孔を通じて

granzyme を放出して標的細胞のアポトーシスを誘導する。munc13-4、syntaxin11、munc18-2 は、何れも perforin や granzyme を含有する細胞障害性顆粒の開口放出を制御している分子であり、その異常により NK 細胞や CTL の脱顆粒が障害される事となる。FHL では、細胞障害活性の低下した CTL や NK 細胞がウイルス感染細胞等の標的細胞を排除出来ずに持続活性化状態となり、IFN- γ を中心とするサイトカインの過剰産生からマクロファージの活性化と血球貪食が引き起こされると推定されているものの、その病態には不明な点が多く残されていた。一方、二次性 HLH は Epstein-Barr virus (EBV) 等の感染症や、膠原病・悪性リンパ腫などに続発するものの、その原因は殆ど解明されていないのが現状であった。加えて、FHL の治療には強力な免疫抑制療法と造血幹細胞移植が必要であるため、臨床的には早期診断が非常に重要であり、迅速スクリーニング検査の確立が望まれていた。フローサイトメトリー法による NK 細胞内の perforin 発現解析は FHL2 スクリーニングとしてほぼ確立していたものの、NK 細胞や CTL を用いた細胞傷害活性や脱顆粒機能検査の有用性は確立していないのが現状であった。当時、我々は NK/CTL の細胞障害性顆粒の放出機構と血小板の脱顆粒機構には共通点が多く存在し、FHL3~5 の原因分子である munc13-4/syntaxin11/munc18-2 が血小板に豊富に発現する事を突き止めており、血小板内の蛋白発現解析が FHL3~5 のスクリーニング検査に利用できる事を突き止めていた。

2. 研究の目的

(1) FHL スクリーニング法の確立

FHL 各病型の新たなスクリーニング検査法を確立してその有効性を確認すると共に、既存のスクリーニング法と組み合わせる事により診断精度を向上させる。

(2) 本邦における FHL 症例の集積

本邦の FHL 症例に占める各病型の頻度とその臨床的特徴を明らかにすると共に、既知の遺伝子に異常を認めない遺伝性 HLH 症例を集積して新たな原因遺伝子の発見に繋げる。

(3) FHL/二次性 HLH の病態解析

発見された FHL 症例について遺伝子解析や機能解析を行い、各病型の病態を把握すると共に、二次性 HLH 症例の病態を把握する。更に、FHL の病態生理を詳細に解明するため、各病型の患者由来 iPS 細胞を樹立し、そこから T 細胞や NK 細胞、単球/マクロファージ系細胞を誘導する系を確立して、ステロイドや免疫抑制剤の非影響下での包括的な解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 血小板蛋白を用いたウェスタンブロット法と、フローサイトメトリー法による血小板内の munc13-4/syntaxin11/munc18-2 蛋白発現解析法を確立し、実際の症例における有用性を検証する。加えて、NK 細胞内 perforin 発現解析と NK/CTL の脱顆粒機能解析を行い、それぞれの有用性を評価した。

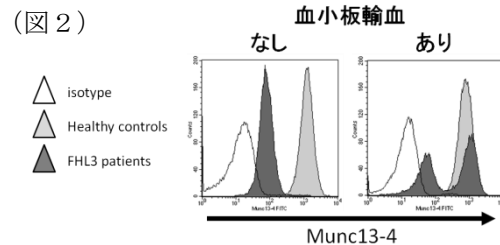
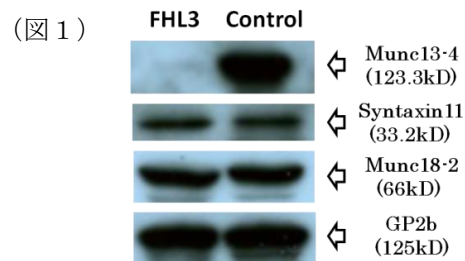
(2) HLH 症例の臨床情報と集積し各 FHL 病型や二次性 HLH 症例の臨床的特徴をまとめた。

(3) FHL 患者から線維芽細胞採取して iPS 細胞を樹立し、各種血液・免疫系細胞を分化誘導して機能解析を行い、病態の解明を試みた。

4. 研究成果

(1) 血小板を用いた FHL3/4/5 スクリーニング検査法の確立

Munc13-4/syntaxin11/munc18-2 蛋白が血小板に豊富に発現している事を利用し、僅かな量の血液から分離した血小板を用いて FHL3/4/5 の原因蛋白の発現解析を行えるようになった (図 1)。特に FHL3 に関してはフローサイトメトリー法を用いて血小板内の munc13-4 発現を解出来るようになり、血小板輸血依存状態の患者でも迅速診断が可能となった (図 2)。FHL4/5 についてもフローサイトメトリー法による診断が可能と思われたが、新たな症例が見つからなかった為、その有効性を確認する事はできなかった。

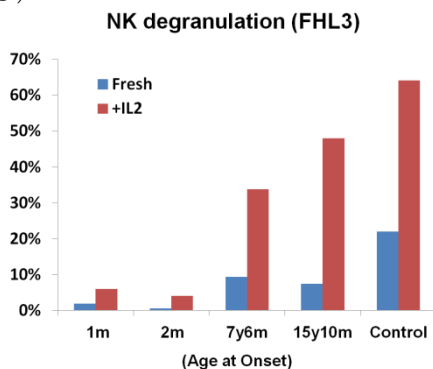


(2) 本邦に於ける FHL 症例の集積

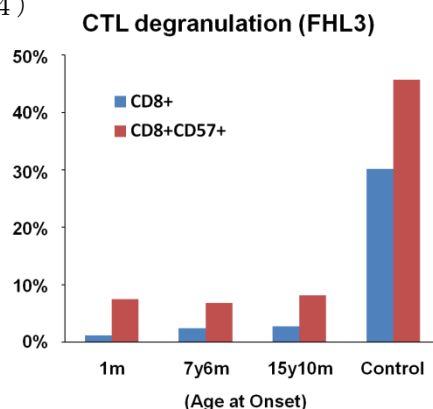
2009 年末までに本邦で集積された FHL 症例を解析し、2 例の FHL5 患者が存在していた事を報告した。又、FHL4 は恐らく日本には存在せず、CTL の脱顆粒機能が欠損しているが既知の遺伝子に異常を認めない症例が存在している事も明らかになった。

(3) FHL 3 症例のスクリーニングに於ける CTL 脱顆粒機能検査と蛋白発現解析の有効性
 本研究期間中に 2 例の非典型的 FHL3 症例 (7 歳発症男児と 15 歳発症女児) を診断し、何れの症例に於いても NK の脱顆粒機能は比較的保たれていたが (図 3)、CTL の脱顆粒機能は早発典型症例と同程度に低下していた (図 4)。又、何れの症例にも原因遺伝子である *UNC13D* の一方のアリルにミスセンス変異を認め、これらの変異により蛋白発現が不安定になる事が確認された。これらの結果より、FHL3 症例のスクリーニングとして CTL 脱顆粒機能解析と蛋白発現解析の組み合わせが鋭敏であることが示唆された。

(図 3)



(図 4)



(4) FHL 症例と二次性 HLH 症例の特徴
 FHL スクリーニングに寄せられた HLH 症例の発症早期の臨床情報を原因別に解析した所、LDH 等の溢脱酵素は FHL より二次性 HLH 症例に於いて高い傾向があった。白血球分画・ferritin・sIL-2R を各病型間で比較検討した所、FHL 症例では全例が(リンパ球)/(好中球)比が 1 以上であり、(sIL-2R)/(ferritin)比も一例を除いて 1 以上であった。一方、二次性 HLH 症例の(リンパ球)/(好中球)比は 1 以下である症例が多く、sIL-2R の値に比して ferritin の上昇が著しい症例が存在する事が判明し、膠原病や新生児ヘルペスウイルス感染症に続発する HLH 症例でこの傾向が強いことが判明した。EBV 感染により発症する

EBV-HLH 症例や原因不明症例に於いては明らかな傾向は認められなかった。以上の結果より、FHL の病態がリンパ球の活性化を中心としたものであると類推されると同時に、膠原病や新生児ヘルペスウイルス感染症に続発する HLH の病態は FHL とはかなり異なっている事が示された。加えて、発症早期の白血球分画・ferritin・sIL-2R・LDH を検討する事により、ある程度の HLH 病型推定が可能である事が示された。

(5) FHLiPS 細胞の樹立と機能解析

正常ヒト iPS 細胞より単球/マクロファージ/樹状細胞系の細胞を誘導する事に成功した。又、FHL3 症例一例より同意を取得し、線維芽細胞を採取して iPS 細胞の作成に取り掛かっている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Yanagimachi MD, Niwa A, Tanaka T, Honda-Ozaki F, Nishimoto S, Murata Y, Yasumi T, Ito J, Tomida S, Oshima K, Asaka I, Goto H, Heike T, Nakahata T, Saito MK. Robust and highly-efficient differentiation of functional monocytic cells from human pluripotent stem cells under serum- and feeder cell-free conditions. PLoS One. 2013;8(4):e59243 査読有
 DOI:10.1371/journal.pone.0059243.
- ② Nishi M, Nishimura R, Suzuki N, Sawada A, Okamura T, Fujita N, Kanai R, Yano J, Adachi S, Yasumi T, Sato E, Yasutomo K, Ishii E, Ohga S. Reduced-intensity conditioning in unrelated donor cord blood transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. Am J Hematol. 2012 Jun;87(6):637-9. 査読有
 DOI: 10.1002/ajh.23190.
- ③ Ohta H, Miyashita E, Hirata I, Matsumura R, Yoshida H, Hashii Y, Higashiura T, Yasumi T, Murata Y, Heike T, Yang X, Kanegane H, Ohara O, Ozono K. Hematopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning from a family haploidentical donor in an infant with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. Int J Hematol. 2011 Sep;94(3):285-90. 査読有
 DOI: 10.1007/s12185-011-0916-6.
- ④ Murata Y, Yasumi T, Shirakawa R, Izawa

K, Sakai H, Abe J, Tanaka N, Kawai T, Oshima K, Saito M, Nishikomori R, Ohara O, Ishii E, Nakahata T, Horiuchi H, Heike T. Rapid diagnosis of FHL3 by flow cytometric detection of intraplatelet Munc13-4 protein. *Blood*. 2011 Aug 4;118(5):1225-30. 査読有
DOI: 10.1182/blood-2011-01-329540.

- ⑤ Nagai K, Yamamoto K, Fujiwara H, An J, Ochi T, Suemori K, Yasumi T, Tauchi H, Koh K, Sato M, Morimoto A, Heike T, Ishii E, Yasukawa M. Subtypes of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan based on genetic and functional analyses of cytotoxic T lymphocytes. *PLoS One*. 2010 Nov 30;5(11):e14173. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0014173.

[学会発表] (計5件)

- ① YASUMI T. Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis may Present with Atypical Features in Adolescence and Adulthood. The 4th JSH International Symposium 2013. May 24-25. Matsuyama
- ② 八角高裕 血球貪食性リンパ組織球症の病態解明に向けて 第116回日本小児科学会学術集会 2013年4月19~21日 広島
- ③ 八角高裕 一般検査から見た FHL/二次性 HLH の特徴と病態の考察 第8回血球貪食症候群研究会 2013年3月16日 東京
- ④ 堀雅之 Late-onset FHL3: 2症例の検討 第8回血球貪食症候群研究会 2013年3月16日 東京
- ⑤ YASUMI T. Diagnosing FHLs among HLHs: Current status and future direction. 第54回日本小児血液・がん学会 2012年11月30日~12月2日 横浜

[図書] (計1件)

- ① 近藤直実・平家俊男編 診断と治療社 自己炎症性疾患・自然免疫不全症とその周辺疾患 2012 280

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八角 高裕 (YASUMI TAKAHIRO)
京都大学大学院医学研究科・講師
研究者番号: 00511891

(2) 研究分担者

平家 俊男 (HEIKE TOSHIO)
京都大学大学院医学研究科・教授
研究者番号: 90190173

(3) 研究協力者

西小森 隆太 (NISHIKOMORI RYUTA)
京都大学大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 70359800