

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670475

研究課題名(和文) ゲノム・細胞工学的手法を用いた家族性血球貪食症候群の包括的診療基盤の確立

研究課題名(英文) Establishing the research basis for innovative medical care of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis.

研究代表者

平家 俊男 (HEIKE, Toshio)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90190173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：NK細胞/CTLの脱顆粒機能解析、責任蛋白発現解析、及び既知の原発性HLHの責任遺伝子解析を通じて症例を集積し、一般的な検査データの組み合わせでHLH症例の病態分類が可能である事を報告した。

(Yasumi, et al. British J Haematology, 2015)

更に、HLH症例由来のCTLライン作成に成功し、脱顆粒機能や細胞傷害活性の評価を行うシステムを構築した。加えて、FHL3患者由来のCTLラインに原因遺伝子UNC13Dの変異cDNAコンストラクトを強制発現させて、蛋白発現や脱顆粒機能に与える影響を解析する系の確立にほぼ成功した。

研究成果の概要(英文)：We established a system to provide comprehensive screening of FHL to all HLH patients by the detection of perforin expression in NK cells; Munc13-4, syntaxin-11, and Munc18-2 expression in platelets; by NK cell and CTL degranulation assays; and by genetic analysis. We compared the levels of serum sIL2R, ferritin, and other readily available laboratory parameters among pediatric HLH patients during the early stage of the disease, and showed that these parameters can be used to predict the underlying etiology and to efficiently identify patients who need molecular screening for FHL. (Yasumi, et al. British J Haematology, 2015)

We also established a system to analyze the cytolytic activity and the degranulation capacity of CTL lines derived from HLH patients. In addition, we have succeeded in evaluating the effect of a UNC13D mutation by transfecting the mutated cDNA construct into CTL lines established from a FHL3 patient.

研究分野：小児免疫・アレルギー学

キーワード：血球貪食性リンパ組織球症 免疫調節異常症 機能解析

1. 研究開始当初の背景

血球貪食性リンパ組織球症 (HLH: hemophagocytic lymphohistiocytosis) は、免疫系の異常活性化と炎症性サイトカインの過剰産生を主要病態とし、マクロファージによる血球貪食像を組織学的な特徴とする炎症性症候群である。HLH は発症の背景・原因により、感染・膠原病・悪性疾患等に続発する二次性 HLH と、遺伝的素因により発症する原発性 HLH とに大別され、後者は免疫調節障害 (Immune Dysregulation) を基本病態とする原発性免疫不全症に分類される。

原発性 HLH の代表疾患である家族性血球貪食性リンパ組織球症 (FHL: familial hemophagocytic lymphohistiocytosis) の原因分子は、全て細胞傷害性 T 細胞 (CTL: cytotoxic T lymphocyte) や NK (natural killer) 細胞の細胞傷害機構に関わる分子であり、細胞傷害機構の異常が病態の本質である。CTL や NK 細胞はこの機構を介してウイルス感染細胞などの標的細胞にアポトーシスを誘導するが、この機構は抗原提示細胞や CTL 自身をも標的として作用し、免疫応答の制御・終息にも関与している。FHL では細胞傷害活性の異常により標的細胞のアポトーシス誘導が障害される事に加え、抗原提示の持続と CTL 自身のアポトーシスの抑制から CTL の過剰増殖と活性化が起こり、IFN- γ を中心とした炎症性サイトカインが過剰産生され、マクロファージの活性化を引き起こすと考えられている。

FHL の確定診断は遺伝子検査でなされ、診断の補助として細胞傷害活性や細胞傷害性顆粒の放出機能の評価が行われるが、これらの機能解析は一部の限られた施設でのみ施行可能であるという問題が存在する。又、遺伝子変異の疾患原性を機能的に評価する系が確立していないため、遺伝子解析のみでは FHL の最終診断がつかない場合も認められる。FHL の治療には造血幹細胞移植が必要であるが、炎症をコントロール出来ず移植に至らない症例も多く、新しい視点に立つ治療基盤の開発も望まれている。加えて、HLH 全体に占める FHL の割合は 10% 程度に留まり、残る 90% の症例は二次性 HLH に分類されるが、その病態解明は全く進んでおらず、その病態の重篤性から病態解析に必要な検体を入手する機会も限られている。

2. 研究の目的

上記の現状を背景とし、本研究では以下の項目を重点目的として研究を行う。

(1) FHL に対する包括的検査体制の確立

FHL の包括的な解析を進める為、既知の原発性 HLH を正確に診断する体制を構築すると共に、臨床情報を集積して本邦に於ける FHL 症例の現状を把握する。同時に患者検体を収集し、バイオマーカー検索などに応用する。

(2) HLH 病態の病型分類

症例の包括的スクリーニングにより得られた情報や、サイトカイン等の既知のバイオマーカー解析を基に症候群としての HLH を病態別に分類することを試みる。

(3) FHL 遺伝子変異の機能解析系の確立

既存のヒト NK/CTL 細胞株を基にゲノム編集技術を用いて FHL 遺伝子を欠損した細胞株を作成し、変異遺伝子の cDNA コンストラクトを強制発現させて細胞傷害活性を評価する系を確立する。

(4) 疾患特異的 iPS 細胞を用いた HLH 解析

既知の FHL 症例や原因不明の HLH 症例より疾患特異的 iPS 細胞を作成し、各種免疫細胞を分化誘導して免疫抑制治療の影響を受けない環境での病態解析を行う。最終的にはヒト化マウスを用いた生体内での HLH 病態の再現を目指す。

3. 研究の方法

(1) FHL に対する包括的検査体制の確立

当科に解析を依頼された全 HLH 症例に対し、NK 細胞内の Perforin 発現と血小板内の Munc13-4/Syntaxin11/Munc18-2 発現、NK/CTL の細胞傷害性顆粒の放出機能解析を行うと同時に、既知の FHL 遺伝子を網羅的に解析する。同時に全症例の臨床情報を集積して本邦に於ける FHL 症例の現状を把握する。

(2) HLH 病態の病型分類

症例の包括的スクリーニングにより得られた結果と患者の臨床情報、血清中の炎症性サイトカインの解析などを組み合わせて総合的に解析し、症候群としての HLH を病態別に分類することを試みる。

(3) FHL 遺伝子変異の機能解析系の確立

ヒト NK 細胞ライン (KHYG1) 及び CTL ライン (TALL-104) を基に、TALEN 等のゲノム編集技術を用いて既知の FHL 遺伝子の欠損細胞株を作成する。代替方法として、FHL 患者の末梢血単核球を日本人には稀な HLA を持つ allogenic LCL で刺激して CTL ラインを作成する。得られた細胞に患者より同定された変異遺伝子の cDNA コンストラクトを強制発現させて細胞傷害活性や細胞傷害性顆粒の放出を評価する系を確立する。

(4) 疾患特異的 iPS 細胞を用いた HLH 解析

FHL 症例や原因不明の HLH 症例由来の疾患特異的 iPS 細胞を作成し、NK 細胞・CTL・単球/マクロファージ等を分化誘導して、網羅的遺伝子発現解析などを用いて病態の解析を試みる。最終的には、ヒト細胞が生着する免疫欠損マウス (NOG マウスなど) にこれらの細胞を移植し、ヒト HLH を再現したマウスモデルの作成を目指す。

4. 研究成果

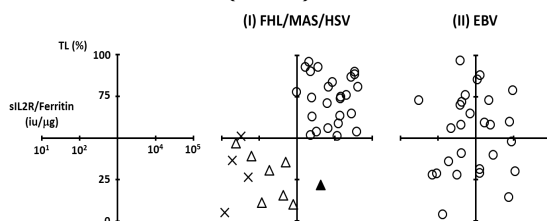
(1) FHL に対する包括的検査体制の確立

HLH 症例の集積を行うと同時に、FHL に対する包括的な診断体制を確立した。この過程で、通常の遺伝子解析では診断が困難であったが、NK 細胞の細胞傷害性顆粒放出障害と Munc13-4 蛋白発現の低下より FHL3 型の診断が可能であった症例を経験し、その原因が遺伝子の部分重複である事を突き止めた(投稿準備中)。

(2) HLH 病態の病型分類

HLH 症例の集積と FHL 症例の診断の過程で、一般的な臨床検査データ(特に末梢白血球中のリンパ球の割合、可溶性 IL-2 受容体とフェリチンの比率)の組み合わせで FHL 症例をかなりの確立で絞り込めることを突き止め、HLH 症例の病型分類が可能である事を報告した(図 1)(Yasumi, et al. British J Haematology, 2015)。

(図 1)



病初期 HLH 症例の TL-sIL2R/ferritin プロファイル

(I) FHL(○)/マクロファージ活性化症候群(MAS)(×)/HSV-HLH(△)、と(II) EBV-HLH に於ける病初期のデータに基づいた HLH の分類。TL: 末梢白血球中の総リンパ球の割合(%)。

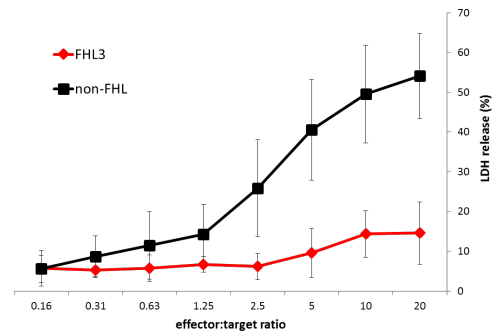
(3) FHL 遺伝子変異の機能解析系の確立

ヒト NK 細胞ライン(KHYG1)及び CTL ライン(TALL-104)を基に、TALEN 等のゲノム編集技術を用いて既知の FHL 遺伝子の欠損細胞株の作成を試みたが、増殖効率が悪くクローニングが行えない等の問題で実用的な細胞株の作成に至らなかった。そこで、患者末梢血単核球より allogenic LCL に特異的な CTL ラインを作成する系を構築し、細胞傷害活性(図 2)や脱顆粒機能(図 3)の評価を行うシステムを構築した。又、FHL3 患者由来の CTL ライン作成に成功し、同細胞に原因遺伝子 UNC13D の変異 cDNA コンストラクトを強制発現させて、蛋白発現や脱顆粒機能に与える影響を解析する系の確立にほぼ成功した(図 4)。

これにより、これまで病原性の評価が難しかった UNC13D 遺伝子変異について、ヒト CTL に於ける機能評価を行う事が可能となり、今後の FHL3 の病態解明に大きく寄与する事が期待される。同様の方法で FHL2 など他の FHL 病型の患者より allogenic LCL 特異的 CTL ラインを作成する事が可能であり、今後の FHL 遺伝子変異の病原性評価に大きく貢献することが期待される。更に、これらの CTL ラインは脱顆粒機能や細胞傷害活性を回復させ

る新規治療薬剤のスクリーニングにも応用が可能であり、新薬開発の基盤となり得るものである。

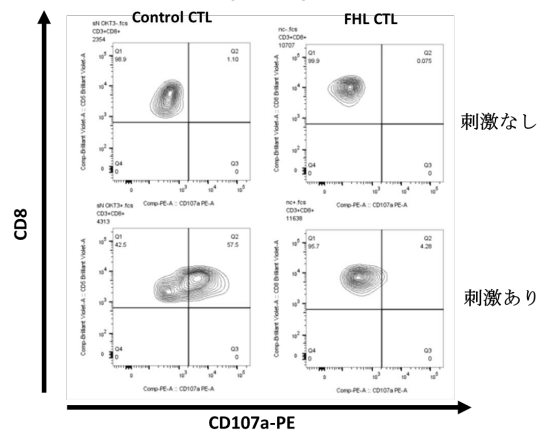
(図 2)



HLH 症例由来 CTL の細胞傷害活性

FHL 以外の HLH 症例由来の CTL ラインに比べ、FHL3 症例由来の CTL ラインでは allogenic LCL に対する細胞傷害活性が著明に低下している。

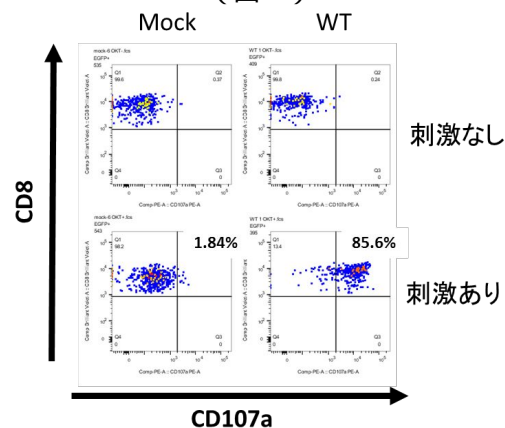
(図 3)



FHL3 症例由来 CTL の脱顆粒機能評価

FHL3 症例由来の CTL では正常コントロールに比較して細胞傷害性顆粒の放出が低下している。

(図 4)



FHL3 症例由来 CTL の脱顆粒機能評価

FHL3 症例由来の CTL に正常の UNC13D コンストラクトを強制発現させると脱顆粒機能が回復する。

(4) 疾患特異的 iPS 細胞を用いた HLH 解析
FHL3 症例由来 iPS 細胞株は作成済みである。

その他の HLH 症例由来の細胞を多数保存しており、必要に応じて iPS 細胞を樹立する準備を整えている。又、iPS 細胞からの単球/マクロファージの分化誘導法は確立済みである。今後、疾患特異的 iPS 細胞から NK 細胞や T 細胞を分化誘導させる系を開発し、ヒト HLH の病態を再現したマウスモデルの構築を目指したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Yasumi T, Hori M, Hiejima E, Shibata H, Izawa K, Oda H, Yoshioka K, Nakagawa K, Kawai T, Nishikomori R, Ohara O, Heike T. Laboratory parameters identify familial haemophagocytic lymphohistiocytosis from other forms of paediatric haemophagocytosis. *Br J Haematol*. 査読有. 2015;170:532. doi:10.1111/bjh.13461.

Iwatani S, Uemura K, Mizobuchi M, Yoshimoto S, Kawasaki K, Kosaka Y, Hori M, Yasumi T, Nakao H. Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Presenting as Hydrops Fetalis. *AJP Rep*. 査読有. 2015;5:e22. doi:10.1055/s-0034-1544110.

八角高裕、柴田洋史、下寺佐栄子、平家俊男. HLH 病態の多様性と治療戦略の展望. *臨床血液*. 査読無. 2015;56:2248. doi:10.11406/rinketsu.56.2248.

〔学会発表〕(計 2 件)

八角高裕. HLH 病態の多様性と治療戦略の展望. 第 77 回日本血液学会学術集会. 2015 年 10 月 18 日. ANA クラウンプラザホテル金沢 (石川県金沢市).

日衛嶋栄太郎、柴田洋史、井澤和司、河合朋樹、八角高裕、西小森隆太、平家俊男、小田紘嗣、小原収. UNC13D 遺伝子の exon duplication による家族性血球貪食性リンパ組織球症 3 型の 1 例. 第 9 回日本免疫不全症研究会学術集会. 2016 年 1 月 23 日. ベルサール東京日本橋 (東京都中央区).

〔その他〕

研究室ホームページアドレス

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~pediatrics/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平家俊男 (HEIKE, Toshio)
京都大学・大学院医学研究科
発達小児科学・教授
研究者番号: 90190173

(2) 研究分担者

八角高裕 (YASUMI, Takahiro)
京都大学・大学院医学研究科
発達小児科学・講師
研究者番号: 00511891