

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591260

研究課題名（和文） 二次性血球貪食症候群における T 細胞抑制性補助シグナルの研究

研究課題名（英文）Analysis of T cell co-stimulatory molecules in secondary hemophagocytic syndrome.

研究代表者

神波 信次 (KOUNAMI SHINJI)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：50316098

研究成果の概要（和文）：

小児 2 次性血球貪食症候群は高い致死率を有する疾患であり、予後の改善には病態の解明が必要である。血球貪食症候群は過剰な免疫反応が原因と考えられているが、その病態は不明である。本研究では免疫応答に関与する T 細胞抑制性補助シグナルレセプターについて、小児血球貪食症候群で検討した。本研究の結果、CTLA-4 の遺伝子多型が小児血球貪食症候群の発症、臨床症状に関与していることを世界で初めて証明した。

研究成果の概要（英文）：

Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) is a life-threatening conditions characterized by uncontrolled activation of T-cells and macrophages. The precise mechanism leading to the development of immune response dysregulation resulting in hypercytokinemia has not been well evaluated. We speculated and analyzed that T cell costimulatory molecules might be involved in the abnormal immune reactions in acquired HLH. Our results suggest that *CTLA-4* polymorphism might play a role in the development of acquired HLH.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2008 年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2009 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2010 年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児血液学

1. 研究開始当初の背景

2 次性血球貪食症候群は感染症、自己免疫疾患、悪性腫瘍を起因として、過剰な活性化状態に陥った T 細胞、マクロファージが産生する高サイトカイン血症により、播種性血管内凝固異常症候群、汎血球減少、肝脾腫、中枢神経合併症をきたす致命的の症候群である。申請者らが 10 年間に経験した 2 次性血球貪食症候群 65 例の臨床的検討においても死亡が 7 例（約 11%）にみられた。「なぜ T 細胞・マク

ロファージが過剰な活性化状態に陥るのか」ということが発症機序解明の根本命題である。家族性（先天性）血球貪食症候群では近年責任遺伝子として Perforin 遺伝子、Munc-13 遺伝子、Syntaxin 遺伝子が同定され、いずれも免疫応答制御に重要な働きを持つ分子であり、その欠損により T 細胞、マクロファージが過剰な活性化状態に陥ることが明らかとなった。2 次性血球貪食症候群においても同様に、何ら

かの免疫応答制御機構の異常が発症機序として想定されているが現在のところ不明である。2次性血球貪食症候群は家族性血球貪食症候群よりも頻度が高く、前述のように高い死亡率を有していることから、発症機序の解明に基づく治療法の開発が必要な状況である。一方、免疫応答は様々な分子に制御されていることが近年明らかにされつつある。中でも Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4 (CTLA-4), B and T lymphocyte attenuator (BTLA), programmed cell death 1 (PD-1) の3つの分子が T 細胞抑制性補助シグナルレセプターとして発見され免疫応答の収束に大きな役割を担っていることが明らかにされてきた。また、これらの分子は SLE, 関節リウマチなどの様々な自己免疫疾患の発症に関与していることが明らかにされている。これらの知見を併せ、小児2次性血球貪食症候群におけるこれら T 細胞抑制性補助シグナルレセプターの研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、小児2次性血球貪食症候群における T 細胞抑制性補助シグナルレセプターの関与を明らかにし、小児血球貪食症候群の予後改善を目指すことである。

3. 研究の方法

本研究では以下の課題について研究を進めた。

- ① CTLA-4, BTLA, PD-1 遺伝子多型の解析 (患者 43 例、正常群 100 例)
 - ・CTLA-4 は -C318T (PCR/RLFP 法), +A49G (PCR/RLFP 法), (AT) リピート数 (direct シークエンス法), CT60 (PCR/RLFP 法) について解析を行う。
 - ・BTLA はエクソン5に存在する +C800T (PCR/RLFP 法) について解析を行う。
 - ・PD-1 は P.D1.1, P.D1.3, P.D1.5 について解析 (PCR/RLFP 法) を行う。

これらの遺伝子多型を患者群、正常コントロール群で解析し遺伝子多型頻度を比較した。また、患者の臨床症状、臨床検査値との相関を検討すると共に、遺伝子多型と測定した血清サイトカインとの関連についても検討した。

- ② 血清サイトカイン値の測定

ビーズ法によりフローサイトメーターを用い血清サイトカイン値を測定した。サイトカインは IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, TNF- α , IFN- γ , MCP-1 を測定した。ビーズ法を用い微量検体で同時測定を行った。

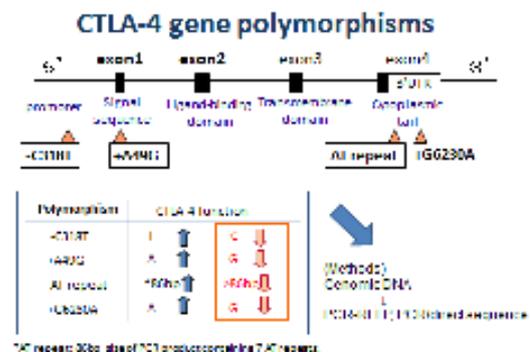
上記の研究課題で得られた結果と臨床データを総合的に解析し、二次性血球貪食症候群における T 細胞抑制性補助シグナルレセプター; CTLA-4, BTLA, PD-1 の病態への関与を検討した。

4. 研究成果

1) CTLA-4 遺伝子多型が小児2次性血球貪食症候群に関与している。

(1) CTLA-4 遺伝子多型頻度

患者群と正常コントロール群の多型頻度の比較では検討した4つの多型部位のうち3つの部位、+A49G, AT リピート数, +G6230A, で genotype, allele 頻度に両群間の有意差を認めた。いずれも CTLA-4 の T 細胞抑制力が弱くなる多型を患者群に多く認めた。各多型部位が Hardy-Weinberg 平衡にあることを確認したのち各多型間の連鎖不平衡解析を行なったところ、AT リピート数と +G6230A に連鎖がみられた (連鎖不平衡係数=0.7966)。また、ハプロタイプ推定頻度を検定したところ、AT リピート数と +G6230A の多型部位において、X-G のハプロタイプが患者群に多くみられた ($p=0.002$)。なお、血球貪食症候群の原因病原体、性別、年齢による遺伝子多型の偏りはみられなかった。



CTLA-4 genotype & allele frequencies

| Polymorphisms | genotype | | Allele | | P* | OR(95%CI) |
|---------------|----------|---------|---------|---------|-------|------------------|
| | Ref.197 | Ref.197 | Ref.197 | Ref.197 | | |
| +4748T | TT | TT | TT | TT | 1 | |
| | CT | CT | CT | CT | | |
| | CC | CC | CC | CC | | |
| | C | C | C | C | | |
| +6230A | AA | AA | AA | AA | 0.189 | 4.008(1.95-8.25) |
| | GA | GA | GA | GA | | |
| | GA | GA | GA | GA | | |
| | A | A | A | A | | |
| -3183G | GG | GG | GG | GG | 0.489 | 4.056(2.02-8.12) |
| | GG | GG | GG | GG | | |
| | GG | GG | GG | GG | | |
| | G | G | G | G | | |
| -3183G | GG | GG | GG | GG | 0.023 | |
| | GG | GG | GG | GG | | |
| | GG | GG | GG | GG | | |
| | G | G | G | G | | |
| +6230A | AA | AA | AA | AA | 0.017 | 2.493(1.27-4.73) |
| | GA | GA | GA | GA | | |
| | GA | GA | GA | GA | | |
| | A | A | A | A | | |

P* = Fisher's exact test; OR = odds ratio

(2) CTLA-4 遺伝子多型と臨床症状

血球貪食症候群でみられる臨床症状について、中枢神経症状（けいれん、意識障害）、肝脾腫の大きさ、DICの有無、低ナトリウム血症の有無、低アルブミン血症の有無、について各遺伝子多型との相関を検討した。いずれも血球貪食症候群診断時（骨髄検査施行時）の臨床症状について解析した。+G6230A多型と中枢神経症状の有無に相関がみられ（p=0.027）、CTLA-4のT細胞抑制力が弱くなる多型に中枢神経合併症が多くみられた。

CTLA-4 genotype and clinical symptoms

| | +4748T | +6230A | -3183G | +6230A |
|---------------------|---------|--------|--------|---------|
| CRS symptoms (n=43) | 0.524 | 0.0148 | 0.022 | 0.00124 |
| DIC (n=35) | 1.0 | 0.504 | 1.0 | 0.525 |
| Splenomegaly (n=43) | 0.18529 | 0.008 | 0.725 | 1.0 |

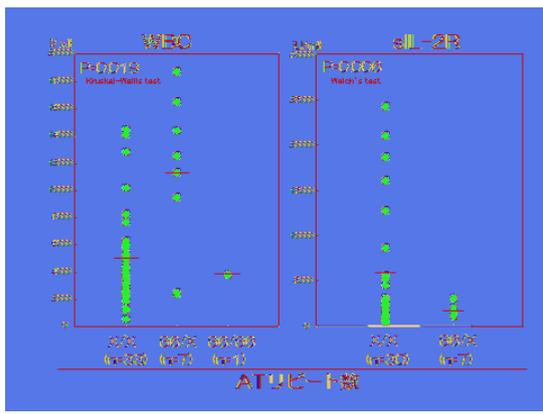
Fisher's exact test

- CRS symptoms; confusion or consciousness disturbance
- DIC; the DIC criteria of Japan Ministry of Health, Labor and Welfare was used
- Splenomegaly; splenomegaly, or, spleen > 5cm below the costal margin.

(3) CTLA-4 遺伝子多型と臨床検査値

血球貪食症候群診断時の臨床検査値について検討した。ATリポート数、+G6230Aと末梢血白血球数、可溶性IL-2R (sIL-2R)に相関がみられた。いずれもCTLA-4機能が弱くなる多型で、末梢血白血球数が低値で、sIL-2Rは高値となる、すなわち血球貪食症候群として重症である検査結果をとる傾向がみられた。他のサイトカインとの有意な相関

はみられなかった。



CTLA-4; genotype and laboratory data

| | +4748T | +6230A | -3183G | +6230A |
|----------------|--------|--------|---------|---------|
| WBC (n=43) | 0.47 | 0.124 | 0.029 | 0.055 |
| Hb (n=43) | 0.12 | 0.37 | 0.42 | 0.37 |
| PLT (n=43) | 0.17 | 0.37 | 0.37 | 0.37 |
| AP (n=43) | 0.07 | 0.34 | 0.026* | 0.027* |
| Albumin (n=43) | 0.06 | 0.36 | 0.05 | 0.05 |
| IL-2R (n=43) | 0.04 | 0.43 | 0.36 | 0.055 |
| IL-6 (n=43) | 0.04 | 0.06 | 0.07 | 0.04 |
| s-IL-2R (n=43) | 0.08 | 0.06 | 0.0006* | 0.0008* |
| IL-10 (n=43) | 0.02 | 0.05 | 0.02* | 0.02* |

Fisher's exact test; *P<0.05

2) BTLA、PD-1 遺伝子多型について

CTLA-4同様の検討を行ったが患者群、コントロール群に各遺伝子多型部位頻度に有意な差はみられなかった。また、臨床症状、臨床検査値、血清サイトカインについても有意な相関を示す遺伝子多型部位はみられなかった。

3) 本研究で得られた結果のまとめ

以上の結果からT細胞抑制性補助シグナルレセプターの中でCTLA-4が小児2次性血球貪食症候群の病態に関与していることが明らかとなった。

この知見はT細胞抑制性補助シグナルと血球貪食症候群の関係について明らかにした初めてのレポートでありCTLA-4タンパクを用いた血球貪食症候群の新規治療につながるものと考えられる。

4) 今後の検討課題

本研究で得られた知見をさらに根拠づけるため①小児血球貪食症候群におけるCTLA-4タンパク発現の動態解析、②解析症例数を増やした検討を行いたい。

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4件)

- 1) Megumi Yoshiyama, Shinji Kounami,

Keiko Nakayama, Takahiro Okutani, Noriyuki Aoyagi, Norishige Yoshikawa. Cytotoxic T-Lymphocyte-associated antigen 4 gene polymorphisms in Japanese children with infection-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. Acta Haematol: 123; 186-190, 2010 (査読有)

- 2) 神波信次、中山京子、芳山 恵、吉川徳茂、岩橋誠司、末永智浩. 血小板減少性紫斑病が診断契機となった common variable immunodeficiency の 6 歳男児例. 小児内科 41 (6) : 951-954, 2009 (査読有)
- 3) Megumi Yoshiyama, Shinji Kounami, Keiko Nakayama, Noriyuki Aoyagi, Norishige Yoshikawa. Clinical assessment of Mycoplasma pneumoniae-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. Ped Int: 50, 432-435, 2008 (査読有)
- 4) 神波信次、中山京子、芳山 恵、吉川徳茂. 急性リンパ性白血病維持療法中に発症した Pneumocystis pneumoniae の 3 症例. 日本小児血液学会誌 22(5/6) : 360-365, 2008 (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

- 1) CTLA-4 遺伝子多型は小児感染症関連血球貪食症候群に関与する. 芳山 恵, 神波信次, 中山京子, 吉川徳茂. 日本血液学会総会 2009. 11. 24、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神波 信次 (KOUNAMI SHINJI)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 50316098

(2) 研究分担者

芳山 恵 (YOSHIYAMA MEGUMI)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 00433368

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :