

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20790741

研究課題名(和文) 小児2次性血球貪食症候群におけるヘムオキシゲナーゼの研究

研究課題名(英文) Analysis of heme oxygenase-1 in secondary hemophagocytic syndrome

研究代表者

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

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であるが、本研究ではヘムオキシゲナーゼ-1の免疫制御機構に着目し小児血球貪食症候群におけるヘムオキシゲナーゼ-1の研究を行った。小児血球貪食症候群では他の感染症より血清中ヘムオキシゲナーゼ-1は高値を示し、新たなバイオマーカーとして活用しうる可能性がある。

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 that heme oxygenase-1 might be involved in the abnormal immune reactions in acquired HLH. Serum levels of heme oxygenase-1 were elevated in HLH patients and our results suggest that heme oxygenase-1 might be a useful bio-marker of HLH.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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

二次性血球貪食症候群はウイルス、細菌などの感染症、小児特発性関節炎などの自己免疫疾患、悪性リンパ腫などの悪性腫瘍など、さまざまな原因により発症し、持続する発熱、肝脾腫、けいれん・意識障害などの中枢神経症状、播種性血管内凝固症候群をきたす致命

的症候群である。過剰な活性化状態に陥ったT細胞/単球・マクロファージがもたらす高サイトカイン血症が病態の主因であるが、二次性血球貪食症候群において、なぜT細胞/単球・マクロファージが過剰な活性化状態に陥るのか、現在も明らかでない。我々が経験した小児血球貪食症候群72例の中で2次性血

球貪食症候群は 65 例 (90.3%) を占め、そのうち 5 例 (7.7%) に死亡がみられ、治療成績向上のため発症機序の解明が重要である。我々はこれまで二次性血球貪食症候群の発症機序について研究を進め、小児感染症関連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である cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) の遺伝子多型を解析し、1) T 細胞抑制作用が弱くなる多型が患者群で多いこと、2) T 細胞抑制作用が弱くなる多型で臨床症状・検査値が重症であること、を明らかにした。この結果から、発症機序解明のため、二次性血球貪食症候群における免疫応答制御機構のさらなる研究が必要であると考えた。

ヘムオキシゲナーゼ (heme oxygenase; HO) はヘム代謝に関わる酵素であると同時に、細胞を酸化ストレスによる細胞障害から守る細胞保護タンパクとして研究されてきた。近年、HO のなかで、その誘導酵素である HO-1 は細胞保護のみならず、炎症・免疫制御に関与していることが明らかになった。末梢血単球における解析では、特定の単球・マクロファージ亜群に HO-1 が発現し、HO-1 産生が炎症・免疫制御に重要な役割を果たすことが明らかとされた (Yachie ら *Exp. Biol. Med.* 228:550-556, 2003)。すなわち、HO-1 を産生する CD16<sup>high</sup>CCR2<sup>-</sup> および CD16<sup>low</sup>CCR2<sup>+</sup> の末梢血単球が、異なる時相で異なる役割を果たし、炎症・免疫制御に関与していることが明らかになりつつある。肝、腎などの臓器においても、臓器所属の単球・マクロファージによる HO-1 産生が臓器における局所の炎症・免疫応答制御に関与していることが判明した。また、HO-1 タンパクが制御性 T 細胞の増殖・活性化を介して免疫応答制御に関係する可能性が臓器移植後の拒絶反応において明らかにされている (Yamashita ら *FASEB. J.* 20:776-778, 2006)。このように HO-1 がさまざまな疾患において炎症・免疫制御に関与している可能性がある。以上のことから、二次性血球貪食症候群における HO-1 について解析し、二次性血球貪食症候群における HO-1 による炎症・免疫応答制御について検討し、HO-1 を介する新たな免疫調節療法の開発を着想した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は新たな治療法開発を目指し、二次性血球貪食症候群の発症機序を解明

することである。すなわち「HO-1 による炎症・免疫応答制御が二次性血球貪食症候群の病態に関与する」とする仮説を立証することが研究の目的である。

## 3. 研究の方法

以下の研究課題から「二次性血球貪食症候群における HO-1 による炎症・免疫応答制御の関与を明らかにすること」を試みた。

### 1) HO-1 遺伝子多型解析

患者末梢血から DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出する。HO-1 遺伝子座プロモーター領域の GT リpeat について既報のプライマーにて PCR 法にて増幅、PCR 産物を電気泳動および direct シークエンス法を併用して GT リpeat 数を決定する。日本人では GT リpeat 数は 16 リpeat から 39 リpeat が予測され、既報のとおり 27 リpeat 未満、27 から 33 リpeat 未満、33 リpeat 以上の 3 群について患者群と正常コントロール群の多型頻度の比較を行う。また各多型群と臨床症状、臨床検査値との相関を解析するとともに、今回検討する HO-1 mRNA 発現量、血清 HO-1 値との相関について解析する。

### 2) 末梢血単球亜群の動態解析

患者末梢血からリンパ球分離液を用い単核細胞を分取後、フローサイトメーター (CytomicsFC500, BECKMAN COULTER) を用い、2 色法 (CD16-FITC, CCR2-PE) にて、末梢血単球について CD16<sup>high</sup>CCR2<sup>-</sup> および CD16<sup>low</sup>CCR2<sup>+</sup> の 2 群を同定し、経時的に測定する。

\* 二次性血球貪食症候群における上記末梢血単球亜群についての知見はなく、コントロールとして正常コントロール群のみならず、インフルエンザ A 感染症、川崎病各 5 例についても同様の検討を行った。

### 3) 血清 HO-1 タンパクの測定

血球貪食症候群発症時、治療開始後、寛解期の血清について、血清 HO-1 タンパクを ELISA キット (Stressgen, Victoria,

Canada) を用いて測定する。採取した血液は直ちに血清分離し、測定まで-80℃で保存する。

\*二次性血球貪食症候群での血清 HO-1 タンパク値のデータはなく、正常コントロール群のみならず、インフルエンザ A、川崎病患者各 5 例についても測定し比較検討を行った。

#### 4) 患者情報の収集

二次性血球貪食症候群患者について以下の臨床データについて収集する。

(臨床症状)

転帰、発熱期間、肝脾腫、中枢神経症状、播種性血管内凝固症候群、低ナトリウム血症、低タンパク血症

(検査値)

末梢血血算、血液凝固系検査 (PT, APTT, フィブリノーゲン, FDP), ALT/AST, LDH, CPK, 血清 Na 値, 血清アルブミン値, 血清フェリチン値, 可溶性 IL-2R, 尿  $\beta 2$  ミクログロブリン値。

上記の結果から以下について検討した。

1. HO-1 遺伝子多型について患者群と正常群の遺伝子多型頻度比較
2. HO-1 遺伝子多型と臨床データの相関の解析
3. HO-1 遺伝子多型と血清 HO-1 タンパク値の相関の解析
4. 末梢血単球亜群の動態と血清 HO-1 タンパク値の解析

#### 4. 研究成果

##### 1) HO-1 遺伝子多型について

検討した 3 群の遺伝子多型について患者群 (47 例) と正常コントロール群に有意差を示す遺伝子多型は認めなかった。

##### 2) HO-1 遺伝子多型と臨床症状について

予後と有意な相関を示す遺伝子多型は認めず、DIC の有無、中枢神経症状など臨床症状と相関を示す遺伝子多型はみられなかった。

##### 3) HO-1 遺伝子多型と臨床検査値について

GT リポート数が 33 以上の遺伝子多型をもつ患者群で血清 ALT 値が高値となる傾向がみられたが有意差はみられなかった

( $p=0.11$ )。血清 s IL2R, LDH 値, フェリチン値と相関を示す遺伝子多型はみられなかった。

4) HO-1 遺伝子多型と血清 HO-1 値について血清 HO-1 値は高値を示したが HO-1 遺伝子多型と血清 HO-1 値に有意な相関はみられなかった。

5) 血球貪食患者における血清 HO-1 値について

#### ①小児 2 次性血球貪食症候群患者では血清 HO-1 値は高値である。

測定した 47 例の患者群血清 (血球貪食症候群診断時) の HO-1 値は 18-175ng/ml と 10ng/ml 以上の高値を示した。正常コントロールとして測定した 10 例は平均 2.8ng/ml で全例 10 以下、インフルエンザ A 感染症 5 例は平均 3.2ng/ml、川崎病 5 例の平均 4.3ng/ml と較べて全例高値であった。

#### ②血清 HO-1 値と他の検査値との相関

血清 HO-1 値と血清フェリチン値, 血清 LDH 値, s IL2R 値などの臨床検査値との相関について検討したが明らか相関はみられなかった。血清フェリチン値が高い症例では血清 HO-1 値も高値となる傾向がみられたが有意ではなかった。

#### ③血清 HO-1 値と臨床症状について

予後と HO-1 値に相関はみられず、他の臨床症状とも有意な相関はみられなかった。

(研究成果のまとめ)

本研究では小児血球貪食症候群で血清 HO-1 値が有意に高値でありヘムオキシゲナーゼの病態への関与が窺われた。また、血清 HO-1 値はこれまで報告されている血球貪食症候群のバイオマーカー (血清フェリチン値, 血清 s IL2R 値) とは有意な相関がみられず、今後血球貪食症候群の新しいバイオマーカーになり得ると考えられた。血球貪食症候群の診断、予後予測マーカーとなり得る可能性があり今後症例数を増やし検討する必要がある。

#### 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 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

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

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :