

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24791084

研究課題名(和文)ランゲルハンス細胞組織球症の発症とトル様受容体経路の多型性の関連

研究課題名(英文) Association between development of Langerhans cell histiocytosis and polymorphism in the Toll-like receptor pathways

研究代表者

早瀬 朋美 (Hayase, Tomomi)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：50433587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ランゲルハンス細胞組織球症(LCH)の病変部では、未熟樹状細胞の形質を持つLCH細胞の腫瘍性増殖と炎症細胞浸潤がみられる。LCH細胞のトル様受容体(TLR)の発現を解析したところ、TLR1,2,6,7,8の発現が亢進していた。病変部の生検組織からDNAを抽出し、5例で全エクソンシーケンス(WES)解析を、16例で変異特異的PCRによるBRAF変異解析を行った。WES解析でTLRに遺伝子変異は認めなかった。5例中3例に既報の体細胞変異であるMAP2K1変異を検出した。PCR法では16例中6例に既報の体細胞変異であるBRAFFV600E変異を認めた。

研究成果の概要(英文)：Langerhans cell histiocytosis (LCH) is characterized by proliferation of immature dendritic cells and infiltration of inflammatory cells. We analyzed expression of toll-like receptors (TLRs) in LCH cells and found that TLR1, 2, 6, 7, 8 was over expressed. Whole exome sequencing (WES) was performed on paired samples of LCH lesions and normal tissues obtained from 5 patients. Mutation specific PCR for BRAF was performed in 16 LCH samples. No mutation of TLRs was found but previously reported MAP2K1 mutation was found in 3 of 5 patients by WES. BRAFFV600E mutation was found in 6 of 16 LCH samples by PCR.

研究分野：小児科学

キーワード：ランゲルハンス細胞組織球症 トル様受容体 BRAF MAP2K1 全エクソンシーケンス解析 リアルタイムPCR

1. 研究開始当初の背景

1) ランゲルハンス細胞組織球症

(langerhans cell histiocytosis: LCH) は、未熟樹状細胞の性質をもつ LCH 細胞が異常増殖するとともに、LCH の病変部位では LCH 細胞のほか T リンパ球や好酸球、マクロファージ、破骨細胞様巨細胞など、さまざまな炎症細胞が浸潤し、組織傷害が生じる (森本 哲 . 組織球の疾患 . 小児科学 , 医学書院 , 2008) 。

LCH 患者血清では、IL-12 や IL-18、IL-8、CCL2、CXCL1、CXCL9 などの炎症性サイトカイン・ケモカインの異常高値が認められ、LCH 病変部位に浸潤している炎症細胞の相互刺激によりサイトカインストームが形成されると考えられた (Morimoto A, et al. 26th Histiocyte Society Annual Meeting, 2010) 。

LCH 細胞の増殖の機序として、BRAF 遺伝子変異が報告され腫瘍性増殖の説が唱えられたが (Badalian-Very G, et al. Blood. 2010) 感染症などによる反応性増殖の説もあり、不明な点が多かった。 (Egeler RM. Immunol Rev. 2010) 。

2) Toll 様受容体 (Toll-like receptor: TLR)

は樹状細胞に発現する病原体を認識する受容体で、十数種類が報告されており、樹状細胞の活性化やサイトカイン産生に関わっていた (Akira S, et al. Cell. 2006) 。 Toll 様受容体およびその経路のシグナル伝達分子

(Interferon regulatory factor: IRF) の多型性による疾患感受性が自己免疫疾患や感染症、悪性腫瘍において、報告された (Salloum R, et al. Transl Res. 2011, Ok M, et al. Int J Med Microbiol. 2011, Kutikhin AG. Hum Immunol. 2011) 。

LCH 細胞には Toll 様受容体 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9 が高発現していると報告され、LCH 細胞からの炎症性サイトカイン・ケモカインの産生に重要な働きをしていると考えられた。

(Badalian-Very G, et al. 26th Histiocyte Society Annual Meeting, 2010) 。

2. 研究の目的

ランゲルハンス細胞組織球症に關与する Toll 様受容体を特定し、その変異解析を行う。ランゲルハンス細胞組織球症患者に高発現する Toll 様受容体変異を明らかにすることで、未だ不明点の多い病態の一部を解明し、診断、治療の一助とする。

3. 研究の方法

1) LCH 病変における TLR の発現についての解析

LCH 病変のホルマリン固定パラフィン包埋組織切片の TLR と CD1a の免疫染色を行った。次に、LCH 細胞と正常皮膚ランゲルハンス細胞の TLR 発現を比較するため、Gene Expression Omnibus: accession number GSE35340、および、GSE16395 を TLR に着目して解析した。

2) 全エクソンシーケンス解析

多くの網羅的な情報が得るため、LCH 細胞および正常細胞の両者について、次世代シーケンサーを用いたタンパク質をコードする全エクソンシーケンス (WES) 解析を行った。LCH 細胞はホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 切片から CD1a 免疫染色陽性細胞をレーザーマイクロダイセクションにより採取し、DNA 抽出を試みたが、解析に適する十分量の検体が得られなかった。よって、6 検体の新鮮凍結 (FF) 組織を用いた。また、正常細胞として、患者の末梢血検体を収集し DNA を採取した。解析に必要な十分量の DNA を採取できた 5 症例の LCH 検体と正常コントロールの末梢血でペア解析を行った。

3) 変異特異的リアルタイム PCR 法による BRAF 変異解析

16例のLCH生検組織のFFまたはパラフィン包埋検体(FFPE)からDNAを抽出し、アレル特異的リアルタイムPCR法(Entrogen社 BRAF codon 600(E/K/D) mutation analysis kit)を使用し BRAF V600E/K/D 変異についての解析を行った。1変異に対して必要なDNA量は20ngだったため、DNA量が少ない検体についてはV600E変異のみを解析した。使用したアレル特異的リアルタイムPCR法キットの変異検出感度は>1%だった。

4. 研究成果

1)LCH病変におけるTLRの発現について解析したところ、LCH細胞ではTLR1,2,6,7,8の発現が亢進していた。これらが、LCHにおける病態形成に参与している可能性が考えられたが、後述のLCH細胞のWES解析からはTLRの異常は認めなかった。

2)WES解析では解析を行った5例中3例のLCH細胞において既報のMAP2K1変異(Brown NA, et al. Blood. 2014, Chakraborty, et al. blood. 2014)を検出したが、BRAF変異は認めなかった。TLRの変異は認めなかった。(表1)

表1 全エクソンシーケンス解析結果

| 症例 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-----------|-------------|---|-------------|---|-------------|
| BRAF 変異 | - | - | - | - | - |
| MAP2K1 変異 | p.56_61 del | - | p.56_61 del | - | p.57_62 del |
| TLR 変異 | - | - | - | - | - |

- : 陰性

3) 変異特異的リアルタイムPCR法では解析を行った16例中6例にBRAFV600E変異を認めた。(表2)

BRAFV600E変異を認めたうちの1例はWES解析も行っており、WES解析では

BRAF変異陰性であった。今回用いた解析キットにおけるBRAF V600Eの検出感度は1%とされているが、実際に細胞株を用いた検出限界の検定では0.25%まで検出可能であった。生検時FFが保存されていない症例でも、FFPEから抽出したDNAを用いることで変異特異的リアルタイムPCR法によりBRAF V600Eの変異解析が可能であった。

表2 BRAFV600E変異特異的リアルタイムPCR法結果

| 症例 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|------------|----|----|----------|----------|----------|----------|----------|----|
| 検体 | FF | FF | FF | FF | FF | FF | FF | FF |
| BRAF V600E | - | - | - | + | - | - | + | - |
| 症例 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
| 検体 | FF | FF | FF PE | FF PE | FF PE | FF PE | FF PE | FF |
| BRAF V600E | - | - | + | + | + | + | - | - |

- : 陰性 + : 陽性 FF : 新鮮凍結組織
FFPE : ホルマリン固定パラフィン包埋組織

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〕
なし
(計 0件)

〔学会発表〕
早瀬 朋美、川原 勇太、翁 由紀子、森本 哲. ランゲルハンス細胞組織球症(LCH)細胞における体細胞変異の検索. 第41回LCH研究会. 東京. 2016年3月20日
(計 1件)

〔図書〕
なし
(計 0件)

〔産業財産権〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

早瀬 朋美 (HAYASE, Tomomi)

自治医科大学小児科学・助教

研究者番号 50433587

2) 研究分担者

なし

3) 研究連携者

なし

4)

なし