

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460451

研究課題名(和文)ランゲルハンス細胞組織球症の解析 - 質量分析装置を用いた新規バイオマーカーの同定 -

研究課題名(英文) Identification of new biomarkers about Langerhans cell histiocytosis using mass spectrometry

研究代表者

村上 一郎 (MURAKAMI, Ichiro)

高知大学・教育研究部医療学系連携医学部門・教授

研究者番号：80548701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ランゲルハンス細胞組織球症(以下LCH)患者血清とコントロール血清、LCH亜型間等で有意差を示す血清ピークを質量分析計によって得、それらのピーク即ち新規バイオマーカー候補蛋白の中から、より有用性の高いと考えられるタンパクの同定を進め、ITI4を新規バイオマーカー候補として論文報告した。ITI4は急性炎症に関連して変化する急性相タンパクであり、我々が2014年に論文報告した、LCH発症に關与するメルケル細胞ポリオーマウイルス(以下MCPyV)(Murakami et al. Hum Pathol (2014))に対する患者の反応性とLCH亜型に關連がある事を示した。

研究成果の概要(英文)：Plasma sample from 12 patients with LCH-RO (-) (5 MS-LCH and 7 SS-LCH) and 5 non-LCH patients were analyzed by peptidomics. Mass spectrometry (MS) spectra were acquired and peptides exhibiting quantitative differences between MS-LCH and SS-LCH patients were targeted. One new candidate biomarker, m/z 3145 was selected and identified after obtaining a MS/MS fragmentation pattern using liquid chromatography-MS/MS. This peak was identified as a proteolytic fragment derived from interalpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 (ITI4, [PDB: Q14624]). Peptidomics of LCH have revealed that the level of acute-phase ITI4 distinguishes MS-LCH-RO (-) from SS-LCH-RO (-). Acute-phase proteins serve non-specific, physiological immune functions within the innate immune system. LCH may be a reactive disorder with both underlying neoplastic potential of antigen presenting cells harboring BRAF mutations and hyper-immunity of other inflammatory cells against MCPyV infection.

研究分野：人体病理学

キーワード：ランゲルハンス細胞組織球症

1. 研究開始当初の背景

1953年 Lichtenstein は、好酸球性肉芽腫症、Hand Schüller Christian 病、Letterer Siwe 病の3疾患は、病変の部位・程度、罹患年齢に相違はあるものの、いずれも組織球の浸潤・増殖を共通の組織学的特徴とするとの理解から、これらを histiocytosis X という名称で総括する事を提唱した。その後、増殖している細胞は、樹状細胞の一種であるランゲルハンス細胞の性格を有している事が証明され、1987年に国際組織球学会により、LCH と呼ぶ事が提唱され、現在に至っている。

LCH の原因は確定しておらず、腫瘍性疾患なのか反応性疾患なのか未確定であり、ウイルス感染、先天異常等の様々な関与について研究がなされて来た。

我々は、LCH は腫瘍性疾患の性格を背景に有する反応性疾患である可能性のあるデータを最近得た。

LCH の増殖ランゲルハンス細胞様細胞には monoclonality の存在、BRAF mutation の存在が報告されており、我々も、CGH を用いた 1p36 領域の異常、LOH に関して報告した (Murakami et al. Hum Pathol 2002)。これらの報告は腫瘍説を裏づけるデータと考えられるが、LCH2 亜型 (single system (SS)-LCH、multisystem (MS)-LCH ; LCH-RO(risk organ)+、LCH-RO-) に特異的な異常に関しては確定的なものがなかった。

一方、我々は、SHP-1、インターロイキン 17 レセプター等の発現と LCH 亜型と関連する事を見出した。

フォスファターゼ SHP-1 は、悪性リンパ腫、白血病において機能を失っている(メチル化による発現低下) (Oka et al. American Journal of Pathology 2001) が、LCH においては過剰発現が見られている。LCH 亜型と SHP-1 についても有意差

のある相関関係があり、発症原因と関連があると考え、ランゲルハンス細胞様細胞株に SHP-1 を transfect して解析を進めて来た(2009 アメリカ組織球症協会グラント取得 (2009年12月 - 2010年12月))。

SHP-1 は、ランゲルハンス細胞では Toll-like receptor を介するインターフェロン発現に関与する事が知られており、LCH でも過剰発現しているインターフェロンとの関与が示唆された。また、ウイルス感染に関与する IL-17R に関して LCH 亜型との相関を見出し (Murakami et al Virchows Arch 2013) LCH は BRAF 等の遺伝子異常を有する異常ランゲルハンス細胞が何らかのウイルスに過剰に反応した病態では? との仮説の基に皮膚常在ウイルスと見なされつつある MCPyV との関係調べ、患者血清や病変部組織にウイルスの DNA が存在する症例がある事を見出した (Murakami et al Hum Pathol (2014))。

2. 研究の目的

平成 23 年度採択基盤研究(C)に於いて、LCH 患者血清とコントロール血清、LCH 亜型間等で有意差を示す血清ピークを得た。本応募課題研究では、質量分析計によって得られた、それらのピーク即ち新規バイオマーカー候補蛋白の同定を進める。

3. 研究の方法

質量分析計によって得られた、それらのピーク即ち新規バイオマーカー候補蛋白の同定を進めた。

4. 研究成果

LCH 患者血清とコントロール血清、LCH 亜型間等で有意差を示す血清ピークを質量分析計によって得、それらのピーク即ち新規バイオマーカー候補蛋白の中から、より有用性の高いと考えられるタンパクの同定を進め、ITIH4 を新規バイオマーカー候補として論文報告した。ITIH4 は急性炎症に

関連して変化する急性相タンパクであり、我々が2014年に論文報告した、LCH発症に關与するメルケル細胞ポリオーマウイルス（以下 MCPyV）(Murakami et al. Hum Pathol (2014)) に対する患者の反応性と LCH 亜型に關連がある事を示した。

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 13 件)

(1) Kumata K, Nagata K, Matsushita M, Kuwamoto S, Kato M, Murakami I, Fukata S, Hayashi K. Thyrotropin Receptor Antibody (TRAb)-IgM Levels Are Markedly Higher Than TRAb-IgG Levels in Graves' Disease Patients and Controls, and TRAb-IgM Production Is Related to Epstein-Barr Virus Reactivation. *Viral Immunol.* 査読有 2016 Oct;29(8):459-463. doi: 10.1089/vim.2016.0043

(2) Kuroda N, Yorita K, Naroda T, Hayashi Y, Murakami I. Renal oncocytoma, small cell variant, with pseudorosettes, showing cyclin D1 expression and tubulovesicular cristae of mitochondria. *Pathol Int.* 査読有 2016 Jul;66(7):409-10. doi: 10.1111/pin.12410.

(3) Iwasaki T, Matsushita M, Nonaka D, Nagata K, Kato M, Kuwamoto S, Murakami I, Hayashi K. Lower expression of CADM1 and higher expression of MAL in Merkel cell carcinomas are associated with Merkel cell polyomavirus infection and better prognosis. *Hum Pathol.* 査読有 2016 Feb;48:1-8. doi: 10.1016/j.humpath.2015.09.030.

(4) Iwasaki T, Matsushita M, Nonaka D, Murakami I, Hayashi K. Comment on

'Cytokeratin 20-negative Merkel cell carcinoma is infrequently associated with the Merkel cell polyomavirus'. *Mod Pathol.* 査読有 2016 Jan;29(1):89-90. doi: 10.1038/modpathol.2015.69.

(5) Tanio S, Matsushita M, Kuwamoto S, Horie Y, Kodani I, Murakami I, Ryoke K, Hayashi K. Low prevalence of Merkel cell polyomavirus with low viral loads in oral and maxillofacial tumours or tumour-like lesions from immunocompetent patients: Absence of Merkel cell polyomavirus-associated neoplasms. *Mol Clin Oncol.* 査読有 2015 Nov;3(6):1301-1306. doi: 10.3892/mco.2015.629

(6) Nagata K, Okuno K, Ochi M, Kumata K, Sano H, Yoneda N, Ueyama J, Matsushita M, Kuwamoto S, Kato M, Murakami I, Kanzaki S, Hayashi K. Production of thyrotropin receptor antibodies in acute phase of infectious mononucleosis due to Epstein-Barr virus primary infection: a case report of a child. *Springerplus.* 査読有 2015 Aug 27;4:456. doi: 10.1186/s40064-015-1236-8.

(7) Iwasaki T, Matsushita M, Nonaka D, Kato M, Nagata K, Murakami I, Hayashi K. Phosphohistone-H3 (PHH3) is prognostic relevant in Merkel cell carcinomas but Merkel cell polyomavirus is a more powerful prognostic factor than AJCC clinical stage, PHH3, Ki-67 or mitotic indices. *Pathol Int.* 査読有 2015 Aug;65(8):404-9. doi: 10.1111/pin.12305.

(8) Murakami I, Oh Y, Morimoto A, Sano H, Kanzaki S, Matsushita M, Iwasaki T, Kuwamoto S, Kato M, Nagata K, Hayashi K, Imashuku S, Gogusev J, Jaubert F, Oka T,

Yoshino T. Acute-phase ITIH4 levels distinguish multi-system from single-system Langerhans cell histiocytosis via plasma peptidomics. Clin Proteomics. 査読有 2015 Jun 18;12(1):16. doi: 10.1186/s12014-015-9089-2.

(9) Gogusev J, Murakami I, Telvi L, Goguin A, Sarfati E, Jaubert F. Establishment and characterization of a human parathyroid carcinoma derived cell line. Pathol Res Pract. 査読有 2015 Apr;211(4):332-40. doi: 10.1016/j.prp.2014.12.008.

(10) Murakami I, Matsushita M, Iwasaki T, Kuwamoto S, Kato M, Nagata K, Horie Y, Hayashi K, Imamura T, Morimoto A, Imashuku S, Gogusev J, Jaubert F, Takata K, Oka T, Yoshino T. Interleukin-1 loop model for pathogenesis of Langerhans cell histiocytosis. Cell Commun Signal. 査読有 2015 Feb 22;13:13. doi: 10.1186/s12964-015-0092-z. Review.

(11) Iwasaki T, Matsushita M, Nonaka D, Kuwamoto S, Kato M, Murakami I, Nagata K, Nakajima H, Sano S, Hayashi K. Comparison of Akt/mTOR/4E-BP1 pathway signal activation and mutations of PIK3CA in Merkel cell polyomavirus-positive and Merkel cell polyomavirus-negative carcinomas. Hum Pathol. 査読有 2015 Feb;46(2):210-6. doi: 10.1016/j.humpath.2014.07.025.

(12) Murakami I, Gogusev J, Jaubert F, Matsushita M, Hayashi K, Miura I, Tanaka T, Oka T, Yoshino T. Establishment of a Langerhans cell histiocytosis lesion cell line with dermal dendritic cell characteristics. Oncol Rep. 査読有 2015 Jan;33(1):171-8. doi: 10.3892/or.2014.3567.

(13) Murakami I, Takata K, Matsushita M, Nonaka D, Iwasaki T, Kuwamoto S, Kato M, Mohri T, Nagata K, Kitamura Y, Yoshino T, Hayashi K. Immunoglobulin expressions are only associated with MCPyV-positive Merkel cell carcinomas but not with MCPyV-negative ones: comparison of prognosis. Am J Surg Pathol. 査読有 2014 Dec;38(12):1627-35. doi: 10.1097/PAS.0000000000000279.

〔学会発表〕(計 2件)

(1) 診療領域別講習特別プログラム
研究講演会 組織球・樹状細胞腫瘍の
病理診断アップデート ランゲルハ
ン細胞腫瘍の病理診断と最新知見 村
上一郎 2016 5 12 第105回 日本病
理学会総会 仙台国際センター会議
棟・展示棟(宮城県仙台市) 2016 5 12
(5 12-2016 5 14)

(2) 32nd Annual Meeting of the
Histiocyte Society Oct 17-19, 2016
Dublin, Ireland

ECOLOGY OF MERKEL CELL
POLYOMAVIRUS IN HEALTHY SKIN
SHOWS A CLOSE AGREEMENT
WITH INTERLEUKIN-1 LOOP
MODEL IN LANGERHANS CELL
HISTIOCYTOSIS Ichiro Murakami,
Junko Nakashima, Yumiko Hashida,
Masanori Daibata, Michiko Matsushita,
Takeshi Iwasaki, Satoshi Kuwamoto,
Masako Kato, Keiko Nagata, Kazuhiko
Hayashi, Takashi Oka, Tadashi Yoshino,
Toshihiko Imamura, Akira Morimoto,
Shinsaku Imashuku, Jean Gogusev,
Francis Jaubert Oct 17, 2016-Oct 19,
2016

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
高知大学医学部病理学講座
http://www.kochi-ms.ac.jp/~ff_ptl12/dop/index.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上一郎 (MURAKAMI Ichiro)
高知大学・教育研究部医療学系連携医学部
門・教授 研究者番号：80548701

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

岡 剛史 (OKA Takashi)
岡山大学・医歯薬総合研究科・講師 研究者
番号： 50160651

(4) 研究協力者

()