様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２９　年　　６　月　　９　日現在

機関番号：　１４３０１
研究種目：　基盤研究(C)（一般）
研究期間：　2014～2016
課題番号：　２６４６１５８２

研究課題名（和文）分子病態に基づく血球貪食性リンパ組織球症の新規診療基盤開発

研究課題名（英文）Establishing an innovative platform for the analysis of hemophagocytic lymphohistiocytosis

研究代表者

八角　高裕（Yasumi, Takahiro）

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：００５１１８９１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,700,000円

研究成果の概要（和文）：家族性血球貪食性リンパ組織球症（FHL）に対する包括的診断体制を確立する過程で、従来のNK細胞を用いた解析に比較し、CD57陽性CTL分画を用いた脱顆粒機能解析がスクリーニング検査として優れていることを見出した。又、allogenic LCLに特異的なFHL3患者由来CTLライン、及びHerpesvirus Saimiriを用いて不死化したFHL2・FHL3患者由来CTL細胞株を作成し、これらにPRF1・UNC13D遺伝子の変異cDNAコンストラクトを強制発現させて、蛋白発現・脱顆粒機能・細胞傷害活性に与える影響を解析する系を確立した。

研究成果の概要（英文）：During the process of establishing a comprehensive screening system for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis, we found that a CD57+ CTL degranulation assay more effectively identifies FHL3 patients than the NK cell-based assays.
We established CTL lines derived from FHL2 and FHL3 patients and immortalized some of these cells using herpesvirus saimiri. By transiently expressing PRF1 or UNC13D cDNA constructs into the established FHL model CTL lines, we succeeded in evaluating the effect of a given gene mutation on the protein expression, degranulation, and cytotoxic function.

研究分野：　小児免疫学

キーワード：　血球貪食性リンパ組織球症　迅速診断法　分子病態解析　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、発熱・汎血球減少・肝脾腫・多臓器障害などを主要徴候とし、マクロファージによる血球貪食像を組織学的特徴とする疾患群であり、遺伝的素因による原発性のものと、感染や膠原病などに続発する二次性のものとに大別される。その研究は、主に家族性血球貪食性リンパ組織球症（familial HLH: FHL）の解析を通じて行われており、細胞障害性 T リンパ球（CTL）の異常活性化によるサイトカインの過剰産生と、それに引き続くマクロファージの活性化が基本病態と考えられてきた。

FHL の原因分子である perforin・munc13-4・syntaxin11・munc18-2 は、何れも NK 細胞や CTL の細胞障害活性に関与する分子である。FHL モデルマウスはウィルス感染を契機に HLH を発症するが、その病態機序は、細胞障害活性の低下した CTL や NK 細胞が感染細胞を排除出来ずに持続活性化状態となり、サイトカインの過剰産生からマクロファージの活性化と血球貪食が引き起こされる事であると考えられている。しかし、FHL の殆どは幼少期に発症し、強力な免疫抑制療法と造血幹細胞移植を必要とする為、実際の患者での病態生理は殆ど研究されていない。最近では、機能残存型と思われる遺伝子変異による遅発・非典型例も報告されているが、遺伝子変異の機能的評価システムが確立しておらず、変異が病態や臨床症状に与える影響の評価はなされていない。更に、種々の感染や膠原病を背景に発症する二次性 HLH 症例の病態に関しては殆ど手付かずの状態であった。

我々は、血小板に munc13-4・syntaxin11・munc18-2 蛋白が豊富に発現する事を利用し、血小板を用いたウェスタンブロット法による FHL3・4・5 のスクリーニング検査法を確立すると共に、Flow Cytometry を用いて血小板内の munc13-4 発現を評価する事に成功し、FHL3 の迅速スクリーニングを報告した（Murata, et al. Blood 2011）。これらの方法に、既存の perforin 発現解析と NK 細胞及び CTL の脱顆粒機能解析を組み合わせ、全国より寄せられる HLH 症例に対して FHL スクリーニングを行っていたが、この過程で、NK 細胞の脱顆粒機能が残存している FHL3 症例や、munc13-4 の欠損を認めるものの通常の遺伝子検査で変異を特定し得ない症例の存在を確認している。中には、NK 活性や脱顆粒機能が低下していながら既知の分子異常を認めない症例や、家族内集積を認めながらも既知の機能異常を伴わない症例も存在し、未知の分子機構や異なる病態の存在が疑われる。更に、病初期に於ける症例の白血球分画やフェリチン・可溶性 IL-2 受容体（sIL-2R）などの検査データを集積・解析した結果、FHL はリンパ球の活性化を背景とするものの、多くの二次性 HLH 症例に於いては骨髄球系細胞の活性化を主体とする病態が存在している事を見出した（Yasumi, et al. British J Haematology 2015）。

以上より、HLH の病態には、FHL に代表されるリンパ球を中心とした獲得免疫系の活性化を主体とする病態と、骨髄球系細胞を中心とした自然免疫系の活性化を主体とする病態の、少なくとも２つの異なる病態が混在しており、これまでとは異なるアプローチによる解析が必要とされる状況であった。

２．研究の目的

以上の背景と研究成果を基として、(1) 既知の原発性 HLH に対する包括的検査体制の確立、(2) FHL 遺伝子変異の機能解析系の確立、(3) バイオマーカーやトランスクリプトーム解析による HLH の原因・誘因別病態解明、(4) 原因不明 HLH 症例の新規責任遺伝子の同定、(5) 患者細胞や疾患特異的 iPS 細胞とヒト化マウスを用いた生体内での HLH 病態解明基盤の確立、を重点研究目的とした。

３．研究の方法

(1)既知の原発性 HLH に対する包括的検査体制の確立

全国より FHL を疑われて当科に寄せられる全ての HLH 症例に対し、①NK 細胞・CTL の脱顆粒機能解析、②FHL 責任分子の蛋白発現解析、③既知の原発性 HLH に対する遺伝子解析（PRF1/UNC13D/STX11/STXBP2/SH2D1A/BIRC4/ITK）、の 3 項目を行う。同時に、日本人には極めて稀な HLA 型を有する LCL（B 細胞リンパ芽球様細胞株）を用いて患者 CTL ラインを作成し、後述のバイオマーカーやトランスクリプトーム解析に使用する。

(2) FHL 原因遺伝子変異の機能評価系確立

配列特異的な人工 DNA ヌクレアーゼ技術を用い、ヒト NK 細胞株（KHYG1）と CTL 細胞株（TALL-104）を基にして、既知の FHL 遺伝子を欠損した細胞株を作成する。作成した細胞株に患者より同定された変異遺伝子を強制発現し、特定の遺伝子変異が脱顆粒機能や細胞障害活性に与える影響を評価する系を確立する。

(3) バイオマーカーやトランスクリプトーム解析による HLH の原因・誘因別病態解明

患者血清中のサイトカインやケモカイン等のバイオマーカーの直接測定を行うと共に、患者より直接分離した細胞や患者 iPS 細胞より誘導した細胞を刺激して、バイオマーカー・トランスクリプトーム解析を行う。

(4)原因不明 HLH 症例の新規責任遺伝子の同定

上記の解析から得られた情報と臨床情報を基に HLH 症例の病態分類を行い、原因不

明 HLH 症例に対して病態別にエキソーム解析を行い、新規原因遺伝子の同定を目指す。

（5）患者細胞や疾患特異的 iPS 細胞とヒト化マウスを用いた生体内での HLH 病態解明基盤の確立

患者 iPS 細胞より分化誘導した各種血液細胞、或いは患者より採取した造血幹細胞を、ヒトの免疫系再構築が可能な免疫不全マウスに移植してヒト化 HLH マウスモデルを作成し、生体内での病態解析と治療法開発の基盤となる系を確立する。

## ４．研究成果

（1）既知の原発性 HLH 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（論文投稿中）。又、従来の NK 細胞を用いた解析に比較し、CD57 陽性 CTL 分画を用いた脱顆粒機能解析が FHL3 のスクリーニング検査として優れていることを見出し報告した（Hori, et al. J Clinical Immunology 2107）。加えて、患者末梢血単核球より日本人には極めて稀な HLA 型を有する allogenic LCL に特異的 CTL ラインを作成する系を構築し、allo 抗原特異的な細胞傷害活性や脱顆粒機能の評価を行うシステムを構築した。これにより、患者由来 CTL を用いた直接的な細胞傷害活性評価が可能となった。

（2）FHL 原因遺伝子変異の機能評価系確立

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、allogenic LCL に特異的な FHL3 患者由来 CTL ラインを作成し、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、脱顆粒機能に与える影響を解析する系を確立した。更に、FHL2 及び FHL3 患者由来 CTL を Herpesvirus Saimiri を用いて不死化・株化することに成功し、これらの細胞株に PRF1 及び UNC13D の変異 cDNA コンストラクトを発現させて細胞傷害活性を評価する事が可能となった（投稿準備中）。

これにより、これまで病原性の評価が難しかった PRF1 及び 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 FHL2/FHL3 病態解明に大きく寄与する事が期待される。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。

（3）バイオマーカーやトランスクリプトーム解析による HLH の原因・誘因別病態解明

FHL3 に加え、EBV-HLH や原因不明二次性 HLH 症例の CTL ラインを作成しており、これら細胞株を用いたトランスクリプトームやプロテオーム解析の準備を整えている。又、一部の検体を用いてパイロット的解析を行っており、中でも成人発症 Still 病の母より出生した直後に二次性 HLH を発症した新生児例の解析に於いてその病態に迫ることが出来た。

この症例では、胎内感染を示唆する IgM の上昇と、恐らく母親由来と思われる血清 IL-18 の異常高値が認められたが、フェリチン値は可溶性 IL-2 受容体の値に比して低値であり、リンパ球の活性化を主体とする FHL に類似した HLH 病態があると考えられた。このことより、高濃度の IL-18 の存在化では、マクロファージの活性化が乏しい状況でも CTL が過剰に活性化しうる事が示唆され、MAS に代表される IL-18 の上昇を伴う HLH 病態の発症機構の解明に繋がるものと考えられた（Hashimoto, et al. Clinical Immunology 2017）。

（4）原因不明 HLH 症例の新規責任遺伝子の同定

FHL や EBV-HLH を除いた原因不明 HLH 症例が集積されており、一部の症例に対しては両親を含めたトリオでのエキソーム解析を行ったが、HLH の新規責任遺伝子同定には至っていない。

（5）患者細胞や疾患特異的 iPS 細胞とヒト化マウスを用いた生体内での HLH 病態解明基盤の確立

FHL3 症例由来 iPS 細胞株は作成済みである。その他の HLH 症例由来の検体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、CTL ライン株も多数確立済みである。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

（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 5 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 HemophagocyticLymphohistiocytosis 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.

Hori M, Yasumi T, Shimodera S, Shibata H, Hiejima E, Oda H, Izawa K, Kawai T, Ishimura M, Nakano N, Shirakawa R, Nishikomori R, Takada H, Morita S, Horiuchi H, Ohara O, Ishii E, Heike T. A CD57+ CTL Degranulation Assay Effectively Identifies Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Type 3 Patients. J Clin Immunol. 査読有. 2017; 37: 92. doi:10.1007/s10875-016-0357-3.

Hashimoto M, Ogata S, Yamaguchi A, Kawada K, Kenmochi M, Ebato T, Nomoto K, Bando Y, Shimodera S, Shibata H, Ono S, Nakayama M, Yasumi T, Ishii M. Hemophagocytic lymphohistiocytosis with high serum levels of IL-18 and predominant lymphocyte activation in a neonate born to a mother with adult-onset Still's disease. Clin Immunol. 査読有. 2017; 180: 95. doi: 10.1016/j.clim.2017.04.007.

〔学会発表〕（計 3 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）.

柴田洋史、八角高裕、日衛嶋栄太郎、下寺佐栄子、中川権史、井澤和司、河合朋樹、西小森隆太、小原収、平家俊男. 家族性血球貪食症候群（FHL）3 型における迅速診断系・機能解析系の確立. 第 44 回日本臨床免疫学会総会 2016 年 9 月 9 日. 京王プラザホテル（東京都新宿区）.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔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
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

（2）研究分担者
なし

（3）連携研究者
①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小原収（OHARA, Osamu）
公益財団法人かずさ DNA 研究所
ヒトゲノム研究部・部長
研究者番号：20370926

（4）研究協力者
①西小森隆太（NISHIKOMORI, Ryuta）
京都大学大学院医学研究科
発達小児科学・准教授
研究者番号：70359800

②堀雅之（HORI, Masayuki）
京都大学・大学院医学研究科
発達小児科学・大学院生

③日衛嶋栄太郎（HIEJIMA, Eitaro）
京都大学・大学院医学研究科
発達小児科学・大学院生

④柴田洋史（SHIBATA, Hirofumi）
京都大学・大学院医学研究科
発達小児科学・大学院生

⑤下寺佐栄子（SHIMODERA, Saeko）
京都大学・大学院医学研究科
発達小児科学・大学院生