

200936090A

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

# 血球貪食症候群の病態・診療に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 安 友 康 二

平成22（2010）年5月

# 目 次

## [ I ] 総括研究報告

研究代表者 安友康二 .....	1
------------------	---

## [ II ] 分担研究報告

1. 血球貪食性リンパ組織球症の治療法の確立と病態解明に 関する研究 .....	5
石井榮一 愛媛大学大学院医学系研究科小児医学	
2. 先天性血球貪食症候群におけるT細胞機能解析に 関する研究 .....	7
安川正貴 愛媛大学大学院医学系研究科生体統御内科学	
3. 血球貪食性リンパ組織球症の治療法の確立と病態解明に 関する研究 .....	10
金兼弘和 富山大学附属病院小児科	
4. 血球貪食性リンパ組織球症の治療法の確立と病態解明に 関する研究 .....	12
河 敬世 大阪府立母子保健総合医療センター	
5. 血球貪食症候群の診断・治療指針および診断法の開発 .....	15
大賀正一 九州大学病院総合周産期母子医療センター	

6. 血球貪食症候群の病態・診療研究に資する  
検体保存体制整備 ..... 1 8  
藤本純一郎  
国立成育医療センター研究所

7. 家族性血球貪食症候群のゲノム解析研究 ..... 2 1  
北村明子  
徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

[ III ] 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 2 3

[ IV ] 研究成果の論文 ..... 2 7

[ V ] 班構成員名簿 ..... 1 4 7

## [ I ] 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
総括研究報告書

血球貪食症候群の病態・診療に関する研究

研究代表者 安友康二 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授

研究要旨：血球貪食症候群(HPS)は、多様な原因で発症する致死性の疾患であるため、その早期発見と適切な治療が要求される。その中でも家族性血球貪食症候群(FHL)は、常染色体劣性遺伝で家族性に発症する致死性疾患群であり、最も重症なHPSとして位置づけられる。本研究班では、日本のHPSの実態を把握し、その病態および診断・治療法の開発を目的とする研究を実施した。その結果、HPSの診断および治療に必要な指針を改定し、HPSの予後についても明らかにすることができた。さらにFHLの原因遺伝子の同定研究を実施し、複数の候補領域を同定することに成功した。また、FHLを早期診断するためのMunc13-4に対する単クローン抗体を樹立し、フローサイトメーターで使用できることも確認した。そして、HPSの実態を把握するためにJPLSGと連携し、継続したHPS病態・診療研究体制を構築した。

研究分担者

- ・石井榮一：愛媛大学大学院医学研究科
- ・安川正貴：愛媛大学大学院医学研究科
- ・藤本純一郎：国立成育医療センター研究所
- ・河敬世：大阪府立母子保健総合医療センター
- ・金兼弘和：富山大学医学部小児科
- ・大賀正一：九州大学病院総合周産期母子医療センター
- ・北村明子：徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

A. 研究目的

血球貪食症候群(HPS)は原発性と二次性に大別され、多様な原因によって発症する。また適切な治療が施されないと死に至る疾患群であるため、HPSの実態を把握し、診断・治療基準を確立し、その病態を理解する研究を実施することは重要である。その目的を達成するため本研究では以下の項目を研究目的とした。

- (1) HPSの中には、明らかな遺伝性が存在する家系が知られており、家族性HPS(FHL)と称される。FHLにはこれまで4種類の原因遺伝子が報告されているが、日本のFHL症例の40%程度の症例では、未だ原因遺伝子が同定されていない。本研究班では、未だ原因が不明のFHL症例の原因

遺伝子を同定し、HPSの病態を理解することを目的とした。

- (2) FHLの原因遺伝子の一つであるMunc13-4の遺伝子異常を証明するためには、DNA配列を検討し、変異を見出すことが必要である。しかしMunc13-4はエクソン数が多いために、直接シーケンスには時間を要する。そのため、これまでウエスタンブロット法によってタンパク発現を検討する方法が第一次スクリーニングとして用いられてきた。しかし、ウエスタンブロット法を実施するためには1日以上を要し、専門的技術も必要となる。そこで、本研究班では、フローサイトメーターで用いることのできる抗Munc13-4抗体の樹立を目的とした。
- (3) HPSの診断、治療の指針を見直し、新たな指針を作成することを目指した。それに加えて、新たな治療法についても検討することを目的とした。
- (4) HPSの実態を把握するために他の組織との連携が必要であり、日本小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)との連携をすすめた。

B. 研究方法

1. 班会議を開催し、本班の研究項目について

て議論する。JPLSGとの連携を構築するために必要事項を検討する。

2. これまでの治療指針、診断指針について改訂点を検討する。

3. HPS罹患者のCTL活性の迅速診断法を検討する。

4. HPS治療法についてこれまでの治療法の問題点を抽出する。

5. FHL検体の収集

既知の遺伝子異常は除外されていることを診断基準として日本人FHLの検体を収集する。

(倫理面への配慮) 本研究は、徳島大学ゲノム倫理審査委員会の承認を得て実施する。個人情報には匿名化して取り扱う。

6. 全ゲノム連鎖解析

高密度SNPマッピングアレイを用いて、SNP遺伝子型タイピングを行い、全ゲノム連鎖解析を行う。Merlin programを用いてLOD値を算出し、統計学的に連鎖の妥当性を検証する。有意に連鎖を認めた場合、候補領域から候補遺伝子の選定を行い、直接シーケンス法で変異スクリーニングを行う。

7. Munc18-2遺伝子変異を探索

新たに発見されたMunc18-2の日本人患者の有無を検討する。

8. Munc13-4に対する新規診断法の開発

Munc13-4の発現をフローサイトメーターで検出できる単クローン抗体を樹立する。

### C. 研究結果

1. 2009年4月16日(奈良)、2009年11月28日(千葉)で全体班会議を実施し、本班の運営方針、研究進捗状況を各班員が発表して議論した。また、11月の班会議では来年度の本班の継続に向けての将来構想についても議論した。全体班会議に加えて、安友と研究分担者の石井、安友と研究分担者の藤本はそれぞれ個別に会議を行い、本班の運営方針について討論した。

JPLSGとの連携をすすめるために、JPSLGの責任者の名古屋医療センターの堀部敬三先生と会合を持ち、JPLSGとの連携について討論を行った。その結果、JPLSGと本班は全面的に協力して、HPS

診療の検討を行うことになった。2009年6月に開催されたJPLSGの全体会議において、本班の紹介と連携方針について安友が発表した。

2. 診断フローチャート作成：JPLSGとの連携構築にあたって、これまで用いられてきた JPSLG の診断フローチャートを改訂した。改訂点は、以下の三点である。1) 診断のためのサンプル送付先を簡素化した。2) T リンパ球細胞傷害活性測定の必須化。3) 家族性症例の DNA サンプルの収集・保存を国立成育医療センターに一元化した。診断フローチャートについては、本研究班で独自に開設したホームページ (<http://hlh-fhl.basic.med.tokushima-u.ac.jp/index.html>) に掲載し誰でもがアクセスできる環境を構築した。

診断基準：これまで、HPS については JPLSG が作成した診断基準が用いられてきた。本研究班では新生児期発症の HPS では乳児期以降の発症と比較して臨床所見が異なるため診断基準に補足が必要であるという結論に達した。その結果、1) sIL-2R/ferritin の有効性、2) 高TG の重要性は低い、3) 肝脾腫とDIC の重要性は高い、4) 好中球減少よりもリンパ球減少が重要、5) 活性化 T 細胞の増加・発熱が目立たない、の五項目について従来の診断基準に補足する必要があると考えられた。本診断基準については今後の臨床的検討が必要である。

3. 31名から樹立したアロ抗原特異的CTL株は全て、アロ抗原刺激によって高濃度の IFN- $\gamma$  を産生した。PRF1 遺伝子ナンセンス変異 CTL の細胞傷害活性は著しく低下していた。PRF1 遺伝子ミスセンス変異 CTL の細胞傷害活性は中等度に低下を認めた。他方、UNC13D 遺伝子異常ならびに STXP2 遺伝子異常 CTL の細胞傷害活性は、ほぼ PRF1 遺伝子ナンセンス変異 CTL 活性と PRF1 遺伝子ミスセンス変異

CTL 活性の中間程度に低下していた。また、原因不明 FHL2 例のうち 1 例の CTL 活性は軽度低下しており、他の 1 例はほとんど検出されない程度に高度低下していた。

4. 日本における HLH 症例はデータセンターに登録され HLH-2004 治療が行われている。月平均 1, 2 例のペースで 2009 年 12 月末までに 52 例が登録された。一方国際研究による集積では 206 例が集積され 3 年全生存率は 63% で HLH-94 の 58% より改善した。移植前の死亡は 37 例 (18%) で HLH-94 の 63 例 (27%) を有意に上回った。しかし移植後の予後に差はなかった。
5. FHL の日本人家系を 13 集めることに成功した。特に、近親婚歴を持つ一家系が存在しており、その家系は全ゲノム解析を実施する上では重要な家系である。
6. これまでに日本人 FHL13 家系 35 名(患者 13 名、家系内健常人 22 名)の検体採取を行った。8 家系 28 名 (患者 8 名、家系内健常人 20 名)を対象に、Illumina 370 quad を用いて全ゲノム SNP 遺伝子型タイピングを行った。しかし、疾患遺伝子座の異質性 (Locus Heterogeneity) が考えられ、有意な LOD 値を満たすことはできなかった。血族婚を有する 1 家系を対象に、Illumina 370 quad を用いて全ゲノム SNP 遺伝子型タイピングを行い、3 つの領域を候補領域として同定することに成功した (J-FHL-1, J-FHL-2, J-FHL-3)。3 候補領域はいずれも、FHL1(9q21.3-22)、FHL2 (*PRF1*, 10q22) FHL3(*UNC13D*, 17q25.1) FHL4(*STX11*, 6q24) FHL5(*STXBP2*, 19p13.3-p13.2)とは重複しておらず、既知の遺伝子座への連鎖は除外できた。
7. 2 例の MUNC18-2 遺伝子異常 (FHL5) を同定することに成功した。
8. Munc13-4 の単クローン抗体を樹立するために Munc13-4 の 778-895 部分をコードする領域を pGEX6P-1 に組み込み、GST 融合タンパクを合成し、精製

した。その GST 融合タンパクを用いて定法に従い単クローン抗体を樹立した。その結果、フローサイトメーターで用いることのできる Munc13-4 に対する抗体の樹立に成功した。

#### D. 考察

本班の運営に当たっては、全体班会議を二回実施し、それぞれの研究目的を明確にして班を運営することができた。その結果、JPLSG との連携も構築できた。本連携は、継続した HPS 病態の把握には極めて有効であると考えられる。

難治性疾患克服研究事業・研究奨励分野での研究目的である診断指針、治療指針の作成に関しては、HPSには従来の指針があることからその指針を見直す検討を行った。その結果、新生児期の HPSには診断についてそれ以外の発症例とは異なる基準をもうける方が良いという結論が得られた。しかし、この結論については今後の臨床的検討が必要である。また治療指針については、骨髄非破壊移植の適応が考えられたが、これについても今後の臨床的検討が必要になる。

FHLの遺伝解析に関しては、2009年にヨーロッパのグループから新たな遺伝子異常が Munc18-2に報告された。日本人症例でもその遺伝子異常を石井・安川らが同定することに成功した。この発見は日本人にも同変異が存在することを証明したことに意義があり、今後 Munc18-2の早期診断法を開発する必要性を示している。

Munc13-4は遺伝子サイズが大きいため、直接シーケンス法には時間がかかる。そのため簡易診断法が求められてきた。我々は Munc13-4に対する単クローン抗体の樹立に成功し、その抗体はフローサイトメーターでも用いることができることを確認した。今後は、この抗体が実際の診断でも用いることができるかについて、実際に患者サンプルを用いて明らかにすることを計画している。

#### E. 結論

(1) 今年度の研究により、HPS 診療の実態を

把握しその資料を今後の診療に生かす体制を構築することができた。

(2) HPSの診断・治療指針を改訂した。

(3) Munc18-2の変異を持つ日本人患者を同定することに成功した。

(4) 新しい原因遺伝子候補領域の同定に成功した。

(5) Munc13-4遺伝子変異の簡易診断が可能な単クローン抗体の樹立に成功した。

#### F. 健康危険情報

特記すべき事無し。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表：

1. Kijima M, Iwata A, Maekawa Y, Uehara H, Izumi K, Kitamura A, Yagita H, Chiba S, Shiota H, Yasutomo K. Jagged1 suppresses collagen-induced arthritis by indirectly providing a negative signal in CD8+ T cells. *J Immunol* 182:3566-3572 (2009)

2. Okamoto M, Matsuda H, Lucas JL, Domenico J, Yasutomo K, Takeda K, Gelfand EW. Jagged1 on dendritic cells and Notch on CD4+ T cells initiate lung allergic responsiveness by inducing IL-4 production. *J Immunol* 183:2995-3003 (2009)

3. Erdenebayar N, Maekawa Y, Nishida J, Kitamura A, Yasutomo K. Protein tyrosine phosphatase-kappa regulates CD4+ T cell development through ERK1/2-mediated signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 390:489-93 (2009)

4. Alam MS, Maekawa Y, Kitamura A, Tanigaki K, Yoshimoto T, Kishihara K, Yasutomo K. Notch signaling drives IL-22 secretion in CD4+ T cells by stimulating the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:5943-5948 (2010)

研究分担者のそれぞれの発表は、各分担者項目を参照。

##### 2. 学会発表：

1. 宮崎サイエンスキャンプ 招待講演 安友康二、Tリンパ球細胞傷害活性の制御機構 (2010年2月27日、宮崎)

研究分担者のそれぞれの発表は、各分担者項目を参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし



## [ II ] 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

研究分担報告書

血球貪食性リンパ組織球症の治療法の確立と病態解明に関する研究

研究分担者

石井榮一 愛媛大学大学院医学系研究科小児医学 教授

研究要旨：血球貪食性リンパ組織球症（HLH）の標準的治療法を確立し、家族性 HLH（FHL）の病態解析を行った。研究方法は HLH の治療研究に関しては国際治療研究 HLH-2004 治療研究を進め HLH の標準的治療の確立に努める。治療研究の内容はシクロスポリン A、デキサメタゾン、エトポシドによる初期治療を行い、FHL ではできるだけ早期の造血幹細胞移植を併用する。さらに FHL に対しては蛋白発現および CTL 活性解析にてスクリーニングを行い FHL 症例を抽出、さらに既知の遺伝子異常（4 種類）の遺伝子型とその頻度を明らかにする。

#### A.研究目的

血球貪食性リンパ組織球症（HLH）の標準的治療法を確立し、FHL の病態解析を進め新たな治療法開発の基礎データとする。

#### B.研究方法

HLH に関しては国際治療研究 HLH-2004 に参加し HLH の標準的治療の確立に努める。治療研究の内容はシクロスポリン A、デキサメタゾン、エトポシドによる初期治療を行い、家族性・遺伝性 HLH ではできるだけ早期の造血幹細胞移植を併用することにより、前治療研究 HLH-94 に比較して 3 年全生存率が向上するか評価する。そのうち FHL については蛋白発現解析および CTL 活性解析にてスクリーニングを行い FHL 疑い例に対して 4 種類の遺伝子異常の有無を解析し、各遺伝子型の頻度を明らかにする。

（倫理面の配慮）すべての症例は十分な説明と同意を得たうえで個人が特定されないよう ID で登録される。

#### C.研究結果

日本における HLH 症例はデータセンターに登録され HLH-2004 治療が行われている。月平均 1, 2 例のペースで 2009 年 12 月末までに 52 例が登録された。一方国際研究による集積では 206 例が集積され 3 年全

生存率は 63%で HLH-94 の 58% より改善した。移植前の死亡は 37 例(18%)で HLH-94 の 63 例 (27%) を有意に上回った。しかし移植後の予後に差はなかった。

一方蛋白発現解析および CTL 活性解析にてスクリーニングを行い 31 例が FHL として抽出された。PRF1 による FHL2 は 10 例、UNC13D による FHL3 は 7 例、STXBP2 による FHL5 は 2 例で、STX11 による FHL4 は 1 例もなかった。

#### D.考察

HLH-2004 治療研究は移植前の生存率の向上に有効であった。今後は移植も含めたさらなる治療成績の改善を目的として、新たな治療研究を行う必要がある。FHL の鑑別は CTL 活性および蛋白発現解析により可能であり、遺伝子解析も順調に行われている。しかし一部の症例では遺伝子異常が同定されておらず、今後新規遺伝子の解明を進める必要がある。

#### E.結論

HLH-2004 治療研究は移植前の死亡率を減少させたが、全生存率の有意な向上は得られていない。次期治療研究では、新たな治療薬の導入、移植前処置の軽減、などが考慮される予定である。FHL の抽出は順調であり、日本における FHL の実態解明はほぼ終了した。今後は病態に基づく新たな治療展開に向けた

基礎研究を行う必要がある。

F.健康危険情報  
特になし。

G.研究発表

1. 論文発表

1. Trizzino A, Zur Stadt U, Ueda I, Risma K, Janka G, Ishii E, Beutel K, Sumegi J, Cannella S, Pende D, Mian A, Henter J-I, Griffiths GM, Santoro A, Filipovich A, Arico M. Genotype-phenotype study of familial hemophagocytic lymphohistio cytosis due to perforin mutations. *J Med Genet* 45:15-21 (2008)

2. Suzuki N, Morimoto A, Ohga S, Kudo K, Ishida Y, Ishii E. Characteristics of hemo phagocytic lymphohistiocytosis in neonates: A Nationwide Survey in Japan. *J Pediatr* (in press)

3. Ohga S, Kudo K, Ishii E, Honjo S, Morimoto A, Ohsugi Y, Sawada A, Inoue M, Tabuchi K, Suzuki N, Ishida Y, Imashuku S, Kato S, Hara T. Hematopoietic stem cell transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. *Pediatr Blood Cancer* 54: 299-306 (2009)

2. 学会発表

1. Ohga S, Kudo K, Osugi Y, Sawada A, Tabuchi

K, Suzuki N, Morimoto A, Ishida Y, Kato S, Ishii E (2008) Hematopoietic stem cell transplantation for familial hemophago cytic lymphohistiocytosis or Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lympho histiocytosis in Japan. 24<sup>th</sup> Annual Meeting of the Histiocyte Society, October, Berlin, Germany

2. Suzuki N, Morimoto A, Ohga S, Kudo K, Ishida Y, Kato S, Ishii E (2009) Neonatal hemophagocytic Lymphohistiocytosis in Japan. 25<sup>th</sup> Annual Meetig of Histiocyte Society, September, Bilbao, Spain

3. Kogawa K, Sato H, Asano T, Ohga S, Kudo K, Morimoto A, Sato T, Ohta S., Wakiguchi H, Kanegane H, Oda M, Ishii E (2009) Nationwide survey of EBV-HLH in Japan. 25<sup>th</sup> Annual Meetig of Histiocyte Society, September, Bilbao, Spain

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

研究分担報告書

先天性血球貪食症候群におけるT細胞機能解析に関する研究

研究分担者

安川正貴 愛媛大学大学院医学系研究科生体統御内科学 教授

研究要旨：先天性血球貪食症候群（familial hemophagocytic lymphohistiocytosis; FHL）患者のT細胞機能を解析して、本疾患の病態との関連を検討した。31人のFHL患者からアロ抗原特異的細胞傷害性T細胞（CTL）株を樹立して、遺伝子異常と細胞傷害活性を解析した。31症例中、17症例が perforin 遺伝子異常（FHL2）であり、10症例が MUNC13-4 遺伝子異常（FHL3）であることが判明した。また、2症例が最近新たに同定された MUNC18-2 遺伝子異常（FHL5）であった。FHL4 は存在しなかった。残り2症例の遺伝子異常は不明である。FHLのサブタイプによって、細胞傷害活性低下の程度は異なり、CTL機能障害とFHLサブタイプの病態との関連が示唆された。

#### A. 研究目的

先天性血球貪食症候群（familial hemophagocytic lymphohistiocytosis; FHL）における遺伝子異常とT細胞機能、特に細胞傷害性T細胞（cytotoxic T lymphocyte; CTL）機能を解析し、FHLサブタイプとの関連を明らかにする。

#### B. 研究方法

31人のFHL患者末梢血T細胞を、EBウイルスでトランスフォームしたアロリンパ芽球様細胞株で繰り返し刺激し、アロ抗原特異的CTL細胞株を樹立した。細胞傷害活性をクロミウム放出試験で測定した。また、アロ抗原刺激によるサイトカイン産生能を、ELISA法で測定した。

他方、すでに同定されているFHLの責任遺伝子（*PRF1*, *UNC13D*, *STX11*, *STXBP2*）の異常につき解析した。

（倫理面の配慮）すべての症例は、患者本人または両親に十分な説明と同意を得たうえで個人が特定されないようIDで登録された。

#### C. 研究結果

1) 遺伝子解析結果：31症例中、17症例が perforin 遺伝子異常（FHL2）、10症例が MUNC13-4 遺伝子異常（FHL3）、2症例が

最近新たに同定された MUNC18-2 遺伝子異常（FHL5）であることが判明した。STX11 遺伝子異常による FHL4 は1例も存在しなかった。また、残り2症例の遺伝子異常は不明であり、原因不明のFHLが存在することが示された。

2) サイトカイン産生と細胞傷害活性：31名から樹立したアロ抗原特異的CTL株は全て、アロ抗原刺激によって高濃度のIFN-gを産生した。*PRF1* 遺伝子ナンセンス変異CTLの細胞傷害活性は著しく低下していた。*PRF1* 遺伝子ミスセンス変異CTLの細胞傷害活性は中等度に低下を認めた。他方、*UNC13D* 遺伝子異常ならびに *STXBP2* 遺伝子異常CTLの細胞傷害活性は、ほぼ *PRF1* 遺伝子ナンセンス変異CTL活性と *PRF1* 遺伝子ミスセンス変異CTL活性の中間程度に低下していた。また、原因不明FHL2例のうち1例のCTL活性は軽度低下しており、他の1例はほとんど検出されない程度に高度低下していた。

#### D. 考察

我が国におけるFHLサブタイプの頻度は、FHL2, FHL3, FHL5がそれぞれ、55%, 32%, 6%であり、検索した範囲ではFHL4は存在しないことが示された。また、責任遺伝子が不明なFHL症例が存在することも明らかとなっ

た。

CTL の細胞傷害活性低下の程度は、FHL のサブタイプによって異なることが明らかとなった。つまり、*PRF1* 遺伝子ナンセンス変異<*UNC13D* 遺伝子異常ならびに *STXBP2* 遺伝子異常<*PRF1* 遺伝子ミスセンス変異<正常の順で、低下することが明らかとなった。

本研究結果から、CTL の細胞傷害活性低下の程度と FHL サブタイプとの関連が初めて明らかとなった。従来、FHL の細胞傷害活性は NK 細胞を用いて解析されてきた。しかし、NK 細胞数は基礎疾患や治療によって大きく異なり、疾患本来の細胞傷害活性を反映しているとは考え難い。本研究で樹立したアロ抗原特異的 CTL 株は作製が比較的簡単であり、僅かの採血量から解析可能で、また大量の患者検体を保存することもでき、将来の遺伝学的ならびに免疫学的解析に大いに貢献できるものと思われる。

興味深いことに、原因不明 FHL2 症例の CTL 活性は大きく異なっていた。つまり、1 例は軽度低下、他の 1 例は高度低下していた。このことは、原因不明 FHL がまだ少なくとも 2 種類存在することを強く示唆している。

#### E. 結論

我が国における FHL サブタイプの頻度を明らかにし、CTL 活性低下の程度と FHL サブタイプとの関連を初めて明らかにした。今後は、責任遺伝子不明 FHL の原因を明らかにする必要がある。

#### F. 健康危険情報 特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ochi, T., Fujiwara, H., Suemori, K., Azuma, T., Yakushijin, Y., Hato, T., Kuzushima, K. and Yasukawa, M.: Aurora-A kinase: A novel target of cellular immunotherapy for leukemia. *Blood* 113:66-74 (2009).

2. Matsubara, E., Sakai, I., Yamanouchi, J., Fujiwara, H., Yakushijin, Y., Hato, T., Shigemoto, K. and Yasukawa, M.: The role of zinc finger protein 521/early hematopoietic zinc finger protein in erythroid cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 284:3480-3487 (2009).

3. Tanimoto, K., Yakushijin, Y., Fujiwara, H., Otsuka, M., Ohshima, K., Sugita, A., Sakai, A., Hato, T., Hasegawa, H. and Yasukawa, M.: Clinical significance of co-expression of CD21 and LFA-1 in non-Hodgkin's B-cell lymphoma. *Int. J. Hematol.* 89:497-507 (2009).

4. Suemori, K., Fujiwara, H., Ochi, T., Ogawa, T., Matsuoka, M., Matsumoto, T., Mesnard, J.-M. and Yasukawa, M.: HBZ is an immunogenic protein but not a target antigen for HTLV-1-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Gen. Virol.* 90:1806-1811 (2009).

5. Yamanouchi, J., Hato, T., Tamura, T., Fujiwara, H., Yakushijin, Y. and Yasukawa, M.: Compound heterozygous mutations in the *PROS1* gene responsible for quantitative and qualitative protein S deficiency. *Int J Hematol.* 90:537-539 (2009).

6. Okamoto, S., Mineno, J., Ikeda, H., Fujiwara, H., Yasukawa, M., Shiku, H. and Kato, I.: Improved expression and reactivity of transduced tumor-specific TCRs in human lymphocytes by specific silencing of endogenous TCR. *Cancer Res.* 69:9003-9011 (2009).

##### 2. 学会発表

1. Fujiwara, H., Ochi, T., Suemori, K., Azuma, T., Kuzushima, K., Yasukawa, M.: Aurora-A kinase: a novel target of immunocell therapy against human leukemia.

- (Presidential symposium) The 35<sup>th</sup> Annual meeting of the European group for blood and marrow transplantation Göteborg, Sweden. 2009.3.30
2. Nagai, K., Fujiwara, H., Ochi, T., Shirakata, T., Yasukawa, M., Mineno, J., Kuzushima, K. Development of a novel anti-leukemia immunogenetherapy using Aurora-A kinase-specific T-cell reseptor genes transfer. The 51st Annual meeting of the American Sociey of Hematology. New Orleans. U.S.A. 2009.12.7
  3. Ochi, T., Fujiwara, H., Nagai, K., Shirakata, T., Kuzushima, K., Okamoto, S., Mineno, J., Shiku, H., Ozawa, H., Ishikawa, F., Yasukawa, M. Development of novel stem cell transplantation and gene-immunotherapy using WT1-specific T-cell receptor gene. 51<sup>th</sup> American Society of Hematology. New Orleans, U.S.A. 2009.12.6
  4. Fujiwara, H., Ochi, T., An, J., Nagai, K., Shirakata, T., Mineno, J., Shiku, H., Yasukawa, M.: WT1-targeting immunogene therapy for human leukemia by using WT1-specific T cell receptor gene transfer. The 4<sup>th</sup> International Conference on WT1 in Human Neoplasia Osaka, Japan. 2009.9.10
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

研究分担報告書

血球貪食性リンパ組織球症の治療法の確立と病態解明に関する研究

研究分担者

金兼 弘和 富山大学附属病院小児科 講師

研究要旨：EBウイルス関連血球貪食性リンパ組織球症（EBV-HLH）は、EBV感染を契機に異常な免疫反応が起こり、その結果マクロファージによる血球貪食をきたす疾患である。自然寛解する軽症例から、エトポシドなどの抗癌剤投与を必要とする重症例までさまざまである。今回わが国のEBV-HLHについてアンケート調査を行い、その実態を明らかにするとともに、適切な治療法確立のために重症度分類を行った。

A. 研究目的

EBウイルス関連血球貪食症候群（EBV-HLH）は、EBV感染を契機に異常な免疫反応が起こり、その結果高サイトカイン血症ならびにマクロファージによる血球貪食をきたす疾患である。自然寛解する軽症例もあれば、早期に抗癌剤も含めた適切な治療を行わないと致命的となるものも少なからず存在する。EBV-HLHは日本をはじめとするアジアに多いことが知られ、日本では少なくとも年間25例以上のEBV-HLHが発症している。今回、わが国の小児EBV-HLHの臨床的特徴をアンケート調査によって明らかとし、治療法確立のために重症度分類を行うこととした。

B. 研究方法

2003年から2008年に発症した18歳未満のEBV-HLH症例を調査対象とし、日本小児血液学会と日本小児感染症学会の会員に調査票を郵送する形でアンケート調査を行った。集積された症例数は143例であり、回収率は78%であった。慢性活動性EBV感染症や重複症例を除いた117例について解析を行った。

HLHの診断基準すなわち1) 発熱 $\geq 38.5^{\circ}\text{C}$ 、2) 脾腫あり、3) 血球減少、4) 高トリグリセリド血症または低低フィブリノーゲン血症、5) NK細胞活性低値または欠損、6) フェリチン $\geq 500\text{ ng/mL}$ 、7) sIL-2R $\geq 2400\text{ U/mL}$ 、8) 骨髄、脾臓、または

リンパ節に血球貪食像ありの8つをスコアとし、5つ以上満たすものを重症例とした。また大阪府立母子保健医療センターの河は血球貪食症候群の重症度分類（図1）を提唱しており、この分類についても検討を加えた。

A	GOT/GPT	<2	0	HPSスコア A~Dの総和
		2 $\leq$ , <3	1	
		3 $\leq$	2	
B	LDH	<1,000	0	0~3点 軽症
		1,000 $\leq$ , <3,000	1	4~7点 中等症、重症
		3,000 $\leq$	2	
C	フェリチン	<10,000	0	化学療法、移植後HPSスコア A~Cの総和
		10,000 $\leq$ , 30,000<	1	
		30,000 $\leq$	2	
D	血小板数	$\geq 100,000$	0	0~2点 軽症
		<100,000	1	

図1 河のスコア

C. 研究結果

わが国の小児EBV-HLHの平均発症年齢は $4.1\pm 3.2$ 歳であり、男女比は0.88であった。EBV感染は初感染が93%を占めた。発症時の臨床症状は発熱（100%）、肝腫大（81%）、脾腫大（58%）、リンパ節腫大（44%）、中枢神経症状（17%）の順に多く認められた。初回治療はVP16を含む多剤併用化学療法が53%に、ステロイドを中心とした治療が32%に行われたが、経過観察やガンマグロブリン投与のみの例も15%認められた。初回治療で68%の症例は寛解となったが、寛解が得られなかった症例のほとんどは死亡した。

HLH2004 の診断基準のうち5つ以上を認めたものを重症例として5つ未満のものを軽症例として生存率を比較したところ、軽症例ではすべて生存していた。

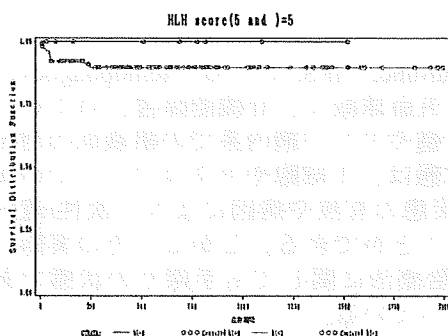


図2 HLH スコアと全死亡比較

前述の河のスコアで0-3点を軽症例、4-7点を重症例として生存率を比較したところ、河のスコアでは軽症例と重症例で生存率に差は認められなかった。

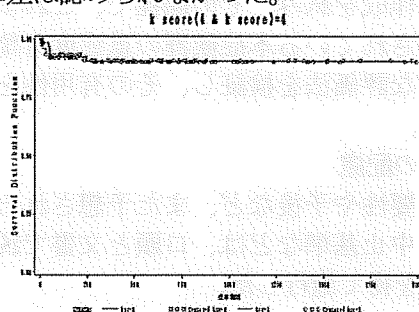


図3 河のスコアと全死亡比較

#### D. 考察

河は血球貪食症候群の重症度分類を提唱しているが、今回の検討では河のスコアにおいて軽症例と重症例の生存率で差は認められなかった。すべてが同じ治療を受けたわけではなく、重症度に応じて治療が行われた結果を示しており、必ずしも河のスコアが有用でないことを示すものではない。しかし、EBV-HLH に対する重症度分類としてはEBV コピー数、クローナリティー、EBV 感染細胞等も考慮に入れた新たな分類が必要かもしれない。

#### E. 結論

アンケート調査によってわが国のEBV-HLH 117例の臨床的特徴を明らかにすることができた。重症度分類として河のスコアと生存率を比較したが、軽症例と重症例で生存率に差は認められなかった。EBV-HLH に対する重症度分類は新たなものが必要と考えられ、今後の検討を要すると思われる。

研究協力者：子川和宏（防衛医科大学校小児科）

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

子川和宏、佐藤弘樹、浅野 健、大賀正一、工藤寿子、森本 哲、佐藤 貴、大田 茂、脇口 宏、金兼弘和、小田 慈、石井榮一。日本における小児EBV-HLHの全国調査。第51回日本小児血液学会、2009、11/27-29、千葉。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

研究分担報告書

血球貪食性リンパ組織球症の治療法の確立と病態解明に関する研究

研究分担者

河 敬世 大阪府立母子保健総合医療センター 院長

研究要旨：血球貪食症候群(hemophagocytic syndrome; HPS,または hemophagocytic lymphohistiocytosis;HLH)(以下 HPS/HLH)は、発熱、汎血球減少、肝機能障害、DIC、高LDH、高フェリチン血症などの検査値異常と骨髄やリンパ網内系での組織球の増殖と血球貪食により診断される症候群である。その本態は、T細胞やマクロファージの異常活性化による高サイトカイン血症であり、基礎疾患の有無や病因により一次性/遺伝性/家族性のものと二次性/反応性のものとに分けることができる。しかし、その実態に関しては不明な部分が多く、さらに重症度分類や治療法に関しても手探りの状態であり、標準的な診断・治療法の確立が喫緊の課題となっている。

#### A. 研究目的

HPS/HLH は一次性/遺伝性と二次性/反応性に大別される。一次性 HPS/HLH の責任遺伝子の解明が進み、パーフォリンを中心とした細胞傷害性顆粒の産生・搬送・分泌機能に関する遺伝子に何らかの異常のあることが判明してきた。一次性 HPS/HLH の診断が確定すれば、その時の臨床的重症度と関係なく、造血幹細胞移植の絶対的適応である。一方、二次性の場合には原因も様々であり、軽症のものから重症型まで多岐にわたる。原因が何であれ、高サイトカイン血症（サイトカインネットワークの極端なアンバランス）による組織球の増殖・活性化と細胞傷害活性の低下（ウイルス感染などの場合）が考えられ、臨床的重症度が予後を左右する。それゆえ、診断・重症度分類とそれに基づいた治療戦略の構築が求められている。

これまでは、一次性 HPS/HLH の診断基準として提唱されている HLH\_2004 が広く用いられてきたが、重症度はまったく反映されておらず、また治療法に関しても免疫化学療法が推奨されているのみで、基礎疾患や重症度別の治療法を確立する必要がある。

#### B. 研究方法

これまで提唱されてきた診断基準は、それ

なりに有用であるが、近年診断例が増加しつつある造血幹細胞移植後 HPS などへの応用は難しく、包括的な診断基準と個別の診断基準を作成するために症例を集積する必要がある。本研究では移植後 HPS の診断基準の作成を試み、その過程で、これまでに提唱されている本症候群の重症度分類や客観的な評価法を検証し、その有用性を検討する。

倫理面への配慮

治療の必要性や予後など、また予想される副作用、中止基準などは、口頭と文書で説明し同意を得て施行した。

#### C. 研究結果

表1に二次性 HPS/HLH の重症度分類を、図1にそれらをスコア化したものを示した。本分類法では、重症度分類の中等症、重症はスコア4以上に分類された。表の2～5はわれわれが経験した17例の同種移植後 HPS の患者背景、臨床的特徴、治療効果と個別の診断基準を示したものである。骨髄破壊の前処置による移植 (MAST) が 7/84 例(8.3%)、骨髄非破壊的前処置による移植 (RIST) が 10/149 例(6.7%)であった。

表 1

**血球貧血症候群 (HPS) の治療法**

1. 一次性HPS : 同種造血幹細胞移植の適応

2. 二次性HPS :

- 軽症型は、発熱や血球減少の程度が軽く、全身状態も保たれている。輸血の必要性もなく、経過観察か、プレドニゾンやγグロブリン大量療法などの単剤療法(免疫調節のみ)が良い。
- 中等症は、軽症型と重症の間で、T細胞やマクロファージの異常活性化の抑制を目的に免疫化学療法(プレドニゾン+シクロスポリン+エトポシドの3剤併用)を行う。
- 重症型は、高熱が持続し汎血球減少症の程度も強く、肝障害などの臓器障害や凝固異常、DIC、フェリチン値の異常高値(数千ng/ml<)などを呈し、全身状態も悪い。

**H P Sスコア**

A	GOT/GPT	<2	0	HPSスコア A~Dの総和
		2≤, <3	1	
		3≤	2	
B	LDH	<1,000	0	0~3点 軽症
		1,000≤, <3,000	1	
		3,000≤	2	
C	フェリチン	<10,000	0	化学療法、移植後HPSスコア A~Cの総和
		10,000≤, 30,000<	1	
		30,000≤	2	
D	血小板数	≥100000	0	0~2点 軽症
		<100000	1	
				3~6点 中等症、重症

図 1

表 2

移植後早期HPSを発症した17例 (MAST: 7, RIST: 10)

UFI	Disease	Age at transplant (Y)	SC source Donor	HLA matching allele(GvH方向)	MAC or RC	GvHD prophylaxis
289	AJL	3	RBH, mother	4/6	MAC	Tacro+MTX
364	ALL	2	CD34FB, father	3/6	MAC	Tacro
333	AJL	9	UBH	6/6	MAC	Tacro+MTX
380	NHL	3	RBH, mother	3/6	MAC	Tacro+MTX+mPSL
465	AJL	3	RBH, mother	4/6	MAC	Tacro+MTX+mPSL
485	ALL	13	RBH, sibling	4/6	MAC	Tacro+MTX+mPSL
479	NHL	3	RBH, mother	3/6	MAC	Tacro+MTX+mPSL
311	Immunodeficiency	9	UBH	6/6	RC	Tacro+MTX
375	EBV-NK-LPD	16	CD34FB, mother	3/6	RC	Tacro
164	NHL	13	RFB, father	3/6	RC	none
471	JA	5	RBH, sibling	6/6	RC	Tacro
493	BJL	1	UCB	6/6	RC	CSA
499	ALL	9	RBH, mother	3/6	RC	Tacro+MTX+mPSL
503	ALL	12	RBH, father	5/6	RC	Tacro+MTX+mPSL
510	NHL	1	UBH	6/6	RC	Tacro+MTX
521	NHL	9	CD34FB, father	3/6	RC	Tacro+MTX
524	NHL	1	RBH, father	4/6	RC	Tacro+MTX+mPSL

2002 - 2008

表 3

移植後早期HPSを発症した17例 (MAST: 7, RIST: 10)

UFI	Onset days post transplant	Symptoms		Laboratory data				
		Fever	Skin rash	WBC at onset	Ferritin	LDH	sIL-2R phagocytosis	
289	10	Y	Y	100	99429	1155	9785	Y
364	8	Y	no	100	103000	4900	HE	Y
333	12	Y	no	100	70185	602	4241	Y
380	5	Y	no	100	206898	2590	2637	HE
465	8	Y	Y	100	113412	2121	2857	Y
485	10	Y	Y	300	158205	1228	5575	Y
479	14	Y	Y	3000	11329	1608	2149	HE
311	10	Y	Y	200	55000	1450	4641	Y
375	7	Y	no	100	239000	8245	1912	HE
164	7	Y	Y	100	10290	1870	16170	HE
471	9	Y	no	500	44816	745	1424	Y
493	7	Y	Y	100	15068	487	2707	Y
499	9	Y	no	100	60263	1641	5332	HE
503	19	no	no	100	39934	1215	3289	Y
510	7	Y	Y	100	23499	738	7440	HE
521	17	Y	no	900	43678	1268	1775	HE
524	6	Y	Y	200	21589	1013	6260	HE

2002 - 2008

表 4

移植後早期HPSを発症した17例 (MAST: 7, RIST: 10)

UFI	Treatment before Etop	Etop 50mg/m2	Combination therapy	Outcome	Engraftment	aGVHD grade
289	IVG, mPSL-Pulse	no		CR	Y	I
364	IVG	1		CR	failure	HE
333	mPSL-Pulse	1		CR	Y	I
380	mPSL-Pulse	1		CR	Y	II
465	mPSL-Pulse	2		CR	Y	II
485	no	1	mPSL-Pulse	CR	Y	E
479	mPSL-Pulse	1		CR	Y	II
311	IVG, mPSL-Pulse	1		CR	Y	II
375	mPSL-Pulse	1		CR	failure	HE
164	no	2	mPSL-Pulse	CR	Y	IV
471	no	4	mPSL-Pulse	CR+Recurrence	Y	0
493	mPSL-Pulse	2	HD-IVG	CR	Y	I
499	mPSL-Pulse	1		CR	Y	II
503	no	1		FD	secondary failure	HE
510	mPSL-Pulse	2		CR	Y	II
521	no	1		CR	failure	HE
524	mPSL-Pulse	1		CR	Y	II

2002 - 2008

表 5

**【A proposal for diagnostic criteria of early onset of HPS following allogeneic SCT】**

We propose the following criteria from the clinical course and laboratory findings obtained in our patients.

- [1] Sustained fever with no identifiable infectious etiology
- [2] Hepatic dysfunction with a high AST/ALT ratio (> 1.0)
- [3] High serum concentrations of ferritin, LDH and sIL-2R
- [4] Hemophagocytosis in the bone marrow, spleen or lymph nodes

HPS is strongly suspected with the presence of [1]-[3], even if [4] is not confirmed.

**D. E. 考察および結論**

表 1 の重症度分類とそのスコア評価法の有用性は確認できたが、今後の多数例での検討が必要である、

移植後HPSは、移植後早期の生着前後にみられる場合と、生着後数ヵ月以降にみられる場合があり、後期のものは二次性HPS/HLH の感染症関連の HPS/HLH に準じて対処すればよいが、早期のものは適切に対応しないと拒絶されたり、多臓器不全に進展して死の転帰をとりやすいので要注意である。今回の検討に基づき、同種移植後早期のHPSの診断基準を示したものが表 5 である。治療に関しては少量の VP-16(100mg/m2 の半量)が即効性で著効するが、不応例の予後が不良で、新規の治療法開発が急がれる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kimoto T, Kawa K, et al. Growth deceleration in a girl treated with imatinib. *Int J Hematol*;89:251-252 (2009)
2. Kikuchi A, Kawa K, et al. A study of rasburicase for the management of hyperuricemia in pediatric patients with newly diagnosed hematologic malignancies at high risk for tumor lysis syndrome. *Int J Hematol*;90: 492-500 (2009)
3. Atsuta Y, Kawa K, et al. Disease specific analyses of unrelated cord blood transplantation compared with unrelated bone marrow transplantation in adult patients with acute leukemia. *Blood*;113:1631-1638 (2009)

2. 学会発表

該当無し。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
（分担）研究報告書

血球貪食症候群の診断・治療指針および診断法の開発

研究分担者 大賀 正一 九州大学病院総合周産期母子医療センター 准教授

研究要旨：家族性血球貪食性リンパ組織球症（Hemophagocytic Lymphohistiocytosis: HLH）を正確に診断し、早期治療を開始するため、遺伝子異常が確定した新生児発症例から、新生児 HLH の診断と治療の問題点について検討した。全国調査の結果から、新生児 HLH は①発熱が顕著でない、②感染性のもものではヘルペスウイルスが多く TORCH が鑑別になる、③免疫化学療法への適応と至適量決定が難しい、などが明らかとなった。FHL5 が発見され、フローサイトメトリ（FACS）によるスクリーニングの重要性が増している。新生児例には、従来の診断基準と治療プロトコルの再検討が必要であることが示された。また、治療不応例に対する移植までの治療法および造血細胞移植の前処置などについても現在検討中である。

A. 研究目的

家族性HLHのうちFHL2, 3, 4の原因遺伝子は各々 *PRF*, *UNC13D*, *STX11* で、2009年に *STXBP2*異常がFHL5として同定された。FACSやWestern blottingにて、これらのスクリーニング法が開発されてきた。一方、二次性HLHの存在と臨床像の多様性から、本症の診断と治療は決して容易ではない。治療に関しても骨髄非破壊的前処置を用いた造血細胞移植が推奨されるが、その方法は確立していない。本症における診断と治療の問題点を明らかにする。

B. 研究方法

FACSにてperforin蛋白の細胞内染色を行い、*PRF*遺伝子の塩基配列をDirect Sequencingにより決定しFHL2を診断する。新生児の診断確定例から、診断と治療を検討する。新生児発症例の全国調査を行い、臨床的特徴と治療の問題点を明らかにする。とくに新生児から乳児期早期発症例の造血細胞移植までの診断と治療について検討する。

C. 研究結果

HLHを発症した新生児（原発性2例、二次性1例）を経験した。1例はCD8およびCD56陽性細胞にperforin蛋白発現が欠損し、*exon3 del550.551CTG*の2塩基欠失を確認してFHL2

と診断した。片アレルは検索中である。この満期産成熟児は出生時から肝脾腫と血球減少を呈したが38℃以上の発熱は明らかでなかった。デキサメサゾンとシクロスポリン療法、交換輸血などを受けた。もう1例は在胎34週1724gで出生し脾腫と血球減少を呈した。子宮内発育遅延から胎内発症も示唆された。二次性HLHはサイトメガロウイルス関連であった。新生児例の全国調査結果などと比較し、新生児の診断における注意点が明らかとなった。①発熱（とくに未熟児例で）、高トリグリセリド血症の重要性は低い。②肝脾腫と播種性血管内凝固症候群の重要性は高い。③好中球減少よりリンパ球減少が目立つ。④活性化T細胞の増加が顕著でない。⑤胎児発症（胎児水腫・低出生体重）がある。⑥NK活性の評価は難しいが、診断には可溶性IL-2受容体/フェリチンを含めた8項目の十分な検討を行う。また、治療については、腎不全管理の困難さ、VP16投与の適応とこれに変わる薬剤が問題となった。

D. 考察

研究班の調査から、日本のHLH患者の遺伝子型と表現型が解明されてきた。HLH2004診断基準と治療プロトコルは臨床的に極めて有用であるが、遺伝子型の診断技術が進み、新生児例や非典型例などが明らかとなってい