

201024071A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

先天性顆粒放出異常症の病態解明と
診断法の確立に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 石井 榮一

平成23(2011)年3月

目 次

I. 総括研究報告

- 先天性顆粒放出異常症の病態解明と診断法の確立 ----- 1
石井榮一
(表 1、図 2)

II. 分担研究報告

1. 症例の集積、検体採取と保存、解析 ----- 9
藤本純一郎
(図 2)
2. 家族性血球貪食性リンパ組織球症のリンパ球機能解析に関する研究 ---- 13
安川正貴
3. 先天性顆粒放出異常症の病態解明と診断法の確立に関する研究 ----- 16
山本健
4. X連鎖リンパ増殖症候群の分子遺伝学的解析に関する研究 ----- 19
金兼弘和

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 23

I. 総括研究報告書

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

先天性顆粒放出異常症の病態解明と診断法の確立に関する研究

研究代表者 石井 榮一 愛媛大学大学院医学系研究科教授

研究要旨

先天性顆粒放出異常症は細胞傷害性Tリンパ球（CTL）の顆粒放出の異常によりさまざまな臨床所見を呈する乳幼児の疾患の総称であり、家族性血球貪食性リンパ組織球症、Chediak-Higashi 症候群、Griscelli 症候群、Hermansky-Pudlak 症候群、X-linked lymphoproliferative disease などが含まれる。家族性血球貪食性リンパ組織球症は今回の解析でその約90%の症例が4種類の遺伝子異常を有していることが判明した。JPLSG 研究による症例集積と原因遺伝子の解析、リンパ球機能解析は順調に進んでおり、その研究は世界をリードしている。Chediak-Higashi 症候群、Griscelli 症候群、Hermansky-Pudlak 症候群はこれまで日本での実態は明らかでなくその研究も全くすすんでいなかったが、今回初めてその実態を明らかにすることができた。その中でも特に各疾患特有の合併症の存在が判明したことにより、現在その病態解明を行っている。X-linked lymphoproliferative disease は日本でも症例の集積と診断法の確立が進んでいるが、今回新たに同定された新規遺伝子異常の実態とリンパ球機能解析を行った。したがって今後の課題は、これら各亜型の日本における実態を明らかに残された遺伝子異常を同定するとともに、診断システムおよび標準的治療法を開発する。また疾患特有の合併症の病態を解明し、新たな治療法の開発を進めることである。これまで実態が不明であった先天性顆粒放出異常症であるが、従来の概念と異なった経過をたどりさらには長期生存している例もあることから、将来的には成人を含めた幅広い研究体制の構築が必要と考えられた。

研究分担者

安川正貴・愛媛大学大学院医学系研究科・教授

藤本純一郎・独立行政法人国立成育医療研究センター・臨床研究センター長

山本健・九州大学生体防御医学研究所・准教授

金兼弘和・富山大学附属病院・講師

A. 研究目的

先天性顆粒放出異常症は細胞傷害性Tリンパ球（CTL）やNK細胞の顆粒放出の異常によりさまざまな臨床所見を呈する乳幼児の疾患の総称であり、家族性血球貪食性リンパ組織球症、Chediak-Higashi 症候群、Griscelli 症候群 type 2、Hermansky-Pudlak 症候群 type 2、X-linked lymphoproliferative disease などが含まれる。いずれもリンパ球の分泌顆粒の放出に関わる遺伝子異常が同定されつつあるが、日本における実態

とその診断法は確立されていない。

本研究の目的は、これら先天性顆粒放出異常症の病態に関わる遺伝子異常の解明と診断システムの開発を行うことである。

先天性の遺伝子異常は多数存在するが、本疾患はこれまで統一された基礎・臨床研究が存在しなかった。また本疾患の病態解明と診断法の確立は、免疫機能の解明により小児医療の発展のみならずウイルス感染や悪性腫瘍など多くの病態の解明につながるものと考えられる。

B. 研究方法

現在組織されている研究会（HLH 研究会）および小児白血病リンパ腫研究グループ（JPLSG）、免疫不全研究グループ（PIDJ）を中心に症例登録のデータセンターを整備するとともに、病態解明のための機能解析および遺伝子解析を推進し診断法を確立する。具体的には、

- ① 基礎研究および臨床研究の質を高めるため、データセンターを設置し疾患特有の臨床研究手法を確立するとともにアウトカム研究のためのデータベースを構築する。
- ② 先天性顆粒放出異常症の遺伝子異常の解明とリンパ球機能解析を行い、診断法の標準化とそれを用いた疾患層別化を開発する。
- ③ 診断基準を用いた治療の国際共同研究を進める。

(倫理面への配慮)

本研究事業で行われる研究は、ヘルシンキ宣言および個人情報保護法に則り、各施設倫理委員会およびゲノム審査委員会の承認を得て実施する。

遺伝子治療研究はまだ準備段階であり、可能性が生じた段階で、再度遺伝子治療研究に関する指針の遵守が必要となる

患者及び患者家族に対して研究および治療開始時に統一した説明文を用いて文書による同意を得る。同意説明文では、遺伝子や他の検査の内容、治療の内容、副作用について説明する。さらに、疾患の特徴、検査・治療内容、治療経過についてさらに理解を深めていただくために資料を作成配布し、Web 上でもそれらの情報入手を可能とする。研究目的の検体保存およびその解析は、別途説明文書および同意書を作成し、研究目的と保存期間を明らかにした上で、他の目的には使用しないこと、プライバシーを保護すること、研究期間を過ぎれば検体を破棄することについて説明し、その同意の上で実施する。検体および臨床データは、個人情報を匿名化して取り扱う。

C. 研究結果

本年度の研究成果は以下である

- 1) 先天性顆粒放出異常症のうち Chediak-Higashi 症候群、Griscelli 症候群、Hermansky-Pudlak 症候群の全国調査を行った。全国の小児血液疾患の治療を行っている JPLSG 参加 287 施設にアンケート調査を行い、220 施設から回答を得た。その結果、Chediak-Higashi 症候群 14 例(うち 3 例は 10 年以上前の症例)、Griscelli 症候群 0 例、Hermansky-Pudlak 症候群 4 例の存在が確認された。新たな症例については日本小児血液学会疾患登録事業により把握可能なシステムを構築した。

- 2) Chediak-Higashi 症候群 11 例について臨床解析を行ったところ、従来の報告のように血球貪食症候群をきたす症例はほとんどなく、長期生存例では消化管合併症および中枢神経合併症が多いことが明らかになった。さらに患者末梢血から樹立した T 細胞を用いてリンパ球機能を解析したところ、Chediak-Higashi 症候群では CTL が低下し、さらに顆粒放出機能が欠損していた。現在患者から iPS 細胞を樹立し、消化管および中枢神経合併症の成因の解析を進めているところである(京都大学倫理委員会申請中)。

- 3) Griscelli 症候群は世界で多く報告されている疾患であるが、日本では 1 例も存在しないことが明らかになった。疾患登録事業でも報告がない。従って Griscelli 症候群の解析は今後行わない予定である。Hermansky-Pudlak 症候群は 4 例報告され心臓・肺の合併症が多いことが明らかになったが、検討の結果いずれも type 1 であることが判明した。
- 4) 家族性血球貪食性リンパ組織球症 (FHL) は症例登録も確立され、月 1, 2 例程度の登録がある。FHL は現在国際治療研究が行われているが、その治療成績で大きな改善は得られなかった。しかし本年集積したデータを解析した結果、①日本では FHL に対してその 80%の症例が非血縁臍帯血移植が行われていること、②骨髄非破壊的前処置の使用により安全に移植が行われていること、③移植による予後は 60%以上であったこと、などが明らかとなった。今後はこの結果を参考に、FHL に対する標準的治療を開発する予定である。

さらに、全例で CTL 活性を測定し、異常例のみを対象に遺伝子解析を行った。FHL は二次性血球貪食症候群と臨床的には鑑別が出来ないため、我々は CTL 低下または家族発症陽性例のみを真の FHL として現在の日本における FHL の各亜型の頻度を解析した。その結果、FHL2 54%, FHL3 34%, FHL4 0%, FHL5 6%, non-FHL2/3/4/5 6%であった。顆粒放出解析ならびに CTL 活性の結果からは未知の遺伝子異常による FHL が存在する可能性が示唆された。

残り 10%以下の遺伝子不明例は現在新たな解析方法を導入して、その同定に全力をあげ

ている。

- 5) X-linked lymphoproliferative disease (XLP) は新規遺伝子 XIAP 異常による XLP2 が報告された。今回日本では3家系5例が XLP2 であることを証明した。

XLP2 は XLP1 と比較して血球貪食症候群の合併が多いことから、欧米では FHL の亜型ではないかと報告されている。そこで今回 XLP2 のリンパ球機能解析を行った結果、XLP2 では顆粒放出および CTL 活性は正常であることが明らかになった。XLP2 におけるリンパ球機能と血球貪食との関連性は明らかではないが、今後さらに詳細を検討していく必要がある。

- 6) 以上より日本における顆粒放出異常症の実態と問題点が明らかになった。今後は各亜型の全体像を明らかにし、その標準的診断法および治療法を確立する予定である。なお表に各亜型の種類と今回明らかになった所見を示す。また先天性顆粒放出異常症のリンパ球機能からみた異常部位の詳細を図に示す。

D. 考察

先天性顆粒放出異常症の日本における実態を初めて明らかにした。その結果、

- 1) 日本における顆粒放出異常症は血球貪食症候群を合併する FHL と血球貪食以外の特有の合併症をきたす Chediak-Higashi 症候群が存在する。Griscelli 症候群 type 2、Hermansky-Pudlak 症候群 type 2 は全く報告がない。
- 2) その多くは遺伝子異常が同定され、そのリンパ球機能も解析されつつあるが、Chediak-Higashi 症候群では合併症を含めた病態が不明な疾患も多い
- 3) FHL では国際治療研究が進められているが、造血幹細胞移植を含めた標準的治療法は確立されていない。他の疾患も標準的治療は確立されていない
- 4) Chediak-Higashi 症候群や FHL2 のように長期生存例があることから成人にも多くの未診断例がいる可能性があり実態調査の範囲を広げていく必要がある
- 5) 各亜型の標準的診断および治療法を確立する必要がある。また将来的には遺伝子治療を含めた新たな治療法の開発が必要である

E. 結論

先天性顆粒放出異常症の日本における実態が初めて明らかになった。またその多くで遺伝子異常およびリンパ球機能の異常も解析された。

今後は合併症を中心にその病態を明らかにするとともに、各亜型の標準的診断法および治療法を確立していく必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nagai K, Ishii E, Yasukawa M, et al (2010) Subtypes of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan based on genetic and functional analyses of cytotoxic T lymphocytes. **PLoS ONE** 5: e14173

Ohga S, Ishii E, et al (2010) Hematopoietic stem cell transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. **Pediatr Blood Cancer** 54: 299-306

Morimoto A, Ishii E, et al (2010) Nationwide survey of single-system single site Langerhans cell histiocytosis in Japan. **Pediatr Blood Cancer** 54: 98-102

Kudo K, Ishii E, et al (2010) Improved outcome of refractory Langerhans cell histiocytosis in children with hematopoietic stem cell transplantation in Japan. **Bone Marrow Transplant** 45: 901-906

Yasukawa M, et al (2010) Adoptive T-cell immunotherapy using T-cell receptor gene transfer: aiming at a cure for cancer. **Immunotherapy** (in press)

MacNamara A, Yasukawa M, et al (2010) HLA class I binding of HBZ determines outcome in HTLV-1 infection. **PLoS Pathog** 6: e1001117, 2010.

Lei, J., Yasukawa M, et al (2010) Peroxisome proliferator-activated receptor α and γ agonists together with TGF- β convert human CD4⁺CD25⁻ T cells into functional Foxp3⁺ regulatory T cells. **J Immunol** (in press)

Shultz L, Yasukawa M, et al (2010) Generation of functional human T cells with HLA-restricted immune responses in HLA-class I expressing NOD/SCID/IL2 γ ^{null} humanized mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 13022-13027

Murakami Y, Yasukawa M, et al (2010) Human herpesvirus 6 infection impairs Toll-like receptor signaling. *Virology* 51: 791e, 2010.

Yasukawa M, et al (2010) Relapse of renal cell carcinoma with disappearance of HLA class I following hTERT peptide vaccination. *Ann Oncol* 21:2122-2124

Akiyama K, Yamamoto K, et al (2010) Genome-wide association study to identify genetic variants present in Japanese patients harboring intracranial aneurysms. *J Hum Genet* 55:656-661.

Tanaka F, Yamamoto K, et al (2010) Strong interaction between the effects of alcohol consumption and smoking on esophageal squamous cell carcinoma among individuals with ADH1B and/or ALDH2 risk alleles. *Gut* 59:1457-1464.

Yokomizo A, Yamamoto K, et al (2010) Histopathologic subtype-specific genomic profiles of renal cell carcinomas identified by high-resolution whole-genome single nucleotide polymorphism array analysis. *Oncol Lett* 1: 1073-1078.

Kukita Y, Yamamoto K, et al (2010) A definitive haplotype map as determined by genotyping duplicated haploid genomes finds a predominant haplotype preference at copy number variation events. *Am. J Hum. Genet* 86:918-928.

Shiota M, Yamamoto K, et al (2010) P300/CBP-associated factor regulates Y-box binding protein-1 expression and promotes cancer cell growth, cancer invasion and drug resistance. *Cancer Sci* 101:1797-1806

Takeuchi F, Yamamoto K, et al (2010) Blood pressure and hypertension are associated with seven loci in the Japanese population. *Circulation* 121:2302-2309

Takeuchi F, Yamamoto K, et al (2010) Common variants at the GCK, GCKR, G6PC2-ABCB11 and MTNR1B loci are associated with fasting glucose in two Asian populations. *Diabetologia* 53: 299-308.

Kawakami C, Kanegane H, et al (2010) X-linked agammaglobulinemia complicated with endobronchial tuberculosis. *Acta Paediatr* (in press)

Harai T, Kanegane H, et al (2010) Case of acute cerebellar ataxia associated with primary Epstein-Barr virus infection. *Pediatr Int* 54: e178-80

Zhao M, Kanegane H, et al (2010) Early and rapid detection of X-linked lymphoproliferative syndrome with SH2D1A mutations by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* (in press)

Chang B, Kanegane H, et al (2010) Gonadal mosaicism of a TAZ (G4.5) mutation in a Japanese family with Barth syndrome and left ventricular noncompaction. *Mol Genet Metab* 100: 198-203

Zhao M, Kanegane H, et al (2010) A novel XIAP mutation in a Japanese boy with recurrent pancytopenia and splenomegaly. *Haematologica* 95: 688-689

2. 学会発表

Nagai K, Yamamoto K, Ishii E, Yasukawa M, et al (2010) Real incidence and variation of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan based on genetic and functional analyses of cytotoxic T lymphocytes. 26th Annual Meeting of Histiocyte Society, October, Boston, USA

Asano T, Ishii E, et al (2010) Hemophagocytic lymphohistiocytosis after hematopoietic stem cell transplantation in children: nationwide survey of

Japan. 26th Annual Meeting of Histiocyte Society,
October, Boston, USA

Kudo K, **Ishii E**, et al (2010) Outcome of poor responders at 6 weeks of induction therapy: JLSG-02 protocol study for multisystem Langerhans cell histiocytosis in Japan. 26th Annual Meeting of Histiocyte Society, October, Boston, USA

Ohga S, **Ishii E**, et al (2010) Hematopoietic stem cell transplantation for hemophagocytic lymphohistiocytosis. 15th Congress of the Asian Pacific Blood and Marrow Transplantation, October, Thailand

Nagai K, **Yasukawa M**, et al (2010) Engineering of human T-cells with a novel Aurora-A kinase-specific T-cell receptor gene transfer confers anti-leukemia reactivity. American Society of Hematology (ASH) 52nd Annual Meeting, September, Orland, USA

Asano T, **Ishii E**, et al (2010) Hemophagocytic lymphohistiocytosis after stem cell transplantation in children: nationwide survey. 第72回日本血液学会、9月、横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

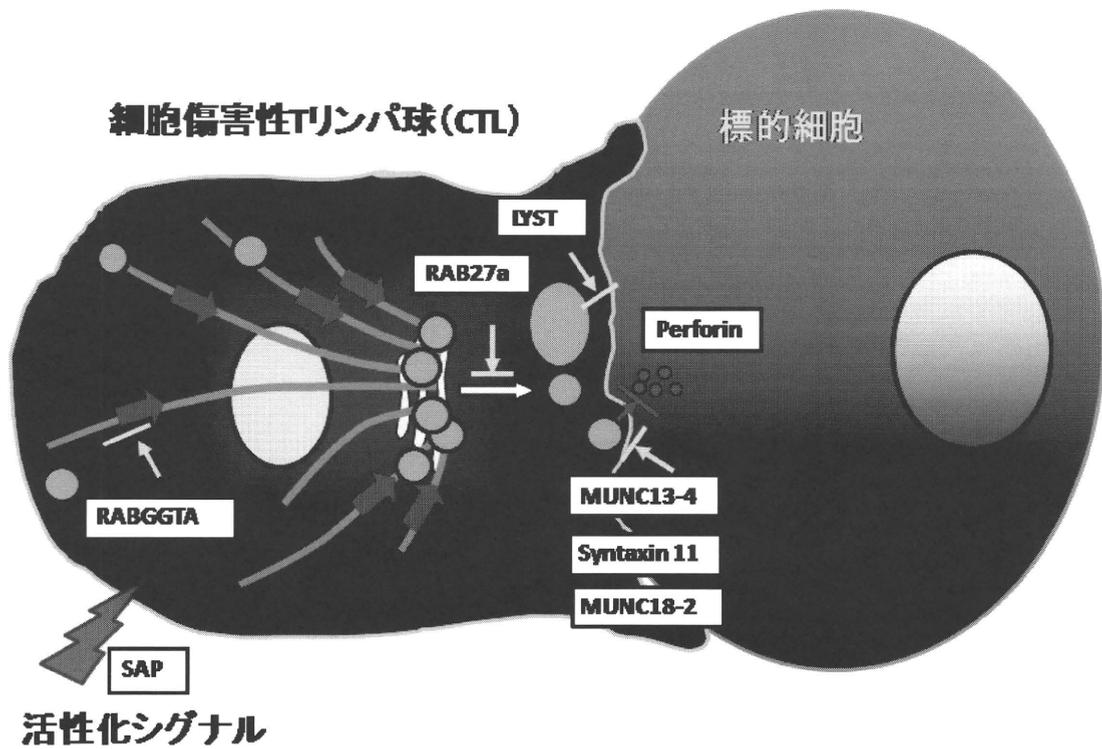
1. 特許所得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

顆粒放出異常症(赤は22年度の成果)

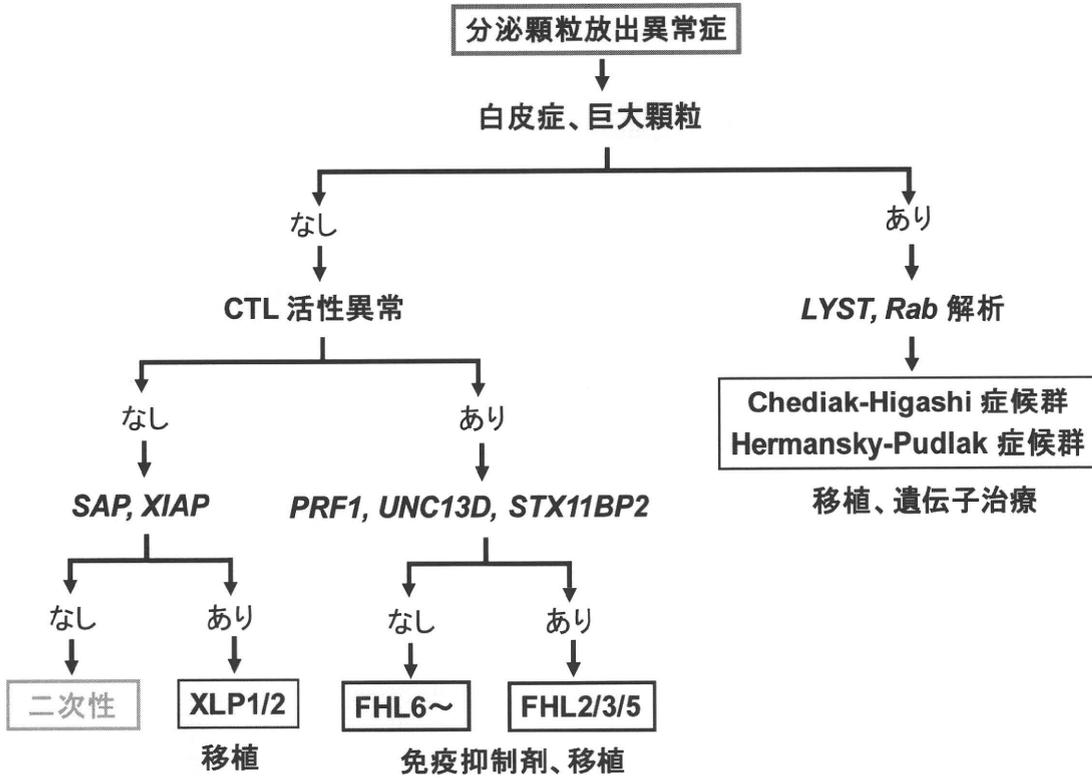
疾患	頻度(/年)	欠損遺伝子	CTL 活性	予後
Chediak-Higashi 症候群	1-2 例	LYST	低下	SCT なしでは不良、CNS 異常
Griscelli 症候群	0 例	RAB27a	不明	不明
Hermansky-Pudlak 症候群	0-1 例	RABGGTA	不明	肺合併症
FHL type 2	2-3 例	PRF1	欠損-低下	SCT なしでは不良
FHL type 3	1-2 例	UNC13D	低下	SCT なしでは不良
FHL type 4	0 例	STX11	不明	不明
FHL type 5	0-1 例	STXBP2	低下	SCT なしでは不良

FHL, 家族性血球貪食性リンパ組織球症、SCT, 幹細胞移植、CNS, 中枢神経合併症

図. CTLの顆粒分泌とその分子異常



分泌顆粒放出異常症の診断・治療アルゴリズム



Ⅱ. 分担研究報告書

症例の集積、検体採取と保存、解析

研究分担者 藤本純一郎 国立成育医療センター 臨床研究センター長

研究要旨

疾患の病態解明や診断・治療法開発には、患者由来検体の保存と活用が必須である。特に、難病等の希少疾患の場合は、患者由来検体の体系的かつ計画的な保存ならびに分配システムの構築が望まれる。本研究では、先天性顆粒球放出異常症の病態・診療研究に資する検体保存体制整備として、国立成育医療研究センターにおいて構築しつつある患者由来検体保存体制の活用を提案した。希少疾患の場合、胚細胞系列遺伝子の保存が重要であり、1)末血白血球や頬粘膜細胞の保存、2)必要に応じた細胞不死化操作、3) 厳重な匿名化による個人情報保護と検体管理、が求められる。現状では、患者由来腫瘍細胞の凍結保存、患者細胞由来 DNA、mRNA ならびに cDNA の保存および配分の実績を有する。また、検体管理については、検体に貼付する匿名化番号を専用の検体管理プログラムから発行するシステムを構築している。

A. 研究目的

極めて希少な難病である先天性顆粒球放出異常症の病態・診療研究に資する検体採取と収集ならびに検体体制の整備を行うことを目的とする。

B. 研究方法

1) 希少難病患者検体保存に係る留意点

希少難病では胚細胞系列遺伝子の保存が必要になる。その際の留意点について考察した。

2) 国立成育医療研究センターにおける患者由来検体の保存体制概略

国立成育医療研究センターでは、国内の小児がん治療研究グループと連携し、患者由来検体保存センターとして機能している。本研究における患者由来検体の収集、解析の仕組みを考慮し、中央への検体収集方法と保存システムについて提案した。

C. 研究結果

1) 希少難病患者検体保存に係る留意点

希少疾患の場合、胚細胞系列遺伝子の保存が重要であり、1)末血白血球や頬粘膜細胞の保存、2)必要に応じた細胞不死化操作、3) 厳重な匿名化による個人情報保護と検体管理、が求められる。国立成育医療研究センターにおける検体保存システムの実績としては、細胞の凍結保存、抽出した核酸(DNA, RNA, cDNA)である。個人情報の保護については、後述の匿名化番号発行システムで管理できると考えられる。また、本システムでは、配分に当たり新たな匿名化番号発行も可能であり柔軟に対応できる。患者の個人情報は検体保存センターには収集しない。また、施設も検体保存番号を収集しないことが望ましい。従って研究班あるいはそれに代わる外部機構が患者情報、検体情報のそれぞれにリンクできる研究 ID を発行して管理することが適切と考えられる

(図1)。

本研究では、遺伝子検査を含めた複数検査を行うために複数の外部検査施設に患者検体を送付される。検体保存の管理には、保存番号が統一されていることが望ましいと考えられる。従って、検体管理を①研究 ID で行う、②検体保存センターが発行した保存 ID で行う、の二つの方法が考えられる。前者は管理が容易である点が利点であり、また、診療情報とのひも付けが容易である。一方、後者は情報が増えるため管理が複雑になるという欠点があるが、将来、個人との連結を完全に切ることが可能と言う利点がある。

2) 国立成育医療研究センターにおける患者由来検体の保存体制

匿名化番号発行、匿名化シール発行ならびに検体管理を行うシステムとして、遺伝子情報提供者匿名化システム SCTS21(三井情報開発株式会社製)およびライフサイエンス研究支援システム「BIOPRISM(バイオブリズム)」(NEC製)を併用(一部後者のみ)している。本システムでは、最初から検体はアルファベットと数字のランダムな組み合わせによる匿名化番号で保存されるため、本研究でのシステムとして最適と考えられた(図2)。

D. 考察

細胞、抽出した核酸の保存システムは現行のもので実施可能である。本研究が対象とする疾患は遺伝子解析を行う必要があるため、個人情報の管理が極めて重要となる。そのためにも、研究事務局やデータマネジメント部門を施設の外に置き、研究 ID で検体や臨床情報を扱うことが望ましいと考えられる。その際、管理が容易で、間違いが少ない方法は、研究 ID をそのまま、検体 ID として使用する方法である。

現行の小児血液腫瘍研究グループにおける腫瘍検体は、検体保存用ユニーク ID を発行する、という

方法を採用している。この理由は、将来的に、検体と個人情報との連結を完全に切る仕組みとして採用したに他ならない。しかしながら、実際に検体を保存し、分譲の作業を開始すると、極めて作業が複雑であり、また、在庫管理が極めて難しいことが判明している。

従って、本研究では、研究IDを保存IDとして使用する方法を提案する。

E. 結論

先天性顆粒球放出異常症の患者由来検体保存体制を提案した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表: 該当なし
2. 学会発表: 該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得: 該当なし
2. 実用新案登録: 該当なし
3. その他: なし

図1. 検体ならびに診療情報の収集に関する体制案

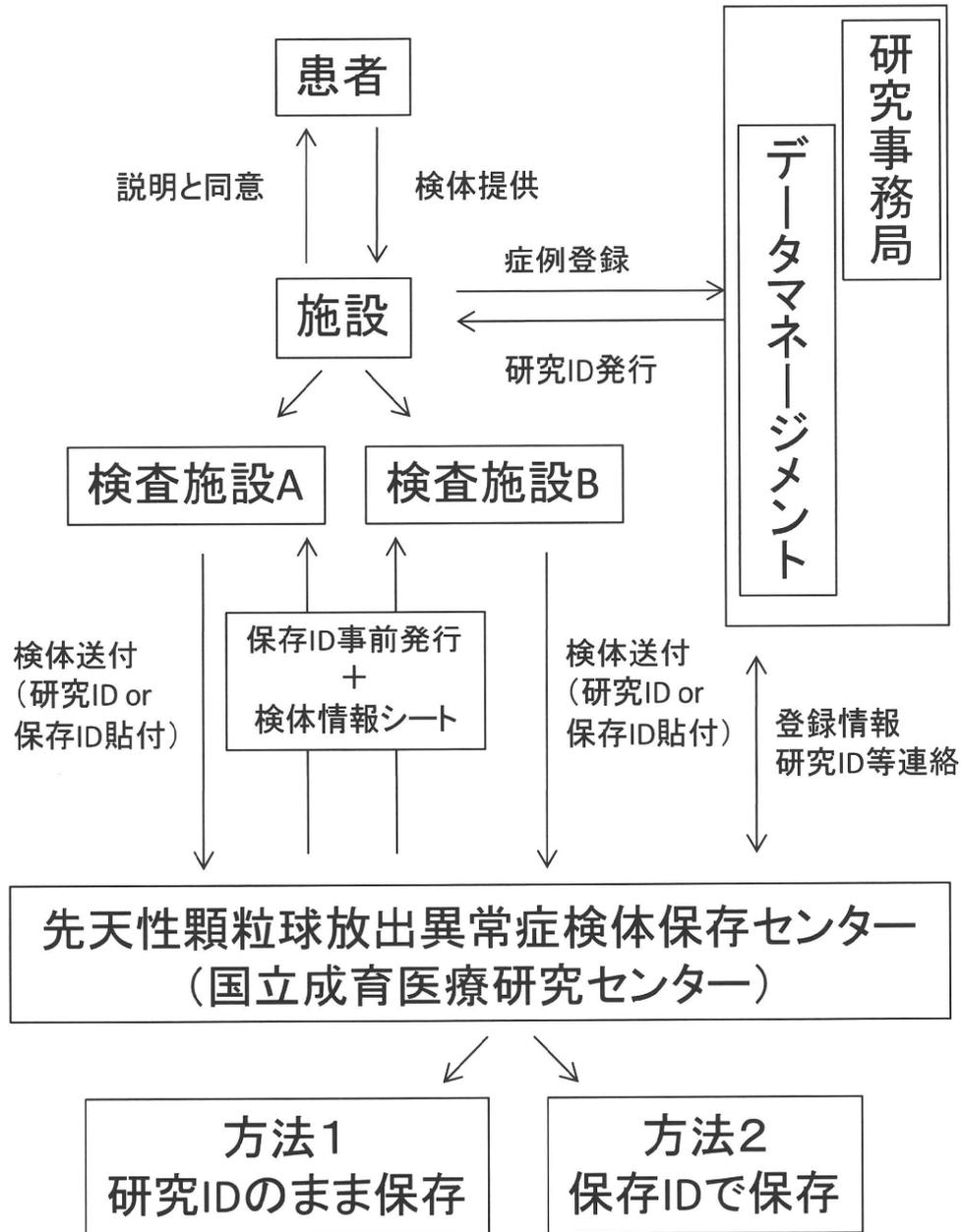
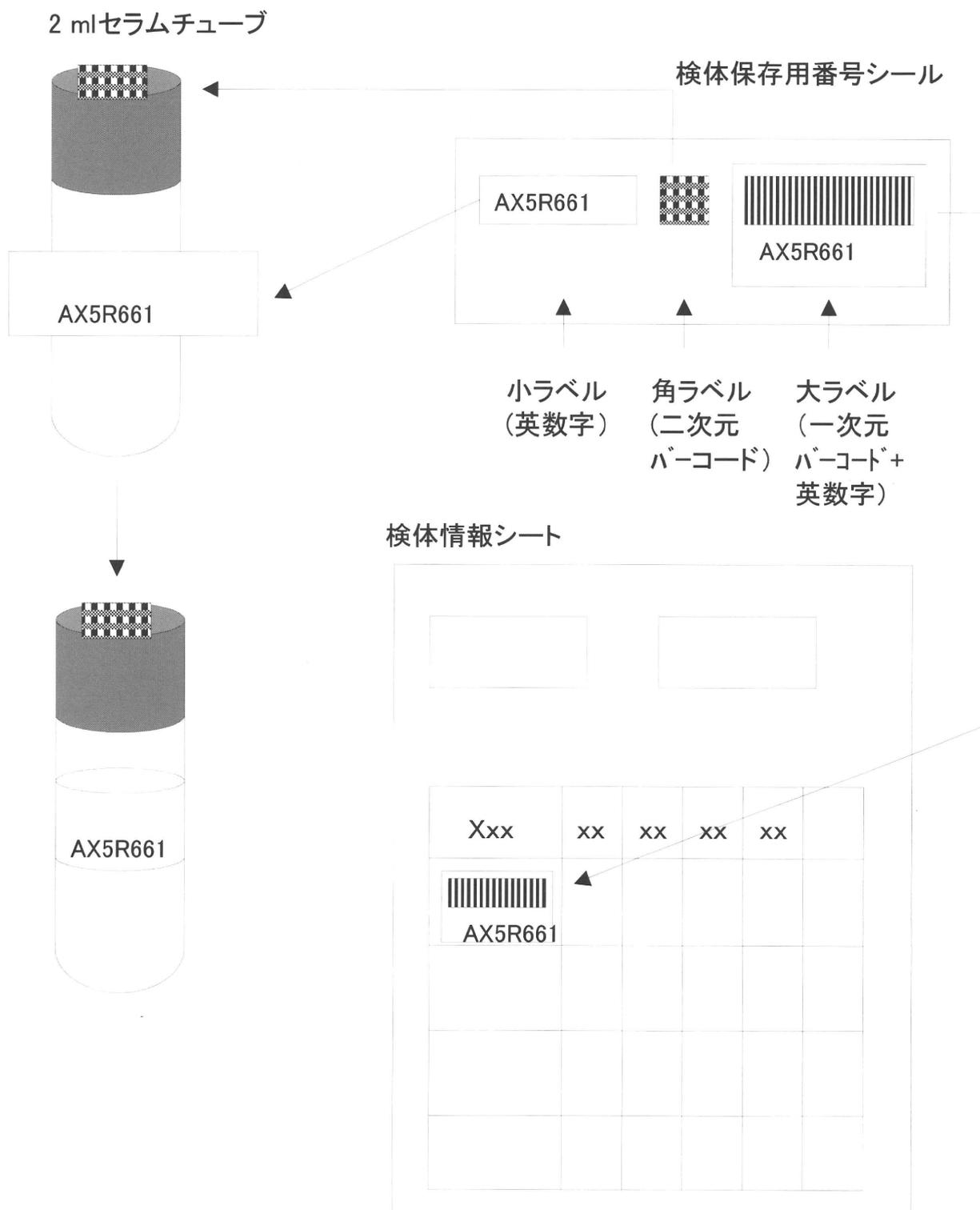


図2. セラムチューブを利用した際の匿名化シールの貼付方法
 (1.5ml エッペンドルフチューブの場合も同じルールで行う)



家族性血球貪食性リンパ組織球症のリンパ球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教授

研究要旨

先天性顆粒放出異常症は、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）の顆粒放出の異常によりさまざまな臨床所見を呈する疾患の総称であり、家族性血球貪食性リンパ組織球症（familial hemophagocytic lymphohistiocytosis; FHL）、Chediak-Higashi 症候群、Griscelli 症候群、Hermansky-Pudlak 症候群、X-linked lymphoproliferative disease などが含まれる。これら疾患における CTL の機能異常のメカニズムを明らかにすることは、本疾患の病態解明に留まらず、免疫系の中心的役割を演じている CTL の細胞傷害分子機構解明に迫ることが期待される。本研究では、FHL 患者より、アロ抗原特異的細胞傷害性T細胞（cytotoxic T lymphocyte; CTL）を誘導し、CTL の機能異常と遺伝子異常や臨床症状との関連性につき検討した。その結果、従来の診断基準では真の FHL 症例の抽出が困難であることがわかった。また、日本における FHL の頻度は、FHL2 が 54%、FHL3 が 34%、FHL4 は 0%、FHL5 が 6%、non-FHL2/3/4/5 が 6% であった。顆粒放出解析ならびに CTL 活性の結果から、未知の遺伝子異常による FHL が存在する可能性が示唆された。

研究分担者

安川正貴・愛媛大学大学院医学系研究科・教授

A. 研究目的

先天性顆粒放出異常症の病態を解明する目的で、家族性血球貪食性リンパ組織球症（familial hemophagocytic lymphohistiocytosis; FHL）患者より、アロ抗原特異的細胞傷害性T細胞（cytotoxic T lymphocyte; CTL）を誘導し、その機能解析を行った。CTL の機能異常と遺伝子異常や臨床症状との関連性につき検討した。

B. 研究方法

日本白血病研究グループ(JPLSG)血球貪食性リンパ組織球症委員会（HLH 委員会）に登録されている医療機関よりHLHと診断された症例を対象とした。まず集積された症例で、FHLの診断基準に満たない二次性血球貪食症候群の症例を除外した。残った症例に対しperforin (*PRF1*), MUNC13-4 (*UNC13D*), syntaxin11 (*STX11*)のタンパク質発現および遺伝子解析を行った。さらに、アロ抗原特異的CTL株を樹立し、その機能解析を行った。さら

に既知の遺伝子異常がなく家族歴陽性またはCTL活性異常例をnonFHL2/3/4に分類し、CD107aアッセイ、アロ抗原特異的免疫応答と*STXBP2*遺伝子解析を行った。

（倫理面への配慮）

本研究事業で行われる研究は、ヘルシンキ宣言および個人情報保護法に則り、各施設倫理委員会およびゲノム審査委員会の承認を得て実施した。患者及び患者家族に対して研究および治療開始時に統一した説明文を用いて文書による同意を得た。

C. 研究結果

本年度の研究成果は以下のとおりである。

7) 1994年より2009年までに登録されたHLH症例数は83例であり、NK活性やウイルス検査により二次性として除外されたのは40例であった。遺伝子解析の結果、FHL2は17例、FHL3は10例、FHL4は0例であった。その他の16例中4例が家族歴陽性または細胞傷害活性低下がありnon-FHL2/3/4と考えられ、12例は現時点において二次性も含めた原因不明のHLHと判断した。non-FHL2/3/4の4例中2例に

STXBP2 遺伝子変異を認め FHL5 と診断し、残り 2 例を未知の遺伝子変異による FHL と診断した。

- 8) FHL5 と診断された 2 症例の *STXBP2* 遺伝子解析では、それぞれ①292-294delGCG/88-1g.a②1243-1246delAGTG/1243-1246delAGT の変異が認められ、ウェスタンブロッティング法にて Munc18-2 蛋白発現が欠損していることが確認された。FHL5 と診断された 2 例のアロ抗原特異的 CTL の細胞傷害活性と脱顆粒反応は著しく低下していた。
- 9) 責任遺伝子不明による FHL (non-FHL2/3/4/5) 2 例の CTL 細胞傷害活性、脱顆粒反応においてはそれぞれ異なった低下程度を示した。これらの症例の存在から未だ遺伝子異常の同定されていない 2 つの FHL 亜型の存在が示唆された。
- 10) 従来の臨床的 FHL 診断基準では二次性 HLH を含んでしまう可能性が指摘されていた。そこで、FHL の真の発症頻度を明らかにするため、すでに遺伝子異常が明らかになった症例と ①家族歴、②血族結婚、③ CTL 活性低下・欠損、のいずれかを満たす症例のみを FHL とした。その結果、FHL2 が 54%, FHL3 が 34%, FHL4 は 0%, FHL5 が 6%, non-FHL2/3/4/5 が 6% であった。顆粒放出解析ならびに CTL 活性の結果からは未知の遺伝子異常による FHL が存在する可能性が示唆された。

D. 考察

- 1) 2009 年にドイツとフランスの研究グループにより中東地域の HLH 発症家系から新たに Munc18-2 (*STXBP2*) 異常による FHL5 が同定された。その中で最も多い変異であった 1430C>T を持つ患者の多くは出生後早期に発症し、一方スプライシングサイトの変異を持つ患者では出生後数年で発症していた。今回、我々が 2 例の患者から同定した 3 種の *STXBP2* の変異はこれまで報告がなく、2 例とも生後 2 か月で発症し症状の進行が速かった。今後、遺伝子変異と臨床経過との関係を解析するためにはさらにデータを蓄積して行く必要がある。
- 2) Munc13-4、Munc18-2 は T 細胞と NK 細胞の脱顆粒機構において分子メカニズムが類似しており、それぞれ Sntaxin11 に結合する。Docking の段階で MUNC18-2/Syntaxin11 が複合体を形

成し、続いて priming の段階で Munc13-4 が Syntaxin11 と結合することが考えられている。今回の我々のデータにおいて FHL3 と FHL5 の細胞傷害活性と脱顆粒機構の傷害の程度は同程度であり、これらの分子メカニズムの考えを支持するものである。

E. 結論

従来の診断基準では真の FHL 症例の抽出が困難であることがわかった。家族歴と T 細胞機能解析により抽出し *STXBP2* 遺伝子解析を行うことにより、本邦においても FHL5 の存在が明らかとなった。また遺伝子異常の同定されていない症例で 2 つの FHL 亜型の存在が示唆され、脱顆粒機構に関わる分子の異常が考えられた。

F. 研究発表

(ア) 論文発表

Ochi T, Yasukawa M, et al. (2011) Novel adoptive T-cell immunotherapy using a WT1-specific TCR vector encoding silencers for endogenous TCRs shows marked anti-leukemia reactivity and safety. *Blood* (in press).

Hasegawa H, Yasukawa M, et al. (2011) Antagonist of CXCL16 ameliorates the progression of vasculitis in arteritis-prone McH5/lpr mice. *Arthritis Rheum.* (in press).

Nagai K, Ishii, E, Yasukawa M, et al. (2011) Feasibility of gene-immunotherapy using WT1-specific T-cell receptor gene transfer for infant acute lymphoblastic leukemia with *MLL* gene rearrangement. *Blood Cancer J.* 1:e10.

Yasukawa M, et al (2011) Adoptive T-cell immunotherapy using T-cell receptor gene transfer: aiming at a cure for cancer. *Immunotherapy* 3:135-140.

Yamanouchi J, Yasukawa M, et al. (2011) Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) phosphorylation assay for platelet response to cilostazol. *Platelets* 22:135-142.

An J, Yasukawa M, et al. (2011) Activation of T-cell receptor signaling in peripheral T-cell lymphoma cells plays an important role in the development of lymphoma-associated hemophagocytosis. *Int. J. Hematol.* 93:176-185.

Nagai K, Ishii E, Yasukawa M, et al. (2010) Subtypes of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan based on genetic and functional analyses of cytotoxic T lymphocytes. *PLoS One* 5: e14173

MacNamara A, Yasukawa M, et al. (2010) HLA class I binding of HBZ determines outcome in HTLV-1 infection. *PLoS Pathog* 6: e1001117, 2010.

Lei, J., Yasukawa M, et al. (2010) Peroxisome proliferator-activated receptor α and γ agonists together with TGF- β convert human CD4⁺CD25⁻ T cells into functional Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 185:7186-7198.

Shultz L, Yasukawa M, et al. (2010) Generation of functional human T cells with HLA-restricted immune responses in HLA-class I expressing NOD/SCID/IL2 γ ^{null} humanized mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 13022-13027

Murakami Y, Yasukawa M, et al. (2010) Human herpesvirus 6 infection impairs Toll-like receptor signaling. *Virol J* 7:91e, 2010.

Yasukawa M, et al. (2010) Relapse of renal cell carcinoma with disappearance of HLA class I following hTERT peptide vaccination. *Ann Oncol* 21:2122-2124

Yasukawa M, et al. (2010) Allo-HLA reactivity of leukemia-specific cytotoxic T lymphocytes. e-Letter. *Blood* Accessed April 19.

Azuma T, Yasukawa M, et al. (2010) Derivative (1;18)(q10;q10) in essential thrombocythemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 199:62-64.

2. 学会発表

Nagai K, Yamamoto K, Ishii E, Yasukawa M, et al. (2010) Real incidence and variation of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan based on genetic and functional analyses of cytotoxic T lymphocytes. 26th Annual Meeting of Histiocyte Society, October, Boston, USA

Nagai K, Yasukawa M, et al. (2010) Engineering of human T-cells with a novel Aurora-A kinase-specific T-cell receptor gene transfer confers anti-leukemia reactivity. American Society of Hematology (ASH) 52nd Annual Meeting, September, Orland, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

4. 特許所得
なし
5. 実用新案登録
なし
6. その他
なし

研究要旨

先天性顆粒放出異常症には、家族性血球貪食性リンパ組織球症 (FHL)、Chediak-Higashi 症候群、Griscelli 症候群、X-linked lymphoproliferative disease などが含まれるが、その原因遺伝子変異の全貌解明には到っていない。本年度は、家族性血球貪食性リンパ組織球症 (FHL) を対象として、これまでに知られている原因遺伝子 (PRF1、UNC13D、STX11) に変異を認めない4症例について、STXBP2遺伝子変異 (FHL5) の有無を検討した。その結果、2症例においてSTXBP2遺伝子変異を同定した (c. 1243_1246delAGTG p. Ser415ArgfsX6変異、およびc. 292_294delGCG p. Ala98delとc. 88 -1g>aの複合ヘテロ変異)。c. 88 -1g>a変異においては、2種類の異常なスプライシングバリエントが生じており、そのためにSTXBP2遺伝子機能が喪失すると考えられた。このように、本研究によって、日本人におけるFHL5の存在が明らかとなった。

A. 研究目的

先天性顆粒放出異常症には、家族性血球貪食性リンパ組織球症 (FHL)、Chediak-Higashi 症候群、Griscelli 症候群、X-linked lymphoproliferative disease などが含まれるが、その原因遺伝子変異の全貌解明には到っていない。したがって、日本におけるこれらの疾患の実態とその診断法確立のためには、それぞれの疾患についての責任遺伝子変異同定がまず不可欠である。

本分担研究の目的は、連鎖解析などの遺伝学解析によって得られた候補遺伝子の塩基配列を徹底的に解析し、これら先天性顆粒放出異常症発症に関わる遺伝子異常を解明することである。このことにより、本疾患群の病態解明とそれに基づく新規診断法の確立が期待される。

B. 研究方法

家族性血球貪食性リンパ組織球症 (FHL) と診断され、これまでに知られている原因遺伝子 (PRF1、UNC13D、STX11) に変異を認めない4症例を解析対象とした。近年、トルコやサウジアラビアなどにおいてSTXBP2遺伝子が新たなFHL原因遺伝子として同定されたことから、まず日本人患者におけるSTXBP2遺伝子変異の有無について解析した。

STXBP2遺伝子は19エクソンから成り、スプライシング部位を含む領域を増幅する19組のPCRプライマ

ーセットを用意した。これを用いてPCRを実施し、直接塩基配列解析法によって塩基配列を決定後、ヒトゲノムリファレンス配列 (hg18) を基準に変異の有無を検索した。また、スプライス部位に変異を認めた症例については、細胞障害活性を検出する際に樹立した細胞株からRNAを抽出し、RT-PCR産物を直接塩基配列解析することによって、スプライシング異常の詳細を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究事業で行われる研究は、ヘルシンキ宣言および個人情報保護法に則り、各施設倫理委員会およびゲノム審査委員会の承認を得て実施している。

C. 研究結果

・FHL 患者における STXBP2 遺伝子変異の同定

FHL と診断された 4 症例について解析した結果、2 症例において STXBP2 遺伝子に変異を同定した。症例 1 では、c. 1243_1246delAGTG p. Ser415ArgfsX6 変異、すなわち、4 塩基の欠失をホモ接合で認め、フレームシフトの結果、終始コドンが生じていた。症例 2 では、c. 292_294delGCG p. Ala98del と c. 88 -1g>a の複合ヘテロ変異を認め、一方のアレルでは 98 番目アラニンの欠失、他方のアレルではイントロン 2 のスプライシングアクセプター部位の異常が生じていた。

・STXBP2 c.88 -1 g>a 変異におけるスプライシング異常の解明

症例2において同定した c. 88 -1g>a 変異によって生じるスプライシング異常について詳細に解析した。患者由来の細胞株より得た RNA より cDNA を合成し、エクソン1および5に位置するプライマーにてPCRを実施したところ、予想されるPCR産物より約250bp長いバンドと約200bp短いバンドの2種類が検出された。塩基配列を解析した結果、前者はイントロン2が挿入されたcDNA断片、後者はエクソン3が欠失したcDNA断片であることが明らかとなった。このことにより、c. 88 -1g>a 変異は2種類の異常なRNAを生成する原因となり、この結果、STXBP2 遺伝子機能が喪失することが明らかとなった。

D. 考察

日本人 FHL 症例において初めて STXBP2 変異 (FHL5) を同定した。STXBP2 は、これまでに FHL の原因遺伝子として同定されていた STX11 (FHL4) の相互作用分子であり、UNC13D とともに顆粒放出に重要な役割を果たしている。このように、FHL の原因遺伝子群がリンパ球における細胞障害顆粒の形成と放出に関連する遺伝子に属することから、未解決の FHL 家系においても顆粒放出関連遺伝子が原因となっている可能性が高い。日本においては大家系が存在せず、連鎖解析による原因遺伝子座の絞り込みが困難であることから、10%弱存在する non-FHL2/3/4/5 については、次世代シーケンサーを用いた塩基配列解析が今後検討されるべきであろう。

E. 結論

日本人 FHL 症例における FHL5 の存在が明らかとなった。

F. 研究発表

2. 論文発表

Kato N, **Yamamoto K**, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies five novel variants associated with blood pressure in East Asians. **Nat. Genet.** 2011 in press

Takeuchi F, **Yamamoto K**, et al. Association of obesity susceptibility genetic variants with type 2 diabetes in the Japanese. **Diabetologia**, 2011 in press

Teshiba R, **Yamamoto K**, et al. Identification of TCTE3 as a gene responsible for congenital

diaphragmatic hernia using a high-resolution single-nucleotide polymorphism array. **Pediatr Surg Int.** 2011; 27(2): 193-198.

Nagai K, **Yamamoto K**, **Ishii E**, **Yasukawa M**, et al. Subtypes of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan based on genetic and functional analyses of cytotoxic T lymphocytes. **PLoS One.** 2010; 5 (11): e14173.

Akiyama K, **Yamamoto K**, et al. Genome-wide association study to identify genetic variants present in Japanese patients harboring intracranial aneurysms. **J Hum Genet.** 2010; 55(10):656-661.

Tanaka F, **Yamamoto K**, et al. Strong interaction between the effects of alcohol consumption and smoking on esophageal squamous cell carcinoma among individuals with ADH1B and/or ALDH2 risk alleles. **Gut**, 2010; 59(11):1457-1464.

Yokomizo A, **Yamamoto K**, et al. Histopathologic subtype-specific genomic profiles of renal cell carcinomas identified by high-resolution whole-genome single nucleotide polymorphism array analysis. **Oncol Lett.**, 2010; 1: 1073-1078.

Kukita Y, **Yamamoto K**, et al. A definitive haplotype map as determined by genotyping duplicated haploid genomes finds a predominant haplotype preference at copy number variation events. **Am. J. Hum. Genet.**, 2010; 86(6):918-928.

Shiota M, **Yamamoto K**, et al. P300/CBP-associated factor regulates Y-box binding protein-1 expression and promotes cancer cell growth, cancer invasion and drug resistance. **Cancer Sci.** 2010; 101(8):1797-1806

Takeuchi F, **Yamamoto K**, et al. Blood pressure and hypertension are associated with seven loci in the Japanese population. **Circulation**, 2010; 121(21): 2302-2309.

Takeuchi F, **Yamamoto K**, et al. Common variants at the GCK, GCKR, G6PC2-ABCB11 and MTNR1B loci are associated with fasting glucose in two Asian populations. **Diabetologia.** 2010; 53(2):