

201024126A

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・診療研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 安 友 康 二

平成23（2011）年5月

目 次

[I] 総括研究報告

1. 血球貪食症候群の病態・診療に関する研究 1
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

[II] 分担研究報告

1. 血球貪食リンパ組織球の病態と診断に関する研究 5
石井榮一
愛媛大学大学院医学系研究科
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 8
安川正貴
愛媛大学大学院医学系研究科
3. 血球貪食症候群の病態・診療研究に関する研究 12
河 敬世
大阪府立母子保健総合医療センター
4. X連鎖リンパ増殖症候群タイプ2の臨床的・遺伝学的特徴に
関する研究 15
金兼弘和
富山大学附属病院
5. 血球貪食症候群の病態・診療研究：診断・治療指針および
診断法の開発 18
大賀正一
九州大学大学院医学研究院

6. 家族性血球貪食症候群のゲノム解析研究	20
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	
7. ヒト ES/iPS 細胞からの血液細胞分化と血球貪食	22
湯尾 明	
国立国際医療研究センター研究所	
8. 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	24
藤本純一郎	
国立成育医療研究センター 臨床研究センター	
 [III] 研究成果の刊行に関する一覧表	 28
[IV] 研究成果の刊行物・別刷	31
[V] 班構成員名簿	75

[I] 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治疾患克服研究事業）
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。さらに近親婚歴を持つ一家系を用いて、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。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
- ・湯尾明：国立国際医療研究センター研究所
- ・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20%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) 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。
- (3) 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)との連携を継続する。

B. 研究方法

1. 班会議を開催し、本班の研究項目について議論する。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。

C. 研究結果

1. 2010年4月24日(盛岡)、2010年12月17日(東京)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。12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。特に、本班の平成23年度の継続が認められた場合、どのような研究項目を実施すべきであるかという点と、平成23年度以降の本班のあり方について議論された。

2. 新たに3家系5例のXIAP欠損症を同定することに成功した。3例はHPSを繰り返しており、症状としては発熱、脾腫、肝炎、血球減少、EBV感染、低ガンマグロブリン血症が認められた。1例は腸炎で死亡していたが、悪性リンパ腫を発症した患者はいなかった。1例は同種臍帯血移植が行われたが、合併症のため死亡した。フローサイトメトリーにてXIAP蛋白の発現低下が認められ、XIAP欠損症では健常者に比べて有意にNKT細胞数は減少しているという結果が得られた。また、すべての家系で新規のXIAP/BIRC4遺伝子変異が同定された。

3. 1985-2005年の57例の移植症例(EBV-HLHとFHL)について、その予後を検討した。EBV-HLH:3例が自家または双生児からSCT

をうけ2例が生存。11例が同種SCTをうけ、6例が生着生存、3例が拒絶されたが2例は生存し1例が死亡した。FHL:1例が自家SCT後中枢神経浸潤で死亡し、42例が同種SCTをうけ、21例が生着しうち3例が死亡した。6例は拒絶され、うち2例は2nd-SCT後生存し、3例が死亡した。その結果、全生存率は67%となった。以上の結果から、年齢と移植前多剤化学療法の使用例はEBV-HLH患者に高く、中枢神経異常の頻度は移植前にEBV-HLHとFHLで差はなかったが、移植後はFHL患者で高かった。FHLの移植後10年全生存率は、移植源が血縁骨髄・末梢血で90%、非血縁臍帯血で67%、非血縁骨髄で58%。同種SCT後に死亡したFHL13例の半分以上が100日以内の治療関連であった。HPSの全生存率は海外より高いが、FHLでは移植後早期死亡と神経学的後遺症が問題であった。T細胞型とNK細胞型のEBVリンパ増殖性疾患患者の末梢血細胞を高純度に分画してEBV量とclonalityを解析した。主たる感染標的細胞以外にもEBV感染が確認されEBV-TRサイズからT/NK前駆細胞で感染が起こる可能性が示唆された。しかし骨髄CD34陽性造血前駆細胞はこの感染から免れていた。

4. 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。

5. 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.a ②1243-1246delAGTG/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。

6. ヒトES細胞3株、ヒトiPS細胞4株で検討したところ、ヒトES細胞では3株中1株のみで、ヒトiPS細胞では4株全てにおいて分化誘導に伴って I 型インターフェロンの発現が認められた。以上のように、ヒトiPS細胞からの血球分化において I 型インターフェロン産生が高頻度である傾向を認めたが、ヒトiPS細胞でも培養条件によっては好中球優位の分化が認められ、一方、ヒトES細胞でも株によってマクロファージ優位の分化が認められた。
7. 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(STXP2, 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。

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。また昨年までと同様にJPLSGとの連携を継続した。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。

FHLの適切な治療法については、非血縁臍帯血移植の有用性が示唆された。一方で、移植後早期の治療関連死と中枢神経合併症が問題であったことから、さらなる改善が必要であると考えられた。

FHLの遺伝子解析については、領域を狭小化することには成功しているものの、原因遺伝子の同定には至らなかった。最近、高速シーケンサーを使ったexome-resequencing法が発達しており、今後はその手法を用いて候補領域に存在する遺伝子をすべて配列決定することが必要であると考えられる。

E. 結論

- (1) 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の各種治療法に対する予後を検討した。さらなる症例の蓄積が必要である。
- (3)新しい原因遺伝子候補領域の同定に成功した。
- (4) 日本人のFHLの遺伝子解析と、CTL機能解析を実施し、未知の遺伝子変異を持つ症例がまだ存在していることが示唆された。
- (5) iPS細胞を使った、HPSモデル構築を試みたが、培養自体に問題があると考えられた。

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. Sugimoto K, Maekawa Y, Kitamura A, Nishida J, Koyanagi A, Yagita H, Kojima H, Chiba S, Shimada M, Yasutomo K. Notch2 signaling is required for potent anti-tumor immunity in vivo. *J Immunol* 184:4673-8 (2010)
2. Nishimoto K, Kochi Y, Ikari K, Yamamoto K, Suzuki A, Shimane K, Nakamura Y, Yano K, Iikuni N, Tsukahara S, Kamatani N, Okamoto H, Kaneko H, Kawaguchi Y, Hara M, Toyama Y, Horiuchi T, Tao K, Yasutomo K, Hamada D, Yasui N, Inoue H, Itakura M, Yamanaka H, Momohara S. Association study of TRAF1-C5 polymorphisms with susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in Japanese. *Ann Rheum Dis* 69:368-73 (2010)
3. Sakata-Yanagimoto M, Sakai T, Miyake Y, Saito T, Maruyama H, Morishita Y, Nakagami-Yamaguchi E, Kumano K, Yagita H, Fukayama M, Ogawa S, Kurokawa M, Yasutomo K, Chiba S. Notch2 signaling is required for proper mast cell distribution and mucosal immunity in the intestine. *Blood* 117:128-34 (2011)

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. 四国4大学皮膚科研究会
招待講演 安友康二、炎症応答の分子基盤
(2010年7月16日、徳島)

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）

分担研究報告書

血球貪食リンパ組織球症の病態と診断

研究代表者 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）は原発性と二次性に分類され、それぞれ VP16, CSA, DEX 3 剤併用による HLH-2004 治療研究が進んでいる。治療成績は移植前の死亡率が HLH-94 と比較して減少したものの、移植自体の成績の向上はなかった。また CSA 早期使用によると思われる脳症の報告が問題となっている。現在 HLH-2004 に代わる次期治療研究が検討されている、一方原発性/家族性血球貪食性リンパ組織球症（FHL）は今回新たに STXP2 による FHL5 が同定され、日本では 2 家系が FHL5 であることが判明した。さらに各亜型の頻度を解析したところ、perforin による FHL2, MUNC13D による FHL3 が全体の 80% を占めていること、約 10% が未知の遺伝子異常による FHL であることが判明した。またリンパ球機能解析より、これら FHL 各亜型は CTL 活性および顆粒放出機能に差があることが明らかになった。今後は HLH-2004 に代わる新しい治療研究を確立するとともに、残り 10% の未知の遺伝子異常を解明する予定である。

A. 研究目的

血球貪食性リンパ組織球症（HLH）は原発性/家族性および二次性に分類されているが、その診断および治療法は確立されていない。本研究の目的は HLH の診断および治療法を確立することである。

B. 研究方法

現在組織されている小児白血病リンパ腫研究グループ（JPLSG）HLH 委員会を中心に症例登録を整備するとともに、HLH-2004 および次期治療研究を推進する。原発性/家族性 HLH では遺伝子異常の解明とリンパ球機能解析を行う。

(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実施する。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、遺伝子検査の内容、治療の内容、副作用について説明する。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

日本における HLH 症例は 2006 年 12 月よりデータセンターに登録され HLH-2004 治療が開始されている。2010 年 11 月末時点で 70 例の登録症例があった。登録は月平均 2 例であり累積登録数は予定登録数を上回っている。FHL2 が 4 例、

FHL3 が 3 例で、多くは EBV による二次性 HLH であった。EBV-HLH では EBV 量の測定とその推移を検討しているが、初期治療相後に EBV が残存している例も多く、ウイルス量と治療予後と相関は認められなかった。

一方国際研究による集積では HLH-2004 による 3 年の全生存率は 64% であった。移植前の死亡率 16% であり、HLH-94 の 27% から大幅に改善した。しかし移植後の 2 年生存率は 66% であり、HLH-94 と差がなかった。

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。

D. 考察

HLH の診断および治療法を確立した。その結果、

- 1) HLH-2004 治療研究は一定の治療成績をもたらしたものの、さらなる治療成績の向上が求められている。現在 VP16, CSA にかわる薬剤の使用が検討されている。
- 2) FHL では適正な移植療法を確立する必要がある。EBV-HLH では予後因子を明らかにする必要がある。
- 3) FHL 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、未知の遺伝子異常による FHL もいまだ存在する。
- 4) 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

HLH 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

Nakazawa Y, **Ishii E**, et al (2011) Detection of T-cell receptor gene rearrangement in children with Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis using the BIOMED-2 multiplex polymerase chain reaction combined with GeneScan analysis. **Clinica Chimica Acta** (in press)

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

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

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

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

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

家族性血球貪食性リンパ組織球症（familial hemophagocytic lymphohistiocytosis; FHL）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であり、この疾患における 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

血球貪食症候群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

得られた研究成果は以下のとおりである。

- 1) 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。
- 2) 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.a ②1243-1246delAGTG/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。
- 3) 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。
- 4) 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、③CTL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

- 5) 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。
- 6) 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

2. 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, 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, 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. *Virology* 407:91e, 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, 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

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

血球貪食症候群の病態・診療研究(21210301)

研究分担者 河 敬世 (大阪府立母子保健総合医療センター顧問)

研究要旨

原発性 HLH の治療成績向上のため、唯一の根本的治療である同種造血幹細胞移植の合併症対策が重要である。今回その中でも重要な移植片対宿主病 (GVHD) とウイルス感染症に焦点を当てた。ウイルス特異的 cytotoxic T lymphocyte (CTL) の培養系、評価系を確立した。そして本来は相反する GVHD に対する免疫抑制療法と、免疫賦括による CTL 増幅の両立を試みた。免疫抑制剤がある範囲の低濃度において、T リンパ球の増幅を抑えつつも、ウイルス抗原で適切に刺激された CTL は増幅も機能も維持された。臨床においても、GVHD 発症後、免疫抑制剤を一定の量まで減じて維持することで、それ以下に減量して GVHD が再燃することなく、ウイルス感染を適切にコントロールすることができた。

A. 研究目的

原発性 HLH の唯一の根本的治療である同種造血幹細胞移植 (HSCT) の成績を向上させることが主たる目的である。移植後にみられる合様な合併症の中でも、移植片対宿主病 (GVHD) とウイルス感染症は頻度が高く、時に重症化して致死的経過をとるため、移植成績の改善における最重要課題である。ところが前者は免疫抑制療法を必要とし、後者には薬物療法のみならずレシピエントの抗ウイルス免疫が必須である。すなわち両者は相反する対応が迫られており、また一方の治療中にもう一方の重症化がしばしばみられるため、その克服には調整の難しいバランスを必要としている。

主目的を達成するため、移植後の免疫抑制療法中における、ウイルスに対する T リンパ球性免疫、数量的評価、機能的評価の方法を確立することを試みた。その方法論として、従来の評価法では「免疫抑制療法中の T リンパ球の増幅」という点が欠落するため、評価前に T リンパ球を培養するステップを設けることとした。

B. 研究方法

まず cytomegalovirus (CMV) の pp65 抗原、Epstein-Barr virus (EBV) の各種 latent proteins、腫瘍抗原の代表として WT1 抗原のアミノ

酸配列に含まれる、各種 HLA (主に HLA-A2402) のエピトープを複数選び、ペプチドを合成した。ペプチドは主に 9mer であった。

まず健常ボランティアないし移植後患者の末梢血単核球 (PBMC) を分離した。単核球には抗原提示細胞である B リンパ球と、細胞性免疫を担う T リンパ球が含まれている。次に PBMC 0.5×10^6 cells に peptide をパルスし、PBMC 2×10^6 cells と混合し、24-well plate にて 2 週間培養した。最初の 3 日はサイトカイン無添加で、その後は低濃度の IL-2 を添加した。2 週間後に抗原特異的 cytotoxic T lymphocyte (CTL) を以下の方法で評価した：すなわち数量的評価として蛍光色素で標識した tetramer および monoclonal antibody 各種を用いたフローサイトメトリー法 (FCM)、また機能的評価として再度 target peptide および negative control peptide, PHA (positive control) などで刺激してインターフェロン γ (IFN γ) の培養液中放出濃度を測定する ELISA 法である。

さらに系が確立した後は、培養条件などを変化させ、移植後の免疫抑制状態を再現し、免疫抑制療法と T 細胞性免疫のバランスを検討した。

C. 研究結果

CTL の培養系と評価系を確立することができた。健常者の CMV に対する CTL (CMV-CTL) についての基本的培養条件下での代表的な結果は、CMV-CTL / CD8+T が培養前 0.22%, 培養 1w で 5.3%, 2w で 46.0% と増殖した。培養 2w の間に CMV-CTL 絶対数は 920 cells から 122 万 cells まで増幅し、IFN γ についても 102.2 pg/mL (neg. cont. 14.6, pos. cont. 295.8) と反応が見られた。

免疫抑制剤 cyclosporin A (CsA) との関係について、標準濃度 500 ng/mL (臨床的に peak 値 1000, trough 値 250 ng/mL 相当)、低濃度 100 ng/mL (臨床的に peak 250, trough 50 相当)、CsA 無添加 (0 ng/mL) で培養した。CsA 0 に対し、CsA 100, CsA 500 ではそれぞれ、CTL は 78.7%, 1.3% であった。IFN γ の産生 においても CMV peptide / positive control 比は 127.8%, 5.4% であった。すなわち CsA が通常量では CTL の増幅も十分な機能もみられない。しかし CsA が閾値以下の低濃度では T リンパ球の増幅は抑えられる (データ未表示) 一方、ペプチド刺激が適切に行われれば CTL の増幅も機能も維持されていた。臨床的には、GVHD 予防薬 CsA は、初期量ではウイルス感染のリスクが高いが、当該濃度 (peak 値 250, trough 値 50ng/mL) まで減少できればウイルス感染に対応できると考えてよい。他の免疫抑制剤 tacrolimus (Tac) やステロイド prednisolone (PSL) でも同様の閾値が存在するものと考えられる。臨床的には PSL の閾値は 0.25-0.3mg/kg/day に相当した。

臨床的には、二次性 HLH を引き起こす一疾患である慢性活動性 EB ウイルス感染症 (CAEBV) の臍帯血移植後の 2 症例で検討することができた。10 歳男児と 11 歳女児であり、いずれも移植後皮膚および消化管 GVHD を来した。前者は CMV 抗原血症に対し抗ウイルス薬も併用したが、PSL を予定量まで下げることができた後は当該量を維持し、GVHD の再燃をみることなく、末梢血にて CMV-CTL を誘導 (CMV-CTL / CD8+T = 0.38%) できた。後者は BK ウイルス性出血性膀胱炎を発症した。BK ウイルスには有効な薬剤がないが、PSL を予定量ま

で下げることができた後は当該量を維持し、GVHD の再燃をみることなく、出血性膀胱炎も治癒した。疾患は異なる (急性リンパ性白血病でバンク骨髄移植後) が、13 歳男児においても皮膚と腸の GVHD を発症したが、低用量 PSL と低用量 CsA (メソトレキセートとセルセプトも併用中) にて GVHD と BK ウイルス性出血性膀胱炎の両方をコントロールすることができた。

D. 考察

HSCT の成績を向上させる目的のもと、GVHD

とウイルス感染のコントロールに一定の示唆を得た意義は大きい。しかし HSCT にはそれ以外の様々な要因が絡んでいる。今後、実際の HSCT のデータを解析し、問題点を洗い出し、移植成績の更なる向上を目指す予定である。

今回の系の確立にともない、CTL を容易に増幅できる可能性が示唆された。ウイルスに対する T 細胞性免疫が体内で誘導できないような状況下において、CTL を対外で増幅し輸注するという、ウイルス感染への新たな対処法としての臨床応用の可能性が考えられた。

E. 結論

CTL の培養系と評価系を確立することができた。免疫抑制剤の濃度を検討し、T リンパ球の増幅を抑制しつつ、ウイルス由来ペプチドによる適切な刺激があれば CTL は増幅し機能を発揮しうる適切な濃度を見出した。GVHD に対する免疫抑制剤の適切な減量により、GVHD のコントロールと、ウイルスに対する T 細胞性免疫の誘導の、両立が可能であった。

F. 健康危険情報

なし (不要)。

G. 研究発表

1. 論文発表：なし.
2. 学会発表：なし.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 22 年度 厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患克服事業
「血液貪食症候群の病態・診療研究」

X 連鎖リンパ増殖症候群タイプ 2 の臨床的・遺伝学的特徴に関する研究

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

X 連鎖リンパ増殖症候群 (XLP) は EB ウイルス (EBV) に対する特異的免疫応答を有する比較的稀な先天性免疫不全症であり、致死性の伝染性単核症あるいは EB ウイルス関連血球貪食性リンパ組織球症 (EBV-HLH)、異常ガンマグロブリン血症、悪性リンパ腫などの臨床的表現系を有するが、家族歴がない場合には臨床診断が困難な場合が多い。1998 年に XLP の責任遺伝子 *SH2D1A/SAP* が同定され、遺伝子診断が可能となり、またその病態が明らかになってきた。臨床的に XLP と診断された患者の約 20% では原因が不明であったが、2006 年に第二の責任遺伝子として *XIAP/BIRC4* が同定された。昨年度本邦初の XLP タイプ 2 (*XIAP* 欠損症) を同定したが、その後 3 家系 5 例の XLP タイプ 2 を同定したので、それらの臨床的・遺伝学的特徴について欧米からの報告例と比較検討する。

A. 研究目的

X連鎖リンパ増殖症候群 (XLP) は致死性の伝染性単核症あるいはEBウイルス関連血球貪食性リンパ組織球症 (EBV-HLH)、異常ガンマグロブリン血症、悪性リンパ腫を臨床的特徴とする比較的稀な先天性免疫不全症である。1998年にその責任遺伝子*SH2D1A/SAP*が同定され、遺伝子診断が可能となり、わが国においても少なからずXLPが存在することを明らかにしてきた。しかし家族歴を有しながら、約20%のXLPでは*SH2D1A/SAP*変異が存在せず、2006年にフランスのRigaudらは第二の責任遺伝子として*XIAP/BIRC4*を同定した。アメリカのMarshらは6家系のXLPタイプ2 (*XIAP*欠損症) を報告するとともに、モノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリーによる*XIAP*欠損症の診断法を報告した。昨年度、本邦初の*XIAP*欠損症を報告したが、今年度はさらに3家系5例の*XIAP*欠損症を同定したので、わが国の*XIAP*欠損症の臨床的・遺伝学的特徴を明らかとする。

B. 研究方法

1. 対象

血球貪食性リンパ組織球症など臨床的に XLP が疑われた患者から文書による同意を得て、末梢血 5 ~10ml を採取し、富山大学医学部小児科学教室まで宅急便等にて送付した。

(倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言に則り、富山大学倫理審査委員会の承認を得ている。

2. フローサイトメトリー

末梢血単核球をパラフォルムアルデヒドにて固定後、サポニンにて細胞膜透過性を高め、市販の抗 *XIAP* モノクローナル抗体で染色後に、FITC 標識二次抗体と反応させ、リンパ球内における *XIAP* 蛋白の発現をフローサイトメーターにて解析した。

Natural killer T (NKT)細胞は抗 CD3 抗体、抗 $V\alpha 24$ 抗体、抗 $V\beta 11$ 抗体を用いて CD3 陽性細胞における $V\alpha 24$ かつ $V\beta 11$ 陽性細胞を NKT 細胞として測定した。

3. 遺伝子解析

末梢血由来 Buffy coat よりゲノム DNA を抽出