

201128032A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 安 友 康 二

平成24 (2012) 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生体防御医学分野

[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 9
石井榮一
愛媛大学大学院小児医学
2. 家族性血球貪食症候群のリンパ球機能解析に関する研究 1 2
安川正貴
愛媛大学大学院生体統御内科学
3. 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 6
藤本純一郎
国立成育医療センター研究所
4. 原発性血球貪食性リンパ組織球症の治療法
:同種造血幹細胞移植における適切な前処置法と移植ソースの
全国集計に基づく検討 1 9
河 敬世
大阪府立母子保健総合医療センター
5. わが国の XIAP 欠損症の臨床的・遺伝学的特徴に関する研究 2 3
金兼弘和
富山大学医学部小児科

6. 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	26
大賀正一 九州大学病院総合周産期母子医療センター	
7. ヒト ES/iPS 細胞からの血液細胞分化と血球貪食	30
湯尾 明 国立国際医療センター血液疾患研究部	
8. 家族性血球貪食症候群の原因遺伝子解明研究	32
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生体防御医学分野	
[III] 研究の刊行に関する一覧表	35
[IV] 研究成果の刊行物・別刷	51
[V] 班構成員名簿	103

[I] 総括研究報告

総括研究報告書

血球貪食症候群の病態・診療研究

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するために構成された。HPSの実態を把握するためにJPLSGと連携し継続したHPS病態・診療研究体制を継続して、症例の把握に努めた。今年度の研究によって、HPSの治療法の検討および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について、全エクソーム解析法によってFHLの原因遺伝子の同定に成功した。

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 臨床研究所
- ・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
- ・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)は適切な治療が施されない
と死に至る極めて重篤な疾患群である。HPSは原
発性と後天性に大別されて、原発性のHPSは家族
性血球貪食症候群(Familial hemophagocytic
lymphohistiocytosis; FHL)として知られており、特

に重篤な経過をとる。これまでに、欧米のFHLを
対象としたゲノム解析から、*PRF1* (perforin),
UNC13D (MUNC13-4), *STX11*(syntaxin 11), *STXB2*
(MUNC18-2) の遺伝子異常が報告されている。し
かし、約20%の症例では未だその原因遺伝子は同
定されておらず、正確な確定診断や、それに基づ
く適正な治療法は確立されていないという実情が
ある。

以上の背景から、本研究班ではHPSの実態を把
握して、適切な診断および治療法を確立するこ
とを目指す。さらに、FHLの原因遺伝子を同定し、
FHLの発症機構を解明する事により、新しいHPS
の治療法の開発を目的とする。

- (1) 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
原因遺伝子を同定することを目的とした。
- (2) 2005年以降の新規診断治療例を加えFHLの移
植成績を再検討し、より効果的な移植療法を

検討する。

- (3) HPSの標準的治療法を確立し、FHLの病態解析を明らかにする。
- (4) FHL患者よりアロ抗原特異的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。さらに、CTLによる標的細胞傷害機構を可視化することを試みた
- (5) 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. これまで用いてきた治療・診断指針について改訂点を検討する。
3. 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。
4. 移植療法についてこれまでの問題点を抽出する。
5. 全ゲノム連鎖解析

(a) SNP タイピング ; 全ゲノム領域を網羅する高密度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う。

(b) 連鎖解析 ; Merlin programを用いて全ゲノム連鎖解析を行い、既知の遺伝子座への連鎖を除外し、新規候補遺伝子座を同定する。

(c) ホモ接合体マッピング ; HomozygosityMapper programを用いて、罹患者が共有し非罹患者が共有していない連続ホモ接合体領域を検出する。

(d) 候補遺伝子の同定 ; 有意な連鎖を示し連続してホモ接合体である候補領域について、エクソン及びエクソン-イントロン境界領域をキャプチャー後、次世代シーケンサーで変異検索を行い、候補遺伝子を同定する。

C. 研究結果

1. FHL家系を対象とした全ゲノム連鎖解析
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。Merlin program (ver.1.1.2)を用いて、常染色体劣性遺伝、完全浸透率モデルで、多点LOD値を算出した。LOD値が陽転化する領域として複数箇所の陽性領域を検出することができた。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。解析をより確実にするためには、より多くの検体が必要であり、現在家系調査・検体収集を継続している。
2. 血族家系を対象としたホモ接合体マッピング
近親婚歴を有する2家系(FHL102, FHL-FKOK)の検体採取を行った。FHL-102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つの連続ホモ接合体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つの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。3つの候補領域のエクソン及びエクソン・イントロン境界領域をキャプチャー後、次世代シーケンサーで変異検索を行い、一つの候補遺伝子変異を同定した。現在、この遺伝子の機能解析を行っている。また、FHL-FKOK家系についても、ホモ接合体マッピングを行い、FHL-102とは異なる新規候補遺伝子座を同定した。
3. 2000年以降のEBV-HLHの治療反応性を解析した。HLH基準 (ASH Ed Prog 2009:127) を満たすEBV量増加例を診断。免疫抑制調節療法 (ITx)、VP16など化学療法 (CTx) およびSCTを段階的に行った。22例 (男9、女13) の年齢

中央値は5歳（9か月～41歳）、EBV初感染19例、再活性化3例。16例中15例の感染標的はT細胞で、EBV DNAの中央値は 1×10^5 copies/mlであった。自然寛解が2例、ITxを20例がうけ12例が軽快。残り8例にVP16を中心とするCTxを施行し5例が軽快し1例が死亡。この死亡例は再活性化例であった。残りEBV再活性化2例もCTxで病勢を制御できずSCTを施行し1例が死亡。CTx群（n=8）と未施行群（n=14）を比較したとき、CTx群は治療前有熱期間が長く（ $p=0.006$ ）、LDHが高く（ $p=0.028$ ）、sIL-2Rが高かった（ $p=0.042$ ）。多変量解析で長期発熱（ $p=0.017$ ）、sIL-2R高値（ $p=0.017$ ）がCTxの必要因子であった。

4. 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。
5. 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。
6. 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。
7. 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2011年11月末までに87例が登録され治療を受けた。一方国際研究による集積では全生存率は69%でHLH-94の63%より改善したが有意差はなかった。しかし移植前の死亡は18%でHLH-94の27%を有意に上回った。移植後の予後に差はなかった。

8. 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HLH-2004登録例87例では、PRF1によるFHL2は8例、UNC13DによるFHL3は5例、STXBP2によるFHL5とSTX11によるFHL4は1例もなかった。登録例の80%がEBVによる二次性HLHであった。
9. 国立成育医療研究センターはJPLSGと連携して、臨床試験等における中央診断実施後の余剰検体を保存し、また、配分する検体センターの役割を担っている。JPLSGの方針として、保存した腫瘍検体についてはヒトゲノム・遺伝子解析研究は行わないことを原則としていたため、国立成育医療研究センター倫理委員会ですでに承認されている保存・分配計画にはヒトゲノム・遺伝子解析研究は一切含まれていない。この研究計画にHLH2004試験に係る余剰検体の保存と分配を追加することは、ヒトゲノム・遺伝子解析研究としての審査を受けなおすことになる。そこで、既存の研究に新たな研究を追加するとともに、HLH2004に係るヒトゲノム・遺伝子解析研究の計画書を別途添付する形で国立成育医療研究センター倫理委員会に申請し承認を受けた。

D. 考察

1. 日本のFHL8家系を対象とした全ゲノムSNP連鎖解析ではLOD値が陽転化する領域を検出することができたが有意なLOD値を得ることができなかった。疾患遺伝子座の異質性が考えられ、より確実な解析を行うためにはさらなる家系の収集が必要であった。収集した家系のうち血族を有する1

家系 (FHL-102) を対象にホモ接合体マッピングを行った。既知の遺伝子座への連鎖を除外でき、3つの新規候補遺伝子座を同定し、この領域から1つの候補遺伝子変異を同定した。現在、この候補遺伝子の機能解析を行っている。また、血族を有するもう1家系 (FHL-FKOK) の解析からも、FHL-102とは異なる候補領域を同定することができた。今後の解析から、FHL-102とは異なる新規候補遺伝子変異が検出される可能性がある。2

2. FHLが早期に診断され移植年齢が低下している。中枢神経病もなく、全身状態が保たれる例も少なくない。Flu+MelのみではUCBT後に生着不全の可能性が高いため、前処置には適切な強度が必要である。EBV-HLHの60%以上はVP16なしに寛解した。成人例と再活性化例が重症であった。初感染小児例は早期のITxが有用で、過剰なT細胞活性化を調節する可能性が示唆された。

3. 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、一方プライミ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。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。

4. HLH-2004 治療研究は移植前の生存率の向上

に有効であったが、全生存率の有意な向上は得られなかった。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のスクリーニングと遺伝子解析が順調に行われているが、遺伝子異常が同定されていない症例については新規遺伝子異常を同定する必要がある。

E. 結論

FHLの原因遺伝子同定研究では、血族を有する家系を対象にしたホモ接合体マッピングでは、既知の遺伝子座への連鎖を除外でき、それぞれ新規候補遺伝子座を同定することができた。特に、一家系では新規の原因遺伝子の同定に成功した。本遺伝子は、これまで報告されている原因遺伝子とは全く別のシグナル伝達系に属することから、本研究から新しいFHLの発症機構の解明が期待できる。

FHLに対するRIC-UCBTと移植前治療の適正化のため、症例集積が必要である。中枢神経病の予防と治療に新たな対策が必要である。EBV-HLHに早期ITxは有用だが、予後因子はさらに検討が必要である。

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. Lian, G., Arimochi, H., Kitamura, A., Nishida, J., Li, S., Kishihara, K., Maekawa, Y., and Yasutomo, K. Manipulation of CD98 resolves type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol*, 188: 2227-2234 (2012).
2. Iwahashi, S., Maekawa, Y., Nishida, J., Ishifune, C., Kitamura, A., Arimochi, H., Kataoka, K., Chiba, S., Shimada, M., and Yasutomo, K. Notch2 regulates the development of marginal

- zone B cells through Fos. *Biochem Biophys Res Commun*, 418: 701-707 (2012).
3. Kitamura, A., Maekawa, Y., Uehara, H., Izumi, K., Kawachi, I., Nishizawa, M., Toyoshima, Y., Takahashi, H., Standley, D. M., Tanaka, K., Hamazaki, J., Murata, S., Obara, K., Toyoshima, I., and Yasutomo, K. A mutation in the immunoproteasome subunit PSMB8 causes autoinflammation and lipodystrophy in humans. *J Clin Invest*, 121: 4150-4160 (2011).
 4. Ohga S, Ishimura M, Yoshimoto G, Miyamoto T, Takada H, Tanaka T, Ohshima K, Ogawa Y, Imadome K, Abe Y, Akashi K, Hara T: Clonal origin of Epstein-Barr virus (EBV)-infected T/NK-cell subpopulations in EBV-positive T/NK-cell lymphoproliferative disorders of childhood. *J Clin Virol* 51(1):31-7, 2011
 5. Eljaafari FM, Takada H, Tanaka T, Doi T, Ohga S, Hara T: Potent induction of IFN- γ production from cord blood NK cells by the stimulation with single-strand RNA. *J Clin Immunol* 31(4):728-35, 2011
 6. Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakagawa-Nakazawa A, Kawano F, Ichikawa S, Shimizu N, Yamamoto N, Morio T, Ohga S, Nakamura H, Ito M, Miura O, Komano J, Fujiwara S: CD4+T cells have a critical role in the proliferation of EBV-infected T and NK cells. *PLOS Pathogen* Oct, 7, 2011 (in press)
 7. Asano T, Kogawa K, Morimoto A, Ishida Y, Suzuki N, Ohga S, Kudo K, Ohta S, Wakiguchi H, Tabuchi K, Kato S, Ishii E: Hemophagocytic lymphohistiocytosis after hematopoietic stem cell transplantation in children: a nationwide survey in Japan. *Pediatr Blood Cancer* Oct, 28, 2011 (in press)
 8. Shiraishi A, Ohga S, Doi T, Ishimura M, Takimoto T, Takada H, Miyamoto T, Abe Y, Hara T: Treatment choice of immunotherapy or further chemotherapy for Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* Dec, 19, 2011 (in press)
 9. Yamamura K, Ohga S, Nishiyama K, Doi T, Tsutsumi Y, Ikeda K, Fujishima A, Takada H, Hara T:
 10. Recurrent atrial fibrillation after high-dose methylprednisolone therapy in a girl with lupus-associated hemophagocytic syndrome. *Lupus* 20(8):871-5, 2011
 11. Shiraishi A, Hoshina T, Ihara K, Doi T, Ohga S, Hara T: Acute liver failure as the initial manifestation of Wilson disease triggered by human parvovirus B19 infection. *Pediatr Infect Dis J* 31(1):103-4, 2012
 12. Kitajima J, Inoue H, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Yoshida T, Kusahara K, Hara T: Differential transmission and postnatal outcome in triplets with congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr Development Pathol* Oct, 10, 2011 (in press)
 13. Nishi M, Nishimura R, Suzuki N, Sawada A, Okamura T, Fujita N, Kanai R, Yano J, Adachi S, Yasumi T, Sato E, Yasutomo K, Ishii E, Ohga S: Reduced-intensity conditioning in unrelated donor cord blood transplantation for patients with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Am J Hematol* 2012 (in press)
 14. 大賀正一: リンパ増殖性疾患と難治性EBウイルス関連疾患 造血障害の研究・教育交流拠点の形成とアジア血液学の創出 Establishment of a collaborative research and education center for hematological disorders in Asia. *JSPS Asian Core Program 2006-2010. The JSPS-NRCT Hematology Workshop in Asia*. pp. 10-14, 2011
 15. 土居岳彦、大賀正一：血球貪食症候群の発症機構に迫る 4. EBV関連血球貪食症候群 *医学のあゆみ*238巻11号 1053-7, 2011
 16. 大賀正一：血球貪食症候群の病態と治療 update
 17. 遺伝性血球貪食症候群の発症機序 *血液内科* 63巻5号 640-3, 2011

18. Nagai K, Yamamoto K, Fujiwara H, An J, Ochi T, Suemori K, Yasumi T, Tauchi H, Koh K, Sato M, Morimoto A, Heike T, Ishii E, Yasukawa M (2010) Subtypes of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan based on genetic and functional analyses of cytotoxic T lymphocytes. *PLoS ONE* 5: e14173
19. Matsuda K, Nakazawa Y, Yanagisawa R, Honda T, Ishii E, Koike K (2011) Detection of T-cell receptor gene rearrangement in children with pstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis using the IOMED-2 multiplex polymerase chain reaction combined with GeneScan analysis. *Clin Chim Acta* 412: 1554-1558
20. Murata Y, Yasumi T, Shirakawa R, Izawa K, Sakai H, Abe J, Tanaka N, Kawai T, Oshima K, Saito M, Nishikomori R, Ohara O, Ishii E, Nakahata T, Horiuchi H, Heike T (2011) Rapid diagnosis of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3 (FHL3) by flow cytometric detection of intraplatelet Munc13-4 protein. *Blood* 118: 1225-1230
21. Yanagimachi M, Goto H, Miyamae T, Kadota K, Imagawa T, Mori M, Sato H, Yanagisawa R, Kaneko T, Morita S, Ishii E, Yokota S (2011) Association of *IRF5* polymorphisms with susceptibility to hemophagocytic lymphohistiocytosis in children. *J Clin Immunol* 31: 946-951
22. Yang X, Kanegane H, Nishida N, Imamura T, Hamamoto K, Miyashita R, Imai K, Nonoyama S, Sanayama K, Yamaide A, Kato F, Nagai K, Ishii E, van Zelm MC, Latour S, Zhao X-D, Miyawaki T (2012) Clinical and genetic characteristics of XIAP deficiency in Japan. *J Clin Immunol* (in press)
23. Nishi M, Nishimura R, Suzuki N, Sawada A, Okamura T, Fujita N, Kanai R, Yano J, Adachi S, Yasumi T, Sato E, Yasutomo K, Ishii E, Ohga S (2012) Reduced intensity conditioning in unrelated donor cord blood transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Am J Hematol* (in press)
24. Kanegane H, Yang X, Zhao M, Yamato K, Inoue M, Hamamoto K, Kobayashi C, Hosono A, Ito Y, Nakazawa Y, Terui K, Kogawa K, Ishii E, Sumazaki R, Miyawaki T (2012) Clinical features and outcome of X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (SAP deficiency) in Japan identified by the combination of flow cytometric assay and genetic analysis. *Pediatr Allergy Immunol* (in press)
25. Shikata H, Yasukawa M, et al. (2012) The role of activation-induced cytidine deaminase (AID/AICDA) in the progression of follicular lymphoma. *Cancer Sci.* 103:415-421.
26. Nagai K, Ishii E, Yasukawa M, et al. (2012) Aurora kinase A-specific T-cell receptor gene transfer redirects T-lymphocytes to display effective anti-leukemia reactivity. *Blood* 119:368-376.
27. Hasegawa H, Yasukawa M, et al. (2011) Lysophosphatidylcholine enhances the suppressive function of human naturally occurring regulatory T cells through TGF- β production. *Biochem Biophys Res Commun.* 415:526-531.
28. 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* 118:1495-1503.
29. Takahara A, Yasukawa M, et al. (2011) Gemcitabine enhances Wilms' tumor gene WT1 expression and sensitizes human pancreatic cancer cells with WT1-specific T-cell-mediated antitumor immune response. *Cancer Immunol. Immunother.* 60:1289-1297.
30. 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.
31. 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.
 32. Zhao M, Kanegane H, et al. Early and rapid detection of X-linked lymphoproliferative syndrome with SH2D1A mutations by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 80:8-13, 2011.
 33. Booth C, Kanegane H, et al. X-linked lymphoproliferative disease due to SAP/SH2D1A deficiency: a multicenter study on the manifestations, management, and outcome of the disease. *Blood* 117:53-62, 2011,
 34. Pachlopnik Schmid J, Kanegane H, et al. Clinical similarities and differences of patients with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (XLP-1/SAP-deficiency) versus type 2 (XLP-2/XIAP-deficiency). *Blood* 117:1522-9, 2011.
 35. Yang X, Kanegane H, et al. Clinical and genetic characteristics of XIAP deficiency in Japan. *J Clin Immunol* 2012 Jan 8. [Epub ahead of print]
 36. Yang X, Kanegane H. et al. Characterization of Epstein-Barr virus (EBV)-infected cells in EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in two patients with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 and type 2. *Herpesviridae*. 2012 3(1):1.
 37. Kanegane H, et al. Clinical features and outcome of X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (SAP deficiency) in Japan identified by the combination of flow cytometric assay and genetic analysis. *Pediatr Allergy Immunol* 2012 Mar 21. [Epub ahead of print]
2. 学会発表
1. Ohga S: Congenital protein C deficiency in the Japanese experience. The 7th Congress of ASPR, Hematology Session “Thrombosis in Children in the West and East” Pediatric Academic Societies (PAS) and Asian Society for Pediatric Research (ASPR) 2011 Joint Meeting, April 30-May 3, 2011 Denver, Colorado, USA (invited speaker)
 2. 大賀正一：血球貪食症候群に対する治療戦略 第62回 日本小児科学会佐賀地方会 特別講演 2011.12.3 佐賀
 3. 大賀正一、石村匡崇、土居岳彦、瀧本智仁、高田英俊、原寿郎：慢性活動性EBウイルス感染症におけるEBV感染T/NK細胞クローンの起源. 第114回日本小児科学会 2011.8.12-14 東京
 4. Ishimura M, Mizuno Y, Takada H, Doi T, Ohga S, Hara T: Diagnostic usefulness of the expression levels of interferon-stimulated genes in histiocytic necrotizing lymphadenitis. 第40回日本免疫学会 2011.11.27-29 千葉
 5. Ohga S, Nishi M, Nishimura R, Suzuki N, Okamura T, Yano J, Adachi S, Sato E, Kanai R, Sawada A, Ishii E: Unrelated cord Blood Transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL). 第73回日本血液学会 2011.10.14-16 名古屋
 6. Shiraishi A, Doi T, Ohga S, Ishimura M, Takimoto T, Takada H, Miyamoto T, Abe Y, Hara T: Treatment outcomes of EB virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in a single institution. 第73回日本血液学会 2011.10.14-16 名古屋
 7. Nakazawa Y, Matsuda K, Yanagisawa R, Ishii E (2011) Monitoring of T-cell receptor gene rearrangement in children treated with HLH-2004 for Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. 27th Annual Meeting of Histiocyte Society, October, Vienna, Austria,

8. Miyazaki Y, Yasukawa M, et al. (2011) Human Telomerase Reverse Transcriptase-Specific T-Cell Receptor Gene Transfer Redirects T-Lymphocytes to Exert Effective Antitumor Reactivity Against Adult T-Cell Leukemia. 53rd Annual Meeting of American Society of Hematology. 2011, 12, 12, San Diego, U.S.A.

9. Asai A, Yasukawa M, et al. (2011) Forced Expression of CC Chemokine Receptor 2 Enhances Anti-Cancer Reactivity Mediated by T Lymphocytes Beforehand Redirected Toward WT1 Inside the Tumor Microenvironment. 53rd Annual Meeting of American Society of Hematology, 2011, 12, 10, San Diego, U.S.A.

38. Ochi T, Yasukawa M, et al. (2011) Redirected CD4⁺ T Cells Using WT1-Specific *T-Cell*

Receptor Gene Transfer Can Supply Multifactorial Help to Enhance the Anti-Leukemia Reactivity Mediated by Similarly Redirected CD8⁺ T Cells Using the Identical Gene Transfer. 53rd Annual Meeting of American Society of Hematology. 2011, 12, 12. San Diego, U.S.A.

39. Kanegane H. SAP and XIAP deficiency in hemophagocytic lymphohistiocytosis. The 3rd Symposium for PID in Asia. May 1, 2011. Denver, Colorado, USA.

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

[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

研究趣旨

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を開発する。

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 2011 年 11 月末までに 87 例が登録され治療を受けた。一方国際研究による集積では全生存率は 69%で HLH-94 の 63%より改善したが有意差はなかった。しかし移植前の死亡は 18%で HLH-94 の 27%を有意に上回った。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 HLH-2004 登録例 87 例では、PRF1 による FHL2 は 8 例、UNC13D による FHL3 は 5 例、STXBP2 による FHL5 と STX11 による FHL4 は 1 例もなかった。登録例の 80%が EBV による二次性 HLH であった。

HLH-2004 治療研究は 2011 年 12 月に終了し、現在次期治療研究について検討中である。候補としては ATG-based study、Campath-based study、VP16-based study などが検討されているが、各国の実情を考慮すると VP16-based study で二次性 HLH と FHL で治療層別化する方法が妥当と考えられている。

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が、全生存率の有意な向上は得られなかった。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のスクリーニングと遺伝子解析が順調に行われているが、遺伝子異常が同定されていない症例については新規遺伝子異常を同定する必要がある。

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を含めた層別化治療が予定されている。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 Nagai K, Yamamoto K, Fujiwara H, An J, Ochi T, Suemori K, Yasumi T, Tauchi H, Koh K, Sato M, Morimoto A, Heike T, Ishii E, Yasukawa M (2010) Subtypes of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan based on genetic and functional analyses of cytotoxic T lymphocytes. **PLoS ONE** 5: e14173
- 2 Matsuda K, Nakazawa Y, Yanagisawa R, Honda T, Ishii E, Koike K (2011) Detection of T-cell receptor gene rearrangement in children with Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis using the IOMED-2 multiplex polymerase chain reaction combined with GeneScan analysis. **Clin Chim Acta** 412: 1554-1558
- 3 Murata Y, Yasumi T, Shirakawa R, Izawa K, Sakai H, Abe J, Tanaka N, Kawai T, Oshima K, Saito M, Nishikomori R, Ohara O, Ishii E, Nakahata T, Horiuchi H, Heike T (2011) Rapid diagnosis of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3 (FHL3) by flow cytometric detection of intraplatelet Munc13-4 protein. **Blood** 118: 1225-1230
- 4 Yanagimachi M, Goto H, Miyamae T, Kadota K, Imagawa T, Mori M, Sato H, Yanagisawa R, Kaneko T, Morita S, Ishii E, Yokota S (2011) Association of *IRF5* polymorphisms with susceptibility to hemophagocytic lymphohistiocytosis in children. **J Clin Immunol** 31: 946-951
- 5 Asano T, Kogawa K, Morimoto A, Ishida Y, Suzuki N, Ohga S, Kudo K, Ohta S, Wakiguchi H, Tabuchi K, Kato S, Ishii E (2011) Hemophagocytic lymphohistiocytosis after hematopoietic stem cell transplantation in children: a nationwide survey in Japan. **Ped Blood Cancer** (in press)
- 6 Yang X, Kanegane H, Nishida N, Imamura T, Hamamoto K, Miyashita R, Imai K, Nonoyama S, Sanayama K, Yamaide A, Kato F, Nagai K, Ishii E, van Zelm MC, Latour S, Zhao X-D, Miyawaki T (2012) Clinical and genetic characteristics of XIAP deficiency in Japan. **J Clin Immunol** (in press)
- 7 Nishi M, Nishimura R, Suzuki N, Sawada A, Okamura T, Fujita N, Kanai R, Yano J, Adachi S, Yasumi T, Sato E, Yasutomo K, Ishii E, Ohga S (2012) Reduced intensity conditioning in unrelated donor cord blood transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. **Am J Hematol** (in press)
- 8 Kanegane H, Yang X, Zhao M, Yamato K, Inoue M, Hamamoto K, Kobayashi C, Hosono A, Ito Y, Nakazawa Y, Terui K, Kogawa K, Ishii E, Sumazaki R, Miyawaki T (2012) Clinical features and outcome of X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (SAP deficiency) in Japan identified by the combination of flow cytometric assay and genetic analysis. **Pediatr Allergy Immunol** (in

press)

Vienna, Austria,

2. 学会発表

1. Nakazawa Y, Matsuda K, Yanagisawa R, Ishii E (2011) Monitoring of T-cell receptor gene rearrangement in children treated with HLH-2004 for Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. 27th Annual Meeting of Histiocyte Society, October,

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

家族性血球貪食症候群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）における細胞傷害性T細胞（cytotoxic T lymphocyte; 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。そこで本研究では、FHL 患者よりアロ抗原特異的 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。さらに、CTL による標的細胞傷害機構を可視化することを試みた。その結果、以下のことが明らかとなった。まず、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。さらに、正常 CTL は、標的細胞の細胞周期に関わらず細胞傷害をきたすのに比べ、FHL 患者 CTL は標的細胞に結合するものの細胞傷害が認められず、長時間にわたって標的細胞からの活性化シグナルが伝達されることが示唆された。

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

家族性血球貪食性リンパ組織球症（familial hemophagocytic lymphohistiocytosis; FHL）の病態を解明する目的で、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。さらに、CTL の細胞傷害性を標的細胞の細胞周期を可視化し、time lapse によって観察した。

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 (*PRFI*),

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。

標的細胞を fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (Fucci) で標識し、CTL による細胞傷害性を time lapse によって観察した。

（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。

- 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.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。
- 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。
- 5) 正常CTLは、標的細胞の細胞周期に関わらず標的抗原特異的に短時間に細胞傷害を示したが、FHL患者CTLは、標的細胞に結合するものの細胞傷害が認められず、長時間にわた

って標的細胞からの活性化シグナルが伝達されることが示唆された。

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。
- 3) 正常CTLは、標的細胞に結合して短時間に標的細胞を抗原特異的に傷害し、他の標的細胞を傷害するが、FHL患者CTLは、標的細胞に結合するものの細胞傷害が認められず、長時間にわたって標的細胞に結合し、活性化シグナルが伝達されることが示唆され、このことが、FHL発症のメカニズムの一つと考えられた。現在、CTL活性化を可視化するプローブを作製中であり、CTL活性化シグナルの可視化を試みている。

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。また、FHL 患者 CTL は、標的細胞に長時間にわたって結合し、長時間活性化シグナルが伝達されることが FHL 発症のメカニズムの一つと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Shikata H, Yasukawa M, et al. (2012) The role of activation-induced cytidine deaminase (AID/AICDA) in the progression of follicular lymphoma. *Cancer Sci.* 103:415-421.

Nagai K, Ishii E, Yasukawa M, et al. (2012) Aurora kinase A-specific T-cell receptor gene transfer redirects T-lymphocytes to display effective anti-leukemia reactivity. *Blood* 119:368-376.

Hasegawa H, Yasukawa M, et al. (2011) Lysophosphatidylcholine enhances the suppressive function of human naturally occurring regulatory T cells through TGF- β production. *Biochem Biophys Res Commun.* 415:526-531.

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* 118:1495-1503.

Takahara A, Yasukawa M, et al. (2011) Gemcitabine enhances Wilms' tumor gene WT1 expression and sensitizes human pancreatic cancer cells with WT1-specific T-cell-mediated antitumor immune response. *Cancer Immunol. Immunother.* 60:1289-1297.

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.

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.

2. 学会発表

Miyazaki Y, Yasukawa M, et al. (2011) Human Telomerase Reverse Transcriptase-Specific T-Cell Receptor Gene Transfer Redirects T-Lymphocytes to Exert Effective Antitumor Reactivity Against Adult T-Cell Leukemia. 53rd Annual Meeting of American Society of Hematology. 2011, 12, 12, San Diego, U.S.A.

Asai A, Yasukawa M, et al. (2011) Forced Expression of CC Chemokine Receptor 2 Enhances Anti-Cancer Reactivity Mediated by T Lymphocytes Beforehand Redirected Toward WT1 Inside the Tumor Microenvironment. 53rd Annual Meeting of American Society of Hematology, 2011, 12, 10, San Diego, U.S.A.

Ochi T, Yasukawa M, et al. (2011) Redirected CD4⁺ T Cells Using WT1-Specific *T-Cell Receptor* Gene Transfer Can Supply Multifactorial Help to Enhance the Anti-Leukemia Reactivity Mediated by Similarly Redirected CD8⁺ T Cells Using the Identical Gene Transfer. 53rd Annual Meeting of American Society of Hematology. 2011, 12, 12. San Diego, U.S.A.

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