

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・診療研究に資する検体保存体制整備

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

本研究の目的は、血球貪食症候群に係る患者由来検体の保存と供給体制に整備である。血球貪食症候群の場合、特に、遺伝性の発症様式を示すものがあるためゲノム解析研究の対象となる場合があること、DNA や RNA 保存のみならず、蛋白質採取やマーカー解析を目的とした細胞保存や活性測定のためのサイトカイン刺激細胞クローンの保存などのために、多種類の検体が複数の施設に送付され保存されること、など複雑な状況にある。血球貪食症候群に関しては、国内の小児がん臨床研究グループ(日本小児白血病リンパ腫研究グループ JPLSG)の中で臨床試験が実施されており、本難治性疾患克服研究事業に係る検体保存についても同じあるいは類似のシステム上で運用することが望ましいと考えられる。本年度、JPLSG の検体保存と供給に係る研究計画に血球貪食症候群の臨床試験と連携したゲノム解析研究を含む検体の保存と分配について本作業を担当する国立成育医療研究センターの倫理委員会の承認を得ることができ、今後の新たな候補遺伝子探索推進の基盤ができた。

A. 研究目的

極めて希少な難病である血球貪食症候群の病態・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) 臨床試験 HLH2004 における検体の流れの総括

日本小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)が実施する血球貪食症候群に対する臨床試験である HLH2004(Treatment Protocol of the Second International HLH Study)に係る中央診断の流れを明確にした。

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整備

国立成育医療研究センターは、JPLSG における検体保存および分配の中央センターとして機能している。そこで、研究方法1)に基づく検体の流れを勘案して HLH2004 の中で発生する余剰検体の保存と分配の項目を保存・分配計画に追記し国立成育医療研究センター倫理委員会の審査を受けた。

C. 研究結果

1) 血球貪食症候群臨床試験 HLH2004 に係る検

体の流れ

HLH2004 では、家族性発症の血球貪食症候群を早期に同定し、それらに対しては造血幹細胞移植を含む強力な治療を行うことによって患者を救命することを目的としている。そこで家族性発症の疑いのある患者を早期に見つけ出すために、①キラー活性、②血球貪食症候群関連蛋白発現、および③EB ウイルス感染検査、の3つを各々別々の施設で行っている(図1)。これらの検査で家族性発症の疑いが強くなった場合は、「先天性免疫不全症の原因遺伝子同定および病態形成機序の解明」研究(富山大学・金兼弘和)の枠組みで、富山大学を経由してかずさ DNA 研究所に検体が送付され、血球貪食症候群の原因遺伝子として判明している perforin, MUNC13-4, syntaxin11 の3遺伝子について変異の有無が検査される。その結果が HLH2004 試験グループに返却されて、どの治療を受けるのかを決める仕組みであることが判明した。なお、かずさ DNA 研究所に送付された検体は検査終了後に廃棄されることも判明した。

この体制の中で、キラー活性測定後の検体はサイトカイン依存性に増殖。維持できる細胞株であ

り、これらの保存・管理はいまだ国立成育医療研究センターは対応できない。そこで、蛋白発現およびEBウイルス検査の後に余剰となっている検体について、国立成育医療研究センターが継続して保存管理ができる体制を目指すことにした。

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整備

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

家族性に発症する血球貪食症候群は極めてまれであり、全国的な研究グループである JPLSG と連携して患者を集積する必要がある。本研究も JPLSG が行う血球貪食症候群に対する臨床試験である HLH2004 の中で行われる検体保存と分配の仕組みを活用したものである。HLH2004 は平成 23 年度に新規患者登録が終了したこともあって、中央診断のための検体の動きを総括し、将来、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に使用できる形で保存することは重要である。

平成 23 年度は、HLH2004 での検体の動きを図1のようにまとめて添付し、かつ、ヒトゲノム・遺伝子解析研究を新たに追加して JPLSG に係る余剰検体保存計画を国立成育医療研究センター倫理委員会で審査し承認を受けた。

今後は、図1に記載したごとく、国立成育医療研究

センターに保存されている検体については、外部の研究者に分配できる基礎ができたと考えられる。現状では、JPLSG の研究活動で収集・保存された検体は JPLSG が所有するとの考えであるが、外部研究者への配分は、①JPLSG 会員になり行う研究、②JPLSG 会員と共同して行う研究、という枠組みで可能となっていることから、手続きは必要であるが門戸は開かれている。

このような検体の保存と分配の機能を維持することにより血球貪食症候群をはじめとする成育難病の克服に活用されることを期待する。

E. 結論

血球貪食症候群の患者由来検体保存体制を整備した。

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

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

HLH2004における検体の流れ図

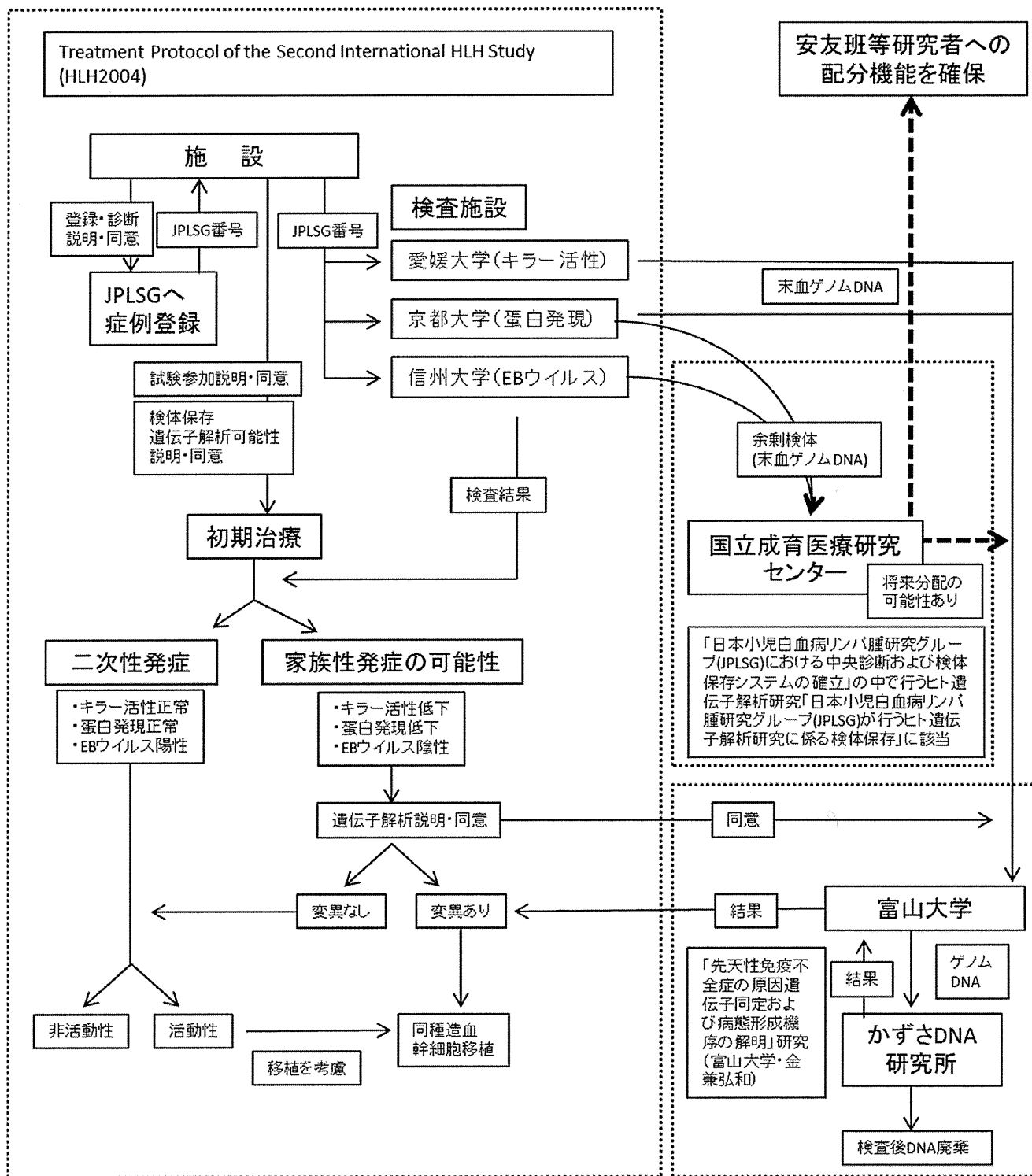


図1. HLH2004における検体の流れと保存体制の整備

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

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

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

原発性血球貪食性リンパ組織球症 primary hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH)は、また家族性血球貪食性リンパ組織球症 familial HLH (FHL)とも呼ばれるが、余命数か月の致死性疾患であり、同種造血幹細胞移植 allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT)が唯一の根本的治療法である。血縁者に適切な骨髄ドナーがいなければ、以前なら移植まで平均約半年かかる非血縁骨髄バンクしかなかったが、21世紀になって臍帯血バンクが充実し、すぐにでも移植が可能となった。移植前処置も以前なら骨髄破壊的前処置 myeloablative conditioning (MAC)のみだったが、21世紀になって毒性のより低い減強度前処置 reduced intensity conditioning (RIC)が広く行われるようになってきた。本疾患において RIC を前処置とした臍帯血移植 cord blood transplantation (CBT)の施行 (RIC-CBT)が可能かはこれまで検討されることがなかった。

本研究は日本造血細胞移植学会のデータベースを用い、対象 53 例を検討した。53 例の全生存 overall survival (OS)率は $65.4 \pm 6.6\%$ だった(中央値 \pm 標準誤差)。非血縁 RIC-CBT は 13 例あり、全身状態が不良でなければ OS $80.0 \pm 12.6\%$ と良好であった。なお非血縁骨髄移植 bone marrow transplantation (BMT)の 7 例 (MAC 6 例, RIC 1 例)では OS $42.9 \pm 18.7\%$ にとどまった。すなわち適切な血縁ドナーがない場合、非血縁 RIC-CBT が望ましいという結果であった。ただし全身状態が不良ではたとえ毒性の低い RIC を用いても救命は困難であった。RIC レジメンとしてフルダラビン fludarabine (Flu) $100-180\text{mg}/\text{m}^2$ + LPAM $120-180\text{mg}/2$ + 抗 T リンパ球抗体 anti-T-lymphocyte globulin (ATG) が現時点で推奨されるが、各薬剤の投与量の最適化には前方視的臨床研究が

必要と考えられた。

A. 研究目的

原発性 HLH (別名, FHL) は、T および NK リンパ球における細胞傷害性顆粒の産生、輸送、放出系に異常がある先天性免疫異常症である。ウイルス感染等を契機に T および NK リンパ球が活性化されると、感染のみならずリンパ球自身の活性化を制御できず、活性化リンパ球の組織浸潤や高サイトカイン血症から多臓器不全に至り、致死性経過をとる。同種 HSCT が唯一の根本的治療法である。

同種 HSCT といえば、MAC, すなわち複数の抗がん剤大量投与や全身放射線照射 total body irradiation (TBI) で骨髄を空にする処置、を行って造血幹細胞の受け入れ準

備をし、ヒト組織適合抗原 human leukocyte antigen (HLA) の合致した血縁者の骨髄(または末梢血幹細胞),あるいは適切なドナーが血縁者にいなければ非血縁者(骨髄バンク)の骨髄を移植するのが、従来の方法であった。しかし2000年台になって、移植前処置に強い免疫抑制効果をもたらすFluを組み入れることで抗がん剤を減量できる(RIC)ことが分かってきた。また移植ソースについても21世紀になって、臍帯血バンクの拡充が目覚ましく、CBTも広く普及するようになってきた。

各前処置、各移植ソースにも長所、短所がある。このような移植の多様化を背景に、いかなる方法が望ましいのか検討する必要が生じてきた。本研究は特に以下の2つを重点的に解析し、新たな標準となるべきベストな移植法を探索することを目的とする。(1)RICは毒性が低く、患者の安全面で優れているが、生着不全のリスクが上がりうる。(2)移植までに平均140日を要する非血縁の骨髄移植BMTと異なり、CBTはすぐに移植可能であるが、生着不全のリスクが上がりうる。すなわち本研究の主眼はRICを用いたCBT(以下RIC-CBT)が成立しうるのかという点であり、この主旨の研究は世界的にも皆無である。なお本研究は大阪府立母子保健総合医療センター倫理委員会の承認を得た上で行われた。

B. 研究方法

日本造血細胞移植学会に集積されたデータベースを用いた。1990年1月から2009年12月まで72回の移植の登録があった。まず原発性HLHであること(診断違いの3例と、本疾患として疑問のある36歳の1例を除外した)を確認し、同種HSCTに限り

(自家移植はなかった)、初回の同種HSCTに限定した(2回目以降の9移植を除外した)。さらに末梢血幹細胞移植の2例を除外し、またFlu+LPAMを含まないまれなRICの4例も除外した。以上より53回53例の移植を解析対象とした。OSは、移植日からあらゆる死亡までの期間で定義した。無事象生存 event-free survival (EFS)率は、以下に示す事象までの期間で定義した:原病の再燃や進行、原病による臓器障害に起因する死亡、移植に関連する死亡 treatment-related mortality (TRM)、1次および2次生着不全に起因する再移植。

C. 研究結果

解析対象となった全53例の移植成績(中央値±標準誤差)は、EFS 57.6±6.9%、OS 65.4±6.6%だった。MAC-BMTは12例、MAC-CBTは25例、RIC-CBTは13例であった。一方RIC-BMTは3例のみのため、以降の統計学的解析からは除外した。EFSは、高いものから順にMAC-BMT 65.6±14.0%、MAC-CBT 59.1±10.0%、RIC-CBT 46.2±13.8%であったが有意差には至らなかった($p=0.35$)。OSは、高いものから順にMAC-BMT 74.1±12.9%、MAC-CBT 63.1±9.8%、RIC-CBT 61.5±13.5%であり、こちらも有意差には至らなかった($p=0.66$)。

各群の死因を分析すると、MAC-CBTではTRM、なかでも非感染死亡が多い傾向にあり($n=4/25$, $p=0.12$)、この点ではRIC-CBTの方が優れていた。RIC-CBTでは原病に起因する臓器障害による死亡が多かった($n=3/13$, $p=0.01$)。前処置開始時の全身状態が極めて不良、すなわち performance Status (PS)が最重症の4であった症例が3例あり、この3例ともRIC-CBTが選択され、

全例で「原病に起因する臓器障害による死亡」に至っていた（肺障害が2例，肝および中枢神経障害が1例）．おそらく血縁者に適切なドナーがなく，原病が進行して非血縁BMTが待てずに非血縁CBTが選択され，また原病に起因する臓器障害のためMACでは耐えられないとの判断でRICが選択された可能性が推察される．PS 4の3例を除いたRIC-CBTの成績はEFS 60.0±15.5%，OS 80.0±12.6%と良好であった．なおCBTのドナーは全例が非血縁であった．BMTも非血縁ドナーに限れば（MAC 6例，RIC 1例），EFSとOSともに42.9±18.7%にとどまり，むしろRIC-CBTの優位性が示された．

移植後30日以上生存した症例において好中球が回復しなかったのは，MAC-BMTの0/11，MAC-CBTの3/25に比べ，RIC-CBTでは2/10に認められた（有意差なし）．ただしRIC-CBTの2例はいずれも再移植を受けて生着した．RIC-CBTではそのほか自己造血回復が2例，混合キメラが2例あり，1回の移植で完全ドナーになりえたのは4例のみであった．完全ドナーとなる上で重要だったのは前処置に使用したL-PAMの量で，120-180mg/m²での完全ドナーは4/6，70-80mg/m²では0/4であった（p=0.04）．TBI例が少ない（n=1）ためその意義は検討不能で，Fluの使用量（100-125mg/m²または150-180mg/m²），移植細胞の数やviability，HLAの拒絶方向不一致度はいずれも生着（完全ドナーキメリズム）に影響を与えなかった．L-PAM 120-180mg/m²の6例中，完全ドナーとなったのはATGを投与した4例のみであった．以上より，CBTにおけるRICレジメンとしてFlu 100-180mg/m² + LPAM 120-180mg/2に加えATGの併用が現時点で推奨されつつ，各薬剤の投与量の最適化に

は前方視的臨床研究が必要と考えられた．

D. 考察

原発性HLHの同種HSCTにおいて適切な血縁ドナーがいなければ，移植まで長期間（平均約半年）かかる非血縁骨髄ドナーを選ぶより，初期治療によって全身状態が改善したところで遅滞なく非血縁CBTを施行すべきである．RICを適切に行えば非血縁CBTでも完全ドナーキメリズムが得られる．MACはむしろTRMが増えるため避けるべきである．

CBTにおけるRICレジメンとしてFlu + LPAM + ATGが望ましい．TBIがATGの代わりになる可能性があるが，本疾患の移植時期が乳幼児期であることを考慮するとTBIは可能なら避けたい．一方でATGでは移植後ウイルス感染症のリスクが高くなりえる（今回の検討では問題にはならなかったが）．Flu，LPAM，ATG投与量の最適化のため前方視的臨床研究が必要と考えられた．

E. 結論

原発性HLHの根治療法として，適切な血縁ドナーがいなければ，代替療法として非血縁RIC-CBTが期待できる．ただし全身状態が不良ではたとえRICを用いても救命は困難である．RICレジメンとしてFlu 100-180mg/m² + LPAM 120-180mg/2 + ATGが現時点で推奨される．各薬剤の投与量の最適化には前方視的臨床研究が必要である．

F. 健康危険情報

なし（不要）．

G. 研究発表

1. 論文発表：Akihisa SAWADA, Shoichi

OHGA, Eiichi ISHII, Masami INOUE, Keiko OKADA, Jiro INAGAKI, Hiroaki GOTO, Nobuhiro SUZUKI, Kazutoshi KOIKE, Yoshiko ATSUTA, Ritsuro SUZUKI, Hiromasa YABE, Keisei KAWA, Koji KATO, Koji YASUTOMO. Reduced Intensity Conditioning Followed by Unrelated Cord Blood Transplantation is Promising for Primary Hemophagocytic Lymphohistiocytosis: A

Nationwide Retrospective Analysis in Japan.
(Under submission)

2. 学会発表：第7回 血球貪食症候群研究会. 2012/03/17 ベルサール八重洲(東京).

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

わが国の XIAP 欠損症の臨床的・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

XIAP 欠損症は *XIAP/BIRC4* 遺伝子変異による稀な先天性免疫不全症で、X 連鎖リンパ増殖症候群 (XLP) タイプ 2 として認識されている。主に EB ウイルス関連血球貪食性リンパ組織球症 (EBV-HLH) として発症するが、その他の病型で発症することもある。本研究ではわが国において 6 家系 9 例の XIAP 欠損症を同定し、XIAP 蛋白発現、遺伝子解析、NKT 細胞数、アロ抗原特異的 T 細胞における細胞傷害活性を検討した。さらにわが国の患者の臨床的特徴をこれまで報告されている欧米の患者のそれと比較検討した。

A. 研究目的

X 連鎖リンパ増殖症候群 (XLP) は致死性的伝染性単核症あるいは EB ウイルス関連血球貪食性組織球症 (EBV-HLH)、異常ガンマグロブリン血症、悪性リンパ腫を臨床的 3 徴とする稀な先天性免疫不全症であり、EBV に対する特異的免疫応答の異常と考えられている。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ったが、家族歴を有しながら約 20% の XLP では原因不明であった。2006 年に *SH2D1A/SAP* 遺伝子のごく近傍に局在する *XIAP/BIRC4* が第二の責任遺伝子として同定され、XLP タイプ 2 と呼称された。2010 年に本邦初の XIAP 欠損症を同定したのを機会に、当教室ではわが国における XIAP 欠損症患者の診断を行ってきた。これまでに同定された 6 家系 9 例の XIAP 欠損症の臨床的・遺伝学的特徴を明らかとし、欧米のそれと比較検討することを本研究の目的とする。

B. 研究方法

1. 対象

EBV-HLH など臨床的に XLP が疑われた患者またはその家族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で 24 時間以内に送付してもらった。

(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. 遺伝子解析

末梢血由来 buffy coat よりゲノム DNA を抽出し、*XIAP/BIRC4* 遺伝子のエキソン 1~6 をそれぞれ PCR 法にて増幅し、ダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定した。

3. 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、サポニンで細胞膜透過性を高め、市販の抗 XIAP モノクローナル抗体 (クローン 48 ならびに 2F1) と反応後に、FITC 標識二次抗体で染色し、リンパ球内における XIAP 蛋白の発現をフローサイトメトリーにて解析した。

Invariant natural killer T (iNKT) 細胞は抗 CD3 抗体、抗 V α 24 抗体、抗 V β 11 抗体を用いた 3 重染色にて CD3 陽性細胞における V α 24 かつ V β 11 陽性細胞を iNKT 細胞として測定した。

4. 細胞傷害活性

患者と HLA が一致しないリンパ芽球様細胞 (LCL) と共培養して、磁気ビーズ法で CD8 陽性細胞を純化し、アロ抗原特異細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) を樹立した。HLA が一致した LCL と一致した LCL をターゲットとして ^{51}Cr リリース法にて細胞傷害活性を調べた。

C. 研究結果

6 家系の患者で *XIAP* 変異が同定された。ナンセンス変異が 2 家系、小欠失によるフレームシフト

変異が 2 家系、1 アミノ酸欠失が 1 家系、大欠失(エキソン 1-2) が 1 家系であった (図 1)。

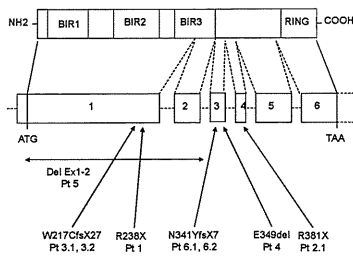


図 1 わが国の XIAP 欠損症における XIAP 変異

家系 4、5 では XIAP 蛋白の発現が正常であったが、その他の家系では発現低下がみられた。

iNKT 細胞数は一部正常範囲を呈する患者もいたが、平均すると健常者に比べると有意に iNKT 細胞の減少を認めた。

アロ抗原特異的 CTL による細胞傷害活性は健常人と同程度であった (図 2)。

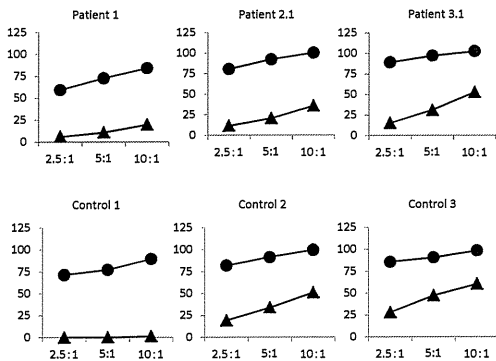


図 2 アロ抗原特異的 CTL による細胞傷害活性

臨床像は HLH が 6 例 (67%) でみられ、うち 5 例は HLH を反復し、EBV-HLH は 4 例で認められた。脾腫は半数で認められ、低ガンマグロブリン血症は 2 例のみであった。また出血性腸炎が 2 例で認められた。これらの臨床的特徴はこれまで報告されている欧米の報告とほぼ同様の特徴を有していた。

D. 考察

XIAP 欠損症では SAP 欠損症 (XLP タイプ 1) の臨床的 3 徴の一つである悪性リンパ腫が報告されていないが、本研究でも悪性リンパ腫の発症はなかった。XIAP 欠損症では反復性 HLH が特徴とされるが、本研究でも同様であり、必ずしも EBV 関連ではなかった。脾腫も XIAP 欠損症に特徴的とされるが、本研究では 2 例しか認められなかった。XIAP 欠損症では SAP 欠損症と異なり、クローン病様の出血性腸炎の報告があるが、本研究でも 2 例で認められた。

フローサイトメーターによる XIAP 蛋白の発現は一部正常なものがあり、SAP 欠損症におけるそれ

ほどには有用ではないかもしれない。iNKT 細胞数も平均すると患者では健常者に比べると有意に低下していたが、一部の患者では正常範囲であった。

アロ抗原特異的 CTL による細胞傷害活性は健常人と同程度であり、家族性血球貪食症候群とは異なる病態が考えられる。

E. 結論

XIAP 欠損症はわが国においても少なからず存在し、その臨床的特徴は欧米の報告例と類似していた。フローサイトメーターによる XIAP 蛋白の発現と iNKT 細胞数の測定は XIAP 欠損症のスクリーニングとして有用であるが、一部の患者では正常なことがあり、確定診断には遺伝子解析が欠かせない。さらなる症例の集積により、病態の解明ならびに効果的治療法の開発が必要と思われる。

研究協力者: Xi Yang、宮脇利男 (富山大学医学部小児科)

F. 研究発表

1. 論文発表

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.

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.

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.

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]

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.

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

Kanegane H. SAP and XIAP deficiency in hemophagocytic lymphohistiocytosis. The 3rd Sympo

sium for PID in Asia. May 1, 2011. Denver, Colorado, USA.

G. 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）
（分担）研究報告書

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

研究分担者 大賀 正一 九州大学大学院医学研究院周産期・小児医療学 教授

研究要旨：血球貪食性リンパ組織球症（Hemophagocytic Lymphohistiocytosis: HLH）の9例に細胞内 Perforin 蛋白発現解析を実施し、2例を FHL2 と診断（1例は複合ヘテロ接合）した。他は二次性であったが、原因不明の1家系を解析中である。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た。発症前・初期に診断される乳児例が増加し、骨髄非破壊的前処置による非血縁臍帯血移植の成功例が増加しつつある。一方、移植の時期とそれまでの治療（中枢神経病の対応を含む）が問題である。EB ウイルス関連 HLH の病態と予後因子を検討し、早期免疫調節療法が約 60%の初感染小児例に寛解をもたらすことを明らかにした。新規遺伝子の探索、新生児 HLH の特徴、EBV 感染 T/NK 細胞特性などの解析を継続している。

A. 研究目的

PRF, *UNC13D*, *STX11*及び*STXBP2*異常によるFHL2-5はHLHを唯一の表現型とする遺伝性疾患である。*SHADIA*と*BIRC4*が原因遺伝子であるX連鎖リンパ増殖性疾患(XLP1,2)の他、先天性顆粒放出異常症・免疫不全症・代謝異常症の一部もHLHを発症しうる。FHLは同種造血幹細胞移植（SCT）が唯一の根治療法である。一方、二次性HLHはEpstein-Barrウイルス（EBV）関連（EBV-HLH）が多く、がん化学療法や稀ながら同種SCTが必要な例もある。FHLおよびEBV-HLHに対する診断と治療法を確立する。

B. 研究方法

FACSにてperforin蛋白細胞内発現のスクリーニングを行い、同意取得後*PRF*遺伝子の塩基配列を決定しFHL2を診断する。EBV DNAをreal-time PCRで定量し、感染標的細胞を同定してEBV-HLH診断の補助検査と

する。2005年以降に新規診断したFHL移植例と2000年以降九大小児科・血液内科で治療したEBV-HLH例を解析し、診断と治療の問題点を検討する。

C. 研究結果

2011年はHLH9例のPerforin蛋白発現から、2例をFHL2と診断した。日本人に多い変異 exon3 1090-91 delCT L362fsが両者にあり、1例は複合ヘテロ接合、もう1例はヘテロ変異のみで解析を継続中である。他はEBV-HLH、Coxsackievirus B1による新生児HLHなどの二次性で、不明の1家系を安友主任と解析中である。

2000年以降、前処置軽減非血縁臍帯血移植（RIC-UCBT）を受けたFHL13名の初回移植を検討した。診断年齢は中央値6か月で、診断から5か月後に移植をうけていた。3例が1か月までに発症、診断時中枢神経病は1例のみであった。移植前治療に半数が

HLH2004を使用し、HLH病勢は制御されたが3例は中枢神経病をきたした。前処置は全身放射線照射 (TBI; n=6, 2~4Gy)、シクロフォスファイド (CY; n=4, 50~120mg/kg)、ブスルファン (BU; n=2)、エトポシド (VP16; n=1)、メルファラン (Mel; n=11, 80~180 mg/m²) 及びフルダラビン (Flu; n=12, 120~180 mg/m²) であった。11名が生着し無病をえたが、混合キメラ2名のうち1名は生着不全となり再移植待ちである。1名が拒絶後再移植にて無病生存し、2例が死亡した。Flu+Mel+low dose TBI (n=6) では無病生着4、生着不全1、死亡1であった。一方、Flu+Mel+non-TBI (n=5) は無病生着2、生着不全2及び混合キメラ1であった。

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。

D. 考察

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。

E. 結論

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

総括研究報告書にまとめて記入

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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

2) 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

3) 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)

4) 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)

5) 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)

6) Yamamura K, Ohga S, Nishiyama K, Doi T, Tsutsumi Y, Ikeda K, Fujishima A, Takada H, Hara T: Recurrent atrial fibrillation after high-dose methylprednisolone therapy in a girl with lupus-associated hemophagocytic syndrome. Lupus 20(8):871-5, 2011

7) 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

8) Kitajima J, Inoue H, Ohga S, Kinjo T,

Ochiai M, Yoshida T, Kusuhara K, Hara T: Differential transmission and postnatal outcome in triplets with congenital cytomegalovirus infection. Pediatr Development Pathol Oct, 10, 2011 (in press)

9) 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)

10) 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

11) 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

12) 大賀正一: 血球貪食症候群の病態と治療 update 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

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) Shiraiishi 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

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

研究分担者 湯尾 明 独立行政法人国立国際医療研究センター研究所疾患制御研究部長

研究要旨

ヒト ES 細胞では 3 株中 2 株において、ヒト iPS 細胞では 6 株中 4 株全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。ヒト iPS 細胞での I 型インターフェロンの発現は、供与先やウイルスベクターの種類と無関係であった。未分化な状態ではヒト ES 細胞でもヒト iPS 細胞でも発現はなかった。従って、I 型インターフェロンの発現と血球貪食との関係は認められなかった。

A. 研究目的

ヒト ES 細胞からの血液細胞の分化に際しては、その本来の性質に関して胎児性マクロファージや卵黄嚢型赤芽球などの卵黄能造血のような発生初期の造血を辿りがちであることが知られている。従って、それを避けるために好中球などの 2 次造血を誘導するための技術開発が、我々を含む複数の研究グループによって推進されてきた。

一方、ヒト iPS 細胞についてもヒト ES 細胞と同様に血球分化が試みられ、ヒト ES 細胞とほぼ同様の成果が報告されつつある。我々もヒト ES 細胞において確立した独自の分化誘導法を駆使してヒト iPS 細胞からの血液細胞分化誘導を検討したところ、マクロファージ主体となってしまった。しかし、分化誘導初期には骨髄系の前駆細胞は存在し、これをマクロファージが貪食していると思われる所見を得た。このような培養系での血球貪食の機構を解明するために研究を進めた。

B. 研究方法

様々のヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞か

ら我々の手法（前半は浮遊培養、後半は接着培養からなる 2 段階法）により血液細胞の分化誘導を行った。用いたヒト ES 細胞は、KhES-3、KhES-4、KhES-5 の 3 株で、いずれも京都大学で樹立された国産の細胞株である。用いたヒト iPS 細胞は、京都大学から供与された 201B7、253G1 の 2 株（レトロウイルスベクターを用いて樹立）、国立成育医療センターから供与された #25 株（レトロウイルスベクターを用いて樹立）、センダイウイルスベクター（SeV ベクター）を用いて樹立された 3 株（SeV-BJ、SeV2、SeV9）の合計 6 株である。分子機構解析の 1 つとして今年度も I 型インターフェロン（IFN α 1、IFN α 2、IFN β 1）の発現を RT-PCR により解析した。

（倫理面への配慮）

ヒト ES 細胞の使用にあたっては、文部科学省に届け出を行っている。

C. 研究結果

ヒト ES 細胞では 3 株中 2 株において、ヒト iPS 細胞では 6 株中 4 株全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。ヒト i P S 細胞での I 型インターフェロンの発現は、供与先やウイルスベクターの種類と無関係であった。未分化な状態ではヒト E S 細胞でもヒト i P S 細胞でも発現はなかった。

D. 考察

ヒト E S 細胞においてもヒト i P S 細胞においても、分化誘導と共に I 型インターフェロンの発現が高頻度に検出される傾向が認められた。その上流には dsDNA による IRF の経路の活性化などが推定され、分化細胞での現象としては興味深い。しかし、血球貪食との関係は認められなかった。

E. 結論

ヒト E S 細胞とヒト i P S 細胞からの血液細胞の分化誘導の過程において、I 型インターフェロンの発現が高頻度に検出される傾向が認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Gokoh M, Nakamura N, Matsuyama S, Nishio M, Akutsu H, Umezawa A, Yasuda K, Yuo A, Saeki K: Early senescence is not an inevitable fate of human induced pluripotent stem-derived cells. Cellular Reprogramming 13:361-370, 2011..

2. 学会発表

1. Nakamura N, Saeki K, Matsuyama S, Nishio M, Akutsu H, Umezawa A, Saeki K, Hasegawa M, Yuo A: A feeder-free and serum-free production of multi-functional mature hepatocytes with electron microscopically valid morphologies: towards an establishment of the global standard for human ES/iPS-based drug discovery tools. 9th annual meeting of International Society for Stem Cell Research, June 2011, Toronto, Ontario, Canada.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称：多能性幹細胞由来褐色脂肪細胞とその製造方法並びに細胞療法的使用
発明者：佐伯久美子、湯尾 明、西尾美和子、川崎正子、佐伯晃一、長谷川護
出願人：独立行政法人国立国際医療研究センター総長、ディナベック株式会社
特願 2011-100218
平成 23 年 4 月 27 日

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原因遺伝子解明研究

研究分担者 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 助教

研究要旨：家族性血球貪食症候群 (Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis; FHL)は、その多くが常染色体劣性遺伝で発症する致死性疾患群である。これまでperforin, MUNC13-4, syntaxin11, MUNC18-2の遺伝子異常が報告されているが、約20%の症例では未だその原因遺伝子が同定されていない。本研究では、日本のFHLを対象に原因遺伝子を同定し、FHLの病態解明や分子標的治療を確立することを目的とする。これまでの研究成果として、日本のFHL14家系の検体収集を行った。8家系を対象とした全ゲノム連鎖解析ではLOD値が陽転化する領域を複数箇所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。近親婚歴を有する2家系のうちの1家系(FHL-102)を対象と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、3つの新規候補遺伝子座を同定した。この候補領域に含まれるエクソン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、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、近親婚歴を有するもう1家系(FHL-FKOK)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。今後、候補領域のエクソン部分をキャプチャー後、次世代シーケンサーで変異検索を行う予定であり、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。

A. 研究目的

家族性血球貪食症候群 (Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis; 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), *STXBP2* (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。本研究では、日本のFHLを対象に、ポジショ

ナルクローニング法・ホモ接合体マッピング法を適用し、表現型に大きく影響する原因遺伝子を同定することを目的とする。原因遺伝子の同定はFHLの病態解明や分子標的治療を確立するために必須の研究である。

B. 研究方法

1. 検体の収集

HLHのうち、1) 乳幼児期に発症、2) 遺伝様式は劣性遺伝、3) 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 は匿名化して取り扱う。

2. FHL家系を対象とする全ゲノム連鎖解析
 - (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い、全ゲノム連鎖解析を行う。
 - (b) 連鎖妥当性の検証 ; 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。
 - (c) 候補遺伝子の同定 ; 有意に連鎖を認めた場合、候補領域の変異スクリーニングを行い、候補遺伝子を同定する。
3. 血族家系を対象とするホモ接合体マッピング
 - (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

10. 日本人FHLの収集

これまでに日本人FHL14家系40名(患者14名、家系内健常人26名)の検体採取を

行った。

11. 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。
12. 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。今後、候補領域のエクソン部分をキャプチャー後、次世代シーケンサーで変異検索を行う予定である。

D. 考察

日本のFHL14家系の検体収集をすることができた。8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。

E. 結論

日本のFHL14家系の検体収集をすることができた。8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。さらなる家系の収集が必要であった。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。

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).

2. 学会発表

北村明子、安友康二；反復性発熱・結節性紅斑・脂肪萎縮を特徴とする新規自己炎症性症候群の原因遺伝子同定；第114回日本小児科学会総会；2011年8月14日

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

[III] 研究の刊行に関する一覧表