

201128264A

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23年度 総括研究報告書

研究代表者 石井 榮一

平成24(2012)年5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に関する研究 ----- 1
石井榮一

II. 分担研究報告

1. 先天性顆粒放出異常症のリンパ球機能解析に関する研究 ----- 5
安川正貴
2. 症例の集積、検体採取と保存、解析 ----- 8
藤本純一郎
(資料) HLH2004 における検体の流れ図
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 ----- 11
山本健
4. 血球貧食症候群例の NK 細胞脱顆粒機能評価 ----- 12
八角高裕
5. HPS のコントロールに難渋後、臍帯血移植を施行した FHL2 乳児例 -- 15
小林正夫

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 19

I. 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

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 (FHL)、Chediak-Higashi 症候群、Griscelli 症候群、Hermansky-Pudlak 症候群、X-linked lymphoproliferative disease (XLP) が含まれる。まず Chediak-Higashi 症候群、Griscelli 症候群、Hermansky-Pudlak 症候群の実態を明らかにし、Chediak-Higashi 症候群14例を集積した。HLH の合併は少なく、その発症に CTL 活性が相関することが明らかになった。LYST 遺伝子異常は約 1/3 に認められた。また長期生存例は中枢神経合併症合併することにより、現在その病態解明を行っている。FHL はその約90%の症例が4種類の遺伝子異常の1つを有しており、のこり10%の遺伝子異常は不明であった。また現在新たな遺伝子異常を抽出しており、その機能解析を進めている。XLP は XLP1, XLP2 共に症例の集積と診断法の確立が進んでいるが、CTL 活性は正常でありそのHLH合併に関する病態は不明である。したがって今後の課題は、Chediak-Higashi 症候群の約 2/3 の症例、および FHL の約10% の遺伝子異常を同定するとともに、各疾患の診断法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。先天性顆粒放出異常症は従来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。

代表者

石井榮一

愛媛大学大学院医学系研究科教授

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

センター長

山本健

九州大学生体防御医学研究所

准教授

八角高裕

京都大学大学院医学研究科講師

小林正夫

広島大学医歯薬総合研究科教授

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 (FHL)、Chediak-Higashi 症候群、Griscelli 症候群、X-linked lymphoproliferative disease (XLP) 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および治療法を開発を行うことである。

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 各疾患の登録システムを構築する
- 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、診断法の標準化を開発する。

③ 診断基準を用いた標準的治療法を開発する。

(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、個人情報情報を匿名化して取り扱う。

C. 研究結果

1) 先天性顆粒放出異常症のうち Chediak-Higashi 症候群、Griscelli 症候群 type 2、Hermansky-Pudlak 症候群 type 2 の全国調査を行った。その結果、日本では Chediak-Higashi 症候群 14 例の存在が確認された。ま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登録システムを構築した。

2) Chediak-Higashi 症候群の解析では、従来の報告のように HLH をきたす症例は少なく、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かった。さらにリンパ球機能解析では CTL が低下し顆粒放出機能が欠損している症例があり、CTL 活性低下例は HLH 合併しやすいことが判明した。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。

3) 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、HLH 全体では月 1, 2 程度の登録がある。また FHL の治療成績を集積した結果、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、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、③移植による予後は 60% 以上であった、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、日本における FHL の各亜型の頻度を解析した結果、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。未知の遺伝子異常例は全ゲノムシーケンス解析でその同定に全力をあげているが、今回 1 家系に MTX 代謝関連遺伝子の異常が同定された。現在その機能解析により責任遺伝子かどうかの有無を検討中である。

4) X-linked lymphoproliferative disease (XLP) は XIAP 異常による XLP 2 が集積された。また日本では XLP1 が多いことを証明した。XLP は HLH 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 XLP のリンパ球機能解析を行った結果、XLP1, XLP2 共に顆粒放出および CTL 活性は正常であることが明らかになった。XLP 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。

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。

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
- 2) その多くは遺伝子異常が同定されているが、

Chediak-Higashi 症候群の約 2/3 の症例、および FHL の約 10% の遺伝子異常は不明であり、早急に同定解析を進める必要がある。

- 3) FHL では国際治療研究が進められているが、標準的治療法は確立されていない。しかし骨髄非破壊的前処置を用いた臍帯血移植が適正な移植方法かどうかの検証が必要である。
- 4) また Chediak-Higashi 症候群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あ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. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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 pstein-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)
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, Vienna, Austria,

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. 分担研究報告書

先天性顆粒放出異常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の一つである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

顆粒放出異常症の一つである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 (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。

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

得られた研究成果は以下のとおりである。

- 5) 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。

- 6) 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。
- 7) 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。
- 8) 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。
- 9) 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

- 6) 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。

- 7) 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。
- 8) 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

2. 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

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

本研究の目的は、先天性顆粒球放出異常症に係る患者由来検体の保存と供給体制の整備である。先天性顆粒球放出異常症には遺伝性の発症様式を示すものがあるためヒトゲノム・遺伝子解析研究の対象となる場合があること、DNAやRNA以外に、細胞マーカー解析や蛋白質解析ならびに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細胞保存の必要があるなど、特殊な事情を考慮したうえで検体の保存と供給体制を整備する必要がある。先天性顆粒球放出異常症のうち、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、また、国立成育医療研究センターは JPLSG における検体保存・供給センターの役割を担っている。そこで、血球貪食症をモデルとして、ヒトゲノム・遺伝子解析研究を対象とする研究用検体の保存ならびに配分の体制を整備することとした。まず、JPLSG が行う血球貪食症候群に対する臨床試験である HLH2004 の中で行われている中央診断と検体の流れを整理したうえで、中央保存する検体の種類を決定し、JPLSG の検体保存と供給に係る研究計画に HLH2004 の中で発生したヒトゲノム・遺伝子解析研究の対象となる余剰検体の保存と分配について追加を行い、国立成育医療研究センターの倫理委員会での審査の末、承認を得ることができた。すなわち、血球貪食症候群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) 血球貪食症候群臨床試験 HLH2004 に係る検体の流れ

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)に係る中央診断と検体の流れを明確にした。その中で、中央保存する検体を決定した。

2) 国立成育医療研究センターにおける HLH2004 関連余剰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、上記の研究方法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ヒトゲノム・遺伝子解析研究として保存・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疾患責任遺伝子関連蛋白発現、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、上記の②または③に送付された検体の一部が、「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、富山大学を經由してかずさ DNA 研究所に検体を送付され遺伝子検査が行われる。すなわち、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、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。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が判明したが、遺伝子変異情報は研究グループに返却されるため、連結可能な形で余剰検体とリンクしていることになる。

臨床試験 HLH2004 の中で行う、キラー活性測定は、患者末梢血由来リンパ球をサイトカインとの共培養で樹立したサイトカイン依存性細胞株であり、超低温凍結および融解後の維持が可能な状態で保存されている。しかしながら、このような検体の保存・管理はいまだ国立成育医療研究センターでは対応できない。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行うことにした。

2) 国立成育医療研究センターにおける HLH2004 関連余剰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。むしろ、腫瘍を診断した後の余剰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明記している。そこで、方針として、すでに承認されている研究計画に HLH2004 試験に係る余剰検体の保存と分配を追記し、また、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に相当する部分については、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、将来のヒトゲノム・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と考えた。

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に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、① JPLSG 会員になり行う研究、② JPLSG 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。

なお、HLH2004 で収集保存されている検体のうち、凍結融解を繰り返すことが可能なキラー細胞株については、中央保存の対象外とした。現在、国立成育医療研究センターで保存を行っている検体は、① リンパ腫や固形腫瘍などの未固定凍結組織片、② パラフィン包埋切片、③ 細胞マーカー診断後の新鮮凍結細胞、④ 腫瘍細胞由来 DNA および RNA (cDNA を含む) である。未固定の細胞については上記の③で対応しているが、融解後に培養維持できることを担保しているわけではなく、あくまでも細胞マーカー解析を含む蛋白発現解析、RNA あるいは DNA 分取を目標としている。今回明らかになったような、融解後の培養可能性も担保した検体の保存については、その管理体制も含めて新たなチャレンジとして重要な課題であると考ええる。

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。JPLSG が行う検体保存と分配に係る活動の中で、ヒトゲノム・遺伝子解析研究への活用を可能にした計画が初めて承認された点で大変重要な進歩であると考ええる。

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

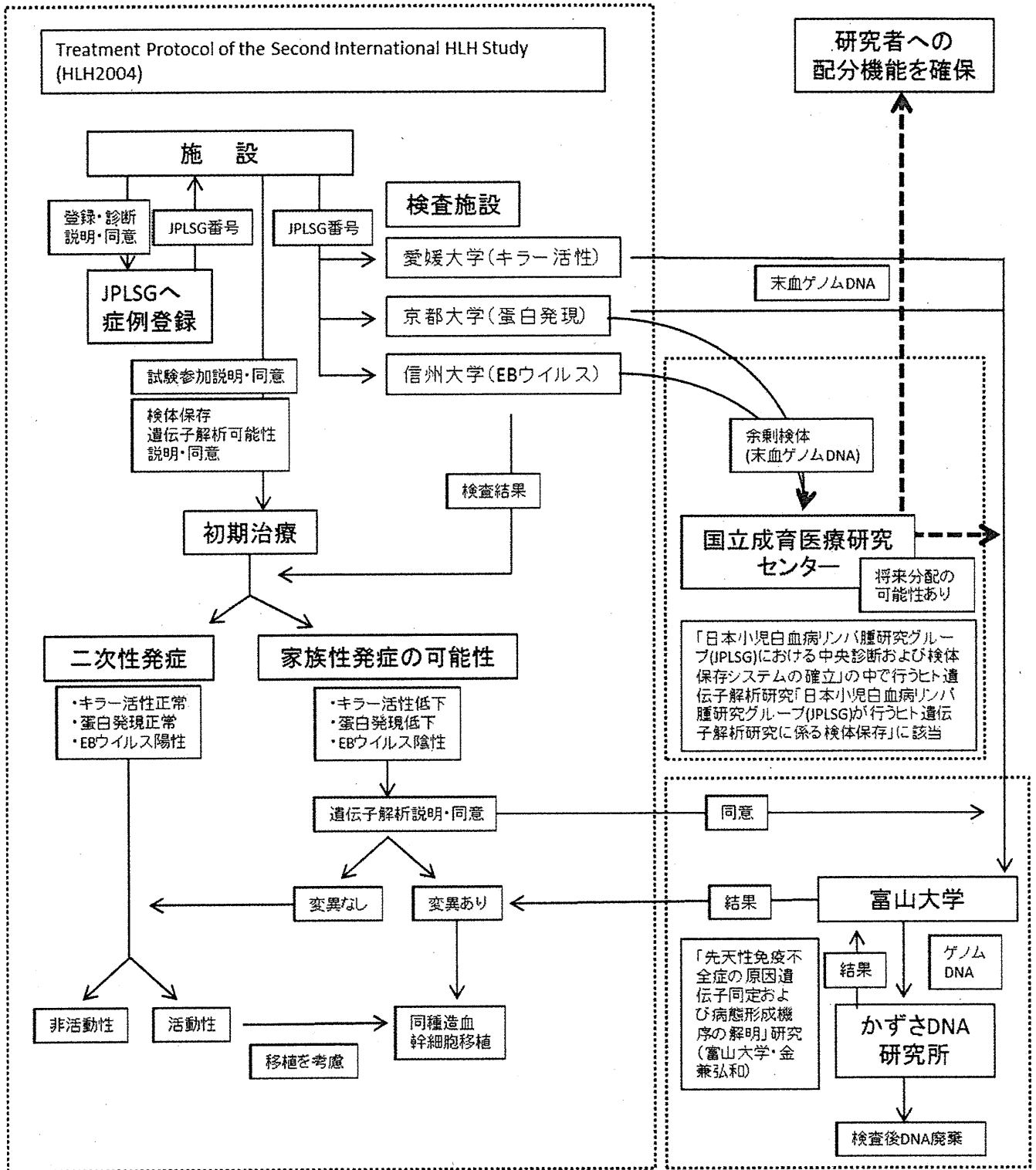


図1. HLH2004における検体の流れと保存体制の整備

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

研究分担者 山本 健 九州大学生体防御医学研究所准教授

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、遺伝子機能から採択した候補遺伝子、SYTL2およびSLAMF7、について、これまでFHL2-5座では変異を認めていないFHL(2症例)を対象に遺伝子変異スクリーニングを行った。その結果、上記2遺伝子には変異を認めず、日本人FHLの原因遺伝子では無いことが明らかとなった。

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あるいは機能的解析によって得られた候補遺伝子の塩基配列を解析し、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2症例を解析対象とした。近年、顆粒球放出に関わる遺伝子の変異がFHLの原因として複数同定されている。本年度は、RAB27A依存性の顆粒球細胞内輸送に重要な役割を演じているSYTL2、およびNK細胞活性を制御するSLAMF7の遺伝子変異をスクリーニングした。

SYTL2(18エクソン)、SLAMF7(7エクソン)をPCRにて増幅し直接塩基配列決定法にて配列情報を取得した。ヒトゲノムデータベースを参照配列とし、CrystalWおよび目視によって変異の有無を確認した。

(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

2症例とも SYTL2 および SLAMF7 に変異を認めなかった。

D. 考察

遺伝子機能から抽出した候補遺伝子解析には制約があるため、全ゲノムのエクソーム解析が必要である。エクソーム解析においては、Private 変異が多数同定されることが予想され、変異遺伝子の機能解析が不可欠である。

E. 結論

SYTL2 および SLAMF7 は日本人 FHL の原因遺伝子では無い。

F. 研究発表

論文発表

1. Wen W, Yamamoto K, et al. Meta-analysis identifies common variants associated with body mass index in east Asians. Nat Genet 2012;44:307-311
2. Cho YS, Yamamoto K, et al. East Asian Genome-Wide Association Meta-Analysis Identifies 8 New Loci for Type 2 Diabetes. Nat Genet 2011;44:67-72.
3. Kato N, Yamamoto K, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies common variants associated with blood pressure variation in east Asians. Nat Genet. 2011 ;43:531-538.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

特記事項なし

血球貪食症候群症例の NK 細胞脱顆粒機能評価

八角 高裕 京都大学大学院医学研究科発生発達医学講座発達小児科学
堀 雅之 京都大学大学院医学研究科発生発達医学講座発達小児科学
平家 俊男 京都大学大学院医学研究科発生発達医学講座発達小児科学

研究要旨

血球貪食性リンパ組織球症 (HLH) は、感染や膠原病などに続発する二次性のものと、遺伝的素因による原発性のものとに大別され、家族性血球貪食症候群 (FHL) は単一遺伝子異常を原因とする原発性 HLH の代表疾患である。この内 FHL3・FHL4・FHL5 の原因である Munc13-4・Syntaxin 11・STXBP2/Munc18-2 は、何れも細胞障害性顆粒の放出機構に関与する分子である為、NK 細胞の脱顆粒機能検査が FHL スクリーニングの一つとして行われているが、その有効性や限界に関する評価は定まっていない。本研究では、FHL2:3 例、FHL3:1 例、X 連鎖性リンパ増殖症 2 型(XLP2):3 症例を含む HLH 症例 40 例について NK 細胞の脱顆粒機能を解析し、FHL2 と XLP2 ではすべて正常であり、FHL3 の 1 例では完全欠損している事を確認したが、二次性 HLH と診断された症例の 10~20%に軽度から中等度の脱顆粒障害が認められた。この内経時的に評価可能であった 4 症例の検討では、2 症例では状態の安定化とともに正常に回復し、残りの 2 症例では軽度低下状態が続いた。二次性 HLH と思われる症例に於ける NK 脱顆粒機能の原因究明が今後の課題として浮かび上がると同時に、FHL スクリーニング検査としての NK 細胞脱顆粒検査は特異性が低い事が判明した。

A、研究目的

血球貪食性リンパ組織球症 (HLH) は、発熱、汎血球減少、多臓器不全を主症状とし、組織球による血球貪食像を特徴とする重症疾患群であり、感染や膠原病などに続発する二次性のものと、遺伝的素因による原発性のものとに大別される。家族性血球貪食症候群 (FHL) は単一遺伝子異常を原因とする原発性 HLH の代表疾患であり、現在までに 4 つの原因分子が同定されている。FHL2 の原因である Perforin は CTL や NK

細胞中の細胞障害性顆粒に含まれており、標的細胞の細胞膜に孔を形成して細胞死を誘導する。FHL3・FHL4・FHL5 の原因分子である Munc13-4・Syntaxin 11・STXBP2/Munc18-2 は、何れも細胞障害性顆粒の放出機構に関与する分子であり、これらの分子異常により CTL/NK 活性が低下する事が病態の中心と考えられている。特に細胞障害性顆粒の放出障害は FHL3~5 の特徴と考えられており、NK 細胞の脱顆粒機能検査が FHL スクリーニングの一つとして利用されているが、その有効性や限界に関する

る評価は定まっていない。本研究では、FHLを疑われた HLH 症例について NK 細胞の脱顆粒機能を解析し、各病型に於ける NK 細胞脱顆粒機能の傾向を検討した。

B、研究方法

全国より寄せられた HLH40 症例とそのトラベルコントロール検体より末梢血単核球(PBMC)を分離し、K562 細胞と 2 時間共培養した。NK 細胞の脱顆粒機能は、CD3 陰性 CD56 陽性細胞中に占める CD107a 陽性細胞の割合をフローサイトメトリー法にて解析した。これと並行して、NK 細胞内 Perforin 蛋白発現をフローサイトメトリー法にて、Munc13-4/STX11/Munc18-2 蛋白発現は血小板を用いたウェスタンブロット法にて評価し、診断の確定には責任遺伝子の解析を行った。

(倫理面への配慮)

当研究は遺伝子解析を含む為、当大学倫理委員会の指針に基づき、承認を得て informed consent を取得して行った。

C、研究結果

40 症例を解析し、遺伝性の HLH として FHL2:3 例、FHL3:1 例が確定診断された。又、その後の報告により、X 連鎖性リンパ増殖症 2 型(XLP2):3 症例が含まれている事が確認され、残りの 33 症例は二次性 HLH と考えられた。HLH に占める FHL の割合は従来の報告と変わらなかったが、XLP2 の割合が多い可能性が示唆された。

それぞれの症例の NK 細胞脱顆粒機能を評価してみると、FHL2 と XLP2 の各 3 症例ではすべて正常であり、FHL3 の 1 例では完全欠損していた。興味深い事に、二次性 HLH

と診断された症例の中に軽度から中等度の脱顆粒障害を呈する症例が 10~20%程度存在している事が判明し、経時的に評価可能であった 4 症例の内、状態の安定化とともに 2 症例は正常に回復し、残りの 2 症例は軽度低下状態が続いた。

D、考察

二次性 HLH 症例の多くが免疫抑制療法にて治療可能なのに対し、FHL の治療には造血幹細胞移植が必要である為、治療方針決定の為に正確で迅速な診断法の確立が望まれている。FHL3~5 の責任分子は細胞障害性顆粒の放出に関わる分子であり、NK 細胞の脱顆粒機能評価がこれらの疾患のスクリーニングに有効であることが報告されている。今回、本邦に於ける HLH 症例の NK 細胞脱顆粒機能を評価し、その有効性を評価したところ、二次性 HLH 症例に於いても軽度から中等度の低下を示す症例が存在する事が判明した。経時的に評価可能であった症例では、状態の安定と共に脱顆粒機能が回復する症例と軽度の低下状態に留まる症例が存在する事が明らかとなった。

二次性 HLH と思われる症例の中に NK 細胞脱顆粒機能の低下を示す症例が存在する事は興味深い。検査上の問題として、HLH 急性期に於いては NK 細胞数が減少して正確な評価が不可能な症例が存在する事や、症例毎に検査時点での疾患活動性及び治療状況が異なる事が挙げられる。NK 細胞脱顆粒の低下が HLH 発症の原因なのか、HLH の病態により引き起こされた二次的な現象なのか、状態が安定化すれば最終的には回復するのか否かなど、個々の症例について長期間にわたる詳細な観察が必要であると

思われる。又、長期間にわたり脱顆粒機能の低下を示す症例の中には未知の原発性 HLH が隠れている可能性もあり、今後の検討課題と思われた。

E、結論

HLH に於ける NK 細胞の脱顆粒機能は、二次性 HLH と思われる症例に於いても一定の割合で低下している事が判明し、その原因究明が今後の課題として浮かび上がってきた。NK 細胞脱顆粒検査は、FHL のスクリーニング検査としては特異性が低い事が判明した。

F、研究危険情報

特になし。

G、研究発表

論文発表

Ohta H, Miyashita E, Hirata I, Matsumura R, Yoshida H, Hashii Y, Higashiura T, Yasumi T, Murata Y, Heike T, Yang X, Kanegane H, Ohara O, Ozono K. Hematopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning from a family haploidentical donor in an infant with familial hemophagocytic lymphohistocytosis. Int J Hematol. 94:285-90. 2011

Tanaka N, Izawa K, Saito MK, Sakuma M, Oshima K, Ohara O, Nishikomori R, Morimoto T, Kambe N, Goldbach-Mansky R, Aksentijevich I, de Saint Basile G, Neven B,

van Gijn M, Frenkel J, Aróstegui JI, Yagüe J, Merino R, Ibañez M, Pontillo A, Takada H, Imagawa T, Kawai T, Yasumi T, Nakahata T, Heike T. High incidence of NLRP3 somatic mosaicism in patients with chronic infantile neurologic, cutaneous, articular syndrome: results of an International Multicenter Collaborative Study.

Arthritis Rheum. 63:3625-32. 2011

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. Rapid diagnosis of FHL3 by flow cytometric detection of intraplatelet Munc13-4 protein. Blood. 118:1225-30. 2011

Tahara M, Sakai H, Nishikomori R, Yasumi T, Heike T, Nagata I, Inui A, Fujisawa T, Shigematsu Y, Nishijima K, Kuwakado K, Watabe S, Kameyama J. Patient with neonatal-onset chronic hepatitis presenting with mevalonate kinase deficiency with a novel MVK gene mutation. Mod Rheumatol. 21:641-5. 2011

H、知的財産権の出願・登録状況

特になし。

HPS のコントロールに難渋後、臍帯血移植を施行した FHL2 乳児例

浅野孝基（広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学）

世羅康彦（広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学）

中村和洋（広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学）

小林 正夫（広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学）

研究要旨

Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) は遺伝性の組織球の増殖と血球貪食像を病理学的特徴とし、血球貪食症候群は致死的であるため、早期の造血幹細胞移植が必要となる。乳児期に移植を必要とする症例も多く、移植関連合併症、晩期障害を最小限とした前処置が必要である。本研究では HPS2 の 2 か月児に放射線照射のない骨髄非破壊的前処置で臍帯血移植を施行した。現在、ドナータイプ 70%の混合キメラである。過去の当科での 2 症例（いずれも乳児期）も同様に放射線照射なしの造血幹細胞移植を施行し、発育、発達に問題なく小学生を迎えている。今後、晩期障害を最小限とした造血幹細胞移植が必要と思われる。

A. 研究目的

Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) は遺伝性の発熱・汎血球減少・肝脾腫・播種性血管内凝固症候群

(DIC)を主要徴候とした組織球の増殖と血球貪食像を病理学的特徴とする症候群である。FHL2, 3, 4, 5 が責任遺伝子が同定されている。本疾患群の特徴はリンパ球の細胞障害活性の低下に基づき、抗原刺激の持続から過剰な免疫反応を締めす。そのため集中管理と早期の根治療法が必要とされる。根治療法は造血幹細胞移植であるが、発症、診断からいかに早期に移植を行うか、そして将来的に晩期障害の少ない移植療法が求められる。本研究では、perforin 欠損 FHL2 症例において移植前のコントロールに難渋し、臍帯血移植を施行した例を呈示し、今

後の問題点を提起する。

B. 研究方法

症例と診断：症例は 2 か月女児。発熱の持続と血球減少、骨髄での血球貪食像を認め、当科紹介となる。FHL の診断は図 1 に示すように CD56 陽性細胞の perforin 欠損で確定した（京都大学小児科八角先生施行）。

C. 研究結果

症例の治療経過：入院当初から全身状態は不良、DIC も合併しており、HLH2004 の治療スケジュールを中心に治療を開始した。しかし、全身状態の改善はみられず、フェリチンの低下も緩徐であり、著明な高血圧を認めたことから治療を変更せざるを得な

かった(図2)。寛解導入は困難であると判断し、臍帯血移植を施行した。前処置は Fludarabine, Melphalan, ATG を図3のように投与し、HLA5/6 (HLA-DR 一座不一致) 臍帯血を輸注した。移植後 VHD 予防は FK506 と MTX を使用した。血球貪食症候群の症状も前処置にて軽快、フェリチンも順調に低下した。軽度の GVHD を認めたが、血球回復は順調で移植関連合併症もほとんどなく経過した。高血圧も移植後1か月で治癒した(図4)。移植後のキメリズムは1か月後95%、3か月後77%、5か月70%と低下傾向にあるが、免疫抑制剤を中止し、混合キメラではあるが良好の経過と考えられる。

D. 考察

当科ではこれまでに本症を含め FHL 症例3例で乳児期に移植を行った。乳児期であることを考え、すべての症例において前処置に放射線照射を使用していない。症例1, 2ともに小学校に入学しているが、発育、発達ともに順調に経過している。本症も現在まで遅れのあった発達、発育ともに回復を示しているため、今後の慎重な経過が必要とされる。乳児期にいかに長期予後に影響せず、生着を含めた移植関連合併症の少ない移植療法が今後の課題と思われる。われれが選択している Fludarabine, melphalan, ATG を中心とした前処置の有用性を今後多数例で検討していく必要がある。

E. 結論

放射線照射のない前処置による臍帯血移植を施行した FHL2 症例を報告し、晩期障害の少ない乳児期移植療法について考察した。

F. 研究危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 学会発表

Mizoguchi Y, Nakamura K, Karakawa S, Okada S, Kawaguchi H, Kobayashi M: Clinical and genetic characteristics of patients with severe congenital neutropenia in Japan. 53rd American Society of Hematology Annual Meeting, December 10-13, 2011

Hiramoto T, Ebihara Y, Mizoguchi Y, Nakamura K, Mochizuki S, Yamamoto S, Matsuzaka E, Hanada S, Ohnishi R, Tani K, Eto K, Nakauchi H, Kobayashi M, Tsuji K: Suppressed Neutrophil Development in Hematopoiesis of Induced Pluripotent Stem Cells Derived From a Severe Congenital Neutropenia Patient with ELA2 Mutation. 53rd American Society of Hematology Annual Meeting, San Diego, CA, December 10-13, 2011.

Hanada I, Terui K, Toki T, Kudo K, Sato T, Kamio T, Sasaki S, Takahashi Y, Hayashi Y, Sugita K, Kojima S, Koike K, Kosaka Y, Kobayashi M, Ito E: JAK2 mutations and CRLF2 rearrangements in Down Syndrome-Associated Acute Lymphoblastic Leukemia in Japan. 53rd American Society of Hematology Annual Meeting, San Diego, CA, December 10-13, 2011.

岡田 賢, 小林正夫, Luyan Liu, Xiao-Fei Kong,