

201231087B

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～平成24年度 総合研究報告書

研究代表者 石井 榮一

平成25(2013)年5月

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
総合研究報告書

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小児医学教授

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 type 2、Hermansky-Pudlak 症候群 type 2、X-linked lymphoproliferative disease (XLP) などが含まれる。Chediak-Higashi 症候群、Griscelli 症候群 type 2、Hermansky-Pudlak 症候群 type 2は、今回初めてその実態を明らかにすることができた。Chediak-Higashi 症候群は血球貪食症候群 (HLH) の合併頻度は30%と低く、むしろ長期生存例における神経合併症が問題であった。またCTL活性低下とHLHの合併は相関する傾向にあった。現在iPSを用いた新たな治療法の開発を進めている。Griscelli 症候群 type 2、Hermansky-Pudlak 症候群 type 2は報告例がなかったが、特有の症状を有する家系が散見され遺伝子検査を含めた解明が必要と考えられた。FHLはJPLSG 研究による症例集積と原因遺伝子の解析、リンパ球機能解析は順調に進んでおり、その研究は世界をリードしている。日本ではその約90%の症例が4種類の遺伝子異常を有しているが、残り約10%の未知の遺伝子については次世代シーケンサーを用いた同定を進めている。また骨髄非破壊的前処置を用いた非血縁臍帯血移植の有用性が証明された。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HLH合併に関する病態は不明である。最終的には先天性顆粒放出異常症の診断・治療アルゴリズムを作成することができた。以上、これまで実態が不明であった先天性顆粒放出異常症の詳細は本研究班で明らかになったが、今後は残された遺伝子異常を同定するとともにiPSを用い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必要がある。また従来の概念と異なった経過をたどりさらには長期生存している例もあることから、将来的には成人を含めた幅広い研究体制の構築が必要と考えられた。

研究体制

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

金兼弘和

富山大学附属病院
講師

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 type 2、Hermansky-Pudlak 症候群 type 2、X-linked lymphoproliferative disease (FHL) などが含まれる。いずれもリンパ球の分泌顆粒の放出に関わる遺伝子異常が同定されつつあるが、日本における実態とその診断法は確立されていない。

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

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

B. 研究方法

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

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

進める。

(倫理面への配慮)

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

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

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

C. 研究結果

研究成果は以下である

- 1) 先天性顆粒放出異常症のうち Chediak-Higashi 症候群、Griscelli 症候群 type 2、Hermansky-Pudlak 症候群 type 2 の全国調査を行った。全国の小児血液疾患の治療を行っている JPLSG 参加 287 施設にアンケート調査を行い、220 施設から回答を得た。その結果、Chediak-Higashi 症候群 15 例、Griscelli 症候群 type 2 0 例、Hermansky-Pudlak 症候群 type 2 0 例の存在が確認された。新たな症例については日本小児血液学会疾患登録事業により把握可能なシステムを構築した。
- 2) Chediak-Higashi 症候群 15 例について臨床解析を行ったところ、従来報告のように

血球貪食症候群 (HLH) をきたす症例は 30%と少なく、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いことが明らかになった。LYST 遺伝子異常は 2/3 の症例で同定されたが、残り 1/3 は正常であり未知の遺伝子異常の可能性が示唆された。さらに患者末梢血から樹立した T 細胞を用いてリンパ球機能を解析したところ、HLH 合併例では CTL が低下しさらに顆粒放出機能が欠損していた。Chediak-Higashi 症候群は造血幹細胞移植により長期生存が可能であるが、神経合併症の進行は阻止できない。そのため現在患者から iPS 細胞を樹立し、中枢神経合併症の成因の解析を進めているところである。

- 3) Griscelli 症候群 type 2、Hermansky-Pudlak 症候群 type 2 は世界で多く報告されている疾患であるが、日本では 1 例も報告されていない。しかし易感染性、色素脱失など特有の症状を有する家系が散見されており、現在の遺伝子解析を含めた解明を進めている。
- 4) FHL は症例登録も確立され、月 1, 2 例程度の登録がある。本登録システムは世界をリードするものであり、日本における全ての HLH は蛋白発現解析スクリーニングで FHL 疑い例を抽出し、遺伝子解析で診断するという手法を実行している。その結果、日本における FHL の各亜型の頻度は FHL2, FHL3 が 80%を占めることがわかったが、顆粒放出解析ならびに CTL 活性の結果からは約 10%の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。現在次世代シーケンサーを用いた遺伝子同定をすすめている。なお 1 家系で新しく葉酸代謝に関係する遺伝子異常を同定しており、現在その機能解析を進めているところである。
- 5) FHL は現在国際治療研究が行われているが、その治療成績で大きな改善は得られなかった。しかし本年集積したデータを解析した結果、①日本では FHL に対してその 80%の症例で非血縁臍帯血移植が行われていること、②骨髄非破壊的前処置の使用

により安全に移植が行われていること、③移植による予後は 60%以上であったこと、などが明らかとなった。以上より FHL では骨髄非破壊的前処置を用いた非血縁臍帯血移植が適正な治療法と考えられた。

- 6) X-linked lymphoproliferative disease (XLP) は XLP1, XLP2 が集積された。XLP のリンパ球機能解析を行った結果、XLP は顆粒放出および CTL 活性は正常であることが明らかになった。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。
- 7) 以上より日本における顆粒放出異常症の実態が明らかになり、その診断および治療アルゴリズムを作成することができた。図に示す。

D. 考察

先天性顆粒放出異常症の日本における実態を初めて明らかにした。その結果、

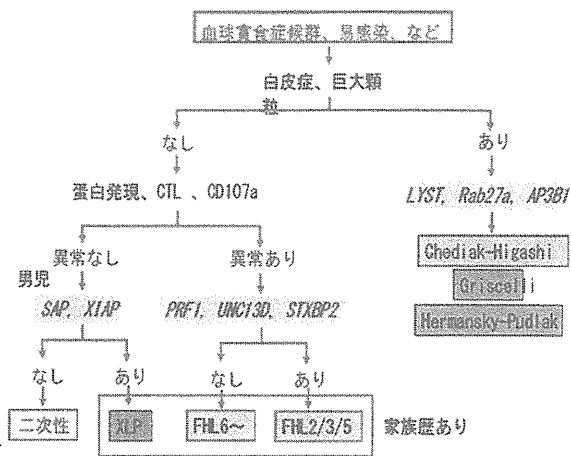
- 1) 顆粒放出異常症は日本では FHL と Chediak-Higashi 症候群が存在する。Griscelli 症候群 type 2、Hermansky-Pudlak 症候群 type 2 は報告例がないが、類似家系が存在しており、さらなる集積が必要である。
- 2) 顆粒放出異常症の多くは遺伝子異常が同定され、そのリンパ球機能も解析されつつあるが、合併症を含めた病態が不明な疾患も多い。現在 iPS を用いた病態解析を進めている。
- 3) FHL では国際治療研究が進められているが、日本での検討では骨髄非破壊的前処置を用いた非血縁者臍帯血移植が適正な治療法と考えられる。Chediak-Higashi 症候群も造血細胞移植が有用であるが、神経合併症予防のための新たな治療法の確立が望まれる。
- 4) 顆粒放出異常症は長期生存例があることから成人にも多くの未診断例がいる可能性があり実態調査の範囲を広げていく必要がある
- 5) 先天性顆粒放出異常症の標準的診断およ

び治療法を確立した。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。また各亜型の診断および治療アルゴリズムを確立した。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、副作用の少ない新たな治療法を確立する必要がある。

先天性顆粒放出異常症の診断アルゴリズム



F. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Kanegane H, Ishii E, Miyawaki T, et al. (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* 23: 488-493
- 2 Nishi M, Yasumi T, Ishii E, Ohga S, et al. (2012) Reduced intensity conditioning in unrelated donor cord blood transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Am J Hematol* 87: 637-639
- 3 Yang X, Kanegane H, Ishii E, Miyawaki T, et al. (2012) Clinical and genetic characteristics of XIAP deficiency in Japan. *J Clin Immunol* 32: 411-420
- 4 Asano T, Ishii E, et al. (2011) Hemophagocytic lymphohistiocytosis after hematopoietic stem

cell transplantation in children: a nationwide survey in Japan. *Ped Blood Cancer* 59: 110-114

- 5 Yanagimachi M, Ishii E, Yokota S, et al. (2011) Association of *IRF5* polymorphisms with susceptibility to hemophagocytic lymphohistiocytosis in children. *J Clin Immunol* 31: 946-951
- 6 Murata Y, Yasumi T, Ishii E, Heike T, et al. (2011) Rapid diagnosis of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3 (FHL3) by flow cytometric detection of intraplatelet Munc13-4 protein. *Blood* 118: 1225-1230
- 7 Matsuda K, Nakazawa Y, Ishii E, Koike K, et al. (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
- 8 Nagai K, Yamamoto 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
- 9 Honma N, Yamamoto K, et al. (2013) Estrogen receptor-beta gene polymorphism and colorectal cancer risk: effect modified by body mass index and isoflavone intake. *Int J Cancer* 132: 951-958.
- 10 Kitajima H, Sonoda M, Yamamoto K (2012) HLA and SNP haplotype mapping in the Japanese population. *Genes Immun* 13: 543-548.
- 11 Yanagimachi MD, Yasumi T, Saito MK, et al. Robust and highly-efficient differentiation of functional monocytic cells from human pluripotent stem cells under serum- and feeder cell- free conditions. *PLoS One* (In press)
- 12 Tsumura M, Yasumi T, Kobayashi M, et al. (2012) Dominant-negative STAT1 SH2 domain mutations in unrelated patients with Mendelian susceptibility to mycobacterial disease. *Hum Mutat* 33:1377-87
- 13 Kawai T, Yasumi T, Kobayashi M, Heike T, et al. (2012) Frequent somatic mosaicism

- of NEMO in T cells of patients with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. *Blood* 119:5458-66
- 14 Kawai T, Yasumi T, Heike T, et al. (2012) Multiple reversions of an IL2RG mutation restore T cell function in an X-linked severely combined immunodeficiency patient. *J Clin Immunol* 32:690-7
 - 15 Izawa K, Yasumi T, Ohara O, et al. (2012) Detection of base substitution-type somatic mosaicism of the NLRP3 gene with >99.9% statistical confidence by massively parallel sequencing. *DNA Res* 19:143-52
 - 16 Asai H, Yasukawa M, et al. (2013) Co-Induced Functional CCR2 Potentiates In Vivo Anti-Lung Cancer Functionality Mediated by T Cells Double Gene-Modified to Express WT1-Specific T-Cell Receptor. *PLoS One* 8:e56820.
 - 17 Okamoto S, Yasukawa M, et al. (2012) A Promising Vector for TCR Gene Therapy: Differential Effect of siRNA, 2A Peptide, and Disulfide Bond on the Introduced TCR Expression. *Mol Ther Nucleic Acids* 18:e63.
 - 18 Kanda T, Yasukawa M, et al. (2012) HLA-restricted presentation of WT1 tumor antigen in B-lymphoblastoid cell lines established using a maxi-EBV system. *Cancer Gene Ther* 19:566-571.
 - 19 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.
 - 20 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.
 - 21 Hiramoto T, Kobayashi M, Tsuji K, et al. Wnt3a stimulates maturation of impaired neutrophils developed from severe congenital neutropenia-derived pluripotent stem cells with heterozygous *ELANE* mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* (in press)
 - 22 Kobayashi Y, Kobayashi M, et al. (2012) Identification of the integrin $\beta 3$ L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant thrombocytopenia with anisocytosis. *Br J Haematol* (in press)
 - 23 Zhang X, Kobayashi M, Sugita K, et al. (2012) Oncogenic fusion E2A-HLF sensitizes t(17;19)-positive acute lymphoblastic leukemia to TRAIL-mediated apoptosis by upregulating the expression of death receptors. *Leukemia* 26:2483-93
 - 24 Ohno N, Kobayashi M, Karakawa S, et al. (2012) Transient pseudothrombocytopenia in a neonate: Transmission of a maternal EDTA-dependent anticoagulant. *Platelets* 23:399-400.
 - 25 Kajiume T, Kobayashi M, et al. (2012) Regulation of hematopoietic stem cells using protein transduction domain-fused Polycomb. *Exp Hematol* 40:751-760.
- ## 2. 学会発表
- 1 Kanegane H, Yang X, Nishida N, Ishii E, Miyawaki T. Clinical features and outcome of X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (SAP deficiency) and type 2 (XIAP deficiency) in Japan. The 28th Annual Meeting of the Histocyte Society, 2012, London, UK.
 - 2 Yasumi T. Diagnosing FHLs among HLHs: Current status and future direction. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会
 - 3 Hirata O, Kobayashi M, et al. Gain-of-function mutations of *STAT1* in Japanese patients with CMCD. The 15th European Society for Immunodeficiencies Meeting, Florence, Italy, 2012.10
 - 4 Kobayashi Y, Kobayashi M, et al. Identification of integrin $\beta 3$ L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant macrothrombocytopenia. The 54th Annual meeting of American Society of Hematology, Atlanta 2012.12
 - 5 Onodera R, Kobayashi M, et al. A novel method using extracted human neutrophil antigens from HNA gene-transfected cell lines for detection of antibodies against human neutrophil antigens. The 54th Annual meeting of American Society of Hematology, Atlanta 2012.12

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

