

# 家族性血球貪食性リンパ組織球症 3 型の迅速診断法に関する検討

八角高裕<sup>1)</sup>、堀 雅之<sup>1)</sup>、西小森隆太<sup>1)</sup>、小原 収<sup>2)3)</sup>、平家俊男<sup>1)</sup>

1) 京都大学大学院医学研究科発達小児科学

2) 公益財団法人かずさ DNA 研究所ヒトゲノム研究部

3) 独立行政法人理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター

## 研究要旨

本邦の家族性血球貪食性リンパ組織球症 (FHL) 症例の殆どを 2 型 (FHL2) と 3 型 (FHL3) が占めるが、perforin 発現解析による FHL2 スクリーニング法が確立しているのに対し、FHL3 に対するスクリーニング法は十分に確立されているとは言い難い。我々は、NK 細胞脱顆粒機能解析と Munc13-4 蛋白発現解析を用いて FHL3 スクリーニングを行って来たが、NK 脱顆粒機能は 2 次性 HLH 症例でも一過性に低下している場合があり、逆に FHL3 症例でも比較的残存している場合があり、感度・特異度とも低い事が問題となっていた。我々が診断した FHL3 症例では全例で Munc13-4 発現が低下していたため迅速診断が可能であったが、FHL3 診断における Munc13-4 蛋白発現解析の有効性についても十分に評価されていない。これらの問題を解決すべく、FHL3 症例の迅速診断における NK 細胞/CTL を用いた脱顆粒機能解析の有用性と、UNC13D ミスセンス変異による FHL3 症例の診断に対する Munc13-4 蛋白発現解析の有用性を評価した。

その結果、CD57+CD3+CD8+分画を用いた解析は、NK 細胞を用いた脱顆粒機能解析に比較して感度・特異度とも高く、FHL3 の機能スクリーニングとして優れている事が判明した。更に、これまで FHL3 として報告されている UNC13D ミスセンス変異のほぼ全てで Munc13-4 蛋白発現低下を来すことが確認された。以上の結果より、CD57+CTL を用いた脱顆粒機能解析と Munc13-4 蛋白発現解析の組み合わせは、FHL3 の迅速スクリーニング法として非常に有用であることが示された。

## A. 研究目的

血球貪食性リンパ組織球症 (HLH) は、サイトカインストームを基本病態とし、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。感染や膠原病・悪性腫瘍などに続発する 2 次性症例と単一遺伝子異常を原因とする原発性症例とに大別されるが、治療法の選択や造血幹細胞移植の適応判断の為、原発性症例に対する迅速診断法の確立が重要である。

家族性血球貪食性リンパ組織球症 (FHL) は原発性 HLH の代表疾患であり、FHL2-FHL5 の 4 病型が知られている。何れの病型も NK 細胞や細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の細胞傷害活性に關与する分子の異常が原因であり、FHL2 は標的細胞の形質膜に孔を形成して細胞死を誘導する蛋白である perforin の異常、FHL3-5 は perforin を含む細胞内顆粒放出機構の異常が原因である。本邦に於ける FHL 症例の殆どを FHL2 と FHL3 が占めるため、特にこれら 2 病

型に対するスクリーニング法の確立が重要であるが、FHL2 に対して NK 細胞内の perforin 発現解析によるスクリーニング法が確立しているのに対し、FHL3 に対するスクリーニング法は十分に確立されているとは言えない。FHL3-5 に対しては、一般的に NK 細胞の脱顆粒機能解析によるスクリーニングが行われているが、脱顆粒機能が比較的残存する FHL3 症例は珍しくなく、一時的に脱顆粒機能低下を示す 2 次性 HLH 症例が存在する事も確認されている。

我々は、FHL3 の原因蛋白である Munc13-4 (責任遺伝子は *UNC13D*) の血小板内発現解析を用いた FHL3 スクリーニング法を開発し、迅速診断に用いている。これまで FHL3 症例で Munc13-4 蛋白発現が正常であった症例の報告は無く、蛋白発現解析は診断に有用であると考えられるが、大半の症例では蛋白発現解析がなされておらず、評価は定まっていないのが現状である。

以上を背景として、本研究では FHL3 の迅速診断法に関する有効性の検討を行った。

## B. 研究方法

患者検体の解析：当科に解析依頼のあった HLH 症例（FHL2：5 症例、FHL3：8 症例を含む）に対し、NK/CTL の脱顆粒機能と血小板内 Munc13-4 蛋白発現を解析した。

・脱顆粒機能解析：患者血及び正常人コントロール血より末梢血単核球（PBMC）を分離し、一部は直接、残りは IL-2 存在下で 48 時間培養後に K562 細胞と 2 時間共培養し、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。加えて、IL-2 存在下で培養した PBMC の一部を P815 細胞と抗 CD3 抗体（OKT3）の存在下で 2 時間共培養し、CD3 陽性 CD8 陽性 CD57 陽性細胞中に占める CD107a 陽性細胞の割合を解析した。

・患者検体蛋白発現解析：患者末梢血より分離した血小板を用い、ウェスタンブロット法とフローサイトメトリー法にて Munc13-4 発現を検討した。

既報告 *UNC13D* ミスセンス変異が Munc13-4 蛋白発現に与える影響の検討：文献上報告されている *UNC13D* ミスセンス変異の内、以下の条件を満たす変異の cDNA コンストラクトを作成し、HEK293T 細胞に強制発現させて Munc13-4 蛋白の発現レベルを検討した。

）解析対象 *UNC13D* ミスセンス変異の条件

- 1.患者サンプルの解析で、脱顆粒機能又は NK 活性の低下が確認されている。
- 2.蛋白発現解析を施行されていない。
- 3.*UNC13D* の両アリルに変異が認められている。
- 4.ミスセンス変異と同一アリルに既知の病的変異を認めない。

（倫理面への配慮）

研究を行うに当たり、京都大学倫理委員会の指針に基づき、承認を得て informed consent を取得の上で解析を行った。

## C. 研究結果

分離直後の NK 細胞を用いた脱顆粒機能解析では、

正常コントロールに比して FHL3 症例では全例機能低下が認められたが、二次性症例でも一過性の機能低下を認める症例が数多く確認され、特異度が低い事が判明した。IL-2 添加培養後の NK 細胞を用いた脱顆粒機能解析では、多くの FHL3 症例で正常コントロールと同程度の脱顆粒が認められ、感度が低い事が確認された。一方、IL-2 添加培養後の CTL（CD57+CD3+CD8+細胞分画）の脱顆粒機能を評価した所、ほぼ FHL3 症例に特異的に低下している事が確認された。

既報告ミスセンス変異が蛋白発現に与える影響の検討では、現時点で解析の終了した全ての変異で Munc13-4 蛋白発現の低下が確認された。

## D. 考察

NK 細胞と CTL とは、ほぼ同一の細胞障害活性機構を用いていると考えられているが、今回の検討より、CTL の脱顆粒機能低下は NK 細胞のそれに比してより FHL3 に特異的であることが示唆される。この事は、NK 細胞と CTL の細胞障害性顆粒の放出機構に差異があり、Munc13-4 蛋白に対する依存性が異なる可能性を示唆するものである。試験管内での解析がどの程度生体内での機能を反映するかという問題は残るが、FHL3 と二次性 HLH 症例の病態の違いを考える上で興味深い。

本研究では、疾患関連性のあるほぼ全ての *UNC13D* ミスセンス変異が Munc13-4 蛋白発現の低下を招く事も明らかとなった。このことは、Munc13-4 蛋白発現の安定化により細胞障害活性を回復させ、ひいては FHL3 の病態を安定化させられる可能性を示唆するものである。異常な蛋白を正常化するのではなく、その安定性を高める薬剤の発見・開発により FHL3 治療が行える可能性を示唆するものであり興味深い。

## E. 結論

CD57+CTL を用いた脱顆粒機能解析と Munc13-4 蛋白発現解析の組み合わせは、FHL3 の迅速スクリーニングとして非常に有用であることが示された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Nakagawa K, Gonzalez-Roca E, Souto A, Kawai T, Umebayashi H, Campistol JM, Cañellas J, Takei S, Kobayashi N, Callejas-Rubio JL, Ortego-Centeno N, Ruiz-Ortiz E, Rius F, Anton J, Iglesias E, Jimenez-Treviño S, Vargas C, Fernandez-Martin J, Calvo I, Hernández-Rodríguez J, Mendez M, Dordal MT, Basagaña M, Bujan S, Yashiro M, Kubota T, Koike R, Akuta N, Shimoyama K, Iwata N, Saito MK, Ohara O, Kambe N, Yasumi T, Izawa K, Kawai T, Heike T, Yagüe J, Nishikomori R, Aróstegui JI. Somatic NLRP3 mosaicism in Muckle-Wells syndrome. A genetic mechanism shared by different phenotypes of cryopyrin-associated periodic syndromes. *Ann Rheum Dis.* (In press)
2. Abe J, Nakamura K, Nishikomori R, Kato M, Mitsuiki N, Izawa K, Awaya T, Kawai T, Yasumi T, Toyoshima I, Hasegawa K, Ohshima Y, Hiragi T, Sasahara Y, Suzuki Y, Kikuchi M, Osaka H, Ohya T, Ninomiya S, Fujikawa S, Akasaka M, Iwata N, Kawakita A, Funatsuka M, Shintaku H, Ohara O, Ichinose H, Heike T. A nationwide survey of Aicardi-Goutieres syndrome patients identifies a strong association between dominant TREX1 mutations and chilblain lesions: Japanese cohort study. *Rheumatology (Oxford).* (In press)
3. Kawai M, Yoshikawa T, Nishikomori R, Heike T, Takahashi K. Obvious optic disc swelling in a patient with cryopyrin-associated periodic syndrome. *Clin Ophthalmol.* 7:1581-5. 2013
4. Ser36Tyr, presents with mild ectodermal dysplasia and non-infectious systemic inflammation. Yoshioka T, Nishikomori R, Hara J, Okada K, Hashii Y, Okafuji I, Nodomi S, Kawai T, Izawa K, Ohnishi H, Yasumi T, Nakahata T, Heike T. Autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency caused by a novel NFKBIA mutation, p. *J Clin Immunol.* 33(7):1165-74. 2013
5. Taniuchi S, Nishikomori R, Iharada A, Tuji S, Heike T, Kaneko K. MEFV Variants in Patients with PFAPA Syndrome in Japan. *Open Rheumatol J.* 7:22-5. 2013
6. Imagawa T, Nishikomori R, Takada H, Takeshita S, Patel N, Kim D, Lheritier K, Heike T, Hara T, Yokota S. Safety and efficacy of canakinumab in Japanese patients with phenotypes of cryopyrin-associated periodic syndrome as established in the first open-label, phase-3 pivotal study (24-week results). *Clin Exp Rheumatol.* 31(2):302-9. 2013
7. 内尾寛子、額田貴之、井庭憲人、深尾大輔、橋本有紀子、田部有香、井上美保子、濱畑啓悟、吉田晃、百井亨、河合朋樹、西小森隆太、平家俊：NEMO 蛋白異常をフローサイトメトリーにより早期診断した色素失調症の新生児例 *日本小児科学会雑誌* 117 巻 8 号 1303-1307. 2013
8. 河合朋樹、平家俊男：メンデル遺伝型マイコバクテリア感染症 *臨床免疫・アレルギー科* 60 巻 5 号 548-52. 2013
9. 阿部純也、西小森隆太、平家俊男：Aicardi-Goutieres 症候群アレルギー・免疫 20 巻 10 号 62-9. 2013
10. 河合朋樹、平家俊男：患者レジストリーと遺伝子診断 *アレルギー・免疫* 20 巻 10 号 14-23. 2013

## 2. 学会発表

1. 河合朋樹、中川権史、八角高裕、西小森隆太、平家俊男：本邦における自己炎症性疾患データベース 第23回日本小児リウマチ学会
2. 西小森隆太、井澤和司、河合朋樹、八角高裕、河合利尚、梅林宏明、武井修治、小林法元、小原收、Eva Gonzalez-Roca Juan I. Arostegui 平家俊男：Muckle-Wells 症候群における NLRP3 体細胞モザイク変異の検討中川権史 第41回日本臨床免疫学会
3. 中川権史、志村七子、白崎善隆、山岸舞、井澤和司、西小森隆太、河合朋樹、八角高裕、平家俊男、小原收：CINCA 症候群/NOMID 患者単球における IL-1 分泌能の一細胞解析 第34回日本炎症・再生医学会
4. Kawai T, Nishikomori R, Yasumi T, Awaya M, Ohara O, Nakahata T, Saito M, Hara T, Yokota S, Kondo N, Ida H, Kanbe N, Kanazawa N, Agemtsu K, Yachie A, Nonoyama S, Takei S, Heike T. Autoinflammatory diseases database in Japan. 7th International Congress of FMF and AIDs.
5. Nakagawa K, Shimura N, Shirasaki Y, Yamagishi M, Izawa K, Nishikomori R, Kawai T, Yasumi T, Heike T, Ohara O. Single Cell Fluorescent Immunoassay of CINCA/NOMID. 7th International Congress of FMF and AIDs

## H. 知的財産権の出願・登録状況

無し