

家族性血球貪食性リンパ組織球症 3 型の新規機能解析系の構築

研究分担者 平家 俊男 京都大学大学院医学研究科発達小児科学講座
研究協力者 八角 高裕 京都大学大学院医学研究科発達小児科学講座
研究協力者 柴田 洋史 京都大学大学院医学研究科発達小児科学講座

研究要旨

家族性血球貪食性リンパ組織球症 (FHL) は、NK細胞や細胞障害性T細胞 (CTL) の細胞傷害活性の異常を本態とし、造血幹細胞移植を必要とする致死性の疾患である。本邦のFHL症例では *UNC13D* 遺伝子 (蛋白名 *munc13-4*) の異常を原因とするFHL3型の頻度が2番目に高いが、*UNC13D* 遺伝子変異のCTLに於ける機能的影響を評価する系が存在せず、診断や病態解析の支障となっている。本研究では、ヒトFHL3モデルCTL細胞株を樹立し、*UNC13D* 遺伝子変異がCTLの脱顆粒・細胞傷害活性に与える影響を評価する新規機能解析系を構築した。

A. 研究目的

家族性血球貪食性リンパ組織球症 (FHL) は、NK細胞や細胞障害性T細胞 (CTL) の細胞傷害活性の異常を根本原因とし、造血幹細胞移植を必要とする致死性の疾患である。本邦のFHL症例では *UNC13D* 遺伝子 (蛋白名 *Munc13-4*) の異常を原因とするFHL3型の頻度が2番目に高いが、*UNC13D* 遺伝子変異のCTLに於ける機能的影響を評価する系が存在せず、診断や病態解析の支障となっている。本研究では、ヒトFHL3モデルCTL細胞株を樹立して *UNC13D* 遺伝子変異がCTLの脱顆粒・細胞傷害活性に与える影響を評価する新規機能解析系を構築し、疾患原性が不明な変異を有する症例の診断に役立てると共に、FHLに於けるCTLの活性化機構を解明する事を目的とする。

B. 研究方法

新規機能解析系の確立のため、ヒトFHL3モデルCTL細胞株を2種類樹立した。各細胞株に野生型・ミスセンス変異 *UNC13D*-cDNAを強制発現させ、蛋白発現の安定性、及び脱顆粒機能と細胞傷害活性への影響を評価した。

(倫理面への配慮)

この研究は患者の遺伝子解析を含んだ研究であり、京都大学医の倫理委員会の承認を受けて行われた。

C. 研究結果

FHL3患者由来のモデルCTL株を2種類作成し

た。1種類は (c. 118-308C>T/c. 1596+1G>C) 変異を有するFHL3患者から樹立したアロ抗原特異的T細胞ラインであり、もう1種類は (c. 1721_1722insA/ c. 1763G>A) 変異を有するFHL3患者のCTLを、Herpesvirus saimiriを用いて不死化した細胞株である。

それぞれの細胞株は脱顆粒機能及び細胞傷害活性を欠損しており、いずれに於いても野生型 *UNC13D*-cDNAの強制発現により脱顆粒能・細胞傷害活性の回復を認めた。各モデル細胞株に変異cDNAを強制発現する事により、様々な *UNC13D* 変異が脱顆粒・細胞傷害活性に与える影響が評価可能であった。脱顆粒機能は *munc13-4* 蛋白の発現量と正相関し、一定以上の脱顆粒機能があれば正常レベルの細胞傷害活性を示すことが示唆された。

D. 考察

我々は *munc13-4* 蛋白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、迅速診断に用いて来た。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。今回の研究により、疾患関連性のあるほぼ全ての *UNC13D* 変異が *munc13-4* 蛋白発現の低下を招く事が明らかとなると共に、CTL の脱顆粒・細胞傷害機能が *munc13-4* 蛋白発現量と正相関する事が示唆される結果を得た。以上の

結果より、munc13-4 蛋白発現解析による FHL3 スクリーニングの有用性が再確認された。

今回作成したモデル細胞株は、munc13-4 の構造や機能解析に留まらず、細胞傷害活性の異常が CTL の過剰活性化につながる機構を解明する事にも応用が可能である。又、顆粒放出機能を直接回復させる薬剤のスクリーニング系としての応用が可能であり、今後の展開が期待されるものである。

E. 結論

ヒト FHL3 モデル CTL 細胞株を樹立し、*UNC13D* 遺伝子変異が CTL の脱顆粒・細胞傷害活性に与える影響を評価する新規機能解析系を構築した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hori M, Yasumi T, Shimodera S, Shibata H, Hiejima E, Oda H, Izawa K, Kawai T, Ishimura M, Nakano N, Shirakawa R, Nishikomori R, Takada H, Morita S, Horiuchi H, Ohara O, Ishii E, Heike T. A CD57+ CTL Degranulation Assay Effectively Identifies Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Type 3 Patients. *J Clin Immunol*. 37(1):92-99. 2017
- 2) Eroglu FK, Kasapcopur O, Beşbaş N, Ozaltın F, Bilginer Y, Barut K, Mensa-Vilaro A, Nakagawa K, Heike T, Nishikomori R, Arostegui J, Ozen S. Genetic and clinical features of cryopyrin-associated periodic syndromes in Turkish children. *Clin Exp Rheumatol*. 34(6 Suppl 102):S115-S120. 2016
- 3) Kawasaki Y, Oda H, Ito J, Niwa A, Tanaka T, Hijikata A, Seki R, Nagahashi A, Osawa M, Asaka I, Watanabe A, Nishimata S, Shirai T, Kawashima H, Ohara O, Nakahata T, Nishikomori R, Heike T, Saito MK. Pluripotent cell-based phenotypic dissection identifies a high-frequency somatic NLRC4 mutation as a cause of autoinflammation. *Arthritis Rheumatol*. 69(2):447-459. 2017
- 4) Nanishi E, Hoshina T, Takada H, Ishimura M, Nishio H, Uehara T, Mizuno Y, Hasegawa S, Ohga S, Nagao M, Igarashi M, Yajima S, Kusumoto Y, Onishi N, Sasahara Y, Yasumi T, Heike T, Hara T; PID-Infection Study Group. A nationwide survey of common viral infections in childhood among patients with primary immunodeficiency diseases. *J Infect*. 73(4):358-68. 2016
- 5) Mensa-Vilaro A, Teresa Bosque M, Magri G, Honda Y, Martínez-Banaclocha H, Casorran-Berges M, Sintés J, González-Roca E, Ruiz-Ortiz E, Heike T, Martínez-García JJ, Baroja-Mazo A, Cerutti A, Nishikomori R, Yagüe J, Pelegrín P, Delgado-Beltrán C, Arostegui JI. Brief Report: Late-Onset Cryopyrin-Associated Periodic Syndrome Due to Myeloid-

Restricted Somatic NLRP3 Mosaicism. *Arthritis Rheumatol*. 68(12):3035-3041. 2016

- 6) Saida S, Umeda K, Yasumi T, Matsumoto A, Kato I, Hiramatsu H, Ohara O, Heike T, Adachi S. Successful reduced-intensity stem cell transplantation for GATA2 deficiency before progression of advanced MDS. *Pediatr Transplant*. 20(2):333-6. 2016
- 7) Oda H, Sato T, Kunishima S, Nakagawa K, Izawa K, Hiejima E, Kawai T, Yasumi T, Doi H, Katamura K, Numabe H, Okamoto S, Nakase H, Hijikata A, Ohara O, Suzuki H, Morisaki H, Morisaki T, Nunoi H, Hattori S, Nishikomori R, Heike T. Exon skipping causes atypical phenotypes associated with a loss-of-function mutation in FLNA by restoring its protein function. *Eur J Hum Genet*. 24(3):408-14. 2016
- 8) Nakashimai H, Miyake F, Ohki S, Hattori S, Matsubayashi T, Izawa K, Nishikomori R, Heike T, Honda Y, Shigematsu Y. Febrile attacks triggered by milk allergy in an infant with mevalonate kinase deficiency. *Rheumatol Int*. 36(10):1477-8. 2016

2. 学会発表

- 1) 日衛嶋栄太郎 八角高裕 井澤和司 岡藤郁夫 平家俊男 SKIV2L 遺伝子異常を同定した Tricho-hepato-enteric syndrome の 1 例 第 43 回日本小児栄養消化器肝臓学会
- 2) 田中孝之 西小森隆太 中川権史 井澤和司 河合朋樹 八角高裕 平家俊男 本邦でのメバロン酸キナーゼ欠損症のまとめ 第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会
- 3) 本田吉孝 河合朋樹 西小森隆太 八角高裕 井澤和司 日衛嶋栄太郎 中川権史 柴田洋史 下寺佐栄子 大音泰介 芝剛 仁平寛士 小田紘嗣 小原收 平家俊男 PFAPA の臨床像で発症し、長期経過後に腸管炎症、陰部潰瘍を合併したため診断に至った孤発性の TNFAIP3 異常症の 1 例 第 26 回小児リウマチ学会総会・学術集会
- 4) 柴田洋史、八角高裕、日衛嶋栄太郎、下寺佐栄子、中川権二、井澤和司、河合朋樹、西小森隆太、小原收、平家俊男 家族性血球貪食症候群 (FHL) 3 型における迅速診断系・機能解析系の確立 第 44 回日本臨床免疫学会総会
- 5) 井澤和司、八角高裕、西谷真彦、仁平寛士、日衛嶋栄太郎、田中孝之、河合朋樹、西小森隆太、平家俊男、笹原洋二、岡野翼、金兼弘和 ADA2 欠損症の 2 例 第 24 回食細胞機能異常症研究会

G. 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 該当なし