

原発性血球貪食性リンパ組織球症の疾患モデル細胞傷害リンパ球細胞株の樹立

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

原発性血球貪食性リンパ組織球症（HLH）は、NK細胞や細胞傷害性T細胞（CTL）の顆粒分泌依存性細胞傷害機構の先天的な障害を原因とする疾患である。一旦HLHを発症すると救命には造血幹細胞移植が必須であり、採取可能な血液検体に制限があるため、ヒト細胞傷害性細胞を用いた病態解析が難しいのが問題点であった。本研究では、原発性HLHの詳細な病態解明を目的として、患者検体から樹立した疾患モデルNK・CTL細胞株を用いた病態解析系を確立した。

A. 研究目的

原発性血球貪食性リンパ組織球症（HLH）は、NK細胞や細胞傷害性T細胞（CTL）の顆粒分泌依存性細胞傷害機構の先天的欠陥を原因とし、致死性HLHの発症を特徴とする疾患である。一旦HLHを発症すると可及的速やかな造血幹細胞移植を必要とするため、患者血液検体の採取できる量・期間に制限があり、ヒト細胞傷害性細胞を用いた病態解析は殆ど行われてこなかった。本研究では、原発性HLHの患者検体から各疾患のモデルとなるNK、CTL細胞株を樹立し、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、各疾患に於けるNK細胞やCTLの過剰活性化機構と病態解明を目的とする。

B. 研究方法

当科で診断したFHL2型症例、FHL3型症例、Chediak-Higashi症候群（CHS）症例の末梢血単核球細胞より、Herpesvirus Saimiriを用いてNK細胞とCTLの疾患モデル細胞株を樹立し、顆粒分泌機能と細胞傷害活性を評価した。各細胞株に野生型・変異cDNAを強制発現させ、蛋白発現の安定性や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

FHL2患者由来のモデルCTL株を2種類、FHL3患者由来のモデルNK細胞株2種類とCTL細胞株4種類、CHS患者由来のモデルNK細胞株2種類、CTL株2種類を樹立した。

患者のPBMCと同様に、FHL2の細胞株は正常な顆粒分泌能を持つが細胞傷害活性を欠損しており、FHL3・CHSの細胞株は脱顆粒機能及び細胞傷害活性の低下を認めた。FHL2、FHL3のモデル細胞株で、変異cDNAの強制発現による蛋白発現・顆粒分泌能の変化を評価したところ、その変異を持つ初代細胞の変異スクリーニング時の蛋白発現量・細胞傷害顆粒分泌機能と相関しており、患者の病態を再現していることが示唆された。

D. 考察

我々はFHL3迅速スクリーニング法と責任蛋白の機能解析法を開発し、FHL3症例では蛋白発現解析が迅速診断法として非常に有用である事を示した。今年度は同様の手法を用いて、CTLだけでなくNK細胞の細胞株化にも成功し、FHL2、CHS症例の細胞株樹立にも成功した。診断困難な症例に対し、疾患モデルヒト細胞傷害性リンパ球を用いた病態再現や蛋白機能解析を行う基盤ができたと考える。また各疾患の病態解析に留まらず、疾患ごとの細胞傷害顆粒分泌の挙動を詳細に解析することにより、NK細胞とCTLの過剰活性化が導かれる共通経路や、疾患ごとの表現型の差異の解明にもつながることが期待される。

E. 結論

原発性HLHモデルNK細胞・CTL細胞株を樹立し、診断困難な症例・病態の評価への基盤が構築された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Hiejima E, Shibata H, Yasumi T, Shimodera S, Hori M, Izawa K, Kawai T, Matsuoka M, Kojima Y, Ohara A, Nishikomori R, Ohara O, Heike T. Characterization of a large UNC13D gene duplication in a patient with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3. Clin Immunol. doi:10.1016/j.clim.2018.03.012. 2018. In press.

2) Kadowaki T, Ohnishi H, Kawamoto N, Hori T, Nishimura K, Kobayashi C, Shigemura T, Ogata S, Inoue Y, Kawai T, Hiejima E, Takagi M, Imai K, Nishikomori R, Ito S, Heike T, Ohara O, Morio T, Fukao T, Kanegane H. Haploinsufficiency of A20 causes auto-inflammatory and autoimmune disorders. J Allergy Clin Immunol. 2017 doi:10.1016/j.jaci.2017.10.039.

3) Hiejima E, Yasumi T, Nakase H, Matsuura M, Honzawa Y, Higuchi H, Okafuji I, Yorifuji T, Tanaka T, Izawa K, Kawai T, Nishikomori R, Heike T. Tricho-hepato-enteric syndrome with novel SKIV2L gene mutations: A case report. Medicine (Baltimore). 2017 96: e8601. doi: 10.1097/MD.00000000000008601.

5) Takada S, Kambe N, Kawasaki Y, Niwa A, Honda-Ozaki F, Kobayashi K, Osawa M, Nagahashi A, Semi K, Hotta A, Asaka I, Yamada Y, Nishikomori R, Heike T, Matsue H, Nakahata T, Saito MK. Pluripotent stem cell models of Blau syndrome reveal an IFN- γ -dependent inflammatory response in macrophages. J Allergy Clin Immunol. 2017 doi:10.1016/j.jaci.2017.04.013.

6) 山下由理子, 松本真輔, 平本龍吾, 小森功夫, 田中孝之, 西小森隆太, 平家俊男, 梅津守一郎, 乾あやの 胎児水腫と新生児期の胆汁うっ滞性肝機能障害を認め, 6歳でメバロン酸キナーゼ欠損症と診断できた女児例

日本免疫学会会誌 2017;40(2):131-137. doi: 10.2177/jsci.40.131.

2. 学会発表

1) 家族性血球貪食症候群3型における新規機能解析法の確立 柴田洋史 八角高裕 日衛嶋栄太郎 下寺佐栄子 井澤和司 河合朋樹 西小森隆太 小原收 平家俊男 第120回日本小児学会学術集会

2) A human CTL-based functional assay for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. Shibata H, Yasumi T, Shimodera S, Hiejima E, Izawa K, Kawai T, Shirakawa R, Wada T, Nishikomori R, Horiuchi H, Ohara O, and Heike T. 17th meeting of the European Society for Immunodeficiencies (Edinburgh, Scotland). 2017

3) A novel CTL-based functional assay reveals a strong correlation between the pathogenicity of an UNC13D variant and the instability of its translated munc13-4 protein; munc13-4 protein expression assay is a reliable method for identification of patients with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3. Shibata H, Yasumi T, Shimodera S, Hiejima E, Izawa K, Kawai T, Shirakawa R, Wada T, Nishikomori R, Horiuchi H, Ohara O, and Heike T. 33rd Annual meeting of Histiocyte society (Singapore). 2017

4) Characterization of a large UNC13D gene duplication in a patient with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3. Shibata H, Hiejima H, Yasumi T, Shimodera S, Hori M, Izawa K, Matsuoka M, Kojima Y, Ohara A, Nishikomori R, Ohara O, and Heike T. 33rd Annual meeting of Histiocyte society (Singapore). 2017

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