

プロテオーム解析による原発性貪食性リンパ組織球症の新生児スクリーニング法開発の試み

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細胞や細胞障害性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し、救命には造血幹細胞移植が必須とする予後不良の疾患であるが、HLH発症前の診断と早期の移植治療により成績が大きく向上するという結果が示され、発症前診断の重要性が示唆された。また、蛋白発現と原発性HLH疾患原性との相関が示され、質量分析法とプロテオーム解析技術を用いたHLH疾患関連蛋白の定量法が確立しつつあり、新生児スクリーニング法確立の基盤ができたと考えられる。

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細胞移植を必要とするが、長期生存率は7割程度と依然として不良である。本研究では、原発性HLHの多くで疾患責任蛋白の発現の低下が疾患原性と相関するという知見と、原発性HLHの未発症同胞症例において移植成績が良好であることに着目し、質量分析計とプロテオーム解析を用いた、新生児スクリーニング法の確立を目的とする。

B. 研究方法

当科で診断したFHL3型15症例の蛋白発現解析結果の解析を行うとともに、多施設共同研究による未発症同胞症例の移植成績の解析を行った。さらに、原発性HLH患者の新生児スクリーニング法の基盤的データ取得のために、健常人、FHL3型2症例のPBMC、ろ紙血を用いて最新鋭の質量分析機器とDIAプロテオミクス解析を行い、HLHの疾患関連蛋白ならびに免疫不全症関連蛋白質の発現を網羅的に評価した。

（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患者の蛋白発現解析では全ての患者に健常人と比較し著明な疾患責任蛋白発現の低下を認めた。これに対しFHL3型ではないHLH患者では新生児症例であっても、疾患責任蛋白の低下は認められなかった。

多施設共同研究により原発性HLH患者ではHLH発症後の長期生存率が7割程度であるのに対し、未発症同胞症例では9割以上と大きく治療成績が改善することが示された。

健常人、FHL3患者のろ紙血、PBMCのプロテオーム解析では原発性HLH疾患責任蛋白の定量が可能であり、FHL3患者検体では疾患責任蛋白の著しい発現低下を検出することが示された。

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。今年度は多施設共同研究で得られた、原発性HLH患者の移植成績が、未発症時に造血細胞移植を行うことで大きく改善するという知見と、蛋白発現が原発性HLH疾患原性と相関するという結果が得られ、原発性HLHにおける新生児スクリーニングの有効性が示唆された。最新鋭の質量分析機器とプロテオミクス解析技術を用いることで、ろ紙血からでもHLH関連蛋白の定量が可能となっており、新生児スクリーニング法確立の基盤ができたと考えられる。

また質量分析法を用いた蛋白解析では、他の免疫不全症の疾患責任蛋白発現の定量的評価も可能であり、免疫不全症の包括的新生児スクリーニングへの発展へとつながることが期待される。

E. 結論

質量分析法による蛋白発現解析を応用した原発性HLHの新生児スクリーニング法の確立のための基盤が構築された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Boisson B, Honda Y, Ajiro M, Bustamante J, Bendavid M, Gennery AR, Kawasaki Y, Ichishima J, Osawa M, Nihira H, Shiba T, Tanaka T, Chrabieh M, Bigio B, Hur H, Itan Y, Liang Y, Okada S, Izawa K, Nishikomori R, Ohara O, Heike T, Abel L, Puel A, Saito MK, Casanova JL, Hagiwara M, Yasumi T. Rescue of recurrent deep intronic mutation underlying cell type-dependent quantitative NEMO deficiency. *J Clin Invest.* 2019, 129:583-597.

2) Lucchini G, Marsh R, Gilmour K, Worth A, Nademi Z, Rao A, Booth C, Amrolia P, Silva J, Chiesa R, Wynn R, Lehmborg K, Astigarraga I, Gungor T, Stary J, Moshous D, Ifversen M, Zinn D, Jordan M, Kumar A, Yasumi T, Veys P, and Rao K: Treatment dilemmas in asymptomatic children with primary haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood.* 132, 2088-2096. 2018

3) Shibata H, Yasumi T, Shimodera S, Hiejima E, Izawa K, Kawai T, Shirakawa R, Wada T, Nishikomori R, Horiuchi H, Ohara O, Ishii E, and Heike T. Human CTL-based functional analysis shows the reliability of a munc13-4 protein expression assay for FHL3 diagnosis. *Blood.* 2018, 131:2016-2025.

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