

# ヒト疾患モデルCTLを用いた血球貪食症候群 関連蛋白の構造・機能解析

## [1] 組織

代表者：八角 高裕

(京都大学大学院医学研究科)

対応者：堀内 久徳

(東北大学加齢医学研究所)

白川 龍太郎

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：柴田洋史 (京都大学大学院医学研究科)

井澤和司 (京都大学大学院医学研究科)

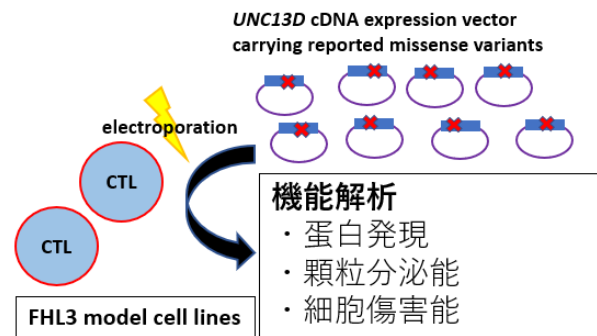
研究費：物件費 30 万円

## [2] 研究経過

細胞障害性T細胞 (CTL) がウイルス感染細胞等の標的細胞を排除する機序として、感染細胞との間に免疫シナプスと呼ばれる細胞接着構造を形成し、lytic granule を開口放出してアポトーシスを誘導する機構が重要である。Lytic granule には perforin や granzyme といったアポトーシス誘導分子が含まれ、これらが標的細胞に細胞死を誘導する。

血球貪食症候群は、免疫応答の過剰な活性化から汎血球減少や多臓器不全を来す重篤な病態であり、原発性 (遺伝性・家族性) と二次性 (膠原病やウイルス感染に続発) に大別される。家族性血球貪食症候群の原因遺伝子として perforin、及び lytic granule の開口放出に必須の因子 Munc13-4, syntaxin11, Munc18-2 が同定されており、これら分子の異常により CTL の細胞傷害活性が欠損・低下する結果、CTL の過剰な増殖・活性化からマクロファージの二次的な過剰活性化が誘導され、結果として生じる過剰な炎症性サイトカイン産生が血球貪食症候群の病態を引き起こすと理解されている。本邦に於ける家族性血球貪食症候群症例の約 4 割が Munc13-4 分子の異常を原因とするが、種々の Munc13-4 分子異常が CTL の細胞傷害活性に与える影響に関してほとんど解析されていない。今回の共同研究では、疾患責任タンパク質の機能及び lytic granule の放出・細胞傷害活性への影響を解析し、分子病態に基づいた疾患の理解を深め、診断治療の向上の繋げることを目的とした。

本共同研究では、まず血小板内蛋白発現解析の疾患スクリーニングにおける有用性・信頼性の評価と、変異蛋白の機能解析を行い、疾患原性に影響を与える因子について解析を行った。研究の遂行にあたっては電子メールによる意見交換を定期的に行うと共に、平成 29 年 12 月には東北大学加齢医学研究所を訪問して打ち合わせを行った。



## [3] 成果

### (3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず、臨床的に FHL が疑われ、血小板内蛋白発現解析と FHL3 の責任遺伝子である UNC13D 遺伝子解析を施行した 108 症例について評価したところ、遺伝子変異の種類を問わず FHL3 症例では著明な血小板内 Munc13-4 蛋白発現の低下を示す事が示され、血小板内 Munc13-4 蛋白発現解析は FHL3 の診断において感度・特異度とも非常に高い検査であることが確認された。

続いて既報の疾患原性と考えられているミスセンス変異においても蛋白発現が疾患原性に関わるか調べるため、我々が確立した FHL 疾患モデルヒト CTL 細胞株を用い、既報のミスセンス変異の機能解析を行った。FHL3 モデルヒト CTL において、既報の疾患原性ミスセンス変異を一過性発現させその機能を見たところ、蛋白発現の低下が細胞傷害顆粒放出機能低下と強く相関していた。これにより、疾患原性 Munc13-4 分子では蛋白の不安定性が lytic granule の放出と細胞傷害活性に強く影響している事が示された。

### (3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究を通し、京都大学大学院医学研究科と東北大学加齢医学研究所の間で研究者間の交流、議論を行い、研究を深めていくことができた。

又、これまで FHL の病態の本態である CTL の解析は十分に行われていなかったが、FHL 症例より樹立したヒト CTL 細胞株を用いることで包括的に機能を評価することが可能となり (Best E-poster award at 17th meeting of the European Society for Immunodeficiencies 2017)、この系を用いて我々が開発した血小板を用いた FHL3 迅速診断法の有用性を示し (Nezelof Award in Basic Science at 33rd Annual meeting of Histiocyte society 2017)、国際学会で高い評価を受けると共に、結果を論文として報告することができた (Shibata H et al. Blood. 2018)

更に、本共同研究で得られた Munc13-4 蛋白の不安定性が疾患原性に大きく影響するという知見は、蛋白不安定性の原因となる構造・機能の解析が病態解明につながるというだけでなく、新生児スクリーニングや、新たな治療戦略のための薬剤開発など新しい研究領域の開拓への展開に寄与すると考えられる。

### [4] 成果資料

1. 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. In Press.
2. 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. 2017, 37:92-99.
3. Yasumi T, Hori M, Hiejima E, Shibata H, Izawa K, Oda H, Yoshioka K, Nakagawa K, Kawai T, Nishikomori R, Ohara O, Heike T. Laboratory parameters identify familial haemophagocytic lymphohistiocytosis from other forms of paediatric haemophagocytosis. Br J Haematol. 2015, 170:532-8.
4. 堀内久徳, 白川龍太郎, 八角高裕. 血小板顆粒放出の分子メカニズム. 臨床血液 2012, 53:664-71.
5. Murata Y, Yasumi T, Shirakawa R, Izawa K, Sakai H, Abe J, Tanaka N, Kawai T, Oshima K, Saito M, Nishikomori R, Ohara O, Ishii E, Nakahata T, Horiuchi H, Heike T. Rapid diagnosis of FHL3 by flow cytometric detection of intraplatelet Munc13-4 protein. Blood. 2011, 18:1225-30.