

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・白川 龍太郎

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：柴田洋史・井澤和司

(京都大学大学院医学研究科)

研究費：物件費 15 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、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を得た (Shibata H et al. Blood. 2018)。さらに臨床応用を見据え、新生児スクリーニングの意義と実現可能性の評価と、疾患原性変異の基礎的解析のための細胞株樹立を行った。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

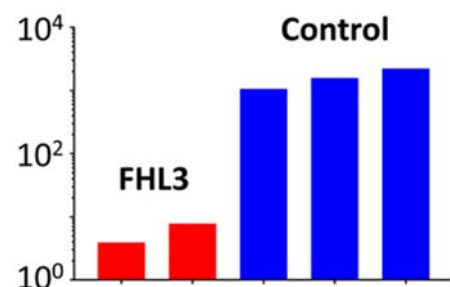
(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

① 多施設国際共同研究による家族性血球貪食性リンパ組織球症の未発症同胞例の解析により血球貪食症候群を発症する前に造血細胞移植を行うことで、移植成績が大きく向上することを示した。

② Munc13-4 異常症では蛋白の不安定性が疾患原性に大きく関与している事より、蛋白発現解析による新生児スクリーニング法の可能性を評価した。フローサイトメトリー法を用いた Munc13-4 発現解析結果を後方視的に解析すると、FHL3 以外の血球貪食症候群を発症した新生児では成人と同等に Munc13-4 が発現しているが、FHL3 患者では新生児期であっても発現が著減している事が確認された。質量分析法を用いて、現在先天性代謝疾患のスクリーニングに用いられている濾紙血検体 (DBS) で患者の Munc13-4 発現低下を指摘しうるかを評価したところ、健常人の DBS では全て Munc13-4 発現を定量可能であったが、患者検体では著減している事が確認された。

③ 網羅的な蛋白の機能・構造解析を行うためには、



様々な変異蛋白を発現する細胞をハイスループットに樹立する必要がある。そこで、樹立済みの FHL3 患者由来 CTL 細胞株を用い、高い効率で組み替え可能な

遺伝子カセットの導入を試み、導入細胞のクローニングに成功した。

(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、造血細胞移植を血球貪食症候群未発症の状態で行うことで治療成績が向上するという知見は、治療成績の向上に新生児スクリーニングが大きく貢献する可能性を示唆する。加えて、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と、質量分析と濾紙血検体 (DBS) を用いて蛋白発現評価が可能であるという結果から、新生児スクリーニング法の実現可能性は高いと考えられ、今後の臨床応用が期待できる。加えて、網羅的な変異解析へと応用可能な CTL 細胞株の樹立に成功しており、変異蛋白カセットの組み換えによる網羅的変異蛋白機能スクリーニングを用いて、蛋白不安定性の原因となる構造・機能の解析を行うことで、病態解明や新規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. Yanagisawa R, Nakazawa Y, Matsuda K, Yasumi T, Kanegane H, Ohga S, Morimoto A, Hashii Y, Imaizumi M, Okamoto Y, Saito AM, Horibe K, Ishii E. Outcomes in children with hemophagocytic lymphohistiocytosis treated using HLH-2004 protocol in Japan. *Int J Hematol.* 2019, 109(2):206-213
2. Lucchini G, Marsh R, Gilmour K, Worth A, Nademi Z, Rao A, Booth C, Amrolia P, Silva J, Chiesa R, Wynn R, Lehmsberg K, Astigarraga I, Güngör T, Stary J, Moshous D, Ifversen M, Zinn D, Jordan M, Kumar A, Yasumi T, Veys P, Rao K. Treatment dilemmas in asymptomatic children with primary hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 2018, 132(19):2088-2096.
3. 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.* 2018, 191:63-66.
4. 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(18):2016-2025.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.