

課題番号 22

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 20 万円

[2] 研究経過

細胞障害性T細胞 (CTL) やNK細胞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 (FHL) 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 FHL3 型であるが、種々の Munc13-4 分子異常が CTL やNK細胞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かった。そこで、平成 29 年度より継続してきた本共同研究では、Munc13-4 蛋白の変異が 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、診断治療の向上に繋げることを目的とした。

昨年度までの研究で、血小板内 Munc13-4 蛋白発現

解析の疾患スクリーニングにおける有用性・信頼性を評価すると共に、変異蛋白の機能解析系を確立し、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)。今年度は、臨床応用を見据えた新生児スクリーニング実現可能性の評価を進めるとともに、晩期発症患者に認められるアミノ酸置換変異が NK 細胞と CTL の機能に与える影響の評価を行った。

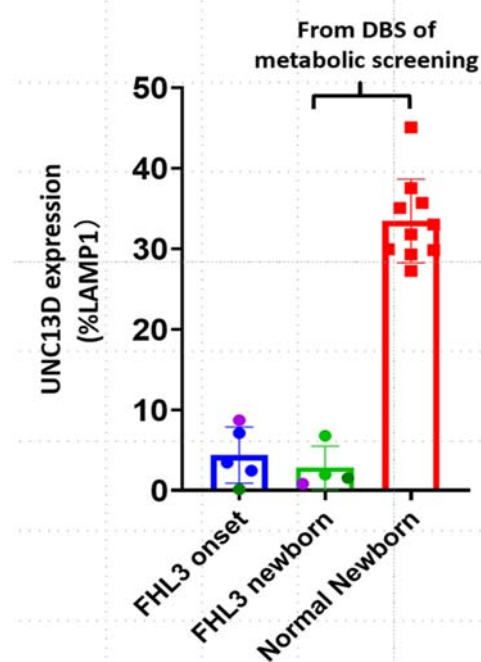
本研究の遂行にあたっては、電子メールによる意見交換を定期的に行った。

[3] 成果

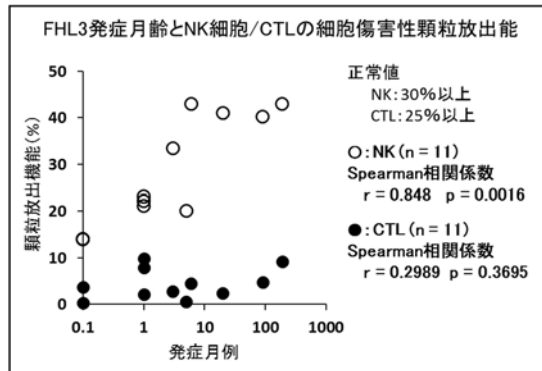
(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

① 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、昨年度に引き続いて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。診断確定時 (発症時) に採取した FHL3 患者濾紙血検体 (DBS) と、新生時期 (発症前) に採取され実際に先天性代謝疾患のスクリーニングに用いられた患者検体を収集し、質量分析法を用いて健康新生児の検体と比較して Munc13-4 蛋白の発現低下を指摘しうるかを評価したところ、発症前 (新生時期)・発症時のいずれの検体を用いても、患者検体に於いて蛋白発現が著減している事が確認された。



② これまで経験した FHL3 症例の発症月齢と患者 CTL 及びNK 細胞に於ける lytic granule の放出機能を評価したところ、CTL に於ける lytic granule 放出機能は発症月齢に関係なく一様に低下していたが、NK 細胞の lytic granule の放出機能は発症月齢と正の相関があり、NK 細胞に於ける顆粒放出能の残存が疾患の軽症化と関連することが明らかとなった。



(3-2) 波及効果と発展性など

本研究を通じ、京都大学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を深め、互いの強みを生かした共同研究体制を確立することができた。

本研究を通じて得られた、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) を用いた蛋白発現解析の実現可能性より、新生児スクリーニングの実用化へ向けた発展が期待できる。FHL 患者に対して発症前に造血細胞移植を行う事で治療成績が飛躍的に向上するという知見を昨年報告しており、新生児スクリーニングの実用化により発症前診断が可能となり、患者予後の大幅な改善が期待できる。又、NK 細胞に於ける顆粒放出能の残存が疾患の軽症化と関連することより、NK 細胞の機能向上に特化した新規治療法の開発も期待される所である。

[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, Lehmborg K, Astigarraga I, Gungör 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, 118:1225-30.