

(学位論文の要約)

【背景】

血球貪食性リンパ組織球症 (hemophagocytic lymphohistiocytosis : HLH) は、発熱や汎血球減少、播種性血管内凝固症候群などを主要徴候とし、マクロファージの増殖と血球貪食像を病理学的特徴とする全身性炎症症候群である。原因により、遺伝的素因による原発性 HLH と、感染や膠原病などに続発する 2 次性 HLH とに大別され、家族性血球貪食性リンパ組織球症 (familial hemophagocytic lymphohistiocytosis : FHL) は原発性 HLH の代表疾患である【1】。救命には造血細胞移植が必須であり、早期の移植施行が予後を改善する事が知られている【2】。しかし、造血細胞移植には大きなリスクが伴うため、迅速かつ正確な診断が必要である。

FHL には現時点で 4 つの原因遺伝子が同定されており、何れも顆粒分泌に依存する細胞傷害機構に関わる分子をコードしている。FHL2 の原因分子 perforin (遺伝子 *PRF1*) は標的細胞の形質膜に孔を形成してアポトーシスを誘導する蛋白である【3】。FHL3/FHL4/FHL5 の原因である *munc13-4* (遺伝子 *UNC13D*)【4】/*syntaxin11* (遺伝子 *STX11*)【5】/*munc18-2* (遺伝子 *STXB2*)【6】は、何れも perforin を含む細胞傷害性顆粒の放出に関わる分子である。この為、FHL では NK 細胞及び細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の細胞傷害活性の欠損・低下を特徴とする【7】。FHL の頻度は 10-20 万人に 1 人と推定され、FHL2 と FHL3 が全体の 95%以上を占めており、これら 2 つの型に対する診断が臨床的に重要となるが、NK 細胞内 perforin 発現解析による FHL2 型の迅速診断法が確立している一方、FHL3 型に対する信頼性の高い迅速診断法は確立されていなかった。我々は 2011 年に FHL3 型の迅速診断法としてフローサイトメトリーによる血小板内 *munc13-4* 蛋白発現解析法を報告し【8】、本邦の患者診断に用いてきたが、この方法の信頼性は十分に評価されていないのが現状である。既報告 FHL3 症例に於ける *munc13-4* 蛋白の発現を検証してみると、評価が行われた全症例に於いて発現低下が確認されていた。しかし、病的変異として報告されているものの、*munc13-4* 蛋白発現や細胞傷害活性の検討が行われておらず、臨床的意義が不明な *UNC13D* ミスセンスバリエーションの存在が明らかとなった。そこで、本研究では FHL3 診断に於ける *munc13-4* 蛋白発現解析の信頼性の評価を行った。

【目的】

FHL3 診断に於ける *munc13-4* 蛋白発現解析の信頼性評価を目的とし、蛋白発現解析による迅速診断結果と遺伝子解析結果を比較検証するとともに、*UNC13D* バリエーションの機能評価が可能なヒト FHL3 モデル CTL 細胞株を新たに樹立し、報告されている *UNC13D* ミスセンスバリエーションが *munc13-4* 蛋白発現、及び細胞傷害性顆粒の放出機能と細胞障害活性に与える影響を評価する。

【方法】

2011年から2016年までにFHL3スクリーニングを施行した108人のHLH患者での血小板内munc13-4発現解析によるFHL3スクリーニングと、*UNC13D*遺伝子検査の結果を照合した。次に、既報論文から蛋白発現評価が行われていないミスセンスバリエーションのうち、(A)NKもしくはCTL脱顆粒機能、またはNK細胞の細胞傷害機能の低下が確認されている、(B)両アレルに*UNC13D*の変異が確認されている、(C)同一アレルに他に疾患原性となる変異が存在しない、という三つクライテリアを全て満たす11のミスセンスバリエーションを選出し、当研究室で診断した症例に認められた3つのミスセンスバリエーションと良性バリエーションの発現ベクターを構築した。これらのバリエーションの機能解析のためにFHL3患者より疾患モデル細胞株となるalloantigen specific CTLと、Squirrel monkeyのリンパ球を宿主とするHerpesvirus Saimiri (HVS)を用いて不死化CTLを樹立した。HEK293T細胞や樹立した疾患モデル細胞株に*UNC13D*のcDNAコンストラクトを一過性に発現させバリエーション蛋白の発現量と脱顆粒機能・細胞障害機能を評価した。

【結果】

1. Munc13-4 蛋白発現解析による FHL3 迅速診断

108人のHLH患者の解析において、病原性バリエーションを確認した15症例全例でmunc13-4蛋白発現の明確な低下が認められた。血小板輸血を受けていた患者では正常及びmunc13-4欠損血小板の2峰性の集団が明らかであり、FHL3以外の患者でmunc13-4発現の低下を認めた症例はなかった。患者検体の血小板内munc13-4蛋白発現量をコントロールの検体の血小板内munc13-4発現量とのMFIの比で評価するとFHL3患者は他のHLH患者と明確に区別できた(optimum threshold 50.98%, AUC, 1.00)。

2. *UNC13D* 遺伝子ミスセンスバリエーションの病原性評価

バリエーションの蛋白発現に与える影響を検討した。HEK293T細胞に作成したバリエーションのコンストラクトを発現させると、そのほとんどは著明な蛋白発現低下を示したが、二つのバリエーション(c.175G>A (p.Ala59Thr)とc.2180G>A (p.Arg727Gln))では蛋白発現が一定レベル残存していた。cycloheximide chase 解析を用いて翻訳されたバリエーション蛋白の安定性を評価したところ、良性バリエーションは野生型と同等の安定性を示したが、当研究室で診断した疾患原性変異は分解が亢進していた。c.175G>A (p.Ala59Thr)とc.2180G>A (p.Arg727Gln)バリエーションは中間的な安定性を示した。

3. *UNC13D* 遺伝子バリエーションの機能評価系の確立

*UNC13D*バリエーションの包括的機能評価系の確立を試みた。患者からalloantigen specific CTLとHVSを用いて不死化したCTL細胞株を樹立した。いずれの細胞株も脱顆粒能と細胞傷害能を欠損していた。野生型*UNC13D*のcDNAを一過性に発現させることで脱顆粒

機能や細胞傷害能は正常人由来細胞株と同等まで回復した。

4. 樹立細胞株を用いた *UNC13D* バリエントの機能評価

樹立した細胞株に *UNC13D* ミスセンスバリエントを導入し、バリエント munc13-4 蛋白の発現レベルを評価したところ、HEK293T 細胞への導入時と同様の蛋白発現パターンが観察された。蛋白発現が野生型コンストラクトと同等なバリエントは脱顆粒能を回復させると共に、野生型コンストラクトと同等レベルまで細胞傷害活性を回復させた。一方、蛋白発現がほぼ完全に失われているバリエントでは脱顆粒及び細胞傷害機能の回復は認められなかった。蛋白発現が一定レベル残存していた2つのバリエントは野生型 *UNC13D* コンストラクトと同等レベルまで脱顆粒・細胞傷害機能を回復させた。

【考察】

ヒト FHL3 モデル CTL 細胞株を基盤に構築した *UNC13D* 遺伝子バリエント機能評価系を用いた解析により、FHL3 型に於ける *UNC13D* バリエントの病原性は munc13-4 蛋白の発現量に強く規定されることが示され、血小板内 munc13-4 の発現解析による FHL3 スクリーニングの高い信頼性が確認された。

UNC13D の病原性ミスセンスバリエントが蛋白発現低下を来す機構は未解明であるが、FHL2 と同様 FHL3 においても蛋白の不安定性が疾患原性に大きく関与することが示唆された。蛋白発現が正常な病的 *UNC13D* バリエントの存在は否定出来ないが、今回確立した機能解析系を用いれば容易に機能評価が可能であり、さらなる解析を進めることで munc13-4 蛋白の構造や機能調節の解明にも役立つものと考えられる。今回、生理状態よりも強い蛋白発現が想定される強制発現系で全ての病的 *UNC13D* ミスセンスバリエントが蛋白発現の有意な低下を来した事より、殆どの FHL3 症例は munc13-4 蛋白発現解析で診断可能であると思われる。

FHL は 2 型と 3 型が大半を占める為、munc13-4 と perforin 発現解析によりほとんどの FHL 患者の迅速診断が可能となり、早期造血細胞移植による予後の改善につながる事が期待される。

【文献】

1. Ishii E: Hemophagocytic Lymphohistiocytosis in Children: Pathogenesis and Treatment. *Front Pediatr* 4:47, 2016.
2. Bergsten E, Horne A, Aricó M, et al: Confirmed efficacy of etoposide and dexamethasone in HLH treatment: long-term results of the cooperative HLH-2004 study. *Blood* 130:2728-2738, 2017.
3. Stepp SE, Dufourcq-Lagelouse R, Le Deist F, et al: Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science* 286:1957-1959, 1999

4. Feldmann J, Callebaut I, Raposo G, et al: Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell* 115:461-473, 2003.
5. Zur Stadt U, Beutel K, Kolberg S, et al: Mutation spectrum in children with primary hemophagocytic lymphohistiocytosis: molecular and functional analyses of PRF1, UNC13D, STX11, and RAB27A. *Human mutation* 27:62-68, 2006.
6. Zur Stadt U, Rohr J, Seifert W, et al: Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Type 5 (FHL-5) Is Caused by Mutations in Munc18-2 and Impaired Binding to Syntaxin 11. *American Journal of Human Genetics* 85:482-492, 2009.
7. Sieni E, Cetica V, Hackmann Y, et al: Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis: when rare diseases shed light on immune system functioning. *Front Immunol* 5:167, 2014.
8. Murata Y, Yasumi T, Shirakawa R, et al: Rapid diagnosis of FHL3 by flow cytometric detection of intraplatelet Munc13-4 protein. *Blood* 118:1225-1230, 2011.