

京都大学	博士（医学）	氏名	村田 祐樹
論文題目	Rapid diagnosis of FHL3 by flow cytometric detection of intraplatelet Munc13-4 protein (フローサイトメトリー法を用いた血小板内Munc13-4 蛋白発現検出による家族性血球貪食性リンパ組織球症3型の迅速診断)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>血球貪食性リンパ組織球症 (hemophagocytic lymphohistiocytosis : HLH) は、発熱・汎血球減少・凝固異常等を主症状とし、血球貪食像を組織学的特徴とする炎症性症候群である。</p> <p>遺伝子異常による原発性のものと、感染や自己免疫疾患等に続発する二次性のものとに大別され、原発性 HLH の代表疾患として、家族性血球貪食性リンパ組織球症 (familial HLH : FHL) が知られている。HLH 急性期には強力な免疫抑制療法が必要であるが、多くの二次性症例で治療の漸減・中止が可能である一方、FHL に対しては免疫抑制療法の継続と造血幹細胞移植が必須である為、両者の鑑別が治療方針の決定に重要であり、FHL の迅速診断法が模索されてきた。</p> <p>FHL は、その原因分子により FHL2/3/4/5 の 4 病型に分類され、細胞障害性 T 細胞 (CTL) 及び Natural Killer (NK) 細胞の細胞障害活性低下を特徴とする。細胞障害活性は、これらの細胞が持つ細胞障害性顆粒の脱顆粒により、顆粒に含まれるアポトーシス誘導分子の放出を主な機序としており、この顆粒に含まれる Perforin の異常が FHL2 の原因である。FHL3/4/5 の原因分子である Munc13-4/Syntaxin11/Munc18-2 は何れも細胞障害性顆粒の脱顆粒に関わる分子であり、これらの病型では CTL や NK 細胞の脱顆粒障害が認められる。現在、FHL2 に関してはフローサイトメトリー法を用いた NK 細胞内 Perforin 発現解析による迅速診断法が確立しており、FHL3/4/5 に対しては、NK 細胞の脱顆粒機能解析によるスクリーニングが一般的に行われている。しかし、HLH 急性期には NK 細胞の減少により脱顆粒機能評価が不可能な場合がある上、一過性の脱顆粒機能低下を呈する二次性症例も存在しており、NK 細胞の脱顆粒機能解析に代わる診断法の確立が望まれた。特に、FHL 症例の殆どを FHL2 と FHL3 が占める本邦では、FHL3 迅速診断の臨床的意義が大きいと思われた。</p> <p>本研究では、Munc13-4 が血小板に豊富に発現しその脱顆粒にも関与している事に着目し、血小板の脱顆粒機能及び Munc13-4 発現の評価による FHL3 迅速診断の可能性を検討した。</p> <p>2008 年 1 月から 2010 年 3 月の期間に、FHL を疑われた 85 名の HLH 患者を対象とし、血小板の脱顆粒機能解析と Munc13-4 発現解析を行った。その結果、血小板の脱顆粒機能は FHL3 症例で低下傾向が認められたものの、急性期に一過性低下を呈する二次性症例が多く存在し、その有用性は限定的であった。血小板を用いたウェスタンブロット法による Munc13-4 発現解析は FHL3 の診断確定に有用であったが、HLH 急性期には血小板を輸血されている症例が多く、このような症例では輸血された正常血小板の混入により正確な診断が行えない欠点が明らかとなった。この場合、血小板に代わり末梢血単核球を用いても、密度勾配遠心法で採取した末梢血単核球に大量の血小板が混入する為、問題の解決とはならなかった。</p>			

そこで、血小板輸血の影響を避ける為、個々の血小板内の Munc13-4 発現をフローサイトメトリー法で解析する方法を開発した。特異度の高い抗体を使用する事により、Munc13-4 発現の低下した異常血小板と輸血由来の正常血小板を明確に区別する事が可能となり、血小板輸血症例に於いても FHL3 の正確な診断が可能となった。この方法は、解析時間も短く検査に必要な血液量も少量 (100 μ L 以下) であり、FHL3 の迅速診断法として有用である。

(論文審査の結果の要旨)

FHL は致命的な遺伝性 HLH 疾患であり、救命には可能な限り早期の造血幹細胞移植が必要である為、正確で迅速な FHL 診断法の開発が求められてきた。FHL3 は本邦に於ける主要な FHL 病型であるが、診断法として現在広く行われている NK 細胞脱顆粒機能解析には、特異度の低さや、急性期の NK 細胞減少による解析不能症例の存在という問題点があった。当研究は、CTL/NK 細胞と血小板が共通の脱顆粒機構を使用している事実に着目し、血小板を用いた FHL3 診断法を開発を行ったものである。

まず、血小板蛋白を用いたウェスタンブロット法による Munc13-4 発現解析が FHL3 の診断確定に有用である事が示された。しかし、治療目的で行われる血小板輸血の影響により、急性期に於ける診断精度が課題として浮かび上がった。この問題を解決する方法として、フローサイトメトリー法を用いて個々の血小板内の Munc13-4 発現を解析する方法が開発され、血小板輸血の必要な急性期に於いても正確な診断が可能となった。本解析法は、必要とする検体量が少量で短時間での解析が可能である為、臨床現場に於ける有用性が高く、FHL の診療に寄与する所が多い。

従って、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値のあるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 26 年 7 月 4 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降