

**京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書**

2020年 4月 22日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 藤 洋 作 様

所 属 部 局 医学研究科 医学・医科学専攻 発達小児科学

職 名 准教授

氏 名 八角 高裕

助 成 の 種 類	令和元年度 ・ 研究活動推進助成		
申請時の科研費 研究課題名	新規診療基盤構築に向けた原発性血球貪食性リンパ組織球症の分子病態解析		
上記以外で助成金を 充当した 研究内容	なし		
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名)		
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等) ・原発性免疫不全症における、ろ紙血プロテオーム解析を用いた新生児スクリーニングの可能性 (第3回 日本免疫不全・自己炎症学会総会・学術集会、2020年2月16日、東京)		
成 果 の 概 要	別紙参照		
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	1,000,000 円	
	使用した助成金額	1,000,000 円	
	返納すべき助成金額	0 円	
	助成金の使途内訳	費 目	金 額
		倫理審査費用	5,000円
		シーケンス外部委託	49,500円
		サイトカイン測定試薬	102,850円
		抗体試薬	217,327円
	細胞培養試薬	625,323円	
当財団の助成に ついて	貴財団からの助成のお陰で、予定していた研究の基礎検討が進み、論文として成果をまとめる段階まで来ております。これを実績として新たな公的研究費の獲得に繋がりたいと思います。		

成果の概要/八角高裕

【研究概要】

原発性免疫不全症（PID）の多くは乳幼児期に発症し、治療には造血細胞移植を必要とする場合が多いが、重症例の予後は不良である。患者の予後を大幅に改善する為には発症前の治療介入が不可欠であり、新生児スクリーニングによる早期診断が望まれている。現在、PIDに対するスクリーニング検査は遺伝子解析を中心に計画されているが、シーケンス結果の評価には時間がかかる上、未報告の稀なバリエーションの病原性を判断する事は容易ではない。その点、責任蛋白発現の欠損・著減は直接的な疾患診断に結びつくものである。

我々の研究グループは、患者由来のNK細胞株やT細胞株を用いた独自の解析手法を用い、重症PIDの一つである家族性血球貪食性リンパ組織球症3型（FHL3）の診断法確立と病態解明を行ってきた。これまでの研究で、疾患責任蛋白であるMunc13-4（遺伝子名：UNC13D）発現解析によるFHL3スクリーニングの有用性と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ている（Shibata H et al. Blood. 2018）。つまり、FHL3は責任蛋白発現解析による新生児スクリーニングの良い適応になることが期待される。

新生児スクリーニングを実用化する場合、検体採取・輸送・保存が容易である必要があり、新たな検体採取を避ける意味でも、先天性代謝性疾患スクリーニングに用いられている新生児乾燥ろ紙血（DBS）検体の利用が理想的である。しかし、大量に含まれるアルブミンなどの影響により、一般的なプロテオミクス解析を用いてPID責任分子の様な微量蛋白質を検出することは困難である。この問題を克服する目的で最先端プロテオミクス技術と最新鋭の質量分析器を用いた予備検討を行ったところ、Munc13-4を含む複数のPID責任蛋白質をDBS検体より検出できる可能性が示されていた。

以上の結果を基に、本研究ではDBS検体を用いたMunc13-4蛋白発現解析によるFHL3新生児スクリーニングの実現可能性について検討した。

【研究成果】

まず、DBS検体中に含まれる微量なPID関連蛋白質の検出感度を上げる事を試みた。血液中にはアルブミンや凝固因子などの水溶性蛋白が大量に含まれている。一方、PIDの責任蛋白の多くは細胞の膜成分に局在して存在する。そこで、DBS検体より不溶性分画のみを濃縮する処置を施したところ、これまで不可能であった多くのPID責任蛋白質が検出可能となることが示された（左下表参照）。

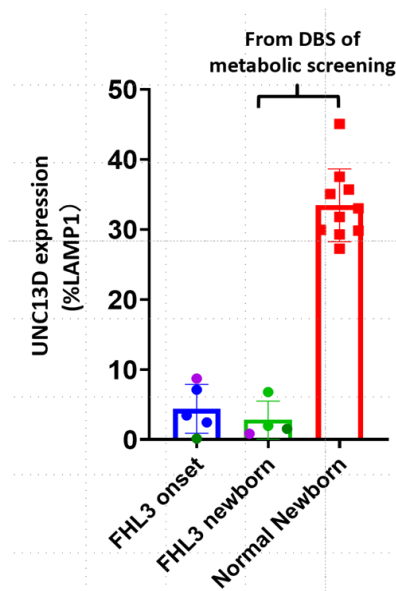
続いて、診断確定時（発症時）に採取したFHL3患者DBS検体、及び、新生時期（発症前）に採取され実際に先天性代謝疾患のスクリーニングに用いられた患者DBS検体を収集し、健常新生児のDBS検体と比較してMunc13-4蛋白の発現低下を指摘しうるかを評価し

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、患者検体に於ける蛋白発現の著減が確認された（右下図参照）。

以上の結果より、DBS を用いた蛋白発現解析による新生児 FHL3 スクリーニングが可能である事が証明されると同時に、他の PID についても応用が可能である事が示唆された。

検出可能な主要 PID 責任蛋白

protein	gene	Disease name
Proteins related to primary HLH		
munc13-4	UNC13D	FLH3
syntaxin11	STX11	FLH4
munc18-2	STXBP2	FLH5
rab27a	RAB27A	Griscelli syndrome type 2
AP3β1 subunit	AP3B1	Hermansky-pudlak syndrome type 2
Other PID proteins		
p91phox	CYBB	Chronic granulomatous disease
p47phox	NCF1	Chronic granulomatous disease
p67phox	NCF2	Chronic granulomatous disease
p40phox	NCF4	Chronic granulomatous disease
WASP	WASP	Wiskott-Aldrich syndrome
BTK	BTK	X-linked agammaglobulinemia
Integrin beta-2	ITGB2	LAD type 1



【今後の展開】

本研究を通じて得られた知見より、DBS 検体を用いた新生児 PID スクリーニング実用化の可能性が示された。今後は、他疾患の責任蛋白についても検討を行ってスクリーニングの対象疾患を増やすと共に、感度・特異度の評価とコスト削減について検討を行う予定である。