

200936084A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

「ダウン症候群でみられる一過性骨髄異常
増殖症の重症度分類のための診断基準と
治療指針の作成に関する研究」

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 林 泰秀

平成22（2010）年3月

目 次

I. 総括研究報告

ダウン症候群でみられる一過性骨髄異常増殖症の重症度分類のための診断基準と
治療指針の作成に関する研究

林 泰 秀 3

II. 分担研究報告

1. ダウン症候群でみられる一過性骨髄異常増殖症の
遺伝子変異による病型分類に関する研究

伊 藤 悦 朗 15

2. TAMの病態への関与が疑われる染色体異常とその関連遺伝子に関する研究

滝 智 彦 17

3. 一過性骨髄異常増殖症の重症度分類のための
細胞表面マーカー解析と細胞保存に関する研究

大 喜 多 肇 19

4. ダウン症候群に併発する造血異常における網羅的ゲノム解析

小 川 誠 司 23

5. TAM症例の登録システムと治療指針の確立のための臨床試験に関する研究

菊 地 陽 27

6. 新生児期に発見されたTAM症例に対する新生児科医の対応と

フォローアップのマニュアルの作成 そのための基礎調査としてのサーベイランス

田 村 正 徳 29

7. 一過性骨髄異常増殖症の重症度分類のための診断基準と治療指針の
新生児臨床における活用に関する研究

塚 本 桂 子 33

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 41

IV. 研究成果の代表的論文 49

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
総括研究報告書

ダウン症候群でみられる一過性骨髄異常増殖症の重症度分類のための診断基準と
治療指針の作成に関する研究

研究代表者 林泰秀 群馬県立小児医療センター院長

研究要旨:ダウン症候群では新生児期に一過性に白血病様芽球が末梢血中に増加することがあり、一過性骨髄異常増殖症(transient abnormal myelopoiesis, TAM)と呼ばれている。その頻度は約10%(100人/年)とされているが、新生児期に発症するため新生児施設で診断、治療されることも多く、また自然治癒する予後良好な疾患と考えられていたため登録もされず、正確な数の把握はされていなかった。最近の多数例の検討で、TAMの死亡例が20~30%みられることが報告されたが、重症例を診断するための診断基準も、重症例に対する標準的治療もまだ確立していない。これまで新生児専門医と小児血液専門医で別々に行なわれていたTAMの診断と治療が、今年度の研究班の活動により新生児科医師が日本小児血液学会の疾患登録システムを用いることにより一本化され、TAMの全体像の把握が可能となった。また、このシステムに登録されていない新生児側の症例については、日本未熟児新生児学会の希有疾患サーベイランス委員会の対象疾患として承認されたので、これまで把握できなかった新生児施設のみに入院したTAM症例も把握できるようになった。さらに、重症例の抽出と病態解明のために、今年度は、これまでの検体でマーカー、染色体、GATA1等の発症・進展に関与すると思われる既知の遺伝子解析に加え、網羅的ゲノムアレイによる解析を行い、TAMでみられた切断点近傍の遺伝子解析、GATA1変異と臨床像の関係の解析を行うことができ、TAMの発症機序の解明に貢献できた。今後、登録される多数の症例の細胞保存システムを利用して解析すれば、TAMでみられる高サイトカイン血症や肝線維症の機序やTAMの分子機構およびモザイク型ダウン症候群や正常児に発生したTAMの機序の解明に役立つ。また、TAMから白血病に進展する機序も明らかになり、ひいては成人のがんの発生と進展機構の解明にも貢献すると思われる。

研究分担者氏名

伊藤悦朗 弘前大学医学部 教授
滝智彦 京都府立医科大学 講師
大喜多肇 国立成育医療センター 室長
小川誠司 東京大学大学院医学系研究科 特任准教授
菊地陽 東京大学大学院医学系研究科 准教授
田村正徳 埼玉医科大学総合医療センター 教授
塚本桂子 国立成育医療センター 医員

A. 研究目的

ダウン症候群では新生児期に一過性に白血病様芽球が末梢血中に増加することがあり、一過性骨髄異常増殖症(transient abnormal myelopoiesis, TAM)と呼ばれている。その頻度は約10%(100人/年)とされているが、新生児期に発症するため新生児施設で診断、治療されることも多く、また自然治癒する予後良好な疾患と考えられていたため登録もされず、正確な数の把握はされていなかった。多数例の検討で、死亡例

が20~30%みられることが報告されたが、重症例を診断するための診断基準も、重症例に対する標準的治療もまだ確立していない。近年、重症例に対して少量シタラビンによる治療の有効性も示されつつあり、前方視的試験により国内のTAM症例の重症度の診断と予後を正確に把握する必要性が高まっている。TAMの登録システムを立ち上げて全数把握を試み、重症例の診断基準を確立し、詳細な二次調査を通じて標準的治療の確立を目指した観察研究を行い予後の改善と生存の質を向上させることが研究の目的である。

B. 研究方法

1) 疾患登録システムの確立(図1)

① 日本小児血液学会の登録システム

日本小児血液学会の疾患登録システムの中でTAMの登録システムを立ち上げ、これを用いて新生児科の医師も小児血液学会員を通してオンラインによる登録ができるようにする。オンライン登録ができない場合は、FAXによる登録も受け付ける。この研究は

日本の小児血液腫瘍疾患診療施設の9割以上が加盟する日本小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)に今年度から設置されたTAM委員会が実施主体となって行われる。

②日本未熟児新生児学会の登録システム

A) 日本未熟児新生児学会の学会事業としての稀有疾患サーベイランスの利用

TAMは血液疾患ではあるが、新生児期に発症する疾患であり、新生児集中治療室(NICU)施設で診療することが多い。そして、NICU施設に必ずしも小児血液専門医が在籍しているとは限らない。以上のような状況より小児血液学会の疾患登録のみでは把握できない症例が多数あると考えられるため、日本未熟児新生児学会の稀有疾患サーベイランスで症例を把握することにし理事会に申請した。

B) サーベイランス非参加施設の調査

日本周産期・新生児医学会新生児専門医研修登録施設458施設のうち、日本未熟児新生児学会稀有疾患サーベイランス参加施設118施設を除いた346施設を対象としてアンケート調査を行った。質問は、施設規模などに関する基本情報、ダウン症症例数とTAM症例数を問う1次調査票と、日本小児血液学会の疾患登録を行っていない症例についての詳細を後方視的に調査する2次調査票の2部構成とした。1次調査票では、施設の基本情報に加えて、相談できる小児血液専門医の有無と日本小児血液学会の疾患登録の有無を質問した。その上で、日本小児血液学会疾患登録を行っていない症例のみの臨床経過、検査データなどを2次調査票に記入していただいた。

このアンケートを2006～2008年の症例について、2009年から2012年までの3年間、毎年それぞれの年の症例について調査を企画した。まず、今年度は2006～2008年の症例についての後方視的調査を行った。各症例についての臨床経過、検査データなどは、各施設の倫理基準に則り、診療情報の2次利用に関して承認を得た上で、個人を特定できる情報を除外して分担研究者が収集処理することとした。

2) 重症例の抽出と病態解析

重症例の抽出のための方法として臨床所見以外に、遺伝子解析や網羅的ゲノム解析を行い、精度の高い診断と病態解明を目指した。特に、重症のTAMで見られる高サイトカイン血症や肝線維症の有無と遺伝子異常や網羅的ゲノム解析の結果との関係を明らかにすることが、重症例抽出のための診断基準を作成するにあたって重要と思われる。

① 染色体・遺伝子解析

染色体異常を有するTAM症例のカルノア固定液を用いてSKY法やFISH法を行った。また、DNAを用いてAffymetrix社のGeneChip Human mapping 250K

Styアレイによりコピー数の増減を検討した。

② GATA1遺伝子等の解析

これまでに全国から弘前大学小児科に集められた100例以上のTAMの臨床検体の遺伝子解析を行った。末梢血からDNAおよびRNAを抽出しGATA1遺伝子を解析した。

③ 網羅的ゲノム解析

ダウン症候群に生じたTAMの初診時と寛解時検体、急性巨核芽球性白血病(AMKL)をのちに発症している場合にはそのAMKL検体を対象とし、計39検体の解析を行った。解析にはAffymetrix社のGeneChip Human Mapping 250Kアレイを用い、ゲノム全域にわたる網羅的なゲノムコピー数やアレル不均衡の解析を行い、ゲノム異常の詳細について検討を行った。

④ マーカー解析

TAM芽球のマーカー解析を末梢血、骨髄、臍帯血を用いて全血法により蛍光3～10重染色し、溶血後、Beckman-Coulter社のフローサイトメトリーFC500(2レーザー・5カラー)およびGallios(3レーザー・10カラー)を用いて解析し、3カラー(CD45-gating+2カラー)、5カラー(CD45-gating+4カラー)、10カラー(CD45-gating+9カラー)のそれぞれの解析の精度について比較を行なった。

⑤ サイトカインの測定

血清の各種サイトカイン値の測定をTAMの3症例でマイクロビーズアレイシステム(Bio-Plex, Bil Rad)を用いて行った。

3) 細胞保存

マーカー解析の残余白血球について、細胞保存液セルバンカー(十慈フィールド)を用いて液体窒素中に凍結保存し、解凍後の細胞解析、RNAおよびDNA抽出とその品質について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究事業で行われる臨床試験は、日本小児血液学会臨床研究審査委員会の承認の後、各施設の倫理委員会の承認を得て実施する。本研究で行うゲノム解析は、政府の定める各種倫理指針に準拠し、参加研究施設の倫理委員会の審査・承認を得て行われた。

C. 研究結果

1) 疾患登録システムの確立(図1)

① 日本小児血液学会の登録システム

日本におけるTAMの実態の把握のためのシステム作りとしてJPLSGにTAM委員会が昨年度6月に設置され、その後計4回のTAM委員会を開催し、欧米と日本のこれまでに報告されたTAMの多数例を解析した。その結果、出生時白血球数10万/ μ l以上かつ

在胎週数37週未満の症例において生存率が20-40%程度と他の群と比較して著しく予後不良であり、この2つの指標を用いて重症度分類を行うことが最も妥当であると結論した。また、日本小児血液学会疾患登録や日本小児血液学会 MDS 委員会による後方視的調査から、日本において臨床的に発見される TAM の発症数は年間 20-30 例であると推定された。しかし、これらの情報はいずれも後方視的調査によるものであり、診断の正確性や症例の把握率に関しては不十分なため、中央診断を行った上での前方視的登録による実態把握が不可欠であると考えられ、前方視的な臨床研究の必要性が確認された。臨床研究の方法としては新規治療法の開発を目指した介入研究は症例が希少であることや過去における有効な治療に関するエビデンスも少ないことなどから時期尚早と判断し、中央診断による確実な症例の把握とそれらの症例の確実な追跡を目的とした前方視的登録による観察研究を計画することとなった。そして過去に有用性が報告されているシタラビン少量療法やステロイド療法、交換輸血などを推奨治療として呈示した上で、まずは各施設判断で治療を行い、次期試験以降において介入研究をめざすこととなった。

②日本未熟児新生児学会の登録システム

A) 日本未熟児新生児学会の学会事業としてのサーベイランス

TAMを診療する本邦のNICUでは、小児血液専門医が不在の施設もあり、治療に難渋する症例や不必要な抗癌剤の投与が行われる症例があると考えられる。また、TAM症例ではGATA1遺伝子の変異が必発であるが、新生児科領域ではそのような芽球の遺伝子異常をルーチンでは調べていない。今回、この研究を進めることで、NICUでのTAM症例を把握し、臨床データを蓄積して、それを基に適切な対応やフォローアップができるようになると思われる。

B) サーベイランス非参加施設

アンケート調査を2010年2月に実施し、117(34.3%)施設から回答を得て、中間結果を集計した。これらの施設は総合周産期施設14、地域周産期施設51、その他施設 52 であった。対象とした施設群は、日本周産期新生児学会周産期専門医研修施設に 2004 年に登録、指定された施設を基にしたが、この間に、産科・NICU が閉鎖した施設が 9 施設みられた。2006-2008 年の 3 年間の、TAM 症例は 42 例で、各施設でのダウン症の総数に対する割合は 8.0%と、一般的にいわれている値よりもやや低かった。TAM 症例について相談できる小児血液専門医が在籍していない施設が半分以上を占めた。日本小児血液学会にすでに登録されていた 6 例を除く TAM 36 症例の詳細について、2次調査票によりデータを収集し、今後回収される調査票と併せて、解析を進めている。

2) 重症例の抽出と病態解析

① 染色体・遺伝子解析

染色体異常を有する3つのクローンを持つTAM症例のGATA1変異を解析したところ、この症例のTAM細胞でのGATA1変異は欠失-挿入型のユニークなものであった。症例の芽球は2ヵ月で自然消滅したが、生後10ヵ月の時に再び芽球が増加し、AMKLと診断され、細胞の染色体分析では3クローンのうちの1つのクローンのみの異常を認めた。このことから、TAMとAMKLで共通にみられた不均衡転座の切断点にTAMおよびAMKLの発症に関与している遺伝子が存在すると考えられた。一方、TAMでのみみられたinv(6)(p23q21)の切断点、del(13)(q?)の欠失領域にある遺伝子の中に自然消滅するTAMの発症に関与している可能性も考えられ、ゲノムアレイおよびFISH法によりその詳細を検討中である。

② GATA1 遺伝子等の解析

2003年から2008年までに78例のTAMの臨床検体を収集し、GATA1遺伝子の解析を行った。GATA1遺伝子変異は72例に検出された。6例は複数のGATA1変異を有していたため、今回の解析からは除外した。残りの66例(男児32例、女児34例)の内、生後6ヶ月以内の早期死亡は16例(24.2%)であった。早期死亡例の予後因子は、これまでの研究で既に報告されていたものと同じであった。11例(16.7%)は、その後白血病を発症した。白血病発症に関わる因子は、総ビリルビンの低値のみであった($p = 0.023$)。

マウスを用いた実験では、GATA1の発現量を低下させることにより白血病が発症することが知られているが、ヒトのTAM芽球のGATA1s発現量に関与する研究は見当たらない。今年度は転写産物の種類によりGATA1遺伝子変異を分類し、その遺伝子発現の様式を解析した。現在、遺伝子変異とTAMの表現型について解析を進めている。

③ 網羅的ゲノム解析

A) TAM細胞に生じているゲノム異常

今回検討を行ったTAM検体のゲノム解析では、21番染色体の過剰以外にゲノムコピー数異常やアレル不均衡は検出されなかった。SNPアレイの特性を生かしてヘテロSNP箇所であレル特異的なコピー数解析を行うことにより、この過剰であった21番染色体は、uniparental disomyに由来することが多いと推定された。NOTCH経路を制御する遺伝子群(*NOTCH1*、*HES1*、*DLL1*)についての発現量を定量PCR法を用いて検討したところ、TAMでは高発現であることが確認された。

B) ダウン症候群に合併した白血病に生じているゲノム異常

TAMの経過後に発症したAMKLのゲノム解析では、21番染色体のtrisomy以外に、複数のゲノム異常が観察された。最も多い付加的なゲノム異常は1番染色体

長腕の増加であり、全体の22%にこの領域の異常がみられた。7番染色体の欠失が次いで多くみられた(16.7%)。その他、19番染色体長腕の増加や、7番染色体短腕の欠失も複数の症例で共通してみられた。

④ マーカー解析

TAM5例の末梢血および臍帯血の白血球表面マーカー解析を行なった。いずれも、CD33陽性の骨髓球系の細胞の増殖が認められ、CD7やCD34が陽性で未熟な性質を示すとともに、巨核球・血小板系抗原を発現する等の共通した性質を有していたが、巨核球・血小板系抗原の発現の状況は多様であり、他の抗原の発現も多様であった。また、CD56やCD244等のNKあるいは細胞傷害性T細胞マーカーを発現している症例も多かった。

3カラー、5カラー、10カラー解析の比較を行なったところ、10カラー解析でも抗体の組合せを工夫することにより、蛍光補正や抗体結合の干渉などの問題もなく、精度の高い解析が可能であった。さらに同時に多くの抗原を検出することによって、抗体の相互の発現状況について把握することが可能であった。5カラーでは3カラーの1/2、10カラーでは3カラーの1/4以下の検体量で同じ項目数を測定可能であり、検体の節約の面からも非常に有用であった。

⑤ サイトカインの測定

IL-1 β 、TNF- α 、INF- γ の高値例があった。サイトカインと臨床像の関係を検討中である。

3) 細胞保存

マーカーに用いた芽球の残余細胞を液体窒素に凍結保存し、解凍後にマーカー解析、RNAおよびDNA抽出を行なったところ、いずれの操作も可能であった。しかし、凍結保存せずに処理した場合、RNAあるいはDNA抽出液に溶解して凍結保存した場合と比較したところ、細胞が凝集しやすいこと、核酸の収率が著しく減少すること等の難点が経験された。

D. 考察

今年度の研究班の活動により新生児科医師が日本小児血液学会の疾患登録システムを用いることにより一本化された。これにより TAM の全体像の把握が可能となり、これまで診療する医師により分断されていた TAM の診断と治療が統一される画期的なことになった。また、このシステムに登録されていない新生児側の症例については、日本未熟児新生児学会の希有疾患サーベイランス委員会の対象疾患として承認されたので、これまで把握ができなかった新生児施設のみに入院した TAM 症例も把握できるようになった。

平成 22 年度以降はこれまでに登録された多数例の詳細な二次調査を行ない、TAM 重症例の診断基準を確立し、重症例に対してはシタラビン少量療法の

投与量や投与時期を決定し、標準的治療法を提言し、全国的な観察研究を行なう。このことにより予後不良であった TAM の予後を改善することができ、死亡例を減少させるのみならず、重症例の生存の質(QOL)を改善し、長期入院する患者が少なくなり、経済的効果も得られると思われる。

また、重症例の抽出と病態解明のために、今年度はこれまでの検体を用いて、マーカー、染色体、GATA1等のTAMの発症・進展に関与すると思われる既知の遺伝子解析に加え、ゲノムアレイによる網羅的ゲノム解析を行った。それによって TAM でみられた染色体切断点近傍の遺伝子解析、GATA1 変異と臨床像の関係の解析を行うことができ、TAM の機序の解明に貢献できた。今後、登録される多数の症例の細胞保存システムを利用して解析すれば、TAM でみられる高サイトカイン血症や肝線維症の機序や TAM の分子機構およびモザイク型ダウン症候群や正常児に発生した TAM の機序の解明に役立ち、TAM から白血病に進展する機序も明らかになり、ひいては成人のがんの発生と進展機構の解明にも貢献すると思われる。

E. 結論

今年度の研究班の活動により、新生児科医師が日本小児血液学会の疾患登録システムを用いることにより登録システムが一本化された。これにより TAM の全体像の把握が可能となり、これまで新生児専門医と小児血液専門医で別々に行なわれていた TAM の診断と治療が統一されることになった。今後は重症例に対して観察研究を行う予定である。また重症例の抽出と病態解明のための解析を進め、これらの研究の継続により予後不良であった重症の TAM の予後が改善されるのみならず、生存の質も改善されると思われる。

F. 健康危険情報

今年度は登録システムを確立しているところであり、健康危険情報はまだない。今後シタラビン少量療法等の観察研究が開始されると、有害事象に対して注意を払う必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kitoh T, Taki T, Hayashi Y, Nakamura K, Irino T, Osaka M. Transient abnormal myelopoiesis in a Down syndrome newborn followed by acute myeloid leukemia: identification of the same chromosomal abnormality in both stages. *Cancer Genet Cytogenet.* 2009, 188:99-102.
2. 菊地陽. ダウン症候群と transient abnormal myelopoiesis (TAM) について. *日小血会誌* 2009, 23:58-61.

3. Ono R, Kumagai H, Nakajima H, Hishiya A, Taki T, Horikawa K, Takatsu K, Satoh T, Hayashi Y, Kitamura T, Nosaka T. Mixed-lineage-leukemia (MLL) fusion protein collaborates with Ras to induce acute leukemia through aberrant Hox expression and Raf activation. *Leukemia*. 2009, 23 : 2197–2209.
4. Kurosawa H, Okuya M, Matsushita T, Kubota T, Endoh K, Kuwashima S, Hagsawa S, Sato Y, Fukushima K, Sugita K, Okada Y, Park MJ, Hayashi Y, Arisaka O. JAK2V617F mutation-positive childhood essential thrombocythemia associated with cerebral venous sinus thrombosis. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2009, 31 : 678–680.
5. Sanada M, Suzuki T, Shih LY, Otsu M, Kato M, Yamazaki S, Tamura A, Honda H, Sakata-Yanagimoto M, Kumano K, Oda H, Yamagata T, Takita J, Gotoh N, Nakazaki K, Kawamata N, Onodera M, Nobuyoshi M, Hayashi Y, Harada H, Kurokawa M, Chiba S, Mori H, Ozawa K, Omine M, Hirai H, Nakauchi H, Koefler HP, Ogawa S. Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms. *Nature*. 2009, 460 : 904–908.
6. Takita J, Motomura A, Koh K, Ida K, Taki T, Hayashi Y, Igarashi T. Acute megakaryoblastic leukemia in a child with the MLL-AF4 fusion gene. *Eur J Haematol*. 2009, 83 : 149–153.
7. Taketani T, Taki T, Nakamura H, Taniwaki M, Masuda J, Hayashi Y. NUP98-NSD3 fusion gene in radiation-associated myelodysplastic syndrome with t(8;11)(p11;p15) and expression pattern of NSD family genes. *Cancer Genet Cytogenet*. 2009, 190 : 108–112.
8. Watanabe-Okochi N, Oki T, Komeno Y, Kato N, Yuji K, Ono R, Harada Y, Harada H, Hayashi Y, Nakajima H, Nosaka T, Kitaura J, Kitamura T. Possible involvement of RasGRP4 in leukemogenesis. *Int J Hematol*. 2009, 89 : 470–481.
9. Mizoguchi Y, Fujita N, Taki T, Hayashi Y, Hamamoto K. Juvenile myelomonocytic leukemia with t(7;11)(p15;p15) and NUP98-HOXA11 fusion. *Am J Hematol*. 2009, 84 : 295–297.
10. Park MJ, Taki T, Oda M, Watanabe T, Yumura-Yagi K, Kobayashi R, Suzuki N, Hara J, Horibe K, Hayashi Y. FBXW7 and NOTCH1 mutations in childhood T cell acute lymphoblastic leukaemia and T cell non-Hodgkin lymphoma. *Brit J Haematol*. 2009, 145:198–206.
11. Jo A, Tsukimoto I, Ishii E, Asou N, Mitani S, Shimada A, Igarashi T, Hayashi Y, Ichikawa H. Age-associated difference in gene expression of pediatric acute myelomonocytic lineage leukemia (FAB M4 and M5 subtypes) and its correlation with prognosis. *Brit J Haematology*. 2009, 144: 917–929.
12. Toki T, Kanezaki R, Adachi S, Fujino H, Xu G, Sato T, Suzuki K, Tauchi H, Endo M and Ito E. The key role of stem cell factor/KIT signaling in the proliferation of blast cells from Down syndrome-related leukemia. *Leukemia*. 2009, 23:95–103.
13. Matsuda K, Sakashita K, Taira C, Tanaka-Yanagisawa M, Yanagisawa R, Shiohara M, Kanegane H, Hasegawa D, Kawasaki K, Endo M, Yajima S, Sasaki S, Kato K, Koike K, Kikuchi A, Ogawa A, Watanabe A, Sotomatsu M, Nonoyama S and Koike K. Quantitative assessment of PTPN11 or RAS mutations at the neonatal period and during the clinical course in patients with juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2010 (in press)
14. Hasegawa D, Manabe A, Yagasaki H, Ohtsuka Y, Inoue M, Kikuchi A, Ohara A, Tsuchida M, Kojima S, Nakahata T. on behalf of Japanese Childhood MDS Study Group Treatment of children with refractory anemia: the Japanese childhood MDS Study Group. *Pediatr Blood Cancer*. 2009, 53: 1011–1015.
15. Yoshida N, Yagasaki H, Yoshimi A, Takahashi Y, Xu Y, Hama A, Nishio N, Muramatsu H, Watanabe N, Matsumoto K, Kato K, Ueyama J, Inada H, Goto H, Yabe M, Mimaya J, Kikuchi A, Manabe A, Kojima S. Clinical features and prognostic impact of GM-CSF signaling pathway-related genes in juvenile myelomonocytic leukemia. *Pediatr Res*. 2009, 65: 334–340.
16. Isoda T, Ford AM, Tomizawa D, van Delft FW, Gonzalez De Castro D, Mitsui N, Score J, Taki T, Morio T, Takagi M, Saji H, Greaves M, Mizutani S. Immunologically silent cancer clone transmission from mother to offspring. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009, 106: 17882–17885.
17. Nakahata S, Saito Y, Hamasaki M, Hidaka T, Arai Y, Taki T, Taniwaki M, Morishita K. Alteration of enhancer of polycomb 1 at 10p11.2 is one of the genetic events for developing adult

- T-cell leukemia/lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009, 48: 768-776.
18. Matsumoto Y, Taki T, Fujimoto Y, Taniguchi K, Shimizu D, Shimura K, Uchiyama H, Kuroda J, Nomura K, Inaba T, Shimazaki C, Horiike S, Taniwaki M. Monosomies 7p and 12p and FLT3 internal tandem duplication: possible markers for diagnosis of T/myeloid biphenotypic acute leukemia and its clonal evolution. *Int J Hematol*. 2009, 89: 352-358.
 19. Nagata S, Toyoda M, Yamaguchi S, Hirano K, Makino H, Nishino K, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Nakagawa M, Yamanaka S, Akutsu H, Umezawa A, Tada T. Efficient Reprogramming of Human and Mouse Primary Extra-Embryonic Cells to Pluripotent Stem Cells, *Genes to Cells*. 14 : 1395-1404, 2009
 20. Kato M, Sanada M, Kato I, Sato Y, Takita J, Takeuchi K, Niwa A, Chen Y, Nakazaki K, Nomoto J, Asakura Y, Muto S, Tamura A, Iio M, Akatsuka Y, Hayashi Y, Mori H, Igarashi T, Kurokawa M, Chiba S, Mori S, Ishikawa Y, Okamoto K, Tobinai K, Nakagama H, Nakahata T, Yoshino T, Kobayashi Y, Ogawa S. Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature*. 2009, 459:712-716.
 21. Yokoyama Y, Suzuki T, Sakata-Yanagimoto M, Kumano K, Higashi K, Takato T, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S. Derivation of functional mature neutrophils from human embryonic stem cells. *Blood*. 2009, 113:6584-6592.
 22. Kawamata N, Ogawa S, Seeger K, Kirschner-Schwabe R, Huynh T, Chen J, Megrabian N, Harbott J, Zimmermann M, Henze G, Schrappe M, Bartram CR, Koeffler HP. Molecular allelokaryotyping of relapsed pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Int J Oncol*. 2009, 34:1603-1612.
 23. Akagi T, Shih LY, Ogawa S, Gerss J, Moore SR, Schreck R, Kawamata N, Liang DC, Sanada M, Nannya Y, Deneberg S, Zachariadis V, Nordgren A, Song JH, Dugas M, Lehmann S, Koeffler HP. Single nucleotide polymorphism genomic arrays analysis of t(8;21) acute myeloid leukemia cells. *Haematologica*. 2009, 94:1301-1306.
 24. Akagi T, Ogawa S, Dugas M, Kawamata N, Yamamoto G, Nannya Y, Sanada M, Miller CW, Yung A, Schnittger S, Haferlach T, Haferlach C, Koeffler HP. Frequent genomic abnormalities in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome with normal karyotype. *Haematologica*. 2009, 94:213-223.
 25. Ezaki S, Suzuki K, Kurishima C, Miura M, Moriwaki K, Arakawa H, Kunikata T, Sobajima H, Tamura M. Levels of catecholamines, arginine vasopressin and atrial natriuretic peptide in hypotensive extremely low birth weight infants in the first 24 hours after birth.. *Neonatology*. 2009, 95:248-255.
2. 学会発表
 1. 朴明子, 佐野弘純, 小笠原水穂, 嶋田明, 外松学, 井田孔明, 林泰秀. Down 症候群に伴う transient abnormal myelopoiesis (TAM) の予後因子についての検討. 第 51 回日本小児血液学会, 千葉, 2009.11.27-29
 2. 加藤元博, 滝田順子, 朴明子, 真田昌, 川俣紀彦, Claus Bartrum, H Phillip Koeffler, 菊地陽, 五十嵐隆, 小川誠司, 林泰秀. 21 trisomy と小児急性リンパ性白血病. 第 51 回日本小児血液学会, 千葉, 2009.11.27-29
 3. 土岐力, 伊藤悦朗. ダウン症候群と血液腫瘍(シンポジウム:小児血液腫瘍の発症リスクと先天異常). 第 71 回日本血液学会学術集会、平成 21 年 10 月 25 日、京都市.
 4. 松原亜以子, 加藤元博, 真田昌, 滝田順子, 千葉滋, 林泰秀, 小俣政男, 小林幸夫, 渡邊俊樹, 石川雄一, 吉野正, 小川誠司. 各種腫瘍における高密度 SNP アレイを用いた網羅的ゲノムプロファイリング. 第 68 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2009.10.1-3
 5. 朴明子, 加藤元博, 清河信敬, 真田昌, 滝田順子, 小川誠司, 林泰秀. 小児 T 細胞型急性リンパ性白血病における網羅的ゲノム解析. 第 68 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2009.10.1-3
 6. Hasegawa D, Ogawa C, Hirabayashi S, Park MJ, Hayashi Y, Manabe A, Hosoya R. A Japanese pedigree with RUNX1 mutation resulting in FPD/AML. 第 71 回日本血液学会, 京都, 2009.10.23-25
 7. Park MJ, Kato M, Kiyokawa N, Sanada M, Takita J, Ogawa S, Hayashi Y. Genome-wide analysis of pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. 第 71 回日本血液学会, 京都, 2009.10.23-25
 8. Taketani T, Taki T, Fukada S, Yamaguchi S, Hayashi Y. Clinical significance of somatic mutations in hematological malignancies with NUP98-fusion genes. 第 71 回日本血液学会, 京都, 2009.10.23-25
 9. Okubo J, Kato M, Takita J, Sanada M, Ohki K, Nishimura R, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y,

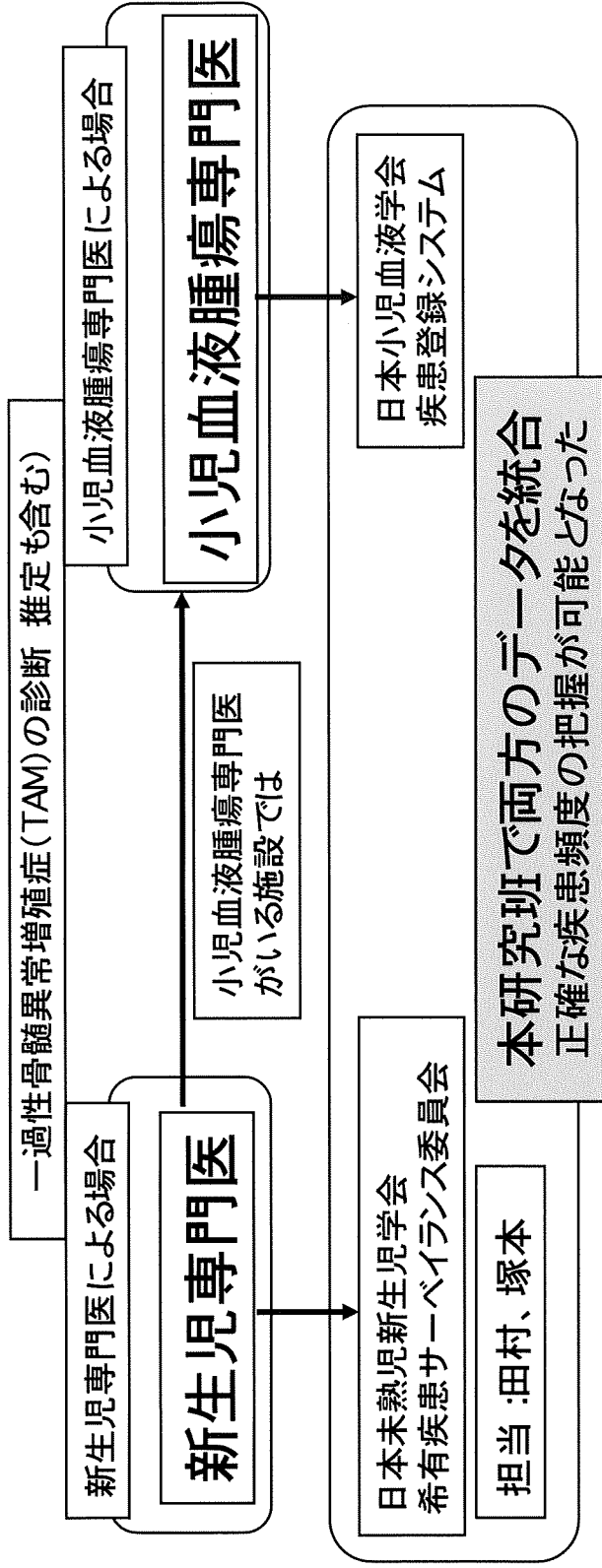
Ogawa S. Molecular allelo-karyotype of adult acute lymphoblastic leukemia(ALL) and pediatric ALL. 第 71 回日本血液学会, 京都, 2009.10.23-25

10. 佐野弘純, 朴明子, 外松学, 今野友貴, 伊藤悦朗, 林泰秀. 新規のリボソームタンパク遺伝子変異を認めた Diamond-Blackfan 貧血の一例. 第 51 回日本小児血液学会, 千葉, 2009. 11.27-29

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

TAMの正確な患者数を把握するためのシステム



TAMの診断基準、治療指針の作成のためのシステム

日本小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)
TAM委員会

ダウン症候群に合併したTAMに対する多施設共同観察研究
(研究計画書作成中→次年度早期に日本小児血液学会
研究審査委員会に提出予定)

- ・診断基準の作成につながる因子の抽出
- ・治療指針の作成につながるデータの収集
- ・中央診断:末梢血GATA解析、
- ・末梢血マーカー診断→(残細胞保存)

平成 21 年度班会議

第 1 回 平成 21 年 6 月 19 日

名古屋

第 2 回 平成 21 年 7 月 25 日

松山市

第 3 回 平成 21 年 11 月 7 日

名古屋

平成 21 年度 JPLSG TAM 委員会

第 1 回 平成 21 年 6 月 19 日

名古屋

第 2 回 平成 21 年 9 月 6 日

東京

第 3 回 平成 21 年 11 月 7 日

名古屋

第 4 回 平成 22 年 2 月 28 日

東京

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

ダウン症候群でみられる一過性骨髄異常増殖症の遺伝子変異による
病型分類に関する研究

研究分担者 伊藤悦朗 弘前大学大学院医学研究科小児科 教授

研究要旨: 平成21年度はまず、本邦で発生する一過性骨髄異常増殖症(TAM)の正確な患者数を把握するための登録システムの構築を行った。これまでのTAMの診療での最も大きな問題点は、TAMを診療する医師が新生児専門医と小児血液専門医とに分かれてしまうことであった。そこで両者が診療したTAM症例を確実に把握するために、それぞれの専門医が所属する学会の中に登録システムを立ち上げることができた。本年度は、重症度分類のための診断基準と治療指針の作成のため、これまで弘前大学小児科で行った66例のGATA1遺伝子変異をもつTAM症例について、GATA1遺伝子と臨床所見や予後について解析を進めている。

A. 研究目的

本研究の目的は、ダウン症候群に伴うTAMの遺伝子解析を行い、治療介入が必要な重症TAMを抽出するための精度の高い診断基準と治療指針を作成することである。

B. 研究方法

これまでに全国から弘前大学小児科に集められた100例以上のTAMの臨床検体の遺伝子解析を行った。末梢血からDNAおよびRNAを抽出し、TAMのほとんどの症例で遺伝子変異が検出されているGATA1遺伝子を解析した。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析は、弘前大学医学部の倫理委員会の承認を得て、本人あるいは両親の同意の上実施した。

C. 研究結果

2003年から2008年までに78例のTAMの臨床検体を収集し、GATA1遺伝子の解析を行った。GATA1遺伝子変異はその内の72例に検出された。6例は複数のGATA1変異を有していたため、今回の解析からは除外した。残りの66例(男児32例、女児34例)の内、生後6ヶ月以内の早期死亡は16例(24.2%)であった。早期死亡は、早産、低出生体重児、診断時の白血球増多、末梢血中のTAM芽球比率の高値、体液貯留と出血傾向と関連がみられた。これらの予後因子は、これまでの研究で既に報告されていたものと同じであった。11例(16.7%)は、その後白血病を発症した。中央値は生後396日(221-747日)であった。白血病発症に関わる因子は、総ビリルビンの低値のみであった($p = 0.023$)。

TAMでは、ほとんどすべての症例にGATA1

遺伝子変異が生じ、その結果、N末端を欠いたGATA1タンパク(GATA1s)のみが発現している。マウスを用いた実験では、GATA1の発現量を低下させることにより白血病が発症することが知られているが、TAM芽球のGATA1s発現量に関する研究は見当たらない。我々は、転写産物の種類によりGATA1遺伝子変異を分類し、その遺伝子発現の様式を解析した。現在、遺伝子変異とTAMの表現形について解析を進めている。

D. 考察

これまでも国内外でTAMの予後に関する研究は行われているが、分子レベルの解析はない。我々は長期予後が明らかになっている臨床検体を多数収集し、GATA1遺伝子変異の種類から早期死亡や白血病発症の危険度を推定することが可能かどうか解析を進めている。今後、重症度分類のための診断基準と治療指針の作成のための基礎データとなると期待される。

GATA1遺伝子は、ほとんどすべてのTAM症例で変異が検出されている。したがって、TAMの確定診断のために非常に有用と考えられる。しかし、今回の解析では、78例中の6例に変異が認められなかった。これらは、いずれも末梢血の芽球の比率が低く、genomic DNAしか解析できなかった症例であった。一方、末梢血の芽球が少なかった症例でも、cDNAも解析可能であった検体はGATA1遺伝子変異の検出が可能であった。これは、末梢血ではTAM芽球以外にGATA1転写因子を発現している細胞はなく、TAM芽球は遺伝子変異を有するGATA1のみが発現しているためであると考えられる。特に女兒の芽球では、X染色体上に正常のGATA1遺伝子が存在するため、genomic DNAを解析する場合、感度が低くなると考えられる。以上より、GATA1変異の解析は末梢

血のmRNAの解析を第一に行うべきであると思われる。

E. 結論

GATA1遺伝子の解析は、TAMの診断ばかりではなく、予後の判定にも有用である可能性がある。本年度は、重症度分類のための診断基準と治療指針の作成のため、これまで弘前大学小児科で行った66例のGATA1遺伝子変異をもつTAM症例について、GATA1遺伝子と臨床所見や予後について解析を進めている。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

研究期間に本研究の成果に関係する論文発表なし

2. 学会発表

土岐力、伊藤悦朗. ダウン症候群と血液腫瘍(シンポジウム:小児血液腫瘍の発症リスクと先天異常). 第71回日本血液学会学術集会、平成21年10月25日、京都市.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

TAMの病態への関与が疑われる染色体異常とその関連遺伝子に関する研究

研究分担者 滝 智彦 京都府立医科大学 講師

研究要旨：染色体異常がほとんどみられないといわれてきた TAM 症例にみられた染色体異常を解析し、その切断点および欠失領域に TAM の病態に関与する可能性のある遺伝子を見出しつつある。TAM では頻度は少ないながらもこれまでさまざまな染色体異常が報告されており、今後行われる TAM の観察研究でさらに多くの TAM 関連染色体異常を収集することによって、TAM の発症、悪性化、AMKL への進展に関与する可能性のある遺伝子異常を同定できることが期待される。

A. 研究目的

ダウン症候群にみられる一過性骨髄異常増殖症 (TAM) では、そのほぼ全例にGATA1遺伝子変異がみられ、これはTAMの発症の初期段階に関与する異常であると考えられている。一方で、GATA1遺伝子変異以外のTAMに関与する染色体・遺伝子異常としては、21トリソミーの構成がTAM合併例ではほとんどが片親性ダイソミーであることが知られている以外は、他の白血病でよくみられるような染色体異常はほとんどみられないといわれていた。しかし、これまで少数例ではあるが染色体異常を有するTAM症例が報告されている。我々は、それらの染色体切断点や増幅・欠失領域の中に、TAMの悪性化やAMKLへの進展に関与する遺伝子が存在すると考え、それらの遺伝子を同定することにより、新しいTAMの診断や治療指針の決定に役立つマーカーの同定を目指している。

B. 研究方法

染色体異常を有するTAM症例のカルノア固定液を用いてSKY法やFISH法を行った。また、DNAを用いてAffymetrix社のGeneChip Human mapping 250K Styアレイによりコピー数の増減を検討した。（倫理面への配慮）

患児検体の解析にあたっては、患児の両親の同意を得て行なった。遺伝子解析については京都府立医科大学倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

我々は以前、A. 47,XY,inv(6)(p23q21),+21c、
B. 47,XY,der(7)t(1;7)(q25;p15),+21c、
C. 47,XY,del(13)(q?),+21cという染色体異常を有する複数のクローンを持つTAM症例のGATA1変異を解析した (Kitoh T, et al. Cancer Genet Cytogenet. 2009)。この症例のTAM細胞でのGATA1変異は欠失-挿入型のユニークなもので

あった。症例の芽球は2ヵ月で自然消滅したが、生後10ヵ月の時に再び芽球が増加し、AMKLと診断された。興味深いことに、AMKLの細胞の染色体分析ではBタイプのみを認め、AタイプとCタイプの異常は観察されなかった。このことから、TAMとAMKLで共通にみられたBタイプの不均衡転座の切断点にTAMおよびAMKLの発症に関与している遺伝子が存在すると考えられた。一方、TAMでのみみられたinv(6)(p23q21)の切断点、del(13)(q?)の欠失領域にある遺伝子の中に自然消滅するTAMの発症に関与している可能性も考えられ、現在ゲノムアレイおよびFISH法によりその詳細を検討している。

D. 考察

TAMにおける染色体異常の詳細な解析はこれまでほとんどないが、さまざまな報告の中にはいくつかの染色体異常が記載されている。その中には、①TAMでは21トリソミー以外に染色体異常はみられなかったが、AMKLで新たな染色体異常が出現した、②TAMでみられた染色体異常がAMKLでは消失した、③TAMでみられた染色体異常に加えてAMKLではさらに別の染色体異常が出現した例など、さまざまな形の染色体異常が存在する。我々の解析例との共通の染色体異常も存在し、このような染色体異常の詳細な解析が重要であると思われる。

E. 結論

これまで染色体異常はほとんどみられないといわれていたTAMにも、実際にはさまざまな染色体異常が存在している。これらの切断点や増幅・欠失領域の中に、TAMの悪性化やAMKLへの進展に関与する遺伝子が存在している可能性が示唆され、このような遺伝子を明らかにするために染色体分析情報は重要である。現在計画されている「TAMに対す

る多施設共同観察研究」では、従来あまり解析が行われてこなかったTAMの染色体分析情報を収集することを計画しており、それらの集積によって、TAMの発症、悪性化、AMKLへの進展に關与する遺伝子が同定できれば、その診断や治療戦略に役立つと思われる。

F. 健康危険情報 該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Taketani T, Taki T, Nakamura H, Taniwaki M, Masuda J, Hayashi Y. NUP98-NSD3 fusion gene in radiation-associated myelodysplastic syndrome with t(8;11)(p11;p15) and expression pattern of the NSD family genes. *Cancer Genet Cytogenet* 190: 108-112, 2009
2. Park M, Taki T, Oda M, Watanabe T, Yumura-Yagi K, Kobayashi R, Suzuki N, Hara J, Horibe K, Hayashi Y. FBXW7 and NOTCH1 mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia and T cell non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 145: 198-206, 2009
3. Mizoguchi Y, Fujita N, Taki T, Hayashi Y, Hamamoto K. Juvenile myelomonocytic leukaemia with t(7;11)(p15;p15) and NUP98-HOXA11 fusion. *Am J Hematol* 84: 295-297, 2009
4. Takita J, Motomura A, Koh K, Ida K, Taki T, Hayashi Y, Igarashi T. Acute megakaryoblastic leukemia in a child with the MLL-AF4 fusion gene. *Eur J Haematol* 83: 149-153, 2009
5. Isoda T, Ford AM, Tomizawa D, van Delft FW, Gonzalez De Castro D, Mitsuiki N, Score J, Taki T, Morio T, Takagi M, Saji H, Greaves M, Mizutani S. Immunologically silent cancer clone transmission from mother to offspring. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 17882-17885, 2009
6. Ono R, Kumagai H, Nakajima H, Hishiya A, Taki T, Horikawa K, Takatsu K, Satoh T, Hayashi Y, Kitamura T, Nosaka T. MLL fusion protein collaborates with Raf to induce acute leukemia through aberrant Hox expression and Raf activation. *Leukemia* 23: 2197-2209, 2009

2. 学会発表

1. Takeshi Isoda, Masatoshi Takagi, Masayuki Nagasawa, Tomohiro Morio, Tomohiko Taki, Masafumi Taniwaki, Shuki Mizutani. Materno-fetal transmission and loss of non-inherited maternal MHC in p190 type BCR-ABL leukemia. 第68回日本癌学会総会, 横浜, 2009年10月1~3日
2. Takeshi Taketani, Tomohiko Taki, Seiji Fukuda, Seiji Yamaguchi, Yasuhide Hayashi. Clinical

significance of somatic mutations in hematological malignancies with NUP98-fusion genes. 第71回日本血液学会学術集会, 京都, 2009年10月23~25日
3. Takeshi Isoda, Noriko Mitsuiki, Yuki Aoki, Dausuke Tomizawa, Masatoshi Takagi, Masayuki Nagasawa, Tomohiro Morio, Nakaba Ochiai, Tomohiko Taki, Masafumi Taniwaki, Hiroh Saji, Shuki Mizutani. Loss of NIMA as a possible role of materno-fetal transmission of p190 type BCR-ABL leukemia. 第71回日本血液学会学術集会, 京都, 2009年10月23~25日

4. 佐野弘純, 久保田知里, 朴 明子, 嶋田 明, 外松 学, 滝 智彦, 田渕 健, 多和昭雄, 堀部敬三, 土田昌宏, 花田良二, 月本一郎, 林 泰秀: 小児急性骨髄性白血病におけるWT1遺伝子変異と臨床像. 第71回日本血液学会学術集会, 京都, 2009年10月23~25日

5. 朴 明子, 滝 智彦, 小田 慈, 八木啓子, 小林良二, 鈴木信寛, 原 純一, 堀部敬三, 林 泰秀: T細胞性急性リンパ性白血病におけるPTENとPI3K-AKT経路の遺伝子異常. 第51回日本小児血液学会, 浦安, 2009年11月27~29日

6. 竹谷 健, 滝 智彦, 福田誠司, 山口清次, 林 泰秀: NUP98遺伝子再構成を有する小児造血器腫瘍に同定された遺伝子変異とその臨床的意義. 第51回日本小児血液学会, 浦安, 2009年11月27~29日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

一過性骨髄異常増殖症の重症度分類のための細胞表面マーカー解析と細胞保存に関する研究

研究分担者 大喜多 肇 国立成育医療センター研究所 室長

研究要旨: 現在検討されている、TAM の全数把握、検査値や臨床データから重症例の抽出と標準的治療を目指す前方視的な登録システムの中で、重症例抽出のための基礎データを蓄積するために有用な骨髄、末梢血のマーカー解析項目の選定を行うとともに、検査後の余剰検体を将来の研究に資するために有効に保存するシステムの確立を行った。

A. 研究目的

ダウン症候群の新生児期に一過性に白血球芽球が末梢血中に増加する疾患があり、一過性骨髄異常増殖症(transient abnormal myelopoiesis, TAM)と呼ばれている。その頻度はダウン症候群患児のおよそ10%(100人/年)といわれているが、正確な数の把握はなされていない。TAMの多くの症例では染色体は正常であるが、GATA1遺伝子の変異が同定されており、この変異はTAM発症に関係していると考えられている。これまで、無治療経過観察のみで芽球は自然に消失し、比較的予後良好であると考えられていたが、近年臓器障害のために早期死亡する症例が約30%みられることが報告されている。一方、こういった重症例に対して少量シタラビンによる化学療法の有効性も示されつつあり、前方視的試験により国内のTAM症例の重症度の診断と予後を正確に把握する必要性が高まっている。

TAMは新生児期に発症するため、これまで新生児施設で診断、治療する事が多く、また予後良好と考えられていたため登録もされず、本邦における全数把握もされていない。また自然治癒する例と、難治例の鑑別が困難であり、難治例に対する標準的治療も確立していない。現在、小児血液学会の登録システムを用いて、新生児科の医師も小児血液学会員を通して登録ができるようにし、全数把握を試み、重症例の抽出を行うことが計画されている。

欧米ではTAMについては従来から解決すべき大きな問題とされていたが、米国のCOGグループとヨーロッパのI-BFMグループが検討を報告した。また我が国においても未熟児、新生児学会において血液と新生児の医師が合同でシンポジウムを開催し協議の場が設けられた。本邦の後方視的解析では妊娠在胎週数、血清ビリルビン値等が予後不良因子であるとされた。本研究では、現在検討されている、全数把握、検査値や臨床データから重症例の抽出と標準的治療を

目指す前方視的な登録システムの中で、骨髄、末梢血のマーカー解析を行って、重症例抽出のための基礎データを蓄積するとともに、検査後の余剰検体を将来の研究に資するために保存するシステムを立ち上げることを目的とした。

B. 研究方法

白血球のマーカー解析の発現状況について、末梢血、骨髄、臍帯血を全血法により蛍光3〜10重染色し、溶血後、Beckman-Coulter社のフローサイトメトリーFC500(2レーザー・5カラー)およびGallios(3レーザー・10カラー)を用いて解析し、3カラー(CD45-gating+2カラー)、5カラー(CD45-gating+4カラー)、10カラー(CD45-gating+9カラー)のそれぞれの解析の精度について比較を行なった。解析の残余白血球について、細胞保存液“セルバンカー(十慈フィールド)”を用いて液体窒素中に凍結保存し、解凍後の細胞解析、RNAおよびDNA抽出とその品質について検討した。

(倫理面への配慮)

患児検体の解析にあたっては、患児の保護者・親権者に説明の上、検査施設に検体を送付して検査を行なうことの同意を取得した上で行なった。当該施設における血液疾患罹患患児のマーカー検査の実施については倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

TAM患児5例の末梢血および臍帯血の白血球マーカー解析を行なった。結果を表1に示す。いずれも、CD33陽性の骨髄球系の細胞の増殖が認められ、CD7やCD34が陽性で未熟な性格を示すとともに、巨核球・血小板系抗原を発現する、等の共通した性格を認めたが、巨核球・血小板系抗原の発現の状況は多様であり、他の抗原の発現も多様であった。また、CD56やCD244等のNKあるいは細胞傷害性T細胞マーカーを示す症例も多かった。

3カラー、5カラー、10カラー解析の比較を行なったところ、10カラー解析でも抗体の組合せを工夫することにより、蛍光補正や抗体結合の干渉などの問題もなく、精度の高い解析が可能であり、さらに同時に多くの抗原を検出することによって、抗体の相互の発現状況について把握することが可能であった。さらに、5カラーでは3カラーの1/2、10カラーでは3カラーの1/4以下の検体量で同じ項目数を測定可能であり、検体の節約の面からも非常に有用であった。

残余白血球を液体窒素に凍結保存し、解凍後にマーカー解析、RNAおよびDNA抽出を行ったところ、いずれの操作も可能であった。しかし、凍結保存せずに処理した場合、RNAあるいはDNA抽出液に溶解して凍結保存した場合と比較したところ、細胞が凝集しやすいこと、核酸の収率が著しく減少すること、等の難点が経験された。

D. 考察

TAM患児の白血球のマーカーについては、巨核球・血小板抗原やCD7の発現を認める異常な細胞の出現が知られているが、多数例の体系的・網羅的な解析の報告は少なく、その詳細については不明な点が多い。また、臍帯血、骨髄、末梢血それぞれの白血球の性状や分布の異同についても詳細な報告はない。将来的な予後層別化を視野に入れた重症例抽出のための基礎データ蓄積には、より多くのマーカー情報を取得して、その情報を体系的に保管することが求められる。そのため、通常のTおよびBリンパ球や、単球、顆粒球に関する一般的なマーカーの他、巨核球血小板抗原、幹細胞系抗原の他、現在使用可能なより多くの抗原に対する抗体を用いた詳細かつ精密な解析が必要であり、そのためには、少量の検体でより多くの項目について検査可能なマルチカラー解析は非常に有用である。また、検体量を節約することにより、より多くの細胞を残余検体として保存することも可能である。

検体の保存に関しては、凍結保存細胞から核酸を抽出する場合、新鮮材料から抽出する場合に比較して収率が悪くなる傾向が強いため、余剰検体の保存に際しては、あらかじめ一部の細胞からRNAおよびDNAを抽出して保存することが望ましいと考えられる。

E. 結論

TAMの全数把握、検査値や臨床データから重症例の抽出と標準的治療を目指す前方視的な登録システムの中で、重症例抽出のための基礎データを蓄積するために有用な骨髄、末梢血のマーカー解析項目の選定と、検査後の余剰検体を将来の研究に資するために有効に保存するシステムの確立を行った。TAM患児から採取可能な検体量は非常に限られている。そのため、マーカー解析では、マルチカラー解析

によって少量の検体で多数の抗原に対する精密かつ詳細な解析を行ない、将来的な予後と相関するマーカー発現状況に関する検討のためにより多くの情報を収集するとともに、少しでも多くの検体を残して有効に保存し、将来的な基礎研究に活用するための工夫が必要である。

F. 健康危険情報 該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Miyagawa Y, Kiyokawa N, Ochiai N, Imadome K-I, Horiuchi Y, Onda K, Yajima M, Nakamura H, Katagiri YU, Okita H, Morio T, Shimizu N, Fujimoto J, Fujiwara S. Ex vivo expanded cord blood CD4 T lymphocytes exhibit distinct expression profile of cytokine-related genes from those of peripheral blood origin. *Immunology*. 2009 Nov; 128(3):405-19.

2. 学会発表

該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

表1

	Case-1/PB	Case-1/CB	Case-2	Case-3	Case-4	Case-5
CD1a	NT	NT	0.1	0.1	0.3	2.3
CD2	5.1	6.4	1.7	2.1	2.1	5.4
CD3	1.3	1.0	2.9	1.1	1.2	3.6
CD4	3.3	11.3	84.5	32.9	66.4	53.7
CD5	1.2	1.2	4.0	1.3	1.4	3.5
CD7	90.0	92.7	87.3	92.2	86.2	87.6
CD8	0.8	0.5	1.1	0.4	0.7	1.4
CD10	0.5	0.7	0.8	1.4	1.9	1.1
CD11b	NT	NT	NT	57.0	NT	NT
CD13	30.8	30.3	7.5	2.8	12.4	0.5
CD14	3.1	1.0	1.4	0.3	1.1	1.6
CD15	3.7	4.3	NT	2.7	NT	20.6
CD16	NT	NT	NT	0.9	NT	NT
CD18	NT	NT	NT	0.6	NT	NT
CD19	0.4	0.9	3.9	0.2	1.6	0.3
CD20	0.8	0.6	1.0	0.2	0.9	0.2
CD22	NT	NT	1.7	0.3	0.5	0.6
CD24	NT	NT	35.3	39.3	6.1	10.4
CD27	NT	NT	NT	6.4	NT	NT
CD29	NT	NT	NT	97.0	NT	NT
CD31	NT	NT	NT	NT	98.3	NT
CD33	88.4	69.9	86.1	83.9	90.9	87.5
CD34	NT	69.3	78.8	91.0	56.2	88.9
CD36	79.0	80.2	77.3	NT	66.7	NT
CD38	NT	NT	91.9	96.2	88.8	NT
CD41	17.3	18.4	20.1	53.3	11.5	40.4
CD42b	27.1	26.3	23.5	NT	11.4	28.8
CD44	NT	NT	65.3	57.0	37.4	NT
CD45	NT	NT	NT	NT	32.2	NT
CD45	NT	NT	98.9	98.2	97.0	NT
CD45RA	NT	NT	20.7	41.6	5.1	NT
CD49d	NT	NT	NT	83.5	NT	NT
CD49e	NT	NT	NT	69.7	NT	NT
CD55	NT	NT	NT	NT	77.9	NT
CD56	76.6	72.7	2.6	37.7	59.5	32.9
CD58	NT	NT	93.8	39.4	45.0	98.0
CD59	NT	NT	NT	NT	87.8	NT
CD61	21.3	18.0	12.9	53.9	14.6	28.2
CD62L	NT	NT	NT	0.9	NT	NT
CD64	5.2	2.4	NT	1.7	NT	3.7
CD65	6.5	5.6	6.5	7.5	5.8	19.7
CD66c	NT	NT	1.1	1.0	4.5	4.5
CD85k	NT	NT	NT	NT	0.3	NT
CD97	NT	NT	NT	NT	10.5	NT
CD99	NT	NT	17.1	1.1	0.6	NT
CD166	NT	NT	NT	NT	9.2	NT
CD117	94.8	94.9	86.8	0.6	87.8	90.7
CD133	NT	NT	NT	NT	0.5	NT
CD138	NT	NT	NT	NT	0.3	NT
CD144	NT	NT	NT	NT	0.2	NT
CD184	NT	NT	NT	0.8	NT	NT
CD235a	6.4	4.0	3.1	NT	NT	38.3
CD244	NT	NT	34.6	54.5	67.4	NT
CD271	NT	NT	NT	NT	0.4	NT
cyt-CD3	0.1	0.3	NT	NT	0.5	3.1
cyt-CD79a	0.4	0.1	NT	NT	0.2	0.6
cyt-MPO	4.3	0.4	NT	NT	2.1	21.0
cyt-TdT	0.4	0.0	NT	NT	0.2	2.9
HLA-DR	0.4	3.5	58.9	13.1	29.5	66.1
Ig-γ	NT	NT	0.8	0.3	0.3	0.3
Ig-κ	0.5	0.9	3.1	0.8	0.6	0.5
Ig-λ	0.5	0.5	0.9	0.2	0.5	0.3
Ig-μ	NT	NT	1.6	0.4	0.1	0.7
TCR-α/β	NT	NT	3.2	4.7	1.4	5.0
TCR-γ/δ	NT	NT	0.3	0.1	0.1	0.4
TRAIL-R1	NT	NT	NT	0.5	NT	NT
TRAIL-R2	NT	NT	NT	0.3	NT	NT
7.1(NG-2)	NT	NT	0.1	0.0	0.4	3.0