

2009 36116A

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

ファンconi貧血とその類縁疾患の  
生体試料収集に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 矢部 みはる

平成22(2010)年3月

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

ファンコニ貧血とその類縁疾患の  
生体試料収集に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 矢部 みはる

平成22（2010）年3月

# 目次

I. 総括研究報告	
ファンconi貧血とその類縁疾患の生体試料収集に関する研究	
矢部 みはる .....	1
II. 分担研究報告	
1. ファンconi貧血とその類縁疾患の移植時試料収集に関する研究	
矢部 普正 .....	7
2. ファンconi貧血とその類縁疾患からの生体試料保存に関する研究	
加藤 俊一 .....	13
3. ファンconi貧血とその類縁疾患の遺伝子異常の分子診断	
高田 穰 .....	17
III. 会議記録 .....	23
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	27
V. 研究成果の刊行物・印刷 .....	31

# I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服事業）

総括研究報告書

ファンconi貧血とその類縁疾患の生体試料収集に関する研究

研究代表者 矢部 みはる 東海大学医学部基盤診療学系臨床検査学 准教授

研究要旨 ファンconi貧血(FA)は染色体不安定性を特徴とする非常に稀な遺伝性骨髄不全であり、遺伝的に異なる13種類以上の群に分類されるが、日本での遺伝子群の疫学や臨床像の実態は明らかではない。このような難病の病態解明には種々の生体試料の採取体制、系統的な検体保存体制が必要である。FAおよびその類縁疾患の遺伝子解析および生体試料収集、東海大学医学部研究資源バンクでの保存、独立行政法人医薬基盤研究所生物資源研（難病研究資源バンク）での保存に関して、東海大学医学部の医の倫理委員会に申請を行い承認が得られた。2009年8月から2010年2月までに6症例のFA患者の同意が得られ、骨髄有核細胞、骨髄線維芽細胞、皮膚線維芽細胞の保存が可能であった。FAは発ガン性の高い疾患であり、その病態解明のために、細胞の保存は造血細胞移植前と造血細胞移植後の放射線や化学療法を受けた患者由来の細胞も保存することを目標とし、3症例において移植後の細胞保存も可能であった。FAの遺伝子解析は培養保存された線維芽細胞を使用して京都大学放射線生物研究センターで行われ3症例の解析が終了し、新規の変異が2症例で同定された。難病研究資源バンクへの細胞寄託のための準備を行っている。

研究分担者氏名

矢部 普正	東海大学医学部基盤診療学系再生医療学	准教授
加藤 俊一	東海大学医学部基盤診療学系再生医療学	教授
高田 穰	京都大学放射線生物研究センター	教授

研究協力者氏名

猪子 英俊	東海大学医学部基礎医学系分子生命科学	教授
山下 孝之	群馬大学生体調節研究所	教授

## A. 研究目的

ファンconi貧血(FA)をはじめとする先天性骨髄不全症候群(CBMFS)などの稀少疾患の病態解明には種々の生体試料の採取体制と、系統的な検体保存体制が必要である。特に造血幹細胞移植が適応となる本疾患群においては血液細胞の他に骨髄や皮膚などの生体試料を用いた研究が極めて有用であるが、系統的な採取・保存・提供体制がない。FAやその類縁疾患が造血幹細胞移植の適応であるため、生体試料として、血液細胞以外に骨髄幹細胞や皮膚線維芽細胞をライブラリー化することにより、DNA解析、機能解析に加えて幹細胞レベルでの病態解明の研究に活用することができる。本研究においては、FAとその類縁疾患の患者生体試料(血液、骨髄、皮膚)の採取を行い、リンパ球やBリンパ球細胞株および骨髄造血幹細胞や間葉系幹細胞、皮膚線維芽細胞を分離して保存することである。

## B. 研究方法

FA およびその類縁疾患の遺伝子解析および生体試料収集、東海大学医学部研究資源バンクでの保存、独立行政法人医薬基盤研究所生物資源研究部(難病研究資源バンク)に関して、東海大学医学部の医の倫理委員会に申請を行った。

現時点では1年間の研究期間であるため、骨髄移植を目的に入院したFAおよびその類縁疾患5症例を目標とした。

末梢血リンパ球にて、DNA架橋剤添加による染色体断裂と、FANCD2モノユビキチン化の障害を確認し、FAの診断を確定する。造血細胞移植前の末梢血液細胞、骨髄細胞、皮膚細胞の採取、収集を行う。末梢血から血球分離を行い、リンパ球、DNA、RNAおよび一部のリンパ球ではEBウイルスでトランスフォームしたB細胞株を作成する。骨髄細胞と線維芽細胞を含む骨髄間葉系細胞の培養細胞と皮膚線維芽細胞も培養し、凍結保存を行う。FAとその類縁疾患の遺伝子解析は、皮膚、骨髄線維芽細胞やリンパ球のDNAおよびRNAを送付し、研究分担者である高田穰教授の研究室で実施されている。また、FAは発ガン性の高い疾患であり、病態解明のために造血細胞移植後の放射線治療、化学療法の影響を受けた本人由来の細胞保存も目標としている。移植後の骨髄線維芽細胞、皮膚線維細胞の採取、培養を行いshort tandem repeats (STR)法で患者本人由来の細胞である事を確認後、研究資源バンクへ保存を行っている。

### 「倫理面への配慮」

ヒトゲノム・遺伝子研究の実施にあたっては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を、臨床研究の実施にあたっては「臨床研究に関する倫理指針」を順守し、研究対象者に対する人権擁護を基本とし、インフォームドコンセントに基づいた科学的にも倫理的にも妥当な研究の計画と実施している。説

明同意書には遺伝カウンセリングの設置や、提供試料（血液、骨髄、皮膚）の確認項目、検体の使用および保存中止請求書類も加えた。また、平易な文面で記載された小児用の説明書も作成し、家族だけではなく患児の理解や同意を得る努力が行われている。

### C. 研究結果

東海大学医学部の医の倫理委員会審査の結果、「ファンconi貧血とその類縁疾患の原因遺伝子解析および生体資料収集とその利用」の研究申請が2009年8月18日付けで承認された（研究実施期間；2009年8月18日～2014年7月31日）。同時に2005年に東海大学医学部の医の倫理委員会で承認された、課題名「ファンconi貧血における遺伝子解析」によって同意保存されている細胞についても解析、試料収集の対象であることが承認された。独立行政法人医薬基盤研究所生物資源研究部（難病研究資源バンク）への細胞寄託に関しては、細胞提供が十分できる旨、アンケート調査で回答し、先方の受け入れ体制が確定次第、寄託予定である。

FA 関連疾患試料の専用の液体窒素保存タンクも確保され、東海大学で「ファンconi貧血とその類縁疾患の生体資料収集のための指針」を作成し、細胞保存の手順と管理責任者および作業員の確認を行っている。2009年8月から2010年2月までに6症例のファンconi貧血患者の同意が得られ、骨髄有核細胞、骨髄線維芽細胞、皮膚線維芽細胞の保存が行われた。末梢血リンパ球のB細胞割合が少な

い症例が多く、EB ウイルストランスフォームB細胞株の作成は困難であり、何らかの工夫が必要である。

保存細胞は次の通りである。

移植前骨髄：3症例

移植前骨髄線維芽細胞：4症例

移植前皮膚線維芽細胞：5症例

移植後骨髄線維芽細胞：3症例

移植後皮膚線維芽細胞：3症例

2010年2月までに4症例4細胞および10症例のリンパ球DNA、RNAが京都大学放射線生物研究センター高田穰教授に送付され解析が行われている。3症例のFA遺伝子解析の結果、3症例ともA群に属しており、うち1例は末梢血リンパ球ではモザイクズム（復帰変異）のため、FAの診断が確定できなかった症例であり、骨髄線維芽細胞などの体細胞解析の有用性が示された。また世界で初めての変異を認めた症例が2例あり、日本人の症例解析が新しい知見をもたらす可能性が示唆された。

### D. 考察

FAやCBMFSの頻度や臨床症状、遺伝子変異は民族により特徴が見られ、日本人におけるデータの集積が重要である。本研究ではFAをはじめとしたCBMFSの日本における疫学の基盤になると推測される。また、先に述べたように世界で初めての変異を認めた症例が2例あり、日本人の症例解析が新しい知見をもたらす可能性も十分考えられる。通常のバイオバンクでは入手困難な骨髄細胞、間葉系幹細胞、皮膚細胞などを用いることにより幹細

胞レベルでの病態解明や iPS 細胞を用いた遺伝子治療などの新規治療法の開発に道を開くことが期待され、難治性疾患克服事業における行政的効果にも寄与できる。新たに東海大学で造血細胞移植を施行予定の FA 患者が 2 名おり、また、遺伝子解析等で同意保存されている骨髄細胞等が 10 症例以上あり、これらの症例についても、順次、線維芽細胞の培養、増殖、保存と遺伝子解析を予定している。今後、FANCA、FANCG、FANCC 以外の比較的稀な遺伝子変異の同定を試みることも考えている。また、FA は染色体不安定を特徴とし、白血病を高率に発症し、種々の上皮性悪性腫瘍の合併も多い。FA 遺伝子の発生遺伝学的機構や体細胞変異による後天的な不活化が悪性腫瘍の発症に関与する可能性もある。移植後の放射線療法や化学療法を受けた患者本人の細胞も保存することにより、発癌機構の貴重な遺伝モデル疾患となり、その解明に期待がもたれる。

#### E. 結論

FA は染色体脆弱を伴う病的細胞であり、皮膚や骨髄からの細胞培養や増殖細胞の確保が懸念されたが、6 症例の細胞保存が可能であった。また、従来リンパ球で行われていた、遺伝子解析も体細胞で行うことにより、リンパ球で診断不可能であったモザイクの患者でもより確実に診断が可能となった。FA 患者の中にはこのような体細胞モザイクを呈し、末梢血リンパ球の染色体断裂や遺伝子検索で診断不可能な症例が少数ながら存在するため、より診断が確実な皮膚や骨髄の線維芽細胞の

確保が重要と思われる。新規の変異も確認され、多数の遺伝子解析により、日本人の FA の原因遺伝子の基盤が作られると思われる。今後、iPS 細胞の作成、各研究資源バンクへの細胞保存や細胞寄託についても検討中である。

#### F. 健康危険情報

本研究での生体試料収集は移植時の処置や病態評価の検査として行うため、採取に伴う苦痛や影響は認めなかった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Matsushita H, Masukawa A, Arakawa S, Ogawa Y, Asai S, Yabe M, Ando K, Miyachi H. Persistence of derivative chromosome 22 after achieving a major molecular response in chronic myeloid leukemia with a cryptic BCR-ABL1 fusion gene. *Int J Hematol*. 2009 Dec 10.
2. Oshima K, Kikuchi A, Mochizuki S, Toyama D, Uchisaka N, Yabe M, Hanada R. Fanconi anemia in infancy: report of hematopoietic stem cell transplantation to a 13-month-old patient. *Int J Hematol*. 2009 Jun;89(5):722-3.
3. Yabe H, Yabe M, Koike T, Shimizu T, Morimoto T, Kato S. Rapid improvement of life-threatening capillary leak syndrome after stem cell transplantation by bevacizumab. *Blood* 2010 (in press)
4. Yabe H, Koike T, Shimizu T, Ishiguro H, Morimoto T, Hyodo H, Akiba T, Kato S and Yabe M. Natural pregnancy and delivery after unrelated bone marrow transplantation using



fludarabine-based regimen in a Fanconi anemia patient. Int J Hematol 2010 Feb 4. [Epub ahead of print]

5. Yoshida H, Hashii Y, Okuda T, Kusui S, Sato E, Inoue A, Kawakami C, Yabe M, Ohta H and Ozono K. A case of congenital bone marrow failure with radio-ulnar synostosis. Int J Hematol 2010 Janu 4. [Epub ahead of print]

6. 矢部みはる Fanconi 貧血の造血幹細胞移植 分子細胞治療 2009 ; 18 : 7-13.

7. 矢部みはる Fanconi 貧血 小児内科増刊号 2009 ; 1178-1182.

8. 矢部みはる 急性骨髄性白血病 WHO 分類 小児科診療<sup>レ</sup>クス 2009 ; 82-87.

## 2. 学会発表

1. Miharu Yabe, Hiromasa Yabe, Satoshi Arakawa, Takashi Shimizu, Tsuyoshi Morimoto, Takashi Koike, Hiromitsu Takakura and S. Kato. Chromosomal aberration in Fanconi anemia patients with myelodysplasia. 第71回日本血液学会学術集会 2009年10月

2. Hiromasa Yabe, Miharu Yabe. Allogeneic stem cell transplantation using fludarabine-based regimen for Japanese Fanconi anemia patients. 第51回日本小児血液学会総会シンポジウム 2009年11月

3. Takashi Shimizu, Hiromasa Yabe, Miharu Yabe, Tsuyoshi Morimoto, Takashi Koike, Hiromitsu Takakura, Nobuyoshi Sugiyama, Eisuke Sukanuma, and S. Kato. A fludarabine based preparative regimen in alternative

stem cell transplantation for aplastic anemia. 第71回日本血液学会総会 2009年10月

4. 森本克、高倉広充、菅沼栄介、兵頭裕美、平井康太、小池隆志、池上真理子、松田晋一、清水崇史、矢部普正、矢部みはる、加藤俊一、王 康雅 脂肪性肝炎を発症した急性リンパ性白血病の3例 第51回日本小児血液学会総会 2009年11月

5. 矢部みはる、矢部普正、清水崇史、森本克、小池隆志、高倉広充、松本正栄、井上裕靖、加藤俊一 身体異常を伴う分類不能型骨髄不全症に対する造血細胞移植 第32回日本造血細胞移植学会総会 2010年2月

6. 菅沼栄介、矢部普正、矢部みはる、清水崇史、小池隆志、高倉広充、森本 克、加藤俊一 非血縁骨髄移植後に健常児を出産したファンconi貧血の1例 第32回日本造血細胞移植学会総会 2010年2月

## 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

## II. 分担研究報告

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

ファンconi貧血とその類縁疾患の生体試料収集に関する研究

分担研究課題：ファンconi貧血とその類縁疾患の移植時試料収集に関する研究

研究分担者 矢部 普正 東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学 准教授

研究要旨

ファンconi貧血 (FA) は骨髄不全や発癌の機序解明に重要な疾患であるが、全国で年間数例が発症するのみの稀少疾患で、その生体試料の収集は一般的に極めて困難である。われわれは国内唯一の正確な診断施設および多数例の移植経験を持つ専門施設として、外来での診断、ドナーの検索やコーディネート、入院後の同種造血細胞移植 (SCT) と退院後の長期フォローアップを行っており、全国から患者を受け入れている。2009年1月～12月には9例のFAに対してSCTを行い、同時に生体試料収集の体制整備を行った後に6例のFAからの試料収集、保存を行った。FAは13種類の原因遺伝子の異常が明らかにされており、今後も症例の蓄積、生体試料の収集および保存が必要である。

A. 研究目的

ファンconi貧血 (FA) は先天性再生不良性貧血 (AA) の代表疾患であるが、高率に骨髄異形成症候群 (MDS) や急性骨髄性白血病 (AML) に移行し、さらに固形がんの合併も多いことが知られている。血液異常に対しては同種骨髄移植 (SCT) が唯一根治を期待できる治療として行われているが、HLA一致同胞以外の代替ドナーからの移植では、粘膜障害や移植片対宿主病 (GVHD) などの移植関連合併症が高率に認められ、移植成績は不良であった。われわれは代替ドナー移植においても低線量放射線を組み合わせた新規前

処置法の開発により、世界で最も優れた移植成績を報告してきたが、今回はFAの生体試料の収集・保存を開始し、今後のFAの病態解明、発現の分子機構の解明への準備を開始したので報告する。

B. 研究方法

1. 対象と移植方法

対象は2009年1月より2009年12月までに東海大学小児科・細胞移植科でSCTを施行した9例で、年齢の中央値 (範囲) は8歳 (4～20歳) であった。移植前の状態はAAが7例、MDS (RA) が1例、AMLが1例であった。移植細胞ソースはHLA一致同胞骨髄が1例、HLA一致非血縁骨髄が4

例、HLA 不一致非血縁骨髄が 3 例、非血縁臍帯血が 1 例であった。移植前処置は AA では放射線胸腹部照射(TAI) 3 Gy + フルダラビン(Flu) 150 mg/m<sup>2</sup> + シクロフォスファミド(CY) 40 mg/kg + 抗胸腺細胞グロブリン(ATG) 5 mg/kg を用い、MDS では TBI 2 Gy + ブスルファン(Bu) 3.2 mg/kg + Flu 140 mg/m<sup>2</sup> + CY 40mg/kg、AML では 3 回目の移植であることから TBI 2 Gy + Flu 105 mg/m<sup>2</sup> + シタラビン(Ara-C) 6g/m<sup>2</sup> で行った。

GVHD 予防は HLA 一致同胞間移植ではシクロスポリン (CyA) とメソトレキセート (MTX) の併用、非血縁臍帯血移植と HLA 一致あるいは 1 アリル不一致非血縁者間骨髄移植では MTX とタクロリムス (Tac) の併用、1 抗原不一致非血縁骨髄移植は MTX と Tac にミコフェノール酸モフェチル (MMF) を加えた。

## 2. 調査方法

9 例の診療録により移植後の生着率、GVHD をはじめとする合併症、原病の再発と無病生存を検討した。

### (倫理面への配慮)

移植の説明は患者両親へ文書を用いて行い、同胞ドナーには骨髄採取についてイラストを用いた説明を行って、いずれの場合も両親から文書による同意を得た。なお、生体試料の採取、保存についての説明は日を改めて文書を用いて行い、両親や患児から同意を得た。説明同意書には遺伝カウンセリングの設置や、提供試料(血液、骨髄、皮膚)の確認項目、試料の利用方法および保存中止請求書類も加えた。また、平易な文面とイラストで記載された小児用の説明書も作成し、家

族だけではなく患児の病気に対する理解や資料収集の同意を得る努力が行われている。

## C. 研究結果

### 1. SCT の施行状況

HLA 一致同胞間移植では、全身麻酔下でドナーより骨髄採取を行い、速やかに輸注した。非血縁臍帯血移植では、今回対象となった症例は東海大学臍帯血バンクからの移植であり、液体窒素タンクからベッドサイドに搬送し、温浴中で急速解凍して輸注した。非血縁骨髄移植では、採取担当病院より受け取った骨髄液を、ABO 一致度に合わせた処理後、輸注した。

### 2. 生体試料の採取・保存

説明を行った 6 症例の家族および患者全例の同意は非常にスムーズであった。生体試料としては、末梢血を採血後、単核球分離し、一部は DNA を抽出して保存した。また中心静脈カテーテル挿入を全身麻酔下で行うため、移植前の病態評価として骨髄穿刺を行い、同時にカテーテル挿入切開部位より皮膚も採取した。骨髄単核細胞を保存、さらに骨髄線維芽細胞、皮膚線維芽細胞を培養保存した。移植後にも day56 の骨髄穿刺時、および中心静脈カテーテル抜去時に皮膚の採取を行った。

### 3. 生着と GVHD

生着は全例で得られたが、EB ウイルス関連リンパ増殖症、急性 GVHD、capillary-leak syndrome などの合併症を呈した 1 例が難治性カンジダ感染症を克

服できずに骨髄抑制が進行し、非血縁臍帯血による再移植を施行したが、緑膿菌による敗血症性ショックで死亡した。他は AML が再発した 1 例で化学療法を要したため、再び輸血依存となったが、残りの 7 例は輸血より離脱した。

急性 GVHD は grade 0 が 5 例、grade I が 1 例、grade II が 2 例、grade III が 1 例であった。慢性 GVHD は AML の早期再発の 1 例を除いた評価可能な 8 例中 2 例に限局型を認めた。

#### 4. 原病の再発と無病生存

AML の 1 例は 3 番と 7 番の予後不良な染色体異常を伴い、先行する 2 回の移植で再発した例であり、3 回目の移植後も 2 ヶ月弱で再発し、死亡した。その他、5 歳の男児例が前述したように多彩な合併症に遭遇し、わが国で報告例がなかった *Candida rugosa* 感染から敗血症を合併して死亡した。現在 7 例が移植後 3-12 ヶ月を経て生存中である。

#### D. 考察

FA に対する造血細胞移植においては、前処置関連毒性を許容範囲に押さえながら、非血縁ドナーを含む代替ドナー移植の生着率と GVHD の抑制を工夫することで移植成績の向上を期待できる。芽球の増加を伴う MDS や AML に進展した例では、前処置の強化が必要で QOL の低下を招きやすいことや、ハイリスク染色体所見を伴う例では治癒が困難であり、定期的な骨髄検査、染色体検査を行い、MDS や AML へ移行しないうちに移植に踏み切るべきである。

また血管内皮障害に基づく移植後早期合併症は多臓器に影響することが多く、FA においては組織・臓器の脆弱性を伴うことから感染症を合併した場合に難治性となりやすく、十分な注意が必要である。

生体試料の収集に関しては、いずれも処置に伴う麻酔下で複数の医師のもとで行われ、患児の苦痛や影響はなかった。なお、生体試料の培養には、一部に増殖不良な症例があり、余裕を持った症例数の確保が必要と考えられた。

#### E. 結論

稀少疾患である FA を診断から治療、さらに生体試料の採取・保存まで一連の作業を同一施設で行うことにより、臨床的貢献と他に類を見ない保存効率を実現することが出来た。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yabe H, Yabe M, Koike T, Shimizu T, Morimoto T, Kato S. Rapid improvement of life-threatening capillary leak syndrome after stem cell transplantation by bevacizumab. *Blood* 2010 (in press)
2. Yabe H, Koike T, Shimizu T, Ishiguro H, Morimoto T, Hyodo H, Akiba T, Kato S and Yabe M. Natural pregnancy and delivery after unrelated bone marrow transplantation using fludarabine-based regimen in a Fanconi anemia patient. *Int J Hematol* 2010 Feb 4. [Epub ahead of print]

3. Yagasaki H, Kojima S, Yabe H, Kato K, Kigasawa H, Sakamaki H, Tsuchida M, Kato S, Kawase T, Muramatsu H, Morishima Y, Kodera Y. Tacrolimus/Methotrexate versus cyclosporine/methotrexate as graft-versus-host disease prophylaxis in patients with severe aplastic anemia who received bone marrow transplantation from unrelated donors: results of matched pair analysis. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009 ;15:1603-8.
4. Tsukimoto I, Tawa A, Horibe K, Tabuchi K, Kigasawa H, Tsuchida M, Yabe H, Nakayama H, Kudo K, Kobayashi R, Hamamoto K, Imaizumi M, Morimoto A, Tsuchiya S, Hanada R. Risk-stratified therapy and the intensive use of cytarabine improves the outcome in childhood acute myeloid leukemia: the AML99 trial from the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *J Clin Oncol.* 2009; 27 :4007-13.
5. 田渕 健、気賀沢寿人、吉見礼美、熱田由子、足立壮一、磯山恵一、井上雅美、加藤剛二、河野嘉文、菊地 陽、小林良二、土屋 滋、堀越泰雄、矢部普正、渡辺 新、加藤俊一 小児期造血幹細胞移植全国集計（1983～2005）－細胞源ドナー別移植成績 *日本小児血液学会雑誌*

2009;23: 142-154.

6. 矢部普正 再生不良性貧血の治療－造血幹細胞移植 *小児科診療* 2009; 72: 295-301.
7. 矢部普正 小児再生不良性貧血に対する同種造血幹細胞移植 *日本小児血液学会雑誌* 2009; 23: 236-243.
8. 矢部普正 遺伝病とターナー症候群；ファンconi貧血 *ビジュアル疾患解説* 2009 ;4 :4-5.
9. 矢部普正 白血病治療マニュアル改訂第3版 移植後リンパ増殖症 *南江堂* 2009年5月25日 275-277 (共著)

## 2. 学会発表

1. Hiromasa Yabe. Miharu Yabe. Allogeneic stem cell transplantation using fludarabine-based regimen for Japanese Fanconi anemia patients. 第51回日本小児血液学会総会 2009年11月 (浦安)
2. 矢部普正 多様化する造血細胞移植 (2) 移植方法の選択と成績 第51回日本小児血液学会総会 2009年11月 (浦安)
3. 矢部普正 小児造血幹細胞移植におけるサイモグロブリンの有用性 第51回日本小児血液学会総会 2009年11月 (浦安)
4. 矢部普正 小児における同種造血細胞移植の現況と問題点 第47回日本癌治療学会学術集会 2009年10月 (横浜)
5. 森本克、高倉広充、菅沼栄介、兵頭

- 裕美、平井康太、小池隆志、池上真理子、松田晋一、清水崇史、矢部普正、矢部みはる、加藤俊一、王康雅 脂肪性肝炎を発症した急性リンパ性白血病の3例 第51回日本小児血液学会総会 2009年11月 (浦安)
6. Miharu Yabe, Hiromasa Yabe, Satoshi Arakawa, Takashi Shimizu, Tsuyoshi Morimoto, Takashi Koike, Hiromitsu Takakura and S. Kato. Chromosomal aberration in Fanconi anemia patients with myelodysplasia. 第71回日本血液学会学術集会 2009年10月 (京都)
  7. Takashi Shimizu, Hiromasa Yabe, Miharu Yabe, Tsuyoshi Morimoto, Takashi Koike, Hiromitsu Takakura, Nobuyoshi Sugiyama, Eisuke Sukanuma, and S. Kato. A fludarabine based preparative regimen in alternative stem cell transplantation for aplastic anemia. 第71回日本血液学会総会 2009年10月 (京都)
  8. 渡辺修大、矢部普正、太田秀明、堀越泰雄、鈴木信寛、磯山恵一、古賀友紀、望月一弘、足立壮一、石田宏之、岡村隆行、長澤正之、堀部敬三、鶴澤正仁、日本小児白血病リンパ腫研究グループ (JPLSG) 造血幹細胞移植委員会 小児 AML/CR1 に対する HLA 一致 同胞間 BMT の GVHD 予防における MTX と CyA の比較：日本小児血液学会造血細胞移植委員会登録例の解析 第31回日本造血細胞移植学会 2009年2月 (札幌)
  9. 秋山政晴、小川千登世、菊地陽、柳町昌克、小池和俊、松本正栄、森鉄也、牧本敦、角田治美、梶原道子、滝田順子、小原明、海老原康博、矢部普正 東京小児がん研究グループ (TCCSG) SCT 委員会 移植後再発に対して再移植を施行した ALL の68例 第31回日本造血細胞移植学会 2009年2月 (札幌)
  10. 兵藤裕美、富田雄一郎、矢部普正、矢部みはる、清水崇史、小池隆志、高倉広充、森本克、加藤俊一 TBI 12Gy を含む前処置で同種骨髄移植を施行後、妊娠に至った女性の2例 第31回日本造血細胞移植学会 2009年2月 (札幌)
  11. 清水崇史、矢部普正、矢部みはる、菅沼栄介、小池隆志、高倉広充、森本克、加藤俊一 非血縁ドナーのゲノム組込みが疑われた移植後高 HHV-6 血症の1例 第31回日本造血細胞移植学会 2009年2月 (札幌)
  12. 矢部普正、矢部みはる、高倉広充、小池隆志、清水崇史、菅沼栄介、森本克、加藤俊一 腸内および気道殺菌を行わない造血細胞移植の試み 第31回日本造血細胞移植学会 2009年2月 (札幌)
  13. 矢部みはる、矢部普正、荒川聡、増川敦子、山本美紀、高倉広充、菅沼栄介、小池隆志、清水崇史、

森本 克、加藤俊一 移植後長期生存患者の体細胞における染色体不安定性 第31回日本造血細胞移植学会 2009年2月 (札幌)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含む)

(特許取得・実用新案登録・その他)

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

ファンconi貧血とその類縁疾患の生体試料収集に関する研究

分担研究課題：ファンconi貧血とその類縁疾患からの生体試料保存に関する研究  
分担研究者 加藤俊一 東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学 教授

研究要旨

ファンconi貧血 (FA) をはじめとする先天性骨髄不全症候群 (CBMFS) などの稀少疾患の病態解明には種々の生体試料の採取体制と、系統的な検体保存体制が必要である。東海大学小児科・細胞移植科で造血細胞移植を施行した6症例の末梢血、骨髄細胞、骨髄線維芽細胞、皮膚線維芽細胞の保存を試み、公的バンク等に寄託可能な試料の確保が可能であった。

A. 研究目的

本分担研究における目的は、矢部みはる研究代表者により採取された Fanconi 貧血 (FA) 患者の生体試料を無処理あるいは体外培養のうえで冷凍保存し、広く全国の研究者に提供できる体制を構築することにある。

B. 研究方法

末梢血リンパ球の染色体脆弱試験と FANC D2モノユビキチン化の障害により、FAの診断を確定する。造血細胞移植前の末梢血液細胞、骨髄細胞、皮膚細胞の採取、収集を行った。

末梢血から血球分離を行い、リンパ球、

DNA、RNAおよび一部のリンパ球ではEB

ウイルスでトランスフォームしたB細胞株の作成を試みた。

骨髄細胞と線維芽細胞を含む骨髄間葉系細胞の培養細胞と皮膚線維芽細胞を培養し、保存を行った。

また、造血細胞移植後の放射線治療、化学療法後の細胞に対する影響を観察するため、骨髄線維芽細胞、皮膚線維細胞の採取、培養を行い、short tandem repeats (STR) 法で患者本人の細胞である事を確認後、研究資源バンクへ保存を行っている。なお、一部の細胞は以前に同意を得て、診断のために凍結保存されていた骨髄や皮膚線維芽

細胞を解凍して培養増殖を試みた。

FA 関連疾患試料の専用の液体窒素保存タンクも確保され、東海大学で「ファンコニ貧血とその類縁疾患の生体資料収集のための指針」を作成し、細胞保存の手順と管理責任者および作業員の確認を行っている。試料等は通し番号で匿名化し、保存試料がわかるように略号を添え培養細胞は採取年月日と保存年月日の両者を記載する。保存細胞数と本数を記載し、USB メモリと紙ベースで保存している。その対応表は個人情報管理責任者が保管している。各細胞の保存方法は以下の通りである。

末梢血リンパ球、DNA 保存：細胞濃度を  $1\sim 5 \times 10^7/\text{ml}$  になるように細胞沈渣（ペレット）にセルバンカーを必要量加える。2ml セラムチューブに 1ml ずつ分注し、液体窒素タンクに凍結保存する。

骨髓有核細胞保存：細胞濃度を  $2\sim 5 \times 10^7/\text{ml}$  になるように細胞沈渣（ペレット）にセルバンカーを必要量加える。2ml セラムチューブに 1ml ずつ分注し、液体窒素タンクに凍結保存する。

骨髓線維芽細胞保存：細胞濃度を  $2\sim 5 \times 10^5/\text{ml}$  になるように細胞沈渣（ペレット）にセルバンカーを必要量加える。2ml セラムチューブに 1ml ずつ分注し、液体窒素タンクに凍結保存する。造血細胞移植後は STR にて患者タイプを確認後保存する。20 本-40 本を目標とする。

皮膚線維芽細胞保存：細胞濃度を  $2\sim 5 \times 10^5/\text{ml}$  になるように細胞沈渣（ペレット）にセルバンカーを必要量加える。2ml セラムチューブに 1ml ずつ分注し、液体窒素タンクに凍結保存する。造血細胞移植後は STR にて患者タイプを確認後保存する。

20 本-40 本を目標とする。

### C. 研究結果

2009 年 8 月から 2010 年 2 月までに 6 症例のファンコニ貧血患者の同意が得られ、骨髓有核細胞、骨髓線維芽細胞、皮膚線維芽細胞の保存が行われた。解凍された細胞の増殖も良好であった。培養細胞の保存は、多くは培養開始後約 1-3 ヶ月で目標の細胞数の確保が可能であったが、増殖不良の細胞もあり、余裕を持った症例数の確保が必要と思われる。また、末梢血リンパ球の B 細胞割合が少ない症例が多く、EB ウイルストランスフォーム B 細胞株の作成は困難であり、何らかの工夫が必要である。今後、分離したリンパ球と DNA の保存への切り替えを考えている。

保存細胞は別表の通りである。

### D. 考察

保存を試みた 6 症例全ての生体試料収集が達成できた。FA 患者の中には体細胞モザイクを呈し、末梢血リンパ球の染色体断裂や遺伝子検索で診断不可能な症例が少数ながら存在するため、より診断が確実な皮膚や骨髓の線維芽細胞の確保が重要と思われる。今後、新規症例の試料保存と同時に、凍結細胞の解凍後の生存率や接着率などの検定を行い、公的バンクへの寄託や iPS 細胞作成のための細胞提供を準備している。

### E. 結論

FA は染色体脆弱を伴う病的細胞であり、皮膚や骨髓からの細胞培養や増殖細胞の確保が懸念されたが、解凍細胞も含め、

6 症例の細胞保存が可能であった。収集された細胞がより多くの研究へ活用され、病態の解明と治療の開発につながることを期待したい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 著書

- 1) 加藤俊一. 日本移植学会の倫理指針. 「腎移植のすべて」高橋公太編集、泰山堂、東京、2009, pp506-507.
- 2) 加藤俊一、矢部普正編. 「小児の造血細胞移植」、医薬ジャーナル社、東京、2010、pp1-107.

#### 原著論文

- 1) 加藤俊一. 小児期に造血幹細胞移植を受けた長期生存者におけるQOL評価法ガイドライン作成に向けて. 日本小児血液学会雑誌, 2009;23:161-164.
- 2) 渡辺 新、掛江直子、坂本なほ子、加藤俊一. 同胞小児ドナーになることの正確な理解に役立つ年齢群別パンフレットの作成. 日本小児血液学会雑誌, 2009;23:155-160.
- 3) Oda M, Isoyama K, Ito E, Inoue M, Tsuchida M, Kigasawa H, Kato K, Kato S. Survival after cord blood transplantation from unrelated donor as a second hematopoietic stem cell transplantation for recurrent pediatric acute myeloid leukemia. *Int J Hematol.* 2009 Apr;89(3):374-82.
- 4) Yazaki M, Atsuta Y, Kato K, Kato S, Taniguchi S, Takahashi S, Ogawa H, Kouzai Y, Kobayashi T, Inoue M, Kobayashi R, Nagamura-Inoue T, Azuma H, Takanashi M, Kai S, Nakabayashi M, Saito H; Japan Cord Blood Bank Network. Incidence and risk factors of early bacterial infections after unrelated cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009 Apr;15(4):439-46.
- 5) Isoyama K, Oda M, Kato K, Nagamura-Inoue T, Kai S, Kigasawa H, Kobayashi R, Mimaya J, Inoue M, Kikuchi A, Kato S. Long-term outcome of cord blood transplantation from unrelated donors as an initial transplantation procedure for children

with AML in Japan. *Bone Marrow Transplant.* 2010 Jan;45: 69-77..

- 6) Kudo K, Ohga S, Morimoto A, Ishida Y, Suzuki N, Hasegawa D, Nagatoshi Y, Kato S, Ishii E. Improved outcome of refractory Langerhans cell histiocytosis in children with hematopoietic stem cell transplantation in Japan. *Bone Marrow Transplant.* 2009 Sep 21 Epub ahead of print.
- 7) Ohga S, Kudo K, Ishii E, Honjo S, Morimoto A, Osugi Y, Sawada A, Inoue M, Tabuchi K, Suzuki N, Ishida Y, Imashuku S, Kato S, Hara T. Hematopoietic stem cell transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. *Pediatr Blood Cancer.* 2010 Feb;54(2):299-306.
- 8) Yagasaki H, Kojima S, Yabe H, Kato K, Kigasawa H, Sakamaki H, Tsuchida M, Kato S, Kawase T, Muramatsu H, Morishima Y, Kodera Y. Tacrolimus/Methotrexate versus cyclosporine/methotrexate as graft-versus-host disease prophylaxis in patients with severe aplastic anemia who received bone marrow transplantation from unrelated donors: results of matched pair analysis. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009 Dec;15(12):1603-8. Epub 2009 Oct 4.

### 2. 学会発表

- 1) Takakura H, Shimizu T, Morimoto T, Koike T, Yanagimachi N, Yabe M, Yabe H, Tanaka A, Kato S. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Inborn Errors in Metabolism (IEM) - A single institute experiences - The 3<sup>rd</sup> International Symposium of Lysosomal Storage Diseases. 2009 Sep.26-27, Nagoya.
- 2) 加藤俊一. 多様化する造血細胞移植. 第51回日本小児血液学会総会. 2009年11月、東京.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特許：第4437335号

名称：「ヒト未分化造血幹細胞および

その分離方法ならびに分離装置」  
 発明者：加藤俊一、中村嘉彦  
 取得日：平成22年1月15日

2. 実用新案登録 なし  
 3. その他 なし

保存細胞一覧

症例	骨髓有核細胞
1	$5.0 \times 10^6/\text{tube} \times 5$
2	$3.0 \times 10^6/\text{tube} \times 4$
3	$4.6 \times 10^6/\text{tube} \times 5$
4	-
5	-
6	-

症例	皮膚線維芽細胞 (移植前)	皮膚線維芽細胞 (移植後)
1	$2.8 \times 10^5/\text{tube} \times 20$	$5.3 \times 10^5/\text{tube} \times 30$
2	$3.0 \times 10^5/\text{tube} \times 20$ $2.7 \times 10^5/\text{tube} \times 20$	$2.25 \times 10^5/\text{tube} \times 20$ $5.0 \times 10^5/\text{tube} \times 10$
3	$5.0 \times 10^5/\text{tube} \times 25$	$3.0 \times 10^5/\text{tube} \times 10$ $4.5 \times 10^5/\text{tube} \times 10$
4	-	-
5	$2.0 \times 10^5/\text{tube} \times 20$	-
6	$4.25 \times 10^5/\text{tube} \times 20$	-

症例	骨髓線維芽細胞 (移植前)	骨髓線維芽細胞 (移植後)
1	$2.0 \times 10^5/\text{tube} \times 20$	$2.16 \times 10^5/\text{tube} \times 20$ $2.7 \times 10^5/\text{tube} \times 20$
2	$1.0 \times 10^5/\text{tube} \times 10$ $1.88 \times 10^5/\text{tube} \times 2$	$4.0 \times 10^5/\text{tube} \times 5$ $2.3 \times 10^5/\text{tube} \times 3$
3	$3.1 \times 10^5/\text{tube} \times 6$ $2.7 \times 10^5/\text{tube} \times 20$	$2.0 \times 10^5/\text{tube} \times 1$ $4.1 \times 10^5/\text{tube} \times 3$
4	$2.4 \times 10^5/\text{tube} \times 20$	-
5	-	-
6	-	-