

200936174A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

先天性角化不全症の効果的診断法の確立と
治療ガイドライン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 小島 勢二

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

先天性角化不全症の効果的診断法の確立と
治療ガイドライン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 小島 勢二

平成 22 (2010) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	
先天性角化不全症の効果的診断法の確立と治療ガイドラインの作成に関する研究 (研究総括、中央診断、データ管理) ……………	1
名古屋大学大学院医学系研究科 小児科学	小島 勢二
II. 分担研究報告書	
先天性角化不全症の効果的診断法の確立と治療ガイドラインの作成に関する研究 (血球テロメア長測定、遺伝子変異検査) ……………	11
名古屋大学医学部附属病院 小児科	高橋 義行
先天性角化不全症の効果的診断法の確立と治療ガイドラインの作成に関する研究 (骨髓生検の病理診断) ……………	15
名古屋第一赤十字病院 病理部	伊藤 雅文
先天性角化不全症の効果的診断法の確立と治療ガイドラインの作成に関する研究 (治療プロトコールの立案) ……………	18
弘前大学大学院医学研究科 小児科	伊藤 悦朗
先天性角化不全症の効果的診断法の確立と治療ガイドラインの作成に関する研究 (小児期造血障害疾患登録による先天性角化不全症疫学データベース構築) ……	20
東邦大学医療センター大森病院 輸血部	小原 明
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	23
IV. 研究成果の刊行物・別冊	25

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総括研究報告書

先天性角化不全症の効果的診断法の確立と治療ガイドラインの作成に関する研究

研究代表者 小島 勢二 名古屋大学大学院医学系研究科 小児科学 教授

研究要旨： 典型的な先天性角化不全症（Dyskeratosis congenital, DC）は皮膚、爪、口腔粘膜に特徴的な所見がみられる先天性骨髄不全症候群であるが、小頭症や精神発達障害、肺線維症を合併する Hoyeraal-Hreidarrson 症候群(HHS)や網膜症をともなう Revesz 症候群も同一の遺伝子変異がみられることから先天性角化不全症の最重症型と考えられている。さらに、特発性骨髄不全症候群や肺線維症の一部に身体的特徴はみられないものの、やはり同一の遺伝子変異がみられることから、本症の不全型が潜んでいることが判明した。本症の原因遺伝子としてはこれまで6種のテロメア関連遺伝子が同定されているが、臨床診断がついても原因遺伝子が同定されるのは40%に満たない。

わが国では、これまで臨床診断された本症の報告例は10例に満たないが、不全型の多くは、診断に至らず特発性骨髄不全症候群や肺線維症として治療されているものと思われる。そこで、末梢血のリンパ球テロメア長を Flow FISH 法でスクリーニングし、テロメア長の短縮がある検体について、既知の6種類のテロメア関連原因遺伝子について変異の有無を検討することで効率的に本症を診断するシステムを確立した。このシステムにより顕著にリンパ球テロメア長の短縮がみられた特発性再生不良性貧血患者から TINF2 遺伝子に変異をもつ不全型の1例を診断することが可能であった。今後、全国880施設を対象にした一次調査で報告された34例について二次調査や遺伝子診断をおこない、効果的な診断方法や治療ガイドラインの確立をめざす予定である。

研究代表者

小島 勢二 名古屋大学大学院医学系研究科 小児科学 教授

研究分担者

高橋 義行 名古屋大学医学部附属病院 小児科 助教

伊藤 雅文 名古屋第一赤十字病院 病理部 部長

伊藤 悦朗 弘前大学医学部 小児科学 教授

小原 明 東邦大学医学部附属大森病院 輸血部 教授

A. 研究目的

典型的な先天性角化不全症 (Dyskeratosis congenital, DC) は皮膚、爪、口腔粘膜に特徴的な所見がみられる先天性骨髄不全症候群であるが、小頭症や精神発達障害、肺線維症を合併する Hoyeraal-Hreidarrson 症候群 (HHS) や網膜症をともなう Revesz 症候群も同一の遺伝子変異がみられることから DC の最重症型と考えられている。さらに、特発性骨髄不全症候群や肺線維症の一部に身体的特徴はみられないものの、やはり同一の遺伝子変異がみられることから、本症の不全型が潜んでいることが判明した。わが国では、これまで臨床診断された本症の報告例は10例に満たないが、不全型の多くは、診断に至らず特発性骨髄不全症候群や線維症として治療されているものと思われる。

このように DC は臨床像が多岐にわたり、とくに不全型には遺伝子診断が必須である。原因遺伝子として、テロメアの安定化や維持に関連する DKC1, TERC, TERT が知られていたが、最近1年間に新たに NHP2, NOP10, TINF2 の新規原因遺伝子が発見された。海外では、イギリスの Hammersmith 病院に本症の疾患登録センターがおかれ、2007年までに280家系が登録されており、世界的な研究拠点となっている。しかし、280例のうち原因遺伝子が同定されているのは、37%にすぎず、いまだ発見されていない未知の遺伝子が存在すると考えられている。

当科においては、過去に特発性骨髄不全症患者96例を対象に、わが国にも不全型が存在するかを検討したが、2例から TERT 遺伝子のヘテロ変異をみいだした。このように不全型を含めた DC の確定診断には、上記の責任遺伝子の検索が必要であるが、すべての特発性骨髄不全患者や肺線維症患者に遺伝子検索をおこ

なうのは、現実的ではない、DC患者由来の組織や細胞株は短縮したテロメア長を有することから、本研究では、血球テロメア長の測定が本疾患のスクリーニング検査として有用であるかを検討する。

まず、全国の小児科施設を対象に一次アンケート調査をおこない後方視的にわが国における本症の実態を把握する。一次調査で把握された症例を対象に二次調査、さらに遺伝子診断をおこなう。また、現在日本小児血液学会では、再生不良性貧血や骨髄異形成症候群の中央診断事業の実施を計画しているが、本研究を同事業に組み入れることにより不全型も含め前方視的に本症の診断が可能となり、わが国における正確な本症の発症頻度等が明らかになるであろう。

なお、二次調査で得られた患者アンケートや文献検索にもとずき、治療ガイドラインの作成も本研究班に課せられた責務である。さらに、本症については、いまだ原因遺伝子が同定されるのは40%にすぎないことから検体バンクを確立し、新規原因遺伝子の発見に備えるのも本研究班の目的である。

B. 研究方法

1) 全国の小児科施設(520施設)、小児血液学会評議員(150名)、大学病院皮膚科(110施設)を対象に、症例の有無を問う一次アンケート調査をおこなう。把握された症例につき、さらに臨床症状、検査所見、治療、予後を含む二次アンケート調査をおこなう。

2) 中央診断事業として、末梢血や骨髄塗抹標本を名古屋大学と聖路加国際病院で、骨髄生検標本は研究分担者である伊藤(雅)が所属する名古屋第一赤十字病院で中央診断をおこなう。名古屋大学小児科におかれたセントラルラボラトリーでは、Flow FISH法による

血球テロメア長の測定、さらに6種のテロメア関連遺伝子 (DKC1, TERC, TERT, NHP2, NOP10, TINF2) の変異の有無を検討する。

血球テロメア長の測定や遺伝子検索は、中央診断で本疾患が疑われた場合のほか、二次調査で把握された症例も対象とする。

テロメア長は年齢により長さに生理的な幅があるが、すでにコントロールとなる健常人のテロメア長は測定済みである。テロメア長の測定は蛍光色素でラベルされたテロメアリピートに結合するPNAプローブをもちいて末梢血リンパ球とハイブリダイズさせる。この蛍光強度をフローサイトメトリーによって定量することでテロメア長の測定をおこなう。

遺伝子解析に関しては、末梢血リンパ球からDNAを抽出し、各遺伝子に特異的なプライマーを作成し遺伝子断片を増幅後、ABI3100を用いてコード領域全長の塩基配列を決定する。

3) わが国における2次調査や海外からの文献検索をおこない、本症に対する治療ガイドラインの作成をおこなう。

4) 遺伝子診断目的で送られてきた検体の余剰については、倫理委員会、患者および患者家族の同意を得たのちリンパ球、DNAとして保存する。

(倫理面への配慮)

小児血液学会としておこなう疾患登録事業は、疫学研究倫理指針に準拠した臨床研究として、すでに学会倫理審査委員会で承認されている。調査にあたっては、個人情報の守秘を厳守し、データの取り扱いに注意する。中央診断事業についても、患者検体の匿名化を図る。患者検体をもちいた研究の実施にあたっては、小児血液学会の倫理委員会の承認を得るほか、検体の採取にあたっては、患者および家族へ事前に十分な説明をおこない、文

書による同意を得る。ヒト遺伝子研究に該当する場合は、ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針に従う。なお、本研究はすでに名古屋大学医学部・日本医科大学倫理委員会で承認済みである。

C. 研究結果

1) 一次アンケート

一次アンケートの回収率は69%であった。全国の25施設から総計34例の報告がみられた。うち5施設の大学病院皮膚科から7例の報告があった。

2) 中央診断事業

平成21年2月からの12月間に186例が中央診断を目的に骨髄、末梢血塗抹標本と骨髄病理標本が送付されてきた。中央診断の結果、75例が再生不良性貧血、25例が骨髄異形成症候群、20例が若年型骨髄単球形白血病、11例が先天性骨髄不全症候群、14例が急性白血病と診断された。41例は、その他の疾患に分類された。11例の先天性骨髄不全症候群のうち4例がBlackfan-Diamond症候群、1例がcongenital dyserythropoietic anemia、1例が乳児鉄芽球性貧血、1例が先天性無巨核球性血小板減少性紫斑病、1例がKostman症候群、3例が先天性角化不全症と診断された。

臨床病態やリンパ球テロメア長の短縮を契機に遺伝子検索をおこない確定診断が得られた4例の先天性角化不全症について病理組織学的検討をおこなった。

いずれの症例も再生不良性貧血としては、非典型的な像であり、巨核球が観察され、少数のp53陽性細胞の出現、弱い異形成がみられるなど骨髄異形成症候群の特徴を備えていた。

3) リンパ球テロメア長の測定

血球テロメア長は年齢と逆相関を示し、各年齢層で正常域が異なることから61人の0-50

歳の健常人についてリンパ球テロメア長を Flow FISH 法を用いて測定し、各年齢層における正常域を定めた。中央診断事業で送られてきた48人の再生不良性貧血患者、9例の先天性角化不全症患者についてリンパ球テロメア長の測定をおこなった。9例の先天性角化不全症患者のうち6例は先天性角化不全症に一致する身体的特徴がみられたが、3例は身体的特徴がなく当初は特発性再生不良性貧血と診断されていた。9例全例において、年齢相応の健常人と比較してテロメア長の著明な短縮を認めた。

4) 責任遺伝子の検討

9例について遺伝子検索をおこなったところ、6例について同定可能であり、DKC1の変異を2例、TERTの変異を2例、TERCの変異を1例、TINF2の変異を1例に認めた。TERTの変異を認めた2例とTINF2の変異を認めた1例は、身体的特徴がなく特発性再生不良性貧血と診断されていたが、リンパ球テロメア長の短縮、遺伝子解析の結果、本症と診断された。

5) 治療ガイドラインの作成

これまで、本症の治療としてメテロノン等の性ホルモンの有効性が示唆されているが、明らかな結論は得られていない。最近になってこれら性ホルモんにTERT遺伝子に働き、テロメラーゼ活性を高める作用があることが報告された。名古屋大学小児科、日本医科大学血液内科で内科的治療をうけた6例の治療への反応性をしめす(表1)。抗胸腺細胞グロブリンやシクロスポリンによる免疫抑制療法で治療された4例は全例で治療への反応はみられなかったが、メテロノンあるいはダナゾールが投与された2例はともに血液所見の改善がみられている。

Gene	Location of mutation	Age	Sex	Diagnosis	Family history	Chromosome abnormality	Shorting telomere	Treatment
TERC	N323 C>T	72	M	MDS RA	(-)	46,XY	NA	Response to metenolone
Unknown	-	12	M	sAA	(-)	46,XY	(+)	Response to Danazol
TERT	T726A	9	F	sAA	(-)	ND	(+)	No response to IST
TINF2	R282C	22	M	sAA	(-)	46,XY	(+)	No response to IST
TINF2	Del n871-874	43	F	sAA	Father:sAA	46,XX	(+)	No response to IST
TINF2	Del n865-866	29	M	sAA	(-)	46,XY	NA	No response to IST

・名古屋大学 小児科
・日本医科大学 血液内科

(表1)

一方、フルダラビンを基本とした骨髄非破壊的前処置による造血幹細胞移植の有効性をしめす症例報告も散見されるようになった。当科においても

これまでにHLA 非適合血縁ドナーから2例、非血縁者ドナーから1例と計3例について骨髄非破壊的同種骨髄移植をおこなったが3例ともに生着が得られ生存中である。自験例と文献報告をもとにした治療の概略をしめす(表2)。

先天性角化不全症に対する治療方針(案)

1.軽症 経過観察
2.中等症 酢酸メテロノンまたはダナゾールの投与
3.やや重症型、重症、最重症 ・40歳未満で臓器障害(肝臓、肺等)がなければ、HLA一致血縁あるいは非血縁ドナーからの同種骨髄移植* ・40歳以上あるいは臓器障害があれば酢酸メテロノンまたはダナゾールの投与
移植前治療はリン酸フルダラビンを含む骨髄非破壊的前処置が望ましい。
例)・HLA一致血縁ドナー Flu:25mg/m ² ×4日, CY:750mg/m ² ×4日 ・HLA一致非血縁ドナー Flu:25mg/m ² ×4日, CY:750mg/m ² ×4日, ATG:2.5mg/kg×4日, TBI:3 Gy

(表2)

D. 考察

わが国における先天性角化不全症の研究の基礎となる疫学情報は、これまで日本小児血液学会で17年間に把握された6例にすぎない。しかし、今回の全国の小児科および、大学病院皮膚科880施設を対象にした一次調査では34例が把握された。特筆すべきは、110の大学

病院皮膚科のうち5施設から7例の症例登録がみられたことである。本疾患は汎血球減少に先行して皮膚や爪病変がみられることから、これらの症例は皮膚科で管理されていると考えられる。今回のアンケート調査は、全国の大学病院の皮膚科のみを対象としたが、今回対象としなかった病院皮膚科にまで調査対象をひろげれば、さらに症例数は増加すると考えられる。

これまで、名古屋大学小児科で把握されている9例のうち3例は、身体的特徴がみられず特発性再生不良性貧血と診断をうけていた。うち、2例は当科で診療した96例の特発性再生不良性貧血患者において、TERT, TREC, TINF2遺伝子変異のスクリーニングをおこなない発見した症例である。同様に、日本医科大学血液内科の山口は、107例の日本人成人骨髄不全患者から2例にTINF2遺伝子の変異例を発見している。わが国における再生不良性貧血と骨髄不全症候群を含む骨髄不全患者の発症数は年間5000例と推定されていることから、すべての骨髄不全患者に遺伝子検索をおこなうのは、現実的ではない。そこで、DKC患者由来の組織は短縮したテロメア長を有することから、われわれは血球テロメア長を測定することで不全型を含め先天性角化不全症のスクリーニングが可能であるかを検討した。当科で本症と診断し、リンパ球テロメア長の測定が可能であった8例すべてでリンパ球テロメア長は著明な短縮がみられた。不全型の3例も典型例と同様にテロメア長が短縮しているのを確認している。テロメア長の測定は従来サザンブロット法でおこなわれてきたが、Flow FISH法を用いて簡便化が可能であった。スクリーニングで選定された患者検体のみを遺伝子診断の対象とすることで大幅にコストと労力の削減につながった。日本小児血液学

会中央診断事業の一環として本研究を実施することで不全型を含め、本症の診断が可能となりわが国における先天性角化不全症の疫学情報が充実することが期待される。実際、この間に中央診断事業の一環としてテロメア長を測定した47人の再生不良性貧血患者のうちテロメア長が健常人の5%未満に短縮していた1例は、遺伝子検索でTINF2遺伝子の変異が確認されている。

今回、先天性角化不全症と診断し6種の遺伝子検索をおこなった9例のうち責任遺伝子が同定されたのは6例でのみで、のこり3例は不明である。イギリスの Hammersmith 病院には本症の疾患登録センターがおかれ、228例について遺伝子検索がおこなわれたが63%については同定されなかった。われわれの経験からも、今後新規遺伝子変異が発見されるのに備えて、検体の保存事業が重要と思われる。

本症に対する治療ガイドラインの策定も本研究班の目的の一つである。本格的な作業は、2次調査の結果を待っておこなうがこれまでの当科や日本医科大学における治療経験や海外を中心とした症例報告から方向性は明らかになりつつある。すなわち、薬物療法としては免疫抑制剤には反応がみられず、メテノロン等の蛋白同化ホルモンが有用である。根本的治療は骨髄移植であるが、移植前処置はフルダラビンを基本とした骨髄非破壊的前処置が有望である。特発性造血障害治療研究班が“診療の参照ガイド”を改訂するのにあわせ、Fanconi貧血、Blackfan-Diamond貧血、Congenial dyserythropoietic anemia、先天性鉄芽球性貧血をふくむ先天性骨髄不全症候群の“治療の参照ガイド”の作成に向け、準備中である。

E. 結論

本症に対する全国一次調査の結果、従来、日本小児血液学会で把握されていた先天性角化不全症の症例数が6例であったと比較して、34例と多数の症例の把握が可能であった。とくに、2009年から中央診断事業を実施することにより中央診断に送られてきた75例の再生不良性貧血のうち3例と比較的高頻度に本症が発見された。特筆すべきは、身体的特徴をもたない再生不良性貧血患者に対し、リンパ球テロメア長によるスクリーニングをおこない、本症の発見が可能であったことである。今後、成人を含めることでさらに本症の診断数が増加することが期待される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Yoshida N, Yagasaki H, Xu Y, Matsuda K, Yoshimi A, Takahashi Y, Hama A, Nishio N, Muramatsu H, Watanabe N, Matsumoto K, Kato K, Ueyama J, Inada H, Goto H, Yabe M, Kudo K, Mimaya J, Kikuchi A, Manabe A, Koike K, Kojima S. Correlation of clinical features with the mutational status of GM-CSF signaling pathway-related genes in juvenile myelomonocytic leukemia. *Pediatr Res* 65(3):334-40, 2009
- (2) Narui R, Yagasaki H, Takahashi Y, Hama A, Nishio N, Muramatsu H, Shimoyama Y, Kojima S. Concurrent Langerhans cell histiocytosis and nephroblastoma. *Pediatr Blood Cancer*

52(5):662-4, 2009

- (3) Nishio N, Yagasaki H, Takahashi Y, Muramatsu H, Hama A, Yoshida N, Kudo K, Kojima S. Natural history of transfusion-independent non-severe aplastic anemia in children. *Int J Hematol* 89(4):409-13, 2009
- (4) Hama A, Kudo K, Itzel BV, Muramatsu H, Nishio N, Yoshida N, Takahashi Y, Yagasaki H, Ito M, Kojima S. Plasmacytoid dendritic cell leukemia in children. *J Pediatr Hematol Oncol* 31(5):339-43, 2009
- (5) Hasegawa D, Manabe A, Yagasaki H, Ohtsuka Y, Inoue M, Kikuchi A, Ohara A, Tsuchida M, Kojima S, Nakahata T; Japanese Childhood MDS Study Group. Treatment of children with refractory anemia: the Japanese Childhood MDS Study Group trial (MDS99). *Pediatr Blood Cancer* 53(6):1011-5, 2009
- (6) Torii Y, Yagasaki H, Tanaka H, Mizuno S, Nishio N, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Successful treatment with rituximab of refractory idiopathic thrombocytopenic purpura in a patient with Kabuki syndrome. *Int J Hematol* 90(2):174-6, 2009
- (7) Kimura H, Miyake K, Yamauchi Y, Nishiyama K, Iwata S, Iwatsuki K, Gotoh K, Kojima S, Ito Y, Nishiyama Y. Identification of Epstein-Barr Virus (EBV)-Infected Lymphocyte Subtypes by Flow Cytometric In Situ Hybridization in EBV-Associated Lymphoproliferative Diseases. *J Infect*

Dis 200(7):1078-87, 2009

- (8) Xu Y, Takahashi Y, Wang Y, Hama A, Nishio N, Muramatsu H, Tanaka M, Yoshida N, Villalobos IB, Yagasaki H, Kojima S. Downregulation of GATA-2 and Overexpression of Adipogenic Gene-PPARgamma in Mesenchymal Stem Cells from Patients with Aplastic Anaemia. *Exp Hematol* 37(12):1393-9, 2009
- (9) Makishima H, Cazzolli H, Szpurka H, Dunbar A, Tiu R, Huh J, Muramatsu H, O'Keefe C, Hsi E, Paquette RL, Kojima S, List AF, Sekeres MA, McDevitt MA, Maciejewski JP. Mutations of E3 Ubiquitin Ligase Cbl Family Members Constitute a Novel Common Pathogenic Lesion in Myeloid Malignancies. *J Clin Oncol* 27(36):6109-16, 2009
- (10) 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* 15(12):1603-8, 2009
- (11) Muramatsu H, Kojima S, Yoshimi A, Atsuta Y, Kato K, Nagatoshi Y, Inoue M, Koike K, Kawase T, Ito M, Kurosawa H, Tanizawa A, Tono C, Hamamoto K, Hotta N, Watanabe A, Morishima Y, Kawa K, Shimada H. Outcome of 125 children with CML who received transplants from unrelated donors: the Japan Marrow Donor Program (JMDDP). *Biol Blood Marrow Transplant* 16(2):231-8, 2010
- (12) Muramatsu H, Makishima H, Cazzolli H, O'Keefe C, Yoshida N, Xu Y, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Takahashi Y, Kato K, Manabe A, Kojima S, Maciejewski JP. Mutations of E3 ubiquitin ligase Cbl family members but not TET2 mutations are pathogenic in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood* 115(10):1969-75, 2010
- (13) Villalobos IB, Takahashi Y, Akatsuka Y, Muramatsu H, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Saji H, Kato M, Ogawa S, Kojima S. Relapse of leukemia with loss of mismatched HLA due to uniparental disomy following haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2010 Feb 1. [Epub ahead of print]

2. 招待講演

- (1) Kojima S. Future steps in the treatment of SAA. 5th International Congress on Pediatric MDS and Bone Marrow Failure Syndromes 2009, Rotterdam, Netherlands, 22, Apl, 2009
- (2) Kojima S. Treatment of Aplastic anemia in Japan. *Aplastic Anemia & MDS: Exploring the Challenges*, Valencia, Spain. Jul.2009
- (3) Kojima S. The Role of Allogeneic

Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Patients with Severe Aplastic Anemia. 14th Congress of the Asia-Pacific Blood and Marrow Transplantation, Seoul, Korea. 27, Aug, 2009

- (4) 小島勢二：小児再生不良性貧血の診断と治療。小児血液病教育セミナー、天津、中国、2009.9.17
- (5) Kojima S. Aplastic anemia in Asia. EBMT SAA Working Party Meeting, Engelberg, Switzerland. 18, Oct, 2009
- (6) Kojima S. Treatment of Juvenile myelomonocytic leukemia in Japan. International JMML symposium 2009, New Orleans, USA. Dec, 2009
- (7) Kojima S. Optimal conditioning regimen for severe aplastic anemia. The 3rd consensus conference on the Treatment of aplastic anemia, Hamamatsu, Japan. 21, Feb, 2010
- (8) Kojima S. Transplant Treatment for Aplastic Anemia, MDS and PNH. Bone Marrow Failure Scientific Symposium 2010, Bethesda, USA. 12, Mar, 2010
- (9) Kojima S. Clinical Challenges / Opportunities for Study. 2010 Severe Aplastic Anemia State of the Science Symposium, Bethesda, USA. 12, Mar, 2010
- (10) 小島勢二：再生不良性貧血の病因研究と治療の進歩。第5回北海道血液・腫瘍カンファレンス、札幌、2009.5.15

3. 学会発表

海外

- (1) Yoshimi A, Kojima S. Proposal for the

response criteria of immunosuppressive therapy in children with aplastic anemia. 5th International Congress on Pediatric MDS and Bone Marrow Failure Syndromes 2009, Rotterdam, Netherlands, 23, Apl, 2009

- (2) Kamio T, Kojima S. Relapse of Children with Aplastic Anemia after Immunosuppressive Therapy. 5th International Congress on Pediatric MDS and Bone Marrow Failure Syndromes 2009, Rotterdam, Netherlands, 23, Apl, 2009
- (3) Takahashi Y, Kojima S. Decreased incidence of clonal evolution to myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia with monosomy 7 in children with aplastic anemia following reduced use of G-CSF. 5th International Congress on Pediatric MDS and Bone Marrow Failure Syndromes 2009, Rotterdam, Netherlands, 23, Apl, 2009
- (4) Yagasaki H, Kojima S. Acceptable HLA-mismatching of unrelated donor bone marrow transplantation for patients with aplastic anemia based on molecular typing of 10 HLA loci: an analysis of 301 patients through the Japan Marrow Donor Program. 5th International Congress on Pediatric MDS and Bone Marrow Failure Syndromes 2009, Rotterdam, Netherlands, 23, Apl, 2009
- (5) Yoshida N, Kojima S. Impact of GM-CSF signaling pathway-related

- genes on clinical outcome of children with juvenile myelomonocytic leukemia. 5th International Congress on Pediatric MDS and Bone Marrow Failure Syndromes 2009, Rotterdam, Netherlands, 24, Apl, 2009
- (6) Muramatsu H, Takahashi Y, Hama A, Kojima S. Gene mutation in children with Juvenile myelomonocytic leukemia. International JMML symposium 2009, New Orleans, USA. Dec, 2009
- (7) Muramatsu H, Makishima H, Jankowska AM, Cazzolli H, O'Keefe C, Yoshida N, Xu Y, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Takahashi Y, Kato K, Manabe A, Kojima S, and Maciejewski JP. C-Cbl but Not TET2 Mutation Are Present in Patients with Juvenile Myelomonocytic Leukemia. 52nd ASH Annual Meeting, 2009, New Orleans, USA. 7, Dec, 2009
- (8) Konno Y, Toki T, Tandai S, Xu G, Terui K, Ohga S, Kojima S, Yanagisawa R, Koike K, Hasegawa D, Kosaka Y, Kanei R, Imai T, Hongo T, Park MJ, Watanabe A, and Ito E. Mutations in Ribosomal Protein Genes of Diamond-Blackfan Anemia Patients in Japan. 52nd ASH Annual Meeting, 2009, New Orleans, USA. 7, Dec, 2009
- (9) Nishio N, Takahashi Y, Muramatsu H, Hama A, Nagata T, and Seiji Kojima. Screening of Telomere Length in Peripheral Blood Lymphocytes From Patients with Aplastic Anemia by Flow-Fluorescence in Situ Hybridization. 52nd ASH Annual Meeting, 2009, New Orleans, USA. 7, Dec, 2009
- (10) Muramatsu H, Takahashi Y, Kojima S. Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Aplastic Anemia. Bone Marrow Failure Scientific Symposium 2010, Bethesda, USA. 12, Mar, 2010
- (11) Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Classification of Childhood Bone Marrow Failure Syndrome Based on the Revised WHO Classification. Bone Marrow Failure Scientific Symposium 2010, Bethesda, 12, Mar, 2010
- (12) Shimada A, Takahashi Y, Kojima S. Down-regulated GATA2 and up-regulated PPARγ in bone marrow mesenchymal cells in aplastic anemia patients. Bone Marrow Failure Scientific Symposium 2010, Bethesda, USA. 12, Mar, 2010
- 国内
- (1) 濱 麻人、吉見礼美、村松秀城、西尾信博、永田俊人、高橋義行、平林真介、真部 淳、伊藤雅文、小原 明、土田昌宏、小島勢二：小児再生不良性貧血の骨髓像-140例のセントラルレビューによる検討。第71回日本血液学会総会、京都、2009.10.24
- (2) 西尾信博、高橋義行、村松秀城、濱 麻人、永田俊人、小島勢二：小児再生不良性貧血患者のFlow-FISHによるテロメア長測定は、免疫抑制療法への反応予測因子となりうるか。第71回日本血液学会総会、京都、2009.10.24

- (3) 今野友貴、丹代 諭、徐 剛、土岐 力、
工藤 耕、照井君典、大賀正一、小島勢
二、長谷川大一郎、青木由貴、金井理恵、
今井 剛、本郷輝明、朴 明子、柳沢 龍、
伊藤 悦朗：本邦のDiamond-Blackfan
貧血患者におけるリボゾームタンパク遺
伝子の変異。第71回日本血液学会総会、
京都、2009.10.24
- (4) 坂口大俊、西尾信博、梁 絹、王 月、
村松秀城、濱 麻人、永田俊人、高橋義
行、小島勢二：小児再生不良性貧血患者
におけるテロメア関連遺伝子変異の解析。
第71回日本血液学会総会、京都、
2009.10.25
- (5) 濱 麻人、小島勢二：小児再生不良性貧
血の中央診断。第51回日本小児血液学会
総会、千葉、2009.11.27
- (6) 磯田健志、遠藤明史、満生紀子、小野敏
明、青木由貴、富澤大輔、高木正稔、梶
原道子、長澤正之、森尾友宏、西尾信博、
濱 麻人、在家祐司、真部 淳、伊藤雅
文、小島勢二、水谷修紀：Low grade MDS
の骨髓所見を示した先天性角化不全症
TINF2変異の一例。第51回日本小児血液
学会総会、千葉、2009.11.29

H. 知的財産権の出願・登録状況
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

先天性角化不全症の効果的診断法の確立と治療ガイドラインの作成に関する研究

血球テロメア長測定、遺伝子変異検査

研究分担者 高橋 義行（名古屋大学医学部附属病院 小児科 助教）

研究要旨： 典型的な先天性角化不全症（Dyskeratosis congenita, DC）は皮膚、爪、口腔粘膜に特徴的な所見がみられる先天性骨髄不全症候群であるが、特発性骨髄不全症候群や肺線維症の一部に身体的特徴はみられないものの、やはり同一の遺伝子変異がみられることから、本症の不全型が潜んでいることが判明した。本症の原因遺伝子としてはこれまで6種のテロメア関連遺伝子が同定されているが、不全型の多くは、診断に至らず特発性骨髄不全症候群や線維症として治療されているものと思われる。本症には特発性骨髄不全症候群の第1選択薬である免疫抑制療法の効果はみられないため、適切な診断がなされることは患者にとって重要である。適切な診断のため末梢血のリンパ球テロメア長を Flow FISH 法でスクリーニングし、テロメア長の短縮がある検体について、既知の6種類のテロメア関連原因遺伝子について変異の有無を検討する。この診断法の確立について分担研究を行った。

A. 研究目的

Dyskeratosis congenita (DC) の患者細胞はテロメア長が短縮しており、これはテロメラゼ複合体を形成する遺伝子の異常に起因する。近年、身体的特徴を有さない特発性再生不良性貧血患者の一部に、潜在的な DC 患者が存在する事が判明した。フローサイトメトリーによる血球リンパ球のテロメア長の測定が DC 患者のスクリーニングに有効であるか検討するとともに、DC および DC が疑われる患者における責任遺伝子の同定を試みた。

B. 研究方法

当科、および他院から紹介された DC および潜在的 DC 患者 10 例を対象としてテロメア

長の測定、責任遺伝子の同定を試みた。7 例は、DC の特徴的な身体所見がみられたが、3 例は DC の身体的特徴がなく、特発性と診断されていた。

また、特発性再生不良性貧血と診断された 48 例について診断時の検体を用いてテロメア長を測定した。健常人と比較して著明な短縮を認めた場合、テロメア関連遺伝子の変異解析を行った。

（倫理面への配慮）

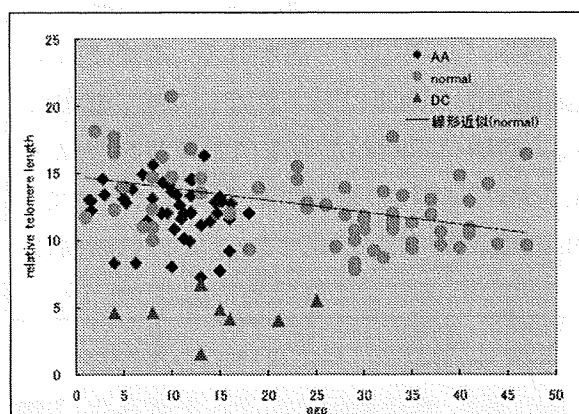
患者検体は連結可能匿名化を行い、検査において患者を特定できないようにした。ヒト遺伝子研究に該当する場合は、ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針に従う。なお、本研究はすでに名古屋大学医学部倫理委員会

で承認済みである。

C. 研究結果

10例のテロメア関連造血不全症のうち、テロメア長が測定できた8例では全例に著明な短縮を認めた。遺伝子変異は、5例について同定可能であり、*DKC1*を2例、*TERT*を2例、*TERC*を1例に認めた。

また、特発性再生不良性貧血(AA)と診断された48例のテロメア長を測定したところ、1例において著明な短縮を認めた(図)。この症例において責任遺伝子の同定を試みたところ、*TINF2*の変異が検出された。



図

D. 考察

特発性再生不良性貧血と診断されていた患者のうち、著明なテロメア長短縮をきたしテロメア関連遺伝子の変異をもつ患者を同定し得た事より、Flow-FISHによるリンパ球テロメア長測定は、テロメア関連造血不全症のスクリーニングに極めて有用と思われた。一方、DCに関連する既知の遺伝子変異が同定されない症例もあり、今後テロメラーゼ複合体を形成する他の遺伝子における変異解析を予定している。

E. 結論

これまで特発性再生不良性貧血と診断されてきた患者の一部は、DCをはじめとする潜在的な遺伝性造血不全症候群である可能性が示唆された。Flow-FISHによるリンパ球テロメア長測定は、テロメア関連造血不全症のスクリーニングに有用である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Xu Y, Takahashi Y, Yoshimi A, Tanaka M, Yagasaki H, Kojima S. Immunosuppressive activity of mesenchymal stem cells is not decreased in children with aplastic anemia. *Int J Hematol* 89(1):126-7, 2009
- (2) Yoshida N, Yagasaki H, Xu Y, Matsuda K, Yoshimi A, Takahashi Y, Hama A, Nishio N, Muramatsu H, Watanabe N, Matsumoto K, Kato K, Ueyama J, Inada H, Goto H, Yabe M, Kudo K, Mimaya J, Kikuchi A, Manabe A, Koike K, Kojima S. Correlation of clinical features with the mutational status of GM-CSF signaling pathway-related genes in juvenile myelomonocytic leukemia. *Pediatr Res* 65(3):334-40, 2009
- (3) Narui R, Yagasaki H, Takahashi Y, Hama A, Nishio N, Muramatsu H, Shimoyama Y, Kojima S. Concurrent Langerhans cell histiocytosis and nephroblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 52(5):662-4, 2009
- (4) Nishio N, Yagasaki H, Takahashi Y, Muramatsu H, Hama A, Yoshida N,

- Kudo K, Kojima S. Natural history of transfusion-independent non-severe aplastic anemia in children. *Int J Hematol* 89(4):409-13, 2009
- (5) Hama A, Kudo K, Itzel BV, Muramatsu H, Nishio N, Yoshida N, Takahashi Y, Yagasaki H, Ito M, Kojima S. Plasmacytoid dendritic cell leukemia in children. *J Pediatr Hematol Oncol* 31(5):339-43, 2009
- (6) Torii Y, Yagasaki H, Tanaka H, Mizuno S, Nishio N, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Successful treatment with rituximab of refractory idiopathic thrombocytopenic purpura in a patient with Kabuki syndrome. *Int J Hematol* 90(2):174-6, 2009
- (7) Xu Y, Takahashi Y, Wang Y, Hama A, Nishio N, Muramatsu H, Tanaka M, Yoshida N, Villalobos IB, Yagasaki H, Kojima S. Downregulation of GATA-2 and Overexpression of Adipogenic Gene-PPARgamma in Mesenchymal Stem Cells from Patients with Aplastic Anaemia. *Exp Hematol* 37(12):1393-9, 2009
- (8) Muramatsu H, Makishima H, Cazzolli H, O'Keefe C, Yoshida N, Xu Y, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Takahashi Y, Kato K, Manabe A, Kojima S, Maciejewski JP. Mutations of E3 ubiquitin ligase Cbl family members but not TET2 mutations are pathogenic in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood* 115(10):1969-75, 2010
- (9) Villalobos IB, Takahashi Y, Akatsuka Y, Muramatsu H, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Saji H, Kato M, Ogawa S, Kojima S. Relapse of leukemia with loss of mismatched HLA due to uniparental disomy following haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2010 Feb 1.
2. 学会発表
- (1) Muramatsu H, Makishima H, Jankowska AM, Cazzolli H, O'Keefe C, Yoshida N, Xu Y, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Takahashi Y, Kato K, Manabe A, Kojima S, and Maciejewski JP. C-Cbl but Not TET2 Mutation Are Present in Patients with Juvenile Myelomonocytic Leukemia. 52nd ASH Annual Meeting, 2009, New Orleans, USA. 7, Dec, 2009
- (2) Nishio N, Takahashi Y, Muramatsu H, Hama A, Nagata T, and Seiji Kojima. Screening of telomere length in peripheral blood lymphocytes from patients with aplastic anemia by flow-fluorescence in situ hybridization. The 51st annual meeting of American Society of Hematology. New Orleans, USA. 7, Dec, 2009
- (3) 濱 麻人、吉見礼美、村松秀城、西尾信博、永田俊人、高橋義行、平林真介、真部 淳、伊藤雅文、小原 明、土田昌宏、小島勢二：小児再生不良性貧血の骨髓像-140例のセントラルレビューによる検討。第71回日本血液学会総会、京都、2009.10.24
- (4) 西尾信博、高橋義行、村松秀城、濱 麻人、永田俊人、小島勢二：小児再生不良性貧血患者の Flow-FISH によるテロメア長測定は、免疫抑制療法への反応予測因子となりうるか。第71回日本血液学会

総会、京都、2009.10.24

- (5) 坂口大俊、西尾信博、梁 絹、王 月、村松秀城、濱 麻人、永田俊人、高橋義行、小島勢二：小児再生不良性貧血患者におけるテロメア関連遺伝子変異の解析。第71回日本血液学会総会、京都、2009.10.25

G. 知的財産権の出願・登録状況

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

先天性角化不全症の効果的診断法の確立と治療ガイドラインの作成に関する研究

骨髓生検の病理診断

研究分担者 伊藤雅文 名古屋第一赤十字病院病理部

研究要旨：本研究は、先天性角化不全症（DC）について、造血不全を呈することから、造血障害のメカニズム、病理組織像を明らかにすることを目的とする。臨床病理学および遺伝子検索からDCと診断された、造血不全症例の骨髓病理を検索し、その病理学的特徴を明らかにした。小児骨髓異形成症候群、再生不良性貧血と類似する組織像であるが、そのいずれの定型的所見を満たさないパターンで、臨床的には再生不良性貧血により近い病態を呈する。

A. 研究目的

本研究の目的は1) 後方視的に先天性角化不全症と診断された、造血不全症例について、骨髓病理学的観点からその病理病態像を明らかにし、骨髓病理組織学的変化の特徴を抽出する。2) 新規発症例を対象に前方視的に中央診断をおこない疾患登録システムを構築する。

B. 研究方法

1) については、骨髓病理組織像の検討が可能であった1例については、経時的な病理組織学的検討が可能であり、免疫組織学的検討を加えた。

2) については、日本小児血液学会の疾患登録事業とリンクし、末梢血や骨髓塗抹標本を名古屋大学で、骨髓生検標本を当院で中央診断を行った。

(倫理面への配慮)

病理中央診断は、匿名化した情報での解析

を行った。

C. 研究結果

1) 病理組織学的検討ができた症例は、6歳男児汎血球減少症例である。骨髓組織では、骨髓生検標本は、ほとんど脂肪髄からなり、造血細胞は極めて少数で、成熟巨核球は観察されない。再生不良性貧血で見られる mast cell は見られない。骨髓の線維化はなく、再生不良性貧血との鑑別を要する像である。骨髓クロット標本では、少数の造血細胞が見られ、高度な顆粒球低形成で、分化型顆粒球は極めてわずかである。相対的赤芽球過形成で、軽度の megaloblastic change を伴い、弱い異形成を見る。芽球の増加は見られない。Mast cell は観察されない。組織学的には low grade MDS の鑑別が難しい像である。

免疫組織学的に、MDS で見られる赤芽球の HbF 発現を比較的多数認め、p53+細胞