

E. 結論

上記結果で示したように、いずれの項目も順調に実験が進行中であり、iPS 細胞や ES 細胞を用いた細網異形成症の病態解析の準備が整いつつある。来年度にはこれらを用いた詳細な病態解析を行い、早期診断法や新規治療法の開発を行う予定である。

F. 研究危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 特別講演

- 1) 中畑龍俊:iPS 細胞の臨床への応用. 第 6 回北関東小児がんセミナー 5 月 16 日 高崎市 協和発酵キリン株式会社探索研究所
- 2) 中畑龍俊:iPS 細胞を用いたこれからの小児医療. 第 5 回医学生・若手医師のための小児科診療最前線～新生児医療から高度先端医療・移植医療まで～ 6 月 6 日 大阪市 きたのホール
- 3) 中畑龍俊:iPS 細胞などの幹細胞を用いたこれからの小児医療の可能性. 第 1 回日本小児科学会長野地方会 6 月 7 日 松本市 信州大学医学部附属病院
- 4) 中畑龍俊:幹細胞を用いた再生医療の現状と未来. 第 15 回岡山県自己血輸血研究会 7 月 18 日 岡山市 オルガホール
- 5) 中畑龍俊:iPS 細胞を用いた今後の医療. 第 9 回神奈川小児免疫病・リウマ

チ性疾患研究会 7 月 31 日 横浜市 横浜ベイシェラトンホテル&タワーズ

- 6) 中畑龍俊:iPS を用いた今後の医療. 第 8 回奈良輸血セミナー 8 月 1 日 奈良市 レストラン菊水(協和発酵キリン)
- 7) 中畑龍俊:iPS 細胞などの幹細胞を用いた血液疾患の研究と診療. 第 16 回奈良県血液研究会 9 月 26 日 奈良県商工会議所 奈良市
- 8) 中畑龍俊:iPS 細胞を用いた今後の医療. 第 19 回日本小児リウマチ学会総会・学術集会 10 月 2-4 日(4 日) 京都リサーチパーク 京都市
- 9) 中畑龍俊:iPS 細胞産業化の課題に関する論点整理. BioJapan 2009～World Business Forum～ 10 月 9 日 パシフィコ横浜 横浜市(セッション『iPS 細胞産業化の課題ー生命倫理、標準化の観点から』)
- 10) 中畑龍俊:iPS 細胞を用いた今後の医療. 第 28 回信州免疫アレルギー懇話会 11 月 18 日 信州大学医学部附属病院 松本市

2. 基調講演

- 1) 中畑龍俊:再生医療研究の現状と将来. 第 14 回静岡健康・長寿学術フォーラム 10 月 2-4 日(3 日) 静岡県コンベンションアーツセンター 静岡市

3. シンポジウム

- 1) 中畑龍俊、遠藤文夫:再生医療の近未来と iPS 細胞. 第 112 回日本小児科学会学術集会総合シンポジウム 1 4 月 17 日 奈良文化会館 奈良県奈良市

- 2) 中畑龍俊:iPS 細胞を用いた今後の医療の可能性. 第 112 回日本小児科学会学術集会総合シンポジウム 1 4 月 17 日 奈良文化会館 奈良県奈良市

4. 国際学会(シンポジウム)

- 1) Tatsutoshi Nakahata: Clinical applications of various stem cells. The Fourth iCeMS International Symposium (Integrated Physical/Chemical Biology of The Cell: From Genes to Membrane Systems) May 27-29(28),2009 Hotel Fujita K y o t o .
- 2) Tatsutoshi Nakahata: Future of regenerative medicine with various stem cell. Morning Symposium 3-2 Regenerative Medicine, The 9th World Congress on Inflammation July 6-10,2009 Keio Plaza Hotel, Tokyo.
- 3) Tatsutoshi Nakahata: Future of regenerative medicine with various stem cell. Plenary Lecture, The 3rd International Symposium of Lysosomal Storage Diseases. Sep. 26-27, 2009 Nagoya Noh Theater, Nagoya.

5. 国内学会(一般演題)

- 1) 丹羽明、深津智樹、梅田雄嗣、張璽、森嶋達也、才田聡、斉藤潤、沖田圭介、酒井宏水、山中伸弥、平家俊男、中畑龍俊:iPS 細胞由来赤芽球系分化の経時的解析と成熟血球の機能評価. 第 71 回日本血液学会学術集会 10 月 23 -25 日 国立京都国際会館 京都市

6. セミナー、研究会、懇話会、地方会、フォーラム、班会議

- 1) 才田聡、渡邊健一郎、野村安隆、八木英哉、納富誠司郎、森嶋達也、藤野寿典、松原央、足立壮一、中畑龍俊、荒川芳輝、岸陽:Anaplastic ependymoma の1歳女児例. 第 31 回近畿小児がん研究会 3 月 14 日 大阪市 大阪市総合医療センター
- 2) 中畑龍俊:iPS 細胞を用いた今後の医療の可能性. 第 45 回姫路市医師会夏季大学 7 月 26 日 姫路市医師会館 姫路市
- 3) 中畑龍俊:Future of regenerative medicine with various stem cells. The 3rd International Symposium of Lysosomal Storage Diseases (第 13 回国際ライゾーム病シンポジウム) 9 月 26-27 日 名古屋能楽堂 名古屋市

H. 知的財産権の出願・登録状況、参考文献

1. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

2. 参考文献

- 1) Pannicke U, Hönig M, Hess I, Friesen C, et al. Reticular dysgenesis (aleukocytosis) is caused by mutations in the gene encoding mitochondrial adenylate kinase 2. Nat Genet. 2009 Jan; 41(1): 101-5.
- 2) Lagresle-Peyrou C, Six EM, Picard C, et al. Human adenylate kinase 2 deficiency causes a profound

hematopoietic defect associated with
sensorineural deafness. Nat Genet.
2009 Jan; 41(1):106-11.

細網異形成症の疫学調査、診断、治療法に関する研究

森 尾 友 宏 （東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学分野）

研究要旨

細網異形成症は極めて稀な疾患であるが、骨髄不全症候群の中に診断がつかないままに紛れている可能性がある。本年度は骨髄不全症候群として診断が確定していない症例についての情報を得て、個別に解析遺伝子について確認を行った。その結果全例で難聴を認めなかったが、8例中1例においてのみ Dyskerin などの責任遺伝子が判明した。そこで候補遺伝子を効率よくスクリーニングする手技を開発するとともに、AK2 遺伝子解析を立ち上げた。1症例において遺伝子解析を実施したが変異を認めなかった。

A. 研究目的

細網異形成症は、リンパ球分化障害、骨髄系細胞分化障害、感音性難聴を呈する難病である。多系統の細胞の分化障害により発症することが特色である。本症患者の予後の改善と根治をめざし、医療水準向上に貢献するため、本年度は本疾患の鑑別診断として重要な骨髄不全症候群の実態を把握し、骨髄不全症候群および細網異形成症の遺伝子診断を行行うことを目的とした。

B. 研究方法

1. 小児期の骨髄不全症候群で診断が確定していない8症例につき情報を得る。
2. 骨髄不全症候群で診断確定に至っていない症例で、かつ造血細胞移植が行われていない症例では末梢血検体から核酸を抽出し保存した。造血細胞移植が行われている患者では、口腔スワブを採取し、同様に核酸を抽出して保存

する。

3. 骨髄不全症候群候補遺伝子の解析を行うと共に、片アリル遺伝子異常(遺伝子脱落あるいは発現異常)を解析するために、mRNAレベルでの発現が1/2となる状態を解析できるシステムを構築する。
4. 候補患者において AK2 遺伝子解析を行う。

(倫理面への配慮)

本研究は、患者検体を用いて解析を行う。実際には診療に役立つ情報が得られるが、採取量及び、採取時の苦痛には十分な配慮を行う。また遺伝子解析については各種指針に則り、患者個人情報保護について十分な配慮を行う。

C. 研究結果

1. 骨髄不全症候群の情報収集
8症例の情報を収集した。その中では全

例がリンパ球の減少を伴う汎血球減少を示したが、リンパ球数は 1,000/mm³ 以上であった。また 8 症例においては感音性難聴を認めなかった。そのうち 5 症例においては造血細胞移植が行われていた。

2. 核酸の抽出及び保存

移植を行った 5 症例のうち 2 症例からは口腔スワブから核酸を抽出し保存した。また移植が行われていない 3 症例のうち 2 症例では末梢血から核酸を抽出保存した。

3. 骨髄不全症候群遺伝子解析

上記 4 症例において骨髄不全症候群責任遺伝子解析系および、片アレル発現不全を検出できる realtime PCR 系を立ち上げて解析を行った。1 症例において haploinsufficiency が証明され、今後さらにその機能解析に進める体制を整えている。

4. AK2 遺伝子解析

AK2 遺伝子解析につき、自施設において塩基配列決定が可能になった。1 症例において AK2 遺伝子解析を行ったが異常を認めなかった。

D. 考察

細網異形成症は極めて稀な疾患であり、典型的な症状、身体所見及び検査異常を示す患者は存在しなかった。しかし骨髄不全症候群での非典型例の中でも、責任遺伝子が確定している症例は少なく(20%程度)、この疾患群に AK2 遺伝子異常が含まれている可能性も考えられる。

E. 結論

候補となる患者の検体を収集し、骨髄不

全症候群および AK2 異常症の両者を診断できるシステムを開発した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Oba D, Hayashi M, Minamitani M, Hamano S, hisaka N, Kikuchi A, Kishimoto H, Takagi M, Morio T, Mizutani S. Autopsic study of cerebellar degeneration in siblings with ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD). *Acta Neuroathologica*, 2010. (in press)
- 2) Inoue H, Takada H, Kusuda T, Goto T, Ochiai M, Kinjo T, Muneuchi J, Takahata Y, Takahashi N, Morio T, Kosaki K, Hara T. Successful cord blood transplantation for a CHARGE syndrome with CHD7 mutation showing DiGeorge sequence including hypoparathyroidism. *Eur J Pediatr*, 2010 Jan 6. [Epub ahead of print]
- 3) Nanki T, Takada K, Komano Y, Morio T, Kanegane H, Nakajima A, Lipsky PE, Miyasaka N. Chemokine receptor expression and functional effects of chemokines on B cells: implication in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2009 Oct 5;11(5):R149. [Epub ahead of print]
- 4) Miyanaga M, Sugita S, Shimizu N, Morio T, Miyata K, Mochizuki M. A significant association of viral loads

- with corneal endothelial cell damage in cytomegalovirus anterior uveitis. *Br J Ophthalmol.* 2009 Sep 3. [Epub ahead of print]
- 5) Hasegawa D, Kaji M, Takeda H, Kawasaki K, Takahashi H, Ochiai H, Morio T, Omori Y, Yokozaki H, Kosaka Y. Fatal degeneration of specialized cardiac muscle associated with chronic active Epstein-Barr virus infection. *Pediatr Int.* 51:846-8, 2009.
 - 6) 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 a distinct expression profile of cytokine-related genes from those of peripheral blood origin. *Immunology* 128:405-419, 2009.
 - 7) Morinishi Y, Imai K, Nakagawa N, Sato H, Horiuchi K, Ohtsuka Y, Kaneda Y, Taga T, Hisakawa H, Miyaji R, Endo M, Oh-Ishi T, Kamachi Y, Akahane K, Kobayashi C, Tsuchida M, Morio T, Sasahara Y, Kumaki S, Ishigaki K, Yoshida M, Urabe T, Kobayashi N, Okimoto Y, Reichenbach J, Hashii Y, Tsuji Y, Kogawa K, Yamaguchi S, Kanegane H, Miyawaki T, Yamada M, Ariga T, Nonoyama S. *J. Pediatr.* 155: 829-833, 2009.
 - 8) Morio T, Takahashi N, Watanabe F, Honda F, Sato M, Takagi M, Imadome KI, Miyawaki T, Delia D, Nakamura K, Gatti RA, Mizutani S. Phenotypic variations between affected siblings with ataxia-telangiectasia: ataxia-telangiectasia in Japan. *Int. J. Hematol.* 90:455-462, 2009.
 - 9) Isoda T, Ford A, Tomizawa D, van Delft F, De Castro DG, Mitsui N, Score J, Taki T, Takagi M, Morio T, Saji H, Greaves M, Mizutani S. Immunologically silent cancer clone transmission from mother to offspring. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106: 17882-5. 2009.
 - 10) Uchisaka N, Takahashi N, Sato M, Kikuchi A, Mochizuki S, Imai K, Nonoyama S, Ohara O, Watanabe F, Mizutani S, Hanada R, Morio T. Two brothers with ataxia-telangiectasia-like disorder with lung adenocarcinoma. *J. Pediatr.* 155:435-438, 2009.
 - 11) Futagami Y, Sugita S, Fujimaki T, Yokoyama T, Morio T, Mochizuki M. Bilateral anterior granulomatous keratouveitis with sunset glow fundus in a patient with autoimmune polyglandular syndrome. *Ocul Immunol Inflamm.* 17:88-90, 2009.
 - 12) Takahashi N, Matsukoto K, Saito H, Nanki T, Miyasaka N, Kobata T, Azuma M, Lee S-K, Mizutani S, Morio T. Impaired CD4 and CD8 effector function and decreased memory T-cell populations in ICOS deficient patients. *Immunol.* 182:5515-5527, 2009.

13)Yoshida H, Kusuki S, Hashii Y, Ohta H, Morio T, Ozono K. Ex vivo-expanded donor CD4 T lymphocyte infusion against relapsing neuroblastoma: A transient Graft-versus-Tumor effect. *Pediatr Blood Cancer* 52:895-897, 2009.

2. 学会発表

14)清河信敬、恩田恵子、今留謙一、矢島美佐子、中村宏紀、片桐洋子、森尾友宏、藤本純一郎、藤原成悦: ドナーリンパ球輸注を目的とした臍帯血由来活性化CD4細胞の性状解析、第39回日本免疫学会総会・学術集会、2009年12月2日～4日、大阪

15) 森尾友宏、水谷修紀: Basic to Clinical: Artemis/Cernnunos/Lig4 deficiency、第51回日本小児血液学会、2009年11月27日～29日、東京

16)満生紀子、遠藤明史、小野敏明、高木正稔、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀: 当科における原発性免疫不全症に対する骨髄非破壊的前処置による移植の検討、第51回日本小児血液学会 2009年11月27日～29日、東京

17)遠藤明史、満生紀子、小野敏明、高木正稔、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀: RISTにて臍帯血移植後、TMA、血球貪食症候群を発症し死亡したX連鎖重症複合型免疫不全症の1例、第51回日本小児血液学会、2009年11月27日～29日、東京

18)森尾友宏: ex vivo増殖臍帯血T細胞輸注療法の臨床研究、政策創薬総合研究事業平成21年度「臍帯血DLIの

実用化と細胞治療製剤の医薬品化へ向けてのトランスレーショナルリサーチ」(研究代表者 藤原成悦)、2009年10月20日、東京

19)満生紀子、大川哲平、高橋考治、遠藤明史、青木由貴、小野敏明、落合央、峯岸志津子、高木正稔、梶原道子、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀: RISTによる非血縁臍帯血移植を施行したSCID3例、小児H-SCT研究会、2009年10月9日、東京

1) 長澤正之、小野敏明、遠藤明史、青木由貴、磯田健志、富澤大輔、高木正稔、梶原道子、森尾友宏、水谷修紀: 当科における同種造血幹細胞移植(1995-2007年)の検討、第112回日本小児科学会学術総会、2009年4月17日～19日、奈良

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

APPLICATION OF SYNOVIUM-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS (MSCs) FOR CARTILAGE OR MENISCUS REGENERATION(米国国際特許出願中YCT-1301)出願人: 関矢一郎、発明者: 宗田大、森尾友宏、清水則夫、黒岩保幸

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

細網異形成症の診断と治療に関する調査研究

小原 收 ((財)かずさDNA研究所副所長)

研究要旨

細網異形成症の確定診断を可能とするために、その疾患発症原因となる可能性のある遺伝子解析とそのための情報基盤整備を行った。今年度は、2例の細網異形成症疑い検体に対して現在疾患原因として知られているアデニレートキナーゼ2遺伝子の構造解析を行ったが、それらの遺伝子にはいずれも疾患原因と想定されるような変異は見いだせなかった。これは細網異形成症に、アデニレートキナーゼ2以外の原因遺伝子が存在することを強く示唆する結果であり、今後の更なる細網異形成症原因遺伝子探索の必要性を示している。

A. 研究目的

細網異形成症は、リンパ球分化障害、骨髄系細胞分化障害、感音性難聴を呈する難病である。多系統の細胞の分化障害により発症することが特色である。本症患者の予後の改善と根治をめざし、医療水準向上に貢献するため、分担研究として細網異形成症の原因遺伝子を同定する事を目的とする。本年度は、我が国における細網異形成症疑いの患者検体について既知原因遺伝子における変異の有無を検討する。

B. 研究方法

細網異形成症の疑いのある患者検体について、既知の細網異形成症責任遺伝子として近年同定されたAdenylate kinase 2 (以下AK2と略)の構造解析を行った。具体的には、これらの遺伝子のタンパク質コードエクソン領域をその両端に存在するイントロン領域(20塩基以上)を酵素的増幅法(PCR法)で増幅するためのプライマー合成、

ゲノムDNAからの増幅反応、増幅産物のDNA塩基配列解析、得られた配列のデータベース中のリファレンス配列との比較を行った。また、今後のために、AK2のメッセンジャーRNA配列も解析できる準備を行った。この塩基配列比較については、我々が開発したMutation@A Glance (<http://rapid.rcai.riken.jp/mutation/>)を活用した。

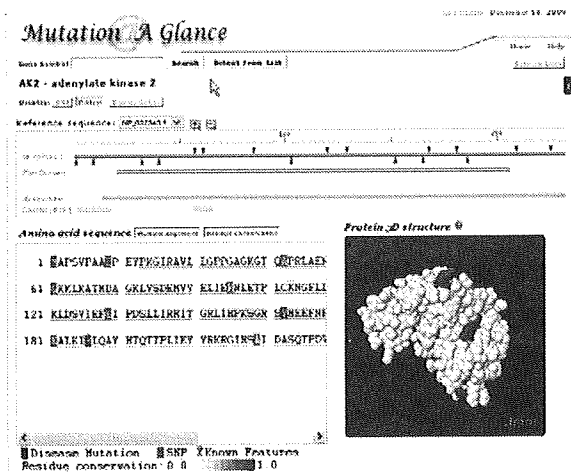
(倫理面への配慮)

臨床検体は共同研究者の施設で採取・調製され、匿名化された状態でのみ受け入れ、受け入れ時にそれぞれの施設で同意書へのサインが行われていることを確認した。今回の研究ではゲノムDNAの構造解析を含むため、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)に従い、(財)かずさDNA研究所での倫理審査委員会による承認を得て行った。

C. 研究結果

本年度は、2例の細網異形成症疑い検体に対して、AK2の遺伝子構造解析を行った。その結果、アミノ酸変化を伴う既知の一塩基多型は検出されたものの、タンパク質機能に大きな影響を与えることが示唆されるような変異は見出されなかった。こうしたAK2の構造と機能相関を迅速に評価することは重要な基盤となるので、そのためにAK2に関するデータを Mutation@A Glance に登録し、以下のように既知変異と単なる一塩基多型を見分け、新たに見出された遺伝子変異の機能的なインパクトを評価する系を立ち上げた(図1)。以下に、このシステムで見られるAK2の分子情報のスクリーンショットを示す。これにより、AK2の変異がタンパク質の3次元構造上にもたらす影響の評価までも簡便に行う事が可能となった。

図1



D. 考察

1. 達成度について

初年度に予定していた研究課題はほぼ達成できた。

2. 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

次世代シーケンサーによる疾患責任遺伝子探索は正に国際的な競争が激化している時期であり、それを臨床研究に結び付けるために必要な、遺伝子変異情報と機能情報を相互比較するための生物情報学的基盤が強く求められている。AK2を例としてその基盤の有効性を検討できたことは、他の疾患研究についても国際的な基盤となりえるものであると期待できる。

3. 今後の展望について

次年度以降、我が国で我々が立ちあげているPIDJ臨床アーカイブを活用することにより、より大きな細網異形成症疑い患者検体プールへのアクセスが可能となるであろう。それにより、もっと効率的な細網異形成症原因遺伝子探索が実現できるものと期待できる。

E. 結論

初年度の細網異形成症責任遺伝子探索の準備は順調に進捗した。しかしながら、細網異形成症の病態の多様性のために、現在既知のAK2遺伝子だけでそれらの病態が説明できるとは考えられず、実際、今年度の検体では既知遺伝群に疾患関連性の変異は見いだせなかった。細網異形成症の症例数が限定されることから、AK2以外の原因遺伝子探索には、遺伝学的なアプローチが適していると考えられる。そうした方法論と次世代シーケンサーの活用により、新たな細網異形成症原因遺伝子探索が可能になるものと期待できる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 今井 耕輔、Sujatha Mohan、小原 收：
免疫不全症候群の遺伝子診断の中央
化とデータベース 臨床検査 53(5)，
533-540 (2009)
- 2) 大嶋 宏一、小原 收：免疫不全症遺
伝子解析法の実際 臨床検査 53(5)，
547-552 (2009)
- 3) Ikeda K, Yamaguchi K, Tanaka T,
Mizuno Y, Hijikata A, Ohara O, Takada
H, Kusuhara K, Hara T. Unique
activation status of peripheral blood
mononuclear cells at acute phase of
Kawasaki disease. Clin Exp Immunol.
2009 Dec 15. [Epub ahead of print]
- 4) Oshima K, Yamazaki K, Nakajima Y,
Kobayashi A, Kato T, Ohara O,
Agematsu K. A case of familial
Mediterranean fever associated with
compound heterozygosity for the pyrin
variant L110P-E148Q/M680I in Japan.
Mod Rheumatol. 2009 Dec 8. [Epub
ahead of print]
- 5) Keerthikumar S, Bhadra S, Kandasamy
K, Raju R, Ramachandra YL,
Bhattacharyya C, Imai K, Ohara O,
Mohan S, Pandey A. Prediction of
candidate primary immunodeficiency
disease genes using a support vector
machine learning approach. DNA Res.
2009 Dec;16(6):345-51.

- 6) Uchisaka N, Takahashi N, Sato M,
Kikuchi A, Mochizuki S, Imai K,
Nonoyama S, Ohara O, Watanabe F,
Mizutani S, Hanada R, Morio T. Two
brothers with ataxia-telangiectasia-like
disorder with lung adenocarcinoma. J
Pediatr. 2009 Sep;155(3):435-8.
- 7) Hashii Y, Yoshida H, Kuroda S, Kusuki
S, Sato E, Tokimasa S, Ohta H,
Matsubara Y, Kinoshita S, Nakagawa N,
Imai K, Nonoyama S, Oshima K, Ohara
O, Ozono K. Hemophagocytosis after
bone marrow transplantation for
JAK3-deficient severe combined
immunodeficiency. Pediatr Transplant.
2009 Jul 31. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

- 1) 土方 敦司、大嶋 宏一、今井 耕輔、
野々山 恵章、金兼 弘和、宮脇 利
男、小原 收：原発性免疫不全症研究
における問題解決のための情報科学
的アプローチ 第3回日本免疫不全
症研究会 2010年1月30日、東京
- 2) 森尾 友宏、今井 耕輔、小原 收、金
兼 弘和、竹森 利忠、田中 敏郎、松
本 功、原 寿郎：分類不能型免疫不
全症の全国調査と亜群同定 第3回
日本免疫不全症研究会 2010年1月
30日、東京
- 3) Hijikata A, Raju R, Keerthikumar S,
Ramabadran S, Balakrishnan L,
Pandey A, Mohan S, Ohara O.
Mutation@A Glance:A New
Bioinformatics Tool for Mutation
Analysis in Primary Immunodeficiency

Diseases. Keystone Symposia Human Immunology and Immunodeficiencies Beijing / China 2009 年 5 月

4) Keerthikumar S, Ramabadran S, Raju R, Balakrishnan L, Hijikata A, Pandey A, Ohara O, Mohan S. RAPID: Resource of Asian Primary Immunodeficiency Diseases An Integrated Informational Platform. Keystone Symposia Human Immunology and Immunodeficiencies Beijing / China 2009 年 5 月

5) Imai K, Nonoyama S, Oshima K, Kanegane H, Miyawaki T, Ohara O, Takemori T, Hara T. Primary Immunodeficiency Database Network in Japan. Keystone Symposia Human Immunology and Immunodeficiencies Beijing / China 2009 年 5 月

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

骨髄非破壊的造血幹細胞移植にて救命し得た 細網異形成症の1例

蒲池 吉朗 (名古屋大学医学部小児科)

小島 勢二 (名古屋大学医学部小児科)

研究要旨

Reticular Dysgenesis(RD)は新生児期に発症するリンパ球及び好中球減少と難聴を主徴とする重症複合免疫不全症(SCID)の一型で、わが国の全国登録でも過去に1例の報告があるのみの極めて稀な疾患である。長らく原因遺伝子は不明であったが、2008年にミトコンドリアのエネルギー代謝に関与する Adenylate Kinase 2 (AK2)が原因遺伝子であることが報告された。今回、日齢2に先天性造血不全症候群が疑われ当科紹介、精査の結果、RDと臨床診断し、日本で初めてHLA一致の兄から骨髄非破壊的造血幹細胞移植を行ない救命し得た女児例を経験した。本児では、その後難聴も明らかとなり、遺伝子解析の結果 AK2 の compound heterozygous mutations (R103Q, R137X)を認め、RDと確定診断した。リンパ球減少とG-CSF不応性の好中球減少および難聴を伴う患者では、遺伝子解析により早期にRDの確定診断を行い、造血幹細胞移植を施行することが救命のために必要と考えられた。

A. 研究目的

細網異形成症 (RD)は新生児期の重症感染症により発症するリンパ球及び好中球ともに著減している SCID の極型として1959年に De Vaal と Seyneheve により報告され、その頻度は SCID の中でも2%以下で、難聴を伴う非常に希な疾患である。RDの原因遺伝子は長らく不明であったが、2008年11月にフランスとドイツの2つのグループがミトコンドリアのエネルギー代謝に関与している Adenylate Kinase 2 (AK2)が原因遺伝子であることを報告した。(Nat Genet. 2009;41(1):101-5, 106-11)

B. 研究方法

今回我々は、RDと臨床診断していた SCID の1例をフランスのグループと共同し

て解析し、AK2の異常を見だし、日本で初めてRDと確定診断したので報告する。

C. 研究結果

症例は日齢5の女児。近医にて在胎24週に胎児エコーで腹水が認められたが出生時には消失。在胎36週4日、経膈分娩で出生した。出生体重3068g、APGAR scoreは8点(1分)/10点(5分)であった。出生後軽度の酸素飽和度の低下があり、血液検査で白血球数 $2900/\mu\text{l}$ と減少していた。日齢2には白血球数 $1500/\mu\text{l}$ (好中球 $120/\mu\text{l}$ 、リンパ球 $1020/\mu\text{l}$)とさらに低下、CRP値も2.3と上昇したためG-CSFと抗生剤の投与を行なったが改善が認められず、当科紹介、入院となった。本児は第3子で二人の兄はどちらも健康で、他に特記

すべき家族歴はなかった。

入院時現症は、体重 2800g、体温 37.0°C、心拍数 120 回/分、呼吸数 40 回/分。呼吸音：清。心音：整、雑音なし。腹部：軟、平坦、肝臓3cm、脾臓1cm 触知。頸部、腋窩部、臍径部リンパ節は触知せず。口蓋扁桃は認めず。皮疹も認めなかった。胸部 CT 検査にて胸腺低形成を認めた。

入院時検査所見では、末梢血白血球 200/ μ l(好中球 17/ μ l、リンパ球 140/ μ l)と著減し、血小板 8.2 万/ μ l、CRP1.4 以外特記すべきことはなかった(表 1)。

表 1 入院時検査所見

末梢血検査			生化学検査		
WBC	200	/ μ l	TP	6.1	g/dl
好中球	8.7	%	BUN	5	mg/dl
リンパ球	69.6	%	CRE	0.5	mg/dl
単球	5	%	Na	141	mEq/l
RBC	365万	/ μ l	K	5.0	mEq/l
Hb	13.2	g/dl	Cl	107	mEq/l
Hct	39	%	GOT	21	IUA
Ret	16	%	GPT	5	IUA
Plt	8.2万	/ μ l	ALP	394	IUA
			LDH	289	IUA
			TB	3.7	mg/dl
			DB	1.8	mg/dl
血清免疫グロブリン			GLU	36	mg/dl
IgG	802	mg/dl	CRP	1.4	mg/dl
IgA	<10	mg/dl			
IgM	<10	mg/dl			
			染色体検査：正常女性核型		
			抗HLA抗体：陰性(母親血清)		

骨髄は低形成で顆粒球系細胞はほとんど認めなかった。末梢血リンパ球の表面マーカーは、CD3+ 9.86%, CD4+ 0.23%, CD8+13.9%, CD8+HLA-DR+ 17.2%, CD8+CD45RO+ 8.30%, CD8+TCR $\alpha\beta$ +12.5%, CD16+ 14.2%, CD19+20+ 25.1%と T 細胞は著減し、そのほとんどが活性化したメモリー CD8 陽性細胞であった。B 細胞は増加、NK 細胞は正常範囲内であった。リンパ球芽球化能は、PHA, ConA, PWM, SAC に対して S.I は各々 0.9, 1.1, 1.5, 1.7 と著減していた。T cell Receptor Excision Circle(TREC)は 10copy/ μ gDNA 以下であった。in vitro 免疫グロブリン産生も認められなかった(表 2)。

表 2 免疫学的検査

末梢血リンパ球表面マーカー					
CD2 ⁺	18.54%	CD8 ⁺ DR ⁺	17.22%	CD16 ⁺	14.16%
CD3 ⁺	9.86%	CD8 ⁺ CD45RO ⁺	8.30%	CD19 ⁺ CD20 ⁺	25.1%
CD4 ⁺	0.23%	CD8 ⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺	12.46%		
CD8 ⁺	13.92%	CD8 ⁺ TCR $\gamma\delta$ ⁺	0.30%		
リンパ球芽球化能					
	(-)	PHA	ConA	PWM	SAC
Count (cpm)	540.0	488.5	598.0	836.5	896.0
S.I.	-	0.9	1.1	1.5	1.7
TREC: <10 copy/ μ g DNA					
in vitro 免疫グロブリン産生: 認めず					
NK細胞活性 (E/T 20:1): 20 % (control 18-40%)					
胸部CT: 胸腺低形成					

患児末梢血リンパ球中 CD4 陽性細胞はほとんど認められなかったが、CD8 陽性細胞が 14% 存在し、ほとんどが HLA-DR+, CD45RO+ であったことから、経胎盤移行した母 CD8 細胞の存在を疑った。患児末梢血リンパ球のキメリズム解析を行ったところ、患児 CD8 細胞は母親由来、B 細胞と NK 細胞は患児由来と考えられた。

以上より、本症例は母 CD8 細胞を有する SCID に好中球減少も合併していたことから、RD と診断した。

経過: HLA 一致の兄がいたため兄妹間の同種骨髄移植を行った(生後 4 ヶ月)。本症例では母由来 CD8 細胞が存在したため、Fludarabine (total: 125 mg/m²)、L-PAM (total: 80 mg/m²)による前処置を行なった。輸注総細胞数は 1.87x10⁸/kg で、CD34 陽性細胞は 3.91x10⁶/kg であった。GVHD 予防は、短期メソトレキセートとサイクロスポリン A を用いた。好中球 500/ μ l 以上は day21、リンパ球 1000/ μ l 以上は day22、網状球 10%以上 day26、血小板 20000/ μ l 以上は day28 であった。移植後 Day3 に急性心不全を発症したが、対症療法のみにて Day41 には軽快した。急性および慢性 GVHD の発症は認めなかった。移植後の FISH 法を用いたキメリズム解析では、末梢血リンパ球 CD3, CD19, CD56 陽性細胞分画における XY 陽性細胞は各々

100%,100%,99.4%であり(Day70)、骨髓細胞では XY 陽性細胞は 95.8%(Day90)と完全キメラと考えられた。ガンマグロブリン補充は Day206 以降中止したが、IgG 1000mg/dℓ以上を維持しており、PHA,ConA に対する芽球化能は Day40 には各々26094cpm、19679cpmとなり、Day62にはCD3陽性細胞1500/ μ ℓとなり、免疫学的再建は順調であった。しかしながら、移植後1年6ヵ月経過(1歳9ヵ月)頃に母より難聴の訴えがあり、意味のある発語もなかったため(2歳3ヵ月)、聴性脳幹反応(ABR)を行ったところ RD に高頻度に合併する両側感音性難聴を認めた。

遺伝子解析:2008年にRDの原因遺伝子AK2が同定されたため、Cavazzana-Calvo M.に本児のAK2解析を依頼したところ、複合ヘテロ変異(R103Q, R137X)が認められた(図1)。

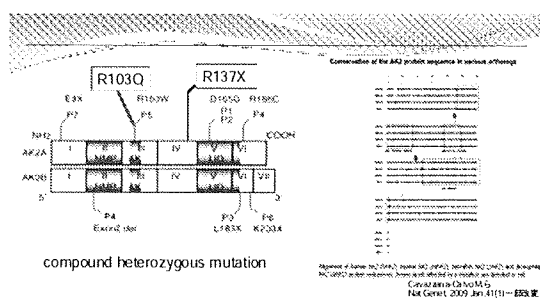


図1 AK2 遺伝子変異解析

D. 考察

RDの根治療法は、造血幹細胞移植であるが、これまでわが国での成功例の報告はなかった。今回救命できた原因として、本症例ではHLA一致の同胞がいたこと、新生児期に発見され重篤な感染症なく移植まで管理できたこと、フルダラビンをを用いた骨髓非破壊的前処置が可能であったことが挙げられる。

2008年にRDの原因遺伝子AK2が同定されたため、本症例で解析した結果、compound heterozygous mutationを示し、RDの確定診断に至った。

RDは非常にまれな疾患ではあるが、新生児期の好中球減少症のうち、リンパ球減少とABR検査にて感音性難聴を伴うならば、鑑別診断としてRDを考慮すべきであると考えられた。

E. 結論

本邦初のRDにおける造血幹細胞移植成功例を報告した。リンパ球減少とG-CSF不応性の好中球減少および難聴を伴う患者では、遺伝子解析により早期にRDの確定診断を行い、造血幹細胞移植を施行することが必要と考えられた。

謝辞

キメリズム解析を行っていただきました名古屋医療センター・臨床研究センター 大橋春彦先生に深謝致します。

F. 研究危険情報

特になし。

G. 研究発表

蒲池吉朗:「新規に発見された原因遺伝子検索にて診断が確定した Reticular Dysgenesis(細網異形成症)の1例」東海小児血液懇話会、2009.2月 名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

骨髄不全症におけるテロメア長短縮化症例を検索することの重要性

山口 博 樹 (日本医科大学 血液内科)

研究要旨

骨髄不全症(BMF)において、テロメア制御遺伝子異常が原因で発症したと考えられる症例が約 3%存在し、これらは免疫抑制療法(IST)に不応性であった。そこでテロメア長の短縮化を検索することが、臨床上 BMF と診断された不全型の Dyskeratosis congenita(DKC)の症例や、IST 抵抗性の再生不良性貧血(AA)をスクリーニング出来ないかを臨床的に AA と診断された 28 症例において検討した。テロメア長が短縮した症例群では IST に反応が認められた症例は 1 症例(14.3%)のみであった($p=0.005$)。しかしテロメア制御遺伝子の変異が明らかとなった症例を除外すると、IST の反応性とテロメア長の短縮化には明らかな関連性は認められなかった。BMF においてテロメア長の検索は不全型の DKC をスクリーニングするには有用であるが、IST 抵抗性の AA をスクリーニングすることは難しい。

A. 研究目的

再生不良性貧血(aplastic anemia: AA)は造血幹細胞の減少に基づく骨髄機能低下によって発症する骨髄不全症(BMF)の一つである。BMF にはその他にも骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndrome: MDS) や、Dyskeratosis congenita(DKC)などの遺伝性の BMF などが含まれる。典型的な AA は免疫機序を介した病態により発症し免疫抑制療法 (immunosuppressive therapy: IST)が有効である。また臨床的に MDS と診断された中にも IST が有効な症例が認められることがある。

染色体 3' 末端のテロメアに局在するテロメラーゼ複合体や Shelterin 複合体は、

テロメア配列を伸長、補修、構造形成の保護をすることでテロメアを介した細胞分裂能および染色体の安定性を維持している。近年 DKC の原因遺伝子である上述のテロメア制御遺伝子の変異が、一部の AA や MDS に認められ、不全型の DKC の存在が明らかになった。不全型の DKC は臨床的に AA や MDS と診断されても IST の効果は得られない。以上より BMF の臨床診断にテロメア制御遺伝子異常の検索は重要であると考えられた。

しかしテロメア関連遺伝子変異の検索は煩雑で、実際の臨床のスクリーニングには不向きである。この理由として以下のことが考えられる。①対象となる遺伝子が多く、また遺伝子変異に hot spot がない

ためこれらの遺伝子の全長を検索しなくてはならない。②発見された塩基変異がテロメア長制御に影響をあたえる否かは機能解析を行わなければならない。③約1/3のDKCは原因遺伝子が不明であり、既知の遺伝子変異検索では不完全である。

そこでテロメア長の短縮化を検索することが、臨床上 BMF と診断された不全型DKC や、IST 抵抗性の AA をスクリーニングに有用でないかを検討した。

B. 研究方法

対象は臨床的にAA、MDSの不全性貧血(RA)と診断された28症例。テロメラーゼ複合体遺伝子である *DKC1*、*TERC*、*TERT* と、Shelterin 複合体遺伝子である *TINF2* 各遺伝子に関して direct sequence 法にて遺伝子配列を決定し変異を検索した。また Southern blot 法にてテロメア長を測定し、age-match 正常コントロールと比較することでテロメアの短縮化の検討を行った。

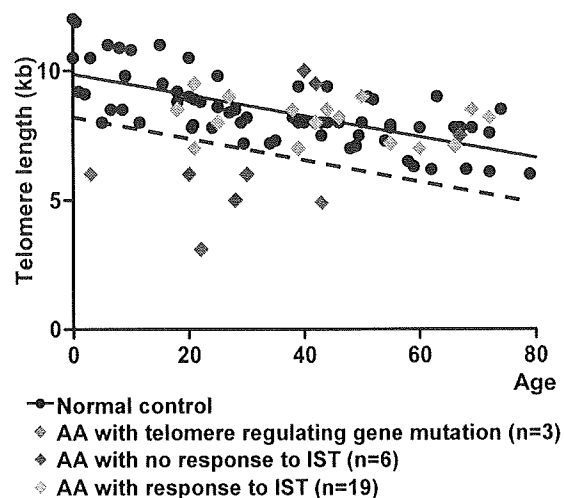
C. 研究結果

1. 臨床的にAA、MDSと診断された症例のテロメア長

臨床的にAA、MDSと診断され28症例に対してテロメア長を測定し正常コントロールと比較したところ、7症例にテロメア長の短縮化が認められた(図1)。またテロメア制御遺伝子群の変異を検索したところ、3症例に変異が認められた(*TERT*

E280K、*TINF2* R282C、*TINF2* Del n871-874)(図1赤)。

図1 臨床的に再生不良性貧血と診断された症例(n=28)

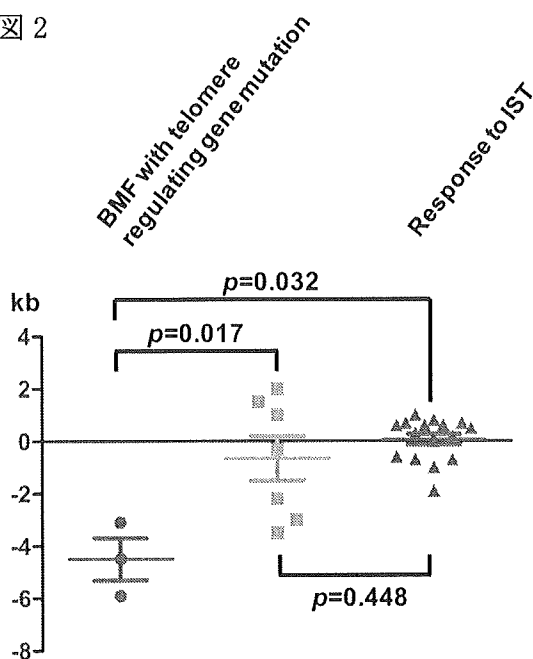


2. テロメア長の短縮化と免疫抑制療法の反応性

テロメア長が短縮した症例群では IST に反応が認められた症例は1症例(14.3%)のみであったが、短縮が認められなかった症例群では16症例(84.2%)に IST の反応が認められた ($p=0.005$)。

また IST の反応性によって症例を比較すると、不応症例群は、反応が得られた症例群と比較してややテロメア長が短い傾向が認められた($p=0.056$)。しかしテロメア制御遺伝子の変異が明らかとなった3症例を独立させて比較すると、これらは有意差をもってテロメア長の短縮化が認められたが($p=0.017$)、IST 不応症例群と反応群とではテロメア長の有意な違いは認められなかった ($p=0.448$)。(図2)

図 2



D. 考察

テロメア長が短縮した症例の中で IST に反応が認められた 1 症例のテロメア長は、正常下限よりわずかに短い程度の短縮であった。テロメア長は個人差があり、また BMF のような血球の減少が著しい場合は測定が難しい。今後はテロメア長の短縮の定義を検討する必要があると思われる。またテロメア長が短縮した症例の中で、テロメア制御遺伝子群の変異が認められなかった症例は、新規の遺伝子変異の存在を示唆していると思われる。

E. 結論

BMF においてテロメア長の測定は不全型 DKC をスクリーニングするには有用であるが、IST 抵抗性の AA をスクリーニングすることは難しいと考える。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hiroki Yamaguchi, Koiti Inokuchi, Junko Takeuchi, Hayato Tamai, Yoshio Mitamura, Fumiko Kosaka, Hinh Ly and Kazuo Dan. Identification of the *TINF2* and *SBDS* gene mutations in adult Japanese patients with acquired bone marrow failure syndromes. *Haematologica*. Submitted.

- 2) 山口博樹。遺伝子異常による造血不全。最新医学 2009; 64(7): 1603-1609

2. 学会発表

- 1) 竹内純子、山口博樹、玉井勇人、三田村佳勇(yoshio)、小坂文子、猪口孝一(koiti)、檀 和夫:本邦の骨髄不全症における *TINF2* 遺伝子異常の検索;第 71 回日本血液学会, 2009 年 10 月 23 日~25 日, 京都
- 2) 山口博樹、檀 和夫:テロメア関連遺伝子異常による骨髄不全症;第 71 回日本血液学会, 2009 年 10 月 23 日~25 日, 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

音受容に関する Adenylate Kinase-2(AK2)の内耳における役割についての研究

塩谷 彰 浩 (防衛医科大学校 耳鼻咽喉科学講座)

研究要旨

AK2 は免疫学的には骨髄細胞の分化、アポトーシスに関連していることが示唆されている。また、AK2 の発現が先天的にみられない細網異形成症の患者では免疫不全の他に難聴が高率にみられることが報告されている。そこで今回、我々は AK2 が音受容機構にどのように関与しているかを検討するために本研究を開始した。今年度はマウスにおける AK2 の存在の確認としてウエスタンブロットを行い、内耳における AK2 の存在を確認することができた。

A. 研究目的

AK2 の発現が先天的にみられない細網異形成症の患者では免疫不全の他に難聴が高率にみられることが報告されている。難聴のタイプは内耳性難聴であることより AK2 が内耳内において聴覚に重要な役割を果たしていることが推察される。本研究は AK2 が音受容機構にどのように関与しているかを検討するために本研究を開始した。

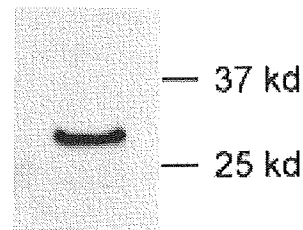
B. 研究方法

マウスを麻酔後、断頭、内耳骨胞を摘出し PBS 中で内耳組織を取り出した。内耳組織をホモジナイズしてサンプルとした。抗 AK2 抗体に対するウエスタンブロットを行った。

C. 研究結果

マウス内耳組織のウエスタンブロットにより、内耳組織に AK2 が確実に存在することが証明された(図1)。

図1



D. 考察

AK2 はミトコンドリアの内外膜間に存在し、好中球などにおいて細胞性免疫に大きい役割を果たしている他にいくつかの機能があることが報告されている。本研究では AK2 がマウス内耳組織などに強く発現していることが証明されたが、AK2 の機能として(1) ADP を ATP と AMP に脱リン酸化するというアデニンヌクレオチドの代謝に関与しているとされる。AK2 の欠陥が内耳障害に関与していると仮定すれば、内耳血管において ADP は内皮細胞の integrity の障害に重要な役割を果たしていることが推察される。これはこれまでにない発見であると考えられる。(2)ミトコンドリアの内外膜間に存在し、

FADD (Fas-associated protein with death domain)、caspase 10 と結合しアポトーシスを誘導するとされる。AK2 が内耳障害の起こるメカニズムにおいても深く関与していることが示唆される。今後は AK2 の内耳における局在の検討、内耳障害モデルを用いた機能的解析を加えてゆく予定である。

E. 結論

AK2 が内耳内において聴覚受容や内耳障害の病態に重要な役割を果たしている可能性が推察された。

F. 研究危険情報

特になし。

G. 研究発表

特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

○ 参 考 资 料