

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

久保達也、内田 靖:ジアゾキサイドが有効であった新生児一過性高インスリン血性低血糖症の1例 岐阜県小児科懇話会(第149回) 2010年9月16日 岐阜

久保達也、下川祐子、田淵久美子、青木雄介、安達真也、館林宏治、内田 靖:当院に於ける在胎 35 週以上の一絨毛膜双胎の取扱いと循環不全の発症頻度 日本周産期循環管理研究会(第8回) 2010年10月3日 東京

館林宏治、田淵久美子、安達真也、久保達也、内田靖:母体敗血症に伴い、サイトカインストームを発症したと考えられた一 双胎例 東海小児感染症研究会(第14回) 2010年10月9日 名古屋

館林宏治、田淵久美子、安達真也、久保達也、内田靖: *Ureaplasma parvum* により先天性肺炎を発症したと考えられる1例 岐阜県周産期懇話会(第44回) 2010年10月16日 岐阜

久保達也、下川祐子、田淵久美子、青木雄介、安達真也、館林宏治、内田 靖:胎便排泄遅延を呈した超低出生体重児に対するガストログラフィン注腸の検討 岐阜県周産期懇話会(第44回) 2010年10月16日 岐阜

内田 靖、盆野元紀、山本初実、大森雄介、山下博徳、酒見好弘、太田 明、河田 興、佐藤和夫、高橋 伸、古河寛史:国立病院機構病院における先天奇形児の実態調査 日本人類遺伝学会(第55回) 2010年10月29日 さいたま

田淵久美子、館林宏治、下川祐子、安達真也、青木雄介、久保達也、内田 靖:ジアゾキサイドが有効であった新生児一過性高インスリン血性低血糖症の1例 日本小児科学会東海地方会(第250回) 2010年10月31日 豊明

盆野元紀、大森雄介、山本初実、酒見好弘、山下博徳、太田 明、河田 興、内田 靖、佐藤和夫、高橋 伸、古河寛史:成育医療への応用を目的としたNICU共通データベースの構築とその活用による経年的疾病発症に関する研究:国立病院機構における新生児医療の実勢調査 日本未熟児新生児学会(第55回) 2010年11月6日 神戸

館林宏治、田淵久美子、内田 靖: *Ureaplasma parvum* により先天性肺炎を発症したと考えられる1例 日本未熟児新生児学会(第55回) 2010年11月7日 神戸

盆野元紀、大森雄介、山本初実、酒見好弘、山下博徳、太田 明、河田 興、内田 靖、佐藤和夫、高橋 伸、古河寛史:成育医療への応用を目的としたNICU共通データベースの構築とその活用による経年的疾病発症に関する研究 国立病院総合医学会(第64回) 2010年11月26日 福岡

酒見好弘、山下博徳、盆野元紀、山本初実、大森雄介、太田 明、河田 興、内田 靖、佐藤和夫、高橋 伸、古河寛史:国立病院機構病院における新生児救急搬送の実態調査 国立病院総合医学会(第64回) 2010年11月26日 福岡

内田 靖、盆野元紀、山本初実、大森雄介、山下博徳、酒見好弘、太田 明、河田 興、佐藤和夫、高橋 伸、古河寛史:国立病院機構病院における先天異常児に関する調査研究 国立病院総合医学会(第64回) 2010年11月26日 福岡

河田 興、太田 明、盆野元紀、山本初実、大森雄介、山下博徳、酒見好弘、内田 靖、佐藤和夫、高橋 伸、古河寛史:新生児領域データベース登録における定義・基準の作成 NHO ネットワーク共同研究(成育医療/新生児) 国立病院総合医学会(第64回) 2010年11月26日 福岡

館林宏治、田淵久美子、内田 靖:母体敗血症に伴い、サイトカインストームを発症したと考えられた一 双胎例 日本小児感染症学会(第42回) 2010年11月28日 仙台

田淵久美子、館林宏治、内田 靖:シカ肉生食後にウェステルマン肺吸虫症を発症した1家族例 日本小児感染症学会(第42回) 2010年11月28日 仙台

河田 興、太田 明、盆野元紀、山本初実、大森雄介、山下博徳、酒見好弘、内田 靖、佐藤和夫、高橋 伸、古河寛史:新生児領域データベース登録における定義・基準の作成(有害事象・副作用報告基準を目指して) NHO ネットワーク共同研究(成育医療/新生児) 日本臨床薬理学会(第31回) 2010年12月1日 京都

下川祐子、田淵久美子、青木雄介、安達真也、館林宏治、久保達也、内田 靖:胸部 CT 上間質性肺炎を呈したRSウイルス感染症の1例 岐阜県小児科懇話会(第150回) 2010年12月2日 岐阜

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Bloom 症候群の二次アンケート調査の解析

研究分担者 岐阜大学大学院医学系研究科
教授 金子 英雄

研究要旨

本研究の目的は、Bloom 症候群症候群に関して、今まで明らかになっていなかった本邦の患者数、QOL等を明らかにし、診断指針を作製し普及させることで、患者のQOL向上、生命予後の改善を図ることである。一次アンケート調査で明らかになった Bloom 症候群の確定例 9 例、疑い例 3 例に二次アンケート調査票を送付した。確定例の全例から、調査票の回答を得ることができた。以下のことが明らかになった。低身長、低体重は全例に認められた。確定例 9 例のうち 4 例は、死亡していた。発癌が 7 例に認められ、そのうちリンパ腫が 6 例だった。合併症として糖尿病が 9 例中 5 例に認められた。以上より、本邦における Bloom 症候群の臨床像が明らかになった。

A. 研究目的

本研究の目的は、Bloom 症候群に関して、今まで明らかになっていなかった本邦の患者数、QOL等を明らかにし、診断指針を作製し普及させることで、患者のQOL向上、生命予後の改善を図ることである。

B. 研究方法

一次アンケートにて、Bloom 症候群の患者の診療経験ありと回答があった 10 施設の 12 症例に別紙の二次アンケートを送付した。一次アンケート調査では、そのうち確定例が 9 例、疑い例が 3 例だった。（倫理面への配慮）

臨床情報を収集する場合は、連結可能匿名化する。一次調査、二次調査に関しては、「Bloom 症候群とその類縁疾患の実態調査、早期診断法の確立に関する研究」、遺伝子変異解析に関しては、「先天性免疫不全症の原因遺伝子同定および病態形成機序の解明」として、岐阜大学医学研究等倫理委員会の承認を既に得ている。十分なインフォームドコンセントを行ったのち、書面にて署名を得て行った。

C. 研究結果

確定例 9 例、疑い例 3 例に二次アンケート調査表を送付し、9 例の確定例からは全例回答を得ることができた。9 例の臨床像を表に示す。低身長、低体重は全例に認められた。9 例のうち 4 例は、死亡していた。発癌が 7 例に認められ、そのうちリンパ腫が 6 例だった。合併症として糖尿病が 9 例中 5 例に認められた。sister chromatid exchanges (SCE)の増加は、8 例中 8 例に認められた。

表 Bloom 症候群二次アンケート調査

No.	性別	年齢	身長(年齢)	体重(年齢)	皮膚症状	発癌の有無	その他の合併症
1	F	37歳(死亡)	141cm(36歳)	25Kg(36歳)	なし	乳がん(31歳)、卵巣癌リンパ腫(34歳)、再生不良性貧血(36歳)	DM
2	M	26歳(生存)	138cm(25歳)	29Kg(25歳)	なし	白血病(25歳)	
3	F	13歳(生存)	125cm(13歳)	24Kg(13歳)	カフオレ病	骨肉腫(リンパ腫)(13歳)	DM (2型)
4	F	20歳(生存)	140cm(20歳)	32Kg(20歳)	なし	なし	気管支喘息
5	M	7歳(死亡)	不明	不明	脱色素斑	Wilms腫瘍(5歳)、MDS(5歳)	
6	F	16歳(生存)	116cm(9歳)、142cm(16歳)	20Kg(9歳)、42Kg(16歳)	日光過敏性紅斑、毛細血管拡張、色素沈着	現在まで認めず	ASD、DM (2型)、尿路結石
7	F	28歳(死亡)	140cm(26歳)	37Kg(26歳)	なし	リンパ腫(13歳)	DM、肝障害
8	M	23歳(死亡)	143cm(21歳)	43Kg(21歳)	自光過敏性紅斑	白血病(23歳)	DM (1型)
9	F	40歳(生存)	144cm(19歳)	45Kg(19歳)	日光過敏性紅斑	白血病(25歳)	

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

D. 考察

Bloom 症候群の際立った特徴は、高率に癌腫を合併することである。国外での報告では、20 歳代までに約 1/3 の Bloom 症候群がなんらかの癌腫を発症しており、最も癌腫の発症頻度の高い疾患の一つである。今回の調査でも 9 例中 4 例が癌腫が原因で死亡していた。なかでも、B 細胞リンパ腫が高率に認められた。小柄な体型と SCE が解析した全例に認められ、診断上重要な所見と考えられた。

E. 結論

日本国内における Bloom 症候群に関して、二次アンケート調査を行った。Bloom 症候群は確定例 9 例のうち、低身長、低体重は全例に認められた。9 例のうち 4 例は、死亡していた。発癌が 7 例に認められ、そのうちリンパ腫が 6 例だった。合併症として糖尿病が 9 例中 5 例に認められた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Morita H, Kaneko H, Ohnishi H, Kato Z, Kondo N. Antigen specific immune response of endotoxin removed recombinant P34. Allergy in press
2. Kaneko H, Toshiyuki F, Kasahara K, Yamada T, Kondo N. Augmented cell death with human and mouse Bloom syndrome helicase deficiency. Molecular Medicine Report in press
3. Kaneko H, Teramoto T, Kondo M, Morita H, Ohnishi H, Orii K, Matsui E, Kondo N. Efficacy of the slow dose-up method for specific oral tolerance induction for children in cow's milk allergy: Comparison with previous reported protocols. Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology 20: 538-539, (2010)
4. Matsui E, Shinoda S, Fukutomi O, Kaneko H, Fukao T, Kondo N. Relationship between the benefits of suplatast1 tosilate, a Th2 cytokine inhibitor, and gene

polymorphisms in children with bronchial asthma.

Experimental and therapeutic medicine 1: 977-982, (2010)

5. Kondo N, Matsui E, Nishimura A, Kaneko H.

Pharmacogenetics of asthma in children. Allergy Asthma Immunol Res. Jan;2(1):14-9, (2010)

6. Ozeki M, Funato M, Teramoto T, Ohe N, Asano T, Kaneko H, Fukao T, Kondo N.

Reversible cerebrospinal fluid edema and porencephalic cyst, a rare complication of ventricular catheter. J Clin Neurosci. 17:658-61, (2010)

7. Ozeki M, Kunishima S, Kasahara K, Funato M, Teramoto T, Kaneko H, Fukao T, Kondo N. A family having type

2B von Willebrand disease with an R1306W mutation: Severe thrombocytopenia leads to the normalization of high molecular weight multimers. Thromb Res. 125:e17-22. (2010)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

本邦 Bloom 症候群における BLM 遺伝子変異の解析

研究分担者 岐阜大学大学院医学系研究科 教授 深尾 敏幸

研究要旨

Bloom 症候群の病因遺伝子産物は RecQ ヘリカーゼファミリーに属する BLM タンパクである。BLM 遺伝子のコーディング領域は 4437bp であり、1417 アミノ酸をコードしている。本邦 Bloom 症候群における、BLM 遺伝子変異の解析をおこなった。7 症例のうち、3 症例が homozygous に 631delCAA を有していた。ミスセンス変異を有する症例は 1 例のみであった。14alleles のうち 8alleles で、631delCAA が認められ、本邦 BLM 遺伝子変異における、比較的 common な変異と考えられた。

A. 研究目的

Bloom 症候群では、小柄な体型、日光過敏性紅斑さらには、高率に癌腫を合併する常染色体劣性の遺伝性疾患である。病因遺伝子 BLM は、ヘリカーゼ活性を有し、DNA の複製・修復に関与する。BS の診断は sister chromatid exchanges (SCE) の増加が参考になるが、他の染色体脆弱症候群との境界例も存在し、診断に苦慮する場合も少なくない。最終的には、遺伝子診断により、確定診断をすることになる。そこで、本邦 Bloom 症候群の BLM 遺伝子変異の有無について解析した。

B. 研究方法

- 1) 末梢血単核球から、DNA を抽出し PCR 法で、BLM 遺伝子の 20 個のエクソンを増幅した。ダイレクトシーケンシング法にて、塩基配列を決定した。
- 2) 631delCAA 変異の簡易検出法: プライマーに HinfI site を導入した。正常コントロールでは、PCR 産物が HinfI で切断されるが、631delCAA では、切断されず、電気泳動により、簡便に識別できる。
- 3) blmAsh 変異の簡易検出法: blmAsh が存在すると BstNI site が出現するため、PCR 産物を BstNI で切断し、電気泳動により、正常コントロールと移動度の差により、識別する。

(倫理面への配慮)

臨床情報を収集する場合は、連結可能匿名化する。一

次調査、二次調査に関しては、「Bloom 症候群とその類縁疾患の実態調査、早期診断法の確立に関する研究」、遺伝子変異解析に関しては、「先天性免疫不全症の原因遺伝子同定および病態形成機序の解明」として、岐阜大学医学研究等倫理委員会の承認を既に得ている。十分なインフォームドコンセントを行ったのち、書面にて署名を得て行った。

C. 研究結果

本邦 7 人の Bloom 症候群について、BLM 遺伝子の全エクソンを増幅し、塩基配列を解析した。表に示すように、6 例で、両 allele に BLM 遺伝子異常を認めた。1 例で、1 つの allele の遺伝子変異しか検出できなかった。7 症例のうち、3 症例が homozygous に 631delCAA を有していた。ミスセンス変異を有する症例は 1 例のみであった。14alleles のうち 8alleles で、631delCAA が認められ、本邦 BLM 遺伝子における、比較的 common な変異と考えられた。制限酵素サイトの有無による、631delCAA 変異の検出は、簡便に患者、保因者、健常パターンを区別することができた。

本邦症例におけるBLM遺伝子変異

	Zygosity of the mutation	mRNA sequence alteration	Predicted protein alteration
case 1	heterozygous	631delCAA 1610insA	S186X 514-1-X
case 2	homozygous	631delCAA	S186X
case 3	homozygous	631delCAA	S186X
case 4	homozygous	631delCAA	S186X
case 5	heterozygous	631delCAA 735delACTG	S186X 221-10-X
case 6	heterozygous	A2475C T2979C	S801R S969P
case 7	heterozygous	1610insA unknown	514-1-X

D. 考察

本邦 Bloom 症候群患者の BLM 遺伝子について、解析した。ナンセンス変異を有する症例が多かった。1 例は、1 allele の変異のみ検出できたが、他の allele はエクソン上に、変異は認められなかった。631delCAA は、3bp の欠失であるが、186 番目にストップコドンを生じ、機能的な BLM タンパクは産生されないと考えられる。1 例のみミスセンス変異が検出されたが、今後、これらの変異 BLM タンパクの機能についても解析していく予定である。

E. 結論

7 症例のうち、3 症例が homozygous に 631delCAA を有していた。ミスセンス変異を有する症例は 1 例のみであった。14 alleles のうち 8 alleles で、631delCAA が認められ、本邦 BLM 遺伝子変異における、比較的 common な変異と考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Fukao T, Horikawa R, Naiki Y, Tanaka T, Takayanagi M, Yamaguchi S, Kondo N: A novel mutation (c.951C>T) in an exonic splicing enhancer

results in exon 10 skipping in the human mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase gene. *Mol Genet Metab* 100:339-344, 2010

2) Fukao T, Ishii T, Amano N, Kursula P, Takayanagi M, Murase K, Sakaguchi N, Kondo N, Hasegawa T. A neonatal onset succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase (SCOT)-deficient patient with T435N and c.658-666dupAACGTGATT p.N220_I222dup mutations in the OXCT1 gene. *J Inherit Metab Dis.* 33:636, 2010

3) Hori T, Fukao T, Kobayashi H, Teramoto T, Takayanagi M, Hasegawa Y, Yasuno T, Yamaguchi S, Kondo N. Carnitine palmitoyltransferase 2 deficiency: The time-course of blood and urinary acylcarnitine levels during initial L-carnitine supplementation. *Tohoku J Exp Med* 221:191-195, 2010

4) Fukao T, Sass JO, Kursula P, Thimm E, Wendel U, Ficicioglu C, Monastiri K, Guffon N, Varic I, Zobot M-T, Kondo N. Clinical and molecular characterization of five patients with Succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase (SCOT) deficiency *Biochimica Biophysica Acta Molecular Basis of Disease* in press

2. 学会発表

1) Fukao T, Maruyama S, Ohura T, Toyoshima M, Mushimoto Y, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Kondo N. Subtle abnormality in urinary organic acid and blood acylcarnitine profiles may result in misdiagnosis of beta-ketothiolase (T2) deficiency with mild mutations. 2010 Annual symposium of Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism. August 31-September 3, 2010 (Istanbul, Turkey)

2) Fukao T, Sass, JO, Thimm E, Wendel U, Ficicioglu C, Monastiri K, Guffon N, Baric I, Zobot M-T, Kondo N. Clinical and molecular studies of five patients with succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase deficiency. 2010 Annual symposium of Society for the Study of Inborn

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

Errors of Metabolism. August 31-September 3, 2010

(Istanbul, Turkey)

3) 深尾敏幸、山口清次、重松陽介、高柳正樹、新宅治夫、堀川玲子 「先天性ケトン体代謝異常症の発症形態と患者数の把握、診断指針に関する研究」班

先天性ケトン体代謝異常症(T2 欠損症、SCOT 欠損症)の診断指針—日本での診断された症例の検討から
第52回日本先天代謝異常学会総会 10月21—23日、大阪、2010

4) 深尾敏幸、堀友博、近藤直実: サクシニル-CoA:3-ケト酸 CoA トランスフェラーゼ(SCOT)欠損症5症例の検討。 第52回日本先天代謝異常学会総会 10月21—23日、大阪、2010

5) 堀友博、深尾敏幸、深澤佳絵、寺澤大祐、近藤直実: 間欠的嘔吐、不機嫌で発症した男児遅発性 OTC 欠損症の1例。 第52回日本先天代謝異常学会総会 10月21—23日、大阪、2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Bloom 症候群における T 細胞機能評価のための基礎的検討；T 細胞分化障害を認める多様な
原発性免疫不全症候群における T 細胞多様性解析

研究分担者 金沢大学医薬保健研究域医学系小児科 教授 谷内江昭宏

研究要旨

Bloom 症候群においては、進行性の T 細胞機能障害が存在する可能性が示唆されるが、その実態はよくわかっていない。特に、活発は増殖・活性化を基盤として形成される多様な T 細胞クローンに機能的偏りが惹起される可能性について評価したものはない。本研究は、微細な T 細胞分化障害を T 細胞抗原受容体の多様性を定量的にかつ定性的に解析する手法を用いて、Bloom 症候群における進行性免疫機能低下を評価することを目的とした。本年度は、解析の妥当性を検討する目的で、正常対照ならびに T 細胞分化障害を呈することが知られている原発性免疫不全症例について検討を行った。FCM を用いた定量的 TCR V β 分布解析と、CDR3 サイズ分布解析による定性的評価は、両者を組み合わせることにより微細な多様性の偏り、分化障害を検出されることが示唆された。今後、この手法を用いて Bloom 症候群患者の T 細胞分化を解析する予定である。

共同研究者

和田 泰三(金沢大学医薬保健研究域医学系小児科)

東馬 智子(金沢大学医薬保健研究域医学系小児科)

A. 研究目的

Bloom 症候群では、進行性の T 細胞免疫不全が起こることが予想されが、これについて詳細は明らかにされていない。本研究では、T 細胞分化の微細な障害を T 細胞抗原受容体(TCR)の多様性を解析することにより評価する。併せて、このような評価が Bloom 症候群の臨床診断の一助となる可能性についても検討する。

B. 研究方法

T 細胞分化異常を伴うことが明らかな原発性免疫不全症候群について、TCR 構造解析を施行し、このような解析の意義を確認すると同時に、方法の妥当性を検討した。対象として X-SCID、Omenn 症候群、DiGeorge 症候群ならびに関連疾患とした。TCR 構造解析は、1)フローサイトメトリー(FCM)法を駆使した TCR V β 鎖の多様性解析と、2)spectratyping 法による CDR3 サイズ分布解析を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究における遺伝子解析の施行にあたっては、文部科学省、厚生労働省ならびに経済産業省より告示された「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、学内倫理審査委員会の審査を得ることとする。さらに、本研究における遺伝子解析ならびにリンパ球解析に際して研究の内容ならびに以下の確認事項をあらかじめ書面により説明し、本人あるいは家族の承諾を書面により得るものとする。

- 1) 末梢血液に関して、血清ならびにリンパ球検体は連結可能匿名化とし、本研究の目的以外には使用しない。
- 2) 得られた情報の秘密は厳守し、決して他人に漏らしたり譲渡したりしないこと。

C. 研究結果

本年度は以下の予備的検討を行った。

- 1) FCM 法による TCR V β repertoire 分布解析；Omenn 症候群や DiGeorge 症候群では多様性が制限されると同時に、特定のクローンの選択的増加が確認された(図1)。一方 X-SCID では、予想に反して多様性が比較的保たれていた。

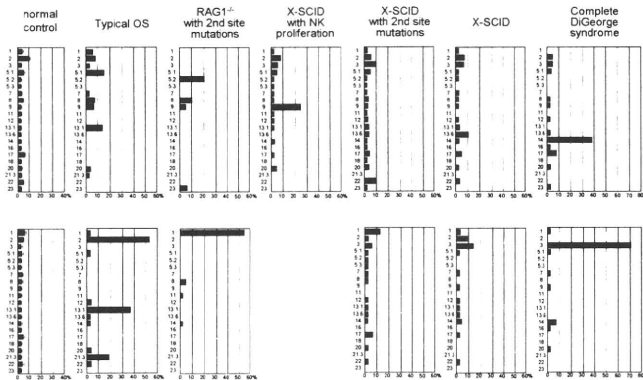


図1;重症複合免疫不全症におけるTCR Vβ repertoire 分布解析

2) CDR3 サイズ分布解析;正常対照においては、CDR3 サイズはほぼ 5-6 の間に分布していたが、Omenn 症候群やDiGeorge 症候群では CDR3 サイズは顕著に低下し、ほとんど4以下の低値を示した(図2)。一方、X-SCID ではごく一部の Vβ repertoire でのみ CDR3 サイズの異常低値が認められた。

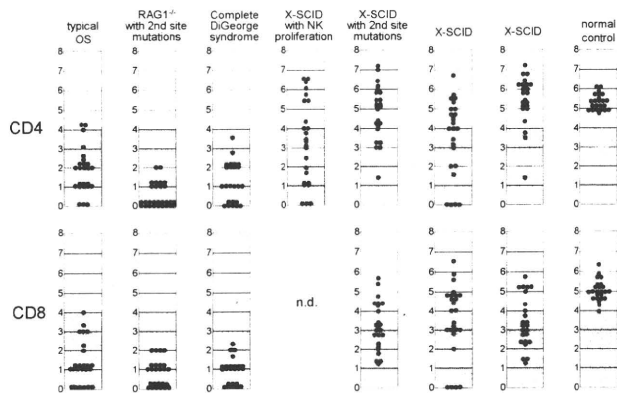


図2;重症複合免疫不全症における CDR3 サイズ分布解析

D. 考察

TCR 構造解析により、胸腺レベルでの T 細胞分化障害が敏感に検出されることが示された。さらに、このような TCR 構造の異常は、Omenn 症候群のような「分化障害＋異常クローンの選択的増加」をも評価することが可能であった。これらの結果から、Bloom 症候群において予想される進行性 T 細胞多様性制限を評価する指標として、TCR 構造解析が有用であることが示唆された。

E. 結論

TCR 構造解析は T 細胞分化障害の検出に有用である

こと、Bloom 症候群における T 細胞分化の評価指標となることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsunoda S, Yachie A, Wakasugi H, Matsushita K, Yamaguchi Y, Kawano M. A case of IgG4-positive multiorgan lymphoproliferative syndrome: dramatic perturbations of the CD8-positive T-cell repertoire in peripheral blood. *Scand J Rheumatol.* 2010;39:520-3.
- 2) Toga A, Wada T, Sakakibara Y, Mase S, Araki R, Tone Y, Toma T, Kurokawa T, Yanagisawa R, Tamura K, Nishida N, Taneichi H, Kanegane H, Yachie A. Clinical significance of clonal expansion and CD5 down-regulation in Epstein-Barr Virus (EBV)-infected CD8+ T lymphocytes in EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Infect Diseases* 2010; 201:1923-32.
- 3) Asai E, Wada T, Sakakibara Y, Toga A, Toma T, Shimizu T, Nampoothiri S, Imai K, Nonoyama S, Morio T, Muramatsu H, Kamachi Y, Ohara O, Yachie A. Analysis of mutations and recombination activity in RAG-deficient patients. *Clin Immunol* 2011; 138: 172-177.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Bloom症候群におけるBLMタンパクの検出

研究分担者 清河 信敬 独立行政法人 国立成育医療研究センター 研究所
小児血液・腫瘍研究部 部長

研究要旨

Bloom 症候群の簡易スクリーニング法として、フローサイトメトリーによる BLM 蛋白検出法の確立を試みた。種々の抗 BLM 抗体について検討したところ、ポリクローナル抗体のほとんどは非特異反応が強く、特異的な検出が困難であったが、モノクローナル抗体のいくつかは、健常人白血球では反応を示したのに対して患者白血球では反応を示さなかったことから、特異的な BLM 蛋白の検出が可能と考えられた。今後、さらに特異性や感度が高い抗体の選択、染色法や、膜透過処理法、BLM 蛋白を検出しやすい細胞の刺激法について検討することによって、FCM による Bloom 症候群の簡易スクリーニング法確立が期待される。

A. 研究目的

Bloom 症候群は、生下時からの小柄な体型、日光過敏性紅斑、免疫不全を特徴とする常染色体劣性の遺伝形式を示す疾患である。さらに際立った特徴は、高率に癌腫が合併することである。国外での報告では、20歳代までに約 1/3 の Bloom 症候群がなんらかの癌腫を発症している。また、複数の癌腫を合併することも知られており、早期に診断して、定期的にフォローすることが重要である。しかし、本邦での報告例は極めて少なく、患者数を含め国内におけるその現状は不明な点が多く、診断法や、診断の指針も十分には確立されてはいない。

本症候群の病因は DNA の複製・修復に関与する RecQ 型 DNA ヘリカーゼの一つである BLM である。ゲノム遺伝子上の BLM の異常に起因して、その蛋白の異常が起こり、酵素が低下することによって、細胞レベルでは、染色体の不安定性、紫外線に対する細胞の生存率が低下する。そのため、Bloom 症候群診断には sister chromatid exchange (SCE) の増加が参考となるが、SCE の検査は保険適応が無く、検査方法が煩雑で、高度な技術を要することから、簡便に患者をスクリーニングする方法の開発が望まれている。

そこで本研究では、SCE と同等の精度で、簡便かつ短時間で診断可能な、Bloom 症候群のスクリーニング法を開発することを目的とする。本研究で目指す、

Bloom 症候群スクリーニング法開発によって、その QOL 向上に寄与することが期待される。

B. 研究方法

入手可能な市販の Bloom 蛋白に対する抗体、1) ウサギ抗 BLM ポリクローナル抗体 (Cell Signaling Technology 社)、2) 同 (Abcam 社)、3) ヤギ抗 BLM ポリクローナル抗体 (Abcam 社)、4) マウス抗 BLM モノクローナル抗体 (クローン BFL-103, Abcam 社)、4 種類を検討に用いた。健常人および Bloom 症候群患者末梢血について、全血法、間接法による免疫蛍光染色を行い、フローサイトメトリーで反応性を解析した。Bloom 蛋白は細胞内に存在する酵素であるため、抗体の反応に先立って、白血球の細胞膜透過処理を 1) IntraPrep (ベックマンコールター社)、CytotfixCytoperm (BD バイオサイエンス社) の 2 つの試薬で行い、比較した。2 次抗体として、FITC 標識および PE 標識抗体を用いて、それぞれの検出感度を比較した。

(倫理面への配慮)

関連法規を遵守し、検体提供者への人権擁護、個人情報保護に細心の注意を払って実施した。

C. 研究結果

まず、健常人末梢血を用いて、Bloom 蛋白がフローサイトメトリー法によって検出可能か検討した。その

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

結果、1) Cell Signaling Technology 社のウサギポリクローナル抗体では、陽性シグナルは検出されなかった。2) Abcam 社のウサギポリクローナル抗体ではリンパ球で明確な陽性シグナルが得られたが、顆粒球では極弱い陽性シグナルしか得られなかった（図 1）。3) Abcam 社ヤギポリクローナル抗体では、リンパ球、顆粒球ともに強い陽性シグナルが得られた。4) Abcam 社マウスモノクローナル抗体（クローン BFL-103）では、リンパ球、顆粒球ともに明確な陽性シグナルが得られた（図 2）。そこで、Bloom 症候群患者末梢血に対して同様の検討を行ったところ、ウサギおよびヤギポリクローナル抗体では、健常人の場合と同様に陽性シグナルが得られたため、これらの抗体は非特異反応が強くてこの検出法には適さない可能性が示唆された（図 1）。一方、マウスモノクローナル抗体（クローン BFL-103）については、Bloom 症候群患者末梢血ではリンパ球、顆粒球とも反応性を認めず、健常人末梢血で認められた陽性シグナルが、特異的に Bloom 蛋白を認識している可能性が示唆された。

一方、膜透過処理試薬については、今回検討した 2 種類の試薬では、検出感度や非特異反応に大きな差は認められなかった。また、FITC 標識および PE 標識 2 次抗体の比較では、PE の方が、シグナルが強い傾向を認めたものの、バックグラウンドも高かったため、結果としての検出感度（陽性ピークと陰性ピークの傾向強度の差）には、大きな差を認めなかった。

D. 考察

今回の検討で、特定のマウス抗 Bloom 蛋白抗体を用いたフローサイトメトリー法によって、健常人の末梢血白血球における Bloom 蛋白の発現を特異的に検出できる可能性が示唆された。今後、すでに Bloom 症候群として診断が確定している患者末梢血検体を用いた検討によって、特異性についてさらに確認する必要があるものの、この方法を用いることによって、Bloom 症候群の診断の簡便なスクリーニングが可能となることが期待される。

また、今回は、末梢血白血球に対して、直接 Bloom 蛋白の発現を検討したが、今後、PHA や Con A 等によって刺激した状態のリンパ球などについて検討す

ることによって、より発現の強い状態での Bloom 蛋白検出を行える条件を検討することが必要である。さらに、市販されている他のマウスモノクローナル抗 Bloom 抗体の検討、フローサイトメトリー法に適した新規抗 Bloom 抗体の開発、膜透過処理法や 2 次抗体の選択、等、より感度および特異性の高い検出方法についても、検討が必要である。

E. 結論

Bloom 症候群の簡易スクリーニング法として、フローサイトメトリーによる BLM 蛋白検出法の確立を試みた。適切な抗体を選択すれば、Bloom 症候群患者白血球における Bloom 蛋白の欠如を、フローサイトメトリー法によって簡便に判別可能であると考えられ、今後、簡易スクリーニング法への応用が期待される。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

図1 ウサギ ポリクローナル抗体を用いた

Bloom 蛋白検出の検討

細胞質内(核内)Bloom蛋白のFCMによる検出
abcam rabbit polyclonal

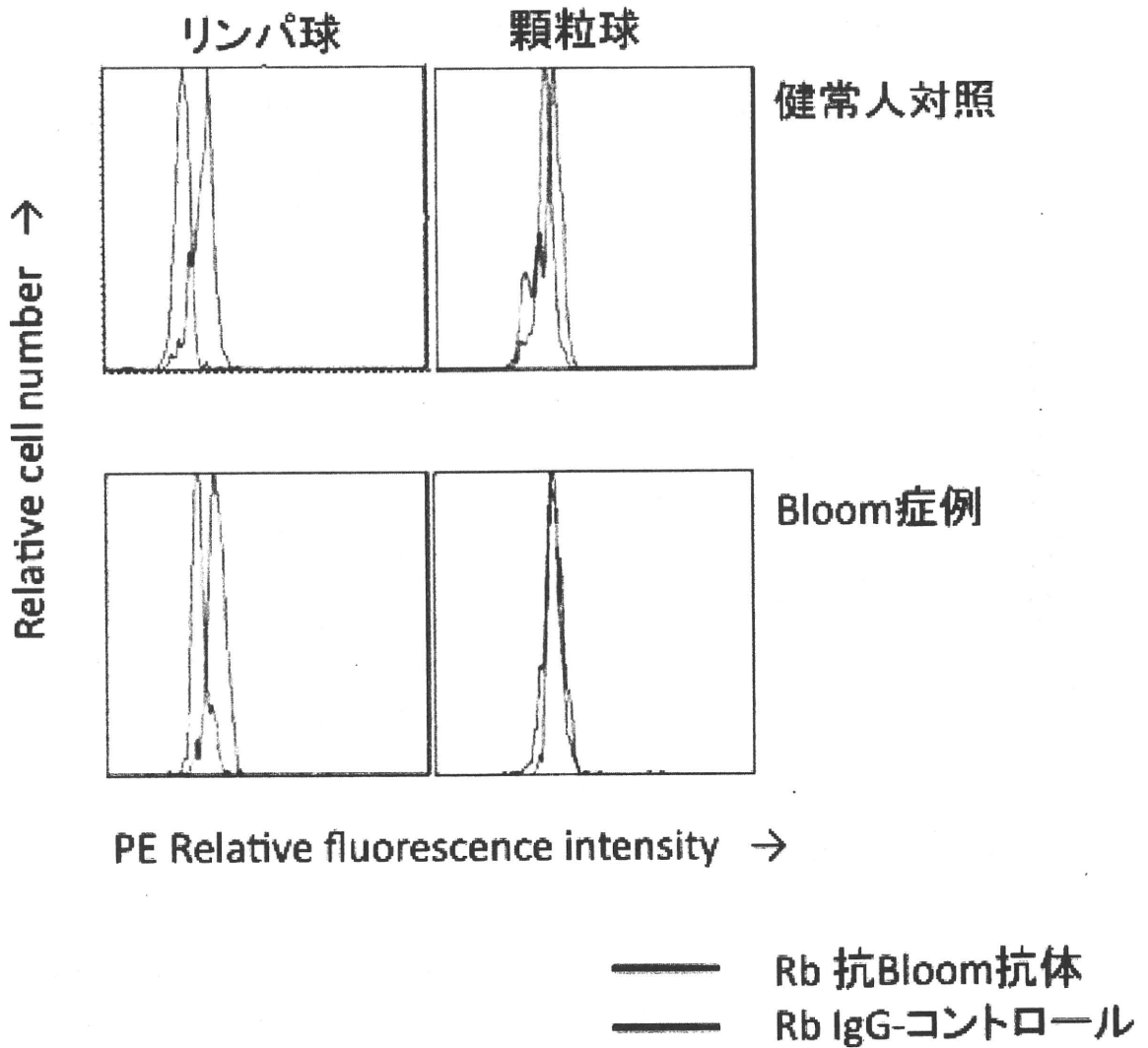
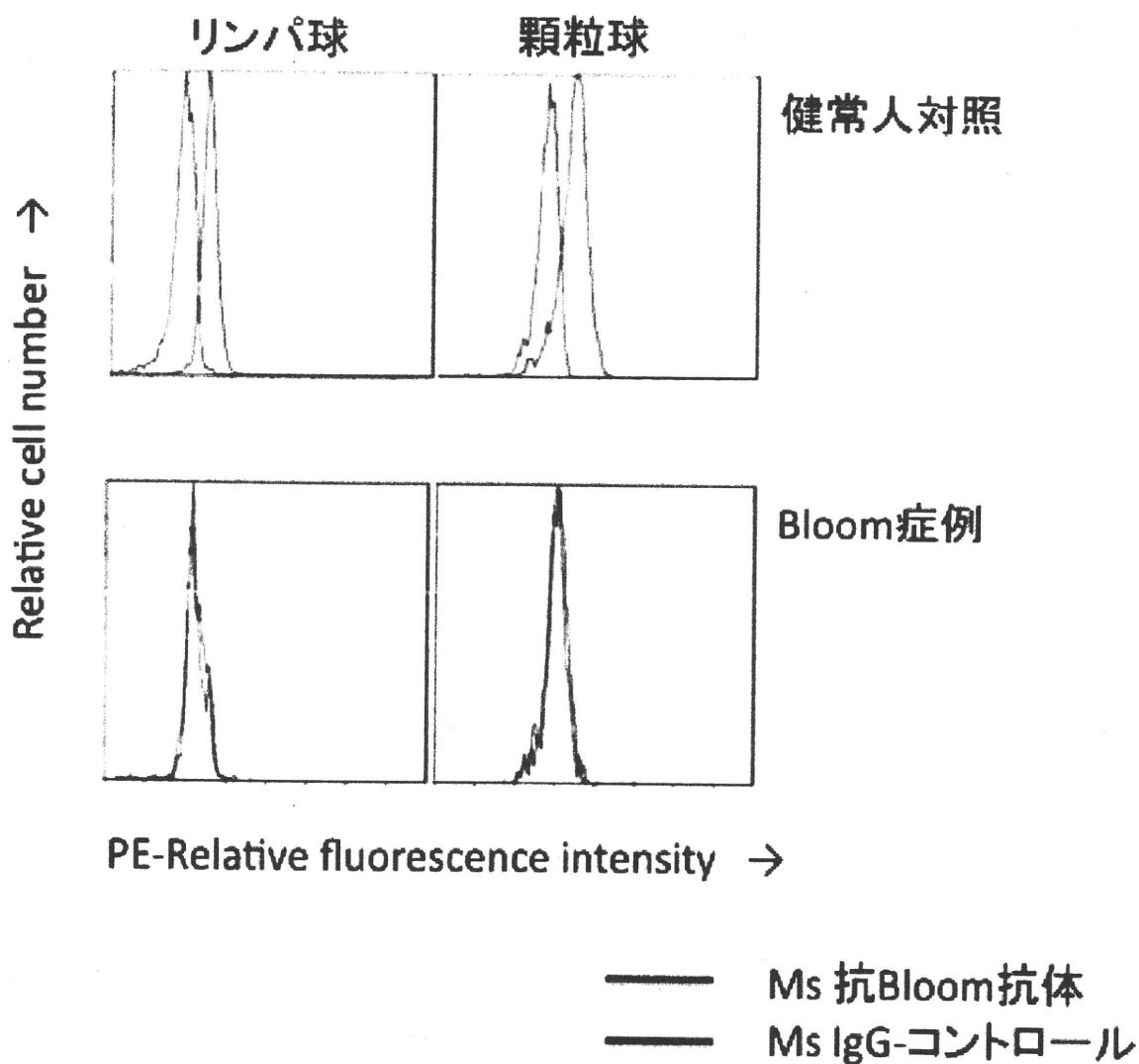


図2 マウスモノクローナル抗体を用いた

Bloom蛋白検出の検討

細胞質内(核内)Bloom蛋白のFCMによる検出
abcam mouse monoclonal anti-BLM (BLM103)



Rothmund-Thomson 症候群の診断指針の作製

研究分担者 滝田 順子 東京大学医学部附属病院 無菌治療部 講師

研究要旨： Bloom 症候群の類縁疾患である Rothmund-Thomson 症候群(RTS)は多形成皮膚萎縮症、低身長、白内障、骨形成異常、骨肉腫の合併を特徴とする早老症であり、予後不良な難治性疾患である。臨床的には外胚葉形成異常(毛髪異常、爪形成不全)、白内障を合併する I 型と先天性骨欠損および骨肉腫を効率に合併する II 型に分類されるが、両者を合わせてもこれまでに世界で 300 例程度の報告しかなく、本邦における正確な発生数は不明である。常染色体劣性の遺伝形式をとることが知られており、II 型の約 60%に RECQL4 の変異が報告されているが、発症機構は十分解明されておらず有効な治療法も確立されていない。大部分が小児期に発症する骨肉腫もしくは成人以降に発症する様々な固形癌により死亡する。従って、合併するがんの早期発見・予防が本症の予後の改善に有効と考えられる。そこで本研究では、RTS の診断指針を作製し、本邦における発症率の把握と実態調査を行うための基盤を作製した。

A. 研究目的

Rothmund-Thomson 症候群(RTS)は多形成皮膚萎縮症、低身長、白内障、骨形成異常、骨肉腫を高率に合併する非常に稀な早老症であり、1868年に Rothmund らによって初めて報告された。臨床的には外胚葉形成異常、白内障を合併する I 型と先天性骨欠損および骨肉腫を高率に合併する II 型に分類されるが、両者とも多形皮膚萎縮症、低身長は必発である。常染色体劣性の遺伝形式をとることが知られており、II 型の約 60%に RECQL4 の変異が報告されているが、発症機構は十分解明されておらず標準治療も確立されていない。本症はこれまでに世界で300例程度の報告しかなく、本邦における発症頻度は不明である。予後は極めて不良であり、大部分が小児期に発症する骨肉腫もしくは成人以降に発症する種々の固形癌により死亡する。従って、合併するがんの早期発見・予防が本症の予後の改善に有効と考えられるが、そのためには明確な診断基準の策定が急務である。そこで、本研究では、RTS の診断指針を作製し、本邦における発症率の把握と実態調査を行うための研究基盤を作製する。また、RTS の発症メカニズムを解明し、新たな標的分子を同定するために RTS 患者の正常検体ないし腫瘍検体を用いて網羅的ゲノム解析を行う。

B. 研究方法

文献的に情報収集を行い、RTS の診断指針を作製する。また RTS に高頻度に合併する骨肉腫の発症分子機構を解明するために 18 例の骨抜く腫患者の腫瘍検体より DNA を抽出し、

GenChip 250K/500K アレイの Output を CNAG/AsCNAR を用いて分析し、平均解像度 24kb~6kb でゲノム全域にわたる網羅的なゲノムコピー数の解析を行う。この手法により SNP プローブの特性を利用し、従来の解析技術では網羅的な検出が困難であったコピー数の減少を伴わないヘテロ接合性の消失、すなわち uniparental disomy (UPD) の検出を行うことができる。

(倫理面への配慮)

本研究で行った臨床検体を用いた実験は、東京大学の倫理審査委員会で審査され、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(2003年3月)」を遵守することを条件に承認された。検体提供者への人権擁護、個人情報保護に細心の注意を払って本研究を実施した。

C. 研究結果

1. 診断指針(案)

RTS に関して、これまでに確定診断法は確立されていない。Wang と Plon らは、乳児期に発症する難治性非典型的湿疹に加えて、毛髪異常、低身長、骨格異常、白内障、爪の異常、角化症のいずれか2つが見られれば、RTS 疑いと定義している。この提唱を参考に以下の RTS 診断指針(案)を作成した。

多形皮膚萎縮症(前駆症状は難治性非典型的湿疹)に加えて、典型的臨床症状が 2 つ以上みられれば、RTS 疑いとする。さらに家族歴あり、なしに分類し、ありの場合、RECQL4 遺伝子検査を行う。また家族歴なしの場合、皮膚生検による多形皮膚萎縮所見の確認、もしくは皮膚線維芽細胞、リンパ球の FISH 解析による染色体異常

の確認を行い、いずれかの異常所見が得られれば RECQL4 遺伝子検査を行う。遺伝子検査で異常がみられない場合でも暫定診断とし、確定診断例と同様に定期検査による悪性腫瘍のスクリーニングを行うことを推奨する。また暫定診断例に関して、同意が得られたものに関しては新たな候補遺伝子の解析を進める。

2. 骨肉腫における網羅的ゲノム解析

RTSの新たな標的分子を同定する予備実験として、本研究ではRTSに高頻度に合併する骨肉腫 18 例につき SNP アレイによる網羅的ゲノム解析を行った。その結果、複数の検体で染色体 12q、17p の高度増幅が検出され、また新たな高度増幅領域として 4q、5p などが検出された。これらの領域には細胞増殖やシグナル伝達に重要な遺伝子が複数存在していることが確認された。高頻度な異常としては 1q、8q、12p および 12q の gain が認められた。同じ骨腫瘍である Ewing 肉腫と比べて、骨肉腫では、比較的大きな染色体領域の増加、欠失および高度増幅が同一症例において高頻度に生じている特徴が認められた。

D. 考察

RTS の主な臨床症状は、1) 多形皮膚萎縮症（前駆症状は難治性非典型的湿疹）、2) 低身長、3) 骨格異常、4) 日光過敏症、5) 若年性白内障、6) 毛髪異常と多彩であり、特異的なものはなく、また疾患特異的な検査所見もない。原因遺伝子の一つとして RECQL4 遺伝子が同定されているので、遺伝子検査は有用と考えられるが陽性率は 70%程度である。従って、現時点では複数の臨床症状の組み合わせにより診断基準を定める必要があり、本研究で提唱する診断指針案も主として、複数の臨床症状による診断が主体となっている。RTS には高頻度に悪性腫瘍が合併することから、予防医学の観点からも疑い症例を含めた定期検査を奨励する方針とした。また、骨肉腫の網羅的ゲノム解析の結果より、他の骨腫瘍と比較して骨肉腫の発症には非常に複数のゲノム異常が関与していることが判明し、DNA 修復障害が発症に関与している本症とゲノムプロファイルの観点からも強い関連性が示唆された。

E. 結論

RTS の本邦における診断指針を作製した。また RTS に高頻度に合併する骨肉腫の複雑なゲノムプロファイルを明らかにし、本症との関連性を示唆する所見を得た。

F. 健康危惧情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Takahashi K, Oka A, Mizuguchi M, Saitoh M, Takita J, Sato A, Mimaki M, Kato M, Ogawa S, Igarashi T: Interstitial deletion of 13q14.13-q32.3 presenting with Arima syndrome and bilateral retinoblastoma. *Brain Dev*, 2010 Aug 19. [Epub ahead of print]

2) Minobe K, Ono R, Matsumine A, Shibata-Minoshima F, Izawa K, Oki T, Kitaura J, Iino T, Takita J, Iwamoto S, Hori H, Komada Y, Uchida A, Hayashi Y, Kitamura T, Nosaka T: Expression of ADAMTS4 in Ewing's sarcoma. *Int J Oncol* 37:569-581, 2010

3) Okazaki K, Unemoto J, Kondo M, Kusaka T, Kozawa K, Yoshizumi M, Shimada A, Takita J, Kaneko T, Hama T, Kimura H: Sustained cytokinemia and chemokineemia concomitant with juvenile myelomonocytic leukemia in an infant with Noonan syndrome. *Leuk Res* 34:e226-228, 2010

4) Tsuchida M, Ohara A, Manabe A, Takita J (Collaborator 83); Tokyo Children's Cancer Study Group: Long-term results of Tokyo Children's Cancer Study Group trials for childhood acute lymphoblastic leukemia, 1984-1999. *Leukemia* 24:383-396, 2010

5) Tumurkhuu M, Saitoh M, Sato A, Takahashi K, Mimaki M, Takita J, Takeshita K, Hama T, Oka A, Mizuguchi M: Comprehensive genetic analysis of overlapping syndromes of RAS/RAF/MEK/ERK pathway. *Pediatr Int* 52:557-562, 2010

6) Okamoto T, Koh K, Takita J, Ida K: Voriconazole-micafungin combination therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Int* 52:137-141, 2010

7) 滝田順子:ゲノムアレイと小児固形腫瘍-がんゲノミクスに基づいた標的分子の同定. *日本小児がん学会雑誌* 47:248-251, 2010

8) 滝田順子, 小川誠司:小児固形腫瘍における網羅的ゲノム解析と標的分子の同定. *細胞工学* 29:706-710, 2010

2. 学会発表

1) Takita J, Nishimura R, Sanada M, Ohki K, Kato M, Chen Y, Kanegane H, Okita H, Fujimoto J, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S: ALK gene aberrations in pediatric

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

solid tumors. The 6th Congress of Asian Society for Pediatric Research & 51st Annual Meeting of Taiwan Pediatric Association, Taipei, Taiwan, April 15~18, 2010

2) Nishimura R, Takita J, Ohki K, Kato M, Chen Y, Sanada M, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S: High resolution copy number analysis of Ewing Sarcoma family of tumors using high-density SNP-genotyping microarray. The 6th Congress of Asian Society for Pediatric Research & 51st Annual Meeting of Taiwan Pediatric Association, Taipei, Taiwan, April 15~18, 2010

3) Motomura A, Takita J, Nishimura R, Ohki K, Ohkubo J, Ida K, Kikuchi A, Okita H, Ogawa S, Igarashi T: Refractory Ewing Sarcoma family of tumors in a child with EWS-FEV fusion gene. The 6th Congress of Asian Society for Pediatric Research & 51st Annual Meeting of Taiwan Pediatric Association, Taipei, Taiwan, April 15~18, 2010

4) Ohira M, Nakamura Y, Kojima T, Takita J, Kato M, Ogawa S, Oba S, Ishii S, Kamijo T, Nakagawara A: Risk stratification of neuroblastoma by genomic signature including ALK abnormality. Advances in Neuroblastoma Research, Stockholm, Sweden, June 21-24, 2010

5) Takita J, Okubo J, Nishimura R, Oki K, Uchisaka N, Chen Y, Sanada M, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S: Effects of selective ALK inhibitors to neuroblastoma. Advances in Neuroblastoma Research, Stockholm, Sweden, June 21-24, 2010

6) Okubo J, Takita J, Nishimura R, Ohki K, Kato M, Chen Y, Sanada M, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S: Aberrant activation of ALK kinase by a short form ALK protein in neuroblastoma. Advances in Neuroblastoma Research, Stockholm, Sweden, June 21-24, 2010

7) 滝田順子, 西村力, 大木健太郎, 金兼弘和, 大喜多肇, 藤本純一郎, 菊地陽, 林泰秀, 五十嵐隆, 小川誠司: Ewing/PNET family における ALK 遺伝子の解析. 第 113 回日本小児科学会学術集会, 岩手, 2010 年 4 月 23 日~25 日

8) 大久保淳, 滝田順子, 西村力, 大木健太郎, 加藤元博, 真田昌, 菊地陽, 林泰秀, 五十嵐隆, 小川誠司: 小児固形腫瘍における ALK 阻害剤の効果に関する検討. 第 113 回日本小児科学会学術集会, 岩手, 2010 年 4 月 23 日~25 日

9) 西村力, 滝田順子, 大木健太郎, 加藤元博,

陳玉彦, 真田昌, 菊地陽, 林泰秀, 五十嵐隆, 小川誠司: 横紋筋肉腫における ALK 遺伝子の増幅・変異の検討. 第 113 回日本小児科学会学術集会, 岩手, 2010 年 4 月 23 日~25 日

10) 大木健太郎, 滝田順子, 西村力, 加藤元博, 陳玉彦, 真田昌, 菊地陽, 林泰秀, 五十嵐隆, 小川誠司: 神経芽腫における部分欠損型 ALK の活性化. 第 113 回日本小児科学会学術集会, 岩手, 2010 年 4 月 23 日~25 日

11) 朴明子, 加藤元博, 清河信敬, 滝田順子, 真田昌, 小川誠司, 林泰秀: 小児 T 細胞性急性リンパ性白血病における網羅的ゲノム解析. 第 113 回日本小児科学会学術集会, 岩手, 2010 年 4 月 23 日~25 日

12) 西村力, 滝田順子, 真田昌, 大久保淳, 大木健太郎, 加藤元博, 五十嵐隆, 林泰秀, 小川誠司: 難治性小児固形腫瘍における ALK 変異と臨床応用. 第 7 回北関東小児がんセミナー, 高崎, 2010 年月 5 日 12 日

13) Oki K, Takita J, Hiwatari M, Nishimura R, Okubo J, Uchisaka N, Adachi M, Sanada M, Igarashi T, Ogawa S: Mutations of IDH1 and IDH2 genes in pediatric solid tumors. 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Osaka, September 22~24, 2010

14) 樋渡光輝, 滝田順子, 大久保淳, 西村力, 大木健太郎, 内坂直樹, 安達正時, 真田昌, 五十嵐隆, 林泰秀, 小川誠司: 小児固形腫瘍における ALK 阻害剤を用いた抗腫瘍効果の検討. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010 年 9 月 22 日~24 日

15) 大久保淳, 滝田順子, 大木健太郎, 西村力, 内坂直樹, 安達正時, 真田昌, 加藤啓輔, 林泰秀, 五十嵐隆, 小川誠司: 胸膜肺芽腫における網羅的ゲノム解析. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010 年 9 月 22 日~24 日

16) 滝田順子, 西村力, 大木健太郎, 樋渡光輝, 大久保淳, 内坂直樹, 真田昌, 大喜多肇, 藤本純一郎, 金兼弘和, 五十嵐隆, 林泰秀, 小川誠司: 小児固形腫瘍における ALK 遺伝子の関与. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010 年 9 月 22 日~24 日

22) 朴明子, 加藤元博, 清河信敬, 滝田順子, 小川誠司, 林泰秀: 小児 T 細胞性造血器腫瘍における LEF 1 遺伝子の異常. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010 年 9 月 22 日~24 日

17) Uchisaka N, Kato M, Takita J, Sanada M, Nishimura R, Oki K, Okubo J, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S: Mutation analysis of lymphocyte tyrosine kinase (LTK) in acute

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

lymphoblastic leukemia. 第 72 回日本血液学会
学術集会, 横浜, 2010 年 9 月 24 日～26 日

18) Matsubara A, Kato M, Sanada M, Takita J,
Chiba S, Hayashi Y, Kobayashi Y, Watanabe T,
Yoshino T, Koefler H, Bartram C, Ogawa S:
Genome-wide analysis using high-density SNP
microarrays in various types of hematologic
malignancies. 第 72 回日本血液学会学術集会,
横浜, 2010 年 9 月 24 日～26 日

19) Park M, Kato M, Kiyokawa N, Takita J,
Ogawa S, Hayashi Y: Mutations of LEF1 gene in
pediatric T cell acute lymphoblastic leukemia.
第 72 回日本血液学会学術集会, 横浜, 2010
年 9 月 24 日～26 日

20) Oki K, Takita J, Hiwatari M, Nishimura R,
Sanada M, Okubo J, Uchisaka N, Igarashi T,
Hayashi Y, Ogawa S: Genome-wide scanning of
pediatric acute myeloid leukemia using SNP-
genotyping microarrays. 第 72 回日本血液学会
学術集会, 横浜, 2010 年 9 月 24 日～26 日

21) Oki K, Takita J, Hiwatari M, Nishimura R,
Sanada M, Okubo J, Uchisaka N, Igarashi T,
Hayashi Y, Ogawa S: Mutations of IDH1 and
IDH2 in pediatric acute myeloid leukemia. 第 72
回日本血液学会学術集会, 横浜, 2010 年 9 月
24 日～26 日

22) 西村力, 滝田順子, 大木健太郎, 金兼弘和,
大喜多肇, 藤本純一郎, 陳玉彦, 真田昌, 五十
嵐隆, 林泰秀, 小川誠司: 小児固形腫瘍におけ
る ALK 遺伝子の解析. 第 26 回日本小児がん
学会学術集会, 大阪, 2010 年 12 月 17 日～19
日

23) 大久保淳, 滝田順子, 大木健太郎, 西村力,

内坂直樹, 安達正時, 真田昌, 加藤啓輔, 林泰
秀, 小川誠司, 五十嵐隆: 高感度 SNP アレイを
用いた胸膜肺芽腫における網羅的ゲノム解析.
第 26 回日本小児がん学会学術集会, 大阪,
2010 年 12 月 17 日～19 日

24) 吉田健一, 滝田順子, 西村力, 安達正時,
大木健太郎, 大久保淳, 永田安伸, 真田昌, 林
泰秀, 五十嵐隆, 小川誠司: 次世代シーケン
サーを用いたエクソンシーケンスによる神経芽腫
の標的分子の解析. 第 26 回日本小児がん学会
学術集会, 大阪, 2010 年 12 月 17 日～19 日

25) 大木健太郎, 滝田順子, 樋渡光輝, 西村力,
大久保淳, 安達正時, 真田昌, 外松学, 林泰秀,
小川誠司, 五十嵐隆: 小児悪性腫瘍における
Isocitrate dehydrogenase 1/2 の変異解析. 第
26 回日本小児がん学会学術集会, 大阪, 2010
年 12 月 17 日～19 日

36) 安達正時, 滝田順子, 樋渡光輝, 西村力,
大木健太郎, 大久保淳, 内坂直樹, 真田昌, 小
川誠司, 林泰秀, 五十嵐隆: 小児固形腫瘍にお
ける NOTCH シグナルの検討; 発現様式と遺伝
子変異の解析. 第 26 回日本小児がん学会学術
集会, 大阪, 2010 年 12 月 17 日～19 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

Bloom 症候群の診断指針の作製

研究分担者 岐阜大学大学院医学系研究科
教授 金子 英雄

研究要旨

Bloom 症候群は、発癌が高頻度に発生し、生命予後を左右する。早期に診断し、定期的にフォローすることが重要と考えられる。しかし、非典型例では、診断に苦慮する場合が少なくない。そこで、Bloom 症候群の診断指針の作製を試みた。二次アンケートの結果をもとにして診断指針に重要な臨床症状の項目を拾い上げた。血液検査では、姉妹染色分体組み換えの頻度の増加が、Bloom 症候群に特異的であり、Bloom 症候群であることを強く示唆すると考えられた。最終的に、確定診断は遺伝子検索を行うこととし、以上の流れをまとめて、Bloom 症候群の診断指針を作製した。

A. 研究目的

本研究の目的は、Bloom 症候群に関して、今まで明らかになっていなかった本邦の患者数、QOL等を明らかにし、診断指針を作製し普及させることで、患者のQOL向上、生命予後の改善を図ることである。今回、二次アンケート調査、姉妹染色分体組み換えの頻度を基にして Bloom 症候群の診断指針を作製した。

B. 研究方法

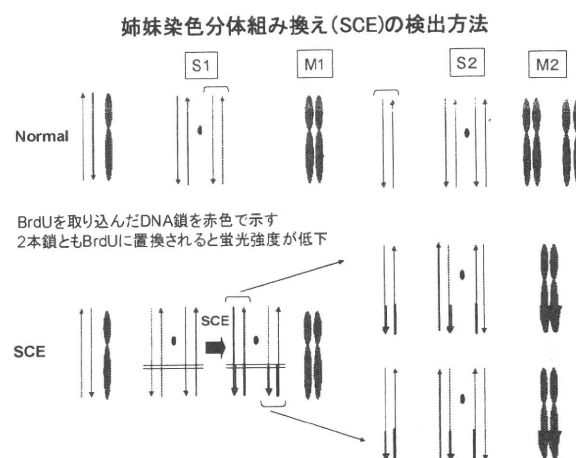
姉妹染色分体組み換えは、末梢血単核球細胞に PHA を添加し、2 回細胞分裂をさせ、DNA を合成させる。その時にチミンのかわりに BrdU をとりこませる。DNA が二本鎖とも、BrdU を取り込むと蛍光強度が低下することを用いて、姉妹染色分体組み換えの頻度を測定した。1 細胞内に 46 本存在する染色体すべてを対象として 1 細胞内の乗換数をカウントした。50 細胞全てに同様のカウントを行い、乗換数を算出した。

（倫理面への配慮）

臨床情報を収集する場合は、連結可能匿名化とする。一次調査、二次調査に関しては、「Bloom 症候群とその類縁疾患の実態調査、早期診断法の確立に関する研究」、遺伝子変異解析に関しては、「先

天性免疫不全症の原因遺伝子同定および病態形成機序の解明」として、岐阜大学医学研究等倫理委員会の承認を既に得ている。十分なインフォームドコンセントを行ったのち、書面にて署名を得て行った。

図 1

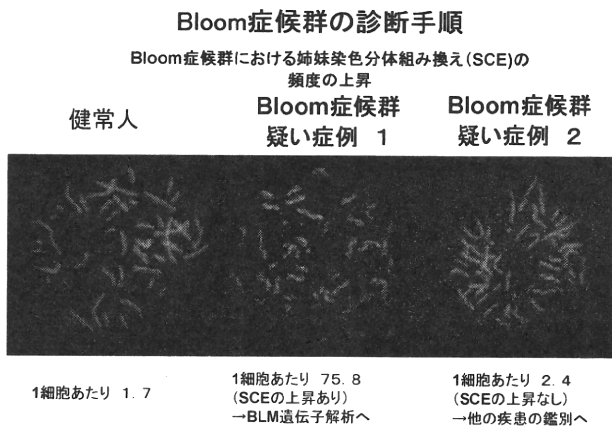


C. 研究結果

健常人、Bloom 症候群疑い症例 1、Bloom 症候群疑い症例 2 の姉妹染色分体組み換えを示す (図 2)。Bloom 症候群 (疑い症例 1) では健常人の約 40 倍の

姉妹染色分体組み換えの頻度の上昇が認められたが、疑い症例 2 は、健常人とほぼ同等だった。この場合疑い症例 1 は、BLM 遺伝子解析に進み、疑い症例 2 は、他の疾患の鑑別に進む。二次アンケート調査の結果からも、姉妹染色分体組み換えの頻度の上昇は、Bloom 症候群であることを強く示唆すると考えられた。また、二次アンケートから、全例に小柄な体型が認められたことから、Bloom 症候群には、必須な所見と考えられた。以上をもとに、Bloom 症候群の診断指針を作製した（添付資料）。

図2



D. 考察

二次アンケート調査の結果から、姉妹染色分体組み換えの頻度の上昇は、Bloom 症候群に必須の所見と考えられた。今回、Bloom 症候群において、姉妹染色分体組み換え頻度の上昇に関して、再現性をもって検出することができた。今後、作製した Bloom 症候群の診断指針を実際の症例に応用して、その結果を分析して、追加や修正を行う予定である。

E. 結論

Bloom 症候群の診断指針を作製した。小柄な体型などの臨床症状や、姉妹染色分体組み換えの頻度の上昇など検査所見をもとにフローチャートを作製した。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Morita H, Kaneko H, Ohnishi H, Kato Z, Kondo N. Antigen specific immune response of endotoxin removed recombinant P34. Allergy in press
- Kaneko H, Toshiyuki F, Kasahara K, Yamada T, Kondo N. Augmented cell death with human and mouse Bloom syndrome helicase deficiency. Molecular Medicine Report in press
- Kaneko H, Teramoto T, Kondo M, Morita H, Ohnishi H, Orii K, Matsui E, Kondo N. Efficacy of the slow dose-up method for specific oral tolerance induction for children in cow's milk allergy: Comparison with previous reported protocols. Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology 20: 538-539, (2010)
- Matsui E, Shinoda S, Fukutomi O, Kaneko H, Fukao T, Kondo N. Relationship between the benefits of suplatast1 tosilate, a Th2 cytokine inhibitor, and gene polymorphisms in children with bronchial asthma. Experimental and therapeutic medicine 1: 977-982, (2010)
- Kondo N, Matsui E, Nishimura A, Kaneko H. Pharmacogenetics of asthma in children. Allergy Asthma Immunol Res. Jan;2(1):14-9, (2010)
- Ozeki M, Funato M, Teramoto T, Ohe N, Asano T, Kaneko H, Fukao T, Kondo N. Reversible cerebrospinal fluid edema and porencephalic cyst, a rare complication of ventricular catheter. J Clin Neurosci. 17:658-61, (2010)
- Ozeki M, Kunishima S, Kasahara K, Funato M, Teramoto T, Kaneko H, Fukao T, Kondo N. A family having type 2B von Willebrand disease with an R1306W mutation: Severe thrombocytopenia leads to the normalization of high molecular weight multimers. Thromb Res. 125:e17-22. (2010)

2. 学会発表

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表