

201024265A

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方法の確立と

治療ガイドラインの作成に関する研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小島 勢二

平成 23 (2011) 年 4 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 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小島 勢二

平成 23 (2011) 年 4 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	
血球テロメア長測定、遺伝子変異検査 ……………	9
名古屋大学医学部附属病院 小児科	高橋 義行
治療プロトコールの立案 ……………	12
弘前大学大学院医学研究科 小児科	伊藤 悦朗
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……………	14
東邦大学医療センター大森病院 輸血部	小原 明
骨髓生検の病理診断 ……………	16
名古屋第一赤十字病院 病理部	伊藤 雅文
不全型先天性角化不全症の新規診断法の開発 ……………	19
日本医科大学 血液内科	山口 博樹
遺伝性疾患と間質性肺炎に関する研究 ……………	23
名古屋大学大学院医学系研究科 呼吸器内科学	長谷川 好規
皮膚科領域における疫学調査、診断治療ガイドラインの策定 ……………	25
名古屋大学大学院医学系研究科 皮膚病態学分野	秋山 真志
臨床所見を利用した自己免疫性骨髓不全の診断 ……………	27
金沢大学医薬保健研究域医学系 細胞移植学	中尾 眞二
治療ガイドラインの検討及び立案 ……………	29
日本大学 小児科	谷ヶ崎 博
表現型 (造血不全と免疫不全) に基づいた診断法に関する研究 ……………	30
九州大学大学院医学研究院 周産期・小児医療学	大賀 正一

造血幹細胞移植プロトコールの立案	33
東海大学医学部基盤診療学系 再生医療科学	矢部 普正
Dyskeratosis congenita における免疫異常に関する	38
富山大学附属病院 小児科	金兼 弘和
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	41
IV. 研究成果の刊行物・別冊	43

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）

総合研究報告書

「先天性角化不全症の効果的診断方法の確立と治療ガイドラインの作成に関する研究」班

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, DKC）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家族性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。

今回の検討においても特発性骨髄不全症候群と診断された 96 人の小児、120 人の成人について本症の原因遺伝子の解析をしたところ、小児コホートからは、2 例に TERT 遺伝子の異常、成人コホートからは TERC 遺伝子(1 例)、TERT 遺伝子(1 例)、TINF2 遺伝子(3 例)の変異が発見された。このように DKC の不全型は、特発性骨髄不全症候群や肺線維症の 2～4%の頻度で発見されており、わが国におけるこれらの疾患の発症頻度を考慮するとすくなくとも年間 20 例以上の新規症例があると予想される。

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、今回 DKC と診断された 10 例に遺伝子検査をおこなったところ 4 例に既知の遺伝子変異が検出された。

本研究では、日本小児血液学会による中央診断事業として、臨床診断可能な典型例や最重症例のみでなく、不全型をも含む包括的な疾患登録をおこない、わが国における本症の疫学情報を明らかにすることを試みた。中央診断事業を開始してから 16 ヶ月で 223 例の骨髄塗抹標本と骨髄標本がレビューされた。うち、先天性骨髄不全症候群を含む骨髄不全症は 104 例みられ、うち 3 例が DKC と診断された。特筆すべきは、特徴的な身体所見はみられないものの、リンパ球テロメア長の短縮を契機に遺伝子解析をおこない TINF2 遺伝子の変異を示す患者が発見されたことである。

重症 DKC の骨髄不全に対しては、同種血液幹細胞移植が唯一の治療法であるが、フルダラビンを含む骨髄非破壊的前処置法の開発により、飛躍的な移植成績の向上がもたらされた。また、蛋白同化ホルモンが *in vitro* の実験でテロメラーゼ活性を高めることが発見され、実際投与された患者において血液所見の改善がみられている。

研究分担者

高橋 義行	名古屋大学医学部附属病院 小児科 講師
伊藤 悦朗	弘前大学大学院医学研究科 小児科 教授
小原 明	東邦大学医療センター大森病院 輸血部 教授
伊藤 雅文	名古屋第一赤十字病院 病理部 部長
山口 博樹	日本医科大学付属病院 血液内科 助教
長谷川 好規	名古屋大学大学院医学系研究科 呼吸器内科学 教授
秋山 真志	名古屋大学大学院医学系研究科 皮膚病態学 教授
中尾 眞二	金沢大学医薬保健研究域医学系 細胞移植学 教授
谷ヶ崎 博	日本大学医学部 小児科学 助教
大賀 正一	九州大学大学院医学研究院 周産期・小児医療学 客員教授
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
金兼 弘和	富山大学附属病院 小児血液・免疫学 講師

A. 研究目的

先天性角化不全症 (DKC) は、皮膚の網状色素沈着、爪の委縮、口腔内の粘膜白斑症をともなう骨髄不全症で、10歳前後までに80%以上の患者にこれらの身体所見を付随した再生不良性貧血（再不貧）を発症する。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家系が登録されているが、わが国では、2005年に日本小児血液学会で全国調査がおこなわれたが、13例を数えるのみである。本研究では、まず、わが国におけるDKCの症例を把握するために、1次疫学調査をおこない症例を把握する。把握された症例についてはさらに、臨床症状、検査所見、治療、予後を含む2次アンケート調査をおこなう。なお、主任研究者の小島は Asian Pasific Bone Marrow Transplantation Group (APBMT) 内の骨髄不全疾患研究グループの代表を務めていることから、アジア諸国におけるDKCの疫学、診療状況も調査し、今後の共同研究に備える。

DKCの原因遺伝子としては、DKC1、TERC、TERT、NHP2、NOP10、TINF2の6種の遺伝子変異が報告されている。さらに、7番目の責任遺伝子として、2010年12月に開催された米国血液学会で small Cajalbody RNAs 遺伝子群に属する TCAB1 遺伝子の発見が報告された。わが国では、これまでDKCの原因遺伝子としては、分担研究者

の金兼等により DKC1 の変異例が報告されたのみである。本研究では、同意が得られた患者について、既知の遺伝子変異を解析し、わが国における遺伝子変異の頻度を明らかにする。遺伝子変異が確認できない患者については、検体を保存し、新規原因遺伝子の探索に備える。

分担研究者の山口は、米国 NIH に留学中に、これまで特徴的な身体所見がみられず特発性骨髄不全症とされていた患者の2-5%に、TERC や TERT の変異をもつ不全型のDKCが潜んでいることを報告した。(Blood 2003, N Engl J Med 2005)。一方、Armaniosらは家族性特発性線維症 (IPF) の8%に TERT 遺伝子の変異がみられることを報告した。(N Engl J Med 2007)。従来原因不明とされてきた特発性骨髄不全症や肺線維症の一部に本症の不全型が潜んでいる可能性がしめされ「テロメア病」とも称すべき新たな疾患概念が提唱された。わが国における骨髄不全症や肺線維症を対象にテロメア関連遺伝子の検索をおこない、わが国における「テロメア病」の実態を明らかにする。

先に述べたように、本症を含め発症頻度が低く個々の施設での経験することがすくない先天性骨髄不全症群を診断することは困難をともなう。そこで、前方視的に中央診断することで、わが国における本症の疫学を明らかにすることが期待できる。とりわけ、DKCに特徴的な身体所見がみられない不全型の多くは、診断に至らず、特発性再不貧や骨髄

異形性症候群として治療されていると考えられる。わが国で発症する小児期骨髄不全症を対象に、末梢血リンパ球のテロメア長の測定をDKCのスクリーニングに用いて、中央診断システムを確立する。

先に述べたように、症状が多岐にわたることや、診断に有用なテロメア長の測定や遺伝子診断がコマーシャルレベルで利用できないことから本症の診断は困難であることが多い。造血障害に対しては、造血幹細胞移植が試みられているが、前処置関連毒性や移植片対宿主病の頻度が高く、治療法は確立されていない。そこで、DKCの診断基準を策定し、海外の報告や今回の2次調査で得られた情報に基づき、治療指針を作成することも本研究班の目的のひとつである。

B. 研究方法

1) 全国疫学調査、アジアにおける予備調査

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。皮膚科領域については、分担研究者の秋山が、皮膚科専門医が勤務する全国の市中病院皮膚科を対象に、内科領域については、分担研究者の山口が、血液内科専門医が所属する全国の病院を対象に1次調査を追加する。1次調査で把握された症例については、さらに臨床症状、検査所見、治療、予後を含む2次アンケート調査をおこなう(添付資料1)。APBMTG参加施設におけるDKCをふくむ骨髄不全症の、疫学、診療実態のアンケート調査をおこなう。東アジアの調査に関しては、分担研究者の小原が、東南アジアについては、大賀が担当する。

2) 疾患登録システムの確立(図)

日本小児血液学会の事業として、小児骨髄不全症候群の中央診断事業を開始する。中央診断事務局を名古屋大学小児科に設置し、再生不良性貧血、骨髄異形性症候群、あるいは先天性骨髄不全症が疑われる症例が発生した場合は、各施設から事務局に連絡をもらい、登録番号を発行する。以後はその番号でやりとりを行う(匿名化)。中央診断およびそれに伴う検査については患者保護者の同意を取得した後に行う。レビューは骨髄および末梢血塗抹標本を2施設(名古屋大学小児科、聖路加国際病院小児科)で、骨髄病理標本を1施設(名古屋第一赤十字病院病理部)で行う。DKCの鑑別のためにFlow

FISH法をもちいてリンパ球のテロメア長を測定する。テロメア長が年齢を一致させた健常人の10%以下に短縮していた場合には、末梢血からDNAを抽出し、直接シーケンス法で6種の原因遺伝子の変異の有無を検討する。確定診断ができた症例については、小児血液学会疾患登録にオンラインで登録する。

3) 遺伝子解析

10例のDKC疑い症例について遺伝子解析がおこなわれた。8例はDKCに特徴的な身体所見と造血不全をしめした。1例は身体的特徴はしめさないがスクリーニング検査でテロメア長の短縮がみられた再不貧小児であり、他の1例は、脱色素斑と原因不明の間質性肺炎を示した成人例である。6種の既知の原因遺伝子について直接シーケンス法で塩基配列を決定した。

また、これまで特発性再生不良性貧血と診断されていた症例に、不全型の本症を存在するかを明らかにするために、96人の日本人小児特発性再生不良性貧血症例を対象にTERTとTERC、TINF2遺伝子の変異の有無を検討する。同様に日本人成人骨髄不全症120人と対象に先に述べた3種の遺伝子の変異の有無を検討する。

4) 診断基準、治療指針の作成

国内外の文献情報、本研究班でこれまで得られた解析結果と臨床情報をもとに、診断基準と治療指針を作成する。小児領域の診断基準の作成は、分担研究者である伊藤(悦)、谷ヶ崎、金兼が担当し、成人領域は中尾が担当する。また、前治療をふくむ移植方法の指針の立案は矢部がおこなう。

(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、個人情報を守秘を厳守し、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、実施施設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、患者および家族から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) 全国疫学調査、アジアにおけるよび調査

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 が報告がされた。25 施設について現在、添付資料 1 の 2 次アンケートの送付が予定されている。

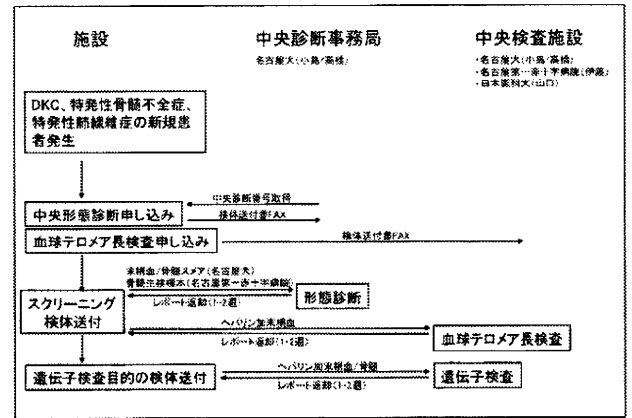
APBMTG の参加施設に再不貧の疫学、診療実態に関するアンケートを送付したところ 8 施設から回答が得られた。各施設を受診する再不貧の年間症例数には幅がみられるが、アジアの主要施設では、50 を越える施設も少なくなく、なかには中国、天津の血液病センターのように 950 人に達する施設もみられる。再不貧のなかで先天性骨髄不全症の割合は、1 から 10%であった。血球テロメア長の測定や DKC 関連遺伝子の解析ができる施設は、1 施設のみであった。

2) 疾患登録システムの確立 (図)

図に示す中央診断事業を開始してから 16 ヶ月で 223 人の骨髄塗抹標本と骨髄標本がレビューされた。うち、先天性骨髄不全症候群を含む骨髄不全症は 104 人みられた。9 人が先天性骨髄不全症候群であり、うち 3 人が DKC と診断された。さらに、特徴的な身体所見はみられないものの、リンパ球テロメア長の短縮を契機に遺伝子診断をおこない本症と診断された 1 人を含む 4 人について骨髄の病理組織学的検討をおこなった。いずれの症例も再不貧としては、非典型的な像であり、巨核球が観察され、少数の p 53 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。

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 人の再不貧患者、自験例を含む 11 人の DKC 患者についてリンパ球テロメア長の測定をおこなった。3 例は、特徴的な身体所見がみられない不全型である。11 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。

中央診断システム



(図)

特徴的身体所見がみられないが、リンパ球テロメア長が、著明に短縮していた 8 歳男児については、遺伝子解析の結果 *TINF2* 遺伝子変異がみられたことから本症の不全型と診断した。また、脱色素斑と間質性肺炎に罹患した 46 歳の男性についても、テロメア長の短縮がみられたので、DKC の不全型を疑っているが、遺伝子解析では変異が同定されていない。

3) 遺伝子解析

臨床的に DKC と診断された 10 人について遺伝子検索をおこなったところ、4 人について同定可能であり、DKC1 の変異を 2 人、TERC の変異を 1 人、*TINF2* の変異を 1 人に認めた。また、特発性骨髄不全症候群と診断された 96 人の小児、120 人の成人について本症の原因遺伝子の解析をしたところ、小児コホートからは、2 人に *TERT* 遺伝子の異常、成人コホートからは *TERC* 遺伝子(1 人)、*TERT* 遺伝子(1 人)、*TINF2* 遺伝子(3 人)の変異が発見された。

4) 診断基準、治療指針の作成

重症 DKC に対しては、現時点では造血幹細胞移植が唯一の治療法である。過去の報告から骨髄破壊的前処置による移植成績は極めて不良であった。研究班に属する名古屋大学、東海大学では、非血縁、HLA 不一致血縁ドナーからの移植にフルダラビンを含む骨髄非破壊的前処置を導入し、4 人とも重症な合併症もなく血液学的な回復がみられ生存中である(表 1)。一方、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が施行された 4 人のうち血液所見の改善が得られた症例はみられなか

った。一方、蛋白同化ホルモンが投与された 1 人には反応がみられている(表 2)。

本研究の集計結果と国内外の知見をもとに、厚生労働省科学研究費補助金“特発性造血障害に関する調査研究班”と協力して“先天性角化不全症の参照ガイド”を作成した(添付資料 1)。本参照ガイドは造血障害研究班で作成した、他の骨髄不全症に対する参照ガイドと併せて、ちかぢか、出版される予定である。

(表 1)

Patient	Sex	Age (yrs)	SCT Donor	Conditioning Regimen	Outcome	Institute
1	F	9	MUD	Flu-100, Cy-100, ATG, TAI-3Gy	Alive, >96month	Tokai U
2	M	21	Mismatched RD	Flu-100, Cy-100, ATG, TLI-3Gy	Alive, >61month	Nagoya U
3	M	18	MUD	Flu-100, Cy-100, ATG, TBI-3Gy	Alive, >17month	Nagoya U
4	M	6	MUD	Flu-100, Cy-100, ATG, TAI-3Gy	Alive, >5month	Tokai U

(表 2)

Gene	Location of mutation	Age	Sex	Diagnosis	Familial history	Chromosome abnormality	Shorting telomere	Treatment
TERC	n323 C/T	72	M	MDS RA	(-)	46XY	NA	Response to metoclopramide
TERT	T726M	9	F	CAA	(-)	ND	(+)	No response to IST
TERT	G662D	10	M	mAA	(-)	ND	NA	ND
TINF2	R829	22	M	CAA	(-)	46XY	(+)	No response to IST
TINF2	Del n871-874	43	F	CAA	Father:AA	46XX	(+)	No response to IST
TINF2	Del n865-866	29	M	CAA	(-)	46XY	NA	No response to IST

D. 考察

1998年から2005年の17年間に日本小児血液学会の疾患登録事業で把握された本症は6人にすぎないが、本研究班の1次アンケートの結果34例が登録され、本症の発症頻度が過小評価されている可能性がしめされた。今回の1次アンケートは主に小児科施設を対象としたが、皮膚科、内科領域からの登録もあり、現在予定されている皮膚科、内科を対象にしたアンケート調査の結果により、わが国における本症の疫学が明らかになると思われる。

本症の診断は、これまで各施設に任されていたが、広範な症状をしめす本症の診断は容易ではない。本研究班が中心となって小児患者の中央診断システ

ムが整ったことにより、本症の新規発症例の把握が可能となった。実際、中央診断を開始してから1年間に3人の新規発症例が発見されている。

とりわけ、本症の診断上問題となるのは、従来特発性再不貧と診断されていた症例のなかに、特徴的な身体所見をしめさない不全型が存在することである。本研究の結果、わが国で特発性再不貧と診断されている症例のなかに、TERC、TERT、TINF2遺伝子変異をもつ不全型が小児において、成人においても2~5%潜んでいることが判明した。これらの患者は免疫抑制療法などの不適切な治療をうけることになるので、その弊害は看過できない。しかし、わが国で発症する年間1000人にも達するすべての骨髄不全症の患者に対して、遺伝子解析をおこなうのは現実的ではない。今回の研究の結果、不全型を含めすべてのDKC患者においては、血球テロメア長の著明な短縮が観察された。テロメア長の測定により本症のスクリーニングをおこない、疑い症例について遺伝子解析をおこない、診断を確定する方法が効率よいと考えられる。実際、中央診断で判明したテロメア長の短縮を契機にTINF2の遺伝子変異が発見された不全型を経験しており、本システムは有用で社会的意義も高いと考えられる。

Armaniosらは家族性特発性線維症(IPF)の8%にTERT遺伝子の変異がみられることを報告しているが、分担研究者の長谷川は愛知県下で1年間に受診した79例のIPF患者のうち9例(11%)に家族歴がみられたことを報告している。わが国におけるIPFの罹患者数は2万人に達するが、本症におけるテロメア関連遺伝子の研究は着手されていない。長谷川は、厚生労働省びまん性肺疾患に関する調査研究班に所属しており、同研究班と連携して、わが国のIPF症例のなかにテロメア関連遺伝子が関与する症例があるかの検討を開始した。

上記のようにテロメア長の測定は、本症のスクリーニングに有用であるが、これまでのテロメア長測定はSouthern blotting法かFlowFISH法を用いておこなっていた。これらの測定法は、ある程度のDNA量や細胞数が必要であったため、汎血球減少症が著しい症例には不向きであった。そこでかわって、少量の検体で済むReal time PCR法を用いた高感度のテロメア長測定法を今後は検討する必要がある。

上述のように骨髄不全症の中には不全型のDKC

症例は 2-5%存在することは明らかであるが、臨床的に骨髄不全症の診断時にスクリーニングとして多数の原因遺伝子変異を検索することは現実的ではない。テロメア長測定はスクリーニング検査として有用ではあるが、テロメア制御遺伝子の変異を認めているにもかかわらずテロメア長が正常範囲内の症例が少なからず存在する。このことは、テロメア長を測定している細胞が、いわゆる「残存した細胞」であり、DKC 患者の造血細胞の中でもテロメア長が維持されている細胞の可能性がある。また DKC の発症には加齢と世代促進が必要であるが、対象となる症例が小児であった場合は例えテロメア制御遺伝子の変異を認めてもテロメア長の短縮化が軽度の可能性もある。そこでこうした症例をより鋭敏にスクリーニングする検査としてテロメラーゼ活性の測定も考慮する。小児期のためテロメア長の短縮が軽度であったとしても、テロメア制御遺伝子の変異があればテロメラーゼ活性の低下は明らかであると予想される。

今回の検討では、検索した 10 人のうち 4 人で遺伝子変異があきらかになり、遺伝子変異が検出される頻度は、欧米からの報告と同程度である。DKC の原因遺伝子としては、DKC1、TERC、TERT、NHP2、NOP10、TINF2 の 6 種の遺伝子変異が報告されていたが、さらに、7 番目の責任遺伝子として、2010 年 12 月に開催された米国血液学会で *small Cajalbody RNAs* 遺伝子群に属する TCAB1 遺伝子の発見が報告された。遺伝子変異が見つからない 6 人については、さっそく TCAB1 遺伝子の変異の有無を検討する予定である。従来直接シーケンシング法では検出することが困難であった大規模な欠失の検出が可能な *Multiplex Ligation Probe Amplification*(MLPA)法を併用し、検出頻度の向上を図ることも検討中である。さらに、臨床的に DKC の身体的所見とテロメア長の短縮化を認めるが、既知の DKC の原因遺伝子の変異を認めない症例を対象に、次世代高速シーケンサーを用いて全ゲノムの網羅的解析をおこない、新規原因遺伝子の同定を試みる必要もある。

重症例に対してはこれまでも、造血幹細胞移植がおこなわれているが、非血縁者間の移植成績は十分なものではない。Alter 等による 65 例の過去の報告例のレビューでは、血縁者間移植の生存率が 71%であるのに対し、非血縁者間移植の 2 年生存

率は 31%にすぎない。われわれの導入したフルダラビンを含む骨髄非破壊的前処置法では、代替ドナーからの移植にもかかわらず、全例で生着が得られ、生存中である。有望な前処置法であり、他の施設を含めた前方視的研究でその有用性の確認が待たれる。

今回の検討では、ATG やシクロスポリンによる免疫抑制療法を受けた患者では、血液所見の改善が得られた症例はみられなかった。その意味でも、テロメア長のスクリーニングにより、特発性再不貧と診断されている不全型 DKC を発見することは、患者に与える利益は大きい。Metenolone acetate などの蛋白同化ホルモンは、細胞内でエストロゲンに変換され、エストロゲン受容体を活性化することで、テロメラーゼ活性を高めることが知られている。実際、今回の検討でも Metenolone acetate が投与された 2 例はともに造血能の回復がみられている。移植ドナーが得られない DKC 患者の治療法として、蛋白同化ホルモンの適切な投与方法を検討することも本研究班の課題である。

E. 結論

小児骨髄不全症に対する中央診断事業の実施により、過去 16 ヶ月間に 4 人と比較的高頻度に本症が発見された。特筆すべきは、特発性再不貧と診断された患児の中から、リンパ球テロメア長のスクリーニングをおこなうことで本症の不全型が発見されたことである。今後成人の骨髄不全症や特発性肺線維症患者も同様な方法でスクリーニングすることにより、従来原因不明とされてきた患者群のなかから本症の不全型を発見する道が開けた。正確な診断を下すことで不適切な治療をさけることは、患者にとっても、医療経済の見地からも極めて重要である。

重症 DKC の骨髄不全に対しては、同種血液幹細胞移植が唯一の治療法であるが、フルダラビンを含む骨髄非破壊的前処置法の開発により、飛躍的な移植成績の向上がもたらされた。また、蛋白同化ホルモンが *in vitro* の実験でテロメラーゼ活性を高めることが発見され、実際に投与された患者において血液所見の改善がみられている。今後は、蛋白同化ホルモンの適切な投与方法の検討も本研究班の課題である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishio N, Takahashi Y, Ohashi H, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Shimada A, Yagasaki H, Kojima S. Reduced intensity hematopoietic cell transplantation from an alternative donor in patients with dyskeratosis congenital. *Pediatric Transplantation* 15(2):161-6, 2011
- 2) Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsuiki N, Takagi M, Matsuda K, Muramatsu H, Doisaki S, Nagasawa M, Morio T, Kasahara Y, Koike K, Kojima S, Takao A, Mizutani S. Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease with somatic KRAS mutation. *Blood* 2010 Nov 9. [Epub ahead of print]
- 3) Pulsipher MA, Young NS, Tolar J, Risitano AM, Deeg HJ, Anderlini P, Calado R, Kojima S, Eapen M, Harris R, Scheinberg P, Savage S, Maciejewski JP, Tiu RV, Difrongo N, Horowitz MM, Antin JH. Optimization of therapy for severe aplastic anemia based on clinical, biological and treatment response parameters: conclusions of an international working group on severe aplastic anemia convened by the blood and marrow transplant clinical trials network, march 2010. *Biol Blood Marrow Transplant* 17(3):291-9, 2011
- 4) Nishio N, Kojima S. Recent progress in dyskeratosis congenita. *Int J Hematol* 92(3):419-24, 2010
- 5) Watanabe N, Takahashi Y, Matsumoto K, Hama A, Muramatsu H, Doisaki S, Horibe K, Kato K, Kojima S. Prognostic factors for outcomes of pediatric patients with refractory or relapsed acute leukemia undergoing allogeneic progenitor cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Jul 29. [Epub ahead of print]
- 6) Maeda N, Horibe K, Kato K, Kojima S, Tsurusawa M. Survey of childhood cancer survivors who stopped follow-up physician visits. *Pediatr Int* 52(5):806-12, 2010
- 7) Sugimoto Y, Muramatsu H, Makishima H, Prince C, Jankowska AM, Yoshida N, Xu Y, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Takahashi Y, Kato K, Manabe A, Kojima S, Maciejewski JP. Spectrum of molecular defects in juvenile myelomonocytic leukaemia includes ASXL1 mutations. *Br J Haematol* 150(1):83-7, 2010
- 8) Kudo K, Hama A, Kojima S, Ishii R, Morimoto A, Bessho F, Sunami S, Kobayashi N, Kinoshita A, Okimoto Y, Tawa A, Tsukimoto I. Mosaic Down syndrome-associated acute myeloid leukemia does not require high-dose cytarabine treatment for induction and consolidation therapy. *Int J Hematol* 91(14):630-5, 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 resulting from uniparental disomy after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 115(15):3158-61, 2010
- 10) Funahashi Y, Iwata S, Ito Y, Kojima S, Yoshikawa T, Hattori R, Gotoh M, Nishiyama Y, Kimura H. Multiplex real-time PCR assay for simultaneous quantification of BK polyomavirus, JC polyomavirus, and adenovirus DNA. *J Clin Microbiol* 48(3):825-30, 2010
- 11) Yoshimi A, Kojima S, Hirano N. Juvenile myelomonocytic leukemia: epidemiology, etiopathogenesis, diagnosis, and management considerations. *Paediatr Drugs* 12(1):11-21, 2010 doi: 10.2165/11316200-000000000-00000. Review.

- 12) Yoshida N, Yagasaki H, Hama A, Takahashi Y, Kosaka Y, Kobayashi R, Yabe H, Kaneko T, Tsuchida M, Ohara A, Nakahata T, Kojima S. Predicting response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica*. 2011 Jan 27. [Epub ahead of print]

2. 招待講演

- 1) Kojima S. Unmanipulated haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. Haploidentical Transplantation-Asia Pacific Meeting Seminar 2010, Seoul, Korea. 23-24, Jul, 2010
- 2) Kojima S. Relapse of leukemia with loss of mismatched HLA resulting from uniparental disomy after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. Haploidentical Transplantation-Asia Pacific Meeting Seminar 2010, Seoul, Korea. 23-24, Jul, 2010
- 3) Kojima S. Treatment of Aplastic Anemia in Children Japanese Experience. Saint Petersburg, Russia. 22, Sep, 2010
- 4) Kojima S. Advances in Pediatric Leukemia, Bone Marrow Failure and Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Japan: Past, Present and Future. Texas Children's Cancer Center weekly research seminar series, Houston, USA, 9, Dec, 2010
- 5) 小島 勢二 : Pediatric hematology and oncology in Nagoya: Past, present and future. 第 52 回日本小児血液学会総会, 大阪、2010.12.19
- 6) Kojima S. Severe Aplastic Anemia: The Japanese Perspective. 2011 BMT Tandem Meetings, Hawaii, USA, 18, Feb, 2011

3. 学会発表

海外

- 1) Takahashi Y, Doisaki S, Nishio N, Muramatsu H, Shimada A, Hama A, Kojima S. The telomere length in peripheral blood lymphocytes is a useful predictor of the response to immunosuppressive therapy in patients with acquired aplastic anemia.

52nd ASH Annual Meeting, 2010, Orlando, USA. 4, Dec, 2010

国内

- 1) 西尾信博、高橋義行、村松秀城、濱麻人、嶋田明、小島勢二 : Flow-FISH 法によるリンパ球テロメア長測定は先天性角化不全症の screening に有用である。第 113 回日本小児科学会学術集会、盛岡、2010.4.23-25
- 2) 高橋義行、ブストス・イツェル、土居崎小夜子、村松秀城、西尾信博、嶋田明、濱麻人、小島勢二 : Recovery of deficient regulatory T cells after IST or SCT using ATG in children with aplastic anemia. 第 72 回日本血液学会学術集会、横浜、2010.9.24-26
- 3) 濱麻人、真部淳、伊藤雅文、野沢和江、土居崎小夜子、村松秀城、嶋田明、高橋義行、小原明、小島勢二 : 小児再生不良性貧血と Refractory cytopenia of childhood の臨床像の比較：中央診断登録例 78 例の検討。第 52 回日本小児血液学会総会、大阪、2010.12.17
- 4) 土居崎小夜子、村松秀城、濱麻人、嶋田明、高橋義行、小島勢二、神谷尚宏、真部淳、多賀崇 : 本邦における Congenital dyserythropoietic anemia(CDA) の責任遺伝子の解析。第 52 回日本小児血液学会総会、大阪、2010.12.17

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 講師

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、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。

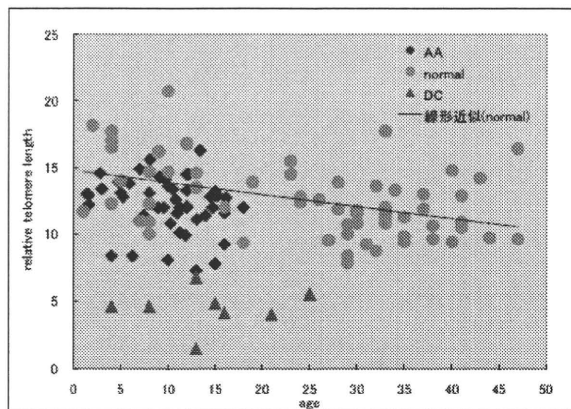
（倫理面への配慮）

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。

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

Dyskeratosis congenita(DC)の診断、治療ガイドラインを作成した。

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る。さらにテロメラーゼ複合体を形成する他の遺伝子についても変異解析をすすめていく必要がある。

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のあることが明らかとなった。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) Nishio N, Takahashi Y, Ohashi H, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Shimada A, Yagasaki H, Kojima S. Reduced intensity hematopoietic cell transplantation from an alternative donor in patients with dyskeratosis

congenital. *Pediatric Transplantation* 15(2):161-6, 2011

- 2) Watanabe N, Takahashi Y, Matsumoto K, Hama A, Muramatsu H, Doisaki S, Horibe K, Kato K, Kojima S. Prognostic factors for outcomes of pediatric patients with refractory or relapsed acute leukemia undergoing allogeneic progenitor cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Jul 29. [Epub ahead of print]
- 3) Sugimoto Y, Muramatsu H, Makishima H, Prince C, Jankowska AM, Yoshida N, Xu Y, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Takahashi Y, Kato K, Manabe A, Kojima S, Maciejewski JP. Spectrum of molecular defects in juvenile myelomonocytic leukaemia includes ASXL1 mutations. *Br J Haematol* 150(1):83-7, 2010
- 4) 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 resulting from uniparental disomy after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 115(15):3158-61, 2010
- 5) Yoshida N, Yagasaki H, Hama A, Takahashi Y, Kosaka Y, Kobayashi R, Yabe H, Kaneko T, Tsuchida M, Ohara A, Nakahata T, Kojima S. Predicting response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica*. 2011 Jan 27. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

海外

- 1) Takahashi Y, Doisaki S, Nishio N, Muramatsu H, Shimada A, Hama A, Kojima S. The telomere length in peripheral blood lymphocytes is a useful predictor of the response to immunosuppressive therapy in patients with acquired aplastic anemia. 52nd ASH Annual Meeting, 2010 , Orlando, USA. 4, Dec, 2010

国内

- 1) 西尾信博、高橋義行、村松秀城、濱麻人、嶋田明、小島勢二：Flow-FISH 法によるリンパ球テロメア長測定は先天性角化不全症の screening に有用である。第 113 回日本小児科学会学術集会、盛岡、2010.4.23-25
- 2) 高橋義行、ブストス・イツツェル、土居崎小夜子、村松秀城、西尾信博、嶋田明、濱麻人、小島勢二：Recovery of deficient regulatory T cells after IST or SCT using ATG in children with aplastic anemia. 第 72 回日本血液学会学術集会、横浜、2010.9.24-26
- 3) 濱麻人、真部淳、伊藤雅文、野沢和江、土居崎小夜子、村松秀城、嶋田明、高橋義行、小原明、小島勢二：小児再生不良性貧血と Refractory cytopenia of childhood の臨床像の比較：中央診断登録例 78 例の検討。第 52 回日本小児血液学会総会、大阪、2010.12.17
- 4) 土居崎小夜子、村松秀城、濱麻人、嶋田

明、高橋義行、小島勢二、神谷尚宏、真部淳、多賀崇：本邦における Congenital dyserythropoietic anemia(CDA) の責任遺伝子の解析。第 52 回日本小児血液学会総会、大阪、2010.12.17

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

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方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

研究分担者 伊藤悦朗 弘前大学大学院医学研究科 小児科学 教授

研究要旨： 典型的な先天性角化不全症（Dyskeratosis 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。本年度は、海外のデータをもとに我が国のDC患者に対し現時点で最も推奨されるところと思われる診療ガイドラインを作成した。今後、2次疫学調査の結果をもとに診療ガイドラインの改良を行っていく。

A. 研究目的

DCの至適な造血幹細胞移植方法の確立を目指し、移植プロトコールを立案し、治療ガイドラインの作成を目指す。

B. 研究方法

昨年度は880施設を対象に1次アンケート調査を行い、過去10年間のDCの症例数の把握を行った。本年度はこの結果をもとに2次調査を行い、発症頻度や臨床像を解析する。

（倫理面への配慮）

2次調査は、名古屋大学倫理委員会の審査を通してから行う。

最近、DKC症例に対して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示す症例報告が散見されるようになった。そこで上記の2次調査で蓄積された症例をもとに、平成23年度末までに移植プロトコールを含む治療ガイドラインの作成

を目標とする。

C. 研究結果

1次アンケート調査の結果、69%の回答が得られた。その結果、34例のDCが把握された。病像、治療法、予後を含む2次調査の準備を進めている。

本年度は、我が国における造血幹細胞移植の実態など成績の収集が不十分であるため、海外の移植のデータを参考に、我が国のDC患者に対して最も推奨されるところと思われる診療ガイドラインを作成した（表1）。

D. 考察

典型的な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。今回1次調査により、皮膚科領域からの症例が初めて把握された。我が国では、これまで臨床診断された本症の報告例は15例に満たなかったが、本調査により34例もの症例が把握された。テロメア長の測定や遺伝子解

析により診断の確定を進めている。

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は無効である。不全型の患者が不必要な治療を受け健康被害を受けないようにするためにも治療ガイドラインの作成が必要であると考えられる。

我々は、海外のデータをもとに治療ガイドライン（案）を作成した。造血不全以外の合併症については、根本的な治療法はないため合併症に対するサポートが中心となる。骨髄不全に対する治療としては、再生不良性貧血の重症度分類による軽症例は経過観察のみであるが、中等症の症例に対してはダナゾールなどの蛋白同化ホルモンを投与する。蛋白同化ホルモンの投与により、約半数の患者で一時的な血液学的反応がみられることがある。血液学的反応がみられるまでに2~3ヶ月を要することもある。副作用としては、肝障害、男性化、気分の変容などがあり、これらの症状が出ないように投与量を調節する。重症と判断される場合には、現時点では造血幹細胞移植が唯一の治療である。しかしながら、DCは極めて稀な疾患であるため、過去の報告は極めて少ない。過去の報告から、骨髄破壊的前処置の治療成績は極めて不良で、21例中14例が死亡しており、特に非血縁ドナーからの移植での生存者はない。Alterらの過去の文献を含めたすべての前処置を含む65症例のreviewによると、血縁者間移植では5年生存率71%に対し、非血縁者間移植では2年生存率は31%であった。近年、骨髄非破壊的前処置が行われるようになってきており、少ない合併症で血液学的回復を得る事が可能となってきている。表1に推奨する前処置を示す。移植ドナーはHLA一致同胞が第一選択であるが、潜

在的な患者であることを除外するため、家族内のテロメア長スクリーニングを行うべきである。

表1. 先天性角化不全症に対する治療指針（案）

1. 軽症 経過観察
2. 中等症 酢酸メテノロンまたはダナゾールの投与
3. 夜や重症型、重症、兼重症 ・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ノロ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:25 mg/m ² X 4日、CY:750 mg/m ² X 4日
・HLA一應不一致血縁ドナー Flu:25 mg/m ² X 4日、CY:750 mg/m ² X 4日、ATG:2.5 mg/kg X 4日
・HLA一致非血縁ドナー Flu:25 mg/m ² X 4日、CY:750 mg/m ² X 4日、ATG:2.5 mg/kg X 4日、TBI:3 Gy
Flu:fludarabine, CY:cyclophosphamide,ATG:antithymocyte globuline, TBI:total body irradiation

E. 結論

今回の疾患登録調査により、本疾患の本邦における実態がより明らかになってきた。しかしながら、診断法の開発により潜在する症例がさらに見出される可能性は高いと考える。本年度は、海外のデータをもとに我が国のDC患者に対し現時点で最も推奨されると思われる診療ガイドラインを作成した。今後、我が国のDCの病像、治療法、予後を含む2次調査の結果をもとに治療ガイドラインの改良を行う。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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方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

研究分担者 小原明 東邦大学医療センター大森病院 輸血部 教授

研究要旨： 稀少な先天性角化不全症 (DC) 研究の基礎となる疫学データベースの構築を実施した。小児血液学会疾患登録事業を元にし、DCの症例把握に努めた結果、2006から2009年に診断されて登録された314例の造血障害症例から、新規診断DC症例が2例報告された。造血不全、血液症状を呈するDCが小児血液科医師に認知され、診断の手引き、遺伝子診断の体制が整った事で今後も潜在する症例が見いだされる可能性は高い。

A. 研究目的

【背景】

先行研究 (2007年小児血液学会実施 (責任者) 日本医大前田美穂教授)) により、調査対象期間 (1988年から2004年) に1,337例の小児造血障害疾患があり、DC症例は6例(0.45%)であった。2007年に日本小児血液学会疾患登録事業が開始され、小児血液学会会員施設で診断された造血不全疾患が年度毎に報告され登録される体制が整えられた。

【目的】

本邦小児の先天性角化不全症症例の疫学データベース構築を目的に、小児血液学会疾患登録事業 (全数把握) を一次調査とした疫学観察研究 (小児血液再不貧2005研究・MDS2006研究) を実施した。質の高いデータベース構築により、これを基盤としたDCの診断法・治療法開発を目指す。

B. 研究方法

本研究班の研究では治療介入を行わない、疫学観察研究として実施する。小児血液学会会員235施設を対象にした全例登録 (疾患登録事業)

は、前年診断症例を対象に Web 登録にて実施され、およそ診断から1年経過した段階で二次調査 (再不貧 2005 研究・MDS2006 研究) が実施した。構築されるデータベースには小児期発症の造血障害全般を網羅し、DC 症例に限定はしない。

(倫理面への配慮)

研究計画は、疾患登録事業、小児血液再不貧2005研究・MDS2006研究により構成され、いずれも小児血液学会臨床研究審査委員会の科学倫理審査承認を得た。

C. 研究結果

2006, 2007, 2008, 2009年診断登録症例数を表に示す (表)。

a.疾患登録 (一次調査) 症例: 小児血液学会会員236施設の90%に相当する213施設が登録した。非腫瘍性血液疾患は毎年1200から1300症例であり、血小板異常症が最多。造血障害疾患は総計314例で、そのうち特発性再不貧は毎年50-56例とほぼ一定した症例数であった。同じ時期 (2006、2007年) のMDS (RA, RCMD)症例数は12, 11例。AML 165, 162例、