

ロウイルス・ベクターを用いて発現させた。GATA1を発現させると、巨核球の増殖は著しく抑制されたが、IDを発現させても巨核球の異常増殖を抑制することはできなかった。

#### D. 考察

GATA1sとIDsに共通して欠損しているGATA1の領域には、たいへん、興味深いことに、正常な赤血球造血に不可欠なGATA1のRb結合モチーフが含まれていた。RBとの結合が失われることがTAMの発症に重要であることが示唆された。

#### E. 結論

我々は、6例のTAMでGATA1 ID変異を見出した。GATA1 IDは、第3エクソンに生じた遺伝子変異により、GATA1遺伝子にalternative splicingが生じ発現していた。GATA1sとGATA1 IDはRb蛋白との結合領域を欠き、巨核球の異常増殖を抑制できなかった。以上の結果は、GATA1変異のためにGATA1とRbの結合が障害されることが、TAMの発症に重要であることを示唆している。

#### F. 健康危険情報

該当せず。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, RuNan Wang, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T, Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. **Blood** 2012 [Epub ahead of print].
2. Yokoyama T, Toki T, Aoki Y, Park MJ, Kanno Y, Tanaka T, Yamazaki Y, Ito E, Hayashi Y, Nakamura T. Identification of *TRIB1* R107L gain-of-function mutation in human acute megakaryocytic leukemia. **Blood** 2012 [Epub ahead of print].

なし

3. Kamio T, Ito E, Ohara A, Kosaka Y, Tsuchida M, Yagasaki H, Mugishima H, Yabe H, Morimoto A, Ohga S, Muramatsu H, Hama A, Kaneko T, Nagasawa M, Kikuta A, Osugi Y, Bessho F, Nakahata T, Tsukimoto I, Kojima S. Relapse of aplastic anemia in children after immunosuppressive therapy: a report from the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. **Haematologica**. 2011;96(6):814-819.
4. Kudo K, Terui K, Sasaki S, MD, Kamio T, Sato T, Ito E. CD7-positive acute myelomonocytic leukemia with trisomy 21 as a sole acquired chromosomal abnormality in two adolescents. **Leuk Res**. 2011;35(9): e167-8.

##### 2. 学会発表

1. 土岐力、伊藤悦朗. TAMにみられたGATA1遺伝子異常の最近の話題(シンポジウム:ダウン症候群に発症する一過性骨髄異常増殖症(TAM)). 第114回日本小児科学会学術集会, 平成23年8月12~14日, 東京.
2. Toki T, Kobayashi E, Kanazaki R, Wang R, Terui K, Kanegane H, Maeda M, Endo M, Mizuochi T, Adachi S, Hayashi Y, Shimizu R, Yamamoto Y, Ito E. GATA1 Mutants lacking Rb-Binding motif observed in transient abnormal myelopoiesis in Down Syndrome. 第54回アメリカ血液学会, 米国・サンディエゴ (2011年12月9日~13日).

#### 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

## TAMの病態への関与が疑われる染色体異常とその関連遺伝子に関する研究

研究分担者 滝 智彦 京都府立医科大学 講師

**研究要旨:**染色体異常の観点から一過性骨髄異常増殖症(TAM)の発症および急性巨核芽球性白血病(AMKL)への進展に関与する遺伝子を同定するため、TAMの経過後に発症したAMKLおよび骨髄異形成症候群(MDS)でみられた染色体異常の切断点に存在する遺伝子について解析を行っている。SNPアレイによるコピー数解析では、AMKLでみられた不均衡転座に相当する領域でのゲノムコピー数の変化が検出され、1q25では3つの遺伝子、7p15では1つの遺伝子が切断点の近傍に存在しており、これらの遺伝子がキメラ遺伝子を構成する候補遺伝子と考えられた。しかし、これらの遺伝子の組み合わせによるRT-PCR法ではキメラ転写産物は同定できなかった。それぞれの遺伝子と融合する遺伝子の存在を考え、cDNAバブルPCR法やinverse PCR法によるさらに詳細な解析を行っている。

### A. 研究目的

染色体転座関連遺伝子が、キメラ遺伝子の形成に加えて、染色体転座を伴わない変異によってもさまざまな悪性腫瘍に関与していることが知られている。このことは、染色体転座を手掛かりとしたがん関連遺伝子の同定が、染色体転座を有さない症例の腫瘍化のメカニズムの解明にも役立つことを示唆している。本研究では、染色体異常を手掛かりとして、一過性骨髄異常増殖症(TAM)の発症および白血病への進展に関与する遺伝子異常を同定する。

### B. 研究方法

TAMの経過後に発症した染色体異常を有する急性巨核芽球性白血病(AMKL)症例と骨髄異形成症候群(MDS)症例の各1例のDNAを用いて、Affymetrix社のGenome-Wide Human SNP Array 6.0によりゲノムコピー数の増減を検討した。コピー数の変化が生じている部位に存在する遺伝子と融合する遺伝子を、RT-PCR法、cDNAバブルPCR法、inverse PCR法などを用いて同定を試みた。

(倫理面への配慮)

患児検体の解析にあたっては、患児の両親の同意を得て行なった。遺伝子解析については京都府立医科大学倫理委員会の承認を得た。

### C. 研究結果

TAMおよびAMKLの両方の時期にder(7)t(1;7)(q25;p15)を有した症例のAMKL細胞のSNPアレイ解析では、1q25および7p15領域でのゲノムコピー数の変化が確認された。1q25領域のコピー数が変化していた箇所近傍には3つの遺伝子が存在し、そのうちの1つは白血病との関連が知られている遺伝子であった。7p15では、コピー数変化のごく近傍に1つの遺伝子が存在したが、コピー数変化はこの遺伝子の外で生じていた。これらの遺伝子の組み合わせによるRT-PCR法ではキメラ転写産物は同定できなかったが、存在した4つの遺伝子のどれかが染色体転座により遺伝子再構成を起こしている可能性を考え、cDNAバブルPCR法、inverse PCR法などを用いて相手遺伝子の同定を試みている。cDNAバブルPCR法では、現時点で予想された遺伝子の組み合わせを持つ転写産物は同定されていないが、これらの遺伝子配列を含む複数の転写産物が同定されており、現在これらの詳細な解析を行っている。

### D. 考察

同一症例でのTAMおよびAMKLに共通して観察された転座切断点近傍に存在する遺伝子の中に、TAMおよびAMKLの発症に関与する遺伝子が存在

する可能性を考え引き続き解析を行っている。現時点で、4つの遺伝子の中でがんとの関連が報告されているものは、白血病との関連が知られている1遺伝子のみであるが、他の遺伝子が何らかの形でTAMおよびAMKLの発症や進展に関与している可能性も念頭に置きながら、さらに解析を進める予定である。

## E. 結論

TAMの発症においても染色体転座関連遺伝子の異常が関与している可能性が示唆される。キメラ遺伝子の同定には、今後RNAシーケンスを行うことも予定している。

## F. 健康危険情報

該当せず

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Isome K, Matsubara K, Taki T, Nigami H, Yura K, Iwata A, Wada T, Taniwaki M, Fukaya T. Spinal cord compression by epidural involvement over 21 vertebral levels in acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hemtol Oncol* 33: 153-157, 2011
2. Kobayashi S, Taki T, Chinen Y, Tsutsumi Y, Ohshiro M, Kobayashi T, Matsumoto Y, Kuroda J, Horiike S, Nishida K, Taniwaki M. Identification of IGHC $\delta$ -BACH2 fusion transcripts resulting from cryptic chromosomal rearrangements of 14q32 with 6q15 in aggressive B-cell lymphoma/leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 50: 207-216, 2011
3. Shiba N, Taki T, Park M, Nagasawa M, Kanazawa T, Takita J, Ohnishi H, Sotomatsu M, Arakawa H, Hayashi Y. CBL mutation in childhood therapy-related leukemia. *Leukemia* 25: 1356-1358, 2011
4. Sasaki N, Kuroda J, Nagoshi H, Yamamoto M, Kobayashi S, Tsutsumi Y, Kobayashi T, Shimura Y, Matsumoto Y, Taki T, Nishida K, Horiike S, Akao Y, Taniwaki M. Bcl-2 is a better therapeutic target than c-Myc, but attacking both

could be a more effective treatment strategy for B-cell lymphoma with concurrent Bcl-2 and c-Myc overexpression. *Exp Hematol* 39: 817-828.e1, 2011

5. Yamamoto-Sugitani M, Kuroda J, Ashihara E, Nagoshi H, Kobayashi T, Matsumoto Y, Sasaki N, Shimura Y, Kiyota M, Nakayama R, Akaji K, Taki T, Uoshima N, Kobayashi Y, Horiike S, Maekawa T, Taniwaki M. Galectin-3 (Gal-3) induced by leukemia microenvironment promotes drug resistance and bone marrow lodgment in chronic myelogenous leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 17468-17473, 2011
6. Hori T, Suzuki N, Hatakeyama N, Yamamoto M, Inazawa N, Miyachi H, Taki T, Tsutsumi H. Infantile acute promyelocytic leukemia without a RARa rearrangement. *Pediatr Int* 53: 1070-1073, 2011
7. Gotou M, Hanamura I, Nagoshi H, Wakabayashi M, Sakamoto N, Tsunekawa N, Horio T, Goto M, Mizuno S, Takahashi M, Sukanuma K, Yamamoto H, Hiramatsu A, Watarai M, Shikami M, Imamura A, Mihara H, Taki T, Miwa H, Taniwaki M, Nitta M. Establishment of a novel human myeloid leukemia cell line, AMU-AML1, carrying t(12;22)(p13;q11) without chimeric MN1-TEL and with high expression of MN1. *Genes Chromosomes Cancer* 51: 42-53, 2012
8. Shiba N, Park M, Taki T, Shimada A, Tabuchi K, Adachi S, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Arakawa H, Hayashi Y. DNMT3A mutations are rare in childhood acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukemia. *Br J Haematol* 156: 413-414, 2012
9. Shiba N, Park M, Taki T, Takita J, Hiwatari M, Kanazawa T, Sotomatsu M, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. CBL Mutations in infant acute lymphoblastic leukemia. *Br J Haematol* 156: 672-674, 2012
10. Kondo Y, Nagai K, Nakahata S, Saito Y, Ichikawa T, Suekane A, Taki T, Iwakawa R, Enari M, Taniwaki M, Yokota J, Sakoda S,

Morishita K. Overexpression of DNA sensor proteins, AIM2 and IFI16, contributes to tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma with p53 inactivation. *Cancer Sci* in press

11. Sano H, Shimada A, Murata C, Park M, Sotomatsu M, Taki T, Tabuchi K, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y. RAS mutation in childhood acute myeloid leukemia does not influence clinical outcome: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Int J Hematol* in press

## 2. 学会発表

1. Kobayashi S, Taki T, Tsutsumi Y, Nagoshi H, Matsumoto Y, Kuroda J, Horiike S, Nishida K, Taniwaki M. Expression analysis of *BACH2*-related genes in B-cell malignancies. 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011年10月3~5日
2. Nagoshi H, Taki T, Hanamura I, Nishida K, Kuroda J, Okuda K, Kobayashi S, Yamamoto M, Tsutsumi Y, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Otsuki T, Nitta M, Taniwaki M. Recurrent involvement of *PVT1* gene in multiple myeloma with 8q24 abnormality. 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011年10月3~5日
3. Taki T, Nishida K, Ohtake S, Miyazaki Y, Takeuchi J, Miura I, Jinnai I, Ohyashiki K, Sakamaki H, Miyawaki S, Honda S, Ohnishi K, Ohno R, Naoe T, Taniwaki M. Clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia: the JALSG AML201 study. 第73回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011年10月14~16日
4. Kobayashi S, Taki T, Tsutsumi T, Nagoshi H, Matsumoto Y, Kuroda J, Horiike S, Nishida K, Taniwaki M. Analysis of *BACH2*-Related Genes in B-cell Malignancies. 第73回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011年10月14~16日
5. Nagoshi H, Taki T, Hanamura I, Nishida K, Kuroda J, Okuda K, Kobayashi S, Yamamoto M, Tsutsumi Y, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Kuroda J, Taniwaki M. Frequent involvement of *PVT1* in multiple myeloma carrying 8q24 rearrangement and Identification of novel *PVT1-NBEA* chimeric gene. 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego, December 9-13, 2011
6. Nagoshi H, Taki T, Hanamura I, Nitta M, Otsuki T, Nishida K, Okuda K, Sakamoto N, Kobayashi S, Yamamoto M, Tsutsumi Y, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Kuroda J, Taniwaki M. Frequent involvement of *PVT1* in multiple myeloma carrying 8q24 rearrangement and Identification of novel *PVT1-NBEA* chimeric gene. 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego, December 9-13, 2011
7. Shiba N, Taki T, Park M, Murata C, Oki K, Ichikawa H, Shimada A, Kanazawa T, Sotomatsu M, Tabuchi K, Adachi S, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Arakawa H, Hayashi Y. *NUP98-NSD1* fusion gene is strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia: a study of the Japanese Childhood AML99 Cooperative Study Group. 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego, December 9-13, 2011
8. Taketani T, Taki T, Fukuda S, Hyuga M, Onishi C, Yamaguchi S, Hayashi Y. The Concurrent mutations in hematological malignancies with *NUP98*-fusion genes are associated with clinical prognosis. 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego, December 9-13, 2011

## 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

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

一過性骨髄異常増殖症の重症度分類のための  
細胞表面マーカー解析と細胞保存に関する研究

研究分担者 大喜多 肇 国立成育医療研究センター研究所 室長

研究要旨: 一過性骨髄異常増殖症(TAM)のフローサイトメトリーによる細胞表面マーカー解析をマルチカラーで行い、重症例抽出のための基礎データを蓄積するために有用な骨髄、末梢血のマーカー解析項目の選定を行った。通常末梢血白血球では発現を認めない抗原が発現しており、症例ごとに特徴的なマーカーが発現していた。前方視的登録システムと連携したマーカー解析・細胞保存を行うことにより、層別化や治療法開発のための研究推進が期待される。

#### A. 研究目的

ダウン症候群の新生児期に一過性に白血病様芽球が末梢血中に増加する疾患があり、一過性骨髄異常増殖症(transient abnormal myelopoiesis, TAM)と呼ばれている。その頻度はダウン症候群患児のおよそ10%(100人/年)といわれているが、正確な数の把握はなされていない。TAMの多くの症例では染色体は正常であるが、GATA1遺伝子の変異が同定されており、この変異はTAM発症に関係していると考えられている。これまで、無治療経過観察のみで芽球は自然に消失し、比較的予後良好であると考えられていたが、近年臓器障害のために早期死亡する症例が約30%みられることが報告されている。一方、こういった重症例に対して少量シタラビンによる化学療法の有効性も示されつつあり、前方視的試験により国内のTAM症例の重症度の診断と予後を正確に把握する必要性が高まっている。

TAMは新生児期に発症するため、これまで新生児施設で診断、治療する事が多く、また予後良好と考えられていたため登録もされず、本邦における全数把握もされていなかった。また自然治癒する例と、難治例の鑑別が困難であり、難治例に対する標準的治療も確立していない。現在、小児血液学会の登録システムを用いて、新生児科の医師も小児血液学会員を通して登録ができるようにし、全数把握を試み、重症例の抽出を行われている。

欧米ではTAMについては従来から解決すべき大きな問題とされていたが、米国のCOGグループとヨーロッパのI-BFMグループが検討を報告した。また我が

国においても未熟児、新生児学会において血液と新生児の医師が合同でシンポジウムを開催し協議の場が設けられた。本邦の後方的視的解析では妊娠在胎週数、血清ビリルビン値等が予後不良因子であるとされた。本研究では、現在検討されている、全数把握、検査値や臨床データから重症例の抽出と標準的治療を目指す前方視的な登録システムの中で、骨髄、末梢血のマーカー解析を行って、重症例抽出のための基礎データを蓄積するとともに、検査後の余剰検体を将来の研究に資するために保存するシステムを立ち上げることを目的とした。

#### B. 研究方法

白血球のマーカー解析の発現状況について、末梢血、骨髄液を全血法により蛍光染色し、溶血後、Beckman-Coulter社のフローサイトメトリーGallios(3レーザー・10カラー)を用いて解析し、10カラー(CD45-gating+9カラー)を行なった。骨髄CD34+細胞をマウス間質細胞株OP9上、あるいはIL-3、GM-CSF等のサイトカイン添加で培養し、骨髄球系細胞に分化させ、同様にマーカー解析を行った。

(倫理面への配慮)

患児検体の解析にあたっては、患児の保護者・親権者に説明の上、検査施設に検体を送付して検査を行なうことの同意を取得した上で行なった。当該施設における血液疾患罹患患児のマーカー検査の実施については倫理委員会の承認を得ている。

#### C. 研究結果

新規TAM患児3例の末梢血および骨髄液の白血

球マーカー解析を行なった。これまでの自験例の結果とも合わせ、TAMの芽球に特徴的なマーカー発現は、骨髓球系のCD33に加えて、CD7, CD117, CD34,

CD244, CD56と考えられた。CD41, CD42bの巨核球・血小板系抗原およびCD36, CD61の関連抗原発現の状況は多様であり、必ずしも陽性でない症例が認められた。骨髓の非腫瘍性骨髓系細胞や、培養系で分化した未熟な骨髓球系細胞に対してCD56, CD244の発現を検討した結果、正常の場合骨髓球細胞にCD56の発現は認めないが、未熟な骨髓球の一部にCD244の発現を確認した。

#### D. 考察

TAM患児の白血球では、巨核球・血小板抗原やCD7の発現を認める異常な細胞の出現が知られている。しかしながら多数例による体系的解析の報告は少なく、その詳細は明らかになっていない。

今回の検討では、TAMの芽球の特徴的なマーカーの一つとしてCD244が挙げられた。CD244は一般にはNK細胞、細胞傷害性T、単球のマーカーとされているが、骨髓の非腫瘍性骨髓系細胞の一部や、培養系で分化した未熟な骨髓球系細胞にも陽性であることが明らかになり、未分化な骨髓球にも発現していることが示唆された。MRD解析を考慮した場合、末梢血中におけるTAM芽球の検出に関しては、CD34やCD117等、通常末梢血白血球では発現を認めない抗原を指標に追跡する方法が最も確実であり、これらの抗原の発現を認めない症例の場合には、CD33, CD7, CD244, CD56の中から、各症例の初発時のマーカー所見を基本に、末梢血中の正常白血球と区別可能な抗体の組み合わせを選択する方法が最も現実的で確実と考えられた。

TAM患児の白血球マーカーに関する多数例を用いた網羅的な解析は少なく、その詳細は不明な点が多い。また、臍帯血、骨髓、末梢血それぞれの白血球の性状や分布の異同についても詳細な報告はなく、いまだにはっきりと分かっていない。予後層別化のための基礎データ蓄積には、多数のマーカー情報を系統的に取得することが求められる。そのため、TおよびBリンパ球や、単球、顆粒球、巨核球血小板、幹細胞系抗原の他、現在使用可能なより多くの抗原に対する精密な解析が必要である。そのためには、少量の検体でより多くの項目について検査可能なマルチカラー解析が非常に有用であった。解析に使用する検体を少量とすることで、より多くの細胞を保存でき、

将来の研究に使用することが可能となる。

#### E. 結論

TAM芽球の細胞表面マーカー解析を10カラーにて詳細に行い、特徴的な細胞表面マーカーを抽出し、より重症例の抽出や層別化のための基礎データを蓄積するために有用な骨髓、末梢血の細胞表面マーカー解析項目の選定を行った。TAM患児から採取可能な検体量は限定されているため、マルチカラー解析によって少量の検体で多数の抗原に対する精密かつ詳細な解析を行ない、予後と相関するマーカーを検討するための情報を収集するとともに、少しでも多くの検体を有効に保存し、将来の基礎研究に活用するための工夫が必要である。

#### F. 健康危険情報

分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

該当なし

##### 2. 学会発表

1) 三春 晶嗣, 清河 信敬, 小林 健一郎, 大喜多 肇, 山田 浩之, 飯島 一智, 森 鉄也, 福島 敬, 斉藤 正博, 康 勝好, 真部 淳, 10カラーフローサイトメトリーを用いたB前駆細胞急性リンパ芽球性白血病のMRD検出, 第53回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011年11月25日-27日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし

ダウン症候群でみられる一過性骨髄異常増殖症および  
急性巨核芽球性白血病の原因遺伝子の探索

研究分担者 小川誠司 東京大学医学部附属病院 Cancer Board 特任准教授

研究要旨

一過性骨髄異常増殖症(TAM)は、ダウン症候群児の一部にみられる新生児期に未熟な巨核芽球が末梢血中あるいは肝に増加する病態であり、また、TAM 症例の約 20~30%が 4 歳までに急性巨核芽球性白血病(AMKL)に移行する。TAM ではほぼ全例で *GATA1* 遺伝子に変異がみられ、また、*GATA1* 遺伝子変異に加えていくつかの遺伝子の変異が蓄積することで、TAM から MDS、AMKL に移行すると考えられているが、両疾患でどのような遺伝子変異が起こっているかの全貌はわかっていない。本研究においては、高速シーケンサーを用いて、TAM、AMKL 検体の網羅的な変異解析を行い、TAM においては *GATA1* 遺伝子変異が 21 trisomy 以外の主な遺伝子異常であり、他の遺伝子変異が比較的少ないこと、AMKL においては *GATA1* 遺伝子変異以外にも複数の遺伝子の変異が起こっていることが示された。

A. 研究目的

一過性骨髄異常増殖症(TAM, transient abnormal myelopoiesis)は、ダウン症候群児の 5~10%にみられる新生児期に未熟な巨核芽球が末梢血中あるいは肝に増加する類白血病反応であり、ほぼ全例で *GATA1* 遺伝子変異が起こっていることが知られている。また、*GATA1* 変異に加えていくつかの遺伝子の変異が蓄積することで、TAM から急性巨核芽球性白血病(AMKL, acute megakaryoblastic leukemia)に移行すると考えられている。今回我々は TAM および AMKL の分子病態を明らかにするために、高速シーケンサーを用いて網羅的な遺伝子変異の解析を行った。

B. 研究方法

TAM 18 症例および AMKL 14 症例の DNA を用いて、ヒト全エクソン領域をターゲットとするビオチン化された cRNA (Agilent 社 SureSelect®)を用いて濃縮したのち、高速シーケンサー(illumina 社 GA IIx, Hiseq 2000)で解析を行った。腫瘍比率が低い検体を解析から除くため、Sanger 法で *GATA1* 遺伝子変異が確認できた DNA のみを高速シーケンサーでの解析対象とした。寛解期に採取した末梢血由来の DNA を自己正常検体として、TAM あるいは AMKL におけ

る腫瘍細胞特異的な変異を検出した。

(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. 結果

TAM では症例あたり平均して 1.5 個、AMKL では平均して 7 個の somatic mutation が同定された。AMKL ではこれまでに *GATA1* 変異に加えてこれまでも報告があった *TP53* 遺伝子のなど変異も同定されたが、多くは AMKL で報告のない遺伝子変異だった。

D. 考察

TAM 検体では変異数は 1.5 個と比較的少なく、これまで考えられていた trisomy 21 に加えて、*GATA1* 遺伝子変異が起こることにより TAM を発症するというモデルを裏付ける結果となった。一方、AMKL では *GATA1* 遺伝子変異に加えていくつかの変異が同定された。このうち複数の症例で変異がみられる遺伝子や複数の遺伝子に変異が起こっている pathway にある遺伝子については、多数例での変異頻度の解析を

行う予定である。また、新たに同定された遺伝子変異については TAM、AMKL の発症にどのように関与しているか、さらに詳細な検討の必要があると考えられた。

#### E. 結論

高速シーケンサーを用いて TAM、AMKL 検体の網羅的な変異解析を行い、TAM では平均 1.5 個、AMKL では平均 7 個の somatic mutation を同定した。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, Yamochi T, Kagami T, Tsutsumi A, Sato-Otsubo A, Muto S, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Ogawa S, Watanabe T. Polycomb-mediated loss of miR-31 activates NIK-dependent NF- $\kappa$ B pathway in adult T-cell leukemia and other cancers. *Cancer Cell*. in press.
2. Shiba N, Hasegawa D, Park M, Murata C, Sato A, Ogawa O, Yagasaki H, Manabe A, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. CBL Mutation in Familial Platelet Disorder with Propensity to Acute Myeloid Leukemia (FPD/AML) Patient in a Japanese Pedigree with RUNX1 Mutation *Blood*. in press.
3. Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, RuNan W, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T, Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Blood*. in press.
4. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M, Chalkidis G, Suzuki Y, Shiosaka M, Kawahata R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Ishiyama K, Mori H, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Sugano S, Haferlach C, Koeffler HP, Shih LY, Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011 : 478 : 64-9.
5. Yoshida K, Sanada M, Kato M, Kawahata R, Matsubara A, Takita J, Shih LY, Mori H, Koeffler HP, Ogawa S. A nonsense mutation of IDH1 in myelodysplastic syndromes and related disorders. *Leukemia*. 2011;25(1):184-186.
6. Thoennissen NH, Lasho T, Thoennissen GB, Ogawa S, Tefferi A, Koeffler HP. Novel CUX1 missense mutation in association with 7q- at leukemic transformation of MPN. *Am J Hematol*. 2011;86(8):703-705.
7. Takita J, Chen Y, Okubo J, Sanada M, Adachi M, Ohki K, Nishimura R, Hanada R, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Aberrations of NEGR1 on 1p31 and MYEOV on 11q13 in neuroblastoma. *Cancer Sci*. 2011.
8. Shiba N, Park MJ, Taki T, Takita J, Hiwatari M, Kanazawa T, Sotomatsu M, Ishii E, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. CBL mutations in infant acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2011.
9. Oki K, Takita J, Hiwatari M, Nishimura R, Sanada M, Okubo J, Adachi M, Sotomatsu M, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. IDH1 and IDH2 mutations are rare in pediatric myeloid malignancies. *Leukemia*. 2011;25(2):382-384.
10. Ogawa S, Takita J, Sanada M, Hayashi Y. Oncogenic mutations of ALK in neuroblastoma. *Cancer Sci*. 2011;102(2):302-308.
11. Katagiri T, Sato-Otsubo A, Kashiwase K, Morishima S, Sato Y, Mori Y, Kato M, Sanada M, Morishima Y, Hosokawa K, Sasaki Y, Ohtake S, Ogawa S, Nakao S. Frequent loss of HLA alleles associated with copy number-neutral 6pLOH in acquired aplastic anemia. *Blood*. 2011.
12. Iwakawa R, Kohno T, Kato M, Shiraishi K, Tsuta K, Noguchi M, Ogawa S, Yokota J. MYC amplification as a prognostic marker of early-stage lung adenocarcinoma identified by whole genome copy number analysis. *Clin Cancer Res*. 2011; 17(6): 1481-1489.
13. Warren EH, Fujii N, Akatsuka Y, Chaney CN, Mito JK, Loeb KR, Gooley TA, Brown ML, Koo KK, Rosinski KV, Ogawa S, Matsubara A, Appelbaum FR, Riddell SR. Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation with T cells specific for minor histocompatibility antigens. *Blood*. 2010;115(19):3869-3878.

##### 学会発表

1. 小川誠司, 加藤元博, 林泰秀. TAM における遺伝学的基盤探索. 第 114 回日本小児科学会学術集会.
2. Yoshida K, Toki T, Park MJ, Nagata Y, RuNan Wang, Shiraishi Y, Sanada M, Nagasaki M, Miyano S, kanegane H, Kawakami K, Kato K, Hayashi Y, Ito E, Ogawa S. Whole exome analysis of transient abnormal myelopoiesis and acute megakaryocytic leukemia with Down syndrome. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10.15
3. 吉田健一, 土岐力, 朴明子, 永田安伸, 王汝南,



白石友一, 真田昌, 昆彩菜, 佐藤亜衣子, 長崎正朗, 宮野悟, 金兼弘和, 川上清, 加藤剛二, 小島勢二, 林泰秀, 伊藤悦朗, 小川誠司. ダウン症候群に合併した一過性骨髄増殖症(TAM)および急性巨核芽球性白血病(AMKL)の全エクソンシーケンス. 第53回日本小児血液学会・がん学会学術集会. 前橋, 2011.11.25

#### 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。

## TAM 症例の登録システムと治療指針の確立のための臨床試験に関する研究

研究分担者 菊地 陽 帝京大学医学部小児科 教授

研究要旨:日本における Down 症候群の出生時にみられる一過性骨髄異常増殖症 (TAM)の実態の把握のためのシステム作りとして日本小児白血病リンパ腫研究グループ (JPLSG)の TAM 委員会において、中央診断による確実な症例の把握とそれらの症例の確実な追跡を目的とした前方視的登録による観察研究を開始した。GATA1 変異、表面マーカー、血球形態の中央診断を行い、末梢血中の微小残存腫瘍、サイトカインプロファイルの中央検査を盛り込んだ観察研究計画で、日本小児血液学会臨床研究審査委員会の承認を得て各施設に研究計画書を配布し、2012年2月15日現在で76施設で倫理委員会承認済みであり、24症例が登録されている。

### A. 研究目的

Down症候群の出生時にみられる一過性骨髄異常増殖症(TAM)は従来自然軽快する予後良好な病態とされてきたが、近年になりその20-30%に早期死亡がみられるとの報告がなされている。日本における TAMの実態の把握とその重症度分類の作成のため、臨床情報収集のためのシステム作りを行うことを目的として本研究班での活動を行った。

### B. 研究方法ならびにC. 研究結果

昨年設置された日本小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)のTAM委員会において計7回の検討を行い、TAMの実態解明を目的とした観察研究計画を立案した。GATA1変異を弘前大学小児科、表面マーカーを三重大学小児科、血球形態を名古屋大学小児科でそれぞれ中央診断として行い、末梢血中の微小残存腫瘍を三重大学小児科、サイトカインプロファイルを群馬県立小児医療センターでそれぞれ中央検査として行うことを盛り込んだ観察研究計画で、日本小児血液学会臨床研究審査委員会の承認を得て各施設に研究計画書を配布し、2011年3月から研究を開始した。2012年2月15日現在で76施設で倫理委員会承認済みであり、24症例が登録されている。

また、重症TAM症例に対する治療に関しては、今回の研究計画では介入試験は時期尚早であるとして盛り込まれなかったが、新生児領域を中心に重症TAM症例に対する治療指針作成の要望が強いため、従来行われてきて報告のあるものについてその内容をまとめて、推奨治療という形で日本小児血液学会雑誌に総説として呈示した(G. 1. 論文発表 参照)。

(倫理面への配慮)

本研究においては文書による説明同意を行い、同意の得られた症例のみが観察研究の対象となる。また、連結可能匿名化により、症例の登録・追跡調査を行うことにより、対象症例の個人情報外部に流出する危険を限りなくゼロにする配慮をしている。また、研究の安全性を担保するため、本研究は介入試験における効果安全性評価委員会の役割をもつものとして JPLSGの倫理委員会の監視の下に行われる予定である。

### D. 考察

今回の観察研究の開始により、日本のTAM症例の均質な情報が集積され、推奨治療の提示によりTAMに対する対応が統一して行われ、症例の把握・重症例の治療などが標準化されて行われるようになり、結果として重症TAMの予後の改善につながるものと思われる。

### E. 結論

日本におけるTAMの実態の把握のためのシステム作りとしてJPLSGに設置されたTAM委員会において、中央診断による確実な症例の把握とそれらの症例の確実な追跡を目的とした前方視的登録による観察研究を2011年3月から開始した。2012年2月15日現在で76施設で倫理委員会承認済みであり、24症例が登録されている。今後、この観察研究の開始により、TAMについてのより正確な情報が得られ、重症TAMの予後の改善につながる情報が得られるものと期待される。

### F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

村松 秀城、菊地 陽

一過性骨髄異常増殖症(TAM)の治療戦略

日本小児血液学会雑誌 Vol 25: p179-184,  
2011

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

少量シタラビン療法を施行したダウン症候群に合併した一過性骨髄異常増殖症29例の  
合併症プロフィール

研究分担者 村松秀城 名古屋大学医学部附属病院小児科 助教

研究要旨: 一過性骨髄異常増殖症(TAM)は、従来予後良好であるとされてきたが、肝不全等の臓器障害による早期死亡例が一定の割合で存在することが近年明らかとなった。今回、我々は2003年から2008年に診断・治療された TAM 症例を対象に、全国アンケート調査を行い、153 例の臨床情報を収集した。うち、28 例に対して少量シタラビン療法が施行されていた。大部分の症例は目立った副作用は認めず安全に治療が施行できていたが、重大な合併症として、腫瘍崩壊症候群 3 例(高 K 血症、敗血症、多臓器不全によりそれぞれ死亡)が確認された。TAM を発症する新生児期は腎機能が未熟であり、少量シタラビン療法を安全に施行するために、腫瘍崩壊症候群の発生の可能性に考慮する必要がある。

A. 研究目的

一過性骨髄異常増殖症(Transient Abnormal Myelopoiesis: TAM)はダウン症候群の新生児期に、一過性に白血球芽球が末梢血中に増加する疾患である。従来、予後良好であるとされてきたが、肝不全等の臓器障害による早期死亡例が一定の割合で存在することが近年明らかとなった。

2003年から2008年の診断例に対して全国アンケート調査を行ない、計153例について解析、検討した。

B. 研究方法

2003年から2005年診断例に対する全国アンケート調査および2006年から2008年に小児血液学会疾患登録がなされた症例に対する二次調査の結果、解析可能であった計153例の調査結果について検討した。

(倫理面への配慮)

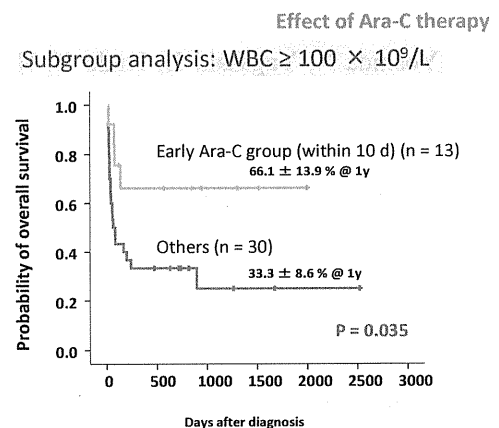
本研究は、名古屋大学医学部倫理委員会の審査・承認を得た。

C. 研究結果

初診時白血球数の中央値(範囲)は37,800/ $\mu$ L(4,400 - 356,900)、在胎週数の中央値(範囲)は37週(27-40)であった。31例(20%)が診断後9ヶ月以内に死亡した。少量シタラビン療法を施行した症例は28例(18%)であった。投与量および投与期間の中央値(範囲)はそれぞれ、0.95 mg/kg/day (0.4-3.1

mg/kg/day)、7日間(2-15日間)であった。白血球数100,000/ $\mu$ L以上の症例に限定したサブグループ解析の結果、診断後10日以内に治療開始された症例の予後は有意に予後良好であった(1年全生存率66.1  $\pm$  13.9% (n = 13) vs. 33.3  $\pm$  8.6% (n = 30); p = 0.035、図1)。

図1. 少量シタラビン療法の臨床効果



少量シタラビンを投与した28例のうち、3例(10%)で腫瘍崩壊症候群を発症しうち高K血症、敗血症、多臓器不全によりそれぞれ死亡した。腫瘍崩壊症候群を発症した症例はいずれも治療開始時の白血球数が極めて高値であった(330,000/ $\mu$ L, 356,900/ $\mu$ L, 495,000/ $\mu$ L)。3例とも化学療法開始前に交換輸血は行われていなかった。少量シタラビン療法の投与方法は、0.4-1.5mg/kg/day、2例が24時間投与・1例は1

時間投与であった。

#### D. 考察

少量シタラビン療法施行の副作用は全般には少なく、早期に治療介入を行うことで白血球数高値の症例において予後を改善しうる可能性が示された。一方、3例(10%)と無視できない割合で腫瘍崩壊症候群を合併することが判明した。今後、非常に白血球数が高値(30万/ $\mu$ L以上)の症例においては、交換輸血等により腫瘍量を減じること、ラスブリカーゼの使用の検討、電解質バランスおよび腎機能悪化に注意を十分に払って少量シタラビン療法を施行する必要があるものと考えられる。

#### E. 結論

少量シタラビン療法は重症TAM患者に対する有望な治療法である可能性が示されたが、より安全性を高めるために腫瘍崩壊症候群に注意する必要があると考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Watanabe N, Takahashi Y, Matsumoto K, Horikoshi Y, Hama A, Muramatsu H, Yoshida N, Yagasaki H, Kudo K, Horibe K, Kato K, Kojima S. Total body irradiation and melphalan as a conditioning regimen for children with hematological malignancies undergoing transplantation with stem cells from HLA-identical related donors. *Pediatr Transplant* 2011;15:642-649.
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* 2011;17:516-523.
3. Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsuiki N, 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* 2011;117:2887-2890.
4. Shima H, Tokuyama M, Tanizawa A, Tono C, Hamamoto K, Muramatsu H, Watanabe A, Hotta N, Ito M, Kurosawa H, Kato K, Tsurusawa M, Horibe K, Shimada H. Distinct impact of imatinib on growth at prepubertal and pubertal ages of children with chronic myeloid leukemia. *J Pediatr* 2011 ; 159 : 676-681.
5. Sakaguchi H, Takahashi Y, Watanabe N, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Shimada A, Yagasaki H, Kudo K, Kojima S. Incidence, clinical features, and risk factors of idiopathic pneumonia syndrome following hematopoietic stem cell transplantation in children. *Pediatr Blood Cancer Pediatr Blood Cancer*. 58 : 780-784, 2012
6. Nishio N, Takahashi Y, Tanaka M, Xu Y, Yoshida N, Sakaguchi H, Doisaki S, Hama A, Muramatsu H, Shimada A, Kojima S. Aberrant phosphorylation of STAT5 by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in infant cytomegalovirus infection mimicking juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia Res* 2011;35:1261-1264.
7. Nishio N, Takahashi Y, Ohashi H, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Shimada A, Yagasaki H, Kojima S. Reduced-intensity conditioning for alternative donor hematopoietic stem cell transplantation in patients with dyskeratosis congenita. *Pediatr Transplant* 2011;15:161-166.
8. Narita A, Muramatsu H, Takahashi Y, Sakaguchi H, Doisaki S, Nishio N, Hama A, Shimada A, Ito M, Kojima S. Autoimmune-like hepatitis following unrelated BMT successfully treated with rituximab. *Bone marrow transplantation (in press)*
9. Muramatsu H, Takahashi Y, Shimoyama Y, Doisaki S, Nishio N, Ito Y, Hama A, Shimada A, Yagasaki H, Ito M, Kojima S.

- CD20-negative Epstein-Barr virus-associated post-transplant lymphoproliferative disease refractory to rituximab in a patient with severe aplastic anemia. *Internat J Hematol* 2011;93:779-781.
10. Muramatsu H, Takahashi Y, Sakaguchi H, Shimada A, Nishio N, Hama A, Doisaki S, Yagasaki H, Matsumoto K, Kato K, Kojima S. Excellent outcomes of children with CML treated with imatinib mesylate compared to that in pre-imatinib era. *Int J Hematol* 2011;93:186-191.
11. Kamio T, Ito E, Ohara A, Kosaka Y, Tsuchida M, Yagasaki H, Mugishima H, Yabe H, Morimoto A, Ohga S, Muramatsu H, Hama A, Kaneko T, Nagasawa M, Kikuta A, Osugi Y, Bessho F, Nakahata T, Tsukimoto I, Kojima S. Relapse of aplastic anemia in children after immunosuppressive therapy: a report from the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. *Haematologica* 2011;96:814-819.
12. Ismael O, Shimada A, Hama A, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Yoshida N, Ito M, Takahashi Y, Akita N, Sunami S, Ohtsuka Y, Asada Y, Fujisaki H, Kojima S. Mutations profile of polycythemia vera and essential thrombocythemia among Japanese children. *Pediat Blood Cancer* (in press)
13. Hama A, Muramatsu H, Makishima H, Sugimoto Y, Szpurka H, Jasek M, O'Keefe C, Takahashi Y, Sakaguchi H, Doisaki S, Shimada A, Watanabe N, Kato K, Kiyoi H, Naoe T, Kojima S, Maciejewski JP. Molecular lesions in childhood and adult acute megakaryoblastic leukaemia. *British J Haematol* 2012;156:316-325
14. 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.
- 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。

新生児期に発見されたTAM症例に対する新生児科医の対応とフォローアップの  
マニュアルの作成 そのための基礎調査としてのサーベイランス

研究分担者 田村 正徳 埼玉医科大学総合医療センター総合周産期母子医療センターセンター長

研究要旨:新生児期に発見されたダウン症の一過性骨髄異常増殖症症例に対する新生児科医の対応とフォローアップのマニュアルの作成を目的として、基礎調査を日本未熟児新生児学会のサーベイランス事業として始め、二次調査を施行中である。

#### A. 研究目的

新生児期に発見されたダウン症の一過性骨髄異常増殖症(transient abnormal myelopoiesis, 以下TAM)症例に対する新生児科医の対応とフォローアップのマニュアルの作成とそのための基礎調査。

#### B. 研究方法

Aに記載した目的のため、現状を把握するための基礎調査として症例のサーベイランスを行う。方法としては日本未熟児新生児学会の学会事業としてのサーベイランスとする。TAMは血液疾患ではあるが、新生児期に発症する疾患であり、新生児集中治療室(NICU)施設で診療する事が多い。そして、NICU施設に必ずしも小児血液専門医がいるとは限らない。以上のような状況より日本小児血液学会の疾患登録のみでは把握できない症例が多数あると考えられるため、日本未熟児新生児学会のサーベイランスで症例を把握する事にした。

(倫理面への配慮)

研究分担者で日本未熟児新生児学会のサーベイランス事業担当者となる田村が、所属施設で今回のサーベイランスを行う事について倫理委員会で承認を受けている。また調査は匿名で行い、患者が同定されるような情報は集めない。

#### C. 研究結果

2010年3月より日本未熟児新生児学会のサーベイランス事業が開始された。2010年度は21例の報告があり、16例について二次調査が終了している。2011年度は11月末までで16例の報告がある。直近の報告も含まれているため二次調査が終了しているものは半数の8例である。

二次調査の終了した24例中7例に化学療法が行われている。死亡例は4例で、うち3例に対して化学療法が施行されていたことが判明した。

#### D. 考察

ダウン症候群に発症するTAMは一過性の良性疾患と考えられていたが、最近の文献によると30%程度は発症時より著しい白血球増加と血小板減少に肝機能傷害を合併し、新生児期に死亡する予後不良な症例である。このような症例についても、外国からの報告では積極的な治療介入が予後を改善するという報告がある。また、新生児期の芽球増加が治まっても、1-2才頃に特徴的な急性巨核芽球性白血病を発症する症例がやはり30%程度あり、必ずしも予後良好な疾患とは言えない。その一方、TAMを診療すると考えられる日本のNICUの状況を鑑みると、このような症例に遭遇した場合でも身近に小児血液専門医がいるとは限らず、治療に難渋する症例や不必要な抗癌剤の投与が行われる症例があると考えられる。今回の調査では、また個別の症例については検討していないが、死亡例に化学療法が施行された症例が多く、これはTAMの一部には化学療法が施行されても予後が不良な一群が存在する事を示唆している。

また血液疾患の発症には遺伝子異常が強く関わっている事が近年明らかになっており、TAMの場合GATA1遺伝子の異常がこれまで報告されている。しかし、今回二次調査を行った24例中10例では遺伝子異常の検索が行われておらず、TAMの診療について均てん化を測っていく必要があると考えられる。

今回、この研究を進める事で、NICUでのTAM症例を把握し、臨床データを蓄積して、それを元に適切な対応やフォローアップができるようになると考えられる。

#### E. 結論

サーベイランス事業により従来、日本小児血液学会の疾患登録事業では把握できていない症例の把握が少しずつ進んでいる。その検討により日本におけるTAMの実態が詳細に把握でき、新生児科医がこの

疾患に対して適切に対応できるようになるための基礎情報が蓄積されている。

#### F. 健康危険情報

省略。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

まだ論文発表にはなっていないが、日本未熟児新生児学会雑誌にサーベイランス事業の対象疾患として掲載された。

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし。

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3.その他

なし。



厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)  
分担研究報告書

新生児の症例登録システムの確立とその解析指針の確立

研究分担者 塚本 桂子 国立成育医療センター 周産期センター 新生児科

研究要旨

稀少疾患である一過性骨髄異常増殖症(TAM)症例をより正確に把握、検討するために、小児血液専門医のみならず、新生児科医・小児科医からの症例を収集するためのシステムを構築することを目的に、新生児・周産期施設に対して、2006-2008年の症例について後方視的に調査した。2次調査票の検討で、早期死亡率は24%で、予後関連因子として、白血球数、出血症状、肝機能異常、腹水が挙げられた。今後も、新生児施設、一般小児科施設での症例を含めた症例の把握と解析による診断・管理・治療プロトコルの確立・評価とともに、TAM管理指針の作成と新生児科・小児科医への提供が急務と考えられた。今回は、当センターでも高リスクTAM症例を経験し、化学療法の実際における注意点について考察した。NICUでも、新生児科医が全身状態と同時に、腫瘍崩壊症候群や副作用のモニタリングを適切に行うことで、化学療法を効果的かつ安全に施行することが可能と考えられた。

A. 研究目的

日本小児血液学会では、ダウン症候群にみられる一過性骨髄異常増殖症(TAM)の病態を詳細に明らかにするために、TAMの症例登録がなされていて、さらにはTAM委員会が主導となって、前方視的調査が整備されつつある。しかし、実際にTAM症例に最初に遭遇する機会が最も多いのは新生児医療の現場であり、この日本小児血液学会の疾患登録のみではTAM症例全数を把握することは困難な可能性がある。このような新生児医療現場においてTAM症例を有効に登録するシステムを構築することを目的とした。

2009年度より、新生児医療現場での発生実態および登録実態を3年間にわたり前方視的に把握することとし、その方法として、以下の二つを計画、実施を開始した。

- 1) 日本未熟児新生児学会サーベイランス委員会における稀有疾患サーベイランス事業
- 2) サーベイランス非参加施設に対する年度ごとのアンケート調査

1)は、2010年度より開始され、症例が登録されつつある。さらに、2010年はサーベイランス参加施設に対して2006年から2009年までの後方視的調査を行うこととして、アンケート調査を行った。また、2)サーベイランス非参加施設に対しては、2009年分のアンケート調査を行った。これにより、昨年度に行ったサーベイランス非参加施設への調査と併せて、新生児施設全体の2006-2009年分のTAM症例について、把握することが可能となる。これらの新生児科サイドでの1)および2)の調査結果と日本小児血液学会の疾患登録を併せて検討することにより、可能な限り多くの施設から症例を把握することで全数登録から漏れる症例を減らし、かつ重複しないよう工夫し、より実体に近い全数調査にするシステムを構築することが可能となる。

さらに、TAM症例の重症度に応じた安全で有効な管理のための分類と管理プロトコルの作成を試みた。

## B. 研究方法

＜調査Ⅰ：2006～2009年の新生児施設症例のまとめ＞

対象は、日本未熟児新生児学会稀有疾患サーベイランス参加施設 118 施設と、日本周産期新生児学会新生児専門医研修登録施設 458 施設のうち日本未熟児新生児学会稀有疾患サーベイランス参加施設 118 施設を除いた 346 施設とした。質問は、施設規模などに関する基本情報とダウン症症例数、TAM 症例数を問う 1 次調査票と、日本小児血液学会疾患登録を行っていない症例についての詳細を後方視的に調査する 2 次調査票の 2 部構成とした。1 次調査票では、施設の基本情報に加えて、「TAM 症例に遭遇したときに相談できる小児血液専門医がいますか」と、2006-2009 年度の 4 年間に経験した TAM の症例数、それぞれについて「小児血液学会への症例登録が済んでいるか」を併せて質問した。その上で、日本小児血液学会疾患登録を行っていない症例のみの臨床経過、検査データなどを、2 次調査票に記入してもらうこととした。項目は、在胎週数、出生体重、出生前診断の有無、症状(合併奇形、先天性心疾患の有無、出血症状と部位、呼吸障害の有無と酸素投与・人工呼吸期間、胸水、腹水、心嚢水、全身浮腫、肝腫大、脾腫、その他の浸潤所見、骨髄検査の有無と所見、血液検査所見、染色体検査所見、遺伝子検査の有無と所見、交換輸血・ステロイド投与・輸血療法などの支持療法の有無と内容、化学療法の有無と内容・副作用、生存/死亡・MDS/白血病の発症・最終観察期間などである。

各症例についての臨床経過、検査データなどは、各施設の倫理基準に乗っ取り、診療情報 2 次利用に関して承諾を得た上で、個人を特定できる情報を除外して分担研究者が収集処理し、倫理面での配慮を行うこととした。

統計学的検討には、t 検定と Fisher の直接確率計算法を用いた単変量解析と、変数減少法による多変量解析、ROC 曲線に基づきカットオフ値を決定した上での多変量解析を用いた。p<0.05 を有意とした。

＜調査Ⅱ：2010 年のサーベイランス非参加施設からのアンケート調査及び 2011 年のサーベイランス参加施設からの症例＞

サーベイランス非参加施設に対しては、2011 年 5

月から 8 月にかけて、これまでとほぼ同様のアンケート内容で封書による一次調査を行い、同時に日本小児血液学会疾患登録未登録症例について、2 次調査票を回収した。サーベイランス参加施設については、2011 年に経験した症例について、前方視的に登録を募った。

＜調査Ⅲ：新生児に対する化学療法の実例—自験例の経験をもとに＞

2011 年度に、当センター NICU で経験した TAM 症例に対して、リスクに基づき、化学療法を施行した。その経過をまとめ、新生児科医が NICU において化学療法を実施する上での注意点を考察した。

## C. 研究結果

＜調査Ⅰ＞

1. 概観…アンケート回収率は 40.0%で、各 NICU 入院数に対するダウン症候群の割合は 1.3%、そのうちの 8.6%が TAM であった。TAM 症例の日本小児血液学会疾患登録率は 28.7%であった。施設の内容は、サーベイランス参加施設の 36%が総合周産期施設であるのに対して、非参加施設では総合周産期施設は 14%と少なかった。しかし、地域周産期施設はサーベイランス参加施設の 34%に対し、非参加施設は 45%と多かった(図1)。また、これらの施設のうち、相談可能な小児血液専門医がいる施設は約半数であった。サーベイランス参加施設で 62%、非参加施設で 47%であった(図2-a, b)。

### 2. 2 次調査票の検討

①早期死亡危険因子…2 次調査票が得られた 79 例について詳細に検討した。生後 6 ヶ月以内の早期死亡例は 19 例(24%)であった。早期死亡に関連する因子について単変量解析を行ったところ、出血症状と胸・腹水や浮腫、肝機能障害が強く関連していた。また、輸血や交換輸血等の支持療法を要した症例では、早期死亡する可能性が強いことが示された。化学療法は、単変量解析では、早期死亡を有意に減らす結果を得られなかった(表1)。多変量解析では、出血症状と全身浮腫が重要であることが明らかになった(表2)。カットオフ値を用いて多変量解析を行ったところ、統計学的に有意と判断された因子は、出血症状有り、LDH 1200IU/L 以上、末梢血白血球数 10 万/ $\mu$ L 以上で、腹水ありが関連する傾向が見られ

た(表3)。

②少量AraC療法…施行例は14例で、2006～2007年は6.7%であったが、2008～2009年では25%と増加する傾向があった。開始日齢中央値9[範囲1-50]から、シタラビン $1.0 \pm 0.5$ mg/kg/日を $6 \pm 2$ 日間投与された。日令10までに開始された症例の生存率は、68%であった。副作用は、貧血、好中球・血小板減少、凝固異常などであった。

③TAMに対して、交換輸血・ステロイド・化学療法など何らかの介入を要した症例で検討すると、少量AraC療法はOR7.2[95%CI: 1.2-62.0] ( $p=0.0277$ )で、生存に寄与していた(表4)。生存曲線の検討では、 $p=0.0193$ で少量AraC療法あり群のほうが生存率が良好であった(図3)。

#### <調査II>

i)サーベイランス非参加施設 330施設への2010年の症例についての「アンケート調査の回収率は、50.3%であった。回収率は、2009年は41.3%、2010年は44.3%と、年々増加する傾向が認められた。今後、二次調査票の集計および解析を行うとともに、2011年の症例に対するアンケート調査を実施する。

ii)サーベイランス参加施設 190施設からの回答は、2011年12月現在、45施設(回収率23.6%)であった。今後、2010～2011年の症例の二次調査票を集計し、解析していく。

#### <調査III>

i)症例:在胎36週1日、出生体重2249gの男児。  
ii)入院までの経過:母体は38才1経妊1経産。骨盤位のため、近医より地域病院産科に紹介され、出生前日、NRFS、羊水過小、早産のため、紹介元病院産科に母体搬送となり、緊急帝王切開で出生した。アプガースコアは、1分4点、5分9点であった。出生直後よりダウン様顔貌と著明な肝脾腫に気づかれ、同院NICUへ入院した。入院時の血液検査にて、白血球数23万と異常高値のため、TAMと診断された。重度の肝機能障害、凝固異常、出血傾向を認めたため、日齢1、精査加療目的に当センター新生児科に紹介、搬送入院となった。  
iii)入院時所見:バイタルサインは正常範囲内、呼吸は軽度の多呼吸以外に異常なし、腹部で著明な肝脾腫、心エコーでASDを認めた。血液検査(表5)では、WBC $156500/\mu\text{L}$ 、芽球80.5%より、TAMと診断

された。Hb $10.6\text{g/dL}$ 、plt $17.7\text{万}/\mu\text{L}$ で、軽度の貧血を認めた。肝機能障害が著明で、AST $811\text{IU/L}$ 、ALT $200\text{IU/L}$ 、LDH $8010\text{IU/L}$ と上昇し、凝固能検査にてPT-INR検査不能、APTT135秒、Fibrinogen測定不能と異常値であった。同時に尿量減少、BUN $13.6\text{mg/dl}$ 、クレアチニン $1.73\text{mg/dl}$ と、腎機能障害を認めた。また、肝線維化マーカーは異常高値であった。

iv)入院後経過(図4-a):呼吸補助として経鼻酸素投与、次いでnCPAP療法を、循環補助としてドーパミン・ドブタミンの投与を要した。TAMに対して、まず、腫瘍細胞減量の目的で、日齢1に交換輸血を施行した。その結果、WBCは $48500/\text{mcl}$ と減少した。また、利尿剤投与に反応し、尿量増加が見られた。白血球数、早産、肝機能障害と凝固障害より高リスク群と考え、交換輸血後も芽球60～80%と減少なく、WBCも再増加が見られたため、日齢2から少量シタラビン療法を開始した。補助治療として、プレドニン $1\text{mg/kg/日}$ から開始し、日齢14までで漸減中止した。また、適宜FFP、RRC、PCの輸血、アルブミン補充療法を併用した。

v)化学療法の実際:化学療法中は、骨髄抑制、肝機能障害に注意した。貧血・血小板減少に対しては適宜輸血を行った。凝固異常に対しては、Fibrinogenの目標を $100\text{mg/dl}$ 以上として、FFPの補充を行った。ATIII製剤も投与した。また、腫瘍崩壊症候群を懸念して、輸液を維持量の約1.5倍に増量し、治療中に電解質異常、溢水傾向があれば、治療中断や腹膜透析も考慮することとした。腫瘍崩壊症候群の予防として、以下の治療を適宜併用した。

①輸液…通常は維持輸液の2-4倍とされるが、新生児の腎機能特に本症例での尿量減少を考慮して、1.5倍量で開始し、尿量やバランスを見て増減することとした。

②利尿剤…フロセミド $0.5 \sim 1.0\text{mg/kg/回} \times 2-3$ 回を静脈内投与/日、アセタゾラミド $5\text{mg/kg/日}$ を持続点滴した。

③アルカリ化…尿pHが高いとリン酸塩が析出しやすく、低いと尿酸塩が析出しやすくなるため、尿pHを7.0～7.5に調整するように、ハーフメイロンを持続投与した。

④高尿酸血症…アロプリノール $10\text{mg/kg/日}$ を投与した。

抗腫瘍剤投与中は以下のような検査スケジュール

で、全身状態に加え、TAM の病勢と副作用・腫瘍崩壊症候群をモニタリングした。

- i 尿 pH モニタリング:1日1回中検で検尿、ほかは試験紙で各勤務1回チェック。
- ii 血液ガス分析:1日3検以上。
- iii CBC、尿酸・Ca・P:1日2検
- iv 凝固:1日1検
- v LDH、ビリルビン:1日1検
- vi 頭部エコー、心エコー:1日1検

少量シタラビン療法の結果、白血球数は減少し、シタラビン開始後4日目に20000/mcl以下となったため、シタラビンを中止した。経過中、尿量は増加し、pH の逸脱、尿酸値の増加は認めなかった(図4-b, c)。その後、骨髄抑制のため、貧血と血小板減少を認めため、約8週間濃厚赤血球、濃厚血小板の輸血を要した(図4-a)。

#### D. 考察

新生児期に発症し、日本小児血液学会の疾患登録されない TAM 症例を把握するために、2010年から新生児施設での登録事業、アンケートによる調査を行っている。今回、2006～2009年の症例を集積する目的で、後方視的調査を加えて、併せて解析を行った。

回収率は、サーベイランス参加施設で29%、非参加施設では46%であった。非参加施設の回収率は、アンケート調査開始後3年間で、回収率が徐々に増加する傾向があり、2011年に行った調査の回収率は、50%を上回った。TAM への関心の高まりが伺われると同時に、同一施設に同様の調査を毎年行ってきたことの効果と考えられた。これに対して、サーベイランス参加施設への調査では、ダウン症症例、ひいては TAM 症例・重症例の割合そのものは、非参加施設より多いことが予想されるにもかかわらず、登録数はまだ少ない。2011年では増加の傾向にあるとはいえ、まだ1/4以下であり、今後も引き続き、プロトコルの周知と患者登録の重要性を訴え、協力を呼びかけていき、症例の集積の向上を図る必要があると思われた。

今回の調査で、小児血液学会への疾患登録率は28.7%であった。今回の調査には、2009年の登録開始前の症例も含まれるため、登録数は少ないことが考えられるが、ある割合では小児血液学会の疾患登

録から漏れてしまう症例が生ずることはこれまでの検討で明らかであり、その把握のための、新生児・周産期施設への調査が重要である。

TAM 症例の急性期管理・治療および慢性期のフォローに関するプロトコルの作成が重要であることは、本研究班においては十分認識されている。今後、引き続き、①日本未熟児新生児学会稀有疾患サーベイランス事業と、②サーベイランス非参加施設へのアンケート調査を通じて、実態の把握と症例の集積に努めるとともに、各関連学会等での発表や雑誌掲載、インターネットを介した情報提供などで、TAM の管理治療指針が、広く新生児科医に提供されることが、望まれる。

ハイリスクの TAM 症例で、少量 AraC 療法の適応と判断され、少量 AraC 療法を施行した症例を経験した。当センターの血液科・腫瘍科にコンサルトし、NICU で化学療法を実施した。症例は、呼吸症状、肝機能障害と凝固異常の他、腎機能障害も合併していたが、経過中、腫瘍崩壊症候群や重篤な感染症、出血症状の悪化など大きな副作用は認められず、安全に行うことが可能であった。化学療法開始後、順調に芽球の減少を認めため、AraC 投与は3日間で終了し、その後再投与は不要であったが、抗腫瘍作用は有効であった。生後2ヶ月の時点で、再燃、白血病への進行はなく、引き続き経過観察中である。

これまでの調査から、周産期・新生児担当施設で、約半数は小児血液専門医がいるか、コンサルトできるが、残りの半数は小児血液専門医がいない施設で、TAM 症例に遭遇しうることが明らかとなっている。化学療法は、可能であれば、小児血液専門医のいる施設の NICU や小児病棟へ児を搬送し、小児血液専門医と新生児科医が協力し、行われることが望ましい。しかし、現実には、小児血液科医のいない施設で、TAM 症例特に中等症、重症例に遭遇した場合も、搬送できず、専門医への相談が不十分な環境で、新生児科医・一般小児科医だけで、化学療法に踏み切らざるを得ない場面は、起こりうると考えなければならない。そのような状況でも安全かつ効果的に管理治療が行われるためにも、推奨プロトコルの作成とその情報を広く発信し、学会誌やインターネットを介した情報提供などで、広く新生児科医、小児科医が利用できるようにする必要がある。

また、中等症・重症例を適切な施設に紹介するなどの管理のために、搬送やコンサルトできる窓口の整