

201128214A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

自己免疫性リンパ球増殖症候群(ALPS)およびその類縁疾患の
実態調査および病態病因解析に関する研究

平成23年度 **総**括・分担研究報告書

研究代表者 高木正稔

平成 24 (2012) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

自己免疫性リンパ球増殖症候群(ALPS)およびその類縁疾患の実態調査および病態病因解析に関する研究

目次

I. 班員名簿	1
II. 総括研究報告	2
自己免疫性リンパ球増殖症候群(ALPS)およびその類縁疾患の実態調査および病態病因解析に関する研究	
高木正稔（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発生発達病態学分野）	
III. 分担研究報告	
水谷修紀（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発生発達病態学分野）	11
森尾友宏（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発生発達病態学分野）	15
長澤正之（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発生発達病態学分野）	19
石井榮一（愛媛大学 大学院医学系研究科 小児医学分野）	22
金兼弘和（富山大学 附属病院小児科）	25
滝田順子（東京大学 無菌治療部・小児科）	27
笠原善仁（金沢大学医薬保健研究域 保健学系医療科学専攻病態検査学）	30
杉本昌隆（国立長寿医療研究センター 老化細胞研究プロジェクトチーム）	34
林 泰秀（群馬県立小児医療センター 血液腫瘍 院長）	37
IV. 研究成果に関する刊行の一覧表	43
V. 別刷	45

班員名簿

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
研究代表者	高 木 正 稔	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 発生発達病態学分野	講 師
研究分担者	水 谷 修 紀	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 発生発達病態学分野	教 授
	森 尾 友 宏	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 発生発達病態学分野	准 教 授
	長 澤 正 之	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 発生発達病態学分野	教 授
	石 井 榮 一	愛媛大学大学院医学系研究科 小児医学分野	教 授
	金 兼 弘 和	富山大学 附属病院小児科	講 師
	滝 田 順 子	東京大学 無菌治療部	講 師
	笠 原 善 仁	金沢大学医薬保健研究域 保健学系医療科学専 攻病態検査学	教 授
	杉 本 昌 隆	国立長寿医療研究センター 老化細胞研究プロ ジェクトチーム	プロジェク トリーダー
林 泰 秀	群馬県立小児医療センター 小児血液腫瘍	院 長	

「自己免疫性リンパ球増殖症候群(ALPS)およびその類縁疾患の実態調査および
病態病因解明に関する研究」

研究代表者 高木 正稔

(東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・発生発達病態学分野・講師)

研究要旨：自己免疫性リンパ球増殖症候群 Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) はアポトーシスの障害により肝脾腫、リンパ節腫脹などのリンパ増殖を示し自己免疫疾患を合併する症候群で FAS や FAS リガンドの異常が知られている。近年われわれは ALPS 類縁疾患として RAS 関連自己免疫性リンパ球増殖症候群様疾患 RAS associated ALPS like disease (RALD) を発見した。こういった視点から従来の ALPS の分類・診断基準ではこのような疾患が正確に反映されておらず、新たな疾患分類、診断基準の作成を行った。また同時にアンケート調査を行い本邦における現況の把握を行い、本邦において 20 例程度の ALPS が存在した数例の ALPS 類縁疾患が存在することが明らかとなった。type III の症例において CD95 遺伝子変異の体細胞変異が存在することが報告された。現在まで本邦においても ALPS type 0, type Ia 患者が同定してきたが、その中で double negative (DN) T 細胞の増加や ALPS 臨床症状が存在するにもかかわらず、CD95、CD95L、caspase-10、-8 の遺伝子異常が見いだされない type III と考えられる 6 症例が存在し、CD95 およびシグナル下流分子の caspase-8、-10 の遺伝子変異のモザイクの存在について解析が必要と考えられた。また JMML が自己免疫を合併することが明らかとなり RALD とオーバーラップした症例が存在することが明らかとなった。RAS による自己免疫発症機序を明らかにする目的で分子細胞生物学的な解析を行い RAS-MAPK 経路が活性化されているにもかかわらず、*INK4a*、*ARF* 量遺伝子プロモーター領域のメチル化は検出されず、非メチル化ゲノムのみが検出された。この原因として RAS-MAPK 経路より RAS-PI3K が優位に働いていることが想定された。この発見は ALPS 患者の治療を行っていくうえで、考える上で重要な視点を提供できたと考えられる。

水谷修紀	東京医科歯科大学	教授
森尾友宏	東京医科歯科大学	准教授
長澤正之	東京医科歯科大学	教授
石井榮一	愛媛大学	教授
金兼弘和	富山大学	講師
滝田順子	東京大学	講師
笠原善仁	金沢大学	教授
杉本昌隆	国立長寿医療研究センター プロジェクトリーダー	
林 泰秀	群馬県立小児医療センター 院長	

Autoimmune lymphoproliferative syndrome(ALPS)はアポトーシスの障害により肝脾腫、リンパ節腫脹などのリンパ増殖を示し自己免疫疾患を合併する症候群で FAS や FAS リガンドの異常が知られている。近年われわれは ALPS 類縁疾患として RAS 関連自己免疫性リンパ球増殖症候群様疾患 RAS associated ALPS like disease (RALD) を発見した(Blood 2011)。本研究においてまず本邦における ALPS および RALD を始めとした ALPS 様疾患の全容を把握し、さらに予後や治療法が全く未確定なこれら ALPS 様疾患の病態解明を行うことにより、将来的に最良の医療を提供するための基盤を構築する。

A. 研究目的

自己免疫性リンパ球増殖症候

RALD の発見により 2008 年 Teachey DT らによって提唱された分類、診断基準、2009 年米国 National Institute of Health (NIH)版の分類、診断基準は再考を迫られ、遺伝子異常を基盤とした再分類を行うことが必要となった。しかし ALPS として所見をもつが、遺伝子変異が見いだせない type III が存在すること、さらにこの type III の症例において CD95 遺伝子変異の体細胞変異が存在することが報告された。現在まで本邦においても ALPS type 0、type Ia 患者が同定してきたが、その中で double negative (DN)T 細胞の増加や ALPS 臨床症状が存在するにもかかわらず、CD95、CD95L、caspase-10、-8 の遺伝子異常が見いだされない type III と考えられる 6 症例が存在し、CD95 およびシグナル下流分子の caspase-8、-10 の遺伝子変異のモザイクの存在について解析が必要と考えられた。また RALD を始めとした ALPS 類縁疾患の病態症例は希少で本邦における現状は未知である。本邦における ALPS 類縁疾患の現状を症例報告ベースで把握する。

若年性顆粒単球性白血病は JMML 体細胞レベルでの RAS、PTPN11、NF1、c-CBL などの変異を持つ腫瘍性疾患である。自己抗体を有する JMML 症例は散見されるが、自己抗体出現の機序は明らかではない。JMML で SLE nephritis を合併した例や各種自己抗体を合併した例では、全身のリンパ節腫脹や高γグロブリン血症がみられ、リンパ球や組織球の活性化が自己抗体産生に関与したと考えられている。こういった症例の 1 例 1 例の解析が全体としての病態の把握につながるものと考えられる。

RALD、JMML は共に Ras に活性化型変異を持つ。Ras 遺伝子に活性化型変異が入ると、*INK4a/ARF* 遺伝子座の活性化により、細胞増殖は停止し、細胞老化が誘導される。しかしながらこの遺伝子座がメチル化や欠損により失活した場合、細胞は癌化する可能性が高くなることが知られている。本研究では Ras に活性化型変異を持つ RALD、JMML および正常細胞を比較し、*INK4a/ARF* 遺伝子の発現に違いが見られるか、またその原因について、細胞生物学的手法を用いて明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

・ALPS および ALPS 類縁疾患の疾患概念の確立と本邦における現状の調査

2009 年米国 National Institute of Health (NIH)版の分類、診断基準をもとに遺伝子異常を基盤とした再分類を行う。また分担研究者が連携した形での診断のためのフローチャートを作成する。またアンケート調査を全国の小児科、血液内科、リウマチ膠原病内科に送付し ALPS およびその類縁疾患の現状の把握を試みた。

・本邦における ALPS の変異解析と病態解析

臨床症状および検査所見から ALPS が疑われた症例からインフォームドコンセントを得た上で、末梢血を採取、TCRαβ⁺CD4⁻CD8⁻ double negative (DN)T 細胞比率を解析すると共に、活性化 T 細胞の作成し、抗 CD95 抗体添加による細胞死の誘導を解析した。CD95 遺伝子変異は、活性化 T 細胞あるいは EBV 不死化 B 細胞を用いて解析した。Type III 症例については末梢血から BD IMag にて DNT 細胞、CD4⁺、CD8⁺、NK、B、TCRαβ 細胞および単球、顆粒球を、骨髄からは CD34⁺、glycophorin A⁺、CD10⁺ 細胞を分離し、DNA を抽出した。また、口腔粘膜表皮細胞および骨髄由来 fibroblast を採取し、変異特異的 PCR によって変異細胞比率を半定量化した。

・本邦における ALPS 類縁疾患の変異解析と病態解析

ALPS 類縁疾患で KRAS、NRAS 遺伝子の解析を行った。また細胞系列に遺伝子変異が存在するのか検討するために、末梢血と骨髄からフローサイトメトリーを用いて各細胞分画を採取し、DNA 抽出後にシーケンス解析により変異の有無を確認した。JMML 類似の臨床症状を呈する症例の骨髄より抽出した DNA と RNA を用いた。方法は、KRAS、NRAS、PTPN11、CBL、CASPASE 10、FASL および RNA splicing pathway の中でも変異の頻度が高い U2AF35、ZRSR2、SRSF2 および SF3B1 につきサンガーシーケンスを用いて、変異解析を行った。

・RALD の分子細胞生物学的な病態の解析
1) *INK4a/ARF* 遺伝子プロモーター領域のメチル化解析

RALD(2 検体)、JMML(1 検体)細胞からゲノム DNA を抽出し、Methylation-specific PCR(MSP)によって *INK4a* および *ARF* 遺伝子プロモーターメチル化の状態を調べた。対照として、正常リンパ球から抽出したゲノム DNA を用いた。実験系のコントロールとして、両遺伝子がメチル化、および非メチル化していることが知られている U2OS、Saos2 細胞のゲノム DNA を使用した。PCR の標的とするプロモーター領域、およびプライマー配列は過去の報告を参考にした。

2) p16^{INKa}、p14^{ARF} および Ras シグナル経路タンパク質の解析

サンプルから調製したライゼートを用い、イムノブロットにより、対象となるタンパク質の検出を行った。

(倫理面への配慮)

研究は、ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成 13 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)、疫学研究に関する倫理指針(平成 14 年文部科学省・厚生労働省告示第 2 号)、臨床研究に関する倫理指針(平成 15 年厚生労働省告示第 255 号)に則って行われ、遺伝子解析研究は東京医科歯科大学医学部の設置する遺伝子解析にかかわる倫理委員会に研究の承認得て行われた。検体の解析を行う分担研究者の所属する各施設についても、各々研究計画書に基づいた申請を行い、各施設の設置する倫理委員会の承認を得て検体の収集、解析が行われた。研究への参加についてのインフォームドコンセントの取得に際しては、プライバシーの保護や安全の確保を含め被験者の人権を最大限に尊重した。

C. 研究結果

・ALPS および ALPS 類縁疾患の疾患概念の確立

ALPS および類縁疾患を 2009 年米国 National Institute of Health (NIH)版をもとに再分類した。

ALPS の分類

以前の分類名	改定した分類名	遺伝子	定義
ALPS type 0	ALPS-FAS	<i>FAS</i>	ALPS 診断基準を満たし <i>FAS</i> の生殖細胞系でのホモ接合体変異を持つもの
ALPS type Ia	ALPS-FAS	<i>FAS</i>	ALPS 診断基準を満たし <i>FAS</i> の生殖細胞系でのヘテロ接合体変異を持つもの
ALPS type Im	ALPS-sFAS	<i>FAS</i>	ALPS 診断基準を満たし <i>FAS</i> の体細胞変異を持つもの
ALPS type Ib	ALPS-FASLG	<i>FASLG</i>	ALPS 診断基準を満たし <i>FASLG</i> の生殖細胞系での変異を持つもの
ALPS type IIa	ALPS-CASP10	<i>CASP10</i>	ALPS 診断基準を満たし <i>CASP10</i> の生殖細胞系での変異を持つもの
ALPS type III	ALPS-U	不明	ALPS 診断基準を満たし <i>FAS</i> , <i>FASLG</i> , または <i>CASP10</i> の異常がなく遺伝的背景が不明のもの

ALPS 類縁疾患の分類

以前の分類名	改定した分類名	遺伝子	定義
ALPS type IIb	CEDS	<i>CASP8</i>	リンパ節腫脹または脾腫, DNT の軽度増加, 再燃性の感染症, <i>CASP8</i> の生殖細胞系での変異.
ALPS type IV	RALD	<i>KRAS</i> または <i>NRAS</i>	自己免疫の合併、リンパ節腫脹または脾腫, DNT は正常もしくは増加, <i>KRAS</i> または <i>NRAS</i> の体細胞変異
DALD	DALD	不明	自己免疫の合併、リンパ節腫脹または脾腫, DNT は正常, FAS によるアポトーシスの障害

以前の分類名	改定した分類名	遺伝子	定義
XLP1	XLP1	SH2D1A	劇症型の Epstein-Barr ウイルス感染症、低ガンマグロブリン血症またはリンパ腫.

CEDS、カスベース 8 欠損症; RALD、RAS 関連自己免疫性リンパ増殖症; DALD、Dianzani 自己免疫性リンパ増殖症; XLP1、X 染色体関連自己免疫性リンパ増殖症.

ALPS 診断基準を 2009 年米国 National Institute of Health (NIH) 版をもとに RALD の疾患概念を取り入れ日本語版を作成した。

必須要件
1. 慢性 (6 か月以上)の経過を取る非腫瘍性、非感染性のリンパ節腫脹または脾腫、もしくは両者の合併
2. 正常もしくは増多したリンパ球の中で CD3 陽性 TCR $\alpha\beta$ 陽性 CD4 陰性 CD8 陰性 2 重陰性 (DN) T 細胞の上昇 (全リンパ球中の 1.5%以上、または CD3 陽性リンパ球の 2.5%以上)
付帯的要件
基本項目
1.リンパ球のアポトーシスの障害 (2 回の独立した検索による)
2. <i>FAS</i> , <i>FASLG</i> , または <i>CASP10</i> の体細胞または生殖細胞系での変異
補助項目
1. 血清 sFASL の上昇 (>200 pg/mL) またはインターロイキン(IL)-10 (>20 pg/mL) の上昇または血清ビタミン B ₁₂ (> 1500 ng/L) の上昇またはインターロイキン (IL)-18 (> 500 pg/mL) の上昇
2. 経験に富んだ血液病理学者の診断による典型的な免疫組織学的所見
3. 自己免疫性血球減少 (溶血性貧血, 血小板減少, or 好中球減少) そして免疫グロブリン Ig G 上昇(ポリークローナルな高ガンマグロブリン血症)
4. 自己免疫の有無にかかわらず非腫瘍性・非感染性のリンパ球増殖症の家族歴
確定診断は必要要件 2 つと付帯的要件のうち基本項目 1 つ
暫定診断は必要要件 2 つと付帯的要件のうち補助項目 1 つ

・ALPS および ALPS 類縁疾患の現状の調査

アンケート調査を行い ALPS 及び ALPS 類縁疾患の現状を検討した。662 送付し 128 の回答を得た。この中から 2 次調査を行い 20 例の ALPS、ALPS 様疾患を同定した。

・本邦における ALPS の病態解析

本邦において解析可能であった ALPS 症例(表 1)は 19 例であり、全て DNT 細胞の増加を認められ、臨床症状では肝脾腫、リンパ節腫脹を大多数の認め、合併疾患は自己免疫性血球減少が最も多く(10/19 例)、腎炎、自己免疫性肝炎、血球貪食症候群も認められた。悪性疾患として Hodgkin 病が 1 例認められた。

19 例中 13 例は CD95 遺伝子変異が同定され、1 例はホモの遺伝子変異を有する type 0、残りは全てヘテロの遺伝子変異による type Ia であった。確定した遺伝子変異については、hot spot は認められないが、splice 異常が 13 例中 10 例と多数を占めた。

表 1 ALPS 症例の臨床的特徴

No	年齢(月)/性	家族歴	肝脾腫脹/リンパ節	疾患	DNT cells (%)	Type
1	8 / F	+	++/+/+	AIHA, ITP, Hodgkin	8.1	Ia
2	30 / M	+	+/+/+	ITP, Germinoma	5.6	Ia
3	0 / F	-	+/+/+/+	Hydrops fetalis	6.4	0
4	86 / F	-	-/-	ITP	9.3	Ia
5	156 / M	-	-/+/+	MPGN	30.4	Ia
6	24 / M	-	+/+/+	EBV-related	6.5	Ia
7	1 / M	-	+/+/+	AIHA, ITP	14.2	Ia
8	/ M	-	+/+/+/+/+		18.5	Ia
9	3 / M	+	+/+/+/+/+/+		17.2	Ia
10	/ F	+	-/-	ITP	6.9	Ia
11	/ M	+	-/-	ITP	15.4	Ia
12	36 / M	-	+/+/+/+		15.5	Ia
13	12 / F	-	+/+/+/+		12.2	Ia
14	9 / F	-	+/+/+/+	AIHA	5.6	III
15	156 / F	-	-/+/+	AIHA	2.4	III
16	156 / F	-	+/+	AIH	3.2	III
17	156 / M	-	/+/+/+	AN, ITP	2.0	III
18	93 / F	-	+/+/+/+	AIH	2.8	III
19	96 / M	-	+/+/+/+	HLH	2.8	III

19 例中 6 例(表 1、No14-19)では活性化 T 細胞における CD95 抗体誘導性細胞死は正常と同様であり、CD95 のみならず、caspase-10、-8 にも遺伝子変異は検出されなかった。

CD95 遺伝子変異のモザイクの存在を検討する目的で、DNT 細胞を分離し、exon 5-9 の mRNA の RT-PCR 解析したところ、症例 14 において正常長の PCR 産物に加え短い PCR 産物を認め、塩基配列解析で exon 7 が欠失していること、DNA 上検索から

intron 7 +1G→A 変異を同定した。遺伝子変異は DNT 細胞においては検出されたが、活性化 T 細胞での塩基配列解析では同定されなかった。他の 5 例においても同様の解析を加えたが、CD95 遺伝子モザイク変異は検出できなかった。

遺伝子変異モザイクの存在比率が、DNT 細胞では 100%であったが、その他の細胞においては塩基配列解析からは検出できなかったため、遺伝子変異特異的 PCR を設定し、末梢リンパ球分画および骨髄 CD34+幹細胞などにおける遺伝子変異を有する細胞比率を半定量的に求めたところ、顆粒球、単球や骨髄 glycoporphin A 細胞等では 1-2% しか存在しなかったが、DNT 細胞以外の末梢血リンパ球分画では 10%前後存在した。さらに口腔粘膜上皮細胞や繊維芽細胞においても 1%程度遺伝子変異が検出された。臨床的観点から type III と type Ia を比較検討すると、発症年齢、DNT 細胞比率、血清可能性 CD95L 濃度で有意な差を認めた。今回見出された type Im 症例のこれらの臨床的指標は type Ia のものに近い値を示した。

3 例とも DNT 細胞が 10.4、20.3、12.5% (正常値: <1.5%) と増加していた。患者から樹立した活性化 T 細胞は抗 FAS 抗体刺激培養を行ってもアポトーシスが誘導されなかった。FAS 遺伝子解析によって症例 1 は IVS8+5G>T、症例 2 および 3 は Q226X 変異を認め、3 例とも ALPS-FAS と診断した。また血清の IL-10 は症例 1 で 173、症例 3 で 296pg/mL と増加していた。

・ALPS 類縁疾患の病態解析

慢性活動性 EBV 感染症(CAEBV)としてフォローされていた 3 例を ALPS-FAS と診断した。近年 CAEBV は EBV がモノクローナルに T 細胞または NK 細胞に感染した T/NK-LPD と考えられるようになってきた。今回検討した 3 例は EBV 感染細胞の同定は行われたおらず、臨床像のみから CAEBV と診断されていた。また ALPS でも CAEBV ほどではないが、EBV 関連抗体価の異常を伴うことがあり、ALPS ならびに CAEBV の診断は臨床像のみならず、免疫学的ならびに遺伝学的検査を十分に行い、鑑別すべきと考えられた。

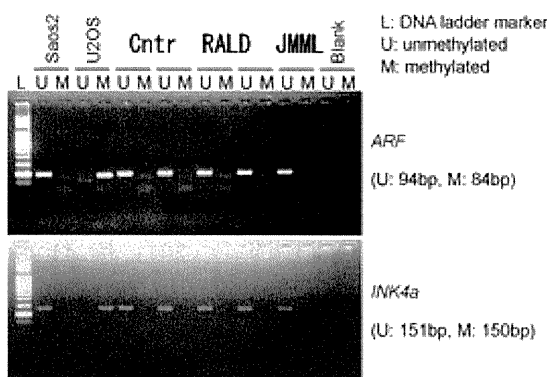
JMML 類似の造血器疾患 28 検体を用いて解析した。15 例で PTPN11 の変異を認め、5 例で KRAS、1 例で NRAS の変異を認めた。また 3 例で CBL 変異を認めた。これらの変異は全て既知のものであった。更にこれらの異常がみられない 2 例で U2AF35 R156M 変異と SRSF2 の 6 bp の in-frame 欠失を検出した。これらはいずれも成人例では報告のない新規変異であった。U2AF35 で検出された R156M は、成人 MDS でのホットスポット変異である Q157P/I 変異に隣接しており、種を超えて保存されているアミノ酸部位であった。また、SRSF2 の 6 bp の in-frame 欠失は、C 末の RS ドメインのコドン 170 と 171 の欠失をもたらすことが判明した。

自己免疫を合併する JMML 患者血液細胞系列毎に KRAS 遺伝子変異の有無を検討した。末梢血より単球、好中球に加え、B リンパ球、T リンパ球、NK 細胞および iNKT 細胞を、骨髄血より赤芽球および造血幹細胞分画と、造血幹細胞より未分化な細胞である FLK1(KDR)陽性細胞分画を分離・採取して解析を行った。その結果、単球、好中球を含む全ての分画で KRAS の G13D 変異が検出され、NK、NKT 細胞を含むリンパ球や赤芽球、さらには FLK1 陽性細胞も腫瘍クローンに含まれていることが示された。骨髄中の FLK1 陽性細胞分画では、造血細胞へコミットしていない段階の細胞と考えられる FLK1 陽性 CD45 陰性細胞も G13D 変異を有していた。これらの各細胞分画における KRAS 変異の割合(単一細胞レベルでの KRAS 変異の出現頻度)を検討したところ、JMML における主な増殖細胞である単球および好中球や赤芽球では、90%以上の細胞が KRAS の G13D 変異を有していた。未分化造血幹細胞(lineage 陰性 CD34 陽性 38 陰性細胞)や、より未分化な FLK1 陽性 CD45 陰性細胞では 2/3 程度の細胞が G13D 変異陽性であった。一方、B 細胞や NK 細胞では G13D 変異を有する細胞は 60%程度、iNKT 細胞は 40%程度、T 細胞は 25%程度に認められ、細胞分画毎に変異を有する細胞の割合にばらつきが見られた。Cycleave PCR 法では単一細胞から変異遺伝子と正常遺伝子の両者を同時に検出することが可能である。興味深いことに、

本症例では検討した全ての細胞分画で、変異アレルのみ検出され正常アレルの増幅が認められない細胞が存在した。これらは *KRAS* 遺伝子のホモ変異、もしくは正常 *KRAS* アレルの欠失と考えられる。

・ *INK4a* および *ARF* 遺伝子プロモーターのメチル化解析

細胞から抽出したゲノム DNA を用いて、*INK4a/ARF* 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態を MSP により解析した。図に示すように、RALD(2 検体)、JMML(1 検体) および正常リンパ球(2 検体)を MSP により解析したところ、全てのサンプルにおいて *INK4a*、*ARF* 量遺伝子プロモーター領域のメチル化は検出されず、非メチル化ゲノムのみが検出された。



次に、これら検体における p16^{INK4a} および p14^{ARF} の発現をイムノブロットにより調べた。全てのサンプルにおいて p14^{ARF} の発現は認められなかった。p16^{INK4a} に関しては、正常リンパ球において極めて低いレベルで発現が認められ、RALD2 検体においては正常リンパ球よりも高いレベルの発現が認められた。これに対し、JMML 検体では p16^{INK4a} は検出出来なかった。

Ras シグナルは MAPK(ERK)の活性化を介して p16^{INK4a} の発現を誘導することが知られている。そこでこれらのサンプルにおける MAPK(ERK)のリン酸化を調べた。正常リンパ球および JMML 検体では、リン酸化型 MAPK は殆ど検出されなかった。しかしながら、RALD 両検体において、顕著なリン酸化型 MAPK の増加が認められた。Ras は MAPK 以外にも PI3K 経路を介して細胞の増殖を制御することが知られている。

また近年、p16^{INK4a} の発現および細胞老化に関して、ERK と PI3K は拮抗して働くことが報告された。そこで、これらのサンプルにおける PI3K の活性を PI3K の下流因子である AKT のリン酸化により評価した。その結果、JMML においてのみ、AKT のリン酸化の亢進が認められた。

D. 考察

本邦においては 20 例前後の ALPS 患者および数例の ALPS 様疾患が存在することがあきらかとなった。またそのほとんどは ALPS-FAS であったが、日本人 ALPS type III 患者 5 名から CD95 遺伝子変異をモザイクに有する type Im の 1 例を日本で初めて同定した。また RALD を始めとした JMML の自己免疫疾患合併例も報告され、RAS 変異による ALPS 様疾患 RALD の疾患概念が確立できた一方で JMML と RALD のオーバーラップ例も少なからず存在することが明らかとなり、治療法の全く異なる 2 つの疾患に適切な治療が行えていない可能性が示唆された。

活性化型変異 Ras は *INK4a/ARF* 遺伝子の発現を誘導し、細胞老化を引き起こすことが知られている。癌細胞では、メチル化や欠失により *INK4a/ARF* 遺伝子が失活しているため、Ras が活性化しても細胞老化は誘導されず、細胞の増殖が促進される。しかしながら *INK4a/ARF* 遺伝子が失活していない細胞でも、Ras から PI3K 経路にシグナルが強く流れると、p16^{INK4a} の発現を抑制し、細胞の増殖を促すことが報告されている。RALD は Ras-MAPK 経路を介して p16^{INK4a} の発現を誘導することにより、良性腫瘍に多く見られるような細胞老化が起きている可能性が考えられ、JMML は、MAPK の活性化は認められず、PI3K 経路の亢進が確認された。p16^{INK4a} の発現解析結果を合わせ、JMML では Ras-PI3K 経路の亢進により、*INK4a* 遺伝子の発現が抑制されている可能性が考えられた。このことは ALPS の治療として米国で用いられている mTOR 阻害剤であるシロリムスの有用性を示唆する結果となった。

E. 結論

20 例前後の ALPS 患者が本邦に存在する

ことが明らかとなった。その多くは ALPS-FAS であった。自然軽快する症例も認められたが、腫瘍を発症した患者も存在した。また数例の ALPS 類縁疾患も認められた。RALD 患者のみならず JMML で RALD に近似しオーバーラップしている症例も見い出いだされた。治療法の全く異なる 2 疾患の適切な診断が必要と考えられた。

F. 健康危惧情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Honda F, Kano H, Kanegane H, Nonoyama S, Kim ES, Lee SK, Takagi M, Mizutani S, Morio T. The kinase Btk negatively regulates the production of reactive oxygen species and stimulation-induced apoptosis in human neutrophils. *Nat Immunol*. 2012 Feb. 26; 13(4): 369-78.
2. Honda F, Hane Y, Toma T, Yachie A, Kim ES, Lee SK, Takagi M, Mizutani S, Morio T. Transducible form of p47phox and p67phox compensate for defective NADPH oxidase activity in neutrophils of patients with chronic granulomatous disease. *BBRC*. 2012 Jan. 6; 417(1): 162-8.
3. 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*. 2011 117(10): 2887-90.

2. 学会発表

1. T-Cell Development Failure At beta-Selection Checkpoint and TCR alpha/delta Locus Break Formation Associated with Chromosome 14 Translocation in Ataxia-Telangiectasia Mutated Deficient Mice. Isoda T, Takagi M, Piao J, Nakagama S, Sato M, Masuda K, Ikawa T, Azuma M, Morio T, Kawamoto H, Mizutani S. the 53rd ASH(The American Society of

Hematology) Annual Meeting and Exposition (Oral). San Diego, CA. Dec. 12, 2011.

2. 遺伝性毛細血管拡張性小脳失調症の Double Negative 期における T リンパ球分化異常と発がんメカニズムの関係. 磯田健志, 高木正稔, 朴今花, 増田喬子, 伊川友活, 東みゆき, 森尾友宏, 河本宏, 水谷修紀. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会 口演. 2011 年 11 月 25 日 群馬
3. RAS 関連自己免疫性リンパ増殖性疾 (RALD). 高木正稔. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会. 2011 年 11 月 25-27 日 前橋
4. 毛細血管拡張性運動失調症の女兒に発症した diffuse large B-cell lymphoma にたいする rituximab 併用化学療法の経験. 町田静香, 富澤大輔, 高木正稔, 金子節子, 金親あや乃, 原田浩之, 大川哲平, 遠藤明史, 梶原道子, 長澤正之, 森尾友宏, 水谷修紀. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会. 2011 年 11 月 25-27 日 前橋
5. 白血病キメラ遺伝子の迅速スクリーニングを可能とする新規検査手法の評価について. 高木正稔, 佐藤正樹, 阿部友照, 渡辺英俊, 穴口嵩記, 瀬川雄司, 安田章夫, 水谷修紀. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会. 2011 年 11 月 25-27 日 前橋
6. 当施設での小児移植前処置における経口・静注ブスルフェンの PK/PD の後方視的比較検討. 遠藤明史, 大川哲平, 満生紀子, 青木由貴, 小野敏明, 磯田健志, 富澤大輔, 高木正稔, 長澤正之, 森尾友宏, 水谷修紀, 梶原道子, 石渡康芳, 安原真人. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会. 2011 年 11 月 25-27 日 前橋
7. 造血幹細胞移植患者赤血球の細胞誘電および膜蛋白の解析. 長澤正之, 宮武浩子, 高木正稔, 森尾友宏, 水谷修紀,

- 早川智広, 林義人, 勝本洋一, 大森慎二. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会. 2011 年 11 月 25-27 日 前橋
8. Li-Fraumeni 様症候群より同定されたスプライス変異 p53 の機能解析. 高木正稔, 櫻井直人, 朴今夏, 中谷中, 西岡淳二, 岩本彰太郎, 駒田美弘, 水谷修紀. 第 56 回日本人類遺伝学会・第 11 回東アジア人類遺伝学会 共同大会. 2011 年 11 月 9-12 日 幕張
 9. ATM 欠損 T 細胞分化における T 細胞受容体遺伝子転座をもつ白血病リンパ腫の発症機構. 磯田健志, 高木正稔, 河本宏, 水谷修紀. 平成 23 年度第 2 回 JPLSG 全体会議・合同班会議 口演. 2011 年 11 月 4 日 名古屋
 10. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond Blackfan anemia. Kuramitsu M, Matsubara A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, Wang RN, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Masumi A, Momose H, Mizukami T, Takizawa K, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I. 第 73 回日本血液学会学術集会. 2011 年 10 月 14-16 日 名古屋
 11. DNA damage checkpoint prevent blastic crisis in CML. Sato M, Takagi M, Piao J, Honda H, Yasuda A, Mizutani S. 第 73 回日本血液学会学術集会. 2011 年 10 月 14-16 日 名古屋
 12. T-cell development failure in Ataxia telangiectasia (AT). Isoda T, Takagi M, Piao J, Masuda K, Ikawa T, Azuma M, Morio T, Kawamoto H, Mizutani S. 第 73 回日本血液学会学術集会. 2011 年 10 月 16 日 名古屋
 13. Microfluidic RT-LAMP system for the rapid detection of fusion gene transcripts in human leukemia. Takagi M, Sato M, Abe T, Watanabe H, Anaguchi T, Segawa Y, Yasuda A, Mizutani S. 第 73 回日本血液学会学術集会. 2011 年 10 月 14-16 日 名古屋
 14. Analysis of dielectricity and membrane proteins of erythrocytes in patient having allogenic SCT. Nagasawa M, Miyatake H, Hayakawa T, Hayashi Y, Katsumoto Y, Takagi M, Morio T, Ohmori S, Mizutani S. 第 73 回日本血液学会学術集会. 2011 年 10 月 14-16 日 名古屋
 15. Retrospective PK/PD analysis of oral and intravenous busulfan in pediatric patient having SCT. Nagasawa M, Okawa T, Endo A, Mitsuiki N, Aoki Y, Ono T, Isoda T, Tomizawa D, Takagi M, Morio T, Mizutani S, Kajiwara M, Ishiwata Y, Yasuhara M. 第 73 回日本血液学会学術集会. 2011 年 10 月 14-16 日 名古屋
 16. ATM prevent blastic crisis in chronic myeloid leukemia (CML). Takagi M, Mizutani S. 第 70 回日本癌学会学術総会. 2011 年 10 月 3-5 日 名古屋
 17. 9 ヶ月よりの不明熱、溶血性貧血、若年性特発性関節炎の経過後、炎症性腸疾患、壊疽性膿皮症に移行した症例. 大川哲平, 本田富美子, 峯岸志津子, 高木正稔, 今井耕輔, 森尾友宏, 南木敏宏, 窪田哲朗, 長堀正和. 第 2 回関東甲越免疫不全症研究会. 2011 年 9 月 22 日 東京
 18. 毛細血管拡張性小脳失調症 (Ataxia Telangiectasia) における T 細胞分化異常の解析. 磯田健志, 高木正稔, 森尾友宏, 水谷修紀. 第 39 回日本臨床免疫学会総会 MWS ワークショップ 口演. 2011 年 9 月 15 日 新宿
 19. RAS associated ALPS like disease (RALD) の提唱. 高木正稔, 朴今花, 満生紀子, 長澤正之, 森尾友宏, 松田和之, 小池健一, 笠原善仁, 村松秀城, 土居崎小夜子, 小島勢二, 水谷修紀. 第 114 回日本小児科学会学術集会. 2011 年 8 月 13 日 東京
 20. 母体の血液腫瘍は妊娠中の胎児に転移し発症しうる. 磯田健志, 満生紀子, 富澤大輔, 落合央, 高木正稔, 長澤正之, 森尾友宏, 滝智彦, 佐治博夫, 水谷修紀. 第 114 回日本小児科学会学術集会. 2011 年 8 月 13 日 東京

H. 知的所有権の取得状況

(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. 分担研究報告

「自己免疫性リンパ球増殖症候群(ALPS)およびその類縁疾患の実態調査および
病態病因解明に関する研究」

研究分担者 水谷 修紀

(東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・発生発達病態学分野・教授)

研究要旨：自己免疫性リンパ球増殖症候群 ALPS 類縁疾患である RAS 関連自己免疫性リンパ球増殖症候群様疾患(RALD)はその病態、症状に不明な点が多く若年性顆粒単球性白血病(JMML)との差異が問題となっている。一方で RAS 変異を有する JMML の一部は自然完解することが知られている。これら視点から自然完解した JMML 症例を再検討した。JMML は完解していたものの、これら症例は依然として RAS の変異が残存し、また自己免疫症状を呈しており、RALD に近い病態と考えられた。

A. 研究目的

自己免疫性リンパ球増殖症候群 Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS)はアポトーシスの障害により肝脾腫、リンパ節腫脹などのリンパ増殖を示し自己免疫疾患を合併する症候群で FAS や FAS リガンドの異常が知られている。一方で我々の同定した RAS 関連自己免疫性リンパ球増殖症候群様疾患(RALD)も臨床症状は ALPS と近似し、症状、一般検査所見からは両者を区別することは難しい。若年性顆粒単球性白血病(JMML)は RAS-MAPK 経路の異常を基調とする疾患で RALD と同様に RAS 変異に基づいて発症する疾患である。その一部は自己免疫症状を伴いこういった観点からは RALD に近い症例も存在する。しかし国際的な診断基準からは末梢血単球数増加が必須で、これは RALD には観察されない。一般的に JMML は予後不良の疾患で救命には造血幹細胞移植が必須とされている。しかし軽微な化学療法、分化誘導療法や経過観察のみで寛解した症例も報告があり、RALD と自己免疫症状を伴う JMML と RALD の差異は明らかでない。自然寛解した JMML を中心に症例を集積し RALD との差異を明らかにする。

B. 研究方法

JMML 診断中核施設より患者診療施設、

担当医情報を入手し、担当医に造血幹細胞移植なしで生存している JMML 患者の有無を質問する。造血幹細胞移植なしで生存している JMML がいたら、主治医より患者、または、及び代諾者に RAS 変異のある腫瘍細胞の残存病変検索の可否を訪ね、承諾の得られたケースについて変異細胞の有無を検索する。また免疫グロブリン値、肝脾腫の有無の臨床情報を入手する。

(倫理面への配慮)

RAS 変異のある腫瘍細胞の残存病変の有無の検索は連結不可能匿名化で行われた。遺伝子解析にあたっては、三省合同のゲノム指針に則り、患者又は両親から同意を得、当センターの倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

6名の造血幹細胞移植なしで生存している JMML 患者が同定された。このうち4名で高ガンマグロブリン血症が認められ、全例で何らかの自己抗体が陽性であった。2例では ALPS/RALD と類似の臨床所見を示し、またこのうち1例は SLE 様の症状を呈していた。

6症例全てで RAS 変異をもつ血液細胞が残存し、変異は T リンパ球、B リンパ球、骨髄単球すべての血球系細胞に認められた。

これら細胞は TCR 受容体の解析から polyclonal であることが明らかとなった。また RALD の分子生物学的特徴とされる Bim 蛋白質の発現量低下が見られた。

D. 考察

JMML は予後不良の血液腫瘍性疾患で、造血幹細胞移植が唯一の治療法とされる。しかしながら造血幹細胞移植なしで生存している症例も存在し、その多くが RAS 変異を抱えたままであり何らかの免疫異常を呈することが明らかとなった。症状的に ALPS/RALD に非常に近い症例も存在し、RALD と JMML の差が非常にあいまいであることが明らかとなった。しかし JMML は基本的に予後不良疾患であり骨髄移植が唯一の治療法とされる。一方 RALD は長期的予後は明らかとなっていないが、免疫抑制剤の使用である程度の間症状の緩和が得られる可能性が示唆され、自然寛解もきたいされ、骨髄移植の適応は慎重に検討する必要があると考える。

E. 結論

RAS 変異のある JMML のうち自然寛解を示す一群があることが明らかとなった。またこのうちの一部は自己免疫症状を呈していた。こういった症例は診断当初 JMML の診断基準を満たしてはいたが、より RALD に近い病態と考えられた。RAS 変異のある JMML に対し治療法の選択を考える上で慎重にあるべきと考えられた。

F. 健康危惧情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Honda F, Kano H, Kanegane H, Nonoyama S, Kim ES, Lee SK, Takagi M, Mizutani S, Morio T. The kinase Btk negatively regulates the production of reactive oxygen species and stimulation-induced apoptosis in human neutrophils. *Nat Immunol*. Feb. 26, 2012. 13(4): 369-78. doi: 10.1038/ni.2234.
2. Sato R, Iizumi S, Kim ES, Honda F, Lee SK, Adachi N, Koyama H, Mizutani S,

Morio T. Impaired cell adhesion, apoptosis, and signaling in WASP gene-disrupted Nalm-6 pre-B cells and recovery of cell adhesion using a transducible form of WASp. *Int J Hematol*. Mar. 2012. 95(3): 299-310. Epub Feb. 5, 2012

3. Honda F, Hane Y, Toma T, Yachie A, Kim ES, Lee SK, Takagi M, Mizutani S, Morio T. Transducible form of p47phox and p67phox compensate for defective NADPH oxidase activity in neutrophils of patients with chronic granulomatous disease. *BBRC*. Jan. 6, 2012. 417(1): 162-8.
 4. Nakamura K, Du L, Tunuguntla R, Fike F, Cavalieri S, Morio T, Mizutani S, Brusco A, Gatti RA. Functional characterization and targeted correction of ATM mutations identified in Japanese patients with ataxia-telangiectasia. *Hum Mutat*. 2012. 33(1): 198-208.
 5. 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*. 2011. 117(10): 2887-90
 6. Atsumi Y, Fujimori H, Fukuda H, Inase A, Shinohe K, Yoshioka Y, Shikanai M, Ichijima Y, Unno J, Mizutani S, Tsuchiya N, Hippo Y, Nakagama H, Masutani M, Teraoka H, Yoshioka K. Onset of quiescence following p53 mediated down-regulation of H2AX in normal cells. *PLoS One*. 2011. 6(8): e23432.
 7. Nishiyama M, Doi S, Matsumoto A, Nishioka M, Hosokawa S, Sasaki A, Mizutani S. Exercise-induced myocardial ischemia in a case of anomalous origin of the left main coronary artery from the noncoronary sinus of valsalva. *Pediatr Cardiol*. 2011. 32(7): 1028-31.
- ##### 2. 学会発表
1. T-Cell Development Failure At beta-Selection Checkpoint and TCR alpha/delta Locus Break Formation

- Associated with Chromosome 14 Translocation in Ataxia-Telangiectasia Mutated Deficient Mice. Isoda T, Takagi M, Piao J, Nakagama S, Sato M, Masuda K, Ikawa T, Azuma M, Morio T, Kawamoto H, Mizutani S. the 53rd ASH(The American Society of Hematology) Annual Meeting and Exposition (Oral). San Diego, CA. Dec. 12, 2011.
2. 遺伝性毛細血管拡張性小脳失調症の Double Negative 期における T リンパ球分化異常と発がんメカニズムの関係. 磯田健志, 高木正稔, 朴今花, 増田喬子, 伊川友活, 東みゆき, 森尾友宏, 河本宏, 水谷修紀. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会 口演. 2011 年 11 月 25 日 群馬
 3. 毛細血管拡張性運動失調症の女兒に発症した diffuse large B-cell lymphoma にたいする rituximab 併用化学療法 of 経験. 町田静香, 富澤大輔, 高木正稔, 金子節子, 金親あや乃, 原田浩之, 大川哲平, 遠藤明史, 梶原道子, 長澤正之, 森尾友宏, 水谷修紀. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会. 2011 年 11 月 25-27 日 前橋
 4. 白血病キメラ遺伝子の迅速スクリーニングを可能とする新規検査手法の評価について. 高木正稔, 佐藤正樹, 阿部友照, 渡辺英俊, 穴口嵩記, 瀬川雄司, 安田章夫, 水谷修紀. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会. 2011 年 11 月 25-27 日 前橋
 5. 当施設での小児移植前処置における経口・静注ブスルファンの PK/PD の後方視的比較検討. 遠藤明史, 大川哲平, 満生紀子, 青木由貴, 小野敏明, 磯田健志, 富澤大輔, 高木正稔, 長澤正之, 森尾友宏, 水谷修紀, 梶原道子, 石渡康芳, 安原真人. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会. 2011 年 11 月 25-27 日 前橋
 6. 造血幹細胞移植患者赤血球の細胞誘電および膜蛋白の解析. 長澤正之, 宮武浩子, 高木正稔, 森尾友宏, 水谷修紀, 早川智広, 林義人, 勝本洋一, 大森慎二. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会. 2011 年 11 月 25-27 日 前橋
 7. Li-Fraumeni 様症候群より同定されたスプライス変異 p53 の機能解析. 高木正稔, 櫻井直人, 朴今夏, 中谷中, 西岡淳二, 岩本彰太郎, 駒田美弘, 水谷修紀. 第 56 回日本人類遺伝学会・第 11 回東アジア人類遺伝学会 共同大会. 2011 年 11 月 9-12 日 幕張
 8. ATM 欠損 T 細胞分化における T 細胞受容体遺伝子転座をもつ白血病リンパ腫の発症機構. 磯田健志, 高木正稔, 河本宏, 水谷修紀. 平成 23 年度第 2 回 JPLSG 全体会議・合同班会議 口演. 2011 年 11 月 4 日 名古屋
 9. DNA damage checkpoint prevent blastic crisis in CML. Sato M, Takagi M, Piao J, Honda H, Yasuda A, Mizutani S. 第 73 回日本血液学会学術集会. 2011 年 10 月 14-16 日 名古屋
 10. T-cell development failure in Ataxia telangiectasia (AT). Isoda T, Takagi M, Piao J, Masuda K, Ikawa T, Azuma M, Morio T, Kawamoto H, Mizutani S. 第 73 回日本血液学会学術集会. 2011 年 10 月 16 日 名古屋
 11. Microfluidic RT-LAMP system for the rapid detection of fusion gene transcripts in human leukemia. Takagi M, Sato M, Abe T, Watanabe H, Anaguchi T, Segawa Y, Yasuda A, Mizutani S. 第 73 回日本血液学会学術集会. 2011 年 10 月 14-16 日 名古屋
 12. Analysis of dielectricity and membrane proteins of erythrocytes in patient having allogenic SCT. Nagasawa M, Miyatake H, Hayakawa T, Hayashi Y, Katsumoto Y, Takagi M, Morio T, Ohmori S, Mizutani S. 第 73 回日本血液学会学術集会. 2011 年 10 月 14-16 日 名古屋
 13. Retrospective PK/PD analysis of oral and intravenous busulfan in pediatric patient

having SCT. Nagasawa M, Okawa T, Endo A, Mitsui N, Aoki Y, Ono T, Isoda T, Tomizawa D, Takagi M, Morio T, Mizutani S, Kajiwara M, Ishiwata Y, Yasuhara M. 第73回日本血液学会学術集会. 2011年10月14-16日 名古屋

14. ATM prevent blastic crisis in chronic myeloid leukemia (CML). Takagi M, Mizutani S. 第70回日本癌学会学術総会. 2011年10月3-5日 名古屋
15. 毛細血管拡張性小脳失調症 (Ataxia Telangiectasia)における T 細胞分化異常の解析. 磯田健志, 高木正稔, 森尾友宏, 水谷修紀. 第39回日本臨床免疫学会総会 MWS ワークショップ 口演. 2011年9月15日 新宿
16. RAS associated ALPS like disease (RALD) の提唱. 高木正稔, 朴今花, 満生紀子, 長澤正之, 森尾友宏, 松田和之, 小池健一, 笠原善仁, 村松秀城, 土居崎小夜子, 小島勢二, 水谷修紀. 第114回日本小児科学会学術集会. 2011年8月13日 東京
17. 母体の血液腫瘍は妊娠中の胎児に転移し発症しうる. 磯田健志, 満生紀子, 富澤大輔, 落合央, 高木正稔, 長澤正之, 森尾友宏, 滝智彦, 佐治博夫, 水谷修紀. 第114回日本小児科学会学術集会. 2011年8月13日 東京

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

「自己免疫性リンパ球増殖症候群(ALPS)およびその類縁疾患の実態調査および
病態病因解明に関する研究」

研究分担者 森尾 友宏

(東京医科歯科大学院医歯学総合研究科・発生発達病態学分野・准教授)

研究要旨：自己免疫性リンパ増殖症疾患 ALPS 類縁疾患 RALD が同定され、その疾患概念が確立しつつあるが、その治療法については全く未知であり、プレドニゾロン、シクロスポリン A、ミコフェノール酸モフェチルを用いて治療を行った。プレドニゾロンの有効性は臨床的に明らかであったが、またミコフェノール酸モフェチルの有効性が示唆された。今後、治療法の標準化に向けた、症例、治療経験の蓄積が必要と考えられた。

A. 研究目的

自己免疫性リンパ増殖症疾患 ALPS 類縁疾患 RALD が同定され、その疾患概念が確立しつつあるが、その治療法については全く未知であり、ALPS の治療方針に元準じて治療が行われているのが現状である。我々の経験した 2 症例の RALD の臨床経過を検討し、その治療法を模索する。

B. 研究方法

症例 1；2 歳および症例 2；19 歳例、自己免疫性リンパ増殖症疾患 ALPS 様症状を呈し、KRAS および NRAS の変異が同定された。自己免疫症状に対しステロイドを中心とした、免疫抑制剤の治療を行い、その有用性を検討した。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析にあたっては、三省合同のゲノム指針に則り、患者又は両親から同意を得、当センターの倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

症例 1 は重度の自己免疫性血小板減少症、自己免疫性溶血性貧血、高ガンマグロブリン血症を呈していた。プレドニゾロン 2mg/kg の投与で自己免疫性血小板減少症、自己免疫性溶血性貧血は改善し、プレドニゾロンの減量を行った。しかしながらプレ

ドニゾロン減量に伴い自己免疫性血小板減少症のコントロールは不良となり、一時低下していたガンマグロブリン値の再上昇が認められた。そこでシクロスポリン A の投与をプレドニゾロンと併用で行った。しかしシクロスポリン A に対する反応は不良で、プレドニゾロンの増量を余儀なくされた。しかし高容量でのプレドニゾロンの長期投与による副作用出現が懸念されたためミコフェノール酸モフェチルの投与をおこないつつ、プレドニゾロンの減量を行い、現在ミコフェノール酸モフェチル 33mg/kg プレドニゾロン 0.3mg/kg で自己免疫症状の緩和を得て、経過を観察している。

症例 2 は汎血球減少があり、本年度は経過フォロー中に原因不明の心膜炎→心不全や過労を契機とした筋炎を呈した。また最近の骨髄検査では、過形成性骨髄で、3 系統に異形性を認め、骨髄上は MDS-RCMD と判断した。免疫抑制薬による介入時期と考えていたが、骨髄所見からは今後根治的治療である造血細胞移植に踏み切るかを判断する時期である。

D. 考察

RALD は ALPS と同様にプレドニゾロンにより症状の緩和が見られることが明らかとなった。しかし Takagi らの報告からは、プレドニゾロン反応不良で、呼吸器症状の悪化から造血幹細胞移植が行われた症例も

報告されており、症例ごとの注意深い経過観察が必要と考えられた。また RALD は ALPS と同様にプレドニゾロンにより症状の緩和が見られることが比較的高用量での投与が余儀なくされ、長期投与に伴う副作用が問題となることが予想された。RAS 経路の活性化は calcium/calcineurin シグナルを活性化させ、NFAT を介した IL2 産生を促すことからシクロスポリン A の有効性が予測され、今回は 2 次選択としてシクロスポリン A が用いられたが、反応は不良であった。そこで細胞内プリン代謝 de novo 系律速酵素であるイノシンモノホスフェイト合成酵素 Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) を可逆的かつ特異的に阻害し、グアニンヌクレオシドプールを枯渇させ、DNA 合成を阻害することに効果を発揮するミコフェノール酸モフェチルを用いたところ、比較的、反応性が良く、プレドニゾロンの減量が行えた。これは RAS 経路の活性化には GDP 結合型 RAS がグアニンヌクレオチドエクチェンジファクター guanine-nucleotide exchange factors (GFE) によって GTP 結合型 RAS となることが必要である。ミコフェノール酸モフェチルによりこれにはこの活性化に必要なグアニンが枯渇すれば、結果的に RAS 経路が阻害される可能性がある。このような観点から臨床的にはミコフェノール酸モフェチルが効果を発揮した可能性が考えられた。今後、分子生物学的な解析を通して RAS 経路におけるミコフェノール酸モフェチルの作用機序について検討を加えていく必要があると考える。また RAS の細胞膜への移行と prenylation 化を阻害する bisphosphonate である zoledronic acid などその効果を検討する必要があると考えられる。

E. 結論

RALD の治療法としてステロイドを含めた免疫抑制剤が臨床症状の緩和に有用であることが明らかとなった。また MMF の有用性が臨床的に、またその薬理学的効果からも示唆された。

F. 健康危惧情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表
 1. Honda F, Kano H, Kanegane H, Nonoyama S, Kim ES, Lee SK, Takagi M, Mizutani S, Morio T. The kinase Btk negatively regulates the production of reactive oxygen species and stimulation-induced apoptosis in human neutrophils. *Nat Immunol.* 2012 Feb. 26; 13(4): 369-78.
 2. Sato R, Iizumi S, Kim ES, Honda F, Lee SK, Adachi N, Koyama H, Mizutani S, Morio T. Impaired cell adhesion, apoptosis, and signaling in WASP gene-disrupted Nalm-6 pre-B cells and recovery of cell adhesion using a transducible form of WASP. *Int J Hematol.* 2012 Mar; 95(3): 299-310.
 3. Honda F, Hane Y, Toma T, Yachie A, Kim ES, Lee SK, Takagi M, Mizutani S, Morio T. Transducible form of p47phox and p67phox compensate for defective NADPH oxidase activity in neutrophils of patients with chronic granulomatous disease. *BBRC.* 2012 Jan. 6; 417(1): 162-8.
 4. Nakamura K, Du L, Tunuguntla R, Fike F, Cavalieri S, Morio T, Mizutani S, Brusco A, Gatti RA. Functional characterization and targeted correction of ATM mutations identified in Japanese patients with ataxia-telangiectasia. *Hum Mutat.* 2012. 33(1): 198-208.
 5. 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.* 2011. 117(10): 2887-90.
 6. Ishimura M, Takada H, Doi T, Imai K, Sasahara Y, Kanegane H, Nishikomori R, Morio T, Heike T, Kobayashi M, Ariga T, Tsuchiya S, Nonoyama S, Miyawaki T, Hara T. Nationwide survey of patients with primary immunodeficiency diseases in Japan. *J Clin Immunol.* Dec. 2011. 31(6): 968-76.

7. Kato K, Kojima Y, Kobayashi C, Mitsui K, Nakajima, Yamaguchi R, Kudo K, Yanai T, Yoshimi A, Nakao T, Morio T, Kasahara M, Koike K, Tsuchida M. Successful allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic granulomatous disease with inflammatory complications and severe infection. *Int J Hematol.* 2011 Nov; 94(5): 479-82.
 8. Lee SW, Kim JH, Park MC, Park YB, Chae WJ, Morio T, Lee DH, Yang SH, Lee SK, Lee SK, Lee SK. Alleviation of rheumatoid arthritis by cell-transducible methotrexate upon transcutaneous delivery. *Biomaterials.* 2012 Feb; 33(5): 1563-72.
 9. Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakazawa A, Kawano F, Ichikawa S, Shimizu N, Yamamoto N, Morio T, Ohga S, Nakamura H, Ito M, Miura O, Komano J, Fujiwara S. Novel mouse xenograft models reveal a critical role of CD4+ T cells in the proliferation of EBV-infected T and NK cells. *PLoS Pathog.* 2011 Oct; 7(10): e1002326.
 10. Nakajima K, Hayashi M, Tanuma N, Morio T. An autopsy case of poly-microgyria and intracerebral calcification with death by intracerebral hemorrhage. *Neuropathology.* 2012 Apr; 32(2): 207-10.
 11. Morio T, Atsuta Y, Tomizawa D, Nagamura-Inoue T, Kato K, Ariga T, Kawa K, Koike K, Tauchi H, Kajiwara M, Hara T, Kato S. Outcome of unrelated umbilical cord blood transplantation in 88 patients with primary immunodeficiency in Japan. Japanese Cord Blood Bank Network. *Br J Haematol.* 2011. 154(3): 363-72.
 12. 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(2):172-7.
2. 学会発表
 1. T-Cell Development Failure At beta-Selection Checkpoint and TCR alpha/delta Locus Break Formation Associated with Chromosome 14 Translocation in Ataxia-Telangiectasia Mutated Deficient Mice. Isoda T, Takagi M, Piao J, Nakagama S, Sato M, Masuda K, Ikawa T, Azuma M, Morio T, Kawamoto H, Mizutani S. the 53rd ASH(The American Society of Hematology) Annual Meeting and Exposition (Oral). San Diego. CA. Dec. 12, 2011
 2. 遺伝性毛細血管拡張性小脳失調症の Double Negative 期における T リンパ球分化異常と発がんメカニズムの関係. 磯田健志, 高木正稔, 朴今花, 増田喬子, 伊川友活, 東みゆき, 森尾友宏, 河本宏, 水谷修紀. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会 口演. 2011 年 11 月 25 日 群馬
 3. 毛細血管拡張性運動失調症の女兒に発症した diffuse large B-cell lymphoma にたいする rituximab 併用化学療法の実験. 町田静香, 富澤大輔, 高木正稔, 金子節子, 金親あや乃, 原田浩之, 大川哲平, 遠藤明史, 梶原道子, 長澤正之, 森尾友宏, 水谷修紀. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会. 2011 年 11 月 25-27 日 前橋
 4. 当施設での小児移植前処置における経口・静注ブスルフェンの PK/PD の後方視的比較検討. 遠藤明史, 大川哲平, 満生紀子, 青木由貴, 小野敏明, 磯田健志, 富澤大輔, 高木正稔, 長澤正之, 森尾友宏, 水谷修紀, 梶原道子, 石渡康芳, 安原真人. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会. 2011 年 11 月 25-27 日 前橋
 5. 造血幹細胞移植患者赤血球の細胞誘電および膜蛋白の解析. 長澤正之, 宮武浩子, 高木正稔, 森尾友宏, 水谷修紀, 早川智広, 林義人, 勝本洋一, 大森慎二. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会. 2011 年 11 月 25-27 日 前橋