

6. 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
  7. T-cell development failure in Ataxia Telangiectasia (AT). Isoda T, Takagi T, 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 口演. 2011 年 10 月 16 日 名古屋
  8. 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
  9. Retrospective PK/PD analysis of oral and intravenous busulfan in pediatric patient having SCT. Nagasawa M, Okawa T, Endo A, Mitsuki 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
  10. 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
  11. 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
  12. 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
  13. 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

「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 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)

研究要旨：自己免疫性リンパ球増殖症候群(Autoimmune lymphoproliferative syndrome : ALPS) は、リンパ球のアポトーシスの異常が原因で発症し様々な自己免疫の病態を呈する。細胞のアポトーシス経路に関わる FAS および FAS リガンド異常による ALPS-FAS や ALPS-FASLG (Type I)、Caspase 10 異常による ALPS-CASP10 (Type II) などに分類される。またその類縁疾患として、RALD (RAS associated ALPS like disease) や CEDS (Caspase 8 deficiency state) がある。しかし、RAS の変異がどのようにリンパ球機能に影響を与え自己免疫疾患が発症するかは解明されていない。そこで GFP 遺伝子に直列的に配置された Internal ribosome entry sequence (IRES) の下流に  $KRAS^{G13D}$  を導入したベクターを作製し、マウス ES 細胞に導入し、 $KRAS^{G13D}$  を発現する ES 細胞を取得した。

A. 研究目的

自己免疫性リンパ球増殖症候群 (Autoimmune lymphoproliferative syndrome : ALPS) は、リンパ球のアポトーシスの異常が原因で発症し様々な自己免疫の病態を呈する。細胞のアポトーシス経路に関わる FAS および FAS リガンド異常による ALPS-FAS や ALPS-FASLG (Type I)、Caspase 10 異常による ALPS-CASP10 (Type II) などに分類される。またその類縁疾患として、RALD (RAS associated ALPS like disease) や CEDS (Caspase 8 deficiency state) がある。しかし、RALD の原因となる RAS の変異がどのようにリンパ球機能に影響を与え、自己免疫疾患が発症するかは解明されていない。そこで ES 細胞に RAS 遺伝子を組み込みリンパ球分化を検討することにより、その病態の解明を試みた。

B. 研究方法

GFP 遺伝子に直列的に配置された Internal ribosome entry sequence (IRES) の下流に  $KRAS^{G13D}$  を導入したベクターを作製し、マウス ES 細胞に導入し、 $KRAS^{G13D}$  を発現する ES 細胞を樹立し、OP9 および OP9-DLL1 フィーダー細胞上で IL7 および Flt3 リガ

ンドを添加し T 細胞、および B 細胞への分化誘導を試みた。

(倫理面への配慮)

組み換え DNA 実験は東京医科歯科大学 組み換え DNA 実験委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果

$KRAS^{G13D}$  が過剰発現にならないよう、より生理的に  $KRAS^{G13D}$  アレルからの発現を得るために GFP 遺伝子に直列的に配置された Internal ribosome entry sequence (IRES) の下流に  $KRAS^{G13D}$  を導入した pMSCV-GFP-IRES- $KRAS^{G13D}$  を作製した。これにより GFP は遺伝子導入細胞のマーカーとして使用できる。293T 細胞に pMSCV-GFP-IRES- $KRAS^{G13D}$  を導入し、作成したベクターが機能することを Western Blotting 法で  $KRAS^{G13D}$  の発現を確認した。293T 細胞にパッケージングプラスミドとともに pMSCV-GFP-IRES- $KRAS^{G13D}$  を導入し、レトロウイルスを作成し、マウス ES 細胞に感染させた。ソーティングおよびピックアップにて選別したマウス ES 細胞から、RNA を抽出し、cDNA 合成後、GFP 遺伝子の

RT-PCR で *KRAS*<sup>G13D</sup> が導入されたことを確認した。また未分化の状態が発現している遺伝子 Nanog および Oct3/4 の発現を RT-PCR で確認した。また、alkaline phosphatase 染色を行うことによっても未分化性を確認した。取得した *KRAS*<sup>G13D</sup> を発現する ES 細胞に分化誘導を行い、フローサイトメトリーにより解析を行ったが、分化の差を観察することができなかった。

#### D. 考察

RALD 発症機構の解明の足がかりとなる、*KRAS*<sup>G13D</sup> を発現するマウス ES 細胞が作製できた。

今後、作製したマウス ES 細胞を用いてリンパ球分化を検討する必要がある。この細胞は T 細胞系の分化誘導で DN 段階の分化の差が期待できる。また、RALD では制御性 T 細胞 (Treg) の減少が見られることから、Treg の分化過程での変化も調べる必要がある。

さらに、合わせて *KRAS*<sup>G13D</sup> によるリンパ球分化過程におけるアポトーシスの影響を調べるため、アポトーシス経路を解析していく。

#### E. 結論

RAS を発現するマウス ES 細胞を樹立した。本細胞を用いて、RAS によるリンパ球分化、免疫に与える影響を検討できると考える。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Shiba N, Taki T, Park MJ, Nagasawa M, Kanazawa T, Takita J, Ohnishi H, Sotomatsu M, Arakawa H, Hayashi Y. CBL mutation in childhood therapy-related leukemia. *Leukemia*. 2011. 25(8): 1356-8
2. 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. Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. *Haematologica*. 2011. 96(6): 814-9.

3. Saito M, Nagasawa M, Takada H, Hara T, Tsuchiya S, Agematsu K, Yamada M, Kawamura N, Ariga T, Tsuge I, Nonoyama S, Karasuyama H, Minegishi Y. Defective IL-10 signaling in hyper-IgE syndrome results in impaired generation of tolerogenic dendritic cells and induced regulatory T cells. *J Exp Med*. 2011. 208(2): 235-49.
  4. 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. 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
  2. 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
  3. 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

4. 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
5. 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
6. 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
7. 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

「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 石井 榮一

(愛媛大学院医学系研究科・小児医学分野・教授)

研究要旨：若年性骨髄単球性白血病(JMML)は造血幹細胞の異常と考えられており、約20%の症例に *KRAS* 遺伝子変異が認められる。我々は *KRAS* の G13D 変異を有し、複数の自己抗体を認めた JMML の症例を経験した。*KRAS* の G13D 変異は、腫瘍細胞である単球に加えて、好中球、赤芽球や骨髄中の未分化造血幹細胞、FLK1 陽性細胞にも認められた。さらに B、T、NK および NKT の各リンパ球分画も G13D 変異が陽性であった。単一細胞レベルでの解析では、*KRAS* の正常アレルを欠失し、変異型の *KRAS* のみを有する細胞が解析した全ての細胞分画で認められた。今後 *KRAS* 変異を有するリンパ球と自己抗体産生との関連性や、*KRAS* 正常アレルの腫瘍化に及ぼす影響について解析を継続する予定である。

A. 研究目的

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 $\gamma$ グロブリン血症がみられ、B 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。

また、*RAS* 遺伝子異常による ALPS 関連疾患—RALD が提唱され、RALD でもリンパ球の異常活性化により自己抗体が出現すると考えられている。同様に *RAS* 遺伝子異常により発症する JMML との関連性が想定され、自己抗体を有する JMML と同一の疾患群に属すると考えられることもできる。

我々は、自己抗体を有する JMML の 1 例を経験した。この症例は *KRAS* 遺伝子変異を有していた。複数の自己抗体陽性であったが、リンパ節腫脹や顕著な高 $\gamma$ グロブリン血症等の ALPS や RALD に特徴的な所見を認めず、自己抗体産生の原因として、B リンパ球の異常活性化の寄与は少ないと考えられた。我々は、この JMML の自験例において、自己抗体が出現する機序を検討し、*RAS* 遺伝子異常の病態についての解明を試みた。

B. 研究方法

症例は、生後 4 ヶ月の男児で、反復性・難治性口腔カンジダ症を主訴に受診した。受診時、著明な肝脾腫が認められ、末梢血で白血球、単球の増加、幼弱顆粒球の出現、胎児型 Hb の増加を認めた。骨髄検査では芽球の増加はなく、Ph 染色体は陰性であった。*in vitro* で GM-CSF に対する感受性の増加を認め、さらに骨髄造血細胞の解析より、*KRAS* 遺伝子に変異(G13D 変異)を認めたことから JMML と診断した。この *KRAS* 変異は、患児の頬粘膜および爪を用いた検討では検出されず、体細胞変異と考えられた。患児の IgG は 981mg/dl と月齢相当では軽度増加していた。sIL2R は 6591U/ml と高値だった。抗核抗体 40 倍、dsDNA 14IU/ml、直接・間接クームス陽性、PAIgG 382ng/10<sup>7</sup>cell と各種自己抗体を認めた。一方で double negative T 細胞は 1.2%と増加はみられなかった。

どの細胞系列に *KRAS* 変異が存在するか検討するために、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。

次に、末梢血と骨髄の各細胞分画における *KRAS* 変異の出現頻度を検討した。フローサイトメトリーを用いて、各分画の細胞を 96 ウェルプレートに、single cell として採取した。分離した単一細胞の *KRAS* 遺伝子変異の有無を Cyclecleave PCR 法による定量 PCR を用いて検討した。単一細胞からの解析であるため、まず遺伝子変異部位が存在する *KRAS* エクソン 1 を含めた領域を PCR で増幅後、Cyclecleave PCR 法を行った。

遺伝子解析の実施に際して、患児の保護者より文書にて解析に対する同意を得ている。また検体はすべて匿名化した上で解析をおこなった。

### C. 研究結果

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(lineage マーカー陰性 CD34 陽性かつ CD38 陰性分画)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 CD38 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。

Cyclecleave 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 homozygous mutation、もしくは正常 *KRAS* アレルの deletion と考えられる。Cyclecleave PCR 法で認められた各パターンを図 1 (a, b, c)に示す。また各細胞系列の G13D 変異の割合を図 2 に示す。

図 1

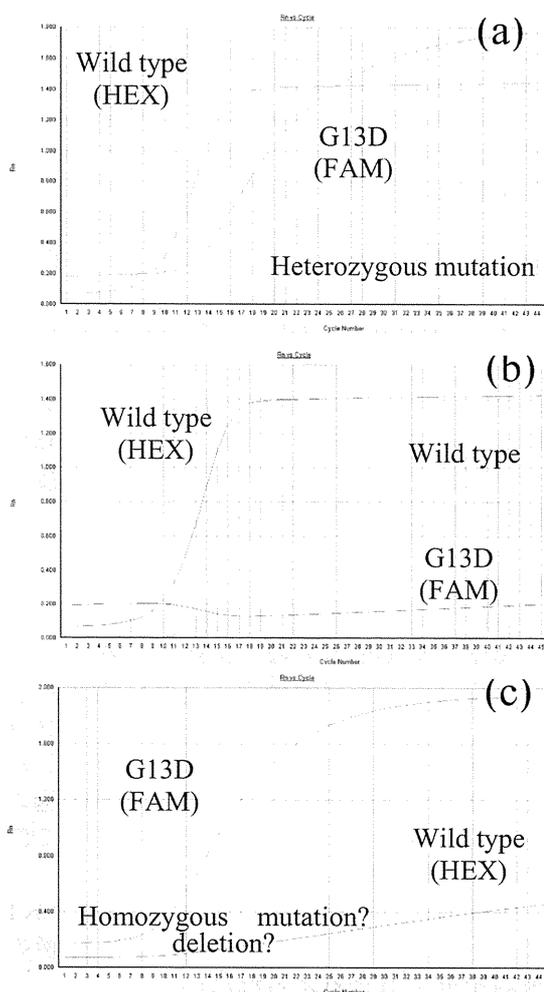
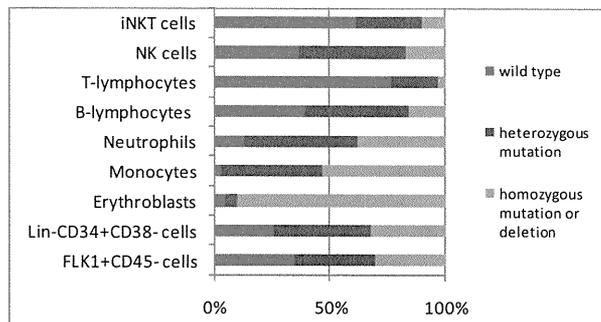


図 2



#### D. 考察

FLK1 は中胚葉から発現し、ヘマンジオブラスト(血液と血管内皮の共通幹細胞)への分化に重要な役割を果たす。すなわち、我々の症例では造血幹細胞以前の未分化な中胚葉細胞に *KRAS* 変異が生じたために、顆粒球系やリンパ球といった下流の細胞分画にも *KRAS* 変異が認められ、最終的に JMML を発症したと考えられる。しかしながら我々の症例では、これまでの自己抗体を有した JMML の報告例とは異なり、T・B 細胞にも *KRAS* 変異があるにもかかわらずリンパ増殖症を生じなかった。その細胞起源がいまだに明確でない iNKT 細胞や NK 細胞が自己抗体産生に関与している可能性もあり、これらの細胞の働きが *KRAS* 変異を有した場合どのように変化するのかに関して、今後の検討が必要である。

また、JMML で認められる遺伝子変異は、ヘテロ変異が一般的と考えられているが、ホモ変異(あるいは正常アレルの欠失)も出現する可能性が示唆された。これが JMML の病態にどのように関与するのか、今後症例を集積して検討したい。

#### E. 結論

JMML の一部の症例は造血幹細胞レベルの異常で発生すると報告されているが、本症例では FLK1 陽性細胞に *KRAS* 変異を認めたことより、より未熟なヘマンジオブラストあるいはそれ以前の段階から発生したと考えられた。そのため、骨髄球系細胞のみならず T、B、NK、iNKT 細胞すべてに *KRAS* 変異を認めた。

本症例の自己抗体産生機序に NK、iNKT 細胞が関与する可能性が考えられ、今後の検討を要すると考えられた。

#### F. 健康危惧情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

特になし

##### 2. 学会発表

1. G13D *KRAS* mutation was found in flk1-positive cells in a case of Juvenile

#### myelomonocytic leukemia (JMML)

徳田桐子, 江口真理子, 石前峰斉, 河上早苗, 本田美里, 田内久道, 石井榮一. 第 73 回日本血液学会学術集会.

2011 年 10 月 14 日 名古屋

臨床血液 52 巻 9 号, 487 頁, 2011 年

#### 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

「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 金兼 弘和(富山大学・附属病院小児科・講師)

研究要旨：EB ウイルス関連リンパ増殖性疾患からみた自己免疫性リンパ増殖症候群に関する研究

A. 研究目的

自己免疫性リンパ増殖症候群(ALPS)は FAS 関連分子の変異により FAS を介するリンパ球のアポトーシスの欠陥を病因とする原発性免疫不全症の一つである。臨床的には肝脾腫、リンパ節腫脹などのリンパ増殖症と溶血性貧血、血小板減少症、好中球減少症などの自己免疫疾患を特徴とする。一方 EB ウイルス関連リンパ増殖症(EBV-LPD)は移植後 LPD(PTLPD)、慢性活動性 EBV 感染症(CAEBV)、X 連鎖リンパ増殖症候群タイプ 1(XLP-1)など EBV 感染に伴う LPD であり、肝脾腫やリンパ節腫脹はもちろんであるが、一部には自己免疫疾患を伴うこともあり、ALPS と臨床的にオーバーラップしている。本研究では EBV-LPD に ALPS が紛れ込んでいないかを検証する。

B. 研究方法

対象は肝脾腫、血液学的異常、EBV 抗体価の異常から CAEBV としてフォローされていた 3 例である。文書による同意を得て、リンパ球サブセットにて TCR- $\alpha/\beta$ +CD4-CD8- (double negative: DN) T 細胞、活性化 T 細胞を用いて抗 FAS 抗体刺激によるアポトーシス誘導、FAS 遺伝子解析、血清 IL-10 測定を行った。

C. 研究結果

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

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。

表 1. ALPS-FAS と EBV 関連リンパ増殖性疾患

疾患	ALPS-FAS	XLP-1	CAEBV	PTLPD
遺伝	常染色体	X 連鎖	?	?
性	両方	男性のみ	両方	両方
局在	10q25	Xq25	?	?
遺伝子	FAS	SH2D1A	?	?
HLH	まれ	しばしば	時々	まれ
悪性リンパ腫	時々	しばしば	時々	時々
免疫グロブリン	高	低または高	高	低～正常
自己免疫	++	-	+	-

E. 結論

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る。

F. 健康危惧情報  
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tadaki H, Saitsu H, Kanegane H, Miyake N, Imagawa T, Kikuchi M, Hara R, Kaneko U, Kishi T, Miyamae T, Nishimura A, Doi H, Tsurusaki Y, Sakai H, Yokota S, Matsumoto N. Exonic deletion of CASP10 in a patient presenting with systemic juvenile idiopathic arthritis, but not with autoimmune lymphoproliferative syndrome type IIa. *Int J Immunogenet.* 2011. 38: 287-93.
2. Nomura K, Kanegane H, Otsubo K, Wakiguchi H, Noda Y, Kasahara Y, Miyawaki T. Autoimmune lymphoproliferative syndrome mimicking chronic active Epstein-Barr virus infection. *Int J Hematol.* 2011. 93: 760-4.
3. 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.* 2011. 31: 968-76.
4. Pachlopnik Schmid J, Canioni D, Moshous D, Touzot F, Mahlaoui N, Hauck F, Kanegane H, Latour S, et al. Clinical similarities and differences of patients with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (XLP-1/SAP deficiency) versus type 2 (XLP-2/XIAP deficiency). *Blood.* 2011 Feb. 3; 117(5): 1522-9.
5. Booth C, Gilmour KC, Veys P, Kanegane H, Gaspar HB, et al. X-linked lymphoproliferative disease due to SAP/SH2D1A deficiency: a multicenter study on the manifestations, management and outcome of the disease. *Blood.* 2011 Jan. 6; 117(1): 53-62.

2. 学会発表

1. Toki T, Kobayashi E, Kanezaki R, Wang R, Terui K, Kanegane H, Maeda M, Koike T, Endo M, Adachi S, Hayashi Y, Shimizu R,

Yamamoto M, Ito E. Novel GATA1 mutants with internal deletions in transient abnormal myelopoiesis in down syndrome. 第73回日本血液学会学術集会. 2011年10月15日 名古屋

2. Toshida K, Toki T, Park MJ, Nagata Y, Wang R, Shiraishi Y, Sanada M, Nagasaki M, Miyano S, Kanegane H, Kawakami K, Kato K, Kojima S, Hayashi Y, Ito E, Ogawa S. Whole exome analysis of transient abnormal myelopoiesis (TAM) and AMKL with down syndrome. 第73回日本血液学会学術集会. 2011年10月15日 名古屋

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

「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 滝田 順子（東京大学・無菌治療部小児科・講師）

研究要旨：自己免疫性リンパ球増殖症候群(ALPS)は、アポトーシスの障害によりリンパ球の増殖を来し、肝脾腫、リンパ節腫脹、自己免疫疾患を来す難治性の疾患である。一方、RAS 変異を造血細胞に有し、ALPS および若年性骨髄単球性白血病(JMML)類似の症状を呈する疾患群は、RAS associated ALPS like disease (RALD)と呼ばれる。RALD は ALPS と異なり、FAS 経路の異常はみられないが、臨床的に JMML や ALPS とオーバーラップする点が多く、これらの鑑別は困難なことが多い。そこで本年度は、ALPS、RALD および JMML の分子病態を解明するために、JMML 類似の造血器疾患 28 検体を用いて、RAS 経路および RNA splicing pathway の遺伝子である U2AF35、SRSF2、ZRSR2、SF3B および CASPASE10、FASL につき変異解析を行った。その結果、2 検体において新規 U2AF35 と SRSF2 の変異を検出した。これらの検体は、PTPN11、RAS および CBL 変異は陰性であった。以上の結果から、ALPS、RALD および JMML の一部の症例では、既知の FAS 経路、RAS 経路に加えて RNA スプライシング経路の異常も発症に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

自己免疫性リンパ球増殖症候群 Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) は、細胞死(アポトーシス)の障害により、リンパ球の異常増殖、肝脾腫、リンパ節腫脹、自己免疫疾患など多彩な症状を呈する難治性疾患である。原因として、FAS 経路、FASL、CASPASE-10 の異常が判明している。ALPS および若年性骨髄単球性白血病(JMML)類似の症状を呈する RAS associated ALPS like disease (RALD)は、ALPS と異なり FAS 経路の異常はみられないが、臨床的に若年性骨髄単球性白血病(JMML)や ALPS とオーバーラップする点が多く、これらの鑑別は困難なことが多い。またこれらの疾患の分子病態の相違は十分解明されてない。そこで、本年度は、ALPS、RALD および JMML の分子病態を解明するために、JMML 類似の造血器疾患 28 検体を用いて、RAS 経路、CBL に加えて、最近、骨髄異形成症候群(MDS)で高頻度に異常を起していることが明らかとなった RNA splicing pathway の変異解析を行った。

B. 研究方法

材料としては、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。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

解析した検体の 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 deletion 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 deletion 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。CASPASE10 よび FASL の変異は検出されなかった。

#### D. 考察

今回解析した 28 例中、24 例において JMML で報告されている RAS 経路の異常が見出された。また 2 例で新たに RNA スプライシング経路の変異を検出した。新たに検出された U2AF35 R156M 変異は、成人例のホットスポット変異の近傍であり、種を超えた保存領域であったことから、変異により何らかの機能異常を来している可能性が高い。また SRSF2 の 6 bp の in-frame deletion は、RS ドメイン内に検出されたが、RS ドメインは他の RNA splicing コンパウンドと結合することが知られている。従って、この in-frame deletion により結合に影響が生じる可能性が示された。

#### E. 結論

ALPS、RALD および JMML の一部の症例では、既知の FAS 経路、RAS 経路に加えて RNA スプライシング経路の異常も発症に関与している可能性が示唆された。

#### F. 健康危惧情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

特になし。

##### 2. 学会発表

1. Motomura A, Oki K, Takita J, Nishimura R, Okubo J, Hiwatari M, Sanada M, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Aberrations of DNMT3A in pediatric myeloid malignancies. 第 73 回日本血液

学会学術集会. 2011 年 10 月 15 日 名古屋

2. Hiwatari M, Ohki K, Takita J, Nishimura R, Sanada M, Okubo J, Sotomatsu M, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Mutation analysis for IDH1 and IDH2 in infantile leukemia. 第 73 回日本血液学会学術集会. 2011 年 10 月 14 日 名古屋
3. 西村力, 滝田順子, 吉田健一, 白石友一, 川幡亮一郎, 永田安伸, 大久保淳, 真田昌, 五十嵐隆, 林泰秀, 宮野悟, 小川誠司. 次世代シーケンサーによる神経芽腫のエクソーム解析. 第 70 回日本癌学会学術総会. 2011 年 10 月 4 日 名古屋
4. 樋渡光輝, 滝田順子, 真田昌, 西村力, 大久保淳, 井田孔明, 外松学, 菊地陽, 五十嵐隆, 林泰秀, 小川誠司. 乳児白血病における IDH 1/2 遺伝子の変異解析. 第 70 回日本癌学会学術総会. 2011 年 10 月 3 日 名古屋
5. 大久保淳, 大木健太郎, 滝田順子, 樋渡光輝, 西村力, 真田昌, 五十嵐隆, 林泰秀, 小川誠司. 小児固形腫瘍における IDH 変異の解析. 第 70 回日本癌学会学術総会. 2011 年 10 月 3 日 名古屋
6. 大久保淳, 滝田順子, 大木健太郎, 西村明, 安達正時, 加藤元博, 真田昌, 林泰秀, 小川誠司, 五十嵐隆. 神経芽腫における部分欠損型 ALK の造腫瘍性に関する検討. 第 114 回日本小児科学会学術集会. 2011 年 8 月 14 日 東京
7. 大久保淳, 滝田順子, 大木健太郎, 西村力, 安達正時, 真田昌, 加藤啓輔, 林泰秀, 小川誠司, 五十嵐隆. 高密度 SNP アレイを用いた胸膜肺芽腫における網羅的ゲノム解析. 第 114 回日本小児科学会学術集会. 2011 年 8 月 14 日 東京
8. 大木健太郎, 滝田順子, 樋渡光輝, 西村力, 大久保淳, 安達正時, 外松学, 林泰秀, 小川誠司, 五十嵐隆. 小児悪性

腫瘍における Isocitrate dehydrogenase 1/2 の変異解析. 第 114 回日本小児科学会学術集会. 2011 年 8 月 14 日 東京

なし

9. 柴徳生, 滝智彦, 朴明子, 加藤元博, 滝田順子, 金澤崇, 外松学, 長澤正之, 荒川浩一, 林泰秀. 治療関連白血病と乳児白血病における CBL 遺伝子変異の解析. 第 114 回日本小児科学会学術集会. 2011 年 8 月 13 日 東京
10. 滝田順子, 西村力, 安達正時, 大木健太郎, 大久保淳, 樋渡光輝, 真田昌, 林泰秀, 小川誠司, 五十嵐隆. 革新的ゲノム解析技術を用いた難治性小児固形腫瘍における発症分子機構の解明. 第 114 回日本小児科学会学術集会. 2011 年 8 月 12 日 東京
11. 安達正時, 滝田順子, 西村力, 真田昌, 樋渡光輝, 大木健太郎, 大久保淳, 林泰秀, 五十嵐隆, 小川誠司. 神経芽腫における全エクソン領域のシーケンス解析. 第 114 回日本小児科学会学術集会. 2011 年 8 月 12 日 東京
12. 柴徳生, 滝智彦, 朴明子, 滝田順子, 金澤崇, 外松学, 長澤正之, 大西宏明, 荒川浩一, 小川誠司, 林泰秀. 小児白血病 246 例における CBL 遺伝子変異の解析. 平成 23 年度第 1 回足立班・堀部班・牧本班・清河班合同班会議. 2011 年 6 月 18 日 名古屋

#### 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

「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 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)

研究要旨: 自己免疫性リンパ増殖症候群は CD95 誘導性細胞死の欠失により、リンパ節腫脹、脾腫、double negative T (DNT)細胞の増加、高 $\gamma$ グロブリン血症、自己免疫疾患の合併を認めるが、通常に遺伝子解析では CD95 遺伝子異常を認めない ALPS III 型が存在する。ALPS III 型と考えられた日本人症例 6 症例において CD95 およびシグナル下流蛋白の遺伝子モザイク変異の有無を解析した。5 例では CD95、caspase-8、-10 に遺伝子変異を認めなかったが、1 例の DNT 細胞分画において intron 7 +1 G→A による exon 7 mRNA 欠失を認めた。変異特異的 PCR 法による解析から、変異細胞の存在比率は、DNT 細胞は 100%、末梢血リンパ球分画、顆粒球、赤芽球、骨髄 CD34<sup>+</sup>細胞では約 1-10%であり、ALPS type Im と診断した。さらに口腔粘膜上皮細胞、骨髄繊維芽細胞においても約 1%変異細胞が存在し、胚細胞分裂時に発生した *de novo* CD95 遺伝子変異による現時点で報告のない ALPS type Im と考えられた。発症年齢、DNT 細胞比率、血清可能性 CD95L、可能性 IL-2R 濃度は type Im 症例において典型的 type Ia 症例と同等で、type III 症例とは異なり、臨床的に type Im 型を推測する指標と考えられた。

A. 研究目的

自己免疫性リンパ増殖症候群 (Autoimmune Lymphoproliferative syndrome; ALPS)は、CD95、CD95L、caspase-10、-8 の遺伝子変異のより、CD95 誘導性細胞死システムが機能しなくなることにより発症する。ALPS の診断基準として慢性非腫瘍性リンパ節腫脹、肝脾腫、TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> double negative (DN)T 細胞の増加、活性化 T 細胞における CD95 誘導性細胞死の欠損が挙げられ、自己免疫疾患、家族歴の存在やリンパ節または脾臓の典型的な組織像、CD95、CD95L、caspase-10、-8 の遺伝子異常が参考となる。遺伝子変異により、CD95 のホモの遺伝子変異(type 0)、CD95 ヘテロ変異 (type Ia)、CD95L 変異 (type Ib)、caspase-10 変異 (type IIa)、caspase-8 変異 (type IIb)に分類される。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 DNT 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を加え、臨床所見との関連につき検討した。

B. 研究方法

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、TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> 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<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、NK、B、TCR  $\gamma\delta$ 細胞および単球、顆粒球を、骨

髄からは CD34<sup>+</sup>、glycophorin A<sup>+</sup>、CD10<sup>+</sup> 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。

本研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」におけるところの「生殖細胞系列変異又は多型解析」に相当する。すでに金沢大学医学部「ヒトゲノム・遺伝子解析」委員会に承諾されている。患者および患者家族に研究目的・内容につき十分な説明を行い、インフォームドコンセントのもと、同意書を取得した。

### C. 研究結果

日本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た。悪性疾患として Hodgkin 病が 1 例認められた。

表 1 ALPS 症例の臨床的特徴

No	年齢(月)	性	家族歴	肝脾腫	リンパ節腫	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	-	+++	+++	ANJTP	2.0	III
18	93	F	-	+++	+++	AIH	2.8	III
19	96	M	-	+++	+++	HLH	2.8	III

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(図 1)。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。

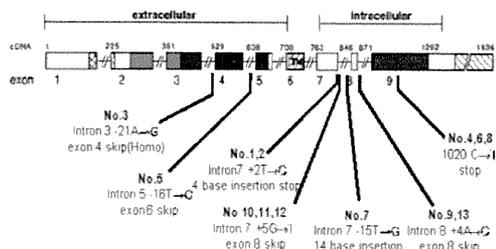


図 1 ALPS における CD95 遺伝子変異

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(図 2)、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。

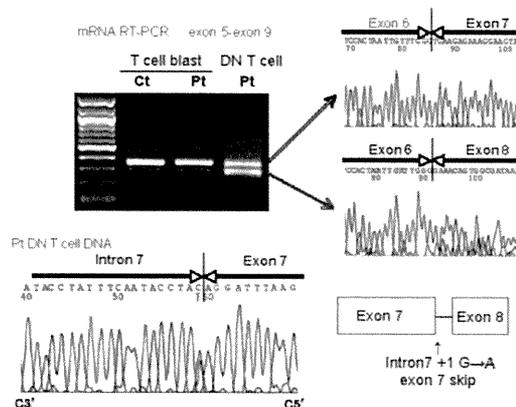


図 2 ALPS type Ia 症例における CD95 遺伝子変異

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<sup>+</sup>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 glycophorin 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(図3)、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られた。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。

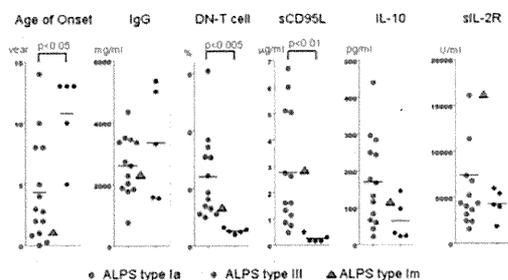


図3 ALPS 型別の各種指標の相違

#### D. 考察

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。既報告のtype Im症例では、口腔粘膜や繊維芽細胞などの非血液系細胞においては、遺伝子変異が検出されておらず、血液免疫幹細胞における体細胞変異と考えられている。一方、本症例においては、外胚葉、中胚葉由来の口腔粘膜上皮細胞や繊維芽細胞において変異が存在し、胚細胞分裂時におけるde novoの変異によるモザイクである点が特徴的な症例であった。

ALPSにおいて増加が特異的であるDNT細胞では、本症例では一番変異細胞比率が高く、その他のリンパ球亜群において10%前後の変異が存在し、CD95/CD95Lシステムによる細胞死機構が生体内で機能している細胞であることが間接的ではあるが示される。Germ-line遺伝子変異が検出されない場合、DNT細胞の検索がtype Imの診断には必要と考えられる。一方、DNT細胞に増加が認められたが、モザイク変異も見出されなかったtype III4症例では、type Ia, Imと可能性CD95L、DNT細胞比率、発症年齢等の臨床的マーカーでも異なる点があり、CD95特異的細胞死以外の細胞死誘導システムの異常や最近報告されたNRAS変異によるtype IVの可能性の検索が必要を思わ

れた。

#### E. 結論

ALPS III型と考えられた1例にintron 7+1 G→Aによるexon 7 mRNA欠失のモザイク変異を検出した。変異特異的PCR解析から、変異細胞比率は、DNT細胞100%、末梢血リンパ球分画、顆粒球、赤芽球、骨髄CD34<sup>+</sup>細胞では1-10%で、口腔粘膜上皮細胞、骨髄繊維芽細胞にも変異細胞が存在し、胚細胞分裂時に発生したde novo遺伝子変異による報告のないALPS type Imと考えられた。発症年齢、DNT細胞比率、血清可能性CD95L、可能性IL-2R濃度はtype Im症例において典型的type Ia症例と同等で、臨床的にtype Im型を推測する指標と考えられた。

#### F. 健康危惧情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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*. 117(10): 2887-90, 2011.

##### 2. 学会発表

1. 家族性血球貪食性リンパ組織球症 2 型の CD8+T 細胞における CD5 発現低下. 和田泰三, 榊原康久, 東馬智子, 笠原善仁, 堀田成紀, 上野康尚, 八角高裕, 西真範, 小原收, 谷内江昭宏. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 第 7 回血球貪食症候群研究会. 2011 年 8 月 12~14 日 東京
2. RAS associated ALPS like disease(RALD)の提唱. 高木正稔, 篠田邦大, 朴今花, 満生紀子, 森真理, 松田和之, 村松秀城, 土居崎小夜子, 長澤正之, 森尾友宏, 笠原善仁, 小池健一, 小島勢二, 高尾明, OliveiraJoao B, 水谷修紀. 第 114 回日本小児科学会学術集会. 2011 年 8 月 12~14 日 東京

3. 新規 SCN4A 遺伝子変異を認めたミオトニア合併周期性四肢麻痺の一家系. 榊原康久, 清水正樹, 笠原善仁, 谷内江昭宏. 第 114 回日本小児科学学術集会. 2011 年 8 月 12~14 日 東京
  4. 会員制掲示板による 1 型糖尿病患者同士の関わりの効果. 東庸子, 稲垣美智子, 笠原善仁. 第 54 回日本糖尿病学会学術集会. 2011 年 5 月 19~21 日 札幌
  5. 1 型糖尿病持続皮下インスリン療法におけるグルリジンの安全性および効果の検討. 笠原善仁, 岡島道子. 第 54 回日本糖尿病学会学術集会. 2011 年 5 月 19~21 日 札幌
- 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

「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 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)

研究要旨：RALD、JMML は共に Ras に活性化型変異を持つ。活性化型 Ras を発現する細胞は、*INK4a/ARF* 遺伝子座の状態により、細胞の表現型が大きく異なる。本研究では、RALD、JMML 細胞において Ras シグナル経路と *INK4a/ARF* 遺伝子座を調べ、細胞生物学的見地からこれら疾患の差異について検討を行った。平成 23 年度は RALD2 例、JMML1 例について調べ、その結果両者の間で Ras シグナル経路の活性と p16<sup>INK4a</sup> の発現に違いがあることを示唆する結果を得た。

A. 研究目的

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(2 検体)、JMML(1 検体)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

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

(Herman et al. PNAS. 1996; Sato et al., Cancer Res. 2001)。

2. p16<sup>INK4a</sup>、p14<sup>ARF</sup> 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。

C. 研究結果

1. *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 1A に示すように、RALD(2 検体)、JMML(1 検体)および正常リンパ球(Normal, 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<sup>INK4a</sup> および p14<sup>ARF</sup> の発現をイムノブロットにより調べた。図 1B に示すように、全てのサンプルにおいて p14<sup>ARF</sup> の発現は認められなかった。p16<sup>INK4a</sup> 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(レーン 5,6)。これに対し、JMML 検体では p16<sup>INK4a</sup> 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<sup>INK4a</sup> 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(図 2A)。

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<sup>INK4a</sup> 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(図 2B)。

#### D. 考察

MSP の結果から、今回解析した RALD、JMML サンプルはすべて、Ras 変異により癌化した細胞に多く見られる *INK4a/ARF* 遺伝子座のメチル化によるサイレンシングは起きていないことが示された。また非メチル化ゲノムがすべてのサンプルにおいて検出されていることから、癌細胞にしばしば見られるこの遺伝子座の大規模欠失も生じていないことが考えられる。

活性化型変異 Ras は、MAPK(ERK)を介して *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、ERK が過剰に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<sup>INK4a</sup> 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 および JMML 検体で *INK4a/ARF* 遺伝子産物の発現を調べたところ、RALD 検体においてのみ、正常リンパ球より高いレベルの p16<sup>INK4a</sup> の発現が認められた。ヒトにおいて *ARF* 遺伝子の発現は、Ras の活性化と

同時に RB タンパク質の失活が必要となる。解析したサンプルにおいて *ARF* 遺伝子の発現は認められなかったことから、RB タンパク質はすべてにおいて正常に機能しているものと考えられる。さらに Ras シグナルの解析から、RALD においてのみ MAPK の活性化が認められた。したがって RALD においては Ras-MAPK 経路を介して p16<sup>INK4a</sup> 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る。JMML に関しては 1 検体のみの解析であるが、MAPK の活性化は認められず、PI3K 経路の亢進(AKT のリン酸化)が確認された。p16<sup>INK4a</sup> 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る。

#### E. 結論

RALD、JMML は共に Ras に活性化型変異を持つが、RALD では MAPK の活性化、JMML では PI3K 活性化により、p16<sup>INK4a</sup> の発現パターンに違いが見られた。しかしながら、このような生化学的指標によりこれらの疾患を定義するためには、さらに多くの数の検体について解析を行わなくてはならない。

また、細胞老化が RALD の細胞生物学的指標となるかについては非常に興味深い点であり、詳細に検討を行う必要がある。

#### F. 健康危惧情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Nakamura H, Kawagishi H., Watanabe A, Sugimoto K., Maruyama M, Sugimoto M. Cooperative role of RNA-binding proteins, Hzf and HuR in p53 activation. *Mol. Cell. Biol.* 31: 1997-2009. 2011

##### 2. 学会発表

1. Kawagishi H, Nakamura H, Tsugawa T, Sugimoto M. HuR maintains replicative lifespan by repressing ARF tumor suppressor. 第 34 回 日本分子生物学会年会. 2011 年 12 月 13~16 日 横浜

2. Kawagishi H. and Sugimoto M. RNA-binding protein HuR suppresses cellular lifespan by repressing the translation of *ARF* mRNA. Mechanism and Model of Cancer, SALK symposia, 2011

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

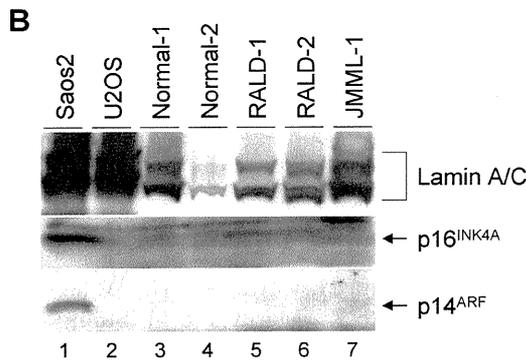
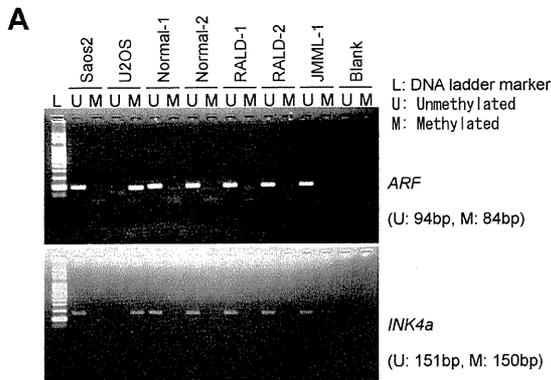


図 1. *INK4a* および *ARF* 遺伝子の解析

(A) MSP により、RALD および JMML サンプルにおける *ARF/INK4a* 遺伝子プロモーター領域のメチル化を調べた。Saos2 および U2OS 細胞はそれぞれ非メチル化、メチル化のコントロールとして使用した。  
(B) これらサンプルから調製したライゼ

ートを用いて、 $p16^{INK4a}$  および  $p14^{ARF}$  の発現を免疫ブロットにより調べた。

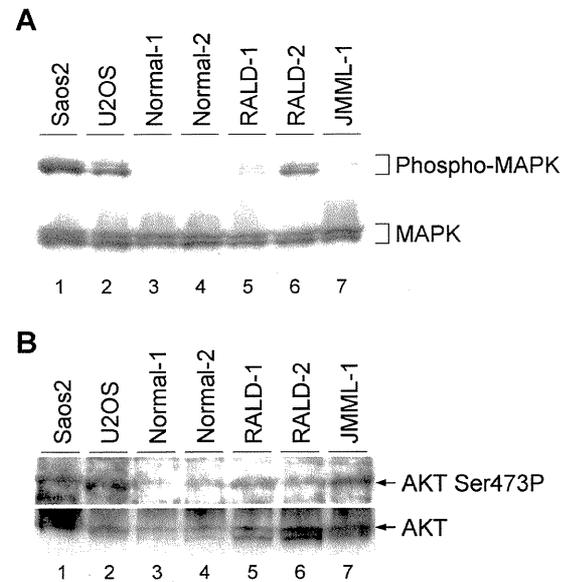


図 2. MAPK および AKT リン酸化の解析  
(A) 各細胞から調製したライゼート中におけるリン酸化 MAPK(ERK)およびトータルMAPKを免疫ブロットにより解析した。  
(B) PI3K の基質である AKT のリン酸化を、免疫ブロットにより調べた。

「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 林 泰秀（群馬県立小児医療センター・血液腫瘍・院長）

研究要旨:皮膚粘膜カンジダ症候群の経過中に Evans 症候群と心嚢液貯留を認めた症例を経験し、*AIRE*、*CARD9*、*CLEC7A*、*IL2RA*、*FAS*、*NRAS*、*KRAS* 等遺伝子解析を行ったが変異はみられず、自己免疫性リンパ増殖症(ALPS)の診断に一致しなかった。今後、次世代シーケンサー等の網羅的遺伝子解析を行う予定である。

A. 研究目的

自己免疫性リンパ増殖症 (Autoimmune lympho-proliferative syndrome、ALPS)は FAS 依存のアポトーシス経路の障害で、リンパ増殖症を呈し、リンパ節腫脹、脾腫などを特徴とし、自己免疫疾患を合併する症候群である。RAS-MAPK 経路の異常が病態の中心にあると考えられ、*RAS*、*PTPN11*、*NFI* や *CBL* などの遺伝子異常が認められる。また RAS-MAPK 経路の胚細胞性変異は Cardio-facio-cutaneous (CFC)症候群、Costello 症候群などを発症することが知られている。また、*NRAS*、*KRAS* 変異のある ALPS 類似の病態が RAS associated ALPS like disease (RALD)という新しい疾患概念として提唱されている

我々はこれらを疑わせる症例を経験したので報告する。

B. 研究方法

<遺伝子解析>

末梢血により DNA を抽出し、*AIRE*、*CARD9*、*CLEC7A*、*IL2RA*、*FAS*、*NRAS*、*KRAS* 遺伝子にプライマーを作成し、PCR で増幅して直接塩基決定法にて検索した。

<フローサイトメトリーによる解析>

autoimmune polyendocrinopathy candidiasis (APECED)で検出される *IL17A*、*IL-17F*、*IL-22*、*IL-23*、*IFN-alpha* に対する自己抗体の検索と CR- $\alpha/\beta$  + *CD4-CD8-T* 細胞の検索を行った。

<アポトーシスの解析>

In vitro で FAS を介したアポトーシスの解析を行った。

<臨床症例>

12 歳の男児で発熱を主訴に来院した。二卵性双生児の第二子で幼少時より感染症罹患時に DIC の合併が複数回あり、皮膚粘膜カンジダ症候群、気管支拡張症と診断された。発熱と鼻出血、顔面浮腫を認め受診し、入院となった。

体温は 38.2℃で、顔面蒼白、口唇の浮腫、口腔内アフタと口腔粘膜に白苔をみとめ、呼吸音両肺野に crackles があり、心雑音はなく、肝腫大とばち指がみられ、脾腫大、関節腫脹、発疹、表在リンパ節腫大はみられなかった。

《血算》

WBC	4500	/ $\mu$ l
Seg	32.0	%
Band	3.0	%
Lymph	24.0	%
Mono	5.0	%
Atyp.lymp	5.0	%
RBC	348	$\times 10^4$ / $\mu$ l
Hb	8.0	g/dl
Hct	25.7	%
MCV	73.9	fl
MCH	23.0	pg
MCHC	31.1	%
Plt	0	$\times 10^4$ / $\mu$ l
Ret	7.2	‰

単純ヘルペス IgG (-)、IgM (-)