

201128255A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

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

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小島 勢二

平成 24 (2012) 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

先天性角化不全症の効果的診断法の確立と
治療ガイドラインの作成に関する研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小島 勢二

平成 24 (2012) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告書

- 先天性角化不全症の効果的診断法の確立と治療ガイドラインの作成に関する研究
(研究総括、中央診断、データ管理) …………… 1
名古屋大学大学院医学系研究科 小児科学 小島 勢二

II. 分担研究報告書

- 血球テロメア長測定、遺伝子変異検査 …………… 11
名古屋大学医学部附属病院 成長発達医学 高橋 義行
- 小児領域における診断・治療ガイドラインの策定 …………… 13
弘前大学大学院医学研究科 小児科 伊藤 悦朗
- 小児期造血障害疾患登録による先天性角化不全症疫学データベース構築 …………… 16
東邦大学医療センター大森病院 輸血部 小原 明
- 骨髄生検の病理診断 …………… 18
名古屋第一赤十字病院 病理部 伊藤 雅文
- 不全型先天性角化不全症の新規診断法の開発 …………… 21
日本医科大学 血液内科 山口 博樹
- 遺伝性疾患と間質性肺炎に関する研究 …………… 25
名古屋大学大学院医学系研究科 呼吸器内科学 長谷川 好規
- 皮膚科領域における疫学調査、診断治療ガイドラインの策定 …………… 27
名古屋大学大学院医学系研究科 皮膚病態学分野 秋山 真志
- 骨髄不全におけるクローン性造血とテロメア長短縮の意義 …………… 30
金沢大学医薬保健研究域医学系 細胞移植学 中尾 眞二
- 治療ガイドラインの検討及び立案 …………… 33
日本大学 小児科 谷ヶ崎 博
- 表現型(造血不全と免疫不全)に基づいた診断法に関する研究 …………… 34
九州大学大学院医学研究院 周産期・小児医療学 大賀 正一

造血幹細胞移植プロトコールの立案 東海大学医学部 再生医療科学 36 矢部 普正
テロメア長の短縮を認めた Diamond-Blackfan 貧血の 1 例 富山大学附属病院 小児科 40 金兼 弘和
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 43
IV. 研究成果の刊行物・別冊 45

I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

先天性角化不全症の効果的診断方法の確立と治療ガイドラインの作成に関する研究

研究代表者 小島勢二 名古屋大学大学院医学系研究科 小児科学 教授

研究要旨

典型的な先天性角化不全症（DC）は皮膚、爪、口腔粘膜に特徴的な所見がみられる先天性骨髄不全症候群であるが、特発性骨髄不全症候群の一部に、身体的特徴はみられないものの、同一の遺伝子変異がみられる不全型が発見されており、びまん性肺疾患からも、DC と同一の遺伝子異常が発見されたことから“Telomere disease”として新しい包括的な疾患概念が提唱されている。

以上のように本症の診断が困難であることから、日本小児血液学会と協力して、本症の中央診断システムを確立した。すなわち、すべての骨髄不全患者の末梢血リンパ球のテロメア長をスクリーニングし、著明な短縮がみられる場合には7種類のテロメア関連遺伝子の変異を検討した。

本研究班の目的のひとつに本症に対する治療ガイドラインの策定がある。研究班班員が所属する施設で非血縁ドナーから移植された6例は、造血能の回復がみられ順調な経過をたどっている。6例ともに、フルダラビンを含む骨髄非破壊的前処置で移植されていた。これらの知見をもとに、特発性造血障害調査研究班が“診療ガイド”を改訂するのにあわせて、先天性角化不全症に対する“診療ガイド”を作成し全国の主要施設に配布した。

研究分担者

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

A. 研究目的

典型的な先天性角化不全症（Dyskeratosis congenital, DC）は爪の萎縮、口腔内白斑、皮膚色素沈着を3徴とする先天性骨髄不全症候群である。DC患者ではこれらの古典的症状を併せ持つ典型例以外にも、多彩な全身症状がみられる症例から血球減少のみの症例まで多彩な臨床像を示すため、その臨床診断は困難である。低身長、小脳低形成、小頭症、網膜症などをともない独立した疾患と考えられてきたHoyeraal-Hreidarsson 症候群やRevesz 症候群において、DCと同じ遺伝子変異がみられることからこれらの疾患はDCの極型と考えられている。このようにDCは、臨床像が多岐にわたり不全型の診断には遺伝子診断が必須である。原因遺伝子としては、7種類の原因遺伝子が知られているが、本症と診断された症例でこれらの遺伝子の変異が発見されるのは半数にすぎない。実際、当研究班ではこれまでに、17検体について遺伝子解析をおこなったが9例に遺伝子変異が検出されたのみであった。平成23年度に稀少小児遺伝性血液疾患の迅速な原因究明及び診断・治療法の開発に関する研究班が発足したことから、同班と連携して、次世代シーケンサーを用いた新規原因遺伝子の探索をおこなう。

DCの確定診断には責任遺伝子の検索が必要であるが、すべての患者に遺伝子検索をおこなうのは現実的ではない。われわれは、Flow・FISH法を用いて血球テロメア長を測定することで不全型を含めたDCのスクリーニングに有用であることを見いだしている。本邦ではこれまでSouthern blotting法かFlow・FISH法を用いて、テロメア長の短縮化を検索していた。Real time PCR法はより少量の検体でテロメア長の測定が可能であるので、本法が、他の方法と同様にDCや不全型DC患者をスクリーニングすることが可能であるかを検討する。

最近、米国NIHグループから、血球テロメア長は再生不良性貧血患者において、免疫抑制療法への反応性の予測はできなかったが、再発や骨髄異形成症候群を含むクローン性疾患への移行や長期予後の予測に有用であると報告され、血球テロメア長の測定はDCのみならず再生不良性貧血においても注目されてい

る。クロナリティ陽性の再生不良性貧血患者でもテロメア長が短縮しており、それが予後と関連している可能性がある。そこで、再生不良性貧血患者を対象としてヒトアンドロゲンレセプターアッセイ（HUMARA）により顆粒球のクロナリティを評価するとともに、定量的PCR法によりテロメア長を測定する。

本疾患の治療ガイドラインの策定にあたっては、安全でかつ効果的な造血幹細胞療法の確立が必須である。本症に対する移植症例数は決して多くはないが、海外からの文献検索や国内の移植経験をもとに、最適な前治療法やGVHD予防法を考案し、本症の治療ガイドラインを提言する。

B. 研究方法

昨年度までに引き続き、末梢血や骨髄塗抹標本を名古屋大学、聖路加国際病院で、骨髄生検標本は研究協力者である伊藤（雅）が所属する名古屋第1赤十字病院で中央診断をおこなう。高橋はFlow・FISH法による血球テロメア長のスクリーニングをおこなう。さらにDCの疑い症例に対しては7種のテロメア関連遺伝子（DKC1、TERC、TERT、NHP2、NOP10、TINF2、TCAB1）の変異の有無を直接シーケンシング法で検討する。

遺伝子診断を目的で送られて来た検体の余剰については、次世代シーケンサーによる今後の新規遺伝子探索に備えて、倫理委員会、患者および患者家族の同意を得た後にDNAとして保存する。

テロメア長の測定として従来のFlow・FISH法、Southern blotting法とReal time PCR法とを比較して、Real time PCR法でもテロメア長の短縮を検索可能であるかを検討する。

顆粒球のクロナリティ解析を女性再不貧患者27人、女性健常者60人を対象におこなう。一方、テロメア長測定は再不貧35人、対照として健常者44人（年齢中央値44、範囲18-78）を対象におこなう。クロナリティの検出はヒトアンドロゲンレセプターアッセイを、テロメア長の測定はReal time PCR法を用いて行う。

3人のDC患者を対象に、肺を遮蔽した放射線胸部腹部照射(TAI) 3Gy、フルダラビン(Flu) 25 mg/m²を4日間、CY 750 mg/m²を4日間、ウサギ抗胸腺細胞グロブリン(ATG) 1.25 mg/kgを4日間で前治療をおこない、GVHD予防は短期メソトレキセート(MTX; 15 mg/m², +1 day, 10 mg/m², +3, +6, +11 day)とタクロリムス(FK506; 0.03 mg/kg/day持続点滴)の併用で非血縁者間骨髄移植を施行する。

本研究班で得られた研究成果や海外からの文献検索をもとに、厚生労働省難治性疾患克服研究事業特発性造血障害調査研究班と共同して“先天性角化不全症の診療の参照ガイド”の作成をおこなう。

(倫理面への配慮)

小児血液学会としておこなう疾患登録事業は、疫学研究倫理指針に準拠した臨床研究として、すでに学会倫理審査委員会で承認されている。調査にあたっては、個人情報守秘を厳守し、データの取り扱いに注意する。中央診断事業についても、患者検体の匿名化を図る。患者検体をもちいた研究の実施にあたっては、各研究施設での倫理委員会の承認を得るほか、検体の採取にあたっては、患者および家族から事前に十分な説明をおこない、文書による同意を得る。ヒト遺伝子研究に該当する場合は、ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針に従う。なお、本研究はすでに名古屋大学医学部・日本医科大学倫理委員会で承認済みである。

C. 研究結果

2009年2月から2011年8月までに、500例の中央診断がおこなわれ総計33例の先天性骨髄不全症候群が診断された。そのうちDCは3例であった。また、2011年3月1日から2012年2月29日までの1年間に中央診断で再生不良性貧血と診断された97例のテロメア長をFlow・FISH法で測定したところ、85例が年齢-テロメア長標準直線を下回った。そのうち12例においては-3SD以上の著明な短縮を認めた。これらの症例はいずれもDCに特徴的な臨床徴候は示さなかった。このうち1例はDiamond-Blackfan貧血であった。また、別の1例では小頭症

を伴う多発奇形のある乳児症例で、何らかの先天性造血不全症が疑われた。これら12例において7種の遺伝子検査を行ったが、既知のテロメア関連遺伝子の異常を認めなかった。

そのほか、院外施設の呼吸器内科より特発性肺線維症の成人症例のテロメア長測定の依頼があり、テロメア長測定を実施したところ、軽度のテロメア長短縮(-1.7SD)を認めた。この症例について遺伝子検査を行ったところDKC1遺伝子の変異を認めた。同様に、院外施設の小児科からの紹介でDC類縁疾患であるRevesz症候群疑いの乳児症例の遺伝子検査を行ったところTINF2遺伝子の変異を認めた。

DCと不全型DC患者についてテロメア長をSouthern blotting法とReal time PCR法で測定し、年齢相当の健常人コントロールと比較した。Real time PCR法による測定結果は、Southern blotting法と同様にテロメア長の短縮を検索するのに有用であった。

再生不良性貧血の女性患者を対象としてクロナリティを検索したところ、それぞれ27例中8例(29%)が陽性であった。再生不良性貧血患者における全年齢の相対的テロメア長は、顆粒球とT細胞の両方で、健常人コントロールと比較して有意に短縮していた(顆粒球 $P=0.0069$ 、T細胞 $P=0.0170$)。しかし、60歳未満と60歳以上に分けて比較すると、60歳未満の再生不良性貧血患者では有意なテロメア長短縮がみられるのに対し、60歳以上の例ではこのような短縮は確認されなかった。年齢相当の健常人コントロールよりもテロメア長が短い再生不良性貧血患者は35例のうち4例で認められた。このうち3例はいずれも免疫抑制療法無効の輸血依存例であり、残りの1例は再生不良性貧血と診断されてはいたが、実際には第20染色体のトリソミーを持つ骨髄異形成症候群との境界例であった

9歳女兒、6歳男児、5歳女兒の3例に対し、非血縁者間同種骨髄移植を施行した。HLAは6/6一致、HLA-DRB1不一致、HLA-DR血清型不一致がそれぞれ1例であった。前処置による毒性は軽度で速やかな生着が得られ、急性GVHDはgrade 0、grade I、grade IIがそれぞれ1例、慢性GVHDは1例に

限局型を認めた。全例で造血機能は正常化し、それぞれ移植後 13 ヶ月、18 ヶ月、10 年を経て生存中である。爪の萎縮は進行しているが、舌の白板は 3 例とも消失した。

D. 考察

わが国における DC に関する疫学情報は十分でない。日本小児血液学会では、1998 年から小児期造血障害疾患の疾患登録をおこなっている。先行研究の調査対象期間（1988 年から 2004 年）に 1,337 例の小児造血障害疾患があり、DC 症例は 6 例 (0.45%) であった。一方、2006 年から 2010 年に登録された 427 例の造血障害から、新規 DC 患者が 3 例報告された。これは先行研究から外挿された頻度よりも有意に多く、本研究班の活動により造血不全症状を呈する DC が小児血液科医師に認知され、診断の手引き、遺伝子診断の体制が整った事により潜在する症例が見いだされ、正確な診断が行われた可能性が高い。

再生不良性貧血と診断される群の中の潜在性 DC を診断する目的でテロメア長測定を行った。 $-3SD$ 以上のテロメア長短縮を認めた症例でもテロメア関連遺伝子の異常を認めなかった。しかし、臨床的に DC と診断される患者の半数近くは原因遺伝子不明であり、このような症例では既知のテロメア関連遺伝子異常がないからと言って完全には潜在性 DC は否定できないと考えられる。今後は、このような症例を対象に、次世代シーケンサー等を用いた新規原因遺伝子の探索も必要になるであろう。また、テロメア長と再生不良性貧血に対する免疫抑制療法の反応性についてもその関連性が報告されて来ており、今回、テロメア長測定した再生不良性貧血症例での免疫抑制療法反応性を調査する必要もあるであろう。

Real time PCR 法は、Southern blotting 法や Flow・FISH 法と同様にテロメア長の短縮を検索することが可能であった。検索に必要な DNA 量は、Southern blotting 法や Flow・FISH 法に比べ約 1/5~1/10 であり骨髄不患者の臨床検査としては有用であった。今後は骨髄不全患者のテロメア長は、まず Real time PCR 法にてスクリーニングを行い、テロメア長の短縮化が疑われる患者は、Flow・FISH

法か Southern blotting 法でテロメア長の短縮化を確定するという方法が良いのではないかと考えられた。

ヒトアンドロゲンレセプターアッセイによりクロナリティが証明された骨髄不全患者では、テロメア長が短縮していることが予想されたが、実際に今回の検討では、造血幹細胞プールが縮小し、少数の造血幹細胞によって造血が維持されている再生不良性貧血患者では、健常人に比べて顆粒球のテロメア長が有意に短縮していた。しかし、クロナリティ陽性患者におけるテロメア長は、同年齢の健常人コントロールと比べて明らかな短縮は認められなかった。したがって、骨髄不全患者ではクローン性造血状態であっても、テロメラーゼ活性の増強などの代償機構によってテロメア長が維持されていることが示唆された。

米国 NIH からの報告では、治療前のテロメア長が相対的に短縮している再生不良性貧血症例では、テロメア長が保たれている例に比べて骨髄異形成症候群に移行するリスクが高く、予後が悪いことが示されている。今回の検討でも、健常人コントロールに比べてテロメア長が短縮している再生不良性貧血患者の中には、骨髄異形成症候群との境界例や、治療抵抗性の再生不良性貧血症例が多く含まれていた。したがって、テロメア長の測定は再不貧の予後を推測する上で有用な可能性がある。

本症に対する治療ガイドラインの策定も本研究班の目的のひとつである。DC に対する非血縁ドナーからの移植成績は従来は極めて不良であったが、研究班班員が所属する施設で移植された 6 例は、移植後造血能の回復がみられ順調な経過である。6 例ともに、フルダラビンを含む骨髄非破壊的前治療法で移植されていた。これらの知見をもとに、特発性造血障害調査研究班が“診療ガイド”を改訂するのにあわせて、先天性角化不全症に対する“診療ガイド”を作成し全国の主要施設に配布した。

E. 結論

骨髄不全症を対象にした中央診断事業を実施して 3 例の本症を診断した。特筆すべきは、成人特発

性間質性肺炎患者に DKC1 遺伝子変異を検出したことである。一部の再生不良性貧血患者において著明な血球テロメア長の短縮を認めたが、これらの患者においては既知のテロメア関連遺伝子の異常はみられなかった。これらの患者には、未知の遺伝子異常が潜んでいる可能性が考えられ、次世代シーケンサーによる検討をおこなうとともに、骨髄異形成症候群への移行を含めた、これらの症例の予後の検討も必要であろう。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshida N, Hirabayashi S, Watanabe S, Zaike Y, Tsuchida M, Yoshimi A, Masunaga A, Otsuka Y, Ito M, Kojima S, Nakahata T, Manabe A. [Prognosis of 75 patients with juvenile myelomonocytic leukemia: prospective study by MDS committee in the Japanese Society of Pediatric Hematology]. *Rinsho Ketsueki*. 2011 Dec;52(12):1853-8. Japanese.
- 2) 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. *Pediatr Blood Cancer*. 2011 Nov 21. doi: 10.1002/pbc.23409. [Epub ahead of print]
- 3) Kimura H, Ito Y, Kawabe S, Gotoh K, Takahashi Y, Kojima S, Naoe T, Esaki S, Kikura A, Sawada A, Kawa K, Ohshima K, Nakamura S. Epstein-Barr virus (EBV)-associated T/NK lymphoproliferative diseases in non-immunocompromised hosts: prospective analysis of 108 cases. *Blood*. 2012 Jan 19;119(3):673-86.
- 4) Ismael O, Shimada A, Hama A, Takahashi Y, Sato Y, Hayakawa M, Tsuchiya H, Tainaka T, Ono Y, Kaneko K, Ando H, Sato K, Kojima S. Congenital pancreatoblastoma associated with β -catenin mutation. *Pediatr Blood Cancer*. 2012 May;58(5):827.
- 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*. 2012 May;58(5):780-4.
- 6) Hama A, Yoshimi A, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Shimada A, Takahashi Y, Nozawa K, Ito M, Tsuchida M, Manabe A, Ohara A, Kojima S. Bone marrow findings of childhood aplastic anemia: analyses of 140 cases by central reviewers. *Rinsho Ketsueki*. 2011 Aug;52(8):653-8.
- 7) Ito Y, Kawabe S, Kojima S, Nakamura F, Nishiyama Y, Kaneko K, Kiuchi T, Ando H, Kimura H. Identification of Epstein-Barr virus-infected CD27+ memory B cells in patients after transplantation. *J Gen Virol*. 2011 Nov;92(Pt 11):2590-5.
- 8) 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 Sep;15(6):642-9.
- 9) Yagasaki H, Kojima S, Yabe H, Kato K, Kigasawa H, Sakamaki H, Tsuchida M, Kato S, Kawase T, Morishima Y, Kodera Y.

- Acceptable HLA-mismatching in unrelated donor bone marrow transplantation for patients with acquired severe aplastic anemia. *Blood*. 2011 Sep 15;118(11):3186-3190.
- 10) Kojima S, Nakao S, Young N, Bacigalupo A, Gerard G, Hirano N, Maciejewski J, Deeg J, Marsh J, Zhang FK, Lee JW, Ozawa K. The Third Consensus Conference on the treatment of aplastic anemia. *Int J Hematol*. 2011 Jun;93(6):832-7.
 - 11) 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. *Leuk Res*. 2011 Sep;35(9):1261-4.
 - 12) 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. *Int J Hematol*. 2011 Jun;93(6):779-81.
 - 13) Watanabe N, Matsumoto K, Kojima S, Kato K. Invasive Fungal Infections in Pediatric Patients With Hematologic Malignancies Receiving Oral Amphotericin B Solution and Early Intravenous Administration of Fluconazole. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2011 May;33(4):270-5.
 - 14) 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; Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. Relapse of aplastic anemia in children after immunosuppressive therapy: a report from the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. *Haematologica*. 2011 Jun;96(6):814-9.
 - 15) Takamatsu H, Yagasaki H, Takahashi Y, Hama A, Saikawa Y, Yachie A, Koizumi S, Kojima S, Nakao S. Aplastic anemia successfully treated with rituximab: The possible role of aplastic anemia-associated autoantibodies as a marker for response. *Eur J Haematol*. 2011 Jun;86(6):541-545.
 - 16) Ozono S, Inada H, Nakagawa S, Ueda K, Matsumura H, Kojima S, Koga H, Hashimoto T, Oshima K, Matsuishi T. Juvenile myelomonocytic leukemia characterized by cutaneous lesion containing Langerhans cell histiocytosis-like cells. *Int J Hematol*. 2011 Mar;93(3):389-93.
 - 17) Yoshida N, Yagasaki H, Hama A, Takahashi Y, Kosaka Y, Kobayashi R, Yabe H, Kaneko T, Tsuchida M, Ohara A, Nakahata T, Kojima S. Predicting response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica*. 2011 May;96(5):771-4.
 - 18) 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 Feb;93(2):186-91.
 - 19) 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 Mar;15(2):161-6.
- 20) Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsui 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 Mar 10;117(10):2887-90.
- 21) Pulsipher MA, Young NS, Tolar J, Risitano AM, Deeg HJ, Anderlini P, Calado R, Kojima S, Eapen M, Harris R, Scheinberg P, Savage S, Maciejewski JP, Tiu RV, Difronzo N, Horowitz MM, Antin JH. Optimization of Therapy for Severe Aplastic Anemia Based on Clinical, Biological and Treatment Response Parameters: Conclusions of an International Working Group on Severe Aplastic Anemia Convened by the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network, March 2010. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011 Mar;17(3):291-9.
2. 学会発表
- 海外
- 1) Hama A, Muramatsu H, Ito M, Tsuchida M, Sakaguchi H, Doisaki S, Tanaka M, Shimada A, Takahashi Y, Kobayashi R, Ito E, Yabe H, Ohga S, Ohara A, Kojima S. Comparison of clinical outcome between children with aplastic anemia and refractory cytopenia of childhood who received immunosuppressive therapy with antithymocyte globulin and cyclosporine. 53th Annual Meeting of the American Society of Hematology. Dec. 11, 2011. San Diego, USA.
- 2) Muramatsu H, Yabe H, Kobayashi R, Kikuchi A, Kudo K, Kawa K, Kato K, Suzui R, Takahashi Y, Inagaki J, Inoue M, Kojima S. Allogeneic bone marrow transplantation from HLA mismatched family donors in children with aplastic anemia. 53th Annual Meeting of the American Society of Hematology. Dec. 12, 2011. San Diego, USA.
- 3) Kudo K, Kobayashi R, Kosaka Y, Tsuchida M, Mugishima H, Ohara A, Yagasaki H, Yabe H, Morimoto A, Takahashi Y, Phga S, Nakahata T, Kojima S. Antithymocyte Globulin (ATG), Cyclosporine (CyA), and Danazol versus ATG and CyA as treatment for children with aplastic anemia: Result of matched-pair analysis. 53th Annual Meeting of the American Society of Hematology. Dec. 11, 2011. San Diego, USA.
- 4) Hasegawa D, Chen XJ, Hirabayashi S, Ishida Y, Watanabe S, Zaike Y, Tsuchida M, Masunaga A, Yoshimi A, Hama A, Kojima S, Ito M, Nakahata T, Manabe A. Clinical characteristics and treatment outcome of refractory cytopenia of childhood (RCC): A prospective registration through the Japanese Society of Pediatric Hematology. 53th Annual Meeting of the American Society of Hematology. Dec. 11, 2011. San Diego, USA.
- 5) Yoshida N, Kikuchi A, Kobayashi R, Yabe H, Kosaka Y, Muramatsu H, Takahashi Y, Kato K, Suzuki R, Ohara A, Kojima S. Outcomes in children with severe aplastic anemia receiving bone marrow transplantation from an HLA-matched family donor or intensive immunosuppressive therapy as first-line treatment. 53th Annual Meeting of the American Society of Hematology. Dec. 12, 2011. San Diego, USA.

国内

- 1) Hama A, Manabe A, Nozawa K, Sakaguchi H, Doiaski S, Muramatsu H, Shimada A, Takahashi Y, Ohara A, Ito M, and Kojima S. Central Review of the Morphology in Childhood Aplastic Anemia and Myelodysplastic Syndrome. 第73回日本血液学会学術集会. 2011年10月14-16日. 名古屋.
- 2) Hasegawa D, Chen XJ, Hirabayashi S, Watanabe S, Zaike Y, Tsuchida M, Masunaga A, Yoshimi A, Hama A, Kojima S, Ito M, Ishida Y, Nakahata T, Manabe A. Refractory Cytopenia of Childhood (RCC): A prospective study using a central review by the JSPH. 第73回日本血液学会学術集会. 2011年10月14-16日. 名古屋.
- 3) Ohba R, Furuyama K, Mnabe A, Ito E, Kojima S, Ozawa K, Harigae H. Characteristics of sideroblastic anemia in Japan – from the analysis of multicenter study. 第73回日本血液学会学術集会. 2011年10月14-16日. 名古屋.
- 4) Shimada A, Goto A, Xu Y, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Noda Y, Kojima S, Ito M. Frequent TP42 mutation in pediatric refractory cytopenia of childhood but rare in aplastic anemia. 第73回日本血液学会学術集会. 2011年10月14-16日. 名古屋.
- 5) Yoshida N, Kikuchi A, Kobayashi R, Yabe H, Kosaka Y, Muramatsu H, Takahashi Y, Kato K, Suzuki R, Ohara A, Kojima S. First line treatment for aplastic anemia in children: transplantation vs. immunosuppressive therapy. 第73回日本血液学会学術集会. 2011年10月14-16日. 名古屋.
- 6) Muramatsu H, Yabe H, Kobayashi R, Kikuchi A, Kudo K, Kawa K, Kato K, Suzuki R, Takahashi Y, Inagaki J, Inoue M, Kojima S. Allogeneic stem cell transplantation from HLA-mismatched family donors in children with AA. 第73回日本血液学会学術集会. 2011年10月14-16日. 名古屋.
- 7) Olfat M.M. Ismael, Shimada A, Hama A, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Yoshida N, Takahashi Y, Kojima S. Mutation profile of childhood Polycythaemia Vera and Essential Thrombocytosis. 第73回日本血液学会学術集会. 2011年10月14-16日. 名古屋.
- 8) Doisaki S, Muramatsu H, Mori M, Sato M, Kawaguchi H, Kinoshita A, Hibi Y, Yamada K, Hoshino H, Kiyoi H, Yoshida N, Sakaguchi H, Hama A, Shimada A, Takahashi Y, Kojima S. Somatic mosaicism for oncogenic G12D NRAS mutation associated with juvenile myelomonocytic leukemia. 第73回日本血液学会学術集会. 2011年10月14-16日. 名古屋.
- 9) Sakaguchi H, Muramatsu H, Doisaki S, Yoshida N, Hama A, Shimada A, Takahashi Y, Atsushi Manabe, Kojima S. Aberrant Dna methylation in juvenile myelomonocytic leukemia. 第73回日本血液学会学術集会. 2011年10月14-16日. 名古屋.
- 10) Bustos I, Takahashi Y, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Shimada A, Hama A, Kojima S. Immune reconstitution after unmanipulated HLA haploidentical with antithymoglobulin. 第73回日本血液学会学術集会. 2011年10月14-16日. 名古屋.
- 11) 坂口大俊、小島勢二. 造血不全における血球テロメア長の測定. 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.
- 12) 伊藤悦朗、照井君典、土岐力、小島勢二、小原明、大賀正一、森尾友宏、浜口功、倉光球、菅野仁、小川誠司、佐藤亜以子. 先天性赤芽球癆 (Diamond-Blackfan 貧血) の効果的診断法の確立に関する研究. 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.
- 13) 嶋田明、Olfat Ismael、濱麻人、坂口大俊、土居崎小夜子、村松秀城、高橋義行、福田実、宮島雄二、堀部敬三、小島勢二. 小児 CMML は稀で、JMML とは異なった遺伝子変異がみられる. 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.
- 14) 後藤綾、嶋田明、徐銀燕、坂口大俊、土居崎小

夜子、村松秀城、濱麻人、高橋義行、野田幸弘、伊藤雅文、小島勢二. 小児不応性血球減少症における TP53 遺伝子変異. 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.

15) 濱麻人、村松秀城、伊藤雅文、土田昌宏、坂口大俊、土居崎小夜子、田中真己人、嶋田明、高橋義行、小林良二、伊藤悦朗、矢部普正、大賀正一、小原明、小島勢二. 小児再生不良性貧血の骨髓像：117 例のセントラルレビューによる検討. 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.

16) Olfat Ismael、嶋田明、徐銀燕、坂口大俊、土居崎小夜子、村松秀城、濱麻人、高橋義行、吉田奈央、秋田直洋、角南勝介、大塚欣也、浅田洋二、藤崎弘之、小島勢二. 小児真性多血症と本態性血小板血症の遺伝子変異プロファイル. 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

先天性角化不全症の効果的診断法の確立と治療ガイドラインの作成に関する研究

血球テロメア長測定、遺伝子変異検査

研究分担者 高橋 義行（名古屋大学大学院医学系研究科成長発達医学 准教授）

研究要旨： 典型的な先天性角化不全症（Dyskeratosis congenita, DC）は皮膚、爪、口腔粘膜に特徴的な所見がみられる先天性骨髄不全症候群である。特発性骨髄不全症候群や特発性肺線維症の一部に同一の遺伝子変異がみられることから、本症の不全型が潜んでいることが判明した。本症の原因遺伝子としてはこれまで7種のテロメア関連遺伝子が同定されているが、不全型の多くは、診断に至らず特発性骨髄不全症候群や特発性肺線維症として治療されているものと思われる。本症には特発性骨髄不全症候群の第1選択薬である免疫抑制療法の効果はみられないため、適切な診断がなされることは患者にとって重要である。適切な診断のため末梢血のリンパ球テロメア長を Flow FISH 法でスクリーニングし、テロメア長の短縮がある検体について、既知の7種類のテロメア関連原因遺伝子について変異の有無を検討する。この診断法の確立について分担研究を行った。

A. 研究目的

Dyskeratosis congenita (DC) の患者細胞はテロメア長が短縮しており、これはテロメラーゼ複合体を形成する遺伝子の異常に起因する。近年、特発性再生不良性貧血 (Aplastic Anemia; AA) 患者の中に、身体的特徴を有さない潜在的な DC 患者が存在する事が判明した。フローサイトメトリーによる血球リンパ球のテロメア長の測定が DC 患者のスクリーニングに有効であるか検討するとともに、DC および DC が疑われる患者における責任遺伝子の同定を試みた。

B. 研究方法

2011年3月1日から2012年2月29日までの間に、当院および他院にて AA と診断された患者 97 例について、診断時に採取した末梢血を用いてテロメア長を測定した。健常人と比較して著明な短縮を認めた場合、テロメア関連遺伝子の変異解析 (TERC, TERT, DKC1, TINF2, NOP10, NHP2, TCAB1) を行った。

また、当院および他院にて、DC が疑われる患者から採取した末梢血を用いてテロメア長を測定し、テロメア関連遺伝子の変異解析を行った。

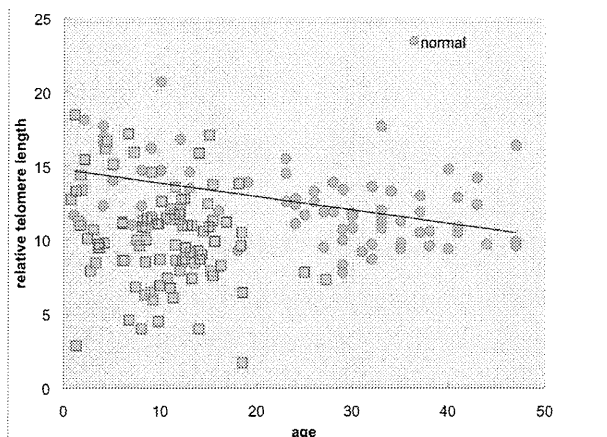
（倫理面への配慮）

患者検体は連結可能匿名化を行い、検査において患者を特定できないようにした。また、テロメア長測定およびテロメア関連遺伝子検査に際しては、当院倫理審査委員会にて承認を受けた研究計画書、患者説明書および同意書を用いて、患者もしくはその親権者から書面にて同意を得た。

C. 研究結果

AA と診断された 97 例のテロメア長を測定したところ、85 例が年齢-テロメア長標準直線を下回った (図)。内 12 例において $-3SD$ 以上の著明な短縮を認めた。これらの症例はいずれも DC に特徴的な臨床徴候は示さなかった。このうち 1 例は Diamond-Blackfan 貧血の症例であった。また、別の 1 例では小頭症を伴う多発奇形のある乳児症例で、

何らかの先天性造血不全症が疑われた。これら 12 例において遺伝子検査を行ったが、既知のテロメア関連遺伝子の異常を認めなかった。



図

また、院外施設の呼吸器内科より特発性肺線維症の成人症例のテロメア長測定の依頼があり、テロメア長測定を実施したところ、軽度のテロメア長短縮 ($-1.7SD$) を認めた。この症例について遺伝子検査を行ったところ *DKC1* 遺伝子の変異を認めた。

さらに、院外施設の小児科からの紹介で DC 類縁疾患である *Revesz* 症候群疑いの乳児症例の遺伝子検査を行ったところ *TINF2* 遺伝子の変異を認めた。

D. 考察

AA と診断される群の中の潜在性 DC を診断する目的でテロメア長測定を行った。 $-3SD$ 以上のテロメア長短縮を認めた症例でもテロメア関連遺伝子の異常を認めなかった。臨床的に DC と診断される患者の半数近くは原因遺伝子不明であり、このような症例では既知のテロメア関連遺伝子異常がないからと言って完全には潜在性 DC は否定できないと考えられる。

テロメア長と AA に対する免疫抑制療法 (IST) 反応性に関してもその関連性が報告されて来っており、今回、テロメア長測定した AA 症例での IST 反応性を集計して、今後の検討に生かしていく必要がある。

E. 結論

AA 患者におけるテロメア長測定は、潜在性 DC の

診断に有用である。さらに今後は、AA 患者におけるテロメア長と IST 反応性について症例を集積して検討し、AA 患者におけるテロメア長測定意義の新たな側面を検討していく。

F. 研究発表

1. 論文発表

Asai D, Osone S, Imamura T, Sakaguchi H, Nishio N, Kuroda H, Kojima S, Hosoi H. Allo-SCT in a patient with CRMCC with aplastic anemia using a reduced intensity conditioning regimen. *Bone Marrow Transplant*. 2011 Nov 14.

2. 学会発表

坂口大俊 造血不全症における血球テロメア長の測定意義 第 53 回日本小児血液がん学会学術集会 シンポジウム 前橋 2011.11.26

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

先天性角化不全症の効果的診断法の確立と治療ガイドラインの作成に関する研究

分担研究項目：小児領域における診断・治療ガイドラインの策定
研究分担者 伊藤 悦朗（弘前大学大学院医学研究科小児科学 教授）

研究要旨： 先天性角化不全症（DKC）は皮膚、爪、口腔粘膜に特徴的な所見がみられる先天性骨髄不全症候群であるが、特発性骨髄不全症候群の一部に、身体的特徴はみられないものの、同一の遺伝子変異がみられる不全型が発見されており、肝線維症やびまん性肺疾患からも、DKCと同一の遺伝子異常が発見されたことから“Telomere disease”として新しい疾患概念が提唱されている。本症の原因遺伝子としては7種のテロメア関連遺伝子が同定されているが、直接シーケンス法で原因遺伝子が同定されるのは半数にすぎない。今回、初めて全国的な疫学調査を行い、34例が把握された。二次調査により、本邦症例の実態を解明し、診断ガイドラインを作成する。

A. 研究目的

先天性角化不全症（DKC）は皮膚、爪、口腔粘膜に特徴的な所見がみられる先天性骨髄不全症候群である。特発性骨髄不全症候群の一部に、身体的特徴はみられないものの、同一の遺伝子変異がみられる不全型が発見されており、臨床像が多岐に渡るため診断に至っていない症例があることが予想される。本邦の患者が正確な診断を受けられるように、全国的な疫学調査を行い、診断ガイドラインを作成することを目的とする。

B. 研究方法

一昨年度は880施設を対象に1次アンケート調査をおこない、過去10年間のDKCの症例数の把握を行った。本年度は、この結果をもとに2次調査を行い、発症頻度や臨床像を解析する。この結果に基づき、診断ガイドラインを作成する。

（倫理面への配慮）

二次疫学調査は、中心となる名古屋大学の倫理委員会の審査・承認を受けた上で行う。

C. 研究結果

1次アンケート調査の結果、69%の回答が得られた。その結果、34例のDKCが把握された。この34例を対象に病像、治療法、予後を含む2次調査をおこない、現在集計中である。

D. 考察

典型的なDKCは皮膚、爪、口腔粘膜に特徴的な所見がみられる先天性骨髄不全症候群である。今回1次調査により、皮膚科領域からの症例が初めて把握された。我が国では、これまで臨床診断された本症の報告例は15例に満たなかったが、本調査により34例もの症例が把握された。テロメア長の測定や遺伝子解析により、診断の確定を進めている。

本症には特発性骨髄不全症候群の第1選択薬である免疫抑制療法は無効である。不全型の患者が不必要な治療を受け健康被害を受けないようにするためにも治療ガイドラインの作成が必要であると考えられる。

E. 結論

今回の疾患登録調査により、本疾患の本邦における実態がより明らかになってきた。しかしながら、診断法の開発により潜在する症例がさらに見出される可能性は高いと考える。今後、我が国のDCの病像、治療法、予後を含む2次調査の結果をもとに診療ガイドラインの改良を行う。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 (in press).
- 2) 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 Jan 18. [Epub ahead of print].
- 3) Kato K, Yoshimi A, Ito E, Oki K, Hara J, Nagatoshi Y, Kikuchi A, Kobayashi R, Nagamura-Inoue T, Kai S, Azuma H, Takanashi M, Isoyama K, Kato S; Japan Cord Blood Bank Network. Cord blood transplantation from unrelated donors for children with acute lymphoblastic leukemia in Japan: the impact of methotrexate on clinical outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17(12):1814-21.
- 4) 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.

- 5) 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.
- 6) 伊藤悦朗、小島勢二、大賀正一、小原明。「難治性貧血の診療ガイド」編集委員会：Ⅶ 先天性骨髄不全症 4. Diamond-Blackfan 貧血/診療の参照ガイド 難治性貧血の治療ガイド 特発性造血障害の病態・診断・治療の最新動向 pp. 220-227 南江堂 2011.

2. 学会発表

- 1) 菅野仁, 入部雄司, 内山智貴, 青木貴子, 小倉浩美, 大賀正一, 伊藤悦朗, 藤井寿一:ダイアモンド・ブラックファン貧血の新規バイオマーカー同定.第73回日本血液学会学術集会、名古屋 (2011年10月14~16日).
- 2) 入部雄司, 青木貴子, 山本俊至, 古川徹, 三谷昌平, 土岐力, 大賀正一, 伊藤悦朗, 小倉浩美, 藤井寿一, 菅野仁:次世代シーケンシングデータからのDiamond - Blackfan 貧血関連遺伝子の探索. 第73回日本血液学会学術集会、名古屋 (2011年10月14~16日).
- 3) Kuramitsu M, Matsubara 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. 第73回日本血液学会学術集会 (2011年10月～16日).
- 4) Toki T, Kobayashi E, Kanezaki R, Wang RN, Terui K, Kanegane H, Maeda M, Endo M, Mizuochi T, Adachi S, Hayashi Y, Shimizu R, Yamamoto M, and 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、名古屋 (2011年10月14～16日).
- 5) 花田勇、照井君典、土岐力、工藤耕、佐藤知彦、神尾卓哉、佐々木伸也、高橋良博、林泰秀、杉田完爾、小島勢二、小池健一、小阪嘉之、小林正夫、伊藤悦朗. ダウン症候群関連 ALL における *JAK2* および *CRLF2* 遺伝子異常の解析. 第53回日本小児血液・がん学会学術集会、前橋市 (2011年11月25～27日).
- 6) 伊藤悦朗、照井君典、土岐力、小島勢二、小島勢二、大賀正一、森尾友宏、浜口功、倉光球、菅野仁、小川誠司、佐藤亜以子. 先天性赤芽球癆 (Diamond-Blackfan 貧血) の効果的診断の確立に関する研究 (シンポジウム). 第53回日本小児血液・がん学会学術集会、前橋市 (2011年11月25～27日).
- 7) 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、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・がん学会学術集会、前橋市 (2011年11月25～27日).
- 8) Toki T, Kobayashi E, Kanezaki R, Wang RN, Terui K, Kanegane H, Maeda M, Endo M, Mizuochi T, Adachi S, Hayashi Y, Shimizu R, Yamamoto M, and Ito E. GATA1 mutants lacking Rb-binding motif observed in transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome. 第53回アメリカ血液学会, 米国・サンディエゴ (2011年12月10日～13日).
- 9) Hanada I, Terui T, MD, Toki T, Kudo K, Sato T, Kamio T, Sasaki S, Takahashi Y, Hayashi Y, Sugita K, Kojima S, Koike K, Kosaka Y, Kobayashi M and Etsuro Ito E. Lower incidence of *CRLF2* rearrangements in Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia in Japan. 第53回アメリカ血液学会, 米国・サンディエゴ (2011年12月10日～13日).

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし