

2012 31078A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小島 勢二

平成 25 (2013) 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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小島 勢二

平成 25 (2013) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告書	
先天性角化不全症の効果的診断法の確立と治療ガイドラインの作成に関する研究 (研究総括、中央診断、データ管理) ……………	1
名古屋大学大学院医学系研究科 小児科学	小島 勢二
II. 分担研究報告書	
血球テロメア長測定、遺伝子変異検査 ……………	9
名古屋大学医学部附属病院 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 ……………	11
弘前大学大学院医学研究科 小児科学	伊藤 悦朗
小児期造血障害疾患登録による先天性角化不全症疫学データベース構築 ……………	14
東邦大学医療センター大森病院 輸血部	小原 明
骨髄生検の病理診断 ……………	16
名古屋第一赤十字病院 病理部	伊藤 雅文
不全型先天性角化不全症の新規診断法の開発 ……………	18
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 ……………	21
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 ……………	22
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
骨髄不全の病態診断における血漿トロンボポエチン測定の意義 ……………	24
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 ……………	27
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 ……………	28
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 30
東海大学医学部 再生医療科学 矢部 普正

テロメア長の短縮を認めた Diamond-Blackfan 貧血の 1 例における網羅的遺伝子解析
..... 34
富山大学附属病院 小児科 金兼 弘和

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 36

IV. 研究成果の刊行物・別冊 38

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

日本小児血液学会と協力して、先天性角化不全症（DKC）の中央診断システムを確立したが、3年間に中央診断で本症と診断された症例は3例のみであった。不全型DKCのスクリーニングとして、再生不良性貧血（AA）と診断された95例の血球テロメア長を測定したところ、6例（6.3%）において-3SD以上の著明なテロメア長の短縮がみられた。6例について7種類のテロメア関連遺伝子の変異の有無について検討したが、遺伝子変異は検出されなかった。既知の原因遺伝子の変異が検出されなかった16例について、次世代シーケンサーによる全エクソンシーケンスをおこなったところ、サンガー法では原因遺伝子が同定されなかった5例において既知の原因遺伝子が同定された。次世代シーケンサーによる診断は、臨床上也も有用であると考えられた。

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 小児科学 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 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 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 講師

A. 研究目的

本疾患は、臨床像が多岐にわたることから、とくに不全型には遺伝子診断が正確な診断には必須である。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。平成23年度に厚生労働省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、同班と連携して平成24年度には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。なお、DKCの確定診断には、上記の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。昨年に引き続いて、Flow・FISH法を用いて血球テロメア長を測定することが、不全型を含めたDKCのスクリーニングに有用であるかを検討する。最近、米国NIHグループから、定量的PCR法による血球テロメア長の測定は、再生不良性貧血患者において、再発、骨髄異形性症候群(MDS)を含むクローン性疾患への移行、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DKCのみならず、AAにおいても注目されている。一方、我々のFlow・FISH法による前方視的検討では、血球テロメア長の測定はAA患者における免疫抑制療法への反応の予測に有用であった。この結果、平成24年度から開始予定の小児・成人再生不良性貧血を対象とした免疫抑制療法の国際共同臨床試験では、名古屋大学で一括して血球テロメア長を測定することが予定されている。本研究の推進により、AA患者における血球テロメア長の測定意義が明らかになることが期待される。

B. 研究方法

昨年度までに続いて、末梢血や骨髄塗抹標本を名古屋大学と聖路加国際病院で、骨髄生検標本は分担研究者である伊藤(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。小島/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い、さらにDKC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)の変異の有無をサンガー法で検討する。平成23年度に、小島を班長に、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。次世代シーケンサーによる候補遺伝子の検索は東大小川研でおこない、当研究班は候補遺伝子のバリデーションと機能解析を担当する。また、平成24年度からは、成人・小児再生不良性貧血患者を対象に、日本、韓国、中国による国際共同臨床試験が開始されることになっていることから、小児のみならず、成人患者についても、血球テロメア長のスクリーニングを実施する。

平成23年度に出版した“特発性造血障害疾患の診療の参照ガイド”ではDKC症例に対する同種骨髄移植の前治療として、フルダラビンを基本とした骨髄非破壊的前処置を推奨した。移植症例のアンケート調査をおこない、推奨した前処置の、安全性と有効性について検証する。

(倫理面への配慮)

小児血液がん学会としておこなう疾患登録事業は、疫学研究倫理指針に準拠した臨床研究として、すでに学会倫理審査委員会で承認されている。調査にあたっては、個人情報を守秘を厳守し、データの取り扱いに注意する。中央診断事業についても、患者検体の匿名化を図る。患者検体をもちいた研究の実施にあたっては、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

2006年から2011年の間に、日本小児血液がん学会疾患登録事業には総計535例の造血不全症が登録されたが、DKCは7例にすぎず、本症はわが国においては極めて稀少な疾患である。一方、2009年2月から2012年6月までに、700例の中央診断がおこなわれ総計60例の先天性骨髄不全症候群が診断された。そのうちDKCは3例のみであった。また、2012年2月1日から2013年1月31日までの1年間に中央診断で造血不全と診断された95例のテロメア長をFlow・FISH法で測定したところ、6例(6.3%)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DKCに特徴的な臨床徴候は示さなかった。これら16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。

そこで、既知の原因遺伝子に変異を認めず、テロメア長の短縮が確認されたDKCおよび不全型DKC症例16例を対象に次世代シーケンサーによる全エクソンのシーケンスをおこなった。5例においては、サンガー法による検討では原因遺伝子が同定できなかったが、全エクソン解析では、DKC1(2例)、TINF2(2例)、TERT(1例)の変異が検出された。また、RECQL4、ATM、BLMなど早老症や遺伝子修復に関連する既知の常染色体劣性遺伝性疾患のヘテロ変異が高率に認められ、DKCの病態への関与が考えられた。

DKCの原因遺伝子であるDKC1はリボゾームのバイオゲネシスにも重要な役割をはたしている。一方、先天性造血不全症のひとつであるDiamond-Blackfan貧血(DBA)では、リボゾーム蛋白遺伝子の変異が50%にみられ、リボゾーム機能不全が病因と考えられている。今回、リボゾーム蛋白の変異が同定されていない46例のDBAに対して全エクソンシーケンスをおこなったが、DKC1を含めてテロメア関連遺伝子の変異はみられなかった。

日本小児血液学会のおこなう中央診断では、小児期造血不全症を骨髄病理組織所見に基づき、AA、

Refractory cytopenia of childhood (RCC)の2群に分けている。血球テロメア長の短縮が、MDSや急性骨髄性白血病への移行の予測因子となりうるかを検討するために、血球テロメア長と病理組織像との関連について検討をおこなった。AAにおけるテロメア長の平均値は-1.1SD(-3.4~+1.6)、RCCにおけるテロメア長の平均値は-1.3SD(-4.1~+0.8)で差がみられなかった($p=0.82$)。また、-2SD以下の短縮を示す症例の割合もAAで11/47、RCCで11/42と同様に差がなかった($p=0.76$)。

本研究班では、DKCの移植前治療としてFlu、CY、ATG、TAI/TBI(3Gy)を推奨している。平成24年度に、本前治療も用いて5歳男児例が非血縁ドナーから、同種骨髄移植を受けたが、生着は順調で、合併症もなく、順調に経過している。

D. 考察

この3年間に、日本小児血液学会による中央診断登録症例はすでに700例に達しているが、臨床症状からDKCと診断された症例は3例(0.4%)に過ぎない。一方、AAと診断され血球テロメア長を測定した95例のうち、-3SD以上の著明な短縮がみられた症例は6例(6.3%)にみられた。テロメア長の著明な短縮を認めた症例が潜在性DKCである可能性を考慮して、既知のテロメア関連遺伝子異常の有無をサンガー法で検討したが、変異は同定されなかった。しかし、臨床的にDKCと診断される患者の半数近くは原因遺伝子が不明であり、このような症例で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潜在性DKCは否定できないと考えられる。そこで、テロメア長が-3SD以上の症例や既知の原因遺伝子をも認めず臨床的にDKCと診断された16例を対象に次世代シーケンサーを用いて、全エクソーム解析をおこなった。5例において、サンガー法では同定できなかった既知の原因遺伝子を検出可能であった。DKCのように、原因遺伝子の種類が多く、変異も一塩基変異から大欠失変異や片アリル欠失

まで多彩な疾患の遺伝子診断には、次世代シーケンサーによる診断が、今後は臨床現場でも用いられるようになると思われる。

本症を正確に診断するには遺伝子診断が不可欠であるが、未だ、半数の症例においては原因遺伝子が同定されず、新規原因遺伝子の発見が待たれる。本研究班においても候補遺伝子があがっており、現在、機能解析を進めている。

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AA症例では、テロメア長が保たれている例に比べてMDSに移行するリスクが高く、予後が不良である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AA患者の中には、MDSとの境界例や、治療抵抗性のAA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AAの予後を予測する上で有用な可能性がある。そこで、骨髄病理組織像と血球テロメア長との関連について検討したが、両者に相関はみられなかった。現在進行中のAAに対する免疫抑制療法の前方視的研究では、治療前に血球テロメア長の測定を義務づけているので、今後はテロメア長の測定が、治療への反応や予後を予測する因子として有用であるかが明らかになるであろう。

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。DKCに対する非血縁ドナーからの移植成績は、従来、極めて不良であったが、本研究班が策定したDKCに対する“診療ガイド”にしたがい、研究協力施設で非血縁者間移植をおこなった症例は、造血能の回復が得られ順調に経過している。DKCの移植後長期生存例には、肺線維症などの晩期合併症が知られており、今後の注意深い、経過観察が必要であろう。

E. 結論

小児期骨髄不全症を対象に中央診断事業を実施しているが、これまでに、本症と診断された症例は3例のみで、わが国において本症は極めて稀な疾患である。潜在性DKCのスクリーニング目的で、AA患者の血球テロメア長を測定している

が、一部のAA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、現在、次世代シーケンサーによる新規原因遺伝子の探索が進行中である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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. *Br J Haematol*. 2012 Feb;156(3):316-25.
- 3) Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, Wang R, 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 Mar 8;119(10):2376-84.
- 4) Matsuda K, Yoshida N, Miura S, Nakazawa Y, Sakashita K, Hyakuna N, Saito M, Kato F,

- Ogawa A, Watanabe A, Sotomatsu M, Kobayashi C, Ito T, Ishida F, Manabe A, Kojima S, Koike K. Long-term haematological improvement after non-intensive or no chemotherapy in juvenile myelomonocytic leukaemia and poor correlation with adult myelodysplasia spliceosome-related mutations. *Br J Haematol.* 2012 Jun;157(5):647-50.
- 5) Yoshida N, Doisaki S, Kojima S. Current Management of Juvenile Myelomonocytic Leukemia and the Impact of RAS Mutations. *Paediatr Drugs.* 2012 Jun 1;14(3):157-63.
- 6) 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.* 2012 Aug;47(8):1126-7.
- 7) Kawabata H, Doisaki S, Okamoto A, Uchiyama T, Sakamoto S, Hama A, Hosoda K, Fujikura J, Kanno H, Fujii H, Tomosugi N, Nakao K, Kojima S, Takaori-Kondo A. A case of congenital dyserythropoietic anemia type 1 in a Japanese adult with a CDAN1 gene mutation and an inappropriately low serum hepcidin-25 level. *Intern Med.* 2012;51(8):917-20.
- 8) Kojima S. Treatment of acquired aplastic anemia in children. *Hematology.* 2012 Apr;17 Suppl 1:S11-4.
- 9) Shimada A, Takahashi Y, Muramatsu H, Hama A, Ismael O, Narita A, Sakaguchi H, Doisaki S, Nishio N, Tanaka M, Yoshida N, Matsumoto K, Kato K, Watanabe N, Kojima S. Excellent outcome of allogeneic bone marrow transplantation for Fanconi anemia using fludarabine-based reduced-intensity conditioning regimen. *Int J Hematol.* 2012 Jun;95(6):675-9.
- 10) Jerez A, Sugimoto Y, Makishima H, Verma A, Jankowska AM, Przychodzen B, Visconte V, Tiu RV, O'Keefe CL, Mohamedali AM, Kulasekararaj AG, Pellagatti A, McGraw K, Muramatsu H, Moliterno AR, Sekeres MA, McDevitt MA, Kojima S, List A, Boultonwood J, Mufti GJ, Maciejewski JP. Loss of heterozygosity in 7q myeloid disorders: clinical associations and genomic pathogenesis. *Blood.* 2012 Jun 21;119(25):6109-17.
- 11) Yang W, Zhang P, Hama A, Ito M, Kojima S, Zhu X. Diagnosis of acquired bone marrow failure syndrome during childhood using the 2008 World Health Organization classification system. *Int J Hematol.* 2012 Jul;96(1):34-8.
- 12) Ismael O, Shimada A, Hama A, Elshazley M, Muramatsu H, Goto A, Sakaguchi H, Tanaka M, Takahashi Y, Yinyan X, Fukuda M, Miyajima Y, Yamashita Y, Horibe K, Hanada R, Ito M, Kojima S. De novo childhood myelodysplastic/myeloproliferative disease with unique molecular characteristics. *Br J Haematol.* 2012 Jul;158(1):129-37.
- 13) Wang X, Muramatsu H, Sakaguchi H, Xu Y, Narita A, Tsumura Y, Doisaki S, Tanaka M, Ismael O, Shimada A, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Mutation in the THPO gene is not associated with aplastic anaemia in Japanese children. *Br J Haematol.* 2012 Aug;158(4):553-5.
- 14) Doisaki S, Muramatsu H, Shimada A, Takahashi Y, Mori-Ezaki M, Sato M, Kawaguchi H, Kinoshita A, Sotomatsu M, Hayashi Y, Furukawa-Hibi Y, Yamada K, Hoshino H, Kiyoi H, Yoshida N, Sakaguchi H, Narita A, Wang X, Ismael O, Xu Y, Nishio N, Tanaka M, Hama A, Koike K, Kojima S.

- Somatic mosaicism for oncogenic NRAS mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2012 Aug 16;120(7):1485-8.
- 15) Sakaguchi H, Nakanishi K, Kojima S. Inherited bone marrow failure syndromes in 2012. *Int J Hematol*. 2013 Jan;97(1):20-9.
- 16) Takahashi Y, Muramatsu H, Sakata N, Hyakuna N, Hamamoto K, Kobayashi R, Ito E, Yagasaki H, Ohara A, Kikuchi A, Morimoto A, Yabe H, Kudo K, Watanabe KI, Ohga S, Kojima S; on behalf of the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. Rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine as first-line therapy for children with acquired aplastic anemia. *Blood*. 2013 Jan 31;121(5):862-863.
- 6) Sakaguchi H, Muramatsu H, Wang X, Narita A, Doiaski S, Yoshida N, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Manabe A, Kojima S. Clinical significance of aberrant DNA methylation in juvenile myelomonocytic leukemia. 6th International Symposium on MDS and Bone Marrow Failure Syndromes in Childhood. Nov. 7, 2012. Prague, Czech Republic.
- 7) Sakaguchi H, Hama A, Wang X, Narita A, Doiaski S, Muramatsu H, Nakanishi K, Takahashi Y, Tsuchida M, Kobayashi R, Ito E, Yabe H, Ohga S, Ohara A, Hasegawa D, Manabe A, Ito M, Kojima S. Lymphocyte Telomere Length in Pediatric Aplastic Anemia, Refractory Cytopenia of Childhood, and Refractory Cytopenia with Multi-lineage Dysplasia. 6th International Symposium on MDS and Bone Marrow Failure Syndromes in Childhood. Nov. 7, 2012. Prague, Czech Republic.
- 8) Hama A, Manabe A, Ito M, Hasegawa D, Nozawa K, Kawashima N, Narita A, Sakaguchi H, Doiaski S, Muramatsu H, Nakanishi K, Takahashi Y, Ohara A, Kojima S. A comparison of clinical and laboratory findings among aplastic anemia, RCC and RCMD in 219 cases registered to the central review system. 6th International Symposium on MDS and Bone Marrow Failure Syndromes in Childhood. Nov. 7, 2012. Prague, Czech Republic.
- 9) Muramatsu H, Doiaski S, Shimada A, Takahashi Y, Ezaki M, Sato M, Kawaguchi H, Kinoshita A, Sotomatsu M, Hayashi Y, Furukawa Y, Yamada K, Hoshino H, Kiyoi H, Yoshida N, Sakaguchi H, Sakaguchi H, Narita A, Wang X, Ismael O, Xu Y, Nishio N, Tanaka M, Hama A, Koike K, Kojima S. Somatic mosaicism for oncogenic NRAS

2. 学会発表 海外

- 1) Kojima S. Treatment of Acquired Aplastic Anemia in Children. 34th International Society of Hematology. Apr. 28, 2012. Cancun, Mexico.
- 2) Kojima S. Treatment of Acquired Aplastic Anemia in Children. Asia Pacific Transplant and Hematology Forum 2012. May. 12, 2012. Taipei, Taiwan.
- 3) Kojima S. Therapeutic Advances in Treatment of Aplastic Anemia. 2nd Annual Updates on Breakthrough in Hematology. Sep. 1, 2012. Bangkok, Thailand.
- 4) Kojima S. Asian Experience in Treatment of Aplastic Anemia. Aplastic Anemia Advisory Board Meeting. Oct. 4, 2012. Cambridge, USA.
- 5) Kojima S. Unrelated donor transplant vs Immunosuppressive therapy in patients with severe aplastic anemia. 17th Meeting of the APBMT Group. Oct. 27, 2012. Hyderabad, India.

- mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. Nov. 7, 2012. Prague, Czech Republic.
- 10) Muramatsu H, Sakaguchi H, Koike K, Sanada M, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Makishima H, Wang X, Xu Y, Doiaski S, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Yoshida N, Maciejewski JP, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Comprehensive genetic analysis by deep sequencing in juvenile myelomonocytic leukemia. Nov. 7, 2012. Prague, Czech Republic.
- 11) Hama A, Takahashi Y, Yoshida N, Ito M, Kawashima N, Narita A, Sakaguchi H, Doiaski S, Muramatsu H, Nakanishi K, Matsumoto K, Kato K, Kojima S. Risk factors for Donor-Type aplasia after bone marrow transplant in children with acquired bone marrow failure syndrome. 6th International Symposium on MDS and Bone Marrow Failure Syndromes in Childhood. Nov. 8, 2012. Prague, Czech Republic.
- 12) Kojima S. 小児再生不良性貧血の診断および治療をめぐる諸問題. Asian Aplastic Anemia expert meeting. Dec. 9, 2012. Atlanta, USA.
- 13) Muramatsu H, Okuno Y, Sakaguchi H, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Makishima H, Wang X, Xu Y, Doiaski S, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Yoshida N, Maciejewski J.P, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Whole exome analysis reveals spectrum of gene mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. Dec. 9, 2012. Atlanta, USA.
- 14) Takahashi Y, Ohara A, Kobayashi R, Yabe H, Kikuchi A, Yagasaki H, Morimoto A, Watanabe K, Ito E, Kudo K, Fukuda A, Sakamoto S, Kasahara M, Nakazawa A, Kojima S. Expression of human leukocyte antigen B61 is associated with idiopathic aplastic anemia, hepatitis-associated Aplastic Anemia and Fulminant Hepatic Failure in Children. Dec. 10, 2012. Atlanta, USA.
- 15) Hama A, Takahashi Y, Yoshida N, Ito M, Narita A, Sakaguchi H, Doiaski S, Muramatsu H, Nakanishi K, Matsumoto K, Kato K, Kojima S. Risk factors for Donor-Type aplasia after bone marrow transplant in children with acquired bone marrow failure syndrome. Dec. 10, 2012. Atlanta, USA.
- 16) Kojima S. Upfront Transplant Strategies in Aplastic Anemia. BTG2013. Feb. 23, 2013. Hong Kong, China.
- 国内
- 1) Takahashi Y, Ohara A, Kobayashi R, Yabe H, Kikuchi A, Yagasaki H, Morimoto A, Watanabe K, Ohga S, Ito E, Kudo K, Fukuda A, Sakamoto S, Kasahara M, Nakazawa A, Kojima S. HLA-B61 is associated with idiopathic AA, hepatitis associated AA and fulminant hepatic failure in children. 第74回日本血液学会学術集会. 2012年10月19日. 京都.
- 2) Hama A, Ito M, Hasegawa D, Nozawa K, Narita A, Sakaguchi H, Doiaski S, Muramatsu H, Takahashi Y, Ohara A, Manabe A, Kojima S. Characteristics of bone marrow findings in children with post-hepatitis bone marrow failure. 第74回日本血液学会学術集会. 2012年10月19日. 京都.
- 3) Sakaguchi H, Hama A, Muramatsu H, Narita A, Doiaski S, Takahashi Y, Tsuchida M, Kobayashi R, Ito E, Yabe H, Ohga S, Ohara A, Hasegawa D, Manabe A, Ito M, Kojima S. Telomere Length of Lymphocyte in Pediatric Aplastic Anemia and Refractory

Cytopenia of Childhood. 第 74 回日本血液学会学術集会. 2012 年 10 月 19 日. 京都.

- 4) Shimada A, Olfat A, Xu Y, Goto A, Nagai T, Narita A, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Yamada Y, Hayashi Y, Kojima S. JAK2 V617F mutation in pediatric myeloproliferative neoplasm. 第 74 回日本血液学会学術集会. 2012 年 10 月 20 日. 京都.
- 5) Wang X, Muramatsu H, Sakaguchi H, Xu Y, Narita A, Tsumura Y, Doisaki S, Tanaka M, Ismael O, Shimada A, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Mutation in the c-MPL gene is not associated with aplastic anemia in Japanese children. 第 74 回日本血液学会学術集会. 2012 年 10 月 20 日. 京都.
- 6) 土居崎小夜子、成田 敦、坂口大俊、村松秀城、濱 麻人、中西康詞、高橋義行、小島勢二、神谷尚宏、真部 淳、多賀 崇. Congenital dyserythropoietic anemia における遺伝子診断. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会. 2012 年 11 月 30 日. 横浜.
- 7) 濱 麻人. 小児再生不良性貧血、RCC および RCMD の臨床、検査所見の比較:中央診断登録例 219 例の検討. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会. 2012 年 12 月 2 日. 横浜.
- 8) 小島勢二. 全エクソン解析による先天性骨髄不全症候群に対する新規原因遺伝子の探索. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会. 2012 年 12 月 2 日. 横浜.

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

分担研究項目：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 (不全型 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

2012 年 2 月 1 日から 2013 年 1 月 31 日までの間に、当院および他院にて AA と診断された患者 95 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 -3SD 以上の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。

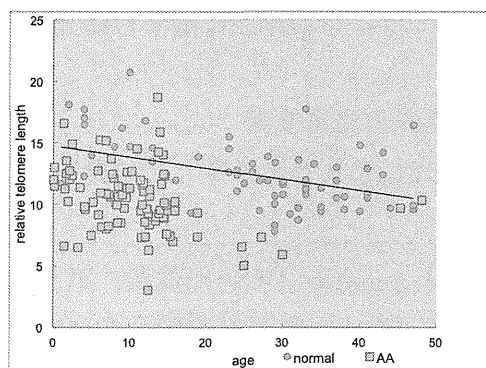
（倫理面への配慮）

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 95 例のテロメア長を測定したところ、83 例が年齢・テロメア長標準直線を下回った (図)。内 6 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。これらの患者を対象にテロメア関連遺伝子のシーケンスを行ったが、変異は認めなかった。



図

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不全型 DC を除外できないと考えられる。次世代シーケンサーでの網羅的遺伝子解析も含めて今後の検討課題である。

テロメア長と AA に対する免疫抑制療法(IST)反応性、AA から骨髄異形成症候群および急性白血病への clonal evolution の発生率、さらには造血細胞移植後合併症の重症頻度の関連を示す報告が散見されており、次年度ではテロメア長とこれら AA の予後との相関について検討していきたい。

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が、AAの予後に影響しうるかどうかは今後の検討課題である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sakaguchi H, Nakanishi K, Kojima S.
Inherited bone marrow failure syndromes in 2012. Int J Hematol. 2013 Jan;97(1):20-9.

2. 学会発表

- 1) 坂口大俊、濱麻人、村松秀城ら 小児再生不良性貧血および不応性貧血におけるリンパ球テロメア長の測定意義 日本血液学会第74回学術集会 京都 2012.10.19
- 2) Hirotohi Sakaguchi, Asahito Hama, Hideki Muramatsu, et al. Lymphocyte Telomere Length in Pediatric Aplastic Anemia and Refractory Cytopenia of Childhood. The 6th International Symposium on MDS and Bone Marrow Failure Syndromes in childhood. Prague, Czech Republic. 2012.11.7

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： 先天性造血不全症の多くは、骨髄不全の他、先天性奇形、発がん素因を共有している。このため、血液学のおよび病理学的鑑別診断が困難である。先天性角化不全症（DKC）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、その一つの *DKC1* はリボソームのバイオゲネシスにも重要な働きをしている。一方、先天性造血不全の一つである Diamond-Blackfan 貧血（DBA）は、リボソーム蛋白（RP）遺伝子の変異が約 50% でみられ、リボソーム機能不全が病因と考えられている。今回、我々は RP 遺伝子変異が同定されていない 46 例の DBA に対して、全エクソンシーケンスを行ったが、*DKC1* を含めテロメア関連遺伝子の変異はみられなかった。この結果より、臨床的に診断される我が国の DBA 疑い症例に DKC が含まれている可能性は低いことが明らかになった。

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。今年度は、骨髄不全の一つである Diamond-Blackfan 貧血（DBA）疑い症例の中に DKC が含まれているかどうかを解析した。

B. 研究方法

原因遺伝子が不明な DBA 臨床検体についてエクソーム解析を行う。ヒト全エクソン領域を target とするベイトと呼ばれる RNA ライブラリーと溶液中でハイブリダイズによりキャプチャし、イルミナ社の高速シーケンサー HiSeq2000 で網羅的な解析を

行う。得られた遺伝子異常は、サンガーシーケンスや次世代シーケンサー（MiSeq）を用いてターゲットシーケンスを行い確認する。

（倫理面への配慮）

本研究で行うゲノム解析は、政府の定める各種倫理指針に準拠し、弘前大学、東京女子医大、国立感染症研究所、東京大学および東京医科歯科大学の倫理審査会の承認の得た上で患者の同意を得た場合に限り検体を研究に使用する。中央診断およびそれに伴う検査については、名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得、患者及び患者保護者の同意を取得した後に行う。

C. 研究結果

これまでに解析した DBA 94 例の内、原因遺伝子の同定されていない 46 例に対して、全エクソン解析を行ったが、*DKC1* の変異を含めテロメア関連遺伝子の変異はみられなかった。

D. 考察

先天性角化不全症 (DKC) は、テロメア長の維持機能が障害されている。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、その一つの *DKC1* はリボソームのバイオゲネシスにも重要な働きをしている。一方、先天性造血不全症の一つである Diamond-Blackfan 貧血 (DBA) は、リボソーム蛋白 (RP) 遺伝子の変異が約 50% でみられる。したがって、DKC も DBA もリボソームの機能不全という共通の分子メカニズムを背景に発症すると考えられる。今回の解析結果では、*DKC1* 変異が原因となる DBA 症例は見つからなかったが、両者を明確に鑑別するため、原因が不明な DKC や DBA では、網羅的な遺伝子解析をさらに進める必要があると考えられた。

E. 結論

臨床的に診断される本邦の DBA 疑い症例に DKC が含まれている可能性は低いことが明らかになった。

F. 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;119:2376-2384.
- 2) Takahashi Y, Muramatsu H, Sakata N, Hyakuna N, Hamamoto K, Kobayashi R, Ito E, Yagasaki H, Ohara A, Kikuchi A, Morimoto A, Yabe H, Kudo K, Watanabe K, Ohga S, Kojima S: Rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine as first-line therapy for children with acquired aplastic anemia. **Blood** 2012 (in press).

- 3) Kawai T, Nishikomori R, Izawa K, Murata Y, Tanaka N, Sakai H, Saito M, Yasumi T, Takaoka Y, Nakahata T, Mizukami T, Nunoi H, Kiyohara Y, Yoden A, Murata T, Sasaki S, Ito E, Akutagawa H, Kawai T, Imai C, Okada S, Kobayashi M, Heike T. Frequent somatic mosaicism of *NEMO* in T cells of patients with X-1 linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. **Blood** 2012;119:5458-5466.
- 4) 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;119:2608-2611.
- 5) Takata K, Sato Y, Nakamura N, Tokunaka M, Miki Y, Yukie Kikuti Y, Igarashi K, Ito E, Harigae H, Kato S, Hayashi E, Oka T, Hoshii Y, Tari A, Okada H, Mohamad AA, Maeda Y, Tanimoto M, Kinoshita T, Yoshino T. Duodenal follicular lymphoma lacks AID but expresses BACH2 and has memory B-cell characteristics. **Mod Pathol.** 2012. [Epub ahead of print].
- 6) Yazaki M, Kamei M, Ito Y, Konno Y, Wang R, Toki T, Ito E. A novel mutation of ribosomal protein s10 gene in a Japanese patient with diamond-blackfan anemia. **J Pediatr Hematol Oncol.** 2012; 34:293-295.

2. 学会発表

- 1) Ito E, Yoshida K, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Toki T, Miyano S, Shiraishi Y, Chiba K, Terui T, Wang R, Sato T, Iribe Y, Ohga S, Kuramitsu M, Hamaguchi I, Ohara A, Kudo K, Kamimaki I, Hara J, Sugita K, Matsubara K, Koike K, Ishiguro A, Kawano Y, Kanno H,

Kojima S and Ogawa S. Identification of two new DBA genes, *RPS27* and *RPL27*, by Whole-Exome Sequencing in Diamond-Blackfan Anemia patients. 第54回アメリカ血液学会、米国・アトランタ(2012年12月8日～11日).

- 2) Sato T, Kuramitsu M, Matsubara A, Yoshida K, Toki T, Terui K, Wang R, Kanno H, Morio T, Ohga S, Ohara A, Kitoh T, Kudo T, Kojima S, Ogawa S, Hamaguchi I, Ito E. Frequent mutations in the *RPS17* gene in Japanese DBA Patients. 第74回日本血液学会、京都(2012年10月19日～21日).
- 3) 伊藤悦朗. Diamond-Blackfan貧血の病態解明と診断法の進歩 (シンポジウム 先天性造血障害の病態解明の進歩). 第54回日本小児血液・がん学会学術集会、横浜(2012年11月30日～12月2日).

G. 知的財産の出願・登録状況

なし。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

先天性角化不全症の効果的診断方法の確立と治療ガイドラインの作成に関する研究

分担研究項目：小児期造血障害疾患登録による先天性角化不全症疫学データベース構築
研究分担者 小原 明（東邦大学医療センター大森病院輸血部 教授）

研究要旨： 稀少な先天性角化不全症(DC)研究の基礎となる疫学データベースの構築を実施した。小児血液学会疾患登録事業を元にして小児期造血障害疾患登録を実施し、DCの症例把握に努めている。2006から2011年に535例の小児期造血障害症例が診断されて、7例のDC症例が登録されたが、2011年新規診断DC症例はいなかった。本研究班の活動はこの数年、小児血液学会総会に於いてシンポジウムで取り上げられており、稀少疾患DCは小児血液科医師に認知されている。2010年までの実績（総登録症例数7例・5年間）から外挿されるDCの頻度は極めて低く、2011年診断症例がいなかった事も統計学的には有意な事ではなく、症例の取りこぼしでもない。

A. 研究目的

【背景】

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。2007年に日本小児血液学会疾患登録事業が開始され、小児血液学会会員施設で診断された造血不全疾患が年度毎に報告され登録される体制が整えられている。

本研究班の活動は毎年小児血液学会総会で取り上げられ、稀少疾患であるDCについて、会員への啓発が繰り返し十分に行われ、診断アプローチも整理されたてきた。

【目的】

本邦小児の先天性角化不全症症例の疫学データベース構築を目的に、小児血液学会疾患登録事業（全数把握）を一次調査とした疫学観察研究（小児血液再不貧2005研究・MDS2006研究）を実施する。質の高いデータベース構築により、これを基盤としたDCの診断法・治療法開発を目指す。また診断アプローチの啓発により、潜在している症例が新たに掘り起こされる可能性を検証する。

B. 研究方法

本研究班の研究では治療介入を行わない、疫学観察研究として実施する。小児血液学会会員231-239施設を対象にした全例登録（疾患登録事業）は、前年診断症例を対象にWeb登録にて実施され、およそ診断から1年経過した段階で二次調査（再不貧2005研究・MDS2006研究）が実施した。構築されるデータベースには小児期発症の造血障害全般を網羅し、DC症例に限定はしない。

（倫理面への配慮）

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

C. 研究結果

2006～2011年診断登録症例数を表に示す（表）。
a.疾患登録（一次調査）症例：診断年2011年は小児血液学会会員201-239施設の84%に相当する201施設が登録した。非腫瘍性血液疾患は毎年1,200から1,300症例であり、血小板異常症が最多。造血障