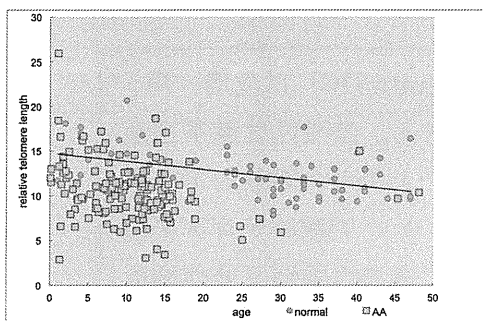


回った (図)。内 18 例において $-3SD$ 以上の著明な短縮を認めた。これらの症例はいずれも DC に特徴的な臨床徴候は示さなかった。このうち 1 例は Diamond-Blackfan 貧血の症例であった。また、別の 1 例では小頭症を伴う多発奇形のある乳児症例で、何らかの先天性造血不全症が疑われた。これらの患者を対象にテロメア関連遺伝子のシーケンスを行ったが、変異は認めなかった。



図

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

- 1) 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; 47: 1126-1127.
- 2) Sakaguchi H, Nakanishi K, Kojima S. Inherited bone marrow failure syndromes in 2012. International Journal of Hematology. 2013; 97: 20-29.

2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) Hirotoishi 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. Plague, 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）

－ 総合研究報告書 －

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。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%で見られ、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。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行い、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。

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を行う。

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。この結果に基づき、診断ガイドラインの作成すすめている。

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。従って、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。

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。また、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, Nuno 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.
 - 7) 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.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) 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) 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.
 - 4) 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:ダイヤモンド・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).
 - 5) 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).
 - 6) 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. 名古屋. (2011 年 10 月～16 日).
- 7) 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).
- 8) 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).
- 9) 伊藤悦朗、照井君典、土岐力、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、佐藤亜似子. 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).
- 10) 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).
- 11) 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).
- 12) 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。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

－ 総合研究報告書 － 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の症例把握に努めた結果、2006から2011年に診断されて登録された535例の小児期造血障害症例から、新規診断DC症例が7例報告された。2011年診断症例はいなかった。本研究班の活動により造血不全、血液症状を呈する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い、診断のアプローチが普及した。正確な診断に基づく新規診断症例が確実に把握できる体制となった。

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。この様な経緯で潜在する未診断症例が取り上げられ、適切な診療に繋がる可能性が高くなった。

【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。造血障害疾患は総計 535 例で、そのうち特発性再不貧は毎年 50-56 例とほぼ一定した症例数であった。

b. Dyskeratosis congenita ; DC 症例は 6 年間で 7 例登録された(表)。2011 年診断症例はいなかった。

D. 考察

小児血液学会疾患登録事業は2006年に開始され、さらに2009年2月から実施している形態中央診断により、診断精度が向上している。また本研究班発足後、毎年小児血液学会総会でDCはシンポジウムで取り上げられ、造血不全、血液症状を呈する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い、診断のアプローチが普及しており、正確な診断が行われた可能性が高い。

本研究班の対象疾患である DC に対しては、2007 年に疾患登録事業とほぼ同じ施設を対象に実施した

先行研究 (1988-2004 年症例) で、17 年間 1,337 例の造血障害から 6 例(0.45%) (95%CI 0.42-0.47%)の DC 症例が登録されているが、これと比較して 6 年間に診断された 7 例 (1.31%) (95%CI 0.34-2.27%) という症例頻度は先行研究よりも多い。すなわち造血不全、血液症状を呈する DC が当研究班の活動により潜在する症例が見いだされている可能性が高い。

E. 結論

今回の疾患登録調査で 2006 から 2011 年に診断されて登録された 535 例の造血障害症例から、新規診断 DC 症例が 7 例報告された。

F. 研究発表

なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表

Diagnosis / Year	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Hospitals (registered/member)	184 / 223	204 / 231	212 / 235	213 / 236	216 / 239	201 / 239
(%)	83%	88%	90%	90%	90%	84%
Idiopathic AA	58	62	68	68	55	56
Hepatitis AA	5	8	11	7	13	5
AA / PNH	2	1	1	0	1	0
Fanconi Anemia	5	4	6	1	4	2
Diamond-Blackfan anemia	9	6	9	10	5	8
Idiopathic PRCA	1	4	5	8	5	7
Severe Cong. Neutropenia	1	2	4	3	5	4
Cyclic Neutropenia	1	2	5	5	2	3
Schwachman-Diamond	0	1	1	2	0	0
Dyskeratosis congenita	2	0	1	3	1	0

As of June 2012

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

－ 総合研究報告書 －

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：骨髓生検の病理診断

研究分担者 伊藤 雅文（名古屋第一赤十字病院病理部 部長）

研究要旨： 先天性角化不全症（DKC）は、小児例では造血障害を伴う場合があり、先天性造血障害症候群のひとつである。小児造血障害症候群の多くは、汎血球減少を呈し、血液学および骨髓病理学的鑑別診断が困難である。MDS、再生不良性貧血を中心とする小児造血障害は病理中央診断が行われて、免疫染色を加えた骨髓病理診断と血液細胞診断を総合的に評価することで、客観的指標に基づく造血障害症候群の診断アルゴリズムを構築した。DKCは、原因遺伝子として6種類のテロメア関連遺伝子が同定され、テロメア長短縮との関連が示唆される。小児造血障害症候群病理中央診断症例を用い、テロメア長短縮と病理組織学的特徴の関連を検討した。テロメア長は再生不良性貧血やMDS（RCC, RCMD, RAEB）で正常症例に比べ短縮する傾向が見られ、特に短縮が強い群で、RCCやRCMDのMDSが多く、すでに芽球の増加を伴う症例も見られた。短縮症例にDKCも含まれたが、RCCの形態を呈し、その他のRCCとの病理組織学的な違いは明らかではなかった。

A. 研究目的

わが国では、小児造血障害症候群を網羅的に病理中央診断するシステムが構築され、複数の診断施設による血液細胞診断と病理組織診断の統合、免疫染色を加え病理診断を行っている。再生不良性貧血、MDS、先天性造血障害はその臨床病態が類似し、また骨髓病理像は従来あまり重視されてこなかった。WHO 分類の改定に伴い、小児造血障害症候群における小児 MDS が RCC として独立したこともあり、本邦における小児造血障害症候群の実態を明らかにする必要から、中央診断化により一定の基準に基づいた病理診断による評価がされるようになった。再生不良性貧血および MDS についてはほぼ安定した診断を得ることができてきた。先天性角化不全症（DKC）を含む先天性造血障害症候群は極めて多彩な疾患からなり、臨床的特徴を有する疾患は特定の遺伝子異常などにより診断が可能となってきた。DKC は、汎血球減少を示す先天性造血障害症候群で、皮膚、爪、口腔粘膜などの特徴的

臨床像から診断されてきた。6 種類のテロメア関連遺伝子に変異が見出され、本疾患とテロメア長短縮の関連性が示唆されてきた。臨床病態は DKC の所見はないが、テロメア長短縮の情報をもとに先天性角化不全症関連遺伝子異常症例が見出された症例が中央診断からスクリーニングされた。

本研究では、中央診断から得られた病理組織学的特徴から、先天性造血障害症候群の特徴を明らかにし、リンパ球テロメア長の短縮が明瞭な症例について、その骨髓病理組織像の検討を行い、テロメア長短縮と骨髓病理像の関連について明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

登録された小児造血障害症例は、複数の診断施設による血液細胞診断および骨髓病理診断、テロメア長測定や遺伝子解析を含む総合的評価で中央診断を行った。骨髓病理診断は、HE 標本と未染標本 5 枚の提供を

条件とし、p53、CD42b、胎仔型ヘモグロビン (HbF)、CD34 などの免疫染色を行い、総合的に診断した。

MDS に特徴的な項目で、客観性の高い所見に加点することで、そのスコアを合計する。スコアと、中央診断の相関を検討しスコアを用いた診断アルゴリズムを構築した。

名古屋大学小児科で行われた、リンパ球のテロメア長測定結果を検討し、病理所見との対比を行った。

(倫理面への配慮)

日本小児血液学会としての登録事業の一環で、疫学研究倫理指針に準拠した臨床研究である。匿名化、個人情報守秘を厳守し、データの取り扱いに注意する。

C. 研究結果

2009年から2012年までに中央診断に病理標本が提出された721例を検討した。再生不良性貧血158例、RCC177例、RCMD74例、RAEB35例、AML30例、JMML35例、先天性造血障害症候群24例、その他114例、検体不良74例であった。スコア5点以上の症例は、全例腫瘍性病変(RCC, RCMD, RAEB, AML, JMML)であった。2-4点では、先天性造血障害症候群3例、RCC12例、RCMD3例、JMML1例。2点以下の症例は、再生不良性貧血の全例、先天性造血障害症候群18例で、腫瘍性病変は含まれなかった。

リンパ球のテロメア長が測定された症例で、-2.0SD以下の短縮は35例で見られた。これら症例は、再生不良性貧血4例、RCC14例(1例のDKC、1例のファンconi貧血、1例の肝炎後造血障害を含む)、RCMD12例、RAEB,AML4例、その他1例であった。

DKC症例とその他のRCCの比較では、病理組織学的特徴は見られなかった。

テロメア長が-2.0SD以内であった群と、-2.0SDであった群との比較では、病理組織学的特徴は明らかではなかった。

D. 考察

小児造血不全症候群は、病理診断の施設間での診断不一致が多く見られた。複数施設による客観化された中央診断により診断の安定化が得られた。病理組織学的に客観化できる所見のみでのスコア化が標準化に

有効であることが明らかとなった。

DKCはテロメア関連遺伝子の異常が知られており、先天性造血障害症候群におけるテロメア長短縮の意義を検討した。再生不良性貧血や、RCC、RCMDなどのMDSでは、いずれも正常群に比べ短縮傾向が見られた。坂口らの検討では、テロメア長は再生不良性貧血とRCCの間では明らかな相関はなく、またRCCとRCMDの間でも同様であった。

短縮が明瞭な症例についての検討では、RCCやRCMDの例が多く、すでに芽球の増加を呈する症例も見られた。診断時のテロメア短縮は、免疫抑制療法の反応性に対する予測因子とはならないが、clonal evolution 発生リスクについては有意な予測因子となったと報告されており、この結果は同一の事象を示していると考えられる。

DKC症例とのそれら症例の比較検討では、DKC症例が少ないこともあり、明瞭な特徴は見出されなかった。

E. 結論

DKCは先天性造血障害症候群から抽出される可能性が高く、テロメア長の検討はそのスクリーニングには一定の有用性を示す。しかし、DKCの病理組織学的特徴は明らかにできなかった。テロメア長短縮は再生不良性貧血やMDSに共通してみられる傾向があり、特に強い短縮ではRCCやRCMD、あるいはすでに芽球の増加を呈する例に見られ、小児造血不全のメカニズムを考える上ではさらに検討が必要と考えられる。

先天性角化不全症を含む先天性造血障害症候群の抽出には、客観的な評価を加えた中央診断が重要で、看過されてきた症例の抽出が可能と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 伊藤雅文: MDSの骨髄病理組織骨髄異形成症候群(MDS)診療 up-to-date (松田晃編) 中外医学社 pp35-48、2011
- 2) 伊藤雅文: 新しい診断と治療のABC 再生不良性貧血(小澤敬也編) 第2章 病理 最新医学

別冊 pp31-38, 2011

- 3) 吉田奈央、平林真介、渡辺静、在家裕司、土田昌宏、吉見礼美、増永敦子、大塚欣敏、伊藤雅文、小島勢二、中畑龍俊、真部淳: 若年性骨髓単球性白血病 75 例の予後 : 小児血液学会 MDS 委員会の前方視的検討 臨床血液 52: 1853-1858, 2011

2. 学会発表

- 1) A. Hama, A. Manabe, K. Nozawa, H. Sakaguchi, S. Doisaki, H. Muramatsu, A. Shimada, Y. Takahashi, A. Ohara, M. Ito, S. Kojima.: 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
- 2) D. Hasegawa, X. Chen, S. Hirabayashi, S. Watanabe, Y. Zaike, M. Tsuchida, A. Masunaga, A. Yoshimi, A. Hama, S. Kojima, M. Ito, Y. Ishida, T. Nakahata, A. Manabe : 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
- 3) W. Yang, P. Zhang, A. Hama, M. Ito, S. Kojima, X. Zhu: Diagnosis of childhood MDS in Japan and China according to the WHO classification. 第 73 回日本血液学会学術集会
- 4) A. Shimada, A. Goto, Y. Xu, H. Sakaguchi, S. Doisaki, H. Muramatsu, A. Hama, Y. Takahashi, Y. Noda, S. Kojima, M. Ito: Frequent TP53 mutations in pediatric refractory cytopenia of childhood but rare in aplastic anemia. 第 73 回日本血液学会学術集会
- 5) H. Yoshihara, T. Kamiya, R. Saito, S. Yonekawa, D. Hasegawa, C. Ogawa, K. Nozawa, A. Hama, S. Kojima, M. Ito, A. Manabe, R. Hosoya: Refractory cytopenia of childhood (RCC) in a single institute. 第 73 回日本血液学会学術集会
- 6) M. Yamamoto, K. Igarashi, N. Hatakeyama, N. Suzuki, H. Tsutsumi, H. Nogushi, K. Nakanishi, M. Ito, H. Miyachi, T. Oda: Various

chromosomal aberrations arising after RIC-CBT in childhood hypocellular AML. 第 73 回日本血液学会学術集会

- 7) A. Hama, M. Ito, A. Manabe, A. Ohara, S. Kojima: A comparison of clinical findings between aplastic anemia and refractory cytopenia of childhood in 78 cases reviewed by central reviewers. 11th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes. Edinburgh, UK, May 18-21, 2011
- 8) M. Ito, A. Hama, A. Manabe, S. Kojima: Diagnosing pediatric bone marrow failures by objective myelodysplastic syndrome scoring system: A histopathological review. 11th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes. Edinburgh, UK, May 18-21, 2011

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）

－ 総合研究報告書 －

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：不全型先天性角化不全症の新規診断法の開発

研究分担者 山口 博樹（日本医科大学血液内科 講師）

研究要旨：先天性角化不全症(DKC)の診断には、テロメア長の短縮化と原因遺伝子変異の同定が重要である。Real time PCR法は、対象症例のDNA検体が微量であってもテロメア長の検索が可能でありDKCの診断に大変有用である。また次世代シーケンサーによる遺伝子変異検索は、正確で効率的にDKCの既知の原因遺伝子変異を同定することが可能であった。また新規の遺伝子変異の同定を現在行っている。

A. 研究目的

先天性角化不全症 (Dyskeratosis congenita: DKC)は網状色素沈着、爪の萎縮、舌の粘膜白斑症などといった特徴的身体的所見を伴う先天性の骨髄不全症(Bone marrow failure: BMF)である。10歳前後までに約80%以上の症例にこれらの特徴的身体的所見が付随しBMFを発症する。また約8%の症例に皮膚、上咽頭、消化管の扁平上皮癌や腺癌などの悪性腫瘍や、急性白血病などの造血器腫瘍の発生が認められる。遺伝型式はX連鎖劣性遺伝が35%、常染色体優性遺伝が5%、常染色体劣勢遺伝が数%に認められるが、残りの約60%近くが型式不明である。DKCの約60%の症例において原因遺伝子が同定され、テロメラーゼ複合体を構成する遺伝子群である、*DKC1*、*telomerase RNA component (TERC)*、*telomerase reverse transcriptase (TERT)*などや、Shelterin複合体を構成する蛋白である*TRF-interacting nuclear protein (TINF2)*に変異が認められている。

テロメラーゼ複合体は細胞分裂によるテロメアの短縮化に対しテロメアの複製、安定の役割をもち、Shelterin複合体はテロメアの先端部位の特異的な

構造形成や保護などを行っている。DKCはこれらの遺伝子の変異によりテロメアが短縮化し、その結果造血幹細胞などの増殖能に障害が起き上記の症候が形成されると考えられている。

これまでに我々はDKCの原因遺伝子である上述のテロメア制御遺伝子の変異が、一部の再生不良性貧血(aplastic anemia: AA)や骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndrome: MDS)に認められ、特徴的身体的所見を伴わず緩徐に発症する不全型DKCの存在が明らかにした(Lancet 2003;362:1628, Blood 2003;102:916, N Engl J Med. 2005 352:1413)。不全型DKCは臨床的にAAやMDSと診断され、効果が得られない免疫抑制療法(immunosuppressive therapy: IST)が行われることがある。以上よりBMFの臨床診断において不全型DKCを鑑別することは重要である。

DKCや不全型のDKCをスクリーニングする方法として遺伝子変異検索が考えられる。しかしテロメア関連遺伝子変異の検索は煩雑で、実際の臨床でのスクリーニングには不向きである。その理由として、①約40%のDKCは原因遺伝子が不明であり、既知の遺伝子変異検索では不完全である。②対象となる

遺伝子が多く、また遺伝子変異に hot spot がないためこれらの遺伝子の全長を検索しなくてはならない。③発見された塩基変異がテロメア長制御に影響をあたえる否かは機能解析を行わなければならない。などが考えられた。

現在のところ DKC や不全型 DKC 症例のスクリーニング法としては、テロメア長の短縮化を検索することが実用的であると考えられている。本邦では Southern blotting 法か Flow FISH 法を用いて、テロメア長の短縮化を検索し DKC や不全型 DKC 症例をスクリーニングしている。しかし Southern blotting 法は、DNA が 1ug 以上は必要で、末梢血や骨髄の細胞数の少ない BMF 症例では検体採取が困難な場合がある。Flow FISH 法は Southern blotting 法よりは必要な細胞は少ないが、やはり細胞数が少ないと正確な結果を出すことが困難な場合がある。また解析にはコントロールとなる 1301 細胞株が必要となるため、解析のたびに 1301 細胞を培養しなくてはならない。

Real time PCR 法によるテロメア長測定は、細胞数が少ない BMF が対象であっても簡便で高感度にテロメア長の短縮化を検索することができると考えられた。我々は Real time PCR 法によるテロメア長測定の実験系を確立し、従来の Southern blotting 法や Flow FISH 法と同様に DKC や不全型 DKC 症例をスクリーニングすることが可能かを検討した。

また近年次世代高速シーケンサーが登場し、これまでのサンガー法による直接塩基決定法より早く効率的に塩基配列の決定が可能となった。我々は大欠失変異や片アレル欠失に関しては SNP アレイ解析で、一塩基変異に関しては次世代シーケンサーを応用し、効率的に原因遺伝子の変異が同定できるかを検討した。さらに原因遺伝子が同定されていない症例に関しては、全 exon シーケンスを行い、新規原因遺伝子を同定することを目標とした。

B. 研究方法

1. Real time PCR 法によるテロメア長測定

対象は DKC1 症例、不全型 DKC2 症例、同世代の健常人 13 人。DNA 検体は 10ng を使用し、各症

例 3 回の測定を行い、その平均値を結果として用いた。

テロメア長測定のための Real time PCR 用の primer は、tel1 primer は 3'端より 6、12、18、24、30、32-37 塩基が、tel2 primer は 6、12、18、24、30、34-39 塩基がヒトテロメア TTAGGG 繰り返し配列と mismatches の配列となっている。この mismatch によってそれぞれの primer はヒトテロメア配列に annealing することが可能であるが、tel1 primer と tel2 primer はどのような形で annealing をしても、3'端の塩基が mismatch となり primer dimmer による増幅が起こらない様に工夫をした。

検量線は Flow FISH 法との比較をすることが容易になるように 1301 細胞から抽出した DNA を用いた。

2. 次世代高速シーケンサーを用いた効率的な原因遺伝子変異同定、ならびに新規遺伝子変異探索

研究対象は、特徴的身体的所見を伴う DKC 症例、もしくはテロメア長の短縮が認められた不全型 DKC 症例。目標症例数は 20 症例。

既知の遺伝子変異のスクリーニングは、*DKC1*、*TERC*、*TERT*、*NOP10*、*NHP2*、*TINF2* を対象に遺伝子解析を行う。大欠失変異や片アレル欠失のスクリーニングは、東京大学医学部附属病院・キャンサーボードの SNP アレイ解析を用いて行う。一塩基変異などのスクリーニングは、日本医科大学生命科学センターの ABI Ion PGM™ シーケンサーもしくは、従来の direct sequence 法にて行う。

新規遺伝子変異の探索は、上記のスクリーニングにおいて変異が同定出来なかった症例に関して、東京大学医学部附属病院・キャンサーボードの次世代シーケンサー Illumina 社 GAI, GAIx, HiSeq2000 を用いて全 exon シーケンスを行う。新規遺伝子が同定された場合は、そのバリデーションや機能解析を日本医科大学生命科学センターにて行う。

(倫理面への配慮)

本研究は当施設遺伝子倫理審査委員会において承認が得られており以下の配慮を予定している。生命倫理上の配慮に関しては、患者、及び健康ボランティア

アの人権、利益の保護について文書にて十分説明をしたうえで同意を得る。また研究への協力に同意した後であってもその同意を取り消すことができること、更に本研究への同意が得られない場合においても今後の治療などにはなんら不利益を被らないことを説明する。個人情報漏洩に対する取り組みとして研究組織とは別に個人情報管理者をおき連結可能匿名化をはかったうえで解析をおこなう。同意が撤回された場合は、検体、診療情報、遺伝情報はすべて匿名化されたまま焼却により破棄する。得られた結果は学会や論文として発表するが個人情報が出ることはない。遺伝子結果の開示を研究対象者が要求する場合は、倫理的問題を考慮し遺伝子カウンセリングを施行し、結果の告知は臨床遺伝専門医(遺伝カウンセラー)により行う。

C. 研究結果

1. Southern blotting 法によるテロメア長測定

DKC 症例(22-402)(図 1)と不全型 DKC 症例(J169)(図 2)は age mach コントロールと比較して明らかにテロメア長の短縮を認めた。またもう一例の不全型 DKC 症例(32-266) (図 3)は、age mach コントロールと比較して軽度のテロメア長の短縮を認めた。

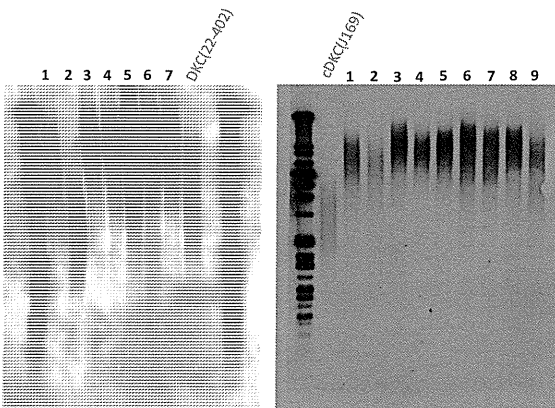


図 1

図 2

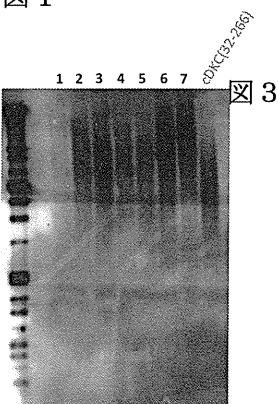


図 3

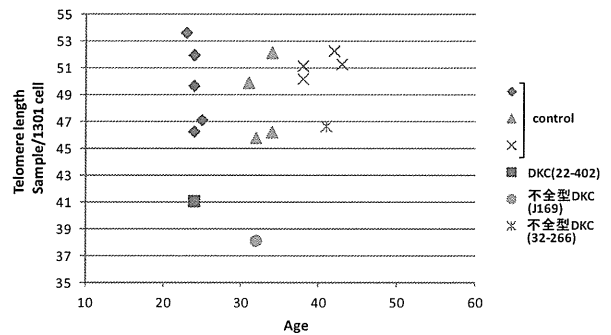
図 1 1, 3-7: age-matched control, 2: テロメア長が短縮したコントロール検体

図 2 1-9: age-matched control

図 3 1-7: age-matched control

2. Real time PCR 法によるテロメア長測定

DKC 症例(22-402)と不全型 DKC 症例(J169)は age mach コントロールと比較して明らかにテロメア長の短縮を認めた(22-402: 41%, J169: 38.1%)。また Southern blotting 法と同様に不全型 DKC 症例(32-266)は、age mach コントロールと比較して軽度のテロメア長の短縮を認めた (32-226: 46.8%)。



3. 既知の遺伝子変異の次世代高速シーケンサーを用いたスクリーニング

2012年12月現在、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 症例、不全型 DKC 症例 16 症例を集積した。その中で表 1 に示す様に、5 症例においては、サンガー法による直接塩基決定法では原因遺伝子が同定できなかったが、次世代高速シーケンサーによって既知の原因遺伝子の変異を同定することが出来た。

表 1 次世代高速シーケンサーによって同定された既知の遺伝子変異

Pt No.	Gene	Mutation type	Mutation
299	TINF2	nonsynonymous SNV	c.G845A:p.R282H
300	TINF2	frameshift insertion	c.824_825insA:p.T275fs
301	DKC1	nonsynonymous SNV	c.T1193C:p.L398P
303	DKC1	nonsynonymous SNV	c.C91A:p.Q31K
385	TERT	nonsynonymous SNV	c.C1895G:p.P632R

4. 次世代高速シーケンサーを用いた新規遺伝子変異の探索

既知の遺伝子変異がサンガー法や次世代高速シーケンサーにて同定されなかった症例に関して現在新規の遺伝子変異の探索を行っている。現時点では表 2 に示す様な新規遺伝子変異の候補が抽出されている。

表 2 次世代高速シーケンサーによって抽出された新規遺伝子変異候補

Pt No.	Gene	Mutation type	Mutation
378	<i>RECQL4</i>	nonsynonymous SNV	c.G3313C:p.G1105R
379	<i>HSPBP1</i>	nonsynonymous SNV	c.C92G:p.S31C
379	<i>HSPBP1</i>	nonsynonymous SNV	c.T91G:p.S31A
380	<i>TP53BP1</i>	nonsynonymous SNV	c.C2591G:p.T864R
384	<i>ATM</i>	nonsynonymous SNV	c.G3778A:p.V1260M
384	<i>BLM</i>	nonsynonymous SNV	c.G3385C:p.G1129R
385	<i>RECQL4</i>	nonsynonymous SNV	c.G1405A:p.V469M
386	<i>BLM</i>	nonsynonymous SNV	c.G2148C:p.L716F
386	<i>TP53BP2</i>	nonsynonymous SNV	c.A1375G:p.K459E
390	<i>RECQL4</i>	nonsynonymous SNV	c.C1394T:p.T465M
391	<i>RECQL4</i>	nonsynonymous SNV	c.C215T:p.A72V

D. 考察

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。使用 DNA 量は、テロメア PCR 用に 30ng、補正用の GAPDH の PCR 用に 30ng、計 60ng で、Southern blotting 法の約 1/10、Flow FISH 法の約 1/5 でスクリーニングが可能であった。また今回検索した Southern blotting 法による DKC や不全型 DKC 症例のテロメア長の実測値と Real time PCR 法による 1301 細胞のテロメア長との比較値には関連が認められ、Real time PCR 法は半定量性もあると考えられた。

次世代高速シーケンサーによる遺伝子変異検索は、従来のサンガー法による直接塩基決定法と比較してより正確で効率的に既知の遺伝子変異を同定することができた。DKC のように原因遺伝子が多く、変異も一塩基変異から大欠失変異や片アレル欠失まで多彩である疾患において、临床上遺伝子診断をする場合に、次世代高速シーケンサーによるターゲットシーケンスは有用であると考えられた。

新規遺伝子探索に関しては、現在探索中ではある

が、表 2 に示すように早老症の一つとして考えられているロスモンド・トムソン症候群の原因遺伝子である *RECQL4* のヘテロ変異が高率 (4/11(36.3%)) に抽出された。ロスモンド・トムソン症候群は常染色体劣性遺伝疾患であるので *RECQL4* のヘテロ変異が DKC の病態にどのように関与しているのかは不明である。また症例 384 の様に常染色体劣性遺伝疾患である毛細血管拡張性運動失調症の原因遺伝子である *ATM* と毛細血管拡張性運動失調症様疾患である Bloom 症候群の原因遺伝子である *BLM* のヘテロ変異を同時に認める症例があった。*ATM* と *BLM* は遺伝子修復に関与する遺伝子群であり、これらのヘテロ変異の共存がどのように DKC の病態に関与しているのかは不明だが、次世代高速シーケンサーで網羅的遺伝子変異探索をすることによって、既知の常染色体劣性遺伝疾患のヘテロ遺伝子変異の組み合わせによる新たな病態が明らかになるのかもしれない。

E. 結論

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 BMF 症例の臨床検査としては有用であった。

次世代高速シーケンサーによる遺伝子変異検索は、正確で効率的に DKC の既知の原因遺伝子変異を同定することができた。また *RECQL4*、*ATM*、*BLM* といった常染色体劣性遺伝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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamaguchi H, Inokuchi K, Takeuchi J, Tamai H, Mitamura Y, Kosaka F, Ly H, Dan K. Identification of TINF2 gene mutations in adult Japanese patients with acquired bone

marrow failure syndromes. Br J Haematol. 2010;150(6):725-7.

- 2) 山口博樹、檀 和夫. テロメア関連遺伝子異常による骨髓不全症. 臨床血液. 2010; 52: 646-653.
- 3) 山口博樹、檀 和夫. 骨髓不全症に対する蛋白同化ステロイドホルモンのテロメラーゼ活性化作用. Annual Review 血液 2011, p48-54.
- 4) 山口博樹. 病理・病態生理: 病因と病型分類. 小澤敬也編, 新しい診断と治療の ABC 72 「再生不良性貧血」最新医学別冊, 最新医学社. 2011; p39-44.
- 5) 山口博樹、猪口孝一. MDS に対する新規治療薬開発の現状. 血液内科. 2011; 63(2): 195-201.
- 6) 山口博樹、山川光徳、猪口孝一、室井一男編, 血液・造血器疾患のマネージメント. 医薬ジャーナル社. 2011.
- 7) 山口博樹、檀 和夫. 骨髓不全症候群におけるテロメア制御異常. 血液フロンティア. 2012; 22(6): 941-952.

2. 学会発表

- 1) Takeuchi J, Yamaguchi H, Inokuchi K, Tamai H, Mitamura Y, Kosaka F, Ly H, Dan K. Evaluation of TIN2 and SBDS gene mutations and screening telomere length in adult Japanese patients with acquired bone marrow failure syndromes. 15th. European Hematology Association. 2009年6月, バルセロナ.
- 2) Takeuchi J, Yamaguchi H, Tamai H, Mitamura Y, Kosaka F, Inokuchi K, Dan K. Screening of telomere length among acquired aplastic anemia patients. 第72回日本血液学会, 2010年9月, 横浜.
- 3) Takeuchi J, Yamaguchi H, Tamai H, Mitamura Y, Kosaka F, Inokuchi K, Dan K. Telomerase activity is useful for the screening of cryptic and late onset Dyskeratosis Congenita and the evaluation

of the treatment response to anabolic steroids for their bone marrow failure. 16th. European Hematology Association. 2011年6月, ロンドン.

- 4) Takeuchi J, Yamaguchi H, Tamai H, Mitamura Y, Kosaka F, Inokuchi K, Dan K. 不全型先天性角化不全症の診断と治療反応性におけるテロメラーゼ活性測定の有用性. 第73回日本血液学会, 2011年9月, 名古屋.
- 5) 山口博樹、檀 和夫. 先天性造血障害の病態解明の進歩. 日本小児血液がん学会学術集会. 2012年12月. 横浜

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）

－ 総合研究報告書 －

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：遺伝性疾患と間質性肺炎に関する研究

研究分担者 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）

研究協力者 橋本 直純（名古屋大学大学院医学系研究科呼吸器内科学 助教）

研究要旨： 先天性角化不全症(DKC)の一表現型としての肺線維症が予後に大きな影響を与える。本研究班では、我が国における家族性特発性肺線維症におけるテロメア遺伝子変異の役割を解析するため、遺伝性疾患と間質性肺炎に関する調査と研究実施のための組織作りを実施した。その結果、特発性肺線維症の血液サンプルの共同利用の道を開くとともに、特発性肺線維症の発症分子メカニズムを解明し、DKCにおける肺線維症の発症メカニズムに関する研究を実施した。

A. 研究目的

本分担研究では、我が国における家族性特発性肺線維症におけるテロメア遺伝子変異の役割を解析することと、肺線維症の発症分子メカニズムを解明し、その分子制御に関する研究を実施する。

B. 研究方法

「特発性肺線維症急性増悪及び薬剤性肺障害に関与する日本人特異的遺伝素因に関する研究」（萩原班）ならびに「原因不明で遺伝的素因が関与すると考えられる呼吸器疾患の遺伝子解析研究」（名古屋大学）に関する研究課題と本研究班の研究課題の共同研究体制の構築を進めた。実験動物を用いた肺の線維化における EMT, PTEN, 低酸素状態の影響について研究を実施した。

C. 研究結果・考察

厚労省萩原班との血液サンプルの共同利用の仕組みを構築した。今後、リンパ球不死化の影響を検討しながら、間質性肺炎患者のテロメア遺伝子変異の解析のための条件を検討したい。一方、動物実験では、遺伝子改変マウスによる血管内皮細胞の EMT

の実証、PTEN C 末端リン酸化部位のリン酸化制御による EMT の制御の可能性、遷延化低酸素の肺線維化・肺傷害に与える影響に関わる因子について明らかにした。

D. 結論

厚労省萩原班との血液サンプルの共同利用の仕組みを構築した。肺線維症における線維芽細胞の制御と遊走能の制御において、PTEN C 末端側リン酸化部位の修飾は新たな線維化治療の分子標的となることが示唆された。

E. 研究発表

論文発表

Sakamoto K, Hashimoto N, Kondoh Y, et al. Differential modulation of surfactant protein D under acute and persistent hypoxia in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012; 303 (L43-L53).

F. 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）

－ 総合研究報告書 －

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：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

研究分担者 秋山 真志（名古屋大学大学院医学系研究科皮膚病態学分野 教授）

研究要旨： 先天性角化不全症（DC）の皮膚科領域を含めた全国疫学調査の基礎となる情報を確立するために、国内外の文献調査を施行し、皮膚科領域におけるDC診療の問題点を明らかにした。さらに、本邦での皮膚科領域も含めたDC診療の実態把握のための全国疫学調査を開始した。具体的には、本研究で行ってきたDC全国疫学調査に、全国の大学病院皮膚科、基幹病院皮膚科を含めた。この疫学調査の結果に基づき、皮膚症状に対する治療指針を作成する基礎となるデータを集積しつつある。

A. 研究目的

本研究の目的は、先天性角化不全症（DC）の皮膚科領域における患者数、診療実態を明らかにし、実態に即した診断基準、治療指針を作成することである。研究初年度から、そのための全国疫学調査の基礎となる情報を確立するために、国内外の文献調査を施行し、皮膚科領域におけるDC診療の問題点を明らかにすることを目的として研究を行った。さらに研究2年目からは、本邦での皮膚科領域も含めたDC診療の実態把握のための全国疫学調査を開始した。具体的には、本研究で行うDC全国疫学調査に、全国の大学病院皮膚科、基幹病院皮膚科を含めて調査した。

本研究における皮膚科領域からのアプローチは、DCの診療実態の解明と治療指針の作成において、欠くことのできない方向性であり、一定の成果をあげつつある。

B. 研究方法

先天性角化不全症（DC）の皮膚科領域を含めた全国疫学調査の基礎となる情報を確立するために、本研究初年度から国内外の文献調査を施行し、皮膚科領域におけるDC診療の問題点を明らかにした。本研究で

の文献調査の結果、本邦での皮膚科領域でのDC診療の実態についての情報は非常に限られたものであることが明らかになったことから、全国の皮膚科関連基幹診療施設に、新たに、DC診療状況のアンケート調査を施行、疫学調査の結果に基づき、皮膚症状に対する暫定的な治療指針を作成する基礎となるデータを集積しつつある。

（倫理面への配慮）

本研究は、ヒト遺伝子解析結果等の情報を含むため、倫理的配慮と研究対象者に対する十分なインフォームドコンセントの下、施行した。

C. 研究結果

先天性角化不全症（DC）の皮膚科領域における国内外の文献調査を本研究初年度から施行し、皮膚科領域でのDC診療の問題点を明らかにした。それら問題点としては、1）疾患名が統一されていない、2）診断基準が不明確、3）疾患としての認知度が低い、等が挙げられた。また、我々の文献調査の結果、本邦での皮膚科領域でのDC診療の実態についての情報は非常に限られたものであり、病因遺伝子変異検索を行う施設は、本邦の皮膚科関連施設には無いことが明らか

になった。さらに、本研究2年目からは、本邦での皮膚科領域も含めたDC診療の実態把握のための全国疫学調査に着手した。具体的には、本研究で行うDC全国疫学調査に、全国の大学病院皮膚科、基幹病院皮膚科を含めた。上記疫学調査の結果に基づき、皮膚症状に対する治療指針を作成する基礎となるデータを集積しつつある。

3年間の本研究の結果を踏まえて、課題として残された点は、以下である。

1) 本邦での皮膚科領域でのDC症例を十分数収集し、DC診療の実態を明らかにする。

2) 本邦における皮膚科領域でのDC症例の病因遺伝子変異検索を行う施設のネットワークを構築する。

以上の2点については、現状での収集症例が少ないことから、得られた情報は非常に限られたものであり、十分な診療実態の把握、さらに、そのさきの遺伝子診断ネットワークの構築は、達成されなかった。

D. 考察

本研究の初年度から一貫して施行した文献調査等の結果から、本邦での皮膚科領域も含めたDC診療の実態把握のためには、全国の皮膚科基幹診療施設に対する疫学調査を施行する必要があることが、さらに明らかになっている。具体的には、本研究で行うDC全国疫学調査には、全国の大学病院皮膚科、基幹病院皮膚科を含めることが重要と考えられた。

また、皮膚症状に対する治療指針を作成するためには、本邦での皮膚科領域も含めたDC診療の実態把握のための全国疫学調査を行う必要性が明白となった。現在、上記疫学調査の結果に基づき、皮膚症状に対する治療指針を作成する基礎となるデータを集積しつつある。本研究における情報収集、研究、調査の結果を詳細に検討すると、皮膚科領域でのDCの遺伝子診断についても、体制を強化する必要性が浮き彫りとなった。DCの病因遺伝子変異検索を施行可能な皮膚科以外の施設との連携システムを構築し、皮膚科領域でのDC患者につき、病因遺伝子変異検索を可能とするような努力が今後必要である。

E. 結論

本研究では、先天性角化不全症（DC）の皮膚科領域も含めた全国疫学調査の基礎となる情報を確立することを目的として、国内外の文献調査を施行し、皮膚科領域におけるDC診療の問題点を明らかにした。さらに、本研究2年目からは、本邦での皮膚科領域も含めたDC診療の実態把握のための全国疫学調査に着手した。具体的には、本研究で行うDC全国疫学調査に、全国の大学病院皮膚科、基幹病院皮膚科を含めて施行しつつある。この全国疫学調査の結果に基づき、皮膚症状を含めたDCの主要症状に対する診断基準、治療指針を作成する基礎となるデータが集積されると予想される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takeichi T, Sugiura K, Matsuda K, Kono M, Akiyama M. Novel *ABCA12* splice site deletion mutation and *ABCA12* mRNA analysis of pulled hair samples in harlequin ichthyosis. *J Dermatol Sci* (in press)
- 2) Natsuga K, Shinkuma S, Kanda M, Suzuki Y, Chosa N, Narita Y, Setoyama M, Nishie W, Akiyama M, Shimizu H. Possible modifier effects of keratin 17 gene mutation on keratitis-ichthyosis-deafness syndrome. *Br J Dermatol* 166: 903-5, 2012.
- 3) Sasaki K, Akiyama M, Yanagi T, Sakai K, Miyamura Y, Sato M, Shimizu H. CYP4F22 is highly expressed at the site and onset of keratinization during human skin development. *J Dermatol Sci* 65: 156-8, 2012.
- 4) Sugiura K, Takeichi T, Kono M, Ogawa Y, Shimoyama Y, Muro Y, Akiyama M. A novel IL36RN/IL1F5 homozygous nonsense mutation, p.Arg10X, in a Japanese patient with adult-onset generalized pustular psoriasis. *Br J Dermatol* 167: 699-701, 2012.
- 5) Umemoto H, Akiyama M, Domon T, Nomura T, Shinkuma S, Ito K, Asaka T, Sawamura D,

991-993.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

- Uitto J, Uo M, Kitagawa Y and Shimizu H. Type VII collagen deficiency causes defective tooth enamel formation due to poor differentiation of ameloblasts. *Am J Pathol* 181: 1659-1671, 2012.
- 6) Kono M, Akiyama M, Kondo T, Suzuki T, Suganuma M, Wataya-Kaneda M, Lam J, Shibaki A, Tomita Y. Four novel *ADARI* gene mutations in patients with dyschromatosis symmetrica hereditaria. *J Dermatol* 39: 819-821, 2012.
- 7) Li Q, Frank M, Akiyama M, Shimizu H, Ho S-Y, Thisse C, Thisse B, Sprecher E, Uitto J. Abca12-Mediated Lipid Transport and Snap29-Dependent Trafficking of Lamellar Granules are Critical for Epidermal Morphogenesis in Zebrafish Disease Model of Ichthyosis. *Dis Model Mech* 4: 777-785, 2011.
- 8) Takeichi T, Sugiura K, Muro Y, Akiyama M. LEDGF/DFS70 activates the MK2/IL6/STAT3 pathway in HaCaT. *J Dermatol Sci* 63: 203-205, 2011.
- 9) Natsuga K, Akiyama M, Shimizu H. Malignant skin tumours in inherited ichthyosis patients. *Br J Dermatol* 165: 263-268, 2011
- 10) Yanagi T, Akiyama M, Nishihara H, Miyamura Y, Sakai K, Tanaka S, Shimizu H. AKT plays an anti-apoptotic role in ABCA12-deficient keratinocytes. *J Invest Dermatol* 131: 1942-1945, 2011.
- 11) Akiyama M. Updated molecular genetics and pathogenesis of ichthyoses. *Nagoya J Med Sci* 73: 79-90, 2011
- 12) Osawa R, Akiyama M, Izumi K, Ujiie H, Sakai K, Nemoto-Hasebe I, Yanagi T, Koizumi H, Shimizu H. Extremely severe palmoplantar hyperkeratosis in a generalized epidermolytic hyperkeratosis patient with a keratin 1 gene mutation. *J Am Acad Dermatol* 2011; 64:

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

－ 総合研究報告書 －

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：先天性骨髄不全症の除外に有用な骨髄不全の病態診断法の確立

研究分担者 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）

研究要旨： 不全型DKCを始めとする先天性骨髄不全症や骨髄異形成症候群などの非免疫病態による骨髄不全を、免疫抑制療法によって改善する良性の骨髄不全（後天性再生不良性貧血）と鑑別するための方法を確立するため、PNH型血球陽性スコアリングシステムの作成、テロメア長の測定、クロナリティ解析、血漿トロンボポエチン（TPO）の測定などを行い、骨髄不全病態や予後との関係を検討した。その結果、血漿TPO値が高値であることが、免疫病態による良性骨髄不全のもっとも簡便な指標であることが明らかになった。

A. 研究目的

不全型 DKC を始めとする先天性骨髄不全症は、明らかな身体奇形を有さない成人の骨髄不全症例の中にも時に含まれている。これらに対する治療方針は、後天性再生不良性貧血（aplastic anemia; AA）とは全く異なるため、両者を鑑別すること極めて重要である。本研究班における分担研究として、我々は、成人骨髄不全患者におけるクローン性造血障害の鑑別方法の確立に取り組んだ。

B. 研究方法

①多クローン性造血と相関することが知られている

「PNH 型血球陽性」骨髄不全患者の臨床像を明らかにすることにより、フローサイトメトリーを用いずに、PNH 型血球の増加の有無を臨床所見から推測するためのスコアリングシステムを開発する。

②白血球のテロメア長を測定するための定量的 PCR 法を確立し、クローン性造血とテロメア長との関係を検討した。

③PNH 型血球の増加を認める例では、血小板数や骨髄巨核球数が低下しているという①で得られた知

見に着目し、血小板数や骨髄巨核球数と逆相関する血漿トロンボポエチン（TPO）値が、骨髄不全の免疫病態や予後と関連するか否かを検討した。

（倫理面への配慮）

「高感度フローサイトメトリーを用いた骨髄不全患者における PNH 型血球の検出」、「骨髄不全患者における血漿トロンボポエチン値と予後との関係に関する検討」については、金沢大学医学倫理審査委員会、「骨髄不全患者における白血球テロメア長測定の意義に関する検討」については、金沢大学ヒトゲノム解析研究倫理審査委員会の審査を受け、それぞれから承認を得た。検体の採取に当たっては患者から文書による同意を得た。

C. 研究結果

①PNH 型血球陽性の骨髄不全 31 例中高 PNH 陽性スコア群は 22 例（71%）、PNH 型血球陰性例 144 例中高 PNH 陽性スコア群は 14 例（10%）、陽性的中率 61%、陰性的中率 94%、免疫抑制療法の奏効率は高 PNH 陽性スコア群で 81%（11 例中 9 例で有効）であった。