

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yanagimachi MD, Niwa A, Tanaka T, Ozaki F, Nishimoto S, Murata Y, Yasumi T, Ito J, Tomida S, Oshima K, Asaka I, Goto H, Heike T, Nakahata T, Saito MK	Robust and highly-efficient differentiation of functional monocytic cells from human pluripotent stem cells under serum- and feeder cell- free conditions.	PLoS One		in press	
Tsumura M, Okada S, Sakai H, Yasunaga S, Ohtsubo M, Murata T, Obata H, Yasumi T, Kong XF, Abhyankar A, Heike T, Nakahata T, Nishikomori R, Al-Muhsen S, Boisson-Dupuis S, Casanova JL, Alzahrani M, Shehri MA, Elghazali G, Takihara Y, Kobayashi M.	Dominant-negative STAT1 SH2 domain mutations in unrelated patients with Mendelian susceptibility to mycobacterial disease.	Hum Mutat	33(9)	1377-1387	2012
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-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency.	Blood	119(23)	5458-5466	2012
Kawai T, Saito M, Nishikomori R, Yasumi T, Izawa K, Murakami T, Okamoto S, Mori Y, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Wada T, Yachie A, Ohmori K, Nakahata T, Heike T.	Multiple reversions of an IL2RG mutation restore T cell function in an X-linked severe combined immunodeficiency patient.	J Clin Immunol	32(4)	690-697	2012
Izawa K, Hijikata A, Tanaka N, Kawai T, Saito MK, Goldbach-Mansky R, Aksentijevich I, Yasumi T, Nakahata T, Heike T, Nishikomori R, Ohara O.	Detection of base substitution-type somatic mosaicism of the NLRP3 gene with >99.9% statistical confidence by massively parallel sequencing.	DNA Res	19(2)	143-152	2012
堀内久徳、白川龍太郎、八角高裕	血小板顆粒放出の分子メカニズム	臨床血液	53(7)	664-671	2012
八角高裕	家族性血球貪食症候群のスクリーニング検査	血液フロンティア	23(1)	27-32	2013

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
八角高裕	免疫調節障害 総論	近藤直実 平家俊男	自己炎症性 疾患・自然免 疫不全症そ の近縁疾患	診断と 治療社	東京	2012	151-155
八角高裕	家族性血球貪食性 リンパ組織球症 (FHL)	近藤直実 平家俊男	自己炎症性 疾患・自然免 疫不全症そ の近縁疾患	診断と 治療社	東京	2012	159-162
八角高裕 太田秀明	Case14 家族性血球貪食性 リンパ組織球症3型 (FHL3)	近藤直実 平家俊男	自己炎症性 疾患・自然免 疫不全症そ の近縁疾患	診断と 治療社	東京	2012	228-229

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

症例の集積、検体採取と保存、解析

研究分担者 藤本純一郎 国立成育医療センター 臨床研究センター長

研究要旨

本研究の目的は、先天性顆粒球放出異常症に係る患者由来検体の保存と供給体制の整備である。先天性顆粒球放出異常症には遺伝性の発症様式を示すものがあるためヒトゲノム・遺伝子解析研究の対象となる場合があること、DNA や RNA 以外に、細胞マーカー解析や蛋白質解析ならびに活性測定のためのサイトカイン刺激細胞クローンの保存など細胞保存の必要があるなど、特殊な事情を考慮したうえで検体の保存と供給体制を整備する必要がある。先天性顆粒球放出異常症のうち、血球貪食症候群に関しては、国内の小児がん臨床研究グループ（日本小児白血病リンパ腫研究グループ JPLSG）の中で臨床試験が実施されており、また、国立成育医療研究センターは JPLSG における検体保存・供給センターの役割を担っている。昨年度までに、先天性顆粒球放出異常症のひとつである血球貪食症患者由来検体につき、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に沿って国立成育医療研究センターの倫理委員会での審査を受け承認を得た。一方、本年度末になって、上記指針の全部改正が 2 月 8 日付で実施されたため、今後は改正指針に従った方法での運用が望ましいと考えられる。そこで、今年度は、改正指針の変更点を概観した。

A. 研究目的

極めて希少な難病である血球貪食症候群の病態・診療研究に資する検体採取と収集ならびに検体制の整備を行うことを目的とする。

B. 研究方法

平成 25 年 2 月 8 日に全部改正されたヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（以下「ゲノム指針」とする）の内容に従い、今後、本研究班の活動を通じて収集保管された検体の取り扱いの留意点をまとめた。

C. 研究結果

1) 改正「ゲノム指針」の主な改正内容

今回の改正の主な点は表 1 に記載した。

表 1 改正「ゲノム指針」の主な改正内容

- | |
|---------------------------------|
| (1) 長期的な追跡を可能とするための匿名化に関する規定の改正 |
| (2) 安全管理に配慮した遺伝情報の取扱いに係る規定の整備 |

(1) 長期的な追跡を可能とするための匿名化に関する規定の改正

改正前は、情報等を提供する場合には、匿名化し、かつ、提供元の対応表を破棄することを原則としていたが、改正により、匿名化の方法を見直し、長期的な追跡研究が実施できるよう、対応表は別途厳重に管理した上で、情報等を提供できる

ように見直されている。すなわち、長期的な観察で新たに得られた情報（例えば、生死情報、副作用情報、がんの場合では再発の有無等）を将来、保存されている試料（検体）に追加し、試料としての価値を高めることができるようになった。

(2) 安全管理に配慮した遺伝情報の取扱いに係る規定の整備

これに関しては、表 2 に要点を示した。ここでは特に、「①インフォームド・コンセントの際に提供者に説明する内容の追加」に関して詳細する。すなわち、インフォームド・コンセントを撤回した際に廃棄される範囲についての決め方と説明、試料・情報の提供を受ける時点では特定されない将来のゲノム研究に使用される可能性があればその旨、遺伝情報に開示に関する事項について提供者又は代諾者等が遺伝情報の全部又は一部を開示しないことについて同意した場合は、開示が行われない可能性があること、起こりうる利害の衝突及び研究者等の関連組織とのかかわり、等である。

なお、今回の改正で「インフォームド・アセント」の言葉が初めて使用された。

表 2 安全管理に配慮した遺伝情報の取扱いに係る規定の整備

- | |
|--------------------------------|
| ①インフォームド・コンセントの際に提供者に説明する内容の追加 |
| ②遺伝情報の安全管理措置の明確化 |

- ③研究業務を委託した場合の情報等の適切な取扱い（契約により明確化）
- ④研究者や倫理審査委員会の委員に対する教育・研修の実施

2) 個別の改正内容への対応

今回のゲノム指針改正に伴い、先天性顆粒球放出異常症に係る患者由来検体の収集と保存に係る計画書で修正などの必要があるか否かを検討した。

まず、「長期的な追跡を可能とするための匿名化」については、当然、将来的に新たに入手される臨床情報を追加することを前提として計画されているため、問題なく運用できる。

「安全管理に配慮した遺伝情報の取扱いに係る規定の整備」については、将来新たな解析が予想されることを前提に計画書が作成されており、十分に対応できている。実際には、先天性顆粒球放出異常症の新たな責任遺伝子が同定された場合に、確定診断がされていない患者検体を利用した解析となり、患者にとっては確定診断がされるという利点と考えられる。結果の開示に関しては、確定診断に関する場合は遺伝カウンセリング体制を担保したうえでの開示が望ましく、それを実現する計画書となっている。

D. 考察

家族性に発症する血球貪食症候群は極めてまれであり、全国的な研究グループである JPLSG と連携して患者を集積する必要がある。本研究も JPLSG が行う血球貪食症候群に対する臨床試験である HLH2004 の中で行われる検体保存と分配の仕組みを活用したものである。HLH2004 は平成 23 年度に新規患者登録が終了したこともあって、

中央診断のための検体の動きを総括し、将来のヒトゲノム・遺伝子解析研究に使用できる形で保存することは重要である。平成 23 年度までに、HLH2004 での検体の動きを整理し、かつ、ヒトゲノム・遺伝子解析研究を新たに追加して JPLSG に係る余剰検体保存計画を国立成育医療研究センター倫理委員会で審査し承認を受けた。

現在、上記体制で運用中だが、本年度は、改正されたゲノム指針に照らし合わせて、本研究班が関与する検体保存計画に不備がないか否かを検討した。まず、改正指針の内容から改正点を概説し、変更点と本研究における方針とを照らし合わせた結果、特に新たな対応が必要な部分はないと考えられた。

E. 結論

血球貪食症候群の患者由来検体保存体制を整備したが、その計画全体が改正されたゲノム指針の下で見直しが必要か否かを検討した結果、見直しは必要ないと考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表：該当なし
2. 学会発表：該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：該当なし
2. 実用新案登録：該当なし
3. その他：なし

先天性顆粒放出異常症のリンパ球機能解析に関する研究

研究分担者 安川 正貴
愛媛大学大学院医学系研究科教授

研究要旨

先天性顆粒放出異常症の一つである家族性血球貪食性リンパ組織球症（familial hemophagocytic lymphohistiocytosis; FHL）における細胞傷害性T細胞（cytotoxic T lymphocyte; CTL）の機能異常のメカニズムを明らかにすることは、本疾患の病態解明に留まらず、免疫系の中心的役割を演じているCTLの細胞傷害分子機構解明に迫ることが期待される。そこで本研究では、FHL患者よりアロ抗原特異的CTLを誘導し、CTLの機能異常と遺伝子異常や臨床症状との関連性につき検討した。特に本年度は、FHL患者と健常者由来CTLの細胞傷害活性ならびにT細胞刺激を可視化することを試みた。その結果、正常CTLは、標的細胞の細胞周期に関わらず細胞傷害をきたすのに比べ、FHL患者CTLは標的細胞に結合するものの細胞傷害が認められず、長時間にわたって標的細胞からの活性化シグナルが伝達されることが明らかとなった。

A. 研究目的

顆粒放出異常症の一つである家族性血球貪食性リンパ組織球症（familial hemophagocytic lymphohistiocytosis; FHL）の病態を解明する目的で、FHL患者より、アロ抗原特異的細胞傷害性T細胞（cytotoxic T lymphocyte; CTL）を誘導し、その機能解析を行った。CTLの機能異常と遺伝子異常や臨床症状との関連性を明らかにする目的で、CTLの細胞傷害性ならびに活性化を可視化し、time lapseによって観察した。

B. 研究方法

CTL株の樹立

FHL患者および健常者から、同種LCLで頻回に刺激して、アロ抗原特異的CTL株を樹立した。細胞傷害活性は、主として⁵¹Cr-release assayで測定した。

T細胞活性化レポーターシステムの構築

1) ベクターコンストラクト

ペプチド-HLA複合体を認識したT細胞受容体からの検出すべきシグナルとして、NF-κB系シグナル

に注目した。これまでの報告 (Hooijberg E, et al. *Blood* 2000; 96: 459-66. Ponomarev V, et al. *Neoplasia* 2001; 3: 480-8.) をもとに、レポーターシステムのプロモーターは、nuclear factor of activated T-cell (NFAT)-binding site (NFAT enhancer element; GGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGT) を minimal β globin promoter (GAATTCAGGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGATTACATTTGCTTCTGACACAAC TGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACC) の前に4つつなげる構造とし、レポーター遺伝子には蛍光、発光ともに検出可能となるように、発光酵素遺伝子 *Luciferase* (*SLR*) と蛍光タンパク遺伝子 *Venus* をIRESでつなぐデザインを選択した。レポーター遺伝子の機能確認には、細胞活性化シグナルとして Ionomycin+PHA-P 刺激を行い、活性化阻害剤として CyclosporinA を用いた。

NFAT enhancer elements、β globin minimal promoter はドラゴンジェノミクス社にオリゴヌクレオチド合成を依頼した。それらを直鎖状につなげるために、

制限酵素で切り出したのち pBluescript IISK プラスミドへサブクローニングした。一方 *SLR-IRES-Venus gene* は当科で作成したレンチウイルスベクタープラスミド (CSII-EF1-SLR-IRL β -Venus) を制限酵素処理し用いた。さらにこれらプロモーターとレポーター遺伝子を一つのレンチウイルスプラスミドに組み込む方法として、Gateway システム (ViraPowerTM HiPerformTM Promoterless Gateway[®] Vector Kit, InvitrogenTM, Catalog no. A11145) を使用した。

pBluescript II SK プラスミド上の NFAT enhancer element \times 4- β globin minimal promoter を制限酵素処理したのち、KOD polymerase を用いて平滑末端処理を行い、さらに Taq polymerase を用いて 3'側にアデニン (A) 塩基を付加した。その後 TOPO[®] cloning reaction により pENTR5'-TOPO[®] ベクターへ Ligation した (Promoter plasmid)。レポーター遺伝子も同様に、制限酵素処理で切り出した *SLR-IRES-Venus gene* を平滑末端処理し、さらに 3'側へアデニン (A) 塩基付加を行い、TOPO[®] cloning reaction により pCR[®] 8/GW-TOPO[®] ベクターへ Ligation した (My gene plasmid)。最後にそれぞれ作成した Promoter plasmid、My gene plasmid を LR clonase 反応により pLenti-6.4/R4R2/V5-DEST ベクターに組み込み、JM109 (コンピテント細胞、TAKARA bio inc.) に Transformation し、目的のレンチウイルス用ベクタープラスミドを得た。ここで得られたプラスミドは制限酵素処理による insert check、シークエンスによる塩基配列の確認を行った。

2) レポーター遺伝子導入用レンチウイルスの作成

目的の遺伝子導入用レンチウイルスを得るために、293T 細胞へレンチウイルス用プラスミド (pLenti-6.4/R4R2/V5-DEST- NFAT enhancer element \times 4- β globin minimal promoter-*SLR-IRES-Venus gene* ベクタープラスミド) をウイルスパッケージングプラスミド (pCAG-HIV プラスミド、pCMV-VSV-G-RSV-Rev プラスミド) とともにリポフェクション法により遺伝子導入することにより、培養上清であるウイルス液を回収した。

3) レポーター遺伝子の機能評価

作製したレポーター遺伝子の機能を検討するために、293T 細胞へ得られたレンチウイルスを用いて遺伝子導入を行った。本レポーター遺伝子には Blasticidin 耐性遺伝子を組み込んであり、Blasticidin S を用いて遺伝子導入陽性細胞のセレクションを行った。

このようにして得られた NFAT 応答レポーター遺伝子陽性 293T 細胞を用いて、活性化シグナルの検出を次の 3 群で比較した。

群	CyclosporinA	Ionomycin	PHA-P
① コントロール群	—	—	—
② カルシニューリン阻害群	900ng/ml	2nM	1 μ g/ml
③ 刺激群	—	2nM	1 μ g/ml

CyclosporinA、Ionomycin、PHA-P はそれぞれ同時に薬剤処理を開始し、37 $^{\circ}$ C、CO₂ 5%の条件下で 48 時間反応させたのち細胞を回収した。細胞数を同じにし、Flow cytometry assay で Venus (蛍光極大 528nm) の発現を、HAMAMATSU 社の発光イメージング装置 : HOKAWA を用いた Luciferase assay にて Luciferase(SLR)の発現をそれぞれ検討した。

In vitro time lapse imaging 法による FHL 患者 T 細胞の細胞傷害能の直接観察

- 1) FHL 患者由来末梢血単核球 (PBMC) の回収
今回の検討は、perforin nonsense mutation を原因とする FHL 患者採血により比重遠心法にて PBMC を回収した。
- 2) FHL 患者由来 PBMC を Allo LCL を用いた MLR (Mixed Lymphocyte reaction) による Allo 抗原特異的な CTL の誘導
日本人にはほとんど認められない HLA のみを有する LCL 株にマイトマイシン C 処理を行い、この Allo-LCL/MMC を用いて Responder : Stimulator 比 = 2:1 で末梢単核球刺激を行った。Allo-LCL に反応し増殖する CTL を、2 回目以降は細胞培養

液に少量 IL-2 (10U/ml) を加え繰り返し刺激し、Allo 抗原特異的 CD8 陽性 CTL を樹立した。比較する陽性コントロールとして、健康人 PBMC から同様に Allo 抗原特異的 CD8 陽性 CTL を樹立した。

3) in vitro timelapse imaging による細胞傷害能の評価

FHL 患者由来ならび健康人由来 Allo 抗原特異的 CD8 陽性 CTL を Effector 細胞と識別できるよう緑の蛍光タンパクである mAG を遺伝子した Allo-LCL (Allo-LCL/mAG) を Target 細胞とした細胞傷害能を検討した。35 mm ガラスボトムディッシュに E:T 比 5:1 で細胞をいれ、死細胞を識別目的に Propidium iodide を反応培養液に加えた。顕微鏡は NIKON 社 Biostation IM を使用し、37°C、CO2 5%、5 時間の観察を行った。

(倫理面への配慮)

本研究事業で行われる研究は、ヘルシンキ宣言および個人情報保護法に則り、各施設倫理委員会およびゲノム審査委員会の承認を得て実施した。患者及び患者家族に対して研究および治療開始時に統一した説明文を用いて文書による同意を得た。

C. 研究結果

得られた研究成果は以下のとおりである。

A) T 細胞活性化レポーターシステムの構築

Promoter plasmid、My gene plasmid、pLenti6.4/R4R2/V5-DEST plasmid を LR clonase 反応したのち、JM109 コンピテント細胞へ Transformation した結果、多数のコロニーが得られた。そのうち 21 コロニーを用いて、制限酵素による Insert check を行った。コロニー No.8 が計画した遺伝子が組み込まれており、最終的にシーケンスにより確認でき、目的の Lenti virus vector plasmid が得られた。

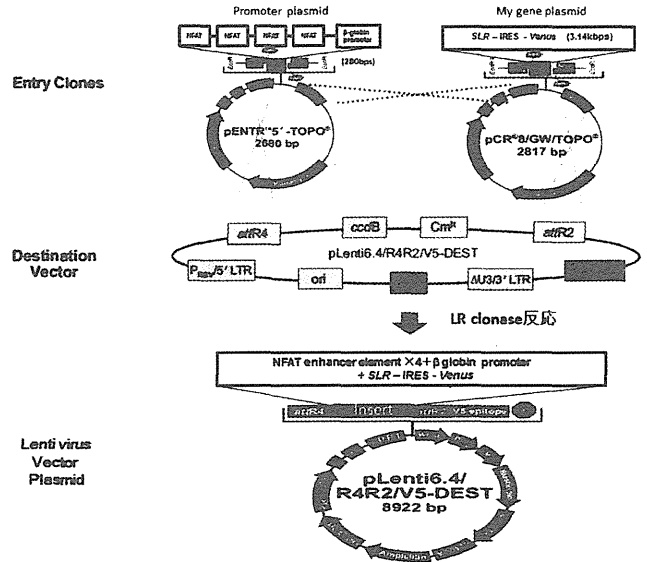


Fig : Plasmid vector construction

得られたレンチウイルスを 293T 細胞へ感染し遺伝子導入し、BlasticidinS 耐性細胞が得られた。その細胞を用いて、Ionomycin、PHA-P による刺激、CyclosporinA による阻害を行った結果、③刺激群は①コントロール群と比較して Venus、SLR とともに発現を認めた。

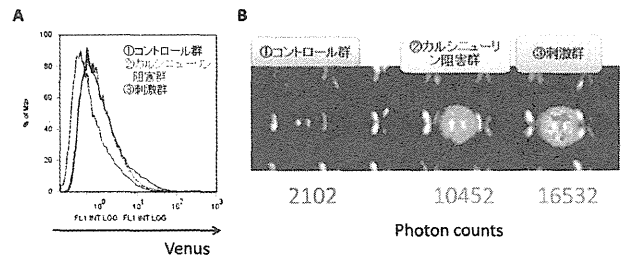
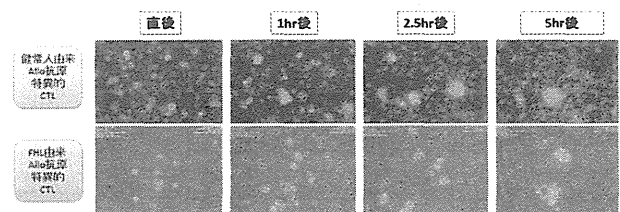


Fig. A : Flow cytometry assay による Venus 発現解析結果

In vitro timelapse imaging による観察の結果、FHL 患者由来 Allo 抗原特異的 CTL は、健康人由来 Allo 抗原特異的 CTL 同様に標的である Allo-LCL への十分な接触がみられたが、健康者由来 CTL と異なり、細胞死を導くことができなかった。



D. 考察

正常 CTL は、標的細胞に結合して短時間に標的細胞を抗原特異的に傷害し、他の標的細胞を傷害するが、FHL 患者 CTL は、標的細胞に結合するものの細胞傷害が認められず、長時間にわたって標的細胞に結合し、活性化シグナルが伝達されることが示唆され、このことが、FHL 発症のメカニズムの一つと考えられた。

E. 結論

FHL 患者 CTL は、標的細胞に長時間にわたって結合し、長時間活性化シグナルが伝達されることが FHL 発症のメカニズムの一つと考えられた。

F. 研究発表

2. 論文発表

Asai H, Yasukawa M., et al. (2013) Co-Introduced Functional CCR2 Potentiates In Vivo Anti-Lung Cancer Functionality Mediated by T Cells Double Gene-Modified to Express WT1-Specific T-Cell Receptor. *PLoS One*. 8:e56820.

Okamoto S, Yasukawa M. et al. (2012) A Promising Vector for TCR Gene Therapy: Differential Effect of siRNA, 2A Peptide, and Disulfide Bond on the Introduced TCR Expression. *Mol Ther Nucleic Acids*. 18:e63.

Kanda, T., Yasukawa, M., et al. (2012) HLA-restricted presentation of WT1 tumor antigen in B-lymphoblastoid cell lines established using a maxi-EBV system. *Cancer Gene Ther*. 19:566-571.

Shikata, H., Yasukawa, M. et al. (2012) The role of activation-induced cytidine deaminase (AID/AICDA) in the progression of follicular lymphoma. *Cancer Sci*. 103:415-421.

Nagai, K., Ishii, E. Yasukawa, M., et al. (2012)

Aurora kinase A-specific T-cell receptor gene transfer redirects T-lymphocytes to display effective anti-leukemia reactivity. *Blood* 119:368-376.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許所得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Asai H, Yasukawa M., et al.	Co-Introduced Functional CCR2 Potentiates In Vivo Anti-Lung Cancer Functionality Mediated by T Cells Double Gene-Modified to Express WT1-Specific T-Cell Receptor.	PLoS One.	8	e56820	2013
Okamoto S, Yasukawa M, et al.	A Promising Vector for TCR Gene Therapy: Differential Effect of siRNA, 2A Peptide, and Disulfide Bond on the Introduced TCR Expression.	Mol Ther Nucleic Acids.	18	e63	2012
Kanda, T., Yasukawa, M., et al.	HLA-restricted presentation of WT1 tumor antigen in B-lymphoblastoid cell lines established using a maxi-EBV system.	Cancer Gene Ther.	19	566-571	2012
Shikata, H., Yasukawa, M. et al.	The role of activation-induced cytidine deaminase (AID/AICDA) in the progression of follicular lymphoma.	Cancer Sci.	103	415-421	2012
Nagai, K., Ishii, E. Yasukawa, M., et al.	Aurora kinase A-specific T-cell receptor gene transfer redirects T-lymphocytes to display effective anti-leukemia reactivity.	Blood	119	368-376	2012

Perforin 欠損（FHL2）症の臍帯血移植後の経過と問題点

浅野孝基、世羅康彦、中村和洋、小林正夫
（広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学）

研究要旨

Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) は遺伝性の組織球の増殖と血球貪食像を病理学的特徴とし、血球貪食症候群は致死的であるため、早期の造血幹細胞移植が必要となる。乳児期に移植を必要とする症例も多く、移植関連合併症、晩期障害を最小限とした前処置が必要である。本研究では HPS2 の 2 か月児に放射線照射のない骨髄非破壊的前処置で臍帯血移植を施行した。現在、ドナータイプ 70%の混合キメラである。過去の当科での 2 症例（いずれも乳児期）も同様に放射線照射なしの造血幹細胞移植を施行し、発育、発達に問題なく小学生を迎えている。今後、晩期障害を最小限とした造血幹細胞移植が必要と思われる。

A. 研究目的

Familial hemophagocytic lympho- histiocytosis (FHL) は遺伝性の発熱・汎血球減少・肝脾腫・播種性血管内凝固症候群 (DIC) を主要徴候とした組織球の増殖と血球貪食像を病理学的特徴とする症候群である。FHL2, 3, 4, 5 が責任遺伝子が同定されている。本疾患群の特徴はリンパ球の細胞障害活性の低下に基づき、抗原刺激の持続から過剰な免疫反応を示す。昨年度、perforin 欠損 (FHL2) 症例において、臍帯血移植を行うことで、hemophagocytic syndrome (HPS) 症状はコントロールできた症例を報告したが、その後の問題点についてまとめる。

B. 研究方法

症例と診断：症例は 2 か月女児。発熱の持続と血球減少、骨髄での血球貪食像を認め、当科紹介となる。FHL の診断は図 1 に示すように CD56 陽性細胞の perforin 欠損で確定した（京都大学小児科八角先生施

行）。

C. 研究結果

症例の治療経過：初診時から全身状態は不良。DIC の合併があり、HLH2004 による治療を開始した。しかし、全身状態の改善はみられず、フェリチンの低下も緩徐であり、著明な高血圧を認め、寛解導入は困難と判断し、臍帯血移植を施行した。前処置は Fludarabine, Melphalan, ATG を図 3 のように投与し、HLA5/6 (HLA-DR 一座不一致) 臍帯血を輸注した。移植後 VHD 予防は FK506 と MTX を使用した。血球貪食症候群の症状も前処置にて軽快、フェリチンも順調に低下した。軽度の GVHD を認めたが、血球回復は順調で移植関連合併症もほとんどなく経過した。高血圧も移植後 1 か月で治癒した。移植後のキメリズムは 1 か月後 95%、3 か月後 77%、5 か月後 70%、12 か月後 40%、15 か月 30%、と低下傾向にある。免疫抑制剤等の投薬はすべてオフとしている。現在までに易感染性等の臨床的問題は全くなく、発育、発

達ともに遅れはみられていない。

D. 考察

当科ではこれまでに本症を含め FHL 症例 3 例で乳児期に移植を行った。乳児期であることを考え、すべての症例において前処置に放射線照射を使用していない。症例 1, 2 ともに小学校に入学しているが、発育、発達ともに順調に経過している。本症も早期の臍帯血移植を施行することで、救命でき、その後の合併症は全く認められていない。若干の発達の遅れも移植後 1 年 3 か月でほぼ順調に回復している。しかし、移植後は 90%以上であったキメリズムが移植後 15 か月で 30%まで低下してきている。本症のリンパ球の細胞障害活性が混合キメラ状態で HPS 等の合併症の併発に影響を与えるかどうかは不明であるが、ヘテロの両親では全く症状がないことを考えれば安定したキメリズムであれば問題ないと考えたい。しかし、徐々のキメリズム低下からの拒絶にいたる可能性を考えれば、今後再移植の準備は進めて行く必要がある。本症の造血細胞移植療法において、乳児期にいかに関与後に影響せず、生着を含めた移植関連合併症の少ない移植が今後の課題と思われる。

E. 結論

放射線照射のない前処置による臍帯血移植を施行した FHL2 症例を報告し、晩期障害の少ない乳児期移植療法について考察した。今後の前方視的な移植前処置を含めた安全な移植療法の確立が必要である。

F. 研究危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 学会発表

Hirata O, Tsumura M, Mizoguchi Y, Okada S, Minegishi S, Morio T, Kobayashi M: Gain-of-function mutations of *STAT1* in Japanese patients with CMCD. The 15th European Society for Immunodeficiencies Meeting. Florence, Italy, 2012.10

Kobayashi Y, Matsui H, Kanai A, Tsumura M, Okada S, Miki M, Nakamura K, Kunishima S, Inaba T, Kobayashi M: Identification of integrin b3 L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant macrothrombocytopenia. The 54th Annual meeting of American Society of Hematology, Atlanta 2012.12

Onodera R, Nakamura K, Taniguchi K, Kurita E, Hiraoka A, Yasui K, Matsuyama N, Hirayama F, Kobayashi M: A novel method using extracted human neutrophil antigens from HNA gene-transfected cell lines for detection of antibodies against human neutrophil antigens. The 54th Annual meeting of American Society of Hematology, Atlanta 2012.12

溝口 洋子, 津村 弥来, 平田 修, 峯岸 志津子, 森尾 友宏, 岡田 賢, 小林 正夫: 機能獲得性 *STAT1* 変異を有する慢性皮膚粘膜カンジダ症の解析.

第 54 回日本小児血液学会 2012 年 11 月 30 日-12 月 2 日

2. 論文発表

Hiramoto T, Ebihara Y, Mizoguchi Y, Nakamura K, Yamaguchi K, Ueno K, Mochizuki S, Yamamoto S, Nagasaki M, Furukawa Y, Tani K, Nakauchi H, Kobayashi M, Tsuji K: Wnt3a stimulates maturation of impaired neutrophils developed from severe congenital neutropenia-derived pluripotent stem cells with heterozygous *ELANE* mutation. Proc Natl Acad Sci USA 2013 (in press)

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-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency.. *Blood*. 2012;119(23):5458-66.

Kobayashi Y, Matsui H, Kanai A, Tsumura M, Okada S, Miki M, Nakamura K, Kunishima S, Inaba T, Kobayashi M: Identification of the integrin $\beta 3$ L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant thrombocytopenia with anisocytosis. *Br J Haematol*. 2012, DOI Dec 17

Tsumura M, Okada S, Sakai H, Yasunaga S, Ohtsubo M, Murata T, Obata H, Yasumi T, Kong XF, Abhyankar A, Heike T, Nakahata T, Nishikomori R, Al-Muhsen S, Boisson-Dupuis S, Casanova JL, Alzahrani M, Shehri MA, Elghazali G, Takihara Y, Kobayashi M: Dominant-negative STAT1 SH2 domain mutations in unrelated patients with Mendelian susceptibility to mycobacterial disease.. *Human Mutation* 2012;33(9):1377-87.

Zhang X, Inukai T, Hirose K, Akahane K, Kuroda I, Honna-Oshiro H, Kagami K, Goi K, Nakamura K, Kobayashi M, Endo M, Yagita H, Kurosawa H, Thomas Look A, Honda H, Inaba T, Nakazawa S, Sugita K: Oncogenic fusion E2A-HLF sensitizes t(17;19)-positive acute lymphoblastic leukemia to TRAIL-mediated apoptosis by upregulating the expression of death receptors. *Leukemia*. 2012;26(12):2483-93

Ohno N, Kobayashi M, Hayakawa S, Utsunomiya A, Karakawa S: Transient pseudothrombocytopenia in a neonate: Transmission of a maternal EDTA-dependent anticoagulant. *Platelets*. 2012;23(5):399-400.

Regulation of hematopoietic stem cells using protein transduction domain-fused Polycomb. Kajiume T, Sera Y, Kawahara Y, Matsumoto M, Fukazawa T, Imura T, Yuge L, Kobayashi M. *Exp Hematol*. 2012;40(9):751-760.

溝口 洋子, 鎌田 綾, 三木 瑞香, 谷 博雄, 世羅 康彦, 中村 和洋, 小林 正夫 : Glanzmann thrombasthenia への遺伝子組み換え活性型第 VII 因子製剤による止血効果, 日本小児血液・がん学会雑誌. 49(1-2)9: 61-66. 2012.

梶梅 輝之, 浅野 孝基, 世羅 康彦, 小林 正夫 : 輸血後蕁麻疹発症前の末梢血一般検査所見,. *アレルギー*. 61(8): 1086-1091. 2012.

溝口洋子, 津村弥来, 岡田賢, 小林正夫.慢性性皮膚粘膜カンジダ症と機能獲得性 STAT1 変異. *臨床免疫・アレルギー科*. 57(4): 437-443. 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

英文リスト

1. Frequent somatic mosaicism of NEMO in T cells of patients with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. 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. *Blood*. 2012;119(23):5458-66.
2. Identification of the integrin $\beta 3$ L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant thrombocytopenia with anisocytosis. Kobayashi Y, Matsui H, Kanai A, Tsumura M, Okada S, Miki M, Nakamura K, Kunishima S, Inaba T, Kobayashi M. *Br J Haematol*. 2012 Dec 17
3. Acute severe encephalopathy related to human herpesvirus-6 infection in a patient with carnitine palmitoyltransferase 2 deficiency carrying thermolabile variants. Kobayashi Y, Ishikawa N, Tsumura M, Fujii Y, Okada S, Shigematsu Y, Kobayashi M. *Brain Dev*. 2012 Jul 30.
4. Central nervous system complications and neuroradiological findings in children with chronic active Epstein-Barr virus infection. Ishikawa N, Kawaguchi H, Nakamura K, Kobayashi M. *Pediatr Int*. 2012 Dec 13
5. Dominant-negative STAT1 SH2 domain mutations in unrelated patients with Mendelian susceptibility to mycobacterial disease. Tsumura M, Okada S, Sakai H, Yasunaga S, Ohtsubo M, Murata T, Obata H, Yasumi T, Kong XF, Abhyankar A, Heike T, Nakahata T, Nishikomori R, Al-Muhsen S, Boisson-Dupuis S, Casanova JL, Alzahrani M, Shehri MA, Elghazali G, Takihara Y, Kobayashi M. *Hum Mutat*. 2012;33(9):1377-87.
6. Continuous Intravenous Infusion of Ketamine and Lidocaine as Adjuvant Analgesics in a 5-Year-Old Patient with Neuropathic Cancer Pain. Kajiume T, Sera Y, Nakanuno R, Ogura T, Karakawa S, Kobayakawa M, Taguchi S, Oshita K, Kawaguchi H, Sato T, Kobayashi M. *J Palliat Med*. 2012;15(6):719-22.
7. Oncogenic fusion E2A-HLF sensitizes t(17;19)-positive acute lymphoblastic leukemia to TRAIL-mediated apoptosis by upregulating the expression of death receptors. Zhang X, Inukai T, Hirose K, Akahane K, Kuroda I, Honna-Oshiro H, Kagami K, Goi K, Nakamura K, Kobayashi M, Endo M, Yagita H, Kurosawa H, Thomas Look A, Honda H, Inaba T, Nakazawa S, Sugita K. *Leukemia*. 2012;26(12):2483-93
8. Transient pseudothrombocytopenia in a neonate: Transmission of a maternal EDTA-dependent anticoagulant. Ohno N, Kobayashi M, Hayakawa S, Utsunomiya A, Karakawa S. *Platelets*. 2012;23(5):399-400.
9. Regulation of hematopoietic stem cells using protein transduction domain-fused Polycomb. Kajiume T, Sera Y, Kawahara Y, Matsumoto M, Fukazawa T, Imura T, Yuge L, Kobayashi M. *Exp Hematol*. 2012;40(9):751-760.e1.

和文リスト

1. Glanzmann thrombasthenia への遺伝子組み換え活性型第VII因子製剤による止血効果, 溝口 洋子, 鎌田 綾, 三木 瑞香, 谷 博雄, 世羅 康彦, 中村 和洋, 小林 正夫. *日本小児血液・がん学会雑誌*. 49(1-2)9: 61-66.2012.
2. 輸血後蕁麻疹発症前の末梢血一般検査所見, 梶梅 輝之, 浅野 孝基, 世羅 康彦, 小林 正夫. *アレルギー*. 61(8): 1086-1091. 2012.
3. 慢性性皮膚粘膜カンジダ症と機能獲得性 STAT1 変異, 溝口洋子, 津村弥来, 岡田賢, 小林正夫. *臨床免疫・アレルギー科*. 57(4): 437-443. 2012.

4. 脳腫瘍を含む小児がんに対するステロイド使用の現状 全国アンケートの集計結果. 山崎文之, 中村和洋, 杉山一彦, 小林正夫, 栗栖薫. *Neurological Surgery*. 40(7): 607-616. 2012.

学会発表

Osamu Hirata, Miyuki Tsumura, Yoko Mizoguchi, Satoshi Okada, Shizuko Minegishi, Tomohiro Morio, Masao Kobayashi: Gain-of-function mutations of *STAT1* in Japanese patients with CMCD: European Society for Immunodeficiency. Florence, Italy, 2012.10

Yoshiyuki Kobayashi, Hirotaka Matsui, Akinori Kanai, Miyuki Tsumura, Satoshi Okada, Mizuka Miki, Kazuhiro Nakamura, Shinji Kunishima, Toshiya Inaba and Masao Kobayashi: Identification of integrin $\beta 3$ L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant macrothrombocytopenia. American Society of Hematology. Atlanta, GA, 2012.12

Rie Onodera, Kazuhiro Nakamura, Kikuyo Taniguchi, Emi Kurita, Asako Hiraoka, Kaduta Yasui, Nobuki Matsuyama, Fumiya Hirayama, and Masao Kobayashi: A Nobel Method using Extracted Human Neutrophil Antigens from HNA gene-transfected cell lines for Detection of Antibodies against Human Neutrophil Antigens. American Society of Hematology. Atlanta, GA, 2012.12

