

201324087A

厚生労働科学研究費補助金
〔難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）〕

RAS関連自己免疫性リンパ球増殖症候群様疾患(RALD)
の実態調査および病態病因解析に関する研究

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高 木 正 稔

平成 26 (2014) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金
〔難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）〕

RAS関連自己免疫性リンパ球増殖症候群様疾患 (RALD)
の実態調査および病態病因解析に関する研究

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高 木 正 稔

平成 26 (2014) 年 5 月

目 次

I.	班員名簿	7
II.	総括研究報告 高木正稔 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発生発達病態学分野)	11
III.	分担研究報告 水谷修紀 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発生発達病態学分野) 森尾友宏 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発生発達病態学分野) 金兼弘和 (富山大学 附属病院小児科)	19 23 28
IV.	研究成果に関する刊行の一覧表	33
V.	別刷	41

I . 班員名簿

班員名簿

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
研究代表者	高 木 正 稔	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 発生発達病態学分野	講 師
研究分担者	水 谷 修 紀	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 発生発達病態学分野	教 授
	森 尾 友 宏	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 発生発達病態学分野	准 教 授
	金 兼 弘 和	富山大学附属病院 小児科	講 師

Ⅱ. 総括研究報告書

「RAS 関連自己免疫性リンパ球増殖症候群様疾患(RALD)の実態調査および病態病因解析に関する研究」

研究代表者 高木 正稔

(東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・発生発達病態学分野・講師)

研究要旨： RALD 症例の集積と診断法の確立、その病態解析を行った。本研究から RALD と若年性骨髄単球性白血病(JMML)は連続した疾患概念であり。両者の間に線を引くことは困難であることが明らかとなった。JMML は一般的に造血幹細胞移植が必要な予後不良な疾患である。しかし RALD のように自己免疫症状を有し、RAS 変異を持つ細胞が存在するにもかかわらず、長期間、造血幹細胞移植なしに生存している症例があることが明らかとなった。また本疾患にミコフェノール酸モフェチルやゾレドロン酸が有用であり可能性が示唆された。また病態解明、治療法開発のための基盤として疾患特異的 iPS 細胞の樹立に成功した。

水谷修紀 東京医科歯科大学 教授
森尾友宏 東京医科歯科大学 准教授
金兼弘和 富山大学 講師

A. 研究目的

RAS 関連自己免疫性リンパ増殖症候群様疾患(RALD)の臨床症状は自己免疫性リンパ増殖症候群(ALPS)と近似し、症状、一般検査所見からは両者を区別することは難しい。一方、若年性顆粒単球性白血病(JMML)は RAS-MAPK 経路の異常を基調とする疾患で RALD と同様に RAS 変異に基づいて発症する悪性腫瘍である。JMML の一部は自己免疫症状を伴い RALD に近い臨床症状を呈する症例も存在する。一般的に JMML

は予後不良の疾患で救命には造血幹細胞移植が必須とされている。しかし軽微な化学療法、分化誘導療法や経過観察のみで寛解した症例も報告があり、自己免疫症状を伴う JMML と RALD の差異は明らかでない。本研究では希少疾患である RALD や自己免疫症状を伴う JMML 症例を集積することにより、疾患概念の確立を行い、行われた治療法を解析することにより、RALD に行える標準療法があるか検討を行った。またその病態を明らかにするための基礎的な研究を行った。

B. 研究方法

全国から RALD 疑い例の紹介を受け診断のための遺伝子検査の標準化を試みた。

希少疾患であり、一例一例の臨床情報を集積することにより、共通項の洗い出しおこなった。

RALD の表現系と ALPS とは臨床症状から

は区別することができない。ALPS-FAS 以外の ALPS から RALD 類縁疾患がある可能性を考え遺伝子解析法を模索した。

RAS 変異がどの血液細胞系列に認められ、そして影響を与え、自己免疫疾患の発症に影響を与えるか、検討した。

RAS の変異の種類の違いが表現系に影響を与えるか検討した。

RAS による細胞増殖シグナルに細胞がどのように反応するか、分子細胞生物学的な解析を行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析にあたっては、三省合同のゲノム指針に則り、患者又は両親から同意を得、当センターの倫理委員会の承認を得て行った

C. 研究結果

RALD 症例より再生医療の実現化プロジェクト「疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究」難治性血液・免疫疾患由来の疾患特異的 iPS 細胞の樹立と新規治療法開発研究班と連携し患者由来疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。この細胞を樹立した患者は NRAS 変異を体細胞モザイクで有しており。NRAS 変異のある iPS 細胞および、NRAS 変異のない isogenic な iPS 細胞を樹立に成功し、今後これら iPS 細胞を用いて、RAS 阻害剤など治療法開発のための創薬研究を展開できる基盤を作成した。(高木)

JMML は一般的に造血幹細胞移植が必要な予後不良な疾患である。しかし RAS 変異を有する JMML の一部は造血幹細胞移植なしに生存することが知られている。これら視点から造血幹細胞移植なしに生存し、寛解している JMML 症例を再検討した。興味深いことにこれら症例は依然として RAS の変異を持つ細胞が残存し、また自己免疫症状を呈しており、RALD に近い病態と考えられた。(水谷)

RALD に行われた治療は未介入、プレドニゾロン、シクロスポリン A、ミコフェノール酸モフェチル、造血幹細胞移植などであった。プレドニゾロンの自己免疫症状に対する有効性は臨床的に明らかであったが、高容量が必要であり、ミコフェノール酸モフェチルの有効性が示唆された。RALD 症例で RAS 阻害効果のあるゾレドロン酸の有効性を検討した。自己免疫症状の緩和と RAS 陽性コロニー数の低下がみられ、有効性が期待された。この臨床観察結果に基づき RALD に対するゾレドロン酸の有効性を検討するための臨床試験を計画し、IRB 承認を得た。(森尾)

今回典型的 ALPS でありながら、既存の遺伝子変異が同定されず、ALPS-U と考えられるがあり、全エクソン解析の手法が試みられた。この結果 NRAS 遺伝子の変異が認められ RALD であることが明らかとなった。(金兼)

D. 考察

造血幹細胞移植なしで生存している JMML 症例は寛解後も RAS 変異を抱えたままであり何らかの免疫異常を呈することが明らかとなった。症状的に ALPS/RALD に非常に近い症例も存在し、RALD と JMML の差が非常にあいまいであることが明らかとなった。従来から提唱されている JMML の診断基準からはこういった症例と RALD を区別することは困難であり、ひとたび JMML と診断されてしまえば造血幹細胞移植が選択されてしまうので、今後造血幹細胞移植なしに生存できる JMML を選別する方法の確立が急務と考えられた。また過去に JMML の罹患歴が明らかであればその後の続発する自己免疫症状は RALD 類似の病態とで説明できることが明らかとなった。しかし JMML の既往歴がなく、その存在が見落とされていた場合、後になって出現した自己免疫症状のみを見ると RALD 診断されてしまうと考えられ、RALD と JMML は連続した疾患概念であることが明らかとなった。

RALD は ALPS と同様にプレドニゾロン

により自己免疫症状の緩和が見られることが明らかとなった。しかしプレドニゾン反応不良で、呼吸器症状の悪化から造血幹細胞移植が行われた症例もあった。また一方で治療介入なしに経過が安定している症例もあった。また RAS 阻害効果が分子説学的に予想されるミコフェノール酸モフェチルの有用性が示唆された。このように症例ごとに様々な治療方針がとられており、症状に見合った治療法の選択が必要なが明らかとなった。また RAS-MAPK を標的とした新規分子標的薬開発の必要性が求められる。そこで難治例に対し RAS 阻害効果のあるゾレドロン酸の有効性を検討した。自己免疫症状の緩和と RAS 陽性コロニー数の低下がみられ、有効性が期待された。

自己免疫症状を呈する RALD および JMML いずれもがリンパ球系列に RAS 変異を持つ細胞があり、リンパ球系統での RAS 変異細胞の存在が RALD の発症、自己免疫症状のある JMML に深く関与している可能性が示唆された。

RAS 遺伝子変異による細胞への影響や JMML や RALD 類似疾患の遺伝子解析が行われ、その病態の解明が進められた。しかし現時点では自己免疫症状のある JMML と RALD を区別しうる遺伝学的背景については明らかにすることはできなかった。しかしながらリンパ球系に RAS 遺伝子変異があると自己免疫症状を呈することが明らかとなった。次なる課題としてはリンパ球系に RAS 遺伝子変異があるとなぜ自己免疫症状を呈するのか、その最適な治療法は何かを明らかにしていかななくてはならない。また自然寛解する JMML と急速に症状の進行がみられる、RAS 変異のある JMML があるが、両者を区別する明確な指標が存在しない。林らの研究で見出された RAS の体細胞モザイクの症例は長期の経過で腫瘍化には至っていないが、滝田らの研究では RAS の体細胞モザイクを持つ症例から急性転化に至った症例が報告され、この問題は早急に解決しなくてはいけない最大の課題と考えられた。全エクソン解析など手法を取り入れることにより、今後、解決の糸口が見出されることを期待する。この中で「疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究」難治性血液・

免疫疾患由来の疾患特異的 iPS 細胞の樹立と新規治療法開発研究班と連携し患者由来疾患特異的 iPS 細胞を樹立できたことは大きな一歩と考える。これらを利用し創薬に向けて少しずつ前進している。

E. 結論

RALD と JMML は連続した疾患概念であり、従来 JMML と診断されていた症例の中に RALD が含まれる可能性があることが明らかとなった。JMML は基本的に造血幹細胞移植が必要な血液悪性腫瘍であり、現在の診断基準を用いると造血幹細胞移植なしに生存できる RALD または JMML を含有してしまうことが明らかになり、診断基準の再検討が必要なのではないかと考えられた。しかし現時点では造血幹細胞移植が必要な RAS 変異のある JMML と造血幹細胞移植なしに生存できる RAS 変異のある JMML とを区別することは出来ず、今後の分子細胞生物学的な解析を通して、両者を区別していくための研究を早急に行う必要があると考えられた。RALD の治療法としてステロイドを含めた免疫抑制剤が臨床症状の緩和に有用であることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takagi M, Sato M, Piao J, Miyamoto S, Isoda T, Kitagawa M, Honda H, Mizutani S. ATM-dependent DNA damage-response pathway as a determinant in Chronic Myelogenous Leukemia. *DNA Repair*. 2013 Jul;12(7):500-7.
2. Takagi M, Piao J, Lin L, Kawaguchi H, Imai C, Ogawa A, Watanabe A, Akiyama K, Kobayashi C, Mori M, Ko K, Sugimoto M, Mizutani S. Autoimmunity and persistent RAS-mutated clones long after the spontaneous regression of JMML. *Leukemia*. 2013 Sep;27(9):1926-8
3. Unno J, Takagi M, Piao J, Sugimoto M, Honda F, Maeda D, Masutani M, Kiyono T,

- Watanabe F, Morio T, Teraoka H, Mizutani S. Artemis-dependent DNA double-strand break formation at stalled replication forks. *Cancer Sci.* 2013 Jun;104(6):703-10
4. Tamaichi H, Sato M, Porter AC, Shimizu T, Mizutani S, Takagi M. Ataxia telangiectasia mutated-dependent regulation of topoisomerase II alpha expression and sensitivity to topoisomerase II inhibitor. *Cancer Sci.* 2013 Feb;104(2):178-84.
 5. Machida S, Tomizawa D, Tamaichi H, Okawa T, Endo A, Imai K, Nagasawa M, Morio T, Mizutani S, Takagi M. Successful treatment of diffuse large B cell lymphoma in a patient with ataxia telangiectasia using rituximab. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2013 Aug;35(6):482-5
 6. Nagasawa M, Ohkawa T, Endo A, Mitsuiki N, Ono T, Aoki Y, Isoda T, Tomizawa D, Takagi M, Kajiwara M, Morio T, Mizutani S. Early coagulation disorder after allogeneic stem cell transplantation is a strong prognostic factor for transplantation-related mortality, and intervention with recombinant human thrombomodulin improves the outcome: a single-center experience. *Int J Hematol.* 2013 Nov;98(5):533-42.
 7. Mizutani S, Takagi M. XCIND as a genetic disease of X-irradiation hypersensitivity and cancer susceptibility. *Int J Hematol.* 2013 Jan;97(1):37-42.
 8. Isoda T, Mitsuiki N, Ohkawa T, Kaneko S, Endo A, Ono T, Aoki Y, Tomizawa D, Kajiwara M, Araki S, Nagasawa M, Morio T, Takagi M, Mizutani S. Irreversible leukoencephalopathy after reduced-intensity stem cell transplantation in adyskeratosis congenita patient with TINF2 mutation. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2013 May;35(4):e178-82.
 9. Piao J, Sakurai N, Iwamoto S, Nishioka J, Nakatani K, Komada Y, Mizutani S, Takagi M. Functional studies of a novel germline p53 splicing mutation identified in a patient with Li-Fraumeni-like syndrome. *Mol Carcinog.* 2013 Oct;52(10):770-6.
 10. 高木正稔, 今井耕輔, 森尾友宏, 水谷修紀. 原発性免疫不全症候群関連の免疫性血小板減少症. *臨床血液* 2013 54(4) 357-64
2. 学会発表
 1. 高木正稔, 金子節子, 今井耕介, 小川誠司, 小島勢二, 森尾友宏, 水谷修紀. ATM変異のない毛細血管拡張性運動失調症 Ataxia Telangiectasia 疑い症例のエクソーム解析. 第6回日本免疫不全症研究会 2013.1.26 東京
 2. 高木正稔, 朴今花, 水谷修紀, 川口裕之, 秋山康介, 森麻希子, 康勝好, 今井千速, 渡辺輝浩, 小川淳, 小林千恵, RALDの視点から見たRAS変異陽性JMML 第18回小児MDS治療研究会 2013.6.2 名古屋
 3. 窪川芽衣, 揚曦, 吉田健一, 高木正稔, 菊地雅子, 横田俊平, 松田和之, 小池健一, 村松秀城, 奥野友介, 白石友一, 千葉健一, 田中洋子, 宮野悟, 小島勢二, 小川誠司, 金兼弘和. NRAS変異を有する自己免疫性リンパ増殖症候群様疾患の1例, 第4回関東甲信越免疫不全症研究会 2013.9.22 東京
 4. 高木正稔, 益谷美都子, 水谷修紀. E2A-HLF陽性急性リンパ性白血病に対するPARP阻害剤の有効性, 第72回日本癌学会学術総会 2013.10.3-5 横浜
 5. 高木正稔. 毛細血管拡張性運動失調症- 原発性免疫不全症から血液悪性腫瘍発症機構に迫る- 第75回日本血液学会学術集会 2013.10.11-13 札幌
 6. Masatoshi Takagi, Jinhua Piao, Takahiro Kamiya, Takeshi Inukai, Kanji Sugita, Kazuma Ohyashiki, Mitsuko Masutani, Shuki Mizutani. Sensitivity to PARP inhibitor in acute lymphoblastic leukemia, 第75回日本血液学会学術集会 2013.10.11-13 札幌
 7. Akifumi Endo, Ken Watanabe, Norio Shimizu, Harutaka Katano, Naoki Inoue, Tetsushi Yoshikawa, Masatoshi Takagi, Kohsuke Imai, Tomohiro Morio, Shuki Mizutani. CIHV-6 was activated in a patient with X-linked severe c

ombined immunodeficiency, 第75回日本血液学会学術集会 2013.10.11-13 札幌

8. Chika Kobayashi, Teppei Okawa, Daisuke Tomizawa, Mari Tezuka, Kohsuke Imai, Masatoshi Takagi, Michiko Kaijiwara, Masayuki Nagasawa, Tomohiro Morio, Shuki Mizutani. A case with refractory langerhans cell histiocytosis responded to combination of 2-CdA and Ara-C, 第75回日本血液学会学術集会 2013.10.11-13 札幌
9. Mari Tezuka, Kei Iwata, Chika Kobayashi, Shinpei Baba, Teppei Okawa, Keisuke Nakajima, Daisuke Tomizawa, Yuuji Sugawara, Masatoshi Takagi, Masayuki Nagasawa, Shuki Mizutani. Critical illness myopathy following endotoxin shock in a case of acute lymphoblastic leukemia, 第75回日本血液学会学術集会 2013.10.11-13 札幌
10. 小林千佳、宮脇零士、青木由貴、今井耕輔、富澤大輔、梶原道子、高木正稔、森尾友宏、水谷修紀. 重症先天性好中球減少症(ELANE変異)に対する非血縁者間同種臍帯血移植、第19回小児H-SCT研究会 2013.10.25 東京
11. 高木正稔. RAS 関連自己免疫性リンパ増殖症様疾患(RALD) 第 116 回日本小児科学会学術集会シンポジウム 2013.4.21 広島

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Ⅲ. 分担研究報告書

「RAS 関連自己免疫性リンパ球増殖症候群様疾患(RALD)の実態調査および病態病因解析に関する研究」

—自然寛解する若年性骨髄単球性白血病(JMML)の分子細胞生物学的解析—

研究分担者 水谷 修紀

(東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・発生発達病態学分野・教授)

研究要旨： 自己免疫性リンパ球増殖症候群(ALPS)類縁疾患であるRAS関連自己免疫性リンパ球増殖症候群様疾患(RALD)はその病態、症状に不明な点が多く若年性顆粒単球性白血病(JMML)との差異が問題となっている。JMMLは予後不良な疾患であるが、RAS変異を有するJMMLの一部は造血幹細胞移植なしに生存することが知られている。これら視点から造血幹細胞移植なしに生存しているJMML症例を後方視的に再検討した。全ての症例でJMMLは完解していたものの、これら症例では依然として末梢血細胞にRASの変異を持つ細胞が残存し、また自己免疫症状を呈している例があり、RALDに近い病態と考えられた。

A. 研究目的

自己免疫性リンパ球増殖症候群 Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS)はアポトーシスの障害により肝脾腫、リンパ節腫脹などのリンパ増殖を示し自己免疫疾患を合併する症候群で FAS や FAS リガンドの異常が知られている。一方で我々の同定した RAS 関連自己免疫性リンパ球増殖症候群様疾患(RALD)も臨床症状は ALPS と近似し、症状、一般検査所見からは両者を区別することは難しい。若年性顆粒単球性白血病(JMML)は RAS-MAPK 経路の異常を基調とする疾患で RALD と同様に RAS 変異に基づいて発症する疾患である。その一部は自己免疫症状を伴い、こういった観点からは RALD に近い症例も存在する。しかし国際的な診断基準からは末梢血単球数増加が必須で、これは RALD には観察されない。一般的に JMML は予後不良の疾患で救命には造血幹細胞

移植が必須とされている。しかし軽微な化学療法、分化誘導療法や経過観察のみで寛解した症例も報告があり、RALD と自己免疫症状を伴う JMML と RALD の差異は明らかでない。自然寛解した JMML を中心に症例を集積し RALD との差異を明らかにする。

B. 研究方法

JMML 診断中核施設より患者診療施設、担当医情報を入手し、担当医に造血幹細胞移植なしで生存している JMML 患者の有無を質問する。造血幹細胞移植なしで生存している JMML がいたら、主治医より患者、または、及び代諾者に RAS 変異のある腫瘍細胞の残存病変検索の可否を訪ね、承諾の得られたケースについて変異細胞の有無を検索する。また免疫グロブリン値、肝脾腫の有無の臨床情報を入手する。

(倫理面への配慮)

RAS 変異のある腫瘍細胞の残存病変の有無の検索は連結不可能匿名化で行われた。遺伝子解析にあたっては、三省合同のゲノム指針に則り、患者又は両親から同意を得、当センターの倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

6名の造血幹細胞移植なしで生存しているJMML患者が同定された。このうち4名で高ガンマグロブリン血症が認められ、全例で何らかの自己抗体が陽性であった。2例ではALPS/RALDと類似の臨床所見を示し、またこのうち1例はSLE様の症状を呈していた。

6症例全てでRAS変異をもつ血液細胞が残存し、変異はTリンパ球、Bリンパ球、骨髄単球すべての血球系細胞に認められた。これら細胞はTCR受容体の解析からpolyclonalであることが明らかとなった。またRALDの分子生物学的特徴とされるBim蛋白質の発現量低下が見られた。

また現在まで3例報告のあった本邦の症例のほか新たに2例のRALD疑い例が集積した。しかしこれら症例はJMMLの診断基準を満たすものであった。

D. 考察

JMMLは予後不良の血液腫瘍性疾患で、造血幹細胞移植が唯一の治療法とされる。しかしながら造血幹細胞移植なしで生存している症例も存在し、その多くがRAS変異を抱えたままであり、何らかの免疫異常を呈することが明らかとなった。症状的にALPS/RALDに非常に近い症例も存在し、RALDとJMMLの差が非常にあいまいであることが明らかとなった。しかしJMMLは基本的に予後不良疾患であり造血幹細胞移植が唯一の治療法とされる。一方RALDの長期的予後は明らかとなっていないが、免疫抑制剤の使用である程度の間、症状の緩和が得られる可能性が示唆され、自然寛

解も期待され、造血幹細胞移植の適応は慎重に検討する必要があると考える。JMML罹患後、造血幹細胞移植なしで、長期生存し自己免疫疾患を合併する症例があることが明らかとなったので、JMMLの従来の診断基準はRALDを包括するものであり、本当の意味での予後不良JMMLを抽出するには不十分であると考えられた。

E. 結論

RAS変異のあるJMMLのうち自然寛解を示す一群があることが明らかとなった。またこのうちの一部は自己免疫症状を呈していた。こういった症例は診断当初JMMLの診断基準を満たしてはいたが、よりRALDに近い病態と考えられた。RAS変異のあるJMMLに対し治療法の選択を考える上で造血幹細胞移植の選択は慎重にあるべきと考えられた。また従来のJMMLの診断基準をRALDの存在を含め再考する余地があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Takagi M, Sato M, Piao J, Miyamoto S, Isoda T, Kitagawa M, Honda H, Mizutani S. ATM-dependent DNA damage-response pathway as a determinant in Chronic Myelogenous Leukemia. *DNA Repair*. 2013 Jul;12(7):500-7.
2. Takagi M, Piao J, Lin L, Kawaguchi H, Imai C, Ogawa A, Watanabe A, Akiyama K, Kobayashi C, Mori M, Ko K, Sugimoto M, Mizutani S. Autoimmunity and persistent RAS-mutated clones long after the spontaneous regression of JMML. *Leukemia*. 2013 Sep;27(9):1926-8
3. Unno J, Takagi M, Piao J, Sugimoto M, Honda F, Maeda D, Masutani M, Kiyono T, Watanabe F, Morio T, Teraoka H, Mizutani S. Artemis-dependent DNA double-strand break formation at stalled replication forks. *Cancer Sci*. 2013 Jun;104(6):703-10
4. Tamaichi H, Sato M, Porter AC, Shimizu T, Mizutani S, Takagi M. Ataxia telangiectasia mutated-dependent regulation of topoisomerase II alpha expression and

- sensitivity to topoisomerase II inhibitor. *Cancer Sci.* 2013 Feb;104(2):178-84.
5. Machida S, Tomizawa D, Tamaichi H, Okawa T, Endo A, Imai K, Nagasawa M, Morio T, Mizutani S, Takagi M. Successful treatment of diffuse large B cell lymphoma in a patient with ataxia telangiectasia using rituximab. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2013 Aug;35(6):482-5
 6. Nagasawa M, Ohkawa T, Endo A, Mitsuiki N, Ono T, Aoki Y, Isoda T, Tomizawa D, Takagi M, Kajiwara M, Morio T, Mizutani S. Early coagulation disorder after allogeneic stem cell transplantation is a strong prognostic factor for transplantation-related mortality, and intervention with recombinant human thrombomodulin improves the outcome: a single-center experience. *Int J Hematol.* 2013 Nov;98(5):533-42.
 7. Mizutani S, Takagi M. XCIND as a genetic disease of X-irradiation hypersensitivity and cancer susceptibility. *Int J Hematol.* 2013 Jan;97(1):37-42.
 8. Isoda T, Mitsuiki N, Ohkawa T, Kaneko S, Endo A, Ono T, Aoki Y, Tomizawa D, Kajiwara M, Araki S, Nagasawa M, Morio T, Takagi M, Mizutani S. Irreversible leukoencephalopathy after reduced-intensity stem cell transplantation in adyskeratosis congenita patient with TNF2 mutation. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2013 May;35(4):e178-82.
 9. Tomizawa D, Tawa A, Watanabe T, Saito AM, Kudo K, Taga T, Iwamoto S, Shimada A, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Takahashi H, Nakayama H, Kiyokawa N, Isoyama K, Mizutani S, Hara J, Horibe K, Nakahata T, Adachi S. Appropriate dose reduction in induction therapy is essential for the treatment of infants with acute myeloid leukemia: a report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Int J Hematol.* 2013 Nov;98(5):578-88.
 10. Horibe K, Saito AM, Takimoto T, Tsuchida M, Manabe A, Shima M, Ohara A, Mizutani S. Incidence and survival rates of hematological malignancies in Japanese children and adolescents (2006-2010): based on registry data from the Japanese Society of Pediatric Hematology. *Int J Hematol.* 2013 Jul;98(1):74-88.
 11. Shimizu K, Yamagata K, Kurokawa M, Mizutani S, Tsunematsu Y, Kitabayashi I. Roles of AML1/RUNX1 in T-cell malignancy induced by loss of p53. *Cancer Sci.* 2013 Aug;104(8):1033-8.
 12. Hosokawa S, Haraguchi G, Sasaki A, Arai H, Muto S, Itai A, Doi S, Mizutani S, Isobe M. Pathophysiological roles of nuclear factor kappaB (NF-kB) in pulmonary arterial hypertension: effects of synthetic selective NF-kB inhibitor IMD-0354. *Cardiovasc Res.* 2013 Jul 1;99(1):35-43.
 13. Takizawa F, Mizutani S, Ogawa Y, Sawada N. Glucose-independent persistence of PAI-1 gene expression and H3K4 tri-methylation in type 1 diabetic mouse endothelium: implication in metabolic memory. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Mar 29;433(1):66-72.
 14. Mizutani S. Guest editorial: recent advances in the genetic basis of childhood hemato-oncological diseases. *Int J Hematol.* 2013 Jan;97(1):1-2.
 15. Urayama KY, Chokkalingam AP, Manabe A, Mizutani S. Current evidence for an inherited genetic basis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol.* 2013 Jan;97(1):3-19.
 16. Matsubara Y, Ono M, Miyai K, Takizawa F, Takasawa K, Onishi T, Kashimada K, Mizutani S. Longitudinal analysis of growth and body composition of Japanese 21-OHD patients in childhood. *Endocr J.* 2013;60(2):149-54.
 17. 高木正稔, 今井耕輔, 森尾友宏, 水谷修紀. 原発性免疫不全症候群関連の免疫性血小板減少症. 臨床血液 2013 54(4) 357-64
2. 学会発表
 1. 高木正稔, 金子節子, 今井耕介, 小川誠司, 小島勢二, 森尾友宏, 水谷修紀. ATM 変異のない毛細血管拡張性運動失調症 Ataxia Telangiectasia 疑い症例のエ

- クソーム解析. 第6回日本免疫不全症研究会 2013.1.26 東京
2. 高木正稔、朴今花、水谷修紀、川口裕之、秋山康介、森麻希子、康勝好、今井千速、渡辺輝浩、小川淳、小林千恵、RALDの視点から見たRAS変異陽性JMML 第18回小児MDS治療研究会 2013.6.2 名古屋
 3. 高木正稔、益谷美都子、水谷修紀.E2A-HLF陽性急性リンパ性白血病に対するPARP阻害剤の有効性、第72回日本癌学会学術総会 2013.10.3-5 横浜
 4. Masatoshi Takagi, Jinhua Piao, Takahiro Kamiya, Takeshi Inukai, Kanji Sugita, Kazuma Ohyashiki, Mitsuko Masutani, Shuki Mizutani. Sensitivity to PARP inhibitor in acute lymphoblastic leukemia, 第75回日本血液学会学術集会 2013.10.11-13 札幌
 5. Akifumi Endo, Ken Watanabe, Norio Shimizu, Harutaka Katano, Naoki Inoue, Tetsushi Yoshikawa, Masatoshi Takagi, Kohsuke Imai, Tomohiro Morio, Shuki Mizutani. CIHHV-6 was activated in a patient with X-linked severe combined immunodeficiency, 第75回日本血液学会学術集会 2013.10.11-13 札幌
 6. Chika Kobayashi, Teppei Okawa, Daisuke Tomizawa, Mari Tezuka, Kohsuke Imai, Masatoshi Takagi, Michiko Kawamura, Masayuki Nagasawa, Tomohiro Morio, Shuki Mizutani. A case with refractory langerhans cell histiocytosis responded to combination of 2-CdA and Ara-C, 第75回日本血液学会学術集会 2013.10.11-13 札幌
 7. Mari Tezuka, Kei Iwata, Chika Kobayashi, Shinpei Baba, Teppei Okawa, Keisuke Nakajima, Daisuke Tomizawa, Yui Sugawara, Masatoshi Takagi, Masayuki Nagasawa, Shuki Mizutani. Critical illness myopathy following endotoxins hock in a case of acute lymphoblastic leukemia, 第75回日本血液学会学術集会 2013.10.11-13 札幌
 8. 小林千佳、宮脇零士、青木由貴、今井耕輔、富澤大輔、梶原道子、高木正稔、森尾友宏、水谷修紀. 重症先天性好中

球減少症(ELANE変異)に対する非血縁者間同種臍帯血移植、第19回小児H-SCT研究会 2013.10.25 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

「RAS 関連自己免疫性リンパ球増殖症候群様疾患(RALD)の実態調査および病態病因解析に関する研究」

—RAS 関連自己免疫性リンパ球増殖症候群様疾患(RALD)に対する最適治療法の開発—

研究分担者 森尾友宏

(東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 発生発達病態学分野 准教授)

研究要旨： RALD の症例の治療経過の解析を通し、適切な治療法を模索するとともに、その経験を提示することにより、今後の治療ガイドライン策定のための基礎資料を得ることを目的とした。未介入、プレドニゾロン、シクロスポリン A、ミコフェノール酸モフェチル、造血幹細胞移植などの治療が行われ、プレドニゾロンの有効性は臨床的に明らかであった。またミコフェノール酸モフェチルやゾレドロン酸の有効性が示唆された。今後、治療法の標準化に向けた、症例、治療経験の蓄積が必要と考えられた。

A. 研究目的

自己免疫性リンパ増殖症疾患 ALPS 類縁疾患 RALD が同定され、その疾患概念が確立しつつあるが、その治療法については全く未知であり、ALPS の治療方針に元準じて治療が行われているのが現状である。我々の経験した 4 症例の RALD の臨床経過を検討し、その治療法を模索する。

B. 研究方法

症例 1 ; 2 歳、症例 2 ; 19 歳例、症例 3 ; 1 歳例、症例 4 ; 1 歳例、自己免疫性リンパ増殖症疾患 ALPS 様症状を呈し、KRAS または NRAS の変異が同定された。その治療法をまとめることにより、RALD 治療方針策定のための基礎資料とする。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析にあたっては、三省合同のゲノム指針に則り、患者又は両親から同意を得、当センターの倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

症例 1 は重度の自己免疫性血小板減少症、自己免疫性溶血性貧血、高ガンマグロブリン血症を呈していた。プレドニゾロン 2mg/kg の投与で自己免疫性血小板減少症、自己免疫性溶血性貧血は改善し、プレドニゾロンの減量を行った。しかしながらプレドニゾロン減量に伴い自己免疫性血小板減少症のコントロールは不良となり、一時低下していたガンマグロブリン値の再上昇が認められた。そこでシクロスポリン A の投与をプレドニゾロンと併用で行った。しかしシクロスポリン A に対する反応は不良で、プレドニゾロンの増量を余儀なくされた。

しかし高容量でのプレドニゾロンの長期投与による副作用出現が懸念されたためミコフェノール酸モフェチルの投与をおこないつつ、プレドニゾロンの減量を行い、現在ミコフェノール酸モフェチル 33mg/kg、プレドニゾロン 0.3mg/kg で自己免疫症状の緩和を得て、経過を観察していた。本症例においてその後血小板減少が出現し、大量ガンマグロブリン療法など行うも、効果は一時的であり、プレドニゾロン長期投与に伴い骨粗鬆症の病態を呈したため、RAS 阻害効果があり骨粗鬆症の治療に用いられるゾレドロン酸の投与を行った。その結果自己免疫症状の緩和が見られ、また血小板数も改善し、臨床症状緩和に関しては効果が認められた。また治療前に算定した骨髓造血幹細胞中の KRAS 変異陽性細胞数も減少が認められた。

症例 2 は汎血球減少があり、本年度は経過フォロー中に原因不明の心膜炎→心不全や過労を契機とした筋炎を呈した。また骨髓検査では、過形成性骨髓で、3 系統に異形性を認め、骨髓上は MDS-RCMD と判断した。免疫抑制薬による介入時期と考えていたが、骨髓所見からは今後根治的治療である造血幹細胞移植に踏み切るかを判断する時期と考えられた。

症例 3 も自己免疫症状を前面に出し、RALD が強く考えられたが、JMML の診断基準をみたすものであった。軽度の貧血、血小板減少があるも、輸血依存ではなかった。プレドニゾロンの投与は見送られ、経過観察となった。

症例 4 は JMML の診断基準に合致せず積極的に RALD と診断できる症例であった。しかし臨床症状は JMML に近いものであり、輸血依存の血球減少が認められた。シタラビンやプレドニゾロンに対する反応は不良で、脾腫が著明で進行性であり、呼吸不全症状が強くなって来たため、造血幹細胞移植を受け、寛解を得た。

D. 考察

RALD は ALPS と同様にプレドニゾロンにより症状の緩和が見られることが明らかとなった。しかしプレドニゾロン反応不良

で、呼吸器症状の悪化から造血幹細胞移植が行われた症例もあった。また一方で治療介入なしに経過が安定している症例もあった。このように症例ごとに様々な治療方針がとられており、症状に見合った治療法の選択が必要なことが明らかとなった。ALPS と同様にプレドニゾロンにより症状の緩和が見られたが、比較的高用量での投与が余儀なくされ、長期投与に伴う副作用が問題となることが予想された。RAS 経路の活性化は calcium/calcineurin シグナルを活性化させ、NFAT を介した IL2 産生を促すことからシクロスポリン A の有効性が予測され、今回は 2 次選択としてシクロスポリン A が用いられたが、反応は不良であった。そこで細胞内プリン代謝 de novo 系速酵素であるイノシンモノホスフェイト合成酵素 Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) を可逆的かつ特異的に阻害し、グアニンヌクレオシドプールを枯渇させ、DNA 合成を阻害することに効果を発揮するミコフェノール酸モフェチルを用いたところ、比較的、反応性が良く、プレドニゾロンの減量が行えた。これは RAS 経路の活性化には GDP 結合型 RAS がグアニンヌクレオチドエクスチェンジファクター guanine-nucleotide exchange factors (GFE) によって GTP 結合型 RAS となることが必要である。ミコフェノール酸モフェチルによりこれにはこの活性化に必要なグアニンが枯渇すれば、結果的に RAS 経路が阻害される可能性がある。このような観点から臨床的にはミコフェノール酸モフェチルが効果を発揮した可能性が考えられた。今後、分子生物学的な解析を通して RAS 経路におけるミコフェノール酸モフェチルの作用機序について検討を加えていく必要があると考える。また RAS の細胞膜への移行と prenylation 化を阻害する bisphosphonate であるゾレドロン酸も一定の効果があることが明らかとなった。今後臨床試験を展開していくためのプロトコールの作成を行い IRB 承認を得た。

E. 結論

RALD の治療法としてステロイドを含めた免疫抑制剤が臨床症状の緩和に有用であ

ることが明らかとなった。またミコフェノール酸モフエチルの有用性が臨床的に、またその薬理学的効果からも示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagasawa M, Ohkawa T, Endo A, Mitsui N, Ono T, Aoki Y, Isoda T, Tomizawa D, Takagi M, Kajiwara M, Morio T, Mizutani S. Early coagulation disorder after allogeneic stem cell transplantation is a strong prognostic factor for transplantation-related mortality, and intervention with recombinant human thrombomodulin improves the outcome: a single-center experience. *Int J Hematol.* 2013 Nov;98(5):533-42.
2. Kumaki S, Sasahara Y, Kamachi Y, Muramatsu H, Morio T, Goi K, Sugita K, Urabe T, Takada H, Kojima S, Tsuchiya S, Hara T. B-cell function after unrelated umbilical cord blood transplantation using a minimal-intensity conditioning regimen in patients with X-SCID. *Int J Hematol.* 98:355-60, 2013.
3. Machida S, Tomizawa D, Tamaichi H, Okawa T, Endo A, Imai K, Nagasawa M, Morio T, Mizutani S, Takagi M. Successful treatment of diffuse large B cell lymphoma in a patient with ataxia telangiectasia using rituximab. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2013 Aug;35(6):482-5
4. Sugita S, Ogawa M, Shimizu N, Morio T, Ohguro N, Nakai K, Maruyama K, Nagata K, Takeda A, Usui Y, Sonoda K, Takeuchi M, Mochizuki M. Use of a comprehensive polymerase chain reaction system for diagnosis of ocular infectious diseases. *Ophthalmology.* 120:1761-68, 2013.
5. Unno J, Takagi M, Piao J, Sugimoto M, Honda F, Maeda D, Masutani M, Kiyono T, Watanabe F, Morio T, Teraoka H, Mizutani S. Artemis-dependent DNA double-strand break formation at stalled replication forks. *Cancer Sci.* 2013 Jun;104(6):703-10
6. Wada T, Muraoka M, Toma T, Imai T, Shigemura T, Agematsu K, Haraguchi K, Moriuchi H, Oh-Ishi T, Kitoh T, Ohara O, Morio T, Yachie A. Rapid Detection of Intracellular p47phox and p67phox by Flow Cytometry; Useful Screening Tests for Chronic Granulomatous Disease. *J Clin Immunol.* 33:857-64, 2013
7. Isoda T, Mitsui N, Ohkawa T, Kaneko S, Endo A, Ono T, Aoki Y, Tomizawa D, Kajiwara M, Araki S, Nagasawa M, Morio T, Takagi M, Mizutani S. Irreversible leukoencephalopathy after reduced-intensity stem cell transplantation in adyskeratosis congenita patient with TNF2 mutation. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2013 May;35(4):e178-82.
8. Fukuda S, Nanki T, Morio T, Hasegawa H, Koike R, Miyasaka N. Recurrent mitral valve regurgitation with neutrophil infiltration in a patient with multiple aseptic abscesses. *Mod Rheumatol.* 2013 (in press)
9. Shimizu M, Kanegane H, Wada T, Motoyoshi Y, Morio T, Candotti F, Yachie A. Aberrant glycosylation of IgA in Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia. *J Allergy Clin Immunol.* 131:587-90, 2013.
10. Yoshimi A, Kamachi Y, Imai K, Watanabe N, Nakadate H, Kanazawa T, Ozono S, Kobayashi R, Yoshida M, Kobayashi C, Hama A, Muramatsu H, Sasahara Y, Jakob M, Morio T, Ehl S, Manabe A, Niemeyer C, Kojima S. Wiskott-Aldrich syndrome presenting with a clinical picture mimicking juvenile myelomonocytic leukaemia. *Pediatr Blood Cancer.* 60:836-41, 2013.
11. Miyabe C, Miyabe Y, Miura NN, Takahashi K, Terashima Y, Morio T, Yamagata N, Ohno N, Shudo K, Suzuki J-I, Isobe M, Matsuhima K, Tsuboi R, Miyasaka N, Nanki T. Am80, a retinoic acid receptor agonist, ameliorates murine vasculitis through the suppression of neutrophil migration and activation. *Arthritis Rheumatism.* 65:503-12, 2013.
12. Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsui N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammerstrom Q, van Zelm MC, Morio T, Imai K, Nonoyama S. Classification of common variable immunodeficiency by quantification of T cell receptor and Ig kappa-deleting

- recombination excision circles. *J Allerg Clin Immunol*. 131:1437-40, 2013.
13. Park TY, Kim SH, Shin YC, Lee NH, Lee RK, Shim JH, Glimcher LH, Mook-Jung I, Cheong E, Kim WK, Honda F, Morio T, Lim JS, Lee SK. Amelioration of neurodegenerative diseases by cell death-induced cytoplasmic delivery of humanin. *J Control Release*. 166:307-15, 2013.
 14. Kawasaki Y, Toyoda H, Otsuki S, Iwasa T, Iwamoto S, Azuma E, Itoh-Habe N, Wada H, Fujimura Y, Morio T, Imai K, Mitsuiki N, Ohara O, Komada Y. A novel Wiskott-Aldrich syndrome protein mutation in an infant with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol*. 290:164-68, 2013.
 15. Kobayashi Z, Akaza M, Numasawa Y, Ishihara S, Tomimitsu H, Nakamichi K, Saijo M, Morio T, Shimizu N, Sanjo N, Shintani S, Mizusawa H. Failure of mefloquine therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy: report of two Japanese patients without human immunodeficiency virus infection. *J Neurol Sci*. 324:190-94, 2013.
 16. Isoda T, Mitsuiki N, Ohkawa T, Kaneko S, Endo A, Ono T, Aoki Y, Tomizawa D, Kajiwarra M, Araki S, Nagasawa M, Morio T, Takagi M, Mizutani S. Irreversible leukoencephalopathy after reduced-intensity stem cell transplantation in adyskeratosis congenita patient with TINF2 mutation. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2013May;35(4):e178-82.
 17. 渡辺恵理, 阿部素子, 工藤寿子, 浜田聡, 糸洲倫江, 中内啓光, 森尾友宏, 渡辺信和:重症複合免疫不全症に対する臍帯血ミニ移植後の混合キメラリズムの遷延 *CYTOMETRY RESEARCH* 23:41-49, 2013.
- 会学術集会 (シンポジウム)、福岡、2013年11月29日 - 12月1日
3. 森尾友宏:原発性免疫不全症候群から学ぶ Human Immunology、第41回日本臨床免疫学会総会、山口、2013年11月27日 - 29日
 4. 森尾友宏:RSウイルス感染症のリスク要因とパリーブズマブ使用の手引き、RSV Symposium on Immune Compromised Children、東京、2013年11月9日
 5. 森尾友宏:日常診療で注意する免疫不全症:初発症状の多彩な顔つき、日本小児科学会静岡地方会第132回地方会(特別講演)、静岡、2013年11月3日
 6. 森尾友宏:易感染性、自己免疫、悪性腫瘍の分子基盤としての原発性免疫不全症、平成25年度遺伝子病制御研究所研究集会、札幌、2013年10月25日
 7. 森尾友宏:分類不能型免疫不全症(CVID)の多彩な病像と分子基盤、第75回日本血液学会学術集会、札幌、2013年10月11日 - 13日
 8. 森尾友宏:免疫細胞培養ガイドライン(免疫治療関連6学会合同策定)について:医療機関・研究施設に求められる基準、第5回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会、名古屋、2013年8月24日
 9. 森尾友宏:好中球の精密な活性化制御機構とその多彩な役割、東京都総合医学研究所セミナー、東京、2013年2月22日

G. 知的財産権の出願・登録状況

2. 学会発表

1. Morio T. Cord blood transplantation for primary immunodeficiency in Japan. AsiaCORD2013. Kobe, Japan. April 2013.
2. 森尾友宏:悪性腫瘍を合併する免疫不全症、第54回日本小児血液・がん学

(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録