

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)〕
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に新たに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 TINF2 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 Kawara, 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 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
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

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)〕

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」

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う造血幹細胞中の 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。シタラピ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出てきたため、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/calcieneurin 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 系律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 となる必要がある。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ェ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 TINF2 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 Allergy 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リズムの遷延 *CYTOMETRY RESEARCH* 23:41-49, 2013.
- 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ピ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

(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」

既存の遺伝子変異を有さない典型的自己免疫性リンパ増殖症候群の一例

研究分担者 金兼 弘和 (富山大学附属病院小児科・講師)

研究要旨: 自己免疫リンパ増殖症候群 (autoimmune lymphoproliferative syndrome : ALPS) は、Fasを介するアポトーシス経路の異常により、リンパ球のホメオスタシスに異常をきたす疾患である。FAS遺伝子の生殖細胞変異を伴うALPS-FAS (60-70%)、体細胞変異を伴うALPS-sFAS (10%)、FASLG遺伝子の変異によるALPS-FASLG (<1%)、CASP10遺伝子の変異によるALPS-CASP10 (2-3%) に分類されるが、遺伝子変異の特定できないもの (ALPS-U) も20-30%存在する。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と考えられる一例を経験した。これに対し全エクソン解析を行ったところ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。全エクソン解析がALPSもしくはALPS類縁疾患の責任遺伝子解明に有用であることが明らかとなった。

A. 研究目的

自己免疫リンパ増殖症候群 (autoimmune lymphoproliferative syndrome : ALPS) は、Fasを介するアポトーシス経路の異常により、リンパ球のホメオスタシスに異常をきたす疾患である。6か月以上続く慢性非悪性非感染性リンパ増殖症および末梢血におけるCD4-CD8-TCR⁺T細胞 (double negative T cells : DNT細胞) の増加によって臨床診断される。原因遺伝子のほとんどはFAS遺伝子の生殖細胞または体細胞の変異であるが、一部FASLGならびにCASP10変異によるものもある。今回典型的ALPSでありながら、FAS, FASLG, CASP10変異が同定されない一例を経験したので報告する。

B. 研究方法

症例は2歳女児である。5か月時に発熱、

汎血球減少、肝機能障害を主訴にY大学病院に入院となった。肝脾腫、凝固線溶系の異常を認め、ステロイドならびにシクロスポリンAの投与にて速やかに解熱し、プレドニゾロン内服にて退院となった。プレドニゾロンの減量に伴い、血小板低下を認め、肝脾腫は持続し、高IgG血症にも気づかれ、ALPS疑いで当大学に検査依頼があった。

患者家族から文書による同意を得て、ヘパリン加静脈血を採取した。単核球に分離後、DNTを含むリンパ球サブセットを行い、残りの単核球から活性化リンパ球を樹立後した。抗Fas抗体で刺激し、Annexin V染色にてリンパ球のアポトーシスを評価した。またバッフィーコートからDNAを抽出し、FAS, FASLG, CASP10遺伝子解析を行った。さらに単核球から磁気ビーズ法にて濃縮したDNT細胞からDNAを抽出し、FAS遺伝子解析を行った。また責任遺伝子同定のた

め、全エクソン解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究はヒト検体を用いて解析を行うものであり、検体量および採取時の苦痛には十分な配慮を行った。遺伝子解析については各種指針を遵守して、患者個人情報保護について十分な配慮を行った。

C. 研究結果

リンパ球サブセットにて DNT 細胞は 6.5%(正常は 1.5%以下)と増加し、肝脾腫、血球減少などの臨床症状と考え併せ、ALPS と診断した。しかし活性化 T 細胞におけるアポトーシスは健常者と同程度に観察され、ALPS-FAS は否定的であった。FAS はもちろんのこと FASLG, CASP10 遺伝子解析を行ったが、いずれも変異は同定されなかった。そこで FAS 体細胞変異による ALPS-sFAS の可能性を考え、純化した DNT 細胞における FAS 遺伝子解析を行ったが、変異は同定できなかった。現在、全エクソン解析による網羅的遺伝子解析の結果、患児は NRAS 遺伝子の変異を持っていることが明らかとなった。

なお患児は現在プレドニゾン 3mg, ミコフェノール酸モフェチル 250mg 内服にてコントロールされている。

D. 考察

非悪性リンパ増殖症、免疫抑制剤に依存する自己免疫性血球減少、高 IgG 血症ならびに DNT 細胞の増加から典型的 ALPS と診断される。わが国においては約 20 例の ALPS-FAS と 1 例の ALPS-sFAS が同定されているが、ALPS-FASLG ならびに ALPS-CASP10 の報告はこれまでない。自験例ではアポトーシスの異常は認められず、ALPS-FASLG, ALPS-CASP10, ALPS-sFAS の可能性が考えられたが、いずれも否定的であった。そこで ALPS-U に分類されるが、何らかの遺伝的背景を有する可能性があるため、患者家族から同意を得て、本人ならびに両親の全エクソンシーケンスを行った。また ALPS の遺伝子解析においては体

細胞変異も少なからず存在するため、従来のサンガー法によるシーケンスよりも次世代シーケンサーを利用したアンプリコンシーケンスの方が適していると思われる。本患者では全エクソン解析が行われ、NRAS 遺伝子の変異が同定された。全エクソン解析が ALPS もしくは ALPS 類縁疾患の責任遺伝子解明に有用であることが明らかとなった。これまで RALD では DNT 細胞の上昇は認められないとされているが、自験例では DNT 細胞の上昇が認められ、DNT 細胞だけで ALPS との鑑別ができないことが明らかとなった。

E. 結論

臨床症状と DNT 細胞増加から ALPS と診断したが、既存の遺伝子変異はなく、ALPS-U と考えられる一例を経験した。自験例に対し全エクソン解析を行うことにより NRAS 遺伝子の変異を同定することができ、RALD の診断が行えた。全エクソン解析が ALPS もしくは ALPS 類縁疾患の責任遺伝子解明に有用であることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kanegane H., Taneichi H., Nomura K., Wada T., Yachie A., Imai K., Ariga T., Santisteban I., Hershfields MS., and Miyawaki T. Successful bone marrow transplantation with reduced intensity conditioning in a patient with delayed-onset adenosine deaminase deficiency. *Pediatr Transplant* 17: E29-E32, 2013.
2. Nomura K., Hoshino A., Miyawaki T., Hama A., Kojima S., and Kanegane H. Neutropenia and myeloid dysplasia in a patient with delayed-onset adenosine deaminase deficiency. *Pediatr Blood Cancer* 60: 885-886, 2013.
3. Marsh RA., Rao K., Satwani P., Lehmborg K., Müller I., Li D., Kim MO., Fischer A., Latour S., Sedlacek P., Barlogis V., Hamamoto K., Kanegane H., Milanovich S., Margolis DA., Dimmock D., Casper J.,

- Douglas DN., Amrolia PJ., Veys P., Kumar AR., Jordan MB., Bleesing JJ., and Filipovich AH. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for XIAP deficiency: an international survey reveals poor outcomes. *Blood* 121: 877-883, 2013.
4. Lee YW., Yang EA., Kang HJ., Yang X., Mitsuiki N., Ohara O., Miyawaki T., Kanegane H., and Lee JH. Novel mutation of IL2RG gene in a Korean boy with X-linked severe combined immunodeficiency. *J Invest Allergol Clin Immunol.* 23: 65-67, 2013.
 5. Morimoto A, Shimazaki C, Takahashi S, Yoshikawa K, Nishimura R, Wakita H, Kobayashi Y, Kanegane H, Tojo A, Imamura T, Imashuku S.; Japan LCH Study Group. Therapeutic outcome of multifocal Langerhans cell histiocytosis in adults treated with the Special C regimen formulated by the Japan LCH Study Group. *Int J Hematol.* 2013; 97: 103-108.
 6. Nomura K, Hoshino A, Miyawaki T, Hama A, Kojima S, Kanegane H. Neutropenia and myeloid dysplasia in a patient with delayed-onset adenosine deaminase deficiency. *Pediatr Blood Cancer.* 2013; 60: 885-886.
 7. 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.* 2013; 131: 587-590.
 8. Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsuiki N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammarström Q, van Zelm MC, Morio T, Imai K, Nonoyama S. Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin κ-deleting recombination excision circles. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 131(5):1437-40.e5
 2. Hoshino A., Kanegane H., Yang X., Ban H., Migita M., Kiyokawa N., and Miyawaki T. B-precursor acute lymphoblastic leukemia in a patient with X-linked agammaglobulinemia. The 4th JSH International symposium 2013, 2013, 5, 24-25, Ehime, Japan.
 3. 金兼弘和. 抗体不全症と中枢神経感染症. 第 18 回日本神経感染症学会, 2013, 10, 11-12, 宮崎.
 4. 金兼弘和. 免疫不全症. 第 41 回日本臨床免疫学会 2013, 11, 27-29, 下関.
 5. 金兼弘和. 造血不全を合併する免疫不全症. 第 55 回日本小児血液・がん学会, 2013, 11/29-12/1, 福岡.
- 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

2. 学会発表

1. Kanegane H, Yang X., Nishida N., Hoshino A., and Miyawaki T. Clinical and genetic characterization of X-linked lymphoproliferative syndrome in Japan. The 4th JSH International symposium 2013, 2013, 5, 24-25, Ehime, Japan.

