

Takagi M, Nagasawa M, Morio T, Mizutani S. Acute myeloid leukemia with EWSR1 split signal. 第 74 回日本血液学会学術集会 2012.10.19-21 京都

26. 玉一博之, 朴 今花, 櫻井直人, 岩本彰太郎, 駒田美弘, 西岡淳二, 中谷 中, 高木正稔, 水谷修紀. Li-Fraumeni 様症候群より同定されたスプライス変異 p53 の機能解析. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会 2012.11.30-12.2, 横浜
27. Aoki Y, Sato Y, Hijikata A, Watanabe T, Takagi M, Suzuki N, Tomizawa D, Koh K, Ishii E, Ohara O, Mizutani S, Ishikawa F. Leukemia initiating cells in infant acute lymphoblastic leukemia with MLL gene rearrangement. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会 2012.11.30-12.2 横浜
28. Takagi M, Piao J, Kamiya T, Masutani M, Mizutani S. PARP inhibitor selectively induce cell death in E2A-PBX1 and E2A-HLF positive leukemia. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会 2012.11.30-12.2 横浜
29. 高木正稔, 佐藤正樹, 朴 今花, 本田博章, 水谷修紀. 慢性骨髄性白血病 急性転化における DNA 損傷応答機構の関与. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会 2012.11.30-12.2 横浜
30. 遠藤明史, 渡邊健, 大川哲平, 富澤大輔, 今井耕輔, 高木正稔, 長澤正之, 森尾友宏, 水谷修紀. Chromosomally integrated HHV-6 の病原性の解析. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会 2012.11.30-12.2 横浜
31. 手束真理, 大川哲平, 磯田健志, 富澤大輔, 高木正稔, 今井耕介, 長澤正之, 森尾友宏, 水谷修紀, 今留謙一. EB ウィルス関連血球貪食症候群の治療後終了後早期再燃に対し, 同胞間骨髄移植を施行した一例. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会 2012.11.30-12.2 横浜
32. 山内 健, 磯田健志, 大川哲平, 手束真理, 富澤大輔, 高木正稔, 今井耕輔, 梶原道子, 長澤正之, 森尾友宏, 水谷修紀.

高 IgM 症候群の臍帯血移植後に遷延する骨髄血球分化障害に対してリメタゾン投与が奏効した一例. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会 2012.11.30-12.2 横浜

33. 水谷修紀. 小児がん医療の問題点. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会 2012 年 11 月 30-12 月 2 日 横浜

#### 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、治療経過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 の診断基準をみたまものであった。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/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, 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.
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, 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.
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, Mitsuiki 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. Isoda T, Takagi M, Piao J, Nishii R, Masaki S, Masuda K, Ikawa T, Azuma M, Morio T, Kawamoto H, Mizutani S. Process for immune defect and chromosomal translocation during early thymocyte development lacking ATM. *Blood.* 2012;120:789-99.
  18. Nozaki T, Takada H, Ishimura M, Ihara K, Imai K, Morio T, Kobayashi M, Nonoyama S, Hara T. Endocrine complications in primary immunodeficiency diseases in Japan. *Clinical Endocrinol.* 2012;77:628-34.
  19. Nakajima K, Hayashi M, Tanuma N, Morio T. An autopsy case of polymicrogyria and intracerebral calcification with death by intracerebral hemorrhage. *Neuropathology.* 2012;32:207-10.
  20. Honda F, Kano H, Kanegane H, Nonoyama S, Kim E-S, Lee S-K, Takagi M, Mizutani S, Morio T. Btk negatively regulates ROS production and stimulation-induced apoptosis in human neutrophils. *Nature Immunol.* 2012;13:369-78.
  21. Jang SH, Lim JW, Morio T, Kim H. Lycopene inhibits Helicobacter pylori-induced ATM/ATR-dependent DNA damage response in gastric epithelial AGS cells. *Free Radical Biol. Med.* 2012;52:607-15.
  22. Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, RuNan W, 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. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Blood.* 2012;119:2376-84.
  23. Sato R, Iizumi S, Kim E-S, Honda F, Lee S-K, Adachi N, Koyama H, Mizutani S, Morio T. Impaired cell adhesion, apoptosis, and signaling in WASP-gene disrupted Nalm-6 pre-B cells and recovery of cell adhesion using a transducible form of WASP. *Int. J. Hematol.* 2012;95:299-310.
  24. Uchida Y, Matsubara K, Morio T, Kasawaki Y, Iwata A, Yura K, Kamimura K, Nigami H, Fukawaya T. Acute cerebellitis and concurrent encephalitis associated with parvovirus B19 infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2012;31:427.
  25. Lee SW, Kim JH, Park MC, Park YB, Chae WJ, Morio T, Lee DH, Yang SH, Lee SK, Lee SK, Lee SK. Alleviation of rheumatoid arthritis by cell-transducible methotrexate upon transcutaneous delivery. *Biomaterials.* 2012;33:1563-72.
  26. Honda F, Hane Y, Toma T, Yachie A, Kim E-S, Lee S-K, Takagi M, Mizutani S, Morio T. Transducible form of p47phox and p67phox compensate for defective NADPH oxidase activity in neutrophils of

- patients with chronic granulomatous disease. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2012;417:162-8.
27. Nakamura K, Du L, Tunuguntla R, Fike F, Cavalieri S, Morio T, Mizutani S, Brusco A, Gatti RA. Functional characterization and targeted correction of ATM mutations identified in Japanese patients with ataxia-telangiectasia. *Hum Mutat.* 2012;33:198-208.
  28. Uchida Y, Matsubara K, Wada T, Oishi K, Morio T, Takada H, Iwata A, Yura K, Kamimura K, Nigami H, Fukuya T. Recurrent bacterial meningitis by three different pathogens in an isolated asplenic child. *J Infect Chemother.* 2012;52:607-15.
  29. 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.
2. 学会発表
1. Morio T. Cord blood transplantation for primary immunodeficiency in Japan. AsiaCORD2013. Kobe, Japan. April 2013.
  2. Morio T. Primary Immunodeficiencies due the Defect in Signaling Molecules. 2012 KSMCB Annual Meeting. Seoul, Korea. Oct. 2012.
  3. Mitsuiki N, Oshim K, Imai K, Ohara O, Morio T, Mizutani A. Genetic Analysis For 207 Cases With Primary Immunodeficiency (PID) Consulted to A Single Center Through PID Network in JAPAN (PIDJ) in 5 Years (2007-2011). 15th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2012). Florence, Italy. Oct. 2012.
  4. Isoda T, Takagi M, Morio T, Kawamoto H, Mizutani S. Visualization of chromosomal translocation and early T-cell development failure in ATM deficiency. 15th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2012). Florence, Italy. Oct. 2012.
  5. Honma K, Imai K, Kamae C, Ishida H, Ito Y, Kojima S, Yokosuka T, Kanegane H, Morio T, Sasahara Y, Fujiwara T, Harigae H, Hashii Y, Ohara O, Nonoyama S. Clinical features and immunological abnormalities of GATA2 deficiency in JAPAN. 15th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2012). Florence, Italy. Oct. 2012.
  6. Wada T, Muraoka M, Toma T, Shigemura T, Agematsu K, Moriuchi H, Ohara O, Morio T, Yachie A. Rapid detection of intracellular p47phox and p67phox by flow cytometry in patients with chronic granulomatous disease. 15th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2012). Florence, Italy. Oct. 2012.
  7. 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. 15th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2012). Florence, Italy. Oct. 2012.
  8. Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsuiki N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammarström Q, MC van Zelm, Morio T, Imai K, Nonoyama S. Classification of common variable immunodeficiency by quantification of T cell receptor recombination excision circles (TREC) and Ig kappa-deleting recombination excision circles (KREC). 15th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2012). Florence, Italy. Oct. 2012.
  9. Mitsuiki N, Oshima K, Imai K, Ohara O, Morio T, Mizutani S. Genetic analysis for 207 cases with primary immunodeficiency (PID) consulted to a single center through PID network in Japan (PIDJ) in 5 years (2007-2011). 15th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2012). Florence, Italy. Oct. 2012.
  10. Morio T. An old and new regulator of ROS production in neutrophils. Seminar of Brain Korea 21 Project for Functional Foods and Nutrigenomics. Seoul, Korea. Mar. 2012.
  11. 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
12. 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
  13. 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
  14. 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
  15. 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
  16. 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
  17. 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
  18. 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
  19. Takada H, Ishimura M, Imai K, Morio T, Kobayashi M, Nonoyama S, Hara O. Endocrine complications in primary immunodeficiency diseases in Japan. 第 41 回日本免疫学会総会・学術集会 2012 年 12 月 5 日-7 日 神戸
  20. Takimoto T, Ishimura M, Takada H, Morio T, Hara T. A Japanese female case of Wiskott Aldrich syndrome with skewed X-Chromosome inactivation. 第 41 回日本免疫学会総会・学術集会 2012 年 12 月 5 日-7 日 神戸
  21. 久間木悟, 笹原洋二, 蒲池吉朗, 村松秀城, 森尾友宏, 合井久美子, 杉田完爾, 浦辺智成, 高田英俊, 土屋滋, 原敏郎. X 連鎖重症複合免疫不全症患者に対する骨髄非破壊的前処置を用いた非血縁者間臍帯血移植後の B 細胞機能. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会(シンポジウム) 2012 年 11 月 30 日-12 月 2 日 横浜
  22. 山内建, 磯田健志, 大川哲平, 手束真理, 富澤大輔, 高木正稔, 今井耕輔, 梶原道子, 長澤正之, 森尾友宏, 水谷修紀. 高 IgM 症候群の臍帯血移植後に蔓延する骨髄球系分化障害に対してリタメゾン投与が奏功した一例. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会(シンポジウム) 2012 年 11 月 30 日-12 月 2 日 横浜
  23. 手束真理, 大川哲平, 磯田健志, 富澤大輔, 高木正稔, 今井耕輔, 長澤正之, 森尾友宏, 水谷修紀, 今留謙一. EB ウイルス関連血球貧食症候群の治療終了後早期再燃に対し、同胞間骨髄移植を施行した一例. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会(シンポジウム) 2012 年 11 月 30 日-12 月 2 日 横浜
  24. 遠藤明史, 渡邊健, 大川哲平, 富澤大輔, 今井耕輔, 高木正稔, 長澤正之, 森尾友宏, 水谷修紀. Chromosomally integrated HHV-6 の病原性の解析. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会(シンポジウム) 2012 年 11 月 30 日-12 月 2 日 横浜
  25. 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タ症の解析. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会(シンポジウム) 2012 年 11 月 30 日-12 月 2 日 横浜
  26. 長澤正之, 大川哲平, 遠藤明史, 満生紀子, 小野敏明, 青木由貴, 磯田健志, 富澤大輔, 高木正稔, 今井耕輔, 梶原道子, 森尾友宏, 水谷修紀. トロンボモジュリン- $\alpha$  は早期の凝固関連移植合併症死を改善する. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会(シンポジウム) 2012 年 11 月 30 日-12 月 2 日 横浜

- ん学会学術集会(シンポジウム) 2012 年 11 月 30 日-12 月 2 日 横浜
27. 森尾友宏. Multivirus specific cytotoxic T-cells for post-transplant virus infection. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集(シンポジウム) 2012 年 11 月 30 日-12 月 2 日 横浜
  28. 佐藤裕子, 加賀美武飛, 鈴木徹臣, 山口克彦, 今井耕輔, 森尾友宏, 佐藤祐. 皮膚症状、著明な好酸球増多を契機に診断された重症複合免疫不全症の 1 例. 第 44 回日本小児感染症学会総会・学術集会 2012 年 11 月 24 日-25 日 北九州
  29. 星野顕宏, 金兼弘和, 大嶋勇成, 笠井正志, 庄司康寛, 寺井勝, 今井耕輔, 森尾友宏, 宮脇利男. 重症複合免疫不全症におけるニューモシスチス肺炎と気胸について. 第 44 回日本小児感染症学会総会・学術集会 2012 年 11 月 24 日-25 日
  30. 和田泰三, 村岡正祐, 東馬智子, 重村倫成, 上松一永, 森内浩幸, 森尾友宏, 谷内江昭江. 慢性肉芽腫症の病型診断における p47phox/p67phoxFACS 解析の有効性. 第 44 回日本小児感染症学会総会・学術集会 2012 年 11 月 24 日-25 日 北九州
  31. 吉岡紀久子, 安富素子, 山田健太, 林仁幸子, 河北亜希子, 大嶋勇成, 和田泰三, 森尾友宏, 今井耕輔. BCG 感染症のための抗結核薬治療下で骨髄移植を施行した Wiskott-Aldrich 症候群の一例. 第 44 回日本小児感染症学会総会・学術集会 2012 年 11 月 24 日-25 日 北九州
  32. 森尾友宏. 細胞内寄生菌にたいする感染防御機構. 第 44 回日本小児感染症学会総会・学術集会(教育セミナー) 2012 年 11 月 23 日 北九州
  33. 森尾友宏. 再生医療・細胞治療領域で問題となる微生物のモニタリング. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会(シンポジウム) 2012 年 11 月 13 日-15 日 大阪
  34. Hayase T, Morimoto A, Ikeda T, Katsube N, Kawahara Y, Fukuda T, Kasii Y, Morio T, Momoi M. HLA-matched unrelated CBT without conditioning in a SCID patient with Artemis abnormality. 第 74 回日本血液学会学術集会 2012 年 10 月 19 日-21 日 京都
  35. Kumaki S, Sasahara Y, Kamachi Y, Muramatsu H, Morio T, Goi K, Sugita K, Urabe T, Takada H, Tsuchiya S, Hara T. Long-term B cell function after unrelated CBT using a RIC regimen in patients with X-SCID. 第 74 回日本血液学会学術集会 2012 年 10 月 19 日-21 日 京都
  36. Sato T, Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Yoshida K, Toki T, Terui K, Wang R, Kanno H, Morio T, Ohga S, Ohara A, Kitoh T, Kudo K, Kojima S, Ogawa S, Hamaguchi I, Ito E. Frequent mutations in the RPS17 gene in Japanese DBA Patients. 第 74 回日本血液学会学術集会 2012 年 10 月 19 日-21 日 京都
  37. 森尾友宏. ウイルス特異的 T 細胞とその維持. 第 18 回日本輸血・細胞治療学会(秋季シンポジウム) 2012 年 10 月 21 日 埼玉
  38. 森尾友宏. 先天性免疫不全症および血液系腫瘍において診断の手がかりとなる皮膚病変と、診断への道筋. 第 36 回日本小児皮膚科学会学術大会(シンポジウム) 2012 年 7 月 15 日 群馬
  39. 森尾友宏. Challenge for Innovation -日本初の再生医療の普及に向けて-. 第 11 回日本再生医療学会総会(パネルディスカッション) 2012 年 6 月 13 日 横浜
  40. 森尾友宏. 「医療機関における自家細胞・組織を用いた再生・細胞医療の実施について」:免疫細胞療法における指針及び治療の現状と展望. 第 60 回日本輸血・細胞治療学会(シンポジウム) 2012 年 5 月 27 日 福島
  41. 森尾友宏. 造血細胞移植後ウイルス感染症の診断・治療の現状と展望. 第 34 回日本造血細胞移植学会総会(教育講演) 2012 年 2 月 24 日 大阪
- 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 の変異の種類による表現系—遺伝子系の関連に関する研究—

研究分担者 長澤 正之

(東京医科歯科大学・地域小児医療調査研究講座・教授)

研究要旨： RALD (RAS associated ALPS like disease) の病因となっているRASの変異がどのようにリンパ球機能に影響を与え自己免疫疾患が発症するかは解明されていない。またRASの変異により発症するJMMLの一部で自然寛解することが報告されている。そこでRAS変異の違いが疾患の表現系に与える影響を解析した。変異のホットスポットであるコドン12番目のグリシンをバリン、アスパラギン酸、セリンに置換した変異体を作成し、その活性を検討した。バリン、アスパラギン酸、セリンの順にGTP結合RASが多く存在し、RASの活性が高いことが明らかとなり。グリシンがセリンに変化した例で自然寛解する例が多いとする過去の報告を支持する結果となった。

A. 研究目的

RALDの原因となるRASの変異がどのようにリンパ球機能に影響を与え、自己免疫疾患が発症するかは解明されていない。松田らは造血幹細胞なしで生存するJMMLではコドン12または13のグリシン(G)がセリン(S)に変異したものが多いと報告した(*Blood*. 2007;109:5477-5480)。そこで様々な変異型RAS遺伝子を発現ベクターに組み込み、細胞に導入しその活性を検討することにより、その遺伝子変異—表現型間の関連を解析することを試みた。

B. 研究方法

コドン12または13のグリシンがセリン、バリン(V)、アスパラギン酸(D)に変異したKRAS遺伝子を作成し、293細胞に導入し、

RAS遺伝子の下流にあるRAFへの結合の特性を利用し、RAFのRAS結合ドメインを架橋したビーズで沈降することにより、GTP結合RASのみを濃縮することができる。この方法を用いて変異型毎のRASの活性を検討する。

(倫理面への配慮)

組み換えDNA実験は東京医科歯科大学組み換えDNA実験委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果

KRAS G12V>G12D>G12Sの順にGTP結合RASが多く存在し、RASの活性が高いことが明らかとなった。

#### D. 考察

KRAS G12S は他の変異型 RAS に比較し RAS の活性が低いことが明らかとなった。この分子細胞生物学的な結果は臨床的に観察された KRAS12S 変異を持つ JMML が自然寛解する可能性が高いとする知見を支持するものであった。

#### E. 結論

KRAS G12S は他の変異型 RAS に比較し RAS の活性が低く、臨床的に観察される表現系を支持するものであった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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.
2. 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
3. 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.
4. Nagasawa M, Epstein-Barr virus associated B cell lymphoma of recipient origin during the elimination of clonally

infected T cells by allogeneic stem cell transplantation. *Case Rep Transplant*. 2012;2012:164824.

5. Nagasawa M, Aoki Y. A Pediatric Case of Systemic Lupus Erythematosus Developed 10 Years after Cord Blood Transplantation for Juvenile Myelomonocytic Leukemia. *Case Rep Transplant*. 2012;2012:619126.

##### 2. 学会発表

1. Chika Kobayashi, Teppei Okawa, Daisuke Tomizawa, Mari Tezuka, Kohsuke Imai, Masatoshi Takagi, Michiko Kajiwara, 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
2. Mari Tezuka, Kei Iwata, Chika Kobayashi, Shinpei Baba, Teppei Okawa, Keisuke Nakajima, Daisuke Tomizawa, Yuji 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
3. 長澤正之, 大川哲平, 遠藤明史, 満生紀子, 青木由貴, 小野敏明, 磯田健志, 富澤大輔, 今井耕輔, 高木正稔, 梶原道子, 森尾友宏, 水谷修紀. Thrombomodulin-alpha improves the coagulation disorder associated transplantation-related mortality after allogeneic SCT. 第74回日本血液学会 2012年10月21日 京都
4. 長澤正之, 大川哲平, 遠藤明史, 満生紀子, 小野敏明, 青木由貴, 磯田健志, 富澤大輔, 高木正稔, 今井耕輔, 梶原道子, 森尾友宏, 水谷修紀. トロンボモジュリン- $\alpha$  は早期の凝固関連移植合併症死を改善する. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会 2012年11月30日-12月2日 横浜
5. 長澤正之, 宮武浩子, 水谷修紀. 血液の誘電パラメータ測定を利用した新たな血栓・凝固機能検査の検討. 第54回日

本小児血液・がん学会 2012年12月2日 横浜

6. 田淵健, 足立壮一, 東英一, 佐藤篤, 塩原正明, 井上雅美, 菊地陽, 小林良二, 長澤正之, 森本哲, 矢部普正. 日本における小児診療チームによる造血幹細胞移植実態の年代毎の変遷. 第54回日本小児血液・がん学会 2012年12月1日 横浜
7. 大川哲平, 遠藤明史, 富澤大輔, 今井耕介, 高木正稔, 長澤正之, 森尾友宏, 水谷修紀. IKBA 遺伝子異常 (外胚様形成免疫不全症) に対し非血縁者間骨髄移植を施行した1例. 第5回 日本免疫不全症研究会 2012.1.21 東京
8. 遠藤明史, 大川哲平, 富澤大輔, 今井耕輔, 高木正稔, 長澤正之, 森尾友宏, 水谷修紀. Chromosomally integrated HHV-6 の再活性化が疑われた重症複合免疫不全症の乳児. 第115回日本小児科学会学術集会 2012.4.20-22 福岡
9. 手束真理, 今井耕輔, 高山かおる, 佐藤祐子, 満生紀子, 大川哲平, 磯田健志, 富澤大輔, 高木正稔, 長澤正之, 森尾友宏, 水谷修紀. Omenn 症候群を呈した完全型 DiGeorge 症候群の1女児例. 第3回関東甲越免疫不全症研究会 2012.9.22 東京
10. 遠藤明史, 渡邊健, 大川哲平, 富澤大輔, 今井耕輔, 高木正稔, 長澤正之, 森尾友宏, 水谷修紀. Chromosomally integrated HHV-6 の病原性の解析. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会 2012.11.30-12.2 横浜
11. 山内建, 磯田健志, 大川哲平, 手束真理, 富澤大輔, 高木正稔, 今井耕輔, 梶原道子, 長澤正之, 森尾友宏, 水谷修紀. 高IgM 症候群の臍帯血移植後に蔓延する骨髄球系分化障害に対してリタメゾン投与が奏功した一例. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会 2012.11.30-12.2 横浜
12. 手束真理, 大川哲平, 磯田健志, 富澤大輔, 高木正稔, 今井耕輔, 長澤正之, 森尾友宏, 水谷修紀, 今留謙一. EB ウイ

ルス関連血球貧食症候群の治療終了後早期再燃に対し、同胞間骨髄移植を施行した一例. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会 2012.11.30-12.2 横浜

#### 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」

—若年性骨髄単球性白血病における KRAS 変異の起源—

研究分担者 石井 榮一

(愛媛大学大学院医学系研究科小児科学・教授)

**研究要旨：** 【背景と目的】若年性骨髄単球性白血病(JMML)はKRASなどの遺伝子変異が原因となるが、その細胞起源は不明の点が多い。我々は複数の自己抗体を有するKRAS変異陽性JMML 症例で各分化段階の造血細胞におけるKRAS変異の有無を解析し、KRAS変異を有する細胞のclonal expansionと免疫異常の関連性について検討した。【症例】生後4カ月時にJMMLと診断された男児。抗核抗体などの自己抗体を認めた。【結果】骨髄単核球より抽出したDNAでKRAS遺伝子のG13D変異を認めた。末梢血と骨髄の各細胞分画でKRAS変異の有無を検討し、FLK 1+CD45-細胞(骨髄間葉系細胞)およびLin-CD34+CD38-細胞(造血幹細胞)ではその60~70%の細胞に、好中球、単球、赤芽球では90%以上の細胞にKRAS変異を認めた。B細胞やT細胞、iNKT細胞では野生型が優位であったが、少数のKRAS変異を有する細胞も存在していた。【考察】本症例は造血幹細胞より未分化なFLK1陽性の中胚葉細胞の段階でKRAS変異が生じたと考えられた。一部のリンパ球にKRAS変異により増殖能が付与されたことから自己抗体を産生するBリンパ球や自己反応性のT細胞が残存している可能性が示唆された。

A. 研究目的

各種自己抗体を有し体細胞に KRAS 変異を認めた若年性骨髄単球性白血病(JMML)症例を解析し、血液分化のいずれの段階で異常が発生したかを検討するとともに、KRAS 変異と自己抗体産生の関連について検討する。

B. 研究方法

【症例】3 ヶ月の男児で反復性・難治性口腔

カンジダ症を主訴として受診。末梢血中の単球増加、肝脾腫を認め、JMML が疑われた。骨髄血より抽出した DNA の解析より KRAS 遺伝子の G13D 変異を同定し、JMML と確定診断した。検査上、抗血小板抗体、抗赤血球抗体や抗核抗体等の自己抗体を認めた。

【各血液細胞分画の解析】各細胞分画の遺伝子変異解析のために、赤血球溶血後、各細胞系列に特異的な抗体を用いて、単球、好中球、NK 細胞、T リンパ球、B リンパ球、

赤芽球、FLK1+CD45-, FLK1+CD45+, Lineage-CD34+CD38-分画を採取した。さらにそれぞれの分画を 96well プレートに single cell として分離した。その後、PCR 等を用いて KRAS 変異の有無や存在様式を詳細に解析した。

#### (倫理面への配慮)

本研究は、ヘルシンキ宣言および個人情報保護法に則り実施された。臨床検体を用いた遺伝子解析は、愛媛大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会において承認を得て実施している。

### C. 研究結果

造血幹細胞よりも未熟な分化段階である FLK1 陽性細胞に KRAS 遺伝子の G13D 変異を認めた。またリンパ球分画を含む解析した全ての造血細胞分画で G13D 変異を検出した。しかし single cell を用いた解析では、G13D 変異を有する細胞の割合は細胞分画によって異なっており、JMML の腫瘍細胞分画に属すると思われる単球や好中球、赤芽球では 90%以上の細胞が KRAS 変異を有していたのに対して、B リンパ球では 50%以下、T リンパ球では 30%以下であった。また KRAS 遺伝子の野生型アレルを欠失し、変異アレルのみを有した細胞も認められた。FLK1 陽性細胞からの血管形成における KRAS 変異の影響を検討するために、HUVEC を用いた tube formation assays を行ったが、KRAS の野生型と G13D 変異のいずれを導入した細胞でも血管様構造の形成に差は認めなかった

### D. 考察

今回の解析によると造血幹細胞より未分化な FLK1 陽性細胞に KRAS 遺伝子変異が発生する音により、造血幹細胞を含むその下流のすべての細胞分画に KRAS 変異が存在していた。これにより、T リンパ球、B リンパ球、NK 細胞に遺伝子変異が生じ、自己抗体の産生系が刺激された可能性があると考えられた。一方 KRAS 遺伝子変異が FLK1 陽性細胞に生じて血管内皮細胞の血管形

成能には影響しないため、JMML では血管系の異常を伴わないと思われた。そのため臨床的にも血管系の異常を伴わないと思われた。

### E. 結論

自己抗体を有する JMML 症例で KRAS G13D 変異が FLK1 陽性細胞に存在することを明らかにした。そのためリンパ球を含む全ての血液細胞に KRAS 変異が存在し、自己抗体を産生する異常な B リンパ球のクローンの生存を引き起こしたと考えられた。経過中に KRAS 遺伝子の野生型アレルが消失することは JMML の病勢の進行を示唆している可能性がある。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Masanori Nishi, Minenori Eguchi-Ishimae, Zhouying Wu, Wen Ming, Hidehiko Iwabuki, Sanae Kawakami, Hisamichi Tauchi, Takeshi Inukai, Kanji Sugita, Yuhei Hamasaki, Eiichi Ishii, Mariko Eguchi (2012) Suppression of the let-7b microRNA pathway by DNA hypermethylation in infant acute lymphoblastic leukemia with MLL gene rearrangements. *Leukemia* 2013 Feb;27(2):389-97.

#### 2. 学会発表

1. 石前峰斉、江口真理子、石井榮一、Developmental impact of MLL-AF4 fusion gene on early hematopoietic stem cells. 第 74 回日本血液学会、2012 年 10 月、京都
2. 八木千裕、石前峰斉、河上早苗、田内久道、徳田桐子、江口真理子、石井榮一、岡田 賢、小林 正夫、X-linked chronic granulomatous disease in a young female due to skewed inactivation of the X-chromosome. 第 74 回日本血液学会、2012 年 10 月、京都
3. 徳田桐子、江口真理子、石前峰斉、河上早苗、本田美里、田内久道、石井榮一、G13D KRAS mutation was found in Flk-1-positive cells in a case of JMML.

第73回日本血液学会、2011年10月、  
名古屋

4. 河上早苗、徳田桐子、田内久道、本田美里、石前峰斉、江口真理子、石井榮一、2回目の同種造血幹細胞移植後にドナー細胞の二次性 MDS を発症した再発乳児 ALL の一例. 第73回日本血液学会、2011年10月、名古屋

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」

—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 $\alpha\beta$ +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、プレドニゾン内服にて退院となった。プレドニゾンの減量に伴い、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。またバツフィーコートから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、患者個人情報の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., Mitsui 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, Mitsui 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
  9. Kanegane H, Yang X, Zhao M, Yamato K, Inoue M, Hamamoto K, Kobayashi C, Hosono A, Ito Y, Nakazawa Y, Terui K, Kogawa K, Ishii E, Sumazaki R, Miyawaki T. Clinical features and outcome of X-linked lymphoproliferative syndrome type1 (SAP deficiency) in Japan identified by the combination of flow cytometric assay and genetic analysis. *Pediatr Allergy Immunol.* 2012; 23: 488-493.
  10. Otsubo K, Horie S, Nomura K, Miyawaki T, Abe A, Kanegane H. Acute promyelocytic leukemia following aleukemic leukemia cutis harboring NPM/RARA fusion gene. *Pediatr Blood Cancer.* 2012; 59: 959-960.
  11. Yang X, Wada T, Imadome K, Nishida N, Mukai T, Fujiwara M, Kawashima H, Kato F, Fujiwara S, Yachie A, Zhao X, Miyawaki T, Kanegane H. Characterization of Epstein-Barr virus (EBV)-infected cells in EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in two patients with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 and type 2. *Herpesviridae.* 2012; 3: 1.
  12. Yang X, Kanegane H, Nishida N, Imamura T, Hanamoto K, Miyashita R, Imai K, Nonoyama S, Sanayama K., Yamaide A, Kato F, Nagai K, Ishii E, van Zelm MC, Latour S, Zhao XD, Miyawaki T. Clinical and Genetic Characteristics of XIAP Deficiency in Japan. *J Clin Immunol.* 2012; 32: 411-420.
  13. Honda F, Kano H, Kanegane H, Nonoyama S, Kim ES, Lee ES, Takagi M, Mizutani S, Morio T. The kinase Btk negatively regulates the production of reactive oxygen species and stimulation-induced apoptosis in human neutrophils. *Nat Immunol.* 2012; 13: 369-378.
  14. Shimizu M, Kuroda M, Sakashita N, Konishi M, Kaneda H, Igarashi N, Yamahana J, Taneichi H, Kanegane H, Ito M, Saito S, Ohta K, Taniguchi T, Furuichi K, Wada T, Nakagawa M, Yokoyama H, Yachie A. Cytokine profiles of patients with enterohemorrhagic Escherichia coli O111-induced hemolytic-uremic syndrome. *Cytokine.* 2012; 60: 694-700.
  15. Oshima K, Nagase T, Imai K, Nonoyama S, Obara M, Mizukami T, Nunoi H, Kanegane H, Kuribayashi F, Amemiya S, Ohara O. A dual reporter splicing assay using Halo Tag-containing proteins. *Curr Chem Genomics* 2012; 6: 27-37.
  16. Nakaoka H, Kanegane H, Taneichi H, Miya

- K, Yang X, Nomura K, Takezaki S, Yamada M, Ohara O, Kamae C, Imai K, Nonoyama S, Wada T, Yachie A, Hershfield MS, Ariga T, Miyawaki T. Delayed onset adenosine deaminase deficiency associated with acute disseminated encephalomyelitis. *Int J Hematol.* 2012; 95: 692-696.
17. Mohammadzadeh I, Yeganeh M, Aghamohammadi A, Parvaneh N, Behniafard N, Abolhassani H, Tabassomi F, Hemmat M, Kanegane H, Miyawaki T, Ohara O, Rezaei N. Severe primary antibody deficiency due to a novel mutation of micro heavy chain. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2012; 22: 78-79.
  18. 星野顕宏, 金兼弘和, 西田直徳, 野村恵子, 大賀正一, 宮脇利男. 抗菌薬投与により治癒し得た再発性肝膿瘍を合併した慢性肉芽腫症の一例. *小児感染免疫* 2012; 24: 175-179.
  19. 道野淳子, 中出祥代, 佐竹伊津子, 西野主眞, 安村 敏, 芳村直樹, 野村恵子, 金兼弘和. 重症複合免疫不全症2例における同種骨髄細胞移植後のキメリズム解析. *日本輸血細胞治療学会誌* 2012; 58: 704-709.
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 4<sup>th</sup> JSH International symposium 2013, 2013, 5, 24-25, Ehime, Japan.
  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 4<sup>th</sup> 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.
  6. Kanegane H, Nomura K, Hoshino A, Miyawaki T. Neutropenia and myeloid dysplasia in a patient with late-onset adenosine deaminase deficiency. The 15th biennial meeting of the European Society of Immunodeficiencies, 2012, Florence, Italy.
  7. Miyawaki T, Kanegane H, Imai K, Yamada M, Takada H, Nonoyama S, Ariga T, Bexon M, Rojavin M, Kobayashi M, Hara T. Efficacy and safety of Hizentra, a subcutaneous immune globulin, in Japanese patients with primary immunodeficiency diseases. The 15th biennial meeting of the European Society of Immunodeficiencies, 2012, Florence, Italy.
  8. Nishida N, Yang X, Kanegane H, Sanayama K, Goi K, Sugita K, Kato K, Miyawaki T. X-linked dysgammaglobulinemia caused by hypomorphic XIAP mutation. The 15th biennial meeting of the European Society of Immunodeficiencies, 2012, Florence, Italy.
  9. Honma K, Imai K, Kamae C, Ishida H, Ito Y, Kojima S, Yokosuka T, Kanegane H, Morio T, Sasahara Y, Fujiwara T, Harigae H, Hashii Y, Ohara O, Nonoyama S. Clinical features and immunological abnormalities of GATA2 deficiency in Japan. The 15th biennial meeting of the European Society of Immunodeficiencies, 2012, Florence, Italy.
  10. Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsui N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammarstrom Q, van Zelm MC, Morio T, Imai K, Nonoyama S. Classification of common variable immunodeficiency by quantification of T cell receptor recombination excision circles (TREC) and Ig kappa-deleting recombination excision circles (KREC). The 15th biennial meeting of the European Society of Immunodeficiencies, 2012, Florence, Italy.
  11. Takada H, Ishimura M, Doi T, Imai K, Sasahara Y, Kanegane H, Nishikomori R, Morio T, Heike T, Kobayashi M, Ariga T,

Tsuchiya S, Nonoyama S, Miyawaki T, Hara T. Nation-wide survey of patients with primary immunodeficiency diseases in Japan: 2008. The 15th biennial meeting of the European Society of Immunodeficiencies, 2012, Florence, Italy.

12. Marsh R, Rao K, Satwani P, Lehmberg K, Muller I, Fisher A, Latour S, Sedlacek P, Barlogis V, Hamamoto K, Kanegane H, Milanovich S, Margolis D, Douglas D, Amrolia P, Veys P, Jordan MB, Kumar AR, Bleesing JJ, Filipovich AH. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for XIAP deficiency: Survival outcomes of 19 patients. 2012 Annual meeting primary immune deficiency diseases north American conference, 2012, Chicago, USA.
13. Kanegane H, Yang X, Nishida N, Ishii E, Miyawaki T. Clinical features and outcome of X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (SAP deficiency) and type2 (XIAP deficiency) in Japan. The 28th Annual Meeting of the Histiocyte Society, 2012, London, UK.
14. Marsh R, Rao K, Satwani P, Lehmberg, Muller I, Li D, Kim MO, Fischer A, Latour S, Sedlacek P, Barlogis V, Hamamoto K, Kanegane H, Milanovich S, Margolis D, Dimmock D, Casper J, Douglas D, Henry M, Amorolia P, Veys P, Kumar A, Jordan M, Bleesing J, Filipovich AH. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for XIAP deficiency: An international survey reveals poor outcomes. The 28th Annual Meeting of the Histiocyte Society, 2012, London, UK.

#### 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