

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, 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.
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, 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.
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. Isoda T, Takagi M, Piao J, Nakagama S, Sato M, 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;26;120(4):789-99.
18. 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(1):198-208.
19. Honda F, Kano H, Kanegane H, Nonoyama S, Kim ES, Lee SK, 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;26;13(4):369-78.
20. Honda F, Hane Y, Toma T, Yachie A, Kim ES, Lee SK, 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 Commun.* 2012 ;417(1):162-8.
 21. Sato R, Iizumi S, Kim ES, Honda F, Lee SK, 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(3):299-310.
 22. 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. Kaneko S, Takagi M, Fukawatase Y, Umezawa A, Mizutani S. Derivation of neural stem cell via iPS cell from ataxia telangiectasia patient. 14th International workshop on Ataxia Telangiectasia Feb.7-11, 2012 Delhi, India
 2. Isoda T, Takagi M, Piao J, Sato M, Masuda K, Ikawa T, Azuma M, Morio T, Kawamoto H, Mizutani S. Visualization of chromosomal translocation and early T-cell development failure in ATM deficiency Ataxia telangiectasia workshop. Feb.7-11, 2012 Delhi, India
 3. 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.
 4. 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
 5. 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JM ML 第18回小児MDS治療研究会 2013.6.2 名古屋
 6. 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
 7. 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
 8. 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
 9. 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
 10. Mari Tezuka, Kei Iwata, Chika Kobayashi, Shinpei Baba, Teppei Okawa, Keisuke Nakajima, Daisuke Tomizawa, Yuj i 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
 11. 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
12. Mizutani S. T-cell development failure and chromosome 14 translocation in Ataxia-Telangiectasia. A-T Clinical Research Conference 2012. Cambridge, UK. 21-23 June 2012
 13. 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
 14. 磯田健志, 高木正稔, 朴今花, 増田喬子, 伊川友活, 東みゆき, 森尾友宏, 河本宏, 水谷修紀. ATM欠損早期T細胞分化におけるリンパ球分化異常と発がんへの分岐点を可視化. Visualization of bifurcation into immunodefect and oncogenesis in early thymocyte lacking ATM. 第5回日本免疫不全症研究会 2012.1.21 東京
 15. Sato M, Takagi M, Piao J, Isoda T, Honda H, Yasuda A, Mizutani S. ATM haploinsufficiency and acceleration of cancer development International symposium 50th Anniversary of RIRBM, Hiroshima University Feb.20-21, 2012 Hiroshima
 16. 磯田健志, 高木正稔, 朴今花, 増田喬子, 伊川友活, 東みゆき, 森尾友宏, 河本宏, 水谷修紀. ATM欠損T細胞分化のDN期におけるTリンパ球減少の原因と染色体転座の関係. 第115回日本小児科学会学術集会 2012.4.20-22 福岡
 17. 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
 18. Takagi M, Piao J, Matsutani M, Ohyashiki K, Mizutani S. PARP inhibitor selectively induces cell death in E2A-PBX1 or E2A-HLF positive leukemia. 第71回日本癌学会学術総会 2012.9.19-21 札幌
 19. Aoki Y, Suzuki N, Takagi M, Tomizawa D, Koh K, Ishii E, Tomizawa M, Saito Y, Ohara O, Mizutani S, Ishikawa F. Distinct pathogenesis of infant mixed-lineage leukemia with MLL-AF4 and MLL-AF9 translocations. 第74回日本血液学会学術集会 2012.10.19-21 京都
 20. Sugimoto K, Suzuki H, Fujimura T, Ono A, Kaga N, Takagi M, Isobe Y, Sasaki M, Taka H, Mori T, Mizutani S, Miyazono K, Komatsu N. L-asparaginase targets glutamine addiction in ALL. 第74回日本血液学会学術集会 2012.10.19-21 京都
 21. 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, 宮澤大輔, 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
 22. 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 2012.10.21 京都
 23. Takagi M, Piao J, Kamiya T, Masutani M, Ohyashiki K, Mizutani S. PARP inhibitor selectively induces cell death in E2A-PBX1 or E2A-HLF positive leukemia. 第74回日本血液学会学術集会 2012.10.19-21 京都
 24. Takagi M, Imai K, Nakagawa M, Morio T, Mizutani S. The Research Front Line of Immune Thrombocytopenia Chronic immune thrombocytopenia as a disease with or without association of defined diseases in children. 第74回日本血液学会学術集会 2012.10.19-21 京都
 25. Endou A, Ookawa T, Tomizawa D, Imai K, 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

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

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

(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, Mitsui 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, Mitsui 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. Honma1 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ビ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回国際血液学会学術集会、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髓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髓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、同胞間骨髓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- α 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
27. 森尾友宏. Multivirus specific cytotoxic T-cells for post-transplant virus infection. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会(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

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 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くと報告した(*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- α 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 ウィ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

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

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」

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 陽性細胞に生じても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⁺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., 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例における同種骨髓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 4th 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 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.
 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, Lehmborg 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, Bleasing 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, Lehmborg K, 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, Bleasing 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

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」

若年性骨髄単球性白血病および類縁疾患における網羅的ゲノム解析

研究分担者 滝田 順子

(東京大学医学部附属病院・無菌治療部・講師)

研究要旨: 自己免疫性リンパ球増殖症候群(ALPS)は、アポトーシスの障害によりリンパ球の増殖を来し、肝脾腫、リンパ節腫脹、自己免疫疾患を来す難治性の疾患である。一方、RAS変異を造血細胞に有し、ALPSおよび若年性骨髄単球性白血病(JMML)類似の症状を呈する疾患群は、RAS associated ALPS like disease (RALD)と呼ばれる。RALDはALPSと異なり、FAS経路の異常はみられないが、臨床的にJMMLやALPSとオーバーラップする点が多く、これらの鑑別は困難なことが多い。そこで本年度は、ALPS、RALDおよびJMMLの分子病態を解明するために、JMML類似の造血器疾患28検体につき、Affymetrix® GeneChip® 250K NspIアレイおよびAgilent 社DNA microarrayを用いて、腫瘍細胞に生じているゲノムコピー数の変化について高精度な網羅的解析を行った。その結果、全体として、JMMLおよび類縁疾患でゲノムコピー数の変化は少ない傾向にあり、ゲノムコピー数の変化そのものの発がんへの関与は低いものと思われた。また、7番染色体以外にも12番染色体短腕のヘテロヘ都合性の消失(LOH)が複数の症例間で重複した変異として検出され、これらに領域に存在する遺伝子が分子病態に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

自己免疫性リンパ球増殖症候群 Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) は、細胞死(アポトーシス)の障害により、リンパ球の異常増殖、肝脾腫、リンパ節腫脹、自己免疫疾患など多彩な症状を呈する難治性疾患である。原因として、FAS経路、FASL、CASPASE-10の異常が判明している。ALPS および若年性骨髄単球性白血病(JMML)類似の症状を呈する RAS

associated ALPS like disease (RALD)は、ALPSと異なり FAS 経路の異常はみられないが、臨床的に若年性骨髄単球性白血病(JMML)や ALPS とオーバーラップする点が多く、これらの鑑別は困難なことが多い。またこれらの疾患の分子病態の相違は十分解明されていない。そこで、本年度は、ALPS、RALD および JMML の分子病態を解明するために、JMML 類似の造血器疾患28検体を用いて、Affymetrix® GeneChip® 250K NspI アレイおよび Agilent 社 DNA microarray による詳細

なゲノムコピー数の解析を行った。

B. 研究方法

材料としては、JMML 類似の臨床症状を呈する症例の骨髄より抽出した DNA と RNA を用いた。GenChip 250K/500K アレイの Output を CNAG/AsCNAR を用いて、平均解像度 24kb ~ 6kb でゲノム全域にわたる網羅的なゲノムコピー数の解析を行った。この手法により従来の解析技術では網羅的な検出が困難であったコピー数の減少を伴わないヘテロ接合性の消失、すなわち uniparental disomy (UPD) の検出を行うことができる。UPD は増幅や欠失と同様にかん関連遺伝子と協調して発がんに関与することが知られている。Human genome 24 array は、DNA の増幅を行うことなく、コピー数の異常を高解像度で解析できるツールであり、236,000 以上のコード領域および非コード領域をカバーしている。両社のアレイを組み合わせて各疾患の標的分子の同定を試みた。

(倫理面への配慮)

本研究で行った臨床検体を用いた実験は、東京大学の倫理審査委員会で審査され、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(2003年3月)」を遵守することを条件に承認された。検体提供者への人権擁護、個人情報保護に細心の注意を払って本研究を実施した。

C. 研究結果

解析した 28 検体のうち、17 検体で何らかのゲノムコピー数の変化を検出したが、11 例では明らかなゲノムコピー数の異常は検出されなかった。ゲノムコピー数の異常箇所としては、全体として 11 か所であり、他の造血器腫瘍と比べて著しく少ない傾向にあった。3 例で染色体 7 番の微細欠失および UPD を検出した。このうち 1 例の 7 番の微細欠失は、Affymetrix® GeneChip® 250K NspI アレイでは検出不能であったが、Agilent 社 DNA microarray により検出が可能であった。7 番染色体の共通欠失領域内

には唯一 FLJ45974 遺伝子が存在することが判明した。また、7 番染色体以外に重複したゲノムコピー数の異常としては 12 番染色体短腕(12p)の Loss of heterozygosity(LOH)が見出された。2 例の LOH のうち 1 例はコピー数の異常を伴わない LOH、いわゆる UPD であった。12p の共通欠失領域内には複数の遺伝子が存在することが明らかとなったが、アポトーシス関連遺伝子である BCL2L14 および RNA スプライシング関連分子である DDX47 が存在することが明らかとなった。

D. 考察

今回の網羅的ゲノムコピー数の解析により、JMML および類似の造血器疾患では、ゲノムコピー数の異常が他の造血器腫瘍と比べて、著しく少ない傾向であった。これは過去の報告とも合致しており、この群の特徴の一つと言える。11 例では、何のゲノムコピー数の異常も検出されなかったが、これらの腫瘍に関しては、正常細胞の混入による偽陰性の可能性も考えられた。7 番染色体の微細欠失に関しては、1 例において Affymetrix® GeneChip® アレイでは検出不能であった欠失が、Agilent 社 DNA microarray では検出可能であったことから、詳細なゲノムコピー数の解析には、異なる手法のアレイを組み合わせることが有用と考えられた。7 番染色体の共通欠失領域内には唯一、non-coding RNA をコードする FLJ45974 が存在することから、この遺伝子が、一部の JMML および類縁疾患の発症に関与している可能性が示唆された。さらに、2 例に重複していた 12p の共通 LOH 領域内にアポトーシス関連遺伝子である BCL2L14 および RNA スプライシング関連分子である DDX47 が存在することが明らかとなり、これらの遺伝子の病態への関与も示唆された。

E. 結論

JMML および類縁疾患において、ゲノムコピー数の頻度は低い傾向にあり、pinpoint な遺伝子変異もしくはエピジェネティックな変化が発症に関与している可能性が示唆された。また 7 番染色体に存在する FLJ45974、および 12p の共通 LOH 領域内

存在する BCL2L14 および DDX47 が候補標的分子である可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Miura K, Sekine T, Takahashi K, Takita J, Harita Y, Ohki K, Park M-J, Hayashi Y, Tajima A, Ishihara M, Hisano M, Murai M, Igarashi T. Mutational analyses of the ATP6V1B1 and ATP6V0A4 genes in patients with primary distal renal tubular acidosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2013 Aug;28(8):2123-30.
2. Nishimura R, Takita J, Sato-Otsubo A, Kato M, Koh K, Hanada R, Tanaka Y, Kato K, Maeda D, Fukayama M, Sanada M, Hayashi Y, Ogawa S. Characterization of genetic lesions in rhabdomyosarcoma using a high-density single nucleotide polymorphism array. *Cancer Science* 2013 Jul;104(7):856-64.
3. Tumurkhuu M, Saitoh M, Takita J, Mizuno M, Mizuguchi M. A novel SOS1 mutation in Costello/CFC syndrome affects signaling in both RAS and PI3K pathways. *J Recept Signal Transduct*. 2013 Apr;33(2):124-8.
4. Shinohara M, Saitoh M, Nishizawa D, Ikeda K, Hirose S, Takanashi J, Takita J, Kikuchi K, Kubota M, Yamanaka G, Shiihara T, Kumakura A, Kikuchi M, Toyoshima M, Goto T, Yamanouchi H, Mizuguchi M. ADORA2A polymorphism predisposes children to encephalopathy with febrile status epilepticus. *Neurology* 2013 Apr 23;80(17):1571-6.
5. Kato M, Yasui N, Seki M, Kishimoto H, Sato-Otsubo A, Hasegawa D, Kiyokawa N, Hanada R, Ogawa S, Manabe A, Takita J, Koh K. Aggressive transformation of juvenile myelomonocytic leukemia associated with duplication of oncogenic KRAS in consequence of acquired uniparental disomy. *J Pediatr*. 2013 Jun;162(6):1285-8
6. Mori M, Hiwatari M, Takita J, Ida K, Kawaguchi H. Successful syngeneic PBSC transplantation for a patient with refractory Evans syndrome. *Bone Marrow Transplant*. 48: 312-13, 2012
7. Kato M, Shiozawa R, Koh K, Nagatoshi Y, Takita J, Ida K, Kikuchi A, Hanada R. The Effect of the Order of Total Body Irradiation and Chemotherapy on Graft-Versus-Host Disease. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2014 Jan;36(1):e9-e12.
8. Kato M, Horikoshi Y, Okamoto Y, Takahashi Y, Hasegawa D, Koh K, Takita J, Inoue M, Kigasawa H, Ogawa A, Sasahara Y, Kawa K, Yabe H, Sakamaki H, Suzuki R, Kato K. Second allogeneic hematopoietic SCT for relapsed ALL in children. *Bone Marrow Transplant*. 47:1307-11, 2012
9. Takita J, Yoshida K, Sanada M, Nishimura R, Okubo J, Motomura A, Hiwatari M, Oki K, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Novel splicing-factor mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia*. 26:1879-81, 2012
10. Okubo J, Takita J, Chen Y, Oki K, Nishimura R, Kato M, Sanada M, Hiwatari M, Hayashi Y, Igarashi T, Ogawa S. Aberrant activation of ALK kinase by a novel truncated form ALK protein in neuroblastoma. *Oncogene*. 31:4667-76, 2012
11. Shiba N, Park MJ, Taki T, Takita J, Hiwatari M, Kanazawa T, Sotomatsu M, Ishii E, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y: CBL mutations in infant acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 156:672-4, 2012
12. Miura K, Sekine T, Takamizawa M, Terashima H, Furuya A, Koh K, Takita J, Ida K, Igarashi T. Early occurrence of nephrotic syndrome associated with cord blood stem cell transplantation. *Clin Exp Nephrol*. 16:180-2, 2012
13. 苗代 有鈴, 三浦 健一郎, 張田 豊, 本村 あい, 樋渡 光輝, 滝田 順子, 井田 孔明, 宇於崎 宏, 五十嵐 隆: 骨髄移植後血栓性微小血管症の 1 例. 日本小児腎不全学会雑誌 32: 195-197, 2012
14. 設楽 佳彦, 井田 孔明, 細井 洋平, 大久保 淳, 伊藤 直樹, 五石 圭司, 滝田 順子, 菊地 陽, 五十嵐 隆: 一般小児病棟でターミナルケアを行った新生児頭蓋内未熟奇形腫の 1 例. 日本小児科学

会雑誌 116 巻:1886-1891, 2012

15. 滝田 順子:小児血液・がんにおける分子標的療法. 日本小児血液・がん学会雑誌. 49:429-430, 2012
16. 滝田 順子:神経芽腫における ALK pathway の解析とその阻害剤. 日本小児血液・がん学会雑誌. 49:431-437,2012
17. 滝田 順子:【造血器腫瘍の新たな分子病態とその臨床的意義】白血病、MDS における IDH1/2 変異の分子病態と臨床的意義(解説/特集). 血液内科(2185-582X)64 巻 2 号 Page133-138(2012.02)

2. 学会発表

1. Hiwatari M, Takita J, Nishimura R, Okubo J, Oki K, and Ogawa S. Mutational analysis for IDH1 and IDH2 in pediatric leukemia. AACR Annual Meeting 2012
2. Nishimura R, Takita J, Yoshida K, Shiraishi Y, Hoshino N, Sanada M, Hayashi Y, Miyano S, Igarashi T, Ogawa S: Whole-exome sequencing of advanced neuroblastomas. Advances Neuroblastoma Research Conference, Toront, June 18 - 21, 2012
3. Nishimura R, Takita J, Yoshida K, Shiraishi Y, Okubo J, Hoshino N, Sanada M, Hayashi Y, Miyano S, Igarashi T, Ogawa S: Whole-exome sequencing of advanced neuroblastomas using next-generation sequencer. The 8th Congress of Asian Society for Pediatric Research, May 17-19, 2012, Seoul
4. Hoshino N, Takita J, Okubo J, Nishimura R, Igarashi T, Ogawa S: Genetic alterations of RET proto-oncogene in neuroblastoma. The 8th Congress of Asian Society for Pediatric Research, May 17 -19, 2012, Seoul
5. 半谷 まゆみ, 渡邊 健太郎, 塩澤 亮輔, 樋渡 光輝, 滝田 順子, 井田 孔明: 多発骨病変を呈し診断に難渋した再発 ALL の 1 例, 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012 年 4 月 20 日~22 日
6. 藤野 修平, 三浦 健一郎, 張田 豊, 磯島 豪, 竹内 正人, 木村 有希, 滝田 順子, 北中 幸子, 五十嵐 隆: 体重増加不良を契機に診断した先天性腎性尿崩症の 1 例, 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012 年 4 月 20 日~22 日
7. 苗代 有鈴, 樋渡 光輝, 塩澤 亮輔, 本村 あい, 滝田 順子, 井田 孔明, 川嶋 寛, 赤羽 正章, 河野 博隆, 高澤 豊, 五十嵐 隆: Kasabach-Merritt syndrome を呈した Kaposiform hemangioendothelioma の 1 例, 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012 年 4 月 20 日~22 日
8. 樋渡 光輝, 滝田 順子, 井田 孔明, 杉山 正彦, 岩中 督, 三上 信太郎, 椎名 秀一郎, 高澤 豊, 五十嵐 隆: 初発時に肝転移を認めた腎細胞癌 stage 4 の 1 例, 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012 年 4 月 20 日~22 日
9. 塩澤 亮輔, 本村 あい, 樋渡 光輝, 滝田 順子, 井田 孔明, 五十嵐 隆: 造血幹細胞移植を併用した大量化学療法により寛解を維持している胸膜肺芽腫の 2 例, 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012 年 4 月 20 日~22 日
10. 本村 あい, 樋渡 光輝, 竹内 正人, 滝田 順子, 井田 孔明, 五十嵐 隆: Francisella Philomiragia による肝脾膿瘍のため死亡した慢性肉芽腫症の 10 歳男児例, 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012 年 4 月 20 日~22 日
11. 星野 論子, 滝田 順子, 西村 力, 大久保 淳, 真田 昌, 白石 友一, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川 誠司, 五十嵐 隆: 神経芽腫におけるポリコーム群たんぱくの網羅的ゲノム解析, 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012 年 4 月 20 日~22 日
12. 大久保 淳, 滝田 順子, 西村 力, 星野 論子, 吉田 健一, 白石 友一, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川 誠司, 五十嵐 隆: 次世代シーケンサーを用いた Ewing 肉腫のエクソーム解析, 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012 年 4 月 20 日~22 日
13. 西村 力, 滝田 順子, 吉田 健一, 白石

- 友一, 大久保 淳, 真田 昌, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川 誠司, 五十嵐 隆: 次世代シーケンサーを用いた神経芽腫のエクソーム解析, 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012 年 4 月 20 日 ~ 22 日
14. 滝田 順子, 西村 力, 大久保 淳, 吉田 健一, 星野 倫子, 真田 昌, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川 誠司, 五十嵐 隆: 先端的ゲノムスキニングを用いた難治性小児固形腫瘍における標的分子の探索, 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012 年 4 月 20 日 ~ 22 日
 15. 中田 雄一郎, 長町 安希子, 上田 健, 山崎 憲政, 仙谷 和弘, 稲葉 俊哉, 滝田 順子, 小川 誠司, 本田 浩章: 活性化 ALK は増幅した MYCN と協調して神経芽腫細胞腫瘍発症に関与する. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012 年 9 月 19 日 ~ 21 日
 16. 倉田 盛人, 後飯 塚僚, 北村 大介, 滝田 順子, 林泰秀, 北川 昌伸, 中村 卓郎: BLNK 欠損 preB-ALL と B 細胞分化における C/Ebpb の働き. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012 年 9 月 19 日 ~ 21 日
 17. 星野 倫子, 西村 力, 奥野 友介, 樋渡 光輝, 永田安伸, 吉田 健一, 真田 昌, 白石 友一, 宮野 悟, 林泰秀, 小川 誠司, 滝田 順子: 神経芽腫におけるエピジェネスティック関連遺伝子の網羅的ゲノム解析. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012 年 9 月 19 日 ~ 21 日
 18. 柴 徳生, 吉田 健一, 奥野 友介, 白石 友一, 田中洋子, 永田安伸, 滝田 順子, 荒川 浩一, 伊藤 悦朗, 真田 昌, 宮野 悟, 小川 誠司, 林泰秀: 全エクソーム解析による小児急性骨髄性白血病の新規発症原因遺伝子変異の同定. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012 年 9 月 19 日 ~ 21 日
 19. 大西 伸幸, サンペトラオルデア, 杉原 英志, 清水孝恒, 滝田 順子, 小川 誠司, 佐谷 秀行: 神経幹細胞を用いたマウス脳腫瘍モデルにおける活性化型 ALK 誘導発がんメカニズム. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012 年 9 月 19 日 ~ 21 日
 20. 関 正史, 西村 力, 奥野 友介, 白石 友一, 千葉 健一, 田中 洋子, 吉田 健一, 真田 昌, 林 泰秀, 宮野悟, 小川 誠司, 滝田 順子: 次世代シーケンサーによる再発肺芽腫のエクソーム解析. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012 年 9 月 19 日 ~ 21 日
 21. 西村 力, 吉田 健一, 白石友一, 奥野 友介, 千葉健一, 田中 洋子, 佐藤 悠佑, 真田 昌, 林 泰秀, 宮野悟, 小川 誠司, 滝田 順子: SNP アレイとエクソーム解析を用いた横紋筋肉腫の初発・再発/転移巣のクローン比較. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012 年 9 月 19 日 ~ 21 日
 22. 樋渡 光輝, 西村 力, 吉田 健一, 白石 友一, 奥野友介, 大久保 淳, 永田 安伸, 五十嵐 隆, 宮野 悟, 林泰秀, 小川 誠司, 滝田 順子: 次世代シーケンサーを用いたユーイング肉腫発生の分子生物学的検討. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012 年 9 月 19 日 ~ 21 日
 23. 中澤 温子, 大喜多 肇, 田中 祐吉, 中川原 章, 滝田 順子, 家原 知子, 田尻 達郎, 池田 均, 秦 順一: 神経芽腫における ALK 発現と国際神経芽腫病理分類との関連. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012 年 9 月 19 日 ~ 21 日
 24. 加藤 啓輔, 吉見 愛, 中尾 賭 朋平, 小林 千恵, 滝田 順子, 柏井 良文, 清河 信敬, 小池 和俊, 土田 昌宏: 骨髄球系抗原陽性 T 細胞型急性リンパ性白血病より樹立された細胞株 ICH-TALL-1 ならびに ICH-TALL-2 の解析, 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012 年 11 月 30 日 ~ 12 月 2 日
 25. 関 正史, 西村 力, 星野 子, 奥野 友介, 白石 友一, 吉田 健一, 千葉 健一, 田中 陽子, 真田 昌, 加藤 啓輔, 土田 昌宏, 宮野 悟, 林 泰秀, 小川 誠司, 滝田 順子: 先端的ゲノム解析技術を用いた胸膜肺芽腫における発症分子機構の解明, 第 54 回日本小児血液・がん学

- 会学術集会，横浜，2012年11月30日～12月2日
26. 柴 徳生，吉田 健一，奥野 友介，白石 友一，加藤元博，大木 健太郎，朴 明子，金澤 崇，工藤 寿子，滝田 順子，加藤 啓輔，荒川 浩一，伊藤 悦朗，花田 良二，真田 昌，小川 誠司，林 泰秀：全エクソーム解析による小児急性骨髄性白血病の新規発症原因遺伝子変異の同定，第54回日本小児血液・がん学会学術集会，横浜，2012年11月30日～12月2日
 27. 半谷 まゆみ，渡邊 健太郎，塩澤 亮輔，樋渡 光輝，滝田 順子，井田 孔明：多発骨病変を呈し診断に難渋した再発急性リンパ性白血病の一例，第54回日本小児血液・がん学会学術集会，横浜，2012年11月30日～12月2日
 28. 安井 直子，康 勝好，関 正史，加藤 元博，滝田 順子，佐藤 亞以子，小川 誠司，磯部 清孝，森 麻希子，秋山 康介，荒川 ゆうき，林 真由美，岸本 宏志，清河信敬，花田 良二：AML に急性転化し死亡したK-RAS変異を伴うJMMLの一例，第54回日本小児血液・がん学会学術集会，横浜，2012年11月30日～12月2日
 29. 鈴木 完，塩澤 亮輔，滝田 順子，工藤 宏樹，小西健一郎，魚谷 千都絵，石丸 哲也，寺脇 幹，吉村 眞，杉山 正彦，小室 広昭，岩中 督：再発巣摘出，術後化学療法，自己末梢血幹細胞移植を経て再々発なく経過している胸膜肺芽腫の1例，第54回日本小児血液・がん学会学術集会，横浜，2012年11月30日～12月2日
 30. 星野 論子，西村 力，奥野 友介，永田 安伸，吉田健一，真田 昌，白石 友一，林 泰秀，宮野 悟，岩中督，小川 誠司，滝田 順子：神経芽腫におけるエピジェネティック関連遺伝子の網羅的ゲノム解析，第54回日本小児血液・がん学会学術集会，横浜，2012年11月30日～12月2日
 31. 関 正史，西村 力，星野 論子，島村 徹平，宮野 悟，永江 弦太，油谷 浩幸，林 泰秀，小川 誠司，滝田順子：神経芽腫における網羅的メチル解析，第54回日本小児血液・がん学会学術集会，横浜，2012年11月30日～12月2日
 32. 塩澤 亮輔，中野 克俊，滝澤 慶一，半谷 まゆみ，柿本 優，渡邊 健太郎，樋渡 光輝，滝田 順子，井田 孔明：当院で経験した再発 T-ALL の5例，第54回日本小児血液・がん学会学術集会，横浜，2012年11月30日～12月2日
 33. 樋渡 光輝，柿本 優，太田 英仁，塩澤 亮輔，渡邊健太郎，滝田 順子，井田 孔明：消化管GVHDに対して経口ベクロメタゾン製剤を投与した骨髄異形成症候群の1例，第54回日本小児血液・がん学会学術集会，横浜，2012年11月30日～12月2日
 34. 渡邊 健太郎，塩澤 亮輔，樋渡 光輝，滝田 順子，杉山 正彦，絹谷 清剛，井田 孔明，岩中 督：集学的治療に抵抗性で胆癌状態のまま小康状態を保っている進行神経芽腫の2例，第54回日本小児血液・がん学会学術集会，横浜，2012年11月30日～12月2日
 35. 滝澤 慶一，塩澤 亮輔，渡邊 健太郎，樋渡 光輝，滝田 順子，井田 孔明：経過に相違を示した3例から考察するKaposiform hemangioendothelioma の治療戦略，第54回日本小児血液・がん学会学術集会，横浜，2012年11月30日～12月2日
 36. 西村 力，吉田 健一，白石 友一，奥野 友介，星野論子，関 正史，真田 昌，林 泰秀，宮野 悟，小川 誠司，滝田 順子：次世代シーケンサーとSNPアレイを用いた横紋筋肉腫3例における初発/再発・転移巣の比較，第54回日本小児血液・がん学会学術集会，横浜，2012年11月30日～12月2日
 37. 高橋 寛吉，加藤 元博，関 正史，磯部 清孝，安井直子，森 麻希子，秋山 康介，康 勝好，岸本 宏志，内田 広夫，滝田 順子，佐藤 亞以子，小川 誠司，花田 良二：FGFR1 および PRDM14 の増幅を認められた rhabdomyosarcoma の一例，第54回日本

小児血液・がん学会学術集会，横浜，
2012年11月30日～12月2日

- | | |
|---|--|
| 38. 才田 謙, 松岡 大輔, 塚原 孝典, 野田 俊輔, 日高 義彦, 上條 祐司, 三浦 健一郎, 滝田 順子, 五十嵐 隆, 小池 健一: CLCN5 遺伝子変異を認めた同一家系内の Dent 病の 2 例. 第 47 回日本小児腎臓病学会学術集会, 東京, 2012 年 6 月 29 日~6 月 30 日. | 1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し |
| 39. 金子 英雄 内田 靖, 大西 秀典, 深尾 敏幸, 谷内江 昭宏, 清河 信敬, 滝田 順子, 山崎 直也, 田内 久道, 近藤 直実: 本邦における Bloom 症候群の実態調査. 第 49 回日本小児アレルギー学会, 大阪, 2012 年 9 月 15 日~9 月 16 日. | |
| 40. 三浦 健一郎, 張田 豊, 高橋 和浩, 滝田 順子, 五十嵐 隆: 染色体劣性遠位尿管性アシドーシスの臨床像と遺伝子変異の解析. 第 55 回日本腎臓学会学術集会, 横浜, 2012 年 6 月 1 日~6 月 3 日 | |
| 41. 倉田 盛人, 菅野 陽平, 高原 智子, 後飯塚 僚, 北村 大介, 滝田 順子, 林 泰秀, 北川 昌伸, 中村 卓郎; preB 細胞性リンパ性白血病(preB-ALL)発症における BLNK と C/EBP の協調作用 第 101 回日本病理学会総会, 東京, 2012 年 4 月 26 日~4 月 28 日. | |

3. 講演

1. 滝田順子: 神経芽腫における標的分子の同定とその臨床応用. 中日国交正常化 40 周年記念小児科研究会, 6 月 14 日, 北京
2. 滝田順子: 次世代シーケンサーを用いた小児固形腫瘍における標的分子の探索. 第 23 回小児固形腫瘍研究会, 10 月 12 日, 京都

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

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 による *Cdkn2a* 遺伝子発現調節メカニズムに関する研究

研究分担者 杉本 昌隆

(国立長寿医療研究センター老化細胞研究プロジェクトチーム・プロジェクトリーダー)

研究要旨： RASシグナルの亢進は、正常細胞においては*Cdkn2a*遺伝子の発現を誘導することにより細胞増殖に対して反作用を示す。昨年度行った解析から、RALDにおいてはRASシグナルの亢進とともに*Cdkn2a*遺伝子の発現が亢進していることが示された。本研究ではRALDの原因となる分子機構を理解することを目的として、RASシグナルによる*Cdkn2a*遺伝子の発現調節機構の解析を行い、RASシグナルによる新たな*Cdkn2a*遺伝子発現調節経路が存在することを明らかにした。

A. 研究目的

自己免疫性リンパ球増殖症候群（ALPS）類縁疾患として、研究代表者らにより近年RAS 関連自己免疫性リンパ球増殖症候群様疾患（RALD）が発見された。RALD ではKRAS 遺伝子の変異が認められており、この変異に起因したRASシグナル経路の亢進が病態を引き起こすと考えられる。ヒトを含む哺乳動物においては、RAS などの癌遺伝子が異常に活性化すると、細胞周期チェックポイント機構の働きにより細胞老化または細胞死が誘導される等、生体にとって潜在的に危険な細胞を排除するメカニズムが活性化される。異常な増殖シグナルを感知してチェックポイントを活性化させるためには、*Cdkn2a* 遺伝子座にコードされるINK4a と ARF タンパク質が不可欠な役割を持つ。昨年度我々は、RALD 検体の解析を行い、*Cdkn2a* 遺伝子の発現が亢進していることを見出した。近年 *Cdkn2a* 遺伝子の発現には、クロマチンレベルの構造変化を介した転写制御とともに、転写後発現調節機構

も重要な役割を持つことが報告されている。我々は RAS などを介した *Cdkn2a* 遺伝子の発現に RNA 結合タンパク質 HuR が関与することを示唆する結果を得ている。HuR は数多くの細胞増殖制御タンパク質の発現を制御しており、様々な癌においてその発現の亢進が認められている。

本研究では、RALD 発症メカニズムを分子レベルで理解することを目的とし、マウス細胞を用いて *Cdkn2a* 遺伝子に関わる RNA 制御機構の解析を行った。

B. 研究方法

野生型マウスより胚性線維芽細胞（MEF）を調製し、活性化型 RAS 遺伝子をウイルスにより導入した。またウイルスベクターを用いた short hairpin RNA 発現系を作製し、HuR のノックダウンを行った。これらの細胞を用いて生化学的解析を行った。

(倫理面への配慮)

実験上必要とされる遺伝子サンプル、動物の取り扱いは「生物の多様性に関する条約のバイオセーフティに関するカルタヘナ議定書」に基づく「遺伝子組み換え生物等の使用等の規則による生物多様性の確保に関する法律」を遵守して行った。

C. 研究結果

MEF をモデルとして、細胞老化に伴う *Cdkn2a* 遺伝子の発現と HuR の関連について解析を行った。既に他のグループから報告があるように、細胞老化とともに HuR の発現は低下する傾向にある。そこで RALD で見られるような活性化型 RAS を MEF に導入したときの HuR の発現を解析した結果、HuR は ARF タンパク質の誘導とともに低下する傾向にあった (図 1)。

次に HuR の発現低下が *Cdkn2a* 遺伝子の発現に対しどのような影響を持つかを調べるために、RNAi を用いて MEF において HuR の発現阻害を行った。その結果、HuR 非存在下においては ARF タンパク質の発現に著しい上昇が見られた (図 2)。またこの様な条件下においては、早期に細胞老化 (増殖停止、細胞の扁平化、SA- Gal 活性の上昇) が誘導されることがわかった (図 3)。しかしながらこのときの ARF mRNA 量には有意な変化は見られなかったことから、HuR による ARF タンパク質発現制御は、転写後調節を介しているものと考えられる (図 4)。実際にこれらの細胞をシヨ糖密動勾配による分画を行い ARF mRNA の分布を測定したところ、HuR 非存在下においては明らかにポリソーム画分に ARF mRNA 量の増加が見られた (データ省略)。

以上の結果から、HuR は ARF タンパク質の発現を抑制することにより、細胞の増殖性を維持している可能性が考えられた。この可能性について検証するために、ARF 遺伝子もしくはその下流の p53 遺伝子を欠損した MEF を調整し、同様に HuR ノックダウン実験を行った。野生型 MEF においては HuR ノックダウンにより細胞老化が早期に誘導されたが、ARF 遺伝子もしくは p53 遺伝子を欠損した MEF においては、細胞増殖

の停止や細胞老化に特徴的な変化 (形態変化、SA- Gal) は認められなかった (図 5)。したがって HuR 非存在下による細胞老化の誘導は ARF タンパク質の発現に依存する現象であると考えられる。

図 1 . RASによるARFタンパク質の誘導とHuRタンパク質の発現低下。MEFに活性化型RASを導入し、上記タンパク質の発現をイムノプロットングにより評価した。Lamin A/Cはローディングコントロールとして使用した。

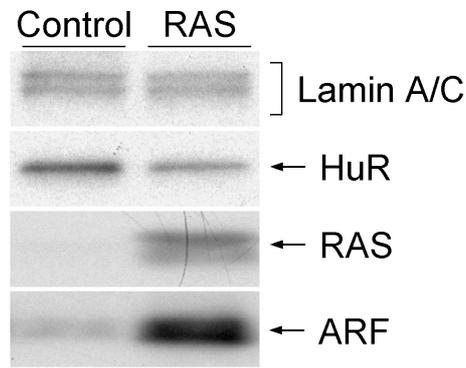


図 2 . HuR発現阻害によりARFタンパク質は増加する。MEFにHuR RNAiウィルスベクターを感染し、上記タンパク質の発現をイムノプロットングにより評価した。Tubulinはローディングコントロールとして使用した。

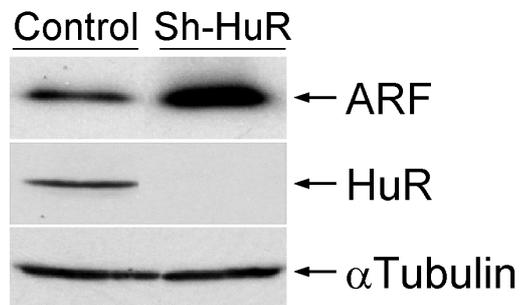


図 3 . 野生型MEFにおいてHuRの発現を阻害すると細胞老化が誘導される。

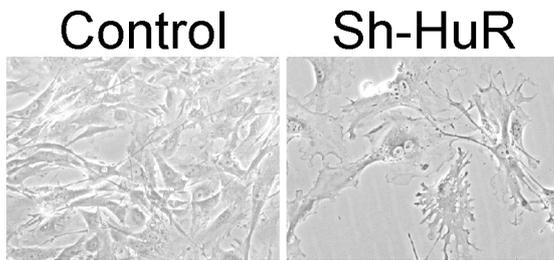


図4 . HuRはARF mRNAの転写に影響を与えない。HuRの発現を阻害したMEFにおいてARF mRNAの量をリアルタイムPCR法により測定した。

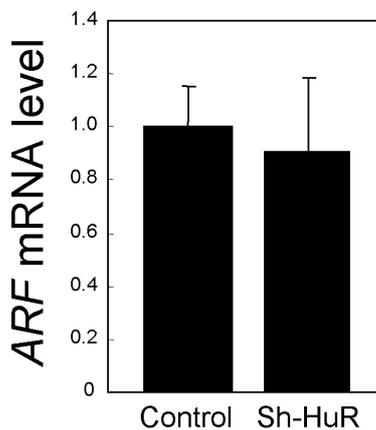
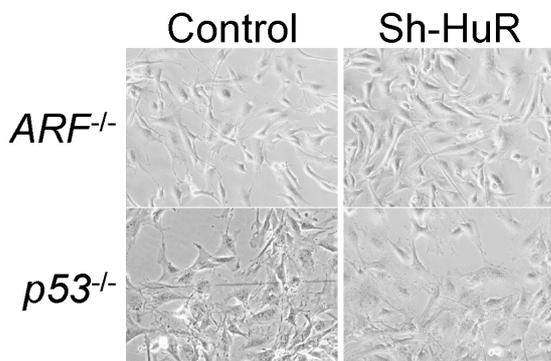


図5 .HuR発現阻害はARF-p53経路依存的な細胞老化を誘導する。ARF（上段）もしくはp53（下段）ノックアウトMEFにおいてHuRの発現を阻害した。図3の野生型MEFで見られたような細胞老化に特徴的な形態的变化は見られない。



D. 考察

Cdkn2a 遺伝子の発現は極めて複雑である。本研究および他のグループの報告から、この遺伝子座の調節には RNA 結合タンパク質 HuR を介した転写後発現調節機構が深く関与することが明らかになった。MEF において活性化型 RAS を導入すると、ARF タンパク質および INK4a タンパク質の発現上昇とともに HuR タンパク質の発現低下が認められた。この細胞では HuR の発現阻害により ARF タンパク質に依存した細胞老化が誘導されることから、RAS による細胞老化誘導に HuR の活性変化（発現低下を含む）による *Cdkn2a* 遺伝子座の転写後調節が貢献していることが考えられる。

昨年度の我々の解析により、RALD においては RAS に活性化変異により、増殖シグナルの亢進が確認された。またこれらのサンプルでは過剰な増殖シグナルに対するは反作用として、*Cdkn2a* 遺伝子の発現が亢進していた。我々は本年度、RAS シグナルによる *Cdkn2a* 遺伝子の発現調節に、HuR を介した転写後発現調節機構が関与する可能性を見出した。RALD においてもこのような発現調節機構が関与するの点については非常に興味深い。RNA の翻訳制御は、細胞のストレス応答において重要な役割を果たしている。しかしながら転写後調節については、従来の網羅的遺伝子発現プロファイリング法では解析が困難であるためにその役割が過小に評価され、見逃している部分も多いと思われるため、より注意深い観察が必要とされる。

また RAS 癌遺伝子は *Cdkn2a* 遺伝子に依存した細胞老化を誘導する。細胞老化のマーカーとして簡便な SA- Gal 染色が汎用されているが、RALD においても RAS の活性化型変異と *Cdkn2a* 遺伝子の上昇が見られるため、SA- Gal がマーカーとして利用可能であるかも知れない。

E. 結論

RAS による *Cdkn2a* 遺伝子の発現変化には、従来から知られていた転写制御だけでなく、HuR などの RNA 結合タンパク質を介した転写後発現調節機構も重要な役割を持

つ。RALD においてもこのような転写後発現制御機構が病態の発症に関与する可能性が考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawagishi, H., Hashimoto, M., Nakamura, H., Tsugawa, T., Watanabe, A., Kontoyiannis, D. L., and Sugimoto, M. HuR maintains replicative lifespan by suppressing ARF tumor suppressor. *Mol. Cell. Biol.* 2013 May;33(10):1886-900

2. 学会発表

1. Sugimoto, M., Kawagishi, H., Tsugawa, T., and Hashimoto, M. HuR maintains replicative lifespan by repressing ARF tumor suppressor. Keystone Symposia Aging and Diseases of Aging, October, 2012
2. 杉本昌隆、川岸裕幸、津川貴行、中村英亮 RNA 結合タンパク質 HuR は癌抑制タンパク質 ARF を抑制することにより細胞の分裂寿命を維持する 日本基礎老化学会第 35 回大会, 2012 年 7 月
3. Tsugawa, T., Michihiro, H., Kawagishi, H., and Sugimoto, M. HuR regulates senescence-associated secretory phenotype through DNA damage response pathway. 第 35 回大会 日本分子生物学会年会 (ワークショップ) 福岡, 2012 年 12 月

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」

皮膚粘膜カンジダ症候群の経過中に Evans 症候群と心嚢液貯留を認めた症例の遺伝子解析

研究分担者 林泰秀、朴明子、加藤政彦

（群馬県立小児医療センター）

研究要旨 皮膚粘膜カンジダ症候群の経過中にEvans症候群と心嚢液貯留を認めた症例を経験し、*AIRE*, *CARD9*, *CLEC7A*, *IL2RA*, *FAS*, *NRAS*, *KRAS*, *STAT1*等遺伝子解析を行い *STAT1*のみにエクソン14のP.T385Mの変異がみられた。この変異はDNA-binding domainの変異でSTAT1蛋白の恒常的リン酸化がみられ、gain of functionの変異と思われた。さらにAML99の157例のRAS遺伝子を解析し、29例に変異がみられた。RAS遺伝子陽性例は晩期再発例に高頻度（ $p=0.02$ ）であったが、生存率では陰性例と有意差がみられなかった。今後AMLでRAS変異のみられる患者におけるRAS遺伝子の胚細胞変異やモザイク例の検討が必要と思われた。増殖や悪化性におけるRAS遺伝子変異の意義は今後の検討課題である。

A. 研究目的

自己免疫性リンパ増殖症(Autoimmune lympho-proliferative syndrome,ALPS)は FAS 依存のアポトーシス経路の障害で、リンパ増殖症を呈し、リンパ節腫脹、脾腫などを特徴とし、自己免疫疾患を合併する症候群である。RAS-MAPK 経路の異常が病態の中心にあると考えられ、RAS、PTPN11、NF1 や CBL などの遺伝子異常が認められる。また RAS-MAPK 経路の胚細胞変異は Cardio-facio- cutaneous (CFC) 症候群、Costello 症候群などを発症することが知られている。また、NRAS、KRAS 変異のある ALPS 類似の病態が RAS associated ALPS like disease (RALD)という新しい疾患概念として提唱されている

我々はこれらを疑わせる症例を経験し詳細な解析を行い、*STAT1*遺伝子の変異をみいだしたので報告する。

さらに、小児急性骨髄性白血病(AML)のAML99プロトコール登録症例におけるRAS 遺伝子の解析を行ったので RAS 遺伝子変異の臨床的意義についても報告する。

B. 研究方法

<本症例の遺伝子解析>

本症例の末梢血により DNA を抽出し、*AIRE*, *CARD9*, *CLEC7A*, *IL2RA*, *FAS*, *NRAS*, *KRAS*, *STAT1* 遺伝子にプライマーを作成し、PCR で増幅して直接塩基決定法にて検索した。

<リン酸化の解析>

STAT1 のリン酸化の解析を行った。

<AML99 症例の RAS 遺伝子の解析>

AML99 登録 157 例において RAS 遺伝子にプライマーを作成し、PCR で増幅して直接塩基決定法にて変異解析を行った。

<症例と臨床経過>

症例は皮膚粘膜カンジダ症候群と診断した 12 歳の男児で、ステロイド投与により、フェリチンは低下傾向となり、血小板低下は改善し、外来経過観察となった。その後も発熱を契機に、血小板低下と貧血、心嚢液貯留を認めたが、増悪と軽快を繰り返している。現在は溶血性貧血と血小板低下、心嚢液貯留を認めている。

(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

- ・遺伝子解析: *AIRE*, *CARD9*, *CLEC7A*, *IL2RA*, *FAS*, *NRAS*, *KRAS*, *STAT1* 遺伝子の解析で変異は認められなかった。
- ・慢性非悪性リンパ増殖症はなかった。
- ・STAT1 の解析でエクソン 14 の c.1153C>T の変異がみられ、これは DNA-binding domain の変異で、これにより STAT1 の恒常的リン酸化がみられた。
- ・AML99 157 例中 29 例 (18.5%) に RAS 遺伝子の変異がみられ、NRAS 18 例 (62%)、KRAS 11 例 (38%) であった。RAS 遺伝子陽性例は M4 と M5 で高頻度であり (p=0.02)、晩期再発例に高頻度 (p=0.02) であったが、生存率では RAS 陰性例とくらべて有意差がみられなかった。

D. 考察

溶血性貧血、免疫性血小板減少症、心嚢液貯留、肝腫大、低身長、ばち指等がみられ、慢性皮膚粘膜カンジダ症の臨床診断であったが、種々の遺伝子検査の結果等からは ALPS の診断に一致しなかったが、STAT1 の変異がみられ、この変異は DNA-binding domain の変異で、恒常的リン酸化がみられた。

AML99 の 157 例の解析で 29 例に RAS 遺伝子変異がみられた。RAS 遺伝子陽性例は晩期再発例に高頻度 (p=0.02) であったが、生存率では陰性例とくらべて有意差がみられなかった。今後 AML で RAS 変異のみられる患者における RAS 遺伝子の胚細胞変異やモザイクの検討が必要と思われた。また増殖や悪化性における RAS 遺伝子変異の意義は、今後の検討課題である。

E. 結論

皮膚粘膜カンジダ症候群の経過中に Evans 症候群と心嚢液貯留を認めた一例を経験し、STAT1 の変異がみられ、恒常的リン酸化がみられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Toki T, Kanazaki R, Kobayashi E, Kaneko H, Suzuki M, Wang R, Terui K, Kanegane H, Maeda M, Endo M, Mizuochi T, Adachi S, Hayashi Y, Yamamoto M, Shimizu R, Ito E. Naturally occurring oncogenic GATA1 mutants with internal deletions in transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome. *Blood* 2013 Apr 18;121(16):3181-4
2. Sano H, Shimada A, Taki T, Murata C, Park MJ, Sotomatsu M, Tabuchi K, Tawa A, Kobayashi R, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y. RAS mutations are frequent in FAB type M4 and M5 of acute myeloid leukemia, and related to late relapse: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Int J Hematol.* 95 : 509-515, 2012

3. Wakai K, Sano H, Shimada A, Shiozawa Y, Park MJ, Sotomatsu M, Yanagisawa R, Koike K, Kozawa K, Ryo A, Tsukagoshi H, Kimura H, Hayashi Y. Cytomegalovirus Retinitis During Maintenance Therapy for T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 35 : 162-163, 2013
4. Gruber TA, Larson Gedman A, Zhang J, Koss CS, Marada S, Ta HQ, Chen SC, Su X, Ogden SK, Dang J, Wu G, Gupta V, Andersson AK, Pounds S, Shi L, Easton J, Barbato MI, Mulder HL, Manne J, Wang J, Rusch M, Ranade S, Ganti R, Parker M, Ma J, Radtke I, Ding L, Cazzaniga G, Biondi A, Kornblau SM, Ravandi F, Kantarjian H, Nimer SD, Döhner K, Döhner H, Ley TJ, Ballerini P, Shurtleff S, Tomizawa D, Adachi S, Hayashi Y, Tawa A, Shih LY, Liang DC, Rubnitz JE, Pui CH, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR. An Inv(16)(p13.3q24.3)-Encoded CBFA2T3- GLIS2 Fusion Protein Defines an Aggressive Subtype of Pediatric Acute Megakaryoblastic Leukemia. *Cancer Cell.* 22 : 683-697, 2012
5. Shimada A, Taki T, Koga D, Tabuchi K, Tawa A, Hanada R, Tsuchida M, Horibe K, Tsukimoto I, Adachi S, Kojima S, Hayashi Y. High WT1 mRNA expression after induction chemotherapy and FLT3-ITD have prognostic impact in pediatric acute myeloid leukemia: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Int J Hematol.* 96 : 469-476, 2012
6. Doisaki S, Muramatsu H, Shimada A, Takahashi Y, Mori-Ezaki M, Sato M, Kawaguchi H, Kinoshita A, Sotomatsu M, Hayashi Y, Furukawa-Hibi Y, Yamada K, Hoshino H, Kiyoi H, Yoshida N, Sakaguchi H, Narita A, Wang X, Ismael O, Xu Y, Nishio N, Tanaka M, Hama A, Koike K, Kojima S. Somatic mosaicism for oncogenic NRAS mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood.* 120 : 1485-1488, 2012
7. Yamada Y, Kato M, Toki F, Watanabe M, Nishi A, Matsushita I, Hirato J, Hayashi Y. Eosinophilic gastrointestinal disorder in an infant with feeding dysfunction. *Int Arch Allergy Immunol.* 158 Suppl 1:83-86, 2012
8. Kato M, Ishioka T, Kita H, Kozawa K, Hayashi Y, Kimura H. Eosinophil granular proteins damage bronchial epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. *Int Arch Allergy Immunol.* 158 Suppl 1:11-18, 2012
9. Kawashima N, Shimada A, Taketani T, Hayashi Y, Yoshida N, Matsumoto K, Takahashi Y, Kojima S, Kato K. Childhood acute myeloid leukemia with bone marrow eosinophilia caused by t(16;21)(q24;q22). *Int J Hematol.* 95 : 577-580, 2012
10. Takita J, Yoshida K, Sanada M, Nishimura R, Okubo J, Motomura A, Hiwatari M, Oki K, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Novel splicing factor mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia.* 26 : 1879-1898, 2012
11. Yokoyama T, Toki T, Aoki Y, Kanezaki R, Park MJ, Kanno Y, Takahara T, Yamazaki Y, Ito E, Hayashi Y, Nakamura T. Identification of TRIB1 R107L gain-of-function mutation in human acute megakaryocytic leukemia. *Blood* 119 : 2608-2611, 2012
12. Okubo J, Takita J, Chen Y, Oki K, Nishimura R, Kato M, Sanada M, Hiwatari M, Hayashi Y, Igarashi T, Ogawa S. Aberrant activation of ALK kinase by a novel truncated form ALK protein in neuroblastoma. *Oncogene.* 31 : 4667-4676, 2012
13. Shiba N, Hasegawa D, Park MJ, Murata C, Matsubara A, Ogawa C, Manabe A, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. CBL mutation in chronic myelomonocytic leukemia secondary to familial platelet disorder with propensity to develop acute myeloid leukemia. *Blood.* 119 : 2612-2614, 2012
14. Inukai T, Kiyokawa N, Campana D, Coustan-Smith E, Kikuchi A, Kobayashi M, Takahashi H, Koh K, Manabe A, Kumagai M, Ikuta K, Hayashi Y, Tsuchida M, Sugita K, Ohara A. Clinical significance of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: Results of the Tokyo Children's Cancer Study Group Study L99-15. *Brit J Haematol* 156 : 358-365, 2012
15. Shiba N, Taki T, Park MJ, Shimada A, Sotomatsu M, Adachi S, Tawa A, Horibe

K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Arakawa H, Hayashi Y. DNMT3A mutations are rare in childhood acute myeloid leukaemia, myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 156 : 413-414, 2012

16. Shiba N, Park MJ, Taki T, Takita J, Hiwatari M, Kanazawa T, Sotomatsu M, Ishii E, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. CBL mutations in infant acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 156 : 672-674, 2012

2. 学会発表

1. 櫻井信晴, 加藤政彦, 朴 明子, 山田佳之, 丸山健一, 林 泰秀, 吉橋博史, 竹崎俊一郎, 山田雅文, 金兼弘和. 慢性粘膜皮膚カンジダ症の2例, 前橋, 2012.7.14
2. 滝田順子, 西村 力, 大久保純, 吉田健一, 星野諭子, 真田 昌, 林泰秀, 宮野 悟, 小川誠司, 五十嵐隆. 先端的ゲノムスクニングを用いた難治性小児固形腫瘍における標的分子の探索. 第115回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012.4.21
3. 西村 力, 滝田順子, 吉田健一, 白石友一, 大久保純, 真田 昌, 林泰秀, 宮野 悟, 小川誠司, 五十嵐隆. 次世代シーケンサーを用いた神経芽腫のエクソーム解析. 第115回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012.4.21
4. 大久保純, 滝田順子, 西村 力, 星野諭子, 吉田健一, 白石友一, 林泰秀, 宮野 悟, 小川誠司, 五十嵐隆. 次世代シーケンサーを用いたEwing肉腫のエクソーム解析. 第115回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012.4.21
5. 柴 徳生, 市川 仁, 滝 智彦, 朴明子, 嶋田 明, 田淵 健, 荒川浩一, 足立壮一, 堀部敬三, 林 泰秀. 発現アレイを用いた小児急性骨髄性白血病における、NUP98-NSD1 融合遺伝子の解析. 第115回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012.4.21
6. 大木健太郎, 大喜多肇, 清河信敬, 朴 明子, 康 勝好, 花田良二, 真部 淳, 菊地 陽, 小原 明, 林泰秀. TCCSGの小児B前駆細胞型急性リンパ性白血病におけるCRLF2とIKZF1、JAK 遺伝子解析. 第115回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012.4.21
7. 大木健太郎, 奥野はるな, 柴 徳生, 金澤 崇, 朴 明子, 外松 学, 神谷尚宏, 小川千登世, 林 泰秀. 第2再発時に初めてMLL-AF4陽性となったB前駆型急性リンパ性白血病1例におけるクローン構造の検討. 第8回来た関東小児がんセミナー, 高崎, 2012.5.19
8. 朴 明子, 林 泰秀. TAMに合併する肝機能障害について. 第48回日本周産期・新生児医学会学術集会, さいたま, 2012.7.8
9. 三谷幸代, 城 青衣, 嶋田 明, 柴徳生, 林 泰秀, 市川 仁. 2遺伝子の発現に基づく高リスク小児急性骨髄性白血病の同定. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.19
10. 倉田盛人, 後飯塚僚, 北村大介, 滝田順子, 林 泰秀, 北川正伸, 中村卓郎. BLNK欠損preB-ALLとB細胞分化におけるC/Ebpbの働き. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.20
11. 星野諭子, 西村 力, 奥野友介, 樋渡光輝, 永田安伸, 吉田健一, 真田昌, 白石友一, 宮野 悟, 林 泰秀, 小川誠司, 滝田順子. 神経芽腫におけるエピジェネティック関連遺伝子の網羅的ゲノム解析. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.20
12. 柴 徳生, 吉田健一, 奥野友介, 白石友一, 田中洋子, 永田安伸, 滝田順子, 荒川浩一, 伊藤悦朗, 真田昌, 宮野 悟, 小川誠司, 林 泰秀. 全エクソーム解析による小児急性骨髄性白血病の新規発症原因遺伝子変異の同定. 第71回日本癌学会学術総会,

- 札幌, 2012.9.21
13. 関 正史, 西村 力, 奥野友介, 白石友一, 千葉健一, 田中洋子, 吉田健一, 真田 昌, 林 泰秀, 宮野悟, 小川誠司, 滝田順子. 次世代シーケンサーによる再発肺芽腫のエクソーム解析. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.21
 14. Kiyokawa N, Matsumoto K, Iijima K, Hasegawa D, Oboki K, Kobayashi K, Okita H, Takada S, Asahara H, Mori T, Fukushima T, Saito M, Koh K, Hanada R, Tsuchida M, Manage A, Kikuchi A, Saito H, Fujimoto J, Hayashi Y, Ohara A. Fusion gene-specific signature of microRNA expression in childhood ALL. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.19
 15. Iijima K, Hasegawa D, Kiyokawa N, Kobayashi K, Okita H, Miharuru M, Mori, T, Kikuchi A, Fujimoto J, Hayashi Y, Ohara A. Gene expression profile related to prognosis of childhood ALL without fusion genes. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.19
 16. Park MJ, Oda M, Kobayashi R, Suzuki N, Hara J, Horibe K, Hayashi Y. IL-7R gene mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.19
 17. Oki K, Okita H, Kobayashi K, Shiba N, Park MJ, Sotomatsu M, Fukushima T, Koh K, Hanada R, Manabe A, Kikuchi A, Tsuchida M, Ohara A, Kiyokawa N, Hayashi Y. Analysis of CRLF2 and IKZF1, JAK, IL7R genes in pediatric B-precursor ALL treated on TCCSG protocol. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.19
 18. Shimada A, Olfat I, Xu Y, Goto A, Nagai T, Narita A, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Yamada Y, Hayashi Y, Ogawa S. JAK2 V617F mutation in pediatric myeloproliferative neoplasm. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.20
 19. Shiba N, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Tanaka H, Chiba K, Nagata Y, Ohki K, Kato M, Park MJ, Takita J, Kanazawa T, Kudo K, Arakawa H, Ito E, Sanada M, Miyano S, Ogawa S, Hayashi Y. Whole exome resequencing reveals novel gene mutations in pediatric AML. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.20
 20. Okuno Y, Shiba N, Shiraishi Y, Yoshida K, Nagata Y, Sato Y, Ohki K, Kato M, Park MJ, Kanazawa T, Kudo K, Chiba K, Tanaka H, Ito E, Takita J, Sanada M, Hayashi Y, Miyano S, Ogawa S. Clonal architecture and evolution of pediatric AML. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.20
 21. Takahashi H, Koh K, Kato M, Fukushima T, Inukai T, Kiyokawa N, Taki T, Saito M, Kajiwara M, Ogawa C, Maeda M, Manabe A, Kikuchi A, Hayashi Y, Hanada R, Tsuchida M, Ohara A. Characteristics and prognostic impacts of structural chromosomal abnormalities in childhood ALL. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.21
 22. Shiba N, Ichikawa H, Taki T, Park MJ, Jo A, Mitani S, Shimada A, Sotomatsu M, Arakawa H, Tabuchi K, Adachi S, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y. NUP98-NSD1 related gene expression signature is associated with a poor prognosis in pediatric AML. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.21
 23. 大木健太郎, 柴 徳生, 新井 心, 朴明子, 外松 学, 清河信敬, 林 泰秀. 小児 B 前駆細胞型急性リンパ性白血病における clonal evolution の解析. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.11.30
 24. 関 正史, 西村 力, 星野倫子, 奥野友介, 白石友一, 吉田健一, 千葉健一, 田中陽子, 真田 昌, 加藤啓輔, 土田昌宏, 宮野 悟, 林 泰秀, 小川誠司. 滝田順子. 先端的ゲノム解析技術を用いた胸膜肺芽腫における発症分子機構の解明. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.11.30
 25. 朴 明子, 大木健太郎, 新井 心, 外松 学, 清河信敬, 小田 慈, 堀部敬三, 林 泰秀. MLPA 法を用いた T-ALL

- 遺伝子異常についての解析 .第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会 ,横浜 , 2012.11.30
26. 西 眞範, 磯村直子, 野村優子, 柳井文男, 犬飼岳史, 渡辺 新, 林 泰秀 . t(17;19)(q22;p13.3)を含む染色体異常を呈した T 細胞性急性リンパ性白血病の 1 例 . 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会 , 横浜 , 2012.11.30
27. 柴 徳生, 吉田健一, 奥野友介, 白石友一, 加藤元博, 大木健太郎, 朴 明子, 金澤 崇, 工藤寿子, 滝田順子, 加藤啓輔, 荒川浩一, 伊藤悦朗, 花田良二, 真田 昌, 小川誠司, 林 泰秀 . 全エクソーム解析による小児急性骨髄性白血病の新規発症原因遺伝子変異の同定 . 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会 , 横浜 , 2012.12.1
28. 柴 徳生, 大木健太郎, 朴 明子, 市川 仁, 足立壮一, 外松 学, 荒川浩一, 田淵 健, 多和昭雄, 堀部敬三, 土田昌宏, 花田良二, 月本一郎, 林 泰秀 . 小児急性骨髄性白血病における GATA2 遺伝子変異同定 . 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会 , 横浜 , 2012.12.1
29. 出口隆生, 村松秀城, 林 泰秀, 菊地陽, 駒田美弘 . TAM 芽球における CD117 発現と末梢血中芽球割合の相関 . 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会 , 横浜 , 2012.12.2
30. 村松秀城, 菊地 陽, 林 泰秀, 川村眞智子, 小島勢二, 矢部みはる, 磯山恵一, 滝 智彦, 辻浩一郎, 土田昌宏, 真田 昌 . ダウン症候群に合併した一過性骨髄異常増殖症に対する少量シタラビン療法による腫瘍崩壊症候群 . 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会 , 横浜 , 2012.12.2
31. 嶋田 明, Ismael Olfa, 徐 銀嶺, 後藤綾, 永井智子, 成田 敦, 坂口大俊, 土居崎小夜子, 村松秀城, 濱 麻人, 高橋義行, 山田佳之, 林 泰秀, 小島勢二 . 小児骨髄増殖疾患における JAK2V617F 遺伝子変異 . 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会 , 横浜 , 2012.12.2
32. Shiba N, Ichikawa H, Taki T, MJ Park, Jo A, Mitani S, Kobayashi T, Shimada A, Sotomatsu M, Arakawa H, Adachi S, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y. NUP98-NSD1 related gene expression signature is strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia. 54rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, December 8, 2012
33. Shiba N, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Nagata Y, Ohki K, Kato M, MJ Park, Takita J, Kanazawa T, Kudo K, Ito E, Sanada M, Miyano S, Ogawa S, Hayashi Y. Whole exome sequencing reveals spectrum of gene mutations in pediatric AML. 54rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, December 9, 2012
34. Shiba N, Ohki K, MJ Park, Adachi S, Kobayashi M, Kinoshita A, Sotomatsu M, Arakawa H, Tawa A, Horibe K, Tsukimoto I, Hayashi Y. GATA2 mutations in pediatric acute myeloid leukemia: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. 54rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, December 9, 2012

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

