

多臓器型ランゲルハンス細胞組織球症(LCH)の登録、診断、診療ガイドラインの 作成と既知の薬の治験に関する研究

担当責任者 森本 哲 自治医科大学とちぎ子ども医療センター教授

研究要旨

【背景】多臓器型ランゲルハンス細胞組織球症(LCH)は主として乳児期に発症する希少疾患で、しばしば再燃し、中枢性尿崩症や神経変性症などの不可逆的合併症を伴う。予後不良で認知度の低い多臓器型 LCH の治療成績向上は急務の課題である。【目的】多臓器型 LCH の治療成績を向上させることを目的とする。【方法】1)小児および成人の臨床試験、2)病勢判定法の確立、3)治療開発に向けた病態解明、4)長期フォローアップ調査、5)社会への啓発。【結果】1)小児に対する LCH-12 臨床試験に 75 例、観察研究に 24 例が登録された。成人多病変型 LCH に対する臨床試験の開始準備が整った。2)オステオポンチン(OPN)がリスク臓器浸潤陽性多臓器型 LCH のマーカーであることを発表した。治療反応性の判定法の確立するため検体を収集した。3)髄液中 OPN が中枢神経 LCH のマーカーとなる可能性を見出した。LCH 細胞の遺伝子変異解明のため全エクソン配列解析を実施中。4)発症後 6~20 年の小児多病変型 LCH の長期フォローアップ調査の準備が整った。5)社会への啓発が進んだ。【結論】本研究により多臓器型 LCH の治療成績向上のための基礎が構築できた。

A. 研究目的

本研究は多臓器型ランゲルハンス細胞組織球症(LCH)の啓発と予後改善を目的とする。多臓器型 LCH は主として乳児期に発症する希少疾患である。未熟樹状細胞である LCH 細胞が皮膚や骨、リンパ節などで増殖し組織破壊が生じるが、その病態は不明な点が多い。認知度が低いためしばしば診断が遅れる。治療として化学療法が必要であるが標準治療はない。約 10% が致死的で、約 30% は頻回に再燃し長期の経過をたどり、成長・発達障害、中枢性尿崩症、中枢神経変性症などの不可逆的病変を残す。また、若年成人にも多臓器型はあるが、本邦では全く認知されておらず、成人多臓器型患者は医療難民化している。このような多臓器型 LCH の啓発と予後改善は急務である。日本小児血液・がん学会、NPO 法人日本 LCH 研究会(JLSG)、日本白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)、LCH 患者会と全面的に連携して研究を進める。

B. 研究方法

LCH について以下の 5 点についての研究を行う。

- 1) 小児および成人の臨床試験
- 2) 病勢判定法の確立
- 3) 治療開発に向けた病態解明
- 4) 長期フォローアップ調査

5) 社会への啓発

1) 小児および成人の臨床試験

a) 小児ランゲルハンス細胞組織球症のリスク別臨床研究(LCH-12)を遂行する。

- * H23年に作成したLCH-12研究計画に基づき、JPLSG参加施設(<http://www.jplsg.jp/>)の20歳未満の新規に診断された全LCH症例の登録を行う。
- * H21年度に作成した診断ガイドラインに基づき、登録例の中央病理診断を行い、残余検体(生検組織および血漿)は、国立成育医療研究センターの検体保存センターで保管する。
- * 多臓器型と多発骨型に対して、JLSG-02治療研究を改良した治療レジメンによるLCH-12臨床試験を行う。登録期間は4年、追跡期間は登録終了後3年。プライマリーエンドポイントは病型別の無イベント生存期間・率で、目標症例数は130例(多臓器型85例、多発骨型45例)である。
- * 臨床試験対象外の病型は治療を規定せず前向き観察研究を行う。登録期間は4年間、追跡期間は登録終了後3年間。
- * これらのデータは、JPLSGデータセンター(NPO法人臨床研究支援機構、OSCR)で管理する。

b) 成人多臓器型LCHの治療開発

JLSG-02治療研究に登録された成人LCHの治療

結果を基に、成人の多臓器型LCHに対する全国多施設共同臨床研究計画書を作成し臨床試験を開始する。

2) 病勢判定法の確立

a) 血漿中液性因子測定し初期治療反応性の判定法を開発する。

b) 血漿中変異遺伝子DNA定量し微小残存病変の測定系を開発する。

c) 中枢神経変性LCHの髄液中液性因子を測定しマーカーを見出す。

3) 治療開発に向けた病態解明

* 全エクソン配列解析によりLCH細胞の新たな遺伝子変異を見出す。

4) 長期フォローアップ調査

* H23年度に作成した長期フォローアップガイドラインに基づき、1996～2009年にJLSG-96/02治療研究に登録された320例の多病変型LCHのコホートの長期フォローアップ調査を行う。

5) 社会への啓発

a) 2004年に発足したLCH患者会と共に患者会を開催し医療相談などを行う。

b) 1996年の発足したJLSGと共に学術集会を開催し、LCHの症例検討・講演を行う。

c) JLSGのホームページ(<http://www.jlsg.jp/>)で、文献紹介/疾患解説/ガイドライン掲載やセカンドオピニオン案内を行う。

d) 教科書・総説論文の執筆、特異な症例の報告を行う。

(倫理面への配慮)

1) 臨床試験(LCH-12)は、ヘルシンキ宣言および個人情報保護法に則り、小児血液・がん学会臨床試験審査委員会(H24年3月23日)および、研究代表者の所属機関のIRBの承認(H24年5月30日)を受け、UMINの臨床試験登録(試験ID:000008067、登録日:2012/06/01)を行った。

2) LCH-12への症例登録は、各施設の倫理委員会の承認を得られた施設のみ行う。

3) 定期モニタリングを実施し、効果安全性評価委員会の諮りながら進める。

4) 成人の多臓器型LCHに対する臨床試験についても、ヘルシンキ宣言および個人情報保護法に則り、研究代表者の施設の倫理委員会の承認を得て実施する。

5) 患者及び患者家族に対して研究および治療開始時に統一した説明文を用いて文書による同意を得る。同意説明文では、遺伝子や他の検査の内容、治療の内容、副作用、費用及び補償の有無等について説明する。さらに、疾患の特徴、検査・治療内容、治療経過についてさらに理解を深めていただくために資料を作成配布し、Web上でもそれらの

情報入手を可能とする。

6) 遺伝子解析については、研究代表者の所属機関のIRBの承認を得て行う。研究目的の検体保存およびその解析は、説明文書および同意書を作成し、研究目的と保存期間を明らかにした上で、他の目的には使用しないこと、プライバシーを保護すること、研究期間を過ぎれば検体を破棄することについて説明し、その同意の上で実施する。検体および臨床データは、個人情報を匿名化して取り扱う。ヘルシンキ宣言および個人情報保護法に則り、各施設倫理委員会およびゲノム審査委員会の承認を得て実施する。また、患者及び患者家族に対して研究および治療開始時に統一した説明文を用いて文書による同意を得て行い、検体および臨床データは個人情報を匿名化して取り扱う。

C. 研究結果

1) 小児および成人の臨床試験

a) 小児ランゲルハンス細胞組織球症のリスク別臨床研究(LCH-12)を遂行した。

* H23年に作成したLCH-12研究計画に基づき、H24年6月1日に、JPLSG参加施設の20歳未満の新規に診断されたLCHの登録を開始した。

* H21年度に作成した診断ガイドラインに基づき、中央病理診断を行い、残余検体を国立成育医療研究センターの検体保存センターで保管した。

* 多臓器型と多発骨型に対してはJLSG-02治療研究を改良した治療レジメンにより臨床試験(UMIN臨床試験ID:000008067)、計75例が登録された(H27年2月末時点)。

* 上記の病型は治療を規定せず前向き観察研究を行う。H24年6月1日の開始から、計24例が登録された(H27年2月末時点)。

b) 成人多臓器型LCHの治療開発の基盤を整備した。

* JLSG-02研究の成人LCHのパイロット試験結果を基に、Special Cレジメンを基本とした、成人の多病変型LCHに対する全国多施設共同臨床研究計画書を作成した。多病変型全例に対しSpecial Cで治療開始し、治療開始後6週間の時点で反応不良例はシタラピンを含むSalvageレジメンに移行する。エンドポイントは、病型別の無イベント生存期間・率。登録期間は5年、予定登録数は40例である。研究事務局およびデータセンターはNPO法人日本LCH研究会(JLSG)に置く。倫理委員会審査中である。

2) 病勢判定法の確立

a) 高リスクLCHで血清中osteopontin(OPN)が高値でありマーカーとなることを論文発表した。(論文発表2)

b) 血漿中変異遺伝子DNA測定のための検体を90

検体収集した。

c) 髄液中OPNは、中枢神経変性LCH例において有意に高値で、マーカーとなる可能性を見出した(未発表データ)。

3) 治療開発に向けた病態解明を進めた。

* LCH組織と正常細胞のペア検体を収集し、LCH細胞の遺伝子変異を見出すため、全エクソン配列を解析中。

4) 長期フォローアップ調査の準備を整えた。

* 1996～2009年にJLSG-96/02治療研究に登録された320例の多病変型LCHのコホートの長期フォローアップ調査の準備を整えた。

5) 社会への啓発を進めた。

a) LCH患者会と共に患者会(H26年8月3日:京都)を開催し、LCHに関する講演、医療相談を行った。

b) JLSGと共に学術集会(H26年11月29日:岡山、H27年3月15日:東京)を開催し、LCHの研究報告、症例検討、講演を行った。

c) JLSGのホームページで、厚労省班のLCHガイドライン/文献紹介/疾患解説掲載やセカンドオピニオン案内を行った。

d) 総説論文の発表を行った。(論文発表3、4)

D. 考察

1) 多発骨型および多臓器型LCHに対する臨床試験、および、その他の病型の前方視的観察研究により、本邦における小児LCHの全貌が明らかとなり、標準的治療の確立と治療成績向上が期待される。

成人LCHに対する治療は全く手探り状態である。外来治療が可能なSpecialクレジメンは成人LCHに有効と考えられた。この結果を基に、Specialクレジメンを基本とした、成人の多病変型LCHに対する全国多施設共同臨床研究により、多病変型の成人LCHの予後改善が期待される。

2) OPNが予後不良の高リスクLCHのマーカーとなることが明らかになり、初期治療反応性の評価に使用できる可能性がある。

血漿中変異遺伝子DNAは微少残存病変の評価に使用できる可能性があり、収集した検体の測定値と臨床情報を比較し解析していく。

髄液OPNは中枢神経変性LCHに対するIVIG療法(論文発表1)の効果を評価する指標として使用できる可能性がある。

3) LCH細胞に新たな遺伝子変異が見つかれば、難治性LCHに対するキナーゼ阻害薬の導入の可能性が広がる。

4) JLSG-96/02治療研究登録コホートの追跡調査により、中枢神経変性LCHに代表される不可逆的合併症の実態が解明され、長期の経過観察の重要性がさらに明らかとなると考えられる。

5) LCHについての正しい情報は極端に不足しており、Webの公式サイトの情報にさえLCHの全体像を把握していない誤情報がある。このような状況で、患者家族の不安は著しく大きい。最新の正しい情報を医師のみならず患者家族や一般大衆に発信したことで、LCHの治療成績向上に寄与できたと考えられる。

E. 結論

①LCHの臨床試験が進み、②病勢判定法の開発の基盤ができ、③LCH細胞の遺伝子変異解析が緒につき、④長期フォローアップの準備が整い、⑤LCHの社会への啓発が進んだ。以上により多臓器型LCHの治療成績向上のための基礎が構築できた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Imashuku S, Fujita N, Shioda Y, Noma H, Seto S, Minato T, Sakashita K, Ito N, Kobayashi R, Morimoto A; Japan LCH Study Group (JLSG). Follow-up of pediatric patients treated by IVIG for Langerhans cell histiocytosis (LCH)-related neurodegenerative CNS disease. *Int J Hematol*. 2015; 101: 191-197.

2) Oh Y, Morimoto A, Shioda Y, Imamura T, Kudo K, Imashuku S; Japan LCH Study Group. High serum osteopontin levels in pediatric patients with high risk Langerhans cell histiocytosis. *Cytokine*. 2014; 70: 194-197.

3) Morimoto A, Oh Y, Shioda Y, Kudo K, Imamura T. Recent advances in Langerhans cell histiocytosis. *Pediatr Int*. 2014; 56: 451-461.

4) 森本 哲. ランゲルハンス細胞組織球症. *小児科* 2014; 55: 1769-1774.

2. 学会発表

1) 川原勇太、著明なTリンパ球減少に伴いニューモシスチス肺炎を合併したランゲルハンス細胞組織球症の乳児例. 川原勇太、和田聖哉、植田綾子、尾崎理史、新島 瞳、早瀬朋美、森本 哲. 第39回LCH研究会, 2015年3月15日, 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

血球貪食症候群(HLH)の登録、診断、診療ガイドラインの作成

担当責任者 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： 血球貪食症候群(HLH)は家族性血球貪食性リンパ組織球症 (FHL)、Chediak-Higashi 症候群などの原発性HLHとEBVなどの基礎疾患に続発する二次性HLHが含まれる。そのうち日本の原発性HLHはリンパ球機能に関わる遺伝子異常が同定され、その病態が解明されつつある。またChediak-Higashi 症候群症例から iPS 細胞を作成し、その病態解析を進めている。治療については原発性HLHは造血幹細胞移植が不可欠であり、今回適切な前処置を用いた標準的移植療法を開発した。EBVによる二次性HLHは全国調査でその実態と予後因子を明らかにした。近く治療の標準化に向けて臨床研究を開始する予定である。

A. 研究目的

血球貪食症候群(HLH)は家族性血球貪食性リンパ組織球症 (FHL)、Chediak-Higashi 症候群、Griscelli 症候群、Hermansly-Pudlak 症候群などの原発性とEBVなどの基礎疾患に続発する二次性が含まれるが、その病態、診断、治療については不明の要素が多い。本研究の目的は、HLHの病態を明らかにし、その標準的診断および治療法を確立することである。

B. 研究方法

小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)および小児血液・がん学会に登録された症例を対象とした。まず臨床所見および検査所見より原発性および二次性に分類し、原発性HLHではリンパ球機能解析および既知の遺伝子異常(FHLでは *PRF1*, *UNC13D*, *STXBP2*, Chediak-Higashi 症候群では *LYST*, Griscelli 症候群では *RAB27a*, Hermansly-Pudlak 症候群では *AP3B1*)の遺伝子の有無を解析する。遺伝子異常が同定されなかった患者では、次世代シーケンサーを用いた全エクソンシーケンセスを行い新規の原因遺伝子の探索を行う。二次性HLHのうちEBV-HLHでは全国症例を集積し、その予後因子を明らかにする。またそれにより新しい治療研究を作成する。

(倫理面への配慮)

本研究事業で行われる研究は、ヘルシンキ宣言および個人情報保護法に則り、ヒトゲノム遺伝子解析倫理委員会の承認を得て実施する。患者及び患者家族に対しては説明文を用いて文書による同意を得る。

C. 研究結果

原発性HLHのうちFHLでは、FHL2, FHL3が全体の約80%を占めていた。また未知の遺伝子異常による症例4例で次世代シーケンサーを用いた全エクソンシーケンセスを行い、そのうち1例で既知の遺伝子異常を、1例で代謝性疾患の遺伝子異常(*mevalonate kinase* 異常)を同定した。リンパ球機能解析ならびに遺伝子解析の結果から、CTL活性と遺伝子型との相関が明らかとなった。

Chediak-Higashi 症候群では、血球貪食症候群をきたす症例ではCTL活性が低下しており、CTL活性の異常が血球貪食症候群合併の予測因子であることが明らかになった。Chediak-Higashi 症候群の長期合併症として神経疾患がある。今回症例からiPS細胞を樹立し各細胞へ分化させ、その病態を解析中である。

FHLでは造血幹細胞移植が必須であるが、その適切な治療法は不明であった。今回の解析では低量全身照射を含む骨髄非破壊的前処置による

臍帯血移植の有用性を明らかにした。

二次性 HLH のうち EBV-HLH の全国調査を行い、その病態と予後を明らかにした。予後因子ではビリルビン値とフェリチン値が予後と相関することが明らかとなった。EBV 量とその clonality の重要性はすでに証明済みであり、現在予後因子による層別化治療研究を作成中である。

D. 考察

原発性 HLH のリンパ球機能解析および遺伝子解析を行い、また遺伝子異常不明例では全エクソーム解析を行い新たな遺伝子異常を同定した。Chediak-Higashi 症候群では iPS 細胞を用いた病態解明を進めている。また治療としては副作用の少ない骨髄非破壊的前処置を用いた臍帯血移植の有用性を明らかにした。

EBV-HLH はいくつかの予後因子を抽出し、現在これらの予後因子を含む層別化治療研究を立案中である。特に EBV 量およびその clonality が予後因子として重要であり、また残存 EBV 感染 B 細胞根絶を目的とした rituximab の導入を検討中である。

E. 結論

日本にける HLH のうち、原発性 HLH の遺伝子異常およびリンパ球機能の異常を解析し適切な治療法を開発した。二次性 HLH の予後因子を明らかにし、治療研究を開発中である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagai K, Ochi F, Terui K, Maeda M, Ohga S, Kanegane H, Kitoh T, Kogawa K, Suzuki N, Ohta S, Ishida Y, Okamura T, Wakiguchi H,

Yasukawa M, Ishii E (2013) Clinical characteristics and outcomes of Chédiak-Higashi syndrome: a nationwide survey of Japan. **Pediatr Blood Cancer** 10: 1582-1586

2. Sawada A, Ohga S, Ishii E, Inoue M, Okada K, Inagaki J, Goto H, Suzuki N, Koike K, Atsuta Y, Suzuki R, Yabe H, Kawa K, Kato K, Yasutomo K (2013) Feasibility of reduced-intensity conditioning followed by unrelated cord blood transplantation for primary hemophagocytic lymphohistiocytosis: a nationwide retrospective analysis in Japan. **Int J Hematol** 98: 223-230
3. Kogawa K, Sato H, Asano T, Ohga S, Kudo K, Morimoto A, Ohta S, Wakiguchi H, Kanegane H, Oda M, Ishii E (2014) Prognostic factors of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in children: Report of the Japan Histiocytosis Study Group. **Pediatr Blood Cancer** 61: 1257-1262
4. Honda S, Arakawa S, Nishida Y, Yamaguchi H, Ishii E, Shimizu S (2014) Ulk1-mediated Atg5-independent macroautophagy mediates elimination of mitochondria from embryonic reticulocytes. **Nat Commun** 5: 4004

2. 総説

1. 永井功造、石井榮一 (2014) サイトカイン・ストームによる病態と治療戦略 (2) 家族性血球貪食性リンパ組織球症. **臨床とウイルス** 42: 125-131
2. 福田光成、永井功造、石井榮一 (2014) 白血球(顆粒球)の異常(悪性腫瘍を除く)、Chediak-Higashi 症候群. **神経症候群(第2版)別冊日本臨床** 433-438
3. 永井功造、石井榮一 (2014) 造血器腫瘍に

併発する血球貪食症候群の治療. EBM 血液疾患の治療 466-469

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

自己免疫性リンパ球増殖症候群(ALPS)/RAS関連ALPS 様疾患(RALD) の登録、 診断、診療ガイドラインの作成

担当責任者 高木正稔 東京医科歯科大学発生発達病態学分野 講師

研究要旨

自己免疫性リンパ球増殖症候群(ALPS)/RAS関連ALPS 様疾患(RALD) の登録、診断、診療ガイドラインの作成を行った。登録はPIDJデータベースを利用し、2014年5例の登録があった。11例の診断依頼にたいして対してフローサイトメトリーによるDNT細胞の測定、FAS, FASL, NRAS, KRASのシーケンスを行った。診断、診療ガイドラインは平成23年度「自己免疫性リンパ球増殖症候群(ALPS)およびその類縁疾患の実態調査、および病因解析に関する研究」研究班で作成したものに準拠し、改訂をおこなった。

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。近年われわれはALPS 類縁疾患としてRAS 関連自己免疫性リンパ球増殖症候群様疾患 RAS associated ALPS like disease (RALD)が知られている。本研究において、将来的に最良の医療を提供するための基盤を構築する。

RALDの発見により2008年 Teachey DTらによって提唱された分類、診断基準、2009年米国 National Institute of Health (NIH)版の分類、診断基準は再考を迫られ、遺伝子異常を基盤とした再分類を行うことが必要となった。しかしALPSとして所見をもつが、遺伝子変異が見いだせないALPS-U (type III)が存在すること、さらにこのALPS-U (type III)の症例においてCD95 遺伝子変異の低頻度体細胞変異が存在することが報告された。現在まで本邦においてもALPS FAS (type 0、type Ia)患者が同定されてきたが、その中でdouble negative (DN)T細胞の増加やALPS臨床症状が存在するにもかかわらず、FAS、FASL、caspase-10、-8の遺伝子異常が見いだされないALPS-U (type III)と考えられ、FAS およびシグナル下流分子のcaspase-8、-10の遺伝子変異のモザイクの存在について解析が必要と考えられた。

ALPS およびその類縁疾患は一般的な保険収載されている検査のみでは、確定診断は困難であり、血清中の可溶性FASリガンド(sFASL)、IL-10の上昇、末梢血中のTCR $\alpha\beta$ 陽性 CD3 陽性 CD4/CD8 二重陰性リンパ球(DNT)の増加、FASによるアポトーシス誘導能の解析など、比較的高校 s

と、煩雑な方法により診断が行われる。こういった現状は症例の診断の遅延をもたらす、的確な医療が提供されない可能性がある。より簡便な診断方法の確立が急務と考えられる。またRALDを始めとしたALPS類縁疾患の症例は希少で本邦における現状は未知である。本邦におけるALPS類縁疾患の現状をデータベースで把握する。

B. 研究方法

FAS, FASL, NRAS, KRAS 遺伝子のエクソン部分をPCR法で増幅し、BigDye Terminator v3.1 (Life technologies) を用いてシーケンスを行った。

(倫理面への配慮)

本研究では「ヒトゲノム遺伝子解析研究」ならびに「ヒト(もしくはヒト由来検体・情報(臨床情報を含む)等)を対象とする研究」を行ったため、学内倫理委員会承認を得た。「課題番号:103 小児期発症疾患の遺伝的素因に関する研究」

C. 研究結果

登録はPIDJデータベースを利用し、2014年5例の登録があった。11例の診断依頼にたいしてフローサイトメトリーによるDNT細胞の測定、FAS, FASL, NRAS, KRAS 遺伝子のシーケンスを行った。いくつかの症例では臨床症状、DNT細胞増加よりALPSが疑われるものの、遺伝子診断では診断はつかなかった。こういった症例に対し責任遺伝子を明らかにするため次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析を計画し、ゲノムの調整を行った。2014年度末から2015年度初めに解析を行う予定である。診断、診療ガイドラインは平成23年度「自己免疫性リンパ球増殖症候群(ALPS)およびその類縁疾患の実態調査、および病因解析に関

する研究」研究班で作成したものに準拠し、改訂をおこなった。何らかの形で学会等での承認を得れるよう手続きを行う。

D. 考察

ALPS と臨床的に疑われるも、診断のつかないケースが多々あることが明らかとなった。また診断確定のために行う検査はいずれも保健適応がなく非常に手間のかかる研究室レベルでの検査であり、遺伝子診断の方が簡便である。一方遺伝子診断では、診断確定率が低く、ALPS は類縁疾患を含め雑多な疾患であり、より多くの候補遺伝子見出していく必要があると考えられた。今後、低頻度体細胞モザイクの同定を含め、より簡便な、確定診断法の確立がのぞまれる必要がある。

E. 結論

11 例の ALPS 疑い症例に対してフローサイトメトリーによる DNT 細胞の測定、FAS, FASL, NRAS, KRAS 遺伝子のシーケンスを行った。DNT 細胞の上昇から ALPS が疑われるも、FAS, FASL, NRAS, KRAS 遺伝子の異常はなかった。エクソーム解析による新規疾患遺伝子の検索を行っている。

F. 健康危険情報

(委託業務成果報告(業務項目)には記入せずに、委託業務成果報告(総括)にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

高木正稔, 宮脇零士, 小林千佳, 青木由貴, 富澤大輔, 今井耕輔, 森尾友宏, 水谷修紀. Ras 関連 ALPS 様疾患 (RALD) 新規治療法開拓への展望. 第 117 回日本小児科学会学術集会 2014 年 4 月 11 日-13 日 名古屋

楊 曦, 高木正稔, 菊地雅子, 横田俊平, 小池健一, 村松秀城, 小島勢二, 金兼弘和. NRAS 体細胞モザイク変異による自己免疫性リンパ増殖症候群様疾患の 1 例. 第 117 回日本小児科学会学術集会 2014 年 4 月 11 日-13 日 名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

X連鎖リンパ増殖症候群の病態解析と新たな治療法開発に関する研究

担当責任者 金兼 弘和 東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野 准教授

研究要旨: X連鎖リンパ増殖症候群(X-linked lymphoproliferative syndrome: XLP)はEBウイルス(EBV)に対する免疫応答の欠陥を有する原発性免疫不全症であり、*SH2D1A*変異によるXLP1と*XIAP*変異によるXLP2が存在する。典型的XLPとは異なる臨床像を呈した免疫不全症の2家系について全エクソーム解析を行ったところ、*XIAP*ならびに*SH2D1A*変異が同定された。家系1においてはX染色体の不活化の偏りによって女性保因者がXLP2を発症していた。家系2においてはメモリーT細胞分画に*SH2D1A*体細胞変異を認め、正常機能を有していた。この患者T細胞から*SH2D1A*以外の遺伝学的背景が均一なiPS細胞を作成することが可能であり、これを使うことで新たな治療法開発に繋げたい。

A. 研究目的

X連鎖リンパ増殖症候群(X-linked lymphoproliferative syndrome: XLP)はEBウイルス(EBV)に対する免疫応答の欠陥を有する原発性免疫不全症であり、致命的伝染性単核症、リンパ腫、異常ガンマグロブリン血症を臨床的特徴とする。1998年にSAPをコードする*SH2D1A*が責任遺伝子として同定された。2006年にはXLPの第二の責任遺伝子として*XIAP/BIRC4*が同定され、それぞれXLP1、XLP2と命名されるようになった。これまでリンパ球内のSAP蛋白、*XIAP*蛋白を染色するフローサイトメトリー法と遺伝子解析を組み合わせ、わが国におけるXLP1とXLP2をそれぞれ30例、20例以上診断してきた。その過程で非典型的なXLP患者と遭遇したので、その病態解析を行い、新たな治療法開発に繋げたい。

B. 研究方法

女兒を含む同胞3例が血球貪食性リンパ組織球症を発症した1家系(家系1)ならびに家系内に3例の低ガンマグロブリン血症の男性を含む1家系(家系2)を対象に患者家族の同意を得て、全エクソーム解析を行ったところ、それぞれ*XIAP*、*SH2D1A*変異が同定された。

家系1についてはフローサイトメトリーにて*XIAP*蛋白の発現ならびにメチル化特異的PCRを用いてX染色体の不活化を解析した。

家系2についてはフローサイトメトリーにて各細胞亜群におけるSAP蛋白の発現ならびにEBVでトランスフォームした自己B細胞株に対するCD137

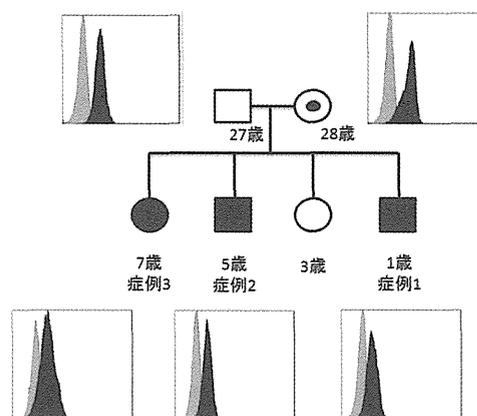
の発現を調べた。

(倫理面への配慮)

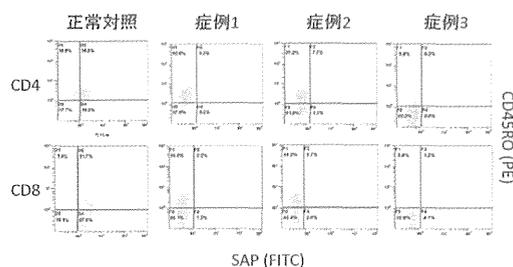
本研究はヒト検体を用いて解析を行うものであり、検体量および採取時の苦痛には十分な配慮を行った。遺伝子解析については各種指針を遵守して、患者個人情報保護について十分な配慮を行った。

C. 研究成果

家系1において症例1,2の男児例のみならず、症例3の女児例においても*XIAP*蛋白の発現が低下していた(図1)。遺伝子解析では症例3は母親と同様に*XIAP*ヘテロ接合体変異であったため、X染色体の不活化の偏りが予想された。メチル化特異的PCR法を行ったところ、母親のX染色体の不活化はランダムであったが、症例3では非ランダムであり、母親由来の*XIAP*変異アレルのみが活性化していた。



通常 XLP1 においては SAP 蛋白の発現欠損を認めるが、家系 2 においては症例 1、2、3 ともにメモリーCD8⁺T 細胞の一部に SAP 陽性細胞が認められ、症例 2 ではメモリーCD4⁺T 細胞の一部にも SAP 陽性細胞が認められた(図 2)。ソーティングしたメモリーT 細胞の遺伝子解析を行ったところ、SAP 陽性細胞比率に相当する *SH2D1A* 正常アレルが検出された。SAP 陽性細胞は自己 B 細胞株で刺激培養すると CD137 の発現が認められたが、SAP 陰性細胞は認められなかった。



D. 考察

家系 1 の症例 3 は遺伝学的には保因者であったが、X 染色体の不活化の偏りによって *XIAP* 変異アレルのみが活性化し、同胞男児例と同様に *XIAP* 蛋白が発現したものと考えられた。*XIAP* 欠損のために血球貪食性リンパ組織球症を発症したと考えられた。

家系 2 ではメモリーT 細胞の一部に体細胞変異により *SH2D1A* 正常クローンが生じて、SAP 陽性細胞が認められたと考えられた。この SAP 陽性細胞は自己 B 細胞株に対する応答が認められた。一部に存在 SAP 陽性細胞が正常機能を代償していることが、この家系における XLP1 の軽症化に関与しているものと考えられた。

E. 結論

SH2D1A 体細胞モザイクを有する XLP1 患者の T 細胞から iPS 細胞を作成すれば、*SH2D1A* 以外の遺伝学的背景が均一な SAP 陽性 T 細胞と陰性 T 細胞を樹立することができる。この T 細胞を使えば、SAP が関わる機能解析ならびに選択治療薬のスクリーニングが容易となり、XLP1 に対する新しい治療法開発が期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Aguilar C, Lenoir C, Lambert N, Bègue B, Brousse N, Canioni D, Berrebi D, Roy M, Gérart S, Chapel H, Schwerd T, Siproudhis L,

Schäppi M, Al-Ahmari A, Mori M, Yamaide A, Galicier L, Neven B, Routes J, Uhlig HH, Koletzko S, Patel S, Kanegane H, Picard C, Fischer A, Bensussan NC, Ruemmele F, Hugot JP, Latour S. Characterization of Crohn disease in X-linked inhibitor of apoptosis-deficient male patients and female symptomatic carriers. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 134: 1131-41.e9.

- 2) Yabal M, Müller N, Adler H, Knies N, Groß CJ, Damgaard RB, Kanegane H, Ringelhan M, Kaufmann T, Heikenwälder M, Strasser A, Groß O, Ruland J, Peschel C, Gyrd-Hansen M, Jost PJ. XIAP Restricts TNF- and RIP3-Dependent Cell Death and Inflammasome Activation. *Cell Rep* 2014; 7: 1796-808.
- 3) 金兼弘和. 原発性免疫不全症に合併する自己炎症疾患～炎症性腸疾患をモデルとして～. *日本小児科学会雑誌* 2014; 118: 1588-94.

2. 学会発表

- 1) Kanegane H. Whole exome sequencing reveals atypical phenotype of X-linked lymphoproliferative syndrome. A symposium for researchers and clinicians on XLP and WAS 2014 Nov3-4. London, UK.
- 2) Yang X, Nishida N, Hoshino A, Goi K, Kanzaki T, Yoshida K, Muramatsu H, Ogawa S, Kojima S, Kanegane H. X-linked dysgammaglobulinemia associated with somatically reverted memory T cells in a family with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1. 16th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies 2014 Oct.29-Nov.1. Prague, Czech Republic.
- 3) Nishida N, Yang X, Hoshino A, Kanegane H. Inflammatory bowel disease in Japanese patients with XIAP deficiency. 16th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies 2014 Oct.29-Nov.1. Prague, Czech Republic.
- 4) Kanegane H. XLP (X-Linked Lymphoproliferative Syndrome) and EB-Virus infection. PAS/ASPR Joint Meeting 2014 May3-6. Vancouver, Canada.
- 5) Yang X, Kunitsu T, Ikeda Y, Taga T, Wada T, Yachie A, Yasumi T, Heike T, Kanegane H. Female patient with X-linked lymphoproliferative syndrome type 2 caused by extremely skewed inactivation of X-chromosome PAS/ASPR Joint Meeting. 2014 May3-6. Vancouver, Canada.
- 6) 金兼弘和. 教育講演「原発性免疫不全症に合併する自己炎症」. 第 117 回日本小児科学会 2014 Apr11-13. 名古屋市.
- 7) 和田泰三, 金兼弘和, 太田和秀, 谷内江昭宏.

XIAP 欠損症における血清 IL-18 の持続高値.
第 117 回日本小児科学会 2014 Apr11-13. 名古屋市.

- 8) 國津智彬, 池田勇八, 多賀 崇, 野村明孝, 竹内義博, 松井 潤, 吉田 忍, 八角高裕, 楊 曦, 金兼弘和. 女兒例を含む XIAP 欠損症の同胞例第 117 回日本小児科学会 2014 Apr11-13. 名古屋市.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

全エクソン、全ゲノム解析、機能解析

担当責任者 小川誠司 京都大学医学系研究科 腫瘍生物学講座 教授

研究要旨:小児の増殖性血液疾患は年間発症数が各疾患 20 例～200 例で、致命的経過をたどる例が多く、治療法も統一されていなかった。また、本疾患は AYA (adolescence and young adult) 世代にも発症するが、その病態は不明であり的確な診断が難しい。本研究では、診療ガイドライン改訂に向けた病態解析として、これまでの臨床研究に登録された患者検体を用い、次世代シーケンサーを用いて既知や未知の遺伝子変異の解析を行い病態を解析する。同定できた遺伝子を含めた高精度の診断基準を作成し、診療のガイドラインの改訂と予後の改善に役立てることを目的とする。

A. 研究目的

小児の増殖性血液疾患は年間発症数が各疾患 20例～200例で、致命的経過をたどる例が多く、治療法も統一されていなかった。この疾患は乳幼児に加えAYA (adolescence and young adult) 世代にも発症し、AYA世代の患者は小児以上に認知度が低いため的確な診断がなされず実態すら不明である。平成21年度以降、一過性骨髄異常増殖症 (TAM班)、血球貪食症候群 (HLH班)、ランゲルハンス細胞組織球症 (LCH班)、自己免疫性リンパ球増殖症候群 (ALPS) および類縁疾患 (RALD) (ALPS/RALD班) の4つの厚労省難治性疾患研究班が発足し、疫学調査、疾患登録、診断基準・診療ガイドライン・長期フォローアップガイドラインの作成、原因遺伝子解析等が行われてきた。昨年度から新規疾患としてX-連鎖リンパ増殖症 (XLP) と小児骨髄増殖症(MPD)を研究対象として加え、6疾患の研究班とし、日本小児血液・がん学会の疾患委員会、中央診断、疾患登録事業と連携し、病態解析により重症例の抽出を行い、高精度の診断基準を作成し、診療のガイドラインの改訂と予後の改善に役立てることが目的である。分担研究者は、診療ガイドライン改訂に向けた病態解析として、これまでの臨床研究に登録された患者検体を用い、次世代シーケンサーを用いて既知や未知の遺伝子変異の解析を行い、同定できた遺伝子を診断や重症度の判定に組込むことを目的として研究を行う。

B. 研究方法

DNA を用いて、ヒト全エクソン領域をターゲットとするビオチン化された cRNA (Agilent 社 SureSelect ®)を用いて濃縮したのち、次世代シーケンサー (illumina 社 HiSeq 2000) で解析を行う。家

族内発症が認められ、遺伝性であることが予想される症例や、散発性でも生殖細胞の変異による発症が疑われる疾患の解析の際には、同意が得られた場合には合わせて親族の解析も行う。また、腫瘍性疾患の解析の場合には、寛解期に採取した末梢血由来の DNA などをも自己正常検体として腫瘍細胞特異的な変異を検出する。

(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、京都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

現在各研究班からの症例の集積を行っているが、これまでに稀少小児遺伝性血液疾患の迅速な原因究明及び診断・治療法の開発に関する研究 (小島班) で行ったTAMおよびダウン症候群に合併するAMKLの解析ではコヒーシン複合体を構成する遺伝子など多くの新規の遺伝子変異を同定し、また、HLH、LCH、ALPS/RALDにおいても原因遺伝子を同定して診断を確定した。

D. 考察

次世代シーケンサーを用いた全エクソンシーケンスは、腫瘍性疾患および遺伝性疾患における新規の遺伝子変異の検索および遺伝子診断に極めて有効であると考えられた。

E. 結論

今後も症例の集積を進めて、次世代シーケンサーを用いた解析を進めていく必要があると考え

られた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sato Y, Maekawa S, Ishii R, Sanada M, Morikawa T, Shiraishi Y, Yoshida K, Nagata Y, Sato-Otsubo A, Yoshizato T, Suzuki H, Shiozawa Y, Kataoka K, Kon A, Aoki K, Chiba K, Tanaka H, Kume H, Miyano S, Fukayama M, Nureki O, Homma Y, Ogawa S. Recurrent somatic mutations underlie corticotropin-independent Cushing's syndrome. *Science*. 344(6186):917-920, 2014.
2. Lin DC, Meng X, Hazawa M, Nagata Y, Varela AM, Xu L, Sato Y, Liu LZ, Ding LW, Sharma A, Goh BC, Lee SC, Petersson BF, Yu FG, Macary P, Oo MZ, Ha CS, Yang H, Ogawa S, Loh KS, Koeffler HP. The genomic landscape of nasopharyngeal carcinoma. *Nat Genet*, 2014.
3. Lin DC, Hao JJ, Nagata Y, Xu L, Shang L, Meng X, Sato Y, Okuno Y, Varela AM, Ding LW, Garg M, Liu LZ, Yang H, Yin D, Shi ZZ, Jiang YY, Gu WY, Gong T, Zhang Y, Xu X, Kalid O, Shacham S, Ogawa S, Wang MR, Koeffler HP. Genomic and molecular characterization of esophageal squamous cell carcinoma. *Nat Genet*. 46(5):467-473, 2014.
4. Damm F, Mylonas E, Cosson A, Yoshida K, Della Valle V, Mouly E, Diop M, Scourzic L, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Kikushige Y, Davi F, Lambert J, Gautheret D, Merle-Beral H, Sutton L, Dessen P, Solary E, Akashi K, Vainchenker W, Mercher T, Droin N, Ogawa S, Nguyen-Khac F, Bernard OA. Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients. *Cancer Discov*. 2014
5. Shen W, Clemente MJ, Hosono N, Yoshida K, Przychodzen B, Yoshizato T, Shiraishi Y, Miyano S, Ogawa S, Maciejewski JP, Makishima H. Deep sequencing reveals stepwise mutation acquisition in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest*. 2014
6. Kurtovic-Kozaric A, Przychodzen B, Singh J, Konarska MM, Clemente MJ, Otrrock ZK, Nakashima M, Hsi ED, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Boultonwood J, Makishima H, Maciejewski JP, Padgett RA. PRPF8 defects cause missplicing in myeloid malignancies. *Leukemia*. 2015
7. Wang L, Sato-Otsubo A, Sugita S, Takase H, Mochizuki M, Usui Y, Goto H, Koyama T, Akiyama H, Miura O, Ogawa S, Arai A. High-resolution genomic copy number profiling of primary intraocular lymphoma by single nucleotide polymorphism microarrays. *Cancer Sci*. 2014
8. Seki M, Yoshida K, Shiraishi Y, Shimamura T, Sato Y, Nishimura R, Okuno Y, Chiba K, Tanaka H, Kato K, Kato M, Hanada R, Nomura Y, Park MJ, Ishida T, Oka A, Igarashi T, Miyano S, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J. Biallelic DICER1 mutations in sporadic pleuropulmonary blastoma. *Cancer Res*. 2014
9. Matsunawa M, Yamamoto R, Sanada M, Sato-Otsubo A, Shiozawa Y, Otsu M, Isono K, Koseki H, Nakauchi H, Ogawa S. Haploinsufficiency of Sf3b1 leads to compromised stem cell function but not to myelodysplasia. *Leukemia*. 2014
10. Kihara R, Nagata Y, Kiyoi H, Kato T, Yamamoto E, Suzuki K, Chen F, Asou N, Ohtake S, Miyawaki S, Miyazaki Y, Sakura T, Ozawa Y, Usui N, Kanamori H, Kiguchi T, Imai K, Uike N, Kimura F, Kitamura K, Nakaseko C, Onizuka M, Takeshita A, Ishida F, Suzushima H, Kato Y, Miwa H, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Naoe T. Comprehensive analysis of genetic alterations and their prognostic impacts in adult acute myeloid leukemia patients. *Leukemia*. 2014
11. Hosono N, Makishima H, Jerez A, Yoshida K, Przychodzen B, McMahon S, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Sanada M, Gomez-Segui I, Verma AK, McDevitt MA, Sekeres MA, Ogawa S, Maciejewski JP. Recurrent genetic defects on chromosome 7q in myeloid neoplasms. *Leukemia*. 2014
12. Hasegawa S, Imai K, Yoshida K, Okuno Y, Muramatsu H, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Kojima S, Ogawa S, Morio T, Mizutani S, Takagi M. Whole-exome sequence analysis of ataxia telangiectasia-like phenotype. *J Neurol Sci*. 2014
13. Wang R, Yoshida K, Toki T, Sawada T, Uechi T, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Kudo K, Kamimaki I, Kanezaki R, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Terui K, Sato T, Iribe Y, Ohga S, Kuramitsu M, Hamaguchi I, Ohara A, Hara J, Goi K, Matsubara K, Koike K, Ishiguro A, Okamoto Y, Watanabe K, Kanno H, Kojima S, Miyano S, Kenmochi N, Ogawa S, Ito E. Loss of function mutations in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol*. 2015 [Epub ahead of print]
14. Nakamoto-Matsubara R, Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yoshida K, Yanagimoto S, Shiozawa Y, Nanmoku T, Satomi K, Muto H, Obara N, Kato T, Kurita N, Yokoyama Y, Izutsu K, Ota Y, Sanada M, Shimizu S, Komeno T, Sato Y, Ito T, Kitabayashi I,

Takeuchi K, Nakamura N, Ogawa S, Chiba S.
Detection of the G17V RHOA mutation in
angioimmunoblastic T-cell lymphoma and related
lymphomas using quantitative allele-specific PCR.
PLoS One. 2014

2. 学会発表

Kenichi Yoshida, Seishi Ogawa Overview:
Genetic analysis of hereditary hematologic
disorders 第76回日本血液学会学術集会.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

小児骨髄増殖症(MPD)の登録、診断と診療ガイドラインの作成および全エクソン解析 とそれに基づく病態解析に関する研究

担当責任者 嶋田 明 岡山大学病院小児科講師

研究要旨

小児骨髄増殖性疾患(MPD/MPN)の中でも、真性多血症(polycythemia vera, PV)、本態性血小板血症(essential thrombocytosis, ET)、好酸球増多症(hypereosinophilic syndrome, HES)、肥満細胞症(mastocytosis, MS)などの本邦小児期における真の発症率は不明なままである。またこれ以外にこれまでの分類では対応できない unclassified MDS/MPN も存在する。小児の ET と成人の ET はその分子病態が異なっており、今後次世代シーケンサーで解析を進めていく必要がある。

A. 研究目的

小児期の骨髄増殖性疾患 myeloproliferative disorder(MPD)/myeloproliferative neoplasm(MPN) は造血幹細胞レベルのクローナルな増殖に起因するとされる、稀な疾患群である。また骨髄異形成症候群(Myelodysplastic syndrome, MDS)との異同が注目され、MDS/MPN 疾患群も存在する MPN の代表的な病型として慢性骨髄性白血病(chronic myeloid leukemia, CML)が、MDS/MPN の代表的な疾患として若年性骨髄単球性白血病(Juvenile myelomonocytic leukemia, JMML)があげられ、その分子病態については、近年急速に明らかとなってきている。一方それ以外の MPN である真性多血症(polycythemia vera, PV)、本態性血小板血症(essential thrombocytosis, ET)、好酸球増多症(hypereosinophilic syndrome, HES)、肥満細胞症(mastocytosis, MS)などの本邦小児期における真の発症率は不明なままである。またこれ以外にこれまでの分類では対応できない unclassified MDS/MPN も存在するようである。今回我々は本邦における真の発症率を明らかとし、次世代シーケンサーなどを用いて、その分子病態を明らかとすることで、新たな治療法の提言などに

つながるものと考えられる。

B. 研究方法

各疾患群について、小児血液がん学会内で全国アンケート調査を行い、データベースを構築する。順次説明同意をもって、検体を採取し、次世代シーケンズ解析を行う。

(倫理面への配慮)

説明同意書をもって、検体を採取し、個人情報は匿名化され、番号が振られる。当院での倫理審査は承認されている。

C. 研究結果

以前の報告を踏まえて多数の小児例で解析を行ったが、小児の ET では JAK2V617F 変異が約 30%と低率で、成人でみられた CALR 遺伝子、MPL 遺伝子変異もほとんど見られなかった。

HES/MS については小児アレルギー学会、小児皮膚科学会と合同でアンケート調査を行い、疾患のデータベースを構築している。

D. 考察

ET に関しては同時に解析した成人例では一定割合で CALR 遺伝子変異や MPL 遺伝子変異がみつかったことから、小児の ET は成人の ET と分子病態が異なる可能性が示唆され、今後次世代シーケンサーでの解析が必要である。

HES/MS に関しては小児血液がん学会での疾患登録では非常に少数例しか把握されていなかったため、現在小児アレルギー学会と小児皮膚科学会と合同で調査を行っている。

Unclassified MDS/MPN 例については前回の検討を引き継ぎ、全国調査を行っている。

E. 結論

小児の ET は成人の ET と分子病態が異なる可能性が示唆され、今後次世代シーケンサーでの解析が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

準備中

2. 学会発表

Sekiya Y et al. Jak2, MPL and CALR mutations in children with essential thrombocytemia, 2014 年度日本血液学会学術集会、大阪

G. 知的所有権の出願・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

一過性骨髄異常増殖症(TAM)の登録、診断、診療ガイドラインの作成と
TAM、LCH、MPDのNOGマウスへの移植とTAMのiPS細胞の樹立に関する研究

担当責任者 渡邊 健一郎 静岡県立こども病院血液腫瘍科科長

研究要旨:一過性骨髄異常増殖症(TAM)症例の診断、診療ガイドライン作成のため、日本小児白血病リンパ腫研究グループ (JPLSG)において前方視的観察研究を行い、全国規模で症例を登録した。小児の増殖性血液疾患であるTAM、ランゲルハンス細胞組織球症(LCH)、骨髄増殖症(MPD)について、NOGマウスを用いて異種移植疾患モデルを作製する研究を行った。従来細胞株樹立も困難で、ヒト細胞を用いたin vivo疾患モデルがなかったTAMの異種移植モデルを樹立した。この解析により、TAMには多様なマイナークローンが存在しそのクローン選択により白血病への移行することが示唆された。全エクソン解析等によりさらに詳細な解析を進めている。ヒト細胞を用いた疾患モデルの樹立が困難な小児血液腫瘍疾患において、NOGマウスモデルが応用可能であると考えられた。

A. 研究目的

小児の増殖性血液疾患である一過性骨髄異常増殖症(TAM)、ランゲルハンス細胞組織球症(LCH)、骨髄増殖症(MPD)には難治例が存在し、新たな治療開発が必要である。TAMの症例の登録を行い、診断および診療ガイドラインの作成を行う。NOD/Shi-scid, IL-2R γ null(NOG)マウスはヒト細胞が高率に生着するため、ヒト造血系や白血病等の異種移植モデルマウスとして有用である。本研究では有用な疾患モデルが乏しかったTAM、LCH、MPDについて、NOGマウスを用いた異種移植モデル、また疾患特異的iPS細胞の樹立を行い、疾患モデルを作製することを目的とする。

B. 研究方法

日本小児白血病リンパ腫研究グループ (JPLSG)においてTAM患者を登録し、前方視的観察研究を行う。形態、GATA1遺伝子変異、フローサイトメトリーといった中央診断を行い、臨床情報を集積する。患者の病的細胞が含まれる分画を分離し、NOGマウスの尾静脈または皮下に移植する。病的細胞に特異的な形態、マーカーを検鏡、フローサイトメトリー、遺伝子変異解析を用いて、生着を確認し、キメリズム、NOGマウス内での動態を評価する。また、iPS細胞の樹立を行う。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヘルシンキ宣言に従い、倫理委員会の承認を得た後、検体採取の際には、十分な説明を行い、文書による同意を得ている。遺伝子解析つ

ては、ヒトゲノム遺伝子解析に関する倫理指針に従っている。

C. 研究結果

JPLSG前方視的観察研究TAM-10を行い、TAM患者を168例登録した。現在、中央診断のデータ、臨床情報を集積し、データの精度を高める作業を行っている。

TAM細胞については3例でNOGマウスへの生着を確認した。そのうち1例については、継代移植が可能であり、複数のNOGマウスを用いて継代移植を行った。生着した細胞について、GATA1遺伝子変異、DNAコピーナンバー解析を行うと、元々の患者検体とは異なったGATA1変異、いくつかの異なったゲノム構造異常をもつクローンがそれぞれのマウスで主なクローンとして生着していることがわかった。このうち8代まで継代が可能であった細胞がもつ16q欠失について、欠失部位特異的なプライマーを作成しPCRで解析し、患者検体にこの異常をもつ細胞がマイナークローンとして既に存在していたことを示した。同様に患者検体には、異なるGATA1変異を有するTAM細胞も、マイナークローンとして存在していたことが判明した。これらの結果から、TAM患者にはゲノム異常をもつ細胞がマイナークローンとして存在し、それがクローン選択をうけることで白血病が発症することが示唆された。この実験系で各マウス内に生着したTAM細胞は種々の再増殖能を示した。その差異の原因を探るため、それぞれの細胞について全エクソン解析を行ったが、現在のところ

る再増殖能を規定する特異的な遺伝子変異は検出されておらず、さらに詳細な解析を行っている。

D. 考察

TAM症例を前方視的に登録し、詳細なデータの集積を行うことができた。このデータの解析により、本邦でのTAMに実態、早期死亡と白血病発症に関連する因子が明らかとなると期待される。

従来細胞株樹立も困難で、ヒト細胞を用いたin vivo疾患モデルがなかったTAMの異種移植モデルを樹立し、TAMから白血病への移行のメカニズムについて解析することができた。今後、さらに詳細な病態解析を行い、治療開発のモデルとしての応用も期待できる。LCH、MPDについては、移植に適した細胞が得られず、今後の課題となった。

E. 結論

JPLSG前方視的観察研の究により全国規模でTAM症例を登録することができた。

TAMのNOGマウスを用いた異種移植モデルを作製した。ヒト細胞を用いた疾患モデルの樹立が困難な小児血液腫瘍疾患において、NOGマウスモデルが応用可能であると考えられた。

F. 健康危険情報

(委託業務成果報告(業務項目)には
記入せずに、委託業務成果報告(総括)にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Daifu T, et al. The NOD/Shi-scid/IL-2Rgamma mice xenograft model recapitulates anaplastic large cell lymphoma dissemination to the bladder. *Leuk Lymphoma* 2014 Oct 24, 1-2.
 - 2) 渡邊健一郎 NOGマウスモデルと小児がん. *小児外科* 47(2),129-132, 2015.
2. 学会発表
濱麻人他 ダウン症における一過性異常骨髄増殖症の形態学的特徴: JPLSG TAM-10形態中央診断の解析. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会 2014年11月28日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

一過性骨髄異常増殖症(TAM)のiPS細胞の樹立およびサイトカインの解析に関する研究

業務主任者又は担当責任者 朴明子 群馬県立小児医療センター部長

研究要旨:一過性骨髄異常増殖症(TAM)は、無治療経過観察のみで芽球は自然に消失し、予後良好であると考えられていたが、近年臓器障害のために早期死亡する症例が一部存在することが報告されており、サイトカインとの関連についても報告されている。TAMの症例の血清サイトカイン臨床像を解析することにより、TAMの中で予後良好群と予後不良群を見出すことを目的とした。今回の研究で、TAM126例の血清サイトカインを測定した。TAMにおいては、meconium aspiration syndrome(MAS)を伴う新生児と比較し、IL-1β, IL-2, IL-17をはじめとする多数のサイトカインが高値であり、多くのTAMの症例で高サイトカイン血症が存在していた。また、MASを伴わない新生児や正常小児と比較すると、測定したサイトカイン全般において高値であった。今後、臨床像との比較を行い、サイトカイン測定結果により予後良好群と予後不良群を見出すことについて検討を行う。

を用いて文書による同意を得た。

A. 研究目的

一過性骨髄異常増殖症(TAM)はダウン症候群の新生児期に一過性に白血病様芽球が末梢血中に増加する疾患である。これまでは、無治療経過観察のみで芽球は自然に消失し、予後良好であると考えられていたが、近年臓器障害のために早期死亡する症例が一部存在することが報告されており、サイトカインとの関連についても報告されている。一方、少量シタラビンによる化学療法の有効性も示されつつ有るが、どのような患者を対象とするべきか、未だ不明確である。TAMの症例の血清サイトカインと臨床像を解析することにより、TAMの中で予後良好群と予後不良群を見出すことを目的とする。

B. 研究方法

Bio-Plex™サスペンションアレイシステムを用い、2色の蛍光色素の比率を変えて染め分けた直径5.6μmのポリスチレン製ビーズを使用した。Bio-Plex™アッセイでは、ターゲットとなるタンパク質(サイトカイン)に特異的なモノクローナル抗体をビーズ表面に結合させた。この抗体結合ビーズとサンプル・二次抗体(検出抗体)をマイクロプレートのウェルの中で反応させ、サンドイッチELISAを行った。

異なった組み合わせの抗体結合ビーズを用意することで、1つのサンプルで多数の測定対象を検出した。測定した血清サイトカインは計27種類(IL-1β, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, basic FGF, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, IP-10, MCP-1 (MCAF), MIP-1α, MIP-1β, PDGF-BB, RANTES, TNF-α, VEGF)である。

(倫理面への配慮)

日本小児血液・がん学会の臨床研究審査委員会の承認の後、施設倫理委員会の承認を得て実施した。患者及び患者家族に対して治療開始時に統一した治療研究の説明文

C. 研究結果

表1 TAM126例のサイトカイン測定結果(単位pg/ml)

	median (range)	mean		median (range)	mean
IL-1β	2.69 (0.79-351.09)	17.98	IL-8	45.29 (8.81-8350.14)	260.21
IL-1ra	149.19 (8.85-9285.4)	313.44	IL-9	14.32 (0.7-448.67)	28.46
IL-2	13.29 (1.16-69.57)	15.16	IL-10	9.62 (1.41-260.55)	17.21
IL-4	3.82 (0.85-32.97)	4.40	IL-12	14.23 (0.46-223.57)	31.09
IL-5	5.56 (0.96-20.88)	6.70	IL-13	9.95 (1.01-199.2)	21.78
IL-6	36.01 (0.57-2656.06)	135.94	IL-15	31.05 (0.11-89.76)	28.90
IL-7	13.24 (0.97-613.25)	30.30	IL-17	111.93 (2.47-372.25)	135.43
	median (range)	mean		median (range)	mean
IFN-γ	131.94 (4.01-6328.43)	215.11	MIP-1β	266.66 (51.75-5176.85)	596.68
IP-10	1206.90 (70.84-18554.56)	2734.95	Eotaxin	149.99 (12.5-2265.32)	221.93
TNF-α	42.67 (5.69-1029.24)	67.49	RANTES	4798.17 (130.12-14839.9)	5139.40
GM-CSF	118.72 (10.93-560.98)	136.92	PDGF-bb	2877.44 (141.27-14480.06)	3982.28
G-CSF	48.90 (9.39-7232.39)	125.15	FGF-basic	53.88 (6.77-935.3)	66.73
MCP-1	203.01 (23.18-4051.1)	444.11	VEGF	75.68 (12.17-1974.52)	152.27
MIP-1α	6.83 (0.53-759.18)	25.96			

Bio-Plex™アッセイを用いて測定したサイトカインの結果を表1に示す。

表2 TAM126例とmeconium aspiration syndrome(MAS)の児のサイトカイン測定結果の比較

	TAM	TAM (n=126)	MAS* (n=11)	Non-MAS* (n=19)	Healthy Children (n=9)
IL-1β	↑	18.0 ± 9.5	3.8 ± 0.6	1.7 ± 0.6	0.7 ± 0.4
IL-2	↑	14.9 ± 2.6	0.1 ± 0.1	n.d.	9.1 ± 6.0
IL-4		4.4 ± 0.6	1.3 ± 0.4	0.3 ± 0.1	2.6 ± 1.5
IL-5		5.5 ± 0.9	1.1 ± 0.4	1.2 ± 0.2	1.3 ± 0.4
IL-6		133.8 ± 58.2	909.5 ± 268.1	213.4 ± 69.4	13.1 ± 7.2
IL-7		30.3 ± 11.4	3.3 ± 0.6	3.1 ± 0.4	10.1 ± 1.4
IL-8		260.2 ± 190.2	1462.4 ± 144.8	262.2 ± 144.8	7.1 ± 1.6
IL-10		17.2 ± 5.3	31.7 ± 7.8	11.5 ± 2.2	3.1 ± 0.8

	TAM	TAM (n=126)	MAS* (n=11)	Non-MAS* (n=19)	Healthy Children (n=9)
IL-12		30.0 ± 8.4	4.3 ± 2.7	2.1 ± 1.0	19.4 ± 11.4
IL-13	↑	21.6 ± 5.6	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1
IL-17	↑	135.4 ± 19.9	0.9 ± 0.5	0.1 ± 0.1	4.3 ± 4.3
G-CSF		125.2 ± 112.3	848.2 ± 331.7	96.0 ± 29.8	2.0 ± 1.2
GM-CSF	↑	136.9 ± 18.5	39.3 ± 7.7	12.9 ± 4.0	n.d.
IFN-γ	↑	215.1 ± 99.0	28.5 ± 9.8	2.8 ± 1.4	5.9 ± 3.7
MCP-1		444.1 ± 111.9	580.6 ± 185.0	369.0 ± 132.7	45.0 ± 6.2
MIP-1β	↑	1005.7 ± 816.8	556.7 ± 159.6	386.0 ± 37.7	160.8 ± 16.6
TNF-α	↑	61.9 ± 17.9	16.5 ± 4.8	3.9 ± 0.8	2.6 ± 1.1

今回測定したTAM126例のサイトカインとOkazakiらの報告(Pediatrics 2008, 121, e748-53)による新生児の血清サイトカインとの比較を表2に示す。MASは分娩時の胎便吸引により起こり、呼吸窮迫症候群を生じさせる化学性肺臓炎および気管支の機械的閉塞を引き起こしたりする。TAMにおいては、MASを伴う新生児と比較し、IL-1β, IL-2, IL-17をはじめとする多数のサイトカインが高値であり、多くのTAMの症例で高サイトカイン血症が存在していた。また、MASを伴わない新生児や正常小児と比較すると、測定したサイトカイン全般において高値であった。

D. 考察

免疫応答の基礎となっているのが、ヘルパーT(Th)1細胞とTh2細胞の拮抗作用と言われるTh1/Th2細胞バランスである(図1)。IFN-γなどのサイトカインを分泌するTh1細胞は感染防御とともにマクロファージを活性化し、自己免疫疾患の発症に関与している。IL-4、IL-5のサイトカインを分泌するTh2細胞はB細胞から抗体を作らせ、アレルギー疾患の発症に関与している。今回のサイトカインの解析結果から、TAMにおいてはTh1/Th2のどちらかだけが優位な病態ではなかった。IL-17高値などから考えると、TAMの病態においては、自己免疫疾患の病態形成に関連するTh17細胞など関与している可能性が示唆された。

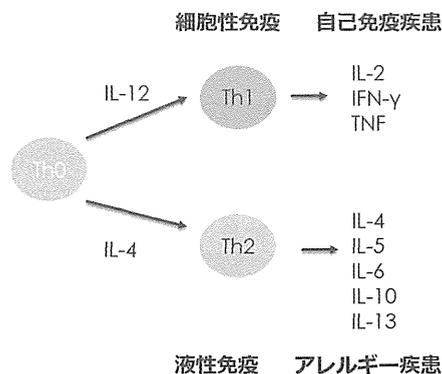


図1 Th1/Th2バランス

E. 結論

サイトカインを測定したことにより、TAMにおいては、多くの症例でサイトカインが高値であることが示された。今後、臨床像との比較を行い、サイト

カイン測定結果により予後良好群と予後不良群を見出すことについて検討を行う。

F. 健康危険情報

(委託業務成果報告(業務項目)には記入せずに、委託業務成果報告(総括)にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 朴 明子.【胎児・新生児の肝・胆道疾患】胆汁うっ滞 一過性骨髄異常増殖症(TAM)と肝障害. 周産期医学 44 巻 10 号 P1290-1292,2014.10,論文種類:解説
 2. Park MJ, Sotomatsu M, Ohki K, Arai K, Maruyama K, Kobayashi T, Nishi A, Sameshima K, Takagi T, Hayashi Y. Liver disease is frequently observed in Down syndrome patients with transient abnormal myelopoiesis. Int J Hematol. 99 : 154-61, 2014
 3. Seki M, Yoshida K, Shiraishi Y, Shimamura T, Sato Y, Nishimura R, Okuno Y, Chiba K, Tanaka H, Kato K, Kato M, Hanada R, Nomura Y, Park MJ, Ishida T, Oka A, Igarashi T, Miyano S, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J. Biallelic DICER1 mutations in sporadic pleuropulmonary blastoma. Cancer Res. 74 : 2742-9, 2014
 4. Shiba N, Funato M, Ohki K, Park MJ, Mizushima Y, Adachi S, Kobayashi M, Kinoshita A, Sotomatsu M, Arakawa H, Tawa A, Horibe K, Tsukimoto I, Hayashi Y. Mutations of the GATA2 and CEBPA genes in paediatric acute myeloid leukaemia. Br J Haematol. 164 : 142-5, 2014
 5. Shiba N, Ohki K, Park MJ, Sotomatsu M, Kudo K, Ito E, Sako M, Arakawa H, Hayashi Y. SETBP1 mutations in juvenile myelomonocytic leukaemia and myelodysplastic syndrome but not in paediatric acute myeloid leukaemia. Br J Haematol. 164 : 156-9, 2014
2. 学会発表
 1. 大木 健太郎, 鎌 裕一, 原 勇介, 佐野 仁志, 柴 徳生, 新井 心, 朴 明子, 外松 学, 林 泰秀. trisomy8 と MLL-AF9 を有する急性骨髄性白血病の clonal architecture の解析. 第 117 回日本小児科学会学術集会, 名古屋, 2014.4.11-13
 2. 佐野 仁志, 大木 健太郎, 朴 明子, 柴 徳生, 足立 壮一, 堀部 敬三, 多和 昭雄, 花田 良二, 月本 一郎, 林 泰秀. 小児AMLにおける G-CSF receptor(CSF3R)遺伝子異常の解析. 第117回日本小児科学会学術集会, 名古屋, 2014.4.11-13
 3. 原 勇介, 柴 徳生, 大木 健太郎, 朴 明子, 足立 壮一, 多賀 崇, 荒川 浩一, 多和 昭