

## II. 分担研究報告書

## Erdheim-Chester 病に関する調査研究

研究分担者 片山 一朗 （大阪大学大学院医学系研究科皮膚科・教授）  
研究協力者 村上 有香子 （大阪大学医学部附属病院皮膚科・医員）

研究要旨：Erdheim-Chester 病(ECD)は非ランゲルハンス細胞性組織球症の一種で、稀な疾患である。昨年同定した 71 例の ECD 症例のうち 38 例について二次調査が施行され、男女比、年齢中央値、症例ごとの発症及び診断時期、主病変と浸潤臓器、症状、病理所見、実際に行われている治療内容、その割合や反応性、5 年生存率、LCH 合併の有無、遺伝子変異の有無などの診療情報をまとめた。

### A. 研究目的

各科が協同的に ECD 症例を集積し、有病率や臨床症状、病変部位別の頻度、治療反応性等の基礎的なデータをまとめると同時に BRAF や NRAS 等の遺伝子変異の検索を行い、遺伝子診断の意義を明らかにする。得られた臨床データとも併せて重症度分類の確立や発症関連因子、予後関連因子、日本における BRAF 等の変異の頻度等を明らかにする。

### B. 研究方法

一次調査で回答のあった ECD 症例について、各部局の担当者にさらに詳細な臨床情報を尋ねて二次調査を行い、その内容について検討。また大阪大学皮膚科において加療中の患者については独自に遺伝子学的解析、組織学的解析も行った。

（倫理面への配慮）研究対象者に対してインフォームドコンセントを行い、書面による同意を得た。

### C. 研究結果

1 東京大学による調査結果（皮膚症状を有する者 2 2 名について。下記の患者を含む）

骨病変を合併する者が 18 名。合併しないものが 4 名。この 4 名のうち 3 名は中枢神経病変、循環器病変を合併していた。残りの 1 名は大腿皮膚及び皮下組織の深部に大腿動脈周囲まで及ぶ腫瘍の浸潤がみられたが、前述のような合併症は見られなかった。

2 大阪大学による調査結果（当院にて加療中の ECD 患者 1 名について）皮膚病変部の mRNA には BRAF、NRAS の変異は認められなかった(図 1)が、別の遺伝子の発現が増加していることが示唆された(図 2)。

図 1

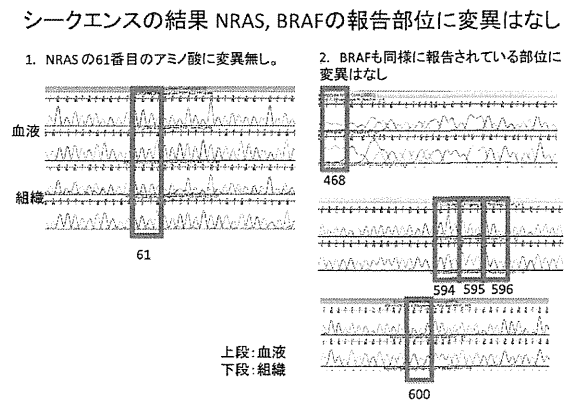
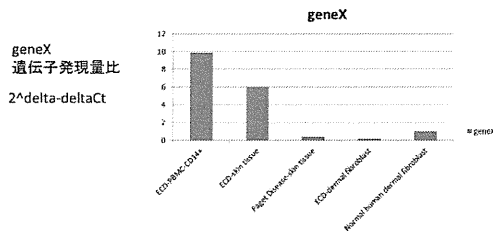


図2

ページェット病の病変部皮膚や、正常人のfibroblastと比較してECDのPBMC-CD14(+)細胞でgeneXの発現が増加していた。



末梢血のCD14(+)細胞の増加(図3)、末梢血BR AF遺伝子発現の増加もみられたが(図4)、病因との関連は不明である。また、電子顕微鏡にて皮膚病変部のマクロファージを解析したところ、動脈硬化症においてみられる細胞に類似した像がみられた(図5)。

図3

ECD患者のPBMCは単球が多かった。正常人では5~10%程度。

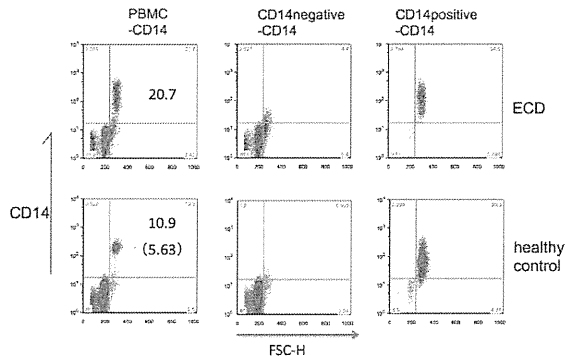
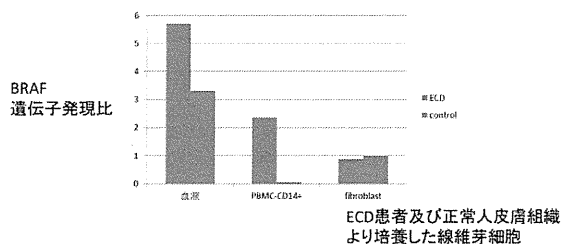


図4

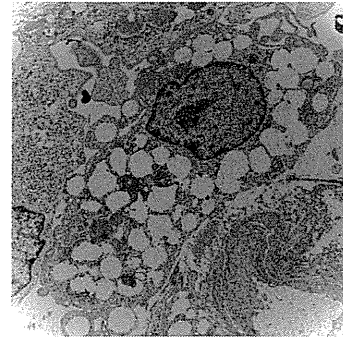
ECDの血液及びPBMC-CD14+細胞のmRNAにおいてBRA Fの発現量が増加していた。



ECD患者及び正常人皮膚組織より培養した線維芽細胞

図5

皮膚病変部の電顕おける所見は動脈硬化症における血管内皮周囲の所見と類似



#### D. 考察

海外での報告に比べ本邦では5年生存率も高く、骨病変も必発ではなかった。本邦では BRAF 変異はほとんどの症例で調べられていなかったが、今回7症例中3例で陽性となっているのでさらなる検索が有用と思われる。

また、大阪大学皮膚科の患者においては BRAF の変異はなかったが、末梢血における BRAF の発現量が増加していたことより、これらの検索の有用性も示唆された。

#### E. 結論

日本における ECD 症例、検体をさらに集積し、遺伝子解析数も増やすことが必要である。重症度や症状による、病変部、末梢血の遺伝子変異および発現量の違いを明らかにすることが治療や予後の予測につながると考えられる。

#### 論文発表:

●[Yang L](#), [Murota H](#), [Serada S](#), [Fujimoto M](#), [Kudo A](#), [Naka T](#), [Katayama I](#).

Histamine contributes to tissue remodeling via periostin expression. *J Invest Dermatol*. 2014 Aug;134(8):2105-13. doi: 10.1038/jid.2014.120. Epub 2014 Feb 27.

●[Tamiya H](#), [Terao M](#), [Takiuchi T](#), [Nakahara M](#), [Sasaki Y](#), [Katayama I](#), [Yoshikawa H](#), [Iwai K](#).

IFN- $\gamma$  or IFN- $\alpha$  ameliorates chronic proliferative dermatitis by inducing expression of linear ubiquitin chain assembly complex. J Immunol. 2014 Apr 15;192(8):3793-804. doi: 10.4049/jimmunol.1302308. Epub 2014 Mar 14.

●Murota H, Itoi S, Terao M, Matsui S, Kawai H, Satou Y, Suda K, Katayama I.

Topical cholesterol treatment ameliorates hapten-evoked cutaneous hypersensitivity by sustaining expression of 11 $\beta$ -HSD1 in epidermis. Exp Dermatol. 2014 Jan;23(1):68-70. doi: 10.1111/exd.12284.

●Koguchi-Yoshioka H, Wataya-Kaneda M, Yutani M, Nakano H, Sawamura D, Katayama I.

Partial anhidrosis demonstrated by Q-SART in a patient with a novel mutation in the EDARADD gene. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2015 Jul;29(7):1443-4. doi: 10.1111/jdv.12493. Epub 2014 Mar 25.

●Terao M, Tani M, Itoi S, Yoshimura T, Hamasaki T, Murota H, Katayama I 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1 specific inhibitor increased dermal collagen content and promotes fibroblast proliferation. PLoS One. 2014 Mar 25;9(3):e93051. doi: 10.1371/journal.pone.0093051. eCollection 2014.

●Igawa K, Kokubu C, Yusa K, Horie K, Yoshimura Y, Yamauchi K, Suemori H, Yokozeki H, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Umezawa A, Katayama I, Takeda J.

Removal of reprogramming transgenes improves the tissue reconstitution potential of keratinocytes generated from human induced pluripotent stem cells. stem Cells Transl Med.

2014 Sep;3(9):992-1001. doi: 10.5966/sctm.2013-0179. Epub 2014 Jul 14.

●Murakami Y, Wataya-Kaneda M, Tanaka M, Takahashi A, Tsujimura A, Inoue K, Nonomura N, Katayama I

Two Japanese cases of birt-hogg-dubé syndrome with pulmonary cysts, fibrofolliculomas, and renal cell carcinomas. ase Rep Dermatol. 2014 Feb 7;6(1):20-8. doi: 10.1159/000358216. eCollection 2014.

●Tagami-Nagata N, Serada S, Fujimoto M, Tanemura A, Nakatsuka R, Ohkawara T, Murota H, Kishimoto T, Katayama I, Naka T. Suppressor of cytokine signalling-1 induces significant preclinical antitumor effect in malignant melanoma cells. Exp Dermatol. 2015 Nov;24(11):864-71. doi: 10.1111/exd.12802. Epub 2015 Sep 3.

●村上香子, 片山一朗. 組織球症: 小児によく見られる皮膚疾患アトラス-鑑別と治療のポイント. 編者: 片山一朗, 横関博雄. 医薬ジャーナル社: 日本 2015. 158-159

学会発表: なし

書籍出版: なし

G. 知的所有権の取得状況

該当なし

## Erdheim-Chester 病の肺病変について

研究分担者： 小倉 高志（神奈川県立循環器呼吸器センター副院長兼呼吸器内科部長）  
馬場 智尚（同センター呼吸器内科医長）  
泉 信有（国立国際医療センター呼吸器内科）

### 研究要旨

Erdheim-Chester 病は、肺病変の合併は 20-50%に認められ、胸部 CT では小葉間隔壁の肥厚、小葉中心性の結節、スリガラス状濃度上昇、胸水を伴うと報告されている。今回の疫学的調査では集積した 40 例のうち肺病変の合併は 11 例であり、呼吸器症状を有した例は 8 例であった。胸部 CT では、小葉間隔壁の肥厚（6 例）、小葉中心性結節性陰影（2 例）、嚢胞形成（4 例）、胸膜肥厚（4 例）であった。Erdheim-Chester 病の CT 画像所見として、小葉間隔壁の肥厚は特徴的であり、リンパ路にそった病変の進展が考えられた。

### A. 研究目的

Erdheim-Chester 病の肺病変について、その臨床像と画像所見を明らかにする事。

### B. 研究方法

アンケートによる疫学的調査の解析から、Erdheim-Chester 病の肺病変についても検討する。  
（倫理面の配慮）人権擁護上、対象者に対する配慮が必要である。当研究では疫学研究に関する倫理指針、臨床研究に関する倫理指針を遵守する。臨床情報は施設の定める手続きに従い匿名化を行った上で扱う。以上の体制により、研究の安全性および倫理的妥当性が確保される。

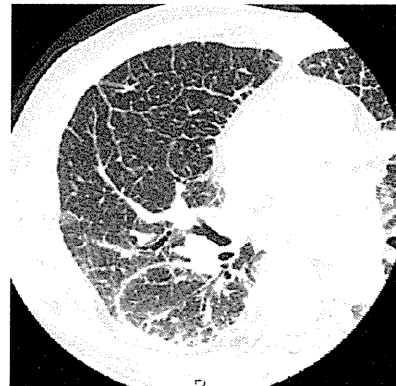
### C. 研究結果

今回の疫学的調査では解析した 38 例のうち肺病変の合併は 11 例であり、呼吸器症状を有した例は 8 例であった。

胸部 CT を検討できた 11 例では、小葉間隔壁の肥厚（6 例）、小葉中心性結節性陰影（2 例）、嚢胞形成（4 例）、胸膜肥厚（4 例）であった。

典型的画像と対応する病理像を示す。

図 1

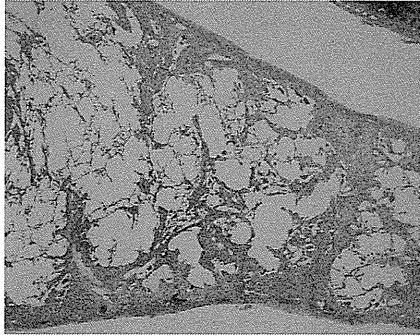


（患者 1）胸部 HR-CT 像。小葉間隔壁の肥厚が目立つ。

### D. 考察

今回の CT 画像については、アンケート調査からの記述の検討である。いままでの報告と同様に、小葉間隔壁の肥厚や胸膜肥厚などの広義間質の病変の頻度が高かった。そのため、リンパ路にそった病変の進展が考えられた。

図 2



患者 1 の肺組織像。胸膜・小葉間隔壁に沿った線維化・細胞浸潤

E. 結論

Erdheim-Chester 病の CT 画像所見として、小葉間隔壁の肥厚は特徴的であり、リンパ路にそった病変の進展が考えられた。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

「該当なし」

2. 実用新案登録

「該当なし」

3. その他

「該当なし」

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）  
分担研究報告書

課題名

Erdheim-Chester 病に関する調査研究  
(希少疾患領域の研究デザインに関する研究)

研究分担者：齋藤明子（独立行政法人国立病院機構 名古屋医療センター臨床研究センター  
一臨床試験研究部 臨床疫学研究室）

研究要旨

Erdheim-Chester disease (ECD)は、非ランゲルハンス細胞性組織球症の一型で、全身に浸潤した組織球により骨痛、腎不全、心不全、肺線維症、尿崩症、眼球突出など多彩な症状を呈する疾患で、6割の患者が32ヶ月以内に死亡するとの予後不良な疾患である。世界的に見ても数百例程度の希少疾患であり、標準的治療法も改善されていないなど不明な点が多く存在する。本研究に関し、平成26年度は科横断的にECD症例情報を集積し、有病率、臨床症状、病変部位別の頻度等の基礎的なデータをまとめ、本邦におけるECD診療の実態を把握した。平成27年度は更に二次調査を行い、得られた詳細なデータより発症関連因子や予後関連因子など探索的に検討した。今後、治療指針作成、ECD患者の診断及び治療の一助とすることが最終的な目標である。当研究室は、このような希少疾患による疾患の発生動向を確認する為の研究デザインの組み方、データ管理方法、統計解析手法などの方法論について担当した。

A. 研究目的

Erdheim-Chester disease (ECD)は、非ランゲルハンス細胞性組織球症の一型で、全身に浸潤した組織球により骨痛、腎不全、心不全、肺線維症、尿崩症、眼球突出など多彩な症状を呈する疾患で、6割の患者が32ヶ月以内に死亡するとの予後不良な疾患である。世界的に見ても数百例程度の希少疾患であり、標準的治療法も改善されていないなど不明な点が多く存在する。本研究に関し、平成26年度は科横断的にECD症例情報を集積し、有病率、臨床症状、病変部位別の頻度等の基礎的なデータをまとめ、平成27年度は協力が得られる施設より症例の二次調査にて詳細情報を取得し、本

邦におけるECD診療の実態を把握した。さらに、得られたデータより発症関連因子や予後関連因子などの解明を通じて重症度分類の確立、治療指針の作成を行い、ECD患者の診断及び治療の一助とすることが最終的な目標である。当研究室は、このような希少疾患による疾患の発生動向を確認する為の研究デザインの組み方、データ管理方法、統計解析手法などの方法論について担当した。

B. 研究方法

平成26年度は、希少疾患領域の特殊性を考慮し、ECD多施設共同後方視的調査研究計画書作成に統計デザインの視点から関与した。平成27年度は、

多施設共同後方視的調査研究として、診療科横断的に幅広く一次調査を行い、日本国内におけるECD症例の概数を把握した後、ECD症例が存在する施設に対し、詳細な臨床情報を得る目的で二次調査を行ったため、国内ECD症例として同定された71例中症例報告書が回収された38例の患者背景、家族歴、発症時期、診断時期、症状、浸潤臓器、合併症、血液検査所見、病理所見、これまでの治療内容と反応性、転帰等のデータを基に、予備解析を行った。得られた情報を基に、国内におけるECD症例の患者背景など疫学的情報や予後因子などを研究事務局と共に検討した。

(倫理面への配慮)

研究は施設倫理委員会の承認の下に人権擁護上の配慮をもって行う。症例は、参加施設毎に匿名化番号が付与され、連結可能匿名化された番号を研究用に用いる。対応表は施設内で管理される。研究結果発表においても、被験者は特定されない形で学会や学術雑誌に公表する。

### C. 研究結果

当研究室ではこれまで小児希少疾患のデータ管理の実務・研究の経験をもとに、希少疾患に対する疫学研究と臨床試験を融合させた研究体制の構築や、患者の長期追跡を実現するための枠組みを電子的データ収集システム(EDC)開発と共に構築してきた。これまでの経験を活かし、研究計画全体のデザインについて検討した。希少疾患としてのECDの有病率、実態把握、診療実態把握が必要であるため、当初の参加施設限定ではなく全国規模の調査とし、全容把握できる状態を確保すること、及び国内診療施設の網羅性の把握を行うデザインとした。また、患者氏名等の強固な個人識別情報の一部は調査に利用しないこととした。

平成27年度は、一次調査に引き続き二次調査を行った。一次調査実施数に対する回答は、52%(2005/3850)であった。このうち、71例のECDを同定し、二次調査結果が回収された38例の患者特性やアウトカムを分析した。

患者背景・疾患特性(表1)より男性に多く、診断時年齢中央値は54歳であった。全身症状、発熱、倦怠感、体重減少などの症状が確認された。約9割の症例で複数病変が確認され、最多は骨病変(84%)であった。中枢神経病変(53%)、循環器病変(44%)、内分泌病変(42%)がこれに続いた。

表1. 患者背景・疾患特性

患者背景/疾患特性	n	%
性別		
男	25	65.8
女	13	34.2
初発時年齢 中央値(範囲), 歳	51	(25-76)
診断時年齢 中央値(範囲), 歳	54	(28-78)
診断年		
1991-1999	5	13.2
2000-2009	16	42.1
2010-	17	44.7
初発から診断までの期間 中央値(範囲), 月	17	(1-89)
発症からの観察期間 中央値(範囲), 月	54	(3-253)
LCH既往	2	5.0
症状		
全身症状	22	57.9
発熱	14	36.8
倦怠感	16	42.1
体重減少	4	10.5
病変部位		
複数病変	34	89.5
骨病変	32	84.2
中枢神経病変	20	52.6
内分泌病変	16	42.1
循環器病変	17	44.7
呼吸器病変	11	29
腎・後腹膜病変	17	44.7
皮膚病変	16	42.1
消化器病変	6	15.8
主病変		
呼吸器	5	13.51
骨	10	27.03
循環器	4	10.81
心臓	1	2.7
腎後腹膜	2	5.41
腎臓	2	5.41
全身	1	2.7
中枢神経	7	18.92
内分泌	4	10.81
皮膚	1	2.7

表2. 治療内容

治療内容	n	%
IFN	10	26.3
ステロイド	22	57.9
放射線	5	13.2
保存的治療	30	79
支持療法(Bisphosphonate)	9	23.7
疼痛管理	7	18.4
その他	12	31.6

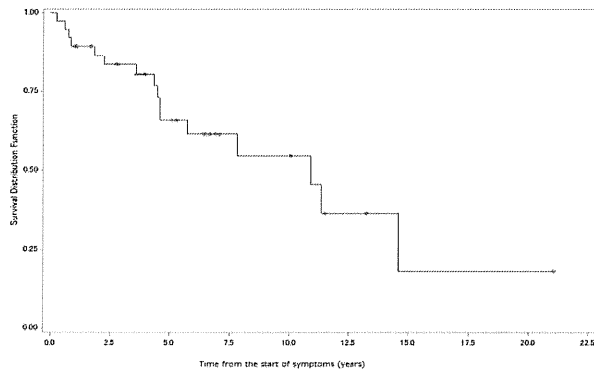
治療内容を表2に示す。8割近くの症例が保存的治療を受けていた。ステロイド投与は半数以上に



見られ、IFN 治療がこれに続いていた。

全 38 例の予後として、発症を起点とした生存時間解析結果 (図 1) を確認した所、生存時間中央値は 10.9 年であった。

図 1. 全生存時間



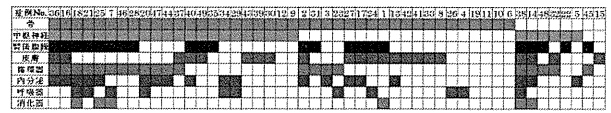
Time(year)	Survivor Function	Std.Error
1	0.8947	0.0498
2	0.8659	0.0559
3	0.837	0.0611
4	0.806	0.0662
5	0.6595	0.0856

生命予後に影響を及ぼす因子について、Cox 解析を用いて探索した結果 (単変量解析結果) を表 3 に示す。年齢が 60 歳以上の場合、ECD の浸潤臓器数が多い場合、骨病変が有る場合は、死亡リスクを高める可能性が示された。一方、体重減少、中枢神経病変、循環器病変、消化器病変については、この逆の所見が観察された。病変部位の重なりについては図 2 の通り様々であり、明らかなパターン化は認められなかった。

表 3. 予後因子解析

予後因子		Univariate analysis		
		ハザード	95%信頼区間	P値
性別	vs. 女性	0.823	0.259-2.616	0.7400
年齢	vs. 60歳未満	26.888	5.337-135.446	<0.0001
臓器浸潤数	+1	1.488	1.073-2.063	0.0173
体重減少	vs. 無	0.193	0.051-0.735	0.0159
骨病変	vs. 無	4.899	1.590-15.096	0.0057
中枢神経病変	vs. 無	0.04	0.005-0.325	0.0026
内分泌病変	vs. 無	0.712	0.264-1.921	0.5020
循環器病変	vs. 無	0.293	0.099-0.874	0.0276
呼吸器病変	vs. 無	0.657	0.233-1.852	0.4268
腎・後腹膜病変	vs. 無	0.692	0.259-1.853	0.4644
皮膚病変	vs. 無	1.184	0.414-3.387	0.7527
消化器病変	vs. 無	0.186	0.052-0.664	0.0096

図 2 病変部位の重なり



症例を蓄積し、因子間の関連性や交絡などの可能性について、検討する必要がある。

#### D. 考察

回収された ECD 症例 38 例について、予備解析を行った。男性が女性に比し約 2 倍多く、診断時年齢中央値は 54 歳であった。複数病変を有する症例が多く、中でも骨病変を多く認めた。Median survival は約 10 年であり、これまでの疫学データとほぼ同様であった。高齢者、ECD の浸潤臓器数、骨病変の存在などが生命予後に負の影響を及ぼす可能性が示された。

#### E. 結論

希少疾患 ECD を対象とした臨床試験の計画段階より参画し、適切な臨床研究デザインを企て、計画に沿って 38 例の ECD 症例の予備解析結果をまとめた。今後も引き続き希少疾患領域における研究の基盤整備に努める。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
該当なし
2. 学会発表  
該当なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

### III. 研究成果の刊行に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
村上有香子 片山一朗	組織球症. 幼少児によくみられる皮膚疾患アトラス-鑑別と治療のポイント	片山一朗 横関博雄	幼小児によくみられる皮膚疾患アトラス-鑑別と治療のポイント	医薬ジャーナル社	日本	2015	158-159

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamamoto H, Lu J, Oba S, Kawamata T, Yoshimi A, Kurosaki N, Yokoyama K, Matsushita H, Kurokawa M, Tojo A, Ando K, Morishita K, Katagiri K, Kotani A.	miR-133 regulates Evi1 expression in AML cells as a potential therapeutic target.	Sci Rep.	12	19204.	2016
Kitamura K, Nishiyama T, Ishiyama K, Miyawaki S, Miyazaki K, Suzuki K, Masaie H, Okada M, Ogawa H, Imai K, Kiyoi H, Naoe T, Yokoyama Y, Chiba S, Hata T, Miyazaki Y, Hatta Y, Takeuchi J, Nannya Y, Kurokawa M, Ueda Y, Koga D, Sugiyama H, Takaku F.	Clinical usefulness of WT1 mRNA expression in bone marrow detected by a new WT1 mRNA assay kit for monitoring acute myeloid leukemia: a comparison with expression of WT1 mRNA in peripheral blood.	Int J Hematol.	103	53-62	2016
Morita K, Nakamura F, Taoka K, Satoh Y, Iizuka H, Masuda A, Seo S, Nannya Y, Yatomi Y, Kurokawa M.	Incidentally-detected t(9;22)(q34;q11)/BCR-ABL1-positive clone developing into chronic phase chronic myeloid leukaemia after four years of dormancy.	Br J Haematol.	In press		2015

Wong WF, Kohu K, Nagashima T, Funayama R, Matsumoto M, Movahed E, Tan GM, Yeow TC, Looi CY, Kurokawa M, Osato M, Igarashi K, Nakayama K, Satake M.	The artificial loss of Runx1 reduces the expression of quiescence-associated transcription factors in CD4(+) T lymphocytes.	Mol Immunol.	68	223-233.	2015
Shibata S, Tada Y, Hau CS, Mitsui A, Kamata M, Asano Y, Sugaya M, Kadono T, Masamoto Y, Kurokawa M, Yamauchi T, Kubota N, Kadowaki T, Sato S.	Adiponectin regulates psoriasiform skin inflammation by suppressing IL-17 production from $\gamma\delta$ -T cells.	Nat Commun.	15	7687	2015
Arai S, Miyauchi M, Kurokawa M.	Modeling of hematologic malignancies by iPS technology.	Exp Hematol.	43	654-660	2015
Iizuka H, Kagoya Y, Kataoka K, Yoshimi A, Miyauchi M, Taoka K, Kumano K, Yamamoto T, Hotta A, Arai S, Kurokawa M.	Targeted gene correction of RUNX1 in induced pluripotent stem cells derived from familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy restores normal megakaryopoiesis.	Exp Hematol.	43	849-857	2015
Kobayashi H, Kobayashi CI, Nakamura-Ishizu A, Karigane D, Haeno H, Yamamoto KN, Sato T, Ohteki T, Hayakawa Y, Barber GN, Kurokawa M, Suda T, Takubo K.	Bacterial c-di-GMP affects hematopoietic stem/progenitors and their niches through STING.	Cell Rep.	11	71-84	2015
Hirokawa M, Sawada K, Fujishima N, Teramura M, Bessho M, Dan K, Tsurumi H, Nakao S, Urabe A, Fujisawa S, Yonemura Y, Kawano F, Oshimi K, Sugimoto K, Matsuda A, Karasawa M, Arai A, Komatsu N, Harigae H, Omine M, Ozawa K, Kurokawa M	PRCA Collaborative Study Group. Long-term outcome of patients with acquired chronic pure red cell aplasia (PRCA) following immunosuppressive therapy: a final report of the nationwide cohort study in 2004/2006 by the Japan PRCA collaborative study group.	Br J Haematol.	169	879-886	2015

Kagoya Y, Yoshimi A, Kataoka K, Nakagawa M, Kumano K, Arai S, Kobayashi H, Saito T, Iwakura Y, Kurokawa M.	NF- $\kappa$ B/TNF- $\alpha$ positive feedback loop with active proteasome machinery supports myeloid leukemia initiating cell capacity.	J Clin Invest.	124	528-542	2014
Yoshimi A, Toya T, Kawazu M, Ueno T, Tsukamoto A, Iizuka H, Nakagawa M, Nannya Y, Arai S, Harada H, Usuki K, Hayashi Y, Ito E, Kirito K, Nakajima H, Ichikawa M, Mano H, Kurokawa M.	Recurrent CDC25C mutations drive malignant transformation in FPD/AML.	Nat Commun.	5	4770	2014
Nishikawa S, Arai S, Masamoto Y, Kagoya Y, Toya T, Watanabe-Okochi N, Kurokawa M.	Thrombopoietin/MPL signaling confers growth and survival capacity to CD41-positive cells in a mouse model of Evi1 leukemia.	Blood	124	3587-3596	2014
Kagoya Y, Yoshimi A, Tsuruta-Kishino T, Arai S, Satoh T, Akira S, Kurokawa M.	JAK2V617F-positive myeloproliferative neoplasm clones evoke paracrine DNA damage to adjacent normal cells through secretion of lipocalin-2.	Blood	124	2996-3006	2014
Sato T, Goyama S, Kataoka K, Nasu R, Tsuruta-Kishino T, Kagoya Y, Nukina A, Kumagai K, Kubota N, Nakagawa M, Arai S, Yoshimi A, Honda H, Kadowaki T, Kurokawa M.	Evi1 defines leukemia-initiating capacity and tyrosine kinase inhibitor resistance in chronic myeloid leukemia.	Oncogene	33	5028-5038	2014
Shinohara A, Imai Y, Nakagawa M, Takahashi T, Ichikawa M, and Kurokawa M.	Intracellular reactive oxygen species mark and influence the megakaryocyte-erythrocyte progenitor fate of common myeloid progenitors.	Stem Cells.	32	548-557	2014
Ueda K, Yoshimi A, Kagoya Y, Nishikawa S, Marquez VE, Nakagawa M, Kurokawa M.	Inhibition of histone methyltransferase EZH2 depletes leukemia stem cell of mixed lineage leukemia fusion	Cancer Sci.	105	512-519	2014

	leukemia through upregulation of p16.				
Hosoi M, Kumano K, Taoka K, Arai S, Kataoka K, Ueda K, Kamikubo Y, Takayama N, Otsu M, Eto K, Nakauchi H, Kurokawa M.	Generation of induced pluripotent stem cells derived from primary and secondary myelofibrosis patient samples.	Exp Hematol.	42	816-825	2014
Kagoya Y, Nannya Y, Nakamura F, Kurokawa M.	Gene expression profiles of central nervous system lymphoma predict poor survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma.	Br J Haematol.	166	794-7	2014
Nukina A, Kagoya Y, Watanabe-Okochi N, Arai S, Ueda K, Yoshimi A, Nannya Y, Kurokawa M.	Single-cell gene expression analysis reveals clonal architecture of blast-phase chronic myeloid leukaemia.	Br J Haematol.	165(3)	414-416	2014
Harms MJ, Ishibashi J, Wang W, Lim HW, Goyama S, Sato T, Kurokawa M, Won KJ, and Seale P.	Prdm16 is required for the maintenance of brown adipocyte identity and function in adult mice.	Cell Metabolism	19	593-604	2014
Kobayashi CI, Takubo K, Kobayashi H, Nakamura- Ishizu A, Honda H, Kataoka K, Kumano K, Akiyama H, Sudo T, Kurokawa M, and Suda T.	The IL-2/CD25 axis maintains distinct subsets of chronic myeloid leukemia-initiating cells.	Blood	123	2540-2549	2014
Tanaka M, Suzuki HI, Shibahara J, Kunita A, Isagawa T, Yoshimi A, Kurokawa M, Miyazono K, Aburatani H, Ishikawa S, Fukayama M.	EVI1 oncogene promotes KRAS pathway through suppression of microRNA-96 in pancreatic carcinogenesis.	Oncogene	33	2454-2463	2014
Little JL, Serzhanova V, Izumchenko E, Egleston BL, Parise E, Klein-Szanto AJ, Loudon G, Shubina M, Seo S, Kurokawa M, Ochs MF, and Golemis EA.	A requirement for Nedd9 in luminal progenitor cells prior to mammary tumorigenesis in MMTV-HER2/ErbB2 mice.	Oncogene	33	411-420	2014

Riccomagno MM, Sun LO, Brady CM, Alexandropoulos K, Seo S, Kurokawa M, and Kolodkin AL.	Cas adaptor proteins organize the retinal ganglion cell layer downstream of integrin signaling.	Neuron	81	779-786	2014
Tsurusawa M, Mori T, Kikuchi A, Mitsui T, Sunami S, Kobayashi R, Takimoto T, Saito A, Watanabe T, Fujimoto J, Nakazawa A, Ohshima K, Horibe K; for the lymphoma committee of the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group.	Improved treatment results of children with B-cell non-Hodgkin lymphoma: A report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group B-NHL03 study.	Pediatr Blood Cancer.	61(7)	1215-21.	2014
Tsurusawa M, Goshō M, Mori T, Mitsui T, Sunami S, Kobayashi R, Fukano R, Tanaka F, Fujita N, Inada H, Koh K, Takimoto T, Saito A, Fujimoto J, Nakazawa A, Horibe K; for the lymphoma committee of the Japanese Pediatric Leukemia/lymphoma Study Group.	Statistical analysis of relation between plasma methotrexate concentration and toxicity in high-dose methotrexate therapy of childhood nonHodgkin lymphoma.	Pediatr Blood Cancer.			2014
Koh K, Tomizawa D, Saito AM, Watanabe T, Miyamura T, Hirayama M, Takahashi Y, Ogawa A, Kato K, Sugita K, Sato T, Deguchi T, Hayashi Y, Takita J, Takeshita Y, Tsurusawa M, Horibe K, Mizutani S, Ishii E.	Early use of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for infants with MLL gene-rearrangement-positive acute lymphoblastic leukemia.	Leukemia.	29(2)	290-6	2015
Manabe A, Kawasaki H, Shimada H, Kato I, Kodama Y, Sato A, Matsumoto K, Kato K, Yabe H, Kudo K, Kato M, Saito T, Saito AM, Tsurusawa M, Horibe K.	Imatinib use immediately before stem cell transplantation in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: Results from Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG) Study Ph+	Cancer Med.			2015

	ALL04.				
--	--------	--	--	--	--



IV. 研究成果の刊行物・別刷  
(主なもの)

## Incidentally-detected t(9;22)(q34;q11)/BCR-ABL1- positive clone developing into chronic phase chronic myeloid leukaemia after four years of dormancy

The World Health Organization (WHO) Classification (4th Edition) assigns chronic myeloid leukaemia (CML) to the myeloproliferative neoplasms, which are defined as clonal disorders with proliferation of one or more of the myeloid lineages. CML is characterized by t(9;22)(q34;q11) translocation and resultant *BCR-ABL1* fusion gene found in all myeloid lineages as well as lymphoid cells and endothelial cells. We herein describe a case of incidentally-detected t(9;22)(q34;q11)/*BCR-ABL1*-positive clones developing into CML after a dormancy period. Our case highlights the significance of distinction between subclinical and definite CML.

A 64-year-old woman was referred to us for systemic evaluation of refractory primary intraocular lymphoma (PIOL). She had received topical therapy with intravitreal methotrexate injections for the preceding 4 months. Imaging studies did not find any intracranial or distant lesions. The bone marrow (BM) was unremarkable without lymphoma infiltration (Fig 1A). Of note, routine G-banded karyotyping identified t(9;22)(q34;q11) in five of 20 metaphase cells analysed (Fig 1B). We considered the possibility of CML; however, the BM was normocellular without increase in neutrophils or neutrophil precursors. The myeloid:erythroid ratio was within a normal range and no fibrosis was detected. Thus, the BM lacked morphological features of CML. The patient did not complain of fatigue or weight loss and there was no evidence of splenomegaly. Laboratory findings were unremarkable, including white blood cell (WBC) count of  $5.6 \times 10^9/l$  with normal differential, haemoglobin level 126 g/l, and platelet count  $274 \times 10^9/l$ . Reverse transcription-nested polymerase chain reaction (RT-nested PCR) assay of peripheral blood (PB) detected e14/a2 (b3/a2) *BCR-ABL1* mRNA. Real-time PCR using the LightCycler® system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) revealed *BCR-ABL1* level (normalized to *RNA18S1*) of  $4.00 \times 10^{-5}$ . Regular fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis for t(9;22)(q34;q11)/*BCR-ABL1* using LSI-BCR/ABL dual colour ES probe (Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA) did not detect *BCR-ABL1* fusion signals either in BM mononuclear cells or in PB neutrophils. We then performed metaphase FISH analysis on BM, which revealed fusion signals in 13 (33%) of 40 metaphases scored. Thus, the discrepancy between the findings of G-banding and interphase FISH analysis was explained by the growth difference between the t(9;22)(q34;q11)/*BCR-*

*ABL1*-positive cells and normal haematopoietic precursors in the *ex vivo* culture system. Despite positive cytogenetic and molecular findings, lack of myeloid lineage proliferation hampered the diagnosis of CML. Thus, systemic treatment for PIOL, comprising chemoimmunotherapy and whole brain radiotherapy was prioritized according to the protocol at our institution (Taoka *et al*, 2012). *BCR-ABL1* mRNA was negative upon completion of the treatment (Fig 2). We employed a watchful waiting strategy for the t(9;22)(q34;q11)/*BCR-ABL1*-positive clones by monitoring *BCR-ABL1* level using real-time PCR as previously described (Emig *et al*, 1999). RT-nested PCR for *BCR-ABL1* mRNA became positive in six months and the *BCR-ABL1* level gradually increased during the following three years. FISH analyses for t(9;22)(q34;q11) in PB neutrophils were repeatedly negative. *BCR-ABL1* level eventually reached  $2.78 \times 10^{-1}$ , which was almost comparable to the mean level ( $5.87 \times 10^{-1}$ ) of 30 newly diagnosed CML patients at our institution (Nannya *et al*, 2008). Laboratory results showed a slightly increased WBC count of  $9.8 \times 10^9/l$  with mild basophilia. The patient remained asymptomatic and without splenomegaly. A follow-up BM analysis showed a hypercellular marrow with proliferation of myeloid lineage cells (Fig 1C). G-banded karyotyping identified t(9;22)(q34;q11) in 17 of 20 metaphases, and FISH analysis of BM aspirate detected *BCR-ABL1* fusion signals in 82% of interphase cells scored. The fusion signals were also present in 94% of PB neutrophils and 20% of PB mononuclear cells (Fig 1D). These findings confirmed the diagnosis of chronic phase CML, and treatment was initiated with dasatinib. After three months, G-banding and FISH analyses of BM indicated a normal karyotype, and real-time PCR analysis showed a 3.5-log decrease in PB *BCR-ABL1* level.

Incidentally-detected t(9;22)/*BCR-ABL1*-positive clones failing to meet the criteria for CML may be considered as subclinical CML, which can progress to definitive CML after a dormant period. Subclinical CML can be morphologically distinguished from definitive CML in that it lacks proliferation of myeloid lineages. Subclinical CML is therefore not classified as CML or even as a myeloproliferative neoplasm according to the WHO classification. In our case, previous intravitreal methotrexate injection therapy was probably irrelevant to the pathogenesis of subclinical CML, considering its

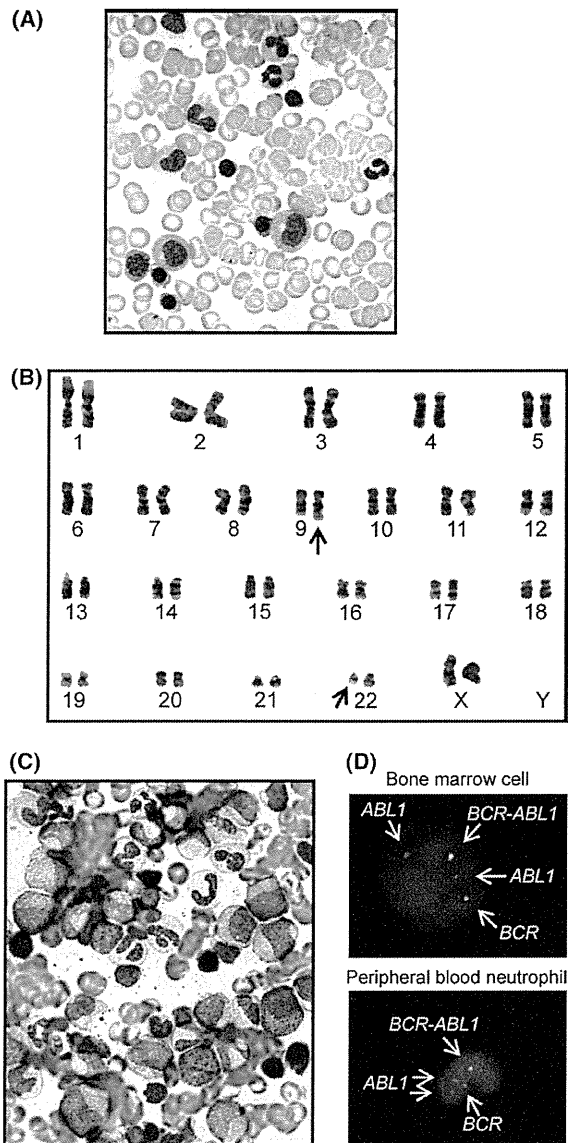


Fig 1. Bone marrow morphology and cytogenetic findings at initial detection of the t(9;22)(q34;q11) translocation and upon progression to definite chronic myeloid leukaemia. (A) Bone marrow analysis at initial detection showed a normocellular marrow without infiltration of lymphoma cells. There were no morphological features of CML. (B) G-banding of bone marrow aspirate at initial detection unexpectedly showed the t(9;22)(q34;q11) translocation (arrows). (C) Bone marrow analysis upon progression to definite CML revealed a markedly hypercellular marrow with proliferation of myeloid lineage cells. (D) FISH analysis upon progression to definite CML detected *BCR-ABL1* fusion signals in a bone marrow mononuclear cell (upper panel) and a peripheral blood neutrophil (lower panel). We used the LSI-*BCR/ABL* dual colour ES probe, which produces green *BCR* signals and red *ABL1* signals. Note that the *ABL1* probe covers the breakpoint, yielding an extra *ABL1* signal.

topical nature and an extremely short latency. On the other hand, systemic treatment for PIOL, particularly radiotherapy, may have contributed to the transition from subclinical to

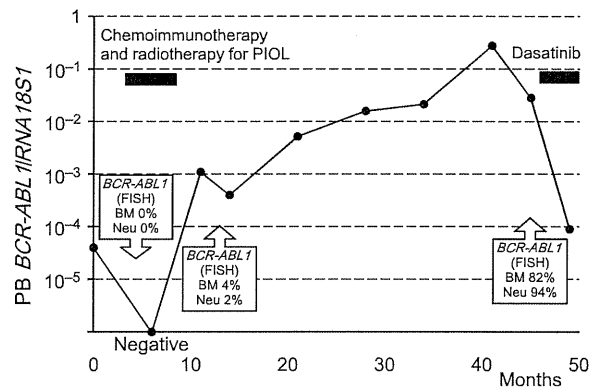


Fig 2. Clinical course of our patient with an incidentally detected t(9;22)/*BCR-ABL1*-positive clone. *BCR-ABL1* mRNA expression in peripheral blood was monitored following the initial detection of a cytogenetic abnormality. *BCR-ABL1* fusion transcripts were quantified by real-time PCR using LightCycler® system (Roche Diagnostics). Levels of *BCR-ABL1* mRNA were normalized to those of *RNA18S1*, which served as an internal control. PIOL, primary intraocular lymphoma; FISH, fluorescence *in situ* hybridization; BM, bone marrow; Neu, neutrophils.

definite CML; exposure to ionizing radiations is a well-known cause of CML (Bizzozero *et al*, 1966).

Coexistence of subclinical CML and another haematological disease is a rare but recurrent event. Two such cases have been reported thus far. One case was a 74-year-old man with monoclonal gammopathy (Shani & Malik, 2009), and the other was a 60-year-old man with multiple myeloma after autologous haematopoietic stem cell transplant (Roper *et al*, 2010). In both cases, G-banded karyotyping and FISH analysis unexpectedly detected t(9;22)(q34;q11)/*BCR-ABL1*-positive clones, whilst proliferation of the myeloid lineages was absent. Treatment with imatinib for subclinical CML was commenced immediately and eight weeks after the initial t(9;22)(q34;q11) detection, respectively.

A treatment strategy for subclinical CML has not been established. There is no evidence to demonstrate the advantage of early intervention over watchful waiting, especially considering the possible adverse effects associated with tyrosine kinase inhibitors (Gunnarsson *et al*, 2015). No data are available regarding spontaneous regression or long-term treatment outcomes of subclinical CML due to the rarity of such condition. However, the excellent efficacy of tyrosine kinase inhibitors for definite chronic phase CML confers a relatively low risk to watchful waiting strategy. Comprehensively, we decided to adopt watchful waiting strategy in our case.

*BCR-ABL1* mRNA is detected in a substantial portion of healthy individuals. A study using the semi-nested PCR technique revealed that *BCR-ABL1* (p210) transcript was positive in 30% of healthy adults and 5% of healthy children (Birnbaum *et al*, 1995). The mere positivity of *BCR-ABL1* mRNA without cytogenetic abnormalities is not therefore clinically

significant when we consider the prevalence of CML. Nevertheless, our case teaches us that the *BCR-ABL1*-positive population may also have a propensity to develop definite CML after radiotherapy and/or chemoimmunotherapy.

## Acknowledgments

The authors appreciate Ms. Yoko Hokama for performing sequencing analysis.

## Author contributions

KM and FN designed the study. FN, YS, KT, AM, SS and HI provided important clinical data. KM, FN and MK wrote the paper. AM, YN, YY and KM critically revised the manuscript. MK supervised the entire work. All authors approved the final manuscript.

## Conflict of interest

This is not a sponsored study, but we declare the potential conflict of interest with the pharmaceutical companies that deal with the drugs described in this study. KM was temporarily employed as Scientific Summer Intern by PRO Unlimited onsite working at Novartis Institutes for BioMedical Research; FN received speaking fee from Novartis Pharma Japan Inc.; KT, YS, HI, AM and YY report no conflict of interest; SS received speaking fee from Bristol-Myers Squibb

Company; YN received grant from Pfizer Japan Inc., speaking fee from Novartis Pharma Japan Inc and Bristol-Myers Squibb Company, and served as a member of advisory board of Bristol-Myers Squibb; MK received grant from Pfizer Japan Inc., grant and speaking fee from Novartis Pharma Japan Inc and Bristol-Myers Squibb Company. MK also reports that he was a member of the technical advisory board of Novartis Pharma Japan Inc and Bristol-Myers Squibb.

Kiyomi Morita<sup>1</sup>  
 Fumihiko Nakamura<sup>1</sup>  
 Kazuki Taoka<sup>1</sup>  
 Yumiko Satoh<sup>2</sup>  
 Hiromitsu Iizuka<sup>1</sup>  
 Akiko Masuda<sup>2</sup>  
 Sachiko Seo<sup>1</sup>  
 Yasuhito Nannya<sup>1</sup>  
 Yutaka Yatomi<sup>2</sup>  
 Mineo Kurokawa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Haematology and Oncology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, and <sup>2</sup>Department of Clinical Laboratory Medicine, The University of Tokyo Hospital, Tokyo, Japan  
 E-mail: kurokawa-ky@umin.ac.jp

**Keywords:** *BCR-ABL1*, chemoimmunotherapy, chronic myeloid leukaemia, radiotherapy, subclinical

## References

- Biernaux, C., Loos, M., Sels, A., Huez, G. & Stryckmans, P. (1995) Detection of major bcr-abl gene expression at a very low level in blood cells of some healthy individuals. *Blood*, **86**, 3118–3122.
- Bizzozero, O.J., Johnson, K.G. & Ciocco, A. (1966) Radiation-related leukemia in Hiroshima and Nagasaki, 1946–1964. I. Distribution, incidence and appearance time. *New England Journal of Medicine*, **274**, 1095–1101.
- Emig, M., Saussele, S., Wittor, H., Weisser, A., Reiter, A., Willer, A., Berger, U., Hehlmann, R., Cross, N.C. & Hochhaus, A. (1999) Accurate and rapid analysis of residual disease in patients with CML using specific fluorescent hybridization probes for real time quantitative RT-PCR. *Leukemia*, **13**, 1825–1832.
- Gunnarsson, N., Stenke, L., Höglund, M., Sandin, F., Björkholm, M., Dreimane, A., Lambe, M., Markeväm, B., Olsson-Strömberg, U., Richter, J., Wadenvik, H., Wallvik, J. & Sjölander, A. (2015) Second malignancies following treatment of chronic myeloid leukaemia in the tyrosine kinase inhibitor era. *British Journal of Haematology*, **169**, 683–688.
- Nannya, Y., Yokota, H., Sato, Y., Yamamoto, G., Asai, T., Ichikawa, M., Watanabe, T., Kumano, K., Hangaishi, A., Takahashi, T., Chiba, S., Yatomi, Y. & Kurokawa, M. (2008) Molecular and cytogenetic response of chronic myelogenous leukemia treated with imatinib mesylate: one institutional experience in Japan. *International Journal of Hematology*, **88**, 159–164.
- Roper, N., DeAngelo, D.J., Kuo, F., Dal Cin, P., Ghobrial, I. & Aster, J.C. (2010) An asymptomatic 61-year-old man with BCR-ABL-positive bone marrow following autologous transplantation for multiple myeloma. *American Journal of Hematology*, **85**, 944–946.
- Shani, D. & Malik, A. (2009) Incidental diagnosis of CML in a patient with anemia and IgG lambda monoclonal protein in blood. *Annals of Hematology*, **88**, 1041.
- Taoka, K., Yamamoto, G., Kaburaki, T., Takahashi, T., Araie, M. & Kurokawa, M. (2012) Treatment of primary intraocular lymphoma with rituximab, high dose methotrexate, procarbazine, and vincristine chemotherapy, reduced whole-brain radiotherapy, and local ocular therapy. *British Journal of Haematology*, **157**, 252–254.