

先天性骨髄不全症の診断基準・重症度分類・診療ガイドラインの確立に関する研究

先天性好中球減少症のガイドライン

研究分担者 小林 正夫（広島大学大学院医歯薬保健学研究院小児科学）

研究要旨：先天性好中球減少症（congenital neutropenia, CN）は末梢血好中球絶対数（absolute neutrophil count, ANC）が $200/\mu\text{l}$ 未満の重症慢性好中球減少、骨髄像で前骨髄球、骨髄球での成熟障害、生後早期から反復する細菌感染症を臨床的特徴とする遺伝性疾患である。2015年のInternational Union of Immunological Societies Expert Committeeが提案した先天性好中球減少症の分類から17の疾患が分類されている。本疾患群は慢性好中球減少症を共通所見とするが、病因、病態、臨床症状は多様であり、それぞれの疾患で特徴ある臨床所見があるので、合併する臨床症状を考慮する必要がある。1990年代にgranulocyte colony-stimulating factor（G-CSF）が治療に使用されるようになり、感染症による生命予後は劇的に改善したが、国際先天性好中球減少症の登録事業（severe chronic neutropenia international registry, SCNIR）からは長期間のG-CSF使用により骨髄異形成症候群/急性骨髄性白血病（myelodysplastic syndromes/acute myeloid leukemia, MDS/AML）に進展する症例の増加が報告されている。従って、感染症対策としてのG-CSFの使用は有用ではあるが、MDS/AMLへの進展を考慮したフォローが必要となる。唯一の根治療法は造血幹細胞移植であるが、その適応、移植時期、移植方法等に一定したものはない。

A．疾患概念と疫学

先天性好中球減少症（congenital neutropenia, CN）は末梢血好中球絶対数（absolute neutrophil count, ANC）が $200/\mu\text{l}$ 未満の重症慢性好中球減少、骨髄像で前骨髄球、骨髄球での成熟障害、生後早期から反復する細菌感染症を臨床的特徴とする。CNのタイプによっては特徴的な合併所見があるので、それぞれに特有な合併症状は診断の参考となる。末梢血液検査では好中球減少、特に末梢血でのANCが $200/\mu\text{l}$ 以下が持続し、単球増加、好酸球増加が認められることが多い。ただし、周期性好中球減少症の場合には3週間隔で好中球減少（ANCが $150/\mu\text{l}$ 以下）と単球増加が相反してみられるので、両者の鑑別は必要である。骨髄像では多くが骨髄顆粒球系細胞は正形成から低形成であり、前骨髄球あるいは骨髄球での成熟障害が認められる。明らかな形態異

常はみられない。赤芽球系、巨核球系には異常を認めない。最終的な確定診断には責任遺伝子の変異の同定が必要である。

発症頻度の確定的な数字はないが、本邦例の集積から100万人に1-2人の発生頻度と推測される。本邦では現在までに80例近い患者数が集積されている。遺伝子解析が施行されている症例の集計から、*ELANE* 変異（SCN1）と *HAX1* 変異（SCN3）に限定されていたが、最近G6PC3欠損症（SCN4）の本邦第一例目が報告された。常染色体性優性遺伝形式をとるSCN1（*ELANE* 遺伝子のヘテロ接合性変異）が最も頻度が高く、75～80%を占めている。HAX1異常によるSCN3はKostmann病と呼ばれ、全例が *HAX1* 遺伝子のホモ接合性変異か複合ヘテロ接合性変異で、常染色体性劣性遺伝形式をとる。その頻度は約15%である。その他のCNの頻度は明ら

かではないが、非常に稀と思われる。

B．病因と病態

重症先天性好中球減少症の 5 型について病因・病態を概説する。

1) SCN1：好中球エラスターゼ変異

好中球エラスターゼ (NE) はセリンプロテアーゼに分類される 30kD の糖蛋白であり、成熟骨髄顆粒球系細胞で最も強く発現している。合成された活性型 NE は主に一次顆粒 (アズール顆粒) に存在するが、細胞膜や核にも存在が知られている。*ELANE* 変異が好中球減少を引き起こす機序について種々の説が挙げられているが、その病態の詳細は明らかでない。

SCN1 における NE の mislocalization 説では、NE が顆粒内へと輸送される際に、変異 NE と adaptor protein complex 3 (AP3) との結合障害により、NE の細胞内輸送異常が起こり、集積した NE が骨髄顆粒球系前駆細胞でアポトーシスを誘導し、骨髄顆粒球系細胞の成熟障害に結びついている可能性を示している。

異常 NE 蛋白が細胞内に蓄積することによるフォールディング病としての概念が提唱されている。小胞体ストレスのマーカーである BiP mRNA 発現が wild type に比し 2~6 倍であったこと、実際に患者骨髄系細胞でも高値が認められたことを示し、NE の細胞内局在の異常と併せてフォールディング病の可能性を示唆している。実際に小胞体ストレスセンサーとして機能する *EIF2AK3* 変異により発症する Wolcott-Raillon 症候群において、多くの患者が好中球減少を合併することが報告されている。しかし、必ずしも BiP mRNA の発現上昇は有意ではないことが示されており、フォールディング病としての結論は不明である。

SCN 患者では C/EBP- α の発現を制御する LEF-1 mRNA 発現の低下がみられることが報告され、LEF1 の発現低下は SCN の本態と考えられる病因の下流に共通した異常と考えられている。また、SCN において G-CSF 受容体下流の転写因子である STAT5 活性が亢進し、LEF-1 のユビキチン化に関与していることが示された。プロテアソームインヒビターである Bortezomib が LEF-1 mRNA レベルを

回復し、顆粒球分化を促したと報告されている。さらに別の報告で NE のインヒビターである secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) が骨髄細胞の増殖、分化、細胞周期を制御していることが示され、患者の骨髄細胞や血漿中における SLPI の低下が報告された²⁴⁾。また NE 自体が増殖抑制物質として作用し、好中球産生の制御を行っているとの報告もあり、*ELANE* 異常症の病態形成には様々な要因が関与している可能性がある。

2) SCN2：GF1 欠損症

2003 年に *GFI1* ヘテロ接合性変異 (DNA 結合に関与する zinc finger 部位) が同定され、好中球減少、単球増多、CD4 リンパ球の減少、ナイーブ T、B 細胞の減少が認められた。G-CSF に対する反応性の低下や、好中球、単球の両方の性質を有する異常細胞の出現も認められた。T、B 細胞に関しては数と活性の低下は認められるもの、機能は正常と推察されている。Cell line を用いた *in vitro* の検討では変異型は野生型に対し *GFI1* の抑制活性を dominant negative に抑制した。*ELANE* 遺伝子のプロモーター領域に *GFI1* の結合部位が同定されたことから *ELANE* 遺伝子発現が *GFI1* により抑制されることがレポーターアッセイで証明された。*GFI1* 変異は *ELANE* 遺伝子の過剰発現を誘導し、産生された過剰な NE が細胞内に蓄積する結果、細胞死が誘導されることが示されている。

3) SCN3：HAX1 異常症 (Kostmann 病)

hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1 (HCLS1)-associated protein X-1 (HAX1) は、細胞内のシグナル伝達に関与する分子として 1997 年に見出されたが、その後多くの細胞内蛋白質やウイルス蛋白質と相互作用し、細胞骨格形成やアポトーシスにも関与することが明らかにされている。スプライシングサイトの違いにより、2 種類のアイソフォーム (アイソフォーム a, b) が存在する。スプライシングによりアイソフォーム b はエクソン 2 が短い構造となる。興味深いことに HAX1 異常症では後述するように、この 2 種類のアイソフォームの存在形式の違いにより臨床病型が異なる。HAX1 の欠失は骨髄前駆細胞内にチトクロム C を放出し、前駆細

胞ならびに好中球でのアポトーシスを亢進させ、好中球減少が惹起される。また、転写因子である LEF1 とその下流遺伝子群の発現低下が認められていることから、HAX1 の欠失が、HCLS1 のリン酸化を抑制し LEF1 の発現を低下させることにより、G-CSF を介した骨髄造血の抑制も示唆されている。

現在までに 17 種類の HAX1 遺伝子変異が報告されているが、HAX1 異常症のうち、アイソフォーム a のみに影響する変異が認められる症例とアイソフォーム a と b の両方に影響する変異が認められる症例がおよそ半数ずつである。アイソフォーム a のみに影響する変異を有する群では神経症状はほとんど認められないのに対し、a と b 両方に影響する変異を有する群では 68% に中等度以上の精神発達遅滞、てんかんが認められている。

4) SCN4 : G6PC3 欠損症

グルコース-6-ホスファターゼ (Glucose-6-Phosphatase; G6Pase) の 1 つである Glucose-6-Phosphatase protein 3 (G6PC3) (または Glucose-6-Phosphatase-β; G6Pase-β) の変異により発症する常染色体劣性遺伝性疾患である。

G6Pase は小胞体内の酵素で、グルコース-6-リン酸からリン酸を除去してグルコースを遊離する。ヒトでは G6Pase は *G6PC1*, *G6PC2*, *G6PC3* からなる遺伝子ファミリーによりコードされている。*G6PC1* の両アレル変異は糖原病 Ia 型を発症するが、グルコース-6-リン酸を細胞質から小胞体内に輸送するグルコース-6-リン酸トランスロカーゼ (glucose-6-phosphatase translocase; G6PT) をコードする *SLC37A4* (*G6PT1*) 変異では糖原病 Ib 型を引き起こす。ヒトでは *G6PC3* 遺伝子のホモ接合または複合ヘテロ接合の変異により G6PC3 欠損症を発症する。また、糖原病 Ib 型でも G6PC3 欠損症と同様に好中球数の減少と機能低下を伴うことが知られている。

G6PC3 欠損症患者における好中球数減少・機能低下の機序としては、前骨髄球中の小胞体分子シャペロンの増加により小胞体ストレス反応が生じて RRNA-dependent protein kinase-like ER kinase pathway が活性化することや、加えて細胞内グルコースの濃度低下により Glycogen synthase kinase

3B が活性化することにより、好中球アポトーシスが亢進する。その結果、骨髄で前骨髄球、骨髄球での成熟障害が生じ、好中球減少が生じる。また、機能低下について不明な点もあるが、グルコース-6-リン酸の蓄積により、UDP-ガラクトースの生成が抑制される結果、nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase の構成要素である gp91^{phox} のグリコシル化が阻害され、呼吸バーストが消失し殺菌能の低下を生じることが想定される。

5) SCN5 : VPS45 欠損症

VPS45 欠損症は、好中球減少、好中球機能異常、原発性骨髄線維症、腎腫大を特徴とする。エンドソーム系を介した膜輸送を制御するタンパクである VPS45 をコードする遺伝子の変異が原因であり、VPS45 タンパクの発現が低下に基づき細胞運動能の低下、アポトーシスの増加が引き起こされる。これらが好中球機能低下や好中球減少の原因と考えられているが、病態の詳細は不明である。

C . 合併症と重症度

CN の分類において特徴的な合併所見を呈するものがある。感染症を反復、重症化と MDS/AML への移行は SCN 全体に共通した臨床所見と経過である。SCN3、いわゆる Kostmann 病ではてんかんをはじめとした中枢神経系 (精神運動発達遅滞、高次脳機能障害など) の合併症の頻度が高く、変異の部位によっては必発の症状であることが報告されている。SCN4 は先天性心疾患、泌尿生殖器奇形、内耳性難聴、体幹・四肢の静脈拡張が高率に認められる。SCN5 では腎肥大と骨髄線維化が認められることから、好中球減少に特徴的な合併症から SCN の分類を推測することが可能である。重症度は ANC の程度とは関係なく感染症の頻度とその重症度による。G-CSF の使用の有無にかかわらず MDS/AML への移行・進展症例は最重症であり、造血幹細胞移植以外に治療法はない。口内炎、慢性歯肉炎 / 慢性歯周病はほぼ必発の所見であり、無治療の患者では歯牙の喪失につながる可能性があることから、QOL 低下の要因となる。

D . 治療

感染症対策としての対症療法と根治療法に分けて治療法を考える必要がある。

1) 対症療法

感染症対策が重要であり、Sulfamethoxazole-trimethoprim (ST) 合剤の定期的投与、必要であれば抗真菌薬投与、歯科医による口腔ケアが必要である。G-CSF 投与で約 90%の患者では好中球増加が認められるので、感染症のコントロールが可能である。ただし、長期間の G-CSF 投与、特に高用量 (8 μ g/kg 以上) の場合に MDS/AML への進展が高率に認められるので経時的な注意が必要である。SCN での G-CSF 使用に基づいた白血病発症の機序の詳細が明らかにされつつある。G-CSF の長期投与で後天的な CSF3R の切断変異が入るが、そのまま長期間 SCN のままで経過する症例と、一部に第 2 の変異が認められる症例に分けられる。後者が AML に移行していくが、第 2 の変異としては *CSF3R*-T618I が共通して認められ、G-CSF に依存しない骨髄系細胞の自己増殖が認められるようになる。最終的には *RUNX1*、*ASXL1* などの更なる遺伝子変異を認める AML の発症に至ることが推測されている。従って、G-CSF の長期投与を行う症例では定期的な骨髄検査、染色体検査、上記の内容の遺伝子検査を行っていくことが望ましい。ただし、どの時点で根治療法である造血細胞移植を行うか確定したものはない。

2) 根治療法

根治療法は造血幹細胞移植である。適切なドナーがいる場合には骨髄非破壊的前処置での移植が推奨されるが、生着不全には注意が必要である。MDS/AML へ移行後は造血幹細胞移植が唯一の治療法であるが、予後は不良となる。

E . 予後

重症感染症の程度ならびに MDS/AML への移行が予後を左右する。G-CSF の投与で感染症(敗血症)での生命予後は格段に進歩している。G-CSF の投与期間が 10 年以上になる症例で投与量を 8 μ g/kg 未満と以上に区分すると、前者での重症敗血症による死亡頻度は 4%、MDS/AML の発症頻度は 11%とされている。一方、後者の場合には重症敗血症による死

亡頻度は 14%、MDS/AML の発症頻度は 40%になることが報告されている。SCN 症例が MDS/AML に移行した場合には化学療法を行うと、好中球の回復はほとんど認められないことから、造血細胞移植の継続が必要となるので、ドナー選択を用意しながらの治療開始が必要である。造血細胞移植が唯一の救命できる治療法となる。

慢性好中球減少のために歯肉炎、歯周病、口内炎は必発の症状であるため、永久歯の維持が困難となる。歯肉が弱いためインプラントも不可能であり、成人期早期から総義歯となる場合があり、QOL はかなり損なわれることとなる。現在、根治療法として造血細胞移植が選択される症例が増えているが、移植時期を小児期と成人に分けた成績の比較では有意に前者が良好である。

F . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kagawa R, Fujiki R, Tsumura M, Sakata S, Nishimura S, Itan Y, Kong XF, Kato Z, Ohnishi H, Hirata O, Saito S, Ikeda M, Baghdadi JE, Bousfiha A, Fujiwara K, Oleastro M, Yancoski J, Perez L, Danielian S, Aillal F, Takada H, Hara T, Boisson-Dupuis S, Bustamante J, Casanova JL, Ohara O, Okada S, Kobayashi M. Alanine scanning mutagenesis of human STAT1 to estimate loss- or gain-of-function variants. **Journal of Allergy & Clinical Immunology** 2016 Dec 14. pii: S0091-6749(16)31281-7. doi: 10.1016/j.jaci.2016.09.035. [Epub ahead of print]
- 2) Hoshino A, Okada S, Yoshida K, Nishida N, Okuno Y, Ueno H, Yamashita M, Okano T, Tsumura M, Nishimura S, Sakata S, Kobayashi M, Nakamura H, Kamizono J, Mitsui-Sekinaka K, Ichimura T, Ohga S, Nakazawa Y, Takagi M, Imai K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Kojima S, Nonoyama S, Morio T, Kanegane H. Abnormal hematopoiesis and autoimmunity in humans with germline IKZF1 mutations.

- Journal of Allergy & Clinical Immunology** 2016 Dec 1. pii: S0091-6749(16)31273-8. doi: 10.1016/j.jaci.2016.09.029. [Epub ahead of print]
- 3) Lévy R, Okada S, Béziat V, Moriya K, Liu C, Chai LY, Migaud M, Hauck F, Al Ali A, Cyrus C, Vatte C, Patiroglu T, Unal E, Ferneiny M, Hyakuna N, Nepesov S, Oleastro M, Ikinçiogullari A, Dogu F, Asano T, Ohara O, Yun L, Della Mina E, Bronnimann D, Itan Y, Gothe F, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Tahuil N, Aytekin C, Salhi A, Al Muhsen S, Kobayashi M, Toubiana J, Abel L, Li X, Camcioglu Y, Celmeli F, Klein C, AlKhater SA, Casanova JL, Puel A. Genetic immune and clinical features of patients with bacterial and fungal infections due to inherited IL-17RA deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 113: E8277-8285, 3016.
 - 4) Tsujita Y, Mitsui-Sekinaka K, Imai K, Yeh TW, Mitsuiki N, Asano T, Ohnishi H, Kato Z, Sekinaka Y, Zaha K, Kato T, Okano T, Takashima T, Kobayashi K, Kimura M, Kunitsu T, Maruo Y, Kanegane H, Takagi M, Yoshida K, Okuno Y, Muramatsu H, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Kojima S, Ogawa S, Ohara O, Okada S, Kobayashi M, Morio T, Nonoyama S. Phosphatase and tensin homolog (PTEN) mutation can cause activated phosphatidylinositol 3-kinase syndrome-like immunodeficiency. ***Journal of Allergy & Clinical Immunology*** 2016 Dec;138(6):1672-1680.e10. doi: 10.1016/j.jaci.2016.03.055. [Epub ahead of print]
 - 5) Vijayan D, Mohd Redzwan N, Avery DT, Wirasinha RC, Brink R, Walters G, Adelstein S, Kobayashi M, Gray P, Elliott M, Wong M, King C, Vinuesa CG, Ghilardi N, Ma CS, Tangye SG, Batten M. IL-27 directly enhances germinal center B cell activity and potentiates lupus sanroque mice. ***Journal of Immunology*** 2016;197:3008-3017.
 - 6) Ma CS, Wong N, Rao G, Okada S, Kobayashi M, Casanova JL, Tangye SG, et al. Unique and shared signaling pathways cooperate to regulate the differentiation of human CD4+T cells into distinct effector subsets. ***Journal of Experimental Medicine*** 2016;213:1589-608.
 - 7) Toubiana J, Okada S, Hiller J, Oleastro M, Lagos Gomez M, Aldave Becerra JC, Ouachée-Chardin M, Fouyssac F, Girisha KM, Etzioni A, Van Montfrans J, Camcioglu Y, Kerns LA, Belohradsky B, Blanche S, Bousfiha A, Rodriguez-Gallego C, Meyts I, Kisand K, Reichenbach J, Renner ED, Rosenzweig S, Grimbacher B, van de Veerdonk FL, Traidl-Hoffmann C, Picard C, Marodi L, Morio T, Kobayashi M, Lilic D, Milner JD, Holland S, Casanova JL, Puel A. Heterozygous STAT1 gain-of-function mutations underlie and unexpectedly broad clinical phenotype. ***Blood*** 2016;127:3154-64.
 - 8) Hayakawa S, Okada S, Tsumura M, Imai K, Morio T, Ohara O, Chayama K, Kobayashi M. Predisposition to gastric cancer in a patient with autosomal dominant immune dysregulation syndrome associated with CTLA-4 haploinsufficiency. ***Journal of Clinical Immunology*** 2016;36:28-32.
 - 9) Yasumura J, Wago M, Okada S, Nishikomori R, Takei S, Kobayashi M. A 2-year old Japanese girl with TNF receptor-associated periodic syndrome: A case report of the youngest diagnosed proband in Japan. ***Mod Rheumatol.*** 2016;26:798-801.
 - 10) Yamasaki F, Takayasu T, Nosaka R, Kawaguchi H, Sugiyama K, Kobayashi M, Kurisu K. Cavernous angioma after chemotherapy for desmoplastic/nodular medulloblastoma associated with anhidrotic ectodermal dysplasia. ***Child Nerv Syst.***

2016;32:395-8.

2. 学会発表

- 1) Okada S, Kagawa R, Fujiki R, Kato Z, Ohnishi H, Boisson-Dupuis S, Bustamante J, Casanova JL, Ohara O, Kobayashi M. Loss-of-function and dominant negative STAT1 coiled-coil domain mutations in MSMD. **Congress of Asia Pacific Society for Immunodeficiencies**(2016 年 4 月 30 日 大阪).
- 2) Mizoguchi Y, Karakawa S, Doi T, Shimomura M, Tomioka K, Sakata S, Furue A, Chijimatsu I, Okada S, Miki M, Kawaguchi H, Kobayashi M. Successful hematopoietic stem cell transplantation in ten patients with severe congenital neutropenia using an intensive immunomyelosuppressive conditioning regimen: The results of a single institute. **The 21st Congress of European Hematology Association** (2016 年 6 月 12 日 , コペンハーゲン・デンマーク) .
- 3) Okada S, Fujiki R, Kagawa R, Tsumura M, Kong X, Sakata S, Nishimura S, Kato Z, Ohnishi H, Itan Y, Boisson-Dupuis S, Bustamante J, Casanova JL, Ohara O, Kobayashi M. Alanine-scanning mutagenesis of human STAT1 to estimate the loss-or gain-of-function nature of variants. **The 17th Biennial Meeting of the European Society for immunodeficiencies** (2016 年 9 月 22 日 , バルセロナ・スペイン).
- 4) Asano T, Tsumura M, Okada S, Kobayashi M. Flow cytometry based simple diagnosis of activated PI3K δ syndrome by evaluating pAKT in circulating B cells. **The 17th Biennial Meeting of the European Society for immunodeficiencies** (2016 年 9 月 22 日 , バルセロナ・スペイン).
- 5) Mizoguchi Y, Miki M, Furue A, Nishimura S, Shimomura M, Tomioka K, Sakata S, Chijimatsu I, Karakawa S, Okada S, Doi T, Nakamura K, Kawaguchi H, Kobayashi M.

Successful Hematopoietic Stem Cell Transplantation Using an Immunosuppressive Conditioning Regimen in Ten Patients with Severe Congenital Neutropenia. A Single-Institute Experience. **The 58th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition** (2016 年 12 月 3-6 日 , サンディエゴ).

G . 知的財産権の出願・登録状況

特になし