

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2012

課題番号：20591262

研究課題名（和文） 先天性骨髄不全症候群の診断と造血細胞移植の開発

研究課題名（英文） Diagnosis and stem cell transplantation for inherited bone marrow failure syndrome

研究代表者

矢部 みはる（YABE MIHARU）

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：40172514

研究成果の概要（和文）：2013年3月までに213例の骨髄不全症の解析を行い、うちFanconi貧血（FA）95例を染色体分析および遺伝子検査で診断した。他の先天性骨髄不全症は41例で、Diamond-Blackfan貧血5例、先天性角化不全症3例、33例は分類不能型であった。造血細胞移植はFAで89例、他のCBMFSでは27（他）に行われ、ともにフルダラビンを前処置に含む前処置で良好な成績が期待された。

研究成果の概要（英文）：Before March 2013, we studied 213 patients with bone marrow failure, and 95 were diagnosed as Fanconi anemia (FA) by chromosome instability and/or genetic subtypes. There were 41 congenital bone marrow failure syndrome (CBMFS) excluded FA and five had Diamond-Blackfan anemia. Three had dyskeratosis congenital and other 31 were unclassifiable CBMFS. Eighty-nine FA patients and 27 patients with CBMFS received stem cell transplantation. Significant advances have been made in the use of fludarabine-based conditioning regimen for both patients with FA and CBMFS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	800,000	240,000	1040,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3600,000	1080,000	4680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：先天性骨髄不全、造血細胞移植、Fanconi貧血、遺伝子診断、発癌、妊孕能

1. 研究開始当初の背景

(1) 先天性骨髄不全症候群 (Congenital bone marrow failure syndrome: CBMFS) は造血細胞の分化増殖が先天性に障害され、血球減少をきたす疾患の総称である。多様であり、身体異常を伴い、骨髄異形成症候群 (MDS) や白血病に移行することが多く、診断および治療管理が困難な稀少疾患である。代表的なFanconi

貧血 (FA)、Dyskeratosis congenita (DC)、Diamond-Blackfan貧血 (DBA) などの責任遺伝子が次々と同定されてはいるが、CBMFSのうち25%は分類不能であり、日本国内での実態を明らかにすることが重要である。

(2) FAは染色体不安定性を特徴とする常染色体劣性のCBMFSであり、頻度も高い。FAは骨髄

不全からMDSや骨髄性白血病(AML)への進行を伴いやすく、固形がんの発症率も高い。造血不全の治療法として造血細胞移植があげられる。日本におけるFAの疫学を解析し、臨床症状との関連についてデータを集積すると同時に、骨髄におけるMDS/AML発症に関与する異常の解析を行い、より効果の高い移植前処置について検討を行うことが必要である。

(3) FAと診断されなかった非FA群の中のCBMFSの診断を確実にし、造血細胞移植を中心とした治療法の開発が期待される。

2. 研究の目的

診断の確立、MDS 化の予測と造血細胞移植の開発を目的とする。

(1) 臨床症状の解析・諸外国との比較

骨髄不全の重症度、MDS/AMLの移行に関与するrisk factorを拾い上げる。皮膚、低身長や骨格奇形などの外表奇形だけではなく、腎心、消化管などの内臓奇形、免疫機能や内分泌異常、知能、発達の評価も行う。

(2) 細胞表現型

低濃度のマイトマイシンC (MMC)やディエポキシブタン(DEB)などのDNA架橋剤や、移植前処置に使用するシクロフォスファミド(CY)、フルダラビン (Flu)、シタラビン(AR-C)に加えて、ブスルファン(Bu)のリンパ球染色体脆弱試験を行うことにより、低線量の放射線を使用しない前処置法の開発が可能か検討を行う。

(3) 細胞学的評価

MDSの形態異常を発症する前に、染色体のクローナルな異常や胎児ヘモグロビン(HbF)の高値をとること多い。経時的に骨髄染色体の詳細な分析を行うことにより、MDSを予測する。

(4) 遺伝子型

FANCAをはじめ8個のFA蛋白が核内複合体を形成し、これに依存してモノユビキチン化を受け、活性型となったFANCD2がBRCA1, BRCA2と協同してDNAの相同組換え修復や細胞周期チェックポイントを制御する。FANCD2のモノユビキチン化の解析と各種抗体(FA-A, C, G)等を用いてFAの診断と遺伝子型を特定し、臨床症状や骨髄不全の重症度、MDS化との関係について検討を加える。FAが否定された非FA群のCBMFSの遺伝子検索については各研究施設と密に連絡をとり検索を行う。

3. 研究の方法

(1) FA 遺伝子診断

末梢血リンパ球へのDNA架橋剤添加による染

色体脆弱検査、FANCD2モノユビキチン化の障害等を基本としてFA遺伝子相補群の同定を行う。新規FA患者に関しては各種サンプル(末梢血リンパ球、骨髄および皮膚線維芽細胞、骨髄細胞)につき試料保存を行う。

(2) Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)の導入を行い、FANCAの変異検出をリンパ球および皮膚・骨髄線維芽細胞にて確認する。

(3) 理学所見と臨床データの蓄積、解析によりMDS/AMLの診断とrisk factorを検討する。

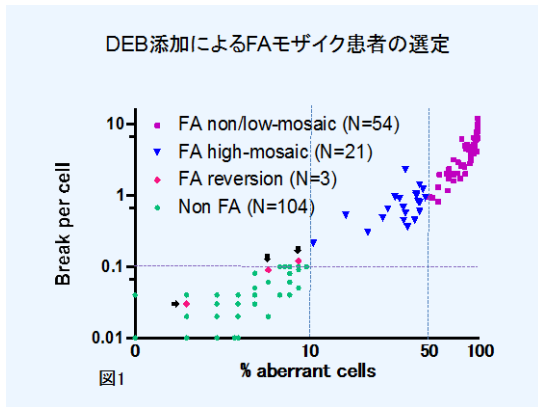
(4) FAに対する造血細胞移植

DNA架橋剤添加による末梢リンパ球の染色体脆弱検査にて体細胞モザイクレベルを欧米諸国のFA患者と比較を試みる。その上でHLA一致同胞間造血細胞移植における生着と移植後キメリズム、移植関連毒性等につき、放射線治療を含む前処置と放射線治療を除いたフルダラビンレジメンで比較検討を行う。

4. 研究成果

(1) 2013年3月までに213例の骨髄不全症の解析を行い、うちFanconi貧血(FA)95例を染色体分析および遺伝子検査で診断した。先天性骨髄不全症は41例で、Diamond Blackfan貧血5例、先天性角化不全症3例、33例は分類不能型であった。

一部のFA患者においては、DNA架橋剤への感受性が正常化し、全く断裂が認められないリンパ球の混在する体細胞モザイク状態がみられた。正常なリンパ球が50%以上を占める高度の体細胞モザイクの頻度は、本邦では28%に認め、欧米諸国の10%に比べて約3倍であった。これは、遺伝子の変異配列の野生型配列への復帰や、代償性変異により蛋白機能が回復した造血細胞クローンが増加した「リバージョン・モザイク(reversion mosaicism)」で説明され、3例にリバージョン・モザイクが証明された。



(2) FA 遺伝子のゲノムシーケンスにより、新たに 24 例の FANCA と 7 例の FANCG 遺伝子の変異を同定した。FANCA 同定に際しては、Multiplex Ligation-dependent Probe (MLPA) 法の導入により解析 FA 症例 42 検体中 16 例 (38.1%) で陽性を認めた。これはダイレクトシーケンス法で FANCA と判明した 27 例中 16 例 (59.3%) で MLPA 法により少なくとも片アレルが検出され、FANCA と診断可能であった。

(3) 皮膚・骨髄の線維芽細胞培養は FA や DC の 16 症例で行われ、資源バンクで保存を行った。2 例では骨髄線維芽細胞でリバージョン・モザイク型の FA を診断した。

(4) FA の臨床像は多様で種々の身体異常を伴うが、全く異常がみられない症例もある。FA Research Fund の調査では身体異常が全くない症例は 25% を占めたが、紹介を含む FA 患者 103 例では 7% と少なかった。消化管や先天性心疾患の合併奇形は諸外国より多い傾向にあった。FA 以外の骨髄不全症でも同様の身体異常を示す症例が約 30-40% にみられ FA との鑑別が困難であった。

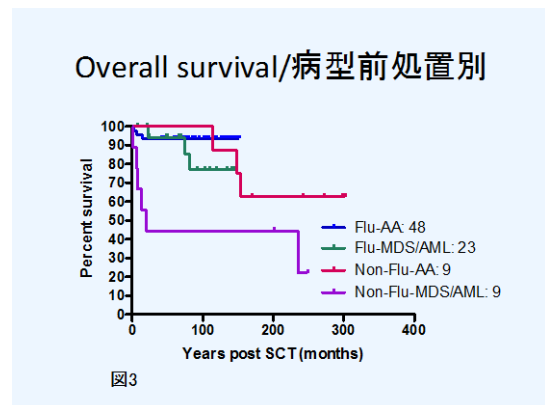
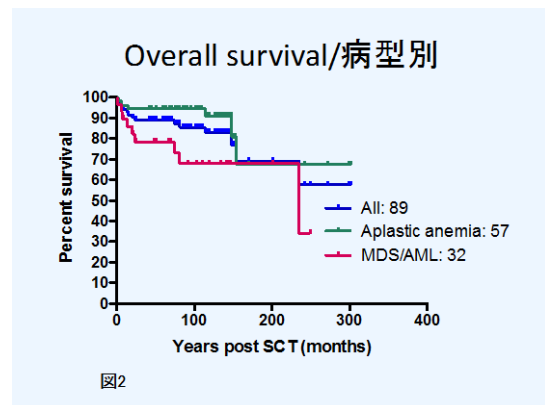
小児・青年期発症の再生不良性貧血(AA)や骨髄異形成症候群(MDS)などの骨髄不全症における急性骨髄性白血病(AML)や固形腫瘍の発症について検討し FA が 103 例、FA 以外の CBMFS が 41 例を対象とした。FA 群の 103 例中 32 例が MDS を発症し、うち 10 例が AML へ進行した。多施設で 89 例が造血細胞移植(HSCT)をうけ、4 例の MDS/AML 例を含む 9 例が移植後に固形腫瘍を発症した。CBMFS 群の 41 例中 13 例が MDS を発症し、2 例が AML へ進行した。全国多施設で 27 例に HSCT が施行され、MDS 症例の 1 例が移植後に固形腫瘍を

発症した。

また、101 例の FA の骨髄染色体分析が行われ、33 例に異常が認められ、30 例が MDS/AML であった。1、3、7 番染色体と複合型の異常が多く、3q 異常を伴う症例では 7 番染色体や複合型異常と合併する傾向にあり、refractory anemia with excess of blasts (RAEB)/AML への移行例が多くみられた。臨床症状や染色体断裂の重症度からは MDS/AML への移行の予測は困難であった。

(5) FA に対する造血細胞移植の検討

高レベルのモザイク患者では造血細胞移植時に使用するアルキル化剤や放射線に正常の感受性を示すリンパ球が多く存在するため生着不全の可能性が高くなると考えられている。HLA 一致同胞間移植を行った 15 症例を検討し、2000 年以降の 7 例の移植では Flu を基本とした一律の非照射レジメンで安定したキメラが得られることが示唆された。



2013 年までに多施設で施行された FA 患者の造血細胞移植 89 症例に対する病型・前処置別の成績を図に示した。移植後 10 年全生存率は 83% であり、2000 年から Fludarabine を前処置に用いることで拒絶や GVHD の頻度が減少し、MDS や AML に移行した症例や非血

縁者間移植においても同胞間移植と同等の成績が得られようになった。

FAとDiamond-Blackfan貧血を除いた染色体脆弱を伴わない8例のCBMFSと先天性角化不全症の3例にFludarabineを用いた代替ドナーからの造血細胞移植を行い検討した。前処置毒性は軽度で、造血能の回復は速やかで、全例に生着が得られ、安定型キメラを維持している。また、急性および慢性GVHDともに著明な重症化はなく、合併症も治療可能であり、全例が生存しており、後天性の再不貧移植と同じ前処置やGVHD予防で十分対応が可能であった。

FAの発症頻度、臨床症状や遺伝子変異は民族により特徴があると予測され、日本人におけるデータの集積が必要である。本研究ではFAの日本における疫学の基盤になると推測される。FAではリンパ球にリバージョン・モザイクを起し、遺伝子変異が末梢血では同定不可能な症例もあり、骨髓細胞や皮膚・骨髓線維芽細胞を含む解析を行うことにより、診断精度の向上が期待できる。FAの臨床像の把握、染色体脆弱性試験、遺伝子解析、治療、さらに生体試料の採取と保存まで一連の作業を同一施設内で行うことができ、解析も効率よく行われた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

① Yabe M, Shimizu T, Morimoto T, Koike T, Takakura H, Tsukamoto H, Muroi K, Oshima K, Asami K, Takata M, Yamashita T, Kato S and Yabe H. Matched sibling donor stem cell transplantation for Fanconi anemia patients with T-cell somatic mosaicism. *Pediatric Transplant*. 査読有 16: 2012: 340-345.

② Maekawa K, Yoshimitu M, Fujiwara H, Matsushita K, Kawada H, Hamada H, Suzuki S, Uozumi K, Ohtsuka M, Hanada S, Yabe M, Yabe H and Arima N. Successful allo-HSCT with a minimal myeloablative conditioning regimen in an adult patient with Fanconi's anemia. *Bone Marrow Transplantation*, 査読有 47: 2012: 159-160

③ Koike T, Yanagimachi N, Ishiguro H, Yabe H, Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Takakura H and Kato S. High incidence of radiation-induced cavernous hemangioma in long-term survivors who underwent hematopoietic stem cell

transplantation with radiation therapy during childhood or adolescence. *Biol Blood Marrow Transplant* 査読有 18: 2012: 1119-1127

④ Hyodo H, Ishiguro H, Tomita Y, Takakura h, Koike T, Shimizu T, Morimoto T, Yabe H, Yabe M, Kojima SI, Shiraishi k, Minemura T and Kato S. Decreased serum testosterone levels in long-term adult survivors with fatty liver after childhood stem cell transplant. *Biol Blood Marrow Transplant*. 査読有 18: 2012: 1090-1098

⑤ Tomita Y, Ishiguro H, Yasuda Y, Hyodo H, Koike T, Shimizu T, Morimoto T, Hattori K, Matsumoto M, Inoue H, Yabe H, Yabe M, Shinohara O, Minemura T and Kato S. High incidence of fatty liver and insulin resistance in long-term adult survivors of childhood SCT. *Bone Marrow Transplantation* 査読有 46: 2011: 416-425

⑥ M Yabe, T Shimizu, T Morimoto, T Koike, H Takakura, E Suganuma, N Sugiyama, S Kato and H Yabe. Alternative donor marrow transplantation in children with aplastic anemia using low-dose irradiation and fludarabine-based conditioning. *Bone Marrow Transplantation*. 査読有 46: 2011:1023-1025

⑦ Yabe H, Yabe M, Koike T, Shimizu T, Morimoto T and Kato S. Rapid improvement of life-threatening capillary leak syndrome after stem cell transplantation by bevacizumab. *Blood*. 査読有 115: 2010: :2723-272

⑧ Nabhan SK, Bitencourt M, Duval M, Abecasis M, Dufour C, Boudjedir K, Rocha V, Socie' G, Passweg J, Goi K, Sanders J, Snowden J, Yabe H, Pasquini R, Gluckman E. Fertility recovery and pregnancy after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in Fanconi anemia patients. *Haematologica* 査読有 95: 2010 : 1783-1787

⑨ Yabe H, Koike T, Shimizu T, Ishiguro H, Kato S and Yabe M. Natural pregnancy and delivery after unrelated bone marrow transplantation using fludarabine-based regimen in a Fanconi anemia patient. *Int J Hemato*. 査読有 91: 2010: 351

⑩ Oshima K, Kikuchi A, Mochizuki S, Toyama D, Uchisaka N, Yabe M, Hanada R. Fanconi anemia in infancy: report of hematopoietic stem cell transplantation to a 13-month-old patient. *Int J Hematol*. 査読有 89: 2009: 722-723

[学会発表] (計 40 件)

① Yabe M, Takahashi Y, Inagaki J, Koh K, Endo M, Kawa K, Kato K, Sakamaki H, Atsuta Y, Yabe H. Hematopoietic stem cell transplantation for Fanconi Anemia patients in Japan: An analysis of the registry data. 24th

Annual Fanconi Anemia Research Fund
Scientific Symposium. September, 2012,
Denver, USA.

② M Yabe, H Yabe, T Shimizu, T Morimoto, T
Koike, H Takakura, K Ohtsubo, A Fukumura, T
Morimoto, H Yoshida, Y Ohtsuka, M Shiomi, S
Kato. A fludarabine-based conditioning for
alternative donor haematopoietic stem cell
transplantation in inherited bone marrow failure
syndrome. 38th Annual Meeting of the
European Group for Blood and Marrow
Transplantation. April 2012, Geneva,

③ Yabe M, Yabe H, Shimizu T, Morimoto T,
Koike T, Takakura H, Otsubo K and Kato S.
Clonal chromosomal aberration in Fanconi
anemia patients with myelodysplasia. 23rd
Annual Fanconi Anemia Research Fund
Scientific Symposium. October 2011.

④ Yabe H, Koike T, Otsubo K, Morimoto T,
Shimizu T, Takakura H, Kato S and Yabe M.
Endocrine function in Japanese Fanconi
anemia patients. 23rd Annual Fanconi Anemia
Research Fund Scientific Symposium. October
2011.

⑤ Yabe M, Cancer after Stem Cell
Transplantation in Japanese Faconi anemia
Patients. 22nd Annual Fanconi Anemia Research
Fund Scientific Symposium. October 2010,
Minneapolis, USA

〔図書〕(計 9 件)

① 矢部みはる Fanconi貧血 血液症候群
(第2版) I 日本臨床社 2013: 13-17

② 矢部みはる、東京医学社、小児疾患診療の
ための病態生理 「Fanconi貧血」、2009年、
1178-1182

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢部 みはる (YABE MIHARU)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号：40172514

(2) 研究分担者

矢部 普正 (YABE HIROMASA)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号：70220217

(3) 連携研究者

加藤 俊一 (KATO SHUNICHI)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：70096212