



Episode 14

小児再生不良性貧血の 診断と治療の進歩

本コーナーのタイトル「Be Ambitious!」はウイリアム・エス・クラーク博士の名言“Boys, be ambitious like this old man”から拝借しました。「未来を自ら切り拓くべし」という後進への強い期待の意も込めて、長年に渡り、血液学の世界で活躍して来られた名誉会員の先生方から現役の先生方に向けた熱く且つ含蓄豊かなメッセージをお届けいたします。



名古屋大学名誉教授
小島 勢二

はじめに



私が名古屋大学を卒業したのは1976年ですが、1年間の名古屋大医学附属病院での初期研修期間を除いて、卒業後5年間は愛知県豊田市にある厚生連加茂病院（現在は豊田厚生病院に改称）に一般小児科医として勤務しました。当時加茂病院には、名古屋大学の第1内科から故山田英雄先生と堀田知光先生（前国立がん研究センター理事長）が代務にみえており、血液疾患のコンサルトを行っておりました。小児の血液疾患についても、快く、相談にのっていただけました。ちょうど、堀田・山田のスコアとして名高い再生不良性貧血の重症度分類を提唱した頃です¹⁾。

卒業後6年目にして、静岡県立こども病院に移り本格的に血液腫瘍の患者さんの診療に従事するようになりました。静岡時代に数人の重症再生不良性貧血の患児の主治医になりましたが、全員が頭蓋内出血や肺炎で短期間に亡くなってしまいました。本症に対して強烈な印象が残りました。この頃、米国から重症再生不良性貧血の治療として同種骨髄移植の有効性が報告され、骨髄移植への渴望が募りました。日本においては、再生不良性貧血に対する骨髄移植の第1例が1979年に名古屋第一赤十字病院から報告されていました²⁾。

名古屋第一赤十字病院へ



タイミングがよいことに、1984年に名古屋第一赤十字病院に無菌室を備えた小児医療センターが設立され、医局からの要請があって、静岡県立こども病院から移動しました。当時、国内においては、小児に骨髄移植を行っている施設は限られており、骨髄移植のよい適応ということで、全国から再生不良性貧血の患者さんが紹介されてきました。家族内に移植ドナーが得られれば、移植することで造血能の回復が得られ退院することができるのですが、家族内にドナーがない場合は輸血するほかに治療手段がなく長期の入院を必要としました。そんなわけで、一時は日赤病院の小児科病棟の1/3を再生不良性貧血の患児が占めておりました。その頃、20人の自験例を対象にgranulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)の臨床治験を行いました。再生不良性貧血に対するG-CSFの効果を検討した報告は世界でも最初ということでBloodに掲載されました³⁻⁵⁾。しかし、G-CSFの投与後にmonosomy 7を伴う骨髄異形成症候群の症例を続けて経験したので、NEJMに報告しましたが⁶⁾、その後、全国調査を行ったところ、全国的にもG-CSFの長期投与例に自験例と同様

に、骨髄異形成症候群が多発していることが判明しました⁷⁾。

その頃、県外から紹介された再生不良性貧血の患者さんが不幸な転帰をとられました。患者さんの御家族から、多額の寄付があり、その寄付をつかって、全国の専門医、患者さん、その御家族を対象に再生不良性貧血のシンポジウムを開催しました。再生不良性貧血を対象に、専門医と患者さんの御家族を交えたシンポジウムは初めての試みということもあり、200名を超える参加者がありました。このシンポジウムでは以下の3つが決議されました(写真1)。

- 1) 小児再生不良性貧血における全国実態調査を行う。
- 2) 小児再生不良性貧血の共同治療研究を進める。
- 3) 当時、世界的には再生不良性貧血の標準的な治療薬である抗胸腺細胞グロブリン(ATG)とシクロスポリン(CSA)が保険適応でなかったため、健康保険への採用を働きかける。

それまでの欧米における無作為割り付け臨床試験の結果ATGとCSAの併用がもっとも反応率がよいことがわかっていましたので、当然の帰結になりますが、ATG+CSAにG-CSFの無作為割り付け試験を企画しました。まず、ATGとCSAの保険適応を再生不良性貧血の患者会会員とともに厚生労働省に働きかけにいきましたが、患者会の会員を同行したかきがあって、ほどなく両薬剤ともに保険の認可を得ることができました。ちなみに、再生不良性貧血の患者会は、当時日赤病院の小児科病棟に入院していた12人の再生不良性貧血の患者さんの御家族が立ち上げた組織ですが、現在は再生つばさの会という名称のもと700人の会員を抱える全国組織に成長しております。

この試験の結果は2000年のBloodに掲載されましたが、G-CSFの併用は反応率や生存率の向上には寄与しないというも

のでした⁹⁾。世界で最初にG-CSFの併用効果は無作為割り付け試験で検証したことが評価されたと考えています。ところで、G-CSFと骨髄異形成症候群の発症とに因果関係はみられたのでしょうか。前方視的にこの点について検討したところ、多変量解析でも、G-CSFの投与期間は骨髄異形成症候群の発症のリスクファクターであることが確認されました⁹⁾。同様の再生不良性貧血に対するG-CSFの無作為割り付け試験は、私達の報告後に、ヨーロッパから2002年¹⁰⁾、2011年¹¹⁾、日本の成人グループ¹²⁾から2007年に、報告されております。メタアナリシスの結果¹³⁾においても、私達の最初の報告が確認され、G-CSFをできるだけの短期間の併用にとどめる方針が世界的にも推奨されています。この結果、骨髄異形成症候群の発症は明らかに減少しました。

日本の骨髄バンクの立ち上げには、患者さん、患者さん御家族の力が大きく寄与しました。最初に骨髄バンクの必要性を訴えたのも、当時日赤病院に入院していた再生不良性貧血の患者さんでした(写真2)。運動は実を結び、1989年には東海骨髄バンク、1993年の日本骨髄バンクの発足に至りました。2000年までに日本骨髄バンクを通して154名の再生不良性貧血の患者さんが移植されていますが、小児の生存率は80%に達しました¹⁴⁻¹⁶⁾。



写真1. 坂本記念シンポジウム 名古屋, 1992年5月



写真2. 骨髄バンクの必要性を訴える新聞記事, 1988年8月

当時の欧米のガイドラインでは、免疫抑制療法に反応が見られない場合には、再度免疫抑制療法を行い、それでも反応が見られない場合に非血縁者間の同種骨髄移植が勧められておりました。

このような状況下で、1997年から始めた、前方視的な臨床研究では、免疫抑制療法に反応がみられない場合の2nd lineとしてバンクドナーからの非血縁者間骨髄移植とATGの再投与の比較試験を行いました¹⁷⁾。205名の小児重症再生不良性貧血患児が登録され、免疫抑制療法に反応がみられない31名が非血縁者間骨髄移植を、21名には、免疫抑制剤の再投与が行われました。結果は、非血縁者間移植の優位性は明らかで、ガイドラインはこの結果に基づき改訂されました。この結果を国際学会で報告したとき、ヨーロッパの研究者から、congratulationsと祝福されましたが、今もって欧米でも同様の比較試験は行われていません。

豊富な臨床検体を用いて、日赤病院の検査室の片隅にある細胞培養室を用いて、再生不良性貧血の病因研究を進めることができました^{18~20)}。研究の興味は、再生不良性貧血における血中サイトカインの動態、骨髄微少環境に向けられました。

名古屋大学での研究の展開



名古屋大学へ移ってからは、再生不良性貧血の研究もそれまでの個人プレーからチームプレーへ、さらに国際化が進みました。これまで、ATGはウマ由来の製剤が使われていたのですが、2009年になって、ウマ製剤の販売がアジアでは中止となりウサギ製剤にとって代わる事態となりました。アジアではウサギ製剤しか入手できない状況でしたが、2011年になって米国のNIHからウサギATGとウマATGの比較試験がNEJMに報告されました²¹⁾。ウサギ製剤は反応率、生存率ともに、ウマ製剤に劣るというウサギ製剤しか入手できないアジア諸国にとっては大変衝撃的な結果でした。この結果を受けて、当院におけるウサギATGの反応性の検討²²⁾、さらに韓国、中国によびかけ、東アジアにおける小児再生不良性貧血に対するATGとウサギATGの反応率や生存率の後方視的な比較を行いました²³⁾。両製剤間で反応率に差はみられないものの、ウサギATG群は感染症の頻度が高く、生存率に関しては、有意に劣っていました。ウサギATGの推奨投与量は過剰で、毒性が強くてた可能性が考えられました。そこで、日本の小児のみならず、日本の成人グループ、韓国、中国の参加を得て、ウサギATGの至適投与量を決定するための前方視的無作為割り付け試験を行っています。今年中には、予定症例数に達し結果が報告できると考えています。ウサギATGの至適投与量を定めるこの試験は、ウマATGの入手ができ

ない、ヨーロッパ諸国においても極めて重要で、いつ結果がオープンされるのかと、たびたび問い合わせがあります。

小児再生不良性貧血の治療は、家族内にHLA一致ドナーが得られれば、同種骨髄移植が、得られない場合にはATGとCSAによる免疫抑制療法が選択されます²⁴⁾。免疫抑制療法で問題なのは、治療への反応率は50~70%程度ですが、反応するかどうかの予測が困難な点です。世界的にも反応予測因子についていくつかの報告がみられますが、治療法の選択に用いるだけの信頼性のある予測因子は存在しません。この点につき、私達も臨床データや検査データを用いて検討してきました^{25~28)}。とりわけ、私達が最近報告したPNH血球とリンパ球テロメア長の組み合わせは、十分臨床応用が可能な予測方法と考えています。PNH血球がみられずかつテロメア長が短縮した症例では、免疫抑制療法への反応率が20%以下であるのに対して、この範疇に入らない症例は、70%の反応率を示します²⁹⁾。非血縁者間の移植成績が向上した現在、免疫抑制療法への反応が期待できない症例には、代替ドナーからの移植を第1選択にする戦略もありうると考えています。

2009年からは日本小児血液学会の骨髄不全症の中央診断を担当しています。骨髄不全症の疑い症例について、日本全国から検体を送付されてきますので、形態診断のみならず、PNH血球やリンパ球テロメア長の測定、先天性骨髄不全症や若年型骨髄単球性白血病の遺伝子診断を担当しています。小児の骨髄不全症の診断において最も重要なことはFanconi貧血などの先天性骨髄不全症を正確に診断することです。先天性骨髄不全症は免疫抑制療法の効果が期待できないばかりか、造血幹細胞移植においても、後天性再生不良性貧血とは前治療を含めて至適な移植方法が異なります。確定診断は遺伝子診断によりますが、責任遺伝子が確定されていない症例も多くみられます。このような状況を背景に、次世代シーケンサーによる稀少小児遺伝性血液疾患の迅速な原因究明および診断・治療法の開発をめざす研究班（小島班）が2011年に発足しました。既存のサンガー法等によっては、原因遺伝子が確定できない250検体について全エクソーム解析を行い68例（27%）に原因遺伝子の確定をすることができました³⁰⁾。加えてFanconi貧血や先天性赤芽球癆等の骨髄不全症のみならず、Down症に関連する骨髄性白血病、若年型骨髄単球性白血病などの小児に特有の白血病についても新規遺伝子を発見することができました^{31~34)}。

名古屋大学医学部附属病院にHiseq2500が導入されてからは、次世代シーケンサーは研究に用いるのみならず、臨床的応用（クリニカルシーケンス）を進めています。全エクソーム解析と比較して安価なターゲットシーケンスを用いて全国から送付されてくる先天性骨髄不全症や先天性免疫不全症の遺伝子診断

を行っています^{30, 35)}。180種の先天性骨髄不全症や骨髄悪性疾患に関わる遺伝子を含むパネルを作成して137例につき検討しましたが、68例(50%)で原因遺伝子が確定できました。技術的な問題から、従来わが国では遺伝子診断が行われていなかったFanconi貧血においても22例のうち19例(82%)で原因遺伝子を確定することができました。一般の小児科医にとってもわかりやすい報告書で結果を返却しています。現在、アジア諸国からの検体の受け付けも始めています。

2008年に発表されたWHOの新分類では、小児骨髄不全症の一型としてrefractory cytopenia of childhood (RCC)が提唱されました³⁶⁾。RCCは小児の低形成骨髄異形成症候群の大部分を占め、再生不良性貧血との鑑別が困難な疾患です。また、両者の臨床あるいは生物学的相違もはっきりしません。幸い、1997年から開始された再生不良性貧血に対する前方視的な免疫抑制療法の治療効果を検討した研究において骨髄標本が保存されていたので、新WHO分類に基づく再分類が可能でした。その結果、同一の免疫抑制療法で治療された再生不良性貧血とRCC患者の免疫抑制療法への反応率とクローナルな血液疾患への移行頻度を比較したところ、両群間に差はみられませんでした³⁷⁾。再生不良性貧血は造血幹細胞を攻撃するT細胞による自己免疫疾患と考えられています。一方、RCCはクローナルな造血幹細胞の異常と考えられています。最近、成人の再生不良性貧血の一部において、次世代シーケンサーによる検討で、クローン性造血がみられることが示されました³⁸⁾。そこで、再生不良性貧血と診断された38例とRCCの44例について、次世代シーケンサーによる体細胞変異の頻度を検討しました。体細胞変異の頻度は、それぞれ3/38(8%)、5/44(11%)と差がみられず、みられた変異もPIGAやBCORなどimmune escapeを示唆する変異でした³⁹⁾。臨床および生物学データはともにRCCが独立した疾患単位であることに疑問を投げかける結果でした。現在、ヨーロッパ骨髄移植グループ(EBMT)が再生不良性貧血のtext bookを監修していますが、小児の骨髄不全症の執筆を依頼されたので、そのなかで我々の考えを主張しています⁴⁰⁾。

終わりに



これまで述べた再生不良性貧血の研究は、決して私個人の力のみでは成し遂げることはできませんでした。日赤、名古屋大学における血液グループ、全国規模での小児血液研究グループ、さらには、東アジアを中心とした再生不良性貧血の研究者からの協力があって初めて研究の遂行が可能であったと考えています(写真3)。

また、米国やヨーロッパを含む再生不良性貧血の研究者のcommunityに比較的若い時期から参加できたのも私にとって幸運でした。過去、3回にわたって再生不良性貧血の治療にかする国際会議を主催しましたが、この会議を通じて再生不良性貧血の治療に関するコンセンサスを世界に向けて発信することができたのも私にとって望外な喜びでした^{41~43)}(写真4)。

再生不良性貧血は、欧米と比較して東アジアに頻度の高い疾患です。これまでの研究の蓄積を活かして、わが国におけるこの分野での更なる研究の進展を願っております。



写真3. 第1回アジア小児がんコンソーシウム 名古屋, 2014年6月



写真4. 第3回再生不良性貧血治療コンセンサスマーティング 浜松, 2010年2月

文 献



- 1) 堀田知光, 平林憲之, 内海真, 滝田資也, 山田英雄. 再生不良性貧血の重症度と予後の再検討. 臨血. 1978; 19: 1634-1640.
- 2) 吉川敏, 山口博, 内藤和行, ほか. 肝炎後重症再生不良性貧血の治療に同種骨髄移植が奏功した1症例. 臨血. 1979; 20: 1459-1466.
- 3) Kojima S, Fukuda M, Miyajima Y, Matsuyama T. Cyclosporine and recombinant granulocyte colony-stimulating factor in severe aplastic anemia. N Engl J Med. 1990; 323: 920-921.
- 4) Kojima S, Fukuda M, Miyajima Y, Matsuyama T, Horibe K. Treatment of aplastic anemia in children with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. Blood. 1991; 77: 937-941.
- 5) Kojima S, Matsuyama T. Stimulation of granulopoiesis by high-dose recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in children with aplastic anemia and very severe neutropenia. Blood. 1994; 83: 1474-1478.
- 6) Kojima S, Tsuchida M, Matsuyama T. Myelodysplasia and leukemia after treatment of aplastic anemia with G-CSF. N Engl J Med. 1992; 326: 1294-1295.
- 7) Ohara A, Kojima S, Hamajima N, et al. Myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia as a late clonal complication in children with acquired aplastic anemia. Blood. 1997; 90: 1009-1013.
- 8) Kojima S, Hibi S, Kosaka Y, et al. Immunosuppressive therapy using antithymocyte globulin, cyclosporine, and danazol with or without human granulocyte colony-stimulating factor in children with acquired aplastic anemia. Blood. 2000; 96: 2049-2054.
- 9) Kojima S, Ohara A, Tsuchida M, et al. Risk factors for evolution of acquired aplastic anemia into myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia after immunosuppressive therapy in children. Blood. 2002; 100: 786-790.
- 10) Gluckman E, Rokicka-Milewska R, Hann I, et al. Results and follow-up of a phase III randomized study of recombinant human-granulocyte stimulating factor as support for immunosuppressive therapy in patients with severe aplastic anaemia. Br J Haematol. 2002; 119: 1075-1082.
- 11) Tichelli A, Schrezenmeier H, Socié G, et al. A randomized controlled study in patients with newly diagnosed severe aplastic anemia receiving antithymocyte globulin (ATG), cyclosporine, with or without G-CSF: a study of the SAA Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Blood. 2011; 117: 4434-4441.
- 12) Teramura M, Kimura A, Iwase S, et al. Treatment of severe aplastic anemia with antithymocyte globulin and cyclosporin A with or without G-CSF in adults: a multicenter randomized study in Japan. Blood. 2007; 110: 1756-1761.
- 13) Gurion R, Gafter-Gvili A, Paul M, et al. Hematopoietic growth factors in aplastic anemia patients treated with immunosuppressive therapy-systematic review and meta-analysis. Haematologica. 2009; 94: 712-719.
- 14) Kojima S, Inaba J, Kondo M, et al. Unrelated donor marrow transplantation for severe acquired aplastic anemia using cyclophosphamide, antithymocyte globulin, and total body irradiation. Blood. 1995; 85: 291-292.
- 15) Kojima S, Matsuyama T, Kato S, et al. Outcome of 154 patients with severe aplastic anemia who received transplants from unrelated donors: the Japan Marrow Donor Program. Blood. 2002; 100: 799-803.
- 16) Yagasaki H, Kojima S, Yabe H, et al. Acceptable HLA-mismatching in unrelated donor bone marrow transplantation for patients with severe aplastic anemia. Blood. 2011; 118: 3186-3190.
- 17) Kosaka Y, Yagasaki H, Sano K, et al. Prospective multicenter trial comparing repeated immunosuppressive therapy with stem-cell transplantation from an alternative donor as second-line treatment for children with severe and very severe aplastic anemia. Blood. 2008; 111: 1054-1059.
- 18) Abe T, Matsuoka H, Kojima S, et al. Correlation of response of aplastic anemia patients to antilymphocyte globulin with *in vitro* lymphocyte stimulatory effect: predictive value of *in vitro* test for clinical response. Blood. 1991; 77: 2225-2230.
- 19) Kojima S, Matsuyama T, Kodera Y. Hematopoietic growth factors released by marrow stromal cells from patients with aplastic anemia. Blood. 1992; 79: 2256-2261.
- 20) Kojima S, Matsuyama T, Kodera Y, et al. Measurement of endogenous plasma granulocyte colony-stimulating factor in patients with acquired aplastic anemia by a sensitive chemiluminescent immunoassay. Blood. 1996; 87: 1303-1308.
- 21) Scheinberg P, Nunez O, Weinstein B, et al. Horse versus rabbit antithymocyte globulin in acquired aplastic anemia. N Engl J Med. 2011; 365: 430-438.
- 22) Takahashi Y, Muramatsu H, Sakata N, et al. Rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine as first-line therapy for children with acquired aplastic anemia. Blood. 2013; 121: 862-863.
- 23) Jeong DC, Chung NG, Cho B, et al. Long-term outcome after immunosuppressive therapy with horse or rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine for severe

- aplastic anemia in children. *Haematologica*. 2014; 99: 664-671.
- 24) Yoshida N, Kobayashi R, Yabe H, et al. First-line treatment for severe aplastic anemia in children: bone marrow transplantation from a matched family donor versus immunosuppressive therapy. *Haematologica*. 2014; 99: 1784-1791.
- 25) Yoshida N, Yagasaki H, Takahashi Y, et al. Clinical impact of HLA-DR15, a minor population of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria-type cells, and an aplastic anaemia-associated autoantibody in children with acquired aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 2008; 142: 427-435.
- 26) Yoshida N, Yagasaki H, Hama A, et al. Predicting response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica*. 2011; 96: 771-774.
- 27) Sakaguchi H, Nishio N, Hama A, et al. Peripheral blood lymphocyte telomere length as a predictor of response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica*. 2014; 99: 1312-1316.
- 28) Elmahdi S, Muramatsu H, Narita A, et al. Markedly high plasma thrombopoietin (TPO) level is a predictor of poor response to immunosuppressive therapy in children with acquired severe aplastic anemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2016; 63: 659-664.
- 29) Narita A, Muramatsu H, Sekiya Y, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and telomere length predicts response to immunosuppressive therapy in pediatric aplastic anemia. *Haematologica*. 2015; 100: 1546-1552.
- 30) Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, et al. Clinical utility of next-generation sequencing for inherited bone marrow failure syndromes. *Genet Med* (in press).
- 31) Hira A, Yoshida K, Sato K, et al. Mutations in the gene encoding the E2 conjugating enzyme UBE2T cause Fanconi anemia. *Am J Hum Genet*. 2015; 96: 1001-1007.
- 32) Yoshida K, Toki T, Okuno Y, et al. The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders. *Nat Genet*. 2013; 45: 1293-1299.
- 33) Wang X, Muramatsu H, Okuno Y, et al. GATA2 and secondary mutations in familial myelodysplastic syndromes and pediatric myeloid malignancies. *Haematologica*. 2015; 100: 398-401.
- 34) Sakaguchi H, Okuno Y, Muramatsu H, et al. Exome sequencing identifies secondary mutations of SETBP1 and JAK3 in juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat Genet*. 2013; 45: 937-941.
- 35) Kojima D, Wang X, Muramatsu H, et al. Application of extensively targeted next-generation sequencing for the diagnosis of primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*. 2016; 138: 303-305.
- 36) Bauman I, Niemeyer CM, Bennett JM, et al. Childhood myelodysplastic syndrome. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. eds. WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; 2008: 104-107.
- 37) Hama A, Takahashi Y, Muramatsu H, et al. Comparison of long-term outcomes between children with aplastic anemia and refractory cytopenia of childhood who received immunosuppressive therapy with antithymocyte globulin and cyclosporine. *Haematologica*. 2015; 100: 1426-1433.
- 38) Yoshizato T, Dumitriu B, Hosokawa K, et al. Somatic mutations and clonal hematopoiesis in aplastic anemia. *N Engl J Med*. 2015; 373: 35-47.
- 39) Narita A, Muramatsu H, Okuno Y, et al. Genetic background of idiopathic bone marrow failure syndromes in children. (Submitted.).
- 40) Elmahdi S, Kojima S. Aplastic anemia and myelodysplastic syndrome in pediatric age. In: Aljurf M, Gluckman E, Dufour C, eds. Bone marrow failure, First edition.. San Diego, CA: ELSEVIER; 2016 (in press).
- 41) Kojima S, Nakao S, Tomonaga M, et al. Consensus conference on the treatment of aplastic anemia. *Int J Hematol*. 2000; 72: 118-123.
- 42) Omine M, Kojima S, Nakao S, Mizoguchi H, Takaku F. International consensus conference on bone marrow failure syndromes: review and recommendations. *Int J Hematol*. 2005; 82: 406-407.
- 43) Kojima S, Nakao S, Young N, et al. The third consensus conference on the treatment of aplastic anemia. *Int J Hematol*. 2011; 93: 832-837.