

図2 好中球 (type II+III) と異常巨核球出現頻度

#### D. 考 察

今回の検討では、核クロマチンパターンによる好中球分類、赤芽球の核融解像の出現頻度の定量的検討が有用であったが、診断を標準化するためには、赤芽球、好中球の核クロマチン構造観察のための最適な染色条件が設定が必要である。また、核クロマチン染色パターンによる好中球分類は主観的判断を伴うため、type IとII、IIとIIIの境界について今後さらに検討する必要があると考えられる。

#### E. 結 論

MDS 診断における minimal dysplasia の指標となる形態異常は、赤芽球系では核融解像 (karyolysis) を示す赤芽球の比率、好中球系では核クロマチン染色パターンによる好中球分類 (type I~III) であった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 野上小民 et al.: 形態から見た MDS 診断の標準化 (1) 顆粒球 (好中球) 日本検査血液学会雑誌 第3巻 第3号 309-316 2002年
2. 鶴田一人 et al.: 形態から見た MDS 診断の標準化 (2) 日本検査血液学会雑誌 第3巻 第3号 317-326 2002年

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

#### H. 参考文献

1. 朝長万左男 医学検査 51, 985, 2002
2. 朝長万左男 et al. 臨床血液 30, 1788, 1989

# 進行期 MDS に対する造血幹細胞移植の至適前処置

岡本真一郎

慶應義塾大学医学部内科

**研究要旨** 進行期骨髓異形成症候群の同種造血幹細胞移植における至適前処置を確立する事を目的として、慶應義塾大学移植チームで施行された骨髓破壊的前処置を用いて施行された同種造血幹細胞移植 38 例の検討を行った。全生存率は 58 % で、再発は進行病期 MDS 25 例中 2 例で認められた。造血幹細胞ソース（血縁者 vs 非血縁者）、前処置、病型による生存率に有意差は無く、移植時の年齢、移植早期の移植関連合併症（特に細菌感染症）が予後不良因子として同定された。再発に関しては、急性ではなく慢性 GVHD を発症しないことが危険因子として確認された。これらの結果は低毒性（reduced intensity）前処置によって移植早期の RRT を軽減する事で、MDS に対する同種移植の移植成績を向上する可能性を強く示唆すると考えられた。

## A. 研究目的

単一施設における骨髓異形成症候群に対する同種造血幹細胞移植の成績を retrospective に解析し、至適前処置確立の基礎データとする。

## B. 研究方法

1992 年 5 月から 2001 年 12 月までに慶應義塾大学病院で骨髓破壊的前処置を用いた同種造血幹細胞移植を受けた 40 例の骨髓異形成症候群を対象とした。前処置は 38 例で全身放射線照射（TBI）（12 Gy）にエンドキサン（120 mg/kg）あるいはキロサイド（28 g/m<sup>2</sup>）併用した。2 例ではブスルファンとエンドキサンを用いた。GVHD 予防は、血縁者間移植ではシクロスポリンと MTX、非血縁者間移植ではタクロリムスと MTX を用いた。全例においてドナーとレシピエントの HLA 型は血清学的に一致しており、造血幹細胞ソースには 2 例を除いて骨髓を用いた。

## C. 研究成果

症例の内訳は慢性骨髓単球性白血病 2 例、RA/RARS 7 例、RAEB 8 例、RAEBT 5 例、MDS より AML へ移行した症例 10 例であった。生着は早期死亡の 2 例を除いて全例で得られた。観察期間の中央値 5 年で全生存率は 58 % であった。Grade II-IV の急性 GVHD は評価可能な 33 例中 16 例（48 %）で、Grade II-IV の急性 GVHD は 3 例

（9 %）で認められ、その発症はタクロリムス群で低い傾向が認められた。慢性 GVHD は評価可能な 23 例中 15 例（65 %）で認められた。その内分けは Limited 5 例、extensive 15 例であった。35 例中 13 例が死亡した。死因の内訳は移植早期の敗血症（5 例）、CMV 間質性肺炎（1 例）、慢性 GVHD（3 例）、急性 GVHD（2 例）、肝静脈閉塞症（1 例）、再発後の敗血症（1 例）であった。再発は進行病期の MDS 25 例中 2 例で認められたのみであった。

5 年生存率は 58 % で、生存率を endpoint とした場合の予後不良因子としては移植時の年齢、移植早期の移植関連合併症（特に生着前の細菌感染症）であり、病型、前処置、GVHD 予防法、造血幹細胞ソースは生存率に影響を与えなかった。再発に関しても病型、前処置による影響は無く、慢性 GVHD の発症が唯一再発率と逆相関した。急性 GVHD の発症の有無は再発に影響を与えなかった。移植後早期の細菌感染症の頻度は、移植前の敗血症その他の documented bacterial infection の既往と有意に相関した。

## D. 考 察

MDS に対する同種造血幹細胞移植の 5 年生存率は血縁者間移植で 40-60 %、非血縁者間移植で 20-50 % と報告され、過去 5 年間で成績の著しい向上は認められていない。移植の成功を妨げ

ている最大の原因は移植関連合併症である。われわれの検討においても移植関連合併症、特に移植早期の細菌合併症、は移植後の生存率を低下させる有意な因子であった。GVHD は有意な因子ではなかったが、慢性 GVHD の発症が再発率を有意に低下させる事と GVHD による臓器障害が相殺された結果と考えられた。

前処置の強度を低下させる事で、移植後早期の死亡率が有意に低下することが複数の施設の比較的多数例を用いた検討により明らかとされている。前処置の強度を低下させる事が再発の増加につながる可能性は否定できないが、今回の検討で慢性 GVHD が移植後の再発率を低下させる事が明らかとなり、GVHD 効果に期待できると考えられた。また急性 GVHD と再発率には有意な相関は無く、適切な GVHD 予防を図る事の必要性が示唆された。

血縁者に HLA 適合ドナーを見出させる確率は 30 % と低く、MDS ではドナーも高齢者となり、不適格性ドナーである可能性も高く、ドナーを得る確率はさらに低いと考えられる。従って、MDS に対する同種移植の造血幹細胞ソースは非血縁者の骨髄あるいは臍帯血に依存する事となる。HLA 適合非血縁者を用いた骨髄非破壊的移植に関して、我々はフルダラビンとメルファランの併用による前処置によって確実に生着が得られることを確認している。しかし、粘膜毒性の程度は、他の骨髄非破壊的移植と比較してやや増加する傾向にある点で改善の余地があると考えている。MDS に対する臍帯血を用いた骨髄非破壊的移植に関しても、至適な前処置は確立しておらず、今後の研究課題である。

## E. 結 論

MDS に対する骨髄破壊的前処置を用いた移植成績を検討し、低毒性 (reduced intensity) 前処置によって移植早期の RRT を軽減する事で、MDS に対する同種移植の移植成績を向上する可能性が強く示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 森 毅彦, 岡本真一郎: 海外バンクドナーからの移植. 臨床血液 43 (6) : 438-441, 2002.
2. Sato N, Okamoto S, Mori T, Watanabe R, Hamano Y, Kawamura J, Ishihara D, Ikeda Y : Recurrent acute myositis after allogeneic bone marrow transplantation for myelodysplasia. Bone Marrow Transplantation 7 (2) 109-112, 2002.
3. Mori T, Okamoto S, Watanabe R, Yamazaki R, Tsukada Y, Nagayama H, Ishida A, Ikeda Y: Incidence of cytomegalovirus (CMV) infection in allogeneic hematopoietic stem cell recipients at low risk of CMV infection. Bone Marrow Transplantation 29: 1005-1006, 2002.
4. Okamoto R, Yajima T, Yamazaki M, Kanai T, Mukai M, Okamoto S, Ikeda Y, Hibi T, Inazawa J, Watanabe M : Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. Nature Medicine 8 (9) : 1011-1017, 2002.
5. Sumimoto H, Tsuji T, Miyoshi H, Hagihara M, Takada-Yamazaki R, Okamoto S, Ikeda Y, Takahashi T, Kawakami Y : Rapid and efficient generation of lentivirally gene-modified dendritic cells from DC progenitors with bone marrow stromal cells. Journal of Immunological Methods 271 : 153-165, 2002.
6. Tsukada Y, Nagayama H, Mori T, Shimizu T, Sato N, Takayama N, Ishida A, Handa M, Ikeda Y, Okamoto S: Granulocyte transfusion as a treatment for enterococcal meningoencephalitis after allogeneic bone marrow transplantation from an unrelated donor. Bone Marrow Transplantation 31 : 69-72, 2003.
7. Matsuoka S, Okamoto S, Watanabe R, Mori T, Nagayama H, Hamano Y, Yokoyama K, Takayama N, Ikeda Y: Granisetron plus dexamethasone versus granisetron alone in the prevention of vomiting induced by conditioning for stem cell transplantation: a prospective

randomized study. International Journal of Hematology 77: 86-90, 2003.

## 2. 学会発表

1. Mori T, Okamoto S, Watanabe R, Tsukada Y, Takayama N, Ikeda Y : Dose-adjusted preemptive therapy for cytomegalovirus disease based on real-time polymerase chain reaction after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. 28th Meeting of Physicians, European Group for Blood and Marrow Transplantation. Montreux, Switzerland, 2002.

2. Okamoto S, Nishihira M, Mori T, Hirooka Y, Yashima T, Kiuchi K, Shimura Y, Takeno H, Kondo S : Quality of life (QOL) after allogeneic stem cell transplantation: prospective study of predictors of impaired QOL. Tandem BMT Meetings. Keystone, Colorado, 2003.

## G. 知的所有権の取得状況

なし

## H. 参考文献

なし

## Fludarabine を用いた骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植

谷本 光音、増田 浩三、豊嶋 崇徳、品川 克至、池田 和真

岡山大学病態制御科学

**研究要旨** fludarabine 125mg/m<sup>2</sup>+cyclophosphamide 60 mg/kg を中心とする骨髄非破壊的前治療を用いた同種末梢血幹細胞移植を、造血器疾患 20 例、固形腫瘍 2 例に対して施行した。再生不良性貧血 1 例を除き全例で生着が得られた。III 度以上の急性 GVHD は 5 例、広汎型慢性 GVHD は 5 例に出現した。15 例で寛解が得られたが 1 年後の無再発生存（固形腫瘍の SD を含む）率は 50 % であり、これは移植時の病勢との相関性が高かった。

### A. 研究目的

高齢者あるいは臓器障害を有する high-risk の骨髄異形成症候群（MDS）に対する骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植として当研究班に提案している、fludarabine（FL）+cyclophosphamide（CY）を基本とした移植法の安全性および有効性を評価する。

### B. 研究方法

対象は、予後不良の AML 5 例、NHL 6 例、MDS 5 例、ALL 1 例、骨髄腫 2 例、再生不良性貧血 1 例、固形腫瘍 2 例の合計 22 例で、年齢中央値 55.5 歳、男性 12 例、女性 10 例で、骨髄非破壊的同種移植を行った理由は、高年齢が 11 例、自家移植後が 4 例、同種移植後が 1 例、臓器障害が 5 例、進行固形腫瘍 2 例、病的骨折による PS 不良 1 例（重複あり）であった。原則として、HLA 一致同胞から末梢血幹細胞を採取し、移植前治療として Flu 25 mg/m<sup>2</sup>/day を 5 日間、Cy 30 mg/kg を 2 日間投与し、GVHD 予防としてシクロスポリン A とメソトレキセートを投与した。

### C. 研究成果

ドナーは HLA 一致同胞が 14 例、血清型 1 抗原不一致 6 例、血清型 2 抗原不一致 2 例で、年齢中央値 49 歳であった。輸注 CD34 陽性細胞数は 3.7 (1.6-10.84) x10<sup>6</sup>/kg で、再生不良性貧血の 1 例を除いて全例生着した。好中球 500/ $\mu$ l 血小板 2 万/ $\mu$ l までの回復に要した日数はそれぞれ 13 (7-14) 日、14 (8-30) 日であった。キメリズム解析では、

T 細胞分画 16 例中 14 例、好中球分画 13 例中 10 例、未分画 8 例中 6 例でドナータイプが 90 % を超え、day 30 までに 20 例中 18 例でいずれかの分画で 90 % を超えた。T 細胞分画と好中球分画を同時に経時的に解析しえた症例では、T 細胞分画のドナータイプが増加した後に好中球分画のドナータイプが増加する傾向が観察された。急性 GVHD は評価可能 21 例中 9 例に発症し、I-II 度が 4 例、III-IV 度が 5 例であった。慢性 GVHD は評価可能 12 例中 5 例に発症し、すべてが extensive type であった。原病の進展による死亡は 5 例で、治療関連死亡は 4 例（急性 GVHD が 1 例、閉塞性細気管支炎による呼吸不全が 1 例、肝中心静脈閉塞症（VOD）が 1 例、ウイルス感染症が 1 例）であった。この他の common toxicity criteria 3 度以上の治療関連毒性は、血圧上昇 1 例、肝機能異常 1 例、食欲不振 1 例であった。

AML 5 例中 5 例、ALL 1 例中 1 例、MDS 5 例中 3 例、NHL 5 例中 4 例、骨髄腫 2 例中 2 例で CR または CRu が得られ、AML 2 例、NHL 1 例が再発した。観察期間中央値は 182 日 (13-733 日) で、day 100、1 年、day 600 での生存率は、75.0 %、56.3 %、25.0 %、無病生存率は 55.0 %、50.0 %、16.7 % であった。ALL の 1 例で再発予防目的にドナーリンパ球が輸注され、AML 1 例と MDS (RAEB) 1 例に治療を目的として行われたが、AML と MDS 症例では寛解は得られなかった。

### D. 考 察

肝中心静脈閉塞症（VOD）による 1 例の死亡

を除けば、治療関連毒性は軽度であった。急性GVHDもコントロール可能な例が多かったが、HLA一致同胞からの移植においても死亡例がみられ、慢性GVHDはいずれもextensive typeであり、注意が必要と考えられた。長期の治療歴を有する再生不良性貧1症例で拒絶されたが、キメリズム解析において、大多数例でday 30までにドナー型が90%を超えた。fludarabineとcyclophosphamideを移植前治療に用いたNIHのChildsらの報告のとおり、T細胞分画のドナータイプの増加が顆粒球のドナータイプの増加に先行し、また、GVHD発症や免疫学的抗腫瘍効果にも先行した。約70%の症例で少なくとも一時的な治療効果が得られたが、移植1年後の生存率、無病生存率は、それぞれ、56.3%、50.0%で、移植時の病勢に依存していた。

#### E. 結 論

fludarabine (25 mg/m<sup>2</sup>/day x 5 日間) + cyclophosphamide (30 mg/kg/day x 2 日間) を移植前治療とする骨髄非破壊的同種末梢血幹細胞移植は、治療関連毒性が少なく、高率に生着が得られた。生存率、無病生存率は、移植時の病勢に依存することが示唆された。

#### F. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

増田浩三, 品川克至, 池田和真, 楠本衣代, 橋本大吾, 齊藤 崇, 片岡 到, 藤井伸治, 豊嶋崇徳, 石丸文彦, 新谷憲治, 谷本光音, 権藤久司, 原田実根: 前処置に Fludarabine を用いた骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植の成績: 九州大学第一内科および岡山大学第二内科の共同研究, 第42回日本血液学会中国四国地方会, 平成15年3月1日, 岡山

#### G. 知的所有権の取得状況

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

#### H. 参考文献

なし

# MDS と MDS 由来急性骨髄性白血病における CD34<sup>++</sup> 細胞上の G-CSF レセプターの発現と機能解析

木村 昭郎、スルタナ タンピラ

(広島大学原爆放射線医科学研究所血液内科)

**研究要旨** MDS 及び MDS 由来急性骨髄性白血病 (MDS-AML) 45 例の骨髄 CD34<sup>++</sup> 細胞上の G-CSFR の発現と機能を解析した。G-CSFR の発現は各病型の一部の例に低下しており、進行期の病型では発現異常 (低発現か高発現) が高率にみられた。顆粒球減少との関係を見ると、病型に関係なく、低発現の例で高率に認めたのに対して、正常発現の例では低率に、高発現の例には逆に高率に認めたことから、顆粒球減少の原因の一つとして CD34<sup>++</sup> 細胞上の G-CSFR の発現低下が考えられた。

## A. 研究目的

原爆被爆者の高齢化に伴い、MDS の増加がみられているが、我々はそのリスクが高いことを最近明らかにしたり。この原爆被爆者や、化学療法後に発症した二次性 MDS では、白血病関連遺伝子でかつ血球分化に重要な役割を果たしている転写因子 AML1 遺伝子の重要なドメインであるラントドメンに、高頻度に点突然変異を認めている<sup>2)</sup>。AML1 の間接的なターゲット遺伝子である G-CSF レセプター (G-CSFR) は、顆粒球系細胞の増殖、分化、活性化に重要な役割を果たしており、本研究では、骨髄 CD34<sup>++</sup> 細胞上の G-CSFR の発現と機能を顆粒球減少との関連性から解析した<sup>3)</sup>。

## B. 研究方法

対象は、被爆者を含む MDS 及び MDS 由来急性骨髄性白血病 (MDS-AML) 患者 45 例 (RA 15 例、RAEB 11 例、RAEB-t 5 例、MDS-AML 14 例、男性 29 例、女性 16 例、年齢 44 才～88 才、中央値 70 才) である。骨髄 CD34<sup>++</sup> 細胞上の G-CSFR の発現 (陽性率及び平均発現強度) は骨髄単核球分画について、CD34 及び G-CSFR に対するモノクローナル抗体でラベルした後、2 カラーの flow cytometry で検出し、CD33、CD13、C-kit などの分化抗原の発現についても同様に行った。CD34<sup>++</sup> 細胞の G-CSF に対する in vitro 反応性は、CD34<sup>++</sup> 細胞を骨髄液よりビーズ法により分離し、以下の実験に用いた。アポトーシスの検出はアネキシン V 結合能で、液体培養系での増殖能を

BrdU 取り込みで、コロニー形成能をコロニー数のカウントにより解析した。また CD34<sup>++</sup> 細胞における Jak-Stat 系の発現は定量的 RT-PCR 法で解析した。

## C. 研究結果

G-CSFR の発現 (平均発現強度) の正常範囲を mean±2SD とすると、FAB 分類の RA、RAEB、RAEB-t 及び MDS-AML の病型で各々の 15 例中 1 例、11 例中 1 例、5 例中 1 例、14 例中 7 例が低下していた。また進行期の病型である RAEB、RAEB-t、MDS-AML では、高発現の例がそれぞれ 2 例、3 例、4 例に認められ、低発現と高発現を合わせた発現異常が高率にみられた。G-CSFR の発現と種々の顆粒球系の分化抗原の発現との関係をみたところ、RA では G-CSFR と CD33 との間に負の相関関係がみられた。次に G-CSFR の発現と末梢血顆粒球減少との関係を見ると、骨髄の cellularity や病型に関係なく、低発現の 10 例中 9 例に顆粒球減少を認めたのに対して、正常発現の例では顆粒球減少があまりみられず (9/27)、高発現の例には逆に多くみられた (5/8)。G-CSF 投与に対する顆粒球増加の反応は、MDS-AML では化学療法の併用の有無にかかわらず、G-CSFR が低発現の 6 例のいずれにも増加が認められなかったのに対し、高発現の 3 例中 3 例に、正常発現例では 2 例中 1 例に反応が見られた。

そこで顆粒球減少を呈した正常ないし高発現の G-CSFR を有する例について、顆粒球減少のメカ

ニズムを明らかにするため、CD34<sup>++</sup> 細胞の G-CSF に対する反応を *in vitro* でみた。G-CSF 依存性のアポトーシス抑制効果は比較的保たれており、RA 1 例、RAEB 2 例、RAEBt 1 例、MDS-AML 1 例でアポトーシスを認め、そのうち 3 例で G-CSF の効果が認められた。増殖能は 7 例中 2 例に G-CSF 依存性の反応が認められた。G-CSF 依存性コロニー形成能は MDS の病型の進行度と相関して低下した。しかし、これらの *in vitro* 反応性については、いずれも顆粒球減少との明らかな関係は認められなかった。次に G-CSFR のシグナル伝達系である Jak-Stat 系の中で、Jak1、Jak2、Tyk2、Stat1 と Stat3 の mRNA 発現をみたところ、いずれの発現についても異常に低い例は見出されず、RA、RAEB では Jak2 と Tyk2 の発現が正常コントロールに比しむしろ増加していた。

#### D. 考 察

MDS と MDS-AML の顆粒球減少の原因の一つとして CD34<sup>++</sup> 細胞上の G-CSFR の発現低下が考えられた。G-CSFR の遺伝子発現は転写因子である PU.1 や C/EBP $\alpha$  により、さらに C/EBP $\alpha$  遺伝子発現は AML1 によって制御されていることが知られている。被爆者を含む二次性 MDS には AML1 遺伝子変異を有する例が多く、これらの例では G-CSFR の発現が抑制されている可能性もあり、この点からの検索も進める予定である。MDS の顆粒球減少は死因として最も重要な感染と結びつくため、G-CSF 投与などでの治療が行われているが、G-CSFR 発現が低い症例に対しては、G-CSF の効果は期待できず、G-CSFR の発現誘導などの治療法の開発も必要と考えられる。一方、G-CSFR を正常ないし高発現している例での G-CSF に対する *in vitro* 反応性や、Jak-Stat 系の解析からは、正常ないし高発現例での顆粒球減少の詳細は不明であり、さらに検討が必要と考えられた。

#### E. 結 論

MDS と MDS-AML の顆粒球減少の原因の一つとして CD34<sup>++</sup> 細胞上の G-CSFR の発現低下が考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Harada, H., et al: Implications of somatic mutations in the AML1 gene in radiation-associated and therapy-related myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia. *Blood* 101(2): 673-680, 2003.
2. Kuramoto, K., et al: Chromosomal instability and radiosensitivity in myelodysplastic syndrome cells. *Leukemia* 16(11): 2253-2258, 2002.
3. Ban, S., et al: Radiosensitivity and expression of nucleotide excision repair genes in peripheral blood mononuclear cells of myelodysplastic syndrome patients. *International Congress Series* 1236: 67-69, 2002.
4. Sultata, T., et al: Expression and functional analysis of granulocyte colony-stimulating factor receptors on CD34<sup>++</sup> cells in patients with MDS and MDS-AML. *Brit. J. Haematol.* (in press)

##### 2. 学会発表

1. Kimura, A., et al: Radiosensitivity and expression of nucleotide excision repair genes in myelodysplastic syndrome (MDS). 26th International Congress of Internal Medicine, Kyoto, 2002.
2. Harada, H., et al: Implications of somatic mutations in the AML1 gene in radiation-associated and therapy-related myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia. 29th World Congress of the International Society of Hematology, Seoul, Korea, 2002.

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

#### H. 参考文献

1. Kimura A, et al: Atomic bomb radiation enhances the risk of MDS. *Leukemia Research* 25(Suppl): S13, 2001.
2. Harada, H., et al: Implications of somatic mutations in the AML1 gene in radiation-associated and



therapy-related myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia. *Blood* 101(2): 673-680, 2003.

3. Sultata, T., et al: Expression and functional analysis of granulocyte colony-stimulating factor receptors on CD34<sup>++</sup> cells in patients with MDS and MDS-AML. *Brit. J. Haematol.* (in press)

# MDS の病態進展と 06-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) 遺伝子メチル化の役割

村手 隆<sup>1</sup>、大野 稔人<sup>2</sup>、平賀 潤二<sup>2</sup>、杉崎 千穂<sup>2</sup>

木下 朝博<sup>2</sup>、青木恵津子<sup>3</sup>、大橋 春彦<sup>3</sup>、内田 俊樹<sup>4</sup>

名古屋大学医学部保健学科<sup>1</sup>、名古屋大学大学院医学系研究科分子細胞内科学<sup>2</sup>、

国立名古屋病院臨床研究センター<sup>3</sup>、名古屋第二赤十字病院<sup>4</sup>

**研究要旨** MDS の病態進展と MGMT 遺伝子発現の相関を検証した。MDS 65 例及び de novo AML 26 例で、MSP 法により MGMT 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化を検索した。MDS では約 30 % にメチル化を認め RAEB in T、CMMoL に高率であった。de novo AML 16 例には 1 例しかメチル化を認めなかった。MGMT メチル化の症例では overall survival で有意に予後不良であった。

## A. 研究目的

MDS において DNA メチル化によって不活化される新たな遺伝子群を明らかにして、DNA メチル化を分子標的とする治療戦略の構築を目指す。近年固形腫瘍において、その不活化が癌関連遺伝子変異の増加をもたらすとされる MGMT 遺伝子の DNA メチル化による不活化<sup>1,2)</sup> を MDS において検討する。

## B. 研究方法

Herman らの primer set<sup>3)</sup> を用いて methylation specific PCR (MSP) 法により、MGMT 遺伝子の DNA メチル化を検討した。予後を追跡し得た症例では DNA メチル化有無と生存率の相関を統計学的に検証した。正常対象として正常人末梢血 DNA、MDS 症例では骨髓 DNA を用いて解析を行った。MDS 症例は RA 24 例、RAEB 15 例、RAEB in T 15 例、CMMoL 11 例で、比較のため AML 26 例 (de novo 16 例、MDS-AML 10 例) でも検討した。

## C. 研究成果

予備実験で正常人末梢血では MGMT 遺伝子の DNA メチル化を認めなかった。図 1 のごとく MDS 骨髓における MGMT 遺伝子の DNA メチル化は全体で 31 % に認められた。RA から RAEB、RAEB in T、CMMoL と順次 MGMT 遺伝子メチル化率が上昇した。一方 AML 症例では MDS から

overt AML に移行したものでは MGMT 遺伝子の DNA メチル化率は 40 % を越えていたが、de novo AML では 10 % 以下と非常に低い傾向を示した。経過を追ってサンプルを解析し得た症例では MDS から AML に移行するに従い、一部の症例では MGMT 遺伝子 DNA メチル化を認めた。予後の追跡できた症例 40 例の解析では DNA メチル化の有無は全生存率と  $p=0.04$  で有意差を認めた。

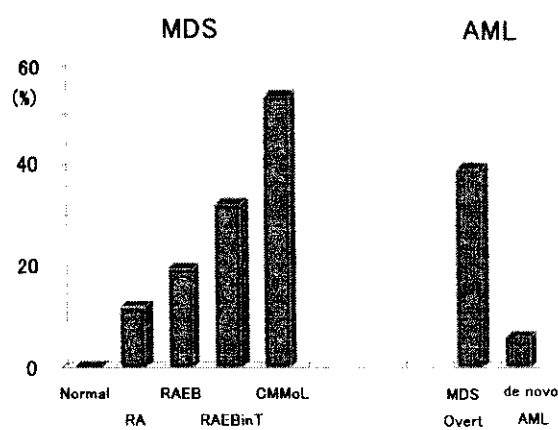


図 1 MDS 病型による MGMT 遺伝子 DNA メチル化の頻度

## D. 考 察

MDS においては我々および他のグループから p15 を初めとする癌抑制遺伝子の DNA メチル化に対する不活化が病態進展と関連することが報告され<sup>4,5)</sup>、治療面では 5-aza deoxycytidine などの DNA メチル化阻害剤が MDS 治療薬として有望であることが報告されている。DNA メチル化阻害

剤の標的が p15 等の既報のものだけであるかについてははまだ結論が得られていない。MGMT 遺伝子はアルキル化剤による DNA 損傷からの細胞死を抑制する機能が知られている。消化器がん、肺がんなどではメチル化による MGMT 遺伝子の不活化が p53、K-ras 遺伝子の mutation を増加することが報告されており<sup>1,2)</sup>、一方ではその裏返しで悪性リンパ腫ではメチル化による MGMT 遺伝子の不活化は抗癌剤の耐性化機序により、予後良好因子となることが報告されている<sup>3)</sup>。白血化のよいモデルと考えられる MDS での MGMT 遺伝子の DNA メチル化の解析は極めて重要なテーマと考えられる。今回の我々の研究は MDS での MGMT 遺伝子の DNA メチル化による不活化は de novo AML に比して高率であること、病態進展と共に高率化することが明らかになった。予後不良因子である可能性が推測され、実際の 40 症例の予後解析では MGMT 遺伝子の DNA メチル化が統計学的に有意な予後不良因子であることが明らかとなった。もちろんこの背景には芽球の増加が連動しており、MGMT 遺伝子の DNA メチル化が独立した予後因子と成りうるかは今後の問題である。また、遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化が必ずしもタンパクの発現量と相関しないとする報告もあり、今後塗沫標本の免疫染色にて検等を行う予定である。

## E. 結 論

1. MGMT 遺伝子のメチル化は MDS 症例の約 30 %に認められ、芽球の多い症例により高頻度であった。
2. MGMT 遺伝子のメチル化症例は overall survival で有意に予後不良であった。

## F. 研究発表

学会発表

平成 15 年度日本血液学会にて発表予定

## G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## H. 参考文献

1. Wolf P, et al. Cancer Res 61: 8113-8119, 2001
2. Park TJ, et al. Cancer 92: 2760-2768, 2001
3. Esteller M, et al. J Natl Cancer Inst 94: 26-32, 2002
4. Uchida T, et al. Blood 90: 1403-1409, 1997
5. Quesnel B, et al. Blood 91: 2985-2990, 1998

# 骨髓異形成症候群における抗アポトーシス分子 Survivin の発現解析 —新しいスプライス・バリエントの同定—

上田 孝典、吉田 明、今村 信

福井医科大学 第一内科

**研究要旨** 骨髓異形成症候群（MDS）の患者の単核球における Survivin 発現の検討をおこなったところ、MDS の RA、RAEB、RAEBt 症例で高率に発現していることを見出した。一方、CMMoL ではほとんど発現していないことがわかった。また、この検討過程で、Survivin の新しいスプライス・バリエントを同定した。このバリエントは、本来、intron3 を構成している一部分が、あらたな exon3B となったものであり、survivin-3B と命名した。この新規のスプライス・バリエントは、Survivin 本体の遺伝子の高発現がみられた MDS の RA、RAEB、RAEB-t の症例において発現がみられた。

## A. 研究目的

骨髓異形成症候群（MDS）において、アポトーシス抑制因子の発現がどのような状態にあるかを検討するため骨髓異形成症候群の患者より得られた単核球における survivin 発現の検討をおこなった。また、この検討の過程で survivin の新しいスプライス・バリエントを同定したので、その発現についても検討した。

## B. 研究方法

### 1. 単核球分離および RNA 抽出。

同意の得られた患者からの末梢血または骨髓血より単核球を分離した後、RNA easy kit (Qiagen) を用い Total RNA を分離した。

2. cDNA は superscript preamplification system (life Technologies, USA) を用いて合成した。Survivin cDNA の増幅のためのプライマーは exon 1 に対応する forward primer 5'-CACCGCATCTCTACATTCAA-3' Exon 4 に対応する reverse primer 5'-CACTTTCTTCGCAGTTTCCT-3' (図 1) を用い 30 cycle の増幅を実施した。PCR 産物は 1.8 % アガロースゲルを用い分析した。また、Actin を内部標準として用いた。

3. Survivin スプライス・バリエントの cDNA cloning. 上記の方法でおこなった RT-PCR 後の amplified product を NuSieve ゲルで分離後、目的の DNA バンドをゲルから切り出し、サブクローニングをおこない、DNA sequence を決定した。

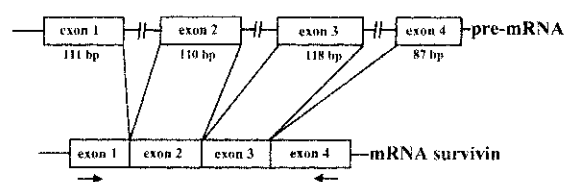


図 1 Survivin 遺伝子の構造と PCR プライマーの対応位置

## C. 研究成果

①MDS の RA、RAEB および RAEBt において比較的強い survivin の発現を認めた。②CMMoL では、survivin の発現は、ほとんど認められなかった (図 2)。③AML では、調べた範囲の症例においては、FAB 分類と Survivin 発現の間に一定の関係を見いだせなかった。④RT-PCR 後の amplified product を NuSieve ゲルで分離したところ図 3 に示すように、survivin 遺伝子本体とは size の異なる複数の cDNA amplified product を認めた。これらの DNA バンドをゲルから切り出し、サブクローニングをおこない、DNA sequence を決定した。#1 のバンドを解析したところ、本来、survivin の intron3 を構成している一部分が、あらたな exon3B となり exon3 と exon4 の間に挿入された構造となっている新しいスプライスバリエントであることが判明した (図 4)。exon4 の比較的上流に stop codon が出現することにより全アミノ酸は 120 となることが予想される。我々は、このスプライス・バリエントを survivin-3B と命名した (図 5)。この新規のスプライス・バリエン

トは、Survivin 本体の遺伝子の高発現がみられた MDS の RA、RAEB、RAEB-t の症例において発現が確認された。

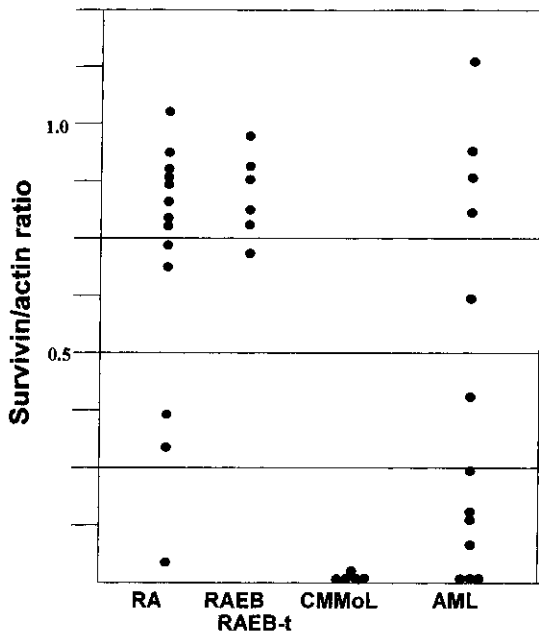


図2 各症例の survivin 遺伝子の発現

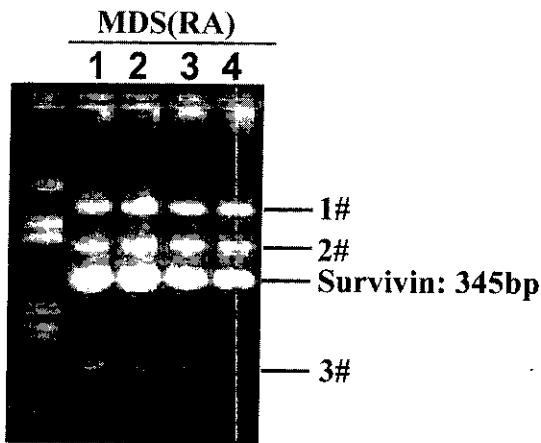


図3 NuSieve ゲルによる survivin 遺伝子 RT-PCR 後の amplified product の分離 (サンプルは MDS (RA) 患者由来)

#### D. 考 察

Survivin の発現パターンを調べた結果、MDS の RA および RAEB、RAEBt において強い発現を示す症例を高率に認めた (図 2)。しかしながら、一方で、CMMoL では Survivin の発現は低い傾向にあり、興味深いことに CMMOL は他の MDS のサブカテゴリーの疾患とは好対照を示すことがわかった。また、我々の同定したスプライス・バリ

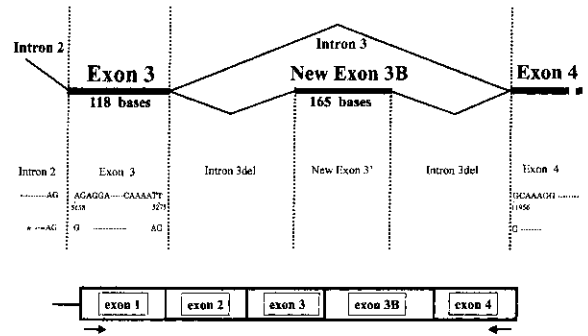


図4 新しいスプライス・バリエント、survivin-3B の遺伝子の構造

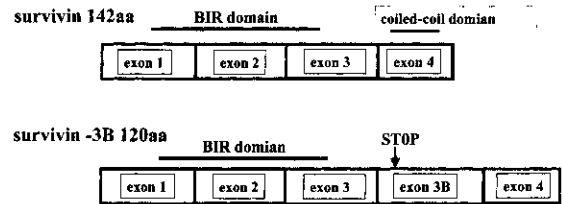


図5 Survivin 本体と survivin-3B の遺伝子のドメイン構造

アント (survivin-3B) は、本来、survivin の intron3 を構成している一部分が、あらたな exon3B となり exon3 と exon4 の間に挿入された構造をとっている。(図 4)。Survivin は、アポトーシスの抑制に重要な役割を果たすと考えられる BIR (Baculoviral IAP repeat) ドメインを有するが、我々の同定したスプライス・バリエント survivin-3B も BIR ドメインを有している。しかしながら、本来 C 末端に存在すべき coiled-coil domain は欠如していると考えられる (図 5)。Survivin の発現は細胞周期に依存しており、M 期において強い発現が認められことが知られており、M 期において coiled-coil domain が紡錘糸と結合することにより細胞分裂に関与しているのではないかと報告されている。survivin-3B は coiled-coil domain は欠如していることより M 期における生物学的な役割は、survivin 本体とは異なると考えられる。

#### E. 結 論

① MDS の RA、RAEB、RAEBt において survivin の高発現を認めた。② survivin の新しいスプライス・バリエント、survivin-3B の存在を見出した。

#### F. 研究発表

1. Badran A, Yoshida A, Wano Y, Mutoh M, Imamura S, Yamashita T, Tsutani H, Inuzuka M, Ueda T. Expression of the anti-apoptotic gene survivin in myelodysplastic syndrome. *Int J Oncol.* 2003 22(1): 59-64
2. Badran A, Yoshida A, Wano Y, Imamura S, Yamashita T, Tsutani H, Inuzuka M, Ueda T. Expression of the antiapoptotic gene survivin in chronic myeloid leukemia. *Anticancer Res.* 2003. in Press.

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

#### H. 参考文献

1. Ambrosini G, et al. *Nat Med* 3: 917-921, 1997.
2. Li F, et al. *Nat Cell Biol* 8: 461-466, 1999.

# 骨髓異形成症候群におけるテロメラーゼ活性の検討

石田 陽治、八嶋亜紀子、伊藤 薫樹、前沢 千早、増田 友之

岩手医科大第3内科・第2病理

**研究要旨** 今回我々が確立したテロメラーゼ活性測定 (TRE assay) は従来の測定法である TRAP 法に比較し、短時間で、簡単な操作で PCR-artifact なしにテロメラーゼ活性を定量化し得る優れた方法であった。造血器悪性腫瘍細胞株 (K562、PEER) を用いた検討では濃度依存性、時間依存性の伸長反応が確認できた。骨髓異形成症候群 (MDS: RA、RAEB、CMMoL) の骨髓単核球分画では順次高値を示した。今後解析を進めるにあたって、各病型あるいは造血幹細胞の分集による解析が不可欠と思われた。

## A. 研究目的

表面プラズモン共鳴現象を応用し、1 pg オーダーで重量変化の経時的測定が可能な生体内分子間相互作用解析装置 (BIACORE 3000、BIACORE AB, Sweden) を用いて、テロメラーゼの定量的評価法 telomeric repeat elongation (TRE) assay を開発した。さらに、造血器腫瘍細胞株ならびにヒト骨髓単核球分画のテロメラーゼ活性の定量化を試みた。

## B. 研究方法

TRE assay の概略を図1に示す。

①Sensor Chip の作製：テロメア配列からなるオリゴヌクレオチドの5'端をビオチン化し、SA chip (BIACORE) 上に固定化した (1,500 RU、1 RU: 1 resonance unit = 1 pg)。②細胞株とテロメラーゼ蛋白質の抽出：白血病。悪性リンパ腫の培養細胞株、K562、PEER および MDS 患者の骨髓単核球から CHAPS 液にて蛋白質を抽出し、0.5 mg/mL の濃度に調整した。③TRE assay：生体内分子間相互作用解析装置 (BIACORE) を用いて、sensor chip 上でフローセルと呼ばれる 20 nl 程の流路系に抽出液をロードした。37°C、pH 7.4 で 1-30 min 反応させ、蛋白質注入前のベースラインと、反応終了後との差 ( $\Delta$ RU) を elongation-value (e-value) と定義した (図2)。

## C. 研究成果

①培養細胞株を用いた TRE assay に関する基礎的検討では、negative control 試験、濃度・時間依

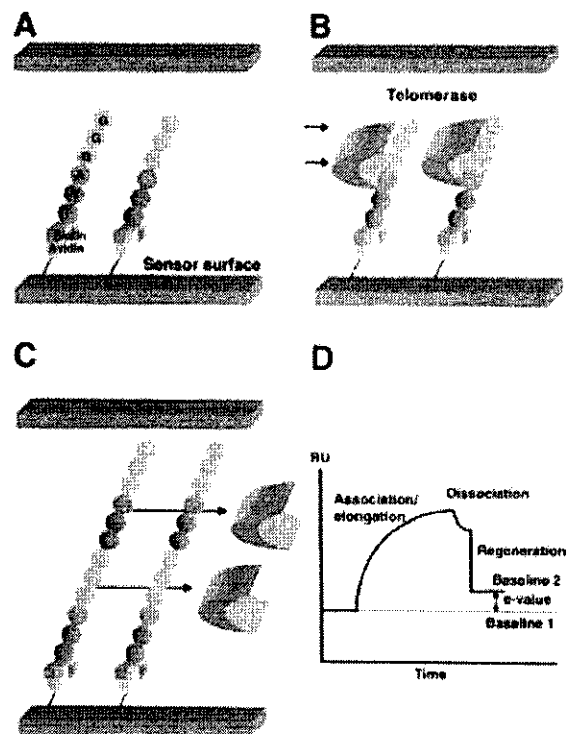


図1 Telomeric repeat elongation assay の概略  
センサーチップの表面に TTAGGG のテロメア配列を固定化する (A)。ここにテロメラーゼを結合させ (B)、塩基の伸長を生じさせる (C)。さらに 1% SDS 溶液で結合蛋白質を除去して、はじめのベースラインとの差を求める。この間の重量変化は (D) のセンサーグラムに継時的に記録され、伸長したテロメア配列の重量 elongation value (e-value) が求められる。

存性試験を行い、正確なテロメラーゼ活性の評価が可能であった (図2、3)。

②センサーチップ上から回収した DNA 断片で、伸長反応が生じていることを確認した (図2)。

③従来の TRAP assay による解析結果と比較的良好な相関を示した (図4)。

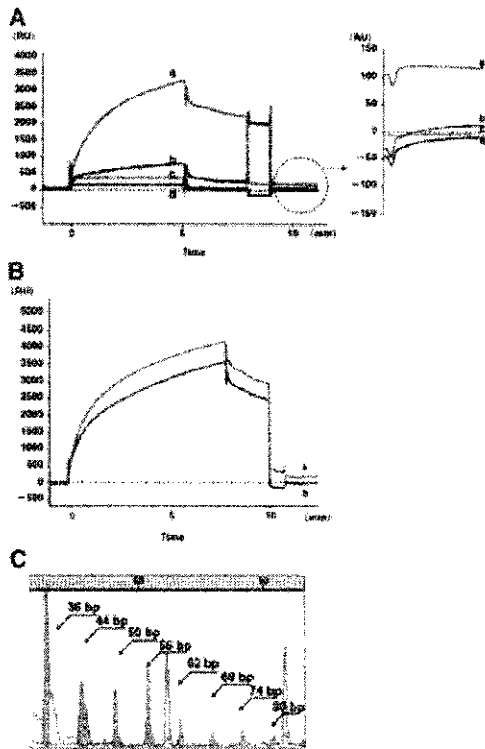


図2 TRE assayの基礎的検討  
陰性コントロール (b, dNTP 除去; c, 熱失活; d, buffer 単独) では伸長は見られない (A)。センサーチップに 3' 端を固定化したものでは伸長は見られない (B)。回収した oligonucleotide を増幅すると 6 塩基毎の伸長が確認できる (C)。

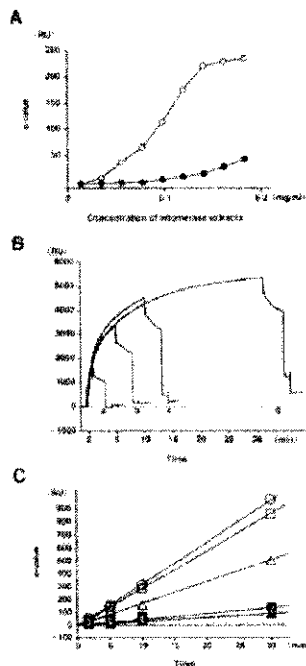


図3 TRE assayの基礎的検討  
濃度依存性 (A)、時間依存性 (B and C) の伸長反応が確認できた。

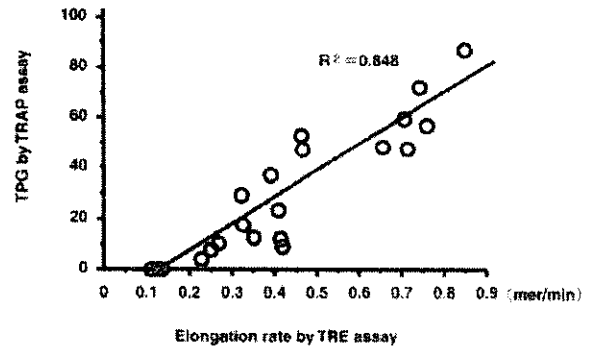


図4 TRE assayと従来のTRAP assayの解析結果の比較



図5 ウェスタンブロットによるhTERTの発現解析

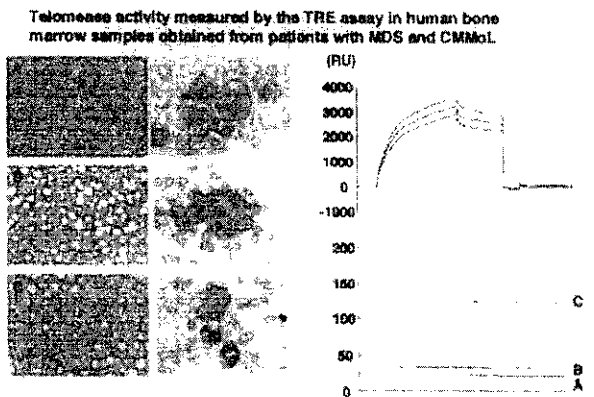


図6 MDSおよびCMMoL患者におけるTRE assayの解析結果。MDS RA (A)、MDS RAEB (B)、CMMoL (C)。それぞれのe-valueは(A) 19、(B) 39、(C) 126であった。

④造血器悪性腫瘍細胞株および骨髄単核球分画でも解析可能であった (図5、6)。

⑤K562はPEERに比較してテロメラーゼ活性が高く、hTERTのウェスタンブロットの結果と一致していた (図5)。

⑥骨髄単核球分画におけるテロメラーゼ活性は、CMMoL 126 > RAEB 39 > RA 19の順であった (図6)。

#### D. 考案

MDSは、無効造血と急性白血病進展を特徴とする、原因不明の疾病である。染色体末端構造テロメアの短縮が、MDSの病因・病態の形成に関



与しているという telomere hypothesis (図 7) は、MDS の発症機構を解明するにあたって、有力な作業仮説のひとつとなっている。我々は、テロメア動態からみた MDS の病態解明にむけて、生体内分子間相互作用解析装置を用いたテロメラーゼ活性の新規定量法を開発した。この TRE アッセイは操作性の簡便さ、再現性、従来の方法との高い相関性などの点で、臨床検体にも十分応用可能と考えられた。

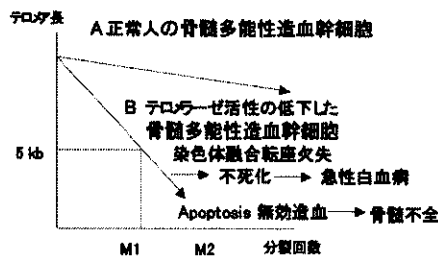


図 7 MDS の病因・病態の形成に関する telomere hypothesis 正常の造血幹細胞に比べて (A) MDS ではテロメアの短縮が加速され、無効造血や急性白血病を発症しやすくなる (B)。

## E. 結 論

TRE assay は従来のテロメラーゼ測定法である TRAP 法に比較し、短時間で簡単な操作で PCR-artifact なしにテロメラーゼ活性を定量化し得る優れた方法であった。

今後解析を進めるにあたって、各病型あるいは造血幹細胞の分集による解析が不可欠と思われる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Maesawa C et al. A rapid biosensor chip assay for measuring of telomerase activity using surface plasmon resonance. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jan 15; 31(2): E4-4.
2. 飯島信 他. 食道扁平上皮癌におけるテロメラーゼを標的分子とした治療戦略に対する基礎的検討. *岩手医誌* 54 巻, 275-284, 2002.
3. 稲葉亨 他. 表面プラズモン共鳴現象を応用したテロメラーゼ活性定量的測定法の開発. *岩手医誌* 53, 317-325, 2001.

### 2. 学会発表

1. Maesawa C et al.: A novel primer extension assay for the evaluation of telomerase activity using surface plasmon resonance. Special conference in American Association for Cancer Research, 2002, Dec, San Francisco.

## G. 知的所有権の取得状況

なし

## H. 参考文献

1. Maesawa C et al. A rapid biosensor chip assay for measuring of telomerase activity using surface plasmon resonance. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jan 15; 31(2): E4-4.
2. 飯島信 他. 食道扁平上皮癌におけるテロメラーゼを標的分子とした治療戦略に対する基礎的検討. *岩手医誌* 54 巻, 275-284, 2002.
3. 稲葉亨 他. 表面プラズモン共鳴現象を応用したテロメラーゼ活性定量的測定法の開発. *岩手医誌* 53, 317-325, 2001.

# 鉄芽球性貧血の姉妹例における X 染色体不活化の解析

唐沢 正光<sup>1</sup>、塚本 憲史<sup>2</sup>、三井 健揮<sup>2</sup>、前川 出<sup>2</sup>、横濱 章彦<sup>2</sup>、野島 美久<sup>2</sup>

群馬大学輸血部<sup>1</sup>、群馬大学第三内科<sup>2</sup>

**研究要旨** 遺伝性鉄芽球性貧血の大半は X 染色体上の ALAS-2 遺伝子の異常による。通常は男性に発症するが、健常 X 染色体の不活化による女性例の報告もあり、この際には発症年齢は通常より高くなる。我々は鉄芽球性貧血の 53 歳と 48 歳の姉妹例を経験した。HUMARA 遺伝子を用い X 染色体不活化を検索したところ両症例とも同じ X 染色体を両親より受け継いでいること、かつ顕著に偏った X 不活化パターンを示すことが明らかとなった。

## A. 研究目的

鉄芽球性貧血は環状鉄芽球増加を特徴とするヘテロな疾患群である。遺伝性と獲得性に大別され、前者では X-linked ALAS-2 遺伝子異常が大半を占め、通常男性に発症する<sup>1)</sup>が、稀に X 染色体不活化の著しい偏りに起因する女性例の報告もある<sup>2)</sup>。今回、鉄芽球性貧血姉妹例を経験し、その X 染色体不活化状態を解析した。

## B. 研究方法

[症例] 姉は 53 歳。1972 年妊娠時に貧血を指摘された。分娩後も貧血が持続したため当院受診、Hb 8.2 g/dl、骨髓穿刺で鉄芽球性貧血と診断された。現在、Hb 6.0 g/dl、WBC 4600/ $\mu$ l、血小板 40.6 万/ $\mu$ l、フェリチン 365.5 ng/ml、環状鉄芽球 35%。妹は 48 歳。数年前から貧血を指摘され、Hb 7.7 g/dl、WBC 4000/ $\mu$ l、PLT 30.1 万/ $\mu$ l、フェリチン 111.9 ng/ml、環状鉄芽球 58%、鉄芽球性貧血と診断された。いずれの症例も骨髓細胞に顕著な形態異常はなかった。

[方法] 末梢血を Ficoll で分離、中間層に CD3 磁気ビーズを反応させ T 細胞分画、pellet を顆粒球分画とした。各分画から DNA を抽出、HUMARA 遺伝子を PCR 法にて増幅後、キャピラリー電気泳動法によるクロナリテイ解析<sup>3)</sup>を行った。

## C. 研究成果

2 症例とも電気泳動後 2 本のバンドの位置は完全に一致しており、HUMARA 遺伝子の (CAG)<sub>n</sub> 繰り返し回数は 2 症例ともまったく同じと考え

られた。メチル感受性制限酵素 HpaII 消化後、顆粒球分画、T 細胞分画ともに片方の同じ位置のバンドのみピークが消失しており、X 染色体の不活化に著しい偏りがあることが明らかとなった。(図 1)

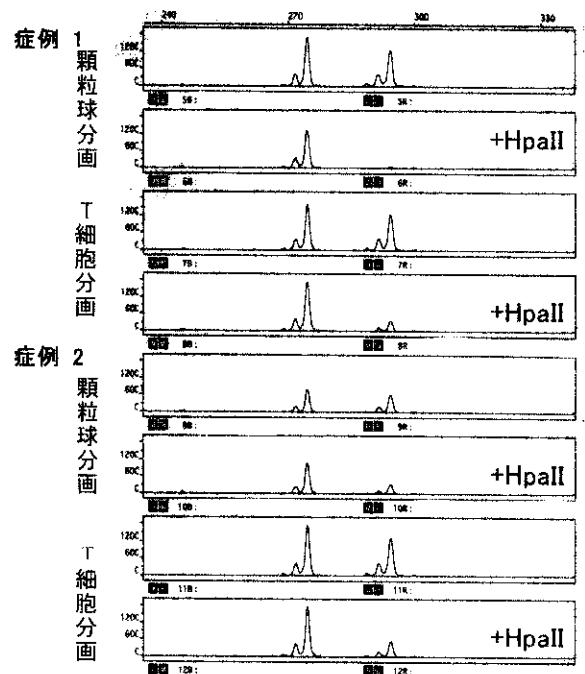


図 1

## D. 考 案

今回検討した 2 症例は、HUMARA 遺伝子増幅後のバンドの位置が完全に一致しており、どちらも両親から同じ X 染色体を引き継いでいると考えられた。さらにメチル感受性制限酵素処理後、同じ位置のバンドのみが消失していた。よって同じ X 染色体が偏りをもって不活化し、これが疾患発

症と関連がある可能性が考えられた。

#### E. 結 論

今後、さらなる家系調査、ALAS-2 遺伝子の塩基配列決定が必要である。

#### F. 研究発表

なし

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

#### H. 参考文献

1. Alcindor T, and Bridges KR, Br J Haemat, 116, 733, 2002
2. Cazzola M, et al, Blood 96, 4363. 2000
3. Karasawa M, et al, Int J Hematol 74, 281, 2001

