

厚生労働科学研究費補助金  
(難治性疾患克服研究事業)

# 特発性造血障害に関する調査研究班

平成 15 年度総括・分担研究報告書

平成 16 年 3 月

主任研究者 小 峰 光 博

## 序

この総括・分担研究報告書には、厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 特発性造血障害に関する調査研究班 における平成 15 年度の研究経過とその成果が記載されている。

平成15年度は、先行する平成 11 ～ 13 年度の第 1 期に続く第 2 期目の 2 年目に当たる。今年度に行われた特定疾患対策研究の全般的な改変に伴って、研究事業名が「難治性疾患克服研究事業」に改められた。

いうまでもなく本班は再生不良性貧血、溶血性貧血、不応性貧血（骨髄異形成症候群）および骨髄線維症の 4 疾患を研究対象疾患としているが、これらは低頻度で原因不明、かつ治療法が未確立のいわゆる血液難病を代表する病態群である。それぞれの病因・病態発生の究明には細胞生物学・分子遺伝学を含む先端の知識と技術が不可欠であり、その展開は日々加速度を高めている。一方、治療介入的なアプローチにも多様な選択肢が導入されてきており、患者福祉の向上に役立てるにはそれらの適切な評価が必要である。

本班の特徴的な性格として、大型臨床研究班であり、複数の造血障害を対象とし、最長 30 年以上の長い歴史をもつことがあげられる。患者実態の把握に全国規模の症例調査を行うとともに、共同して臨床研究・治療研究に当たり、得られた成果を実地臨床に還元するよう力を注ぐことが重要である。研究の進め方として、疾患別の縦割りとは細胞移植療法、遺伝子研究、遺伝子治療などの横断的アプローチを組み合わせ、分担研究者がそれぞれを担当して主導調整する方法を踏襲している。重点研究；骨髄異形成症候群に対する新規治療法の開発に関する研究班とはいわば親子関係にあり、班会議、班員会議等はすべて合同で開催し、共同研究にも相互に協力し合うなどの原則を確認した。平成 15 年 8 月に主任研究者平井久丸教授（東京大）の急逝という予測を超えた事態に見舞われたが、当局のご理解を得て三谷絹子教授に引き継がれ、支障なく研究が継続されたことは誠に幸いであった。

対象 4 疾患に共通する研究課題として、大規模な追跡調査により疾患の自然歴を把握すること、診断基準・重症度区分等の必要な見直しと再点検を行うこと、治療法選択について現状で最善と考えられる診療ガイドラインを作成・提示し、臨床現場での評価を受けることを目標とし、具体的な準備を開始することとした。継続課題とされたものについても研究期限内の完了を目指し、新たに提案された研究課題についても十分な事前検討を経て進めることとした。

平成 14 年度に公費負担による治療研究事業を中心とした全般的な見直しと改正が行われ、平成 15 年 10 月から実施の運びとなった。本班に関連するのは再生不良性貧血であり、新しい認定基準を採用し、軽快者の枠付けを導入し、改訂された臨床調査個人票を用いて新たな申請が始められた。

研究費補助金の取り扱いに伴う事務委任の制度が各施設に次第に浸透してきており、今年度は分担研究者、研究協力者の施設すべてで事務委任がなされるに至った。

特定疾患対策事業の改変に当たり、本年度はとくに健康局疾病対策課のご指導とご助言が必要であった。ここに謹んで感謝いたします。

平成 16 年 3 月 31 日

主任研究者 小 峰 光 博

# 序

## 目 次

特発性造血障害に関する調査研究班 構成員名簿	1
------------------------	---

平成 15 年度総括研究報告	3
----------------	---

小峰 光博

付 1 平成 15 年度 第 1 回 合同班会議総会プログラム

付 2 平成 15 年度 第 2 回 合同班会議総会プログラム

付 3 特定疾患治療研究事業の改正について

(1) 認定基準の見直しについて

(2) 臨床調査票個人票の見直しについて

(3) 軽快者の基準について

(4) 再生不良性貧血の認定基準

(5) 臨床調査個人票 (1. 新規、2. 更新) (重症度分類含む)

付 4 共同研究の研究計画書

(1) 特発性造血障害におけるウイルス感染の検索

(2) ATG 再投与に関する調査

(3) 同種造血幹細胞移植を受けた成人再生不良性貧血患者の予後に関する調査計画書

(4) 再生不良性貧血の治療と予後に関するレトロスペクティブ調査実施計画書

(5) 再生不良性貧血の前方視症例登録：セントラルレビュー実施計画書

(6) 原発性慢性骨髄線維症の全国調査

(7) 高齢者または臓器障害を有する high-risk 骨髄異形成症候群症例に対する骨髄非破壊的移植前治療を用いた同種末梢血幹細胞移植に関する臨床第 I / II 相試験プロトコール (表紙と修正部分)

(8) 骨髄異形成症候群における AML 1 遺伝子変異に関する研究

## 研究報告

### I. 再生不良性貧血

1. ATG 再投与に関する調査結果	62
--------------------	----

浦部晶夫・壹岐聖子・白杵憲祐・大橋春彦・小峰光博

2. 再生不良性貧血に対する ATG 療法におけるシクロスポリン併用の意義の検討	64
--	----

大橋 春彦・服部満美子・寺澤晃彦・津下圭太郎・内海 真

3. 同種造血幹細胞移植を受けた成人再生不良性貧血患者の移植法の実態と長期予後について	68
---	----

岡本真一郎

4. 小児期発症造血障害疾患の病型頻度 .....	72
月本一郎・小原 明・小島勢二・中畑龍俊・大賀正一 矢部みはる・工藤寿子・麦島秀雄	
5. 当科における中等症/重症再生不良性貧血の検討 .....	76
別所正美・石川真穂・三角素弘・矢ヶ崎史治・松田 晃	
6. Two-color フローサイトメトリーを用いた微少PNH血球検出の信頼性 .....	79
中尾眞二・杉盛千春・中条達也・平郡雄二・小峰光博	
7. Fanconi 貧血患者における FANCA 遺伝子の解析 .....	83
浅野茂隆・山下孝之	
8. Pure Red Cell Aplasia を併発した $\gamma$ $\delta$ T 細胞性顆粒リンパ球増多症における TCR 遺伝子再構成の解析 .....	86
唐沢正光・三井健揮・前川 出・横濱章彦・塚本憲史・野島美久	
9. MicroSAGE 法による赤芽球分化における初期段階の遺伝子発現解析 .....	88
澤田賢一・藤島直仁・藤島眞澄・市川喜一・廣川 誠 深谷博志・斉藤邦江・川端良成	
10. 各種造血器疾患における血清 SCGF 定量の意義 .....	90
堀田知光・伊東千絵・安藤 潔	
 <b>II. 溶血性貧血</b>	
11. Rh 抗原エピトープ群の赤血球膜発現メカニズムの解析 .....	94
梶井英治・亀崎豊実・小山田隆・熊田真樹・近江俊徳 奥田 浩・岩本禎彦・小峰光博	
12. PNH 異常幹細胞のクローナルな拡大メカニズム .....	97
木下タロウ・井上徳光・泉井朋久・村上良子・植田康敬	
13. 補体 (C5、C8、C9) に対する RNA アプタマーを用いた PNH に対する溶血阻害薬の開発 .....	99
金倉 讓・小峰光博・西村純一・Bruce Sullenger・Russell Ware	

### Ⅲ. 不応性貧血

14. 不応性貧血症例の新規登録の報告 ..... 102  
通山 薫・伊藤 満・内山 卓・小峰光博
15. 小児骨髓異形成症候群の中央診断 ..... 104  
中畑龍俊・真部 淳
16. 日独不応性貧血 (RA+RCMD) 比較研究 ..... 107  
朝長万左男・対馬秀樹・別所正美・陣内逸郎・松田 晃
17. 小児特殊型 MDS にみられる分子異常 ..... 110  
小島勢二
18. 低リスク骨髓異形成症候群に対するシクロスポリン療法-中間検討 ..... 112  
内山 卓・通山 薫・石川隆之
19. 高齢者または臓器障害を有する high-risk 骨髓異形成症候群症例に対する  
骨髓非破壊的移植前治療を用いた同種末梢血幹細胞移植に関する  
臨床第I/II相試験：中間解析 ..... 114  
谷本光音・池田和真・藤井伸治・豊嶋崇徳・品川克至・石丸文彦・原田実根
20. MDS の鑑別診断におけるP53免疫染色の意義について  
WAVE System および Single Cell PCR を用いた検討 ..... 116  
村手 隆・杉崎千穂・浅野治彦・木下朝博・直江知樹・伊藤雅文
21. ハイリスク MDS における 5'-nucleotidase 発現の検討 ..... 118  
石田陽治・鈴木啓二郎・伊藤薫樹・村井一範
22. 抗白血病剤シタラビン (ara-C) によるアルキル化剤の  
DNA 損傷修復の阻害と殺細胞効果の増強 ..... 121  
上田孝典・山内高弘
23. 骨髓異形成症候群における CREB-binding protein (CBP) および p300 の遺伝子変異解析 ..... 124  
大西一功・重野一幸・吉田 均
24. 骨髓異形成症候群における SDF-1/CXCR4 系異常とアポトーシスとの関連 ..... 126  
金丸昭久・松田光弘・森田泰慶・辰巳陽一・前田裕弘
25. AML1/RUNX1 の点突然変異は骨髓異形成症候群 (MDS) に高頻度に認められる ..... 128  
木村昭郎・新美寛正・原田浩徳・原田結花・稲葉俊哉

#### IV. 骨髓線維症

26. 原発性慢性骨髓線維症の臨床像および予後因子の検討 ..... 132  
原田実根・下田和哉・谷本哲也・岡村 孝
27. 骨硬化症を伴う急性巨核芽球性白血病の芽球由来 IL-11 は  
オステオプロテゲリン ((OPG) を誘導する ..... 134  
新津洋司郎・松永卓也・佐藤 勉

#### V. 移植・遺伝子治療

28. 慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療法の開発 ..... 138  
小澤敬也・上田享司・岡田真由美・高德正昭・花園 豊・久米晃啓
29. 非血縁者間同種臍帯血移植後の造血系・免疫系再構築の検討 ..... 140  
今村雅寛・東海友美・三浦洋子・田中淳司

#### 発表文献リスト

1. 再生不良性貧血に関する研究業績 ..... 144
2. 溶血性貧血に関する研究業績 ..... 146
3. 不応性貧血に関する研究業績 ..... 148
4. 骨髓線維症に関する研究業績 ..... 153
5. 細胞移植療法に関する研究業績 ..... 153
6. 遺伝子治療に関する研究業績 ..... 158
7. その他／各領域に共通する研究業績（造血幹細胞、サイトカイン、血球代謝などを含む） ..... 160

特発性造血障害に関する調査研究班 構成員名簿

平成15年度

区分	氏名	所属	職名	備考
主任研究者	小峰 光博	昭和大学藤が丘病院内科血液	教授	AIHA
分担研究者	浅野 茂隆	東京大学医科学研究所内科	教授	細胞移植領域
	内山 卓	京都大学大学院血液・腫瘍内科	教授	不応性貧血
	浦部 晶夫	NTT 関東病院血液内科	部長	再生不良性貧血
	小澤 敬也	自治医科大学血液学	教授	遺伝子治療領域
	金倉 譲	大阪大学大学院血液・腫瘍内科	〃	PNH
	朝長万左男	長崎大学医学部原研内科	〃	
	中畑 龍俊	京都大学大学院発達小児科	〃	小児科領域
	原田 実根	九州大学大学院病態修復内科	〃	骨髓線維症
	村手 隆	名古屋大学保健学科病因・病態検査学	〃	
研究協力者	石田 陽治	岩手医科大学第3内科	助教授	
	今村 雅寛	北海道大学大学院癌制御医学	教授	
	上田 孝典	福井医科大学第1内科	〃	
	大西 一功	浜松医科大学第3内科	助教授	
	大橋 春彦	国立名古屋病院臨床研究センター	部長	
	岡本真一郎	慶応義塾大学内科	助教授	
	梶井 英治	自治医科大学法医学・人類遺伝学	教授	
	金丸 昭久	近畿大学血液・腎臓・膠原病内科	〃	
	唐沢 正光	群馬大学医学部附属病院輸血部	助教授	
	木下タロウ	大阪大学微生物病研究所	教授	
	木村 昭郎	広島大学原医研血液内科	〃	
	小島 勢二	名古屋大学大学院成長発達医学	〃	
	澤田 賢一	秋田大学第3内科	〃	
	谷本 光音	岡山大学大学院血液・腫瘍・呼吸器内科	〃	
	月本 一郎	東邦大学第1小児科	〃	
	通山 薫	川崎医科大学検査診断学	〃	
	中尾 眞二	金沢大学大学院細胞移植学	〃	
	新津洋司郎	札幌医科大学第4内科	〃	
	別所 正美	埼玉医科大学第1内科	〃	
	堀田 知光	東海大学血液・腫瘍・リウマチ内科	教授・学部長	
佐多徹太郎	国立感染症研究所感染病理部	部長	微生物班	
杉田 稔	東邦大学医学部衛生学	教授	疫学班	
事務局	原田 浩史	昭和大学藤が丘病院内科血液 〒227-8501	講師	
		神奈川県横浜市青葉区藤が丘1-30 TEL 045-971-1151 (EXT 6385) FAX 045-973-8833		
経理事務 担当	内野 康博	昭和大学藤が丘病院経理課 TEL 045-971-1151 (EXT 6206) FAX 045-973-1019	課長補佐	

# 平成15年度総括研究報告

主任研究者 小 峰 光 博

昭和大学藤が丘病院



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
平成 15 年度 総括研究報告

特発性造血障害に関する調査研究

主任研究者 小峰 光博 昭和大学藤が丘病院内科 教授

研究要旨

再生不良性貧血、溶血性貧血、不応性貧血（骨髄異形成症候群）、骨髄線維症の4疾患を対象疾患とし、継続課題と新たに計画された課題とを着実に進展させ、3年間の目標とした事項の達成に向けて研究活動を推進した。再生不良性貧血では新たに5種の共同研究計画が立案、開始され、一部は中間成績がまとめられた。発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）では国際協力による診断基準設定、患者登録、臨床試験に向けた動きに積極的に参加した。不応性貧血では、症例登録、免疫抑制療法の評価研究が続けられ、分子病態究明のための研究が成果を挙げた。骨髄線維症は多数例の把握と追跡により我が国での自然歴が把握された。これらの成果は今後の包括的な診療ガイドラインの作成にあたって不可欠なエビデンスを提供するものとなる。

分担研究者

浅野 茂隆 東京大学医科学研究所内科  
内山 卓 京都大学血液・腫瘍内科  
浦部 晶夫 NTT 関東病院 血液内科  
小澤 敬也 自治医科大学 血液学  
金倉 譲 大阪大学 血液・腫瘍内科  
朝長万左男 長崎大学原研 内科  
中畑 龍俊 京都大学 発達小児科  
原田 実根 九州大学 病態修復内科  
村手 隆 名古屋大学 保健学科

根本過程と一体となり相互に不可分の関係にあって、病態の解明は正常生理の解明と表裏といえるほどに密接していると考えられるからである。近年における医学研究の急速な展開を考慮すると、目標の達成のためには、優れた先見性と熱意を備えた指導者をもつ主要な臨床施設の参加が不可欠である。本班が大型の臨床研究班として位置付けられ編成されているのもこのことへの理解が得られているからと考えられる。

前年度までに開始した数種の治療法評価のための多施設共同臨床試験を継続するとともに、検体集中による病態解析の共同研究を続行し、成績のとりまとめを急ぐことが当面の優先課題であることは前年と同様である。また、これまでの調査研究で把握された対象疾患患者の追跡調査を行い、それぞれ長期経過および予後の詳細を把握することも重要な共通課題として設定した。これらの知見を集大成することにより、今期内に各疾患について、臨床病態、診断基準、重症度区分および治療法選択、予後因子、自然歴などを含む包括的な診療ガイドラインを作成し提示することを目標とする。

今年度に継続された課題と新たに立案された課

A. 研究目的

本年度は研究期間の第2期の2年目に当たり、3年間の目標達成に向けて計画に沿って着実に研究を進める必要がある。

研究対象疾患は、再生不良性貧血、溶血性貧血、不応性貧血（骨髄異形成症候群）、骨髄線維症の4疾患であり、溶血性貧血としては、自己免疫性溶血性貧血と発作性夜間ヘモグロビン尿症を主な対象としている。これら4疾患の究極の病因は解明されておらず、未だ根本的治療の開発にはいたっていない。それは、これらの疾患が内包する医学生物学上の課題が、造血系の発生と機能発現の

題および到達目標について、共同研究を中心に疾患別に列記する。

## 1. 再生不良性貧血

- 1) 平成 11 年～ 13 年度に送付された臨床調査個人票の電算入力で得られたデータベースの点検整理と再集計による実態把握
- 2) 病因ウイルスの検索を目的とする血液・骨髓試料の集中送付
- 3) 重点研究で登録され免疫抑制薬の併用療法を受けた重症例の定期的追跡調査への協力
- 4) 平成 7 (1995) 年の免疫抑制薬の保険収載による一般化以降に班研究者施設で経験された症例の後方視的収集による治療と予後実態の把握
- 5) 新発症例のセントラルレビューを組込んだ前方視登録システムの確立と整備
- 6) ATG 製剤を含む免疫抑制療法の反復施行の有効性と安全性の評価
- 7) 中等症 (旧区分) に対するシクロスポリン単独投与の前方視治療研究の開始
- 8) 造血幹細胞移植療法を受けた成人例の長期予後と QOL に関する全国調査
- 9) 免疫抑制療法に不応/再発例に対するダナゾールの評価研究の完了と集計
- 10) 微少 PNH 血球、染色体異常、染色体不安定性などの意義の究明
- 11) T 細胞レパトアおよび自己抗原の側面からの免疫病態の解明
- 12) 小児例における病態の特徴と治療研究の推進および成人例との比較
- 13) Fanconi 貧血の遺伝分子病態の究明、診断精度の向上と遺伝子治療の追求

## 2. 溶血性貧血

- 1) 赤血球結合 IgG 定量、寒冷凝集素解析、認識抗原分析および Rh 抗原エピトープ発現機序の解明
- 2) AIHA の二つの症例集団 (後方視的と前方視的) の長期追跡調査
- 3) 難反応性 AIHA に対する各種免疫抑制療法の実態調査と有用性評価

4) PNH の臨床病態・自然歴についての日米共同研究の成果を踏まえたグローバルな協調体制の確立と国際診断基準および診療ガイドラインの作成と提示への寄与

- 5) 補体インヒビター薬剤を含む新しい治療法の開発研究と臨床評価
- 6) PNH クローンの拡大機序の解明 (免疫的攻撃の回避機序と遺伝子変異による増殖能獲得機序の検証)
- 7) PIG-A 変異遺伝子の是正による遺伝子治療の可能性の追求

## 3. 不応性貧血

- 1) 新症例登録の継続と追跡調査の集計、新 WHO 病型分類への対応、データベースの有効利用の検討
- 2) 小児科領域の中央診断登録例の臨床的特徴と経過予後の精査、遺伝的異常の関与
- 3) 低リスク MDS に対するシクロスポリン療法の前方視研究の完了と集計、付帯検討事項 (クローン解析、遺伝子異常、HLA タイプ、T 細胞レパトア、PNH 血球) の解析
- 4) 高齢者および高リスク MDS に対する骨髓非破壊的前処置を用いた同種末梢血幹細胞移植療法の前方視研究の推進と結果の集計
- 5) 骨髓移植療法の実態と長期成績についての我が国の実態の把握
- 6) ビタミン K2 と D3 の併用による治療研究 (重点研究班) への参加
- 7) 重点研究班との協力による遺伝子機序や分子病態の究明と治療法の開発研究
- 8) 検体集中および各個研究による分子病態の究明

## 4. 骨髓線維症

- 1) 新症例の登録体制の継続と既登録症例の追跡調査の実施、臨床病態、予後因子の解析
- 2) 治療計画における造血幹細胞移植療法の適応と位置づけの評価
- 3) サリドマイドなど新しい分子標的治療の調査と集計

4) 実験動物モデルの作製による病因・病態の研究

## 5. 遺伝子治療、移植領域

- 1) 慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療を目指した選択的幹細胞増幅法のサル実験モデルでの検討
- 2) 造血幹細胞移植に伴う免疫現象の分子病態解析

## B. 研究方法

本年度の班構成は主任研究者 1、分担研究者 9、研究協力者 22 の計 32 名であり、総数に変わりはない。研究協力者には横断的基盤研究グループからの 2 名（微生物班、疫学班）が含まれる。重点研究；「骨髓異形成症候群に対する新規治療法の開発に関する研究班」（主任研究者は平成 15 年 8 月平井久丸教授の逝去に伴い三谷絹子教授に引き継がれた）とは密に連携協力し、班員会議および班会議総会を合同で開催した。共同研究、とくに不応性貧血（骨髓異形成症候群）の治療と病態解析に関わる研究計画には重点研究班も同等に参加し、MDS の分子機構の解明や治療法開発に関わる臨床試料の提供などにおいては本班研究者が積極的に協力した。再生不良性貧血領域は浦部晶夫、溶血性貧血領域のうち自己免疫性溶血性貧血は小峰光博、発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）は金倉譲、不応性貧血領域は内山卓、骨髓線維症領域は原田実根が担当し、横断的領域では小児造血障害を中畑龍俊、細胞移植療法領域を浅野茂隆、遺伝子治療領域を小澤敬也がそれぞれ分担して主導した。

全国規模の調査研究にはこれまでと同じく、班研究者施設の他に国立病院をはじめとする全国主要病院、血液学会、臨床血液学会、造血細胞移植学会、小児血液学会など、関連諸学会の理解と協力を得ることとした。

本班は臨床班であることから、必要度の高い臨床的課題に組織的に取り組むことに重点を置き、医学研究や治療研究を共同研究の形で進めることにより臨床現場への還元を図り患者福祉の向上に資することを目標の一つとしてきた。3 年間の研

究課題と到達目標について昨年度に合意した内容に沿って研究が進められた。中でも、共通テーマとして、診断基準および重症度分類の見直しと改訂、既登録例についての長期追跡調査の実施と自然歴の把握、新症例の登録体制の整備と確認、有力な新規治療法の臨床評価への努力、診療ガイドラインの作成などは重点的計画的に準備を進めた。各病態について分子・遺伝子レベルでの究明を目指した共同研究も提案され、必要に応じて検体集中による協力体制をとった。前期の 3 年間で開始された数種の治療研究で、目標到達が遅れているもの、即ち、(1) 不応性貧血に対するシクロスポリン療法、(2) 高齢者/ 高リスク MDS に対するミニ移植、(3) 免疫抑制療法に不応/ 再発性再生不良性貧血に対するダナゾール療法、については早期完了に向けて努力することを確認した。

今年度は、特に再不貧領域の諸問題について、研究班として把握すべき知見や治療実態、患者実態の把握など、重要度と緊急度が高い課題について検討を加え、前方視的に検討すべき課題についてまとめるため検討小委員会（ワーキンググループ）を設け、e-メールによる意見交換を重ねた上で、5 月 30 日に東京で会議をもった。その結果を 7 月の班会議総会に諮り、さらに論議を深めた。結論として、以下の 5 項目が優先順位の高い共同研究課題としてまとめられた。その多くは今年度内に開始され、一部はすでに中間成績がまとめられている。それらは、(1) 免疫抑制療法（主に抗胸腺細胞グロブリン）の成人患者における反復施行についての安全性と有効性に関する再調査の実施、(2) 1991 年からの 10 年間に同種造血幹細胞移植を受け、6 カ月以上生存した 16 歳以上の患者についての長期予後と QOL の全国実態調査、(3) 現行の免疫抑制療法薬（ATG とシクロスポリン）が保険収載された 1995 年以降に新しく診断された再不貧の全症例について班研究者施設の経験例の後方視的調査、(4) 今年度を起点とした成人再不貧症例の前方視登録の開始とセントラルレビュー方式の導入、(5) 中等症（新 5 段階区分での stage 2（中等症）と stage 3（やや重症）に相当）症例に対するシクロスポリン単独による免疫抑制

療法の有効性と安全性を評価する前方視治療研究、である。この中(5)については適応外使用に当たることから、メーカーからの薬剤提供を受ける必要があり、手続き上の理由で開始は次年度になる見込みである。(2)のテーマについては、日本造血細胞移植学会と協議し、共同研究として進めることを申し合わせ、11月に調査票送付を開始した。また、(4)のテーマの開始に先立って、複数の基幹施設の担当者が相互連絡を行い、平成16年3月21日に共同鏡検による目合わせ検討会を開いて判定基準の共通化を図った。

発作性夜間ヘモグロビン尿症(PNH)については、平成15年5月16-17日に米国ノースカロライナ州Duke大学で行われた国際Duke Symposium on PNHに、班から小峰と木下と共同研究者、他に数名の本邦研究者が参加した。席上、国際PNH専門家グループ会議(International PNH interest group (I-PIG) meeting)をもつことを提案し、患者登録についても検討された。ヒューマンサイエンス振興財団からの平成15年度難治性疾患克服研究推進事業の外国の研究機関等への委託事業(金倉 譲班員)による補助を受けた大阪大学西村純一博士がこの間の調整役を果たした。また、同年12月5日に第1回I-PIG会議がSan Diegoで開催され、国際共同研究体制の構築が前向きに検討されるとともに、国際的に利用可能な診療ガイドライン作成への作業が具体的に動きだした。

臨床研究および検体研究にあたっては、患者情報の秘守、説明と納得による患者の自由意思の尊重、倫理規定の遵守、研究の公開性、患者支援団体との連携、健康被害報告規定の遵守など、求められる水準を満たすことに常に留意した。

また、昨年度から補助金の管理について所属機関の事務当局への委任が原則とされたのに伴い、本年度は研究協力者を含むすべての施設・機関で事務委任による補助金の管理が行われることとなった。

## C. 研究成果

特定疾患治療研究事業の改正が行われたことに伴い、昨年度末から班内の再不貧検討小委員会において主として電子メール上で意見交換を行い、診断(認定)基準および重症度区分等の見直しのための検討を進めた。対象疾患に広く適用される統一基準に沿った"軽快者"の判定基準(案)を作成するとともに、新様式による臨床調査個人票(新規申請用と継続更新用)を作成し提出した。再不貧について軽快者の枠付けを検討するに当たり、薬物療法(主として免疫抑制療法)によって病態の改善をみた後の悪化・再燃、またさらに長期経過後の病像の移行等について我が国における多数例での実態の把握が十分でないことが改めて認識された。また同種骨髄移植を受けた患者の長期経過の実態についても不明な事項が多い点が指摘された。再不貧については行政当局の考え方に沿い、軽快者として、1)疾患特異的治療が必要ない、2)臨床症状が診断基準を満たさず、著しい制限を受けることなく就労等を含む日常生活を営むことが可能である、3)治療を要する内臓合併症等がない、のすべてを1年以上満たした者とし、骨髄移植例には軽快者の枠付けを適用しないことが望ましいとして対応することとした。新制度下での申請は平成15年10月に開始された。申請された調査個人票のデータは自治体別に電算入力され、逐次厚労省に集積された後、班長事務局宛に送付され、解析資料として利用できる予定であるが、本年度内にその機会はなかった。個人データの取り扱い基準の設定をまって利用可能となる見込みである。

今年度は合同班会議総会および合同班員会議を各2回開催した。第1回総会(平成15年7月25日)では23題が、第2回総会(平成16年1月30日)では40題の演題が発表された。

平成15年度における主な研究成果を疾患別および横断的領域別にその概要を述べる。

### 1. 再生不良性貧血領域

1)平成11年~13年の3年間に登録された再不貧8,200余例の臨床データは我が国の実像をほ

は全数調査に近い形で代表すると考えられるもので、今後の参照資料としても大きな意義をもつ。精査の結果、入力疑義や欠測項目は計 8,147 件に上り、該当患者数は 4,629 例に及んだ。データの適正化を済ませた上で再集計を行うことで、信頼度を高めることができる。

- 2) 病因研究の一つとして、病因ウイルス検索のための検体集中による共同研究が感染症研究所感染病理部佐多徹太郎協力者のもとで開始された。特発性および肝炎後再不貧、MDS などに注目して血液、骨髓試料等を送付する。
- 3) 免疫抑制療法的前方視研究集団（重点研究）の追跡調査に協力し集計に寄与した。平均 4 年の観察期間で、全体の生存率は 90 % 以上、5 年までの累積再発率は 20-30 % と推定されるなど、我が国の現今の重症例の治療成績として基準となる成績がまとめられた。さらに長期間の追跡が望まれる。
- 4) 免疫抑制療法の一般化した過去 10 年間の我が国での成績と実態を把握するための後方視的症例調査を班研究者施設を対象に開始した。
- 5) 1991-2001 年に同種幹細胞移植を受けた成人例の長期予後と QOL に関する全国調査を造血細胞移植学会との共同研究で実施した。QOL の評価には KS のほか、SF-36 による方法を用いた。98 例での中間成績では平均年齢 24 歳（15-48 歳）、血縁者間 83 %、非血縁者 17 % である。長期生存は 80 % であり、非血縁者で生存は劣った。6 カ月以上生存例の 8 % は QOL 低下を示した。cGVHD の発症は 1 年までで、累積 30 % であった。34 % で臓器障害がなく、48 % で cGVHD が活動性で免疫抑制薬が継続された。長期経過の合併症として cGVHD、感染症、非感染性の肺・眼・骨関節合併症がみられた。二次発癌は 1 例であった。前処置に照射を含めた症例での発症はなかった。
- 6) 1995（平成 7）年 12 月にリンフォグロブリン（ウマ ATG）が承認された後に班研究者施設での 15 歳以上の成人再不貧症例に対する再投与の経験例を調査票によって検討した。13/33 施設（39 %）で再投与の経験があり、症例数

は 36 例であった。再投与時の年齢分布に偏りはなく、重症度は stage 3（やや重症）以上が 32 例である。1、2 回ともリンフォグロブリンが 22 例、ウマ ATG-ウサギ ATG が 13 例、ゼットプリン-ウマ ATG が 1 例。投与間隔は 3 カ月以内から 2 年以上と区々であった。Camitta らによる効果判定基準で、CR 0、PR 15 例で、有効率は 41.7 % であった。有効例のうち 13 例は 1 回目に一時的でも反応を示していた。1 回目と 2 回目とで組み合わせによらず、有害事象の増加はなかった。初回 ATG への反応が効果予測に有用な可能性がある。

- 7) セントラルレビューを組み入れた前方視患者登録方式を新たに確立し登録を開始した。併せて、同じ集団の中等症（旧分類）患者に対する CyA 単独による免疫抑制療法の有効性を評価する前方視研究の準備が整った。
- 8) 全国調査の成績から成人例での ATG 単独と CyA 併用の効果と予後を層別化を行って比較検討した。16 歳以上で選別条件をみたした重症 208 例、中等症 95 例である。未治療重症例では CyA 併用は有効率、生存率、failure-free survival (FFS) のいずれについても影響がなく、治療歴のある重症例では併用は有効率を改善したが生存、FFS には無影響であった。また、中等症についても有効率、生存、FFS に併用の意義がみられないとの成績であった。この成績はドイツの前方視ランダム化試験の長期追跡で、重症例では併用が有効率、FFS とともに優れることと異なる。前治療のない重症例の成績は、ATG 単独、CyA 併用を合わせて、有効率 70 %、全生存率 90 %、FFS 60 % であり、後 2 者はプラトーに達していた。再不貧での免疫抑制療法の有効性は明らかであるが、2 剤併用の意義については別途検討の必要がある。
- 9) 小児血液学会再不貧委員会の 1994 年以降の後方視研究の 1,058 例から肝炎後、Fanconi 貧血、Diamond-Blackfan 貧血、染色体異常例など稀な病型について頻度、病態等を集計した。特発性再不貧の年間発症は平均 62 例、肝炎後は特発性の 1/8 程度であった。1994 年以降には

MDS への移行例が減少し、治療成績も向上した。Fanconi 貧血は 68 例が登録され、年間 2-6 例、D-B 貧血は 62 例、年間 3-7 例で、欧米に比し少なく遺伝歴のない例が多い。Fanconi 貧血で 90-99 年に診断の 36 例では家族例陽性が 13 例で、内蔵の合併奇形をもつ重症例が 6 例あった。染色体断裂試験は 23 例、遺伝子検索が 7 例で行われたにすぎず、確定診断法の普及が問題と考えられた。

10) 平成 10 年度に新しく提出された 5 段階の重症度分類を吟味するために、単施設の免疫抑制療法を行った中等症 13 例と重症 20 例について治療成績と予後因子を検討した。ATG+CyA 13 例、CyA 単独 20 例である。6 カ月判定での有効率は 54 %、長期生存率は 70 %であるが、6 カ月以後に改善したのが 4 例あった。生存率は中等症でよい傾向であった。好中球 200 未満、網赤血球 2 万未満は有意の予後因子であり、最重症 (stage 5) を設ける意義があると考えられた。今回の検討では、症例数の関係で中等症を細分することの意義は不明であった。

11) 骨髄不全症の一部で観察される微小 PNH 血球検出の意義と方法の標準化のために 2 施設の結果を比較した。CD11b 陽性顆粒球とグリコフォリンA 陽性赤血球中の CD55-CD59- 細胞比率を再不貧 6 例を対象に同時に測定した。両者の成績はよく一致し、差は ± 50 %以内であった。PNH 赤血球が 0.1 % 以下の検体で Ham 試験変法施行後にはダブル陰性赤血球が消失したことから、方法の正確性が示された。FCM による PNH 血球の測定について施設間格差の検討も必要である。

12) Fanconi 貧血は遺伝的に異なる少なくとも 11 群に分類され、8 群に対応する遺伝子が同定されている。FANCA 異常が 60 %を占めるが、本邦例で 27 家系の変異を同定した。一部に reversion 変異を認め、造血の長期維持がみられた。このことは早期の遺伝子治療の有用性を示唆する。

13) Stem cell growth factor (SCGF) は白血病細胞株培養上清からクローニングされた造血因子で

あり、その血中濃度は骨髄での造血機能を反映することが示された。検討対象疾患を広げて、血清 SCGF 値を測定した。急性白血病、CML 急性転化で高く、MDS では芽球の増加とともに上昇した。造血機能の変動を予測できる可能性があり、再不貧での治療効果判定や MDS との境界例での治療法選択の補助情報として利用できる可能性がある。

14) 顆粒リンパ球増加症 (LDGL) には赤芽球癆 (PRCA) が合併することがある。T-LDGL の多くは TCR  $\alpha\beta$  で、TCR  $\gamma\delta$  タイプは少ない。健常者血中でも TCR  $\gamma\delta$  陽性 T 細胞比率は極めて低い。慢性赤芽球癆を来した 2 例の LDGL 細胞はいずれも TCR  $\gamma\delta$  陽性で、サブユニット解析ではともに V $\delta$ 1 陽性、V $\delta$ 2、3 陰性であった。 $\gamma\delta$  T-LDGL の多くが V $\delta$ 1 陽性であり、また  $\gamma\delta$  T-LDGL を伴った PRCA の多くが V $\delta$ 1 陽性であるとの報告と符号した。この表面形質と PRCA 発症との因果関係は不明である。

15) 赤芽球分化における初期段階の遺伝子発現を microSAGE (serial analysis of gene expression) 法によって解析した。純化 CD34+ 細胞を IL-3、EPO、SCF 存在下で赤芽球系に分化誘導し、mRNA を取った。CD34+ 細胞からは 945 種、赤芽球系前駆細胞から 1030 種の遺伝子を同定した。赤芽球系細胞ではヘモグロビン、フェリチン、リボゾーム蛋白などの house-keeping 遺伝子が高発現し、また heat shock protein (HSP) 90 などの高発現も認めた。各遺伝子の相互作用については今後の課題である。

## 2. 溶血性貧血領域

1) この 1 年間に赤血球結合 IgG 定量、寒冷凝集素の解析依頼が 81 例あり、併せて自己免疫性溶血性貧血 (AIHA) における自己抗原の分析 (Rh、band3、GPA) も進めている。Coombs 陰性 AIHA での結合 IgG サブクラスを検討した。陰性 36 例、陽性 9 例の抗体解離液を用い ELISA 法で測定した。結合 IgG 量の増加とともに IgG1+IgG3 量は増加した。IgG1+3 の総

IgG に占める比率が 80 % 以上と未満の群に分けられる可能性がある。

2) Rh ポリペプチドが規定する抗原は AIHA の自己抗原として主要な役割を演じる。Rh 抗原エピトープ群分子の赤血球膜発現メカニズムの解析を目的に、日本人 Rhmod 血液型家系の 4 例で遺伝子解析を行った。RhD と RhCE 遺伝子に異常はみられなかったが、4 例すべてで RHAG 遺伝子にこれまで報告のない 1 塩基欠失 (1183 番の A の欠失) があり、その結果 frameshift 変異による RHAG 蛋白の細胞内ペプチド鎖の延長が起こると予測され、Rh 抗原エピトープ群分子の赤血球膜発現に RhAG 蛋白の C 末端が重要な役割を果たすことを示唆した。

3) 5 月 16-17 日に米国ノースカロライナ州 Duke 大学で行われた Duke Symposium on PNH に主任研究者は木下研究協力者と共同研究者とともに参加した。席上、国際 PNH 専門家会議 (International PNH interest group (I-PIG) meeting) をもつことを提案し、患者登録について検討された。ヒューマンサイエンス振興財団からの平成 15 年度外国研究機関への研究委託事業による補助を受けた西村純一博士が調整役を果たした。また、同年 12 月 5 日に第 1 回 I-PIG 会議が San Diego で開催され、国際共同研究体制の構築が前向きに検討された。

4) GPI 欠損細胞に 12 番染色体異常を伴った特異な症例の解析から、染色体切断部位に転写促進因子である HMGA2 (HMGI-C) を同定した。この患者の骨髄では HMGA2mRNA の発現量が正常者に比し有意に高く、発現している転写産物はエクソン 5 を含まない異常な分子であった。HMGA2 は間葉系良性腫瘍で高頻度に異常となる遺伝子であることが知られていることから、PNH における変異クローンの拡大にどのように関与するかが興味深い。

5) PNH の赤血球は補体感受性の亢進のために血管内溶血を起こすが、補体溶血を阻害する薬物はまだ臨床に導入されていない。最近、ヒト化抗 C5 抗体製剤で臨床試験が行われ、劇的な

溶血抑制効果が観察されている。PNH の溶血には CD59 の欠損がより大きな意味をもつことから、補体の C8、C9 の抑制の方が臨床的な重要性が大きいことが考えられる。そこで、SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) システムを用いて C8、C9 に対する RNA アプタマーをスクリーニングし、既知の C5 アプタマーと溶血阻止効果を比較した。C8 アプタマーでは SELEX の 4 ラウンドで、また C9 アプタマーは 10 ラウンドで、それぞれ C5 アプタマーと同等の阻止活性をもつものが得られた。開発研究が日米共同研究の一環として進められた。RNA アプタマーによって PNH の溶血を抑制することが可能と考えられ、新しい薬剤としての可能性が確認された。

### 3. 不応性貧血領域

1) 骨髄異形成症候群 (MDS) の成人の新発症例の登録を続けており、データベース化している。1998 (平成 10) 年以降に登録されたのは 362 例で、年齢中央値 64 歳、男/女比 1.9:1 である。病型区分は FAB 分類によったが、一部を WHO 分類に再分類した。染色体異常、異形成、合併症についても基本集計を行った。FAB 分類では RA 43 %、RARS 5 %、RAEB 29 %、RAEB-t 14 %、CMML 6 %、その他 3 % であり、新 WHO 分類によって再分類すると、RA 5 %、RARS 1.7 %、貧血がなく他の血球減少のあるものが 9 % で、unclassifiable に相当する可能性がある。RCMD は MDS 全体の 30 % を占めるが異形成の評価基準が大きく影響する。染色体異常は 45 % の症例でみられた。3 系統の異形成所見の頻度をまとめた。家族内発症が 5 例あり、合併症として皮膚合併症 (感染症以外) 17 例、肺合併症 (感染症以外) 23 例、自己免疫疾患様症状 13 例、悪性腫瘍の既往 30 例、同合併 10 例であった。白血病転化が 75 例で確認され、死亡は 107 例であった。以上の成績は、1997 年までの 1002 例での結果と大きな差がなかった。新たな追加調査を進めることが

- 必要と考えられる。
- 2) 小児 MDS については小児血液学会 MDS 委員会が、それまでの後方視研究の成績を基に、1999 年以降前方視登録と中央診断を行い、すでに 220 例が把握されている。この過程で種々な先天性疾患の関与が明らかにされており、基礎的な共同研究が 9 テーマで進められている。診断の標準化が治療研究の立案にも必須である。220 例の中、一次性 MDS とされたのは 48 例、二次性 MDS 12 例、JMML 35 例、他の疾患 34 例が含まれた。一次性 MDS の内訳 (FAB 分類) は、RA 23、低形成性 MDS 2、RAEB 15、MDS with fibrosis 1、RAEB-M6 6 であり、多様な病態群が含まれた。細胞バンク、DNA バンク、RNA バンクの構築も課題とされている。小児 MDS 診断のための診断基準の作成が必要とされた。
  - 3) これまでにも我が国の不応性貧血 (RA) 症例の年齢中央値が欧米より約 10 歳低年齢であるなど病態の差が指摘されている。その理由を明らかにする目的で、日独 3 施設 (長崎大、埼玉医大、Dusseldorf 大) の RA 症例 (日本 131 例、独 597 例) を比較した。共同鏡検で RA の形態学的診断については日独ではほぼ完全な一致をみたので、相互比較が可能と考えられた。形態異常が軽度の RA (WHO 分類) が FAB 分類での RA 全体に占める割合は、日本で 64 %、独で 25 % と大きな差があり、年齢 (中央値) は 57 歳と 71 歳、血小板は 7 万と 18 万、生存期間が 129 か月と 39 か月など、両国間で顕著な差がみられた。WHO-RA 比率が我が国で多いことは、免疫抑制療法の有効率が欧米より高いことと併せて注目され、再不貧と WHO-RA との重なりや異同についてもさらに究明する必要があることを示した。
  - 4) 小児 MDS には遺伝背景をもつものが多い特徴があり、その検討は病因解明の手掛かりとして期待される。Down 症に発生した MDS/AML 14 例と transient myeloproliferative disorder (TMD) 4 例で、GATA-1 遺伝子変異を検討したところ全例でエクソン 2 の変異がみられ、赤芽球系と巨核球系の異常が主体となることを説明できる。しかし、FLT3、cKIT、N-Ras 等に変異はみられず、P53 変異は 3 例に検出された。また、JMML では 15 例中 7 例で PTPN11 (Noonan 症候群の原因遺伝子で GM-CSF シグナル伝達に関与) のエクソン 3 に変異がみられた。これらの異常が成人 MDS でも関与するかどうか検討を要する。
  - 5) 低リスク MDS (不応性貧血と鉄芽球性貧血) に対するシクロスポリン療法の安全性、有効性を評価する多施設共同研究は平成 13 年 5 月に開始され、22 例が登録され、15 例が予定治療を終了し、9 例で調査票が回収された。24 週 + 8 週投与し、臨床効果を別に定めた基準によって判定した。24 週後の評価で 3 系統のいずれかで改善を認めたのは 6 例 (67 %) で、その効果は 32 週まで持続した。好中球改善は 1、血小板増加は 4、貧血改善は 5 例であった。効果予測に有用な因子は明らかでなかった。好中球減少が遷延した 1 例で重篤な感染症がみられ、後に死亡した。白血病への進展例はなかった。最終集計をまわって有効/無効例の背景因子の解析が必要である。
  - 6) 高齢者および高リスク MDS に対する骨髓非破壊的前処置による同種末梢血幹細胞移植の第 I/II 相試験が進められている。中央値 63 歳、RAEB-t 6 例を含む 7 例が登録され、6 例で移植がなされ、3 例で完全キメラを達成、生存中である。3 例で MDS クローンが残存したため、プロトコルの規定に沿い前処置のシクロホスファミド投与量を 30 から 45 mg/kg に増量する措置をとった。
  - 7) MDS 156 症例で AML1 遺伝子の点変異を全長にわたって調べると 27 例 (17 %)、MDS/AML (RAEB、RAEB-t、MDS からの白血病) に限ると 110 例中 26 例 (24 %) に変異がみられた。RA/RARS 症例での変異は 46 例中 1 例 (2 %) に過ぎなかった。変異のある群の生存期間は変異のない群に比し有意に短かった。機能解析から変異体は機能を喪失しているか、正常 AML1 に対して拮抗的に作用していた。



これらの観察から AML1 に点変異をもつ MDS/AML を 1 疾患単位として捉えることが可能で、新たな疾患分類を提唱することができると考えられた。

- 8) 各個研究として行われた基礎的な研究テーマとそれぞれの成績は以下の通りである。
- (1) MDS の 11 症例を対象に骨髓細胞 DNA について p53 遺伝子変異のスクリーニングに WAVE system を用い、p53 免疫染色と染色陽性細胞からの single cell PCR による変異確認を行い、両者の相関を検討した結果、WAVE 法が p53 変異の検出に簡便かつ有用であることを認めた。
  - (2) ara-C は S 期特異的な抗腫瘍薬であるが、これを DNA 修復過程の阻害に用いれば非増殖細胞の障害作用を期待できる。リンパ球で紫外線やアルキル化薬が惹起する DNA 損傷の修復は ara-C の併用で阻害され、アポトーシスが增強された。修復時の ara-C 転入が関与すると考えられた。このことから ara-C、PAM、MIT の少量併用療法が有効と考えられ、臨床例でも 78 歳 RAEB-t の 1 例で寛解が得られた。
  - (3) 高リスク MDS の治療にはしばしば ara-C を含む多剤併用化学療法が行われる。そのような 10 例について骨髓細胞の 5'-ヌクレオチダーゼ (5'-NT) mRNA を real-time PCR 法で測定し、臨床成績と対比した。5'-NTmRNA 発現が 0.3 未満の症例では 5 例が寛解に達したが、0.3 以上では寛解例はなかった。治療からの生存期間も前者で長い傾向であった。MDS でも急性白血病と同様に細胞内の薬物代謝が成績に関与することを示しており、5'-NTmRNA の測定は高リスク MDS の治療法選択の根拠となり得ると考えられた。
  - (4) CBP および p300 は転写共役因子としてヒストンアセチル化やクロマチンリモデリングに関与する。MDS の 5 例中 1 例に RT-PCR-SSCP 法で、骨髓細胞の p300 に Ser507Gly 変異を認めた。これは p300 の CREB binding domain と CH2 domain の間に位置する。de

novo AML 29 例では CREB、p300 ともに変異を認めなかった。観察された変異部位の機能解析が必要である。

- (5) ケモカインである SDF-1 とその受容体である CXCR4 の系は造血幹細胞のホーミングや増幅に関与する。MDS にみる無効造血はアポトーシスによると考えられることから、低リスク MDS 患者 19 例の CD34+ 細胞における SDF-1/CXCR4 系とアポトーシスを検討した。SDF-1 による CD34+ 細胞の遊走活性は MDS で有意に低下していた。CD34+ 細胞の annexin V によるアポトーシスは、SDF-1 による遊走活性と負相関を、また骨髓血漿中 SDF-1 濃度は MDS で高値であり、アポトーシスと正相関を示したことから、MDS における無効造血には SDF-1/CXCR4 系の何らかの機能異常が関与すると考えられた。

#### 4. 骨髓線維症領域

- 1) 1997 年の全国調査 (過去 10 年の発症例) の 322 例と 1999-2003 年の新規発症 175 例について追跡調査を行った。発症年齢は中央値 63 歳 (28-86)、男/女は 1.66/1 である。我が国では年間約 35 例の原発性慢性骨髓線維症患者が発生すると考えられる。染色体異常は 58% にみられるが特異的な異常はない。移植術の適応となり得る 70 歳未満の症例について多変量解析を行い、予後不良因子として、全身症状あり、ヘモグロビン 10 g/dl 未満、末梢血芽球 1% 以上が抽出された。観察期間中央値は 59 か月である。2 因子以上をもつ症例の生存期間中央値は 65 か月であるが、2 因子未満では 50% 生存に達していない。予後因子の同定は同種造血幹細胞移植の適応判定に有用と考えられた。新規発症例の前方視的解析によって確認する必要がある。
- 2) 本症には好適なモデル動物のないことが研究を困難にしていることから、モデルマウスの作製を試みている。今年度はトロンボポエチン過剰発現マウスを作製し、骨髓線維化が生ずることを確認した。また、患者 CD34+ 細胞を

NOD/SCID マウスに移植する系で時間とともに骨髄線維化が生ずることも観察した。

- 3) 全身の骨硬化を伴い慢性経過をとった急性巨核芽球性白血病の1例について、芽球が分泌するサイトカインと骨硬化との関連を細胞培養系を用いて検討した。その結果、芽球がインターロイキン 11 を産生し、造骨細胞から破骨細胞の抑制因子であるオステオプロテゲリンを過剰に誘導し、そのために骨硬化が起こると考えられた。

#### 5. 骨髄移植・遺伝子治療領域

- 1) 慢性肉芽腫症などの遺伝性疾患に対する造血幹細胞遺伝子治療では化学療法薬や放射線照射などの前処置は避けたい。そこで前処置を省き骨髄内に移植する方法の有効性をカニクイザルで検討した。このままでは遺伝子導入細胞の末梢血への出現は不十分であったため、EPO 反応型選択的増幅遺伝子 (SAG) を組み合わせたところ、移植後 EPO による SAG 導入細胞の体内増幅が可能となった。SAG にはエリスロポエチン受容体細胞外ドメインとトロンボポエチン受容体細胞内ドメインのキメラをコードする遺伝子を用いた。1 頭のサルで EPO 投与に不応性となり、特異的 CTL の誘導によって排除された可能性がある。
- 2) 臍帯血移植の問題点として生着遅延、拒絶、免疫再構築の遅延などがある。移植後末梢血の亜分画細胞のマイクロサテライト DNA による高感度キメリズム解析と T 細胞受容体  $\beta$  鎖 CDR3 領域のスペクトラタイピングを用いて造血系・免疫系の再構築過程を検討した。生着例では 21-28 日で完全キメラとなり、生着前にも末梢血の微量測定でキメラが検出された。亜分画、特に CD3+T 細胞のキメリズムが重要で、生着遅延、拒絶の予知や確認に有用であった。T 細胞受容体レパトワ解析では移植 1 か月で多様性の顕著な減少がみられ、GVHD 出現とともに特定の受容体をもつクローンが出現した。

#### D. 考 察

前項に述べた成績に沿って、共同研究成績を中心に、その意義と今後への課題について考察する。

##### 1. 再生不良性貧血領域

1) 平成 11-13 年度に申請された 8,200 余例はこの期間における我が国の再不貧患者の実態を様々な意味で代表している。データの適正化を行って再度集計する価値がある。

2) 病因研究としてのウイルス検索は、一旦中断されたが新しい手法を取り込んで再開された。新知見が期待される。

3) 重点研究班による免疫抑制療法の前方視研究の追跡調査結果は、我が国における重症例の治療成績と長期経過の実態を客観的に示す重要なデータとして位置づけられ、同時に薬物療法の限界と新たな問題点を提示することとなった。

4) 新たに開始した後方視症例研究は過去 10 年来のすべての重症度を含む症例についての全体像を把握するためのもので、今年度に始まった前方視研究の基盤データとしても不可欠の情報となるはずである。

5) 造血幹細胞移植療法が再不貧治療に占める位置づけを適正に行うには長期成績に関する詳細な実態の把握が必須であるが、これまで体系的な取り組みはなく、今回のものが始めてである。中間成績で 98 例が集計されたが、さらに多数例の収集により完璧を期すこととしている。特に移植関連合併症や晩期障害が重要となろう。

6) ATG を含む免疫抑制療法に不応・再発例での再投与は安全性の観点から禁忌とされてきたが、臨床現場においては残された選択肢として採用を余儀なくされることがまれでない。小児例では再投与の有効性が低いとの成績があるが、班研究者施設での成人例での経験を集計したところ、一定度の有効性ととも、著しい副作用がないことが併せて確認された。ATG 製剤の再投与について、禁忌条項の緩和が望まれる。

7) 新たに発症する再不貧症例を系統的に登録し、

骨髓所見のセントラルレビューを組み入れて、病態・治療研究に前方視的に活用することとした。この種の試みは本班においてもこれまで行われていなかったが、今後大きな意義を有するものと考ええる。輸血を要する中等症に対する CyA 単独療法の評価も臨床的な観点から重要性の高い臨床研究である。

- 8) 後方視的に収集した全国調査の成績から、成人重症例では ATG と CyA 併用の利点は有効率、生存率でみて有意でないとの結果が得られ、欧州の報告と異なった。この点に答える前方視研究は我が国では行われていない。
- 9) 小児科領域で過去 10 年間に収集された 1,000 例以上の記録から、稀な病型の頻度と病態を整理したもので、その臨床的な意義は極めて大きいと評価される。
- 10) 平成 10 年度に新しく導入された重症度の 5 段階区分法の妥当性と有用性はまだ十分に吟味、評価されていない。今回は単施設での評価が後方視的になされた。
- 11) 微少な PNH クローン検出の意義と理由は不明な部分が多いが、免疫機序の関与を示唆し、治療選択や予後推定の根拠となりうる重要な所見である。用いる検出法の適正さを再検討し、方法の正確性が示され、標準化への試みが提案された。
- 12) Fanconi 貧血は小児領域への登録で 68 例が記録されている。11 群に分類される中で最も頻度の高い FANCA 遺伝子異常を 27 家系で調べ、一部に reversion 変異を認めた。一連の遺伝生化学的研究の中で見出された知見である。

## 2. 溶血性貧血領域

- 1) AIHA については、赤血球結合 IgG 定量と Coombs 陰性 AIHA の診断、寒冷凝集素解析、自己抗原の分析、Rh 抗原発現の分子機構等を検体集中によって体系的に進めてきたが、今回は結合 IgG のサブクラス測定へと進展した。いずれも本症の病態解析と病因解明に向けた着実にユニークな研究成果である。
- 2) Rh 抗原の表出が低下した 4 家系の検討で、

抗原エピトープの発現低下はそれらをコードする遺伝子 (RhD、RhCE) の異常でなく、Rh ポリペプチドと関連して膜に存在する Rh 関連糖蛋白遺伝子の遺伝子変異 (1 塩基欠失) によることが明らかとなった。Rh 抗原エピトープの発現調節に関わる重要な知見といえる。

- 3) PNH 研究の進歩における我が国の貢献は大きいものがある。平成 13 年度に東京で開催した初めての国際 PNH シンポジウムに次いで、今年度は 5 月に米国でシンポジウムがもたれ、国際規模の協力体制の構築を提案し、I-PIG 会議の結成への動きの起点となったことの意義は極めて大きい。組織的・継続的な計画が論じられ、12 月には国際共同臨床治験計画も上程され、国際患者登録へ向けての行動計画が立案されつつある状況である。
- 4) PNH における異常クローンの拡大機序は未解決であり、間葉系の良性腫瘍でしばしば検出される転写促進因子 HMGA2 遺伝子の発現亢進が一部の症例で見出され内外の注目を集めている。
- 5) PNH の溶血亢進を補体活性の阻害によって抑制し、治療薬として利用しようとする研究が多方面で活発に行われている。RNA アプタマーもいくつかの抗体製剤と並んで注目される。ここで報告された SELEX 法による検討はヒューマンサイエンス振興財団の外国研究機関への研究委託の支援のもと日米共同研究として進められているものであり、成果が期待される。

## 3. 不応性貧血領域

- 1) 前班までの集積例が 1,000 余例あり、平成 11 年以降の新症例が 362 例に達した。この間に骨髓異形成症候群 (MDS) の分類が従来の FAB 分類から新しい WHO 分類が提唱され、現在は移行期にある。不応性貧血 (RA) が細分類されたことの臨床的意義についても我が国独自の検討が必要となっているが、異形成の評価基準の適用が大きく影響する。
- 2) 小児 MDS 委員会は 1999 年以降中央診断を行い、220 例が登録されている。小児では先天

- 性疾患との関連性が濃いことが大きな特徴で、一次性 MDS とされたのは 48 例であった。診断の標準化が必要で、そのためには診断基準の作成が急がれよう。
- 3) 我が国の不応性貧血 (RA) 集団が欧米より 10 歳ほど若く、概して免疫抑制療法への反応率が高いとの指摘がある。この疑問点の究明は大きく重要な問題であり、班研究者の 2 施設が自主的、主体的にドイツ Dusseldorf 大学と共同研究を行ったことの意義は高く評価される。共同鏡検作業を重ね、血球の形態所見の評価基準に両国間、施設間に差のないことを確認することができた。その上で RA 症例の病態比較を行うと、我が国の症例では形態異常が軽微な病型比率が高く、血小板減少例が多く、年齢が若いなどの相違が明瞭となった。我が国での RA には再不貧との近縁性がより濃厚な傾向があると考えられた。治療法選択とその評価においても慎重に考慮すべき側面といえる。再不貧と RA の境界領域の客観性に富んだ鑑別指標が必要なことを物語るものである。
  - 4) 小児 MDS に特徴的な先天性異常を伴う症例での遺伝子異常を、Down 症に MDS/AML を発症した症例についてみると、GATA-1 遺伝子異常が全例にみられ、それは赤芽球系と巨核球系の異常を中心としやすい臨床的特徴をよく説明する分子異常であった。他の遺伝子異常についても検討されており、さらに成人例での関与の可能性も検討の意義がある。
  - 5) 低リスク MDS の治療研究が継続されており、漸く中間成績を集計できる段階に達した。この種の研究は我が国では未だ組織的には行われておらず、大きな関心が寄せられている。副作用が少なく、60 %以上の有効率が予測されており、次年度の最終集計が待たれる。平行して行われた中央診断、分子病態等の解析も貴重な成績をもたらすであろう。
  - 6) 同じく高齢者・高リスク MDS に対するミニ同種造血幹細胞移植療法の臨床試験も他分野と共同して進められている。進捗はゆっくりだが症例が重ねられ、6 例中 3 例で完全キメラの達成と生存が確認され、プロトコルに従って前処置法の修正が行われ、次のステップに進んだ。
  - 7) MDS およびそれから AML へ移行した成人例 110 例の試料を検体集中で集め、AML1 遺伝子の全長にわたり変異の有無を検討したところ、24 %に変異を認め、変異をもつ例の予後は有意に不良であることが突き止められた。臨床的に独立した亜病型と見做しうるとの結論は重く意義のある成果である。
  - 8) 各個研究として進められた分子レベルの病態研究はどれも高水準の重要な知見である。
- #### 4. 骨髄線維症領域
- 1) 特発性慢性骨髄線維症の症例資料を 500 例規模で把握した臨床研究はこれまで内外に類例をみない貴重なものである。この登録の推移から把握可能な年間発症数は約 35 例と考えられた。両者を含む症例の追跡調査を行い、骨髄移植の対象となり得る 70 歳未満の患者について、予後不良因子を多変量解析で検討し、全身症状、貧血、芽球の 3 項目が抽出された。治療方針の検討に際して今後有用な情報となるであろう。
  - 2) 病態発生の実験研究として、これまで幹細胞異常、染色体異常などが明らかにされたが、さらに研究をすすめるため動物モデルの作成が試みられ、今年度には患者 CD34+ 細胞の NOD/SCID マウスへの移植により宿主骨髄に線維化をきたす有力なモデルが作製された。このモデルは治療法開発のための実験系としても利用できる。
  - 3) 巨核芽球性白血病患者の芽球がサイトカイン IL-11 の分泌を介して造骨細胞に作用し、オステオプロテゲリンを過剰誘導して破骨細胞を抑制して骨硬化を来すとの観察は、線維症発生とも関連する可能性があり、骨髄線維症患者での検討が待たれる。
- #### 5. 骨髄移植・遺伝子治療領域
- 1) 遺伝子治療のサルモデルで、EPO 反応性選択的増幅遺伝子を組み合わせることで導入することにより、遺伝子導入幹細胞の体内での増幅が可