

骨髓異形成症候群における細胞障害性 T 細胞による 骨髓幹細胞のアポトーシス機序の解析 —パーフォリン/グランザイム陽性 MDS 由来 T 細胞株 K2-MDS を用いて—

金丸 昭久、森田 泰慶、松田 光弘、嶋田 高広、辰巳 陽一、前田 裕弘

近畿大学医学部 血液・腎臓・膠原病内科

研究要旨 骨髓異形成症候群における無効造血は細胞障害性 T 細胞による骨髓アポトーシスが原因とされているが、その詳細は不明である。今回、MDS 由来 T 細胞株 K2-MDS の骨髓 CD34 陽性細胞に対する細胞障害活性を解析した。その結果、K2-MDS はパーフォリン/グランザイムによって、骨髓 CD34 陽性細胞にアポトーシスを誘導した。さらに K2-MDS の認識機構として、fractalkine/CX3CR1 系の関与が示唆された。

A. 研究目的

骨髓異形成症候群（以下 MDS）での無効造血には細胞障害性 T 細胞の関与が示唆されているが、¹⁾、詳細な機序は不明である。我々は以前に MDS 患者から特異な T 細胞株 K2-MDS を樹立した²⁾。今回、我々は K2-MDS の骨髓 CD34 陽性細胞に対する細胞障害活性につき検討した。

B. 研究方法

同意を得た健常人から骨髓 CD34 陽性細胞を純化し、PKH-26 でラベルした。K2-MDS と、24 時間共培養した後、フローサイトメーターで細胞障害活性を解析した。アポトーシスは Annexin V 法で確認した。

C. 研究成果

① K2-MDS を CD34 陽性細胞と共培養した結果、濃度依存性に細胞障害活性を示した（図 1）。この細胞障害活性は、transwell insert を用いて細胞接着を解除すると認めなくなる。また、K2-MDS の培養上清は CD34 陽性細胞に細胞障害活性を認めなかった。② Annexin V によると、K2-MDS は CD34 陽性細胞に対してアポトーシスを誘導した（図 2）。③ K2-MDS はその細胞内にパーフォリンとグランザイム B を発現していたが、Fas ligand は発現していなかった（図 3）。④ パーフォリンの特異的阻害剤である concanamycin A (100 nM) は K2-MDS の細胞障害活性を抑制した

（図 4）。⑤ CD34 陽性細胞は CX3C ケモカインである fractalkine⁵⁾ を（図 5A）、K2-MDS はそのレセプターである CX3CR1 を発現し（図 5B）、⑥ 抗 fractalkine 抗体によって、細胞障害活性が抑制された（図 6）。

D. 考 察

以上の結果から、それぞれ①② K2-MDS は細胞接着によって、CD34 陽性細胞に対してアポトーシスを誘導する。③④ その細胞障害機序にはパーフォリン/グランザイムが関与していること。⑤⑥ K2-MDS の標的細胞認識機構として、fractalkine/CX3CR1 系が関与していることが示唆された。

E. 結 論

パーフォリン/グランザイムをその細胞内に有する MDS 由来 T 細胞株 K2-MDS は fractalkine/CX3CR1 系を介して、CD34 陽性細胞に対してアポトーシスを誘導する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Morita Y et al.: A perforin/granzyme-positive MDS-derived T cell line, K2-MDS, induces apoptosis in CD34⁺ cells through the fractalkine-CX3CR1 system. *Clinical Immunology* 113: 109-116, 2004

2. 学会発表

1. 金丸昭久 他: MDS 由来 T 細胞株 K2-MDS 細胞は fractalkine/CX3CR1 系を介して骨髄 CD34 陽性細胞にアポトーシスを誘導する. 第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会 平成 16 年度

G. 知的所有権の取得状況

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

H. 参考文献

1. Biesma DH et al. Cancer 79: 1548-1551, 1997
2. Jonasova A et al. Br J Haematol 100: 304-309, 1998
3. Shimamoto T et al. Br J Haematol 114: 358-361, 2001
4. Matsuda M et al. Leuk Res 24: 103-108, 2000
5. Bazan JF et al. Nature 385: 640-644, 1997

AML1 点変異をもつ MDS/AML の多段階発症機構

木村 昭郎、原田 浩徳、新美 寛正、原田 結花、稲葉 俊哉

広島大学原爆放射線医学科学研究所 血液内科・国際放射線情報センター・がん分子病態

研究要旨 MDS/AML (RAEB、RAEBt、MDS からの AML) の約 25% に AML1 点変異が認められる。AML1 点変異をもつ MDS/AML では -7/7q- や +8 が高率で、もたない MDS/AML では -5/5q- や複雑異常が多く見られた。MDS の発症過程は染色体異常から -5/5q- 経路と -7/7q- 経路などに大別されるが、AML1 点変異は -7/7q- 経路での分化抑制のマスターイベントであると考えられた。

A. 研究目的

骨髄異形成症候群 (MDS) は複数の遺伝子異常が蓄積して発症するが、造血細胞の腫瘍化を直接引き起こす疾患特異的な遺伝子異常は明らかになっていなかった。転写因子 AML1 の異常は造血細胞の悪性化に関与しており、われわれは RAEB、RAEBt、MDS 由来の AML (これらを MDS/AML と記載) の約 25% に AML1 の点変異を認め、なかでも化学療法・放射線療法後及び原爆被爆者では高率であることを報告した^{1,2)}。とりわけ従来報告が無かった C 末側の変異が MDS/AML に特異的に見られた。これらの変異体は AML1 の機能を消失し、正常 AML1 に対して拮抗的に作用した。臨床経過では AML1 変異 MDS/AML は変異のない群と比較し予後不良であった。AML1 点変異は、AML1-MTG8 のようなキメラ蛋白と同様に発症過程におけるマスターイベントであり、臨床病態を規定していることから、AML1 変異 MDS/AML は遺伝子レベルでの一疾患単位である可能性が示唆されている。しかし AML1 点変異を持つ幹細胞が MDS/AML を発症するまでにはさらに複数の遺伝子異常が必要である。その多段階発症過程を明らかにするために AML1 変異 MDS/AML の染色体異常について検討した。

B. 研究方法

研究目的に同意の得られた患者サンプルから単核球を分離して DNA を抽出した。翻訳エクソン (exon 3-8) ごとに PCR-SSCP 法または DHPLC 法を行い、異常症例は配列を決定した。AML1 点変

異を持つ群 (31 例) と持たない群 (80 例) での染色体所見 (G バンド法) を比較検討した。

C. 研究結果

AML1 点変異を持つ MDS/AML 31 例のうち、runt ドメインを含む N 末側 (exon3-5) の変異が 18 例、C 末側 (exon6-8) の変異が 13 例であった。58% に染色体異常が認められ、大部分が欠失・部分欠失や付加異常で、3、11、12 番染色体などの均衡型転座は見られなかった。AML1 変異のない MDS/AML と比較して、-7/7q- が 29%、+8 が 23% と高率であったが、-5/5q- や複雑型染色体異常はなかった。AML1 点変異を持つ未分化型白血病で高頻度に認められる +21 はなく、-21 が 1 例に見られた。C 末側変異と N 末側変異で染色体異常に差はなかった。一方、AML1 変異のない MDS/AML 80 例では 59% に染色体異常が認められ、既報と同程度の -5/5q-、-7/7q-、+8 や複雑型染色体異常が見られた。3 番染色体転座も 2 例あった。(表 1)

D. 考 察

MDS の 50 ~ 70% に染色体異常が認められ、欠失・付加や不均衡型転座が多く、-5/5q-、-7/7q-、+8、20q- や -Y の頻度が高いが転座は少ない³⁾。MDS の造血幹細胞は遺伝学的に不安定状態 (genetic instability) にあり、遺伝子変異を生じる頻度が高くなっている。発症には複数の遺伝子変異の獲得が必要であると推測されているが、染色体異常から発症過程は -5/5q- 経路と -7/7q- 経路に大別される⁴⁾。AML1 変異 MDS/AML では -7/7q-

表1. MDS/AML 患者の AML1 点変異の有無による染色体異常の違い

染色体所見	AML1 変異群	AML1 正常群
	N=31	N=80
正常	13 (41.9%)	33 (41.3%)
-5/5q-	0	17 (21.3%)
-7/7q-	9 (29.0%)	14 (17.5%)
20q-	1 (3.2%)	7 (8.8%)
+8	7 (22.6%)	13 (16.3%)
21 番染色体異常	1 (3.2%)	5 (6.3%)
複雑核型	0	13 (16.3%)
他の染色体異常	3 (9.7%)	11 (13.8%)

や +8 が高率で、変異のない MDS/AML では -5/5q- や複雑異常が多く見られたことから、-7/7q- 経路は AML1 変異により造血幹細胞の分化が抑制され、RAS などの変異による細胞増殖能を獲得して発症すると考えられる。一方 -5/5q- 経路では AML1 変異はなく、分化抑制を起こす遺伝子異常は不明だが p53 の変異により細胞増殖を来たし発症に導かれると推測される。すなわち -5/5q- 経路と -7/7q- 経路はその分化抑制を起こすマスターイベントと増殖シグナルは異なっており、固有の発症メカニズムがあると考えられる。

E. 結 論

MDS/AML における AML1 点変異は -7/7q- 経路で分化抑制を起こすマスターイベントと考えられる。

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. Harada H, et al: High incidence of somatic mutations in the AML1/RUNX1 gene in myelodysplastic syndrome and low blast

percentage myeloid leukemia with myelodysplasia. *Blood* 103(6): 2316-2324, 2004

2. 学会発表

1. Hironori Harada, et al. Point mutations in the AML1/RUNX1 gene associated with myelodysplastic syndrome. RUNX meeting 2004
2. 原田浩徳 et al. AML1/RUNX1 の点突然変異は MDS 病態を決定する. 第 66 回日本血液学会総会, 2004

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. Harada H et al. *Blood* 101: 673-680, 2003
2. Harada H et al. *Blood* 103: 2316-2324, 2004
3. Fenaux P. *Int J Hematol* 73: 429-437, 2001
4. Pedersen-Bjergaard J, et al. *Leukemia* 16: 2177-2184, 2002

骨髓異形成症候群におけるヒストン H3 メチル化プロファイリング

別所 正美、矢ヶ崎史治、石川 真穂、松田 晃、陣内 逸郎

埼玉医科大学 血液内科

研究要旨 近年、DNA やヒストンのメチル化修飾による遺伝子発現調節が発ガンに寄与することが示唆されている。我々は MDS 患者の末梢血好中球よりヒストンを抽出し、H3 のメチル化状態を Western Blot (WB) 法により検討した。結果、MDS では健常者に比し H3 K4 (RA2、RAEB2 例) および H3 K9 (RA2、RAEB4 例) の global hyper methylation が生じており、H3 K9 hyper di-methylation は -7/ 複雑核型異常を有する 3/3 例 (100%) で認め、その他の核型 42.9% に比して高頻度なことが明らかになった。

A. 研究目的

造血器腫瘍では DNA メチル化と腫瘍化の関連が示唆されており、DNA メチル化阻害剤である Decitabine が複雑型染色体異常を有する MDS に対して細胞遺伝学的効果をもたらし予後を改善することが報告されている¹⁾。真核生物ではヒストン H3 K9 のメチル化により DNA メチル化酵素がリクルートされ DNA メチル化が誘導されることが明らかとなってきた。また、H3 K4 のメチル化は転写の活性化と相関する^{2),3)}。MDS 発症に関与する MLL 遺伝子は SET ドメインを有し、最近 H3 K4 のメチル化酵素であることが明らかにされた⁴⁾。今回我々は MDS における epigenetic な発ガン機構を明らかにするため MDS 好中球における global なヒストン H3 のメチル化修飾状態を検討した。

B. 研究方法

RA:4 例、RAEB1:4 例、RAEB2/AML:2 例 (表 1) と健常者を対象に、末梢血より好中球を分離し、ヒストンを抽出後、抗 H3 di or tri methyl K4、抗 H3 di or tri methyl K9 抗体を用い Western Blot 法 (WB) による解析を行った。K562 細胞株を外部標準、total H3 を内部標準とし Methylation Index (以下 M.I.) (式 1) を算出し解析に用いた。解析可能な症例は FISH 法により clonality を確認した。尚、検体採取と解析にあたり可能な限り本人より IC を取得した。

表 1. Patients' Characteristics (I)

Pt. No.	Age/Sex	Diagnosis	WBC (×10 ⁹ /L)	Hb (g/dL)	PL (×10 ⁹ /L)	PM Blast (%) / Neutrophil (%)
1	37F	MDS (RAEB2)	36.15	9.1	29	3/25
2	63M	MDS (RAEB2)	1.52	9.3	120	0/59
3	65M	MDS (RAEB2)	3.50	12.5	48	0/38
4	83F	MDS (RAEB2)	10.58	8.2	47	11/8
5	65M	MDS (RAEB2)	2.79	9.2	302	0/75
6	74M	MDS (RAEB2)	1.63	8.5	31	8/14
7	47F	MDS (RAEB2)	3.85	8.3	50	+/83
8	82F	MDS (RAEB2)	5.68	8.9	172	0/87
9	71M	MDS (RAEB2)	20.99	7.0	66	24/47
10	29F	MDS (RAEB2)	4.55	10.3	41	0/47

Patients' Characteristics (II)

Pt. No.	Karyotype
1	45,X,-7 [20]
2	47,XY,+8 [21] 46,XY [18]
3	47,XY,+8 [12] 46,XY [9]
4	47,X,-8 [13] 46,X [7]
5	45,XY,del(5)(q23q32),-7,+8,add(12)(p11),22,X(22)(q10),inc [1] 45,XY,del(5)(q23q32),-7,-11,add(11)(q23),-18,22,X(22)(q10),inc [5] 56,XY,+1,+2,+4,del(5)(q23q32),+del(5),+8,+8,+10,+11,+13,+15,+21,22,X(22)(q10) [14]
6	44,XY,add(5)(q13),-7, der (12;19)(q10p10),del(16)(q22) [3] 43,XY,-4,add(5)(q13),-4,-7,-10, der (12;19)(q10p10),add(13)(p11), 15,del(16)(q22),add(19)(q12),-3mar [2]
7	46,XX,-13q,-20q [5] 46,XX [15]
8	46,XX [20]
9	46,XY,inv(1)(p13q21) [20] (congenital)
10	46,XX [20]

式

$$\text{Methylation Index} = \frac{\text{patient-Ab}}{\text{K562-Ab}} \times \frac{\text{K562-total H3}}{\text{patient-total H3}}$$

C. 研究成果

研究に供した好中球の分離純度は 91% 以上であった (1 例のみ 58.0%)。MDS では H3 K4、K9 の global hyper tri-methylation が 5/10 例、2/9 例及び H3 K4、K9 の global hyper di-methylation が 4/9 例、6/10 例で認め、H3 K9 hyper di-methylation は -7/ 複雑核型異常を有する 3/3 例 (100%) で認め、その他の核型 42.9% に比して高頻度であった (p=0.0126) (図 1) (表 2)。

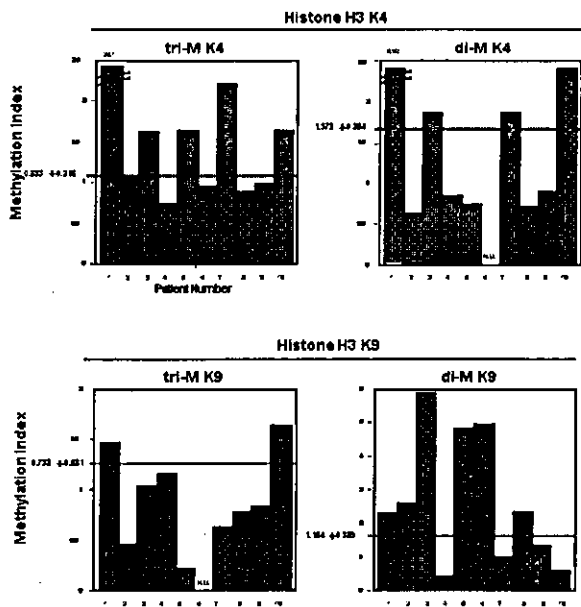


図1. Methylation Index of Histone H3
 横線は健常者コントロール (n=9) の平均±標準偏差の値を示す

表2. Frequency of Histone H3 hypermethylation

Diagnosis	tri-M K4	di-M K4	tri-M K9	di-M K9
RA	24 (60%)	24 (60%)	14 (25%)	24 (60%)
RAEB-1	24 (60%)	14 (25%)	04 (0%)	24 (60%)
MDS/AML, RAEB-2	12 (60%)	12 (60%)	12 (60%)	12 (60%)

Chromosomal abnormality		tri-M K4	di-M K4	tri-M K9	di-M K9
-7, complex	pts	20 (85%)	10 (33%)	10 (33%)	30 (100%)
-8, 13q-20q,	pts	37 (82%)	37 (82%)	17 (43%)	37 (82%)
normal karyotype	pts				

D. 考 察

本研究では MDS の原病態に対するヒストンメチル化の関与を検討する目的で好中球を検体として用いた。その結果、H3 K4 及び K9 の global hyper methylation を MDS の半数に認めた。DNA メチル化と相関する K9 di-methylation は -7/ 複雑核型の症例全てに global hyper methylation が認められた。この結果はこれらの染色体異常の発生にヒストンメチル化を介した epigenetic な機構が関与している可能性を示唆する。また、H3 K9 の hyper-di-methylation は RA の 50.0 % に認められ、

MDS の primary event である可能性もある。今後、メチル化と白血病化との関連を検討する必要があるが、解析可能であった 5 例の末血芽球と好中球の比較では、H3 K9 の M.I. は 4 例で同様の傾向を示し、1 例で芽球の方が高かった。現在、-7/ 複雑核型におけるメチル化標的遺伝子を明らかにするため、抗 di-methyl K4、K9 抗体を用いたクロマチン免疫沈降 subtraction assay を行っている。

E. 結 論

MDS の約半数にヒストン H3 K4 及び K9 の global hyper methylation を認め、H3 K9 hyper di-methylation は -7/ 複雑核型例で高頻度であった。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

1. The Xth Congress of the International Society of Hematology, Asian-Pacific Division

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

I. 参考文献

1. Lübbert M. British Journal of Haematology 114: 349-357, 2001
2. Tamaru H, Eric U. Selker, Nature 414: 277-283, 2001
3. Tamaru H, et al. Nature Genetics 34: 75-79, 2003
4. Milne TA, et al. Molecular Cell 10: 1107-1117, 2002

IV. 骨髓纖維症

原発性慢性骨髄線維症に対する新規治療法開発のためのモデルマウスの作成

原田 実根、下田 和哉、石川 文彦、角光 晴子、亀崎健次郎、岡村 孝

九州大学病態修復内科学・第一内科、久留米大学第二内科

研究要旨 骨髄線維症患者末梢血 CD34 陽性細胞を NOD/SCID/ β 2 ミクログロブリン欠損マウスに移植すると、ヒト血液細胞が生着し、骨髄の線維化が生じる。また巨核球の増殖因子であるトロンボポイエチンのトランスジェニックマウスでは、骨髄の線維化、骨硬化が生じ、脾臓では髓外造血を認めた。これらのマウスは骨髄線維症のモデルマウスになり得、サリドマイドなどの新規薬物療法の有効性検討に有用と考えられた。

A. 研究目的

原因不明の骨髄増殖性疾患である原発性慢性骨髄線維症に対する標準的治療法は確立されておらず、少量サリドマイドやメルファランの効果が報告されているものの、造血幹細胞移植が唯一の根治的療法である。新規薬物療法開発のために、原発性慢性骨髄線維症のモデルマウスの作成を行う。

B. 研究方法

原発性慢性骨髄線維症は造血幹細胞レベルでの腫瘍性変化と考えられている。そこで、骨髄線維症患者末梢血 CD34 陽性細胞を、T細胞を含めたヒト血液細胞が高率に再構成される NOD/SCID/ β 2 ミクログロブリン欠損新生児マウスに移植した。また、原発性慢性骨髄線維症では巨核球の増加を伴うことが多く、巨核球の増殖因子である thrombopoietin (TPO) を骨髄細胞に retrovirus を用い過剰発現させ、それを移植したマウスでは骨髄の線維化が生じることから、免疫グロブリン C μ のプロモーターの下流に TPO を組み込んだトランスジェニックマウス (Tg) を作成した。これら 2 種類のマウスで骨髄線維症が発症するかを検討した。

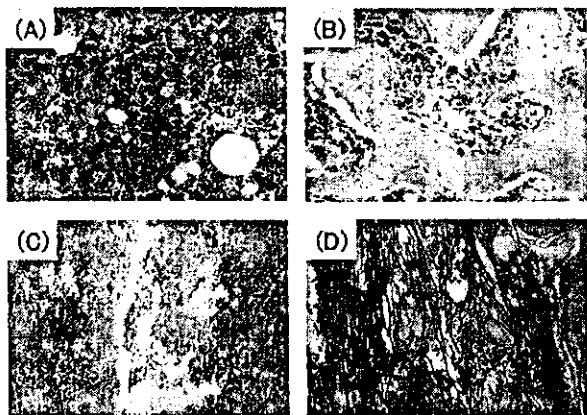
C. 研究成果

臍帯血または骨髄線維症患者末梢血の CD34 陽性細胞を、NOD/SCID/ β 2 ミクログロブリン欠損新生児マウスに移植した。移植後 100 日のマウスでは軽度の脾腫を認め、骨髄細胞数は、臍帯血

CD34 陽性細胞を移植したときは、 2.46×10^7 であるのに対し、骨髄線維症患者末梢血 CD34 陽性細胞を移植すると、 2.83×10^5 個と著減していた。また、臍帯血 CD34 陽性細胞を移植したときは、CD19 陽性の B 細胞も再構築されるのに対し、骨髄線維症患者末梢血 CD34 陽性細胞を移植した場合、B細胞はほとんど検出されなかった。組織学的には、臍帯血 CD34 陽性細胞を移植したときは、骨髄は細胞成分が豊富であるのに対し、骨髄線維症患者末梢血 CD34 陽性細胞を移植した場合、骨髄の細胞成分は少なく、線維化が生じていた。

TPO Tg では、血中 TPO は 3.5 ± 1.5 ng/ml と、野生型マウスの 1.5 ± 0.3 ng/ml に比べ増加しており、末梢血の血小板数は $211.5 \pm 82.3 \times 10^4/\mu$ l と、野生型の $69.3 \pm 10.1 \times 10^4/\mu$ l の約 3 倍に増加していた。白血球は野生型マウスの約 2 倍、Hct 値は約 0.9 倍であり、軽度の貧血を認めた。生後 3 ヶ月の時点では骨髄の細胞数は Tpo Tg と野生型マウスで差を認めないものの、12 ヶ月経過すると TPO Tg では骨髄の線維化と骨硬化が著明となり、細胞成分はほとんど認めなかった (図 (A) (C) 野生型マウス骨髄。(B) (D) TPO Tg マウスの骨髄。(A) (B) は HE 染色、(C) (D) は銀染色)。TPO Tg では脾腫が著明であり、細胞数には差を認めないものの、重量は野生型マウスの脾の 2 倍となる。髓外造血もみられ、GM コロニーは約 10 倍以上、erythroid コロニーは約 2 倍に増加していた。骨髄の線維化には TGF- β (transforming growth factor- β) が、骨硬化には OPG (osteoprotegerin) の関与が示唆されている

が、TPO Tg では野生型マウスと比べ、血中 TGF- β が約 4 倍、OPG が約 1.7 倍に増加していた。



D. 考 察

骨髓線維症患者末梢血 CD34 陽性細胞をマウスに移植すると、マウスで骨髓の線維化が生じることから、骨髓線維症が stem cell disease であることが確認された。ヒト細胞を免疫不全マウスに移植する系と、TPO トランスジェニックマウスの両者ともに、ヒト骨髓線維症様病態を呈し、これらのマウスは骨髓線維症のモデルマウスになり得ると考えられ、サリドマイドなどの新規薬物療法の有効性検討に使用可能であろう。

E. 結 論

骨髓線維症患者末梢血 CD34 陽性細胞を移植した NOD/SCID/ β 2 ミクログロブリン欠損マウスおよび TPO トランスジェニックマウスの両者ともに、ヒト骨髓線維症様病態を呈した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kakumitsu H, Kamezaki K, Shimoda K, Karube K, Haro T, Numata A, Shide, K, Matsuda T, Oshima K, Harada M: Transgenic Mice Overexpressing Murine Thrombopoietin Develop Myelofibrosis and Osteosclerosis. Leuk Res (in press)

2. 学会発表

1. Tanimoto T, Shimoda K, Yamaguchi T, Okamura T, Mizuguchi H, Omine M, Niho Y, Harada M; Prognostic factors in primary chronic myelofibrosis in patients aged less than 70 years: a report on 207 patients with the description of a scoring system and its validation on 100 other patients. 46th American Society of Hematology (2004. 12, San Diego, U.S.A)

H. 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

I. 参考文献

1. 下田和哉: 骨髓線維症のモデルマウス. 血液フロンティア 13: 431-435, 2003
2. 下田和哉, 原田実根: 骨髓線維症と治療の進歩. Annual Review 血液 2004 (高久史磨, 溝口秀昭, 小宮山淳, 坂田洋一, 金倉譲編): 68-77, 中外医学社, 東京, 2004

骨髄線維化を伴った骨髄異形成症候群 (MDS-MF) の病態形成における TGF-beta と TPO の役割

新津洋司郎、松永 卓也、秋山 剛英

札幌医科大学 第四内科

研究要旨 骨髄線維化を伴う骨髄異形成症候群 (MDS-MF) の患者においては、骨髄で核分葉の乏しい巨核球が増加していることが特徴である。しかし、MDS-MF における骨髄線維化と巨核球増多の機序は未だ明らかでない。本研究において我々は、MDS-MF では CD61 陰性単核球から過剰産生される TGF- β が骨髄線維化と巨核球増多に関与している可能性を明らかにした。

A. 研究目的

骨髄異形成症候群 (MDS) の中で骨髄線維化を伴った症例 (MDS-MF) は 10-20 % と比較的稀であり^{1),2)} 骨髄線維化を伴わない MDS (MDS without MF) に比べて、(i) 骨髄において核分葉の乏しい巨核球が増加している³⁾、(ii) 血小板数が保たれている⁴⁾、等の血液学的特徴を有し、骨髄不全死の頻度が高く予後が不良である^{3),5)} という特徴を示す。造血器疾患における骨髄線維化の機序として、これまで (i) 原発性骨髄線維症では CD34 陽性細胞⁶⁾、単球⁷⁾あるいは巨核球⁸⁾、(ii) 急性巨核芽球性白血病⁹⁾ では巨核芽球、(iii) 慢性骨髄性白血病^{10),11)} では巨核球等の血液細胞から過剰産生される transforming growth factor- β (TGF- β) の刺激による骨髄線維芽細胞からのコラーゲンの産生亢進が報告されてきた。しかし、MDS-MF における骨髄線維化と骨髄巨核球増多の発症機序は未だ明らかにされていない。

以上の背景から、我々は、MDS-MF における骨髄線維化および骨髄巨核球増多の機序を TGF- β と TPO の関連で調べることにした。

B. 研究方法

MDS-MF 7 例、骨髄線維化を伴わない MDS (MDS without MF) 8 例、その他の血液疾患 15 例、健常人 (HV) 5 人。骨髄生検標本の評価、real-time RT-PCR での TGF- β mRNA 定量、血中 TGF- β 1/TPO 濃度測定、TGF- β 1 存在下の CFU-Meg assay を行った。

(倫理面への配慮) 本研究は当大学の倫理委員会

で許可されたもので、患者および健常人から末梢血および骨髄液を採取する際には、文書を用いて研究の主旨を説明し、インフォームドコンセントを得ている。

C. 研究成果

(1) MDS-MF では、CD61 陰性単核球が TGF- β 1 を過剰産生するため MDS without MF に比べて血中 TGF- β 1 濃度が高値を示し骨髄線維化を来す事、(2) MDS-MF の CFU-Meg は MDS without MF や HV のそれらと同様に TGF- β 1 による抑制を受ける事、MDS-MF では、MDS without MF に比べて血中 TPO 濃度が高値を示す事、が明らかとなった。

D. 考察

MDS-MF では、(1) CD61 陰性単核球から過剰産生される TGF- β 1 が骨髄線維芽細胞からのコラーゲン産生を亢進させる結果、骨髄線維化を来すこと、(2) TGF- β 1 の過剰刺激で骨髄ストローマ細胞から TPO 産生が増加するため、血中 TPO 濃度は高値を示し、小型で核分葉の少ない巨核球が増加する事、が示唆された。

E. 結論

MDS-MF においては、TGF- β 1 と TPO は骨髄線維化と小型で核分葉の少ない巨核球の増多に関与している。

F. 健康危惧情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1. Niitsu Y et al. Involvement of TGF- β and thrombopoietin (TPO) in the pathogenesis of myelodysplastic syndrome with myelofibrosis. The 44th Annual Meeting of American Society of Hematology 2002, Philadelphia, USA.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

I. 参考文献

1. Imbert M, Nguyen D, Sultan C. Myelodysplastic syndrome (MDS) and acute myeloid leukemias (AML) with myelofibrosis. *Leuk Res* 16: 51-54, 1992
2. Sultan C, Imbert M, Jouault H, Scoazec JY. Myelodysplastic syndromes. *Acta Haematol* 78: 91-93 (Suppl 1), 1987
3. Lambertenghi-Delilieri G, Orazi A, Luksch R, Annaloro C, Soligo D. Myelodysplastic syndrome with increased marrow fibrosis: a distinct clinico-pathological entity. *Br J Haematol* 78: 161-166, 1991
4. Pagliuca A, Layton DM, Manoharan A, Gordon S, Green PJ, Mufti GJ. Myelofibrosis in primary myelodysplastic syndromes: a clinico-morphological study of 10 cases. *Br J Haematol* 71: 499-504, 1989
5. Ohyashiki K, Sasao I, Ohyashiki JH, Murakami T, Tauchi T, Iwabuchi A, Toyama K. Cytogenetic and clinical findings of myelodysplastic syndromes with a poor prognosis. An experience with 97 cases. *Cancer* 70: 94-99, 1992
6. Le Bousse-Kerdiles MC, Chevillard S, Charpentier A, Romquin N, Clay D, Smadja-Joffe F, Praloran V, Dupriez B, Demory JL, Jasmin C & Martyre MC. Differential expression of transforming growth factor-beta, basic fibroblast growth factor, and their receptors in CD34+ hematopoietic progenitor cells from patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia. *Blood* 88: 4534-4546, 1996
7. Rameshwar P, Chang VT, Thacker UF, Gascon P. Systemic transforming growth factor-beta in patients with bone marrow fibrosis--pathophysiological implications. *Am J Hematol* 59: 133-142, 1998
8. Martyre MC, Romquin N, Le Bousse-Kerdiles MC, Chevillard S, Benyahia B, Dupriez B, Demory JL & Bauters F. Transforming growth factor-beta and megakaryocytes in the pathogenesis of idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol* 88: 9-16, 1994
9. Terui T, Niitsu Y, Mahara K, Fujisaki Y, Urushizaki Y, Mogi Y, Kohgo Y, Watanabe N, Ogura M & Saito H. The production of transforming growth factor-beta in acute megakaryoblastic leukemia and its possible implications in myelofibrosis. *Blood* 75: 1540-1548, 1990
10. Thiele J, Kvasnicka HM, Beelen DW, Flucke U, Spoer C, Paperno S, Leder L, Scafer UL. Megakaryopoiesis and myelofibrosis in chronic myeloid leukemia after allogenic bone marrow transplantation: An immunohistochemical study of 127 patients. *Mod Pathol* 12: 129-138, 2000
11. Martyre MC. TGF-beta and megakaryocytes in the pathogenesis of myelofibrosis in myeloproliferative disorders. *Leuk Lymphoma* 20: 39-44, 1995

V. 造血細胞移植

骨髓非破壊的同種造血幹細胞移植におけるキメリズム解析に関する研究

今村 雅寛、三浦 洋子、東梅 友美、平手 大輔、
加藤 菜穂子、重松 明男、岩尾 憲明、田中 淳司

北海道大学大学院医学研究科血液内科学

研究要旨 同種造血幹細胞移植後のキメリズム解析は、生着、拒絶、移植片対宿主病、再発の予知に重要である。特に、骨髓非破壊的同種造血幹細胞移植においては混合キメラから完全キメラへの転換が必要であり、免疫抑制剤の減量・中止とドナーリンパ球輸注の実施時期の決定のために、キメリズムの結果を適宜参考にすることの意義は大きい。末梢血の全血を用いたキメリズム解析では、不十分な情報しか得られず、CD3、CD14・15、CD56 陽性分画のキメリズムを解析することで、より詳細な情報が得られ、同種造血幹細胞移植後の種々の病態を早期に把握でき、それらに対する適切な処置を行うことが可能となる。

A. 研究目的

骨髓非破壊的同種造血幹細胞移植後の末梢血キメリズムを、各種細胞分画で解析することにより、種々の移植後合併症の制御を目指す。

B. 研究方法

骨髓非破壊的同種造血幹細胞移植 30 症例の末梢血単核球をモノクローナル抗体と用いた免疫磁気ビーズ法により CD3、CD14・15、CD56 陽性細胞に分離し、4 種類のマイクロサテライト DNA をプローブとして PCR を施行し、キャピラリー電気泳動法にてキメリズム解析を行った。ドナータイプ 97% 以上を完全キメラとして、種々の病態との関連性を検討した。

C. 研究成果

骨髓非破壊的同種造血幹細胞移植の移植後 28 日目では、全ての細胞分画で完全キメラは認められ難い。未分画細胞、CD3 陽性細胞、CD14・15 陽性細胞、CD56 陽性細胞における完全キメラ達成日は各々 30 日 (15-133 日)、46 日 (15-140 日)、22 日 (14-84 日)、28 日 (15-84 日) であり、回復の順番は CD14・15 陽性細胞、CD56 陽性細胞、CD3 陽性細胞であった。CD56 陽性細胞および CD3 陽性細胞は免疫担当細胞であるため、そのキメリズムの推移は生着、拒絶、移植片対宿主病 (GVHD)、再発に重大な影響を及ぼす。

全身放射線照射 (TBI) 未施行例では全ての細

胞分画で混合キメラが認められた。移植後 1 ヶ月後の CD3、CD14・15 陽性細胞分画が完全キメラの症例で急性 GVHD が多く、CD14・15 陽性細胞分画が混合キメラの症例に再発が多く認められた。拒絶に関しては CD3、CD56 陽性細胞分画が混合キメラの症例で多い傾向が認められた。

D. 考 察

従来、CD3 陽性細胞が完全キメラとなれば、拒絶は少ないとされてきたが、今回の解析により、CD3 陽性細胞のキメリズムに先行する形で、CD56 陽性細胞のキメリズムが優位に立つ場合、遅れて CD3 陽性細胞キメリズムも完全型に移行することが多く、その重要性が明らかとなった。特に、骨髓非破壊的同種造血幹細胞移植において、その意義が大きい。すなわち、免疫担当細胞の中で、T 細胞より初期の免疫能に寄与する NK 細胞のキメリズム解析は予想以上に重要であることが明らかとなった。移植後早期から各種細胞分画ごとにキメリズム解析を行うことで、移植後の生着、拒絶、GVHD、再発の予知を適確に把握でき、それらに対する適切な処置が可能になる。

E. 結 論

同種造血幹細胞移植後のキメリズム解析を、各種細胞分画に分けて行うことで、種々の病態把握が適確になされ、それに対する対応を適切に施行し得ることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 東梅友美ら: 非血縁者間同種臍帯血移植後の免疫機能の再構築の検討. 第 101 回日本内科学会講演会, 東京, 2004 年.
2. 三浦洋子ら: ミニ移植後の末梢血細胞亜分画におけるキメリズム解析. 第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会. 京都, 2004 年.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

H. 参考文献

1. Childs R, et al. Blood 94: 3234, 1999
2. Tsutsumi Y, et al. Acta haematol 107: 89, 2001
3. Bornhauser M, et al. Clin Cancer Res 7: 2254, 2001
4. Tsutsumi Y, et al. Br J Haematol 118: 136, 2002
5. Perez-Simon JA, et al. Leukemia 16: 1423, 2002
6. Valcarcel D, et al. Bone Marrow Transplant 31: 387, 2003
7. Lee K-H, et al. Bone Marrow Transplant 32: 423, 2003
8. Baron F, et al. Bone Marrow Transplant 32, 829, 2003
9. Peterson SL, et al. Biol Blood Marrow Transplant 10, 337, 2004
10. Baron F, et al. Blood 104, 2254, 2004

発表文献リスト

発表文献リスト

国際・国内学会雑誌への発表文献リスト

平成16年度の本研究に当たってなされた研究業績のうち既発表または印刷中の原著論文、学会発表抄録、単行本を関連分野別に区別し、原則として英文、和文の順序で、それぞれを原著、抄録に整理し、班構成員名簿の記載順に配列した。

著者名のアンダーラインは本研究班の構成員を示し、通し番号の肩につけた*印は抄録を示す。

1. 再生不良性貧血に関する研究業績

1. Yagasaki H, Hamanoue S, Oda T, Nakahata T, Asano S, Yamashita T : Identification and characterization of novel mutations of the major Fanconi anemia gene FANCA in the Japanese population. Hum Mutat 24 : 481 - 490, 2004
2. Ohga S, Mugishima H, Ohara S, Kojima S, Fujisawa K, Yagi K, Higashigawa M, Tsukimoto I : Aplastic Anemia Committee Japanese Society of Pediatric Hematology : Diamond-Blackfan anemia in Japan: clinical outcomes of prednisolone therapy and hematopoietic stem cell transplantation. Int J Hematol 79 : 22 - 30, 2004
3. Yoshimi A, Nakamoto C, Nakamura Y, Kato K, Matsuyama T, Kudo K, Kojima S : Induction of complete remission of hypoplastic leukemia with antithymocyte globulin. Int J Hematol 77 : 277 - 281, 2003
4. Fujishima N, Hirokawa M, Aiba N, Ichikawa Y, Fujishima M, Komatsuda A, Y Suzuki, Kawabata Y, Miura I, Sawada K : Gene expression profiling of human erythroid progenitors by micro-serial analysis of gene expression. Int J Hematol 80 : 239 - 245, 2004
5. Fukaya H, Xiao W, Inaba K, Suzuki Y, Hirokawa M, Kawabata Y, Komatsuda A, Endo T, Kishimoto H, Takada G, Sawada K : Co-development of dendritic cells along with erythroid differentiation from human CD34⁺ cells by tumor necrosis factor- α . Exp Hematol 32 : 450 - 460, 2004
6. Feng X, Chuhjo T, Sugimori C, Kotani T, Lu X, Takami A, Takamatsu H, Yamazaki H, Nakao S : Diazepam-binding inhibitor-related protein 1 : a candidate autoantigen in acquired aplastic anemia patients harboring a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells. Blood 104 : 2425 - 2431, 2004
7. Matsuda A, Misumi M, Ishikawa M, Yagasaki F, Jinnai I, Bessho M, Mizoguchi H : Long-term improvement of anemia in a patient with aplastic anaemia by short-term administration of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor. Br J Haematol 125 : 818 - 820, 2004

8. Matsuda M, Misumi M, Shimada T, Yoshida K, Yagasaki F, Ito Y, Kawai N, Murohashi I, Hirashima K, Bessho M : Soluble transferrin receptor and its ratio to erythroblasts in bone marrow may be a new diagnostic tool to distinguish between aplastic and refractory anemia. Acta Haematol 111 : 138 - 142, 2004
9. Bessho M, Hotta T, Ohyashiki K, Takahashi T, Mizoguchi H, Asano S, Ikeda Y, M Sakurai, Tojo A, Kizaki M, Iwanaga M, Tomonaga M, Hirashima K : Multicenter prospective study of clonal complications in adult aplastic anemia patients following recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (Lenograstim) administration. Int J Hematol 77 : 152 - 158, 2003
10. 浦部晶夫 : 再生不良性貧血ガイドライン. 分子細胞治療 3 : 126 - 129, 2004
11. 壺岐聖子、浦部晶夫 : 再生不良性貧血の疫学と臨床像. 内科94 : 429 - 431, 2004
12. 小島勢二 : 再生不良性貧血に対する治療の現況. 臨床血液 45 : 202 - 208, 2004
13. 浦部晶夫 : 再生不良性貧血、赤芽球癆. 今日の治療と看護改訂第2版 南江堂 (東京) : 666 - 669, 2004
14. 唐沢正光 : 初回免疫抑制剤無効の再生不良性貧血に対する治療方針は? EBM 血液疾患の治療 (編 押味和夫、別所正美、岡本真一郎、加藤 淳) 中外医学社 (東京) : 45 - 51, 2004
15. 小島勢二 : 再生不良性貧血. 造血細胞移植マニュアル第3版 (編 森下剛久、森島泰雄、堀部敬三、佐尾浩、濱口元洋、松山孝治) 日本医学館 (東京) : 194 - 202, 2004
16. 小島勢二 : 再生不良性貧血の造血幹細胞移植をどう行うか. EBM 血液疾患の治療 2005-2006 (編 押味和夫、別所正美、岡本真一郎、加藤 淳) 中外医学社 (東京) : 68 - 74, 2004
17. 中尾眞二 : 再生不良性貧血 1) 薬物療法・免疫抑制療法 血液疾患診療の EBM (編 内山卓、小峰光博) メディカルレビュー社 (東京) : 25 - 34, 2004

2. 溶血性貧血に関する研究業績

18. Nishimura J, Kanakura Y, Ware RE, Shichishima T, Nakakuma H, Ninomiya H, Decastro CM, Hall S, Kanamaru A, Sullivan KM, Mizoguchi H, Omine M, Kinoshita T, Rosse WF : Clinical course and flow cytometric analysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the United States and Japan. Medicine (Baltimore) 83(3) : 193 - 207, 2004
19. Ito S, Oyake T, Uchiyama T, Sugawara T, Murai K, Ishida Y : Successful Treatment with Cyclosporine and High-Dose Gamma Immunoglobulin for Persistent Parvovirus B19 Infection in a Patient with Refractory

Autoimmune Hemolytic Anemia. Int J Hematol 80 : 250 - 253, 2004

20. 小峰光博 : 3. 溶血性貧血 EBM 内科処方指針 中外医学社 (東京) 648 - 658, 2004
21. 樋口敬和、小峰光博 : 特集 フローチャートでみる生活習慣病診療指針 3. 溶血性貧血. 成人病と生活習慣病 34 : 455 - 458, 2004
22. 小峰光博 : 《トピックス》 Eculizumab による発作性夜間ヘモグロビン尿症の治療 内科 94 : 535 - 539, 2004
23. 金倉 譲 : 発作性夜間血色素尿症の病態. The Word on Hematology 2 : 2 - 3, 2004
24. 近江俊徳、熊田真樹、亀崎豊実、奥田浩、梶井英治、岩本禎彦 : ブタ Rhesus (RH) 遺伝子の cDNA クローニング、マッピング、多型解析. DNA 多型 12 : 12 - 15, 2004
25. 亀崎豊実、梶井英治 : Coombs 試験. 内科 南江堂 93 : 1172, 2004
26. 亀崎豊実、梶井英治 : Donath-Landsteiner 抗体. 内科 南江堂 93 : 1074, 2004
27. 亀崎豊実、梶井英治 : ハプトグロビン (Hp). 内科 南江堂 93 : 1052, 2004
28. 亀崎豊実、梶井英治 : 寒冷凝集素. 内科 南光堂 93 : 1173, 2004
29. 亀崎豊実、梶井英治 : 血小板関連抗体 (PAIgG). 内科 南江堂 93 : 1053, 2004
30. 亀崎豊実、梶井英治 : 抗血小板抗体. 内科 南江堂 93 : 1245, 2004
31. 小峰光博 : 36. 溶血性貧血. 血液の事典 朝倉書店, 2004
32. 小峰光博 : 37. 自己免疫性溶血性貧血. 血液の事典 朝倉書店, 2004
33. 小峰光博 : 4. 自己免疫性溶血性貧血. 血液疾患診療の EBM (編 内山 卓、小峰光博) メディカルレビュー社 : 51 - 57, 2004
34. 村井一範、石田陽治 : 溶血性貧血、症候性貧血 日常病にどう対応しますか? - 頻度順に考える症状/疾病の対処法 - 治療 増刊号 86 : 761 - 764, 2004
35. 亀崎豊実、梶井英治 : 冷式抗体による自己免疫性溶血性貧血. 内科診療 Q & A 第 38 号 六法出版 (名古屋) : 204 - 207, 2004
36. 高橋直樹、別所正美 : 貧血. 臨床医 増刊号 30 中外医学社 (東京) : 803 - 805, 2004

37. 脇本直樹、別所正美：溶血性貧血。臨床医 増刊号 30 中外医学社 (東京)：1129 - 1130, 2004

3. 不応性貧血に関する研究業績

38. Oyake T, Ito S, Kowata S, Murai K, Ishida Y : Myelodysplastic syndrome with bone marrow hypoplasia is associated with much higher frequency of apoptosis in CD 34⁺ cells. Blood 104 : 651a, 2004
39. Badran A, Yoshida A, Ishikawa K, Goi T, Yamaguchi A, Ueda T, Inuzuka M : Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptosis gene survivin. Biochem Biophys Res Commun 314(3) : 902 - 907, 2004
40. Kawai Y, Kinoshita K, Arai H, Kuwata A, Fukuoka Y, Yamaoka M, Imamura S, Tsutani H, Ueda T : Reduced intensity allogeneic stem cell transplantation for systemic primary amyloidosis refractory to high-dose melphalan. Eur J Haematol 72 : 448 - 450, 2004
41. Qi SN, Yoshida A, Wang ZR, Ueda T : GP7 can induce apoptotic DNA fragmentation of human leukemia cells through caspase-3-dependent and -independent pathways. Int J Mol Med 13(1) : 163 - 167, 2004
42. Takagi K, Kawai Y, Yamauchi T, Ueda T : Inhibition of repair of carboplatin-induced DNA damage by 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine in quiescent human lymphocytes. Biochem Pharmacol 68 : 1757 - 1766, 2004
43. Yamauchi T, Ueda T : Simple and sensitive method for quantification of fludarabine triphosphate intracellular concentration in leukemic cells using isocratic liquid chromatography. J Chromatogr B 799 : 81 - 86, 2004
44. Nakamura S, Kobayashi M, Shibata K, Sahara N, Shigeno K, Shinjo K, Naito K, Ohnishi K : COX-2 independent induction of apoptosis by etodolac in leukemia cells in vitro and growth inhibition of leukemia cells in vivo. Cancer Therapy 2 : 153 - 166, 2004
45. Shigeno K, Yoshida H, Pan L, Luo JM, Fujisawa S, Naito K, Nakamura S, Shinjo K, Takeshita A, Ohno R, Ohnishi K : Disease-related potential of mutations in transcriptional cofactors CREB-binding protein and p300 in leukemias. Cancer Lett 213 : 11 - 20, 2004
46. Takeshita A, Naito K, Shinjo K, Sahara N, Matsui H, Ohnishi K, Beppu H, Ohtsubo K, Horii T, Maekawa M, Inaba T, Ohno R : Deletion 6p23 and add(11)(p15) leading to NUP98 translocation in a case of therapy-related atypical chronic myelocytic leukemia transforming to acute myelocytic leukemia. Cancer Genet Cytogenet 152 : 56 - 60, 2004

47. Matsuda M, Morita Y, Hanamoto H, Tatsumi Y, Maeda Y, Kanamaru A : CD34⁺ progenitors from MDS patients are unresponsive to SDF-1, despite high levels of SDF-1 in bone marrow plasma. *Leukemia* 18 : 1038 - 1040, 2004
48. Morita Y, Matsuda M, Hanamoto H, Shimada T, Tatsumi Y, Maeda Y, Kanamaru A : A perforin/granzyme-positive MDS-derived T cell line, K2-MDS, induces apoptosis in CD34⁺ cells through the fractalkine/CX3CR1 system. *Clin Immunol* 113 : 109 - 116, 2004
49. Kimura A, Sultana TA : Granulocyte colony-stimulating factor receptors on CD34⁺ cells in patients with myelodysplastic syndrome (MDS) and MDS-acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 45 : 1995 - 2000, 2004
50. Ogama Y, Ouchida M, Yoshino T, Ito S, Takimoto H, Shiote Y, Ishimaru F, Harada M, Tanimoto M, Shimizu K : Prevalent hyper-methylation of the CDH13 gene promoter in malignant B cell lymphomas. *Int J Oncol* 25(3) : 685 - 691, 2004
51. Kamiya H, Yakushiji H, Dugue L, Tanimoto M, Pochet S, Nakabeppu Y, Harashima H : Probing the substrate recognition mechanism of the human MTH1 protein by nucleotide analogs. *J Mol Biol* 336:843 - 850, 2004
52. Kojima K, Sakai I, Hasegawa A, Niiya H, Azuma T, Matsuo Y, Fujii N, Tanimoto M, Fujita S : FLJ10849, a septin family gene, fuses MLL in a novel leukemia cell line CNLBC1 derived from chronic neutrophilic leukemia in transformation with t(4;11)(q21;q23). *Leukemia* 18 : 998 - 1005, 2004
53. Kobayashi H, Takemura Y, Hayashi T, Ujiye T, Kawase M, Niino Y, Miyachi H, Ohshima T, Hotta T : Expression level of MDR1 message in peripheral blood leukocytes from healthy adults : a competitive nucleic acid sequence-based amplification assay for its determination. *Clin Chem Lab Med* 42 : 1098 - 1101, 2004
54. Hayashi T, Kobayashi H, Miyachi H, Ohshima T, Ujiye T, Kawase M, Hotta T, Takemura Y : A competitive nucleic acid sequence-based amplification assay for the quantification of human MDR1 transcript in leukemia cells. *Clin Chim Acta* 342 : 115 - 126, 2004
55. 浦部晶夫 : 骨髄異形成症候群の診断——診断基準. 最新医学 別冊 新しい診断と治療の ABC 19 : 115 - 119, 2004
56. 田口潤、朝長万左男 : 特集 白血病治療の最前線—分子病態の理解に基づく新たな展開— (標準的治療法の確立と難治例に対するアプローチ) ハイリスク MDS. *Current Therapy* 22 : 804-808, 2004
57. 朝長万左男 : 解説 MDS 治療の最前線. 血液・腫瘍科 49 : 183-188, 2004