

樹状細胞と造血に関する研究

分担研究者 澤田 賢一（秋田大学医学部内科学講座 血液・腎臓内科学分野 教授）

廣川 誠、斉藤 邦江、斉藤 宏文、藤島 直仁、藤島 真澄

（秋田大学医学部内科学講座 血液・腎臓内科学分野）

研究要旨 ヒト純化造血幹・前駆細胞（CD34+細胞）の赤芽球系特異的分化誘導においては、炎症刺激（tumor necrosis factor- α , TNF- α ）の共存によって樹状細胞(dendritic cells, DCs)による自己赤芽球系前駆細胞の貪食が惹起される。本研究では、この現象の普遍性と自己血球を貪食する DCs の生理的・病態的意義を解析した。In vitro において、CD34+細胞は thrombopoietin (TPO)と TNF- α 共存下で DCs を発生した。同時に、DCs による自己巨核球系前駆細胞の貪食と自己 T リンパ球の増殖誘導を認めた。In vivo では血球貪食症候群において、自己血球を貪食する細胞が DCs であることを示唆した。以上から、DCs による自己造血細胞の貪食は、造血刺激と炎症性刺激の共存下における普遍的現象である。また、生体における同様の機転が示唆された。

A. 研究目的

樹状細胞(dendritic cells, DCs)は、T 細胞を活性化あるいは制御することによって免疫系のホメオスタシスを維持しており、その破綻は自己免疫疾患や免疫異常を惹起すると推定されている。造血幹・前駆細胞（CD34+細胞）由来 DCs の特徴は、造血刺激と炎症性刺激の共存下で造血前駆細胞と同時に発生することである。一方で、炎症性サイトカインの多くは造血前駆細胞のアポトーシスを誘導する。本研究開始の契機は、CD34+細胞由来 DCs が骨髄を“場”として、同時に発生する自己造血前駆細胞とどのように関わり、どのような生理的・病態的意義を担うのかという

疑問であった。我々はこれまでに、ヒト CD34+細胞由来 DCs は、赤血球造血において、①炎症刺激と造血刺激の共存下で発生し、②同時に発生する自己造血前駆細胞を貪食することを明らかにしてきた（Exp Hematol 2002, 2004）。本研究では、炎症刺激と造血刺激の共存下における DCs の発生と自己血球の貪食が、他の血球系列にも認められる普遍的現象であるか否かを検証するとともに、自己血球を貪食する DCs の生理的・病態的意義についてアプローチすることを目的とした。

B. 研究方法

1. CliniMACS を用いてヒト CD34+細胞を純化

した。純化 CD34+細胞を TPO 存在下で浮遊培養し、巨核球系への系特異的分化誘導を行ない、TNF- α による DCs の誘導と DCs による自己巨核球系前駆細胞の貪食を、May-Grunward-Giemsa (MG) 染色、FACS、酵素抗体染色、共焦点顕微鏡を用いて検討した。CD34+細胞純化時に同時に保存した CD34-細胞から、ナイロン・ファイバーカラムを用いて T 細胞を純化した。リンパ球混合反応 (mixed lymphocyte reaction, MLR) は、DCs と自己 T リンパ球を用いて行なった。DCs のサイトカイン産生能は cytometric bead array system を用いて測定した。

2. 血球貪食症候群 (hemophagocytic syndrome, HPS) 患者の骨髓標本を凍結保存した。貪食細胞の性状を、MG 染色、酵素抗体染色、 α -naphthyl butylate (α -NB) 染色を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

実施にあたっては申請者らが所属する研究機関 (秋田大学医学部) の倫理委員会の規定を厳守して研究を遂行した。ヒト細胞の採取にあたっては秋田大学医学部倫理委員会の審査・承認を得ており文書で同意を得た。

C. 研究結果

1. TPO によって巨核球系前駆細胞が誘導された (純度約 90%)。
2. TNF- α は濃度依存性に巨核球系前駆細胞のアポトーシスを誘導し、非巨核球系細胞を増加させた。
3. 非巨核球系前駆細胞は CD4+ CD11c+ CD123+

の DCs からなっていた。

4. DCs による自己巨核球系細胞の接着と貪食を認めた。
5. 自己の巨核球系細胞を貪食した DCs は自己リンパ球の増殖を誘導した。
6. DCs は IL-8 と微量の IL-6 を産生したが、IL-10 や L-12 の産生を認めなかった。
7. HPS 症例において DC11c+細胞の 62.2-84.4%が貪食細胞であった。 α -NB による顆粒染色性は *in vitro* で誘導した DCs に類似していた。

D. 考察

以上の検討から、造血刺激と炎症刺激の共存は造血幹細胞から DCs を誘導し、DCs による自己造血前駆細胞の貪食を誘導する普遍的現象であることが明らかとなった。DCs の自己血球貪食の生理的・病態的意義については不明にとどまる。DCs によるサイトカイン産生が乏しいことから、一般の炎症に関しては免疫寛容の方向に働いていることが示唆された。また、HPS 症例の検討から、本現象は骨髓においても認められることが示唆された。

以上の検討結果から、骨髓の“場”を起点とした免疫寛容や自己免疫疾患の成立機構の存在が強く示唆された。

E. 結論

DCs のみが T 細胞を活性化さらには制御できることから、免疫学的記憶の維持や免疫寛容の誘導 (以下、免疫系ホメオスターシス) における DC の重要性が予測される。1997 年、NS Young (N Engl J Med) によって、自然免疫

系による自己・非自己の識別の破綻が、造血幹・前駆細胞を攻撃対象とする臓器特異的自己免疫疾患の発症につながるという概念が提唱された。本研究によって、その起点である「自己造血前駆細胞の DCs による貪食」を証明した。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Saito K, Hirokawa M, Inaba K, Fukaya H, Kawabata Y, Komatsuda A, Yamashita J, Sawada K. Phagocytosis of co-developing megakaryocytic progenitors by dendritic cells in culture with thrombopoietin and tumor necrosis factor- α and its possible role in hemophagocytic syndrome. Blood [Epub ahead of print], 2005

2. 学会発表

1. Sawada K, Hirokawa M, Inaba K, Fukaya H, Kawabata Y, Komatsuda A, Yamashita J, Saito K. Phagocytosis of co-developing megakaryocytic progenitors by dendritic cells in the culture with thrombopoietin and tumor necrosis factor- α : Possible role in hemophagocytic syndrome. Poster Session 333-III. Monday, December 12, Atlanta, 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

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

MDS の形態診断基準の確立に関する研究

分担研究者 朝長万左男（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授）

研究要旨

2005 年 4 月ポルトガルのリスボンおよび 5 月長崎で開催された MDS 形態に関する国際ワーキンググループ（International Working Group on MDS Morphology）の第 1 回及び第 2 回カンファレンスに出席し、我が国の形態診断基準の実態を報告するとともに、国際基準の確立のためのコンセンサス作りに参加した。中間的まとめとして、好中球の低分葉 (hypolobulation) と脱顆粒 (degranulation)、赤芽球の環状鉄芽球 (ringed sideroblast)、微小巨核球 (micromegakaryocyte) が MDS に特異的であり、10%以上でもって MDS と診断することが合意された。今後さらに骨髓芽球、単芽球、前単球の定義、および形態異常 10%未満の症例の取り扱い方法を確立することになっている。

A. 研究目的

MDS の形態診断基準は、FAB 分類（1983 年）および WHO 分類（2000 年）が提唱したものが使用されているが、その国際的な標準化はいまだ完成していない。特に WHO 分類において FAB 分類の不応性貧血 (RA) が、形態異常が軽い狭義の RA と多血球系に 10%以上の強い形態異常がみられる不応性血球減少症 (RCMD) に細分されたことから、RA と RCMD の境界線および RA と二次性貧血などの境界線に関して、標準化が国際的にもいっそう求められる状況になってきている。そこで欧米及び日本の MDS 専門家が International Working Group on MDS Morphology を結成し、形態診断基準に関するコンセンサス作りを目指すこととなった。我が国から朝長万左男（長崎大）、陣内

逸郎（埼玉医大）が参加した。

B. 研究方法

日本の MDS 形態診断の現状を報告するとともに、MDS 症例の骨髓標本 10 例をエントリーして、欧米例との比較鏡検を行った。全体的には約 100 例の鏡検を行い、欧米・日本共通の MDS 特異的形態異常を選別・定義し、かつその判定方法について、診断一致率を即時にコンピューターで算出しながら、その結果を分析・協議し、コンセンサスを形成して行く方法がとられた。

（倫理面への配慮）

エントリーした骨髓メイギムザ標本は全て通し番号によって識別する方式を取り、患者名が使用されない配慮を行った。

C. 研究結果

1. 赤芽球系について

赤芽球系では多核巨大赤芽球、巨赤芽球様変化を伴う赤芽球、2核の赤芽球で核間クロマチン架橋形成(bridge formation)、核崩壊(karyorhexis)など種々の形態異常がMDSでよく見られることについては合意が得られたが、MDS 特異的かどうかについては、溶血性貧血、悪性貧血、二次性貧血など多くの貧血疾患でも程度は軽いものの観察されることから、特異性はないと判断された。これらはMDS 診断の参考となる形態異常と位置づけられた。

MDS に特異的な赤芽球の形態異常は鉄染色標本で観察できる環状鉄芽球(ringed sideroblast)のみであるとするコンセンサスが形成された。赤芽球の円形核に近接して沈着する青色鉄顆粒(ミトコンドリア内沈着を示唆する)が5個以上をもって判定すると、観察者間一致率が最も高くなることがわかり、これを形態的定義とすることが合意された。

2. 顆粒球系について

好中球の細胞質脱顆粒がまず検討され、10%以上ある場合はMDS に特異的であるとのコンセンサスが形成された。この異常は特に末梢血塗抹標本で観察しやすいことが多くの人から指摘された。

つぎに好中球分葉核の低分葉(hypolobulation)について集中的議論がなされ、10%以上の低分葉好中球の存在は最もMDS に特異的であるとするコンセンサスが形成された。この場合、我が国で従来からpseudo Pelger-Huet anomaly(偽ペルゲル核異常)と

してカウントされてきたものは、ここでいう低分葉好中球の中のごく一部であり、欧米では低分葉好中球をすべてpseudo Pelger-Huet anomaly としている傾向が強いことが分かった。日本のMDS、特にRAにおける2核の円形核でめがね状のもののみをpseudo Pelger-Huet anomaly とすると、その保有率は30%程度と低く、出現率も1-3%ときわめて低い。

したがって、低分葉好中球 10%以上でMDS と判定する基準を採用すると我が国のRA例でも多くの例が10%をこえ、診断がより確実となると思われる。

この他、我が国で重視してきた好中球の核クロマチン凝集の粗大化はこの低分葉好中球のほとんどがクロマチン凝集の粗大化をともなっており、両者は同じ意義を有していることが分かった。

3. 巨核球系について

巨核球系では従来からFAB分類で定義された単核巨核球(5q-症候群で典型的に出現)、分離多核巨核球および微小巨核球(micromegakaryocyte)がMDS 特異的とみなされてきたが、今回のカンファランスではMDS に特異的なものは最後のmicromegakaryocyteのみであり、その形態学的定義はサイズが前骨髓球以下で、単核または分離した2核のものとしてされた。その他の形態異常は特発性血小板減少性紫斑病など、その他の血小板減少症を呈する疾患でも時にみられるため、MDS でよく見られるものの、特異的なものとは認められなかった。

4. 芽球の判定について

WHO 分類では AML と MDS の境界を芽球 20% とすることが提唱されているが、この芽球%のカウント法で、骨髄芽球 (myeloblast) を type I, II, III の 3 型に分類するフランス学派の主張がほぼコンセンサスを得た。Type I は全く顆粒がない芽球であり、Type II は 20 個未満のアズール顆粒を認めるもの、Type III は 20 個以上認めるもので、Type III の芽球がおうおうにして前骨髄球と誤ってカウントされており、その場合芽球%が誤って低く算定される。したがって AML の正しい判定のためには Type III 芽球を普及させる必要がある。

さらに単芽球と前単球の異同についても検討を開始して、今後芽球%の正確な判定のためのコンセンサス作りを継続することとなった。

我が国では芽球の 3 型分類を行っていないため、Type III 芽球の概念の普及がまず必要となってくる。

5. 特異的形態異常が 10%未満の MDS 疑い症例の取り扱い方

我が国の RA 症例では一般に形態異常が軽い。この中には、この MDS 形態カンファレンスで合意された MDS 特異的形態異常が 10%未満の症例が少なからず存在する。欧米でも最近このような症例が増えてきているとの認識がある。

これらの症例の特徴はまだ必ずしも十分研究されておらず、英国のロンドンにある King's College Hospital の Dr. Mufti は M 蛋白陽性例に用いられている MGUS の用語に準じて、Idiopathic cytopenia with unknown significance (ICUS) として、経過観察し、明確な MDS への進展率、染色体異常保有率、白

血病転化率など、今後多角的解析を行うべきカテゴリーとして扱うよう提案した。まだドイツグループなどのコンセンサスが得られていないが、ICUS は今後の重要な課題となる。

D. 考察

今回はじめて欧米の MDS 専門家 (特に形態学) との共同鏡検カンファレンスに参加して、我が国で用いてきた FAB 分類/WHO 分類が、ほぼ同じ形態基準で行われていることが分かった。しかし形態異常がきわめて多岐にわたる MDS において、どのようなものが特異性において優れているか、この観点からの国際的なコンセンサスはこれまでなかった。今回のカンファレンスの最も重要な成果は、多岐にわたる形態異常を長年観察してきた専門家 (FAB 分類提唱者の 1 人 Dt. Bennett および WHO 分類提唱者の 1 人 Dr. Brunning) が一堂に会して MDS 特異的形態異常として、赤芽球系では環状鉄芽球 (ringed sideroblast) のみ、好中球の脱顆粒 (degranulation) と低分葉 (hypolobulation) の 2 つ、巨核球系では微少巨核球 (micromegakaryocyte) のみ、の計 4 つであるとするコンセンサスに達したことである。またそれぞれの細かい形態学的定義がなされた点も重要で、今後これは最終レポートにおいて写真で示され、またカラーアトラスも出版される予定になっており、これが普及すると MDS 診断の標準化がかなり進展するものと期待される。

しかし芽球の判定法についてはまだ議論が必要であり、特に単芽球と前単球を含め、芽球をどのように定義して AML の診断と MDS の

病型分類 (RAEBI, II) を行うのか、大きな課題が残っている。

また ICUS は我が国に多い形態異常の軽い RA 例 (の一部) に相当しており、今回コンセンサスが得られた形態異常によって判定した場合、それらが 10%未満であることにより診断した症例群がどのような特徴をもつのか興味を持たれるところで、早速、取りかかる予定である。

またすでに我々がドイツのデュッセルドルフ大学グループとの共同研究で明らかにした日独 RA の差異とこの ICUS がどのような関係になるのかも興味ある課題である。

E. 結論

第 1 回および第 2 回 MDS 形態国際ワーキンググループのカンファレンスにおいて、MDS に特異的な形態異常を 4 種類に絞るコンセンサスに到達した。今後この基準で診断した MDS と基準を満たさない血球減少症例を ICUS のカテゴリーでまとめ分析することによって、これまで不鮮明であった MDS の境界がより明確になることを期待したい。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 朝長万左男: 形態検査の再発見 好中球の Pelger-Huet 核異常をめぐって; 血液形態学の進化. 臨床病理 53 : 54-60, 2005
2. (がん診療ガイドライン委員会幹事委員

会) 佐治重豊、平田公一、佐々木常男、久保田哲朗、古畑智久、(がん診療ガイドライン評価委員会) 福井次夫、石岡千加史、小山弘、新保卓郎、戸井雅和、松井邦彦、(抗がん剤適正使用ガイドライン作成ワーキンググループ) 佐々木常男、朝長万左男、坂巻壽、陣内逸郎、渡辺隆、清水一之、村上博和、大野竜三.: 抗がん剤適正使用のガイドライン 造血器腫瘍. Int J Clin Oncol 10 Suppl : 1-15, 2005

3. 朝長万左男: マクロファージフォーラム Topics 不応性貧血の克服: MD S 新規治療薬の登場—第 8 回国際 MD S シンポジウム (長崎市) より. 今日の移植 18 : 526, 2005

4. Iwanaga M, Soda M, Koba T, Yamamura M, Atogami S, Momita S, Joh T, Yoshida Y, Tomonaga M: Myelodysplastic Syndromes in Atomic Bomb Survivors in Nagasaki : A Preliminary Analysis. Acta Med Nagasaki 50 : 97-100, 2005

5. Matsuda A, Ulrich Germing, Jinnai I, Misumi M, Andrea Kuendgen, Sabine Knipp, Manuel Aivado, Iwanaga M, Miyazaki Y, Tsushima H, Sakai M, Bessho M, and Tomonaga M.: Difference in clinical features between Japanese and German patients with refractory anemia in myelodysplastic syndromes. Blood 106 : 2633-40, 2005

6. 朝長万左男、波多智子.: 私のこの一枚(18) 診断に迷った進行性汎血球減少症の 1 例「悪性貧血、骨髓異形成症候群、再生不良性貧血?」. 血液フロンティア 15 : 1929-35, 2005

2. 学会発表

1. 朝長万左男: 造血器腫瘍化学療法ガイドラ

- イン作成にあたっての問題点. 第3回日本臨床腫瘍学会総会, 2005. 3. 4, 横浜. (第3回日本臨床腫瘍学会総会 プログラム・抄録集 p78, 2005)
2. Matsuda A, U.Germing, Jinnai I, Misumi M, A.Kuendgen, S.Knipp, Iwanaga M, Miyazaki Y, Tsushima H, Bessho M, Tomonaga M : Difference in Clinical Features Between Japanese and German Patients with Refractory Anemia According to the French-American-British Classification. 8th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes MDS 2005 ,2005. 5.12, Nagasaki, Japan. (Leuk Res 29 Suppl1: S2, 2005年)
3. 朝長万左男 : A M L に対する Total Therapeutic Strategy - 治癒率上昇をめざして -. 第85回北海道医学大会 臨床血液分科会 (第47回日本臨床血液学会北海道地方会), 2005.10.1, 札幌. (第85回北海道医学大会 プログラム・抄録 p16, 2005)
4. 朝長万左男:原爆被爆者における造血器腫瘍の疫学研究:60年の推移と今後の課題. 日本放射線影響学会第48回大会, 2005.11.15, 広島. (日本放射線影響学会第48回大会、第1回アジア放射線研究会議 講演要旨集 p73, 2005)
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)
1. 特許取得
なし。
 2. 実用新案登録
なし。
 3. その他
なし。

再生不良性貧血患者におけるPNH型血球の臨床的意義

分担研究者 中尾眞二（金沢大学大学院医学系研究科細胞移植学 教授）

杉盛千春，山崎宏人（金沢大学大学院医学系研究科細胞移植学）

研究要旨

再生不良性貧血（AA）患者における発作性夜間血色素尿症（PNH）型血球の臨床的意義を検討するため、122例の新規AA例を対象にPNH型血球増加の有無と免疫抑制療法（IST）に対する反応性や予後との関係を検討した。同時にIST前後と、IST後長期間を経過した患者におけるPNH型血球量・割合の推移を検討した。その結果、PNH型血球の増加が見られたAA例（PNH+AA）は全体の68%（83/122）であった。PNH+AA群におけるISTの奏効率（1年での部分及び完全寛解率，91%）は、PNH型血球の増加が見られなかったAA例（PNH-AA，48%）に比べて有意に高かった（ $P<0.01$ ）。一方、5年全生存率は両群間で差がなかった（77% vs 71%）が、5年 failure-free survivalはPNH+AA群で明らかに高値であった（64% vs 12%， $P<0.01$ ）。IST前後でのPNH型血球量・割合は、治療が奏効した33例，無効であった4例ともに有意な変化を示さなかった。また、2年以上経過を追跡できた23例でもPNH型血球量・割合はほぼ一定であった。これらの結果から、PNH型血球の増加は、AA患者のISTに対する反応性と良好な予後を予想する因子であることが示された。また、PNH型血球の割合はIST奏効例においても長期間変化しないことから、造血幹細胞に対する免疫学的攻撃はPNH型幹細胞に対しても同等に起こっており、PNH型幹細胞自身には正常幹細胞と比べて明らかな増殖の優位性はないことが示唆された。

A. 研究の方法

再生不良性貧血（AA）では全体の約70%に抗ヒト胸腺グロブリン（ATG）とシクロスポリン（CsA）による免疫抑制療法（IST）が奏効するため、重症患者に対しては一般

的にISTが施行される¹⁾。しかし、残りの30%には、ISTは奏効しないばかりか、易感染性を増悪させ予後に悪影響を及ぼす可能性がある。患者予後のさらなる向上を目指すためには、免疫学的病態を反映する

マーカーを同定することが重要である。

AA 例の一部では、*PIG-A* 遺伝子に異常を来した造血幹細胞に由来する glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカー型膜蛋白欠損血球 {発作性夜間血色素尿症 (PNH) 型血球} が増加している。GPI アンカー型膜蛋白は、造血幹細胞が免疫学的攻撃を受ける上で重要な役割を果たすため、この蛋白を欠損している PNH 型造血幹細胞が攻撃から逃れて増加することが、再生不良性貧血における PNH 型血球増加の原因とされている。しかし、このような PNH 型血球の臨床的意義は不明であった。そこで、ごく少数の PNH 型血球を検出できる高感度フローサイトメトリを開発し、多数の AA 患者を対象として PNH 型血球増加の臨床的意義を検討した。

B. 研究方法

1999 年 4 月から 2004 年 12 月までに診断され、診断後 1 年以内に ATG+CsA 療法を施行された AA 患者のうち、治療前に PNH 型血球増加の有無を確認できた 122 例を対象とした。PNH 型血球検査には、高感度 2-color フローサイトメトリによる PNH 型血球検査法 (高感度法)² を用いた。本法では PNH 型顆粒球は 0.003%、PNH 型赤血球は 0.005% 以上を有意な増加と判定し、PNH 型血球の増加は、両系統が陽性、もしくは 2 回以上連続して片系統のみ陽性であることと定義した。

C. 研究成果

1. PNH 型血球の増加が見られた AA 例 (PNH+AA) の割合

PNH 型血球の増加が見られた AA 例 (PNH+AA) は全体の 68% (83/122) であった。約 80% の患者で PNH 型血球の増加は 1% 未満の微少なレベルにとどまっていた (図 1)。PNH+AA は PNH 型血球の増加が見られなかった AA 例 (PNH-AA) と比べて大球性貧血を示し、血小板減少の程度が強い傾向がみられた。

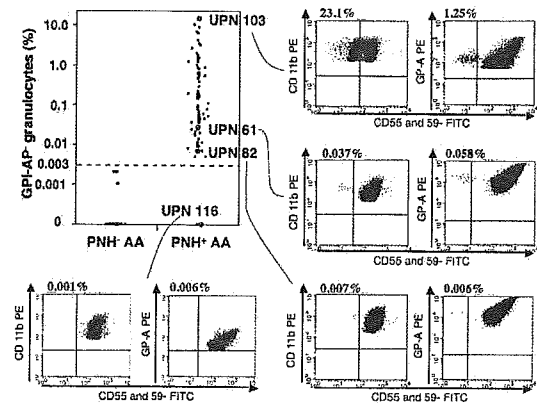


図1. PNH型顆粒球の割合

2. ATG+CsA 療法に対する反応性と PNH 型血球の関係

PNH+AA 群における IST の奏効率 (1 年での部分及び完全寛解率, 91%) は、PNH 型血球の増加が見られなかった AA 例

(PNH-AA, 48%) に比べて有意に高かった ($P<0.01\%$, 図 2A)。5 年完全寛解率でも PNH+AA 群 (36%) は PNH-AA 群 (3%) より有意に高かった ($P=0.03\%$)。PNH 型血球増加の程度と治療反応性との間には有意な相関は見られなかった。

3. IST 後の予後と PNH 型血球の関係

5 年全生存率は両群間で差がなかった (77% vs 71%) が、無効・再発・骨髄異形成症候群

(MDS), 急性骨髄性白血病 (AML), 臨床的PNH などへの移行・死亡を failure と定義した5年 failure-free survivalはPNH+AA群で明らかに高値であった (64% vs 12%, $P<0.01$, 図2B)。臨床的PNH・MDS・AML発症率は両群間で差がなかった (9% vs 7%)。再発率はPNH+AA群で低い傾向にあった (21% vs 36%, $P=0.08$)。

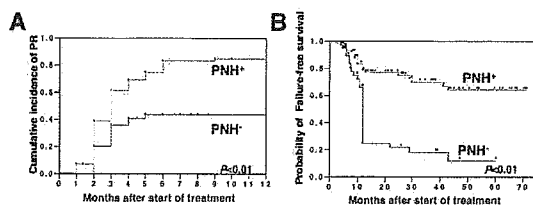


図2. ISTに対する反応性

4. IST前後およびIST後長期経過例におけるPNH型血球量・割合の変化

IST後に追跡できた53例 (PNH+AA 37例, PNH-AA 16例)で治療前後でのPNH型血球量・割合の変化を検討した結果, PNH+AA37例のうち治療が奏効した33例, 無効であった4例ともに有意な変化を示さなかった。PNH-AA 16例のうち治療後1例のみPNH+となったが, その症例はその後再発した。2年以上経過を追跡できた23例でPNH型血球量・割合の推移を観察したところ, ほとんどの症例でほぼ一定であった。

D. 考察

本邦のAA患者では68%にPNH型血球の増加が見られ, このPNH型血球の増加は, AA患者のISTに対する高反応性を予想する因子であることが示された。さらに,

全生存率には差がないものの, PNH+AA例は長期にわたって良好な予後が得られることも示された。

PNH型血球はIST前後でほとんど変化が見られなかった。PNH+AA患者のPNH型血球は, 診断時から治療後の長期間安定して存在することから, 造血幹細胞に対する免疫学的攻撃はPNH型幹細胞に対しても起こっており, PNH型幹細胞自身には正常幹細胞と比べて明らかな増殖の優位性はないことが示唆された。

PNH+AAから臨床的PNHへの進展は数年の観察期間ではほとんど見られなかった。さらに長期間の観察が必要ではあるが, PNH型血球割合の推移から見て, これまでの報告より臨床的PNHに移行する確率は低いと予想される。もし, ある時点で急激にPNHクローンの拡大が見られた場合には, そのPNHクローンに付加的な異常が加わっている可能性が高い。PNHクローン拡大のメカニズムを明らかにする上で今後定期的にPNH型血球検査を施行していくことは重要であると思われた。

E. 結論

PNH型血球の増加は, AA患者のISTに対する高反応性と良好な予後を予想する因子である。また, PNH型血球の割合はIST奏効例においても長期間変化しないことから, 造血幹細胞に対する免疫学的攻撃はPNH型幹細胞に対しても同等に起こっており, PNH型幹細胞自身には正常幹細胞と比べて明らかな増殖の優位性はないことが示唆された³。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

1. 論文発表

1. Frickhofen N, Heimpel H, Kaltwasser JP, Schrezenmeier H. Antithymocyte globulin with or without cyclosporin A: 11-year follow-up of a randomized trial comparing treatments of aplastic anemia. Blood.

2003;101:1236-1242.

2. Wang H, Chuhjo T, Yasue S, Omine M, Nakao S. Clinical significance of a minor population of paroxysmal

nocturnal hemoglobinuria-type cells in bone marrow failure syndrome. Blood. 2002;100:3897-3902.

3. Sugimori C, Chuhjo T, Feng X, et al. Minor population of CD55-CD59- blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. Blood. 2006;107:1308-1314.

H 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

特になし

分担研究報告書

小児骨髄異形成症候群に関する研究

分担研究者 中畑龍俊（京都大学・発達小児科学）、真部淳（聖路加国際病院・小児科）
小島勢二（名古屋大学・小児科学）、小原明（東邦大学・輸血部）

研究要旨

日本小児血液学会の MDS 委員会では 1999 年から前方視的登録による中央診断を行っており、2005 年 11 月までに 388 例が登録された。小児 MDS の特徴として JMML に分類される成人にはない病型が全体の約 4 割を占める、RARS はほとんど存在しないなど多くの特徴が明らかになってきた。中央診断は患者の治療方針の決定ならびに基礎的研究に対して大きな貢献をしていると考えられるが、今後は検体保存の中央化等の課題を解決する必要がある。

A. 研究目的

小児期に成人で見られる MDS とほぼ同様な病態を示す疾患が存在することは広く知られるようになった。一方小児期には成人では見られないような病型も存在することが世界的に明らかになりつつある。日本小児血液学会に設置された MDS 委員会は、毎年 1 回全国の小児血液学会員にアンケートによる後方視的調査を実施し、これにより小児 MDS の予後が極めて不良であることが明らかになったが、その診断の妥当性の検証は困難であった。そこで、診断の標準化を目指して、患者発生時に前方視的に病理セントラルレビューを行う研究が 1999 年 7 月より開始された。2005 年 11 月現在、前方視的登録が 388 例に達した。今回この症例を解析することにより小児 MDS の特徴について検討した。

B. 研究方法

日本小児血液学会会員の属する施設で発症した MDS 疑い症例を対象とした。末梢血および骨髄の塗抹標本および骨髄生検標本をセントラルレビューした。

（倫理面への配慮）

セントラルレビューは診療支援が目的であり、取り違えを防ぐため患者氏名の使用は必要であり「中央診断管理者」を定めて行っている。一方、症例登録は疫学データベースの作成が目的であり、匿名化し「データベース管理者」を定めている。

C. 研究結果

1999 年 9 月から 2005 年 11 月までに 388 例登録された。生検実施される症例も年々増加し、セントラルレビュー開始前に比し約 3

倍となった。小児 MDS の特徴として①小児期には JMML に分類される成人にはない病型が全体の約 4 割を占める、②小児期には RARS はほとんど存在しない、③Down 症候群、Schwachman-Diamond 症候群、Dyskeratosis congenita、Fragile X 症候群、Noonan 症候群、Neurofibromatosis などの先天性疾患に合併する例も見られる、④RAEB~AML-M6 と呼べるような特殊な病型が存在する、⑤再生不良性貧血と RA のどちらとも言えない所謂オーバーラップ症候群が相当数存在する、⑥治療関連性の二次性 MDS が 1 次性 MDS の 1/4 存在する、⑦送られてきた標本の中には essential thrombocythemia、atypical CML、再生不良性貧血、急性骨髄性白血病、Congenital dyserythropoietic anemia 自己免疫疾患 May-Hegglin 疑いなどが含まれていたことからセントラルレビューの重要性が再認識された

D. 考察

日本小児血液学会 MDS 委員会が毎年行っている後方視的調査により、小児 MDS の予後が次第に明らかになったが、その診断の妥当性の検証は困難であった。例として、MDS の診断に必須と考えられる骨髄生検の実施率はわずかに 10% であった (Sasaki H, et al. Leukemia 2001;15:1713-20)。小児 MDS は予後不良な疾患群であるが、新たな臨床試験を行うためには診断の標準化が要求される。以上をふまえて、日本小児血液学会 MDS 委員会では、患者発生時に病理セントラルレビューを行い、診断の標

準化を目指すことになった。本研究は 1999 年 9 月に開始し、2005 年 11 月までに 388 例が登録された。生検実施率 38% であり、中央診断開始前に比し明らかに上昇した。この中央診断には国内発生小児 MDS 例の半数以上が登録されていると推計されるが、今後さらに登録率を上昇させる必要がある。中央診断により、1999 年から小児 MDS 治療研究会における前方視的治療研究 (MDS99 プロトコール) が開始され、その成績が出つつある。今後は基礎的な研究をさらに推進するために発症時の検体を保存し、セルバンク・DNA バンク・RNA バンク等を構築することが課題である。

E. 結論

小児科領域では診断時のセントラルレビューを実施することにより、診断の標準化が図られつつある。今後、WHO 分類も含め、小児 MDS の診断基準を作成することが必要と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yasumi T, Katamura K., Okafuji I., Yoshioka T., Meguro T., Nishikomori R., Kusunoki T., Heike T., Nakahata T.: limited ability of antigen-specific Th1 responses to inhibit Th2 cell development in vivo. J. Immunol. 177:1325-1331. 2005.
2. Kanazawa N., Nishikomori R., Kambe N., Nakata-Hizume M., Okafuji I., Nagai S., Fuji A., Yuasa T., Utani A., Manki A., Sakurai Y., Nakajima M., Kobayashi H., Nishigori C., Heike T., Nakahata T., Miyachi Y.: Early-onset sarcoidosis and *CARD15* mutations: common genetic etiology with Blau syndrome. Blood

- 105:1195-1197, 2005.
3. Tanaka A., Konno M., Muto S., Kambe N., Morii E., Nakahata T., Itai A., Matsuda H.: A novel NF- κ B inhibitor, IMD-0354, suppresses neoplastic proliferation of human mast cells with constitutively activated c-kit receptors. *Blood* 105:2324-2331, 2005.
 4. Sawada J., Shimizu S., Tamatani T., Kanagasaki S., Saito H., Tanaka A., Kambe N., Nakahata T., Matsuda H.: Stem cell factor has a suppressive activity to IgE-mediated chemotaxis of mast cells. *J. Immunol.* 174:3626-3632, 2005, 2005.
 5. Kimura S., Ito C., Jyoko N., Segawa H., Kuroda J., Okada M., Adachi S., Nakahata T., Yuasa T., Filho VC., Furukawa H., Maekawa T.: Inhibition of leukemia cell growth by a novel anti-cancer drug (GUT-70) from calophyllum brasiliense that acts by induction of apoptosis. *Int. J. Cancer* 133:158-165, 2005.
 6. Kusunoki T., Sugai M., Gonda H., Nambu Y., Nagata-Nakajima N., Katakai T., Kusunoki M., Sakamoto A., Tokuhisa T., Nakahata T., Yokota Y., Shimizu A.: CpG inhibits IgE class switch recombination through suppression of NF κ B activity, but not through Id2 or Bcl6. *Biochem. Biophys. Commun.* 328:499-506, 2005.
 7. Tsuchiya A., Heike T., Fujino H., Shiota M., Umeda K., Yoshimoto M., Matsuda Y., Ichida T., Aoyagi Y., Nakahata T.: Characterization of mouse hepatic stem/progenitor cells in a novel culture system. *Gastroenterology* 128:2089-2104, 2005..
 8. Yoshimoto M., Heike T., Shiota M., Kobatashi H., Umeda K., Nakahata T.: Two different role of purified Cd45+ hematopoietic stem cells after transplantation in muscles. *Stem Cells* 23(5):610-618, 2005.
 9. Kosugi N., Ebihara Y., Nakahata T., Saisho H., Asano S., Tojo A.: CD34+CD7+ leukemoid Progenitor cells may be involved in maintenance and clonal evolution of chronic myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.* 11:505-511, 2005.
 10. Tsurusawa M., Manabe A., Hayashi Y., Akiyama Y., Kigasawa H., Inada H., Noguchi Y., Sawai N., Kobayashi R., Nagatoshi Y., Kawakami K., Nakahata T.: Therapy-related myelodysplastic syndrome in childhood : A retrospective study of 36 patients in Japan. *Leukemia Res.* in press.
 11. Hasegawa D., Manabe A., Kubota T., Kawasaki H., Hirose I., Ohtsuka Y., Tsuruta T., Ebihara Y., Goto Y., Yan Zhao X., Sakashita K., Koike K., Isomura M., Kojima S., Hoshika A., Tsuji K., Nakahata T.: Methylation status of the p15 and p16 genes in paediatric myelodysplastic syndrome and juvenile myelomonocytic leukaemia. *Brit. J. Haematol.* In press.
 12. Saito M., Fujisawa A., Nishikomori R., Kambe N., Nakata-Hizume M., Yoshimoto M., Ohmori K., Okafuji I., Yoshioka T., Kusunoki T., Miyachi Y., Heike T., Nakahata T.: Somatic mosaicism of *CIAS1* in a patient with chronic infantile neurologic, cutaneous, articular syndrome. *Arthritis & Rheumatism* 52:3579-3585, 2005.
 13. Ohtsuka Y., Manabe A., Kawasaki H., Hasegawa D., Zaike Y., Watanabe S., Tanizawa T., Nakahata T., Tsuji K.: RAS-blocking bisphosphonate zoledronic acid inhibits the abnormal proliferation and differentiation of juvenile myelomonocytic leukemia cells. *Blood* In press.
 14. Nagayama J., Tomizawa D., Koh K., Nagatoshi Y., Hotta N., Kishimoto T., Takahashi Y., Kuno T., Sugita K., Sato T., Kato K., Ogawa A., Nakahata T., Mizutani S., Horibe K., Ishii E.: Acute lymphoblastic leukemia with a germline *MLL* gene can be cured in a high proportion of infants with use of intensive chemotherapy: results from the Japan Infant Leukemia Study Group. *Blood* in press.
 15. Umeda K., Heike T., Yoshimoto M., Shinoda G., Luo H.Y., Chui D.H.K., Torii R., Shibuya M., Nakatsuji N., Nakahata T.: Identification and characterization of hemangioblasts during cynomolgus monkey embryonic stem cell differentiation. *Stem Cells* in press.
 16. Kato T., Heike T., Okawa K., Yamanaka Y., Nakahata T.: A neurosphere-derived factor (NDF), Cystatin C, supports differentiation of ES cells into neural stem cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況

4. 特許取得
なし
5. 実用新案登録
なし
6. その他
なし

原発性骨髄線維症臨床像の前方視的検討と、蛋白同化ホルモンの効果検討

分担研究者 原田実根（九州大学大学院医学研究院病態修復内科学教授）

研究要旨

1999年から2005年の6年間に、285例の原発性骨髄線維症の新規登録があった。男女比は1.73:1、年齢中央値は65歳であった。貧血を71%に、血小板数の異常を57%に認めた。56%の症例は治療を要し、蛋白同化ホルモンが50例に投与されていた。蛋白同化ホルモンが2004年までに投与された症例の後方視的検討では、34%の症例において貧血の改善が認められた。効果発現まで3ヶ月要し、重篤な副作用は出現していない。

A. 研究目的

原発性骨髄線維症の本邦における疫学、臨床像を明らかにし、効果的な治療法の検討を行う。

には出血症状が認められた。末梢血検査では、Hb 10g/dl未満の貧血が197例(71%)、血小板数10万/ μ L未満が88例(32%)、50万/ μ L以上が70例(25%)であった。染色体検査では100例(60%)は正常核型であったが、67例(40%)は異常核型を示し、del 13、del 20や+8などの異常が認められた。153例(56%)に対し治療が行われており、抗腫瘍剤が60例に、ステロイドが39例に、蛋白同化ホルモンが50例に、サリドマイドが8例に投与されていた。6例は造血幹細胞移植をうけた。

B. 研究方法

日本血液学会認定施設にアンケート調査を行い、2005年に診断した患者登録、臨床情報の集積を行った。また、原発性骨髄線維症による貧血に対する蛋白同化ホルモンの効果を、後方視的に検討した。

蛋白同化ホルモンの貧血に対する効果を後方視的に検討した。本邦では、ダナゾール（ボンゾール）ではなく、酢酸メテノロン（プリモボラン）が主に使われている。2004年までに登録があった39使用例のうち、30例につき経過をアンケート調査した。21例回答があり、3例は詳細不明で、18例につき解析した。年齢は43歳から95歳、中央値64歳である。

C. 研究結果

1999年から2005年の6年間に、285例の新規登録があった。男女比は1.73:1で、年齢は20歳から96歳、中央値は65歳であった。196例(70%)の症例は診断時に症状を有しており、112例(57%)には貧血様症状が、35例(18%)には腹部膨満、腹痛などの腹部症状が、10例(5%)

9 例が輸血依存性であり、治療前の Hb は 3.5-8.4 g/dL (中央値 6.8 g/dL) である。酢酸メテノロンが 10-35 mg 投与されている。1 例は下肢の cramp のためにダナゾールへ変更されている。投与期間は 2-59.4 ヶ月 (中央値 14.3 ヶ月) である。6 例は継続中であり、12 例は中止されている。CR (Hb 11 g/dl より大で輸血非依存) が 3 例 (17%)、PR (Hb 10 g/dl 大で、輸血非依存、かつ Hb 1.5 g/dl 以上の上昇) が 3 例 (17%) あり、貧血に対する効果がみられている。重篤な副作用はでていない。

D. 考察

今後も前方視的に新規発症症例の登録をすすめ、以前後方視的検討により同定した本邦における予後予測因子の妥当性を検討する必要がある。治療に関しては、従来より骨髄線維症による貧血に対して蛋白同化ホルモンの有効性が少数例で報告されてきたが、2005 年にスペインから 30 例の骨髄線維症 (輸血依存性 or Hb 10 以下) にダナゾールを使用し、貧血の改善が約 37%にみられと報告された。今回の本邦における後方視的検討では、酢酸メテノロンもダナゾールと同様に、34%の症例で貧血の改善効果がみられている。効果があつた症例では、Hb は治療開始 3 ヶ月後には上昇傾向が見られていることから、最低 3 ヶ月の投与が必要と思われる。今後原発性骨髄線維症に対する蛋白同化ホルモンの前方視的な治療研究を行い、蛋白同化ホルモン治療の位置づけを明確にする必要がある。

E. 結論

1999 年から 2005 年の 6 年間に、285 例の原発

性骨髄線維症の新規登録があつた。蛋白同化ホルモン (酢酸メテノロン) は、貧血に対し 34%の症例で効果を認めた。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B, Yoshida S, Miyamoto T, Yoshimoto G, Watanabe T, Akashi K, Shultz LD, Harada M. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor γ chain^{null} mice. *Blood*. 2005;106:1565-1573
2. 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*. 2005;29:761-769

2. 学会発表

1. 角光晴子、亀崎健次郎、下田和哉、加留部謙之輔、波呂 卓、沼田晃彦、幣 光太郎、熊野 孝、大島孝一、岡村 孝、原田実根：トロンボポイエチン過剰発現マウスは、骨髄の線維化と骨硬化を生じ、ヒト骨髄線維症の病態を呈する。第 67 回日本血液学会総会、2005 年 9 月 18 日、横浜市

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

1. 「再生型人工組織作製」出願番

号：特願 2002-332530（平成 14 年 11 月
15 日出願）

2. 「白血病細胞のアッセイ法」出願
番号：特願 2003-136409（平成 15 年 5
月 16 日出願）

3. 「ヒト由来免疫担当細胞の製造方
法」出願番号：特願 2003-171420（平成

15 年 6 月 16 日出願）平成 16 年 6 月 16
日 PCT 国際出願 出願番号：

PCT/JP2004/008784 実用新案登録

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

骨髄異形成症候群における WT1 発現の診断的意義に関する研究

分担研究者 村手 隆、 (名古屋大学医学部保健学科、教授)

研究要旨

白血病において病勢や再発の予知に有用であるとされる WT1 遺伝子の発現が MDS と AA の鑑別に有用であるか、さらに MDS の病型によって発現量に変化があるかについて自験例 (AA : 7 例、MDS : 52 例、MDS から overt leukemia (OL) : 8 例) にて定量 RT-PCR を用いて総 WT1, Exon 5 (+) WT1, KTS(+)-Wt1 各遺伝子の発現レベルを測定した。MDS 各群の発現レベルの平均値は病型の推移に従って上昇した。総 WT1, Exon 5 (+), KTS (+) form とも OL と AA, OL と MDS RA の発現レベルの間には統計的に有意な差異が認められたが、AA と MDS RA との間には統計的に有意差は認められず、WT1 のメッセージレベルだけでは AA と MDS RA との鑑別者困難であることが明らかとなった。

A. 研究目的

骨髄異形成症候群(MDS)と再生不良性貧血(AA)との鑑別には簡便で汎用性のある検査が確立されていない。今回、我々は多くの報告により白血病において病勢や再発の予知に有用であるとされる WT1 遺伝子の発現が果たして MDS と AA の鑑別に有用であるか、さらに報告通り MDS の病型により発現量に変化があるかについて自験例で定量 RT-PCR を用いて WT1 遺伝子の発現レベルを測定した。総 WT1 の他に転写因子である WT1 の特性を変化させると報告されている 4 種のアイソフォームで Exon 5 を有するもの、KTS を含むものについても定量 RT-PCR を実施して測定しアイソフォームの測定の意義を検討した。

B. 研究方法

自験例 (AA : 7 例、MDS : 54 例、MDS から overt leukemia (OL) : 8 例) より RNA を抽出し逆転写を行い、設定したプライマーにて PCR 増幅した。内因性コントロールとして abl 遺伝子を用いて両者の比で発現レベルを表示した。測定は Roche 社の Light Cycler™ にて行った。

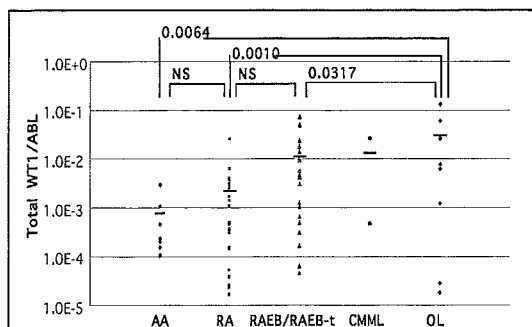
(倫理面への配慮)

研究に参加する患者さんには十分な説明を行い、文書による同意を取得した。

C. 研究成果

総 WT1 の相対的発現量 (WT1/ABL) は平均値で AA: 7.575×10^{-4} , RA: 2.171×10^{-3} , RAEB/RAEB-t: 1.060×10^{-2} , OL: 2.964×10^{-2}

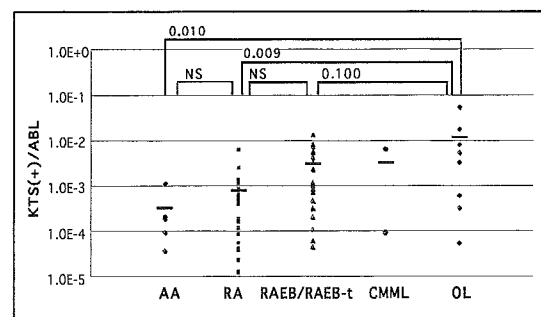
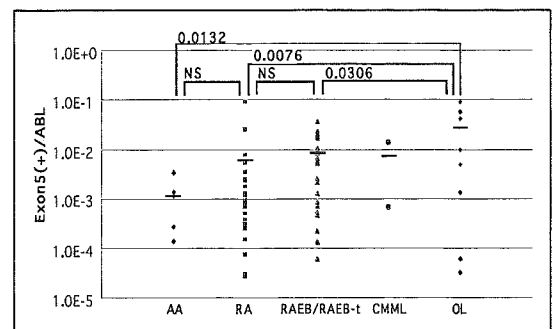
10^{-2} であった。同様に exon 5 (+)のメッセージは AA: 1.100×10^{-3} , RA: 5.911×10^{-3} , RAEB/RAEB-t: 8.465×10^{-3} , OL: 2.670×10^{-2} , KTS(+) のメッセージは AA: 3.280×10^{-4} , RA: 7.952×10^{-4} , RAEB/RAEB-t: 2.972×10^{-3} , OL: 1.107×10^{-2} であった。MDS の病型移行に伴い平均値では増加傾向を認めた。また、3例の MDS で病型の進展したものないしは AA から MDS へ進展したものでは総 WT1 の発現量の増加を認めた。総 WT1, exon 5 (+), KTS (+)の全てにおいて AA, MDS RA と OL の間および RAEB/RAEB-t と OL との間で統計的な有意差を認めたが、研究の主眼とした AA と MDS RA との間の発現量の差の検定では有意差を認めなかった (図参照)。総 WT1 と exon 5 (+), 総 WT1 と KTS(+)のメッセージとの間ではほとんどの例で相関をみとめたが、ごく一部の例では相対的な exon 5(+), KTS(+)メッセージの減少をみた。



D. 考察

WT1 は白血病症例並びに移植症例の検体を用いた解析でその診断的価値は確立している。我々の解析でも個々の症例の MDS 病型移行とその発現とはよく相関していた。MDS 各病型間で平均値は病型移行に伴い上昇する傾向

は認められたが、MDS 群間の分布の分散の有意差検定では RAEB-t において発現量の非常に低い症例が数例あったため、報告にあるような各群間すべてでの有意差はとれなかった。各アイソフォームの発現レベルの解析では total WT1, exon (+) WT1, KTS(+) WT1 とも非常に相関する発現レベルを示したので、臨床的には特に細かいアイソフォーム解析は不要であると考えられた。



E 結論

WT1 遺伝子発現の定量 RT-PCR は MDS の病型移行の診断には有用であるが、AA と MDS RA との鑑別には適応は困難である。

F 健康危険情報

特になし