

第48回日本臨床血液学会総会 予定

G 研究発表

1. 論文発表
無し

2. 学会発表

H 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

特になし

Ⅲ. 研究協力者報告書

骨髄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

研究協力者 今村 雅寛 (北海道大学大学院医学研究科血液内科学 教授)

三浦 洋子、東梅 友美、平手 大輔、梶 昌美、
加藤 菜穂子、杉田純一、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。本研究では、骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植においてキメリズムと臨床病態にいかなる関連性があるのかを検討した。その結果、骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植においては移植後 14 日目の CD3 のドナー型キメリズムの増加と II 度以上の急性 GVHD の発症頻度に有意差を認めた。さらに、移植後 14 日目の CD56 のドナー型キメリズムの低下と拒絶に有意差を認めた。

A. 研究目的

骨髄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予知をはかり、その制御を目指す。

B. 研究方法

骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植 34 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移植後 14 日目に CD3、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

骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植の移植後

14 日目の CD3 分画のドナー型キメリズムが 50%以上の場合に、II 度以上の急性 GVHD の発症率は有意に高かった。また、移植後 14 日目の CD56 分画のドナー型キメリズムが 50%以下であると、拒絶率の上昇が認められた。すなわち、移植後早期の CD3 および CD56 分画のドナー型キメリズムを把握することで、その後起る重篤な臨床病態の早期予知につながり、適切な対応をとることが可能となる。

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、その代わり急性 GVHD の頻度は当然高まる。そのことがまだ細胞数の少ない移植後 14 日目であっても、微量細胞数を用いた早期末梢血キメリズム解析で推測可能であり、免疫抑制剤の使用法の変更など、その後の適切な処置に有用な情報を提供することが確認された。また、移植後 14

日目の CD56 分画のドナー型キメリズムが 50%以下であると拒絶が起こりやすいことも明らかにされ、その後の対策が余裕を持って行えるのは意義深い。しかも、微量の細胞数で 14 日目に解析できることは臨床的有用性が高いといえる。したがって、移植後早期から種々の分画に分けてメリズム解析を行うことで、移植後の生着、拒絶、GVHD 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ことが明らかとなった。今後はさらに、長期的に種々の細胞分画のキメリズムを解析することで、慢性 GVHD や遅発性拒絶、GVL 効果、再発の予知に応用できる可能性がある。

E. 結論

骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植後のキメリズム解析を、14 日目に CD3 と CD56 分画に分けて行うことで、拒絶と急性 GVHD の発症予知が可能であることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Miura Y, Tanaka J, Toubai T, Tsutsumi Y, Kato N, Sugita J, Shigematsu A, Iwao N, Ota S, Masauzi N, Fukuhara T, Kasai M, Asaka M, Imamura M.: Analysis of donor type chimerism in CD3, CD14.15 and

CD56 positive cells after allogeneic myeloablative and nonmyeloablative stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant. (in press)

2. 学会発表

平手大輔、東梅友美、田中淳司、杉田純一、加藤菜穂子、三浦洋子、近藤恵一、岩尾憲明、太田秀一、笠井正晴、浅香正博、今村雅寛：同種造血幹細胞移植後早期のキメリズム解析とその臨床的有用性。第 67 回日本血液学会・第 47 回日本臨床血液学会合同総会。2005 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. Tsutsumi Y, et al. Acta Haematol 107, 89, 2001
2. Tsutsumi Y, et al. Br J Haematol 118, 136, 2002

JAK2 遺伝子の変異を有する骨髄増殖性疾患症例における線維性組織の細胞起源に関する研究

研究協力者 大橋 春彦 (名古屋医療センター・臨床研究センター・部長)

研究要旨

我々は 20 番染色体の部分欠失を伴う真性多血症 (PV) の経過中骨髄の繊維化を合併しその後全身に線維性腫瘍形成を示した症例を経験し、JAK2 遺伝子の変異解析および 20 番染色体についての loss of heterozygosity (LOH) 解析を行った。末梢血顆粒球は JAK2^{V617F} に関してホモ接合体であり 20 番染色体の LOH をほぼ 100% 認めたが、剖検時に得られた線維性腫瘍検体ではそれらの異常は約 3 分の 1 の細胞でのみ認められた。この結果は本症例の線維性腫瘍において線維性組織を形成する細胞が変異した造血細胞以外に由来することを示唆するものと考えられる。

A. 研究目的

骨髄の繊維化は種々の骨髄増殖性疾患 (MPD) において認められる。疾患としての MPD の本態は変異を獲得した造血細胞の多系統におよぶクローン性増殖であり、最近多くの MPD 症例の造血細胞において JAK2 遺伝子の変異 (JAK2^{V617F}) が認められることが明らかとなった。一方 MPD 患者の骨髄において線維性組織を形成している細胞の起源については、一般に非造血系の細胞の反応性増殖と考えられているが、そのことの直接的な証明はなされていない。我々は最近経験した症例の線維性組織について 2 つの遺伝子マーカーを用いてその細胞起源の検討を行った。

B. 研究方法

患者は 68 歳の女性であり、染色体異常 (del(20)(q11q13.3)) を伴う PV の経過中骨髄の繊維化を合併し、その後胸水貯留による呼吸不全で死亡した。剖検では全身の臓器に

腫瘍形成を認め、組織学的検索では高度の繊維化と巨核球を始めとする多系統の造血系の細胞と線維芽細胞様の細胞を認めた (繊維化を伴う髓外造血の像)。

末梢血から比重遠心法により分画した顆粒球、および剖検時に採取した胸腔内および頭蓋内の線維性腫瘍より DNA を抽出した。DNA を鋳型として JAK2 遺伝子のエクソン 14 の塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定し、また 20q に局在する short tandem repeat (STR) マーカー (D20S481) についての蛍光 PCR 法による LOH 解析を行った。

(倫理面への配慮)

検体採取は患者本人および家族の承諾を得て行った。

C. 研究結果

末梢血顆粒球、頭蓋内腫瘍、胸腔内腫瘍において、JAK2^{V617F} アリルの占める比率 (変異アリルと正常アリルのピークの高さから算

出)はそれぞれ 86.4%、33.0%、22.3%であり、LOH を示す細胞の比率 (多型を示す D20S481 の 2 本のピークの高さから算出) はそれぞれ 96.4%、46.2%、31.2%であった。

D. 考察

この症例の末梢血顆粒球は JAK2^{V617F} をホモ接合体として有し、また 20q の部分欠損を有する細胞と考えられた。それに対して線維性腫瘍組織においては、上記の 2 つの異常を示す細胞は約 3 分の 1 を占めるに留まり、残りの細胞はこれらの異常を持たない細胞と考えられた。少なくともこの症例の線維性組織を形成する細胞の多くは変異した造血細胞以外の細胞であることが明らかとなった。この「正常細胞」の起源は不明であるが、従来考えられているように非造血系由来で反応性増殖を来たした細胞である可能性が考えられた。

E. 結論

この症例における線維性腫瘍 (線維化を伴う髄外造血) 組織における線維化を来たしている細胞が、反応性に増殖したおそらく非造血系由来の細胞であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. H Ohashi, C Kato, S Fukami, H Saito, M Hamaguchi: Leukemic relapse in the

central nervous system after allogeneic stem cell transplantation with complete remission in the bone marrow and donor-type chimerism: report of two cases. Am. J. Hematol. 79, 142-146, 2005.

2. 学会発表

1. H Ohashi, T Tabuchi, N Susaki, S Fukami, S. Kunishima, S Moritani, S Ichihara, M Hamaguchi, H Saito: Investigation on cellular origin of fibrous tissue in a case with myelofibrosis. The 8th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes, 2005. 5. 13, Nagasaki, Japan. (Leuk. Res. 29, S43, 2005)
2. 杉崎千穂、浅野治彦、木下朝博、直江知樹、岩崎卓識、大橋春彦、伊藤雅文、村手隆: MDS 鑑別診断における p53 および HbF 染色の意義. 第 67 回日本血液学会・第 47 回日本臨床血液学会 2005. 9. 18, 横浜.
3. 横澤敏也、大橋春彦、深見晶子、加藤千明、永井宏和、寺澤晃彦、鈴木伸明、濱口元洋: DHPLC 法によるイマチニブ耐性例の ABL 遺伝子変異の検出. 第 67 回日本血液学会・第 47 回日本臨床血液学会 2005. 9. 18, 横浜.

疫学観察研究「小児期に発症する再生不良性貧血など
造血障害疾患の臨床像に関する疫学調査」研究計画

研究協力者 小原 明（東邦大学医療センター大森病院 第一小児科・輸血部 教授）

研究要旨

小児血液学会再生不良性貧血委員会は「小児造血障害疫学調査研究;AA2005 研究」を企画し 2006 年 4 月から実施する。この研究は従来 10 年間継続してきた同委員会による症例登録研究を、疫学研究倫理指針に準拠して再度構築した研究である。

A.研究目的

本研究開始後 5 年間に診断された小児期発症の造血障害疾患症例の疫学データベースを構築し、臨床像の実態と、その治療成績・予後を明らかにする。具体的には以下の 3 点を明らかにする。1) 診断時臨床像、2) 診断 1 年後の臨床像とその間に行われた治療、3) 診断 5 年後の臨床像と予後。

B.研究方法

対象とする造血障害の具体的疾患名を以下に示す。小児の血液診療でしばしば遭遇する診断決定困難例も調査対象に含める。1) 特発性再生不良性貧血、2) 肝炎後再生不良性貧血、3) 肝炎後以外の二次性再生不良性貧血、4) Fanconi 貧血、5) Diamond-Blackfan 貧血、6) 先天性重症好中球減少症 7) その他の骨髓造血不全疾患。8) 確定診断困難例。登録症例は、2005 年 1 月 1 日以降 2010 年 12 末日の間に、小児血液学会会員の診療施設で造血障害疾患と診断され、かつ診断時年齢 18 歳未満の症例。登録時の治療の有無は問わない。調査は症例数のみ調査する一次調査と、臨床

像を調査する二次調査、毎年の登録症例追跡を実施する追跡調査から構成する。新規診断症例は診断施設内で個人情報に匿名化処理され、患者匿名化番号が施設登録医師（または個人情報管理者）により割り振られる。

（倫理面への配慮）

研究参加施設の主治医は、診断後二次調査票提出前迄に説明文書と二次登録票・追跡調査書を用いて患者または代諾者に本研究の説明を行い、症例登録の同意を得る。

C.研究結果

1. 研究計画の倫理審査

研究計画の倫理審査は、研究代表者である小原が所属する東邦大学倫理委員会の審査、研究実施主体である日本小児血液学会の臨床研究審査委員会の審査を受審中である（平成 18 年 2 月 6 日現在）

2. 研究計画書抜粋の配布

調査対象となる小児血液学会会員施設に、2006 年 4 月から実施予定として、研究計画書抜粋を発送し、該当患者の捕捉を開始した。

3. 従来研究のまとめ。

既に 1994 年から実施している委員会疫学データベースに登録された症例は 2005 年 10 月現在、特発性再不貧 948 例、肝炎後再不貧 123 例。二次性 8 例、Fanconi 貧血 87 例、Diamond-Blackfan 貧血 90 例、先天性重症好中球減少 30 例、その他の造血障害 51 例の総計 1337 例であり、今後も追跡調査される。

D. 考察

小児血液学会再生不良性貧血委員会症例登録データベースは、1994 年より構築され 1988 年以後に診断された症例の追跡調査を実施してきた。その成果は、1) 再不貧から白血病 MDS に移行する症例が存在すること。2) 診断時に染色体異常を呈する症例があること。3) 日本の Diamond-Blackfan 貧血の臨床像。Fanconi 貧血の臨床像。4) 特発性再不貧では診断年 1994 年以前と以後で、重症症例の予後は著しく改善したが、中等症・軽症の予後に改善傾向が見られていない等である。

今回疫学研究倫理指針に準拠した新規研究体系により、新たに症例データベースを再構築し、小児造血障害疾患の調査を開始する。倫理審査は研究代表者の所属する施設倫理委員会と、小児血液学会の同等の審査委員会審査を受けることで、中央倫理審査とし、研究に参加しやすい体系とした。この研究により、5 年間で特発性再不貧約 300 症例が蓄積されることが見込まれる。また本データベースは、既に計画されている臨床血液学会症例登録と連結可能になるよう、方策を検討している。

E. 結論

疫学研究倫理指針に準拠した、小児造血障害

疾患データベースを構築準備が終了した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 小原明: 血液新法および改正薬事法施行後の輸血のあり方: 血液の遡及調査の報告を受けた医療機関の対応. 血液フロンティア. 15(11): 33-41, 2005

2. Igarashi S, Manabe A, Ohara A, et al.: No advantage of dexamethasone over prednisolone for the outcome of standard- and intermediate-risk childhood acute lymphoblastic leukemia in the Tokyo Children's Cancer Study Group L95-14 Protocol. Journal of Clinical Oncology. 23(27): 6489-6498, 2005

2. 学会発表

1. Ohara A, Kobayashi R, Kojima S. et al.: Heterogeneity of clinical features and outcome of patients with abnormal cytogenetic clones evolving from aplastic anemia. 8th Inter. Symp. on MDS. Nagasaki 2005.5

2. Ohtsuka Y, Manabe A, Ohara A, Nakahata T. et al.: AML-type chemotherapy for newly diagnosed children with myelodysplastic syndrome(MDS) : A Japanese Childhood MDS Study Group trial MDS99. 8th Inter. Symp. on MDS. Nagasaki 2005.5

3. Ohara A.: Pediatric hematopoietic disorder in Japan; epidemiology and clinical trials. 2005 Korean Society of Pediatric Hematology Oncology Spring Meeting. Gyungjoo, Korea 2005

Coombs 陰性 AIHA における赤血球結合 IgG サブクラスに関する研究

研究協力者 梶井英治 (自治医科大学地域医療学センター 教授)

亀崎豊実, 小山田隆(自治医科大学地域医療学センター)

研究要旨

Coombs 陰性 AIHA では、Coombs 試験が陽性にならない程度の結合 IgG 量で溶血に至ることから、赤血球結合 IgG のサブクラスは IgG3 や IgG1 に偏っているのではないかと考えられている。この予想を検証するために、溶血性貧血患者の赤血球酸解離液中 IgG 量および IgG サブクラスの定量を試みたところ、Coombs 陰性 AIHA においては、IgG1 に比して IgG3 がより多く結合している傾向が認められた。また、IgG3 >14 IgG 分子/RBC において易溶血性の情報を付加できる可能性が示され、さらに IgG3 >29 IgG 分子/RBC において Coombs 陽性の情報を付加できる可能性が示された。

A. 研究目的

AIHA の診断に利用される Coombs 試験は赤血球凝集反応を利用しているため、溶血を呈する最少の赤血球結合 IgG 量では陰性を示すことがある。当センターでは、このような「Coombs 陰性 AIHA」の診断に有用な「赤血球結合 IgG 定量」を RIA 法を用いて実施している。一般に、抗赤血球抗体 IgG のサブクラスにより溶血の程度に違いがあることが知られている。Coombs 陰性 AIHA では、Coombs 試験が陽性にならない程度の結合 IgG 量で溶血に至ることから、赤血球結合 IgG のサブクラスは IgG3 や IgG1 に偏っているのではないかと考えられている。今回、この予想を検証するために、溶血性貧血患者の赤血球酸解離液中 IgG 量および IgG サブクラスの定量を試みた。

B. 研究方法

2003 年度に赤血球結合 IgG 測定依頼があり、

主治医にその後の臨床経過と治療経過により AIHA と診断されたかどうかのアンケートをおこなった 31 例 (Coombs 試験陽性 10 例、陰性 21 例) について、赤血球酸解離液中の IgG 各サブクラス量を EISA 法で測定した。

(倫理面への配慮)

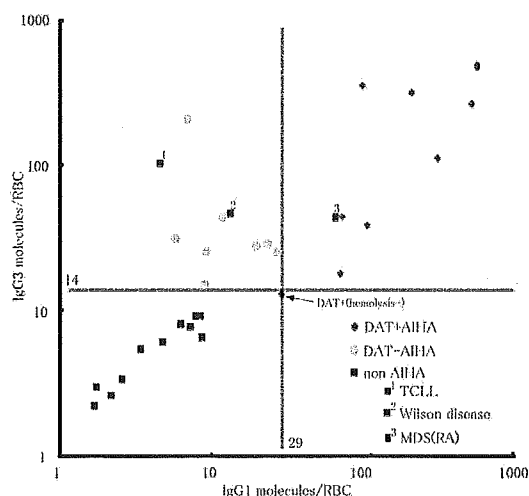
自治医科大学倫理委員会の承認を受け、患者氏名等については検体採取病院で匿名化を行っている。

C. 研究結果

アンケート結果は 31 例中 16 例が臨床経過より AIHA と診断され、Coombs 陽性 AIHA 8 例、クームス陰性 AIHA 8 例であった。

従来の赤血球結合 IgG 定量の結果のみでは、Coombs 陰性領域において AIHA と non AIHA 例との区別は困難であった。IgG サブクラスに注目すると図のようにクームス陰性 AIHA に

おいては、IgG1 に比して IgG3 がより多く結合している傾向が認められた。また、IgG3 >14 IgG 分子/RBC において免疫性溶血の情報を付加できる可能性が示され、さらに IgG1 >29 IgG 分子/RBC において Coombs 陽性の情報を付加できる可能性が示された。



D. 考察

Coombs 陰性 AIHA における溶血機序として、以前より予想されていた赤血球結合 IgG3 サブクラスの優勢が今回の研究により実証された。また、赤血球結合 IgG3 サブクラス量に免疫性溶血の閾値が存在する可能性が示されたことから、赤血球結合 IgG3 サブクラス定量は Coombs 試験より臨床に則した診断補助検査となる可能性が示された。今後、症例並びに健常人例を追加し、サブクラス量と溶血の程度や臨床診断・経過などとの関連を検討したい。

E. 結論

Coombs 陰性 AIHA においては、IgG1 に比して IgG3 がより多く結合している傾向が認め

られた。また、IgG3 >14 IgG 分子/RBC において免疫性溶血の情報を付加できる可能性が示され、さらに IgG1 >29 IgG 分子/RBC において Coombs 陽性の情報を付加できる可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kamesaki T, Kumada M, Omi T, Okuda H, Iwamoto S, Takahashi J, Kimura K, Hirayama F, Kamata H, Obara K, Taniguchi M, Tani Y, Kajii E: A novel mutation in the RHD gene in Japanese individuals with weak D, encoding an amino acid change in the 11th transmembranous domain of the RhD protein. *Vox Sang* 84:141, 2003

2. 亀崎豊実, 梶井英治: 自己免疫性溶血性貧血の分子病態. *臨床血液* 46:307-316, 2005.

2. 学会発表

1. 亀崎豊実, 梶井英治: 自己免疫性溶血性貧血の分子病態. 第 66 回日本血液学会総会・第 44 回日本臨床血液学会総会, 2004. 9. 17, 京都. (*臨床血液* 45:134, 2004)

2. 亀崎豊実, 小山田隆, 熊田真樹, 近江俊徳, 奥田浩, 坂本敦司, 岩本禎彦, 小峰光博, 梶井英治: クームス陰性自己免疫性溶血性貧血患者における赤血球結合 IgG サブクラス定量. 第 66 回日本血液学会総会・第 44 回日本臨床血液学会総会, 2004. 9. 17, 京都. (*臨床血液* 45:222, 2004)

骨髄異形成症候群(MDS)における Fractalkine/CX3CR1 系を介した新しい免疫学的機序の解析

研究協力者 金丸 昭久 (近畿大学医学部 血液内科 教授)

研究要旨

骨髄異形成症候群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、詳細な機序は不明である。これまで、我々は、MDS 由来パーフォリン/グランザイム陽性 T 細胞株を用いて、骨髄 CD34 陽性細胞に対する、fractalkine (FKN)/CX3CR1 を介した細胞障害機構を解析してきた。今回、MDS 患者骨髄でも同様に、それらを介した新しい免疫学的機序関与が示唆された。

A.研究目的

骨髄異形成症候群 (以下 MDS) 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。これまで、我々は、MDS 由来パーフォリン/グランザイム陽性 T 細胞株を用いて、骨髄 CD34 陽性細胞に対する、fractalkine (FKN)/CX3CR1 を介した細胞障害機構を報告してきた。今回、MDS 患者骨髄での、同機序の関連性を解析した。

B.研究方法

患者の層別: IPSS で low および int-1 の患者を「低リスク」、high および MDS/AML を「高リスク」とした。解析方法: 同意を得た MDS 患者と健常人から①CD34 陽性細胞を純化し、Annexin V 法でアポトーシスを測定した。同時にフローサイトメーターで fractalkine 発現を測定した。②CD4 および CD8 陽性細胞を純化し、それぞれの細胞内パーフォリンとグランザイム B 発現および細胞表面の CX3CR1 発現をフローサイトメーターで測定した。③骨髄血漿中のグランザイム B 濃度を ELISA で測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は「ヘルシンキ宣言」に基づいた倫理的原則、治験審査委員会の承認を得た「治験実施計画書」、「薬事法第 14 条第 3 項および第 80 条の 2」に規定する基準を遵守して、プライバシーの保護については十分配慮し、知り得た個人に関する情報を一切、第三者に漏洩しないことを原則とした。

C.研究結果

①低リスク MDS 患者では、健常人および高リスク MDS 患者に比べて、有意に CD34 陽性細胞における fractalkine 発現が高値であり、それは、アポトーシスと正の相関関係があった。②高リスク患者において、CD4 陽性細胞内のグランザイム B 発現が有意に高値であり、低リスク患者でも高い傾向を示した。③低リスク MDS 患者では、骨髄血漿中のグランザイム B 濃度が高値を示す患者は存在したが、アポトーシスとの相関関係は認められなかった。

D.考察

E.結論

今後の更なる症例蓄積と詳細な検討が必要であるが、FKN/CX3CR1 系が強く関与する患者群が存在する可能性が示唆された。

F.研究発表

1.論文発表

2.学会発表

1. 田中みやこ、松田光弘、森田泰慶、平瀬主税、辰巳陽一、前田裕弘、金丸昭久：低リスク骨髄異形成症候群(MDS)におけるfractalkine/CX3CR1 系を介した細胞障害機序の関与。第 67 回日本血液学会・第 47 回日本臨床血液学会・合同総会 平成 17 年度

HUMARA 遺伝子を指標とした異性間骨髄移植におけるキメリズムの長期解析

研究協力者 唐沢正光（群馬大学 医学部 輸血部・助教授）

山根有人、三井健揮、松島孝文、塚本憲史、野島美久

（群馬大学大学院生体統御内科学）

研究要旨

X 染色体遺伝子 HUMARA を指標に女性ホスト・男性ドナー間の造血幹細胞移植 (HSCT) 後の骨髄・末梢血中の残存ホスト細胞の有無を検討した。MDS から移行 (2 症例) または de novo (2 症例) の急性骨髄性白血病患者 4 例を対象とした。1 例では末梢血のみの検討であったが、2 年間ホスト細胞が検出された。残りの 3 例でも骨髄においてそれぞれ 5 年、4 年、3 年の時点でホスト細胞が検出された。移植後の微少キメラの長期間持続は必ずしも再発関連しないことが示唆された。

A. 研究目的

男性ホスト・女性ドナーの組み合わせによる HSCT においては Y 染色体を指標に高感度なホスト細胞の検出が可能である。しかし、逆の女性ホスト・男性ドナーでは感度の劣る Short tandem repeat などの DNA 多型マーカーが用いられている。我々は後者では X 染色体遺伝子 HUMARA を用いた解析法が感度の面で優れていることを報告した。今回、われわれは HUMARA 遺伝子を指標に異性間 HSCT 後の骨髄・末梢血中の残存ホスト細胞の有無を検討した。

B. 研究方法

原理はメチル感受性制限酵素 HpaII により男性由来の X 染色体を完全消化し、残存する女性由来の不活化 X 染色体上の HUMARA 遺伝子を PCR 増幅するものである。造血幹細胞移植を行なった 4 症例より、経時的に末梢血・骨髄穿刺液を採取し、分離した有核細胞より DNA

を抽出した。DNA 試料にメチル感受性制限酵素 HpaII を一昼夜反応させ、感度を上げる目的で HUMARA (Genbank M21748) 遺伝子を nested PCR で増幅した。Forward primer の 5' 末端を FAM で蛍光標識し増幅後、ABI PRISM 310 で解析した。患者の背景を表 1 に要約した。なお、当研究は本学の IRB の承認を受けて行われた。

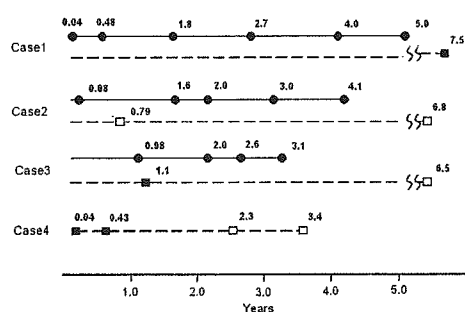
表 1.

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4
Age	22	26	41	47
Diagnosis	AML/MDS	AML/MDS	M3	M4
Status	1st CR	1st CR	1st CR	2nd CR
Donor	Sibling	Sibling	Unrelated	Sibling
Type of				
HCT	BMT	BMT	BMT	PBSCT
Conditioning	non TBI	non TBI	TBI	TBI

C. 研究結果

HSCT後の宿主細胞の検出状態を図1に示した。それぞれ上段の円は骨髄、下段の四角は末梢血の成績を示している。黒塗りのシンボルは宿主細胞の検出陽性、白抜きのシンボルは検出陰性を表している。症例1は骨髄・末梢血とも5年以上にわたり陽性であった。症例2は骨髄では陽性、末血では陰性であった。症例3は骨髄では持続的に陽性であったが、末血では陽性から陰性に変化した。症例4は末梢血のみの検討で、陽性から2年を経て陰性化した。

図1.



D. 考察

今回の検討では検討症例数は十分でないものの、骨髄では検討可能であった3例ともそれぞれ5年、4年、3年の時点で宿主由来の細胞が検出された。従来のSTR法による成績よりも高頻度に検出が可能であった。母体に少数の胎児の細胞が出産後数十年にわたって生存するように、移植後にも長期間、宿主細胞が残存する可能性が示唆される。その場合、骨髄の環境が宿主細胞の生存により適して

いるため、骨髄では末梢血に比較して長期にわたり陽性となるのかもしれない。しかし、骨髄の宿主由来の間葉系細胞などの造血細胞以外の宿主細胞の混入の可能性もあり、さらなる検討が必要であると考えられる。

E. 結論

HUMARA 遺伝子を指標とした高感度検出法は、女性宿主・男性ドナーにおける異性間HSCT後の残存宿主細胞の検出に極めて有用である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Karasawa M, Yamane A, Mitsui T, Irisawa H, Sakura T, Matsushima T, Tsukamoto N, Nojima Y, Miyawaki S: Long-term persistence of host cells detected by X-chromosome gene-based assay in patients undergoing gender-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Hematol* 80: 101-105, 2005

7. 学会発表

唐沢正光, 山根有人, 斉藤泰之, 三井健輝, 入沢寛之, 半田 寛, 佐倉 徹, 松島孝文, 塚本憲史, 村上博和, 野島美久, 宮脇修一: HUMARA 遺伝子を指標とした異性間骨髄移植におけるキメリズムの長期解析. 第66回日本血液学会総会・第46回日本臨床血液学会総会 (平成16年9月, 京都)

PNHの良性腫瘍性に関する研究

研究協力者 木下 タロウ (大阪大学微生物病研究所・教授)

研究要旨

PNHは、PIGA遺伝子の体細胞突然変異によりできたGPIアンカー欠損細胞が、クローナルに拡大する疾患である。今まで、その分子メカニズムは、PNHが再生不良性貧血(AA)と合併することから、免疫的な機序による骨髄造血障害からの選択的拡大であるという仮説が、YoungとLuzzattoらにより提唱されてきた。しかし、AA患者のうち多くは、骨髄のほとんどを占めるまでPNHクローンが拡大しないことや、PNH患者におけるマイナークローンには拡大機構が働かないことから、さらなる異常の関与が考えられた。我々は、PIGAの異常に加え、12番染色体異常を持つ日本人PNH患者(J20)症例を解析し、良性の間葉系腫瘍の発症に関わる遺伝子*HMGA2*の異常を報告した。今回、12番染色体に異常を持つ新規アメリカ人症例を解析し、同じ遺伝子*HMGA2*のJ20とほぼ同じ所に切断点を同定した。2症例において、ほぼ同じ異常を同定したことは、PNHの発症にこの異常が深く関与し、PNH細胞の良性腫瘍性を強く示唆する結果であると考えられる。

A.研究目的

私たちは、PNHにおいて、GPIアンカー欠損細胞が拡大するメカニズムには、現在までに報告されている免疫学的機序による選択以外に、GPIアンカー欠損細胞に新たに起こった何らかの異常が関わっているのではないかと考え、以前、12番染色体に異常のある症例の解析を行ってきた。今回、アメリカで、新たに、46, XX, ins(12)(p12-q13q12)という染色体異常をもつPNH症例を経験し、その異常を明らかにした。

B.研究方法

患者末梢血単球とマウスミエローマ細胞株から異常12番染色体を持つ融合細胞を作成し、FISH解析、サザンブロッティング、inverse

PCRなどの方法を用い、染色体異常を明らかにした。

(倫理面への配慮)

本研究課題は、大阪大学、大阪府立成人病センターおよび米国ユタ大学医学部の倫理審査委員会において承認を受け、患者本人のインフォームドコンセントをとって行っている。

C.研究結果

本症例におけるGPIアンカー欠損は、PIGA遺伝子のエクソン2の14bpの欠損により起こっていた。また染色体異常は、12q12からq14領域までの約19.5Mbpが欠損し、その欠損部位由来の約19Mbpの断片とq14領域の約300kbpの断片が、それぞれ逆位と正位に

12p13 領域に挿入されていた。これらの異常により形成された切断点のうち、12q14 のテロメア側の切断点は、J20 で同定された切断点と約 600bp しか離れておらず、それは、同一遺伝子 *HMGA2* 上にあった。また、GPI アンカー欠損細胞とこの染色体異常をもつ細胞集団は、ほぼ一致した。

D. 考察

これらの染色体異常が、1つの GPI アンカー欠損造血幹細胞に起こったということは、*HMGA2* の異常が、PNH 発症に深く関与することを示唆する。また、*HMGA2* は、良性の間葉系腫瘍の発症に関わることが知られており、PNH が良性腫瘍様増殖をしていることを示唆している。

E. 結論

本研究により、PNH が、少なくとも GPI 欠損造血幹細胞の良性腫瘍様の増殖により発症する症例が存在することを証明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Inoue N., Izui-Sarumaru T., Murakami Y., Endo Y., Nishimura J., Kanakura Y., Meyers G., Wittwer C., Chen Z., Babcock W., Frei-Lahr D., Parker C., Kinoshita T.: Molecular basis of clonal expansion of hematopoiesis in two patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) (Manuscript in preparation)

2. 学会発表

1. Inoue N., Izui-Sarumaru T., Murakami Y., Endo Y., Nishimura J., Kanakura Y., Meyers G., Wittwer C., Chen Z., Babcock W., Frei-Lahr D., Parker C., Kinoshita T.: Clonal expansion in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): Expression of mutant *HMGA2* suggests that PNH is a benign tumor of the bone marrow. The 47th Annual Meeting of the American Society of Hematology, 2005. 12.10, Atlanta, GA, USA. (Blood 106:986a, 2005)

2. 井上徳光 他: GPI アンカー欠損細胞に染色体異常を伴う発作性夜間血色素尿症 (PNH) 新規症例の解析

第42回 補体シンポジウム 2005年

AML1 点変異を有する MDS/AML の多段階発症メカニズムの解明

研究協力者 木村昭郎（広島大学原爆放射線医科学研究所・教授）
原田浩徳（広島大学病院・助手）
原田結花（広島大学原爆放射線医科学研究所・助手）

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 変異群では-7/7q-染色体異常が多く、*FLT3*、*N-RAS*、*PTPN11*、*NF1* の変異が高頻度で、有意に RTK~RAS 経路異常を呈した。一方 AML1 正常群では、-5/5q-と複雑異常が有意に高率で、*p53* 変異を認めた。以上より、AML1 点変異の有無で MDS/AML の発症機構が異なり、AML1 変異群では-7/7q-異常や RAS 経路活性化異常を獲得して発症すると考えられた。

A.研究目的

骨髓異形成症候群(MDS)は複数の遺伝子異常が蓄積して発症する。転写因子 AML1 の異常は造血細胞の悪性化に関与しており、我々は 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、AML1 変異体は転写活性化能の低下~消失を来すことを報告した。AML1 点変異は、AML1-MTG8 のようなキメラ蛋白と同様に、発症過程の主因子と想定される。AML では、「分化阻害」と「増殖」の二種類の変異が協調して発症するという二段階発がんモデルが提唱されているが、MDS の発症機序はさらに複雑で、多段階の遺伝子変異の蓄積が必要である。我々は「AML1 点変異を有する MDS/AML」に特異的な遺伝子異常を解析して、多段階発症機構を明らかにしようと試みた。

B.研究方法

血液疾患 625 例の DNA を分離し、*AML1* 遺伝子の点変異を PCR-SSCP 法で解析した。診断、染色体所見および AML1 変異の有無により、①AML1 変異 MDS/AML (34 例)②AML1 正常 MDS/AML (80 例)、③CBF 白血病 (25 例)の 3 群を選択し、*N-RAS*、*K-RAS*、*c-KIT*、*PTPN11*、*NF1*、*FLT3*、*p53* 遺伝子変異を PCR-SSCP 法、DPHLC 法等で解析して変異例の塩基配列を決定した。

（倫理面への配慮）

広島大学医学部倫理委員会承認済みで、同委員会の定めるヒトゲノム遺伝子解析研究の指針に従って実施する。検体提供者にはインフォームドコンセントを行い、個人情報保護のため、個々の試料情報は連結可能匿名化とする。

C.研究結果

MDS/AML 患者の染色体解析では、複雑核型、-5/5q-異常が AML1 正常群に特異的で、AML1 変異群では 5 番染色体正常の-7/7q-異常例が

高頻度であった。*N-RAS*、*K-RAS*、*c-KIT*、*PTPN11*、*NF1*、*FLT3*、*p53* 遺伝子変異を上
述の 3 群で比較検討した結果、*N-RAS*、
PTPN11、*NF1*、*FLT3* 遺伝子変異が AML1
変異群で高い変異率を示し、チロシンキナー
ゼ受容体(RTK)-RAS シグナル伝達経路に属
する変異の総和では、AML1 変異群で明らか
に高頻度であった(38%対 6.3%、 $P<0.0001$)。
一方、*p53*の変異は AML1 正常群にのみ見ら
れた($P=0.0170$)。*c-KIT*の変異は CBF 白血病
群のみで、この群の RTK-RAS 経路異常は
36%と高率であった。

AML1 変異を有する MDS/AML の腫瘍細
胞は *c-KIT* を発現しており、*c-KIT* を介した
Stem cell factor (SCF)刺激が RAS 経路を過
剰に活性化して、発症機序の一端を担ってい
るのではないかと考え、証明を試みた。HEL
細胞に *PTPN11* 遺伝子変異 (SHP-2 変異体)
を導入し、SCF で刺激して RAS 下流の ERK
のリン酸化レベルを検討したところ、変異
SHP-2 発現細胞では、SCF 刺激により過剰な
ERK のリン酸化が見られた。

D. 考察

MDS の発症機序は、染色体異常の解析から
-7/7q 経路と -5/5q 経路があると推察されて
いた。しかし我々は、造血の中心的役割を担
う AML1 に着目し、AML1 変異の有無により
MDS 発症機序が異なると推測している。今回
の検討から、AML1 点変異を有する
MDS/AML 症例は、RTK-RAS シグナル伝達
経路に属する遺伝子変異を高頻度に合併して
おり、SCF 刺激により細胞表面の *c-KIT* レセ

プターから過剰な増殖シグナルが細胞内に伝
達されることが示唆された。これは *c-KIT* の
変異を高率に合併している CBF 白血病にお
いても同様であることから、AML1 の機能異
常を原因とする血液疾患に共通の協調遺伝子
異常ではないかと考えられた。

E. 結論

「AML1 点変異を有する MDS/AML」は特異
的な協調遺伝子異常を示しており、他の
MDS/AML とは異なった分子病態を呈する一
疾患単位であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Harada H, Harada Y, Kimura A: Implications of somatic mutations in the AML1/RUNX1 gene in myelodysplastic syndrome (MDS): Future molecular therapeutic directions for MDS. Current Cancer Drug Targets (in press).
2. Niimi H, Harada H, Harada Y, Ding Y, Imagawa J, Inaba T, Kyo T, Kimura A: Hyperactivation of the RAS signaling pathway in myelodysplastic syndrome with AML1/RUNX1 point mutations. Leukemia (in press)
3. Harada H, Harada Y, Kimura A: Point mutations in the AML1/RUNX1 gene associated with myelodysplastic syndrome (MDS). Acta Medica Nagasakiensia 50, 91-95, 2005.
4. Harada H, Harada Y: Point mutations in the AML1/RUNX1 gene associated with myelodysplastic syndrome. Critical ReviewsTM in Eukaryotic Gene Expression

15(3), 183-196, 2005.

2.学会発表

1. 原田浩徳, 原田結花, 新美寛正, 丁 曄, 許 泰一, 稲葉俊哉, 木村昭郎 : AML1/RUNX1 点変異をもつ MDS/AML の多段階発症機構. 第 67 回日本血液学会総会・第 47 回日本臨床血液学会総会, 横浜, 2005.9.17. (臨床血液 45(8): 776, 2004.)
2. 原田浩徳, 原田結花, 新美寛正, 許 泰一, 稲葉俊哉, 木村昭郎 : AML1 の点変異をもつ骨髄異形成症候群(MDS)の多段階発症機構. 第 46 回原子爆弾後障害研究会, 広島, 2005.6.5.
3. 原田浩徳, 原田結花, 新美寛正, 許 泰一, 木村昭郎 : AML 化学療法後に AML1 の点変異を得て発症した MDS の 3 例. 第 92 回日本内科学会中国地方会, 岡山, 2005.6.4.

研究協力者 黒川 峰夫 (東京大学 血液・腫瘍内科 教授)

研究要旨

Evi-1 は骨髄異形成症候群 (MDS) 症例の 10-15%程度に高発現している。Evi-1 は急性骨髄性白血病では予後不良因子であることが報告されているが、MDS の予後に与える影響は不明である。今回は特に Evi-1 アイソフォームを区別し、それらの発現が MDS 症例の予後と白血病への進行に与える影響を調べた。その結果、Evi-1 アイソフォーム発現の有無は、MDS の予後および白血病への進行と明らかな関連は認めなかった。

A. 目的

Evi-1 は骨髄異形成症候群 (MDS) において 10-15%の高発現例が存在していると言われているが、その予後に与える影響は不明である。急性骨髄性白血病 (AML) 症例ではクラスター解析の結果 Evi-1 発現群が他群に比し予後不良であったことが報告されている。また AML では Evi-1 アイソフォームのうち造腫瘍性に関わるとされる Evi-1a が予後を悪化させるが、造腫瘍性を持たないとされる Evi-1c は予後に影響を与えなかったと報告された。われわれは両者の造腫瘍性の違いが多量体形成能と関連することを報告したが、本研究では、これらの Evi-1 アイソフォームの発現が MDS 症例の予後に与える影響を調べた。

B. 研究方法

対象は当施設で骨髄検査により MDS と確定診断され、1 ヶ月以上の予後経過が追跡可能であった MDS 症例 57 例とした。診断時に

保存された骨髄検査の検体から mRNA を抽出し、real time PCR を用いて Evi-1a, Evi-1c の両アイソフォームを定量的に測定した。同時に各症例について後方視的に診断からの予後と白血病への進行までの時間を調べた。

(倫理面への配慮)

本研究は研究題目「造血器腫瘍における遺伝子異常の網羅的解析」の一環として行われ、所属施設である東京大学附属病院の倫理審査委員会によって既に承認された内容に準じて行った。

C. 研究結果

全 57 症例中、Evi-1a 陽性例が 6 例 (11%)、Evi-1c 陽性例が 10 例 (17%)、両方とも陰性の例が 41 例 (72%) であった。(なお両アイソフォームともに陽性例は Evi-1a 陽性例として扱った)。生存率に対しては、いずれの群も差がなかった。白血病への進行までの時間については、Evi-1a 陽性群では短く、両方とも陰性の群では長い傾向が見ら