

分担研究報告書

再生不良性貧血の病態における抗モエシン抗体の意義

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)

研究協力者 高松博幸、望月果奈子、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

後天性再生不良性貧血(再不貧)患者の約3割で検出される抗モエシン抗体の機能を明らかにするため、FITCでラベルした抗モエシン抗体で血液細胞や白血病細胞株を調べたところ、この抗体で認識される分子(これまでの検討からモエシンは膜表面には発現しないとされているため、以下ではモエシン様分子と表現)がTリンパ球やマクロファージ、Tリンパ球系および単球系白血病細胞株の細胞表面に発現していることが判明した。さらに、PMAやLPSで刺激した単球系白血病細胞株ではこのモエシン様分子の発現が増加することがわかった。また、抗モエシンモノクローナル抗体や骨髄不全患者血清由来抗モエシンポリクローナル抗体を単球系白血病細胞株に加えたところ、TNF- α の分泌量が約2倍に増加した。さらに、抗モエシンモノクローナル抗体は一部の健常者由来Tリンパ球を刺激してIFN- γ 分泌を誘導した。以上の所見から、造血不全で高頻度に検出される抗モエシン抗体は免疫担当細胞からのサイトカイン産生を介してその病態に関与している可能性が示唆された。

A. 研究の背景

再不貧では免疫抑制療法が70%以上に奏効することから、造血幹細胞への自己免疫的攻撃が骨髄不全の原因と考えられているが、自己抗原は同定されていない。一方、これまでの我々の研究からPNH形質の細胞が増加している(PNH型血球陽性)患者の血清中には、細胞骨格と細胞膜とのリンカータンパク質であるモエシンに対する抗体が高頻度(約50%)に検出されること明らかになった(Takamatsu, et al. Blood, 2007)。モエシンは血液細胞だけでなくほとんどの体細胞で発現されており、抗モエシン抗体も骨髄不全だけでなくリウマチ患者でも検出されることから、当初抗モエシン抗体は骨髄不全の病態とは無関係と考えていた。ただし、一部の報告では、抗モエシン抗体によって認識される蛋白が単球系の白血

病細胞株表面に発現されていることが示されている。そこでこの所見を確認し、再生不良性貧血の病態における抗モエシン抗体の意義を明らかにすることを目的に以下の検討を行った。

B. 研究方法

1. 市販の抗モエシンモノクローナル抗体(クローン38/87)をFITCで標識し、健常者の末梢血白血球及び各種白血病細胞株におけるモエシン様分子の発現をフローサイトメトリで検討した。
2. Phorbol myristate acetate (PMA) と lipopolysaccharide (LPS) 刺激によるモエシン様分子の発現の変化を検討した。
3. 再不貧患者血清中のIgGをプロテインGカラムで精製後、更に組換えモエシン固定化カラ

ムを用いることにより抗モエシン IgG を精製した。

4. THP-1 細胞 5×10^5 個を 20ng/ml PMA 含有 RPMI1640+10%FCS 培地で 24 時間培養後、種々の濃度の LPS と $10 \mu\text{g/ml}$ 抗モエシン抗体を加えて更に 24 時間培養した。また、健常者の T リンパ球 5×10^5 個を $2 \mu\text{g/ml}$ 抗モエシン抗体含有 RPMI1640+10%FCS 培地で 72 時間培養した。

5. 培養上清中の TNF- α 、IFN- γ 濃度を ELISA で測定した。

C. 研究成果

1. 抗モエシン抗体で認識される分子 (モエシン様分子) は、健常者の末梢血 T リンパ球やマクロファージ、T リンパ球系 (Molt-4) 及び単球系 (THP-1, U937) の白血病細胞株の細胞表面に発現していた (図 1) が、CD34 陽性細胞には発現していなかった。

2. 単球系白血病細胞株 THP-1 では PMA/LPS 刺激によりモエシン様分子の発現レベルが増強された。

3. 抗モエシンモノクローナル抗体及び再不貧患者由来の抗モエシンポリクローナル抗体は、THP-1 による TNF- α 分泌を増加させた (図 2)。また、抗モエシンモノクローナル抗体は一部の健常者由来 T リンパ球を刺激して IFN- γ 分泌を誘導した。

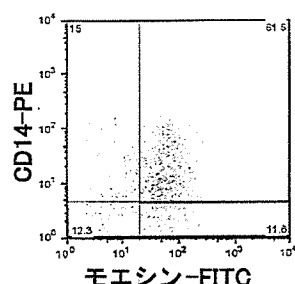
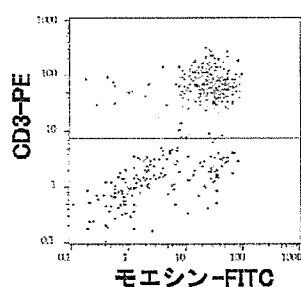


図 1. T リンパ球とマクロファージにおけるモエシン様分子の発現

D. 考察

臓器特異的な自己免疫疾患で検出される自己抗体は多くの場合標的臓器の破壊に伴って生じる二次的な産物であり、自己抗体が病態に直接関与することはないと考えられている。最近、Baroni らは、強皮症患者において PDGF-R を認識する機能的な抗体が存在し、その抗体が PDGF-R を介して線維芽細胞を刺激する結果、I 型コラーゲン遺伝子の発現と筋線維芽細胞の表現型の変換を促進し、強皮症の病態が形成されることを報告した (N Engl J Med., 2006)。このように病態とは一見無関係に見える自己抗体が臓器特異的な自己免疫疾患の病態に影響を及ぼすという現象は、他の自己免疫疾患においても起こっている可能性がある。

モエシンは細胞内蛋白質であり、さらに血液細胞だけでなくほとんどの体細胞で発現されていることから、抗モエシン抗体は骨髄不全の病態とは無関係と当初は考えていた。今回の検討により、抗モエシン抗体で認識される分子が T リンパ球やマクロファージの細胞表面に発現しており、さらに、抗モエシン抗体によって TNF- α や IFN- γ 分泌が増強されることが明らかとなった。したがって患者血清中の抗モエシン抗体はこれら造血抑制性サイトカイン分泌増強を介して、再不貧の病態生理に関与している可能性がある。

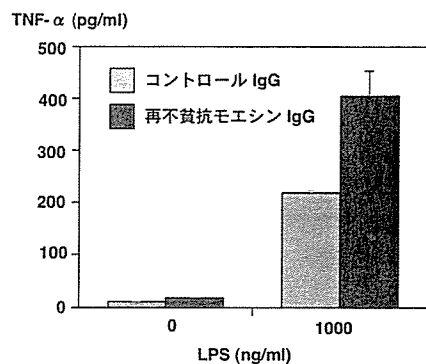


図 2. 再不貧患者血清由来抗モエシンモノクローナル抗体添加による TNF- α 分泌量変化

E. 結論

再不貧患者で高頻度に検出される抗モエシン抗体は T リンパ球やマクロファージの細胞表面に結合し、TNF- α や IFN- γ などのサイトカイン産生を促すことにより、再不貧の病態に関与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. Takamatsu H, Feng X, Chuhjo T, Lu X,

Sugimori C, Okawa K, Yamamoto M, Iseki S, Nakao S: Specific antibodies to moesin, a membrane-cytoskeleton linker protein, are frequently detected in patients with acquired aplastic anemia. *Blood*, in press, 2007

2. Takamatsu H, Feng X, Lu X, Chuhjo T, Okawa K, Nakao S : Stimulation of TNF- α production from monocytes by anti-moesin antibodies in the serum of patients with aplastic anemia: a novel mechanism of myelosuppression by autoantibodies. The 48th Annual Meeting of the American Society of hematology, 2006. 12.9, Orland, FL, USA. (*Blood* 108: 291a, 2006)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許第 3735676 号 発明の名称「再生不良性貧血患者血清に存在する自己抗体の検出方法」

特許権者 国立大学法人金沢大学、

発明者 中尾眞二、高松博幸、馮興民、

中条達也、大川克也

登録年月日 平成17年11月4日

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（京都大学大学院研究科発達小児科学・教授）

研究協力者 真部 淳（聖路加国際病院小児科・部長）

小島 勢二（名古屋大学小児科学・教授）

小原 明（東邦大学輸血部・助教授）

研究要旨

小児血液学会 MDS 委員会では 1999 年に MDS が疑われる症例に対する中央診断を開始した。2006 年 12 月までに約 450 例が登録された。成人の MDS および骨髄増殖性疾患のほとんどの病型が、少数ながら小児期にもみられることが明らかになった。家族性疾患および先天性疾患を今後どのように扱うかは次の課題である。

A. 研究目的

小児 MDS は頻度が少なく診断は容易ではない。一方小児 MDS は一般に予後の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。小児血液学会 MDS 委員会では、1999 年に患者発生時の病理中央診断を開始した。

B. 研究方法

小児血液学会会員（約 1,200 名）の属する施設で発症した MDS が疑われる症例を対象とした。末梢血および骨髄の塗抹標本は 2 カ所でレビューし、骨髄生検標本は 1 カ所でレビューした。なお最初のレポートは 2 週間以内に発行・送付した。

（倫理面への配慮）

患者の個人情報が入り込まないよう、学会の指針

に従った運営を行った。

C. 研究結果

1999 年 7 月から 2006 年 12 月までの約 7 年間に 453 例の小児が登録された。うち、一次性 MDS は 120 例、骨髄増殖性疾患は 98 例、二次性 MDS は 14 例、その他として、急性白血病は 35 例、骨髄不全は 70 例、自己免疫性疾患は 13 例、栄養性・感染症等は 27 例、診断困難・診断未確定は 36 例、検体不備等で診断不能が 40 例であった。

一次性 MDS の 120 例の内訳は、RA/RCMD が 58 例、RAEB が 42 例、RAEBT が 4 例、RARS が 2 例、RAEB-AML-M6 症候群が 5 例、線維化を伴う MDS が 3 例、MDS, unclassified が 1 例、分類不能 MDS が 5 例だった。

骨髄増殖性疾患の内訳は、JMML が 83 例、

CMLが1例、CMMLが5例、CMML/RAEB境界例が2例、aCMLが2例、真性多血症が1例、本態性血小板血症が3例、Hypereosinophilic syndromeが1例だった。

二次性MDSの14例の基礎疾患は再生不良性貧血が4例、脳腫瘍が2例、悪性リンパ腫が2例、横紋筋肉腫が2例、以下、神経芽腫、奇形種、AML、ALL、Kostmann症候群、白血病移植後のドナー型MDSが各1例だった。

D. 考察

成人でみられる病型のほとんどが、少ないながら小児においもみられることが明らかになった。また、これらMDSと骨髄増殖性疾患の症例の中は家族性のものや先天性疾患に伴ってみられるものも多く、小児におけるMDS関連疾患の分類はきわめて困難である。その一方、新しい、未知の疾患が隠れている可能性も高い。

E. 結論

小児MDS関連疾患に対して、発症時に中央診断することにより、小児MDSの成人との類似性や小児期にのみみられる特徴が明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

9. 論文発表

1. Kato I, Aoyama C, Kamiya T, Morimoto T, Manabe A, Matsufuji H, Suzuki K, Kitagawa Y, Hori T, Tsurusawa M, Kiyokawa N, Fujimoto J, Hosoya R: The development of diffuse large B cell lymphoma during the maintenance therapy for

B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2007;48:230-232.

2. Takahashi H, Manabe A, Aoyama C, Kamiya T, Kato I, Takusagawa A, Ogawa C, Ozawa M, Hosoya R, Yokoyama K: Iodine-131-Metaiodobenzylguanidine therapy with reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation in recurrent neuroblastoma. *Pediatric Blood Cancer*, in press

3. Matsuda K, Shimada A, Yoshida N, Ogawa A, Watanabe A, Yajima S, Iizuka S, Koike K-t, Yanai F, Kawasaki K, Yanagimachi M, Kikuchi A, Ohtsuka Y, Hidaka E, Yamauchi K, Tanaka M, Yanagisawa R, Nakazawa Y, Shiohara M, Manabe A, Kojima S, Koike K: Spontaneous improvement of hematologic abnormalities in patients having juvenile myelomonocytic leukemia with specific RAS mutations. *Blood*, in press

4. Sugiyama, D; Ogawa, M; Nakao, K; Osumi, N; Nishikawa, Sa; Nishikawa, Si; Arai, K; Nakahata, T; Tsuji, K: B cell potential can be obtained from pre-circulatory yolk sac, but with low frequency. *Development Biol* 2007;301:53-61.

5. Suzuki, K; Hiramatsu, H ; Fukushima-Shintani, M; Heike, T; Nakahata, T: Efficient assay for evaluating human thrombopoiesis using NOD/SCID mice transplanted with cord blood CD34(+) cells. *Eur J Haematol*, 2007;78:123-130.

6. Umeda, K; Heike, T; Nakata-Hizume, M; Niwa, A; Arai, M; Shinoda, G; Ma, F; Suemori, H; Luo, HY; Chui, DHK; Torii, R; Shibuya, M; Nakatsuji, N; Nakahata, T: Sequential analysis of alpha- and beta-globin gene expression during erythropoietic

- differentiation from primate embryonic stem cells. *Stem Cells* 2006;24:2627-2636.
7. Kitawaki, T; Kadowaki, N; Sugimoto, N; Kambe, N; Hori, T; Miyachi, Y; Nakahata, T; Uchiyama, T: IgE-activated mast cells in combination with pro-inflammatory factors induce T(h)2-promoting dendritic cells. *Int Immunol* 2006;1812:1789-1799.
8. Suzuki, T; Yokoyama, Y; Kumano, K; Takanashi, M; Kozuma, S; Takato, T; Nakahata, T; Nishikawa, M; Sakano, S; Kurokawa, M; Ogawa, S; Chiba, S: Highly efficient ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells using Delta1-Fc chimeric protein. *Stem Cells* 2006;24:2456-2465.
9. Tanaka, H; Matsumura, I; Itoh, K; Hatsuyama, A; Shikamura, M; Satoh, Y; Heike, T; Nakahata, T; Kanakurab, Y: HOX decoy peptide enhances the ex vivo expansion of human umbilical cord blood CD34(+) hematopoietic stem cells/hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells* 2006;24:2592-2602.
10. Kobayashi, R; Yabe, H; Hara, J; Morimoto, A; Tsuchida, M; Mugishima, H; Ohara, A; Tsukimoto, I; Kato, K; Kigasawa, H; Tabuchi, K; Nakahata, T; Ohga, S; Kojima, S: Preceding immunosuppressive therapy with antithymocyte globulin and ciclosporin increases the incidence of graft rejection in children with aplastic anaemia who underwent allogeneic bone marrow transplantation from HLA-identical siblings. *Brit J Haematol* 2006;135:693-696.
11. Umeda, K; Heike, T; Yoshimoto, M; Shinoda, G; Shiota, M; Suemori, H; Luo, HY; Chui, DHK; Torii, R; Shibuya; Nakatsuji, N; Nakahata, T: Identification and characterization of hemoangiogenic progenitors during cynomolgus monkey embryonic stem cell differentiation. *Stem Cells* 2006;24:1348-1358.
12. Matsubara, H; Kobayashi, M; Tokumasu, M; Nakanishi, H; Miyazaki, M; Mizushima, Y; Hiramatsu, H; Adachi, S; Nakayama, T; Onishi, E; Nakahata, T: Salmonella enteritidis septic arthritis after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Leukemia Lymphoma* 2006;47:1435-1437.
13. 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: Infants with acute lymphoblastic leukemia and a germline MLL gene are highly curable with use of chemotherapy alone: results from the Japan Infant Leukemia Study Group. *Blood* 2006;107:4663-4665.
14. Kato, T; Heike, T; Okawa, K; Haruyama, M; Shiraishi, K; Yoshimoto, M; Nagato, M; Shibata, M; Kumada, T; Yamanaka, Y; Hattori, H; Nakahata, T: A neurosphere-derived factor, cystatin C, supports differentiation of ES cells into neural stem cells. *Proc National Acad Sci USA* 2006;103:6019-6024.
15. Imamura, M; Asano, S; Harada, M; Ikeda, Y; Kato, K; Kato, S; Kawa, K; Kojima, S; Morishima, Y; Morishita, Y; Nakahata, T; Okamura, J; Okamoto, S; Shiobara, S; Tanimoto, M; Tsuchida, M; Atsuta, Y; Yamamoto, K; Tanaka, J; Hamajima, N; Kodera, Y: Current status of hematopoietic cell transplantation for adult patients with hematologic diseases and solid tumors in Japan. *Int J Hematol* 2006;83:164-178.
16. Shiota M, Heike T, Haruyama M, Baba S, Tsuchiya A, Fujino H, Kobayashi H, Umeda K, Yoshimoto M, Nakahata T: Isolation and characterization of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells with

myogenic and neuronal properties. Exp Cell Res
2007;313:1008-1023.

なし

1 1 .

実用新案登録

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1 2 .

その他

1 0 . 特許取得

なし

原発性骨髄線維症—臨床像の前方視的検討、Jak2 遺伝子変異、蛋白同化ホルモンの効果

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2006年の7年間に、316例の原発性骨髄線維症の新規登録を得た。男女比は1.80:1、年齢中央値は65歳。貧血を70%に、血小板数の異常を56%に認めた。Jak2の遺伝子変異を46%に認めている。56%の症例は治療を要し、蛋白同化ホルモンが55例に、サリドマイドが9例に投与されている。蛋白同化ホルモンが投与された39例中17例では、貧血の改善が認められた。

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。

の貧血を70%に、血小板数10万/ μ L未満が32%、50万/ μ L以上が24%であった。染色体検査では108例(58%)は正常核型であったが、79例(42%)は異常核型を示し、複雑な染色体異常や、del 13、del 20、+8などの異常が認められた。

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、2006年に診断した患者登録、臨床情報の集積を行うと同時に、1999年から2005年までの登録症例の追跡調査を行った。発症原因の検討に関しては、13例の末梢血好中球を用いて、Jak2遺伝子変異の有無を検討した。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は、2次調査が可能であった39例に関して検討した。

Jak2の遺伝子変異を、好中球よりえら得たDNAを用いて検討した。13例中6例に、V617F変異を認めた。

173例(56%)に対し治療が行われており、抗腫瘍剤が68例に、ステロイドが45例に、蛋白同化ホルモンが55例に、サリドマイドが9例に投与されていた。

C. 研究結果

1999年から2006年の7年間に、316例の原発性骨髄線維症の新規登録があった。男女比は1.80:1、年齢中央値は65歳であった。臨床症状を72%に認めており、貧血症状が54%と最も多い。しかし、症状がなく、偶然の機会に診断された症例も28%あった。検査成績では、Hb 10g/dl未満

蛋白同化ホルモン（酢酸メテノロン）の貧血に対する効果を、2次調査が可能であった39例につき検討した。年齢は43歳から95歳、中央値67歳、25例が輸血依存性であり、治療前のHbは2.9-9.8 g/dL（中央値6.9 g/dL）である。診断から治療までの期間は中央値で1.5ヶ月、中央値で12.6ヶ月の投与をうけた。44%の症例において貧血の改善が認められた。重篤な副作用は出現していない。

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、本邦における後方視的検討では、酢酸メテノロンの使用で、44%の症例で貧血の改善効果がみられている。効果発現まで6ヶ月要した症例もあり、従来言われてきた期間より長期の投与が必要かもしれない。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2006年の7年間に、316例の原発性骨髄線維症の新規登録があった。Jak2の遺伝子変異を46%に認めた。蛋白同化ホルモン（酢酸メテノロン）は、貧血に対し44%の症例で効果を認めた。

健康危険情報

特記事項なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Shide K, Shimoda K, Kamezaki K, Kakumitsu H, Kumamoto T, Numata A, Ishikawa F,

Takenaka K, Yamamoto K, Matsuda T, Harada M: Tyk2 mutation homologous to V617F Jak2 is not found in essential thrombocythaemia, although it induces constitutive signaling and growth factor independence. Leuk Res. (in press)

2. Shimoda K, Shide K, Kamezaki K, Okamura T, Harada N, Kinukawa N, Ohyashiki K, Niho Y, Mizoguchi H, Omine M, Ozawa K, Harada M: The effect of anabolic steroids on anemia in myelofibrosis with myeloid metaplasia: retrospective analysis of 39 patients in Japan. Int J Hematol. (in press)

2. 学会発表

1. 幣 光太郎、下田和哉、亀崎健次郎、角光晴子、熊野 孝、沼田晃彦、石川文彦、竹中克斗、山本 健、原田実根：慢性骨髄増殖性疾患におけるJak2V617F変異と相同的なTyk2遺伝子の変異に関する検討。第68回日本血液学会総会、2005年10月7日、福岡市

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

MDS におけるスフィンゴ脂質代謝酵素メッセージ発現量に関する研究

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

60例のMDS, 19例の acute leukemia、11例の正常骨髄 RNA を用いてスフィンゴ脂質代謝各酵素およびMDR、BCL2のメッセージレベルを定量RT-PCRで解析した。正常と比較して sphingosine kinase 1 が high risk MDS, acute leukemia にて上昇しており、逆に neutral sphingomyelinase 2 は減少していた。また、BCL2 は acute leukemia 症例のみで増加していた。細胞株を用いた実験でスフィンゴ脂質代謝の変化がこれらの疾患においても腫瘍化、抗癌剤耐性に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

MDS および acute leukemia におけるスフィンゴ脂質代謝酵素の発現レベルを定量RT-PCRにて解析し、これら疾患におけるスフィンゴ脂質代謝の動態を理解し、治療への可能性を探る。

B. 研究方法

定量RT-PCRはサイバーグリーン法を用いプライマー、反応条件の特異性は細胞株の予備実験にて確立した。臨床検体より RNA を抽出し定量RT-PCRにて発現レベルを測定した。

（倫理面への配慮）

骨髄の検体採取に当たっては、同意文書を取得した。

C. 研究結果

60例のMDS, 19例の急性白血病、11例の正常骨髄RNAを用いてスフィンゴ脂質代謝酵素

およびMDR、BCL2のメッセージレベルを定量RT-PCRで解析した。sphingosine kinase 1 が high risk MDS, acute leukemia にて上昇しており、逆に neutral sphingomyelinase 2 は減少していた。また、BCL2 は acute leukemia 症例のみで増加していた。白血病細胞株を用いた実験で sphingosine kinase 1 が細胞増殖、抗癌剤耐性に関与していることが示唆された。

D. 考察

MDS および急性白血病骨髄検体でのスフィンゴ脂質代謝各酵素の主要なものの発現レベルが明らかになり、sphingosine kinase 1 の上昇および neutral sphingomyelinase 2 の減少が認められた。これによりこれら疾患ではスフィンゴ脂質代謝が anti-apoptic に働いている可能性が示唆された。

E. 結論

今回の結果により、MDS, acute leukemia におけるスフィンゴ脂質代謝各酵素の発現レベルが初めて明らかとなり、特に sphingosine kinase 1 はその阻害剤が治療薬となりうる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Sobue S, Iwaki T, Sugisaki C, Nagata K, Kikuchi R, Murakami M, Takagi A, Kojima T, Banno Y, Akao Y, Nozawa Y, Kannagi R, Suzuki M, Abe A, Naoe T, Murate T. Quantitative RT-PCR analysis of sphingolipid metabolic enzymes in acute leukemia and myelodysplastic syndromes.

Leukemia 20;2042-2046, 2006

2. 学会発表

祖父江沙矢加、岩崎卓識、杉崎千穂、浅野治彦、安部明弘、坂野喜子、赤尾幸博、野澤義則、菊地良介、村上真史、高木明、小嶋哲人、直江知樹、村手隆 白血病細胞株、白血病および骨髄異形成症候群におけるスフィンゴ脂質代謝酵素の定量 RT-CPR 第48回日本臨床血液学会 2006 9月 福岡

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

Ⅲ. 研究協力者報告書

同種造血幹細胞移植後の末梢血亜分画を用いたキメリズム解析

研究協力者 今村 雅寛（北海道大学大学院医学研究科教授）

研究要旨 同種造血幹細胞移植後の末梢血を用いたキメリズム解析は、生着、拒絶、移植片対宿主病、再発の予測に重要である。骨髄破壊的および非破壊的前処置による同種造血幹細胞移植症例の末梢血亜分画のキメリズムを検討したところ、種々の合併症の予測が可能となり、その臨床的有用性は高いことが明らかとなった。

A. 研究目的

同種造血幹細胞移植後の末梢血キメリズムの動態を、各種細胞亜分画を用いて解析し、移植後の種々の合併症発症の予知とその制御が可能となるか否かを検討する。

B. 研究方法

骨髄破壊的同種造血幹細胞移植 (conventional stem cell transplantation: CST) 36 症例と骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植 (nonmyeloablative stem cell transplantation: NST) 34 症例の末梢血単核球を採取し、モノクローナル抗体を用いた免疫磁気ビーズ法により移植後 14 日、28 日に CD3、CD56、CD14/15 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い、生着、拒絶、移植片対宿主病 (GVHD)、再発との関連性を検討した。

(倫理面への配慮) 本研究は、当大学の倫理委員会の承認を得ており、各症例の利益、安全性、プライバシーなどに十分配慮されて行われた。

C. 研究成果

CST および NST による同種造血幹細胞移植症例、各々 36 例と 34 例の末梢血亜分画 CD3、CD56、CD14・15 のキメリズムをマイクロサテライト DNA の増幅により比較したところ、移植後 28 日目では、非放射線照射 NST 症例の全分画、非

放射線照射 CST 症例の CD3 陽性細胞に混合キメリズムを多く認めた。II 度以上の急性 GVHD は移植後 14 日目の CD3 陽性細胞が 50%以上のドナー型キメリズムを示した場合に多く認められた。NST 症例では CD56 陽性細胞が移植後 14 日目に 50%未満、28 日目に 90%未満のドナー型キメリズムを示した場合に 1 年後の全生存率が不良であった (14 日目で 50%未満対 50%以上の場合の生存率は 0%対 91%、28 日目で 90%未満対 90%以上の場合の生存率は 20%対 74%、いずれも有意差あり)。また、NST および CST 症例で移植後 28 日目の CD14・15 陽性細胞が 90%未満のドナー型キメリズムを示した場合、1 年後の全生存率は不良であった (NST で 90%未満対 90%以上の場合の生存率は 14%対 70%、CST で 90%未満対 90%以上の場合の生存率は 0%対 66%、いずれも有意差あり)。同種造血幹細胞移植後の末梢血亜分画のキメリズムを解析することで、種々の合併症の予測が可能となり、その臨床的有用性は高いが、CST と NST ではキメリズム解析結果の意義が少しく異なることも明らかとなった。

D. 考察

前処置に放射線照射を加えないと移植後 28 日目の混合キメラが増加するが、CST では CD3 分画に、NST では全分画において顕著であった。一方、放射線照射を加えると生着ははやまり、混合キメラは減少するが GVHD の増加につながる。

II 度以上の急性 GVHD は移植後 14 日目の CD3 陽性細胞が 50%以上のドナー型キメリズムを示したときに多く認められ、早期にその発症を予知することが可能であり、免疫抑制剤の投与量や薬剤変更を考慮すべきである。NST 症例では CD56 陽性細胞のキメリズムが重要で、移植後 14 日目で 50%未満、28 日目で 90%未満のドナー型キメリズムを示した場合、生着不全や拒絶を多く認めることと相俟って、1 年後の生存率が不良であった。したがって、このような症例では早急な免疫抑制剤の減量中止が望まれるが、GVHD の増悪に留意する必要もある。さらに、CST および NST 症例で移植後 28 日目の CD14/15 陽性細胞が 90 未満のドナー型キメリズムを示した場合、1 年後の生存率が低下しており、骨髄性白血病の再発と密接に関連しており、免疫抑制剤の使用法の吟味やドナーリンパ球輸注を含む原病再発に対する処置が重要となる。

E. 結論

同種造血幹細胞移植後の末梢血亜分画のキメリズム解析を、移植後早期から経時的に行うことで、移植後の種々の合併症の早期予知が可能となり、適切な対処が迅速になされ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, Hirate D, Kaji M, Sugita J, Shigematsu A, Iwao N, Ota S, Masauzi N, Fukuhara T, Kasai M, Asaka M, Imamura M.: Analysis of donor-type chimerism in lineage-specific cell populations after allogeneic myeloablative and nonmyeloablative stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 37: 837- 843, 2006.

2. 学会発表

三浦洋子、田中淳司、東梅友美他：造血幹細胞移植後の各陽性細胞亜分画におけるキメリズム解析. 第 68 回日本血液学会・第 48 回日本臨床血液学会合同総会. 2006 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

「骨髄増殖性疾患患者の造血コロニーを対象とした JAK2 遺伝子の解析」に関する研究

研究協力者 大橋 春彦

(独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター造血幹細胞研究部長)

研究要旨

MPD 8 症例 (PV-MF 1 例、PV 3 例、ET 4 例) について、赤芽球系コロニーを対象とした解析を行なった。8 例中 7 例で JAK2/V617F 変異を検出したが、そのうち 3 症例における変異陽性コロニーの比率は 10% 未満であった。HUMARA-MSP 法によるクローン性解析を行なった 2 症例においては、JAK2 変異陽性コロニーのみならず JAK2 変異陰性コロニーも明らかな片寄りを示し、JAK2 変異の獲得以前にクローン性造血が成立していた可能性が示唆された。

A. 研究目的

2005 年に骨髄増殖性疾患 (MPD) の病因として JAK2/V617F 変異が同定され、複数の施設から報告された。JAK2/V617F 変異は MPD の各病型 (PV、ET、MF) において高頻度に認められる。しかし、これまでの報告では、各 MPD 症例の末梢血顆粒球における JAK2/V617F 変異のアリル比率 (全 JAK2 アリルに占める JAK2/V617F 変異の比率) はさまざまであり、特に ET においてはその比率が 20% 以下という症例も珍しくない。これらの症例に関しては JAK2/V617F 変異細胞の増殖のみでその病態を説明することは困難である。我々は MPD 症例の一部においては JAK2/V617F 変異の獲得以前に造血細胞のクローン性増殖が起きている可能性があるのではないかと考え、検討を行なった。

B. 研究方法

MPD と診断された 8 症例 (PV から進展した MF 1 例、PV 3 例、ET 4 例) 及び正常女性 1 名よりインフォームドコンセントを得て末梢血を採取した。比重遠心法を用いて顆粒球分画を回収し、DNA を抽出した。単核球を用いメチルセルロース法による *in vitro* コロニーアッセイを行ない、個々の赤芽球系コロニーを用手的に回収し、DNA を抽出した。コロニーアッセイは MethoCult-GF-H4434-V (CSF, G-CSF, GM-CSF, Epo 添加) を用いて行なった。顆粒球における JAK2/V617F 変異解析はダイレクトシーケンス (DS) 法と amplification-refractory mutation system (ARMS) 法とによって行ない、前者のピークの高さから変異アリル比率を算出した。赤芽球系コロニーについては ARMS 法による解析を行な

い、それぞれのコロニーについて、『野生型』、『変異型+野生型』、『変異型』のいずれかと判定した。HUMARA 遺伝子の STR 多型に関してヘテロザイゴートであり、かつ JAK2 遺伝子に関して野生型と変異型の両方のコロニーを認めた 2 症例の赤芽球系コロニーについて HUMARA-MSP 法 (Uchida, Ohashi, et al., Leukemia, 14:207, 2000) を用いて X-chromosome inactivation (XCI) パターンの判定を行なった。

(倫理面への配慮)

MPD 症例を対象とした JAK2 遺伝子の変異解析については、当院のヒトゲノム遺伝子解析に関する倫理審査委員会による承認を受けた。

C. 研究結果

顆粒球と赤芽球系コロニーにおける JAK2 遺伝子の変異解析の結果を表 1 に示す。変異アリルと野生型アリルの両方を認めたコロニーはおそらく JAK2/V617F をヘテロで持つコロニーと考えられる。

2 症例 (PV-MF 及び ET-2) 及び正常コントロールの

表 1: 顆粒球と赤芽球コロニーにおける JAK2 の遺伝子解析の結果

	顆粒球の JAK2 変異		赤芽球系コロニーの JAK2 変異				変異コロニー比率	
	DS法	ARMS法	野生型	両方	変異型	解析不能		
PV-MF	90%	+	40	1	25	0	66	26/66 (39%)
PV-1	96%	+	2	18	54	2	76	72/74 (97%)
PV-2	40%	+	75	2	4	0	81	6/81 (7%)
PV-3	0%	-	70	2	0	0	72	2/72 (3%)
ET-1	88%	+	0	1	37	6	44	38/38 (100%)
ET-2	16%	+	24	40	0	8	72	40/64 (63%)
ET-3	0%	-	54	0	0	8	62	0/54 (0%)
ET-4	0%	-	36	1	0	2	39	1/37 (3%)
Control			40	0	0	0	40	0/40 (0%)

赤芽球系コロニーの XCI パターンと JAK2

表 2 : HUMARA-MSP法による XCI 解析

	タイプ	JAK2遺伝子		
		野生型	両方	変異型
Control	L	13	0	0
	S	6	0	0
PV-MF	L	0	0	0
	S	34	0	19
ET-2	L	9	29	0
	S	1	0	0

比較した結果を表 2 に示す。

D. 考察

顆粒球における JAK2 遺伝子の変異アリル比率と赤芽球系コロニーにおける JAK2 変異コロニーの比率は概ね近似していたが、そうでない症例も認められた。顆粒球で JAK2 遺伝子の変異が検出されなかった 3 例のうち、2 例(PV-3、ET-4)では少数の JAK2 変異コロニーが認められた。いずれの方法でも JAK2 の変異が検出されなかったのは 8 例中 1 例(ET-3)のみであった。

HUMARA-MSP 法による解析では、HUMARA 遺伝子の STR に関してヘテロザイゴートである女性由来の造血コロニーの XCI パターンは L タイプ又は S タイプのいずれかを示し、その比率は概ね 1:1 となることが期待される。正常コントロールでは L タイプ:S タイプは 13:6 であり、ポリクローナルな造血を示していた。それに対して、PV-MF 症例では JAK2 変異を有するコロニーも JAK2 が野生型のコロニーもすべて S タイプであった。ET-2 症例では JAK2 変異を有しないコロニーのうち 1 個のみが S タイプであり、他はすべて L タイプであった。

E. 結論

MPD の一部の症例においては JAK2/V617F 変異細胞が非常に低い頻度で認められることが明らかとなった。また、今回 HUMARA-MSP 法を用いて検討した 2 症例に関しては、造血細胞に元々 XCI の skewing が存在する可能性は否定できないものの、JAK2/V617F 変異の獲得以前にクローン性造血が成立していた可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hiraga I, Kinoshita T, Ohno T, Mori N, Ohashi H, Fukami S, Noda A, Ichikawa A, Nzo T: Promotor hypermethylation of the

の変異解析の結果を個々のコロニーごとに

DNA-repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase and p53 mutation in diffuse large B-cell lymphoma. Int J Hematol 84:248-255, 2006

2. Tabuchi T, Ohashi H, Fukami S, Susaki N, Kunishima S, Yokozawa T, Nagai H, Moritani S, Ichihara S, Saito H, Hamaguchi M: A case of myelofibrosis with myeloid metaplasia with JAK2 (V617F) mutation who developed fibrous tumors in multiple organs. Eur J Hematol 77:264-266, 2006

3. Ohno T, Hiraga I, Ohashi H, Sugisaki C, Li E, Asano H, Ito T, Nagai H, Yamashita Y, Mori N, Kinoshita T, Naoe T: Loss of O6-methylguanine-DNA methyltransferase protein expression is a favorable prognostic marker in diffuse large B-cell lymphoma. Int J Hematol 83:341-347, 2006

4. Li Y, Nagai H, Ohno T, Ohashi H, Murohara T, Saito H, Kinoshita T: Aberrant DNA demethylation in promoter region and aberrant expression of mRNA of PAX4 gene in hematologic malignancies. Leuk Res 30: 1547-1553, 2006

2. 学会発表

1. 横澤敏也、大橋春彦、深見晶子、内藤裕子、加藤千明、永井宏和、寺澤晃彦、鈴木伸明、濱口元洋: イマチニブ治療中の慢性骨髄性白血病症例における D-HPLC 法による ABL 遺伝子変異の検出 第 68 回日本血液学会・第 48 回日本臨床血液学会合同総会 (福岡 2006 年 10 月 6 日)

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 初年度報告

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 9 月から実施した。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。初年度は 55 症例が登録された。

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。

B. 研究方法

対象疾患。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。

2006 年の一次調査は郵送により実施し、2007 年から Web による on line 登録とする。この「Web による on line 登録」は、小児血液学会疾患登録事業として実施される。

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

会の審査で承認された。

2. 2005 年診断新規症例

一次調査で確認された症例数は以下の通り。現在二次調査を実施中で 45 症例の二次調査票が既に回収されている。

特発性 40、肝炎後 3、二次性 1、Fanconi 貧血 1、DB 貧血 4、SCN 3、その他 3

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総計 1337 例は 2006 年も追跡調査されているが、既に 213 例が死亡し、200 例が追跡不能となっている。今後も追跡調査される。

4. 稀少疾患の個別調査

Dyskeratosis congenita の症例調査を実施し、1988 年から 2005 年の間に 13 例の症例が診療されていることが明らかとなった。家族例は 1 例であったが、遺伝子検索をされた 7 例中 DKC1 の異常が 4 例に確認された。

Congenital Dyserythropoietic anemia の症例一次調査が実施され、5 例が報告された。

D. 考察

小児血液学会再生不良性貧血委員会が新たに開始した疫学データベース「再不貧 2005」研究の初年度報告を示した。初年度であったが順調に症

例が登録されている。

また 2007 年から小児血液学会疾患登録事業が開始され、Web による On line 登録が一次登録となる。この疾患登録事業は造形障害疾患以外の血液疾患も対象にしており、小児期の血液疾患に関する基礎疫学データとなる。本研究はその基礎疫学データの上に構築される。さらに 2007 年は登録症例の診断を中央診断することによりデータベースの質を保証すべく、中央診断システム構築を目指す。

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し、順調に初年度調査が実施された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kobayashi R, Yabe H, Hara J, Morimoto A, Tsuchida M, Mugishima H, Ohara A, Tsukimoto I, Kato K, Kigasawa H, Tabuchi K, Nakahata T, Ohga S, Kojima S. Preceding immunosuppressive therapy with antithymocyte globulin and ciclosporin increases the incidence of graft rejection in children

with aplastic anaemia who underwent allogeneic bone marrow transplantation from HLA-identical siblings. Br J Haematology. 135: 693-696, 2006

2. Mugishima H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Fujisawa K, Tsukimoto I. Hematopoietic stem cell transplantation for Diamond-Blackfan anemia: a report from the Aplastic Anemia Committee of the Japanese Society of Pediatric Hematology. Pediatr Transplant. In print 2007.

2. 学会発表

1. Ohara A, Kojima S, Manabe A, et al.: Epidemiology of childhood AA and MDS in Japan; 1990-2002. 4th Inter. Sympos. on MDS in Childhood. Freiburg, Germany 2006.4

2. Kojima S, Yagasaki H, Ohara A. et al.: Prospective multicenter trial of immunosuppressive therapy with antithymocyte globulin and cyclosporine in children with nonsevere aplastic anemia 4th Inter. Sympos. on MDS in Childhood. Freiburg, Germany 2006.4

3. Ohara A, Kojima S, Kobayashi R. et al.: 10-year-outcome of acquired aplastic anemia children treated with antithymocyte globulin, cyclosporine with or without G-CSF. 48th American Society of Hematology annual meeting. Orlando, USA 2006,12.

自己免疫性溶血性貧血患者における血漿 ST2 濃度の検討

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

研究要旨

赤血球結合免疫グロブリン(IgG)定量法は、クームス陰性自己免疫性溶血性貧血(AIHA)の診断に有用であるが、症例によっては赤血球結合 IgG 量のみでは診断に苦慮する場合もあることから、自己免疫性を示唆する複数の検査の開発が期待されている。タイプ2ヘルパーT細胞(Th2)の活性化指標として報告されている血中 ST2 濃度を73例の溶血性貧血患者について測定した。非 AIHA 群に比較して AIHA 群において有意に高値を示したことから、Th2 優位なサブグループもしくは病態が AIHA 症例中に存在することが予想された。クームス陰性 AIHA の診断に、血中 ST2 および赤血球結合 IgG 量ならび IgG サブクラス比は有用な情報になりえることが期待される。

A. 研究目的

自己免疫性溶血性貧血(AIHA)は、自己の赤血球に反応する自己抗体によって、赤血球破壊(溶血)が亢進することにより生じる貧血の総称である。抗赤血球自己抗体の存在を明らかにすることは、AIHA の診断と治療に関して重要な情報をもたらすことから、患者赤血球を試料とする様々な自己抗体検出法が考案されている。特に、赤血球結合免疫グロブリン(IgG)の検出法である直接クームス試験は操作の簡便さから広く普及している。

AIHA が疑われる症例の中に、直接クームス試験が陰性を呈する例のあることは以前から知られていた。近年、クームス試験の検出感度以下の結合 IgG 量を定量する方法が確立され、これらの症例の多くがクームス陰性 AIHA と診断されるようになった。すなわち、成人においては、当教室の成績から、赤血球結合 IgG 量の正常値は赤血球一個あたり平均 33 分子であり、200～250 分子以上でクームス試験が陽性となり、クームス陰性 AIHA 患者では150 分子前後であることが明らかになっている。しかしながら、症例によっては赤血球結合 IgG 量のみでは AIHA の診断

に苦慮する場合もあることから、AIHA を示唆する検査の開発が期待されている。昨年の報告書において、赤血球結合 IgG サブクラスの AIHA 診断における有効性を報告した。

タイプ2ヘルパーT(Th2)細胞は AIHA における自己抗体産生への関与が推定されている。今回、気管支喘息や SLE において、Th2 細胞の活性化の指標として報告されている血中 ST2濃度を AIHA 症例と非 AIHA 症例で比較・検討し、AIHA 診断における有用性について検討を行った。

B. 研究方法

平成15年4月から平成16年3月までの間に、当センターに AIHA 疑いとして精査依頼のあった73例(38施設)の溶血性貧血患者を対象とした。血漿 50 μ l 中の ST2 濃度を ELISA 法(MBL,名古屋)により測定した。また、主治医に対して臨床診断のアンケートを行った。AIHA 診断結果と当センターで測定した赤血球結合 IgG 量ならびに患者血漿中の ST2 濃度を比較・検討し統計学的解析を行った。

(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

アンケート回答 61 例中 34 例が AIHA と診断され、クームス陽性 AIHA 14 例、クームス陰性 AIHA 20 例、非 AIHA 27 例であった。当教室で精査を行ったクームス陰性溶血性貧血の約 1/3 にクームス陰性 AIHA が認められた。血漿中 ST2 濃度を比較すると AIHA 群において有意に高値を示した。

D. 考察

AIHA における自己抗体産生機序として、Th2 細胞からの IL-4、IL-5、IL-10 産生の亢進による自己反応性 B 細胞の増殖・分化誘導、また、IL-12 の産生低下による B 細胞増殖制御の破綻と Th1 抑制・IFN γ 産生低下による Th2 抑制解除が考えられている。また、気管支喘息や SLE などにおいても Th2 の活性化が知られており、その指標として血中 ST2 濃度が報告されている。

ST2 遺伝子は BALB/c-3T3 マウス線維芽細胞の増殖開始過程で、G0 期には全く発現していないにもかかわらず、S 期に入る直前で発現が誘導される遺伝子として、1989 年に Tominaga らによってクローニングされた。その後、膜貫通受容体型の ST2L 遺伝子もクローニングされ、ST2/ST2L 遺伝子が特に Th2 に優位に発現することが明らかになった。特に、気管支喘息においては病状悪化の程度に応じた血中 ST2 上昇が認められており、Th2 活性化の抑制に働いていることが推測されている。

AIHA における自己抗体産生機序として、Th2 細胞

の関与が推定されているが、その実態は未だ明らかになっていない。Th2 活性化の指標として知られている ST2 の血漿中濃度が AIHA 群と非 AIHA 群間に差が認められたことから、Th2 優位なサブグループもしくは病態が AIHA 症例中に存在することが予想された。また、クームス陰性 AIHA の診断に際し、血中 ST2 および赤血球結合 IgG 量ならび IgG サブクラス比は有用な情報になりえることが予想された。

E. 結論

Th2 活性化の指標として知られている ST2 の血漿中濃度が AIHA 群と非 AIHA 群間に差が認められたことから、Th2 優位なサブグループもしくは病態が AIHA 症例中に存在することが予想された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Suganuma H, Kumada M, Omi T, Gotoh T, Lkhagvasuren M, Okuda H, Kamesaki T, Kajii E, Iwamoto S. Aly/ REF, a factor for mRNA transport, activates RH gene promoter function. FEBS J 272:2696-2704, 2006.

2. 学会発表

亀崎豊実, 小山田隆, 富永眞一, 小峰光博, 梶井英治. 自己免疫性溶血性貧血患者における血漿 ST2 濃度の検討. 第 67 回日本血液学会総会・第 47 回日本臨床血液学会回総会, 2005.09., 横浜. (臨床血液 16:871, 2005)