

MDSにおける fractalkine/CX3CR1 を介した新しい免疫学的病態機序の解析

研究協力者 金丸 昭久 (近畿大学医学部 血液内科 教授)

田中みやこ、森田泰慶、前田裕弘 (近畿大学医学部 血液内科)

研究要旨

骨髄異形成症候群(MDS)の無効造血には異常 T 細胞クローンによる免疫学的機序の関与が示唆されているが、その詳細は不明である。これまで、我々は MDS 患者由来 perforin/granzyme 陽性 T 細胞株が骨髄 CD34 陽性細胞に対して fractalkine/CX3CR1 を介する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。

A. 研究目的

MDS 患者骨髄での fractalkine/CX3CR1 を介する細胞障害機構の関連性を解析する。

B. 研究方法

(患者背景) 新規発症の MDS 症例の中で、IPSS で Low および Int-1 を低リスク、High および MDS/AML を高リスクと定義する。低リスク MDS は、2 系統以上の血球減少で、骨髄は正または過形成の骨髄のみ用いる。(方法) 同意を得た MDS 患者および健常人より骨髄を採取し① CD34 陽性細胞を純化し、Annexin V 法でアポトーシスを定量する。同時に FACS で fractalkine 発現を測定する。②CD4 および CD8 陽性細胞を純化し、細胞内 perforin/granzyme B 発現および細胞表面 CX3CR1 発現を FACS で測定する。③同細胞より CD56 陽性細胞をマグネットビーズで除去し、Cd107a/b 発現を FACS で測定する。④同細胞を immobilized-fractalkine で刺激し、granzyme B 産生細胞を ERISPOT で測定する。

(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する。

C. 研究結果

①低リスク MDS 患者では、骨髄 CD34 陽性細胞における fractalkine 発現は、健常人や高リスク MDS 患者と比較して有意に高値を示し、アポトーシスとの間には正の相関関係を認めた。② MDS 患者では、CD4 陽性細胞内の perforin/granzyme B 発現は、健常人と比較して高値を示したが、アポトーシスとの間に相関関係は認めなかった。また、細胞表面 CX3CR1 発現については、健常人との間に有意差を認めなかった。③MDS 患者の CD4 および CD8 陽性細胞の脱顆粒は、健常人と比較して有意に増加していた。④低リスク MDS 患者では、effector T 細胞における fractalkine 刺激反応性 (granzyme B 放出能) が健常人や高リスク MDS 患者と比較して有意に増加していた。

D. 考察

E. 研究発表

3. 論文発表

4. 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 : 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 68 回日本血液学会・第 48 回日
本臨床血液学会

2. 金丸昭久: リスク別からみた MDS 患者の治
療の現状 一造血障害におけるケモカインシス
テムの関与一 第 86 回近畿血液学地方会

研究協力者 唐澤 正光 (群馬大学附属病院 輸血部 助教授)

研究要旨

顆粒リンパ球増多症 (lymphoproliferative disease of granular lymphocytes: LDGL) は最終的に分化した effector 細胞と考えられる顆粒リンパ球 (LGL) の増殖による疾患である。近年、発作性夜間血色素尿症 (PNH) と T-LDGL の合併例が数例報告され、さらに PNH 患者ではサブクリニカルな LDGL を高頻度に伴うことが示唆されている。我々は溶血を併発した 2 症例はいずれも NK-LDGL で、増殖 NK 細胞は臨床症状を随伴し易いとされる CD16+CD56-タイプであった。溶血を合併した 2 例を含め、LDGL における GPI アンカー膜蛋白の発現を検討した。対象はリンパ球ゲート内の CD16 または CD56 陽性細胞比率が 70%以上の LDGL 患者 11 例 (NK 型 4 例, T 型 7 例)。これらの症例において末梢血血液細胞の GPI アンカー膜蛋白 (CD48, CD55, CD59) の発現を解析した。LDGL 症例の顆粒球は CD55, CD59 がほぼ 100%陽性で PNH の合併は否定的であった。これらの所見は溶血合併例を含め、PNH の発症とは関連がなかった。

A. 研究目的

顆粒リンパ球増多症 (LDGL) は顆粒リンパ球の慢性増殖を特徴とする稀な疾患である。臨床的にはしばしば血球減少を併発するが、その機序には不明な点が多い。近年、発作性夜間血色素尿症 (PNH) 患者の多くで顆粒リンパ球の増加が指摘され、顆粒リンパ球の正常造血に対する免疫学的攻撃が PNH クローンの拡大に有利に働いている機序をうかがわせる。本研究では LDGL 患者の末梢血 (顆粒球・赤血球・顆粒リンパ球) 細胞表面 CD55, CD59 発現を解析し、PNH クローンの有無につき検討した。

B. 研究方法

対象は T 細胞性 (T-LDGL) 13 例、NK 細胞性 (NK-LDGL) 7 例の計 20 症例。顆粒球については末梢血から白血球浮遊液を作成し、赤血球については 5%赤血球浮遊液を作成した。FITC-抗 CD55 抗体と PE-抗 CD59 抗体の 2 カラーでフローサイ

トメーターを用いて解析した。一方、顆粒リンパ球については、PerCP-抗 CD3 と FITC-抗 CD16 (または CD56) でゲート設定し、PE-抗 CD55, CD59 の発現を 3 カラー解析した。

(倫理面への配慮)

患者本人または代理人に十分な説明を行い、文書による同意を取得した。

C. 研究結果

(1) LDGL の臨床像

T-LDGL 13 例中 6 例に貧血を認め、1 例が溶血性貧血であった。9 例に好中球減少、4 例に血小板減少を認めた。NK-LDGL では 7 例中 2 例に溶血を伴う汎血球減少を認めた。

(2) LDGL 患者における PNH 型血球の検出

正常対照 40 例における顆粒球および赤血球分画の CD55/CD59 陰性血球 (PNH 型血球) の割合はそれぞれ 0-0.05%、0-0.08%であった。この平均値 + 2x 標準偏差 である 0.04% および 0.07% を cut

off 値として、これ以上を有意な増加と判定した。顆粒球分画では、PNH および再生不良性貧血の全例で PNH 型血球の有意な増加 (0.16-62.45%) を認めたが、LDGL における PNH 型血球の増加は 20 例中 1 例のみであった。赤血球分画においても PNH および再生不良性貧血では PNH 型血球が有意に増加していたのに対して (0.19-77.12%)、LDGL では全例で有意な増加を認めなかった。

D. 考察

LDGL は様々な程度の血球減少や溶血を呈したが、PNH 型細胞は検出できず、これらの臨床症状と PNH とは関連が無いと思われた。

E. 結論

今回の検討からは T 細胞性 LDGL および NK 細胞性 LDGL 症例ともに PNH を合併することは稀である

ことが示唆される。

F. 研究発表

5. 論文発表

1. Isoda A, Tsukamoto N, Mitsui T, Yamane A, Hatsumi N, Matsushima T, Murakami H, Nojima Y, Karasawa M: Expression of CD55 and CD59 on peripheral blood cells in patients with lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. Clin Lab Haematol. 29:52-57, 2007
学会発表

1. 磯田 淳, 三井健揮, 山根有人, 初見菜穂子, 入沢寛之, 斉藤貴之, 半田 寛, 松島孝文, 塚本憲史, 村上博和, 野島美久, 唐沢正光: 顆粒リンパ球増多症における細胞表面 GPI アンカー型蛋白質の発現. 第 65 回日本血液学会・第 45 回日本臨床血液学会合同総会

先天性 GPI 欠損症の発見とその解析

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

イギリスのグループとの共同研究で主症状として門脈血栓症と欠神発作を呈し、劣性遺伝形式をもつ GPI アンカー欠損症の 2 家系が見つかった。その解析により、GPI 合成に必須な *PIG-M* 遺伝子のプロモーター部位にある Sp1 結合サイトの点変異により、遺伝子の発現が激減していることがわかった。欠損は繊維芽細胞でも見られたが、欠損の程度は細胞種ごとに異なり、特に赤血球では欠損の程度は軽く溶血症状は見られなかった。

A. 研究目的

新たに発見された先天性 GPI 欠損症は PNH とは全く異なる疾患であり、その発症機序を明らかにする。

B. 研究方法

EB ウィルスでトランスフォームして患者由来の B cell line を作製し、まずその脂質解析により合成の障害ステップを同定し、その結果をもとに責任遺伝子を同定した。

(倫理面への配慮)

本疾患は、英国の Imperial College London, Hammersmith Hospital との共同研究である。

C. 研究結果

遺伝性 GPI 欠損症においては *PIG-M* 遺伝子のプロモーター部位の Sp1 結合サイト (ATG から -270 C>G) の点変異により、遺伝子の発現が激減していた。欠損は繊維芽細胞でも見られたが、細胞種ごとに発現の程度は異なっていた。また HDAC inhibitor である Na butyrate により、in vitro において GPI アンカー型蛋白の発現が回復した。その結果をもとに、イギリスのグループは患者に

内服投与を行った。in vivo においても血球における GPI の発現が回復し、痙攣発作の治療にも非常に有効であった。

D. 考察

本疾患の解析により、本来ハウスキーピングジーンのように、定常的に発現していると考えられてきた *PIG-M* 遺伝子もその発現に様々な調節機構が働いていることがわかった。

E. 結論

世界で初めて遺伝性 GPI 欠損症が発見され、その責任遺伝子は *PIG-M* であった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Antonio Almeida, Yoshiko Murakami et al: Hypomorphic promoter mutation in the mannosyltransferase-encoding *PIG-M* gene causes inherited glycosylphosphatidylinositol deficiency. Nat. Med. 12: 846-851, 2006

2. 学会発表

- | | |
|--|--|
| <p>1. Yoshiko Murakami et al: A point mutation in an Spl binding motif in the promoter of the mannosyltransferase-encoding <i>PIG-M</i> gene causes inherited glycosylphosphatidylinositol deficiency. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology in Kyoto 2006</p> <p>2. 木下タロウ 他: 遺伝性 GPI アンカー欠損症 第 43 回 補体シンポジウム 2006 年</p> <p>3. 村上良子 他: 遺伝性 GPI アンカー欠損症の 2 家系 第 48 回臨床血液学会 2006 年</p> <p>4. Yoshiko Murakami et al: A point mutation</p> | <p>in an Spl binding motif in the promoter of the mannosyltransferase-encoding <i>PIG-M</i> gene causes inherited glycosylphosphatidylinositol deficiency. XXIth International Complement Workshop in Beijing.</p> <p>H. 知的財産権の出願・登録状況
なし</p> |
|--|--|

MDS/AML の多段階発症機構におけるマスターイベントの解析

研究協力者 木村 昭郎 (広島大学原爆放射線医科学研究所血液内科・教授)
原田 浩徳 (広島大学病院血液内科・助手)
原田 結花 (広島大学原爆放射線医科学研究所国際放射線情報センター・助手)

研究要旨

MDS/AML (RAEB、RAEBt、MDS 由来 AML) の約 20%に AML1 点変異、約 5%に C/EBP α の点変異が認められた。これらの点変異を有する MDS/AML は、正常核型や単純核型異常が多かった。C/EBP α の点変異を有する MDS/AML は、N 末領域または C 末領域に片アレルのみに変異を認め、正常アレルが残存していた。一方、de novo AML は両アレルに変異が見られた。片アレルのみの C/EBP α 点変異は、MDS/AML のマスターイベントの一つ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。われわれはこれまでに RAEB、RAEBt、MDS 由来の AML (これらを MDS/AML と記載) の約 20%に転写因子 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～消失を来たすことを報告した。さらに AML1 点変異を有する MDS/AML は、-7/7q 染色体異常が多く、RTK-RAS 経路 (FLT3、N-RAS、PTPN11、NF1) に高頻度に変異が認められ、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可能性を明らかにした。しかし、AML1 点変異を持たない MDS/AML の発症メカニズムは未だ不明である。今回新たなマスターイベントを明らかにするために C/EBP α 遺伝子異常を検討した。

B. 研究方法

MDS/AML 患者 248 症例の AML1 および

C/EBP α 遺伝子点変異を PCR-SSCP 法で解析し、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あり、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した。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した。

C. 研究結果

MDS/AML のうち、AML1 点変異は 48/248 例 (19.4%)、C/EBP α 点変異は 8/175 例(4.8%)に認められた。これらの変異を有する症例のうち複雑核型を示したのは 5/58 例(8.9%)で、両変異を持たない群 66/192 例(34.4%)に比して有意に低頻度であった。C/EBP α の点変異を認めた 8 例は、いずれも N 末または C 末領域の変異を 1 つだけ有しており、正常アレルが残存していた。一方 AML(M2)患者 4 例では、既報と同様に N 末変異

と C 末変異の 2 つがそれぞれ別のアレルに認められた。

D. 考察

C/EBP α は骨髄球系の発生・分化を制御する転写因子で、2つの転写開始部位により正常転写活性を有する p42 と、野生型 C/EBP α に対して拮抗的に作用する抑制型の p30 がある。de novo AML の場合、N 末領域と C 末領域の変異を別々のアレルに有することにより、p30 と C 末領域インフレーム変異による機能喪失蛋白により正常 C/EBP α 活性は消失し、分化抑制・増殖促進すると考えられる。一方 MDS/AML では片アレルのみに N 末または C 末領域の変異が生じているが、片アレルは正常で野生型 C/EBP α が存在するため、ある程度は転写活性化能が残存していると考えられる。このことは C/EBP α 転写活性抑制の程度が病型すなわち芽球比率、芽球増殖能に反映することを示唆している。C/EBP α 点変異による機能喪失によって活性型 C/EBP α 量が減少し、幹細胞の分化抑制・細胞周期亢進が生じ、MDS/AML の発症へ至ると推測される。

E. 結論

片アレルの C/EBP α 変異が、MDS/AML 発症のマスターイベントの 1 つであることが明らかになった。

F. 研究発表

6. 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* 6, 365-384, 2006.

2. 原田浩徳, 原田結花: 特集 [骨髄異形成症候群 (MDS): 病態の解明と最新の治療] MDS の発症と進展の分子機構. *血液・腫瘍科* 53(2), 136-143, 2006.

3. 原田結花, 原田浩徳, 木村昭郎: [話題] AML1/RUNX1 点変異をもつ MDS/AML の多段階発症機構. *血液・腫瘍科* 53(1), 83-90, 2006.

4. 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* 20(4), 635-644, 2006.

7. 学会発表

① 丁 暉, 原田浩徳, 原田結花, 木村昭郎: 二次性 MDS/AML における AML1/RUNX1 キメラ遺伝子発生プロセスの解明. 第 68 回日本血液学会総会・第 48 回日本臨床血液学会総会, 福岡, 2006. (*臨床血液* 47(9): 1155, 2006.)

② 原田浩徳, 原田結花, 丁 暉, 新美寛正, 木村昭郎: AML1 点変異を有する骨髄異形成症候群 (MDS) の多段階発症メカニズムの解明. 第 47 回原子爆弾後障害研究会, 長崎, 2006. (*抄録集* 43, 2006)

AML1 機能不全による造血幹細胞動態の変化

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

AML1 は白血病のほか家族性血小板減少症や骨髄異形成症候群(MDS)において変異が見られ、その病態に関与すると考えられている。AML1 を成体において欠失するマウスでは MDS 様の造血異常が再現されており、造血幹細胞でのその役割が注目される。今回はマウスモデルを用い、AML1 機能の変化による造血幹細胞動態の変化を解析した。結果、AML1 は静止期にある造血幹細胞活性を負に制御することが明らかとなった。このことより、造血幹細胞の増幅が、AML1 の機能不全型変異による MDS や白血病発症の機序の一つである可能性が示唆される。

A. 研究目的

転写因子 AML1 (Runx1) は急性骨髄性白血病における t(8;21)転座において発見された遺伝子であり、そのノックアウトマウスでは成体型造血発生を欠如する。家族性血小板減少症や MDS において AML1 の遺伝子変異が認められることから、AML1 は造血発生や白血病発症に重要な遺伝子と考えられている。コンディショナルノックアウトマウスの解析により、われわれは AML1 が血小板造血およびリンパ球の分化・成熟に必須であることを報告した。AML1 を欠失する巨核球は多倍体化に障害を認め、MDS に認められる小型巨核球の形態と酷似することから、このマウスは MDS を再現するモデルとなると考えた。一方、本マウスの骨髄細胞の造血コロニー形成能や未分化造血細胞数は増加しており、造血幹細胞レベルでの AML1 の役割が注目される。そこでわれわれは、AML1 機能の低下または亢進における造血幹細胞動態の変化を解析した。

B. 研究方法

AML1 コンディショナルノックアウトマウス

を使用し、静止期にある骨髄造血幹細胞数、限界希釈法を用いた骨髄移植によって示される長期造血再構築可能な造血幹細胞数を測定した。AML1 機能の亢進による造血幹細胞活性の変化は、レトロウイルスベクターによる過剰発現後の骨髄移植により評価した。各造血前駆細胞分画についても AML1 の発現量に対するコロニー形成能を比較した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、動物愛護への配慮の上、所属施設である東京大学医学系研究科の動物実験委員会による承認のもとに行った。

C. 研究結果

AML1 欠失骨髄においては side population (SP) 細胞、未分化造血細胞中の G0 分画の増加が認められ、静止期骨髄造血幹細胞が増加していた。限界希釈法による定量により、AML1 欠失骨髄では長期間の造血を支持する細胞が対照より増加していることが明らかとなった。また、AML1 を過剰発現する骨髄細胞は造血再構築能

が低下しており、AML1 が造血幹細胞数を負に制御していることが明らかとなった。AML1 を欠失する骨髓造血前駆細胞は増加していたが、同数の細胞あたりの造血コロニー形成能には著明な変化は認められず、これらの細胞は質的には正常対照と大差がないことが明らかになった。対照的に、造血前駆細胞に AML1 を過剰発現させたところこれらの細胞のコロニー形成能は低下し、AML1 の過剰発現は造血前駆細胞の増殖を負に制御することが明らかとなった。

D. 考察

AML1 の機能不全は造血幹細胞の疾患である MDS の発症に関与するが、今回の研究により、AML1 の機能欠失による造血幹細胞レベルでの障害は、その数の異常な増幅が中心であることが明らかとなった。MDS に付加的な遺伝子変異により白血病が発症するとされるが、白血病幹細胞においても AML1 の機能不全による増幅が予想され、今後の解析の課題である。

E. 結論

AML1 は造血幹細胞活性を負に制御していることが示された。AML1 の機能不全型変異による造血幹細胞活性の増幅が、ヒト MDS の病態に関与する機序の一つであることが示唆された

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakagawa M, Ichikawa M, Kumano K, Goyama

S, Kawazu M, Asai T, Ogawa S, Kurokawa M, and Chiba S. AML1/Runx1 rescues Notch1-null mutation-induced deficiency of para-aortic splanchnopleural hematopoiesis. *Blood* 108: 3329-34, 2006.

2. Kurokawa M. AML1/Runx1 as a versatile regulator of hematopoiesis: regulation of its function and a role in adult hematopoiesis. *International Journal of Hematology* 84:136-42, 2006.

3. Kako S, Kanda Y, Sato T, Goyama S, Noda N, Shoda E, Oshima K, Inoue M, Izutsu K, Watanabe T, Motokura T, Chiba S, Fukayama M, and Kurokawa M*. Early relapse of JAK2 V617F-positive chronic neutrophilic leukemia with central nervous system infiltration after unrelated bone marrow transplantation. *American Journal of Hematology*, in press. (*corresponding author)

4. Nitta E, Izutsu K, Sato T, Ohta Y, Takeuchi K, Kamijo A, Oshima K, Kanda Y, Chiba S, Motokura T, and Kurokawa M*. A high incidence of late-onset neutropenia following rituximab-containing chemotherapy as a primary treatment for CD20-positive B-cell lymphoma: a single institution study. *Annals of Oncology*, in press. (*corresponding author)

研究協力者 小島 勢二 (名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 教授)

研究要旨

小児再生不良性貧血 (再不貧) 患者 96 人と 76 人の健常人コントロールについてテロメラーゼ複合体関連遺伝子である telomerase RNA component (TERC) と telomerase reverse transcriptase (TERT) 遺伝子の変異の有無について検討した。TERC 遺伝子について変異はみられなかったが、2 人の患児において TERT T726M と G682D の新規遺伝子変異が発見された。2 人とも dyskeratosis congenita (DKC) を思わせる臨床症状はみられていない。

A. 研究目的

DKC は網状色素沈着、爪の萎縮、舌などの粘膜白斑症を伴う骨髄不全症である。最近、特発性と考えられていた再不貧患者のなかに、特徴的身体所見を伴わずに緩徐に発症する DKC の存在が明らかになった。今回、日本人小児再不貧患者にも同様の症例が存在するかを検討した。

B. 研究方法

日本人後天性再不貧小児 96 人を対象とした。年齢の中央値は 11 歳 (範囲 0-16 歳)、男女比は 54/42 で、病型は肝炎後 7 人、水痘後 1 人で他は特発性であった。末梢血単核球から DNA を抽出、TERC, TERT 各エクソン領域を PCR 法で増幅後、direct sequence 法でゲノム配列を決定した。末梢リンパ球のテロメア長については、Telomere PNA キットを用いた flow-FISH 法で測定した。

C. 研究結果

遺伝子多型と見られる変異 (3'+63G>A) が 59 例 (61.5%) に見られたが、TERC 遺伝子については変異は検出されなかった。一方 TERT につ

いては、2 例にこれまで報告のない新規遺伝子変異 (T726M, G682D) が同定された (図 1)。前者は最重症の 9 歳女児で免疫抑制療法に反応なく、非血縁ドナーから同種骨髄移植するも生着せず、その後 HLA2 座不一致の母親から再移植し、造血能の回復が得られて生存中である。患児の父親にも無症状ではあるが同じ変異が確認された。患児のリンパ球テロメア長は、同年齢の健常人コントロールと比較して著明に短縮していたが、父親についてはテロメア長の短縮はみられなかった (図 2)。後者は軽症の 10 歳男児で、8 年間無治療経過観察中である。

D. 考察

日本人小児においても、テロメア関連遺伝子の関与する再不貧が少数であるが存在することが判明した。遺伝子変異がみられる患者においては、免疫抑制療法の効果は期待できず、治療開始前に変異をもつことが判明するのが望ましい。

E. 結論

従来特発性と考えられてきたなかに造血維持に関与する遺伝子異常をもつ患者群が存在する可

能性があり、さらなる検討が必要である。

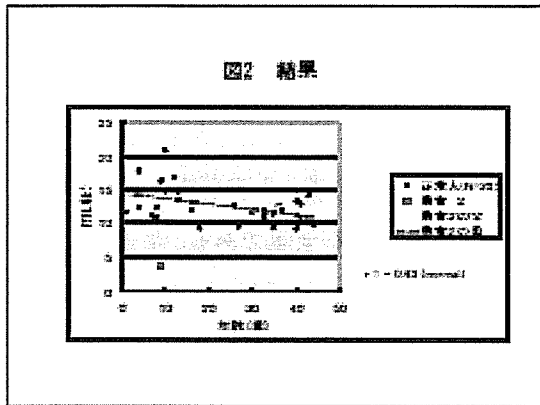
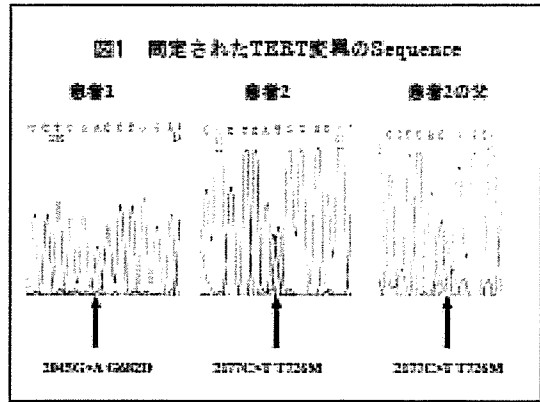
F. 研究発表

1. 論文発表

1. Liang J, Yagasaki H, Kamachi Y, Hama A, Matsumoto K, Kato K, Kudo K, Kojima S: Mutations in telomerase catalytic protein in Japanese children with aplastic anemia. Haematologica 91: 656-658, 2006

2. 学会発表

1. 梁娟、谷ヶ崎博、工藤寿子、小島勢二。日本人小児再生不良性貧血における TERC および TERT 遺伝子変異の検討 第67回日本血液学会・第47回日本臨床血液学会 2005年9月17-19日、横浜



造血幹細胞における HIF-1 α の活性化機構の解明

研究協力者 小松 則夫 (山梨大学医学部附属病院血液内科教授)

研究要旨

HIF-1 (Hypoxia inducible factor-1) は α と β のサブユニットより構成される転写因子であり、HIF-1 α 蛋白が低酸素状態において安定化されることにより低酸素状態への適応に必要な様々な遺伝子の発現を調節している。我々はこれまでに、造血幹細胞において、トロンボポエチン (TPO) が正常酸素分圧下において、HIF-1 α 蛋白を安定化させることを見いだした (Blood, 2005)。本研究では、この分子生物学的なメカニズムの解明を目的として解析を進めた。その結果、TPO による HIF-1 α の安定化には、糖代謝の活性化とミトコンドリアからの活性酸素種 (ROS) の産生が重要であることを明らかにした。

A. 研究目的

TPO は造血幹細胞の増幅や自己複製に関与するサイトカインであるが、そのメカニズムについては明らかになっていない。ひとつの可能性として転写因子 HIF-1 の活性化とそれに伴う血管内皮細胞増殖因子 VEGF の産生誘導が想定されている。そこで、TPO がどのようにして HIF-1 を活性化するのかについて検討を進めた。

B. 研究方法

ヒト白血病細胞株である UT-7/TPO およびマウス骨髄より磁気ビーズを用いて純化した未熟な骨髄細胞を用いた。HIF-1 α の発現レベルについては、ウェスタンブロットで解析した。活性酸素除去剤として Catalase を、また、ミトコンドリア電子伝達系の阻害剤としては Rotenone および Oligomycin を用いた。

(倫理面への配慮)

動物実験を行うにあたっては、山梨大学動物実験委員会の定める指針に従った。

C. 研究結果

はじめに、(1) TPO により ROS 発現が誘導されることを確認した。(2) 活性酸素除去剤及びミトコンドリア電子伝達系阻害剤により TPO による HIF-1 α 蛋白の安定化が阻害されること、(3) ミトコンドリア DNA 除去細胞では TPO による HIF-1 α 蛋白の安定化がみられないこと、(4) さらにミトコンドリアからの ROS 産生誘導にはグルコーストランスポーターの活性化が必要であることを明らかにした。

D. 考察

本研究では、TPO は ROS の産生を介して HIF-1 α タンパクを安定化することを明らかにした。一般的に ROS は細胞増殖を抑制的すると考えられている。これに対し、我々の結果から、ROS は HIF-1 を介して細胞の増殖や生存を促進している可能性がある。

E. 結論

TPO はミトコンドリアからの ROS 産生を誘導することにより、HIF-1 α を安定化することが明らかになった。

F.研究発表

1. 論文発表

1. Nagai R, Matsuura E, Hoshika Y, Nakata E, Nagura H, Watanabe A, Komatsu N, Okada Y, Doi T. RUNX1 suppression induces megakaryocytic differentiation of UT-7/GM cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 345: 78-84.

2. Okada Y, Nagai R, Matsuura E, Hoshika Y, Nakata E, Nagura H, Watanabe A, Komatsu N, Doi T. Suppression of RUNX1 by siRNA in megakaryocytic UT-7/GM cells. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*. 2006; (50): 261-2.

2. 学会発表

1. Keita Kirito, Toru Mitsumori, Takahiro Nagashima, Masae Kunitama, KeiNakajima, Kozue Yoshida, Yongzhen Hu, Mitsuhiro Yanagi, Norio Komatsu. A Novel Inherited Single-Nucleotide Mutation in 5'-UTR in the Transcription Factor RUNX1 in Familial Platelet Disorder with Propensity To Develop Myeloid Malignancies. 48th Annual ASH Annual Meeting, Orlando, Florida, USA. December 9-12, 2006. (Abstract: Blood 108(11): 1917, 2006)

2. Ryo Kurita, Tomoko Yokoo, Erika Sasaki, Yan Dong, Youko Suehiro, yoshikuni Tanioka, Yasushi Soda, Norio Komatsu, Kenzaburo

Tani. Production of Megakaryocytes and Platelets from Common Marmoset (Callithrix jacchus) ES Cells by Constitutive expression of tall/scl Gene. 48th Annual ASH Meeting, Orlando, Florida, USA. December 9-12, 2006. (Abstract: Blood 108(11): 956, 2006)

3. Nami Nogawa, Nobuyoshi Kosaka, Youichi Aizawa, Hiroshi Miyazaki, Norio Komatsu, Takashi Kato. Structure of Erythropoietin in African Clawed Frogs, *Xenopus laevis*, and Its Role in the Liver Erythropoiesis. 48th Annual ASH Meeting, Orlando, Florida, USA, December 9-12, 2006. (Abstract: Blood 108(11): 1148, 2006)

4. Yoshida K, Kirito K, Kaushansky K, Komatsu N. Thrombopoietin (TPO) Regulates HIF-1{alpha} Level through Generation of Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS). ASH Annual Meeting Abstracts, Atlanta, Georgia USA. December 10-13, 2005 (Abstract: Blood 106(11):3145, 2005)

5. 吉田こず恵, 桐戸敬太, 胡永珍, 中寫圭, 三森徹, 永嶋貴博, 國玉眞江, 小澤敬也, 小松則夫。
トロンボポエチンによるHIF-1 α の安定化にはミトコンドリア由来活性酸素が関与する。第68回日本血液学会総会。2006年、福岡

研究協力者 谷本光音（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻腫瘍制御学教授）

研究要旨

高齢または合併症のために骨髄破壊的移植前治療を用いる同種造血幹細胞移植の適応とならない骨髄異形成症候群（MDS）患者に対する reduced intensity stem cell transplant (RIST) の治療成績を検討した。研究班と岡山大学において、7例中3例、8例中3例が生存を続け、高齢や合併症のために骨髄破壊的移植前治療を用いた同種造血幹細胞移植の適応とならない MDS 患者においても治療成績を向上できる可能性があることが示唆された。

A. 研究目的

特発性造血障害に関する調査研究班における共同研究及び岡山大学病院で行った高齢者または臓器障害を有する MDS に対する RIST の成績を解析し、安全性と有効性を検討する。

B. 研究方法

原則として、HLA 一致同胞からの移植では、移植前治療として fludarabine (25 mg/m²/day x 5 days) と cyclophosphamid (30 mg/kg/day x 2 days) (Flu/Cy)、GVHD 予防として cyclosporine A と methotrexate (CyA/MTX) を用いた。非血縁骨髄ドナーからの移植では fludarabine (30 mg/m²/day x 6 days) + busulfan (4 mg/kg/day x 2 days) (Flu/Bu)、CyA/MTX を用いた。

(倫理面への配慮) 共同研究では参加施設の倫理委員会の承認を得た。また、治療に関しては個々の患者の同意を得た。

C. 研究結果

班研究では、2001年から2003年の間に7名が登録され、6例に移植が行われた。3例は原病の悪化のために死亡し、3例は寛解を維持して生

存している（観察期間は1316、1676、1816日）。

岡山大学では8名に9回のRISTを行った。2例が原病の悪化により、2例が再発により、1例が閉塞性細気管支炎（BO）により死亡した。再発（移植後348日）後再寛解中の1例を含む3例が寛解・生存中である（移植後586日、708日、856日）。

D. 考察

全15例の死亡原因は、原病の悪化が5例、再発が2例、BOが1例で、高齢者または臓器障害を有する症例にも安全に行うことができると考えられた。

E. 結論

高齢者または臓器障害を有する MDS に対する RIST は、安全に行え、芽球がコントロールされている MDS の予後の改善を期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujii N, Ikeda K, Koyama M, Aoyama K, Masunari T, Kondo E, Matsuzaki T, Mizobuchi

S, Hiraki A, Teshima T, Shinagawa K, Ishimaru F, Tanimoto M: Calcineurin inhibitor-induced irreversible neuropathic pain after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol* 83:459-61, 2006

2. Fujii N, Hiraki A, Aoe K, Murakami T, Ikeda K, Masuda K, Matsuo K, Shinagawa K, Ishimaru F, Sugi K, Darzynkiewicz Z, Tanimoto M: Serum cytokine concentrations and acute graft-versus-host disease after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: concurrent measurement of ten cytokines and their respective ratios using cytometric bead array. *Int J Mol Med* 17:881-5, 2006

3. Ito Y, Kondo E, Demachi-Okamura A, Akatsuka Y, Tsujimura K, Tanimoto M, Morishima Y, Takahashi T, Kuzushima K: Three immunoproteasome-associated subunits cooperatively generate a cytotoxic T-lymphocyte epitope of Epstein-Barr virus LMP2A by overcoming specific structures resistant to epitope liberation. *J Virol* 80:883-90, 2006

2. 学会発表

1. 難波寛子、片山義雄、品川克至、池田和真、谷本光音：ケモカイン Fractalkine/CX3CL1 お

よび受容体 CX3CR1 陽性単球の慢性 GVHD の病態への関与、第 28 回日本造血細胞移植学会総会：ワークショップ 7；GVHD/GVL 1；マウスモデル・サイトカイン・多型性・HLA；2006.2.24-25, 東京

2. 久保西四郎、片山義雄、菊池智子、山口信也、玉村啓和、藤井信孝、渡邊武、Fernando Arenzana-Seisdedos、池田和真、谷本光音：硫酸化コロミン酸による造血前駆細胞の末梢血の急速な動員、第 68 回日本血液学会・第 48 日本臨床血液学会合同総会；2006.10.6-8、福岡

3. Kubonishi S, Shinagawa K, Tabuchi T, Sugiyama H, Nishimori H, Matsuoka K, Fujii N, Maeda Y, Ishimaru F, Ikeda K, Tanimoto M: Reduced intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for advanced low grade lymphoma、11th Congress of the Asia Pacific Bone Marrow Transplantation；2006.10.28, Nagoya

4. Kozuka T, Ishimaru F, Matsuo K, Nakashima H, Fujii N, Matsuoka K, Kondo E, Katayama Y, Maeda Y, Shinagawa K, Ikeda K, Tanimoto M. Early kinetics of engraftment following reduced-intensity stem cell transplantation: fludarabine and cyclophosphamide versus fludarabine and busulfan. 48th Annual Meeting and Exposition of the American Society of Hematology；2006.12.9-12, Orlando

本邦における染色体異常 5q-を伴う MDS の実態調査

研究協力者 通山 薫、田坂大象（川崎医科大学検査診断学）、岸本光代（川崎医療短期大学）

研究要旨

5 番染色体長腕欠失 (5q-) を有する MDS 患者では lenalidomide が画期的な治療効果をもたらすことが欧米で報告され、本邦においても早期の導入が望まれるところである。それに先立ち我々は全国の主要病院 285 施設を対象として、5 番染色体異常を有する MDS の実態・予後についてアンケート方式で後方視的調査をおこなった。5q-を有する MDS 症例で予後情報があった 116 例についての IPSS 区分は Low 11 例、Int-1 35 例、Int-2 43 例、High 27 例であった。年次別の登録症例数から概算すると、今回調査対象とした 285 施設において、IPSS:Low/Int-1 で貧血のある該当症例の年間発症数は 10 例弱と推定された。

5q-を有する MDS 116 例の生命予後は予後不良染色体異常の併存と赤血球輸血依存性の程度によって大きく影響されることが確認された。5q-を有する MDS 症例では赤血球輸血依存性の解消が予後の改善に役立つと予想される。

A. 研究目的

5q-を有する MDS の後方視的アンケート調査を全国的な規模でおこない、本邦におけるその実態と予後を明らかにする。

B. 研究方法

全国の主要病院 285 施設（特発性造血障害に関する調査研究班参加施設、鉄過剰症全国調査実施施設、JALSG 参加施設）に対して拡大調査を実施したところ、回答のあった 147 施設から 142 症例が追加され、合計 192 症例が登録された。この中で 5q-を有する MDS 症例は 127 症例（付加的染色体異常をもつ症例も含めて）あり、その中で予後情報があった 116 例を主たる解析の対象とした。

なお比較対照として 5 番染色体異常のない MDS 377 症例は特発性造血障害に関する調査研究班の登録症例データベースよりデータ収集した。統計解析には SPSS ソフトウェアを用いた。なお

個人情報の秘匿に十分な配慮をおこなった。

C. 研究結果

5q-を有する MDS で予後情報のある 116 例について、IPSS 区分は Low 11 例、Int-1 35 例、Int-2 43 例、High 27 例であった。5q-のみを有する症例で予後情報があったのは 32 例、5q-症候群と思われるのは 21 例で、貧血が高度である反面、血小板数・好中球数は保たれる傾向にあった。とくに 5q-症候群の場合血小板数中央値 22 万/ μ l は特徴的であった。2006 年初の時点で生存・経過観察中とされた 5q-を有する MDS 登録患者で、IPSS:Low/Int-1 は 24 例であった。なお 24 例中 Hb 10 g/dl 以下の患者は 19 名であった。年次別の登録症例数から概算すると、今回調査対象とした 285 施設において、IPSS:Low/Int-1 で貧血のある該当症例の年間発症数は 10 例弱と推定された。

5q-を有するMDS116例の生命予後はLow/Int-1とInt-2/Highの2群に分かれる傾向があり、予後不良染色体異常の併存と赤血球輸血依存性の程度によって生命予後が大きく影響されることが確認された。

D. 考察

本邦における5q-を有するMDSの実態が明らかになってきた。IPSSでは各群に分布し、予後不良染色体異常の併存と赤血球輸血依存性の程度によって生命予後が大きく影響されることが、さらにLowまたはInt-1で貧血のある症例は年間10例程度の発症であろうと推定される。5q-を有す

るMDS症例では赤血球輸血依存性を解消できれば予後の改善に役立つと予想され、lenalidomideの導入に期待がかかる。

E. 結論

本邦における5q-を有するMDSの後方視的調査にてその実態と予後因子が明らかになった。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

なし。

PNH 関連造血不全疾患における NKG2D リガンド発現の臨床的意義

研究協力者 中熊秀喜（和歌山県立医科大学 血液内科 教授）
花岡伸佳（和歌山県立医科大学 血液内科）
米村雄士、*川口辰哉（熊本大学医学部附属病院 輸血部、*感染免疫診療部）

研究要旨

ストレスを受けた細胞の膜に現れて免疫細胞による駆除の指標になる標的分子として知られる NKG2D リガンド (ULBP、MICA/B) の発現を、PNH および関連の造血不全疾患で調べたところ 45%–72% の症例で検出され、また一部の症例の臨床経過において血球減少や免疫抑制療法の効果との間に関連性が認められた。NKG2D リガンドの解析は造血不全の分子病態の解明、早期診断、新しい治療法の開発に役立つと思われる。

A. 研究目的

PNH 関連疾患の造血不全の発生には免疫が存在すると考えられているが、誘因や免疫誘発のしくみは不明である。造血細胞上の免疫標的分子の同定は造血不全の分子病態の解明、早期診断、新しい治療法の開発に繋がる可能性がある。我々は標的分子の候補として NK や CTL を活性化しうるストレス誘導型蛋白 (NKG2D リガンド；ULBP、MICA/B) を提唱し (Blood, 2006)、それらの血球膜発現の解析を進めている。

B. 研究方法

PNH 関連造血不全疾患患者の血球 (末梢顆粒球と骨髄 CD34⁺細胞) 膜の NKG2D リガンド (ULBP1-3、MICA/B) 発現をフローサイトメトリーにて解析、また血漿中遊離型をサンドイッチ ELISA 法にて定量した。対象は 89 例で、再生不良性貧血 50 例、PNH 17 例、MDS(RA) 22 例、男性 53 人、女性 36 人、年齢は 14–83 歳 (中央値 65 歳)、病期や重症度や治療内容はさまざまであった。健

常人 17 例を対照とした。

(倫理面への配慮) 学内倫理委員会の承認を受け、参加者からインフォームドコンセントを得て実施した。

C. 研究結果

NKG2D リガンドのいずれかが血球膜発現、または血中増加している症例の割合は、再生不良性貧血 36/50 例 (72%)、PNH 12/17 例 (71%)、MDS (RA) 10/22 例 (45%) であった。患者全体では膜発現 53%、血漿中増加 28% であった。健常人では 1 例に顆粒球 MICA のみがわずかに検出された。また一部の症例の臨床経過において血球減少や免疫抑制療法の効果との間に関連性がみられた。

D. 考察

細胞の感染や癌化に伴い細胞膜にストレス蛋白の NKG2D リガンドが病的発現すると、これを指標に免疫細胞による病的細胞傷害が発生する。本研究で PNH 関連造血不全疾患患者の一部でも

これらのリガンドの血球膜発現が検出され、造血障害の発生に深く関与している可能性がでてきた。臨床経過解析もこれを支持していた。

E. 結論

PNH関連の造血不全疾患では血球にNKG2Dリガンドを発現させる誘因が存在し、NKG2D介在性免疫による造血細胞傷害が発生している可能性が高く、診断や治療への応用が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hanaoka N, Kawaguchi T, Horikawa K, Nagakura S, Mitsuya H, Nakakuma H:

Immunoselection by natural killer cells of *PIGA* mutant cells missing stress-inducible ULBP. *Blood*, 107: 1184-1191, 2006

2. 学会発表

1. Hanaoka N, Kawaguchi T, Horikawa K, Nagakura S, Tsuzuki Y, Yonemura Y, Nakakuma H: ULBP and MICA/B as novel indicators for both diagnosis of immune-mediated marrow injury and favorable response to immunosuppressive therapy in bone marrow failure syndromes. The 48th Annual Meeting of the American Society of Hematology, 2006. 12.8-12, Orlando, FL, USA. (*Blood* 108 (Suppl Part 1):295a, 2006)