

臍帯血 CD34 陽性細胞からの大量血小板作製に関する研究

研究協力者 ○新津洋司郎（札幌医科大学内科学第4講座教授）、松永卓也

研究要旨

Three-phase culture system を用いて、臍帯血 CD34 陽性細胞から血小板の作製を試みた。Stem cell factor (SCF), Flt-3/Flik-2 ligand (FL), thrombopoietin (TPO) の存在下で CD34 陽性細胞を human telomerase catalytic subunit (*hTERT*) 遺伝子導入ストローマ細胞 (*hTERT* stroma) と 14 日間共培養した (first phase)。First phase で得られた細胞を、SCF, FL, TPO, interleukin-11 (IL-11) の存在下で更に *hTERT* stroma と 14 日間共培養した (second phase)。Second phase で得られた細胞を SCF, FL, TPO, IL-11 と 5 日間培養した培養上清を gel-filtration して血小板を純化した。胎児 1 人分の臍帯血 (平均 5×10^6 個の CD34 陽性細胞を含有する) から、8.4 単位の血小板輸血製剤に相当する 1.68×10^{11} 個の血小板が作製可能な事が明らかとなった。

A. 研究目的

血小板輸血は、化学療法後や骨髄移植後血小板減少時には必須である。また、血小板は創傷治癒にも役立つ事が知られてきた。しかし、血液センターから供給される血小板輸血製剤には制限があり、また病原体の混入の危険もある。臍帯血に含有される造血幹細胞から、血小板を効率的に作製できれば上記の問題点を解決する事が可能となるため、検討を加えた。

B. 研究方法

Three-phase culture system を用いて、臍帯血 CD34 陽性細胞から血小板の作製を試みた。Stem cell factor (SCF), Flt-3/Flik-2 ligand (FL), thrombopoietin (TPO) の存在下で CD34 陽性細胞を human telomerase catalytic subunit (*hTERT*) 遺伝子導入ストローマ細胞 (*hTERT* stroma) と 14 日間共培養した (first phase)。First phase で得られた細胞を、SCF, FL, TPO,

interleukin-11 (IL-11) の存在下で更に *hTERT* stroma と 14 日間共培養した (second phase)。Second phase で得られた細胞を SCF, FL, TPO, IL-11 と 5 日間培養した培養上清を gel-filtration して血小板を純化した。血小板の形態、凝集能および活性化能力を検討した。

(倫理面への配慮)

臍帯血ドナーからは、書面で同意を得た。

C. 研究結果

胎児 1 人分の臍帯血 (平均 5×10^6 個の CD34 陽性細胞を含有する) から、8.4 単位の血小板輸血製剤に相当する 1.68×10^{11} 個の血小板が作製可能な事が明らかとなった。作製した血小板の機能は健常成人の血小板と同等であった。

D. 考察

本培養技術は新しい血小板輸血製剤の開発に役立つ可能性がある。

討することが可能になると思われる。

E. 結論

本培養技術を用いて、骨髓異形成症候群 (MDS) の骨髓 CD34 陽性細胞を培養することにより、MDS における血小板減少の機序を詳細に検

Hamada H, Niitsu Y. Ex vivo large scale generation of human platelets from cord blood CD34⁺ cells. Stem Cells 2006, 24: 2877-2887.

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsunaga T, Tanaka I, Kobune M, Kawano Y, Tanaka M, Kuribayashi K, Iyama S, Sato T, Sato Y, Takimoto R, Takayama T, Kato J, Ninomiya T,

2. 学会発表

なし

不応性貧血（骨髄異形成症候群）の形態学的診断基準（案）

研究協力者 松田 晃（所属機関名：埼玉医科大学血液内科 助教授）
共著者 別所正美、陣内逸郎、荒関かやの（埼玉医科大学血液内科）
朝長万左男、波多智子、對馬秀樹（長崎大学原研内科）

研究要旨

「再生不良性貧血/骨髄異形成症候群の前方視的症例登録・セントラルレビュー・追跡調査研究」の検鏡担当施設内でワーキンググループを結成し、「骨髄異形成症候群（不応性貧血）の形態学的診断基準（案）」を提案することとした。本（案）では異形成を骨髄異形成症候群に特異的なカテゴリー A と、他の疾患でも認められ骨髄異形成症候群に特異的とはいえないカテゴリー B に分類し、その頻度により形態学的診断確度を Definite MDS、Probable MDS、Possible MDS の 3 段階に区分することとした。本報告書では、本（案）の概略を記す。

A. 研究目的

不応性貧血（骨髄異形成症候群）の診断基準は「特発性造血障害に関する調査研究班」の「不応性貧血（骨髄異形成症候群）診療の参照ガイド」に示されている。しかし、この診断基準の形態学的診断の記載は必ずしも明確ではない。このため骨髄異形成症候群の診断は検鏡者により一致しないことも予想される。

この点を克服するために、「再生不良性貧血/骨髄異形成症候群の前方視的症例登録・セントラルレビュー・追跡調査研究」の検鏡担当施設内でワーキンググループを結成し、「骨髄異形成症候群（不応性貧血）の形態学的診断基準（案）」を提案することとした。

B. 研究方法

「再生不良性貧血/骨髄異形成症候群の前方視的症例登録・セントラルレビュー・追跡調査研究」のセントラルレビューの結果と MDS 形態診断国際ワーキンググループ International Working

Group on MDS Morphology (IWG-MDS) の形態コンセンサスの方向性等を参考にして、「骨髄異形成症候群（不応性貧血）の形態学的診断基準（案）」を作成した。

（倫理面への配慮）

「再生不良性貧血/骨髄異形成症候群の前方視的症例登録・セントラルレビュー・追跡調査研究」参加各施設の倫理委員会の承認を受け、匿名化を行っている。

C. 研究結果

異形成を骨髄異形成症候群に特異的なカテゴリー A と、骨髄異形成症候群に特異的とはいえないカテゴリー B に分類した。

カテゴリー A は以下の 2 系統の 3 種類と定義した。

1. 顆粒球：脱顆粒好中球とクロマチンの粗剛化を伴う低分葉好中球 (pseudo -Pelger-Huet anomaly, Pelger)

2. 巨核球：微小巨核球（micromegakaryocyte, mMgk）

カテゴリー B は骨髄異形成症候群に特異的とはいえない異形成（WHO 分類において記載のあるカテゴリー A 以外の異形成）と定義した。

骨髄異形成症候群を診断確度の観点から下記の3段階に区分した。

Definite MDS

下記の1または2を満たす場合と定義する。

- 1、骨髄において顆粒球系と巨核球系で、カテゴリー A の異形成が単独で10%以上ある。
- 2、骨髄において顆粒球系または巨核球系の1血球系で、カテゴリー A の異形成が単独で10%以上、かつ他の1つ以上の血球系でカテゴリー A と B の合計が赤芽球系で10%以上、顆粒球系で10%以上、または巨核球系で40%以上ある。

Probable MDS

下記の1または2を満たす場合と定義する。

- 1、Definite MDS の基準を満たさず、環状鉄芽球が赤芽球の15%以上（ただし、骨髄異形成症候群以外の鉄芽球性貧血が否定できるならば、Definite MDS とする）
- 2、Definite MDS の基準を満たさず、骨髄において2つ以上の血球系で、カテゴリー A と B の異形成の合計が10%以上認められる。

Possible MDS

上記の Definite MDS、Probable MDS の基準を満たさず、骨髄において1つの血球系のみカテゴリー A と B の異形成の合計が10%以上認められる。

ただし、Probable または Possible MDS と診断される異形成があり、骨髄の芽球比率が5%以上の場合は Definite MDS とする。

さらに、本（案）では、骨髄細胞密度の評価法と再生不良性貧血と骨髄異形成症候群の鑑別法についても言及した。

D. 考察

骨髄異形成症候群以外の疾患においても、異形成、特にカテゴリーBの異形成が低率にみられることはまれではないとする IWG-MDS の基本的コンセンサスを採用した本（案）により、再生不良性貧血と骨髄異形成症候群の鑑別はかなり明確となると考えられる。本（案）は、セントラルレビューの進行とその解析結果により、見直しと改訂が行われなければならないと考える。

E. 結論

骨髄異形成症候群の診断一致率の向上を目指し、形態学的診断確度の3段階区分と再生不良性貧血と骨髄異形成症候群の鑑別法を提案した。

F. 研究発表

1.論文発表

なし。

2.学会発表

なし。

研究要旨

FA はゲノム不安定性を特徴とする先天性骨髄不全症候群である。これまでに同定された 12 個におよぶ FA 蛋白群は家族性乳がん蛋白 BRCA1, BRCA2 と密接に相互作用して、DNA 損傷応答に関与する FA/BRCA 経路を形成する。我々は、FA 蛋白のひとつ FANCA の細胞内動態が FA/BRCA 経路の制御に重要な役割を果たしていることを示し、その制御機構を明らかにすることを目的として研究を行った。その結果、広範なシグナル伝達分子の制御に関与する分子シャペロン Hsp90 が FANCA に結合し、その安定性と核局在を促進することを見出した。Hsp90 阻害剤を細胞に作用させると、FANCA は速やかな分解と核局在の阻害を受け、その結果として FA 経路の活性化が障害され、ゲノム不安定性が亢進する。これらの結果は、Hsp90 が FA/BRCA 経路の制御に重要な役割を果たすことを示唆し、同様の機構が造血幹細胞でも働く可能性が考えられる。Hsp90 阻害剤は、DNA 損傷を介さない新しいタイプの抗がん剤として注目されているが、我々の知見は本阻害剤使用による治療関連造血障害の発症の可能性を示唆する。

A. 研究目的

FA は遺伝的に異なる多数のグループからなる先天性骨髄不全症候群である。患者細胞は特に DNA 架橋剤に高い感受性が高く、著明な染色体断裂を示すのが特徴的である。これまでに同定された FA 蛋白群は、家族性乳がん蛋白とともに DNA 損傷応答に関与する分子経路(FA/BRCA 経路)を形成する。最近は、この経路が ATR/Chk1 を介する細胞周期制御系や、損傷乗り越え修復の機構と相互作用して、DNA 損傷による複製障害(複製ストレス)への応答に関与すると考えられている。

FA/BRCA 経路の概略は以下のように理解されている。すなわち、まず FANCA を含む 8 つの FA 蛋白による核内複合体が形成される。次に、この複合体に依存して FANCD2 がモノユビキチン化を受け活性型となり、クロマチンに結合して

BRCA1, BRCA2 などと相互作用してゲノム安定化に関与する。FA/BRCA 経路の制御機構については不明の点が多いが、我々は FANCA の核内レベルが重要であることを示して来た。今回、分子シャペロン Hsp90 が FANCA に結合して、FA/BRCA 経路を介してゲノム安定性を制御することを見出した。

B. 研究方法

エピトープ標識した FANCA を安定発現細胞株を作成し、細胞のライゼートから FANCA 蛋白複合体を免疫沈降により精製し、質量分析装置で解析した。免疫沈降、イムノプロット、蛍光抗体法などは通常の方法に従った。

C. 研究結果

エピトープ標識 FANCA を含む蛋白複合体を安定発現細胞株から精製したところ、これに

Hsp90 が含まれることが見出された。そこで、次に FANCA と Hsp90 の in vivo および in vitro における結合を免疫沈降法により確認した。また、これらの結合は Hsp90 の特異的阻害剤 17-AAG により阻害された。細胞に 17-AAG を作用させると、FANCA はユビキチン・プロテアソーム系を介して急速に分解されるとともに、核への移行が障害された。また、FANCD2 のモノユビキチン化による活性化が障害され、細胞の DNA 架橋剤に対する感受性が増大した。さらに、17-AAG と DNA 架橋剤の組み合わせは相乗的に染色体の断裂を促進した。Hsp90 と FANCA の複合体は主に細胞質に存在し、また細胞質に貯留する FANCA 変異体も野生型 FANCA と同様、17-AAG により分解された。

D. 考察

我々の結果は、FANCA が Hsp90 の基質蛋白であり、Hsp90 による FANCA の安定性と核移行の制御が FA/BRCA 経路を介してゲノム安定性の制御に関与することを示唆する。同様の機構が造血幹細胞においても作用する可能性が考えられる。Hsp90 はテロメラーゼの活性や細胞周期制御蛋白 Chk1 を制御することが報告されてお

り、幹細胞におけるゲノムの複製や安定化における役割を、今後明らかにしてゆくことが期待される。Hsp90 阻害剤は DNA 損傷を介さない新しいタイプの抗がん剤として臨床治験が進められているが、FA/BRCA 経路の抑制による二次性の骨髄障害が問題になる可能性が予想される。

E. 結論

Hsp90 が FA/BRCA 経路を介する DNA 損傷応答機構を制御することが判明した。この知見は、造血幹細胞の増殖やゲノム安定化の調節機構、および造血障害の病態解明に有用と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Oda T, Hayano T, Miyaso H, Takahashi T, Yamashita T : Hsp90 regulates the Fanconi anemia DNA damage response pathway. Blood 印刷中

2. 学会発表

1. 小田司、山下孝之 : Heat shock protein(HsP90) 阻害剤はファンconi貧血(FA)経路を抑制して腫瘍細胞の DNA 架橋剤への感受性を増強する。第 65 回日本癌学会学術総会 2006 年 9 月 28 日、横浜

輸血後鉄過剰症の全国実態調査

研究協力者 高德 正昭（自治医科大学内科学講座血液額部門 講師）

研究要旨

再生不良性貧血(AA)や骨髄異形成症候(MDS)などの特発性造血障害患者の中には、輸血離脱不能例がある。こうした例は、しだいに輸血による鉄過剰症を合併してくることになる。しかし輸血後鉄過剰症の疫学、診断、治療、予後などの実態は十分に知られていない。我々は、輸血後鉄過剰症の全国実態調査を実施したので報告する。

結果は、個別調査回収が 292 例であった。その内訳は MDS が 152 例、AA が 90 例、慢性赤芽球癆(PRCA)15 例、骨髄線維症(MF)13 例であった。輸血依存となった期間は平均 32 ヶ月で、過去一年以内の輸血総単位数は平均 68.2 単位であった。desferrioxamine (DFO)は 43.4%の患者で投与され、投与法は点滴静注が 68.8%を占めた。検査値異常と合併症の関連では、血清フェリチン値が 1000ng/ml を超える群で、有意に心機能低下や肝機能低下を認めた。

予後では 75 例の死亡例があり、死因の内訳は、感染 53.3%、心不全 24%、白血化 22.7%、出血 13.3%、肝不全 6.7%、その他 10.7%であった。

A. 研究目的

輸血による鉄過剰の疫学調査は過去に実施されておらず、その実態は不明である。

本調査は、輸血後鉄過剰症の国内の実態を把握し、今後の診断基準や治療指針作成の基盤データとすることを目的とした。

B. 研究方法

対象：AA、MDS、PRCA、MF などの基礎疾患を有し、月に 2 単位以上の輸血が 6 ヶ月以上継続した赤血球輸血依存症例。

調査施設：全国の主用血液内科医療機関。

調査方法：一次調査（患者数の把握）、二次調査（患者個別アンケート調査）。

調査期間：一次調査 平成 17 年 7 月下旬から同年 9 月 30 日、二次調査 平成 17 年 10 月 1 日から同年 12 月 31 日。

(倫理面への配慮)

患者個人情報には調査項目から除き、個人情報保護に努めた。

C. 研究結果

全国主要血液内科 174 施設に一次調査依頼し、74 施設から回答があり、その 74 施設で二次調査を実施し、292 例（43 施設）のデータを回収した。

症例の内訳は、男女比 55 : 45、MDS が 152 例、AA が 90 例、PRCA15 例、MF13 例であった。年齢分布は、70 代 30.2%、60 代 29.1%、50 代 13.2%の順であった。輸血依存となった期間は平均 32 ヶ月で、過去一年以内の輸血総単位数は平均 68.2 単位であった。

輸血量と検査値異常の関連では、総血輸血単位数と血清フェリチン値、肝機能 (GOT/GPT) 異

常に正の相関がみられた。

除鉄治療として、DFOは43.4%の患者で投与され、DFO開始時に平均61.6単位輸血を受け、診断からDFO開始までの期間は15.4ヶ月であった。投与法は点滴静注が68.8%で、投与間隔は平均1.9週に1回が57.8%であった。DFO治療のモニターとして血清フェリチンが95.1%で、DFO開始時の血清フェリチン値は平均3010ng/mlで、最終使用時平均は4877ng/mlであった。DFO開始時のGOT異常例は19.9%で、最終時では46.2%であった。また、DFO投与群と非投与群間に、検査値異常や予後に有意差は確認できなかった。

検査値異常と合併症の関連では、血清フェリチン値が1000ng/mlを超える群で、有意に心機能低下や肝機能低下を認めた。

予後では75例の死亡例があり、死因の内訳は、感染53.3%、心不全24%、白血化22.7%、出血13.3%、肝不全6.7%、その他10.7%であった。

D. 考察

輸血後鉄過剰症が、造血障害患者の予後にある程度影響していることが客観的に裏付けられた。また、現在行われているような間欠的DFO療法では、除鉄不十分で予後を改善していないため、経口キレート剤の登場が期待された。

E. 結論

輸血後鉄過剰症の全国実態調査を実施し、292例の解析を行った。症例内訳で、AA(31%)、MDS(52.4%)と大半を占めた。輸血量と血清フェリチン値に正相関があった。DFO投与群と非投

与群間に検査値異常や予後に有意差はなかった。死因として心不全24%、肝不全6.7%を占めた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Takatoku M, Uchiyama T, Okamoto S, Kanakura Y, Sawada K, Tomonaga M, Nakao S, Nakahata T, Harada M, Murate T, Ozawa K. Retrospective nationwide survey of Japanese patients with transfusion-dependent MDS and aplastic anaemia highlights the negative impact of iron overload on morbidity/mortality. Euro J Haematol in press.

2. 学会発表

1. 高德正昭、その他. 輸血後鉄過剰症の全国実態調査 第68回日本血液学会総会・第48回日本臨床血液学会総会 2006年10月7日(福岡市)

2. Takatoku M, et al. Retrospective survey of Japanese patients with transfusion-dependent myelodysplastic syndromes and aplastic anemia highlights the negative impact of iron overload on morbidity/mortality. The 48th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orlando, Dec. 10, 2006.

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takatoku, M., <u>Uchiyama, T.</u> , <u>Okamoto, S.</u> , <u>Kanakura, Y.</u> , <u>Sawada, K.</u> , <u>Tomonaga, M.</u> , <u>Nakao, S.</u> , <u>Nakahata, T.</u> , <u>Harada, M.</u> , <u>Murate, T.</u> , and <u>Ozawa, K.</u>	Retrospective nationwide survey of Japanese patients with transfusion-dependent MDS and aplastic anaemia highlights the negative impact of iron overload on morbidity/mortality.	Eur. J. Haematol.			in press
Oh, I., Ozaki, K., Miyazato, A., Sato, K., Meguro, A., Muroi, K., Nagai, T., Mano, H., and <u>Ozawa, K.</u>	Screening of genes responsible for differentiation of mouse mesenchymal stromal cells by DNA microarray analysis of C3H10T1/2 and C3H10T1/2-derived cell lines.	Cytotherapy	9	80-90	2007
Oh, I., Ozaki, K., Sato, K., Meguro, A., Tataru, R., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K., and <u>Ozawa, K.</u>	Interferon-g and NF-kB mediate nitric oxide production by mesenchymal stromal cells.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	355	955-962	2007
Sato, K., Ozaki, K., Oh, I., Meguro, A., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K., and <u>Ozawa, K.</u> :	Nitric oxide plays a critical role in suppression of T cell proliferation by mesenchymal stem cells.	Blood	109	228-234	2007
Madoiwa, S., Someya, T., Hironaka, M., Kobayashi, H., Ohmori, T., Mimuro, J., Sugiyama, Y., Morita, T., Nishimura, Y., Tarumoto, T., <u>Ozawa, K.</u> , Saito, K., and Sakata, Y.	Annexin 2 and hemorrhagic disorder in vascular intimal carcinomatosis.	Thromb. Res.	119	229-240	2007
Ozaki, K., Hishiya, A., Hatanaka, K., Nakajima, H., Wang, G., Hwu, P., Kitamura, T., <u>Ozawa, K.</u> , Leonard, W.J., and Nosaka, T.	Overexpression of interleukin 21 induces expansion of hematopoietic progenitor cells.	Int. J. Hematol.	84	224-230	2006

Xin, K.Q., Mizukami, H., Urabe, M., Toda, Y., Shinoda, K., Yoshida, A., Oomura, K., Kojima, Y., Ichino, M., Klinman, D., <u>Ozawa, K.</u> , and Okuda, K.	Induction of robust immune responses against human immunodeficiency virus is supported by the inherent tropism of adeno-associated virus type 5 for dendritic cells.	J. Virol.	80	11899-11910	2006
Mizukami, H., Mimuro, J., Ogura, T., Okada, T., Urabe, M., Kume, A., Sakata, Y., and <u>Ozawa, K.</u>	Adipose tissue as a novel target for in vivo gene transfer by adeno-associated viral vectors.	Hum. Gene Ther.	17	921-928	2006
Nagashima, T., Muroi, K., Kawano-Yamamoto, C., Miyoshi, T., Tataru, R., Meguro, A., Fujiwara, S., Obara, Y., Oh, I., Kikuchi, S., Sato, K., Matsuyama, T., Toshima, M., Ohmine, K., Ozaki, K., Takatoku, M., Mori, M., Nagai, T. and <u>Ozawa, K.</u>	Pleocytosis after hemopoietic stem cell transplantation.	Leuk. Lymphoma	47	1613-1617	2006
Ageyama, N., Hanazono, Y., Shibata, H., Ono, F., Nagashima, T., Ueda, Y., Yoshikawa, Y., Hasegawa, M., <u>Ozawa, K.</u> , and Terao, K.	Prevention of immune responses to human erythropoietin in cynomolgus monkeys (<i>Macaca fascicularis</i>).	J. Vet. Med. Sci.	68	507-510	2006
Kawano-Yamamoto, C., Muroi, K., Nagatsuka, Y., Higuchi, M., Kikuchi, S., Nagai, T., Hakomori, S.I., and <u>Ozawa, K.</u>	Establishment and characterization of a new erythroblastic leukemia cell line, EEB: Phosphatidylglucoside-mediated erythroid differentiation and apoptosis.	Leuk. Res.	30	829-839	2006
Ishiwata, A., Mimuro, J., Kashiwakura, Y., Niimura, M., Takano, K., Ohmori, T., Madoiwa, S., Mizukami, H., Okada, T., Naka, H., Yoshioka, A., <u>Ozawa, K.</u> , and Sakata, Y.	Phenotype correction of hemophilia A mice with adeno-associated virus vectors carrying the B domain-deleted canine factor VIII gene.	Thromb. Res.	118	627-635	2006
Ohmori, T., Mimuro, J., Takano, K., Madoiwa, S., Kashiwakura, Y., Ishiwata, A., Niimura, M., Mitomo, K., Tabata, T., Hasegawa, M., <u>Ozawa, K.</u> , and Sakata, Y.	Efficient expression of a transgene in platelets using simian immunodeficiency virus-based vector harboring glycoprotein Ibalph promoter: in vivo model for platelet-targeting gene therapy.	FASEB J.	20	E769-E779	2006

Ogura, T., Mizukami, H., Mimuro, J., Madoiwa, S., Okada, T., Matsushita, T., Urabe, M., Kume, A., Hamada, H., Yoshikawa, H., Sakata, Y., and <u>Ozawa, K.</u>	Utility of intraperitoneal administration as a route of AAV serotype 5 vector-mediated neonatal gene transfer.	J. Gene Med.	8	990-997	2006
Kawamura, K., Kadowaki, N, Kitawaki, T., and <u>Uchiyama, T.</u>	Virus-stimulated plasmacytoid dendritic cells induce CD4+ cytotoxic regulatory T cells.	Blood	107	1031-1038	2006
Yamada, H., Arai, T., Yamashita, K., Sasada, M., and <u>Uchiyama, T.</u>	LPS-induced ROS generation and changes in glutathione level and their relation to the maturation of human monocyte-derived dendritic cells.	Life Sci.	78	926-933	2006
Imamura, M., Asano, S., Harada, M., Ikeda, Y., Kato, K., Kato, S., Kawa, K., Kojima, S., Morishima, Y., Morishita, Y., <u>Nakahata, T.</u> , Okamura, J., <u>Okamoto, S.</u> , Shiobara, S., Tanimoto, M., Tsuchida, M., Atsuta, Y., Yamamoto, K., Tanaka, J., Hamajima, N., and Kodera, Y.	Current status of hematopoietic cell transplantation for adult patients with hematologic diseases and solid tumors in Japan.	Int. J. Hematol.	83	164-178	2006
Kanda, Y., Hyo, R., Yamashita, T., Fujimaki, K., Oshima, K., Onoda, M., Mori, T., Sakura, T., Tanaka, M., Sakai, M., Taguchi, J., Kurakawa, M., Maruta, A., <u>Okamoto, S.</u> , and Sakamaki, H., for the Kanto Study Group of Cell Therapy	Effect of blood cyclosporine concentration on the outcome of hematopoietic stem cell transplantation from an HLA-matched sibling donor.	Am. J. Hematol.	81	838-844	2006
Yamazaki, R., Kuwana, M., Mori, T., Okazaki, Y., Kawakami, Y., Ikeda, Y., and <u>Okamoto, S.</u>	Prolonged thrombocytopenia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: associations with impaired platelet production and increased platelet turnover.	Bone Marrow Transplant.	38	377-384	2006

Kato, H., Kashiwagi, H., Shiraga, M., Tadokoro, S., Kamae, T., Ujiie, H., Honda, S., Miyata, S., Ijiri, Y., Yamamoto, J., Maeda, N., Funahashi, T., Kurata, Y., Shimomura, I., Tomiyama, Y., and <u>Kanakura, Y.</u>	Adiponectin acts as an endogenous antithrombotic factor.	Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.	26	224-230	2006
Nojima, J., Iwatani, Y., Suehisa, E., Kuratsune, H., and <u>Kanakura, Y.</u>	The presence of anti-phosphatidylserine/prothrombin antibodies as risk factor for both arterial and venous thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus.	Haematologica	91	699-702	2006
Ujiie, H., Oritani, K., Kato, H., Yokota, T., Takahashi, I., Maeda, T., Masaie, H., Ichii, M., Kamada, Y., Tamura, S., Kihara, S., Funahashi, T., Tomiyama, Y., and <u>Kanakura, Y.</u>	Identification of amino-terminal region of adiponectin as a physiologically functional domain.	J. Cell. Biochem.	98	194-207	2006
Kamae, T., Shiraga, M., Kashiwagi, H., Kato, H., Tadokoro, S., Kurata, Y., Tomiyama, Y., and <u>Kanakura, Y.</u>	Critical role of ADP interaction with P2Y12 receptor in the maintenance of a1Ibb3 activation: association with Rap1B activation.	J. Thromb. Haemost.	4	1379-1387	2006
Kimura, H., Morii, E., Ikeda, J.I., Ezoe, S., Xu, JX., Nakamichi, N., Tomita, Y., Shibayama, H., <u>Kanakura, Y.</u> , and Aozasa, K.	Role of DNA methylation for expression of novel stem cell marker CDCP1 in hematopoietic cells.	Leukemia	20	1551-1556	2006
Yamanishi, H., Imai, N., Ohmine, T., Nishiyama, M., Suehisa, E., <u>Kanakura, Y.</u> , and Iwatani, Y.	Urine flow cytometer quantification of leukocytes in samples containing a large proportion of lymphocytes.	Clin. Biochem.	39	857-859	2006
Yu, M., Luo, J., Yang, W., Wang, Y., Mizuki, M., <u>Kanakura, Y.</u> , Besmer, P., Neel, BG., and Gu, H.	The scaffolding adapter Gab2, via Shp-2, regulates kit-evoked mast cell proliferation by activating the Rac/JNK pathway.	J. Biol. Chem.	281	28615-28626	2006
Tanaka, H., Matsumura, I., Itoh, K., Hatsuyama, A., Shikamura, M., Satoh, Y., Heike, T., <u>Nakahata, T.</u> , and <u>Kanakura, Y.</u>	HOX decoy peptide enhances the ex vivo expansion of human umbilical cord blood CD34+ hematopoietic stem cells/hematopoietic progenitor cells.	Stem Cells	24	2592-2602	2006

Yoshida, H., Maeda, T., Ishikawa, J., Inoue, S., Matsunaga, H., Kosugi, S., Shiraga, M., Oritani, K., <u>Kanakura, Y.</u> , and Tomiyama, Y.	Expression of CD27 on peripheral CD4+ T-lymphocytes correlates with the development of severe acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation.	Int. J. Hematol.	84	367-376	2006
Inoue, N., Izui-Sarumaru, T., Murakami, Y., Endo, Y., Nishimura, J., Kurokawa, K., Kuwayama, M., Shime, H., Machii, T., <u>Kanakura, Y.</u> , Meyers, G., Wittwer, C., Chen, Z., Babcock, W., Frei-Lahr, D., Parker, C.J., and Kinoshita, T.	Molecular basis of clonal expansion of hematopoiesis in 2 patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH).	Blood	108	4232-4236	2006
Saito, K., Hirokawa, M., Inaba, K., Fukaya, H., Kawabata, Y., Komatsuda, A., Yamashita, J., and <u>Sawada, K.</u>	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	107	1366-1374	2006
Hirokawa, M., Sato, H., Kawabata, Y., and <u>Sawada, K.</u>	Vaginal outflow tract obstruction associated with chronic graft-versus-host disease following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation.	Int. J. Hematol.	83	181-182	2006
Kawabata, Y., Hirokawa, M., Saitoh, Y., Kosugi, S., Yoshioka, T., Fujishima, M., Fujishima, N., Kameoka, Y., Saitoh, H., Kume, M., Takahashi, N., and <u>Sawada, K.</u>	Late-onset fatal Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic syndrome following cord blood cell transplantation for adult acute lymphoblastic leukemia.	Int. J. Hematol.	84	445-448	2006
Komastuda, A., Kawabata, Y., Horiuchi, T., Motegi, M., Ozawa, M., Fijishima, N., Kume, M., Hirokawa, M., Wakui, H., Yamaguchi, A., and <u>Sawada, K.</u>	Successful autologous peripheral blood stem cell transplantation using thiotepa in a patient with systemic sclerosis and cardiac involvement.	Tohoku J. Exp. Med.	209	61-67	2006

Taguchi, J., Miyazaki, Y., Tsutsumi, C., Sawayama, Y., Ando, K., Tsushima, H., Fukushima, T., Hata, T., Yoshida, S., Kuriyama, K., Honda, S., Jinnai, I., Mano, H., and <u>Tomonaga, M.</u>	Expression of the myeloperoxidase gene in AC133 positive leukemia cells relates to the prognosis of acute myeloid leukemia.	Leuk. Res.	30(9)	1105-1112	2006
<u>Nakao, S.</u> , Sugimori, C., and Yamazaki, H.	Clinical significance of a small population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells in the management of bone marrow failure.	Int. J. Hematol.	84	118-122	2006
Sugimori, C., Yamazaki, H., Feng, X., Mochizuki, K., Kondo, Y., Takami, A., Chuhjo, T., Kimura, A., Teramura, M., Mizoguchi, H., Omine, M., and <u>Nakao, S.</u>	Roles of DRB1 *1501 and DRB1*1502 in the pathogenesis of aplastic anemia.	Exp. Hematol.	35	13-20	2007
Takamatsu, H., Feng, X., Chuhjo, T., Lu, X., Sugimori, C., Okawa, K., Yamamoto, M., Iseki, S., and <u>Nakao, S.</u>	Specific antibodies to moesin, a membrane-cytoskeleton linker protein, are frequently detected in patients with acquired aplastic anemia.	Blood	109	2514-2520	2007
Takami, A., Takamatsu, H., Yamazaki, H., Ishiyama, K., Okumura, H., Ohata, K., Konaka, H., Asakura, H., Namiki, M., and <u>Nakao, S.</u>	Reduced-intensity unrelated cord blood transplantation for treatment of metastatic renal cell carcinoma: first evidence of cord-blood-versus-solid-tumor effect.	Bone Marrow Transplant.	38	729-732	2006
Sugiyama, D., Ogawa, M., Nakao, K., Osumi, N., Nishikawa, S., Nishikawa, S-I., Arai, K., <u>Nakahata, T.</u> , and Tsuji, K.	B cell potential can be obtained from pre-circulatory yolk sac, but with low frequency.	Dev. Biol.	301	53-61	2007
Suzuki, K., Hiramatsu, H., Fukushima-Shintani, M., Heike, T., and <u>Nakahata, T.</u>	Efficient assay for evaluating human thrombopoiesis using NOD/SCID mice transplanted with cord blood CD34(+) cells.	Eur. J. Haematol.	78	123-130	2007

Umeda, K., Heike, T., Nakata-Hizume, M., Niwa, A., Arai, M., Shinoda, G., Ma, F., Suemori, H., Luo, H. Y., Chui, D.H.K., Torii, R., Shibuya, M., Nakatsuji, N., and <u>Nakahata, T.</u>	Sequential analysis of alpha- and beta-globin gene expression during erythropoietic differentiation from primate embryonic stem cells.	Stem Cells	24	2627-2636	2006
Kitawaki, T., Kadowaki, N., Sugimoto, N., Kambe, N., Hori, T., Miyachi, Y., <u>Nakahata, T.</u> , and Uchiyama, T.	IgE-activated mast cells in combination with pro-inflammatory factors induce T(h)2-promoting dendritic cells.	Int. Immunol.	1812	1789-1799	2006
Suzuki, T., Yokoyama, Y., Kumano, K. I., Takanashi, M., Kozuma, S., Takato, T., <u>Nakahata, T.</u> , Nishikawa, M., Sakano, S., Kurokawa, M., Ogawa, S., and Chiba, S.	Highly efficient ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells using Delta1-Fc chimeric protein.	Stem Cells	24	2456-2465	2006
Kobayashi, R., Yabe, H., Hara, J., Morimoto, A., Tsuchida, M., Mugishima, H., Ohara, A., Tsukimoto, I., Kato, K., Kigasawa, H., Tabuchi, K., <u>Nakahata, T.</u> , Ohga, S., and 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.	135	693-696	2006
Umeda, K., Heike, T.; Yoshimoto, M; Shinoda, G., Shiota, M., Suemori, H., Luo, H.Y., Chui, D.H.K., Torii, R., Shibuya, M., Nakatsuji, N., <u>Nakahata, T.</u>	Identification and characterization of hemoangiogenic progenitors during cynomolgus monkey embryonic stem cell differentiation.	Stem Cells	24	1348-1358	2006
Matsubara, H., Kobayashi, M., Tokumasu, M., Nakanishi, H., Miyazaki, M., Mizushima, Y., Hiramatsu, H., Adachi, S., Nakayama, T., Onishi, E., and <u>Nakahata, T.</u>	Salmonella enteritidis septic arthritis after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation.	Leuk. Lymphoma	47	1435-1437	2006
Nagayama, J., Tomizawa, D., Koh, K., Nagatoshi, Y., Hotta, N., Kishimoto, T., Takahashi, Y., Kuno, T., Sugita, K., Sato, T., Kato, K., Ogawa, A., <u>Nakahata, T.</u> , Mizutani, S., Horibe, K., and 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	107	4663-4665	2006

Kato, T., Heike, T., Okawa, K., Haruyama, M., Shiraishi, K., Yoshimoto, M., Nagato, M., Shibata, M., Kumada, T., Yamanaka, Y., Hattori, H., and <u>Nakahata, T.</u>	A neurosphere-derived factor, cystatin C, supports differentiation of ES cells into neural stem cells.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	103	6019-6024	2006
Shiota, M., Heike, T., Haruyama, M., Baba S., Tsuchiya, A., Fujino, H., Kobayashi, H., Umeda, K., Yoshimoto, M., and <u>Nakahatam, T.</u>	Isolation and characterization of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells with myogenic and neuronal properties.	Exp. Cell Res.	313	1008-1023	2007
Shide, K., Shimoda, K., Kamezaki, K., Kakumitsu, H., Kumamo, T., Numata, A., Ishikawa, F., Takenaka, K., Yamamoto, K., Matsuda, T., and <u>Harada, M.</u>	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
Shimoda, K., Shide, K., Kamezaki, K., Okamura, T., Harada, N., Kinukawa, N., Ohyashiki, K., Niho, Y., Mizoguchi, H., Omine, M., and <u>Ozawa, K.</u> , <u>Harada, M.</u>	The effect of anabolic steroids on anemia in myelofibrosis with myeloid metaplasia: retrospective analysis of 39 patients in Japan.	Int. J. Hematol.			in press
Sobue, S., Iwasaki, 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., and <u>Murate, T.</u>	Quantitative RT-PCR analysis of sphingolipid metabolic enzymes in acute leukemia and myelodysplastic syndromes	Leukemia	20	2042-2046	2006

V. 研究成果の刊行物・別刷

ORIGINAL ARTICLE

Retrospective nationwide survey of Japanese patients with transfusion-dependent MDS and aplastic anemia highlights the negative impact of iron overload on morbidity/mortality

Masaaki Takatoku¹, Takashi Uchiyama², Shinichiro Okamoto³, Yuzuru Kanakura⁴, Kenichi Sawada⁵, Masao Tomonaga⁶, Shinji Nakao⁷, Tatsutoshi Nakahata⁸, Mine Harada⁹, Takashi Murate¹⁰, Keiya Ozawa¹ on behalf of the Japanese National Research Group on Idiopathic Bone Marrow Failure Syndromes

¹Division of Hematology, Department of Medicine, Jichi Medical University, Tochigi; ²Department of Hematology and Oncology, Kyoto University, Kyoto; ³Department of Medicine, Keio University, Tokyo; ⁴Department of Hematology and Oncology, Osaka University, Osaka; ⁵Department of Internal Medicine III, Akita University, Akita; ⁶Department of Hematology, Atomic Bomb Disease Institute, Nagasaki University, Nagasaki; ⁷Department of Cellular transplantation Biology, Kanazawa University, Ishikawa; ⁸Department of Pediatrics, Kyoto University, Kyoto; ⁹The First Department of Internal Medicine, Kyushu University, Fukuoka; ¹⁰Nagoya University School of Health Sciences, Aichi, Japan

Abstract

Objective: Myelodysplastic syndromes (MDS) and aplastic anemia (AA) are the most common anemias that require transfusion therapy in Japan. This retrospective survey investigated relationships between iron overload, chelation practices, and morbidity/mortality in patients with these diseases. **Method:** Medical histories of transfusion-dependent patients were assessed at transfusion onset, chelation onset, and study end. **Results:** Data were collected from 292 patients with MDS, AA, pure red cell aplasia, myelofibrosis, and other conditions. Patients received a mean of 61.5 red blood cell units during the previous year. Fewer than half (43%) of patients had previously received deferoxamine (DFO) therapy. Only 8.6% received daily/continuous DFO. In all, 75 deaths were reported, with cardiac and liver failure noted in 24.0 and 6.7% of cases. Of these, 97% had ferritin levels >1000 ng/mL. Abnormal cardiac and liver function was observed in 21.9% (14/64) and 84.6% (11/13) of all patients assessed. Effective chelation with DFO resulted in improved serum ferritin, liver enzymes, and fasting blood sugar. **Conclusions:** Mortality is higher in heavily iron-overloaded patients, with liver and cardiac dysfunction being the primary cause. Daily/continuous chelation therapy was effective at reducing iron burden and improving organ function. Chelation therapy should be initiated once serum ferritin levels exceed 1000 ng/mL.

Key words refractory anemias; myelodysplastic syndromes; aplastic anemia; iron chelation therapy; deferoxamine

Correspondence Masaaki Takatoku, Jichi Medical University, 3311-1 Yakushiji, Shimotsuke, Tochigi 329-0498, Japan. Tel: +81 285 58 7353; Fax: +81 285 44 5258; e-mail: mtakatok@jichi.ac.jp

Accepted for publication 8 February 2007

doi:10.1111/j.1600-0609.2007.00842.x

Myelodysplastic syndromes (MDS) and aplastic anemia (AA) are the most common anemias that require transfusion therapy in Japan (1). Because there is no physiological mechanism for iron excretion in humans, as the number of transfused units of blood increases patients rapidly develop iron overload. Excessive accumulation of iron released from aging and damaged erythrocytes by reticuloendothelial macrophages leads to transferrin becoming saturated and the circulation of non-transfer-

rin-bound iron (NTBI) in serum (2). As a result, iron is deposited in the form of ferritin and hemosiderin in the parenchymal cells of the liver, heart, pancreas, brain, and joints (3, 4). Ionic iron-mediated toxicity in these organs such as lysosomal disruption in hepatocytes, collagen formation and fibrogenesis, and lipid peroxidation in heart and spleen cells have been shown to cause various symptoms of congestive heart failure, arrhythmias, cirrhosis, hepatocellular carcinoma, insulin resistance and

diabetes, arthritis, fatigue, and sexual dysfunction (5–8). Iron overload also directly affects the systemic immunity and increases availability of iron to viruses, bacteria, and cancer cells (9, 10).

As phlebotomy is not an option because of their underlying diseases, in anemic patients with iatrogenic iron overload as sequela of repeated transfusions chelation therapy with subcutaneous or intravenous deferoxamine (Desferal®; DFO) has been, to date, the only means of removing the toxic accumulation of NTBI. Daily treatment with DFO has been demonstrated effective; however, in Japan it is common practice to administer DFO fortnightly in a hospital setting because of the risk of infection or bleeding associated with subcutaneous and intramuscular administration. Once-every-2 wk treatment is less than optimal, difficult and inconvenient for patients and physicians, and adversely affects the patient's quality of life (QoL). The goal of this retrospective survey was to investigate the relationships between iron overload, current chelation practices, and morbidity/mortality in Japanese patients with MDS and AA.

Materials and methods

Study design

This retrospective survey investigated the outcomes of iron overload-related morbidity and mortality in Japan from August 2001 to December 2005. A questionnaire was sent to hematology departments in hospitals all over Japan. The medical chart histories of transfusion-dependent (TD) patients were assessed by questionnaire at three time points: (i) transfusion onset, (ii) chelation onset, and (iii) end of study (EOS). TD patients were defined as those receiving >2 packed red blood cell (RBC) units/month for ≥6 months. Data categories on the questionnaire included age, sex, underlying disease, risk of becoming TD, number of RBC units received (in Japan, one RBC unit derives from 200 mL of whole blood), results of laboratory blood tests [serum ferritin, total protein, serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT; aspartate aminotransferase), serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT; alanine aminotransferase), bilirubin, fasting blood sugar (FBS), and HbA_{1c}], cardiac tests (ECHO, ultrasound examination, and electrocardiogram), liver magnetic resonance imaging (MRI), and liver biopsy.

Cardiac function was assessed by each individual patient's physician; in this study there was no preset definition of what constituted cardiac abnormality. Liver MRI assessments were undertaken at radiology departments in each participating hospital. Details of the MRI pulse sequences used and magnetic strengths were not recorded. The prevalence of hepatitis C virus infection in the study population was not recorded.

Statistical analysis

Comparisons between laboratory tests, liver MRI, cardiac examinations, cause of death, patient background, and serum ferritin levels (a measure of iron overload) were performed using Student's *t*-test or the Fisher test. Relationships between EOS ferritin levels and SGOT and SGPT levels were calculated by Cochran–Armitage test. Cutoff values for RBC units were calculated using a logistics model that was evaluated with the Pearson chi-squared test. A *P*-value ≤0.05 was considered significant.

Results

Patients' demography and background characteristics

In response to 173 questionnaires circulated, 43 hospitals replied returning data on 292 patients with a range of underlying conditions. Demographic and background data from these patients are presented in Table 1. Six patients had more than one diagnosis: AA and MDS (*n* = 1); AA and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (*n* = 1); pure red cell aplasia and graft-vs.-host disease (*n* = 1); MDS and myelofibrosis (*n* = 2); and MDS and multiple myeloma (*n* = 1).

Transfusion history

Transfusion history of the patients is summarized in Table 2. Average period of transfusion dependency was

Table 1 Patients' demography and background clinical characteristics

No. of patients	292
Sex <i>n</i> (%)	
Male	159 (54.5)
Female	130 (44.5)
Unknown	3 (1.0)
Age in years <i>n</i> (%)	
20–29	12 (4.1)
30–39	20 (6.8)
40–49	23 (7.9)
50–59	34 (11.6)
60–69	75 (25.7)
70–79	78 (26.7)
>80	14 (4.8)
Other	2 (0.7)
Unknown	34 (11.6)
Underlying disease ¹ <i>n</i> (%)	
MDS	152 (52.1)
AA	90 (30.8)
Pure red cell aplasia	15 (5.1)
Myelofibrosis	13 (4.5)
Other	26 (8.9)
Unknown	2 (0.7)

¹ Six patients had more than one disease.

MDS, myelodysplastic syndromes; AA, aplastic anemia.