

先天性 GPI 欠損症の発症機序について

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

主症状として門脈血栓症と欠伸発作を呈し、劣性遺伝形式をもつ先天性 GPI アンカー欠損症の発見について昨年報告した。本症例では GPI 生合成に必須な *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たが、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害薬である Na butyrate 投与により *in vitro* および *in vivo* で GPI の発現が回復し、難治性のけいれん発作も改善した。*PIG-M* のプロモーターはマウスにおいてもよく保存されている。さらに発症機序を解明するため、同じ変異を持つノックインマウスを作製している。

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た患者由来の B cell line により *in vitro* の実験を行い、その結果をもとに英国で患者の治療を行った。また同様の変異を加えたマウスの ES 細胞株を樹立し、ノックインマウスを作製した。

(倫理面への配慮)

本研究は、英国の Imperial College London, Hammersmith Hospital との共同研究である。

C. 研究結果

先天性 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。HDAC 阻害薬である Na butyrate により、*in vitro* において GPI アンカー型蛋白質の発現が回復した。その結果をもとに、患者に内服投与を行ったところ

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。変異のあった部位はマウスの *Pigm* のプロモーターでもよく保存されており、同様の変異をマウスプロモーターに加えてレポーターアッセイを行ったところ、ヒトと同様プロモーター活性が激減した。そこで同じ変異を加えたマウスの ES 細胞株を樹立し、ノックインマウスを作製した。現在ヘテロマウスの出生が確認できた段階である。

D. 考察

GPI が合成されないと胎生致死になるが、本疾患では先天的な形態異常や発達異常がみられない。これは発生の各段階で様々な転写因子が働き、変異による basal な遺伝子発現の低下が代償されていると考えられる。つまり、本来ハウスキーピング遺伝子のように、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。ノックインマウスにおいて発生のどの時期にどのような調節があるか解析すると共に、患者の症状がマウスで再現できれば、どのような GPI アンカー型蛋白質が関わっているかその発

症機序について追求したい。

E. 結論

世界で初めて先天性 GPI 欠損症が発見され、その責任遺伝子は PIG-M であった。その発症機序を明らかにするため、ノックインマウスを作製している。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Almeida, A.M*, Murakami Y*, Baker A, Maeda Y, I.A.G. Roberts, Kinoshita T, D. M. Layton, and Karadimitris. A: Targeted therapy for inherited GPI deficiency. N Engl J Med. 2007; 356:1641-1647. (* equally contributed)

2. 学会発表

- 村上良子 他 : Discovery of inherited GPI deficiency
第 26 回大阪血液学研究会 2007 年
- 村上良子 他 : 遺伝性 GPI アンカー欠損症と治療
について 第 44 回 補体シンポジウム 2007 年
- 村上良子 : 遺伝性 GPI アンカー欠損症, 第 3 回
Frontier in Hematology/Oncology, 2007 年

C/EBP α 変異パターンによる AML および MDS 病型の解析

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 診療講師)
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 助教)

研究要旨

C/EBP α 変異は MDS/AML および AML 症例に認められ、その変異パターンは①N 末領域のフレームシフト変異、②bZIP 部変異、③C 末領域のフレームシフト変異、の 3 つに大別できた。de novo AML(M2)では、①と②の 2 変異をそれぞれ別のアレルに認めた。一方 MDS/AML では、①～③いずれかの片アレル変異であった。de novo AML(M2)タイプは予後良好で、MDS/AML タイプは予後不良であった。C/EBP α 変異のパターンにより AML や MDS の病型が規定され、遺伝子分類が可能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、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。また 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、AML1 変異を MDS/AML のマスター変異と位置づけた。さらに MDS/AML の新たなマスター変異として、骨髄球系の発生・分化を制御する転写因子 C/EBP α の異常を見いだした。今回 C/EBP α 異常による MDS/AML の発症メカニズムを明らかにするために、de novo AML と MDS/AML における C/EBP α 変異を検討した。

B. 研究方法

MDS/AML 患者 258 例と de novo AML118 例を含

む骨髄造血器腫瘍 480 例および健常人 37 例で、C/EBP α をコードする *CEBPA* 遺伝子の点変異を PCR-SSCP 法により解析し、変異例の塩基配列を決定した。さらに C/EBP α 変異体の転写活性化能を G-CSFR のプロモーターを用いたレポーターアッセイにて検討した。

(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

既報で C/EBP α の点変異として扱われていた H195-P196dup 変異が、MDS/AML で 101/258 例 (39.1%)と非常に高頻度であったが、健常人にも 13/37 例(35.1%)認められた。これ以外の C/EBP α 変異は MDS/AML では 10/258 例(3.9%)、AML では 9/118 例 (7.6%)に認められたが、MDS の RA、CMML や MPD には見られなかった。C/EBP α 変異のパターンは①N

末領域のフレームシフト変異、②bZIP 部変異、③C 末領域のフレームシフト変異、の3つに大別できた。変異を有する症例を MDS/AML 群 (6 例)、治療関連 AML または MDS 群 (7 例)、および de novo AML 群 (6 例) に分けて変異パターンと臨床病態を検討した。前 2 群では、12/13 例が N 末、bZIP、C 末いずれか 1 つの変異を一方のアレルのみに有しており、1 例が同一の N 末変異を両アレルに有していた。染色体異常や他の遺伝子変異を持つものが多く、生存期間は短かった。一方 de novo AML 群は全て、一方のアレルが N 末変異で他方のアレルが bZIP 変異であった。これらの症例では他の遺伝子変異を認めず、骨髄中の好酸球増加例や長期生存例がみられた。転写活性化能は、C/EBP α 変異体では野生型と比較して低下しており、中でも bZIP 変異体では著しく低下し野生型に対して拮抗的に作用した。

D. 考察

骨髄球系の発生・分化の制御に必須のロイシンジッパー型転写因子 C/EBP α p42 は、その遺伝子変異や他の遺伝子産物による転写・翻訳レベルでの発現抑制によって白血病発症にも関与している。C/EBP α 変異は AML M2 に多くみられ、予後良好群と報告されていた。最近の解析により、これまで変異として扱われていた H195-P196dup 変異は多型の一つであると判明したこともあり、我々は骨髄造血器腫瘍における C/EBP α 変異の再検討を行った。変異は AML の 7.6% のみならず、MDS/AML にも 3.9% の症例に認められた。変異のパターンは①N 末領域(1-119aa)のフレームシフト変異のため第 2 の翻訳開始点から蛋白が作られる p30 タイプ、②転写活性化能の著しい低下を来す C 末部 bZIP 領域のインフレーム変異体、③C 末領域のフレームシフト変異体、の 3 つに大別できた。MDS/AML では片アレルのみに変異が生じており、他方のアレルは正常で野生型 C/EBP α が存

在するため転写活性化能がある程度保持されている。そこに他の遺伝子異常が付加されることによって MDS/AML を発症すると推測される。一方 de novo AML の場合、N 末変異と bZIP 変異の両方を別々のアレルに有することにより、正常 C/EBP α 活性は強力に抑制され、分化阻害・増殖促進すると考えられる。C/EBP α 変異を有する家族性 AML 家系では、3 家系とも germline 変異が片アレルの N 末 p30 タイプで、白血病発症時には他方のアレルに bZIP 変異を獲得していることから、p30 と bZIP の両変異を有する造血幹細胞は他の遺伝子変異の付加をあまり必要とせず白血病を発症すると考えられる。このことが良好な治療反応性に反映されているのかもしれない。C/EBP α 点変異による機能喪失によって活性型 C/EBP α 量が減少して幹細胞の分化抑制・細胞周期亢進が生じ、セカンドヒットの種類 (他方アレルの C/EBP α や他の遺伝子異常) によって AML や MDS を発症すると推測される。

E. 結論

C/EBP α 変異のパターンにより AML や MDS の病型が規定され、遺伝子分類が可能であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Watanabe-Okochi N, Kitaura J, Ono R, Harada H, Harada Y, Komeno Y, Nakajima H, Nosaka T, Inaba T, Kitamura T: AML1 mutations induced MDS and MDS/AML in a mouse BMT model. Blood 2008 (in press)
- Li X-L, Arai Y, Harada H, Shima Y, Yoshida H, Rokudai S, Aikawa Y, Kimura A, Kitabayashi I: Mutations of the HIPK2 gene in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome impair AML1-

and p53-mediated transcription. *Oncogene* 26(51), 7231-7239, 2007.

Singapore, 2007. (8.20.2007)

- 原田浩徳, 原田結花: MDS の発症と進展. *Biotherapy* 22(1), 2008 (in press)
- Zharlyganova D, 原田結花, 原田浩徳, Chaizhunossova N, Apsalikov K, Zhunossova A, 川野徳幸, 星 正治, 木村昭郎: セミパラチンスク核実験場近郊住民における骨髓異形成症候群 (MDS) の遺伝子学的検討. *広島医学* (in press)
- 原田浩徳, 原田結花: 〈平成 17 年度第 47 回日本臨床血液学会: MDS 特別賞受賞論文〉 AML1/RUNX1 点突然変異を持つ MDS/AML の多段階発症機構. *臨床血液* 48(7), 541-546, 2007.

2. 学会発表

- 原田浩徳, 原田結花, 丁 曄, 許 泰一, 木村昭郎: C/EBP β 変異パターンによる AML および MDS 病型の解析. 第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会, 横浜, 2007. (10.11.2007) (*臨床血液* 48(9): 861, 2007.)
- 渡辺(大河内)直子, 沖 俊彦, 小埜良一, 原田浩徳, 湯池晃一郎, 東條有伸, 中島秀明, 野阪哲哉, 稲葉俊哉, 北浦次郎, 北村俊雄: RasGRP4 と変異型 AML1 はマウス BMT モデルにおいて協調的に働き, T 細胞性白血病を誘発する. 第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会, 横浜, 2007. (10.11.2007) (*臨床血液* 48(9): 859, 2007.)
- 丁 曄, 原田浩徳, 原田結花, 木村昭郎: AML1 点変異をマスターイベントとする MDS/AML 発症機構の解明. 第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会, 横浜, 2007. (10.11.2007) (*臨床血液* 48(9): 856, 2007.)
- Ding Y, Harada Y, Harada H: AML1/RUNX1 point mutation plays a pivotal role in the pathogenesis of MDS/AML. *RUNX 2007* (14th RUNX Meeting),

Evi-1 による造血制御機構に関する研究

研究協力者 黒川 峰夫 (東京大学医学部付属病院血液・腫瘍内科 教授)

研究要旨

造血細胞の増殖や分化は多くの転写因子によって制御されており、この転写制御機構の破綻が様々な造血器疾患の発症につながる。Evi-1 は骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndrome: MDS)や白血病で高頻度に活性化されている転写因子であるが、その生理作用については不明な点が多かった。今回われわれは Evi-1 欠失マウスおよび条件的 Evi-1 欠失マウスを作成し、Evi-1 が胎生期および成体における造血幹細胞の維持・増殖に必須の役割を担っていることを明らかにした。また、様々な腫瘍関連遺伝子を導入して白血化した細胞において Evi-1 欠失を誘導し、Evi-1 が白血病細胞の増殖にも重要であることを見出した。さらに、野生型及び Evi-1 欠損を誘導した造血幹細胞における遺伝子発現プロファイルと、急性骨髄性白血病症例における遺伝子発現パターンを解析し、造血幹細胞および白血病細胞に共通する Evi-1 の標的候補遺伝子を同定した。今回の解析により、造血系における Evi-1 の機能が明らかとなった。

A. 研究目的

Evi-1 は骨髄異形成症候群や白血病において高頻度に活性化されている転写因子であり、Evi-1 関連造血器疾患は治療抵抗性で予後不良であることから、臨床上的大きな問題となっている。今回の研究では、Evi-1 欠失マウスおよび条件的 Evi-1 欠失マウスを作成し、造血系における Evi-1 の役割を個体レベルで明らかにすることを目的とした。また、Evi-1 が造血細胞や腫瘍細胞の増殖を制御する分子機構についても解析をおこなった。

B. 研究方法

(1) Evi-1 には、Evi-1a、Evi-1b、Evi-1c の少なくとも 3 つの isoform があることが知られているが、従来の Evi-1 欠失マウスは Evi-1 遺伝子の exon7 (Evi-1b に含まれていない) を標的としたため、Evi-1b の発現が残存しているという問題点があった。また、ノックアウトマウスが胎生致死であるため、成体造血における Evi-1 の機能は不明であった。そこで本研究で

は、Evi-1 遺伝子の exon4 を標的として、Evi-1 欠失マウスおよび条件的 Evi-1 欠失マウスを作製した。これらのマウスを用いて、各分画における造血細胞数、造血幹細胞活性、コロニー形成能を評価し、個体造血における Evi-1 の役割を調べた。また、Evi-1(+/-)マウスの幹細胞活性についても同様の解析をおこなった。

(2) 造血発生の始原である paraaortic splanchnopleural(P-Sp) 領域の培養系を用いて、初期造血発生期における造血細胞の増殖に必要な Evi-1 の機能ドメインを同定した。さらに、Evi-1 による造血細胞制御の分子機序について解析した。

(3) 白血病キメラ遺伝子 MLL/ENL、E2A/HLF を条件的 Evi-1 欠失マウスから採取した骨髄細胞に導入し、*in vitro* で不死化させた後、Cre ウイルスを用いて Evi-1 の欠失を誘導し、Evi-1 の欠失が白血病細胞の増殖能に及ぼす影響を評価した。また、cMyc-bcl2 を導入した骨髄細胞をレシピエントマウスに移植するマウス白血病モデルを用いて、生体内における白血

病細胞の維持・増殖に Evi-1 が果たす役割を解析した。
(4) 野生型及び Evi-1 欠損を誘導した造血幹細胞の遺伝子発現プロファイルと急性骨髄性白血病症例における遺伝子発現パターンを解析し、造血幹細胞と白血病細胞に共通する Evi-1 の標的候補遺伝子群を同定した。

(倫理面への配慮)

動物実験については東京大学医学部動物実験施設の規定に沿って行った。また、遺伝子組み換え実験は医学部組換え DNA 安全委員会において承認を受けており、適切な拡散防止措置を施行した。

C. 研究結果

(1) Evi-1 欠失マウスは胎生 13-16 日に出血して死亡した。Evi-1 欠失マウスの胎仔肝では分化した血液細胞は認められるものの、Lineage(-), cKit(+), Scal(+): LSK 細胞などの造血幹細胞・前駆細胞は著減しており、コロニー形成能、造血再構築能も著しく低下していた。次に、条件的 Evi-1 欠失マウスを、インターフェロン (IFN) 依存的に造血細胞で Cre を発現する Mx-Cre-Tg マウスと交配し、成体造血における Evi-1 の機能を解析したところ、Evi-1 欠失骨髄でも胎仔肝同様に、造血幹・前駆細胞数、造血再構築能、コロニー形成能の低下を認めた。一方、分化した造血細胞 (赤血球、顆粒球、リンパ球) 数は正常であった。Evi-1 を欠失した細胞では造血幹細胞の増殖を促すサイトカインへの反応性が低下しており、これが造血幹細胞活性低下の一つの原因であると考えられた。また、Evi-1(+/-)マウスの造血幹細胞活性は、野生型と Evi-1 欠失マウスの中間であり、Evi-1 は量依存的に造血幹細胞活性を調節していることが判明した。

(2) P-Sp 領域培養系を用いた実験により、初期造血発生期における造血細胞の増殖には、Evi-1 の第 1 zinc finger domain と acidic domain が重要であることを明

らかにした。また、Evi-1 は Gata2 の発現上昇と TGF- β signal の抑制を介して造血細胞の増殖を促進していることを見出した。

(3) 白血病関連遺伝子 MLL/ENL 及び E2A/HLF を導入し、*in vitro* で形質転換した骨髄細胞から Evi-1 を欠損させると、そのコロニー形成能が低下した。また、マウス白血病モデルを用いた解析により、Evi-1 を欠失した骨髄細胞では、cMyc-bcl2 による白血病発症が遅延することを見出した。

(4) マイクロアレイを用いて、造血幹細胞上で Evi-1 により活性化される遺伝子 378 個、および抑制される遺伝子 466 個を同定した。また、これらの遺伝子の急性骨髄性白血病症例における発現パターンを調べたところ、造血幹細胞上で Evi-1 に活性化されている遺伝子の多くは、白血病細胞上でも Evi-1 の同様の発現パターンを示し、逆に、造血幹細胞上で Evi-1 に抑制されている遺伝子の多くは、白血病細胞上で Evi-1 と反対の発現パターンを示していることがわかった。Evi-1 標的候補遺伝子の中には、造血幹細胞制御や血小板形成に関与している遺伝子が多く含まれていた。

D. 考察

Evi-1 は骨髄異形成症候群や白血病で高頻度に活性化されている転写因子であるが、その生理機能に関しては不明な点が多かった。今回の研究により、

Evi-1 が量依存的に造血幹細胞や白血病細胞の維持・増殖を制御していることが明らかとなった。また、遺伝子発現プロファイルを用いた解析により、造血幹細胞および造血器疾患に共通する標的遺伝子群の存在が判明した。この遺伝子群の中には造血幹細胞制御や血小板形成に関与する遺伝子が多く含まれており、Evi-1 の活性化がこれらの標的遺伝子の発現異常を介して、造血器疾患の発症を促している可能性が考えられた。今後、Evi-1 による造血制御の分

子機構をさらに詳細に解析することによって、骨髄異形成症候群などの難治性造血器疾患に対する新たな治療法の開発に繋がることが期待される。

E. 結論

MDS 関連遺伝子 Evi-1 の欠失マウスおよび条件的欠失マウスを作成し、造血系における Evi-1 の生理機能を解析した。その結果、(1) Evi-1 は胎生期および成体における造血幹細胞の維持・増殖を、量依存的に制御していること、(2) Evi-1 は Gata2 の活性化および TGF- β signal の抑制を介して初期造血発生期における造血幹・前駆細胞の増殖を促進していること、(3) Evi-1 は白血病細胞の増殖にも重要であることが明らかとなった。また、造血幹細胞および白血病細胞に共通する Evi-1 標的候補遺伝子を同定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Goyama S, Yamamoto G, Shimabe M, Sato T, Ichikawa M, Ogawa S, Chiba S, Kurokawa M. Evi-1 is a critical regulator for proliferation of hematopoietic stem cells and transformed leukemic cells (in submission)
- Sato T, Goyama S, Nitta E, Takeshita M, Yoshimi M, Nakagawa M, Kawazu M, Ichikawa M, Kurokawa M. Evi-1 promotes para-aortic splanchnopleural hematopoiesis through up-regulation of GATA-2 and repression of TGF- β signaling (in submission)
- 黒川峰夫:造血系転写因子と白血病. 臨床血液 48; 1388-1392, 2007.

2. 学会発表

- 合山 進, 山本 豪, 佐藤智彦, 市川 幹, 小川誠司, 千葉 滋, 黒川峰夫: Evi-1 による造血及び白血病の制御機構. 第 5 回幹細胞シンポジウム, 2007 年 5 月

17 日~19 日, 淡路島

- 佐藤智彦, 合山 進, 黒川峰夫: Evi-1 による胎生期造血の制御機構. 第 5 回幹細胞シンポジウム, 2007 年 5 月 17 日~19 日, 淡路島
- 黒川峰夫: 転写因子による造血制御と白血病発症機構. 癌学会第 66 回総会, 2007 年 9 月 3 日~5 日, 横浜.
- 合山 進, 山本 豪, 佐藤智彦, 市川 幹, 小川誠司, 千葉 滋, 黒川峰夫: Evi-1 による造血及び白血病の制御機構. 癌学会第 66 回総会, 2007 年 9 月 3 日~5 日, 横浜.
- 佐藤智彦, 合山 進, 黒川峰夫: Evi-1 による胎生期造血の制御機構. 癌学会第 66 回総会, 2007 年 9 月 3 日~5 日, 横浜.
- 黒川峰夫: 造血系転写因子と白血病. 第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会, 2007 年 10 月 11 日-13 日, 横浜.
- 合山 進, 山本 豪, 佐藤智彦, 市川 幹, 小川誠司, 千葉 滋, 黒川峰夫: Evi-1 による造血及び白血病の制御機構. 第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会, 2007 年 10 月 11 日-13 日, 横浜.
- 佐藤智彦, 合山 進, 黒川峰夫: Evi-1 による胎生期造血の制御機構. 第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会, 2007 年 10 月 11 日-13 日, 横浜.
- 合山 進, 山本 豪, 佐藤智彦, 市川 幹, 小川誠司, 千葉 滋, 黒川峰夫: Evi-1 による造血及び白血病の制御機構. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会, 2007 年 12 月 11 日~15 日, 横浜.
- Goyama, S., Yamamoto, G., Sato, T., Ichikawa, M., Ogawa, S., Chiba, S., Kurokawa, M.: Evi-1 is a critical regulator for hematopoietic stem cells and leukemic cells. Keystone symposia "Stem Cells and Cancer", March 2-7, 2007, Colorado, U.S.A.

- Kurokawa, M.: A role for Evi-1 in Hematopoiesis and leukemia. USA-Japan Cooperative Cancer Research "Animal Models of Hematological Malignancies" , March 19-21, 2007, Hawaii, U.S.A.
- Goyama, S., Yamamoto, G, Sato, T., Ichikawa, M., Ogawa, S., Chiba, S., Kurokawa, M.: Evi-1 is a critical regulator for hematopoietic stem cells and leukemic cells. 5th ISSCR Annual Meeting, June 17-20, 2007, Cairns, Australia.
- Sato, T., Goyama, S., Kurokawa, M.: Evi-1 promotes para-aortic splanchnopleural hematopoies is through up-regulation of GATA-2 and repression of TGF- β signaling. 49th ASH Annual Meeting. December 8-11, 2007, Atlanta, U.S.A.

再生不良性貧血患者由来骨髄間葉系幹細胞における GATA-2 および脂肪分化促進遺伝子 PPAR γ の発現

研究協力者 小島 勢二 (名古屋大学大学院医学研究科小児科学講座 教授)

研究要旨

再生不良性貧血(再不貧)患者と健常人由来骨髄間葉系幹細胞(MSC)における GATA-2 と脂肪分化促進遺伝子である PPAR γ の発現を Real time PCR 法で検討した。GATA-2 の発現は未治療および治療不応例再不貧患者では、健常人と比較して有意に低下していた。GATA-2 は PPAR γ などの脂肪分化促進遺伝子を抑制することで間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化を抑制する。PPAR γ は GATA-2 とは逆に、未治療および治療不応再不貧患者では発現が亢進しており、治療に反応し造血能が改善した患者では、発現が低下した。再不貧患者由来の MSC にみられる GATA-2 の発現の低下は、再不貧患者の骨髄でみられる脂肪細胞の増加に参与している可能性が示された。

A. 研究目的

骨髄の脂肪化は、再不貧を特徴づける重要な所見であるが、脂肪化の機序は明らかでない。再不貧患者の血液幹細胞(HSC)では、GATA-2 の発現の低下が報告されているが、GATA-2 は MSC から脂肪細胞への分化も抑制することが知られている。本研究では、再不貧患者の MSC における GATA-2 の発現の低下が、骨髄の脂肪化に関連するかを検討した。

B. 研究方法

再不貧患者 34 人(未治療: 12 例、治療反応: 11 例、治療不応: 11 例)と健常人 15 人を対象とした。MSC は骨髄単核級を Mesencult(Stem Cell Technologies)で培養して作製し、実験には 3 継代培養細胞を用いた。GATA-2 と PPAR γ の発現は Real time PCR 法で測定し、GAPDH 比で示した。

(倫理面への配慮)

当大学の倫理委員会の承認を得て、検体の採取にあたっては、文書による同意を得た。

C. 研究結果

未治療再不貧患者由来の MSC は健常人由来の MSC と比較して、GATA-2 の発現は低下していた。(P<0.05)。GATA-2 の発現は治療反応例では、増加したが、不応例では、低値にとどまった。一方、PPAR γ の発現は、未治療再不貧患者では、健常人と比較して高値であった。(P<0.05)。治療に反応した場合には、その発現は低下したが、不応例では高値のままであった。

D. 考察

今回の研究結果から、再不貧患者においては、HSC のみならず、MSC においても GATA-2 の、発現の低下が確認された。GATA-2 は脂肪分化促進遺伝子の抑制に働くが、再不貧患者においては、実際 PPAR γ の発現が亢進していた。Interferon γ は再不貧患者の HSC の増殖抑制に参与していると考えられているが、同様に脂肪前駆細胞における GATA-2 の発現を低下させることから、共通の制御機序の存在が想定される。GATA-2 の低下は、MSC から脂肪細胞への分化を促進し、脂肪髄を形成すると考えられる。

E. 結論

HSCにおけるGATA-2の発現の低下が造血不全を、MSCにおけるGATA-2の発現の増加が、骨髄における脂肪化に関与すると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Kosaka K, Yagasaki H, Sano K, Kobayashi R, Kaneko, Yabe H, Tsuchida M, Mugishima H, Ohara A, Morimoto A, Otsuka Y, Ohga S, Bessho F, Nakahata T, Tsukimoto I, Kojima S; Prospective multicenter trial comparing immunosuppressive therapy with stem cell transplantation from an alternative donor as second-line treatment for children with severe and very severe aplastic anemia. *Blood* (in press)
- Hama A, Yagasaki H, Takahashi Y, Matsumoto K, Kiyoi H, Kojima S: Mutation of JAK2, JAK3 and GATA1 in acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Blood*(in press)
- Horibe K, Kigasawa. H, Tsukimoto I. Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. Prospective study of a pirarubicin, intermediate-dose cytarabine, and etoposide regimen in children with Downsyndrome and acute myeloid leukemia: *J Clin Oncology*(in press)
- Wang Y, Yagasaki H, Hama A, Nishio N, Takahashi Y, Kojima S: Mutation of SBDS and SH2D1A is not associated with aplastic anemia in Japanese children. *Haematologica*(in press)
- Hama H, Yagasaki H, Takahashi Y, Nishio N, Muramatsu H, Yoshida N, Tanaka M, Watanabe N, Yoshimi A, Nishio N, Matsumoto K, Kudo K, Horibe K, Kojima S: Acutte megakaryoblastic leukemia in children. A comparison of AMKL with and without Down syndrome. *Br J Haematol*(in press)

本邦初の *RUNX1* 遺伝子変異による家族性血小板機能異常症

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)
 桐戸 敬太 (山梨大学医学部附属病院血液内科 准教授)

研究要旨

家族性血小板機能異常症 (Familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy; FPD/MM) と考えられる 1 家系を経験した。FPD/MM の責任遺伝子として *RUNX1* 遺伝子が同定されていることから、この家系について *RUNX1* 遺伝子変異の有無について解析を行った。その結果、エクソン 8 の 2484 番目の G が欠失し、このためにフレームシフトを起こすことが判明した。このために、*RUNX1* タンパクの C 末端上の転写活性領域を欠失した変異タンパクが形成され、これが dominant negative として作用することが予想された。

A. 研究目的

RUNX1 は造血発生に不可欠な遺伝子であり、そのノックアウトにより成人型造血の障害をきたす。一方、*RUNX1* は急性骨髄性白血病や骨髄異形成症候群などの造血器腫瘍においても、t(8;21)などの相互転座や点突然変異を介してその病態に関わっている。FPD/MM はこの *RUNX1* の変異により発症する遺伝性の造血器障害であり、小児期より血小板減少と血小板機能障害を示す。注目すべきことに、FPD/MM 照影のうち約 30%は 20-30 歳代に骨髄異形成症候群や急性骨髄性白血病に移行する。これまでに FPD/MM 家系は 13 家系が報告されるのみに過ぎないが、今回我々は、臨床的特徴および家族歴より FPD/MM と考えられる症例を経験した。この症例について、*RUNX1* 遺伝子の変異について解析を行った。

B. 研究方法

末梢血検体より DNA を抽出し、*RUNX1* 遺伝子の各エクソンの遺伝子配列について解析を行った。

(倫理面への配慮)

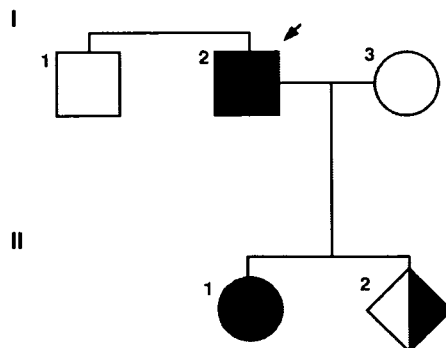
遺伝子解析研究の実施にあたっては、山梨大学

IRB に研究計画書を提出し、審議を経た後に承認を得た。また、検体の採取にあたっては、研究計画の説明を行った後に、書面による同意を得ている。

C. 研究結果

症例呈示 (図 1)

発端者である I-2 は 10 年ほど前に偶然に血小板減少に気付かれたが、特発性血小板減少性紫斑病と考えられていた。2003 年に汎血球減少をきたし、当院を受診。骨髄穿刺にて骨髄異形成症候群と診断した。造血幹細胞移植を目的として血縁ドナーの検索を行ったさいに、II-1 および II-2 にも血小板減少が確認された。このうち、II-1 は 2006 年に acute panmyelosis with myelofibrosis へと進展した。



RUNX1 遺伝子は1から8までの9つ(エクソン7はa,bが存在)のエクソンより構成される。このすべてのエクソンについて、遺伝子配列を解析した結果、1)エクソン1の5' -UTR内の102番目のGがCに変異、2)エクソン8の2484番目のGの欠失が確認された。

このうち、エクソン1の変異については、100名の健常人のDNA解析を行ったところ、6例で同様な変化を認めたことからSNPと考えられた。一方、エクソン8の欠失により、フレームシフトをきたし、その結果としてC末端部の転写調節領域をもたない異常なタンパクが形成されることが予想された。この異常なRUNX1タンパクはDNA結合領域として機能するRUNTドメインは有していることから、正常型に対してdominant negativeに作用することが予想された。なお、RT-PCRを用いてRUNXのmRNAを解析した結果より、エクソン1のSNPとエクソン8の欠失は同じアリル上に存在すること、また変異をもつアリルからのmRNAが優位に増加していることが分かった。現在、このメカニズムについて解析中である。

D. 考察

RUNXの点突然変異はFPD/MM以外にも、急性骨髄性白血病や骨髄異形成症候群において認められることが知られているが、その多くはRUNTドメインに集中している。このため、DNA結合能を失った変異タンパクが形成されることにより、機能するRUNX1タンパクの量的な減少をきたすことが病態として想定されている。一方、本症例では、dominant negativeとして機能する変異体が形成されることが予想された。すなわち、RUNTドメイン変異体と比べ、正常なRUNX1の機能はより強く抑制されていることが推察される。本家系ではこれまでのFPD/MM家系と比べ、造血器腫瘍への移行頻度が高

く(66.7%)、またII-1は17歳と通常の報告よりは若年で造血器腫瘍を発症しているが、形成される変異体がdominant negativeとして機能することと関連があるのではないかと考えられた。エクソン1にみられたSNPの意義については、明らかにし得なかったが、RT-PCRの結果からは、RUNX1の発現量の調整に関与していることが示唆された。

E. 結論

RUNX1に変異を有するFPD/MM家系について報告した。エクソン8のG2484が欠失することにより、フレームシフトをきたし、転写調節領域を持たない変異型RUNX1が形成され、dominant negativeとして機能することが予想された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Kirito K, Sakoe K, Shinoda D, Takiyama Y, Kaushansky K, Komatsu N. A novel RUNX1 mutation in familial platelet disorder with propensity to develop myeloid malignancies. *Haematologica*. 2008;93:155-6.
- Nagai T, Kikuchi S, Ohmine K, Miyoshi T, Nakamura M, Kondo T, Furuyama K, Komatsu N, Ozawa K. Hemin reduces cellular sensitivity to imatinib and anthracyclins via Nrf2. *J Cell Biochem*. 2008 Jan 2; [Epub ahead of print]
- Miyawaki S, Kawai Y, Takeshita A, Komatsu N, Usui N, Arai Y, Ishida F, Morii T, Kano Y, Ogura M, Doki N, Ohno R. Phase I trial of FLAGM with high doses of cytosine arabinoside for relapsed, refractory acute myeloid leukemia: study of the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG). *Int J Hematol*. 2007; 86: 343-7.
- Uchida M, Kirito K, Endo H, Ozawa K, Komatsu N. Activation of FKHL1 plays an important role in protecting erythroid cells from erythropoietin

deprivation-induced apoptosis in a human erythropoietin-dependent leukemia cell line, UT-7/EPO. *Int J Hematol.* 2007; 86: 315-24.

- Kikuchi S, Nagai T, Kunitama M, Kirito K, Ozawa K, Komatsu N. Active FKHRL1 overcomes imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia-derived cell lines via the production of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Sci.* 2007; 98:1949-58.
- Miyoshi T, Nagai T, Kikuchi S, Ohmine K, Nakamura M, Hanafusa T, Komatsu N, Ozawa K. Cloning and characterization of a human BCR/ABL-positive cell line, K562/RR, resistant to the farnesyltransferase inhibition by tipifarnib. *Exp Hematol.* 2007; 35: 1358-65.

2. 学会発表

- Keita Kirito, Toru Mitsumori, Takahiro Nagashima, Masae Kunitama, Kei Nakajima, Kozue Yoshida, Yongzhen Hu, Mitsuhiro Yanagai, and 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. ASH, December 9-12, 2006, Orland, FL
- Keita Kirito, Hu Yongzhen, Kozue Yoshida, Toru Mitsumori, Kei Nakajima, Yumi Nozaki, Takahiro Nagashima, Masae Kunitama, Kumi Sakoe, Norio Komatsu. HIF-1 Supports the Survival of Multiple Myeloma Cells through the Induction of Survivin Gene. ASH, December 8-11, 2007, Atlanta, Georgia
- Nobuyoshi Kosaka, Yusuke Yamamoto, Keiichi Sugiura, Hiroshi Miyazaki, Norio Komatsu, Takahiro Ochiya, Takashi Kato. Regulation of miR-210 Generation in Response to Hypoxia in Erythrocytic Cells. ASH, December 8-11, 2007, Atlanta, Georgia
- Keiichi Sugiura, Nobuyoshi Kosaka, Yusuke Yamamoto, Yusuke Yoshioka, Hiroshi Miyazaki, Norio Komatsu, Takahiro Ochiya, Takashi Kato. Expression of miR-188 and 362 Induced by Erythropoietin Stimulation in a Human Erythrocytic Leukemia Cell Line. ASH, December 8-11, 2007, Atlanta, Georgia

骨髄不全症患者における輸血後鉄過剰症の診療ガイド策定

研究協力者 鈴木 隆浩（自治医科大学医学部内科学講座血液学部門 講師）

研究要旨

昨年度施行した輸血後鉄過剰症全国実態調査の結果を踏まえ、骨髄不全症患者における輸血後鉄過剰症の診療ガイドを策定した。ガイドでは、①骨髄不全に伴う輸血後鉄過剰症の患者で一定の余命が期待できる患者を治療対象とし、②輸血総量 20 単位以上、かつ血清フェリチン値 500 ng/mL 以上を輸血後鉄過剰症の診断基準とする。また、③輸血総量 40 単位以上、血清フェリチン値 1000 ng/mL 以上を鉄キレート療法の開始基準として考慮し、④血清フェリチン値 500 - 1000 ng/mL を目標に治療を行う、ことなどが推奨されている。本診療ガイドは経口鉄キレート剤 deferasirox の導入を控え、今後の鉄キレート療法において極めて有用な診療ガイドになることが期待される。

A. 研究目的

平成 18 年度に我が国初の全国規模の輸血後鉄過剰症全国実態調査を行い、我が国においても輸血後鉄過剰症による心機能低下、肝機能低下が重要な問題になっていることが明らかとなった。輸血後鉄過剰症の唯一の治療法は鉄キレート療法であるが、現在我が国で認可されている鉄キレート剤 deferoxamine は連日使用が必要であるため診療現場では使いにくく、十分な効果を上げていない。近年新規経口鉄キレート剤 deferasirox が開発され、我が国でも近い将来使用可能になると思われる。同薬剤の使用で効果的な鉄キレート療法が可能になると期待されるため、適切な診療の一助にすべく、全国調査から得られた結果を基に、我が国における初の輸血後鉄過剰症の診療ガイドを策定した。

B. 研究方法

昨年度施行した輸血後鉄過剰症全国調査の結果、および鉄過剰症治療の国際ガイドライン案を参考に、我が国の実情に即した診療ガイドを作成した。

C. 研究結果

診療ガイドとして以下の内容を策定した。

①対象患者：

様々な原因による骨髄不全で輸血依存となり、かつ一定の余命が期待できる例。

②輸血後鉄過剰症診断基準

- ・総赤血球輸血量 20 単位（小児の場合ヒト赤血球濃厚液 50 ml/体重 kg）以上 および
- ・血清フェリチン値 500 ng/mL 以上

③鉄キレート療法開始基準

輸血後鉄過剰症において下記の 2 項目を考慮して鉄キレート療法を開始する。

- ・総赤血球輸血量 40 単位（小児の場合ヒト赤血球濃厚液 100 ml/体重 kg）以上
- ・連続する 2 回の測定で（2 ヶ月間以上に亘って）血清フェリチン値 1000 ng/mL 以上。

ただし、1) 慢性的な出血や溶血を伴う場合、2) 現在輸血を受けていない場合（造血幹細胞移植、薬物療法などが奏功した例）、3) 輸血とは無関係に血清フェリチン値が慢性的に高値を示す合併症がある場合（例えばスティル病、血球貧食症候群、悪性腫

瘍など)では臨床情報を総合的に判断して治療を開始する。

④維持基準

鉄キレート剤により、血清フェリチン値を 500 - 1000 ng/mL に維持する。

⑤定期的な検査

鉄過剰症と診断した後は、定期的に血清フェリチン値、心機能・肝機能・耐糖能異常検査を行う。鉄キレート剤開始後は副作用チェックのため以上の検査に加えて、少なくとも年1回、視力検査、聴力検査を行う。

D. 考察

全国調査にて、血清フェリチン値 1000 ng/mL 以上の症例において有意に肝障害などの臓器障害の頻度が高くなること、赤血球輸血量の増大に伴ってフェリチン値は増加し、20 単位の輸血で約 50%、40 単位の輸血で約 75%の患者で血清フェリチン値が 1000 ng/mL を超えることが判明している。以上の結果を踏まえ、我が国における鉄過剰症の診断、治療開始基準として輸血総量 20 - 40 単位、血清フェリチン値 500 - 1000 ng/mL を設定した。また、血清フェリチン値は慢性炎症や慢性出血の存在下では体内の鉄量を反映しない。このため、鉄キレート療法の開始にあたっては、輸血総量とフェリチン値およびその他の臨床情報を参考にした上で治療開始を決定することを推奨しており、可能な限りの確な診断・治療ができるよう配慮している。さらに、鉄過剰症診断後にチェックすべき検査内容を記載して、鉄過剰症による障害や薬剤副作用を早期に発見できるよう配慮した。

E. 結論

我が国初の輸血後鉄過剰症診療ガイドを策定した。本ガイドは経口鉄キレート剤の導入を控え、今

後の鉄キレート療法において極めて有用な診療ガイドになることが期待される。

F. 研究発表

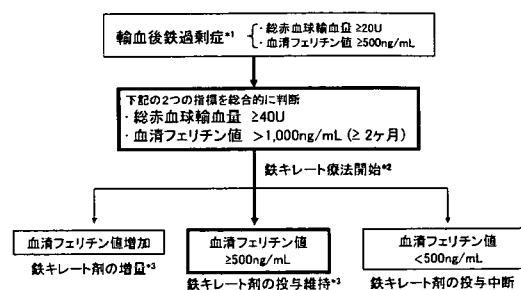
1. 論文発表

- Suzuki T., Tomonaga M., Miyazaki Y., Nakao S., Ohyashiki K., Mtsamura I., Kohgo Y., Niiysu Y., Kojima S., Ozawa K.; Japanese epidemiological survey with consensus statement on Japanese guidelines for treatment of iron overload in bone marrow failure syndromes. Int J Hematol (in press).

輸血後鉄過剰症の診療ガイド(骨子)

対象患者	様々な原因による骨髄不全で輸血依存となり、かつ1年以上の余命が期待できる例
輸血後鉄過剰症診断基準	・総赤血球輸血量20単位(小児の場合、ヒト赤血球濃厚液50mL/体重kg)以上および ・血清フェリチン値 500ng/mL以上
鉄キレート療法開始基準	輸血後鉄過剰症において、下記の1と2を考慮して鉄キレート療法を開始する。 1. 総赤血球輸血量40単位(小児の場合、ヒト赤血球濃厚液100mL/体重kg)以上 2. 連続する2回の測定で(2ヶ月間以上にわたって)血清フェリチン値 >1,000ng/mL
鉄キレート療法開始基準の解説	下記のような場合は、鉄キレート療法の開始にあたり、総輸血量および血清フェリチン値の両方を考慮し、総合的に判断する。 - 慢性的な出血や溶血を伴う場合 - 現在輸血を受けていない場合(造血幹細胞移植、薬物療法などが奏効した例) - 輸血とは無関係に血清フェリチン値が慢性的に高値を示す合併症がある場合(例えば、ステイル病、血球貪食症様群、悪性腫瘍など) なお、鉄キレート療法は、余命1年以上が期待できない患者に対しては推奨されない。
維持基準	・鉄キレート剤により、血清フェリチン値を500-1,000ng/mLに維持する。

輸血後鉄過剰症の診療ガイド(フローチャート)



*: 赤血球輸血依存状態(≥2単位/月の赤血球輸血を6ヶ月以上継続)にあり、1年以上の余命が期待できる例
*: 鉄の体内蓄積量の指標として、少なくとも3ヶ月に1回血清フェリチン値を測定すること。
*: 鉄キレート剤の使用中は、腎機能・肝機能・感覚器に有害事象が出現する可能性があるため、腎機能検査・肝機能検査を定期的に、視力検査・聴力検査を毎年実施すること。

予後不良骨髄異形成症候群に対する骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植に関する研究

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、fludarabine を中心とした移植前治療を用いた骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植の治療成績を検討した。血縁者からの移植では fludarabine+cyclophosphamide (Flu/Cy)、非血縁者からの移植では fludarabine+busulfan (Flu/Bu) を中心とした移植前治療を用いた。班研究と岡山大学において、それぞれ 7 例中 3 例、12 例中 8 例が生存を続けており、高齢や合併症のために従来からの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、Reduced-intensity stem cell transplantation (RIST) によって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「高齢者または臓器障害を有する high-risk 骨髄異形成症候群症例に対する骨髄非破壊的移植前治療を用いた同種末梢血幹細胞移植に関する臨床第 I/II 相試験」、及び岡山大学医学部・歯学部附属病院で同様の症例に行った RIST の成績を解析し、高齢者または臓器障害を有する MDS に対する RIST の安全性と有効性を検討する。

B. 研究方法

HLA 適合同胞末梢血幹細胞移植では、移植前治療として fludarabine (25 mg/m²/day x 5 days) と cyclophosphamide (30 mg/kg/day x 2 days) (Flu/Cy)、GVHD 予防として cyclosporine A と methotrexate (CyA/MTX) を、非血縁骨髄移植では、移植前治療として fludarabine (30 mg/m²/day x 6 days) と busulfan (4 mg/kg/day x 2 days) (Flu/Bu)、GVHD 予防として CyA/MTX、臍帯血移植では、移植前治療として fludarabine (30 mg/m²/day x 6 days)+cyclophosphamide

(25 mg/kg/day x 2 days) +TBI (2 Gy) (Flu/Cy/TBI)、GVHD 予防として cyclosporine A と mycophenolate mofetil (CyA/MMF) を用いた。

C. 研究結果

班研究では、2001 年から 2003 年の間に 7 名 (男性 5 名、女性 2 名、RAEB-t 5 名、RA 1 名、CMML 1 名、年齢中央値 63 (27~67) 歳) が登録された。1 例 (67 歳男性 RAEB-t) が原病悪化のために移植前に死亡し、6 例に対して HLA 一致同胞から末梢血幹細胞移植が行われた。移植された 6 例のうち 3 例は原病の悪化のために、移植後 75、98、200 日目に死亡した。残りの 3 例では、いずれも完全キメラを達成し、平成 19 年 12 月末現在の観察期間は 1681 日、2041 日、2181 日で、寛解を維持して生存している。急性 GVHD は、移植された 6 例のうち 3 例に出現し、I 度が 1 例、III 度が 2 例であった。慢性 GVHD は、評価可能 4 例中 3 例に出現し、いずれも extensive であった。

岡山大学では、2000 年から 2007 年までに 12 名の

MDS 症例 (男性 11 名、女性 1 名、RAEB 7 名、RA 3 名、CMMoL 2 例、年齢中央値 57 (54~68) 歳) に RIST を行った。2 例が原病の悪化により移植後 150 日と 253 日に、1 例が感染症により移植後 17 日に、1 例が閉塞性細気管支炎により移植後 1018 日に死亡したが、8 例が生存している (移植後 130、174、207、377、761、978、1106、1288 日)。

D. 考察

MDS に対する同種造血幹細胞移植は治癒を期待できる治療方法であると考えられている。しかし、MDS の平均発症年齢が高いことから、従来からの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る症例は少ない。今回、特発性造血障害に関する調査研究班と岡山大学において行われてきた、MDS に対する RIST の成績を解析した。血縁者からの末梢血幹細胞移植では Flu/Cy、非血縁者からの骨髄移植では Flu/Bu、臍帯血移植では Flu/Cy/TBI を移植前治療として用いた。班研究と岡山大学において、それぞれ 7 例中 3 例、12 例中 8 例が生存を続けており、高齢や合併症のために従来からの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、RIST によって治療成績を向上できる可能性があることが確認された。MDS の RIST においては、症例の選択、移植の時期、幹細胞のソース (骨髄、末梢血、臍帯血)、移植前治療 (conditioning regimen) の種類、芽球の増加を伴う場合に移植前の化学療法を行うべきか、などに関して引き続き治療研究が必要である。

E. 結論

fludarabine を中心とした移植前治療を用いた同種造血幹細胞移植は、年齢や合併症のために従来の骨髄破壊的移植前治療を用いた同種造血幹細胞の適応とならない MDS において治癒をもたらす可能性の

ある治療である。移植前治療、移植時期、移植の前に化学療法を行うべきかなどについて、引き続き検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Tabayashi T, Ishimaru F, Takata M, Kataoka I, Nakase K, Kozuka T, Tanimoto M. Characterization of the short isoform of Helios overexpressed in patients with T-cell malignancies. *Cancer Sci.* 2007;98(2):182-8.
- Kubonishi S, Kikuchi T, Yamaguchi S, Tamamura H, Fujii N, Watanabe T, Arenzana-Seisdedos F, Ikeda K, Matsui T, Tanimoto M, Katayama Y. Rapid hematopoietic progenitor mobilization by sulfated colominic acid. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;355(4):970-5.
- Ennishi D, Yokoyama M, Mishima Y, Watanabe C, Terui Y, Takahashi S, Takeuchi K, Ikeda K, Tanimoto M, Hatake K. Rituximab plus CHOP as an initial chemotherapy for patients with disseminated MALT lymphoma *Leuk Lymphoma.* 2007;48(11):2241-3.
- Kikuchi T, Kubonishi S, Shibakura M, Namba N, Matsui T, Fukui Y, Tanimoto M, Katayama Y. Dock2 participates in bone marrow lympho hematopoiesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008, 367(1):90-6.

2. 学会発表

- 久保西四郎, 品川克至, 田淵貴大, 杉山暖子, 西森久和, 松岡賢市, 藤井伸治, 前田嘉信, 石丸文彦, 池田和真, 谷本光音: 進行期低悪性度リンパ腫に対する骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植. 第 29 回日本造血細胞移植学会総会 2007.2.17(福岡)

成人骨髄異形成症候群患者を対象とする骨髄破壊的前処置による臍帯血移植の成績

研究協力者	○東條 有伸	(東京大学医科学研究所付属病院	血液・腫瘍内科	教授)
	大井 淳	(東京大学医科学研究所付属病院	血液・腫瘍内科	助教)
	塚田 信弘	(東京大学医科学研究所付属病院	血液・腫瘍内科	助教)
	友成 章	(東京大学医科学研究所付属病院	血液・腫瘍内科	助教)
	高橋 聡	(東京大学医科学研究所付属病院	血液・腫瘍内科	准教授)

研究要旨

当施設で実施した 55 歳以下の成人 MDS 32 例に対する骨髄破壊的前処置後の臍帯血移植成績を解析した。移植片の生着は 29 例で得られ、重症 aGVHD の発症を 4 例に認めた。32 例中 28 例は高悪性度 MDS であったが、5 年無病生存率は $68.1 \pm 9\%$ 、移植関連死および再発の 5 年間累積度数はそれぞれ $16.5 \pm 8\%$ 、 $18.4 \pm 8\%$ と良好であった。以上より、臍帯血は移植適応の MDS 症例において代替ドナーとなりうることを示された。

A. 研究目的

HLA 一致血縁者ドナーからの同種造血幹細胞移植は骨髄異形成症候群(MDS)患者に治癒をもたらす可能性があるが、現実には、概ね 2/3 の症例で移植に適した HLA 一致血縁者ドナーが得られない。近年、非血縁ドナー由来の臍帯血が成人 MDS 患者に対する代替幹細胞ソースとして使用されている。われわれは、今回成人 MDS 患者に対する非血縁者間臍帯血移植(CBT)の成績を解析した。

B. 研究方法

対象は 1998 年 8 月から 2007 年 10 月までの間に東京大学医科学研究所付属病院で非血縁者間臍帯血移植を受けた 32 例の成人 MDS 患者であり、データ解析は 2007 年 11 月 1 日に行った。全ての患者は 4 分割 12Gy の全身放射線照射(TBI)と大量化学療法からなる骨髄破壊的前処置を受けた。また、移植片対宿主病(GVHD)の予防措置として全例が標準的なシクロスポリン(CyA)とメソトレキセートの投与を受け

た。MDS の診断は全例 FAB 分類の基準に準拠し、無病生存率は Kaplan-Meier 法に従って移植時から推定した。

(倫理面への配慮) 本研究は当施設の IRB の承認を受けた臨床プロトコールに従って遂行され、ヘルシンキ宣言に基づいて全ての患者から書面による同意文書を取得した。

C. 研究結果

移植時の診断は、refractory anemia (RA) 4 例、refractory anemia with excess of blasts (RAEB) 7 例、RAEB in transformation (RAEB-t) 2 例、MDS から移行した急性骨髄性白血病(MDS/AML) 19 例である。患者の年齢中央値は 41 歳 (19-52 歳)、体重中央値は 56.5kg (43-75kg)、移植片の凍結前有核細胞数の中央値は $2.43 \times 10^7/\text{kg}$ ($1.17-4.10 \times 10^7/\text{kg}$)、移植片の凍結前 CD34 陽性細胞数の中央値は $0.86 \times 10^7/\text{kg}$ ($0.42-2.14 \times 10^7/\text{kg}$) であった。移植臍帯血ユニットの HLA 適合度を表 1 に示す。32 例中 29 例において骨髄造血の

再構築が得られ、好中球絶対数(ANC) $> 0.5 \times 10^9/L$ 迄の到達期間中央値は22日であった。また、28例で輸血によらない血小板数 $> 50 \times 10^9/L$ が達成され、その期間中央値は47日であった。グレードIII以上の急性GVHDは評価可能な29例中4例で発症し、いっぽう慢性GVHDは評価可能な27例中25例で認められたが、このうち12例は全身型GVHDであった。32例中23例が移植後126日から3533日の時点で無病生存中であり、観察期間中央値2219日での5年無病生存率は $68.1 \pm 9\%$ であった。移植関連死および再発の5年間累積度数はそれぞれ $16.5 \pm 8\%$ 、 $18.4 \pm 8\%$ であった。

表1. 移植臍帯血ユニットのHLA不一致度

HLA-A/B/DR座の不一致度*	症例数
0	0
1	6
2	15
3	9
4	2

*HLA-A/Bは血清型、DRは遺伝子型での判定

D. 考察

TBI併用の骨髄破壊的前処置による生着不全の抑制とCyA+MTXの標準的予防処置による重症GVHDの発症抑制が良好な成績につながったと考えられる。また、cGVHDの発症は高悪性度MDSの移植後再発の抑制に寄与していると推測される。

E. 結論

適切な血縁または非血縁骨髄ドナーのいない成人MDS患者は、移植適応がある場合代替ドナーとしてCBTを考慮すべきであろう。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Tomonari A, Takahashi S, Ooi J, Tsukada N, Konuma T, Kato S, Kasahara S, Iseki T, Yamaguchi T, Tojo A, Asano S. Impact of cytomegalovirus serostatus on outcome of unrelated cord blood transplantation for adults: a single-institute experience in Japan. *Eur J Haematol.* 2007 Dec 19; [Epub ahead of print]
- Tomonari A, Takahashi S, Ooi J, Tsukada N, Konuma T, Kobayashi T, Takasugi K, Iseki T, Tojo A, Asano S. Preemptive therapy with ganciclovir 5 mg/kg once daily for cytomegalovirus infection after unrelated cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2007 Nov 5; [Epub ahead of print]
- Nagamura-Inoue T, Kodo H, Takahashi T, Mugishima H, Tojo A, Asano S. Four cases of donor cell-derived AML following unrelated cord blood transplantation for adult patients: experiences of the Tokyo Cord Blood Bank. *Cytotherapy.* 2007 Oct 4;1-2 [Epub ahead of print]
- Tomonari A, Takahashi S, Ooi J, Tsukada N, Konuma T, Kobayashi T, Sato A, Iseki T, Yamaguchi T, Tojo A, Asano S. Impact of ABO incompatibility on engraftment and transfusion requirement after unrelated cord blood transplantation: a single institute experience in Japan. *Bone Marrow Transplant.* 40:523-8, 2007
- Tomonari A, Tsukada N, Takahashi S, Ooi J, Konuma T, Kobayashi T, Fukuno K, Takasugi K, Fujii T, Endo T, Iwamoto A, Oyaizu N, Tojo A, Asano S. Early-onset pulmonary complication showing organizing pneumonia pattern following cord blood transplantation in adults. *Int J Hematol.* 85:364-6, 2007
- Konuma T, Ooi J, Takahashi S, Tomonari A, Tsukada N, Kobayashi T, Sato A, Tojo A, Asano S. Allogeneic stem cell transplantation for hepatosplenic gammadelta T-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 48:630-2, 2007