

- Takahashi S, Ooi J, Tomonari A, Konuma T, Tsukada N, Oiwa-Monna M, Fukuno K, Uchiyama M, Takasugi K, Iseki T, Tojo A, Yamaguchi T, Asano S. Comparative single-institute analysis of cord blood transplantation from unrelated donors with bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation from related donors in adult patients with hematological malignancies after myeloablative conditioning regimen. *Blood*. 109:1322-30, 2007

2. 学会発表

- Takaaki Konuma, Satoshi Takahashi, Jun Ooi, Akira Tomonari, Nobuhiro Tsukada, Seiko Kato, Maki Oiwa-Monna, Kaoru Uchimaru, Arinobu Tojo, Takuhiro Yamaguchi, Shigetaka Asano. Unrelated Cord Blood Transplantation Using Myeloablative Regimen for Acute Leukemia Patients Aged between 50 and 55 Years: Single Institutional Retrospective Comparison with Patients Less Than 50 Years of Age. 49th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, USA 2007 Dec

本邦における染色体異常 5q-を有する MDS の実態調査（追加解析）

研究協力者 通山 薫（川崎医科大学検査診断学 教授）

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。それに先立って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ところ、平成 19 年 7 月の時点で、5q-を有する MDS 症例 131 例のデータが集積された。IPSS 区分では Low 11 例、Int-1 37 例、Int-2 50 例、High 33 例であった。うち 5q-症候群と思われるのは 18 例であった。2006 年初めの時点で生存・経過観察中の 5q-を有する MDS 登録患者で、IPSS:Low/Int-1 は 29 例であった。なお 29 例中 Hb 10 g/dl 以下で、好中球数と血小板数が保たれている患者は 18 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 例前後と推定される。

5q-を有する MDS 131 例の生命予後は、IPSS では Low/Int-1 と Int-2/High の 2 群に分かれる傾向があり、WPSS に照らしても 2 群に分かれる傾向が示されたが、WPSS のほうが生命予後をより高感度に区分できると考えられた。また単変量および多変量解析によって、芽球増加・予後不良染色体・好中球減少など生存率や白血病移行を左右するリスク因子が抽出された。今後これらの疾患群における治療戦略を立てるうえで、有用な情報が得られた。

A. 研究目的

近年欧米で 5q-を有する MDS に thalidomide 誘導体の lenalidomide が著効を示すことが報告され、本邦でもその導入が期待されている。それに先立って 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ことを目的とした。

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 5 番染色体異常を有する MDS 症例の後方視的調査を実施したところ、平成 19 年 7 月の時点で、予後情報があつた 183 症例が登録

された。この中で 5q-を有する MDS 131 症例（付加的染色体異常をもつ症例も含めて）を主たる解析の対象とした。従って昨年度の本報告よりも症例数が若干増加した。

なお比較対照として 5 番染色体異常のない MDS 375 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。

（倫理面への配慮）

個人情報の秘匿に十分な配慮をおこなった。すなわち患者情報のやりとりには電子メールを用いず、郵送にておこなった。また患者個人情報が含まれたパソコンにはパスワードを設定した。解析結果公表時は個人情報をすべて削除した。

C. 研究結果

5q-を有する MDS で予後情報のある 131 例について、IPSS 区分は Low 11 例、Int-1 37 例、Int-2 50 例、High 33 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 35 例、5q-症候群と思われるのは 18 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 24.2 万/ μ l は特徴的であった。

2006 年初めの時点で生存・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 29 例であった。なお 29 例中 Hb 10 g/dl 以下かつ好中球 750/ μ l 以上、血小板 5 万/ μ l 以上の患者は 18 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 例程度と推定された。

5q-を有する MDS 131 例の生命予後は、IPSS では Low/Int-1 と Int-2/High の 2 群に分かれる傾向があり、WPSS に照らしても 2 群に分かれる傾向が示された。白血病移行例は、IPSS : Low/Int-1 が 48 例中 6 例であったのに対して、WPSS : Very low/Low/Int は 35 例中 1 例のみであった。統計学的解析の結果、5q-を有する MDS 群では WPSS のほうが生存率や白血病移行リスクをより高感度に区分できることがわかった。

さらに統計学的に有意なリスク因子の抽出を試みたところ、単変量解析では芽球増加 (5%以上)・予後不良染色体・血小板輸血依存性が生存率のリスク因子、また好中球減少 (1800/ μ l 未満) が白血病移行のリスク因子であった。また貧血の程度によって生命予後が影響を受ける傾向が見られた。

一方多変量解析では芽球増加 (5%以上)・予後不良染色体・血小板輸血依存性が生存率のリスク因子であり、血小板減少 (10 万/ μ l 未満)・好中球減少 (1800/ μ l 未満)・予後不良染色体が白血病移行の

リスク因子であった。

D. 考察

アンケート方式で患者データの収集をおこなったが、回収率は約 5 割にとどまり、この点で達成率が十分とはいえない結果であるが、解析内容を評価するには、概ね必要なデータを得られたといえる。

本邦における 5q-を有する MDS や 5q-症候群の実態はこれまで不詳であったが、今回の調査でおよその発症頻度を含めて、いくつかの特徴が明らかになった。欧米と異なり本邦ではいわゆる 5q-症候群はごく稀な病型であることがわかった。より広い疾患群として 5q-を有する MDS を解析対象としたところ、生命予後は IPSS では Low/Int-1 と Int-2/High の 2 群に分かれる傾向があり、WPSS に照らしても 2 群に分かれる傾向が示された。とりわけ WPSS のほうが生存率や白血病移行のリスクをより高感度に区分できると考えられた。すなわち今回の症例群においては IPSS に対する WPSS の優位性を示した点にも意義があった。また単変量および多変量解析によって生存率や白血病移行を左右するリスク因子が抽出された。

今後の展望としては、症例のさらなる集積が望まれることと、新規症例はごく短期間の追跡しかできていないので、より長期間の経過観察に基づく調査研究がおこなわれるべきであろう。新規治療が導入されればその成果を含めた治療展開研究が可能となる。

E. 結論

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・予後の後方視的調査をおこない、5q-を有する MDS 131 例の生命予後を解析した。予後予測に WPSS が有用であること、また単変量および多変量解析によって生存率や白血病移行を左右するリスク因子が抽出された。今後これらの

疾患群における治療戦略を立てるうえで、有用な情報が得られた。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

- 田坂大象、岸本光代、辻岡貴之、近藤敏範、松岡亮仁、栃木亜紀、通山 薫、小澤敬也：本邦における染色体異常 5q-を伴う MDS の実態調査. 第 69 回日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学会合同総会, 2007 年 10 月 11 日～13 日, 横浜.

- 花岡伸佳、川口辰哉、堀川健太郎、長倉祥一、続泰史、米村雄士、中熊秀喜：PNH および関連疾患における NKG2D 介在性の造血障害。第 69 回日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学会合同総会, 2007 年 10 月 11 日～13 日, 横浜.
- Hanaoka N, Kawaguchi T, Horikawa K, Nagakura S, Ishihara S, Tsuzuki Y, Yonemura Y, Nakakuma H.: NKG2D-mediated marrow injury in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and its related disorders. The 49th Annual Meeting of the American Society of Hematology, December 8-11, 2007, Atlanta, GA, USA.

HSP47 を標的とする siRNA を用いた骨髄線維症治療の試み

研究協力者 ○新津洋司郎 (札幌医科大学医学部内科学第四講座 教授)
 松永 卓也 (札幌医科大学医学部内科学第四講座)
 渡邊 純一 (札幌医科大学医学部内科学第四講座)

研究要旨

骨髄線維症では、病状の進行に伴い骨髄にコラーゲンの沈着が認められる。HSP47 はコラーゲンの合成過程で細胞内輸送や分子成熟化に必須の分子シャペロンであることから、骨髄のコラーゲン産生細胞において HSP47 の機能を特異的に抑制できれば、骨髄線維症の治療に役立つ可能性がある。以上の背景から、我々は HSP47 を標的とする siRNA (HSP47 siRNA) を用いた骨髄線維症の治療実験を施行した。我々はまず、マウス線維芽細胞株 (NIH3T3) および初代培養のマウス骨髄線維芽細胞を用いて、*in vitro* で HSP47 siRNA の効果を確認した。次に、リポソーム内に HSP47 siRNA を封入した Lip-HSP47 siRNA を作製して、骨髄線維症モデルマウス (トロンボポイエチン遺伝子のトランスジェニックマウス：九州大学病態修復内科原田実根教授、宮崎大学消化器血液内科下田和哉教授より御供与) に静脈内投与し、骨髄のコラーゲン沈着の改善を認めた。Lip-HSP47 siRNA は骨髄線維症の新たな分子標的治療剤となる可能性が考えられる。

A. 研究目的

本研究では、骨髄線維症の新しい分子標的療法として Lip-HSP47siRNA の全身投与療法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

(1) HSP47 siRNA の *in vitro* での効果の検討

マウス線維芽細胞株 (NIH3T3) および初代培養のマウス骨髄線維芽細胞を用いて、*in vitro* で HSP47 siRNA の効果を検討した。NIH3T3 および骨髄線維症のモデルマウスであるトロンボポイエチン遺伝子のトランスジェニックマウス (Shimoda K, Harada M et al. *Leuk Res* 29: 761-769, 2005) の初代培養骨髄線維芽細胞に HSP47 siRNA をリポフェクションし、(i)HSP47 の発現 (Western-blotting), (ii)コラーゲンの産生 (Soluble Collagen Assay), (iii)細胞増幅(WST-1 assay) を測定した。

(2) HSP47 siRNA の *in vivo* での効果の検討

リポソーム内に HSP47 siRNA を封入した Lip-HSP47 siRNA を作製して、上記のトロンボポイエチン遺伝子のトランスジェニックマウスに対して HSP47siRNA(1,200nM x 2回/週, 12回) を静注し、骨髄線維化の改善の程度を検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験のため、特に無し。

C. 研究結果

(1) HSP47 siRNA は、コントロールである Scramble siRNA と比較して、有意に NIH3T3 およびトロンボポイエチン遺伝子のトランスジェニックマウスの初代培養骨髄線維芽細胞における HSP47 の発現を抑制し、コラーゲンの産生を 30% まで抑制し、培養 2 日以降の細胞増殖も抑制した。

(2) HSP47 siRNA は、コントロールである Scramble

siRNA と比較して、トロンボポイエチン遺伝子のトランスジェニックマウスにおける骨髄のコラーゲンの沈着を約 50% 抑制した。

D/E. 考察/結論

以上の結果から、Lip-HSP47 siRNA は骨髄線維症の新たな分子標的治療剤となる可能性が考えられる。今後、副作用及びより効率的な骨髄線維芽細胞への HSP47 siRNA の導入方法 (in vivo) について更に詳細に検討する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Matsunaga T, Fukai F, Miura S, Nakane Y, Owaki T, Kodama H, Tanaka M, Nagaya T, Takimoto R, Takayama T, Niitsu Y. Combination therapy of an anti-cancer drug with the FNIII14 peptide of fibronectin effectively overcomes cell adhesion mediated-drug resistance of acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 2007 Nov 1; [Epub ahead of print]
- Kobune M, Chiba H, Kato J, Kato K, Nakamura K, Kawano Y, Takada K, Takimoto R, Takayama T, Hamada H, Niitsu Y. Wnt3/RhoA/ROCK signaling pathway is involved in adhesion-mediated drug resistance of multiple myeloma in an autocrine mechanism. *Mol Cancer Ther* 2007, 6 (6):1774-1784.
- Kuribayashi K, Nakamura K, Tanaka M, Sato T, Kato J, Sasaki K, Takimoto R, Kogawa K, Terui T, Takayama T, Onuma T, Matsunaga T, Niitsu Y. Essential role of PKC ζ in transducing motility signal induced by superoxide and a chemotactic peptide fMLP. *J Cell Biol* 2007, 176 (7):1049-1060.

2. 学会発表

- Matsunaga T, Fujimi A, Kobune M, Kawano Y, Nagaya

T, Tanaka I, Gasa S, Sakai H, Tsuchida E, Hamada H, Niitsu Y. "Ex vivo large-scale generation of human red blood cells from cord blood CD34⁺ cells by co-culturing with macrophages." The 36th Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology: Hamburg, Germany. (2007年10月)

- Kobune M, Kawano Y, Takimoto R, Matsunaga T, Kato J, Hamada H, Niitsu Y. "Wnt3/RhoA/ROCK signaling pathway is involved in VLA6-dependent adhesion-mediated drug resistance of multiple myeloma." The 49th Annual Meeting of American Society of Hematology: Atlanta, USA. (2007年12月)

「不応性貧血(骨髄異形成症候群)の形態学的異形成に基づく診断確度区分」の提案

研究協力者 松田 晃 (埼玉医科大学国際医療センター血液内科学 教授)

研究要旨

骨髄異形成症候群 (MDS) のための「不応性貧血(骨髄異形成症候群)の形態学的異形成に基づく診断確度区分」を作成し提案した。本診断確度区分では骨髄の芽球比率、形態学的異形成の程度、染色体所見の区分により、MDS の診断確度を ‘Definite’、‘Probable’、‘Possible’ の 3 つに区分し、さらに ‘idiopathic cytopenias of uncertain significance (ICUS)’ の区分を設けた。本報告書ではこの提案の概要を記す。

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部分もある。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、「不応性貧血(骨髄異形成症候群)の形態学的異形成に基づく診断確度区分」を作成し、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)」を昨年度作成した。この(案)を基に、2007年に Valent らにより発表されたコンセンサスレポートと Haase らの染色体所見に関する報告等を加味し、「不応性貧血(骨髄異形成症候群)の形態学的異形成に基づく診断確度区分」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

「不応性貧血 (骨髄異形成症候群) の形態学的異形成に基づく診断確度区分」は 8 つのステップにより構成される。MDS 以外の血球減少症の慎重な除外(ステップ I) から始まる。ステップ I をクリアできた場合に、ステップ II で形態学的異形成の分類、ステップ III でカテゴリー A の異形成の定量的判定、ステップ IV でカテゴリー A と B を合計した各系統の異形成の定量的判定を行い、ステップ V で定量的判定に基づく形態学的異形成の程度 (Grade of dysplasia) を区分する。ステップ VI で染色体所見の区分 (Division of cytogenetic findings) を行う。ステップ VII で骨髄の芽球比率、Grade of dysplasia、Division of cytogenetic findings より診断確度 (Grade of diagnostic accuracy) の評価を行い、MDS の診断確度を ‘Definite’、‘Probable’、‘Possible’ の 3 つに区分し、さらに ‘ICUS’ の区分を設ける。最終的に

WHO 分類を行うこと (ステップ VIII) を原則とする。

■ステップ I : MDS の除外診断のための必要条件

以下の A-E の項目をすべて満たす必要がある。

A. 1 血球系以上の持続する血球減少がある
B. 末梢血と骨髄の芽球比率が 20%未満で、WHO 分類の acute myeloid leukemia with recurrent cytogenetic abnormalities で定義される染色体異常がない。

B. 末梢血の単球数が $1 \times 10^9/L$ 未満である。

D. 血球減少の原因となる他の血液疾患と非血液疾患が除外できる

E. 再生不良性貧血が除外できる

■ステップ II : 形態学的異形成の分類

形態学的異形成をカテゴリー A とカテゴリー B に分類する。

A. カテゴリー A の異形成

MDS に特異性が高いとされる次の 4 種類と定義する。

好中球 :

① hypo-segmented mature neutrophils (pseudo Pelger-Huet anomaly, Pelger)

② degranulation of neutrophils (a- or hypogranular neutrophils, Hypo-Gr)

③ micromegakaryocytes (mMgk)

赤芽球 :

④ ringed sideroblasts (RS)

B. カテゴリー B の異形成

MDS 以外でも出現し、特異性においてカテゴリー A の異形成に劣るが各血球系において 10%以上の頻度で認められる場合は、MDS が示唆される。PAS 陽性赤芽球を除く WHO 分類においてリストアップされた異形成のうち、カテゴリー A 以外のものをカテゴリー B の異形成と定義する。

■ステップ III : カテゴリー A の異形成の定量的判定判定法 :

① hypo-segmented mature neutrophils (Pelger) の頻度

(%) をもとめる。

② degranulation of neutrophils (Hypo-Gr) の頻度 (%) をもとめる。

③ micromegakaryocytes (mMgk) の頻度 (%) をもとめる。

④ ringed sideroblasts (RS) の陽性率 (%) をもとめる。

■ステップ IV : カテゴリー A と B を合計した各系統の異形成の定量的判定

カテゴリー A と B を合計した各系統の異形成の頻度 (%) をもとめる。

■ステップ V : 定量的判定に基づく形態学的異形成の程度の区分

下記の定義で形態学的異形成の程度 (Grade of dysplasia) を 'High'、'Intermediate'、'Low'、'Minimal' に区分する。

High : 下記の 1 または 2 と定義する。

1. カテゴリー A が好中球系で 10%以上 (Pelger が 10%以上または Hypo-Gr が 10%以上) で、かつ巨核球系で 10%以上 (mMgk が 10%以上)

2. カテゴリー A が赤芽球系で 15%以上 (RS が 15%以上)。ただし、RS が 15%以上の所見のみで 'High' と判定する場合は、MDS 以外の鉄芽球形貧血の否定が必要である。

Intermediate :

カテゴリー A+B の頻度が 2~3 血球系で 10%以上

Low :

カテゴリー A+B の頻度が 1 血球系のみで 10%以上

Minimal :

カテゴリー A+B の頻度が 1~3 血球系で 1~9%

■ステップ VI : 染色体所見の区分

染色体所見の区分 (Division of cytogenetic findings) は下記の定義で 'Abnormal'、'Normal'、'Unknown' に区分する。

Abnormal :

MDS 特有のクローン性染色体異常が存在する。

MDS 特有の染色体異常は 5q-, -7/7q-, +8, 20q-, complex、others と定義する。t(8;21)(q22;q22)、t(15;17)(q22;q12)、inv(16)(p13;q22)、t(16;16)(p13;q22) は WHO 分類の定義では AML with recurrent cytogenetic abnormalities となるため、この区分に含めない (ただし、11q23 abnormalities を除く)。

Normal :

染色体異常がない (正常核型)。

Unknown :

分裂細胞などが得られず不明。

■ステップ VII : 診断確度区分

骨髄芽球比率、異形成の程度 (Grade of dysplasia)、染色体所見の区分 (Division of cytogenetic findings) により MDS の診断確度 (diagnostic accuracy) を 'Definite'、'Probable'、'Possible' の3つに区分し、さらに 'ICUS' の区分を設ける。

MDS 診断確度区分 Definite :

次の3つの場合と定義する。

(1) 骨髄芽球比率 : 5~19%の場合

'High'・'Intermediate'・'Low' のいずれかの異形成の程度の区分であれば、染色体所見の区分は 'Abnormal'・'Normal'・'Unknown' にかかわらない。

(2) 骨髄芽球比率 : 0~4%の場合

'High'・'Intermediate'・'Low' のいずれかの異形成の程度の区分であり、かつ染色体所見の区分が 'Abnormal' である。

(3) Grade of dysplasia: 'High' の場合

骨髄芽球比率が 0~19%であれば、染色体所見の区分は 'Abnormal'・'Normal'・'Unknown' にかかわらない。

MDS 診断確度区分 Probable :

骨髄芽球比率が 0~4%、異形成の程度の区分は 'Intermediate' で、染色体所見の区分は 'Normal'

または 'Unknown' の場合。

MDS 診断確度区分 Possible :

骨髄芽球比率が 0~4%、異形成の程度の区分は 'Low' で、染色体所見の区分は 'Normal' または 'Unknown' の場合 (ただし、骨髄が低形成の場合は、AA と低形成 MDS を鑑別する必要がある)。

ICUS : 下記のように定義する。

十分な除外診断が必須で、6ヶ月以上持続する 1~3 血球系の血球減少症を認める。骨髄は正~過形成で芽球比率は 0~4%、染色体所見の区分は 'Normal' または 'Unknown' であり、異形成の程度の区分は 'Minimal' あるいは異形成を認めない。

■ステップ VIII : WHO 分類の実施

'Possible' に区分された例での初回の診断は暫定的なものとする。適切な観察期間 (6ヶ月間) での再検査により診断を確定する。

※ステップ I での十分な検討にもかかわらず、MDS 以外の血球減少症の除外が困難である場合や 'Possible' / 'ICUS' と区分された例では、適切な観察期間での再度の評価が必要である。

D. 考察

我々は、2006年度から不応性貧血 (骨髄異形成症候群) の形態学的診断基準作成のためのワーキンググループを発足させ、形態学的診断基準の確立を目指して、症例の共同鏡検作業と討論をくり返して来た。その結果、形態学的判定の細胞異形成について、MDS に比較的特異性の高い異形成 (カテゴリーA) と、正常人や ACD などの非クローン性の血液疾患においても時に低頻度に見られ、必ずしも MDS に特異性が高いとは言えないが、その頻度が十分高い場合は MDS の存在を示唆する異形成 (カテゴリーB) の二つに区分できると考えるに至った。各カテゴリーの異形成の出現頻度を重視し、異形成の定性的判定ではなく、定量的判定によって形態学的診断につき

まとう検鏡者間の差が最小限となると考えた。10%基準を設けることによって、カテゴリーAのようなMDSに特異性が高い異形成が10%以上存在する場合は、その他のカテゴリーBの異形成を含め、種々の異形成を有する細胞も高頻度に存在しており、クローン性疾患としてのMDSの病態を十分保証できると考えた。‘ICUS’と区分された例に対する再度の評価により、このICUSの意義、ICUSとMDSとの関連などが明らかになる可能性がある。

E. 結論

本診断確度区分により、形態学的診断につきまとう検鏡者間の差が最小限となり、MDSの診断の精度の向上が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 松田晃. 骨髄異形成症候群における形態学診断、分類、予後スコアリングシステムの新たな展開. 臨床血液 48; 1320-1327, 2007.
- Matsuda, A., Jinnai, I., Miyazaki, Y., Tomonaga, M.: Proposals for a grading system for diagnostic accuracy in myelodysplastic syndromes. Clin Leuk, in press.

2. 学会発表

- 松田晃. 骨髄異形成症候群における形態学診断、分類、予後スコアリングシステムの新たな展開. 第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会合同総会, 2007年10月11日～13日, 横浜.
- Matsuda, A., Jinnai, I., Araseki, K., et al.: Proposals of division for diagnostic accuracy in myelodysplastic syndromes. 9th International MDS symposium, May 16-19, 2007, Florence, Italy.

ファンconi貧血(FA)の分子病態に関する研究

研究協力者 山下 孝之 (群馬大学生体調節研究所・遺伝子情報分野 教授)

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 13 個におよぶ FA 蛋白群の一部は、家族性乳がん蛋白 BRCA2, PALB2 等と同一であり、相同組換え DNA 修復に関与する。一方、その他の主要な FA 蛋白の機能は明らかではないが、Pol η , REV1 などの Y-family DNA ポリメラーゼ(Y-Pol)による損傷乗り越え DNA 合成を調節する可能性が示唆されている。今回、私たちは Pol η や REV1 が FA 蛋白と結合することを確認した。また、私たちは分子シャペロン Hsp90 が FA 蛋白を制御することを昨年度に報告したが、Hsp90 が Pol η に結合し、DNA 損傷部位への動員を促進することを新たに見いだした。これらの結果は、Hsp90 が FA 蛋白の機能に種々のレベルで影響することを示唆する。Hsp90 は様々なストレスや化学物質によって活性調節を受けており、FA 蛋白と Y-Pol の制御を介してゲノム安定化に影響する可能性が考えられる。

A. 研究目的

FA の原因遺伝子は、これまでに 13 個が同定されている。このうち 2 個は、家族性乳がん遺伝子 BRCA2, PALB2 と同一であり、相同組換え DNA 修復に関与する。その他の大多数の FA 蛋白は協同して、DNA 損傷応答に関与する FA 経路を形成するが、その機能は十分明らかではない。最近、FA 経路が損傷乗り越え DNA 合成(translesion DNA synthesis, TLS)能を持つ Y-family DNA ポリメラーゼ(Y-Pol)を調節することが示唆されている。

ヒトの Y-Pol として、Pol η , Pol ι , Pol κ , REV1 の 4 種類が知られる。複製中の DNA の損傷部位において、通常の DNA ポリメラーゼの進行はが停止する。この時、複製装置に含まれる PCNA が Rad6/Rad18 によるモノユビキチン化を受け、Y-Pol はユビキチン結合ドメインを介して動員され、複製ポリメラーゼに代わって TLS を行う。TLS は、このようにして DNA 損傷による複製の停止を回避できるが、変異を起こしやすい。

一方、我々は最近、細胞の生存・増殖シグナルを

多面的に制御する分子シャペロン Hsp90 が FA 蛋白のひとつ FANCA に結合し、その安定性と核移行の制御を介して FA 経路の活性を促進することを見いだした。そこで本研究では、(1)Y-Pol と FA 経路の関係と、(2)Hsp90 が Y-Pol による TLS を制御する可能性について、解析を行った。

B. 研究方法

293T 細胞に GFP 融合 Y-Pol 蛋白を安定的に発現させた細胞株を作成し、その細胞抽出物から免疫沈降と western blot を行うことによって、蛋白量や蛋白の結合を解析した。また、細胞を紫外線照射して、GFP-Y-Pol の細胞内動態を蛍光顕微鏡で観察した。

C. 研究結果

293T 細胞で GFP-Pol η と GFP-REV1 を安定に発現する細胞を可溶性分画とクロマチン分画において、これら Y-Pol と FANCA, FANCD2 との結合が見られた。特に、UV 照射によってクロマチン分画における Y-Pol とモノユビキチン化 FANCD2 の結合が増加し

た。次に、GFP-Pol η 、GFP-REV1 が Hsp90 と結合することを見いだした。また、Hsp90 阻害剤は UV 照射による GFP-Pol η 、GFP-REV1 の foci 形成を抑制した。この時、PCNA モノユビキチン化の程度は変化しなかったことから、何らかのメカニズムで Hsp90 が Y-Pol とモノユビキチン化 PCNA の結合を促進することが示唆された。

D. 考察

我々の結果は、Y-Pol と FANCA および FANCD2 が相互作用することを強く示唆する。これまでの報告では、FANCA と FANCD2 は異なる複合体を形成するとされているので、Y-Pol が FANCA、FANCD2 とどのような複合体を形成するのかさらに解析する必要がある。また、このような相互作用が造血細胞でも見られるのか検討する必要がある。

また、これまでの結果より、Hsp90 が FA 経路や Y-Pol の制御を介して、多面的にゲノム安定性を調節する可能性が考えられる。Hsp90 は種々のストレスや化学物質などで発現量や活性の調節を受けており、これらが Hsp90 を介して間接的にゲノム安定性に影響する可能性が考えられる。

E. 結論

Hsp90 は FANCA だけでなく、Y-Pol に結合し、FA 経路と TLS を制御すると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Oda T, Hayano T, Miyaso H, Takahashi T, Yamashita T : Hsp90 regulates the Fanconi anemia DNA damage response pathway. *Blood* 109: 5016-50126, 2007
- Yamashita, T., Oda, T., Sekimoto, T : Hsp90 and the Fanconi anemia pathway: A molecular link between protein quality control and the DNA damage response.

Cell cycle 6:2232-2235, 2007

- Seki S, Ohzeki M, Uchida A, Hirano S, Matsushita N, Kitao H, Oda T, Yamashita T, Kashihara N, Tsubahara A, Takata M, Ishiai M : A requirement of FancL and FancD2 monoubiquitination in DNA repair. *Genes Cells* 12:299-310, 2007
- Yabe M, Yabe H, Hamanoue S, Inoue H, Matsumoto M, Koike T, Ishiguro H, Morimoto T, Arakawa S, Ohshima T, Masukawa A, Miyachi H, Yamashita T, Kato S : In vitro effect of fludarabine, cyclophosphamide, and cytosine arabinoside on chromosome breakage in Fanconi anemia patients: relevance to stem cell transplantation. *Int J Hematol* 85:354-361, 2007

2. 学会発表

- 小田司、山下孝之：分子シャペロン Hsp90 は UV 照射を受けた細胞において DNA ポリメラーゼ η の複製フォーカスへの動員を促進する。第 66 回日本癌学会学術総会 2007 年 10 月 5 日、横浜
- 関本隆志、小田司、山下孝之：分子シャペロン Hsp90 は Translesion synthesis に関与する DNA polymerase-eta の Replication focus への動員に必要である。第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学大会・合同大会 2007 年 12 月 13 日、横浜

IV. 輸血後鉄過剰症の診療ガイド

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	<ul style="list-style-type: none"> ・ 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	<p>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。</p> <ol style="list-style-type: none"> 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	<p>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。</p> <ul style="list-style-type: none"> - 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、スティル病、血球貪食症候群、悪性腫瘍など) <p>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。</p>
維持基準	<ul style="list-style-type: none"> ・ 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。

輸血後鉄過剰症の治療とモニタリング(1)

対象疾患	赤血球輸血依存(月2単位以上の輸血を6ヶ月以上継続と定義)となった患者のうち、一定の余命が期待できる例
対象疾患 に関する 解説	<p>輸血依存となる場合は、例えば以下のようなものが含まれる。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 骨髄異形成症候群 2) 骨髄異形成症候群以外の骨髄不全症候群 <ul style="list-style-type: none"> ・ 再生不良性貧血および類縁疾患(慢性赤芽球癆など) ・ 慢性特発性骨髄線維症 3) 他の二次性骨髄不全 <ul style="list-style-type: none"> ・ がん化学療法に続発する骨髄不全 ・ その他の疾患に合併する骨髄不全

付記: 1)骨髄異形成症候群(MDS)と 2)MDS以外の骨髄不全症候群を区分した理由: 国際的な鉄過剰ガイドラインはMDSに限定しているが、本診療ガイドはMDS以外の骨髄不全も包括するために1)2)として記載した。

輸血後鉄過剰症の治療とモニタリング(2)

鉄過剰治療の目的	<p>輸血依存症例に対する鉄過剰治療とは、鉄の蓄積による、進行性かつ不可逆的な臓器障害のリスクを軽減し、患者の予後とQOLの改善を目指し、血清フェリチン値の低下および臓器障害の軽減などを指標として治療するものである。</p>
輸血依存症例に対するモニタリング	<ul style="list-style-type: none"> 輸血依存となった時点で、鉄蓄積量の指標として、血清フェリチン値を定期的(少なくとも3ヶ月に1回)に測定する。 鉄過剰による臓器障害の有無を確認するために、下記のような検査を輸血依存となった以降定期的に施行することが望ましい。 <ul style="list-style-type: none"> 心機能:心エコー検査等により心機能を評価する。 肝機能:CTまたはMRI、血液生化学的検査(トランスアミナーゼ測定等)により肝機能障害を評価する。 膵内分泌機能:尿糖、血糖、グリコアルブミンなどの測定により耐糖能異常を評価する。

輸血後鉄過剰症の治療とモニタリング(3)

鉄過剰の診断基準	<p>下記の2項目に当てはまる場合には輸血後鉄過剰症と診断する。</p> <ul style="list-style-type: none"> 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 血清フェリチン値(SF) 500ng/mL以上 										
鉄過剰の重症度基準	<p>鉄過剰症の病態を把握するために、下記のように重症度基準を設ける。</p> <ul style="list-style-type: none"> 血清フェリチンの値に基づき下表のようにStage1~4に分類する。 鉄過剰との関連性が疑われる(すなわちSF値の上昇や輸血歴とともに出現または増悪する)心機能・肝機能・膵内分泌機能の障害について、明らかな臓器障害が認められない場合をA、認められる場合をBとし、Stageと併記する。(例:Stage 1A) <p>心機能障害:LVEF<50%</p> <p>肝機能障害:肝酵素異常・肝線維化・肝硬変の所見</p> <p>膵内分泌機能障害:耐糖能低下の所見</p> <table border="1" data-bbox="964 1778 1375 2063"> <thead> <tr> <th>SF</th> <th>Staging</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>> 500ng/ml</td> <td>Stage 1</td> </tr> <tr> <td>> 1,000ng/ml</td> <td>Stage 2</td> </tr> <tr> <td>> 2,500ng/ml</td> <td>Stage 3</td> </tr> <tr> <td>> 5,000ng/ml</td> <td>Stage 4</td> </tr> </tbody> </table>	SF	Staging	> 500ng/ml	Stage 1	> 1,000ng/ml	Stage 2	> 2,500ng/ml	Stage 3	> 5,000ng/ml	Stage 4
SF	Staging										
> 500ng/ml	Stage 1										
> 1,000ng/ml	Stage 2										
> 2,500ng/ml	Stage 3										
> 5,000ng/ml	Stage 4										

輸血後鉄過剰症の治療とモニタリング(4)

鉄過剰治療	<p>鉄キレート剤を用いる。</p> <p>鉄キレート剤治療開始時は必要に応じ(鉄過剰症診断が困難な場合等)、血液専門医に相談することが望ましい。</p> <p><補足></p> <ul style="list-style-type: none"> • 瀉血療法は輸血依存の難治性貧血において適応とならない。 	
鉄キレート療法開始基準	<p>推奨</p> <p>輸血後鉄過剰症において、下記の1・2を考慮して鉄キレート療法を開始する。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 総赤血球輸血量40単位以上 (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 	<p>経過観察</p> <p>右記1,2のいずれにも当てはまらない場合は、モニタリングを継続する。</p>

輸血後鉄過剰症の治療とモニタリング(5)

鉄キレート療法開始基準に関する解説	<ul style="list-style-type: none"> • 下記のような場合には、鉄キレート療法の開始にあたり総赤血球輸血量(40単位)および血清フェリチン値(SF > 1,000ng/mL)の両方を考慮する。 <ul style="list-style-type: none"> - 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SF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、血球貪食症候群、悪性腫瘍など) • 鉄キレート療法は、原疾患・重篤な合併症などにより余命1年以上が期待できない患者に対しては推奨されない。
-------------------	--

輸血後鉄過剰症の治療とモニタリング(6)

鉄キレート療法開始基準に関する解説	<ul style="list-style-type: none"> • 本邦における疫学調査の結果、臨床的異常を示した症例の90%以上でSFが1,000ng/mLを超えており、SFが1,000ng/mLを超えるとSFの上昇とともに肝機能障害を有する症例が増加する傾向が認められた。そのため鉄キレート療法はSFが1,000ng/mLを越えた時点で開始することが推奨される。また、75%の患者がSF>1,000ng/mLとなる総赤血球輸血量は40単位と推定されたため、1と2はほぼ同程度の臨床的意義をもつ指標と考えられる。 • SFは体内の鉄量の指標として完璧ではないが、有用・簡便かつ信頼できるものである。定期的に測定されるSF値が持続的に1,000ng/mL以上であった場合、体内に過剰な鉄が蓄積している可能性が高い。 • 一般に鉄過剰は慢性的に進行するため、生存期間の長い症例ほど鉄過剰症が生存およびQOLに及ぼす悪影響は大きい。このような例では鉄キレート療法による臨床的有用性が特に大きいと考えられる。
維持基準	<ul style="list-style-type: none"> • 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。

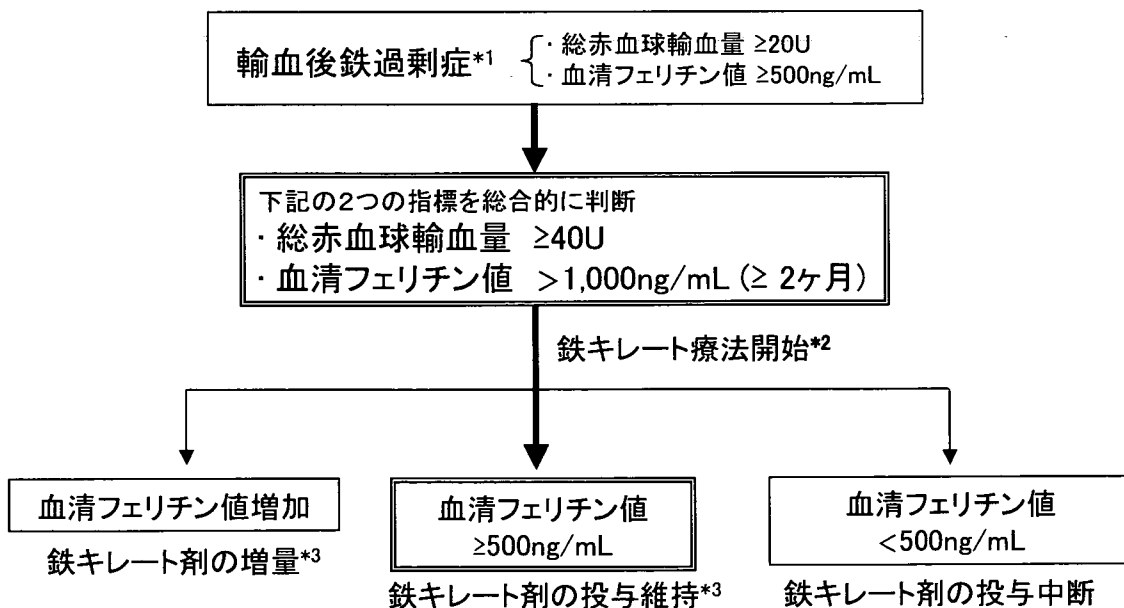
輸血後鉄過剰症の治療とモニタリング(7)

鉄過剰モニタリング	<ul style="list-style-type: none"> • 輸血依存症例に対するモニタリングと同様の検査を継続する。 • 鉄キレート剤を用いた場合には、一般に腎・肝・感覚器に有害事象が出現する可能性があるため、腎機能・肝機能・視力検査・聴力検査を定期的実施する。実施項目および頻度は各薬剤の添付文書の推奨に従う。 • 他の検査項目については各薬剤の添付文書の推奨に従う。
鉄キレート剤治療効果維持	<ul style="list-style-type: none"> • 鉄キレート剤開始(または増量後)3-6ヶ月経過してもSFの増加傾向が認められる場合には、鉄キレート剤を増量する。 • ただし、輸血頻度が低い(月2単位以下)または現在輸血を実施していない場合には、鉄キレート剤を慎重に増量する。投与方法に関しては各薬剤の添付文書に準拠する。

輸血後鉄過剰症の治療とモニタリング(8)

鉄キレート剤 治療安全性維持	<ul style="list-style-type: none"> • SFが継続して500ng/mLを下回った場合には鉄キレート剤を中断する。 • 血清クレアチニンが持続的に上昇した場合は鉄キレート剤を減量又は休薬する。腎機能障害のある患者や、腎機能低下を誘発する薬剤を投与中の患者では、治療開始又は投与量変更後1ヵ月間は毎週血清クレアチニンを測定する。 • 本薬剤に起因した血清トランスアミナーゼの持続的な上昇が認められた場合には鉄キレート剤を休薬し、適切な処置を行う。肝機能検査値異常の原因が判明し、肝機能検査値が正常化した後、減量して治療を再開する。 • 難聴及び水晶体混濁が報告されているため、鉄キレート剤投与開始前及び投与後は定期的(12ヵ月毎)に聴力検査及び眼科的検査(眼底検査を含む)を行い、異常が認められた場合には減量又は休薬し、適切な処置を行う。 • 鉄過剰症の小児患者においては、成長障害の早期発見のため、体重、身長、二次性徴を定期的(12ヵ月ごと)にモニタリングする。
-------------------	--

輸血後鉄過剰症の診療ガイド(フローチャート)



*1: 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

*2: 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。

*3: 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。