

研究協力者 梶井英治 (自治医科大学地域医療学センター教授)、亀崎豊実、小山田隆

## 研究要旨

Coombs陰性AIHA診断における赤血球結合IgG量の適切なカットオフ値の設定を目的にCoombs陰性溶血性貧血140例の検討を行ったところ、カットオフ値65以上で感度78%、特異度75%、尤度比3.1であった。性別・年齢別のカットオフ値を設定すると、より良好な尤度比が得られた。2006年度依頼Coombs陰性症例41例に当カットオフ値を適応したところ、偽陰性5例は全例ステロイド治療中であり、治療前の31例についてみると感度100%、特異度94%、尤度比16.7であった。性・年齢を考慮したカットオフ値の設定により、Coombs陰性AIHA診断における赤血球結合IgG定量は高い有用性を示し、治療前に検査を行った場合にはgold standardとして利用できる可能性が示唆された。

## A. 研究目的

温式AIHA症例の1-10%にCoombs陰性AIHAが存在し、赤血球結合IgG(RBC-IgG)定量が診断に有用とされているが、診断のgold standardとして確立されていない。昨年、報告したように、Coombs陰性AIHAはCoombs陽性AIHAと同様に良好なステロイド反応性を示すことから、直接抗グロブリン試験(DAT: Coombs試験)陰性の溶血性貧血の診療において、AIHAの診断を積極的に進めることは治療の選択に重要である。

今回、Coombs陰性AIHA診断におけるRBC-IgG量の適切なカットオフ値の設定を目的にDAT陰性溶血性貧血140例の検討を行った。

## B. 研究方法

2003年から2006年の4年間に、当教室に精査依頼のあった溶血性貧血245症例(261検体)について、依頼から約1年後に臨床診断について主治医へアンケート調査を行った。

依頼された検体については、immunoradiometric assay法を用いてRBC-IgG定量を行った。

本研究は、自治医科大学臨床研究倫理審査委員会および生命倫理委員会で承認されている(臨A07-63号)。

## C. 研究結果

アンケートへの回答は192例(78%)であった。その144例がDAT陰性であり、臨床的にAIHAと診断された症例は68例(温式64例、冷式4例)、DAT陰性非AIHAは76例であった(DAT陰性溶血性貧血140例)。

DAT陰性溶血性貧血140例においてCoombs陰性AIHAと非AIHAの間で検査値を比較すると、%Retic、MCV、LDH、IDBil、RBC-IgGで有意な差が認められた。有意差を認めた検査項目について、Coombs陰性AIHA診断における感度・特異度・尤度比、ROC曲線下面積を求めたところ、RBC-IgGでのみ、カットオフ値83以上で感度70%、特異84%、尤度比4.8と有用性が認められた。

Coombs陰性AIHA症例におけるRBC-IgGの分布は性・年齢に特異的であり、Coombs陽性AIHAでの報告と同じ傾向を認めた。この性別・年齢別分布を考慮して、カットオフ値(男性60歳未満:60以上、60歳

以上:102以上、女性45歳未満:96以上、45歳以上:128以上)を設定すると、感度71%、特異度88%、尤度比5.9と良好な尤度比が得られた。

2006年度依頼DAT陰性症例41例に当カットオフ値を適応したところ、感度77%、特異度90%、尤度比7.7であり、偽陰性5例は全例ステロイド治療中であった。治療前の31例についてみると、性・年齢の区別なく、カットオフ値78.5で感度100%、特異度94%、尤度比16.7であった。

#### D. 考察

AIHAの第一選択薬はステロイド薬であるが、同時に重篤な副作用も知られている。DAT陰性溶血性貧血の診療において、AIHAと他の溶血性貧血を鑑別することは、治療薬選択の判断に重要である。

以前に我々は、健常人のRBC-IgG量(33±13)とDAT陽性限界のRBC-IgG量(335±72)を報告した。DAT陰性溶血性疾患患者においては、非AIHA例で健常人よりも高値を示す例やCoombs陰性AIHA例において正常域近くの値を示す例も認められることから、実際の診療においては健常人の正常値よりもDAT陰性溶血性貧血患者においてカットオフ値を計算することが必要と考えられる。現時点でのAIHA診断のgold standardが存在しないことから、主治医による検査依頼から1年後の臨床診断をAIHA診断のgold standardとして、性・年齢で層別化してカットオフ値を算出すると、RBC-IgG量が性・年齢に特異的な分布を示すことから、より良好な有用性が認められた。さらに、ステロイド治療群ではRBC-IgG量は正常値からAIHA領域まで幅広く分布しており、無治療群では性・年齢に関係なくカットオフ値78.5で高い有用性を指名した。溶血を引き起こす閾値が、性・年齢に依存しない存在することが予想された。

#### E. 結論

DAT陰性溶血性貧血140例において、Coombs陰性

AIHA診断におけるRBC-IgG検査の感度・特異度・カットオフ値を算出した。性・年齢を考慮したカットオフ値の設定により、Coombs陰性AIHA診断においてRBC-IgGは高い有用性を示した。治療前に検査を行った場合には、gold standardとして利用できる可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

● Kamesaki T, Oyamada T, Omine M, Ozawa K, Kajii E. Cut-off value of red-blood-cell-bound IgG for the diagnosis of Coombs-negative autoimmune hemolytic anemia. *Am J Hematol.* 2009; 84(2):98-101.

● 亀崎豊実, 梶井英治. 自己免疫性溶血性貧血診療の病態と診断. *臨床血液.* 2008;49(10):1322-1329.

##### 2. 学会発表

● 亀崎豊実, 小山田隆, 梶井英治. Coombs陰性自己免疫性溶血性貧血診断における赤血球結合IgGカットオフ値. 第70回日本血液学会総会, 2008年10月11日, 京都.

● 高橋裕志, 池田和彦, 高橋直人, 亀岡淳一, 田嶋克史, 村井一範, 玉井佳子, 七島晶子, 阿久津和子, 野地秀義, 岡本正俊, 木村秀夫, 小山田隆, 亀崎豊実, 梶井英治, 竹石恭知, 佐々木毅, 澤田賢一, 七島勉. 後天性骨髄不全症候群症例における血清ハプトグロビン値の意義. 第70回日本血液学会総会, 2008年10月11日, 京都.

細胞周期プロファイリング(C2P) 技術を用いた骨髄異形成症候群(MDS/AML)と de novo AML の  
生物学的差異に関する検討

研究協力者 金丸 昭久 (近畿大学医学部 血液内科 教授)

研究要旨

骨髄異形成症候群(MDS)は RA などの造血不全から、急性白血病(AML)との区別が芽球%の差に過ぎない RAEB や CMMoL などの前白血病状態までを含む、きわめて広い疾患概念で捉えられる。一般的に AML へと進展した MDS においては化学療法に抵抗性を示し、その治療成績は十分であるとはいえない。AML に進展しやすいとされる High-risk MDS における臨床的に有用な進展マーカーや予後マーカーを同定することは、臨床的にも重要な課題である。今回、我々は de novo AML、MDS/AML 症例において細胞周期関連タンパクに着目した技術を用い、新たな進展因子・予後因子の同定を試みたので報告する。

A. 研究目的

MDS は、「不応性貧血」と「前白血病状態」という二つの臨床的特徴を持つ。白血病に移行しやすい High-risk MDS 症例においても、これまでにいくつかの病勢進展マーカーや予後マーカーが報告されているが、臨床応用という点では、現状でも十分とはいえず、新たなマーカーが必要とされている。「細胞周期プロファイリング (C2P) 技術」は、2005 年シスメックス株式会社により開発され、早期乳がん患者術後の再発リスクの判定を可能にした技術であるが、シスメックス社が開発したタンパクチップを使用するため従来のタンパク質定量方法に比べ、短時間・低コストで解析が可能である。現在我々は、この技術を造血器腫瘍に応用し、造血器腫瘍の新たな病勢進展マーカーや予後マーカーの同定を試みている。今回、我々は C2P 技術により de novo AML、MDS/AML 患者における細胞周期関連タンパクの発現パターンを検討した。

B. 研究方法

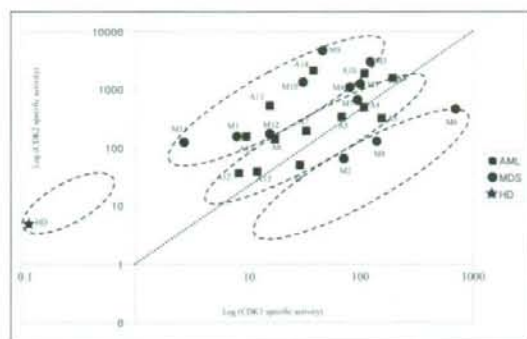
同意を得た患者から採取した検体を比重遠心法により効率的に芽球分画を分離する「Blast retriever」

にて処理した後、(シスメックス社にて)可溶化し各細胞周期関連タンパク質が固層化されたタンパク質チップ上に添加、Kinase activity (mIU/ug lysate) および Protein Expression (U/ug lysate) を測定・解析した。G1/S 期と G2/M 期に関与する細胞周期関連タンパクとして、各々 CDK 1,2,4,6 およびサイクリン B1, D, E, p16, p21, p27 に着目して測定した。また分離された芽球はサイトスピン標本にした後、ギムザ染色し目視にて確認した。

C. 研究結果

前回の報告より症例を蓄積し、27 症例の患者の骨髄検体を用いて解析を行った。このうち、de novo AML 症例は 15 例、MDS/AML 症例は 12 例であった。陰性コントロールとして健常人 CD34 陽性細胞 1 例。今回測定した細胞周期関連タンパク質の中から CDK2/1 比に着目したところ、MDS/AML 症例ではカットラインにより A グループ(CDK2>CDK1)と B グループ(CDK2<CDK1)に層別化できる可能性が示唆された。de novo AML 症例では、CDK2 と CDK1 の双方の activity が高い症例が多く認められた(図)。

図. CDK2/1比の解析結果



High-risk MDSでは、AMLと異なるCDK2/1比活性パターンを示す。

A:AML M:MDS HD:Healthy Donor

#### D. 考察

今回は高リスク MDS ないし白血病へ移行の症例を対象に、細胞周期関連蛋白の発現と機能を定型的 AML と比較で網羅的に解析して、幾らかの知見を得たが、乳癌症例では、CDK2/1 比の高い症例は化学療法後の再発率が高い傾向が報告されている。MDS/AML 症例は、乳癌症例と同様に、CDK2/1 比の高い症例と低い症例で層別化できる可能性があり、今後化学療法への反応性を含む臨床的背景を検討する予定である。また一方、治療の最終標的は白血病幹細胞であるとする認識が高まりつつある。現時点では技術的に微小の細胞集団の解析は困難であるが、方法論の改良をはかり、分画した幹細胞集団と増殖ブールの分裂周期蛋白の動態を検討したいと考えている。その技術改良が実現できれば、低リスク MDS の芽球分画と芽球量の多い高リスク例のそれとの比較も容易に定量できるものと想定でき、MDS の進展機構の一端を細胞周期関連蛋白の発現パターンから解明できることが期待される。

#### E. 結論

MDS/AML 症例は、CDK2/1 比によって患者を層別化できる可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

該当なし

#### 2. 学会発表

- 森田泰慶、平瀬主税、辰巳陽一、松嶋朋子、石原英幹、前田裕弘、金丸昭久、細胞周期プロファイリング技術(C2P)を用いた骨髄異形成症候群(MDS/AML)の予後規定因子の検討 第70回日本血液学会総会

研究協力者 唐沢 正光 (群馬大学医学部附属病院輸血部 准教授)

### 研究要旨

骨髄異形性症候群(MDS)や急性骨髄性白血病(AML)が多発する稀な家系の存在が知られている。しかし、最近の少子化や核家族化などにより、このような家系の多数例での解析がますます困難となっている。われわれはMDS/AMLを多発した2家系を経験し、4から5世代にわたる詳細な家族歴を確定できた。これらの家系内に共通する遺伝子変異の同定は家族性だけでなく、MDS/AML孤発例における発症要因の解明にも有用な情報をもたらすものと期待される。

#### A. 研究目的

2家系におけるMDS, AMLおよびその他の血液疾患の発生状況を詳細に検討した。

#### B. 研究方法

発症例から血液および爪からDNAを抽出した。後者はgermline mutation, 前者はgermline mutation±somatic mutationの検索のために用い、比較検討する。増幅した候補遺伝子の塩基配列を決定し、変異の有無を明らかとする。

(倫理面への配慮)

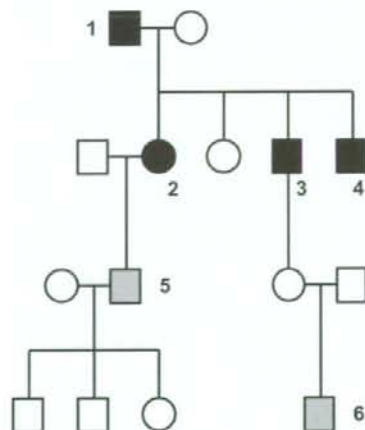
本研究は当大学の倫理委員会において承認され、対象者に文書による説明・同意を得た上で行われた。

#### C. 研究結果

白血病化した症例を黒で、他の血液疾患を発症した症例を灰色で示した。2家系とも常染色体優性遺伝と考えられる遺伝形式を示した。

AMLに移行, 症例5:白血球減少症, 症例6:3歳で悪性リンパ腫に罹患するも現在まで完全寛解。AMLを発症した症例2, 4は治療により完全寛解となっている。白血病に移行した年齢は60歳以上と、家系2と比べて高齢である。また、白血病発症以前に血球減少の時期をすべての白血化例で経験している。

家系1



#### [家系1]

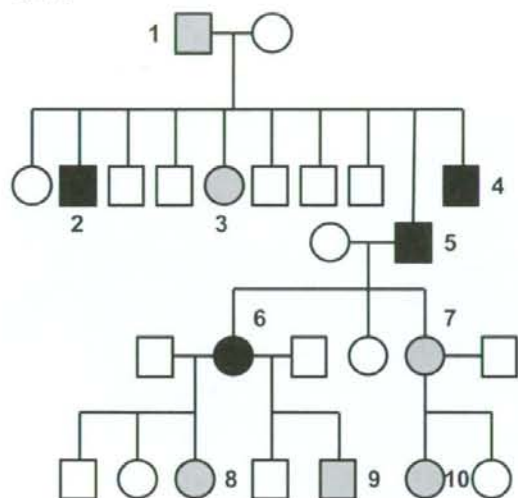
症例1:再生不良性貧血よりAMLに移行, 症例:汎血球減少症よりAMLに移行, 症例3, 4:MDSより

#### [家系2]

症例1:貧血, 症例2, 4, 5, 6が白血病を発症, 症

例 3 : 汎血球減少症, 症例 7, 8, 9, 10 : 血小板減少症。白血化例は 12~35 歳で発症している。症例 6 は白血化前に約 30 年におよび特発性血小板減少症と診断されていた。家系 1 と比べて血小板減少の症例が多く, 白血化例は治療抵抗性であった。

家系 2



#### D. 考察

Diamond-Blackfan anemia, Sewachman-Diamond syndrome, dyskeratosis congenita, Fanconi anemia および Bloom syndrome などの特定の遺伝性症候群に MDS および AML が多発することは良く知られている。しかし,このような遺伝性疾患を伴わないにもかかわらず MDS/AML が多発する稀な家系が報告されている。現時点でこの原因遺伝子として同定されているのは familial thrombocytopenia with propensity to develop AML (FPD/AML)における Runx1 と familial AML における CEBPA の二つの遺伝子である。症候群に伴う遺伝子変異は孤発例の AML では殆ど認められないのに対し, Runx1 および CEBPA の異常は通常の AML 例でもよく見られるといった特徴がある。このため, 後者の解析は AML 発症の解明により

有用であると考えられる。われわれが経験した家系も, 出生時には何の異常も示さなかったが, 小児期を過ぎてから MDS/AML を発症している。いわゆる "pure familial leukemia" と診断される。家系 2 は FPD/AML と考えられるため, RUNX1 を中心に検索を進めている。家系 1 は AML 発症前に血球減少の時期を経ているので, 骨髄不全症候群において変異が報告されている遺伝子などの検索を予定している。

#### E. 結論

Pure familial leukemia 家系の遺伝子変異の解明は通常の MDS/AML の病態の解明にも大きく寄与するものと考えられる。今回の 2 家系は遺伝性であることが明らかであるため, 詳細に候補遺伝子の検索を行っている。

#### F. 研究発表

1. 論文発表なし。
2. 学会発表なし。

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

我々は GPI 欠損細胞においてのみ PIG-A の異常に加え 12 番染色体に異常のある PNH 2 症例の解析から候補遺伝子 *HMGA2* を同定し、この 2 症例については *HMGA2* の高発現が PNH 細胞の腫瘍性増殖に関与していると考えられることを報告した。我々は染色体異常を持たない PNH 患者においても、その異常細胞のクローン性増殖に *HMGA2* が関与しているかを検証するため、患者の末梢血、骨髄における *HMGA2* の発現を解析し、患者の末梢血において *HMGA2* の発現が有意に高いことを見いだした。

### A. 研究目的

PNH において、GPI アンカー欠損細胞の拡大機序として免疫的機序による選択に加えて、良性腫瘍性増殖を起こす遺伝子変異が関与しているかを検証する事を目的としている。12 番染色体に異常のある 2 症例の解析から候補遺伝子 *HMGA2* を同定し、この 2 症例については *HMGA2* の高発現が GPI 欠損細胞の拡大に関与していることが示唆された。一方染色体異常を持たない PNH 患者において、そのクローン性増殖に *HMGA2* が関与しているか、患者サンプルを使って解析した。

### B. 研究方法

末梢血と骨髄における *HMGA2* の発現を再現よく解析するためにサンプルの輸送方法、RNA の抽出方法、定量 RT-PCR の方法を確立した。RNA の安定化剤が入っている Paxgene 採血管で末梢血を採取し、推奨のキットを使って全血から RNA を抽出し、定量 RT-PCR を行ったところ、前述の染色体異常をもつ患者の末梢血において正常人に比して有意に発現の亢進が検出できたことより、解析方法の確立を確認した。協力機関から末梢血の顆粒球における GPI 欠損細胞の割合が 80%以上の患者の末梢血、骨髄血の提供を受け、上記の方法により、解析した。骨髄サン

プルについては、骨髄用の Paxgene 採血管を使い、同様に解析した。また、同じサンプルより miRNA を抽出し、*HMGA2* の発現制御に関わる *let7* の定量 PCR を行った。

(倫理面への配慮)

各協力機関および、当研究所の倫理委員会の承認のもとに、患者、および正常者のインフォームドコンセントを得て、患者サンプルを解析した。

### C. 研究結果

PNH 患者 21 人、正常人 14 人の両者の末梢血において、3' UTR を欠く短い splice variant が優位に発現していたが、その発現量は PNH 患者で有意に高かった。(relative mRNA expression, PNH  $1.7 \pm 0.9$  vs normal  $0.4 \pm 0.2$ ,  $p < 0.05$ ) 一方、PNH 患者 17 人、正常人 7 人の骨髄では両者とも full transcript が有意に発現し、その発現量は両者に有意差はなかった。

(relative mRNA expression, PNH  $9.2 \pm 2.0$  vs normal  $9.2 \pm 2.1$ ) (2009 年 1 月の班会議では PNH 患者で有意に亢進していると発表したが、サンプル数を追加して再検すると有意差が無いことが確定した。)

さらに PNH 患者 21 人、正常人 12 人の末梢血における *let7* family の発現を RT-PCR で解析したところ *let7 b* と *c* の発現量が PNH 患者において有意に低

下していた。(relative miRNA expression, PNH  $0.6 \pm 0.4$  vs normal  $3.4 \pm 3.4$ ,  $p < 0.01$ ) 他の *let7* isoform (a,d,e,98mir)については有意差は認められなかった。骨髓における発現量は両者とも末梢血の1%程度であり、両者に有意差は認められなかった。

#### D. 考察

*HMGA2* は、良性の間葉系腫瘍の発症に関わることが知られている。末梢血で *HMGA2* の発現が亢進していることから、異常クローンが良性腫瘍様増殖を起こし、PNH 発症に関与する可能性が示唆された。実際のクローン拡大の場である骨髓では有意差が認められなかったがこれは *HMGA2* が造血中には一定レベル発現しているためにPNHクローンでの発症亢進がマスクされているためと考える。また、*HMGA2* の発現を負に制御する *let7b,c* の発現がPNHの患者の末梢血で低下していることは、興味深い。末梢血では *let7* の制御を受けない3'UTRを欠く短い splice variant が優位に発現しており、直ちに関連を説明できない。今後様々な角度から有意差の見えている現象を検証し、missing link をつなげたいと考えている。

#### E. 結論

染色体異常のないPNH症例においても、その発症に *HMGA2* の亢進に関与している可能性があることがわかった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 村上良子 他：発作性夜間血色素尿症患者における *HMGA2* の発現について 第45回 補体シンポジウム 2008年.
- Yoshiko Murakami et al: Expression of *HMGA2* in

blood cells from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: XXII<sup>th</sup> International Complement Workshop in Basel, 2008

- Yoshiko Murakami et al: Expression of *HMGA2* in blood cells from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: 50th ASH Annual Meeting in San Francisco, 2008.
- Yoshiko Murakami et al: Expression of *HMGA2* in blood cells from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: The 81<sup>st</sup> Annual meeting of the Japanese Biochemical Society in Kobe, 2008.



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 (広島大学原爆放射線医科学研究所血液内科 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

AML1/RUNX1 遺伝子点変異は MDS/AML の約 20% に認められ、N 末ラントドメイン内変異(Ni 型) と C 末欠損型変異(Ct 型) に大別し、Ni 型は低形成性白血病様、Ct 型は MDS/MPD 様と全く異なる臨床病態を呈し、*in vitro* で臍帯血 CD34 陽性細胞に変異を導入することにより再現できた。Ni 型の場合には発症には付加遺伝子異常が必須と推測され、Ct 型は変異のみで付加的遺伝子異常を必要とせず、発症に至る可能性が考えられた。

### A. 研究目的

AML1/RUNX1 遺伝子点変異は MDS/AML の約 20% に、治療関連 MDS (tMDS/AML) や被爆者 MDS/AML においては約 40% 程度に認められ、RTK(receptor tyrosine kinase)~RAS 経路の活性化を高率に伴う。AML1 変異 MDS/AML では変異体の生化学的機能はいずれも低下~消失しており、臨床病態は均一とは言えない。今回 AML1 点変異型による臨床病態の違いに着目し、それぞれの AML1 点変異がヒト造血幹細胞の分化・増殖にどのような影響を及ぼすかを検討して、AML1 点変異を有する MDS/AML の発症機構解明を試みた。

### B. 研究方法

AML1 点変異症例を部位と変異体のサイズにより (1)ラントドメイン内変異(Ni 型) (ミスセンス変異と微少な挿入によるインフレーム変異) と (2)C 末欠損型変異(Ct 型) に大別し、臨床病態や遺伝子異常を比較した。Ni 型の代表として D171N 変異体、Ct 型の代表として S291fsX300 変異体及び野生型 AML1(WT)を pMXs.IG レトロウイルスベクターに導入構築し、ヒト臍帯血 CD34<sup>+</sup>細胞に導入した。各 GFP 陽性細胞をソーティングし、サイトカインとして

SCF、TPO、FLT-3 に加えて半固型培養では EPO と IL-6 も加えて、メチルセルロース及び液体培地で培養し、mock 細胞と比較解析した。

#### (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。臍帯血提供者及び患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した。

### C. 研究結果

#### 1. 臨床所見

Ni 型 11 例 (男性 7 例、女性 4 例: 年齢中央値 61 才) と Ct 型 7 例 (男性 5 例、女性 2 例: 年齢中央値 70 才) について検討した。両型とも 3 血球系に形態異常を認めた。Ni 型は骨髄低形成と末梢血で汎血球減少を呈し、肝脾腫を有する例はなかった。一方、Ct 型は正~過形成骨髄で、末梢血の白血球数、血小板数は Ni 型に比し有意に高値であり、肝脾腫を 3/7 例に脾腫を全例に認めた。MDS 関連の遺伝子変異は Ni 型では N-RAS、SHP2、FLT-3 などの RTK-RAS 経路の遺伝子変異が 6/11 例に認められたのに対し、Ct 型では 1/7 例のみに認められた。染色体異常は Ni 型

では7/11例に7番の異常や複雑核型を中心とした異常が認められたのに対し、Ct型では2/7に7番の異常や複雑核型を含まない異常が見られたのみであった。

## 2. AML1 変異導入 CD34 陽性細胞の解析

コロニー形成能では、WTでBFU-Eが優位であったのに対し、D171NとS291fsではCFU-GMが優位であった。Replating assayではWTで0回、D171Nで2回、S291fsで3回のreplatingが可能であった。次に液体培養では、WTで増殖が認められなかったのに対して、D171NではCD34陽性比率の増加を伴わず中等度に増殖が認められ、S291fsではCD34陽性比率の増加を伴った高度の増殖が認められた。細胞周期の解析ではD171NはG1期の増加を、S291fsはS期の増加を認めた。形態的にはいずれの変異導入細胞にも3血球系統の異常が見られた。

## D. 考察

Ni型は低形成性白血病様、Ct型はMDS/MPD様と全く異なる臨床病態を呈し、*in vitro*でこれを再現できた。MDS/AMLの発症を考えた場合、造血幹細胞がAML1変異を獲得した後、Ni型D171N変異の場合には発症には付加遺伝子異常が必須と推測される。一方、Ct型S291fsX300変異は分化阻害に加え単独でも増殖能を有しており、この変異のみで付加的遺伝子異常を必要とせず、発症に至る可能性が考えられた。

## E. 結論

AML点変異の部位によりMDS/AMLの発症機構と病態が規定されることが実証できた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Zharlyganova, D., Harada, H., Harada, Y., Shinkarev, S., Zhumadilov, Z., Zhunusova, A., Tchaizhunusova,

N.J., Apsalikov, K., Kemaikin, V., Zhumadilov, K., Kawano, N., Kimura, A., Hoshi, M.: High Frequency of AML1/RUNX1 point mutations in radiation-associated myelodysplastic syndrome around Semiplalatsk nuclear test site. *J. Radiat. Res.* 49(5): 549-555, 2008.

- Tasaka, T., Tohyama, K., Kishimoto, M., Ohyashiki, K., Mitani, K., Hotta, T., Kanamaru, A., Okamoto, S., Karasawa, M., Kimura, A., Tomonaga, M., Uchiyama, T., Ozawa, K. on behalf of the Japanese Cooperative Study Group for Intractable Bone Marrow Diseases: Myelodysplastic syndrome with chromosome 5 abnormalities: a nationwide survey in Japan. *Leukemia* 22(10): 1874-1881, 2008.
- Zharlyganova, D., Harada, Y., Harada, H., Chaizhunusova, N., Apsalikov, K., Zhunusova, A., Kawano, N., Hoshi, S., Kimura, A.: セミパラチンスク核実験場近郊住民における骨髄異形成症候群(MDS)の遺伝子学的検討. *広島医学* 61(4): 357-359, 2008.

### 2. 学会発表

- Harada, H.: Distinct molecular pathways and clinical features of MDS/AML by 2 types of AML1/RUNX1 mutations. 15<sup>th</sup> International RUNX Workshop. Provincetown, MA (USA), Sep.14-17/2008.
- 丁 曄、原田浩徳、原田結花、今川 潤、許 泰一、木村昭郎: AML1/RUNX1点変異によるMDS/AML多段階発症機構. 第70回日本血液学会総会, 京都, 2008.
- 今川 潤、原田浩徳、原田結花、丁 曄、兵頭英出夫、木村昭郎: 慢性骨髄増殖性疾患からの白血病移行メカニズムの解明. 第70回日本血液学会総会, 京都, 2008.

研究協力者 高後 裕 (旭川医科大学 内科学講座 消化器・血液腫瘍制御内科学分野 教授)

## 研究要旨

骨髄不全症候群患者における体内鉄動態に関する臨床研究、および、輸血後鉄過剰症に対する鉄キレート療法の有用性(臓器障害の予防改善効果)に関する臨床研究の付随研究として、血清 NTBI およびヘプシジンの測定を計画した。NTBI 測定に関しては non-metal HPLC を用いた定量システムを立ち上げ、これまで特に疑問視されている低濃度領域の測定に関して、その問題点を明らかにし検出感度の向上を目指した。これまでのところ、使用する蒸留水や試薬に混在する鉄によりベースラインが引き上げられ、不安定な測定系となっていることが判明した。そこで、Chelex 100 やポリアミン系樹脂による除鉄処理を行いバックグラウンドを低減させることに成功した。結果、健康人における血中 NTBI 値を信頼性の高い数値として定量、表記することが可能となった。一方、ヘプシジンは liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) を導入し、現在までに、3 種類のヘプシジン・アイソフォーム(ヘプシジン-20、ヘプシジン-22、ヘプシジン-25)の同時定量を世界で初めて成功させている。この条件下でヒト血清中のヘプシジン測定を実施したところ、アイソフォーム別にそれぞれの濃度を測定可能なことが確認できている。

## A. 研究目的

骨髄不全症候群患者における体内鉄動態に関する臨床研究、および、輸血後鉄過剰症に対する鉄キレート療法の有用性(臓器障害の予防改善効果)に関する臨床研究の付随研究として、血清 NTBI およびヘプシジンの測定を行う。

## B. 研究方法

NTBI は non-metal HPLC システムを導入した。血清中に含まれる NTBI を nitrilotriacetic acid (NTA) でキレートし、一方で apo-Tf にキレートした NTBI が奪われないように予めそちらは Co で飽和させておく。そうすることで NTBI は NTA にのみ結合するが、これを MW 3000 で限外濾過し、さらに CP22 と呼ばれる鉄を結合すると発色する別のキレート剤で置き換え、HPLC を用いて検出する。一方、ヘプシジンは LC-MS/MS システムを導入し、血清を trichloroacetic

acid により clean-up してから 3 種類のアイソフォームを同時に測定する。これらシステムの立ち上げと、測定条件の最適化を検討した。(付随研究に関しては、現在各施設での倫理委員会通過の手続きを進めているが、倫理面への配慮として、当施設に送られてきた試料については、個人を特定可能な名前、ID 番号、カルテ番号とは無関係に設定した「施設別患者匿名化 ID」を運用し、個人情報漏洩防止に努める。)

## C. 研究結果

Non-metal HPLC を用いた NTBI 定量システムにおける低濃度領域の不安要因が、コンタミする鉄によることが判明し、各種除鉄処理を施すことで、健康人の血中 NTBI 値を求めることも可能となった。一方、ヘプシジンは 3 種類のアイソフォーム同時定量可能な設定条件を構築することができ、血中ヘプシジン濃度を算出することができた。

#### D. 考察

現在までに報告されている各種 NTBI 測定法における健常人の NTBI 値は「マイナス表示」になっているものが多く、当初 non-metal HPLC システムを導入、測定した時点では我々も「マイナスの値」を再現する結果となった。しかし、その原因が蒸留水や試薬に元々混在する鉄によるバックグラウンドのためであることが明らかとなり、各種除鉄処理を実施した。さらに、新規キレート剤の導入を予定しており、このような徹底した除鉄処理がシステムのより高いパフォーマンスを引き出すものと考えている。一方、ヘプシジンに関してはこれまで存在が報告されている 3 種類のアイソフォームすべてを同時に定量できるシステムが立ち上がったことより、これまでその機能が正しく評価されていなかったヘプシジン・アイソフォームと病態との関係に関して新しい知見が得られるものと考えられる。

#### E. 結論

NTBI 測定には non-metal HPLC システムを、ヘプシジン測定には LC-MS/MS システムをそれぞれ導入し、測定条件の最適化を検討した結果、NTBI 測定システムに関しては低濃度領域の安定化を図ることができ、ヘプシジン測定システムに関しては 3 種類のアイソフォーム同時定量可能条件を設定することができた。今後、付随研究として行われる検討に際して、信頼性あるデータを提供できるものと考えている。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 生田克哉, 鳥本悦宏, 高後裕; 鉄代謝と病態. 日本臨牀 2008 Mar; 66(3):469-74
- Kohgo Y, Ohtake T, Ikuta K, Suzuki Y, Torimoto Y,

Kato J; Dysregulation of systemic iron metabolism in alcoholic liver diseases. J Gastroenterol Hepatol. 2008 Mar;23 Suppl 1:S78-81.

- Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, Torimoto Y, Kato J; Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. Int J Hematol. 2008 Jul;88(1):7-15.

- 生田克哉, 佐々木勝則, 鳥本悦宏, 高後裕; 生体内不安定鉄と鉄毒性と鉄キレート療法. 血液フロンティア 2009 Feb; 19(2):31-39

##### 2. 学会発表

- Ikuta K, Torimoto Y, Hosoki T, Jimbo J, Shindo M, Sato K, Ohtake T, Sasaki K, Kohgo Y: Changes of the Expressions of the Genes Involved in Iron Metabolism by the Iron Chelation Therapy in the Iron Overloaded Mouse Model. Session Type: Poster (Publication number: 1854, Poster I- 959), Session: 50th ASH Annual Meeting & Exposition, December 6, 2008. San Francisco, California, USA

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

抗胸腺細胞グロブリンとシクロスポリンによる免疫抑制療法を受けた未治療小児再生不良性貧血患児 312 人を対象に、初診時の検査や臨床所見から治療への反応が予測可能であるかを検討した。白血球数が 2500/ $\mu$ l 未満、診断から治療開始までの期間が 30 日未満、男児であることが統計学的に有意な反応予測因子であった。再生不良性貧血と診断された場合には、できるだけ早期に治療を開始するべきである。

### A. 研究目的

小児再生不良性貧血は抗胸腺細胞グロブリンとシクロスポリンの併用療法に 60-70%の患児は反応し、血液学的改善がみられる。治療開始前に治療への反応性を予測できれば、不必要な患者に副作用もあり高額な治療を回避でき臨床に極めて有用である。われわれはこれまで、成人領域で有用性が報告されている患者の HLA 型、微小 Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) 血球、再生不良性貧血に特異的自己抗体を治療前に測定することで治療への反応性が予測可能か、前方視的研究をおこなってきた。しかし、小児においてはこれらの因子は反応予測因子とはなりえなかった。今回は初診時の臨床情報や血液検査所見などの簡便な指標を用いて治療への反応の予測が可能であるかを検討した。

### B. 研究方法

1997年10月から2006年9月までの期間に日本小児再生不良性貧血治療研究会のプロトコールに従って治療された18歳未満の未治療再生不良性貧血小児312人(男186、女126)を対象とした。261人は特発性、44人は肝炎後、7人はその他の原因による再生不良性貧血と診断された。重症度は156人が最重症、107人は重症、49人は中等症に分類された。全例に馬ATGとCSAが投与され、最重症例にはG-CSFが追加された。年齢

の中央値は8歳(範囲:0-17歳)、診断から治療開始までの中央値は15日(範囲:1-180日)であった。好中球が500/ $\mu$ l、血小板数が3万/ $\mu$ l、ヘモグロビン値8.0g/dl以上で輸血が不要となった場合を有効とした。研究への参加にあたっては、参加施設における倫理委員会の承認と患者あるいは家族からの文書による同意を必要とした。

### C. 研究結果

全体の奏効率は56%であった。多変量解析の結果、白血球数2,500/ $\mu$ l未満の患児は2,500/ $\mu$ l以上の患児と比較して奏効率が高かった(61% vs 43%,  $P=0.08$ )。また診断から治療開始までの期間が30日未満の患児は30日以上以上の患児と比較して奏効率が高かった(60% vs 43%,  $P=0.02$ )。また男児は女児と比較してよく反応した(62% vs 43%,  $P=0.02$ )。

### D. 考察

Scheiberg等の成人を含む316人の再生不良性貧血患者を対象にした同様の検討では、初診時の網状赤血球数が25,000/ $\mu$ l以上、リンパ球数が1,000/ $\mu$ l未満であることが、統計学的に有意な反応予測因子であった。両研究の結果の違いが、人種差を反映しているのか、あるいは年齢の違いによるのかを明らかにすることは今後の研究課題である。

## E. 結論

再生不良性貧血と診断された場合には、できるだけ早期に治療を開始することが望ましい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Clinical impact of HLA DR15, a minor population of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria-type cells, and an aplastic anaemia-associated autoantibody in children with acquired aplastic anemia. Yoshida N, Yagasaki H, Takahashi Y, Yamamoto T, Liang J, Wang Y, Tanaka M, Hama A, Nishio N, Kobayashi R, Hotta N, Asami K, Kikuta A, Fukushima T, Hirano N, Kojima S. *Br J Haematol* 142 : 427-435.
- Risk factors for early death in neonates with Down syndrome and transient leukemia. Muramatsu H, Kato K, Watanabe N, Matsumoto K, Nakamura T, Horikoshi Y, Mimaya J, Suzuki C, Hayakawa M, Kojima S. *Br J Haematol* 142: 610-615, 2008
- Mutation analysis of SPA 1 in patients with juvenile myelomonocyte leukemia. Yoshida N, Yagasaki H, Takahashi Y, Kudo K, Manabe A, Kojima S. *Br J Haematol* 142 : 850-851, 2008
- Functional analysis of JAK3 Mutations in transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukemia accompanying Down syndrome. Sato T, Toki T, Kanezaki R, Xu G, Terui K, Kanegane H, Miura M, Adachi S, Migita M, Morinaga S, Nakane T, Kojima S, Kiyoi H, Mano H, Ito E. *Br J Haematol* 141:681-686, 2008
- Acute megakaryoblastic leukemia (AMKL) in children: a comparison of AMKL with and without Down syndrome. Hama A, Yagasaki H, Takahashi Y, Nishio N, Muramatsu H, Yoshida N, Tanaka M, Hidaka

H, Watanabe N, Yoshimi A, Matsumoto K, Kudo K, Kato K, Horibe K, Kojima S. *Br J Haematol* 140: 552-561, 2008

- Quantification of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor hypersensitivity in juvenile myelomonocytic leukemia by 3H-thymidine assay. Tanaka M, Takahashi Y, Xu Y, Yoshida N, Yoshimi A, Villalobos IB, Hama A, Nishio N, Hidaka H, Wang Y, Yagasaki H, Kojima S. *Leuk Res* 32: 1036-42, 2008
- Prospective multicenter trial comparing repeated immunosuppressive therapy with stem cell transplantation from an alternative donor as second-line treatment for children with severe and very severe aplastic anemia. Kosaka Y, Yagasaki H, Sano K, Kobayashi R, Ayukawa H, Kaneko T, Yabe H, Tsuchida M, Mugishima H, Ohara A, Morimoto A, Otsuka Y, Ohga S, Bessho F, Nakahata T, Tsukimoto I, Kojima S, on behalf of the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group, *Blood* 11: 1054-59 2008
- Unrelated cord blood transplantation for severe aplastic anemia. Yoshimi A, Kojima S, Taniguchi S, Hara J, Matsui T, Takahashi Y, Azuma H, Kato K, Nagamura-Inoue T, Kai S, Kato S. *Biol Bone Marrow Transplant* 14: 1057-63, 2008
- Congenital erythroid and myeloid hypoplasia terminating myelodysplastic syndrome. Nishio N, Yagasaki H, Takahashi Y, Muramatsu H, Hama A, Xu Y, Villalobos IB, Kojima S. *J Pdiatr Hematol Oncol* 30: 692-5, 2008

### 2. 学会発表

なし

研究協力者 ○小松則夫 (山梨大学医学部血液・腫瘍内科学講座 教授)

桐戸敬太 (山梨大学医学部血液・腫瘍内科学講座)

## 研究要旨

活性酸素 (ROS) は造血障害を引き起こす重要な要因の一つである。ROS の上昇には様々な要因が関与するが、ROS の大半は糖代謝とそれに伴う酸化的リン酸化により産生されることから、この調節破綻は過剰な ROS 産生と造血障害をきたす重大な要因となることが予想される。造血細胞をサイトカインで刺激すると、糖代謝とそれに伴う酸化的リン酸化が活性化されて ROS 産生が上昇する。我々は、この過程において、ROS に反応して低酸素応答因子である HIF-1 が活性化されること、一方、HIF-1 はピルビン酸脱水素酵素キナーゼ (PK-1) の発現誘導を介して酸化的リン酸化を低下させ、ROS 産生を抑制していることを見いだした。すなわち、HIF-1 は造血細胞において、ROS センサーとして機能し、糖代謝亢進に伴う過剰な ROS 産生を制御することが考えられた。この経路の異常は MDS などの造血障害の要因となることが示唆される。

### A. 研究目的

ROS は造血幹細胞や前駆細胞に対し、その機能を抑制することが知られている。細胞内の ROS の多くは、ミトコンドリアでの糖代謝に伴い発生することが知られている。最近、低酸素応答転写因子 HIF-1 (hypoxia inducible factor-1) が、ミトコンドリアでの糖代謝レベルを制御する上で極めて重要な働きを持つことが報告された。一方、我々は造血細胞において、ミトコンドリア由来の ROS により HIF-1 が活性化されることを見いだした。これらの知見に基づいて、HIF-1 は造血細胞において、ROS レベルを感知し、その発生を抑制する役割を持つのではないかと仮説を立て研究を進めた。

### B. 研究方法

ヒト白血病細胞株 UT-7/TPO を用いて解析を進めた。ROS 産生レベルは CM-H<sub>2</sub>DCFDA を用い、FACS により解析を行った。HIF-1 $\alpha$  および PK-1 に対する siRNA は pSUPER ベクターを用いて遺伝子導入を行

った。

### C. 研究結果

以下の事項を明らかにした。

(1) UT-7/TPO 細胞を TPO で刺激すると 48 時間後をピークに ROS 産生がみられるが、刺激後 72 時間ではほぼ基準値に復した。

(2) TPO 刺激後、48 時間より、糖代謝酵素である Pyruvate dehydrogenase kinase-1 (PK-1) の発現が誘導された。

(3) PK-1 の阻害剤である dichloroacetate 処理により、TPO 刺激後の ROS 産生が遷延した。同様に、siRNA を用いて PK-1 の発現を抑制すると、ROS 産生が遷延することが確認された。

(4) siRNA を用いて HIF-1 $\alpha$  の発現を抑制することにより、TPO による PK-1 の誘導がみられなくなり、また ROS 産生の遷延が認められた。

### D. 考察

我々は、これまでに TPO 刺激によって糖代謝の活性化と共に、ミトコンドリアからの ROS が産生され、さらにこの ROS により HIF-1 が活性化を受けることを報告した (Yosida K., Int.J.Hematol. 2008)。一方、今回の研究により、HIF-1 は PDK-1 を誘導することにより ROS 産生に対して抑制的に作用することが明らかになった。すなわち、HIF-1 は ROS センサーとして機能し、糖代謝の方向性を制御することにより、過剰な ROS 産生を抑制していることが予想された。

## E. 結論

造血細胞において、HIF-1 は ROS センサーとして機能し、ROS レベルを調節する機能を担っていると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Yoshida K, Kirito K, Yongzhen H, Ozawa K, Kaushansky K, Komatsu N. Thrombopoietin (TPO) regulates HIF-1 $\alpha$  levels through generation of mitochondrial reactive oxygen species. International journal of hematology 2008; 88:43-51.
- 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; 93:155-156.
- 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;104:680-691
- Kosaka N, Sugiura K, Yamamoto Y, Yoshioka Y, Miyazaki H, Komatsu N, Ochiya T, Kato T.

Identification of erythropoietin-induced microRNAs in hematopoietic cells during erythroid differentiation. 2008; 142: 293-300

### 2. 学会発表

- Kirito K, Yoshida K, Hu Y, Qiao Q, Sakoe K, Komatsu N. HIF-1 Prevents Hematopoietic Cells from Cell Damage by Overproduction of Mitochondrial ROS after Cytokine Stimulation through Induction of PDK-1. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2008; 112:2435-. The American Society of Hematology 50th Annual Meeting, December 6-9, 2008. San Francisco, California, USA



## MDS 関連分子 c-Cbl による造血制御メカニズムの解析

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

最近 AML や MDS 患者の一部に c-Cbl の変異が認められることが報告され、Cbl と造血制御の関わりが注目されている。c-Cbl は様々なチロシンキナーゼの negative regulator として重要であるが、他に PI3K を介して細胞骨格の制御に関わることも知られている。そこで、我々は Cbl KO マウスを利用して Cbl の造血機能への関わりについて、細胞骨格制御の観点から検討を行った。Cbl KO マウスの線維芽細胞では、フィブロネクチン刺激後のアクチン再構成能が減弱しており、Rac 活性が減弱していることが明らかとなった。Rac 活性は造血幹細胞を骨髄内に保持するために重要とされているため、末梢血中の KSL 細胞数を測定したところ、KO マウスでは末梢血中の KSL 細胞数が有意に増加していることが明らかとなった。以上より Cbl KO マウスでは Rac を介した造血幹細胞の骨髄内保持機能に異常が生じている可能性が示唆される。

また、Cbl KO マウスの KSL 細胞では c-Kit の発現増加が認められた。Cbl KO マウスにおける造血幹細胞増加に c-Kit シグナルの増強が関与している可能性が示唆される。

### A. 研究目的

c-Cbl は RING フィンガー型 E3 ユビキチンリガーゼであり、EGFR や ZAP70 等の各種チロシンキナーゼの negative regulator として作用する分子である。

最近、AML や MDS 患者の一部に c-Cbl の変異が認められることが報告され、注目されている。ほとんどすべての症例で変異は RING フィンガーと linker 領域と呼ばれる部分に集中しており、ユビキチン化能の障害によるチロシンキナーゼの活性化増強が腫瘍化の原因と考えられている。

また、c-Cbl ノックアウトマウス (c-Cbl KO マウス) の解析から、KO マウスでは未分化造血幹細胞を含む c-Kit+Sca1+Lin- (KSL) 細胞が増加していることが知られており、その原因に c-Mpl のシグナル増強が関連していることが示唆されている。

このように Cbl は造血機能に大きな影響を持つことが判ってきたが、Cbl はユビキチンリガーゼによる negative regulator としての機能の他に、PI3K を介し

た positive な細胞骨格制御機能を持つことも知られている。そこで、我々は Cbl KO マウスを用いて細胞骨格制御の観点から Cbl による造血細胞の制御について検討することとした。

### B. 研究方法

Cbl KO マウスにおける細胞骨格関連シグナルの状態を検討するため、KO マウスから胎児線維芽細胞 (MEF) を樹立し、フィブロネクチン刺激を加えて、その細胞形態の変化、Rac 等の低分子 G タンパク質の活性変化などについて検討を行った。また、Cbl KO マウスの骨髄細胞および末梢血を採取し、KSL 細胞数および c-Kit の発現量を野生型コントロールマウスと比較した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え実験については、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に従い、適切な拡散防止措置のもとに

行っている。また、動物実験については動物福祉に配慮し、法令及び施設の規定に沿って研究を行った。

### C. 研究結果

Cbl KO マウスにおける細胞骨格制御の異常の有無を確認するため、KO マウスより MEF を作成し、フィブロネクチン刺激後のアクチン再構成能の変化を調べたところ、野生型では接着後 30 分以内に認められるアクチン再構成が KO マウスでは認められず、KO マウスでは接着の際のアクチンフィラメントの再構成が障害されていることが判明した (図 1)

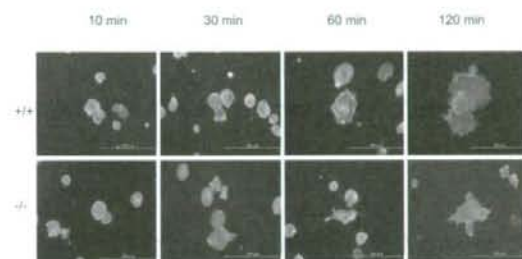


図 1 MEF におけるフィブロネクチン接着後のアクチン再構成の変化

また、MEF をフィブロネクチンで刺激し、Rac 活性を調べたところ、Cbl KO マウスでは刺激前後にわたって Rac 活性が低下していることが判明した (図 2)。

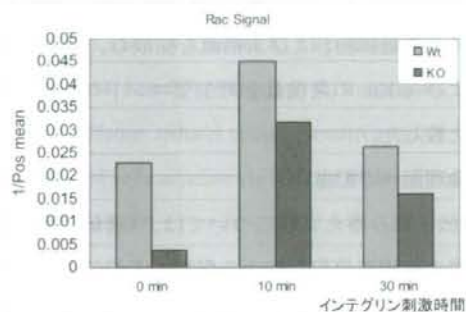


図 2 フィブロネクチン刺激後の Rac 活性の変化

Rac KO マウスでは骨髄における造血幹細胞保持能が低下していることが知られているため、末梢血中に存在する KSL 細胞を測定したところ、KO マウスでは有意に末梢血中の KSL 細胞が増加していることが確認された (図 3)。

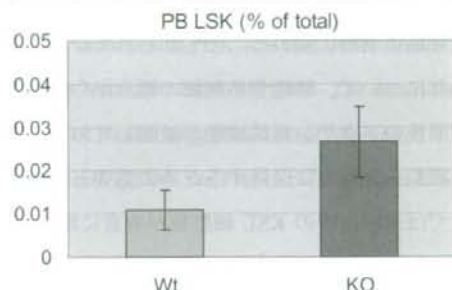


図 3 末梢血中の KSL 細胞数

また、骨髄内の KSL 細胞数が増加していることも同時に確認したが、造血幹細胞は TPO/c-Mpl 以外にも SCF/c-Kit シグナルによって増殖がコントロールされていることが知られている。そこで、Cbl KO マウスの KSL 細胞における c-Kit 発現量を測定したところ、KO マウスでは細胞表面の c-Kit 発現量が有意に増加していることが判明した。

### D. 考察

Cbl KO マウスでは骨髄中の造血幹細胞のみならず、末梢血中の造血幹細胞も増加していることが明らかとなった。KO マウスでは Rac 活性が減弱しており、アクチンフィラメントの再構成に異常が認められるため、インテグリン-Rac-アクチン再構成の制御系に異常が生じている可能性が予測される。この作用は主に Cbl の C 末端側のリン酸化チロシン部位から PI3K を介していると考えられるため、今後は Cbl KO マウスにおける PI3K の活性化状態を調べて

いく必要がある。

また、Cbl KO では造血幹細胞分画細胞の c-Kit 発現量が増加していることが明らかになった。c-Kit は造血幹細胞の増殖制御に重要とされている分子である。今後は c-Kit シグナルの活性化状態についても検討を加えていく方針である。

#### E. 結論

Cbl KO マウスでは、骨髄中および末梢血中の造血幹細胞が増加している。KO マウスでは Rac 活性が減弱しており、アクチン細胞骨格の形成に異常が認められるため、造血幹細胞の homing 能などに異常が生じている可能性が示唆される。また、KO マウスでは c-Kit 発現量が増加しており、c-Kit シグナルの増強が造血幹細胞の増加につながっている可能性が示唆される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

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

岡山大学において、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 transplantation (RIST) の治療成績を検討した。26例中16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 overt leukemia を含めた 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

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/m<sup>2</sup>/day x 5 days) + cyclophosphamide (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 Flu (30 mg/m<sup>2</sup>/day x 6 days) + busulfan (4 mg/kg/day x 2 days) (Flu/Bu)、CyA/MTX を用いた。また、臍帯血移植においては Flu (30 mg/m<sup>2</sup>/day x 6 days) + Cy (25 mg/kg/day x 2 days) + 全身放射線照射 (2Gy) (Flu/Cy/TBI 2Gy)、CyA/ Mycophenolate Mofetil (MMF) を用いた。

#### C. 研究結果

2000年11月から2009年1月までに26名にRISTを行った。診断から移植までの期間の中央値は12カ月。生着不全を6例(23%)に認め、そのうちの5例が敗血症あるいは原病悪化で早期死亡した。また、1例が肺炎により、2例が急性GVHDにより、

2例が原病の再発により死亡した。観察期間の中央値は34カ月であるが、累積生存率は61%であった。また、GVHD発症の有無、移植前血清フェリチン値(境界値1000 ng/ml)で生存率を比較したが、有意な差は得られなかった。

