

本光音：当院における成人臍帯血移植の治療成績、
第 69 回日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学会；
2007.10.12、神奈川

- 小林孝一郎，片岡美由紀，原 嘉孝，久保西四郎，前田嘉信，新谷勝美，品川克至，池田和眞，谷本光音：当科における同種骨髄非破壊的移植 (RIST) の治療成績，第 30 回日本造血細胞移植学会総会；2008.3.1、大阪

D. 考察

overt leukemia 例は生存率が低い傾向にあったが有意な差はなく、白血化した症例にも十分適応可能と考えられた。

E. 結論

高齢者または臓器障害を有する MDS に対する RIST は、安全に行え、overt leukemia を含めた MDS の予後の改善を期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 355:970-975,2007.
- Kikuchi T, Kubonishi S, Shibakura M, Namba N, Matsui T, Fukui Y, Tanimoto M, Katayama Y: Dock2 participates in bone marrow lympho-hematoiesis *Biochem Biophys Res Commun* 367:90-96,2007

2. 学会発表

- 小林孝一郎，門久幸代，片岡美由紀，原 嘉孝，平松靖史，前田嘉信，品川克至，池田和眞，谷

研究協力者 ○檀 和夫 (日本医科大学 血液内科 教授)

山口博樹 (日本医科大学 血液内科 講師)

研究要旨

染色体 3' 末端のテロメアに局在するテロメラゼ複合体や Shelterin 複合体は、テロメア配列を伸長、補修、構造形成の保護をすることでテロメアを介した細胞分裂能および染色体の安定性を維持している。これまでの研究によってテロメラゼ複合体を構成する *TERC* や *TERT* などの変異が再生不良性貧血(AA)などの骨髄不全症(BMF)の約 3%に存在することが明らかになった。そこで我々は本邦の成人 BMF120 人(免疫抑制療法不応性の AA 45 人、骨髄異形成症候群不応性貧血 75 人)におけるテロメア制御遺伝子変異の検索を行った。結果は *TERC* の変異を 1 例、Shelterin 複合体を構成する *TINF2* の変異を 2 例発見し、本邦においてもテロメア制御遺伝子変異をもつ BMF の存在を明らかにした。

A. 研究目的

再生不良性貧血(aplastic anemia: AA)は造血幹細胞の減少に基づく骨髄機能低下によって発症する骨髄不全症(BMF)の一つである。BMF にはその他にも骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndrome: MDS)や、Dyskeratosis congenita(DKC)などの遺伝性の BMF などが含まれる。典型的な AA は免疫機序を介した病態により発症し免疫抑制療法(immunosuppressive therapy: IST)が有効である。しかし臨床的に MDS と診断された中でも IST が有効な症例が認められことから骨髄の形態や染色体分析の異常だけでは鑑別には限界が生じている。

染色体 3' 末端のテロメアに局在するテロメラゼ複合体や Shelterin 複合体は、テロメア配列を伸長、補修、構造形成の保護をすることでテロメアを介した細胞分裂能および染色体の安定性を維持している。近年 DKC の原因遺伝子である上述のテロメア制御遺伝子の変異が、一部の AA や MDS に認められ、その発症に関与していることが明らかになった。これらの異常をもつ BMF は臨床的に AA と診断されても IST の効果は得られない。以上のことから本研究の目

的は、本邦においてテロメア制御遺伝子異常による BMF が存在するかを明らかにすることである。

B. 研究方法

対象は臨床的に AA、MDS の不応性貧血(RA)と診断された症例。テロメラゼ複合体遺伝子である *DKC1*、*TERC*、*TERT* と、Shelterin 複合体遺伝子である *TINF2* 各遺伝子に関して direct sequence 法にて遺伝子配列を決定し変異を検索した。さらに *DKC1*、*TERC* 遺伝子においてその promoter 領域の遺伝子変異が病態に関与しているとの報告があるため、promotor 領域の検索も行った。

また変異症例においては、Southern blot 法にてテロメア長を測定し、テロメアの短縮化の検討を行った。さらに in vitro の機能解析として、wild type より mutagenesis 法にて変異発現ベクターを作成し、*TERC*(-)、*TERT*(-)のテロメラゼ活性を持たない VA13 細胞に各遺伝子を導入し(例えば *TERC* mutation+*TERT* wild type)テロメラゼ活性の回復を検討した。また変異の機能が dominant negative なのか haploinsufficiency なのかを明らかにするために

VA13 細胞に変異と wild type を共発現させ(例えば *TERC* mutation/wild+*TERT* wild type)テロメラーゼ活性の回復を検討した。

C. 研究結果

本邦の成人 BMF120 人(免疫抑制療法不応性の AA 45 人、骨髄異形成症候群不応性貧血 75 人)に対して遺伝子変異を検索し、*TERC* 変異 1 症例、*TINF2* 変異 2 症例を認めた。

TERC 変異(n323 C/T)の症例は、72 歳・男性で、MDS RA の臨床診断であった。BMF の家族歴や DKC に認められる爪の変形などの特徴的な身体的所見や染色体異常は認められなかった。保存検体の DNA 量不足のためテロメア長の評価は出来なかった。機能解析にて *TERT* との結合が障害され、haploinsufficiency の効果でテロメラーゼ活性が低下していることがわかった。

TINF2 変異(R282C と Deln871-874)の症例は、前者は 22 歳・男性、後者は 44 歳・女性で、両者とも重症 AA の臨床診断であったが、IST に対して不応性であった。後者は BMF の家族歴(父が AA)を認めたが、両者とも DKC に認められる爪の変形などの特徴的な身体的所見や染色体異常は認められなかった。また両者ともにテロメア長の短縮化が認められた。R282C 変異は、これまでに DKC において最も多く報告されている変異で、*TINF2* 変異の hot spot である。また Deln871-874 は、deletion 以降はアミノ酸配列が wild type と異なり、codon315 で終止 codon となる。

D. 考察

本邦の BMF においても、テロメア関連遺伝子変異が原因で発症したと考えられる症例が存在することがわかった。我々の検討では *DKC1*、*TERT* の変異は認められなかったが、Liang J らは本邦の小児 AA 症例に対して同様の検討を行い 2 症例の *TERT* の変異

を報告している(Haematologica. 2006;91:656)。これらのテロメア制御遺伝子異常による BMF は、IST に不応性であったことから、AA を含めた BMF の臨床診断に制御遺伝子異常の検索は重要であると考えられる。しかしテロメア関連遺伝子変異の検索は煩雑で、実際の臨床のスクリーニングには不向きである。今後テロメア長の短縮化と IST に対する反応性などを検討し、新たなスクリーニング法の開発が必要である。

E. 結論

本邦の BMF においても、テロメア関連遺伝子変異が原因で発症したと考えられる症例が存在し、これらは IST に不応性であったことから、BMF の臨床診断にテロメア制御遺伝子異常の検索は重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Takeuchi J, Ly H, Yamaguchi H, Carroll KA, Kosaka F, Sawaguchi K, Mitamura Y, Watanabe A, Gomi S, Inokuchi K, Dan K. Identification and functional characterization of novel telomerase variant alleles in Japanese patients with bone-marrow failure syndromes. *Blood Cells Mol Dis.* 2008;40(2):185-91.
- 山口博樹. テロメア異常と骨髄不全症. *日本臨床.* 2008; 66: 483-489.
- 山口博樹、猪口孝一. 再生不良性貧血の分子病態. *血液・腫瘍科.* 2008; 56: 155-161.

2. 学会発表

- 山口博樹、竹内純子、玉井勇人、三田村佳勇、小坂文子、長谷川節雄、檀 和夫、猪口孝一: 本邦の骨髄不全症における SBDS 遺伝子異常の検索; 第 70 回日本血液学会, 2008 年 10 月 10 日-12 日, 京都.

未熟網赤血球の指標としての CD71(トランスフェリン・レセプター) の意義: PNH 症例における解析

研究協力者 千葉 滋 (筑波大学血液内科 教授)

研究要旨

中～高度の RNA 量を有する網赤血球、すなわち未熟網赤血球は、赤血球造血のよい検査指標である。また、トランスフェリン受容体 (CD71) は赤芽球から未熟網赤血球で発現しその後消退する。今回 PNH 7 例を含む溶血性貧血 9 例において、RNA/CD71 の 2 カラー、および CD59/CD71/CD45 のマルチカラーフローサイトメトリーで網赤血球の形質を解析した。RNA 含有量が多い未熟網赤血球は CD71 発現も高く、これらの発現量によって未熟網赤血球分画を同定した。また、全網赤血球中の CD71(+)未熟網赤血球比率は、健常人よりも PNH 患者において有意に上昇しており、赤血球造血充進を反映していると考えられた。さらに CD59(-)の PNH 血球は、全赤血球中よりも網赤血球中の比率の方が高値であり、PNH 血球が網赤血球ではなく成熟赤血球の段階で溶血することが示唆された。CD59/CD71/CD45 マルチカラーフローサイトメトリーは鋭敏に CD59(-)細胞を捕らえることが可能であり、造血病態の評価法として有用と考えられた。

A. 研究目的

未熟網赤血球は成熟網赤血球に比べより多くの RNA を含むため、網赤血球の成熟度を RNA 含有量により半定量化することが可能である。貧血において未熟網赤血球の増加は赤血球造血充進を示唆し、PNH などの溶血性貧血では網赤血球の増加に加え、より未熟な網赤血球が骨髄から放出されることが知られている。

トランスフェリン受容体である CD71 は、II 型膜蛋白のホモ 2 量体で、赤芽球をはじめとする全体細胞に発現している。トランスフェリン・鉄複合体をエンドサイトーシスによって細胞内に取り込んでおり、その発現は、貯蔵鉄量やエリスロポエチン刺激など、種々の因子によって制御されている。

我々はこれまで RNA/CD59 の 2 カラーフローサイトメトリー (FCM) によって、全赤血球のみならず網赤血球中の PNH 血球 (CD59 陰性血球) を鋭敏に検出し解析する方法を報告してきた (Sato S *et al.*,

Laboratory Hematology, 2006)。FCM による解析は感度のみならず定量的な解析も可能である。

より鋭敏に PNH 血球を捉え、また赤血球造血の指標である未熟網赤血球の形質解析を行う目的で、CD71 を加えたマルチカラー FCM で以下の研究を行った。

B. 研究方法

PNH 患者 7 名 (男性 3、女性 4 名) および AIHA 患者 2 名、健常人 10 名を対象とし、末梢血より調整した赤血球を用いた。

PE 標識抗 CD71 抗体と、RNA 結合性を有する蛍光色素 CD4K530 による 2 カラー (CD71/RNA)、および FITC 標識抗 CD59 抗体、PE 標識 CD71 抗体、PRE-Cy5 標識抗 CD45 抗体によるマルチカラー FCM で網赤血球の形質を解析した。

(倫理面への配慮)

検体採取にあたりインフォームドコンセントを

得て行った。

C. 研究結果

CD71 /RNA の 2 カラー FCM で、まず網赤血球は RNA 陽性分画として検出される (図 1 左)。この網赤血球は、より RNA 含有量が多く CD71(+) の未熟網赤血球と、RNA がより少なく CD71(-) の成熟網赤血球に分画された (図 1 右)。PNH や AIHA 患者においては、RNA および CD71 発現強度がともに健常人より有意に上昇していた。次に CD59/CD71/CD45 マルチカラー FCM を行った。FSC と SSC で赤血球分画ゲートし、このうち CD45 陰性分画を、CD59 と CD71 で展開した (図 2 上段)。CD71 (+) 未熟網赤血球とそれ以外の赤血球における CD59(-) PNH 血球比率について検討した (図 2)。PNH において、CD71(+)-未熟網赤血球比率は全網赤血球中の $32.2 \pm 11.9\%$ と、健常人対照の $10.4 \pm 3.5\%$ に比べて有意に高かった。また、PNH 患者において CD59(-) 血球比率は、全赤血球中では $20.0 \pm 13.3\%$ 、未熟網赤血球中では $51.9 \pm 22.8\%$ と後者で高値であった (図 2 に一例を示す)。

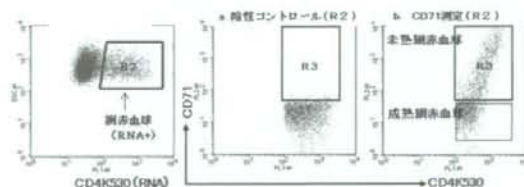


図 1: CD71/RNA 2 カラー FCM

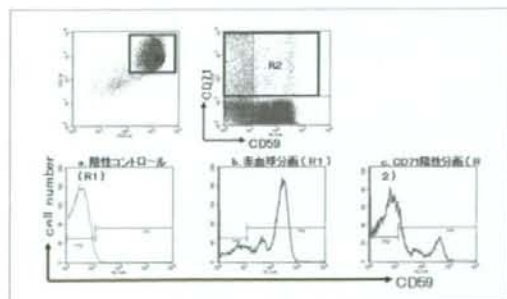


図 2: CD59/CD71/CD45 マルチカラー FCM

D. 考察

トランスフェリン受容体 CD71 は未熟網赤血球に発現し、成熟網赤血球や赤血球では発現が消失する。網赤血球における CD71 の発現量は RNA 含有量と平行し、また PNH を含む造血亢進状態では、CD71 発現量や RNA の増加した、より未熟と考えられる網赤血球が末梢血へ動員されていた。

PNH 患者において CD59(-) 血球比率が、全赤血球中よりも、未熟網赤血球中で高値であったことから、PNH 赤血球は網赤血球の段階ではあまり溶血しないものの、成熟赤血球になると末梢循環中で溶血することが示唆された。

E. 結論

フローサイトメトリーによって、未熟網赤血球や PNH 血球を、鋭敏かつ定量的に捉えることができ、造血病態の評価法として有用と考えられた。今後、特発性造血障害における赤血球造血評価や PNH 血球の検出、さらに PNH 血球の有無と免疫抑制療法への反応性の関係、などについて解析を進める予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Sato S, Kozuma Y, Hasegawa Y, Kojima H, Chiba S, Ninomiya H; Enhanced expression of CD71, transferrin receptor, on immature reticulocytes in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Int J Lab Haematol. 2009 *in press*.

2. 学会発表

該当なし

研究要旨

近年 5q 染色体の欠失を有する MDS において、lenalidomide が貧血の改善、輸血頻度の減少に加え、細胞遺伝学的効果をもたらすことが報告された。5q には複数の癌抑制遺伝子が局在しており、lenalidomide が何らかの機序によってそれらの発現に影響を与えて異常クローンを排除するという可能性が示唆されるが、詳細なメカニズムは不明である。今回我々は 5q 欠失を有する MDS 由来細胞株 MDS-L を用いて lenalidomide の影響を検討した。MDS-L のインビトロ培養系に lenalidomide 10 μ M を連日添加すると、複数核細胞が出現・増加するに伴い、細胞増殖が抑制された。さらにフローサイトメトリーを用いた ploidy 解析にて、多倍体細胞と subdiploid 細胞の増加を認めたが、lenalidomide 処理による初期変化として 2 核細胞(4N 細胞)が増加したことから、lenalidomide の直接効果として細胞質分裂阻害作用が考えられる。マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析にて細胞周期、特に分裂期関連分子の発現低下を認め、lenalidomide の細胞周期への影響が示唆された。また 5q に局在する分子の中でも、lenalidomide 処理により発現が変化する分子が認められた。

A. 研究目的

近年欧米で 5q- を有する MDS に対し、lenalidomide が貧血の劇的な改善に加え、細胞遺伝学的効果を示すことが報告されており、本邦でもその導入が期待されているが、その詳細な作用機序は不明である。本研究では 5q- を有する MDS 患者由来細胞株 MDS-L を用いた lenalidomide の作用機序の解明を目的とする。

B. 研究方法

MDS-L は RARS から RAEB への移行期の患者から樹立した IL-3 依存性細胞株であり、5q-, -7, +8 など MDS に特徴的な染色体異常を有する。この MDS-L に 10 μ M lenalidomide を連日添加し、週 2 回の割合で細胞増殖の評価、May-Gruenwald-Giemsa (MGG) 染色による形態学的評価、フローサイトメトリーを用いた DNA ploidy 解析を行った。

さらにこれらの分子生物学的評価として、Affymetrix- Gene chip human genome U133 plus 2.0

array を用いた網羅的遺伝子発現解析とプロテオーム解析を行った。遺伝子発現解析は lenalidomide 処理後 7~9 日目に独立して 3 回施行した平均値を示し、プロテオーム解析は lenalidomide 処理後 9 日目に施行した。

C. 研究結果

MDS-L に lenalidomide を添加すると複数核細胞の増加を認めた。添加 4 日目には主に 2 核細胞が出現したが、フローサイトメトリーでは tetraploid(4N)細胞が増加していた。さらに 4 日目以降 4 核以上の細胞が増加するとともに 8N 細胞が増加し、10 日目では約半数の細胞が複数核を呈していた。また上記複数核細胞の増加とともに、4 日目以降細胞増殖が抑制され、フローサイトメトリーでも subdiploid 分画が増加した。

これらの分子基盤を検証するためにマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を施行したところ、5q31-33 に局在し、lenalidomide にて発現が上昇した分子として EGR1 (early growth response1)、

CSF1R(macrophage colony-stimulating factor receptor)などを同定し、発現が減少する分子として IRF-1(interferon regulatory factor-1)や KIF20A (kinesin family member 20A)を同定した。また Gen MAPPを用いた Gene ontology(GO)解析において細胞周期、特に MYH10 (non-muscle myosin heavy chain II B)、PLK1(polo-like kinase 1)、CIT(citron kinase)、AURKB(aurora kinase B)など分裂期関連分子の発現低下を認めた。また同時に施行したプロテオーム解析では現時点でマイクロアレイ解析との整合性は得られていない。

なお5q-を有する他の細胞株である HL-60 と KG-1 においては lenalidomide を添加しても複数核細胞の出現や細胞増殖抑制効果は得られなかった。

D. 考察

MDS-L に lenalidomide を添加すると、前述の如く複数核細胞の出現を伴いながら細胞増殖が抑制された。初期変化として形態学的には2核細胞が増加し、これらは DNA ploidy 解析にて tetraploid(4N)を呈していたことから lenalidomide の直接的な作用として、2核細胞(4N細胞)の形成が考えられる。その後形態学的には4核以上の細胞、DNA ploidy では8N、16N細胞が増加していくが、これらはむしろ2核細胞の出現による二次的变化かもしれない。一般にDNAの合成や有糸分裂は正常に行われるが、その後の細胞質分裂に異常を来すことにより2核細胞が出現すると考えられており、MDS-Lにおける2核細胞の出現も細胞質分裂障害の可能性がある。このことを検証するため、我々は現在 Time lapse 顕微鏡を用いた細胞質分裂像の観察を行っている。

さらにマイクロアレイの結果から細胞周期、特に分裂期関連分子の発現が低下しており、その中でも MYH10、PLK1、AURKB、CIT など細胞質分裂に関与する分子の発現低下が認められた。これらはいず

れも5q-に局在しないが、lenalidomide の作用機序の一端を担う可能性がある。一方で5q31-33に局在し、lenalidomide にて発現が変化する分子も認められ、特に EGR1 など近年5q-を有する MDS の病態形成の候補遺伝子と考えられている分子も含まれており、現在遺伝子導入や siRNA を用いた遺伝子発現抑制などを用いて、MDS-L で認められる形態変化や細胞増殖抑制との関連性を検討している。またプロテオーム解析を含めた蛋白レベルでの発現解析も今後の重要な検討課題である。

また lenalidomide は他の5q-を含む細胞株である HL60 や KG1 には全く効果を示さないことが分かっており、lenalidomide の MDS-L 選択性の評価も今後の検討課題である。

E. 結論

今回我々はMDS-Lにおける lenalidomide の影響として、特に形態学的変化を中心に検討した。これらの分子生物学的基盤や5q-との関連性、MDS-L 選択性の評価など今後解明しなければならない課題は多いが、5q-を有する MDS に対して著効を示す lenalidomide の作用機序を考慮する上で興味深い所見であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 松岡亮仁、近藤敏範、辻岡貴之、栃木亜紀、中原貴子、田坂大象、通山 薫：骨髄異形成症候群由来細胞株 MDS-L に対する lenalidomide の影響. 第70回日本血液学会総会, 2008年10月10日-12日, 京都

研究協力者 中熊 秀喜 (和歌山県立医科大学 輸血・血液疾患治療部 (血液内科) 教授)

研究要旨

造血障害はPNHクローン拡大に必要であり、また主死因でもある。PNHは再生不良性貧血 (AA) や骨髄異形成症候群 (MDS) と特発性造血障害を共有する。これらの造血障害には免疫抑制療法が奏効し自己免疫機序の関与が想定されているが詳細は謎である。これらの患者の血球膜に、免疫応答を誘導するNKG2Dリガンドの病的発現を見出し、その意義を検索してきた。これまでのところ1) 少なくとも一部の患者は、NKG2Dリガンドを発現させる何らかのストレスに曝されている、2) NKG2Dリガンド発現が免疫反応のトリガーとなり、造血障害が誘発または促進されている可能性がでてきた。

A. 研究目的

PNH 発症に関わる PNH クローン拡大の背景にある特発性造血障害の分子病態、特に、NKG2D 介在性免疫の造血障害への関与を明らかにする。

B. 研究方法

PNH および PNH 関連造血障害疾患の AA や MDS の患者の血球膜 NKG2D リガンド (ULBP や MICA/B) の病的発現の検証継続と、その発現による血球傷害または造血コロニー形成障害の有無を調べた。また前方視的臨床経過追跡にて、リガンド発現、血球減少、免疫抑制療法効果との関連性を調べた。

(倫理面への配慮) 学内倫理審査委員会の承認と参加者の同意を得て実施した。

C. 研究結果

骨髄不全症候群患者 88 例中 47 例 (53%) の顆粒球膜、11 例中全例の骨髄 CD34 陽性細胞に、何らかの NKG2D リガンドが病的に発現していた。

これらの病的顆粒球は試験管内で自己リンパ球による傷害を受けた。また NKG2D 抗体の存在下では患者骨髄細胞による造血コロニー形成が改善した。

最長 5 年間の臨床経過追跡により、これらのリガンド発現、血球減少、免疫抑制療法効果に相関が認められた。

D. 考察

顆粒球膜 NKG2D リガンド発現は患者の 53% に認められたが、これは随時採血であり、陰性例でも臨床経過を追うとその後に発現が認められた例があり、実際の陽性患者はもっと多いと思われる。顆粒球と骨髄細胞における NKG2D リガンド発現率が異なる理由は、リガンド陽性造血細胞が駆除されて末梢血でリガンド発現顆粒球が減少したとも考えられる。確かに診断時骨髄ではほぼ全例に検出されており、これを支持する。このような PNH 関連疾患における NKG2D リガンドの高率の血球膜病的発現が契機となり造血障害が誘発または促進されている可能性が高い。今後、一層多症例にて検証するとともに、NKG2D 免疫を狙う新しい分子標的療法の開発の可能性を探る必要がある。

E. 結論

感染および腫瘍化した病的細胞の駆除に働く NKG2D

介在性免疫がPNHおよび関連の特発性造血障害の発生にも深く関与している可能性が高くなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 中熊秀喜、花岡伸佳、川口辰哉、島貫栄弥、小島研介、米村雄士、堀川健太郎：PNH や再生不良性貧血では NKG2D 介在性免疫による造血障害が発生する；第70回日本血液学会総会，2008年10月10日～12日，京都。
- 中熊秀喜：発作性夜間ヘモグロビン（血色素）尿症の魅力；第70回日本血液学会総会，2008年10月10日～12日，京都。

「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」の
セントラルレビュー対象登録例による骨髄検査の実態調査

研究協力者 松田 晃 (埼玉医科大学国際医療センター造血器腫瘍科 教授)

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」のセントラルレビュー対象登録例 73 例 (登録施設診断 再生不良性貧血 (AA): 56 例、骨髄異形成症候群 (MDS): 15 例、診断不能: 2 例) の登録票をもちいて、骨髄検査の実態を調査した。73 例中 55 例 (75%) [AA: 47 例 (84%)、MDS: 6 例 (40%)、診断不能: 2 例 (100%)] に腸骨での骨髄生検が実施された。胸骨または腸骨での骨髄穿刺は全例に実施された。骨髄穿刺が 1 回のみで診断がおこなわれた場合は、腸骨が選択されることが多かった (63%)。腸骨での検査のみ (骨髄穿刺のみ、または骨髄生検+骨髄穿刺) で診断された症例は、骨髄検査部位が明らかでない 70 例のうち 32 例 (46%) であった。胸骨で骨髄穿刺を実施するか否かは、施設間の差が著しかった

A. 研究目的

造血不全の診断に実施されている骨髄検査の実態は不明であるため、それを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

13 施設より登録された「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」のセントラルレビュー対象登録例 73 例 (登録施設診断 再生不良性貧血 (AA): 56 例、骨髄異形成症候群 (MDS): 15 例、診断不能: 2 例) の登録票をもちいて、骨髄生検実施の有無、骨髄穿刺実施の有無/検査部位/回数を調査した。

(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

73 例中 55 例 (75%) [AA: 47 例 (84%)、MDS: 6 例 (40%)、診断不能: 2 例 (100%)] に腸骨での骨髄生検が実施された。胸骨または腸骨での骨髄穿刺

は全例に実施された。18 例 (25%) [AA: 9 例 (16%)、MDS: 9 例 (60%)] は骨髄生検の実施なしに診断された。骨髄生検の実施なしに診断された 18 例では 1-3 回 [1 回: 14 例 (AA: 6 例、MDS: 8 例)、2 回 3 例 (AA: 2 例、MDS: 1 例)、3 回 1 例 (AA: 1 例)] の胸骨または腸骨での骨髄穿刺がおこなわれた。骨髄穿刺が 1 回のみ実施された場合は、腸骨が選択されることが多かった (63%)。複数回の骨髄穿刺が実施された場合は、胸骨も選択されることが多かった (78%)。腸骨での検査のみ (骨髄穿刺のみ、または骨髄生検+骨髄穿刺) で診断された症例は、骨髄検査部位が明らかでない 70 例のうち 32 例 (46%) [AA: 54 例中 21 例 (39%)、MDS: 14 例中 9 例 (64%)、診断不能: 2 例中 2 例 (100%)] であった。腸骨での 1 回の骨髄穿刺のみで診断された症例は 10 例 (AA: 5 例、MDS: 5 例) あり、登録施設診断 AA 5 例全例に、MDS 5 例中 1 例に、登録施設診断と検鏡担当施設の評価と何らかの不一致があり、最終中央診断確定のために検鏡担当施設委員会の共同検鏡を要した。5 例以上の症例登録があった 7 施設のうち、登録例に対しての胸骨での骨髄穿刺の実施率 20% 以下が 2 施設、80% 以上が 2 施設であり、胸骨で骨髄

穿刺を実施するか否かは、施設間の差が著しかった。胸骨で骨髄穿刺を実施された群(中央値57歳)と実施されなかった群(中央値54歳)の年齢に差は認められなかった($p=0.728$)。しかし、60歳以上と未満の比較では、60歳以上の群では胸骨でも骨髄穿刺が実施される傾向が認められた($p=0.170$)。

D. 考察

骨髄生検は造血不全の診断に実施されるべき検査であるが、今回の調査では約1/4の症例では骨髄生検は実施されていなかった。特にMDSでの実施率は40%にすぎず、低形成MDS、線維化を伴うMDS(MDS-F)などの診断とMDSの予後不良因子である abnormal localization of immature precursors (ALIP)の有無の評価に問題を生じる可能性があると思われた。AAでは骨髄細胞密度の評価が重要であるが、骨髄生検の実施がなく1回の腸骨での骨髄穿刺のみでAAと診断された症例が約10%認められた。この場合は、特に高齢者においては健常者でも腸骨の骨髄細胞密度が低下するため、骨髄細胞密度の評価に問題を生じる可能性があると思われた。腸骨での1回の骨髄穿刺のみで診断された例のうち、特に登録施設診断がAAであった例は、セントラルレビューでの診断が苦慮された。診断精度を高めるためには腸骨での1回の骨髄穿刺のみでは不十分と思われた。今回の調査では約50%の症例で胸骨での骨髄穿刺は実施されていなかった。安全性と患者に与える恐怖心への配慮、骨髄MRI検査の実施の普及等を理由として、胸骨での骨髄穿刺は敬遠される傾向があることが推測された。胸骨で骨髄穿刺を実施するか否かは、施設間の差が著しく、施設の方針の影響が強いと思われた。60歳以上の群では胸骨でも骨髄穿刺が実施される傾向があり、高齢者の骨髄細胞密度の評価に対して慎重な対応がおこなわれていると推測された。

E. 結論

造血不全の診断に約1/4の症例では骨髄生検は実施されていなかったこと、MDSでの骨髄生検の実施率は40%にすぎないこと、胸骨での骨髄穿刺を実施するか否かは、施設間の差が著しいことなど、AA/MDS等の造血不全の診断に実施されている骨髄検査の実態が明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 該当なし

2. 学会発表

- 該当なし

研究協力者 山下孝之 (群馬大学生体調節研究所・教授)

研究要旨

先天性骨髄不全症候群 Fanconi 貧血(FA)の原因遺伝子産物は種々の DNA 損傷によるゲノム複製阻害に対する細胞応答に重要な役割を果たすと考えられる。特に最近、損傷乗り越え DNA 合成(TLS)と FA 蛋白の相互作用が注目されている。そこで、本研究では TLS を行う代表的な Y-family DNA polymerase (Y-Pol)と FA 蛋白の相互作用、および Y-Pol の制御機構について研究を行った。DNA 損傷を受けた細胞では、クロマチンにおいて Y-Pol メンバーの Pol η と REV1 が FANCA, FANCD2 と結合することが確認できた。また、Y-Pol の制御に分子シャペロン Hsp90 が重要な役割を果たすことを見いだした。

A. 研究目的

FA は遺伝的に多数のグループに分類される先天性骨髄不全症候群であり、これまでに 13 個の FA 遺伝子が同定された。これらは家族性乳がん(BRCA)遺伝子と一部重複し、また協同しつつ FA/BRCA 経路として DNA 損傷によるゲノム複製の阻害に対する細胞応答に重要な役割を果たす。一方、最近 DNA 損傷部位を乗り越えて複製する TLS ポリメラーゼが多数見いだされている。このうち、特に Y-Pol と FA 蛋白の相互作用が示唆され、注目されている。ほ乳類は Pol η , Pol ι , Pol κ , REV1 という 4 つの Y-Pol を持ち、これらは複製忠実度が低く、DNA 損傷のタイプに応じて突然変異を導入しやすい。Y-Pol は複製阻害部位で生ずるモノユビキチン化 PCNA(Ub-PCNA)に、PCNA 結合部位とユビキチン(Ub)結合部位を介して結合することにより複製阻害部位に動員されると考えられる。しかし、Ub-PCNA と Y-Pol の結合の制御機構は明らかではない。本研究では、FA 蛋白と Y-Pol の相互作用を解析し、また Y-Pol の制御機構を解明することを目的とする。

B. 研究方法

培養細胞を用いて、免疫沈降法、ウエスタンブロッ

ット、GST pull-down 法を用いて、蛋白の発現や相互作用を解析した。また、蛋白の細胞内局在は主として蛍光顕微鏡による観察で解析した。

(倫理面への配慮：該当なし)

C. 研究結果

(1) Y-Pol のうち、Pol η と REV1 が DNA 損傷後にクロマチンにおいて FANCA, FANCD2 と結合することを確認した。

(2) FA 細胞で REV1 の DNA 損傷部位への集積が障害され、点突然変異の導入が抑制されるとの報告がある。しかし、FA-A 細胞、FA-D2 細胞でこれを確認することはできなかった。

(3) 分子シャペロン Hsp90 が Pol η に特異的に結合し、DNA 損傷部位への局在に重要な役割を果たすことを見いだした。Hsp90 は Pol η の構造を制御して、安定性、および Ub 結合と PCNA 結合を促進すると考えられる。

D. 考察

ゲノム複製阻害に対応する FA/BRCA 経路と Y-Pol が物理的に結合することは確認されたが、その機能的意義についてはまだほとんど不明である。今後は、

造血障害における意義を研究することが重要と考えられる。前回報告したように、Hsp90はFA/BRCA経路も促進する。Hsp90は腫瘍細胞で活性が亢進しており、この結果として起こるFA/BRCA経路やPol η の機能亢進は腫瘍細胞の抗がん剤耐性や突然変異に関与するかもしれない。逆に、蛋白変性などを引き起こす環境ストレスがHsp90の機能を阻害し、ゲノム複製阻害への対応を阻害し、結果的に造血幹細胞の増殖障害や腫瘍化を招く可能性が考えられる。

E. 結論

TLS機能を持つY-PolのうちPol η とREV1がFA蛋白と結合することが確認された。Hsp90はFA/BRCA経路だけでなく、Pol η の機能を制御することが示唆された。

F. 研究発表

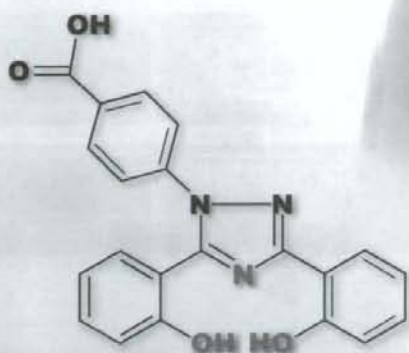
1. 論文発表

- 山下孝之、小田 司、関本隆志: Fanconi 貧血—ゲノム損傷ストレスと造血幹細胞の老化. 日本臨牀 2008;66(3):477-482.

2. 学会発表

- 関本隆志、小田 司、Franklin Mayca Pozo、村雲芳樹、益谷 央豪、花岡 文雄、山下 孝之: 分子シャペロン HSP90は Polymerase- η (Pol- η)の複製フォーカスへの集積と損傷乗越え DNA 合成(TLS)を促進する; 第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会 合同大会, 2008年12月9日-12日, 神戸
- 山下孝之、小田 司、関本隆志: Fanconi 貧血の分子病態—最近の進歩; 第70回日本血液学会, 2008年10月10日-12日, 京都

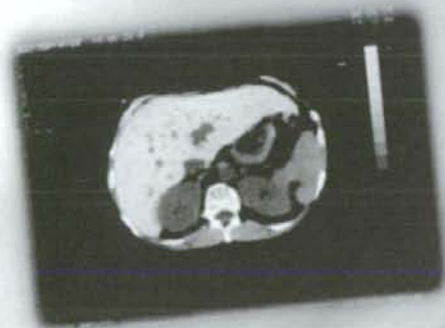
IV. 輸血後鉄過剰症の診療ガイド

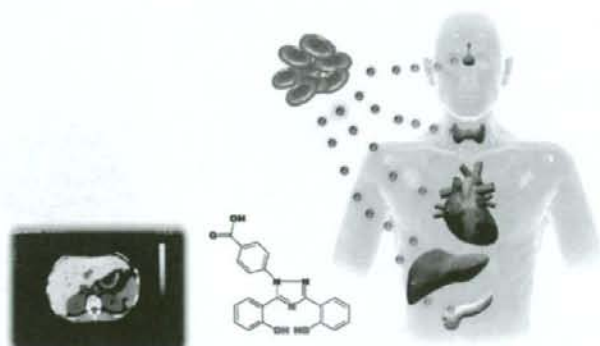


輸	血	後	鉄	過	剰	症	の
診	療	ガ	イ	ド			

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
特発性造血障害に関する調査研究（平成20年度）

研究代表者 小澤 敬也





表紙イラスト：鉄過剰症の主な標的臓器

赤血球輸血によりもたらされる過剰な鉄により、多臓器に広範な障害が認められる。

主なものとして、

肝臓は鉄を蓄積する主要臓器である（左下：CT画像、肝臓の輝度向上）ため、トランスアミナーゼの異常、線維化、肝硬変などが見られる。

心臓には、心筋障害、心不全などをもたらす。

膵臓の β 細胞が破壊され、糖尿病を引き起こす。

下垂体、甲状腺、その他の内分泌臓器に機能不全をもたらす。

（経口鉄キレート剤「デフェラシロクス」の構造を人体の横に示す。）

（旭川医科大学 高後 裕）

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」策定メンバー

自治医科大学内科学講座血液学部門

長崎大学原爆後障害医療研究施設内科

金沢大学大学院医学系研究科細胞移植学

東京医科大学血液内科

大阪大学血液・腫瘍内科学

旭川医科大学内科学講座消化器・血液腫瘍制御内科学

札幌医科大学内科学第4講座

名古屋大学大学院医学系研究科小児科学

小澤敬也、鈴木隆浩

朝長万左男、宮崎泰司

中尾眞二

大屋敷一馬

松村 到

高後 裕

新津洋司郎

小島勢二

<アドバイザー>

Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany

Norbert Gattermann

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
特発性造血障害に関する調査研究（平成20年度）
研究代表者 小澤 敬也（自治医科大学内科学講座血液学部門）

序

再生不良性貧血や骨髓異形成症候群などの骨髓不全症候群では、長期間に亘って赤血球輸血を繰り返さざるを得ない場合が多い。生体では鉄の排泄ルートがないために、輸血で体内に入った過剰の鉄は肝臓・心臓・内分泌器官などに沈着していくようになる。肝臓では肝腫大・線維化・肝硬変が進行し、心臓ではうっ血性心不全や不整脈をきたす。内分泌系では、膵β細胞への鉄沈着により糖尿病が出現し、下垂体系の機能低下も認められる。さらに、鉄過剰は造血系の障害も惹起すると考えられている。輸血後鉄過剰症患者にメシル酸デフェロキサミン（デスフェラル）の連日投与を行うと、血清フェリチン値の低下、肝機能障害の軽快や心機能の改善がみられ、さらに造血状態も改善し、輸血必要量が減少するケースも報告されている。鉄キレート療法をしっかりと行った場合は生存期間も延長することが示されており、鉄過剰は予後に有意の影響を及ぼしていると考えられる。しかし、デスフェラル（注射剤）を輸血の際に投与するだけでは効果がなく、我が国においては、これまでは輸血後鉄過剰症に対して有効な治療手段がないに等しい状況であった。最近、経口鉄キレート剤のデフェラシロクス（エクジエイド）が開発され、我が国でも漸く本格的な鉄キレート療法の実施が可能となった。そこで、特発性造血障害調査研究班では、輸血後鉄過剰症の診療ガイドを平成19年度に策定したところである。本小冊子は、輸血医療に携わる多くの医師に利用いただけるようにその内容をまとめたので、是非御活用いただきたい。

最後に、「輸血後鉄過剰症の診療ガイド」策定メンバー、ならびに本小冊子の作成に御協力いただいた高後裕教授に、心より感謝申し上げる次第である。

平成20年7月

特発性造血障害に関する調査研究班
研究代表者 小澤 敬也

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、1年以上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) ・ 原発性骨髄線維症 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	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。
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="826 1456 1146 1685"> <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										