

く変異体の骨髄細胞への導入によって MDS/AML を発症したマウス骨髄移植モデルでは NF-κB 阻害剤 bortezomib によって生存期間が延長した。

D. 考察

AML1 はこれまで知られていた転写因子としての機能のほか、IKK との蛋白質結合を介して細胞増殖に関わる NF-κB シグナルの制御因子として働くことが明らかになった。

E. 結論

変異型 AML1 による NF-κB シグナルの恒常的活性化が、MDS の発症機構の一つであると考えられる。また、NF-κB が AML1 変異陽性 MDS における新たな治療標的候補として同定された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Shimabe M, Goyama S, Watanabe-Okochi N, Yoshimi A, Ichikawa M, Imai Y, and Kurokawa M. Pbx1 is a downstream target of Evi-1 in hematopoietic stem/progenitors and leukemic cells. *Oncogene*, 10: 4364-4374, 2009.
- Goyama S, Nitta E, Yoshino T, Kako S, Watanabe-Okochi N, Shimabe M, Imai Y, Takahashi K, and Kurokawa M. EVI-1 interacts with histone methyltransferases SUV39H1 and G9a for transcriptional repression and bone marrow immortalization. *Leukemia*, 24: 81-88, 2010.
- Kataoka K, Nannya Y, Hangaishi A, Imai Y, Chiba S, Takahashi T, and Kurokawa M. Influence of pretransplantation serum ferritin on nonrelapse mortality after myeloablative and nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 15:

195-204, 2009.

- Kataoka K, Takahashi T, Iwata H, Seo S, Hangaishi A, Kumano K, and Kurokawa M. Fulminant cytomegalovirus myocarditis after allogeneic bone marrow transplantation: successful cytomegalovirus therapy and mechanical circulatory support for bridge to recovery. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 16: 129-130, 2010.
- Kataoka K, Seo S, Ota S, Takahashi T, and Kurokawa M. Positron emission tomography in the diagnosis and therapeutic monitoring of posttransplant lymphoproliferative disorder after cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, in press.

2. 学会発表

- Nakagawa, M., Shimabe, M., Nishimoto, N., Watanabe-Okochi, N., Ichikawa, M., Nannya, Y., Imai, Y., Kurokawa, M : AML1/Runx1 is a cytoplasmic attenuator of NF-κB signaling: implication in pathogenesis and targeted therapy of AML1-related leukemia. Session Type: Poster Session: The American Society of Hematology 51th Annual Meeting, December 5-8, 2009. New Orleans, Louisiana, USA

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

赤芽球癆の標準的治療の確立に関する研究

分担研究者 澤田 賢一（秋田大学医学部内科学講座、血液・腎臓・膠原病内科学（第三内科）教授）

研究要旨

後天性慢性赤芽球癆（pure red cell aplasia, PRCA）における標準的治療の確立を目的として全国調査を行なった。185例の登録があり、特発性（64例）、胸腺腫関連（42例）、大顆粒リンパ球性白血病関連（14例）および悪性リンパ腫関連赤芽球癆（8例）についてその治療実態を解析するとともに標準的治療に関する考察を加えて報告した。しかし、ABO不適合造血幹細胞移植に伴う赤芽球癆に関しては、登録症例数が1例と少なく、その治療実態は依然として不明であることから新たに全国調査を開始した。現時点における進捗状況について報告する。

A. 研究目的

日本国内における ABO major 不適合同種造血幹細胞移植後に発生する PRCA の発生状況と治療実態を明らかにし、ABO 不適合移植後赤芽球癆に対する標準的治療を確立することである。副次的目的は ABO major 不適合造血幹細胞移植後の赤血球造血回復遅延の有病率とリスク因子を同定することである。

B. 研究方法

1. 対象

調査対象は ABO major 不適合のドナーから同種造血幹細胞移植を受けた患者で、移植ソースは血縁者骨髄および末梢血幹細胞、非血縁骨髄、非血縁臍帯血すべての種類の移植ソースとした。年齢指定はなし、移植時期については赤芽球癆に対する治療とその効果および予後を知るために 2003 年から 2007 年までの 5 年間とした。

2. 方法

一次調査として日本造血細胞移植学会が管理する一元化データベースより ABO major 不適合あるいは ABO major/minor (bidirectional) 不適合ドナーから移植を受けた患者を選択し、好中球数の回復が得られているにもかかわらず網赤血球数の回復が遅延した症例を抽出する。移植後 6 ヶ月以内に原病の再発がみられた症例を除外して、移植後 PRCA の発症が疑わしい症例のコホートを作成した。報告元の施設に別途定める項目について二次調査を今後依頼する予定である。

C. 研究結果

ABO major 不適合のドナーから同種造血幹細胞移植を受けた患者は血縁者間 626 例、非血縁者間 1,038 例、臍帯血 1,182 例であった。登録データから移植後 PRCA が疑われる症例を抽出し、その結果 145 例のコホートが作成された。

D. 考察

日本造血細胞移植学会との協力体制により、ABO major 不適合移植後 PRCA の発症が疑われる国内外最大のコホートが作成された。移植施設に対する二次調査により PRCA の発生状況と治療実態が明らかにされ、移植後 PRCA に対する標準的治療の確立に貢献することが期待される。

E. 結論

ABO major 不適合同種造血幹細胞移植症例 2846 例から PRCA が疑われる 145 例のコホートが作成された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Sawada, K., Hirokawa, M. and Fujishima, N. Diagnosis and management of acquired pure red cell aplasia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 23, 249-59, 2009.
- Hirokawa, M., Sawada, K., Fujishima, N., Kawano, F., Kimura, A., Watanabe, T., Arai, A., Matsui, T., Nakao, S., Urabe, A., Omine, M. and Ozawa K. Acquired pure red cell aplasia associated with malignant lymphomas: a nationwide cohort study in Japan for the PRCA Collaborative Study Group. *Am J Hematol.* 84, 144-8, 2009

2. 学会発表

- Ohyagi, H., Onai, N., Guo, Y-M., Takahashi, N., Hirokawa, M., Sawada, K. and Ohteki T. Prevention of hemophagocytosis by TNF- α and IL-6 blockade in TLR9- and Nod1- ligand induced hemophagocytic syndrome. Saturday, December 5, 2009, Poster Board I-373, 51th The American Society of Hematology, New Orleans, Louisiana, USA, December 5-8, 2009
- 道下吉広、藤島直仁、藤島眞澄、郭 永梅、鷺生

川久美、廣川 誠、澤田賢一:後天性慢性赤芽球癆の免疫病態に関する研究. 第 71 回日本血液学会総会、京都、2009.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

巨核球減少性血小板減少症におけるPNH型血球検出の意義

研究分担者 中尾 眞二（金沢大学大学院医学系研究科 細胞移植学）

研究要旨

我々は昨年までの研究により、巨核球が減少しているため特発性血小板減少性紫斑病とは診断し難い血小板減少症例の中に、再生不良性貧血の免疫病態と関連する発作性夜間血色素尿症（PNH）型血球がしばしば検出されることを明らかにした。血小板減少患者におけるPNH型血球の検出意義をさらに明らかにするため症例数を増やすとともに、免疫抑制療法に対する反応性との関係を検討した。白血球数とヘモグロビン値がほぼ正常でありながら血小板数が10万/ μ L

以下で骨髄巨核球が増加していない72例中22例（31%）でPNH型血球が検出された。シクロスポリン療法を受けた22例（PNH型血球陽性14例、陰性8例）の奏効率はそれぞれ71%、38%であった。したがって、このようなタイプの血小板減少症、特にPNH型血球陽性患者に対しては積極的に免疫抑制療法を行う必要があると考えられた。

A. 研究目的

血小板減少を主訴とする患者の中には、未成熟血小板分画や巨核球の増加を認めないために、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）とは診断できない症例がしばしばある。一方、再生不良性貧血は汎血球減少を特徴としているが、その発症様式は様々であり、血小板減少症から移行する症例もある。我々は、ITPとは診断し難い骨髄巨核球低形成性血小板減少症患者の中にPNH型血球がしばしば検出され、そのような例の多くがシクロスポリン（CsA）により血小板減少の回復が示すことを昨年の研究で明らかにした。そのような巨核球減少性血小板減少症患者におけるPNH型血球の意義を確立するため、同様の特徴を有する症例を集積し、PNH型血球の検出率と、免疫抑制療法に対する反応性を検討した。

B. 研究方法

2007年10月から2009年8月までの間に、高感度フローサイトメトリーを用いたPNH型血球検査が当科で行われた症例の中で、①白血球数3000/ μ L以上、②ヘモグロビン10g/dL以上、③血小板10万/ μ L以下で、骨髄穿刺塗抹標本または骨髄生検にて骨髄巨核球の増加が認められない症例を対象とした。

C. 研究結果

この規準を満たす例は72例同定され、そのうち22例（31%）でPNH型血球が検出された。PNH型血球陽性例と陰性例との間で血球数を比較したところ、ヘモグロビンのみ前者（平均値10.9g/dL）が後者（12.4g/dL）より低値であったが、他の血球数には差はなかった。72例中28例（PNH血球陽性例18例、陰性例10例）で免疫抑制療法が施行された。

CsA 単独療法を受けた 22 例中、PNH 型血球陽性例 14 例の有効率は 71%、陰性例 8 例における有効率は 38%、抗ヒト胸腺細胞ウマ免疫グロブリン (ATG) を含む免疫抑制療法を受けた例全体の有効率はそれぞれ 72%、50%と、いずれにおいても PNH 型血球陽性例の奏効率が陰性群に比べて高かったが、両群間に有意差はみられなかった。

D. 考察

PNH 型血球陽性の再生不良性貧血や骨髓異形成症候群の不応性貧血には、他の血球系統に比べて血小板減少が顕著であるという特徴がある。一方、進行の遅い再生不良性貧血の中には、発病当初は血小板減少だけしか認めなかった例がしばしば経験される。昨年の我々の検討により、慢性的な血小板減少症患者の中に PNH 型血球陽性の骨髓不全が隠れていることが明らかになった。今回の検討により、巨核球減少性の血小板減少症患者の中に、PNH 型血球陽性の軽症再生不良性貧血例病態の患者が約 30%含まれていることが示唆された。さらに、PNH 型血球が陰性であっても、PNH 型血球陽性例ほどではないものの、CsA によって改善する例があることも明らかになった。

免疫病態によると考えられる骨髓不全であっても、一般に診断から治療までの期間が長くなると免疫抑制療法の奏効率が著しく低下する。しかし、現在のガイドラインでは、輸血不要の非重症再生不良性貧血患者に対しては無治療で経過をみるものが勧められている。今回の検討によって、血球減少の程度が軽くても血小板減少が目立つ巨核球減少性の骨髓不全に対しては、PNH 型血球の有無によらず CsA を投与してその反応をみるのが重要と考えられた。

E. 結論

巨核球増加がみられない血小板減少症の中には、

PNH 型血球陽性の「前再生不良性貧血状態」が含まれている。これらの患者は免疫抑制療法に対する反応性が特に高いことから、輸血が不要であっても積極的に CsA を施行することが勧められる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Sugimori C, Mochizuki K, Qi Z, Sugimori N, Ishiyama K, Kondo Y, Yamazaki H, Takami A, Okumura H, Nakao S: Origin and fate of blood cells deficient in glycosylphosphatidylinositol-anchored protein among patients with bone marrow failure. *Br J Haematol* 147:102-112, 2009.
- Espinoza JL, Takamatsu H, Lu X, Qi Z, Nakao S: Anti-moesin antibodies derived from patients with aplastic anemia stimulate monocytic cells to secrete TNF-alpha through an ERK1/2-dependent pathway. *Int Immunol* 21:913-923, 2009.
- Takamatsu H, Espinoza JL, Lu X, Qi Z, Okawa K, Nakao S. Anti-moesin antibodies in the serum of patients with aplastic anemia stimulate peripheral blood mononuclear cells to secrete TNF-alpha and IFN-gamma. *J Immunol* 182: 703-710, 2009

2. 学会発表

- Katagiri T, Qi Z, Seiki Y, Sugimori N, Espinoza JL, Takami A, Ohtake S, Nakao S: Hematopoietic stem cell differentiation pathway in humans deduced from the lineage diversity of PNH-type cells in patients with bone marrow failure. Poster Session, Board I-511: The American Society of Hematology 51th Annual Meeting, December 8-11, 2009. New Orleans, LA, USA

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

小児の骨髄不全と骨髄異形成症候群に関する研究

研究分担者 中畑 龍俊（京都大学大学院研究科発達小児科学）
真部 淳（聖路加国際病院小児科）

研究要旨

先天性骨髄不全を扱う4つの研究班が2009年に相次いで発足した。すなわち、先天性赤芽球癆（Diamond Blackfan 貧血：DBA）（主任：伊藤悦朗）、先天性角化不全症（DC）（主任：小島勢二）、遺伝性鉄芽球性貧血（主任：張替秀郎）、および Congenital dyserythropoietic anemia（CDA）（主任：真部淳）の4班である。いずれの疾患も近年、責任遺伝子が明らかになったが、きわめて稀であり、本邦における実態は把握されていない。そこで全国の小児科施設（520施設）および小児血液学会評議員（150名）を対象に、2000年1月以降の症例について調査を行った。2009年11月にアンケートを送付し、2010年1月末までに70%の施設から回答が得られ、DBA 132例、DC 34例、遺伝性鉄芽球性貧血 5例、CDA 17例が把握された。今後これらの症例の二次調査ならびに遺伝子診断を行うことにより、本邦におけるこれら先天性骨髄不全の全体像が明らかになると考えられる。

A. 研究目的

小児期の骨髄不全の多くは先天要因を有する先天性骨髄不全（inherited bone marrow failure: iBMF）であるが、その多くで遺伝子異常が明らかになってきた。すなわち、

1) DC (Dyskeratosis congenita)

DKC1、TERC、TERT : Telomere の短縮

2) SDS (Shwachman-Diamond 症候群)

SBDS : ribosome 機能の破綻

3) FA (Fanconi 貧血)

13種類の遺伝子同定 : DNA 修復の異常

4) DBA (Diamond-Blackfan 貧血)

RPS19、RPS24 : ribosome 機能の破綻

5) KS (Kostmann 症候群)

ELA2、HAX1、WASP : Elastase? Mitochondria?

などである。

小児において再生不良性貧血など、骨髄不全症例を診療するにあたり、これらの先天疾患をスクリー

ニングすることの臨床的な意義は大きい。すなわち、

1) 骨髄移植レジメンの決定（治療毒性）

2) 同胞ドナーの検索

3) iBMF では ATG は効果がない

4) iBMF の一部では androgen が効果あり

5) iBMF では移植後固形腫瘍の発症に注意を要する

6) 遺伝相談（着床前診断を含む）

などがあげられる。

B. 研究方法

先天性骨髄不全を扱う4つの研究班が2009年に相次いで発足した。すなわち、先天性赤芽球癆（Diamond Blackfan 貧血：DBA）（主任：伊藤悦朗）、先天性角化不全症（DC）（主任：小島勢二）、遺伝性鉄芽球性貧血（主任：張替秀郎）、および Congenital dyserythropoietic anemia（CDA）（主任：真部淳）の4班である。いずれの疾患も近年、責任遺伝子が明らかになったが、きわめて稀であり、本邦における実

態は把握されていない。そこで全国の小児科施設（520施設）および小児血液学会評議員（150名）を対象に、2000年1月以降の症例について調査を行った。なお、DCについては全国の大学病院の皮膚科教室（110施設）も対象とした。

C. 研究結果

2009年11月にアンケートを送付し、2010年1月末までに70%の施設から回答が得られ、DBA 132例、DC 34例、遺伝性鉄芽球性貧血 5例、CDA 17例が把握された。

D. 考察

現在、各症例についての詳細な二次調査ならびに遺伝子検索が開始されたところであるが、本研究により、本邦における先天性骨髄不全の全体像が初めて明らかになると考えられる。その結果に基づき、国内における先天性骨髄不全の取り扱いが決定されるであろう。

2009年2月に開始された小児血液学会の中央診断を組み込んだ骨髄不全および骨髄異形成症候群の全例登録研究は順調に登録数が増加し、早くも190例を超えている。上記の遺伝子検索研究と融合させることにより、これらの症例の前方視的な診断・追跡が可能となるであろう。

E. 結論

本研究により、国内における先天性骨髄不全の取り扱いが決定される見通しが立ったと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Hasegawa D., Manabe A., Yagasaki H., Ohtsuka Y., Inoue M., Kikuchi A., Ohara A., Tsuchida M., Kojima S., Nakahata T.: Treatment of Childhood MDS Study

Group Trial (MDS99). *Pediatr. Blood Cancer* 53:1011-1015,2009.

- Muramatsu H, Makishima H, Jankowska AM, Cazzolli H, O'Keefe C, Yoshida N, Xu Y, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Takahashi Y, Kato K, Manabe A, Kojima S, Maciejewski JP. Mutations of E3 ubiquitin ligase Cbl family members but not TET2 mutations are pathogenic in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*, in press

2. 学会発表

- Manabe A, Hirabayashi S, Watanabe S, Zaïke Y, Tsuchida M, Masunaga A, Yoshimi A, Ito E, Kikuchi A, Ohara A, Kojima S, Nakahata T: Myelodysplastic syndrome and myeloproliferative disease in children: A prospective registration of 222 cases. *Haematologica* 2009;94 (s1): S1 (国際小児MDS/骨髄不全学会、オランダ, 2009)

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

骨髄異形成症候群の国際的予後因子検討事業

研究分担者 宮崎 泰司（長崎大学医歯薬学総合研究科 教授）

研究要旨

骨髄異形成症候群（Myelodysplastic syndromes, MDS）は造血幹細胞の異常に起因するクローン性造血障害だが、病型によって予後は大きく異なり臨床的な対応を決定する上で症例ごとの予後予測が極めて重要である。これまでは1997年に発表された International prognostic scoring system (IPSS) が幅広く用いられてきたが、この度、MDS にみられる染色体異常など、その後に判明した新たな因子を加えての予後予測システムの作成が行われることになった。この事業は国際共同研究として実施されており、日本も本班を中心として参加している。

A. 研究目的

MDS は症例ごとに大きく予後が異なり、臨床現場で治療方針を決定するためには症例の予後を評価することが必要となる。これまでは1997年に発表された IPSS が世界的にも広く用いられ、国内でも実臨床の現場や新薬開発の臨床試験などで活用されてきた。しかし、その後に種々の MDS 予後予測因子が明らかとなり、中でも MDS の染色体異常と夜ごとの関連が収集されてきた。今回、染色体など新たな因子を含めた形で新しい MDS 予後予測システムを開発することとなった。多数例を収集するために本研究は国際共同研究となっている。日本からも本班を中心としてこの研究に参加することとなった。

B. 研究方法

本研究は国際的な MDS 研究組織である MDS foundation がとりまとめ役を担っている。日本のデータは、本班参加施設より MDS 症例のデータベースを提供いただき、長崎大学にてそれを取りまとめて日本 MDS データとした。その際には対応表は長崎大学

へ提出されず、対応表のない連結可能匿名化のデータとなる。各国のグループからのデータは本班と同様に対応表の無い連結可能匿名化データとして MDS foundation が契約している統計解析会社（ClinSmart）へ提出される。各国の代表からなる研究者グループが話し合いでデータ解析に関する方針を決定し、その解析計画に従って解析が行われる。

（倫理面への配慮）

本研究は「疫学研究の倫理指針」に則り、とりまとめとなった長崎大学医歯薬学総合研究科において倫理委員会の審査を受け、承認が得られている。

C. 研究結果

2009年12月に米国で研究者グループによる会議が開かれ進捗報告と今後の方針が話し合われた。2009年12月の時点で10グループより8800例を超える症例データが提出されている。染色体に関しても、予後の異なる5グループに層別可能な染色体リスクの原案が提唱された。今後、各国からのデータのクリーニングを進めると同時に、染色体についても複

数の異常が見られるものをどのように取り扱うかなど、検討を進めることとなった。データ解析によって2010年中のIPSSに類似したスコアリングシステムの作成を目指している。

D. 考察

MDSは症例ごとの臨床像が大きく異なり、その対応は個々の例で大きく異なる。また、IPSSでの問題点とされてきた染色体異常の取り扱いがあらためられることになる。今回の世界的な症例集積による予後予測システムの作成は、多数例に基づきつつ新たな因子を加えるによって、より正確で細やかな対応が可能になると期待される。

E. 結論

新たなMDS予後予測システム作成に対して、国内を代表して本班からの貢献が重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Sakai M, Miyazaki Y, Matsuo E, Moriuchi Y, Hata T, Fukushima T, Imaizumi Y, Imanishi D, Taguchi J, Iwanaga M, Tsushima H, Inoue Y, Takasaki Y, Tsuchiya T, Komoda M, Ando K, Horio K, Moriwaki Y, Tominaga S, Itonaga H, Nagai K, Tsukasaki K, Tsutsumi C, Sawayama Y, Yamasaki R, Ogawa D, Kawaguchi Y, Ikeda S, Yoshida S, Onimaru Y, Tawara M, Atogami S, Koida S, Joh T, Yamamura M, Matsuo Y, Soda H, Nonaka H, Jinnai I, Kuriyama K, Tomonaga M.: Long-term efficacy of imatinib in a practical setting is correlated with imatinib trough concentration that is influenced by body size: a report by the Nagasaki CML Study Group. *Int J Hematol*. 2009Apr;89(3):319-25.
- 宮崎泰司、波多智子: 輸血後鉄過剰症とその治療. *日本医事新報* 2009Sep;4462:51-5.

- Matsuda A, Germing U, Jinnai I, Araseki K, Kuendgen A, Strupp C, Iwanaga M, Miyazaki Y, Hata T, Bessho M, Gattermann N, Tomonaga M: Differences in the distribution of subtypes according to the WHO classification 2008 between Japanese and German patients with Refractory Anemia according to the FAB classification in Myelodysplastic Syndromes. *Leukemia Res*. 2009 Dec 16. [Epub ahead of print]
- Morita Y, Kanamaru A, Miyazaki Y, Imanishi D, Yagasaki F, Tanimoto M, Kuriyama K, Kobayashi T, Imoto S, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R: Comparative analysis of remission induction therapy for high-risk MDS and AML progressed from MDS in the MDS200 study of Japan Adult Leukemia Study Group. *Int J Hematol*, 2010Jan;91(1):97-103.

2. 学会発表

省略

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

JAK2V617F 変異によるアポトーシスならびに細胞周期関連タンパクへの影響

研究分担者 村手 隆（名古屋大学医学部保健学科 教授）

研究要旨

骨髄増殖性疾患、ことに真性多血症の責任遺伝子として JAK2V617F の変異が発見され、その病態への関与に注目が集まっている。我々はこの変異がもたらす細胞への影響を、JAK2V617F 遺伝子を導入した細胞株を用いアポトーシス関連タンパクおよび細胞周期関連タンパクの変化について解析した。解析の結果、JAK2V617F による IL-3 依存性細胞株 Ba/F3 細胞のサイトカイン非依存性増殖には Bcl-XL, p27 の発現調節に変化がその主因であり、その発現異常にはそれぞれ転写の上昇、タンパク分解の抑制が関与することが明らかになった。

A. 研究目的

骨髄増殖性疾患、ことに真性多血症の責任遺伝子として JAK2V617F の変異が発見され、その病態への関与に注目が集まっている。我々はこの変異がもたらす細胞への影響を、アポトーシス関連タンパクおよび細胞周期関連タンパクの変化について解析した。

B. 研究方法

IL-3 依存性マウス細胞株 Ba/F3 に野生型 JAK2、変異型 JAK2V617F を過剰発現した細胞株 (Shide et al. Leuk Res 2007) を用いて、アポトーシス関連タンパクおよび細胞周期関連タンパクの変化を解析した。IL-3 の有無の培養条件下での両細胞株の比較を行い、両者で差異の認められた Bcl-XL, p27 についてその発現異常の機序を詳細に解析した。

（倫理面への配慮）

細胞株を用いた解析であり、とくに関係しない。

C. 研究結果

JAK2 変異型導入株でのアポトーシス関連タンパク

では Bcl-XL の発現上昇を、細胞周期関連タンパクでは p27 の発現の低下を認めた。さらに Bcl-XL では転写亢進とその 5' プロモーター領域に STAT 転写因子結合領域を同定し、p27 については p27 そのものの調節機序は JAK2 野生株、変異株共に差異はなく、変異株においてユビキチン E3 リガーゼのサブユニットである Skp2 mRNA ならびにタンパクの発現が上昇し、p27 タンパクの分解が促進されること、この p27 の発現レベルの低下の原因であることを明らかにした。Bcl-XL, p27 に認められた変化は STAT5 の恒常的活性化型 cDNA を導入することによっても再現された。また、この Skp2 の発現上昇に関わる STAT 結合部位をその 5' プロモーター領域に同定した。これらの現象は BCR/ABL 遺伝子を導入した細胞株においても同様に認められた。

D. 考察

今回の解析により JAK2V617F によるサイトカイン非依存性増殖には Bcl-XL, p27 の発現調節の変化がその主因であることが明らかになった。

E. 結論

今回の我々の検討により、骨髄増殖性疾患における JAK2V617F のもたらす分子病態とその機序が明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Furuhata A, Kimura A, Shide K, Shimoda K, Murakami M, Ito H, Gao S, Yoshida K, Tagawa Y, Hagiwara K, Takagi A, Kojima T, Suzuki M, Abe A, Naoe T, Murate T. p27 deregulation by Skp2 overexpression induced by the JAK2V617 mutation Biochem Biophys Res Commun. 2009 Jun 383(4):411-416.

2. 学会発表

● Murate T, Furuhata A, Kimura A, Murakami M, Ito H, Gao S, Yoshida K, Takagi A, Kojima T, Naoe T. 第 71 回日本血液学会・2009 年 10 月 23 日～25 日, 京都.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

再生不良性貧血の臨床調査個人票の改訂案の提案

研究分担者 杉田 稔（東邦大学医学部社会医学講座衛生学 教授）

研究要旨

我々は平成 20 年度に、再生不良性貧血の臨床調査個人票を用いて、認定基準の観点から新規申請患者の臨床的特徴を検討した。その結果、現状では、記載する主治医の負担の大きさに比較して疫学資料としての妥当性に問題があり、さらに認定審査段階での客観的な判断に支障を生じる危険性さえ存在することが明らかとなった。そこで本研究では、これらの問題点を解決するため、再生不良性貧血の臨床調査個人票の改訂案を提案することを目的とした。具体的には、まず平成 20 年度の我々の研究結果を基に、記載項目の見直し、申請方法の改善など臨床調査個人票の改訂項目を抽出した。次に、本研究班に所属する再生不良性貧血に造詣の深い 13 名を対象として改訂項目に関するアンケート調査を実施した。その結果を基にして臨床調査個人票の改訂案を作成した。今後、この改訂案について本研究班の班員から御意見を頂き、必要な修正を加えた上で厚生労働省健康局疾病対策課に改訂を申し入れる予定である。

A. 研究目的

臨床調査個人票は世界に類を見ない貴重な疫学資料である。我々は平成 20 年度に、再生不良性貧血の臨床調査個人票を用いて、認定基準の観点から新規申請患者の臨床的特徴を検討した。その結果、現状では、記載する主治医の負担の大きさに比較して疫学資料としての妥当性に問題があり、さらに認定審査段階での客観的な判断に支障を生じる危険性さえ存在することが明らかとなった。そこで本研究では、これらの問題点を解決するため、再生不良性貧血の臨床調査個人票の改訂案を提案することを目的とした。

B. 研究方法

平成 20 年度の我々の研究結果を基に、記載項目の見直し、申請方法の改善など臨床調査個人票の改訂項目を抽出した。次に、本研究班に所属する再生不

良性貧血に造詣の深い 13 名を対象として改訂項目に関するアンケート調査を実施した。その結果を基にして臨床調査個人票の改訂案を作成した。

（倫理面への配慮）

本研究では、個人情報を使用しない。

C. 研究結果

1. 記載項目の見直し

1) 網赤血球の記載を‰から実数表記に変更する。

→ 13 名全員が賛成（‰も残す：2 名）

2) 好中球について白血球百分率に加えて実数も記載する。

→ 13 名中 10 名が賛成（%は不要：1 名）

3) MCV の記載を追加する。

→ 13 名中 10 名が賛成（Ht を削除：1 名）

4) データの信頼性を高めるため、骨髓穿刺所見お

よび骨髓生検所見の病理報告書のコピーを添付する。

→ 賛成 6 名、反対 3 名、その他 4 名

5) 骨髓生検所見の記載に造血細胞比率を記載する
(但し、病理報告書のコピーが添付されている場合は不要)。

→ 賛成 7 名、反対 3 名、その他 3 名

6) 血清鉄、不飽和鉄結合能、鑑別診断(鑑別できる・できない)は疫学・福祉行政上の価値が低く、記入する医師の負担も少なくないので削除する。

→ 賛成 8 名、反対 4 名、その他 1 名

2. 申請方法の改善

1) 医療費の公費負担は、申請日ではなく、再生不良性貧血の診断日に遡って実施される。

→ 13 名全員が賛成(付帯意見: 2 名)

2) 記載もれや病理報告書が添付されていない申請者は保健所の受付で受理しない。

→ 賛成 4 名、反対 9 名

上記の結果から、1. 1) 2) 3) および 2. 1) を改訂案に採用した。また、1. 4) はオプションとして採用した。これらに加えて、血清鉄、不飽和鉄結合能、血清フェリチンを実数表記にするなどの修正を加えて、臨床調査個人票の改訂案を作成した。

D. 考察

本研究により、再生不良性貧血の臨床調査個人票の改訂案を提案することができた。今後、この改訂案について本研究班の班員から御意見を頂き、必要な修正を加えた上で厚生労働省健康局疾病対策課に改訂を申し入れる予定である。

この改訂案が採用されれば、再生不良性貧血の臨床調査個人票の記載にかかる主治医の負担が軽減され、かつ認定審査が改善されることが期待される。さらに、記載項目の見直しにより、より正確な臨床疫学的特徴の把握が可能になることが期待される。

E. 結論

再生不良性貧血に関して、平成 20 年度の我々の研究結果とその領域の専門家に対するアンケート調査を基に、記載項目の見直し、申請方法の改善からなる臨床調査個人票の改訂案を提案した。この改訂案により、より正確な臨床疫学像の把握が可能になることと再生不良性貧血の認定審査が改善されることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- Shimada, N., Ohtsu, T., Shirasawa, T., Ochiai, H., Hoshino, H., Kokaze, A., Nakao, S., Ozawa, K., Nagai, M., Sugita, M.: Clinical characteristics of new patients applying for enrolment in the Japanese aplastic anemia register. Session Type: Poster Session, Board #P186: The Joint Scientific Meeting of IEA Western Pacific Region and Japan Epidemiological Association, January 9-10, 2010. Koshigaya, Saitama, Japan

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

III. 研究協力者報告書

骨髄に対する移植片対宿主反応：ドナーCD4陽性T細胞による造血ニッチ障害

研究協力者 今村 雅寛（北海道大学大学院医学研究科 教授）
庄野 雄介（北海道大学大学院医学研究科 大学院）
上羽 悟史（東京大学大学院医学系研究科分子予防医学 助教）
松島 綱治（東京大学大学院医学系研究科分子予防医学 教授）

研究要旨

移植片対宿主反応に伴う骨髄抑制は、同種造血幹細胞移植後に認められるが、その詳細な機序は不明であった。私達は、移植片対宿主病を有するモデルマウスの解析で、ドナーCD4陽性T細胞が移植後早期に宿主の骨髄間質系細胞（特に骨芽細胞）を障害することを明らかにした。この骨髄に対する移植片対宿主反応ではリンパ球系細胞の再構築が遅延し、特にB細胞産生が極度に障害されることがわかった。抗CD4抗体投与により、B細胞産生は回復し、移植片対宿主病も改善した。本研究により、骨髄の造血ニッチが移植片対宿主病の標的となることが明らかとされ、移植後の造血機能障害や免疫学的再構築遅延の原因となり得ることが示された。

A. 研究目的

同種造血幹細胞移植後の急性移植片対宿主病は皮膚、肝臓、腸管を主な標的とするが、その骨髄に与える影響についても明らかにすることを目的に、マウスモデルを作成して解析した。

B. 研究方法

B6マウス（CLEA、東京）ドナーとし、BDF1マウスをレシピエントとした。ドナーマウスより骨髄細胞を採取し、免疫ビーズを用いて成熟型T細胞を除去した後、 5×10^6 骨髄細胞 +/- 脾臓由来 5×10^6 T細胞を 11Gy の全身放射線照射したレシピエントマウスに尾静脈より移植した。移植片対宿主病（GVHD）の重症度評価は、Cookらの報告に準じて行った。血球のカウントはフローサイトメトリあるいはCelltac（日本光電、東京）を用いて行った。定量的RT-PCR法により、転写因子の解析を行った。骨髄を4%パラホルムアルデヒドで

処理後、パラフィンに包埋し、脱灰後HE染色を施し、骨髄病理組織所見の検討を行った。免疫染色は、凍結切片を作成して行った。ALP染色はHistofine Simple Stain Alkaline Phosphatase（ニチレイ、東京）を用いて行った。抗CD4抗体（BioXCell、West Lebanon、NH）の投与は移植後4日目と6日目に200 μ gを腹腔内投与した。

（倫理面への配慮）動物実験の指針に則り、本研究を行った。

C. 研究結果

対照群に比較して、GVHD群では骨髄、脾臓、胸腺細胞の低下を認め、末梢血においても、各系統の細胞数の低下が顕著であった。特に、末梢血の中でも、B細胞の回復が長期にわたり抑制されていたことは注目に値する。GVHD群では各分化段階のB細胞が減少していることが明らかとなり、骨髄細胞を用いた解析では、B細胞の分化・成熟に必要な転

写因子 (E2A、EBF、PAX5) の発現低下が認められた。骨髓病理組織所見の検討では、HE 染色で GVHD 群において顕著な骨芽細胞の消失が見られ、ALP 染色によっても同様の所見が cortical area および trabecular area で確認された。その他の GVHD 群における骨髓病理組織の特徴的所見としては、

細胞成分減少、血管類洞の膨化と融合、出血が挙げられる。

GVHD で障害されるのは造血幹細胞か、あるいは支持細胞かを決定するために、二次移植の系を用いて検討したところ、GVHD 群の造血幹細胞であっても正常の支持細胞の存在下では血球減少を呈することはなく、GVHD によって支持細胞が障害された場合にのみ、血球減少が誘導されることが明らかとなった。

抗 CD4 抗体の投与により、全身的な GVHD のみならず、骨芽細胞に対する障害も解除された。

D. 考察

同種造血幹細胞移植後の急性 GVHD は、従来皮膚、肝臓、腸管を主な標的とすることが示されてきたが、本研究で骨髓に対する GVHD も存在し、ドナー由来 CD4 陽性 T 細胞によるレシピエントの骨髓支持細胞障害、特に骨芽細胞障害が誘導されていることが明らかになった。さらに、B 細胞の持続的分化・成熟障害が誘導され、免疫不全に関連することも示唆された。骨髓に対する GVHD では、造血幹細胞より支持細胞が強く障害されており、初期の B 細胞の分化・成熟にかかわる複数の転写因子の発現が低下しているが、その機序の解明は今後の課題である。

骨髓 GVHD の誘導にはドナー CD4 が関与し

ているが、骨芽細胞上にクラス II 主要組織適合抗原の発現は必須ではなく、他の間接的な機序が関わっていると考えられた。しかも、抗 CD4 抗体投与時期が遅くなれば、GVHD は回復せず、比較的早期に CD4 陽性 T 細胞による骨芽細胞障害が誘導されているため、臨床応用の際に、留意すべき点である。

E. 結論

骨髓に対する移植片対宿主反応が存在し、ドナー由来 CD4 陽性 T 細胞がレシピエントの骨芽細胞障害を起こすことが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

● Shono Y, Ueha S, Abe J, Kurachi M, Wang Y, Imamura M, Matsushima K. : Bone Marrow GVHD: Early destruction of bone marrow hematopoietic niche mediated by donor CD4⁺ T cells. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、2009 年 12 月 2 日～4 日、大阪。

● 庄野雄介、上羽悟史、松島綱治、今村雅寛 : Bone Marrow GVHD: Destruction of hematopoietic niche by donor CD4⁺ T cells. 第 32 回日本造血細胞移植学会総会、2010 年 2 月 19 日～20 日、浜松。

本態性血小板血症で認められた新規 MPL 変異の解析

研究協力者 大橋 春彦 独立行政法人国立病院国立病院機構名古屋医療センター
臨床研究センター 部長

研究要旨

原発性骨髄線維症 (PMF) および本態性血小板血症 (ET) の一部においてトロンボポエチン受容体 (MPL) 遺伝子のコドン 515 変異 (W515L および W515K) が認められることが報告されている。我々は ET の 1 症例で新規の MPL コドン 515 変異 (W515-P518delinsKT) を同定した。この変異は 4 個のアミノ酸 (Trp, Gln, Phe, Pro) の欠損と 2 個のアミノ酸 (Lys, Thr) の挿入を来たす後天的に獲得された変異であった。また *in vitro* で培養した造血コロニーの解析においてホモ変異型のコロニーを認め、染色体組み換えによる変異アレルの増幅が起こっていることが示唆された。

A. 研究目的

原発性骨髄線維症 (PMF) および本態性血小板血症 (ET) の一部においてトロンボポエチン受容体 (TpoR, MPL) 遺伝子のコドン 515 変異 (W515L および W515K) が認められることが報告されている。我々は PMF および ET 症例を対象とした MPL 遺伝子の変異解析を行う過程でコドン 515 を含む複雑な欠損・挿入型変異を同定し、詳細な検討を行った。

B. 研究方法

<症例> 症例は 45 歳の女性であり、解析時点で ET と診断されてから 2 年が経過していた。血液疾患の家族歴はなかった。初診時の血液データは WBC 8,970 / μ L, Hb 11.9 g/dL, Plt 188.4 万/dL であり、経過中血栓症の合併は認めなかった。

<遺伝子解析> 末梢血顆粒球の DNA を用いて MPL 遺伝子エクソン 10 全長のダイレクトシーケンシングを行った。T リンパ球の DNA を用いて検出された MPL 遺伝子の変異の有無を検討した。末梢血単核球を用いて各種サイトカイン存在下で *in vitro* でメチ

ルセルロース法による造血コロニーアッセイを行い、個々のコロニーを回収して DNA を抽出した。造血コロニーの DNA を用いて、蛍光ラベルプライマーを用いた PCR により MPL 遺伝子のコドン 515 を挟む領域を増幅し、GeneScan 法によるフラグメント解析を行い、増幅産物のサイズの差を指標としてそれぞれの造血コロニーの MPL 遺伝子型の判定を行った。

(倫理面への配慮)

骨髄増殖性疾患患者を対象とした遺伝子解析に関しては当施設のヒトゲノム・遺伝子解析研究審査委員会の承認を受けており、また検体採取に当たっては同意を取得している。

C. 研究結果

顆粒球の DNA を用いた解析でこれまで報告されていない MPL 遺伝子変異を検出した。この変異はコドン 515 を含む領域に 10 塩基の欠損と 4 塩基の挿入を来たした *in frame* の変異であった。この結果 4 個のアミノ酸 (Trp, Gln, Phe, Pro) の欠損と 2 個のアミ

ノ酸 (Lys, Thr) の挿入が起こると考えられ、W515-P518delinsKT と命名した。T リンパ球の DNA では変異は認められなかった。

造血コロニーの解析では、赤芽球系コロニーの約半数がホモ変異型であり、残りは野生型であった。骨髓球系コロニーも同様であったが、ヘテロ変異型のコロニーも少数認められた。

D. 考察

ET の 1 症例でアミノ酸の欠損・挿入を来たす MPL 遺伝子エクソン 10 の新規変異 (W515-P518delinsKT) を同定した。今回この変異の機能解析は行っていないが、Tpo 非存在下で TpoR の活性化を抑制する amphipathic motif (KWQFP : 514~518 番目のアミノ酸) の大部分が欠損しており、おそらく他の W515 変異と同様 TpoR の恒常的な活性化を引き起こすものと考えられる。またこの変異は T リンパ球では認められないことから、後天的に獲得されたものであることが確認された。

JAK2-V617F 変異や MPL-W515L/K 変異に関しては変異アリルを有する染色体の組み換えによりホモ変異型造血細胞が形成されることが知られている。造血コロニーを用いた解析でホモ変異型コロニーを認めたことより、本症例においてもおそらく同様の機序により形成されたホモ変異型造血細胞が増殖の主体となっていると考えられる。

E. 結論

ET の 1 症例でアミノ酸の欠損・挿入を来たす新規 MPL 遺伝子変異 (W515-P518delinsKT) を同定した。この変異が後天的に獲得されたものであること、おそらく染色体の組み換えによると思われるホモ変異型細胞の形成が認められることを確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

● Ohashi H, Arita K, Fukami S, Oguri K, Nagai H, Yokozawa T, Hotta T, Hanada S: Two rare MPL gene mutations in patients with essential thrombocythemia. *Int J Hematol.* 2009 Oct;90;431-432.

2. 学会発表

● Ohashi H, Arita K, Oguri K, Yokozawa T, Nagai H, Hamaguchi M, Hanada S, Hotta T: Mutation analysis of the MPL gene in patients with essential thrombocythemia 第 71 回日本血液学会学術集会, 2009 年 10 月 23 日~25 日、京都。

研究協力者 小原 明 (東邦大学医療センター大森病院輸血部 教授)

研究要旨

小児血液学会疾患登録事業を一次調査とする小児期発症の造血障害疾患のデータベースを構築開始した。2006, 2007年診断症例はそれぞれ80, 74症例登録され、53, 54例の特発性再不貧について二次調査を実施した。また2009年2月から再生不良性貧血の中央診断事業を名古屋大学小児科、聖路加国際病院小児科、名古屋第1日赤で開始し、2009年7月時点で114例の診断依頼を受けている。

A. 研究目的

本邦小児の造血障害疾患診療の質向上に貢献する事を目的に、小児血液学会疾患登録事業(全数把握)を一次調査とした疫学観察研究(小児血液再不貧2005研究・MDS2006研究)を実施する。中央診断事業を2009年2月から開始し、診断精度を高めることにより、疫学データベース・臨床試験の質を保証する。質の高いデータベース構築は、これを基盤とした臨床試験実施を可能にする。

B. 研究方法

治療介入を行わない、疫学観察研究として実施する。研究計画は、疾患登録事業、小児血液再不貧2005研究・MDS2006研究により構成され、いずれも小児血液学会臨床研究審査委員会の科学倫理審査承認を得た(2006年)。小児血液学会会員235施設を対象にした全例登録(疾患登録事業)は、前年診断症例を対象にWeb登録にて実施され、およそ診断から1年経過した段階で二次調査(再不貧2005研究・MDS2006研究)が実施された。MDS症例に対する中央診断事業は、これとは別に症例発生時に施設からMDS委員会(小児血液学会)に検体が送付されて実施された。

(倫理面への配慮)

研究代表者小原の所属する東邦大学医学部倫理委員会、ならびに日本小児血液学会臨床研究審査委員会において、承認された。

C. 研究結果

現在研究は進行中であり、本年2006, 2007年診断症例を対象にして報告する。

a.疾患登録(一次調査)症例: 2006年、2007年順に報告施設数163, 171。総数80, 74例。特発性53, 54例、肝炎後8, 10例、その他の二次性0例、Fanconi貧血5, 3例、Diamond-Blackfan貧血11, 5例、先天性重症好中球減少症2, 1例、その他の造血障害1, 1例。同じ時期のMDS(RA, RCMD, MDS unclassified)症例数は17, 14例。AML164, 158例、ALL443, 477例であった。

b.二次調査症例(2006, 2007年診断症例)特発性再生不良性貧血75例の診療状況(2009年11月現在)重症47例(stage5 28例、stage4 19例)、診断後1年間の治療: 同種骨髄移植20例、免疫抑制療法24例、治療前死亡1例、その他2例。1年後(2009年11月)予後 無治療24例、治療中21例、MDS移行1例、死亡1例。移植を受けずに重症例から6ヵ月以内に血小板数5万以上に上昇回復した症例は対象24例中16例。