

中等症 23 例 (stage3 12 例、stage2 11 例)、診断後 1 年間の治療: 免疫抑制療法 16 例、無治療 7 例。1 年後予後、無治療 9 例、治療中 10 例、MDS 2 例。中等症例から 6 ヶ月以内に血小板数 5 万以上に上昇回復した症例は対象 17 例中 6 例。

軽症 (stage1) 5 例、診断後 1 年間の治療: 無治療 5 例。1 年後予後、無治療 4 例、治療中 1 例。

#### c. 形態中央診断

2009 年 7 月時点の集計で、再生不良性貧血・MDS の中央診断に依頼された症例数は 114 例であり、再不貧疑い 51 例、MDS 疑い 23 例、JMML 疑い 21 例、貧血 6 例、好中球減少 5 例、血小板減少 8 例であった。

#### D. 考察

小児血液学会疾患登録事業は 2006 年に開始され、会員施設において診断された全ての血液疾患を対象にした、全数把握疫学研究事業である。2006、2007 年診断症例数を比較すると、ほぼ従来の疫学調査で収集された症例数に見合う登録が得られている。また 2009 年 2 月から実施している形態中央診断により、診断精度が向上している。同時期に登録された MDS 症例は 31 例であり、この事業により直接同じデータベースの中で造血障害の再不貧と MDS を比較検討することが出来るようになった。

#### E. 結論

小児血液学会疾患登録事業を一次調査とする、小児造血障害疾患のデータベース構築は、診療の質向上を達成するのみならず、新たな臨床試験の課題を探索できる有用な方策で有ることが示された。

#### 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 children with refractory anemia: The Japanese Childhood MDS Study Group Trial (MDS99). *Pediatr Blood Cancer* 53:1011-1015, 2009

● 小嶋靖子, 小原明: 二次性再生不良性貧血. *小児科診療* 72:277-283, 2009

##### 2. 学会発表

● 小嶋靖子, 松岡正樹, 三井一賢, 小原明: 著しい骨髄像の変化を示した MDS RAEB-2(WHO) 女児の 1 例. 第 51 回日本小児血液学会(第 6 回血友病看護研究会)・第 25 回日本小児がん学会 千葉:2009.11

● 矢部普正, 明小, 大賀正一, 小林良二, 土田昌宏, 中畑龍俊, 別所文雄, 麦島秀雄, 小島勢二, 小児再生不良性貧血治療研究会: 小児再生不良性貧血に対する代替ドナー移植前処置の検討; Thymoglobulin の投与量を中心に. 第 32 回日本造血細胞移植学会 名古屋:2010.2 望月果奈子, 杉盛千春, 山崎宏人, 高見昭良, 中尾眞二: 再生不良性貧血患者に見られる微少 PNH 型顆粒球は単一の PIG-A 変異クローンに由来する; 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.

## 赤血球結合 IgG の年齢別正常値の推定

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 試験陰性自己免疫性溶血性貧血の診断には赤血球結合 IgG (RBCIgG)定量検査が有用である。非 AIHA と診断された高齢者において経験的に RBCIgG がやや高値を示すことから、以前に報告した RBCIgG 正常値(33±13)について、年齢別の再検討をおこなった。当教室の正常値は、20 年前の検診における健常人由来であり、今回検討した 20-49 歳の年齢層に相当する。両者の平均値と信頼区間はほぼ一致しており、データの再現性が確認された。今回の検討においても、高齢者では有意に高値を示し、ほぼ AIHA 診断カットオフ値以下であった。非 AIHA 例において、網赤血球高値例で RBCIgG 量が低下傾向を示したことから、幼若赤血球での RBCIgG 量は低値を示すことが推測された。

### A. 研究目的

Coombs 試験陰性(C-)自己免疫性溶血性貧血(AIHA)は、AIHA の 1-10%に認められ、診断困難溶血性貧血の 1 つである。

C-AIHA の診断には赤血球結合 IgG (RBCIgG)定量検査が有用であり、ステロイド治療前であれば、カットオフ値を 78 IgG 分子/RBC 以上と設定できる。また、C-AIHA のステロイド反応性は C+AIHA と同様に良好である。

非 AIHA と診断された高齢者において経験的に RBCIgG がやや高値を示すことから、以前に報告した RBCIgG 正常値(33±13)について、年齢別の再検討が必要と考えた。

今回、非 AIHA と診断された検査依頼症例について検討し、RBCIgG の年齢別正常値の推定を行った。

### B. 研究方法

2003～2007 年の 5 年間に、当教室に検査依頼された 239 例の貧血症例で、1 年後の主治医へのアンケートにより AIHA もしくは非 AIHA と診断された 131 例、108 例を検討対象とした。

年齢別に RBCIgG 値のヒストグラムを作成し、分布パターンを検討した。平均・モード、95%信頼区間を算出し、各平均値の統計学的検定を行った。

網赤血球と RBCIgG との相関について検討を行った。

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

非 AIHA 症例における RBCIgG 量は、全年齢並びに各年齢とも対数正規分布を示した(図 1)。

1-9 歳、1-19 歳、20-49 歳、50-69 歳、70 歳以上の各年齢層での平均(95%信頼区間)は 47(31-72)、45(35-57)、35(27-46)、42(33-54)、56(50-68)であり、20-49 歳と 70 歳以上の 2 群間において有意差が認められた。

網赤血球と RBCIgG の間の相関を見ると C-AIHA では明らかな相関が認められなかったが、非 AIHA 群では負の相関傾向が認められた(図 2)。

### D. 考察

正常域のRBCIgGには、自然自己抗体として老化赤血球に結合して除去する生理的機能があるとされている。他施設で過去に報告されている正常値は当教室のデータとほぼ一致していた。

当教室の正常値は、20年前の検診における健常人由来であり、今回検討した20-49歳の年齢層に相当する。両者の平均値と信頼区間はほぼ一致しており、データの再現性が確認された。

経験的に高齢者ではRBCIgG量は高い傾向が認められていた。今回の検討においても、高齢者では有意に高値を示し、ほぼAIHA診断カットオフ値以下であった。

また、非AIHA例において、網赤血球高値例でRBCIgG量が低下傾向を示したことから、幼若赤血球でのRBCIgG量は低値を示すことが推測された。

高齢者でRBCIgGが高値を示す原因として、高齢者に特有な骨髓機能異常や脾機能の低下による老化赤血球の蓄積が関与している可能性が推測された。

## E. 結論

20年前のRBCIgG正常値の再現性が確認された。高齢者ではAIHA診断カットオフ値以下で有意に高値を示した。非AIHA例において、網赤血球高値例でRBCIgG量が低下傾向を示したことから、幼若赤血球でのRBCIgG量は低値を示すことが推測された。

## 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.
- Yoshida H, Ishida H, Yoshihara T, Oyamada T, Kuwana M, Imamura T, Morimoto A. Complications of Evans' syndrome in an infant with hereditary

spherocytosis: a case report. *J Hematol Oncol.* 10(2):40-44,2009.

## 2. 学会発表

- 亀崎豊実, 小山田隆, 梶井英治. 赤血球結合IgGの年齢別正常値の推定. 第71回日本血液学会総会, 2009年10月25日, 京都.

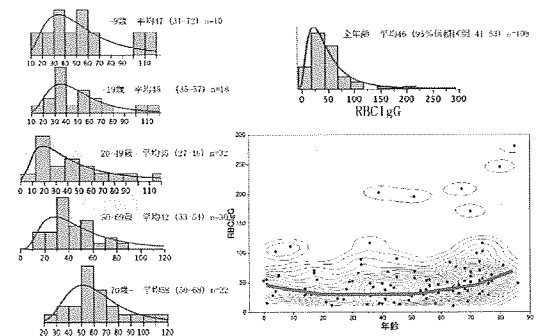


図1. Coombs陰性非AIHAにおける年齢別赤血球結合IgG量

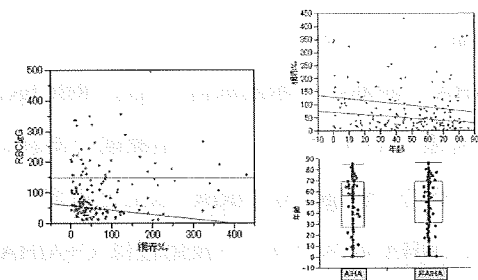


図2. AIHAと非AIHAにおける網赤血球と赤血球結合IgG

## ハイリスク MDS に対する寛解導入療法の無作為比較試験(JALSG MDS200)

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

ハイリスク MDS(RAEB-T および RAEB の一部)および MDS から移行した AML(MDS/AML)に対して、Idarubicin (IDR)+Cytarabine (Ara-C)併用(A 群)と Ara-C+Acclarubicin (ADR) (CA)(B 群)による寛解導入療法の無作為割付方式による多施設共同の比較試験を行った(JALSG MDS200)。症例は、2000 年 6 月から 2005 年 3 月までの評価可能 120 例。CR 率は A 群(n=53)64.7%、B 群(n=67)43.9%。2 年 DFS は、A 群 26.0%、B 群 24.8%。2 年 OS は、A 群 28.1%、B 群 32.1%。化学療法の強化は、生存期間延長に寄与するものではなく、造血幹細胞移植前の化学療法実施の是非、分子標的治療を含む新たな治療戦略の構築が望まれる。

### A. 研究目的

ハイリスク MDS(RAEB-T および一部の RAEB)及び MDS/AML (MDS から移行した AML) に対する標準的治療法は未だ確立されていない。これらの標準的治療法確立を目指して日本成人白血病研究グループ (JALSG) では、MDS200 プロトコール作成にあたり、MDS96 における 3 年間での登録症例数が少ないこと、MDS/AML が比較的高年齢層に多く治療合併症が懸念されること、比較的少量療法である CA 療法が MDS/AML の一部に有効な症例が報告されていることなどを考慮し、強力化学療法である IDR+Ara-C と CA 療法との randomization による比較検討を行うこととした。

### B. 研究方法

以下のすべての適格条件をみたし、除外条件に抵触しない症例を対象とする。

#### 1. 適格条件

- 1) RAEB (International Prognostic Scoring System, IPSS でハイリスクに区分されるもの)
- 2) 年齢が 15 歳以上

- 3) PS が 0-2 の症例

- 4) 骨髄を除く主要臓器(肝、腎、肺、心)の機能が十分保持されている症例
- 5) 未治療例
- 6) Informed consent が得られている症例

#### 2. 除外条件

- 1) 活動性の重複癌
- 2) 重症感染症を有する症例
- 3) 治療を要する心不全、腎不全例
- 4) コントロール不良の糖尿病例
- 5) 肝硬変の症例
- 6) 中枢神経浸潤を有する症例
- 7) 精神障害を有する症例
- 8) 妊娠中あるいは授乳中の女性
- 9) HIV 抗体陽性例
- 10) 骨髄穿刺で dry tap の症例

(倫理面への配慮)

本プロトコールは、ヘルシンキ宣言(1964 年以後、1975 年東京、1983 年ベニス、1989 年香港、1996 年南アフリカ、サマーセット・ウエスト各世界医師会総会にて改訂)の精神に基づいて実施する。実施に

当たっては各施設の規約に基づいて倫理委員会での承認を得た上で実施することが望ましい。適格例に対して、予め用意された説明文に従って、治療内容、副作用その他を説明し、同意を得る。原則として説明と同意は患者本人に対して行うが、本人に説明できない場合は、家族や法定代理人に説明し同意を得る。同意は必ず文書として保存し、同意書には説明した日付、説明した医師、同席者、患者、家族の署名および捺印を記す。

#### (治療方法)

寛解導入にあたり A 治療法と B 治療法を無作為に割り付ける。

#### 1. 寛解導入療法

##### A 治療法 (IDR+Ara-C)

Ara-C 100mg/m<sup>2</sup> Day1-7 cont.iv

IDR 12mg/m<sup>2</sup> Day1-3 30min iv

リスクファクターによる減量計画(MDS96 に準じる)を設定する。

##### B 治療法

Ara-C 10mg/m<sup>2</sup>/12h Day1-14 sic

ACR 14mg/m<sup>2</sup>/day Day1-4 30min iv

#### 2. 地固め療法、維持／強化療法

A 群および B 群ともに JALSG の MDS96 のプロトコールに準じて行う。

#### C. 研究結果

CR 率は A 群(n=53)64.7%、B 群(n=67)43.9%。2年 OS は、A 群 28.1%、B 群 32.1%。2年 DFS は、A 群 26.0%、B 群 24.8%であった。寛解導入による CR 持続期間は、A 群 320.6 日(中央値 213 日)、B 群 378.7 日(中央値 273 日)であった。A 群 49 例のうち、11 例(22.4%)が同種移植を施行され、1000 日以上長期生存例は 3 例(6.1%)認められた。同様に B 群 60 例は、16 例(26.7%)が同種移植を施行され、1000 日以上長期生存例は 6 例(10%)認められた。

#### D. 考察

A 群、B 群で寛解率に差を認めるものの、生存期間に差を認めなかった。移植を含めた予後も両群に差を認めるものではなかった。今回の臨床研究では現状で比較的有用度の高い MDS に対する化学療法はいずれも非劣性を示すに留まり、最終治療の造血細胞移植療法を前提に寛解導入療法の実施の是非を含めて、この領域における化学療法の意義を再検討すべき時期にあると思われた。

#### E. 結論

ハイリスク MDS 患者において、造血幹細胞移植前の化学療法以外の分子標的治療薬、あるいは新規薬剤(脱メチル化薬など)を用いた新たな治療戦略の構築が望まれる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

● Morita Y, Kanamaru A, Miyazaki Y, Imanishi D, Yagasaki E, Tanimoto M, Kuriyama K, Kobayashi T, Imoto S, Ohnishi K, Naoe T, Ohono R.; Comparative analysis of remission induction therapy for high-MDS and AML progressed from MDS in the MDS200 study of Japan Adult Leukemia Study Group. Int J Hematol. 2010 Jan;91(1):97-103.

##### 2. 学会発表

● 森田泰慶、金丸昭久、宮崎泰司、矢ヶ崎史治、谷本光音、栗山一孝、小林透、井本しおん、大西一功、直江知樹、大野竜三:ハイリスク MDS および MDS から移行の急性白血病に対する寛解導入療法の無作為比較試験-JALSG MDS200 の解析。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。

発症に *RUNXI* 遺伝子の欠失が疑われた Familial platelet disorder with propensity to develop myeloid malignancies (FPD/MM)の1家系

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

FPD/MMは常染色体優性遺伝で、軽度から中等度の血小板減少、血小板機能異常で発症し、高率にMDS、AMLへと進展する遺伝性白血病で *RUNXI* 遺伝子の異常が報告されている。我々は FPD/MM と考えられる1家系を経験し、原因遺伝子の解析を行った。発端者は35歳女性。5歳から血小板減少(7-8万/ $\mu$ l)を認め、2008年急性好塩基球性白血病を発症した(芽球は、PO陰性、CD45陰性、CD33陽性、トリイジンブルー陽性)。父は30歳時赤白血病、同胞10名中3名に白血病、1名に汎血球減少症を認めた。また、姉妹3名中1名に血小板減少を認め、発端者の子供5名中2名と妹の子供2名中1名に血小板減少を認めた。本症例は *RUNXI* 遺伝子に点突然変異は認められなかったが、Satellite marker 解析で exon2-4 の欠失が疑われた。これまで exon 欠失の報告は1家系のみと非常にまれである。多くの家系では点突然変異による dominant-negative 効果による発症が想定されているが、欠失による家系の存在は haploinsufficiency も発症に至る機序となり得ることを示唆する。

A. 研究目的

FPD/MMはこれまで欧米を中心に27家系の報告があり、*RUNXI* 遺伝子の変異が報告されている。我々は FPD/MM と考えられる1家系を経験し、*RUNXI* 遺伝子の解析を行い、その変異の検出を試みた。

B. 研究方法

発端者より同意を得て末梢血、骨髄、及び爪を採取。それぞれよりDNAを抽出(Wako DNA Extractor FM kit)、*RUNXI* 遺伝子 exon1-8それぞれPCRにて増幅(Song et al. Nature Genetics, 1999, Harada et al. Blood, 2004)。TAクローニング後ABI310 genetic analyzerを用い遺伝子配列を解析。NCBI blastにて変異検索を行った。また *RUNXI* 遺伝子のサテライトマーカーを蛍光標識 primer にて増幅し(Song et al. Nature Genetics, 1999)、ABI310 genetic analyzerを用い capillary 電気泳動を行うことでLOHの検索を行った。

C. 研究結果

[発端者]35歳女性。5歳の頃より中等度の血小板減少(7-8万/ $\mu$ l)、血小板凝集能の低下を指摘され、経過観察されていた。2008年末末梢血に好塩基性顆粒を持つ芽球を認めた。芽球は、PO陰性、CD45陰性、CD33陽性、トリイジンブルー陽性であり、急性好塩基球性白血病と診断した。

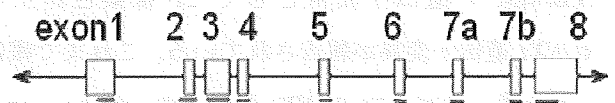


図1 *RUNXI* 遺伝子変異の検索解析した塩基配列を下線で示した。

[家系]父は30歳時赤白血病、同胞10名中3名に白血病、1名に汎血球減少症を認めた。また、姉妹3名中1名に血小板減少を認め、発端者の子供5名中2

名と妹の子供 2 名中 1 名に血小板減少を認めた。家族歴より強く FPD/MM の家系であることが疑われたため、*RUNXI* 遺伝子変異の検索を行った。Exon1-8 までの exon の検索を行ったが、明らかな遺伝子変異を検出することはできなかった (図 1)。これまでの報告では *RUNXI* 遺伝子の変異が同定されていない家系のうち 1 家系において、サテライトマーカー解析により exon2-4 の片アレルの欠失が想定される家系が報告されている (Song et al. Nature Genetics, 1999)。本家系において同様のサテライトマーカー解析を施行したところ、exon1 と 2 の間の 57-106 と exon4 と 5 の間にある 57-76 のマーカーにおいて片アレルの欠失を認めたことより (図 2)、本家系において exon2-4 の片アレルの欠失が想定された。

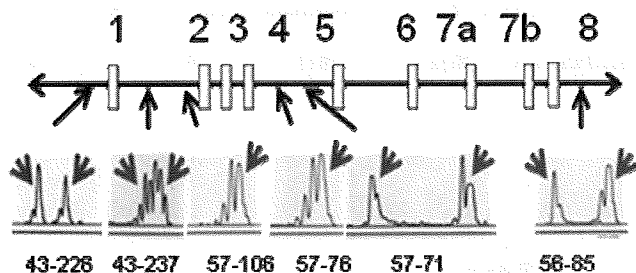


図 2 サテライトマーカー解析

#### D. 考察

FPD/MM は常染色体優性遺伝で、欧米を中心に 27 家系の報告がある比較的にまれな遺伝性白血病である。本邦においてはこれまで 2 家系の報告がある。FPD/MM の遺伝子異常として 21 番染色体上の *RUNXI* 遺伝子変異が報告されている。これまで報告された多くの家系で *RUNXI* 遺伝子の runt homology domain を中心に、様々な exon においてミスセンス、ナンセンス変異等が報告されている。これまで *RUNXI* 遺伝子変異が塩基解析のみで認められなかった家系は 3 家系ある。1 家系はサテライトマーカー解析により exon2-4 の欠失が想定され (Song et al. Nature Genetics, 1999)、その他では *RUNXI* 遺伝子の

コピー数の解析により intron1-6 の間で duplication を認めた家系と、exon5 の欠失を認めた家系が報告されている (Jongmans et al. Leukemia 2009)。多くの家系では *RUNXI* 遺伝子の変異を認め、変異タンパクによる dominant negative 効果による白血病の発症が想定されているが、欠失による家系の存在は haploinsufficiency も発症に至る機序となりうることを示している。我々の家系を含め、*RUNXI* 遺伝子の塩基配列に異常を認めない家系の存在は、その変異が主に塩基解析で検索されている FPD/MM の頻度が実際より過小評価されている可能性を示唆する。

#### E. 結論

今回我々は FPD/MM が強く疑われる家系を経験した。*RUNXI* 遺伝子の塩基解析のみでは遺伝子変異を検出することができなかったが、サテライトマーカー解析により exon2-4 の欠失が想定され、さらなる家系内の調査による確認が必要だが、haploinsufficiency による発症機序が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 三井 健揮、唐沢 正光、小磯 博美、横濱 章彦、斉藤 貴之、半田 寛、村上 博和、塚本 憲史、野島 美久: Familial platelet disorder with propensity to develop myeloid malignancies (FPD/MM) が考えられた 1 家系; 第 71 回日本血液学会総会、2009 年 10 月 23 日~25 日、京都。

## 発作性夜間血色素尿症における HMGA2 の発現について

研究協力者 木下 タロウ (大阪大学微生物病研究所・教授)

### 研究要旨

我々は GPI 欠損細胞においてのみ 12 番染色体に異常のある発作性夜間血色素尿症(PNH) 2 症例の染色体切断部位の解析からクローン拡大に関与する候補遺伝子 *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

我々は PNH において、GPI 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と考えている。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

末梢血と骨髄を RNA の安定化剤が入っている Paxgene 採血管で採取し、全血から RNA を抽出して定量 RT-PCR を行った。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。上

流・下流因子の検索のためマイクロアレーによる発現解析を行ない、さらに定量 PCR で結果を確認した。

(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をもとに、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 24 人、正常人 11 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、そのうち PNH 患者 16 人が正常人より有意に高い発現量を示した (relative mRNA expression > control +2SD)。

一方、PNH 患者 17 人、正常人 7 人の骨髄では両者とも full transcript が優位に発現し、その発現量は両者に有意差はなかった。

マイクロアレー解析では Wnt signal に関連する遺伝子の発現が PNH 患者で亢進してお



り、実際骨髓サンプルの定量 PCR で Wnt5a と cyclinD1 の発現が亢進していることを確認した (relative mRNA expression: Wnt5a は PNH  $2.3 \pm 1.7$  vs normal  $0.4 \pm 0.1$ ,  $p < 0.005$ , cyclinD1 は PNH  $1.8 \pm 0.9$  vs normal  $0.6 \pm 0.2$ ,  $p < 0.005$ )。

#### D. 考察

*HMG2* 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 *HMG2* 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 *HMG2* が造血中には一定レベル発現しているために PNH クローンでの発現亢進がマスクされているためと考えられる。マイクロアレー解析では Wnt signal の亢進が PNH 患者で見られた。Wnt signal は多くの骨髓性増殖疾患で亢進していることが知られているが、PNH においてもその関与が示唆された。

#### E. 結論

染色体異常のない PNH 症例においても、その3分の2の発症に *HMG2* の亢進が関与している可能性があることがわかった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

● 村上良子、井上徳光、金倉 謙、西村純一、

七島 勉、野地秀義、木下タロウ：発作性夜間血色素尿症患者における *HMG2* の発現について 第 71 回 日本血液学会学術集会 京都 2009 年

● Murakami, Y., Inoue, N., Noji, H., Shichishima, T., Nishimura, J., Kanakura, Y., Kinoshita, T.: Wnt Pathway is Upregulated in Blood Cells from Patients with Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria: 51st ASH Annual Meeting, New Orleans, 2009.

## 後天性赤芽球癆における T-cell clonality と subset の解析

研究協力者 木村昭郎 (広島大学原爆放射線医科学研究所血液内科 教授)

新田英昭 (広島大学原爆放射線医科学研究所血液内科 医科診療医)

三原圭一朗 (広島大学原爆放射線医科学研究所血液内科 助教)

坂井 晃 (広島大学原爆放射線医科学研究所血液内科 講師)

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)

### 研究要旨

後天性赤芽球癆 (PRCA) 患者の骨髄におけるクロナリティの所在とサブセットを PCR 法と 4 color flow cytometry 法を用いて解析した。胸腺腫関連 PRCA の 2 症例で骨髄 CD8 陽性細胞にのみ oligoclonality を認めた。また胸腺腫関連 PRCA の 3 症例で骨髄中の T 細胞サブセットを 4 color flow cytometry 法により解析したところ、すべての症例で CD8<sup>+</sup>/perforin<sup>+</sup> effector memory T 細胞が有意に増加していた。これらの結果より胸腺腫関連 PRCA では perforin を高発現する CD8<sup>+</sup> effector memory T 細胞が赤芽球系前駆細胞を障害する有力なメカニズムとなる可能性が示唆された。

### A. 研究目的

後天性 PRCA では末梢血や骨髄で TCR 再構成を認める症例が報告されている。そこで患者の骨髄においてどのような T 細胞が増加しているかを PCR 法と 4 color flow cytometry 法を用いて解析し、胸腺腫関連 PRCA で増加する T 細胞サブセットの同定を試みた。

### B. 研究方法

後天性 PRCA 計 10 症例のうち、4 症例を cell sorter を用いて 骨髄 CD4<sup>+</sup> T 細胞と CD8<sup>+</sup> T 細胞に分取し、それぞれのクロナリティを PCR 法 (BIOMED-2) を用いて解析した。また、後天性 PRCA 計 10 症例のうち 7 症例を 4 color flow cytometry 法を用いて解析し、骨髄で増加する T 細胞サブセットをコントロール群と比較検討した。患者にはインフォームドコンセントを行い、研究目的で骨髄細胞の一部を使用する可能性がある旨を説明し同意を得た。

### C. 研究結果

解析できた胸腺腫関連 PRCA 2 症例ではいずれも骨髄 CD8<sup>+</sup> T 細胞にのみ選択的な oligoclonality を認めた。一方骨髄異形成症候群関連 PRCA では末梢血、骨髄 CD4<sup>+</sup> T 細胞、骨髄 CD8<sup>+</sup> T 細胞のいずれにも oligoclonality を認め再構成を起こす repertoire、signal intensity とともに非常に類似したパターンを示し同一クローンの可能性が高いと思われた。また胸腺腫関連 PRCA 3 症例では骨髄 CD8<sup>+</sup>/perforin<sup>+</sup>細胞がすべて有意に増加しており、そのサブセットを解析した結果 CD8<sup>+</sup>/perforin<sup>+</sup> effector memory T 細胞が増加していることが判明した。尚、1 症例ではあるが解析できた胸腺腫を合併し PRCA を発症していない患者骨髄では、CD8<sup>+</sup>/perforin<sup>+</sup> effector memory T 細胞はコントロール群と変わらず増加していなかった。

#### D. 考察

胸腺腫関連 PRCA では解析できた 2 症例で骨髄 CD8<sup>+</sup> T 細胞に選択的な oligoclonality を認め、3 症例すべてにおいて CD8<sup>+</sup>/perforin<sup>+</sup> effector memory T 細胞が増加していた。このサブセットは健常人で加齢により増加するサブセットとは異なり、症例数は少ないものの胸腺腫関連 PRCA 発症の原因となっている可能性が考えられる為、今後さらなる発症機構の解明が望まれる。

#### E. 結論

胸腺腫関連 PRCA では骨髄 CD8<sup>+</sup>/perforin<sup>+</sup> effector memory T 細胞が oligoclonal expansion していることを示した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Ding Y, Harada Y, Imagawa J, Kimura A, Harada H.: *AML1/RUNX1* point mutation possibly promotes leukemic transformation in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2009 Dec 10;114(25):5201-5205.
- Hirokawa M, Sawada K, Fujishima N, Kawano F, Kimura A, Watanabe T, Arai A, Matsui T, Nakao S, Urabe A, Omine M, 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*. 2009 Mar; 84(3):144-8.
- Harada H, Watanabe M, Suzuki K, Yanagita S, Suzuki T, Yoshida Y, Kumura A, Tsudo M, Matsuda A, Tohyama K, Taniwaki M, Takeshita K, Takatoku M, Ozawa K.: Lenalidomide is active in Japanese patients with symptomatic anemia in low- or intermediate-1 risk myelodysplastic syndromes with a deletion 5q

abnormality. *Int J Hematol*. 2009;90(3): 353-360.

##### 2. 学会発表

- Kimura, A.: BMI-1 and AML-1 Point Mutation in the Pathogenesis of MDS. The 10<sup>th</sup> International Symposium on Myelodysplastic Syndromes, May 6-9, 2009. Patras, Greece
- Harada, H., Watanabe, M., Suzuki, K., Yanagita, S., Suzuki, T., Yoshida, Y., Kimura, A., Tsudo, M., Takatoku, M., Ozawa, K.: Results of Phase II Clinical Study of Lenalidomide in Japanese Patients with Myelodysplastic Syndrome(MDS). The 10<sup>th</sup> International Symposium on Myelodysplastic Syndromes, May 6-9, 2009. Patras, Greece
- Imagawa, J., Harada, H., Ding, Y., Kimura, A., Harada, H.: AML1/RUNX1 Point Mutation Possibly Promotes Leukemic Transformation in Myeloproliferative Disorders. 51<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Hematology, Dec 5-8, 2009. New Orleans, USA (*Blood* 114(22):755, 2009.)

## 血清非トランスフェリン結合鉄 (NTBI) およびヘプシジンの定量

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 測定には non-metal high performance liquid chromatography (non-metal HPLC) を用いた定量システムを立ち上げ、これまで疑問視されていた低濃度領域の定量性に関してその問題点を解決することができ、結果、信頼性の高い安定した測定システムを再構築することができた。このシステムで、健常人の血清 NTBI を測定したところ、男性  $0.206 \pm 0.091 \mu\text{M Fe}$ 、女性  $0.212 \pm 0.095 \mu\text{M Fe}$  であった。一方、ヘプシジン測定には、liquid chromatography - tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) を導入し、3 種類の isoforms (hepc-20、hepc-22、hepc-25) の同時定量システムを開発した。このシステムで健常人の血清ヘプシジン濃度を測定したところ、isoform 別に、hepc-20: 男性  $3.767 \pm 2.565 \text{ ng/ml}$ 、女性  $1.387 \pm 1.882 \text{ ng/ml}$ 、hepc-22: 男性  $1.212 \pm 0.574 \text{ ng/ml}$ 、女性  $0.102 \pm 0.519 \text{ ng/ml}$ 、hepc-25: 男性  $16.240 \pm 12.940 \text{ ng/ml}$ 、女性  $8.159 \pm 13.830 \text{ ng/ml}$  であった。引き続き、本臨床研究に登録された患者の血清 NTBI およびヘプシジン測定とデータ集積を開始した。

### 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い、疾患別、治療経過におけるデータを集積する。さらに、健常人血清での値を基準に診断、治療効果、予後評価のバイオ・マーカーとしての可能性を追求する。

### B. 研究方法

NTBI 測定は nonmetallic polyetherethylketone tube を用いた 2796 BioSeparation Module with 2998 Photodiode Array Detector (Waters) による non-metal HPLC システムを用いた。ヘプシジン測定は API4000QTRAP(Applied Biosystems) で LC-MS/MS を構築し、3 種類の isoform (hepc-20、-22、-25) 同時定量を可能とした。健常人に対し医師が直接同意書を手渡して説明し文書で同意を得て採血し、血清を

$-30^{\circ}\text{C}$  にて一旦凍結保存し、測定直前に血清を解凍し、NTBI およびヘプシジンを測定した。

### C. 研究結果

健常人血清 NTBI 濃度は、男性  $0.206 \pm 0.091 \mu\text{M Fe}$  ( $0.065 - 0.346 \mu\text{M Fe}$ ,  $n=20$ )、女性  $0.212 \pm 0.095 \mu\text{M Fe}$  ( $0.011 - 0.387 \mu\text{M Fe}$ ,  $n=16$ ) であった。これらの値は、年齢、血清フェリチン値、トランスフェリン飽和率などとは明らかな相関を認めなかった。一方、健常人血清ヘプシジン濃度は、hepc-20: 男性  $3.767 \pm 2.565 \text{ ng/ml}$  ( $n=21$ )、女性  $1.387 \pm 1.882 \text{ ng/ml}$  ( $n=19$ )、hepc-22: 男性  $1.212 \pm 0.574 \text{ ng/ml}$ 、女性  $0.102 \pm 0.519 \text{ ng/ml}$ 、hepc-25: 男性  $16.240 \pm 12.940 \text{ ng/ml}$ 、女性  $8.159 \pm 13.830 \text{ ng/ml}$  であった。血清フェリチン値とは、3 isoforms ともいずれも正の相関を示した。各 isoform 間では hepc-22/hepc-20、hepc-25/hepc-20、hepc-25/hepc-22 のいずれも正の相関を示し、これらの isoforms が単一の分子からの truncated form の可能

性が示唆された。また、hepc-20のみ creatinin/hepc-20:  $R^2=0.5395$  と血清クレアチニンと正の相関を示した。

#### D. 考察

健常人血清 NTBI 値が血清クレアチニン値、血清フェリチン値、トランスフェリン飽和率のいずれとも相関を示さなかったため、体内鉄動態を把握する新しい指標としての可能性が考えられた。また健常人血清ヘプシジン3 isoforms 測定に関しては、hepc-20が腎機能と関連しうる結果なども出てきており、鉄代謝異常の病態把握、診断、疾患のモニタリングへの有用性に関する期待が持たれると思われる。

#### 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 システムを導入し、信頼性の高い高感度測定システムの構築が完成した。NTBI 測定は特に低濃度領域の安定した測定が可能となり、ヘプシジンは3種類の isoforms 同時定量が可能となった。健常人の血清 NTBI 値やヘプシジン濃度を基に、本臨床研究で病態と鉄代謝の関係について世界的に新しい貴重な情報を生み出す準備が整った。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Hosoki T, Ikuta K, Shimonaka Y, Sasaki Y, Yasuno H, Sato K, Ohtake T, Sasaki K, Torimoto Y, Saito K and Kohgo Y ; Heterogeneous expressions of hepcidin isoforms in hepatoma-derived cells detected using simultaneous LC-MS/MS. *Proteomics-Clinical Applications* - 2009; 3(11): 1256-1264
- 生田克哉、鳥本悦宏、高後裕. 輸血後鉄過剰症の病態と症状. *血液・腫瘍科* 2009年11月号 59(5):

522-527

- 生田克哉, 佐々木勝則, 鳥本悦宏, 高後裕; 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年2月号 19(2):31-39

##### 2. 学会発表

- 佐々木勝則、高後裕、大竹孝明、生田克哉、鳥本悦宏; Non-metal HPLC を用いた高感度 NTBI 測定法の確立—健常人および鉄過剰症患者の NTBI 測定. 第33回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会, 2009.9.12-13, 倉敷(口演)
- Ikuta K, Shimonaka Y, Hosoki T, Sasaki Y, Yasuno H, Okamura N, Shindo M, Ohtake T, Sasaki K, Torimoto Y, Saito K, Kohgo Y ; A novel simultaneous quantification of hepcidin isoforms by liquid chromatography-mass spectrometry. 第71回日本血液学会学術集会, 2009.10.23-25, 京都(ポスター、優秀演題)
- Ikuta K, Shimonaka Y, Hosoki T, Sasaki Y, Yasuno H, Ohtake T, Sasaki K, Torimoto Y, Saito K, Kohgo Y ; A novel simultaneous quantitative method for hepcidin isoforms using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *BioIron* 2009.6.7-11, Portugal (Poster)
- Kohgo Y ; Evaluation and monitoring of body iron. *Asia Pacific Iron Academy Conference* 2009, 2009.11.26-29, Chiang Mai (Oral Presentation)
- Ikuta K, Hosoki T, Shimonaka Y, Sasaki Y, Yasuno H, Ohtake T, Sasaki K, Torimoto Y, Saito K, Kohgo Y ; Diferric transferrin-sensed hepcidin upregulation in human hepatoma-derived cell line is differentially controlled in each isoform 20, 22, 25; confirmation by a novel simultaneous quantification by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. 51<sup>st</sup> ASH Annual Meeting 2009.12.5-8, New Orleans (Poster presentation, III-981) (Session Name: Regulation of Iron Metabolism Poster II)

小児再生不良性貧血、骨髄異形性症候群および先天性造血不全症候群に対する中央診断システムの確立

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講座 教授)  
濱 麻人 (名古屋大学大学院医学系研究科小児科学講座 助教)

## 研究要旨

日本小児血液学会は平成 21 年 2 月より再生不良性貧血 (AA)、骨髄異形性症候群 (MDS) および先天性造血不全症候群 (CBFS) を対象とした中央診断を開始した。レビューは骨髄および末梢血塗抹標本を 2 施設 (名古屋大学、聖路加国際病院) で、骨髄病理標本を 1 施設 (名古屋第一赤十字病院) で行っている。レビュー開始から 12 ヶ月間で 186 例がレビューされた。レビュー結果は AA が 75 例、MDS が 25 例、若年性骨髄単球性白血病 (JMML) が 20 例、CBFS が 11 例、急性白血病が 14 例、その他 41 例であった。AA、MDS および CBFS の診断は必ずしも容易ではなく、中央診断を行うことによりその診断の精度があがっていくと考えられる。

### A. 研究目的

小児 AA と MDS は比較的まれな疾患で、CBFS、免疫不全、自己免疫性疾患、感染症などさまざまな疾患と鑑別する必要があり診断は必ずしも容易ではない。とくに染色体異常の認められない低形成 MDS と AA の鑑別は困難で、現在のところ形態学に頼らざるを得ない状態であり、施設により異なる判断がなされる可能性がある。多施設共同治療研究を行い、その結果を正しく評価するためには、統一した基準で鑑別診断を行う必要がある。また JMML では遺伝子検査、コロニー検査が診断に重要な役割を果たしており、形態学診断とあわせて総合的に診断する必要がある。これらの背景から、小児 AA、MDS および CBFS を対象とした中央診断を行うことになった。

### B. 研究方法

中央診断事務局を名古屋大学小児科に設置した。AA、MDS、あるいは CBF が疑われる症例が発生した場合は、各施設から事務局に連絡をもらい、登録番号を発行した。以後はその番号でやりとりを行った (匿名化)。中央診断およびそれに伴う検査については患者保護者の同意を取得した後に行った。レ

ビューは骨髄および末梢血塗抹標本を 2 施設 (名古屋大学小児科、聖路加国際病院小児科) で、骨髄病理標本を 1 施設 (名古屋第一赤十字病院病理部) で行った。AA が疑われる場合は PNH 型血球の測定、Dyskeratosis congenital (DC) の鑑別のためにテロメア長測定を行った。JMML が疑われる場合はコロニーアッセイと JMML 関連遺伝子解析 (PTPN11、N-RAS、K-RAS、c-CBL) を名古屋大学小児科あるいは信州大学小児科で行った。

### C. 研究結果

#### 1. レビュー症例数

レビュー開始から 12 ヶ月間で 186 例がレビューされた。レビュー結果は AA が 75 例、MDS が 25 例、JMML が 20 例、CBFS が 11 例、急性白血病が 14 例、その他が 41 例であった。

#### 2. 再生不良性貧血

特発性 AA が 67 例、肝炎関連 AA が 8 例診断された。爪の萎縮などの所見を有し、DC が疑われた 3 症例については、いずれもテロメア長の著明な短縮を認めた。今回は主治医が再生不良性貧血と診断した症例のうち 9 例が RCC と診断された。RCC 症例の骨

髄塗抹標本では、比較的細胞密度が保たれており、赤芽球に巨赤芽球様変化や2核のものを認め、顆粒球では偽ペルガー核異常や巨大後骨髄球を認めた。微小巨核球は同定されなかった。RCCと診断された症例の病理所見は、細胞密度が保たれており、赤芽球に巨赤芽球様変化や分布異常を認めた。微小巨核球は、免疫染色を用いることで容易に同定されていた。骨髄塗抹標本ではAAと診断されたが病理所見でRCCと診断された症例を約20%に認めた。それらの症例は骨髄塗抹標本でも赤芽球に巨赤芽球様変化などの異形成を認めていたが10%未満であったためにAAと診断されていた。

### 3. MDS

16例がMDSと診断された。RCMDが2例、RAEBが4例、二次性MDSが6例、治療関連MDSが3例、CMMLが1例であった。二次性MDSはAAの免疫抑制療法施行から1年後の移行が1例、Fanconi貧血から1例、Shwachman-Diamond症候群(SDS)から4例であった。治療関連MDSは骨肉腫の治療終了1年後、神経芽腫の治療終了1年後およびランゲルハンス細胞組織球症の治療終了1年後に発症した症例であった。

### D. 考察

AAの診断において、赤芽球が残存している場合にはしばしば軽度の異形成を認めることがあり、低形成性MDSとの鑑別が問題になる。改訂版WHO分類(2008年)において小児における芽球の増加を伴わないMDSをrefractory cytopenia of childhood(RCC)とし、末梢血芽球5%未満、骨髄芽球5%未満、骨髄における二血球系統以上の異形成の出現あるいは一血球系統における10%以上の異形成の出現と定義されている。RCCの診断には骨髄生検は必須であり、骨髄の細胞密度、赤芽球、顆粒球、巨核球の異形成や分布の異常、CD34陽性細胞の増加の有無などを評価

する必要がある。RCCをどのように扱うべきかは、治療方針も含めて、臨床上、重要な問題であり、初診時に中央診断を行い、免疫抑制療法への反応性、染色体異常の出現およびMDS/AMLへの移行などを前向きに評価するとともに、分子生物学的手法を用いて両疾患の独立性を明らかにする必要がある。

先天性AAは全体の約10%を占め、Fanconi貧血、DC、SDS、CAMTなどが代表的な疾患である。特発性AAと考えられていた症例の一部にDCの原因遺伝子でテロメアの維持に関与するTERTやTERCなどの遺伝子変異がみられることが明らかになっている。中央診断でDCと診断された3症例は、皮膚や爪の所見からDCが疑われ、フローサイトメトリーによりテロメア長が著明に短縮していることが確認された。特発性AAと診断される症例の中にDCに特徴的な身体所見を呈さない症例が含まれていることがあるため、フローサイトメトリーによるテロメア長のスクリーニングは非常に有用である。現在、中央診断システムにおいては、これらの先天性骨髄不全症候群の網羅的かつ系統的なスクリーニングや診断システムの構築に取り組んでいるところである。

### E. 結論

AA、MDSおよびCBFSを対象とした中央診断を行うことにより、必ずしも診断が容易ではないこれらの疾患の診断の精度があがったと考えられる。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- Makishima H, Cazzolli H, Szpurka H, Dunbar A, Tiu R, Huh J, Muramatsu H, O'Keefe C, Hsi E, Paquette RL, Kojima S, List AF, Sekeres MA, McDevitt MA, Maciejewski JP. Mutations of E3 Ubiquitin Ligase Cbl Family Members Constitute a Novel Common Pathogenic Lesion in Myeloid Malignancies. J Clin

Oncol. 2009 Dec;27(36):6109-16.

- Yagasaki H, Kojima S, Yabe H, Kato K, Kigasawa H, Sakamaki H, Tsuchida M, Kato S, Kawase T, Muramatsu H, Morishima Y, Kodera Y. Tacrolimus/Methotrexate versus cyclosporine/methotrexate as graft-versus-host disease prophylaxis in patients with severe aplastic anemia who received bone marrow transplantation from unrelated donors: results of matched pair analysis. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009 Dec;15(12):1603-8.
- Muramatsu H, Makishima H, 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]
- Villalobos IB, Takahashi Y, Akatsuka Y, Muramatsu H, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Saji H, Kato M, Ogawa S, Kojima S. Relapse of leukemia with loss of mismatched HLA due to uniparental disomy following haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2010 Feb 1. [Epub ahead of print]

## 2. 学会発表

- 濱 麻人、小島勢二：小児再生不良性貧血の中央診断；第51回日本小児血液学会総会，2009年11月14日，千葉。
- 濱 麻人、小島勢二：小児骨髄異形成症候群の中央診断；第51回日本小児血液学会総会，2009年11月14日，千葉。



研究協力者 小松則夫 (順天堂大学血液内科・教授)

## 研究要旨

急性前骨髄球性白血病 APL はオールトランスレチノイン酸 ATRA によって好中球への分化が誘導される。我々はフォークヘッド転写因子である FOXO3A が ATRA による好中球への分化や細胞死誘導に必須の分子であることを明らかにした。

### A. 研究目的

FOXO3A (FKHRL1) は FKHR (FOXO1) や AFX (FOXO4) とともに Forkhead ファミリー転写因子に属し、線虫が寿命制御や栄養欠乏などの生存に適さない環境に適応するために機能する転写因子 DAF16 のヒトオルソログである。この転写因子はアポトーシス、細胞周期停止、オートファジーなどの重要な生命現象に関与することが知られている。我々は APL 細胞の ATRA による好中球への分化・アポトーシス誘導に FOXO3A が関与するか否かを FOXO3A の RNA 干渉法および強制発現系を用いて検討した。

### B. 研究方法

APL 由来の細胞株である NB4、NB4 由来で ATRA 耐性細胞株 NB4/AR、患者の APL 細胞 (文書による同意取得後) を用いた。細胞を ATRA で刺激した後のリン酸化の状態について抗リン酸化 FOXO3A 抗体を用いて解析した。また FOXO3A の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡にて解析した。RNA 干渉法を用いて FOXO3A をノックダウンした。一方、NB4/AR に核内移行型 FOXO3A にエストロゲン受容体を連結させたタモキシフェンによる核内誘導型を発現させた。アポトーシスの検出には抗アネキシン V 抗体を用いた。好中球分化は NBT 還元能と CD11b の発現で評価した。

### C. 研究結果

- 1) NB4 細胞では FOXO3A は恒常的なリン酸化を受けており、ATRA 刺激によって FOXO3A は脱リン酸化され、核内へと移行する現象が観察された。これらの現象は APL 細胞でも確認された。
- 2) RNA 干渉法によって FOXO3A の発現をノックダウンすると NB4 細胞の ATRA による好中球分化やアポトーシス誘導が阻害された。
- 3) NB4 細胞に核内移行型 FOXO3A を強制発現させるとアポトーシスが誘導された。

### D. 考察

APL 細胞および APL 由来細胞株では FOXO3A は恒常的なリン酸化をうけており、定常状態では FOXO3A は転写因子としての機能は喪失していると考えられる。一方、ATRA 刺激によって FOXO3A は脱リン酸化され、核内へと移行することから、ATRA は FOXO3A の転写因子としての機能を誘導すると考えられる。FOXO3A のノックダウンによって ATRA の作用が消失すること、ATRA 耐性細胞株 NB4/AR に核内移行型 FOXO3A を強制発現させることによってアポトーシスを誘導することを明らかにした。以上の結果は APL 細胞が ATRA 耐性を獲得しても核内に FOXO3A を強制発現させることによって ATRA 耐

性を克服できる可能性を示唆している。

## E. 結論

急性前骨髄球性白血病の ATRA による好中球分化・細胞死誘導には FOXO3A の活性化が必須であると結論した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Sakoe Y, Sakoe K, Kirito K, Ozawa K, Komatsu N.; FOXO3A as a key molecule for all-trans retinoic acid-induced granulocytic differentiation and apoptosis in acute promyelocytic leukemia. *Blood*. (印刷中)
- Tsukune Y, Isobe Y, Yasuda H, Shimizu S, Katsuoka Y, Hosone M, Oshimi K, Komatsu N, Sugimoto K.; Activity and safety of combination chemotherapy with methotrexate, ifosfamide, L-asparaginase and dexamethasone (MILD) for refractory lymphoid malignancies: a pilot study. *Eur J Haematol*. (印刷中)
- Ohsaka A, Hirota-Komatsu S, Shibata M, Komatsu N.; Neuropilin-1 forms complexes with vascular endothelial growth factor receptor-2 during megakaryocytic differentiation of UT-7/TPO cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 390:1171-6.
- Hu Y, Kirito K, Yoshida K, Mitsumori T, Nakajima K, Nozaki Y, Hamanaka S, Nagashima T, Kunitama M, Sakoe K, Komatsu N. Inhibition of HIF-1 function enhances the sensitivity of multiple myeloma cells to melphalan. *Mol Cancer Ther*. 2009 8:2329-2338.
- Kirito K, Yongzhen Hu, Komatsu N.; HIF-1 prevents the overproduction of mitochondrial ROS after cytokine stimulation through induction of PDK-1. *Cell Cycle* 2009 8:2844-9.

### 2. 学会発表

- Yokoo, T., Kurita, R., Takahashi, A., Okada, M., Kawano, H., Miura, Y., Hiramoto, T., Inoue, H., Suehiro, Y., Sugiyama, D., Lu, H., Yoshimura, A., Komatsu, N., Tani, K.: Expression Cloning of Genes Enabling Erythropoietin-Independent Erythropoiesis in Vitro. Poster session, Board III-544: The American Society of Hematology 51 th Annual Meeting, December 5-8, 2009. New Orleans, LA, USA
- Miyawaki, S., Hatsumi, N., Yamauchi, T., Tsuboi, K., Fujieda, A., Takeshita, A., Komatsu, N., Usui, N., Arai, Y., Ishida, F., Morii, T., Kano, Y., Ogura, M., Doki, N., Ohnishi, K., Naoe, T., Ohno, R.: Phase 2 Study of FLAGM (Fludarabine+High-Dose Ara-C +G-CSF+Mitoxantrone) for Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia (AML): A Report From the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) Poster session, Board I-80: Erythropoietin-Independent Erythropoiesis in Vitro. Poster session, Board III-544: The American Society of Hematology 51 th Annual Meeting, December 5-8, 2009. New Orleans, LA, USA

## 造血不全症の診療に関する診断・治療状況調査

研究協力者 鈴木 隆浩 (自治医科大学 内科学講座血液学部門 講師)

### 研究要旨

骨髄不全症候群は、多くの場合造血幹細胞移植以外に根本的治療が存在せず、治療法の選択に困ることが多い。これまで当研究班では、診療の一助とするため対象6疾患について「診療の参照ガイド」を策定してきたが、来年度その改訂作業を予定している。そこで、参照ガイド改訂の参考データとすることを目的に、実際の臨床現場における現在の診療内容、現場の医師が感じている問題点についてアンケート調査を行った。その結果、疾患・患者の状態によっては施設毎に検査や治療法にばらつきが存在することが明らかとなり、同時に薬剤使用についての希望、また診療参照ガイドに対する意見を得ることができた。本調査の結果は、来年度行われる診療ガイド改訂作業にあたり、診療現場から伝えられた重要な意見として役立てたい。

#### A. 研究目的

骨髄不全症候群は造血幹細胞移植以外に根本的治療がなく、治療法の選択に困ることが多い。そこで、骨髄不全症候群において各施設の先生方が現在どのような治療方針を選んでいるのかを調査し、来年度の診療参照ガイド改訂の参考にしたいと考え、アンケート調査を行った。

また、同時に診療ガイドの認知度や参照ガイド改訂に期待する内容などについても意見を集めた。

#### B. 研究方法

再生不良性貧血、赤芽球癆、溶血性貧血、不応性貧血、原発性骨髄線維症、輸血後鉄過剰症の7疾患について、治療法・診断時に行う検査・診療の参照ガイドの認知度について調査項目を作成し、本研究班関係施設を中心に血液診療科の存在する全国68施設に調査用紙を送付した。

#### C. 研究結果

期間内に41施設より回答を得ることができ、内容を解析した。

#### ①再生不良性貧血

軽症では全年齢層において約90%の施設が経過観察を選択していた。中等症では、高齢患者以外の場合約50%がATG+CyA、25%がCyA単剤、高齢患者では25%がCyAのみ、33%が経過観察であった。重症以上では若年者の場合30%~50%が幹細胞移植、中年患者では70%以上がATG+CyA、高齢者ではATG+CyAとCyA単剤治療がほぼ50%ずつを占めていた。微少PNH血球は63%の施設が可能な限り全例測定を行っており、参照ガイドの認知率(施設の半数以上の医師が認知している施設の割合)は72%であった。

#### ②赤芽球癆

特発性PRCAの治療は90%以上の施設でCyAが用いられていた。一方、二次性PRCAでは30%~50%の施設で原疾患の治療が優先されていたが、その大部分がCyAとの併用で治療を行っていた。Diamond-Blackfan貧血では全ての施設(3施設)でPSLが第一選択薬であった。初診時スクリーニング項目としては、胸部X線、CT、パルボB19抗体測定、末梢血顆粒リンパ球数、末梢血CD4/CD8比の測定が

90%程度の施設で施行されていた。診療ガイドの認知率は56%であった。

### ③溶血性貧血 (PNH)

溶血に対しては現在は多くの施設で PSL が第一選択であるが、70%の施設が認可後は eculizumab を使用する意向であった。骨髄不全に対しては ATG+CyA、蛋白同化ホルモンを使用するという施設がそれぞれ約 30%認められた。血栓症に対しては90%の施設がワーファリンを使用していた。PNH 血球については81%の施設で測定が行われているが、汎血球減少例に測定を行うと回答した施設が16%認められた。参照ガイドの認知率は60%であった。

### ④溶血性貧血 (AIHA)

Hb >10 g/dL 以上の軽症例では70%の施設で経過観察が行われていた。Hb <10 g/dL 以下ではほとんど全ての施設で PSL が第一選択薬として使用されていた。参照ガイドの認知率は62%であり、難治性 AIHA に対する rituximab 適応拡大を願う声が多く寄せられた。

### ⑤不応性貧血 (MDS)

本アンケートでは IPSS 分類毎および低形成 MDS における治療法を問うアンケートを行ったが、それぞれの病態において回答は大幅にばらつき、全国的に一定の治療方針が存在しない現状が明らかとなった。全体的な傾向としては、低リスク (IPSS: Low ~Int-1、芽球の少ない低形成 MDS) 症例では、経過観察、ビタミン剤、蛋白同化ホルモン、レナリドマイド、CyA の使用頻度が高く、高リスク症例においては造血幹細胞移植を含めた化学療法やメチル化阻害剤の使用意向を挙げる施設が多く認められた。参照ガイドの認知率は69%であった。

### ⑥原発性骨髄線維症

低リスク症例に対しては、全年齢層で約75%の施設で経過観察が行われていた。高リスク症例では移植可能年齢では35%の施設で造血幹細胞移植が考慮

されており、30%程度の施設では蛋白同化ホルモンが選択されていた。高齢者では約60%の施設で経過観察あるいは蛋白同化ホルモンが投与されていた。

診療ガイドの認知率は48%であった。

### ⑦輸血後鉄過剰症

現在余命1年以上となっている鉄キレート療法の適応については69%が現状でよいとの意見であった。また治療対象年齢については、約半数(54%)が年齢に関係なく治療すべきと回答しており、80歳程度とする意見が29%でそれに続いた。また、輸血によるヘモグロビンの維持レベルでは、現行の7.0 g/dL 程度という意見と8.0 g/dL の維持が望ましいという意見がほぼ半数ずつ(それぞれ46%, 40%)であった。また、ヘモグロビン7.0 g/dL 以上で輸血を行った場合の保険査定についてのアンケートでは、ほとんどの地域で症状詳記による対応で問題なしとの回答であったが、大阪・栃木では査定対象になる可能性が指摘されており、査定についてはかなり地域差があることが判明した。診療ガイドの認知率は64%であった。

### D. 考察

#### D. 考察

##### ①再生不良性貧血

30歳以下の若年者では、血縁ドナーが存在する場合でもまず ATG+CyA を選択する施設が多い。重症度が上がるほど移植選択の回答が増えるが、やはり ATG+CyA をまず試みる施設が多い。一方、高齢者ではまず蛋白同化ホルモンあるいは CyA 単剤での治療を行い、効果が不十分な場合に ATG+CyA を考慮するケースが多いことが分かった。骨髄移植の適応と高齢者への免疫抑制療法について、参照ガイドでのコメント強化が必要と考えられた。診療ガイドの認知率は全対象疾患の中で最も高かった。

##### ②赤芽球癆

今回のアンケートで特発性、続発性共にほとんど