

と導かれると推測される。CBF 白血病では t-MN 発症がまれであることから、ATRA による t-MN 発症の促進作用の可能性もあると考えられる。T-MN 発症を予防するため、APL の治療法に工夫をする必要があると考えられた。

## E. 結論

RUNX1 点突然変異が APL 治療後の t-MN の一因となっていることを示した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Nakahara F, Sakata-Yanagimoto M, Komeno Y, Kato N, Uchida T, Haraguchi K, Kumano K, Harada Y, Harada H, Kitaura J, Ogawa S, Kurokawa M, Kitamura T, Chiba S: Hes1 immortalizes committed progenitors and plays a role in blast crisis transition in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 2010 Apr;115(14): 2872-81.
- 原田浩徳, 今川 潤, 原田結花, 木村昭郎: C/EBP $\alpha$  変異パターンによる急性骨髄性白血病(AML)および骨髄異形成症候群(MDS)病型の解析. *広島医学* 2010 Apr;63(4): 311-3.
- Komeno Y, Kitaura J, Watanabe-Okochi N, Kato N, Oki T, Nakahara F, Harada Y, Harada H, Shinkura R, Nagaoka H, Hayashi Y, Honjo T, Kitamura T: AID-induced T-lymphoma or B-leukemia/lymphoma in a mouse BMT model. *Leukemia* 2010 May;24(5): 1018-24.
- 原田結花, 原田浩徳: 骨髄増殖性腫瘍における白血病移行の分子機構. [特集 骨髄増殖性腫瘍をめぐる最近の進歩] *血液・腫瘍科* 2010 Aug;61(2): 143-50.
- Imagawa J, Harada Y, Yoshida T, Sakai A, Sasaki N, Kimura A, Harada H: Giant granulocytic sarcoma of the vagina concurrent with acute myeloid leukemia with t(8;21)(q22;q22) translocation. *Int J Hematol.* 2010 Oct;92(3): 553-5.
- Imagawa J, Harada Y, Shimomura T, Tanaka H, Okikawa Y, Hyodo H, Kimura A, Harada H: Clinical and genetic features of therapy-related myeloid neoplasms after chemotherapy for acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2010 Dec;116(26), 6018-22.
- 原田結花, 原田浩徳: MDS に対するレナリドミド治療とその感受性因子. [特集 骨髄異形成症候群 (MDS) 一病態の解明と克服に向けた進歩. *血液・腫瘍科* 2010 Dec;61(6): 690-8.
- Kato N, Kitaura J, Doki N, Komeno Y, Watanabe-Okochi N, Togami K, Nakahara F, Oki T, Enomoto Y, Fukuchi Y, Nakajima H, Harada Y, Harada H, Kitamura T: Two types of C/EBP $\alpha$  mutations play distinct but collaborative roles in leukemogenesis: lessons from clinical data and BMT models. *Blood* 2011 Jan;117(1): 221-33.
- Harada Y, Harada H: Molecular mechanisms that produce secondary MDS/AML by RUNX1/AML1 Point Mutations. *J Cellular Biochem* 2011;112:425-32.

### 2. 学会発表

- 丁 曄, 原田結花, 今川 潤, 木村昭郎, 原田浩徳: 骨髄増殖性腫瘍からの白血病移行メカニズムの解明. 第 107 回日本内科学会講演会, 2010 年 4 月 9~11 日, 東京.
- 丁 曄, 原田結花, 原田浩徳: 慢性骨髄増殖性腫瘍からの白血病移行メカニズムの解明. 第 6 回麒麟塾, 2010 年 6 月 5 日, 東京.
- Harada H, Harada Y: Molecular mechanism to produce MDS/AML by C-terminal truncated type of AML1/RUNX1 mutations. The 17<sup>th</sup> international RUNX workshop, July 11-14, 2010. Hiroshima, Japan.

- Imagawa J, Harada H, Yoshida T, Sakai A, Harada Y, Sasaki N, Kimura A: A vaginal giant granulocytic sarcoma concurrently with acute myeloid leukemia with t(8;21)(q22;q22). 第 72 回日本血液学会学術集会, 2010 年 9 月 24~26 日, 横浜.
- Harada Y, Harada H, Imagawa J, Kimura A: Deferasirox improved severe cardiac insufficiency and pancytopenia in a patient with aplastic anemia. 第 72 回日本血液学会学術集会, 2010 年 9 月 24~26 日, 横浜.
- Sakurai M, Watanabe N, Harada H, Harada Y, Sadahira K, Fukuchi Y, Tsukada Y, Yokoyama K, Okamoto S, Nakajima H: A case of FPD/AML with a novel RUNX1 mutation. 第 72 回日本血液学会学術集会, 2010 年 9 月 24~26 日, 横浜.
- Harada H, Harada Y, Imagawa J, Kimura A: Molecular mechanisms to produce MDS/AML by C-terminal truncated type of AML1/RUNX1 mutations. 第 72 回日本血液学会学術集会, 2010 年 9 月 24~26 日, 横浜.
- 原田浩徳: 放射線関連 MDS・白血病の発症機序における AML1 点突然変異の役割. 日本放射線影響学会第 53 回大会, 2010 年 10 月 20~22 日, 京都.
- 樽谷美保, 今川 潤, 沖川佳子, 原田結花, 木村昭郎, 原田浩徳: 急性前骨髄球性白血病 (APL) の第一寛解期に JAK2V617F 陽性本態性血小板血症 (ET) を発症した 1 例. 第 103 回日本内科学会中国地方会, 2010 年 11 月 13 日, 岡山.

## 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 (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明らかにし解決することができた、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。このシステムに基づいて、健常人の血清 NTBI を測定したところ、男性  $0.206 \pm 0.091 \mu\text{M}$ 、女性  $0.212 \pm 0.095 \mu\text{M}$  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、測定条件の探索を行い、結果、3 種類の isoforms (hepc-20、hepc-22、hepc-25) の同時定量システムを開発することができた。このシステムを利用して健常人の血清ヘプシジン濃度を求めたところ、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  $0.702 \pm 0.519 \text{ ng/ml}$ 、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。本臨床研究の対象疾患における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い、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を開始し、疾患別、治療前後、経過過程における血清 NTBI 値ならびにヘプシジン値の変動を評価することができる段階に進んだ。

### 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い、疾患別、治療前後、経過過程におけるデータを集積する。さらに、健常人血清 NTBI 値ならびにヘプシジン値を基準に各種疾患の診断、治療、効果、予後評価などのバイオ・マーカーとしての可能性を追求する。

### B. 研究方法

【NTBI 測定】 Nonmetallic PEEK (polyether

-ethylketone) tube を用いた 2796 BioSeparation Module with 2998 Photodiode Array Detector (Waters) に、OmniSpher 5 C18, G100  $\times$  3 Repl, glass column with ChromSep guard column SS (Varian/Agilent Technologies) を装着した non-metal HPLC システムを選択した。これまで疑問視されてきた低濃度領域の不安定性に関して、その問題点を探求したところ、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によるバックグラウンド低減に成功し、結果、低濃度領域における血中 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。

【ヘプシジン測定】ヘプシジン測定は API4000QTRAP

(Applied Biosystems)に UPLC ACQUITY TM systems (Waters) を組み合わせた LC-MS/MS を構築し、ヘプシジン産生臓器である肝臓をその由来とする各種肝がん細胞株の培養上清（血清を含む）を用いて測定条件の探索を行い、結果、3種類の isoform (hepc-20, -22, -25) の同時定量を世界で初めて可能としたシステムの構築に成功した。この条件下でヒト血清中のヘプシジン測定を実施し、isoform 別にそれぞれの濃度を求めた。

【生体試料の取り扱い】当施設に送られてきた試料の保管管理に関しては専用の冷凍庫を準備し、扉には施錠を施した。この冷凍庫は暗証番号式ドアロック設置の部屋に固定し、試料の紛失防止策を講じた。健常人末梢血は採血後1時間以内に血清分離を行い、適当量を分注し-30°Cにて一旦凍結保存した。測定直前に血清を解凍し、NTBIならびにヘプシジン測定のための前処置をそれぞれ行い測定システムにアプライした。

【倫理面への配慮】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た。また、血清を提供していただける健常人に対しては医師が直接説明同意書を手渡して説明し、文書で同意を頂いた。

### C. 研究結果

【健常人血清 NTBI 値】NTBI 測定系の“golden standard”といわれている non-metal HPLC システムを導入し、これまで本システム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明白にし、改善することで検出感度の向上、安定した測定システムを構築することができてきた。その結果、健常

人血清 NTBI 値を求めることが可能となり、男性： $0.206 \pm 0.091 \mu\text{M}$  (n=20)、女性： $0.212 \pm 0.095 \mu\text{M}$  (n=16) という平均値を得ることができた。この健常人血清 NTBI 値は、年齢、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明らかな相関を認めなかった。

【健常人血清ヘプシジン値】LC-MS/MS を構築し、血清を含む試料を用いて測定条件の探索を行い3種類の isoforms (hepc-20, hepc-22, hepc-25 と略す) の同時定量を世界で初めて成功させた。この条件下で健常人血清ヘプシジン濃度を isoform 別に求めたところ、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  $0.702 \pm 0.519 \text{ ng/ml}$ 、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。各 isoform 間の相関を調べてみると、hepc-22/hepc-20 は  $R^2=0.7544$ 、hepc-25/hepc-20 は  $R^2=0.5514$  および hepc-25/hepc-22 は  $R^2=0.6754$  であり、いずれも正の相関を示したことより、hepc-20、hepc-22 および hepc-25 の3種類の isoform は単一の分子から順次消化された truncated form である可能性が示唆される。血清フェリチン値との相関をみると、ferritin/hepc-20 は  $R^2=0.7046$ 、ferritin/hepc-22 は  $R^2=0.6604$  および ferritin/hepc-25 は  $R^2=0.5898$  であり、いずれも正の相関を示した。血清クレアチニン値との相関を検討したところ、Creatinin/hepc-20 で  $R^2=0.5395$  と正の相関を示した。一方、hepc-22 ならびに hepc-25 は血清クレアチニンと明らかな相関は認められなかった。

【登録患者検体の NTBI ならびにヘプシジン測定】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に登録の患者血清13検体、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）に関する臨床研究に登録の患者血清42検体について、NTBI ならびにヘプシジンの測

定が終了し、疾患別、治療前後、経過過程における血清 NTBI 値ならびにヘプシジン値の変動を把握することができ、その血清値を評価することができる段階にきた。平成 23 年度以降も引き続き NTBI ならびにヘプシジンの測定を継続する。

#### D. 考察

Non-metal HPLC システムにて得られた健常人血清 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ことより、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る。一方、LC-MS/MS にて得られた健常人血清中の 3 isoforms の各濃度が血清フェリチン値と相関を示したことより、鉄代謝異常の病態把握、診断、疾患のモニタリング、判断基準に有用であると判断できる。さらに、血清の hepc-20 値については腎機能との関係を示唆する結果であり、さらなる解析を期待するものである。

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に登録の患者血清 13 検体、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）に関する臨床研究に登録の患者血清 42 検体の NTBI 値ならびにヘプシジン値より、現段階では一部、疾患別、治療前後、経過過程における血清 NTBI 値ならびにヘプシジン値の変動を把握することが可能な状況にある。平成 23 年度以降も引き続き当臨床研究登録患者の血清 NTBI ならびにヘプシジンを測定し、当初の目標検体数に到達することで、信頼性の高い内容となり、結果、本臨床研究の対象疾患における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ことが期待される。

#### 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 測定に関しては特に低濃度領域の安定した測定が可能となり、一方、ヘプシジン測定に関しては 3 種類の isoforms を同時に測定することが可能となった。これらのシステムを用いて得られた健常人の血清 NTBI 値ならびにヘプシジン (hepc-20, hepc-22, hepc-25) 濃度を基に、本臨床研究の対象疾患における病態と鉄代謝の関係について、疾患別、治療前後、経過過程における血清 NTBI 値ならびにヘプシジン値の変動を評価することが可能な段階にまで進んだ。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Ohnishi K, Torimoto Y, Ikuta K, Tanaka H, Hosoki T, Tanaka S, Hamano A, Sato K, Fujiya M, Sasaki K, Kohgo Y. ; Detection of soluble HFE associated with soluble transferrin receptor in human serum. *Int J Mol Med.* 2011 Mar;27(3):435-440
- 生田克哉、高後裕：巻頭トピックス．鉄キレート療法の進歩．血液疾患最新の治療 2011-2013, p1-6, 2010 年
- 大竹孝明、生田克哉、高後裕；【肝・胆道系症候群（第 2 版）その他の肝・胆道系疾患を含めて 肝臓編（上）】遺伝と代謝 ヘモクロマトーシス．日本臨床 別冊肝・胆道系症候群 I p451-456 2010 年 9 月
- 大竹孝明、生田克哉、高後裕；【鉄代謝の臨床 鉄欠乏と鉄過剰 診断と治療の進歩】最近の話題 鉄と発癌．日本内科学会雑誌 2010 年 6 月号 99 巻 6 号 1277-1281
- 澤田賢一、生田克哉、木村文昭、森田潔、奈良美保；【鉄代謝の臨床 鉄欠乏と鉄過剰 診断と治療の進歩】鉄欠乏性貧血と鉄過剰症の治療．日本内科

学会雑誌 2010年6月号 99巻6号 1287-1305

- 佐々木勝則、生田克哉；【鉄過剰症 その病態と治療】非トランスフェリン結合鉄 (NTBI) . 日本内科学会雑誌 2010年4月号 139巻2号 139:300

## 2. 学会発表

- 大竹孝明、生田克哉、高後裕：NASH/NAFLD発症のメカニズム NAFLDにおける鉄毒性の検討ー非トランスフェリン結合鉄 (NTBI)測定よりー. ワークショップ；第96回日本消化器病学会総会 2010年4月22日, 新潟
- 佐々木雄介、下中靖、生田克哉、高後裕：鉄負荷によるヘプシジン産生誘導は単球由来液性因子により制御される. 一般口演；第46回日本肝臓学会総会 2010年5月27日~28日, 山形
- 澤田康司、大竹孝明、長谷部拓夢、中嶋駿介、阿部真美、三好茂樹、本村亘、生田克哉、鈴木康秋、大平賀子、高後裕：マウス脂肪肝モデルにおける小腸鉄トランスポーター発現の解析. 一般口演；第46回日本肝臓学会総会 2010年5月27日~28日, 山形
- Sasaki, K., Ikuta, K., Hosoki, T., Ohtake, T., Mizukami, Y., Torimoto, Y., Kohgo, Y. : Growth Inhibition by Transduced Hecpudin Peptides in Human Embryonic Kidney Cells. Session Type : Poster Presentation, Board PO-85 : Japan Society of Gene Therapy The 16th Annual Meeting, July 1-3, 2010. Utsunomiya, Tochigi
- 田中宏樹、生田克哉、佐々木勝則、細木卓明、鳥本悦宏、中村正雄、阿久津弘明、Zhen Li、Jonathan Glass、高後裕：Iron Uptake Facilitator LS 5-81のHIF-1a発現抑制効果. 一般口演；第34回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会 2010年9月12日, 東京
- 生田克哉、佐々木雄亮、下中靖、高後裕：ヘプシジン 3 アイソフォーム同時定量法の確立とその基礎的・臨床的意義. シンポジウム；第34回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会, 2010年9月12日, 東京
- 大竹孝明、生田克哉、長谷部拓夢、中嶋駿介、澤田康司、阿部真美、鈴木康秋、高後裕、田中宏樹、佐々木勝則、鳥本悦宏：非アルコール性脂肪肝における非トランスフェリン結合鉄(NTBI)の検討. 一般口演；第34回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会, 2010年9月12日, 東京
- 倉賀野隆裕、生田克哉、古田穰、木田有利、北村理恵、名波正義、小瀧慶長、蓮池由起子、野々口博史、高後裕、中西健：維持透析患者における血清 non transferrin bound iron (NTBI)値と erythropoiesis stimulating agent (ESA)反応性との関連. 一般口演；第34回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会, 2010年9月12日, 東京
- 佐々木勝則、生田克哉、細木卓明、大竹孝明、鳥本悦宏、田中宏樹、高後裕：非分泌型ヘプシジン 20, 22, 25の細胞増殖抑制効果. 一般口演；第34回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会, 2010年9月12日, 東京
- Ikuta, K., Ito, S., Ichiki, K., Okamura, N., Hosoki, T., Sato, K., Torimoto, Y., Kohgo, Y. : The Effect of Deferasirox on the Assays for Serum Iron and Serum Unsaturated Iron Binding Capacity. Poster, PS-2-57 第72回日本血液学会学術集会 2010年9月25日, 横浜
- 大竹孝明、鈴木康秋、高後裕：NAFLD患者における血清 NTBI 測定に関する研究. シンポジウム; JDDW 2010, 2010年10月13日~16日, 横浜
- Kohgo, Y. : Current status and future prospects for evaluation and monitoring of body iron metabolism. Session Type : JSH/EHA Joint educational session :

JSH International Symposium, July 16, 2010. Akita, Japan

- Ikuta, K., Hosoki, T., Sasaki, Y., Shimonaka, Y., Sasaki, K., Torimoto, Y., Kohgo, Y. : Establishments of Simultaneous Quantification Method for Hepcidin Isoforms and Sensitive Quantification System for Non-Transferrin Bound Iron in Serum. Session Type : Poster Presentation, Board P-5-4 : JSH International Symposium, July 16-17, 2010. Akita, Japan
- Goto, T., Ikuta, K., Yokohata, E., Koyama, D., Onodera, K., Seto, A., Watanabe, K., Ozawa, Y., Sasaki, K., Kohgo, Y., Miyamura, K. : Iron Overload in Adult Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Survivors: Quantification of Iron Burden by Determining Non-Transferrin-Bound Iron. Session Type : Poster Presentation, Board III-234 : The American Society of Hematology 52nd Annual Meeting, December 4-7, 2010. Orland, Florid, USA
- Ohtake, T., Ikuta, K., Hasebe, T., Nakajima, S., Sawada, K., Abe, M., Hosoki, T., Suzuki, Y., Sasaki, K., Torimoto, Y., Kohgo, Y. : Alcohol-Loading and Obesity Regulate the Expression of Transferrin Receptor 1 and Hepcidin in Mice Liver. Session Type : Workshop, IV Falk Gastro-Conference, October 5-6, 2010. Freiburg, Germany
- Sasaki, Y., Shimonaka, Y., Kanada, H., Moriguchi, Y., Ikuta, K., Sasaki, K., Kohgo, Y. : Hepcidin Production is Up-regulated by Non Hepatic Cell-Derived Humoral Factors after Iron Loading. Session Type : Poster Presentation, Board #106 : The International Society of Experimental Hematology 39th Annual Scientific Meeting, September 17, 2010. Melbourne, Australia

## 小児再生不良性貧血の診断時における末梢血リンパ球テロメア長測定の臨床的意義の検討

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)

坂口 大俊 (名古屋大学医学部附属病院小児科 医員)

### 研究要旨

再生不良性貧血(AA)の疑いのある小児患者を対象に末梢血リンパ球のテロメア長を Flow-FISH 法を用いて測定し、臨床的意義を検討した。AA 患者における診断時の前方視的なテロメア長測定は、潜在する不全型 DC の同定に有用であるだけでなく、免疫抑制療法(IST)への反応性を予測するのに有用であることが示唆された。

### A. 研究目的

再生不良性貧血(AA)と診断される患者の中には、種々の先天造血不全症(CBFS)の患者も時として含まれる。先天性角化不全症(DC)もそうした CBFS の一つであり、テロメア維持に関する遺伝子異常が原因で、爪萎縮、舌白斑、皮膚色素沈着の古典的 3 徴の他に、造血不全や特発性肺疾患などの全身症状を呈す疾患である。我々の過去の検討では DC と診断された 8 例全例でテロメア長が健常人の 5%以下に短縮しており、AA 患者と比較しても有意に短縮していた。この結果に基づき、テロメア長の測定が、身体的特徴を示さない潜在的 DC のスクリーニングに有用であるかを検討した。

また、AA において免疫抑制療法(IST)への反応性を予測することは治療適正化のために重要な課題である。これまでに成人の AA 患者ではいくつかの予測因子が報告されているが、我々が小児 AA において検討したところ、それらの因子はいずれも IST 反応性の予測因子とはならなかった。今回、テロメア長短縮が IST 反応性の予測因子となるかどうかを検討した。

### B. 研究方法

当院にて AA 疑いの患者に対し、診断時に末梢血

リンパ球のテロメア長を測定した。テロメア長測定は Flow-FISH 法(Telomere PNA kit @Dako 社)を用いて行った。テロメア長短縮を認めた患者において、DC の原因遺伝子とされる TERC, TERT, NOP10, TINF2 の遺伝子検査を行った。テロメア長測定および遺伝子検査を行う際には、院内倫理委員会で承認された説明書と同意書を用いて、本人もしくは保護者の同意を得て実施した。

また、テロメア長測定が IST 反応性の予測因子となり得るか検討するために、IST 治療前の患児 40 名を対象とし、診断時に末梢血リンパ球のテロメア長を測定した。また、71 名の健常ボランティアの末梢血リンパ球のテロメア長測定を行い、正常コントロールとした。AA と診断された 40 名に対して IST を実施し、6 カ月後に反応性を評価した。IST 反応性の予測因子について、単変量解析および多変量解析を行って検討した。

### C. 研究結果

AA と診断された患者の中で、1 例で著しいテロメア長短縮を認めた。この患者の遺伝子検索を行ったところ、TINF2 遺伝子の ex6 に変異を認め、DC と診断することができた。

次に、IST 反応性の予測因子の検討について、AA



患者 40 例の内、27 例が IST 反応良好群で、13 例が IST 反応不良群であった。両群間の患者背景を比較したところ、年齢、性別、重症度、診断から治療までの時間など、有意な偏りはなかった。一方で、AA 患者 40 例のテロメア長は健常者 71 例に比べて有意に短縮していた。さらには、IST 反応不良群のテロメア長は IST 反応良好群に比べて有意に短縮していた。IST 反応良好群と健常者の間ではテロメア長に有意さはなかった。

単変量解析の結果、診断時血小板数低下とテロメア長短縮が、IST 反応不良性の予測因子となった。さらに、免疫抑制療法の予測として有用とされてきた WBC, Ret, Plt, minor PNH clone 等を含めて多変量解析を行ったところ、テロメア長短縮のみが有意な IST 反応不良性の予測因子となった。

#### D. 考察

臨床的に DC と診断されている患者およびテロメア関連の遺伝的背景を持つ AA 患者では、健常人および AA 患者と比較して、著明なテロメア長短縮を認めた。AA 診断時の Flow-FISH 法によるテロメア長測定は AA 患者の中に潜在する DC 患者の同定に有用であった。

IST 反応性の予測において、反応不良群では全例でテロメア長が年齢調整基準値よりも短縮していたが、反応良好群では約半数が基準値より短縮していたに過ぎず、両群間の平均値は有意差があった。多変量解析の結果、AA 診断時のテロメア長短縮は IST 反応性不良の有意な予測因子となった。これらの結果から、テロメア長が基準値より長い症例では IST 反応性良好であることが期待されるが、短い症例では反応性不良である可能性があると言える。

#### E. 結論

AA 患者における診断時の前方視的なテロメア長

測定は、集団内に潜在する不全型 DC の同定に有用であるだけでなく、IST 反応性を予測するのに有用であることが示唆された。今後も検討を重ね、大規模集団での検証を要する。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Yoshida N, Yagasaki H, Hama A, Takahashi Y, Kosaka Y, Kobayashi R, Yabe H, Kaneko T, Tsuchida M, Ohara A, Nakahata T, Kojima S. Predicting response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica*. 2011 Jan 27. [Epub ahead of print]
- Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsuiki N, Takagi M, Matsuda K, Muramatsu H, Doisaki S, Nagasawa M, Morio T, Kasahara Y, Koike K, Kojima S, Takao A, Mizutani S. Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease with somatic KRAS mutation. *Blood*. 2010 Nov 9. [Epub ahead of print]
- Pulsipher MA, Young NS, Tolar J, Risitano AM, Deeg HJ, Anderlini P, Calado R, Kojima S, Eapen M, Harris R, Scheinberg P, Savage S, Maciejewski JP, Tiu RV, Difronzo N, Horowitz MM, Antin JH. Optimization of Therapy for Severe Aplastic Anemia Based on Clinical, Biological and Treatment Response Parameters: Conclusions of an International Working Group on Severe Aplastic Anemia Convened by the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network, March 2010. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011 Mar;17(3):291-9.
- Nishio N, Kojima S. Recent progress in dyskeratosis congenita. *Int J Hematol*. 2010 Oct;92(3):419-24.
- Kanezaki R, Toki T, Terui K, Xu G, Wang R, Shimada A, Hama A, Kanegane H, Kawakami K, Endo M, Hasegawa D, Kogawa K, Adachi S, Ikeda Y, Iwamoto S,

Taga T, Kosaka Y, Kojima S, Hayashi Y, Ito E. Down syndrome and GATA1 mutations in transient abnormal myeloproliferative disorder: mutation classes correlate with progression to myeloid leukemia. *Blood*. 2010 116:4631-4638.

- 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 resulting from uniparental disomy after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2010 Apr 15;115(15):3158-61.

## 2. 学会発表

- Takahashi Y, Doisaki S, Nishio N, Muramatsu H, Shimada A, Hama A, Kojima S. The telomere length in peripheral blood lymphocytes is a useful predictor of the response to immunosuppressive therapy in patients with acquired aplastic anemia. Session Type: Oral Session. 52nd ASH annual meeting. Dec. 4-7, 2010. Orland, USA
- 濱麻人、真部淳、伊藤雅文、野沢和江、土居崎小夜子、村松秀城、嶋田明、高橋義行、小原明、小島勢二：小児再生不良性貧血と Refractory cytopenia of childhood の臨床像の比較：中央診断登録例 78 例の検討；第 52 回日本小児血液学会総会、2010 年 12 月 17 日～19 日、大阪

## JAK2V617F 遺伝子変異の検出法

研究協力者 小松 則夫（順天堂大学医学部内科学血液学講座 教授）

### 研究要旨

AB-QProbe を用いた ABC-PCR 法は JAK2 アレルバーデン定量する方法として、定量下限値が 5-10%程度と比較的高感度であること、増幅反応後に蛍光を測定することでアレルバーデンの定量が可能であるため簡便であること、1 サンプルにつき反応は 1 回でよいために低コストである、等の特徴があり、臨床検査医学の分野への幅広い寄与が期待される。

### A. 研究目的

骨髄増殖性腫瘍（myeloproliferative neoplasm：MPN）において Janus Kinase 2（JAK2）遺伝子の点突然変異（JAK2V617F）が報告されたが、一人体由来の血液試料であっても、野生型、ホモ型、ヘテロ型の血液細胞が混在しており、従来の SNP 解析のように、遺伝子変異の検出やタイピングでは正確に患者の変異の状況を把握することはできない。一方で、臨床例だけでなくトランスジェニックマウスを用いた実験からも JAK2V617F のアレルバーデンと MPN の病態との間に関連性があることが示唆されており、JAK2V617F アレルバーデンの定量法の重要性が増している。さらに診断だけでなく病態を把握するためにも重要である。そこで本研究では簡便・低コスト・正確な定量手法の樹立を試みた。

### B. 研究方法

JAK2 野生型遺伝子と JAK2V617F 遺伝子に共通のプライマーセットを用いて、サンプル中の両遺伝子を競合的に増幅させる（サンプル中の JAK2 遺伝子は反応前後でアレルバーデンを一定に保ったまま増幅される）。増幅反応後、AB-QProbe と呼ばれる蛍光プローブを用いてサンプルのアレルバーデンを定量

する。AB-QProbe の両末端は BODIPY FL（ex/em = 505/513nm）と TAMRA（ex/em = 555/580）でラベルされており、これらの蛍光色素は近傍のグアニン塩基との電子移動により、蛍光が著しく消光するという特性を有する。さらに、AB-QProbe は、JAK2 野生型遺伝子および JAK2 V617F 遺伝子に対してパーフェクトマッチで結合するため、AB-QProbe は JAK2 野生型遺伝子および JAK2 V617F 遺伝子に対して、同じ親和性を持つ。すなわち、AB-QProbe がサンプル中の JAK2 野生型遺伝子由来の増幅産物に結合した場合にはグアニン塩基の影響により BODIPY FL が消光するが、JAK2V617F 遺伝子由来の増幅産物に結合した場合にはグアニンがチミンに遺伝子変異を起こしているために BODIPY FL の消光は起こらない。これにより、増幅反応後の BODIPY FL の蛍光強度を測定するのみでアレルバーデンの定量が可能となる。

### C. 研究結果

ABC-PCR 法はアレルバーデン 10%-90%の範囲においてリアルタイム AS-PCR 法よりも真値をよく反映した値を示し、リアルタイム AS-PCR 法はある程度の真値からのずれを許容すればアレルバーデン下限値 1%まで定量可能であった。MPN 患者と健常者

より採取した血液サンプルより DNA を抽出し、それらのサンプル中の JAK2 アレルバーデンを ABC-PCR 法およびリアルタイム AS-PCR 法でそれぞれ定量し、アレルバーデン下限値 10%までにおいて両者の定量結果には相関性があることが明らかになった。

#### D. 考察

AB-QProbe を用いた ABC-PCR 法は JAK2 アレルバーデン定量する方法として、定量下限値が 5-10%程度と比較的高感度であり、増幅反応後に蛍光を測定することでアレルバーデンの定量が可能であるため簡便である。また 1 サンプルにつき反応は 1 回でよいために低コストである。近年、標準曲線を用いた相対的な定量（相対定量）ではなく、直接的な定量（絶対定量）によって対象の遺伝子数を測定する新たな手法としてデジタル PCR 法が確立されたが、本研究はアレルバーデンの値を保証された標準サンプルの作成用に、デジタル PCR 法を利用し、AS-PCR 法を基盤としてデジタル PCR 法により JAK2 アレルバーデンを定量できるような反応条件を検討し、次いでこれを用いて野生型と変異型の JAK2 遺伝子量をデジタル PCR 法で定量し、その定量値をもとに ABC-PCR 法のための標準サンプルを作製している。このような標準サンプルの作成技術の確立は、実用化の促進に大いに寄与すると考えられる。

#### E. 結論

本検出法は今後さらに発見がなされてゆくものと予想される種々の遺伝子マーカーの検出・定量へも応用可能であり、臨床検査医学の分野への幅広い寄与が期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

● Morishita S, Komatsu N, Kirito K., Koda, A.H,

Sekiguchi Y, Tsuneda S, Noda N; Alternately binding probe competitive PCR mutation assay as a simple, cost-effective, and accurate quantification method for JAK2V617F allele burden in myeloproliferative neoplasm's. *Annals of Hematology*, in press

##### 2. 学会発表

● Morishita S, Noda N, Sekiguchi Y, Koda A.H, Yahata Y, Kirito K, Tsuneda S, Komatsu N; Alternately Binding Quenching Probe Competitive PCR: Simple, Sensitive, and Cost-Effective JAK2 Allele Burden Quantification Method. Session Type: Poster Session, Board #I-952: The American Society of Hematology 52th Annual Meeting, December 4-7. 2010, Orland, Florida, USA

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

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

輸血後鉄過剰症に対する経口鉄キレート剤（デフェラシロクス：DFX）が承認され、多くの鉄過剰症患者に DFX が使用されている。最近、鉄キレート療法が行われた症例において造血改善例が認められることが明らかとなり、注目を集めている。本研究では、造血不全疾患に対して DFX が投与される症例を前向きに登録し、造血改善およびその他の臓器障害の改善を追跡し、血清フェリチンや非トランスフェリン結合鉄（NTBI）など鉄代謝マーカーの変化を検討した。

平成 23 年 2 月現在 37 症例が登録された。MDS および再生不良性貧血が全体の 73%を占め、年齢中央値は 71 歳であった。6 ヶ月以上経過が観察された 24 症例中 1 例に造血改善が認められている。NTBI はキレート療法開始後 1 ヶ月以内の早期に低下傾向が認められ、その後は比較的緩やかに低下あるいは不変状態となった。

本研究の予定観察期間は最長 5 年間であり、今後も観察を続けると同時に登録症例を増加させるよう務めていく。

### A. 研究目的

造血不全疾患においては赤血球輸血が必要になることが多いが、頻回の赤血球輸血は最終的に鉄過剰症をきたす。過剰鉄は様々な臓器に沈着して臓器障害を引き起こし、MDS など一部の疾患では予後を短縮することが知られている。

この鉄過剰症による臓器障害の予防・治療のために鉄キレート療法が行われ、海外の臨床研究では実際に臓器障害が改善することが確認されているが、興味深いことに鉄キレート療法が有効であった症例のなかに、血液学的改善を認める症例があることが明らかになってきた。

そこで、本研究では鉄キレート療法を施行した患者を対象に、造血能の改善を追跡すると共に、血清フェリチン値や非トランスフェリン結合鉄（NTBI）などの鉄代謝マーカーを測定し、鉄キレート療法が与える影響について検証を行った。

### B. 研究方法

輸血後鉄過剰症と診断され、デフェラシロクス（DFX）による鉄キレート療法を開始する患者を登録し、その後最大 5 年間にわたって、病状など一般情報、血清フェリチン、不飽和鉄結合能（UIBC）、NTBI、ヘプシジンなどの鉄代謝マーカー、血算や各種生化学検査データを収集した。データは、治療前・2 週間後・1 ヶ月後、その後 12 ヶ月後まで 1 ヶ月毎、その後は最大 5 年間 3 ヶ月毎のものを収集し、鉄過剰症の改善、血球数の改善、鉄代謝マーカーの変化について解析を行った。

（倫理面への配慮）

被験者に対しては、各施設倫理委員会で承認された説明書を用いて本人から十分な同意を得た上で、研究を開始した。個人情報保護のため、データは匿名化された上で中央データセンターへ送付し、解析

に使用した。

### C. 研究結果

平成 23 年 2 月現在、全国 21 施設より 37 例の登録があり、その疾患内訳は図 1 で示すように MDS および再生不良性貧血 (AA) で 73% が占められており、その年齢分布は、年齢中央値 71 歳であった (図 2)。

6 ヶ月以上観察可能であった 24 例中 1 例に血液学的改善を認めている。改善を認めた症例は、登録時 72 歳の原発性骨髄線維症の男性であり、赤血球 Major response (13 ヶ月)、血小板 Major response (6 ヶ月) → Super response (9 ヶ月)、白血球 Major response (8 ヶ月) と全血球数に改善が認められ、赤血球、血小板では輸血依存からの離脱が認められている。

血中 NTBI 測定については、現在 9 症例のデータが解析可能であるが、いずれもキレート療法後早期 (2 週間 ~ 1 ヶ月) に有意な減少を認めているが、その後は減少が緩やかになり、正常範囲内 ( $0.3 \mu\text{M}$  以下) まで低下した症例は、血球回復が認められた 1 例のみであった (図 3)。

疾患名	登録症例数	観察中止症例数
AA	やや重症	1
	重症	4
	最重症	3
	unspecified	1
	RA	4
MDS	RARS	1
	RCMD	7
	RAEB	3
	Del 5q	1
	Overt leukemia	1
	unspecified	1
	PRCA	5
PMF	2	
MPN	1	
AML	1	
リンパ腫/浸潤	1	
合計	37	7

図 1 登録症例 原疾患別分類

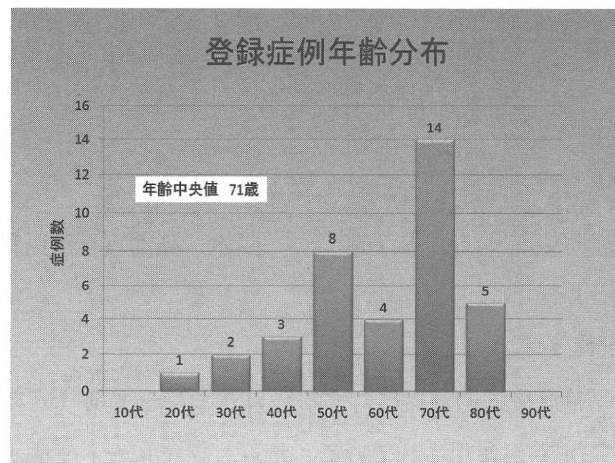


図 2 登録症例年齢別分布

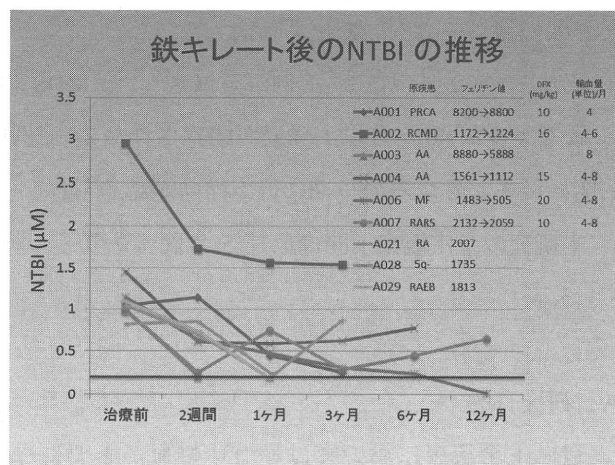


図 3 鉄キレート後の NTBI の変化

### D. 考察

現時点で登録症例数は 37 例と目標の 100 例には届いていないが、徐々に症例数は増えている。登録症例の約 80% 程度が基礎疾患に MDS と AA をもち、これは当班が以前に行った鉄過剰症実態調査の結果と一致する。また、登録症例の年齢分布は中央値 71 歳であり、鉄キレート療法は主に高齢者に行われていることが明らかになった。これは基礎疾患として最も多い、MDS の年齢分布を反映しているものと考えられる。

キレート療法後の造血改善については、現在のところ改善症例が 1 例のみ確認されている。現段階では観察期間の短い症例も多いため、造血回復例がど

の程度期待されるのかを検討するためには、さらに長期間観察し、また登録症例を増加させる必要がある。

NTBI については、検討症例は 9 例と少ないもののキレート早期 (1 ヶ月以内) に低下することが明らかとなった。NTBI は原疾患、輸血量、キレート剤内服量に影響されると考えられるため、今後は症例数を増やしてさらに検討を行う必要があると考えられる。

## E. 結論

鉄キレート療法後の臓器障害改善効果に関する研究を開始した。登録症例の特徴は、原疾患では MDS および AA が多く、年齢中央値は 71 歳で高齢者が多い。これはわが国の現状を反映していると考えられる。血球回復症例は 1 例に認められているが、実際にどの程度の症例で血球回復が期待できるか明らかにするには、さらに登録数と観察期間を増やすことが必要である。キレート療法と NTBI についても、今後サンプル数を増やして検討することが求められる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 鈴木隆浩. 輸血後鉄過剰症の病態と鉄キレート療法. 最新医学. 65(12): 2566-2573, 2010
- 鈴木隆浩, 小澤敬也. 鉄過剰症 日本の現状と病態. 日本内科学会雑誌. 99(6): 1233-1240, 2010.
- 鈴木隆浩. 経口鉄キレート剤による鉄過剰症の治療. 日本医師会雑誌. 139(2): 339-343, 2010.
- Sato K, Ozaki K, Fujiwara S, Oh I, Matsuyama T, Ohmine K, Suzuki T, Mori M, Nagai T, Muroi K, Ozawa K.. Incidental carcinomas detected by PET/CT scans in patients with malignant lymphoma. Int J Hematol. 2010 Nov;92(4):647-50
- Ogawa S, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Naikauch H, Koeffler HP, Sanada M. Deregulated Intracellular Signaling by Mutated c-CBL in Myeloid Neoplasms. Clin Cancer Res. 2010 Aug 1;16(15):3825-3831.
- Ogawa S, Sanada M, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koeffler HP. Gain-of-function c-CBL mutations associated with uniparental disomy of 11q in myeloid neoplasms. Cell Cycle. 2010 Mar 23;9(6):1051-1056.

### 2. 学会発表

- 鈴木隆浩. 骨髄異形成症候群 (MDS) の治療選択 第 72 回日本血液学会学術集会 教育講演 (2010 年 9 月、横浜)
- Okabe H, Suzuki T, Uehara E, Omori T, Ueda M, Nagai T, Sakata Y and Ozawa K : Hematopoietic Disturbance in Iron-Overload. The 1st JSH International Symposium, July 16-17, 2010, Akita
- Okabe H, Suzuki T, Uehara E, Omori T, Ueda M, Nagai T, Sakata Y and Ozawa K :Hematopoietic Disturbance in Iron-Overload 第 72 回日本血液学会学術集会, 2010 年 9 月 24~26 日, 横浜
- 上原英輔, 鈴木隆浩, 岡部寛, 上田真寿, 永井正, 真田昌, 小川誠司, 小澤敬也. c-Cbl regulates interaction of immature hematopoietic cells with the bone marrow microenvironment by Rac GTPase-mediated cytoskeletal signals.第 16 回遺伝子治療学会学術総会, 2010 年 7 月 1 日~3 日, 宇都宮.
- 上原英輔, 鈴木隆浩, 笹崎美幸, 岡部寛, 畑野かおる, 上田真寿, 永井正, 真田昌, 小川誠司, 小澤敬也. Rac を介する細胞骨格シグナルによって c-Cbl は骨髄細胞の骨髄ホーミングを制御する. 第 72 回日本血液学会学術総会, 2010 年 9 月 24 日~26 日, 横浜.

## 骨髄異形成症候群に対する骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植に関する研究

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、MDS 患者に対する骨髄非破壊的前処置を用いた同種造血細胞移植の治療成績を後向きに解析し、有効性と安全性を検討した。移植後 2 年以降には生存曲線はプラトーに達し、28 例中 14 例が生存を続けていた。MDS 患者に対する RIST は有効な根治的治療法であると考えられた。

### 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

2000 年 11 月から 2010 年 4 月までに 28 名に RIST を行った。今回の解析からは、拒絶に対する救援療法としての RIST、および骨髄破壊的移植に準じた量の Busulfan が投与されているものは除外した。

年齢中央値は 59 歳で、男性 26 名、女性 2 名であった。病型は RA 6 例、CMML 4 例、RAEB 13 例 (RAEB-1: 6 例、RAEB-2: 7 例)、Overt leukemia 5 例であった。幹細胞ソースは血縁末梢血 8 例、非血縁骨髄 15 例、臍帯血は 5 例であった。移植時病期は寛解 9 例、治療抵抗性 9 例で、無治療で移植となったものが 9 例であった。

移植前治療として①fludarabine (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)、もしくは② 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全身放射線照射 (2Gy) を追加、CyA/Mycophenolate Mofetil (MMF) を用いた。

### C. 研究結果

全 28 例中 14 例が現在も生存を続けていた。死亡した 14 例のうち、死因は原疾患の増悪が 5 例、感染症 4 例、その他、生着不全、急性 GVHD、VOD などがあった。

全生存率では、生存曲線は移植後 2 年を超えた時期からプラトーに達していた (図 1)。病型による生存率に有意差はなかったが、RA6 名中 4 例、CMML4 例中 2 例、RAEB13 例中 7 例が長期生存していた。一方、Overt leukemia については、5 例中 1 例のみであった(図 2)。

移植時病期、移植前の化学療法の有無については、全生存率に有意差はなかった。一方、有意差はないものの、移植前の化学療法に抵抗性であった場合に全生存率が低い傾向にあった。

### D. 考察

RA および RAEB については 2 年を超えた頃から生存曲線はプラトーに達し、MDS に対する RIST は根治療法として有望であると考えられた。



図 1

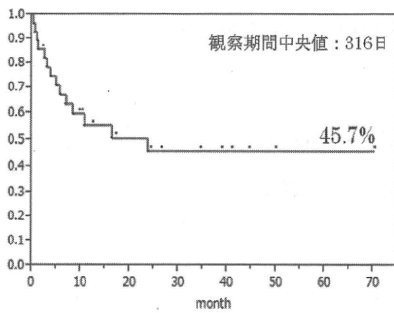
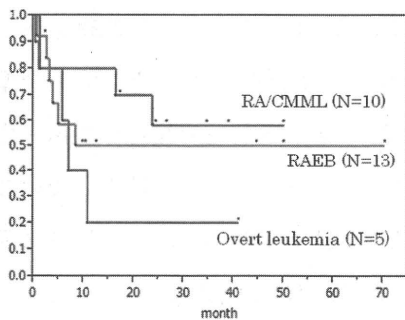
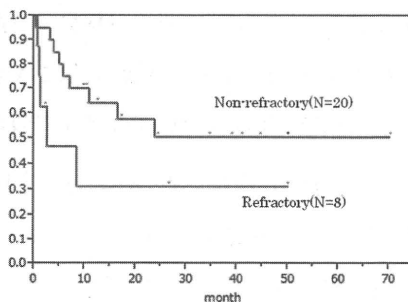


図 2



$p=0.37, NS$

図 3



$p=0.11, NS$

## 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、MDS の予後の改善が期待できる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Kobayashi K, Maeda Y, Hara Y, Nishie M, Nishimoro H, Sugiyama H, Namba N, Kubonishi S, Niiya M, Shinagawa K, Ikeda K, Tanimoto M : Clinical outcomes of unrelated donor umbilical cord blood transplantation for 30 adults with hematological malignancies Anticancer Research 29:1749-1754, 2009

### 2. 学会発表

- 近藤英生、吉田将平、近藤正太郎、原 嘉孝、久保西四郎、前田嘉信、品川克至、池田和眞、谷本光音：移植前フェリチン値の同種骨髄移植成績への影響、第 32 回日本造血細胞移植学会総会；2010.2.20、浜松
- 西之原正昭、小林孝一郎、藤原英晃、廻 勇輔、新谷大悟、藤井伸治、近藤英生、前田嘉信、品川克至、池田和眞、谷本光音：多様な幹細胞ソースによる同種造血細胞移植 244 例における GVHD 発症と移植成績の検討：第 33 回日本造血細胞移植学会総会；2011.3.9

## 不全型 Dyskeratosis congenita の診断におけるテロメラーゼ活性の有用性

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

Dyskeratosis congenita (DKC) は特徴的身体所見が付随する遺伝性の骨髄不全症(BMF)である。近年成人になって特徴的身体所見を伴わず緩徐に発症する不全型 DKC の存在が明らかになった。不全型 DKC のスクリーニングは、テロメア長の短縮化を検索することが実用的であると考えられている。しかしテロメア制御遺伝子の変異を認めているにもかかわらずテロメア長が正常範囲内の症例も少なからず存在する。そこで不全型 DKC の新たなスクリーニング法としてテロメラーゼ活性の有用性を検討した。テロメラーゼ複合体遺伝子変異を有する不全型 DKC3 例のテロメラーゼ活性は、正常コントロールと比較して有意差をもって低下していた。また 15 人の AA では免疫抑制療法(IST)に不応性の 2 症例にテロメラーゼ活性の低下が認められた。テロメラーゼ活性の測定は、不全型 DKC や IST に不応性の AA のスクリーニングに有用かもしれない。

### 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 BMF 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。また臨床的に MDS と診断された中でも IST が有効な症例が認められることがある。

染色体 3' 末端のテロメアに局在するテロメラーゼ複合体や 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。DKC は特徴的身体所見が付随する遺伝性の BMF で、テロメラーゼ複合体や Shelterin 複合体を構成するテロメア制御遺伝子の異常によって発症する。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、特徴的身体所見を伴わず緩徐に発症する不全型の DKC の存在が明らかになった。不全型の DKC は臨床的に AA や MDS と診断され、効果が得られない IST を行われることがある。以上より BMF の臨床診断において不全型 DKC を鑑別することは重要である。

不全型の DKC を鑑別する方法として遺伝子変異検索が考えられる。しかしテロメア関連遺伝子変異の検索は煩雑で、実際の臨床でのスクリーニングには不向きである。この理由として、①約 1/3 の DKC は原因遺伝子が不明であり、既知の遺伝子変異検索では不完全である。②対象となる遺伝子が多く、また遺伝子変異に hot spot がないためこれらの遺伝子の全長を検索しなくてはならない。③発見された塩基変異がテロメア長制御に影響をあたえる否かは機能解析を行わなければならない。などが考えられた。

不全型 DKC 症例のスクリーニングとしては、テロメア長の短縮化を検索することが実用的であると

考えられている。しかしテロメア制御遺伝子の変異を認めているにもかかわらずテロメア長が正常範囲内の症例も少なからず存在する。このことは、テロメア長を測定している細胞が、いわゆる「残存した細胞」であり、DKC 症例の造血細胞の中でもテロメア長が維持されている細胞の可能性がある。また DKC の発症には加齢と世代促進が必要であるが、対象となる症例が小児であった場合はテロメア制御遺伝子の変異を認めてもテロメア長の短縮化が軽度の可能性もある。そこでこうした症例をより鋭敏にスクリーニングする検査としてテロメラーゼ活性の測定は有用ではないかと考えられた。加齢や世代促進によるテロメア長の短縮が軽度であったとしても、テロメア制御遺伝子の変異があればテロメラーゼ活性の低下は明らかであると予想する。また近年性ステロイドホルモンであるアンドロゲンがリンパ球や造血幹細胞のテロメラーゼ活性を亢進させ細胞増殖活性を高めることが報告された。DKC や不全型 DKC に対して性ステロイドホルモンが有効な可能性があり検証が必要である。

本研究は DKC や不全型 DKC をより効率的に診断するために、①テロメア長測定と同様にテロメラーゼ活性の測定が、DKC や不全型 DKC のスクリーニングに有用かを検討した、②性ステロイドホルモンにて加療をしている DKC、不全型 DKC、IST に不応性の AA において、治療によるテロメラーゼ活性の改善が得られているかを確認する、などの研究を行った。

## B. 研究方法

不全型 DKC 3 例、AA 15 例、健常人 10 例に対して、TRAP assay にてテロメラーゼ活性を測定し解析を行った。また性ステロイドホルモン治療によるテロメラーゼ活性の改善の検証には、DCK、不全型 DKC、IST に不応性の AA の各 1 例において、Metenolone

acetate (プリモボラン)による治療前と、治療 3 カ月後における臨床データとテロメラーゼ活性を比較した。

## C. 研究結果

### 1. テロメラーゼ活性の測定の有用性の検証

不全型 DKC (n=3) は、健常人 (n=10) と比較して有意差をもってテロメラーゼ活性が低下していた (不全型 DKC 16.3 TPG unite vs 健常人 86.7,  $p=0.011$ ) (図 1)。

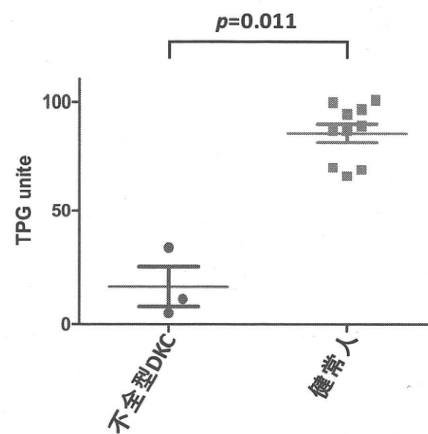


図 1

AA 15 例 (IST 有効 11 例、IST 無効 4 症例) において、IST 無効の AA 2 例でテロメラーゼ活性の低下は認められた。この 2 例はテロメア制御遺伝子に変異は認められず、1 例ではテロメア長の短縮化を認めたが、他の 1 例ではテロメア長は正常下限で短縮化は認められなかった。

### 2. 性ステロイドホルモン治療によるテロメラーゼ活性の改善の検証

臨床データに関しては、不全型 DKC において治療後 3 カ月において Hb の軽度上昇 (Hb 9.8→10.9g/dl) が認められたが、それ以外は有意な改善は認められていない。テロメラーゼ活性に関しては、DCK において有意に活性の亢進が認められ、不全型 DKC と IST に不応性の AA においても有意差はなかったが活性の亢進する傾向が得られた (図 2)。

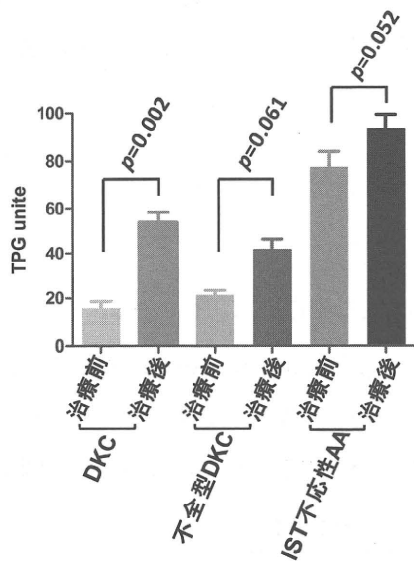


図 2

#### D. 考察

テロメラーゼ活性は、テロメア長と同様に不全型DKCのスクリーニングには有用であることが示された。特にIST無効のAAにおいてテロメア長の短縮化を認めないが、テロメラーゼ活性は低下している症例は、未知のテロメア関連遺伝子変異を有する不全型DKCが、世代促進や加齢による影響が軽度のためテロメア長の短縮が認められないのかもしれない。今後テロメア長の短縮化やテロメラーゼ活性が低下しているIST無効のAAに対して、全エクソン領域や転写制御領域、などを次世代高速シーケンサーを用いて変異解析を行い新規の原因遺伝子を同定する予定である。

またテロメラーゼ活性の測定は、Metenolone acetate (プリモボラン)などの治療の反応性を予想するにも有用である可能性がある。今回の検討では観察期間が短いため臨床的データの改善と関係は示せなかったが、今後の検討によって明らかにしたいと考えている。

#### E. 結論

テロメラーゼ活性はDKCや不全型DKCのスクリー

ニングや治療効果の評価に有用かもしれない。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Yamaguchi H, Inokuchi K, Takeuchi J, Tamai H, Mitamura Y, Kosaka F, Ly H, Dan K. Identification of TINF2 gene mutations in adult Japanese patients with acquired bone marrow failure syndromes. *Br J Haematol.* 2010;150(6):725-7.
- 山口博樹, 檀 和夫. テロメア関連遺伝子異常による骨髄不全症. *臨床血液.* 2010; 52: 646-653.
- 山口博樹, 檀 和夫. 骨髄不全症に対する蛋白同化ステロイドホルモンのテロメラーゼ活性化作用. *Annual Review 血液* 2011, in press..

##### 2. 学会発表

- Takeuchi J, Yamaguchi H, Inokuchi K, Tamai H, Mitamura Y, Kosaka F, Ly H, Dan K: Evaluation of TINF2 and SBDS gene mutations and screening telomere length in adult Japanese patients with acquired bone marrow failure syndromes: 15th. Congress of European Hematology Association. June 10-13, 2009, Barcelona, Spain.
- Takeuchi J, Yamaguchi H, Tamai H, Mitamura Y, Kosaka F, Inokuchi K, Dan K. Screening of telomere length among acquired aplastic anemia patients; 第72回日本血液学会, 2010年9月24-26日, 横浜.