

PNH 型未熟網赤血球の検出とヒドロキシルメチルシトシンの定量、およびその臨床的意義に関する研究

研究協力者 千葉 滋 (筑波大学血液内科 教授)

研究要旨

再生不良性貧血および骨髄異形成症候群 (MDS) および健常者の末梢血単核球について、CD59/CD71/CD45 マルチカラーフローサイトメトリーで未熟網赤血球を検出・定量し、報告されている方法による CD59 陰性赤血球および CD59 陰性顆粒球の検出・定量法と比較した。CD59 陰性未熟網赤血球の検出感度は、CD59 陰性赤血球検出の感度より高く、CD59 陰性顆粒球の検出感度と同程度であると推察された。CD59 陰性未熟網赤血球の検出・定量法は、CD59 陰性赤血球同定法に替わる有用な検査法と考えられた。

一方、MDS をはじめとする骨髄系腫瘍で高頻度にメチルシトシンのヒドロキシル化酵素である TET2 の遺伝子変異 (機能欠失型変異) が同定されていることから、これらの腫瘍におけるヒドロキシルメチルシトシン (5hmC) を定量した。5hmC レベルは、健常者間、MDS 患者間で相互に異なっていたが、健常者 > MDS 患者 > 白血病細胞株の順に高い傾向が見られた。TET2 遺伝子変異との関連や、予後および DNA メチル化阻害剤である 5-アザシチジンへの反応性との関連などをさらに検討している。

A. 研究目的

再生不良性貧血 (AA) および骨髄異形成症候群 (MDS) 患者において、CD59 陰性の発作性夜間血色素尿症 (PNH) 型未熟網赤血球の検出を行うこと ; MDS などの骨髄性腫瘍細胞におけるヒドロキシルメチルシトシンの定量を行うこと ; およびそれぞれの臨床的意義を検討することを目的とした。

B. 研究方法

AA および MDS 計 37 例および健常者 30 例から末梢血単核球を分離し、CD59/CD71/CD45 マルチカラーフローサイトメトリーで未熟網赤血球を検出・定量し、報告されている方法による CD59 陰性赤血球および CD59 陰性顆粒球の検出・定量法と比較した。

一方、10 例の MDS 患者骨髄から分離し保存された単核球由来 DNA を用い、イムノブロット法でメチルシトシン (5mC) およびヒドロキシルメチルシトシン (5hmC) を定量した。この他、健常人末梢血単

核球由来 DNA および急性骨髄性白血病 (AML) 細胞株由来 DNA についても 5mC および 5hmC を測定した。

(倫理面への配慮)

ヘルシンキ宣言を遵守し、研究対象者に対する人権擁護に十分に配慮した。「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」(平成22年11月1日 厚生労働省医政発1101第6号)に基づいて研究を履行した。説明者は、被験者に対し、本研究の目的、意義、方法 ; 予期される効果および危険 ; 拒否の自由 ; 不同意の際に不利益にならず従来の治療が継続されること ; 同意後の撤回の自由 ; 患者個人情報保護、などの点について文書と口頭で平易な用語を用いて説明し、理解を得た上で文書によるインフォームド・コンセントを得て採取された血液や骨髄細胞を用いた。

C. 研究結果

(1) PNH 型未熟網状赤血球の検出。30 例の健康人全てが陰性と同定されるレベルをカットオフレベルと定めたところ、37 例の AA あるいは MDS 患者のうち 18 例で PNH 型未熟網状赤血球が検出された。従来の方法による PNH 型赤血球および顆粒球は、それぞれ 16 例および 18 例で検出された。PNH 型未熟網状赤血球検出症例と PNH 型顆粒球検出症例はすべて重なっていたが、このうちの 2 例で PNH 型赤血球が検出されなかった。

(2) 5hmC 量は、健康者間、MDS 患者間で相互に異なっていたが、健康者 > MDS 患者 > 白血病細胞株という傾向が見られた。TET2 遺伝子変異との関連や、予後および DNA メチル化阻害剤である 5-アザシチジンへの反応性との関連などを検討中である。一方、5mC 量にはこのような個体間あるいは患者間の差が見られなかった。

D. 考察

(1) CD59/CD71/CD45 マルチカラーサイトメトリ法による PNH 型未熟網状赤血球検出法は、PNH 型血球の検出感度において CD59 陰性赤血球検出法よりすぐれており、CD59 陰性顆粒球検出法と同程度であると推察された。本法は CD59 陰性赤血球同定法に替わる有用な検査法と考えられた。

(2) 5hmC の量は病態により固有のレベルに変化している可能性が示唆された。病態との関連をさらに追求する必要がある。

E. 結論

PNH 型血球を高感度でかつ得意度高く同定する方法を開発した。また、メチルシトシンのヒドロキシル化が MDS などの病態に関与する可能性について、新たな示唆を得た。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Kozuma Y, Sawahata Y, Takei Y, Chiba S, Ninomiya H.; Procoagulant properties of microparticles released from red blood cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. Br J Haematol. in press
- Sakata-Yanagimoto M, Sakai T, Miyake Y, Saito TI, Maruyama H, Morishita Y, Nakagami-Yamaguchi E, Kumano K, Yagita H, Fukayama M, Ogawa S, Kurokawa M, Yasutomo K, Chiba S.; Notch2 signaling is required for proper mast cell distribution and mucosal immunity in the intestine. Blood. 2011 Jan; 117(1):128-34.
- Taoka K, Okoshi Y, Sakamoto N, Takano S, Matsumura A, Hasegawa Y, Chiba S.; A nonradiation-containing, intermediate-dose methotrexate regimen for elderly patients with primary central nervous system lymphoma. Int J Hematol. 2010 Nov;92(4):617-23.
- Miyake Y, Okoshi Y, Machino T, Chiba S.; Treatment of central nervous system lymphoma in rats with intraventricular rituximab and serum. Int J Hematol. 2010 Oct;92(3):474-80.
- Doki K, Homma M, Hori T, Tomita T, Hasegawa Y, Ito S, Fukunaga K, Kaneko M, Chiba S, Sumida T, Ohkohchi N, Kohda Y.; Difference in blood tacrolimus concentration between ACMIA and MEIA in samples with low haematocrit values. J Pharm Pharmacol. 2010 Oct;62(9):1185-8.
- Sugumito K, Maekawa Y, Kitamura A, Nishida J, Koyanagi A, Yagita H, Kojima H, Chiba S, Shimada M, Yasutomo K.; Notch2 signaling is required for potent anti-tumor immunity in vivo. J Immunol. 2010 May ,1;184(9):4673-8.
- 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.

千葉滋 : Retrospective analysis of BCL2+DCBCL in the rituximab era: multi-center analysis. セッションタイプ : ポスターセッション : 第72回 日本血液学会総会, 2010年9月24-26日, 横浜

2. 学会発表

- Chiba S.; Distinct roles of Notch signaling and Hes-1 on hematopoietic cell differentiation fate. Session Type: Oral Session: Notch and Stem Cells, October 3-6, 2010. Athens, Greece
- Nagata Y, Sanada M, Yoshida K, Nakaya T, Matsubara A, Obara N, Ishiyama N, Miyawaki S, Takita J, Chiba S, Shih L-Y, Koeffler HP, Ogawa S.; Profiling of multiple gene mutations in myelodysplastic syndromes using high-throughput resequencing combined with barcode labeling. Session Type: Oral Session: The American Society of Hematology 52nd Annual Meeting, December 4-7, 2010. Orlando, FL, USA
- Yoshida K, Sanada M, Nagata Y, Kawahata R, Kato M, Matsubara A, Takita J, Mori H, Ishiyama K, Ishikawa T, Miyawaki S, Obara N, Chiba S, Ogawa S.; Whole exome analysis of myelodysplastic syndromes using next-generation resequencing technology.: The American Society of Hematology 52nd Annual Meeting, December 4-7, 2010. Orlando, FL, USA
- Sakata-Yanagimoto M, Chiba S.; Notch signaling as a mediator of myeloid differentiation and leukemic transformation. セッションタイプ : ワークショップ : 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, 2010年12月7日-10日, 神戸
- 錦井秀和、中村直哉、近藤譲、小島稔、滝澤淳、長谷川雄一、大越靖、鈴川和己、横山泰久、小原直、坂田（柳元）麻実子、野口雅之、青木定夫、安藤潔、

本邦における MDS 患者の生命予後～とくに貧血との関連について

研究協力者 通山 薫 (川崎医科大学検査診断学 教授)

研究要旨

1998 年から 2006 年にかけて造血障害班に登録された MDS 患者のうち 343 症例を基に、以下に示すレトロスペクティブな解析をおこなった。即ち、IPSS リスク群および WPSS リスク群別の生存率（全生存率 OS および非白血病化生存率 LFS）を求めた。さらに比較的予後良好とされている IPSS-Low および Int-1 症例については、赤血球輸血歴の有無、Hb 濃度、および血清フェリチン値と生存率との関係を比較検討した。

IPSS リスク 4 群の生存期間中央値はそれぞれ 9 年以上、8.8 年、1.7 年、0.8 年、LFS については 4 群の中央値はそれぞれ 9 年以上、8.8 年、1.3 年、0.6 年であり、とくに LFS については各群の生存曲線は互いに統計学的有意差を示した。WPSS については有用性は窺えたものの、輸血後鉄過剰症の治療の進捗に加えて既に IPSS の改訂作業が国際レベルで進行中であることに鑑みると、今後 WPSS の意義は薄れる可能性が高いといえよう。

IPSS-Low および Int-1 症例における貧血と生存率との関連については、単に貧血の存在というよりは輸血依存性およびフェリチン高値が低リスク MDS の生命予後の悪化要因のひとつであり、今後有効な貧血治療薬および除鉄療法が低リスク MDS の予後を改善することが期待される。

A. 研究目的

本邦における MDS 患者の生命予後を IPSS および WPSS に基づいて解析し、とくに貧血や輸血との関連について検討する。

B. 研究方法

1998 年から 2006 年にかけて造血障害班に登録された MDS 患者のうち IPSS 算定可能な 343 症例を基に、以下に示すレトロスペクティブな解析をおこなった。即ち、IPSS リスク群の生存率（全生存率 OS および非白血病化生存率 LFS）を求めた。一部 WPSS リスク群別についても検討した。さらに比較的予後良好とされている IPSS-Low および Int-1 症例については、赤血球輸血歴の有無、Hb 濃度、および血清フェリチン値と生存率との関係を比較検討した。

C. 研究結果

IPSS リスク群別の症例数は Low 53 例、Int-1 165

例、Int-2 82 例、High 43 例であった。まず OS について見ると、4 群の生存期間中央値はそれぞれ 9 年以上、8.8 年、1.7 年、0.8 年であった。Low、Int-1 および Int-2 の生存曲線は互いに統計学的有意差を示したが、Int-2 と High の 2 群の生存曲線は有意に分離しなかった。次に LFS については 4 群の中央値はそれぞれ 9 年以上、8.8 年、1.3 年、0.6 年であり、各群の生存曲線は互いに統計学的有意差を示した。

次に輸血情報のある 187 症例について WPSS を適用したところ、Very low 7 例、Low 23 例、Intermediate 45 例、High 75 例、Very high 37 例に区分された。例数が少ないため十分な解析には至らないが、Very low/Low、Intermediate、High、Very high の 4 群に区分する意義はあると思われた。

次に IPSS-Low および Int-1 症例における貧血と生存率との関連について検討した。すなわち上記の比較的 low リスクで Hb 濃度 10 g/dL 未満の患者 114 例について、赤血球輸血歴のある 69 例と輸血歴のない 45

例を比較すると、輸血歴のない群のほうが生命予後は良好であった (Log-rank $p=0.03$)。Hb 濃度 8 g/dL 未満の患者 66 例に絞り込むと有意差は出なかったが、輸血歴のない群のほうが生命予後良好の傾向が見られた。

血清フェリチン値と生命予後の関係については、診断時血清フェリチン値のカットオフを 500 ng/mL とした場合に、血清フェリチン高値例は有意に生存期間が短縮していた (Log-rank $p=0.001$)。

D. 考察

IPSS による予後分類は周知されてから十余年を経過しているが、本邦 MDS 症例における検討が不十分であったので、今回あらためて解析をおこなった。OS については Int-2 群と High 群が明瞭に区分できなかったが、これは症例数が十分でなかったことが原因であろう。LFS については 4 群間に有意差が示された。ただし現実問題として、Int-2 と High は区別されずに同等に扱われることが一般的であると思われる。

今回 WPSS による分類も試みたが、WHO 第 3 版による病型分類や輸血情報が必ずしも正確とはいえず、適正な区分に至らなかった。WPSS の有用性は窺えたが、輸血後鉄過剰症の治療の進歩に加えて既に IPSS の改訂作業が国際レベルで進行中であることに鑑みると、今後 WPSS の意義は薄れる可能性が高いといえよう。

貧血および赤血球輸血と生命予後の関連については興味ある結果となった。すなわち比較的 low risk で Hb 濃度 10 g/dL 未満の患者に限定した場合、輸血歴は生命予後に負に働く因子である点である。Hb 濃度 8 g/dL 未満という輸血適応のある症例に絞ると有意差は出なくなったが、輸血依存性貧血患者にとって輸血は生命予後の改善につながらないことが示唆された。現にフェリチン高値が生命予後にとって負

の因子であることが今回の検討でも示された。これらのことから単に貧血の存在というよりは輸血依存性およびフェリチン高値が low risk MDS の生命予後の悪化要因のひとつであり、今後有効な貧血治療薬および除鉄療法が low risk MDS の予後を改善することが期待される。なお今回の検討は概して診断時のワンポイントにおける検査データに基づくものであるため、当然ながら前方向視的な追跡調査が必要であることを付記しておきたい。

E. 結論

本邦 MDS 症例におけるレトロスペクティブ解析によって、IPSS 区分による生存率 (OS と LFS) を算出した。また単に貧血の存在というよりは輸血依存性およびフェリチン高値が low risk MDS の生命予後の悪化要因のひとつであることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

「不応性貧血(骨髄異形成症候群)診療の参照ガイド」に一部掲載予定。

発作性夜間ヘモグロビン尿症における NKG2D 免疫介在性造血障害

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

特発性造血障害は発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）患者の主死因であるが発生機序は不明である。我々は PNH 造血障害が再生不良性貧血と極めて類似していることを 1995 年に報告して以来、両疾患に共有される免疫機序を探索している。そして、NKG2D 陽性リンパ球を活性化する ULBP や MICA/B などの NKG2D リガンドが少なくとも一部の PNH 患者の造血細胞に病的発現し、自己リンパ球による造血細胞傷害を誘発することを報告した。その検証のため臨床経過の前向き解析を進めている。

A. 研究目的

PNH 患者における造血障害の発生に NKG2D 免疫が関与しているかを調べる。

B. 研究方法

PNH と再生不良性貧血の患者における NKG2D リガンド (ULBP や MICA/B) の血球膜発現を経時的 (最長例で 8 年間余) にフローサイトメトリーにて解析し、血球減少 (造血障害の指標) や免疫抑制療法効果との関係を調べた。(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

随時採血で PNH および再生不良性貧血の患者の約 60% に何らかの NKG2D リガンドの血球膜発現が検出された。臨床経過解析ではこれらリガンド発現と汎血球減少と免疫抑制療法効果の間に密接な連動が認められた。

D. 考察

PNH および再生不良性貧血の患者の 6 割に随時採血で血球膜に NKG2D リガンドが検出された。陰性例でも経過観察すると血球減少の出現に一致してリガ

ンドが現れておりリガンド発現患者の割合はもっと多と考えられる。

これらの造血障害患者では NKG2D リガンド発現を誘発する何らかのストレスの存在が示唆される。また、自己リンパ球による NKG2D リガンド発現血球の傷害は造血障害の発生に関与している可能性がある。NKG2D 免疫は新しい治療標的になるか検証が必要である。

E. 結論

PNH と再生不良性貧血の一部では NKG2D 免疫が造血障害の発生に関与していると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

● Hanaoka N, Nakakuma H, Horikawa K, Nagakura S, Tsuzuki Y, Shimanuki M, Kojima K, Yonemura Y, Kawaguchi T.: NKG2D-mediated immunity underlying paroxysmal nocturnal haemoglobinuria and related bone marrow failure syndromes. *Br J Haematol.* 2009;146:538-45.

● Hanaoka N, Jabri B, Dai Z, Ciszewski C, Stevens AM, Yee C, Nakakuma H, Spies T, Groh V.: NKG2D

initiates caspase-mediated CD3z degradation and lymphocyte receptor impairments associated with human cancer and autoimmune disease. J Immunol. 2010; 5732-42.

- 中熊秀喜：発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）
～最新の臨床と研究～。日本検査血液学会雑誌、
2010; 11: 336-43.
- 中熊秀喜：発作性夜間血色素尿症（PNH）。細胞、
2010; 42: 274-7.

2. 学会発表

なし

日本における後天性鉄芽球性貧血の病態

研究協力者 張替秀郎（東北大学大学院医学系研究科 教授）

研究要旨

今回、日本における後天性鉄芽球性貧血の病態を明らかにする目的で、調査研究を行った。その結果、40例のMDS-RARS、68例のMDS-RCMD、9例のRAEBが確認された。MDS以外の後天性鉄芽球性貧血症例はいなかった。各グループ間での平均年齢、ヘモグロビン値に差はなかったが、染色体分析にて、RCMDはRARSと比較してより複雑な核型を呈する傾向にあり、RCMD26例中9例に+8が認められた。今後、より詳細な臨床的、分子遺伝学的解析が必要である。

A. 研究目的

日本における後天性鉄芽球性貧血の病態を明らかにする。

B. 研究方法

日本国内の血液診療施設に対し、調査票を送付し、臨床データを回収し、解析を行った。実施に当たっては、倫理委員会での承認を得た。

C. 研究結果

40例の refractory anemia with ring sideroblasts (MDS-RARS), 68例の refractory cytopenia with multilineage dysplasia (MDS-RCMD)、9例の refractory anemia with excess blasts (RAEB)が確認された。MDS以外の後天性鉄芽球性貧血症例はいなかった。RARSの平均年齢は73才、RCMDの平均年齢は72才であった。RARSのヘモグロビン値は8.7g/dl、RCMDのヘモグロビン値は8.3g/dlであった。染色体分析ではRCMDはRARSと比較してより複雑な核型を呈する傾向にあり、RCMD26例中9例に+8が認められ、1例にidic(X)(q13)が認められた。

D. 考察

idic(X)(q13)は遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子であるABC7の染色体座に関連する染色体異常で、鉄芽球形成に関与している可能性がある。また、+8が高頻度に認められたことから、第8染色体上に鉄芽球性貧血発症に関連付けられる遺伝子異常が存在する可能性が示唆される。

E. 結論

日本における後天性鉄芽球性貧血ではMDS-RCMDが最も多い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

● Ohba R, Furuyama K, Tsuchiya S, Manabe A, Ito E, Kojima S, Ozawa K, Harigae H. Epidemiological and Genetic Analysis of Sideroblastic Anemia --- Multicenter Study In Japan Poster Session, Board #1004-III: The American Society of Hematology 52th Annual Meeting, December 4-7, 2010. Orlando, Florida, USA

「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

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

2004年3月から2010年2月に登録された「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例105例（登録施設診断 再生不良性貧血（AA）：64例、骨髄異形成症候群（MDS）：37例、診断不能：4例）により、骨髄検査の実態と登録施設診断と中央診断の診断一致率を調査した。骨髄生検は105例中66例（63%）〔登録施設診断 AA 51例（80%）、MDS 12例（32%）、診断不能 3例（75%）〕に実施された。骨髄穿刺の第一選択部位が腸骨であったのは、102例中63例（62%）であったが、日本血液学会の「成人に対する骨髄穿刺の穿刺部位に関する注意」の通達後は、1例を除き第一選択部位は腸骨となった。登録施設診断と中央診断のどちらかが、診断不能とした例（診断保留例）は11.1%であった。診断保留例を除いた例での、登録施設診断と中央診断のAA、ICUS、MDS（FAB分類を問わず）の診断一致率は92.9%であった。中央診断がMDS例であった例での、2名の検鏡者間のWHO分類（第4版）の病型分類の診断一致は93.9%であった。

A. 研究目的

造血不全の診断における骨髄検査の実態と形態学的診断の一致率を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

「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例により、診断に実施された骨髄検査の実態を調査した。中央診断は2名（AMとKT）が別々に検鏡し、登録施設診断、AM、KTのいずれかの診断に不一致があった場合は、共同検鏡により中央診断を確定した。登録施設の診断と中央診断の一致率、検鏡者間の診断一致率を検討した。

（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

2004年3月から2010年2月の期間に17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例は105例（登録施設診断 再生不良性貧血（AA）：64例、骨髄異形成症候群（MDS）：37例、診断不能：4例）であった。

1. 骨髄検査

1) 骨髄生検

骨髄生検は105例中66例（63%）〔登録施設診断 AA 51例（80%）、MDS 12例（32%）、診断不能 3例（75%）〕に実施された。

2) 骨髄穿刺

検査部位が明らかな102例のうち53例は、腸骨での検査のみ（骨髄穿刺のみ、または骨髄穿刺＋骨髄生検）で診断された〔登録施設診断 AA 27/62例（44%）、MDS 23/36例（64%）、診断不能 3/4例（75%）〕

であった。骨髄穿刺が1回のみの場合、選択された部位は腸骨が多く(64%)、骨髄穿刺が複数回行われた場合には、胸骨でも行われることが多かった(69%)。骨髄穿刺の第一選択部位が腸骨であったのは、102例中63例(62%)であった。平成21年6月4日付で、日本血液学会から「成人に対する骨髄穿刺の穿刺部位に関する注意」が通達され、その中で、骨髄穿刺の第一選択部位が後腸骨稜であることが示された。通達後の骨髄穿刺の第一選択部位は1例を除き、腸骨であった。

2. 診断一致率

現行のセントラルレビューシステムに変更後の63例を対象として検討した。

1) 登録施設診断と中央診断でのAA、ICUS、MDS (FAB分類を問わず)の診断一致率

登録施設診断と中央診断が一致したのは52例であった。不一致例は4例認められた。登録施設診断と中央診断のどちらかが、診断不能とした例(診断保留例)は7例(11.1%)であった。診断保留例を除く診断一致率は92.9%であった。複数回の骨髄穿刺が行われた36例では診断の不一致はなかった。施設診断と中央診断とが一致しなかった理由の主たる原因は、細胞数が少なく異形成の評価ができないことであった。

2) 中央診断がMDS例での検鏡間でのWHO分類(第4版)の病型分類の診断一致率

中央診断がMDS例となった33例での、WHO分類(第4版)の病型分類の診断一致は31例(93.9%)で、不一致は2例であった。不一致はRCUDとRCMDの不一致が1例、RCMDとCMMLの不一致が1例であった。

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とされる。前回の調査では約1/4の症例で骨髄生

検は実施されていなかったが、今回の調査でも約1/3の症例では骨髄生検は実施されていなかった。特に登録施設診断がMDSでの実施率は32%と、前回と同様に低率であった。低形成MDSの診断とMDSの予後不良因子であるabnormal localization of immature precursors (ALIP)、CD34陽性細胞の集塊、骨髄の線維化の有無の評価に問題を生じると思われた。安全面への配慮により、骨髄穿刺の第一選択部位は腸骨とすべきという通達は浸透していると思われた。

登録例の約10%は診断が困難な例であった。複数回の骨髄穿刺が行われた例での診断の不一致はなかったことより、診断が難しい例では複数回の骨髄穿刺を行うべきと考えられた。MD アンダーソンがんセンターと他施設でのWHO分類第3版の病型分類の一致率は70-80%であるのに対し、本システムの検鏡者間の病型分類一致率は約93.9%と高率であった。

E. 結論

MDSでの骨髄生検の実施率は32%にすぎないこと、骨髄穿刺の第一選択部位は腸骨とすべきという通達が浸透していること、約10%の例は診断が困難であること、複数回の骨髄穿刺が診断に有用であること、本システムの検鏡間でのMDSの病型一致率が高率であることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

● 該当なし

2. 学会発表

● 荒関かやの、松田晃、通山薫、石川隆之、陣内逸郎、朝長万左男、別所正美、中尾眞二、内山卓、小峰光博、小澤敬也：「特発性造血障害に関する調査研究班」のセントラルレビュー対象症例による骨髄検査の実態調査；第72回日本血液学会学術集会、2010年9月24日～26日、横浜。

進行性骨髄異形成症候群の標準的治療法の確立に関する研究

研究協力者 松村 到 (近畿大学血液内科 教授)

研究要旨

難治性急性白血病の一群である高リスク骨髄異形成症候群(MDS)および MDS から移行した AML(MDS-AML)の標準的治療法の確立を目指し、新規プロトコールの立案を行った。WHO 分類による、高リスク MDS ならびに MDS から移行した急性白血病の予後に関して、化学療法、造血幹細胞移植およびその他の臨床的な要因を検討することを目的とした、大規模臨床コホート研究 (MDS206)と、IDR+Ara-C 療法に G-CSF priming を用いた第Ⅱ相試験(MDS206G)を計画した。

【MDS206—コホート研究—】

A. 研究目的

多施設共同による高リスク骨髄異形成症候群 (以下 MDS) 及び MDS/AML (MDS から移行した AML) 患者に関する化学療法・造血幹細胞移植・その他の臨床的な要因を検討することを目的としたコホート研究を行う。対象患者を同胞あるいは非血縁 HLA 一致造血幹細胞移植ドナーの有無によって natural randomization を行い、臍帯血移植を除く同種造血幹細胞移植が予後に与える影響について比較検討を行う。また寛解導入療法実施状況、寛解状態、移植や移植前処置の種類等が予後に影響を与える要因であるかどうか調査する。

B. 研究方法

(対象症例)

年齢 15 歳以上の、WHO 分類での RAEB-II あるいは MDS/AML (MDS から移行した AML) 未治療で、インフォームド・コンセントが得られている症例を対象とする。

(症例の登録)

患者の同意を得た後、JALSG 事務局へのコンピューターによる症例登録を行う。コンピューターによ

り自動的に登録番号が割り振られる。登録と同時に施設名と登録番号が、電子メールにより研究事務局に送られる。施設の研究責任医師又は担当医師は、付与された登録番号を保管する。本研究登録の為に、各施設の倫理委員会等の承認を得ておく必要がある。

(治療方法)

1. 寛解導入療法
2. 地固め療法
3. 維持強化療法
4. 支持療法

以上の治療方法は全て各施設の方針に則る。但し、65 歳未満で同意がとれた患者に関しては、MDS206G (第Ⅱ相試験) に参加する。

(検査・観察項目)

1. 登録時の検査項目

末梢血検査 (白血球数、白血球分画、赤血球数、Hb、Ht、血小板数、網赤血球数)

- ・生化学検査
- ・凝固検査
- ・血清学的検査 (CRP、各種感染症)
- ・骨髄検査、骨髄染色体検査(WHO 分類の central review)

- ・腫瘍細胞表面形質検査
- ・検尿
- ・胸部レントゲン
- ・ECG
- ・performance status (ECOG)

2. 同種造血幹細胞移植ドナー候補検査

本研究開始後、移植意志がある患者においては、できるだけ速やかに、同胞あるいは非血縁ドナー候補の検索を行い、その結果を症例報告書に記録する。

3. 寛解導入療法実施後

- ・寛解導入療法実施内容（実施の有無）
- ・抗腫瘍効果と有害事象（CTCAE 共通毒性基準）

4. 同種造血幹細胞移植実施後

同種造血幹細胞移植を実施した患者においては移植実施後血液学的回復が認められた時点で、以下の項目について調査を行い、その結果を症例報告書に記録する。

- ・患者背景（移植前 PS、年齢、移植時病期、幹細胞源、ドナーとの関係、移植時合併症の有無）
- ・同種造血幹細胞移植実施内容（移植時骨髄所見、移植前処置、薬剤名、投与経路、投与量、投与期間、放射線照射の有無及びその内容、移植細胞に対する処置、免疫抑制剤、移植細胞数、移植実施日、血液学的回復日、急性 GVHD および慢性 GVHD 発現状況と内容
- ・有害事象（CTCAE 共通毒性基準）

5. 観察期間

本研究登録後 2 年間に観察期間とし、1 年毎に調査を行い、その結果を症例報告書に記録する。

- ・再発の有無
- ・生存・死亡の転帰
(評価)

1. 統計学的解析方法

観察研究の後ろ向き探索的解析であるが、便宜上、前向き無作為割付試験に類似の症例数算定を行う。

統計解析ならびその解釈は本算定基準に必ずしも縛られるものではない。65 歳未満の MDS 患者において HLA 一致ドナーが存在し、実際に移植を受けた場合の 5 年全生存率は 48.8%、存在しない場合の 5 年全生存率は 10%と報告されている。移植の実施を考慮しない場合の HLA 一致ドナーが存在する場合の 5 年全生存率に関する一般的な推計値は無いが、仮に 35%とする。また、65 歳未満で、移植意志ありの患者割合を 70%、そのうち HLA 一致ドナーが存在する確率は 25%が見込まれると仮定する。以上のような背景に基づき、登録年数 3 年、登録終了後の観察年数を 2 年、HLA 一致ドナーが存在する場合の 5 年全生存率を 35%、存在しない場合の 5 年全生存率を 10%（ハザード比=2.19 相当）、両側 $\alpha=0.05$ 、 $\beta=0.2$ と設定し、SWOG の 2 アームの生存に対する症例数算定方法を適応すると必要な 65 歳未満で移植を希望する症例の数は 136 名と算定される。移植を希望しない 65 歳未満の患者を考慮し、さらには、全 MDS 対象患者の中における 65 歳未満者の割合を 60%とすると、必要な MDS 患者の総数は 227 名が必要と算定される。約 1 割の不適格者を見込んで 250 名の症例数がコホート全体として必要となる。観察研究の特性上、総観察人年の増加は探索的解析の統計学的検出力の増大につながるため、必要に応じて観察期間の延長ならびに対象者人数の再設定を行うことも念頭に入れる。

3. 予定症例数と研究期間

予定症例数は 250 例とする。当初、予定症例登録期間を 3 年間としていたが、5 年間に延長した。

(倫理面への配慮)

本プロトコルは、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。

C. 研究結果

平成 18 年 4 月から試験を開始しており、平成 23 年 2 月中旬現在で、106 例の登録がある。

D. 考察

E. 結論

平成 23 年 3 月末で症例登録を終了し、解析を行う予定である。

F. 健康危機情報

本研究はコホート研究であり、健康被害が生じる可能性はないと考える。

G. 研究発表

MDS206G の同項目にまとめて記載。

【MDS206G—第Ⅱ相試験】

A. 研究目的

高リスク MDS 及び MDS/AML を対象として、Idarubicin (IDR) +Cytarabine (Ara-C)による併用療法に G-CSF (レノグラスチム) を同時併用する priming 療法の有効性、安全性を検討し、MDS に対してより有用な化学療法の開発、更には今後対象患者における標準的治療の確立に向けた研究を行う際の基準となる成績を得ることを目的とする。また、本臨床試験登録例を本臨床試験と共に実施する MDS206 コホート研究の対象症例とする。

B. 研究方法

(対象症例)

年齢 15 歳以上の、WHO 分類での RAEB-II あるいは MDS/AML と診断され、PS が 0 から 2 で、主要臓器の機能が十分保持されている、インフォームド・コンセントが得られている未治療症例を対象とする。
(症例の登録)

患者の同意 (Informed Consent: IC) を得た後、JALSG 事務局へのコンピューターによる症例登録を行う。コンピューターにより自動的に登録番号が割り振られる。登録と同時に施設名と登録番号が、電子メールにより研究事務局に送られる。施設の研究責任医師又は担当医師は、付与された登録番号を保管する。登録後、研究事務局から、患者体重から算出された G-CSF (ノイトロジン®) を送付する。

(治療方法)

1. 寛解導入療法

G-CSF priming 療法

化学療法前日に G-CSF (5 \square g/kg)を投与し、翌日から Ara-C (100mg/m²)を 7 日間持続点滴投与および IDR (12mg/m²)を 3 日間点滴投与する。ただし、①年齢(≥60)②骨髓低形成③PS の 3 つのリスクファクターによる減量計画を実施する。

2. 地固め療法 (G-CSF priming しない)

<地固め 1 コース>

Ara-C (200mg/m²)を 5 日間持続点滴投与および MIT(7mg/m²)を 3 日間点滴投与する。

<地固め 2 コース>

BHAC (200mg/m²)を 7 日間点滴投与、ETP(100mg/m²)を 5 日間点滴投与、DNR(50mg/m²)を 3 日間点滴投与および 6MP(70mg/m²)を 7 日間経口投与する。

<地固め 3 コース>

BHAC (200mg/m²)を 7 日間点滴投与、ACR(14mg/m²)を 7 日間点滴投与する。

3. 維持強化療法 (G-CSF priming しない)

維持強化療法は6コースからなり、2ヶ月毎に実施する。減量を行った症例は、維持強化療法でも同様に、減量を行う。

<維持強化1コース>

BHAC (170mg/m²)を5日間点滴投与、DNR(30mg/m²)を2日間点滴投与および6MP(70mg/m²)を7日間経口投与する。

<維持強化2コース>

BHAC (170mg/m²)を5日間点滴投与およびMIT(5mg/m²)を2日間経口投与する。

<維持強化3コース>

BHAC (170mg/m²)を5日間点滴投与、ETP(80mg/m²)を3日間点滴投与およびVDS(2mg/m²)を2日間点滴投与する。

<維持強化4コース>

BHAC (170mg/m²)を5日間点滴投与、ACR(14mg/m²)を4日間点滴投与および6MP(70mg/m²)を7日間経口投与する。

<維持強化5コース>

BHAC (170mg/m²)を5日間点滴投与、DNR(30mg/m²)を2日間点滴投与および6MP(70mg/m²)を7日間経口投与する。

<維持強化6コース>

BHAC (170mg/m²)を5日間点滴投与、ETP(80mg/m²)を3日間点滴投与およびVDS(2mg/m²)を2日間点滴投与する。

4. 支持療法

- 1)治療前から消化管滅菌をはかる
- 2)監視培養を行い、適切な抗生物質投与を行うが、有効で無い場合は、抗真菌剤の投与も考慮する。
- 3)治療中は中心静脈下にルートを取り、十分な補液と利尿を確保する。
- 4)頻回の血小板および赤血球輸血には放射線照射を行い、かつ白血球除去フィルターを用いる。
- 5)化学療法後に好中球減少を来し、感染症を合併

した場合、G-CSFを用いる。但し、芽球が増加すれば、中止する。

(検査・観察項目)

1. 治療前の検査項目

- ・末梢血検査 (白血球数、白血球分画、赤血球数、Hb、Ht、血小板数、網赤血球数)
- ・生化学検査
- ・凝固検査
- ・血清学的検査 (CRP、各種感染症)
- ・骨髄検査、骨髄染色体検査
- ・腫瘍細胞表面形質検査
- ・検尿
- ・胸部レントゲン
- ・ECG
- ・performance status (ECOG)

2. 治療中および治療後の観察項目

- ・CTCAE 共通毒性の判定基準各項
- ・治療前の検査および観察項目

3. FAB分類の central review

(効果判定)

1. 効果判定基準

JALSG 効果判定基準に従い、同時に CR duration も算定する。

2. 副作用判定基準

CTCAE 共通毒性基準を用いて、評価する。

(評価)

1. 解析方法

IDA + Ara-C に G-CSF (レノグラスチム) を同時併用することにより、抗白血病効果増強の可能性の有無を検討するために、完全寛解率の算出を行う。

寛解導入療法施行患者として第一段階 17 例、第二段階 41 例を目標とする。

なお第一段階の 17 例評価を行った時点で、8 例以上に完全寛解が確認されれば第二段階まで症例を集積し、41 例評価を行った時点で、22 例以上に完全寛解

が確認されれば、本治療法を有用と判断することとする。

2. 統計学的検討

ドイツのグループが MDS、高リスク AML を対象に IDA+Ara-C+VP-16 による寛解導入療法で完全寛解率 45%と報告している。また同様な対象患者に対して、この寛解導入療法に G-CSF を同時併用し priming 療法を施行した時の完全寛解率が 62%であったと報告している。以上のような背景から RAEB-II、MDS/AML 症例を対象とした IDA+Ara-C による寛解導入療法に G-CSF を同時併用する priming 療法の期待完全寛解率を 60%、閾値完全寛解率を 40%、片側 $\alpha=0.05$ 、 $\beta=0.2$ と設定し Simon の minimax two-stage design により症例数算定を行った結果、第一段階 17 例、第二段階 41 例と設定した。

3. 予定症例数と研究期間

第一段階 17 例、第二段階 41 例を目標とする。当初、予定症例登録期間を 3 年間としていたが、5 年間に延長した。

(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。

C. 研究結果

平成 18 年 4 月から試験を開始しており、平成 23 年 2 月中旬現在で、28 例の登録がある。17 例登録時の中間解析では、年齢中央値が 55 歳で、RAEB-II 10 例、MDS/AML 7 例であった。17 例登録のうち、完全寛解例は 10 例 (寛解率 58.8%) であり、試験の継続に影響を与える有害事象を認めなかった。

D. 考察

中間解析では、安全に試験が実施されていると判断した。

E. 結論

平成 23 年 3 月末で症例登録を終了し、最終解析を行う予定である。

F. 健康危機情報

現在のところ、試験継続に影響を与えるような、健康被害は起こっていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 松村 到、金倉 譲

骨髄由来細胞による癌転移の促進

Annual Review 血液 2010

2. 松村 到、金倉 譲

白血病・リンパ腫・骨髄腫の实地診療へのアプローチ その 1 实地治療はここまで進んだ-進歩と指針- 白血病「治癒」あるいは「維持」に向けて

Medical Practice vol.27 no.2 2010

3. 松村 到、金倉 譲

慢性骨髄性白血病,BCR-ABL1 陽性

WHO 血液腫瘍分類~WHO 分類 2008

をうまく活用するために~ 2010

4. 松村 到

急性白血病への移行

臨床検査 Vol.54 No.3 2010

5. 松村 到

新薬など進歩著しい急性骨髄性白血病

- の最新治療
がんサポート Vol.82 2010
6. 松村 到、金倉 謙
二次性 AML の分子異常と治療戦略
血液・腫瘍科 Vol.60 No.4 2010
7. 嶋田高広、松村 到
骨髄系腫瘍における TET2 遺伝子変異
血液・腫瘍科 Vol.60 No.6 2010
8. 森田泰慶、松村 到
白血病治療における最近の薬物療法の
進歩
Medical Science Digest Vol.36(7)
2010
9. 松村 到
慢性骨髄性白血病の治療戦略
BIO Clinica 25(7) 2010
10. 川西一信、松村 到
白血病における新規分子標的治療薬
内科 第106巻 第2号 2010
11. 松村 到、金倉 謙
急性白血病
疾病と治療 II 2010
12. 松村 到
CML 治療の現状と展望
細胞 42(14) 2010
13. Itaru Matumura
Pathogenetic and clinical significance
of genetic abnormalities in acute mye
loid leukemia
Acta Med Kinki Univ Vol.35 No.2
2010
14. 宮武淳一、松村 到
ファルネシル転移酵素阻害薬
血液フロンティア Vol.20 S-1 2010
15. 頼 晋也、松村 到
イマチニブで治療中の慢性期 CML 患者
.ELN の基準で suboptimal response で
ある.今後の治療をどうしよう？
造血器腫瘍治療 2版 2010
16. 山口晃史、松村 到
がん性疼痛における造血因子の役割
Annual Review 血液 2011

ファンコニ貧血(FA)と Translesion DNA synthesis (TLS)ポリメラーゼ

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

FA 患者の細胞は DNA 架橋剤への高感受性を特徴とする。最近、FA 蛋白群が TLS ポリメラーゼと協同して DNA 複製ストレスに対処する機構が注目されている。そこで私達は、代表的 TLS ポリメラーゼのひとつである REV1 の調節機構に焦点を当て研究を行い、その制御因子として Hsp90 を同定した。今後、造血細胞の DNA 複製における FA 分子経路と TLS ポリメラーゼの役割をさらに解明することが重要と考えられる。

A. 研究目的

FA 分子経路と TLS が相互作用しつつ円滑かつ安定な DNA 複製を行う機構が注目されている。TLS は特定の DNA ポリメラーゼが損傷部位を乗り越えて DNA 合成を行うことであり、DNA 損傷への耐性や変異の導入に関与する。本研究では、代表的な TLS ポリメラーゼである REV1 の制御機構の解明を目的とした。

B. 研究方法

ヒト培養細胞に安定的に発現させた REV1 あるいは内因性 REV1 を対象に、Hsp90 との結合や、Hsp90 阻害剤が蛋白の安定性、細胞内局在、相互作用、TLS 機能に与える影響を解析した。

C. 研究結果

Hsp90 は REV1 に特異的に結合し、その安定性の促進と構造制御を介して、DNA 損傷部位への REV1 の動員を促進することが判った。これに一致して、Hsp90 を阻害すると REV1 による TLS が抑制された。

D. 考察

REV1 の制御因子として Hsp90 を同定した。一方、DNA 修復において TLS ポリメラーゼと FA 蛋白が共

同して作用することが示唆されているが、そのメカニズムは明らかではない。FA の病態を解明するために、さらなる解析が重要と考えられる。

E. 結論

Hsp90 は REV1 の安定性と DNA 損傷部位への動員を制御し、TLS 活性を促進する。

F. 研究発表

1. 論文発表

● Mayca Pozo F, Oda T, Sekimoto T, Murakumo Y, Masutani C, Hanaoka F, Yamashita T: Molecular chaperone Hsp90 regulates REV1-mediated mutagenesis. *Mol Cell Biol* (in press)

2. 学会発表

● 山下孝之: 「がんシャペロン」 Hsp90 は DNA ポリメラーゼ η による損傷乗り越え DNA 合成を促進する; 第 69 回日本癌学会総会, 2010 年 9 月 22 日, 大阪

IV. 班會議關係資料

資料 2. 班會議議事録

平成 22 年度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班

および

重点研究：不応性貧血の治癒率向上を目指した分子・免疫病態研究班

平成 22 年度 第 1 回合同班員会議 議事録

日時：平成 22 年 7 月 30 日（金）9:30～12:00

場所：アステラス製薬本社 313 会議室

〒103-8411 東京都中央区日本橋本町 2-3-11

《参加者》

小澤、小川、三谷、赤司、石川、高折、岡本、金倉、西村、黒川、澤田、中尾、中畑
宮崎、村手、杉田、亀崎、小島、鈴木、吉田（小澤班事務局）、上田（小川班事務局）、池内（小川班事務局）

＜報告事項＞

小澤班長からの開会の挨拶に引き続き、先日逝去された内山 卓先生の御功績を偲び、黙祷を行った。

その後、小澤班長より配付資料を用いて昨年度の事業報告および本年度の事業計画について報告が行われた。

そして、本年度より合同班会議を行うこととなった、重点研究「不応性貧血の治癒率向上を目指した分子・免疫病態研究」の研究代表者である小川誠司先生が挨拶を行った。また、内山先生の後任として着任された京都大学血液・腫瘍内科 高折晃史先生より挨拶があった。

＜審議事項＞

●再生不良性貧血領域

疫学班(杉田先生)：

臨床調査個人票の改訂最終案をまとめた。内容は今回の班会議総会で提示して特に問題がないようであれば、厚生労働省に提出する予定である。本班の動きに呼応して他の難病班でも調査票の改訂を計画しているところがある。実際の改訂時期はこれらの動きを考慮して決められるかもしれない。

中尾先生： 最近パピルスで調査票を作成する病院も多いため、改訂は一斉に行うのが良いかもしれません。

中尾先生：

診療ガイドの改定では、①診断基準への好中球数の記載、②ATG 療法の適応についての記載変更、③移植前処置について主に記載を変更した。

研究については、巨核球増加を伴わない症例での PNH 血球と予後についての研究を継続したい。また、ATG 至適量決定のための国際共同無作為割り付け臨床試験の準備を進めており、これに関連して日本に再生不良性貧血研究会を作りたいと考えている。

小澤班長： 今回の改訂では診療ガイドの大きな流れは変わらないということで良いですか。

中尾先生： 大体そうですが、免疫抑制療法は施行が遅れると奏効率が低下するた