

D. 考察

血小板減少症の約2%に家族性が認められ親族に白血病発症がある。いわゆる特発性血小板減少性紫斑病（ITP）の中に、RUNX1遺伝子変異症例が含まれている可能性がある。

E. 結論

詳細な遺伝子検索により、3家系の状況を把握するとともに、ITPの多様性を検討し対策を立てる。

F. 研究発表

1. 論文発表

初年度なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働省科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

分担研究報告書

家族性血小板異常症に関する調査研究

研究分担者 白杵憲祐 NTT 東日本関東病院血液内科部長

研究要旨

家族性血小板異常症(FPD)の臨床像の詳細を明らかにするために、過去の診療録や現在診療中の症例から疑わしい症例を検索した。その結果、FPD が疑われる 1 症例と 1 家系 (2 症例) を見いだした。1 例は 24 年間の ITP の病歴の後に化学療法抵抗性の AML に移行した例であった。1 家系は 15 年程度の病歴の ITP の父娘の症例であった。今後、可能であれば遺伝子解析によって診断を進めて行きたい。

A. 研究目的

家族性血小板異常症(FPD)は常染色体優性遺伝形式をとり、高率に急性骨髄性白血病(AML)や骨髄異形成症候群(MDS)などを発症する疾患である。これまでに 20 家系が報告されている極めて稀な疾患で、その臨床像の詳細は明らかにされていない。そこで、FPD の臨床像を明らかにするために、過去の診療例や現在診療中の症例から疑わしい症例を見つけだし、遺伝子解析によって確定診断し、臨床データを蓄積することを目的とする。

B. 研究方法

2008 年 1 月から 2011 年 2 月までの間に当科で新たに特発性血小板減少性紫斑病(ITP)と診断した症例において、診療録の家族歴から FPD の疑われる症例を調べた。また、2010 年 11 月から 2011 年 2 月の間、当科の外来に受診した ITP の症例の問診において、家族歴から FPD の疑われる症例を調べた。1993 年から 2011 年の間の急性白血病症例で、ITP の既往のある症例を診療録から調べた。また、FPD が疑われる ITP を、診療

録をもとに調べた。

C. 研究結果

2008年1月から2011年2月までの間に当科で新たに診断されたITPは37例あり、そのうちITPや白血病、リンパ腫などの家族歴を有する例はなかった。また、2010年11月から2011年2月の間、当科の外来に受診したITPの症例の問診において、家族歴からFPDの疑われる症例はなかった。1993年から2011年の間に当科で診療した363例の急性白血病の症例のうち、ITPからAMLに移行した例を1例、認めた。また、家族内でITPが多発する1家系を見いだした。

症例1：ITPからAMLに移行した1例である。1979年(36才)よりITPで無治療で血小板数6-8万/ μ Lで推移していた。2003年2月頃より血小板数は6万/ μ L以下、白血球減少(好中球絶対数1000/ μ L以下)となり、2003年12月(60才)白血球1900/ μ L、好中球絶対数542/ μ L、ヘモグロビン濃度9.8g/dL、血小板3.1万/ μ L、骨髄では有核細胞数1.2万/ μ L、芽球56%からAML(低形成性白血病)と診断された。2004年1月からCAG療法を開始し、2コースで完全寛解に到達、以後、キロサイト大量療法などの寛解後療法を行なった。しかし、地固め療法3コース終了後に骨髄抑制が遷延し、2005年4月に末梢血芽球4%で再発、再寛解導入療法を行なったが寛解に到達せず、

他院にて臍帯血移植を行なったが、抵抗性で永眠された。

症例2：家族内でITPが多発する1家系の発端者である。現在、57才の男性症例。1996年11月(42才)に紫斑に気づき受診、血小板6.3万/ μ Lであり、骨髄穿刺検査の結果、ITPと診断された。その後、無治療で血小板数は5-10万/ μ Lを推移している。2011年1月現在、血小板数5.6万/ μ L、IPF 9.4%である。1人の配偶者との間に2人の娘があり、長女31才は健康、次女29才はITPである。その他、本人の弟51才健康で健在、両親は父親は肺癌、母親は認知症・肺炎で死亡されている。

症例3：発端者の次女29才である。ITPにて他院小児科に通院していたが、1997年4月(15才)に当科に初診、血小板数3.4万/ μ Lで、以後、無治療で血小板2-6万/ μ Lを推移していた。2007年11月に転勤のために転居して以後、通院していない。父親を通して連絡をとって血液内科受診を勧め、熊本大学血液内科に受診、通院を再開している。

D. 考察

これまでの診療録の調査からFPDが疑われる1症例と1家系を見いだした。症例1は24年間のITPの病歴の後に化学療法抵抗性のAMLに移行した例である。FPDは高率にAMLやMDSなどを発症し、その

AML 移行例は多くの場合には通常の化学療法で治癒が望めないが、その特徴に症例 1 は合致している。そこで、FPD であった可能性が高いと考えられる。今後、骨髓スミア標本からの遺伝子解析が、手技的かつ倫理的に可能であるかを検討し、可能であれば解析を進めて行きたい。

症例 2 と 3 の FPD が疑われる 1 家系では、血小板減少症の罹病期間が 15 年程度と比較的長い。白血球などの造血器腫瘍を発症していない。FPD における IPF 値の報告はないが、症例 2 では IPF 9.4% を呈する典型的な ITP であり、FPD とは異なる可能性も考えられる。症例 2 は遺伝子解析を希望しており、可能であれば本家系の遺伝子解析を進めて行きたい。

E. 結論

診療録の調査から、FPD が疑われる 1 症例と 1 家系 (2 症例) を見いだした。1 例は 24 年間の ITP の病歴の後に化学療法抵抗性の AML に移行した例である。1 家系は 15 年程度の病歴の ITP の父娘の症例である。今後、可能であれば遺伝子解析によって診断を進めて行きたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Nakasone H, Ito A, Endo H, Kida M, Koji I, Usuki K. Pancreatic atrophy is associated

with gastrointestinal chronic GVHD following allogeneic PBSC transplantation. Bone Marrow Transplantation 2010, 45: 590-592

- Kurosawa S, Yamaguchi T, Miyawaki S, Uchida N, Sakura T, Kanamori H, Usuki K, Yamashita T, Okoshi Y, Shibayama H, Nakamae H, Mawatari M, Hatanaka K, Sunami K, Shimoyama M, Fujishima N, Maeda Y, Miura I, Takaue Y, Fukuda T. Prognostic factors and outcomes of adult patients with acute myeloid leukemia after first relapse. Haematologica. 2010, 95: 1857-64.
- Ohmachi K, Ando K, Ogura M, Uchida T, Itoh K, Kubota N, Ishizawa K, Yamamoto J, Watanabe T, Uike N, Choi I, Terui Y, Usuki K, Nagai H, Uoshima N, Tobinai K; The Japanese Bendamustine Lymphoma Study Group. Multicenter phase II study of bendamustine for relapsed or refractory indolent B-cell non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma. Cancer Sci. 2010, 101: 2059-2064.
- Oshima K, Takahashi T, Mori T, Matsuyama T, Usuki K, Asano-Mori Y, Nakahara F, Okamoto S, Kurokawa M, Kanda Y. One-year low-dose valacyclovir as prophylaxis for varicella zoster virus disease after allogeneic hematopoietic stem cell

- transplantation. A prospective study of the Japan Hematology and Oncology Clinical Study Group. *Transpl Infect Dis.* 2010, 12: 421-7.
- Nakasone H, Kanda Y, Takasaki H, Nakaseko C, Sakura T, Fujisawa S, Yokota A, Yano S, Usuki K, Maruta A, Abe D, Hoshino T, Takahashi S, Kanamori H, Okamoto S; Kanto Study Group for Cell Therapy. Prophylactic impact of imatinib administration after allogeneic stem cell transplantation on the incidence and severity of chronic graft versus host disease in patients with Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Leukemia.* 2010, 24: 1236-9.
 - Kurosawa S, Yamaguchi T, Uchida N, Miyawaki S, Usuki K, Watanabe M, Yamashita T, Kanamori H, Tomiyama J, Nawa Y, Yano S, Takeuchi J, Yakushiji K, Sano F, Uoshima N, Yano T, Nannya Y, Moriuchi Y, Miura I, Takaue Y, Fukuda T. Comparison of allogeneic hematopoietic cell transplantation and chemotherapy in elderly patients with non-m3 acute myelogenous leukemia in first complete remission. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011, 17: 401-11.
 - Nakagawa Y, Suzuki K, Hirose T, Chou T, Fujisawa S, Kida M, Usuki K, Ishida Y, Taniguchi S, Kouzai Y, Tomoyasu S, Miyazaki K, Higashihara M, Ando K, Aoki S, Arai A, Akiyama N, Hatake K, Okamoto S, Dan K, Ohyashiki K, Urabe A. Clinical efficacy and safety of biapenem for febrile neutropenia in patients with underlying hematopoietic diseases: a multi-institutional study. *J Infect Chemother.* 2011, 17: 58-67.
 - Kurosawa S, Yamaguchi T, Miyawaki S, Uchida N, Kanamori H, Usuki K, Yamashita T, Watanabe M, Yakushiji K, Yano S, Nawa Y, Taguchi J, Takeuchi J, Tomiyama J, Nakamura Y, Miura I, Kanda Y, Takaue Y, Fukuda T. A Markov decision analysis of allogeneic hematopoietic cell transplantation versus chemotherapy in patients with acute myeloid leukemia in first remission. *Blood.* 2011, 17; 117(7):2113-2120.
2. 学会発表
- 伊藤歩、半下石明、杉元理子、森岡健彦、木田理子、臼杵憲祐、再生不良性貧血における血清フェリチン値の免疫抑制療法に対する治療反応予測因子としての意義、第34回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会、平成22年9月11-12日、第34回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会プログラム・抄録集 47頁、2010年
 - 半下石明、伊藤歩、木田理子、臼杵憲祐、急性骨髄性白血病の治療成績と診断時血

- 清フェリチン値との相関、第34回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会、平成22年9月11-12日、東京国際フォーラム 第34回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会プログラム・抄録集 48頁、2010年
- Akira Hangaishi, Ayumu Ito, Michiko Kida, Kensuke Usuki. The association between ferritin level at diagnosis and outcome in de novo acute myeloid leukemia.
平成22年度、第72回日本血液学会学術集会、臨床血液 51(9); OS-1-61, 2010.
 - Ayumu Ito, Akira Hangaishi, Masako Sugimoto, Takehiko Morioka, Michiko Kida, Kensuke Usuki. Elevated ferritin predicts response to immunosuppressive therapy in patients with aplastic anemia.
平成22年度、第72回日本血液学会学術集会、臨床血液 51(9); OS-2-26, 2010.
 - Kenichi Ishizawa, Joji Yamamoto, Kiyoshi Ando, Ken Ohmachi, Michinori Ogura, Toshiki Uchida, Kuniaki Itoh, Nobuko Kubota, Takashi Watanabe, Naokuni Uike, Ilseung Choi, Yasuhito Terui, Kensuke Usuki, Hirokazu Nagai, Nobuhiko Uoshima, Kensei Tobinai. Phase 2 Study of Bendamustine for Relapsed or Refractory Indolent B-NHL and Mantle Cell Lymphoma
平成22年度、第72回日本血液学会学術集会、臨床血液 51(9); OS-2-172, 2010.
 - Takaaki Ono, Syuuichi Miyawaki, Fumihiko Kimura, Heiwa Kanamori, Shigeki Ohtake, Kunio Kitamura, Hiroyuki Fujita, Isamu Sugiura, Keusuki Usuki, Nobuhiko Emi, Shigehisa Tamaki, Yasutaka Aoyama, Hiroyasu Kaya, Tomoki Naoe, Kenichi Tadokoro, Toshikazu Yamaguchi, Kazunori Ohnishi, Ryuzo Ohno. The analysis of BCR-ABL1 mutations in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemia.
平成22年度、第72回日本血液学会学術集会、臨床血液 51(9); OS-3-2, 2010.
 - Kazuma Ohyashiki, Kensuke Usuki, Arinobu Tojo, Yasuhiro Maeda, Tatuya Kawaguchi, Akira Matsuda, Yukio Kobayashi, Koichi Miyamura, Akirou Kimura, Yasushi Miyazaki, Taro Amagasaki, Eiji Kawahara, Aira Wanajo, Tomoki Naoe. 36-month follow-up of a phase I/II study of nilotinib for imatinib-resistant or -intolerant CML-CP.
平成22年度、第72回日本血液学会学術集会、臨床血液 51(9); OS-3-29, 2010.
 - Yasuhito Nannya, Mineo Kurokawa, Yasunori Ueda, Jin Takeuchi, Hideto Tamura, Koyoyuki Ogata, Hirohiko Shibayama, Keiko Niimi, Nobuhiko Emi, Toshiko Motoji, Kou Ssaki, Kensuke Usuki, Hiroyasu Ogawa, Toru Sakura, Kazuma Ohyashiki, Kei-ya Ozawa, Masaharu Kasai, Yasushi Miyazaki,

Yasunobu Morita, Akira Matsuda, Kaoru Tohyama, Daisuke Koga, Hiroya Tamaki, Kimuko Mitani, Tomoki Naoe, Haruo Sugiyama, Fumimaro Takaku. Clinical significance of WT1 mRNA expression level in patients with myelodysplastic syndrome (MDS).

平成 22 年度、第 72 回日本血液学会学術集会、臨血 51(9); OS-3-38, 2010.

- Koji Miyazaki, Yukari Shirasugi, Kiyoshi Ando, Yoshiaki Tomiyama, Shinichiro Okamoto, Mineo Kurokawa, Keita Kirito, Yuji Yonemura, Shinichiro Mori, Kensuke Usuki, Koji Iwato, Satoshi Hashino, Helen Wei, Richard Lizambri. Evaluation of Romiplostim in a Randomized Placebo-controlled Phase 3 Study of a Japanese Population With Chronic Immune Thrombocytopenia (ITP). BLOOD (ASH Annual Meeting Abstracts 116(21); 3704a), 2010
- Kuniaki Itoh, Nobuko Kubota, Kiyoshi Ando, Ken Ohmachi, Michinori Ogura, Toshiki Uchida, Kenichi Ishizawa, Joji Yamamoto, Takashi Watanabe, Naokuni Uike, Ilseung Choi, Yasuhito Terui, Kensuke Usuki, Hirokazu Nagai, Nobuhiko Uoshima, Kensei Tobinai, for the Japanese Bendamustine Lymphoma Study Group. Durable Responses with Bendamustine in

Patients with Relapsed/Refractory Indolent B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma (B-NHL) or Mantle-Cell Lymphoma (MCL): Long-Term Follow-up of a Phase 2 Trial. BLOOD (ASH Annual Meeting Abstracts 116(21); 4884a), 2010

- Michinori Ogura, Hirohisa Nakamae, Shin Fujisawa, Ken-ichi Ishizawa, Masafumi Taniwaki, Atae Utsunomiya, Kosei Matsue, Kazuo Tamura, Kensuke Usuki, Mitsune Tanimoto, Yoji Ishida, Hideki Akiyama, Rika Sakai, Masanobu Kasai, Masayuki Hino, Kunihiko Takeyama, Taku Seriu, M. Brigid Bradley-Garelik, Chao Zhu. Dasatinib compared with imatinib in newly diagnosed chronic myelogenous leukemia in chronic phase (CML-CP): Results of Japanese subset analysis in DASISION trial. BLOOD(ASH Annual Meeting Abstracts 116(21); 4484a), 2010

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働省科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

分担研究報告書

家族性血小板異常症に関する調査研究

研究分担者 高橋 強志 三井記念病院血液内科部長

研究要旨

三井記念病院における最近10年間での家族性血小板異常症患者について調査した。家族性血小板異常症が疑われる家系を見出すことはできなかった。

A. 研究目的

家族性の血小板異常症は、常染色体優性遺伝の形式をとり、高率に骨髄異形成症候群や白血病の発症を伴うことが知られている。1999年に、RUNX1 遺伝子の変異が原因として報告され、その後日本も含め世界中で約20家系の報告がなされている。しかし、その臨床病態、発症頻度などまだ不明な点が多く、診断基準も定まっていない。本研究班においては、この家族性血小板異常症に関する調査研究を行い、その実態を明らかにしていく。

B. 研究方法

2001年から2010年までの、三井記念病院受診患者において、血小板減少症の病名のついた患者について検索した。得

られた患者について紙カルテ、電子カルテ、検査データにて病態を評価し、二次性の血小板減少症でない患者を抽出し、血小板減少症や骨髄異形成症候群、白血病の家族歴について評価を行った。

C. 研究結果

血小板減少症のうち、薬剤性、膠原病、がんの骨髄転移、脾機能亢進症、再生不良性貧血、骨髄異形成症候群、白血病を除いた患者数は195名であった。このうち、血小板減少症の家族歴があった症例は0例、また家族内で骨髄異形成症候群や急性白血病を発症した症例も0例であり、家族性血小板異常症が疑われる家系を見つけることはできなかった。

D. 考察

無し。

今回、当院での2001年から2010年の期間において、家族性血小板減少症を積極的に疑う症例は認められなかった。しかし、家族歴については、家族性血小板減少症解明の観点から、血小板減少の有無や、血液疾患の発症について必ずしも十分に聴取し記載されているとは言い難く、今後の調査のうえで改善していく必要があると思われる。

E. 結論

当院における10年間の症例検討で家族性血小板異常症症例を同定することはできなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

本邦初の家族性血小板機能異常症における RUNX1 遺伝子変異の機能解析

研究分担者 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

我々は本邦初の FPD と考えられる症例 (FPD-Yamanashi と命名) を発見し、*RUNX1* 遺伝子の exon8 における 1 塩基の欠失を見いだした (Haematologica 2008; 93:155-156)。この変異型は転写活性領域である *RUNX1* 蛋白の C 末領域がフレームシフトによって野生型とはまったく異なるアミノ酸配列へと変化し、本来存在しないリジン残基が新たに 4 カ所出現すること、蛋白の発現が著明に低下することから、ユビキチン化による蛋白分解が発現低下に関与していることが示唆された。そこでこの 4 カ所のリジン残基をそれぞれアラニンに置換した変異体を作成し、293 細胞に導入して *RUNX1* 蛋白の発現量を解析したところ、全てのリジンがユビキチン化による蛋白分解に関与していることがわかった。したがって FPD-Yamanashi タイプの変異はハプロ不全が FPD の病態に関与していると考えられた。

A. 研究目的

転写因子である *RUNX1* は、血液幹細胞の発生と維持に不可欠な遺伝子であるばかりでなく、常染色体優性形式をとる家族性血小板機能異常症 (Familial platelet disorder; FPD) の責任遺伝子でもある。FPD は現在までに約 20 家系が報告されているのみであるが、我々は本邦で初めての FPD と考えられる症例 (FPD-Yamanashi と命名) を発見し、責任遺伝子は連鎖解析から

ch21q22. 1-22. 3 の領域に存在することが示され、*RUNX1* 遺伝子の解析により exon8 における 1 塩基の欠失を見いだした。*RUNX1* 遺伝子は、血小板系列特異的な機能を持つだけでなく、FPD が高率 (30-40%) に急性骨髄性白血病や骨髄異形成症候群が発症することから、これら疾患の発症機序にも深く関与していると考えられている。我々が Y 家系で見いだした新規の変異である exon8 変異はフレームシフトを起こすこと

により転写活性領域である RUNX1 蛋白の C 末領域が野生型とはまったく異なるアミノ酸配列へと変化する (Haematologica 2008; 93:155-156)。これまでの変異は DNA 結合領域に集中していることから、Y 家系で見いだされた C 末領域の変異は FPD 発症機序の解明に新たな知見を加えると考えられる。そこで本研究では血小板減少症 Y 家系において認められた *RUNX1* 遺伝子のプロモーター領域の rSNP とエクソン 8 の変異が RUNX1 蛋白発現に及ぼす影響について検討した。

B. 研究方法

rSNP の影響を検討するために、rSNP とエクソン 8 の変異を持つ construct、エクソン 8 の変異のみを持つ construct および野生型の construct をヒト細胞株 HEK293 に導入し、RUNX 蛋白の発現量を解析した。さらに変異導入法により既報の AML 型フレームシフト変異を持つ construct も作成し、野生型を含めた 3 種類のタイプにおける RUNX1 蛋白の発現量と細胞内局在を解析した。なお本研究は試験管内 *in vitro* の系でのみ実施されたものであり、患者検体や動物を使用しないため、倫理面での問題は無い。

C. 研究結果・考察

エクソン 8 の変異を持つ construct は

rSNP の有無にかかわらず野生型に比べて蛋白量の発現低下が認められた。これはフレームシフトによって野生型蛋白には存在しないリジン残基が新たに 4 カ所に存在するためにユビキチン化による蛋白分解を受けている可能性が示唆された。そこで 4 カ所のリジン残基をそれぞれアラニンに置換した変異体を作成し、293 細胞に導入して RUNX1 蛋白の発現を解析したところ、全てのリジンがユビキチン化による蛋白分解に関与していたが、特に 3 と 4 番目のリジンが RUNX1 蛋白の発現に関与していた。フレームシフト変異にはこれまでに 1 塩基欠失型 (Y 家系型) と 2 塩基欠失型 (AML 型) が報告されており、C 末側のアミノ酸配列は野生型を含めて 3 つの型で全く異なる。そこで C 末側のアミノ酸配列が RUNX1 蛋白発現に及ぼす影響を検討するために、変異導入法により既報の AML 型フレームシフト変異を持つ construct も作成し、3 種類のタイプにおける RUNX1 蛋白の発現量と細胞内局在を解析した。蛋白の発現量は Y 家系型が最も少なく、次いで AML 型、野生型の順であり、核の不溶分画には Y 家系型蛋白が最も多く認められた。RUNX1 蛋白は通常核に局在するが、ミスセンス変異蛋白は細胞質にも局在することが報告されている。Y 家系型は、プロテアソーム阻害剤である MG132 を添加後に蛋白の発現量が増加し、蛋白は核内に局在することが確認された。

AML 型は MG132 添加に関わらず蛋白の発現量が他の 2 つの型より多く、これまでのミスセンス変異の報告例と同様に細胞質と核の両方に局在した。これらのことから RUNX1 のフレームシフト変異は AML 型では局在が変化することによる機能障害が、Y 家系型では遺伝子産物が 50%に減少するハプロ不全が FPD の病態に関与していることが示唆された。

D. 結論

本邦初の FPD-Yamanashi タイプの変異は蛋白の発現量が著明に減少することから、RUNX1 のハプロ不全が FPD の病態に関与していることが考えられた。

E. 研究発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

なし

RUNX1 点変異を有する家族性血小板異常症 FPD からの白血病化機序の解明

研究分担者 原田 浩徳 広島大学原爆放射線医科学研究所血液・腫瘍内科 講師

研究要旨

RUNX1 点変異は FPD/AML の責任遺伝子異常として同定されているが、片アレルの変異だけでは MDS/AML 発症には至らず、発症までには通常数十年を有する。白血病化には付加的な遺伝子異常が必須と考えられ、その一つとして *BM11* 高発現を同定した。

A. 研究目的

RUNX1 点突然変異は、高率に白血病に移行する家族性血小板異常症 FPD/AML の責任遺伝子として同定され、AML の最未分化型 M0、de novo MDS や放射線・治療関連の MDS および AML など、様々な骨髄系造血器腫瘍に認められることが明らかになっている。しかし FPD/AML 患者では、全ての血球が先天的に RUNX1 点変異を有しているにもかかわらず、MDS/AML 発症は成年以降であることが多いことから、白血病化には他の遺伝子異常の積み重ねが必要と考えられる。そこで今回、RUNX1 点突然変異による骨髄系造血腫瘍の発症メカニズムを明らかにするため、FPD/AML 家系における RUNX1 点変異解析、および RUNX1 変異体導入ヒト造血幹細胞の解析を行った。

B. 研究方法

FPD/AML 検体を含む骨髄系造血器腫瘍患者の DNA・RNA を精製し、RUNX1 遺伝子点突然変異を PCR-SSCP 法により解析して変異例の塩基配列を決定した。さらに RUNX1 変異体の転写活性化能を M-CSFR のプロモーターを用いたレポーターアッセイにて検討した。さらに RUNX1 変異体をレトロウイルスベクターを用いてヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞に組み込み、生物学的影響を検討した。

(倫理面への配慮)

広島大学医学部倫理委員会承認済みであり、同委員会の定めるヒトゲノム遺伝子解析研究の指針に従って実施した。検体提供者にはインフォームドコンセントを行い、

個人情報保護のため個々の試料情報は連結可能匿名化とした。

C. 研究結果

FPD/AML 家系における *RUNX1* 点変異の解析を実施した結果、A 大学病院の母娘例では G172E 変異体を同定し、レポーターアッセイを行って正常の *RUNX1* 機能を喪失していることを示した。B 大学病院の女性例では *RUNX1* G143W 変異を同定し、引き続き解析を行っている。C 大学病院の女性例には 5 人の造血器腫瘍血縁者がおり、現在 *RUNX1* 変異を解析中である。

RUNX1 変異体をヒト造血幹細胞に導入すると、分化が阻害されて自己再生能が亢進し、腫瘍細胞様となるが、FPD/AML で見られるようなラントドメイン内アミノ酸置換型変異体 (D171N) 導入細胞は増殖能を欠いており、G1 arrest の状態であった。ラントドメイン内変異を有する患者では *BMI1* が高発現であることから、D171N 変異体を導入した CD34 陽性細胞に *BMI1* を共発現させたところ、低芽球比率を保ったまま MDS 様の細胞増殖が認められた。

D. 考察

RUNX1 点変異は、造血幹細胞の分化を阻害する作用を有しており、これを有する細胞はいわば MDS stem cell と考えられる。しかし片アレルの *RUNX1* 変異だけでは MDS/AML を発症しないことから、エピジェネティックな機序による変異の抑制や

付加的な遺伝子異常の必要性が想定される。付加異常などにより *BMI1* が高発現となることが、MDS/AML 発症機序の一つと考えられる。

E. 結論

RUNX1 点変異導入造血幹細胞に *BMI1* を過剰発現させると MDS/AML を発症することを示した。これは *RUNX1* 点変異を有する FPD 患者が白血病化する機序の一端と考えられる。

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* 115(14), 2872-2881, 2010. (2010.04)
- 原田浩徳, 今川 潤, 原田結花, 木村昭郎: C/EBP α 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* 63(4), 311-313, 2010. (2010.04)
- 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* 24(5), 1018-1024, 2010. (2010.05)

- 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* 61(2), 143-150, 2010. (2010.07)
- 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. *International Journal of Hematology* 92(3), 553-555, 2010. (2010.10)
- 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* 116(26), 6018-6022, 2010. (2010.12)
- 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 α mutations play distinct but collaborative roles in leukemogenesis: lessons from clinical data and BMT models. *Blood* 117(1), 221-233, 2011. (2011.01)
- Harada Y, Harada H: Molecular mechanisms that produce secondary MDS/AML by RUNX1/AML1 Point Mutations. *Journal of Cellular Biochemistry* 112, 425-432, 2011. (2011.02)

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, 東京, 2010. (2010.4.10)
 - 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, 東京, 2010. (2010.6.5)
 - Harada H, Harada Y: Molecular mechanism to produce MDS/AML by C-terminal truncated type of AML1/RUNX1 mutations. The 17th international RUNX workshop, Hiroshima, 2010. (2010.7.14)
 - 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, 横浜, 2010. (2010.9.24)
 - 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, 横浜, 2010. (2010.9.26)
- 原田浩徳: 放射線関連 MDS・白血病の発症機序における AML 1 点突然変異の役割. 日本放射線影響学会第 53 回大会, 京都, 2010. (2010.10.20)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働省科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

家族性血小板異常症に関する調査研究

研究分担者 齋藤明子 独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター
臨床研究企画部 臨床疫学研究室 室長

研究要旨 家族性血小板異常症(familial platelet disorder, FPD)は血小板減少と出血傾向を伴い、高率に白血病に移行する難治性遺伝性疾患である。希少疾患でもあり、診断基準も存在せず、認知度も低かったことから、これまでその実態(頻度、病態、経過、予後など)は明らかにされてこなかった。一方で、1999年に白血病関連遺伝子 RUNX1(AML1)の変異がこの疾患家系において報告され、白血病においても RUNX1 の変異が高頻度にみられることから、当該疾患の頻度は予想より高い可能性が指摘されている。本調査研究の目的は、疾患の発生数の把握と、その家族歴も含めた患者背景、臨床経過の推移(短期的・長期的)などの疫学的な実態把握に加え、RUNX1 の点突然変異や微小染色体欠失を始めとする遺伝子変異の検索を行うなど遺伝子診断の意義と、その生物学的機能を明らかにすることである。
当研究室は、このような希少疾患による疾患の発生動向を確認する為の疫学的調査の方法論についての研究を担当している。

A. 研究目的

家族性血小板異常症(familial platelet disorder, FPD)は血小板減少と出血傾向を伴い、患者の生活の質を著しく低下させるのみならず、高率に白血病を発症することにより、生命予後にも重大な影響を与える難治性遺伝性疾患である。希少疾患であり、診断基準が存在せず、認知度も低かったことから、これまでその実態(頻度、病態、経過、予後)などが全く不明であった。1999年に白血病関連遺伝子 RUNX1(AML1)の変異がこの疾患家系において報告され、病因につながる事が示唆された。さらに、当該研究グループ 研究代表者施設より、RUNX1 の機能欠失がマウスにおいて巨核球の成熟障害による血小板減少をもたらすことが報告され、遺伝子変異が哺乳類で直接 FPD の病態と関与することが示された。その後少数で

はあるが、徐々に報告数も増えてきている。RUNX1 の変異が白血病において高頻度に見られることから、この疾患の頻度は予想より高い可能性がある。当調査研究に基づく全国の網羅的な調査により、より正確な有病率を把握すること、及び臨床的・基礎的な検討を行い、遺伝子診断の意義や、生物学的機能の解明など試みる。このようにして得られた知見により、診断基準の提唱に役立つと考えられる。更に、これらの知見を基に、標準的治療法確立や予後解明を目的とした各種研究計画の立案へ繋げられれば、将来の患者の生命予後の改善が期待でき、社会的貢献を果たすと考えられる。

本研究室では、希少疾患の有病率をより正確に把握するための方法論について担当する。

B. 研究方法

1. 国内外における希少疾患対策などの現状を把握する。
2. 調査を行うにあたり、個人情報及び診療情報の保護に関するポリシーを作成・徹底を図る。
3. 希少疾患であるという当該疾患領域の特殊性を考慮し、前向きコホート研究などの疫学的データの蓄積や臨床研究を実施する際の方法論に関する研究を行う。

(倫理面への配慮)

本研究は世代間に伝わる遺伝子変異を解析する研究であり、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針、臨床研究に関する倫理指針を遵守するとともに、事前に研究代表者施設の倫理審査委員会の承認を得て行う。尚、本研究で用いる臨床検体は、患者の臨床的診断のために採取された検体の残検体や非侵襲的に得られる体細胞(口腔粘膜スミアなど)を用いるため、健康上の危険性はないが、本研究の為の解析に先立ち、書面にてインフォームド・コンセントを得て行う。尚、試料(臨床情報及び検体)の取扱いについては、参加施設の規定に従い、匿名化を図り行う。以上の手続きをとることにより、研究の対象となる患者の倫理性が確保できる。

C. 研究結果

1. 国内外における希少疾患対策の現状把握

国内外の希少疾患への対策に関する現状を把握する為文献的レビューを開始した。米国National Institute of Healthに

よれば、有病数が 20 万人未満の有効な治療法が無い疾患が希少疾患と定義されている。Rare Diseases Act of 2002(希少疾患対策法)に応答する形で、Rare Diseases Clinical Research Network (RDCRN 希少疾患臨床研究ネットワーク)が組織され、米国内の臨床研究関連施設によるコンソーシアム研究として、希少疾患に特化した研究の推進と患者への情報提供などを行っている。現在 10 の研究コンソーシアムと central Data and Technology Coordinating Center (DTCC, 中央データ管理部門)が存在し、20 件以上の研究を米国 50 箇所以上で行っている。いずれも希少かつ難治性疾患の把握と情報の相互リンク、情報共有を図り、研究の推進に役立てることを目的としている。

2. 個人情報保護ポリシーの作成

患者の個人情報及び診療情報などの漏洩、混交、紛失、盗用などを防ぐ為のセキュリティ確保の方針、患者情報の不正流出の防止策、不要となった情報の取り扱い、開示の方法、研究に関わる側の情報の取り扱いなどについて具体的の方針を定め、「個人情報保護方針」を作成した。NPO OSCAR データ管理部用、名古屋医療センター臨床疫学研究室用の 2 種類を別個に作成した。

3. 疫学的情報の蓄積、及び継続的観察を行う為の方法論の研究とシステムの構築

FPD は、診断基準が定まっていないこともあり、疾患の有病数の正確な把握が難しい。本年度は、予備調査として、2007 年～2009 年の 3 年間を対象として、家族性に血小板減少を来した症例についてのアンケート調査を全国 500 以上の施設に実施し、有病数に関する網羅的把握と合併症、遺伝形式等

の実態把握に努めた。今後はより詳細な症例の臨床的情報の収集を行うと共に、可能な限り前向きに追跡し、生命予後も含めた臨床情報を収集出来るシステムの確立を目指す。

D. 考察

FPD は、血小板減少と出血傾向を伴い、患者の生活の質を著しく低下させるだけでなく、高率に白血病発症をきたすという生命予後にも重大な影響を与える難治性疾患の 1 つである。その希少性と疾病の特性に関する認識が不十分であったことから、その有病数はこれまで過小評価されてきた可能性がある。診断率の向上は言うまでもなく、将来的には治療法の開発も目指した病態研究や治療開発研究は、患者の福祉向上に必要な不可欠であるものの、希少性という市場の小ささが故に、開発が遅れて来た領域であり、医師が主導となって行う研究として成立させる必要がある疾患群である。国内には、日本臨床腫瘍研究グループ(Japan Clinical Oncology Group; JCOG)のような歴史ある臨床研究グループを支えるデータセンターが存在するが JCOG データセンターが統括する臨床研究データと本研究が取り扱うデータとの決定的な違いは、“希少疾患領域であること”、“固形がんのような局所治療が主となることはなく、常に全身性疾患としての長期的な全身治療が必要になる”ことなどである。治療内容とその副作用の追跡は、必然的に複雑化・煩雑化する。一方、参加施設側の臨床研究支援体制は未だ十分とはいえず、医師が多忙な臨床業務の傍ら、複雑な研究を行っている実情がある。従って、患者情報や予後情報などの追跡調査

結果の収集は、なるべく簡便で、標準化されていることが望ましい。データの質を落とさずに業務の簡略化・標準化を図れるシステムの開発等も含めて、検討する予定である。

E. 結論

希少難治性疾患としての FPD の実態把握、及び疫学的知見を収集/追跡する為の方法論の研究により、効率的な情報収集と、質の高いデータの蓄積・情報発信を行えるよう、基盤整備に努める。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表等
該当なし

H. 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
該当なし
3. その他
該当なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表