

201128015A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

不応性貧血の治癒率向上を目指した分子・免疫病態研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小川 誠司

平成 24(2012)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

不応性貧血の治癒率向上を目指した分子・免疫病態研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小川 誠司

平成 24(2012)年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

- 不応性貧血の治癒率向上を目指した分子・免疫病態研究に関する研究
東京大学医学部附属病院がんゲノミクスプロジェクト 小川誠司 —— 1

II. 分担研究報告

1. MDSにおけるRNAスプライシング関連分子異常
東京大学医学部附属病院がんゲノミクスプロジェクト小川誠司 —— 13
 2. 「MDSにおける末梢遊離DNAを用いた遺伝子変異及びエピジェネティクス異常解析」
に関する研究
名古屋大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科学 直江知樹 —— 15
 3. 13q欠失を伴う骨髄不全の病態解析
金沢大学医薬保健研究域医学系細胞移植学 中尾眞二 —— 18
 4. SMMA法による骨髄異形成症候群のDNAメチル化度の評価
東京医科大学 内科学第1講座 大屋敷一馬 —— 20
 5. 骨髄異形成症候群の遺伝子解析を目的とした検体集積に関する研究
京都大学医学研究科血液・腫瘍内科学 高折 晃史 —— 22
 6. 不応性貧血の治癒率向上を目指した分子・免疫病態研究
広島大学原爆放射線医科学研究所 稲葉俊哉 —— 24
 7. 異形成を伴う白血病からの新規RUNX1アンチセンスキメラの同定
東京女子医科大学血液内科 泉二登志子 —— 26
 8. 異形成を伴う白血病からの新規RUNX1アンチセンスキメラの同定
獨協医科大学 内科学（血液・腫瘍） 三谷絹子 —— 28
 9. 骨髄異形成症候群患者のゲノム異常、エピゲノム異常を解析するための検体収集システムの構築
筑波大学 医学医療系 千葉滋 —— 30
- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 —— 35
- IV. 研究成果の刊行物・別刷 —— 41

I . 総括研究報告

不応性貧血の治癒率向上を目指した分子・免疫病態研究

研究代表者 小川誠司 東京大学 キャンサーボード がんゲノミクスプロジェクト

研究要旨

不応性貧血（骨髄異形成症候群、MDS）は高齢者に好発する難治性造血器疾患であるが、形態異常を伴う血球産生異常が共通に認められる一方、一部には免疫抑制療法が有効な自己免疫機序が主体となる病態も存在する。治療成績の向上の観点からは、この多様な病態を明らかにした上で、個々の病態に即した分子標的療法を含む治療戦略を構築することが重要である。本研究班は、MDSの多様な分子病態を明らかとすることを目的に、1) MDS リソースバンクの一層の拡充を目指した検体集積事業、2) 次世代シーケンシング技術を活用した網羅的な変異遺伝子探索、3) MDSにおけるエピゲノム異常の解析、4) 13q 欠失で特徴づけられる骨髄不全における免疫病態研究、5) 新規 RUNX1 転座の解析研究を推進している。1) においては、2005 年 8 月より「骨髄異形成症候群に対する病態解明・治療法の開発に関する研究班」によって行われてきた検体集積事業を発展的に継続するものであり、前年度以降に新たに 62 検体が集積され、前班より引き継いで集積された検体数は計 175 例を超えている。また、今後の検体集積事業の発展を目的に、日本成人白血病研究グループ（JALSG）との連携に向けて、原則合意が得られ、研究計画作成作業に入っており、更なる集積数の増加が期待される。2) においては、網羅的な新規変異遺伝子の探索を目的に、次世代シーケンサーによる 29 例の MDS の全エクソン・シーケンシングを行い、MDS において RNA スプライシングに関わる遺伝子群に高頻度かつ特徴的に変異が生じていることを明らかとした。また 20 番長腕の共通欠失領域の標的遺伝子の探索により標的候補遺伝子として NCOA3 遺伝子を同定した。3) においては、脱メチル化剤の導入により MDS 治療が大きく変貌しつつある中、脱メチル化剤の効果判定に有用な解析法が望まれ、前年度に開発した全ゲノム DNA メチル化解析が可能な Single molecule methylation assay (SMMA) 法の実用化に向けての検討が行われた。また、検体の採取が簡便である末梢血の血漿・血清より遊離 DNA を採取し、特定遺伝子プロモーターのメチル化状態を半定量的に検出可能とし、経時的な解析を容易とした。さらには脱メチル化剤である 5-aza の標的因子の同定を次世代シーケンサにより試みた。5-aza 投与により K562 細胞のヘモグロビンの生産量が増加するが、ヘモグロビンなどの転写レベルへの作用ではなく、eEF1a や eIF2b によるヘモグロビンの翻訳効率の上昇が寄与していることを見いだした。4) においては、13q 欠失で特徴づけられる症例は、PNH 型血球の増加が見られ、免疫抑制剤が有効である症例が多いことから、免疫病態の関与が大きく、再生不良性貧血に準じた免疫抑制療法を主体とした治療法の選択をすべきと考えられた。5) においては、MDS の重要な標的分子である *RUNX1* を含む新規転座 t(7;21)(q11;q22) 症例から、新規 RUNX1 アンチセンスキメラ遺伝子を同定し、短縮型の RUNX1 の発現が分子病態上、重要であることを明らかとした。

研究分担者

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">・直江 知樹
名古屋大学大学院医学系研究科
血液・腫瘍内科学 教授・中尾眞二
金沢大学医薬保健研究域医学系
細胞移植学 教授・大屋敷一馬
東京医科大学
血液内科・呼吸器内科学講座 教授・高折 晃史
京都大学医学研究科
血液・腫瘍内科学 教授 | <ul style="list-style-type: none">・稲葉 俊哉
広島大学
原爆放射線医科学研究所 教授・泉二 登志子
東京女子医科大学
血液内科 教授・三谷 絹子
獨協医科大学
内科学（血液・腫瘍） 教授・千葉 滋
筑波大学大学院
人間総合科学研究科 教授 |
|---|--|

A. 研究目的

不応性貧血（骨髄異形成症候群 MDS）は高齢者に好発する難治性造血器疾患であるが、高齢者に適した根治的治療がなく、急速な少子高齢化による患者数の増加も危惧される。MDS では形態異常を伴う血球産生異常が共通に認められる一方、一部には免疫抑制療法が有効な自己免疫機序が主体となる病態も存在する。治療成績の向上の観点からは、この多様な病態を明らかにした上で、個々の病態に即した分子標的療法を含む治療戦略を構築することが重要である。

そこで本研究班では、MDS 研究の基盤となるリソースバンクの一層の拡充と、これを用いた先端的なゲノム・エピゲノム解析、免疫病態解析を通じ、MDS の多様な病態とその責任となる分子病態を明らかにすることにより、新規治療薬剤・診断技術の開発の基盤を構築し、現時的における合理的な治療法選択のための指標を作成することにより、MDS の治療成績の向上に資することを目的とする。

B. 研究方法

1) 検体集積事業（高折・三谷・千葉）

「特発性造血障害に関する調査研究班」および「不応性貧血の治療率向上を目指した分子・

免疫病態研究班」参加施設より、東日本バンク（獨協医科大学血液内科）および西日本バンク（京都大学血液腫瘍内科）に骨髄異形成症候群患者の骨髄液が提供された。

これらの検体は単核球分離後、一部の細胞から DNA を抽出し、残りの細胞は凍結保存された。これらの一部は、前研究から開始されている高密度 SNP アレイによるゲノム解析に用いられた。また、本年度は検体集積事業の拡張を目的に、日本成人白血病研究グループとの連携に向けた研究計画の作成などが進められた（千葉）。

2) 次世代シーケンス技術を活用した網羅的な変異遺伝子探索

A. 全エクソン・シーケンスによる新規変異遺伝子の探索（小川・千葉）

29例のMDS検体を用いて全エクソン・シーケンスを骨髄単核球および末梢血より純化したTリンパ球を正常細胞として行った。全ゲノムよりエクソン領域をアジレント社SureSelectキットにより濃縮し、イルミナ社の次世代シーケンサーを用いて配列決定を行い、MDS細胞特異的（後天的）変異候補を同定し、サンガーシーケンスにより変異の確認を行った。複数例に認められた新規標的候補遺伝子については、多数例の症例を用いて変異頻度を解析した。

B. 20番長腕欠失の標的遺伝子の探索 (泉二)
アレイ CGH 法を用いて、9 例の 20 番染色体に欠失を有する症例の共通欠失領域を同定したのち、同領域内に存在する 32 の遺伝子について、次世代シーケンサー (ABI 社 SOLiD) を使用してシーケンスを行い、変異の有無を解析し、変異が認められた NCOA3 および STK4 について 20 番染色体欠失を伴う 30 例の MDS 例について検索を行った。

3) MDS におけるエピゲノム異常の解析研究

A. SMMA 法による DNA メチル化度の評価 (大屋敷)

メチル化 DNA と結合する methylation binding domain-1 (MBD2) を蛍光色素 TAMRA で標識し、1 分子蛍光分析システム (MF20) を用いて、拡散分光を測定することにより DNA メチル化状態を半定量的に検出した。Single molecule methylation assay (SMMA) 法として人工的にメチル化した DNA と TAMRA 標識 MBD-2 を反応させ、拡散時間よりメチル化状態を計測した。臨床検査レベルの汎用を目指し、MDS 患者由来の全血細胞・顆粒球分画・リンパ球分画、其々のメチル化状態を SMMA 法により半定量的に測定・検討した。

B. MDS における末梢遊離 DNA を用いた遺伝子変異及びエピジェネティクス異常解析 (直江)
MDS 患者および正常ボランティアの末梢血より得られた血漿、血清を用いて、末梢血遊離 DNA を採取した。アガロースゲル電気泳動により、その採取量、断片化の程度などを比較検討し、患者の病勢等との関連性を解析した。プロモーター部位のグローバルなメチル化状態を解析するため、PC-DNA をバイサルファイト処理したのちパイロシーケンス法を用いて、LINE-1 遺伝子プロモーター CpG 部位のメチル化割合を定量解析した。また、TET2 遺伝子変異を有する MDS 患者から得られた末梢血、骨髄各細胞分画 (CD34+/38-, +/+, -/-) より得られたゲノム DNA を用いて、TET2 変異の存在割合を検討した。DNA メチル化酵素阻害剤治療を受ける患者より

経時的に採取された PC-DNA を用いて、遺伝子変異や CpG メチル化状態の変化を検討した。

C. 次世代シーケンサーを用いた脱メチル化剤の作用機序の解明 (稲葉)

細胞から抽出したゲノム DNA を破碎後、GST-MBP (メチル化シトシン結合蛋白質) によりメチル化 DNA を単離した。同時に mRNA を分離して cDNA を合成し、いずれもイリミナ社製の高速並列シーケンサーにより配列を決定した。得られた多数の配列を、コンピュータ上でゲノムシーケンサー上に貼付け、網羅的 DNA メチル化解析やトランスクリプトーム解析を行った。また、得られた遺伝子が真に標的遺伝子であるかどうかを確認するために、RNA 干渉法を用いた遺伝子発現の抑制実験やレトロウイルスを用いた過剰発現実験をおこなった。

4) 骨髄不全における免疫病態研究 (中尾・小川)
1999 年 5 月から 2010 年 6 月に PNH 型血球検査のため金沢大学血液内科に紹介された骨髄不全症例 1228 例を対象とし、13q- 例の頻度、臨床像、PNH 型血球の保有率、免疫抑制療法の反応性を検討した。その結果、13q- 例は 22 例 (1.8%) に認められ、その 22 例中 13q- 単独異常は 16 例、付加的異常を伴う例は 6 例であった。また、DNA の入手が可能であった 7 例については、金沢大学ヒトゲノム解析研究倫理審査委員会の承認と患者の同意を得たのち Affymetrix 250K SNP array を行い、共通して欠失している遺伝子領域を同定した。遺伝子解析は、東京大学キャンサーボード小川誠司研究室で行われた。

5) 新規 RUNX1 アンチセンスキメラの同定 (三谷)
これまでに報告のない t(7;21)(q11.2;q22) 転座を有する異形成を伴う AML 例より、3' RACE と遺伝子特異的 PCR により、新規 RUNX1 キメラを同定し、白血病細胞における発現を確認した。

(倫理面への配慮)

本研究で実施される患者検体を用いた遺伝子解析研究は、原則として MDS 細胞の体細胞突然変異を扱うものであるが、平成 16 年文部科学省、厚生労働省および経済産業省告示第 1 号「ヒト

ゲノム・遺伝子研究に関する倫理指針」を遵守し、事前に各参加施設の倫理委員会の承認を得た。また、研究対象者からは文書による同意を得た。動物実験に関しては、動物愛護の観点から、平成18年文部科学省告示第71号「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」及び各機関の定める動物実験倫理規定を遵守し、予め各機関に届け、機関長の承認を得た。

D. 研究結果

1) 検体集積事業（高折・三谷・千葉・小川）

平成22年4月から平成23年末までに骨髓細胞62検体が提供された。収集された検体からはDNAが抽出され、その一部からはゲノムDNAの高密度SNPアレイ解析が行われた。同解析によって、染色体Gバンド法ではみつからなかったUPDなどのゲノム上の異常が多数同定されている。解析結果は随時、各検体提供施設にフィードバックされている。また、本事業の更なる発展を目的に、我が国で最大の造血器腫瘍研究グループである日本成人白血病研究グループ（JALSG）が計画中のMDSを対象とする治療研究MDS211試験と連携をして、検体集積事業を行うことに原則合意が得られ、現在、研究計画の調整中である。

2) 次世代シーケンス技術を活用した網羅的な変異遺伝子探索

A. 全エクソン・シーケンスによる新規変異遺伝子の探索（小川・千葉）

MDS29例の全エクソン・シーケンスにより、MDS細胞特異的な変異候補が同定され、サンガーシーケンスにより268個（9.2個/例）のタンパクの構造変化を伴う体細胞性変異が確認された。うち235個は遺伝子変異の報告がない新規変異遺伝子であり、16例にU2AF35、SRSF2、ZRSR2、SF3B1などのRNAスプライシングに重要な遺伝子群に変異が生じていることが明らかとした。多数例の解析においても、本遺伝子変異はMDSにおいて高頻度かつ特徴的であることが確認をされた。

B. 20番染色体異常責任遺伝子の同定（泉二）

CGHアレイ法により決定した20番染色体長腕共通欠失領域に存在する遺伝子のうち、がん抑制遺伝子ならびに腫瘍細胞の増殖や分化との関連が示されている32の遺伝子に関して、共通欠失領域を決定した5症例の臨床検体を用いて、次世代シーケンサにより変異の有無を解析した。アミノ酸置換を伴いSNPとして報告がない変異がSTK4遺伝子とNCOA3遺伝子に認められた。次に、20番染色体異常を伴う骨髓異形成症候群30症例について、この二つの遺伝子の全コーディング領域のシーケンスを実施し、NCOA3遺伝子については、新たに2症例で変異が同定された。

3) MDSにおけるエピゲノム異常の解析研究 A. TAMRA-MBD2を用いた脱メチル化剤効果予測法の開発（大屋敷）

MDS治療に用いられるアザシチジンの効果判定および有効例の予測を目的として、本事業の平成22年度に開発した蛍光標識MBD2と1分子蛍光分析システム（single molecule methylation assay: SMMA）法の実用化を検討した。MDS患者の顆粒球では健常者に比べ脱メチル化傾向を示し（ $P = 0.0702$ ）、この傾向は全血細胞での脱メチル化状態も同様であったが（ $P = 0.027$ ）、リンパ球分画ではメチル化度に変化は見られなかった（ $P = 0.8319$ ）。このことより、顆粒球細胞の脱メチル化状態を反映する全血細胞と、リンパ球分画での脱メチル化状態の違いがMDS患者の特徴的な所見である可能性が高いと考えられた。

B. MDSにおける末梢遊離DNAを用いた遺伝子変異及びエピジェネティクス異常解析（直江）
MDSにおける遺伝子およびエピジェネティクス異常を低侵襲で簡便に、経時的に検討する方法として、末梢血遊離DNA（PC-DNA）を用いたゲノム・エピゲノム解析法の確立を目的とした。末梢血血漿、血清より精製したDNAはクロマチン構造を背景として断片化され、その濃度は骨髓芽球数に相関する傾向が示唆された。PC-DNAを用いた遺伝子変異解析が可能であり、特定遺伝子変異の存在割合は骨髓中幹細胞分画におけ

る存在比率を反映する傾向が示唆された。また、特定遺伝子プロモーターのメチル化測定も可能であることが確認された

C. 次世代シーケンサを用いたエピゲノム異常解析 (稲葉)

K562細胞は5-azaによりヘモグロビンの生産量が5倍以上増加したが、シーケンス解析の結果から、ヘモグロビン遺伝子やヘム合成蛋白質遺伝子の転写量の増加によるものではなく、ヘモグロビンmRNAの翻訳効率の増加に由来すると考えられ、翻訳伸長因子eEF1aと翻訳開始因子eIF2Bが関与していることを見いだした。

4) 骨髄不全における免疫病態研究 (中尾・小川)

13q-陽性骨髄不全 22 例の臨床像と予後を検討した。13q-例の骨髄像には明らかな形態異常がないことから、診断は全例がMDS-Uであった。骨髄不全の免疫病態を反映するPNH型血球の増加は、13q-単独異常の16例では全例、付加的染色体異常を伴う6例では50%に認められた。免疫抑制療法は単独陽性例14例、付加的異常を伴う例の5例で施行され、有効率はそれぞれ100%、40%であり、各々の10年生存率は83%、67%であった。7例を対象としてSNPアレイを行ったところ、13q13.3から13q14.3にかけて共通欠失領域があることが明らかになった。以上の所見から、13q-を伴う骨髄不全は、免疫病態による良性の骨髄不全であり、MDSとしてではなく再生不良性貧血として扱うべきであることが示唆された。

5) 新規 RUNX1 アンチセンスキメラの同定 (三谷)

今回 t(7;21)(q11.2;q22)を唯一の染色体異常として保有する異形成を伴う急性骨髄性白血病(AML)の症例から、新規 RUNX1 アンチセンスキメラ遺伝子 RUNX1-antisense UPK3B-DTX2 を同定した。さらに、遺伝子特異的プライマーを用いた RT-PCR 法により、白血病細胞における4種類のアイソフォームの発現を確認した。UPK3B 遺伝子と DTX2 遺伝子は7q11.2 上の近傍に存在し、RUNX1 遺伝子と head-to-head で結合していた。RUNX1 はエク

ソン6までを、DTX2 はエクソン9あるいは10までを含み、介在する UPK3B 遺伝子由来の配列は短かった。このキメラ遺伝子より、長い DTX2 のアンチセンスが転写され、短縮型の RUNX1 蛋白が発現することが、重要な白血病発症機構であると考えられた。

D. 考察

1) 検体集積事業

本事業と日本成人白血病研究グループ(JALSG)との連携により、一体的に臨床情報の整備された高品質かつ多数検体の集積が可能となり、集積事業ならびに集積された検体を活用した研究が発展することが期待される。また、これまでに集積された検体数は合計175となっており、これらからはDNA、RNAが抽出され、残った細胞は凍結保存されている。抽出されたDNAの一部は、高密度SNPアレイ解析に用いられ、同解析の、MDSと再生不良性貧血などの非腫瘍性血液疾患との鑑別や、MDS患者の予後を推定する上での有用性が示された。

2) 次世代シーケンサ技術を活用した網羅的な変異遺伝子探索

ゲノム解析技術は近年著しい進歩を遂げ、様々な疾患研究に用いられ、未知の遺伝子異常が急速に明らかとなりつつある。本研究により、MDSにおいてRNAスプライシングに関わる一連の遺伝子群に後天的変異が高頻度に生じていることを、世界に先駆けて明らかとした。これまでも、いくつかの遺伝子変異がMDS症例において生じていることが報告されてきたが、その多くはAMLなどの骨髄系腫瘍でも観察され、また変異頻度も低かった。本異常はMDSにおいて頻度が高いのみならず、特徴的であり、本成果によりMDSの病態研究が大きく進展し、治療法の開発研究への応用も期待される。

3) MDSにおけるエピゲノム異常の解析研究

昨春より、MDSにおける脱メチル化剤の臨床応用が開始されており、投与に際して、投与患者の選別および脱メチル化剤投与の有効性を確認することは、今後の重要な検討課題と

なることが予想される。SMMA 法 (single molecular methylation assay) による全ゲノムの DNA メチル化状態の検証、末梢血遊離 DNA を用いた遺伝子解析技術は、患者への侵襲が低く、実用性の高い技術となると期待される。メチル化阻害剤の MDS に対する作用機序は明らかになっていない。このような中で、次世代シーケンス技術を活用したゲノムメチル化およびトランスクリプトーム解析により、K562 細胞における 5Aza の赤芽球への分化機序を明らかとした。今後、臨床検体の解析も含め検討を行う予定である。

4) 骨髄不全における免疫病態研究

13q- は、白血病への移行リスクが中間リスク群と定義されており、この染色体異常が検出されると、脱メチル化薬や、非血縁ドナーからの骨髄移植などの侵襲性の強い治療がわが国でも行われてきた。今回の解析により、13q- 陽性骨髄不全、特に単独陽性骨髄不全には前白血病としての性格は全くなく、実態は再生不良性貧血に類似した病態であり、免疫抑制剤の有効性が期待できることが明らかになった。また、単独陽性例では、PNH 型血球の増加が例外なくみられることから、13q- 陽性造血幹細胞と、PIGA 変異造血幹細胞との間には、免疫病態による骨髄不全において生存優位性の獲得に至る何らかの共通機構が存在すると考えられる。このメカニズムが明らかになれば、再生不良性貧血における造血抑制機序を解明できる可能性がある。

5) 新規 RUNX1 アンチセンスキメラの同定

RUNX1 は造血幹細胞の制御や血球の分化に重要な役割を担う転写因子である。約 1 割程度の de novo 症例に遺伝子変異を認めるが、RUNX1/EVI1 等の RUNX1 転座型キメラは病後期に観察される。RUNX1-antisense UPK3B-DTX2 も AML 症例に観察されたことから、これらの RUNX1 キメラは MDS の白血球化に関与する可能性がある。今後も RUNX1 キメラの同定が進めば、MDS の予後不良因子としての位置付けが確立し、その有無を検査することは臨床的

な意味を持つことが期待される。さらに、RUNX1 キメラは、野生型 RUNX1 をドミナント・ネガティブに抑制する際に、ヒストン脱アセチル化酵素をリクルートする。RUNX1 キメラ型 MDS の診断は、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を用いた層別化治療にも有用であると考えられる。

E. 結論

不応性貧血 MDS の治癒率向上につながる分子病態の解明を目的に、様々な解析技術を駆使した研究を推進させた。次世代シーケンスを活用した網羅的な標的分子の探索を通じて、MDS に高頻度かつ特徴的に RNA スプライシング関連分子変異が生じていることを明らかとした。次年度以降も継続してシーケンス解析研究を進めるとともに、RNA スプライシングを介した MDS の分子病態の研究が進むことが期待される。MDS の治療薬として脱メチル化剤の臨床応用が国内でも開始され、有効性の評価・予測が重要な焦点となっているが、本班研究で開発されたメチル化の評価法が有用であると期待される。再生不良性貧血と MDS は病態が一部重複する疾患であるが、13q 欠失で特徴づけられる MDS においては自己免疫機序が強いことが明らかとなり、治療法選択の上で重要なマーカーになると考えられる。MDS は様々な分子病態を含む疾患群であるとされ、分子病態の解明には、多数の臨床検体を使用した解析が重要である。本班で行っている検体集積事業は、本研究班の研究目的の達成において重要な事業であり、来年度以降、JALSG との連携も開始し、検体集積の充実とともに、各分担研究がより一層推進することが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1) Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y,

- Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M, Chalkidis G, Suzuki Y, Shiosaka M, Kawahata R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Ishiyama K, Mori H, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Sugano S, Haferlach C, Koeffler HP, Shih LY, Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S.: Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011;478:64-9
- 2) Takita J, Yoshida K, Sanada M, Nishimura R, Okubo J, Motomura A, Hiwatari M, Oki K, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S.: Novel splicing-factor mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia*. 2012 Feb 20.
- 3) Sugimoto T, Tomita A, Abe A, Iriyama C, Kiyoi H, and Naoe T. Chimeric antisense RNA derived from chromosomal translocation modulates target gene expression. *Haematologica*. 2012. (in press)
- 4) Iriyama C, Tomita A, Hoshino H, Adachi-Shirahata M, Furukawa-Hibi Y, Yamada K, Kiyoi H, Naoe T. Using peripheral blood circulating DNAs to detect CpG global methylation status and genetic mutations in patients with myelodysplastic syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;419:662-9.
- 5) Tomita A, Shirasugi Y, Ito T, Tsurumi H, Naoe T. Extravascular hemolytic attack after eculizumab therapy for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Ann Hematol*. 2011 Nov 15. (in press)
- 6) Goto E, Tomita A, Hayakawa F, Atsumi A, Kiyoi H, Naoe T. Missense mutations in PML-RARA are critical for the lack of responsiveness to arsenic trioxide treatment. *Blood*. 2011;118:1600-9.
- 7) Ohata K, Iwaki N, Kotani T, Kondo Y, Yamazaki H, Nakao S: An Epstein-Barr virus-associated leukemic lymphoma in a patient treated with rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine for hepatitis-associated aplastic anemia. *Acta Haematol* 2011;127 (96-99)
- 8) Katagiri T, Sato-Otsubo A, Kashiwase K, Morishima S, Sato Y, Mori Y, Kato M, Sanada M, Morishima Y, Hosokawa K, Sasaki Y, Ohtake S, Ogawa S, Nakao S: Frequent loss of HLA alleles associated with copy number-neutral 6pLOH in acquired aplastic anemia. *Blood*. 2011; 118 (6601-6609)
- 10) Takamatsu H, Yagasaki H, Takahashi Y, Hama A, Saikawa Y, Yachie A, Koizumi S, Kojima S, Nakao S: Aplastic anemia successfully treated with rituximab: the possible role of aplastic anemia-associated autoantibodies as a marker for response. *Eur J Haematol*. 2011; 86 (541-545)
- 11) Umezu T, Ohyashiki K, Ohyashiki JH: Single molecular methylation assay: A new technology for quantifying global DNA methylation by fluorescence correlation spectroscopy, *Analytical Biochemistry*, 2011, 415(2):145-150.
- 12) Sato T, Ichinohe T, Kanda J, Yamashita K, Kondo T, Ishikawa T, Uchiyama T, Takaori-Kondo A; Clinical significance of subcategory and severity of chronic graft-versus-host disease evaluated by National Institutes of Health consensus criteria. *Int J Hematol*. 2011 Apr;93(4):532-41.
- 13) Hirai M, Kadowaki N, Kitawaki T, Fujita H, Takaori-Kondo A, Fukui R, Miyake K, Maeda T, Kamihira S, Miyachi Y, Uchiyama T. Bortezomib suppresses function and survival of plasmacytoid dendritic cells by targeting intracellular trafficking of Toll-like receptors and endoplasmic

- reticulum homeostasis. *Blood*. 2011 Jan 13;117(2):500-9.
- 14) 1. Jin L, Tabe Y, Kimura S, Zhou Y, Kuroda J, Asou H, Inaba T, Konopleva M, Andreeff M, Miida T. Antiproliferative and proapoptotic activity of GUT-70 mediated through potent inhibition of Hsp90 in mantle cell lymphoma. *Br. J. Cancer* 104: 91-100, 2011
- 15) Ozaki Y, Matsui H, Nagamachi A, Asou H, Aki D, Inaba T. The dynactin complex maintains the integrity of metaphasic centrosomes to ensure transition to anaphase. *J. Biol. Chem* 286: 5589-5598, 2011
- 16) Jiang Q, Quaynor B, Sun A, Li Q, Matsui H, Honda H, Inaba T, Sprecher E, Uitto J. The Samd9L Gene: Transcriptional Regulation and Tissue-Specific Expression in Mouse Development. *J Invest Dermatol* 131: 1428-1434, 2011
- 17) Hiraga N, Imamura M, Abe H, Hayes CN, Kono T, Onishi M, Tsuge M, Takahashi S, Ochi H, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Tateno C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Tanaka S, Chayama K. Rapid emergence of telaprevir resistant hepatitis C virus strain from wildtype clone in vivo. *Hepatology* 54: 781-788, 2011
- 18) Okada M, Suto Y, Hirai M, Shiseki M, Usami A, Okajima K, Teramura M, Mori N, Motoji T. Microarray CGH analyses of chromosomal 20q deletions in patients with hematopoietic malignancies. *Cancer Genet.* 205 (1-2): 18-24, 2012.
- 19) Tanaka N, Wang YH, Shiseki M, Takanashi M, Motoji T. Inhibition of PRAME expression causes cell cycle arrest and apoptosis in leukemic cells. *Leuk Res.* 35(9): 1219-25, 2011.
- 20) Mori N, Inoue K, Okada M, Motoji T. Absence of Mutations on the SNF5 Gene in Hematological Neoplasms with Chromosome 22 Abnormalities. *Acta Haematol.* 126(2): 69-75, 2011
- 21) Nishikii H, Nakamura N, Kondo Y, Okoshi Y, Suzukawa K, Hasegawa Y, Yokoyama Y, Sakata-Yanagimoto S, Enami T, Noguchi M, Chiba S. Treatment outcome of adult Burkitt lymphoma in Japanese patients with modified LMB protocol: a single center retrospective analysis. *J Clin Exp Hematol* 51(2)109-114, Nov, 2011
- 22) Feng L, Eisenstat DD, Chiba S, Ishizaki Y, Gan L, Shibasaki K. Brn-3b inhibits generation of amacrine cells by binding to and negatively regulating DLX1/2 in developing retina. *Neuroscience* 195:9-20, 2011
- 23) Kusakabe M, Hasegawa K, Hamada M, Nakamura M, Ohsuni T, Suzuki H, Mai TT, Kudo T, Uchida K, Ninomiya H, Chiba S, Takahashi S. c-Maf plays a crucial role for the definitive erythropoiesis that accompanies erythroblastic island formation in the fetal liver. *Blood* 118(5):1374-85, Aug 4, 2011
- 24) Sakurai N, Maeda M, Li M, Lee S-UK, Ishikawa Y, Williams JC, Wang L, Su L, Saito TI, Chiba S, Casola S, Yagita H, Teruya-Feldstein J, Tsuzuki S, Bhatia R, Maeda T. Notch-dependent and -independent regulation of mature B cell lineage fate and humoral immune response by the LRF transcription factor homodimer. *J Clin Invest.* 121(7):2583-98, Jul 1, 2011
- 25) 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* 152(2):631-639, May, 2011

26) Yoshida C, Komeno T, Hori M, Kimura T, Fujii M, Okoshi Y, Suzukawa K, Chiba S, Hasegawa Y, Mukai HY, Ito T, Shimizu S, Kamoshita M, Kudo D, Shinagawa A, Chikatsu N, Monma Y, Watanabe N, Kojima H. Adherence to the standard dose of imatinib, rather than dose adjustment based on its plasma concentration, is critical to achieve a deep molecular response in patients with chronic myeloid leukemia. Int J Hematol 93(5):618-623, May, 2011

27)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願中
特願 2010-167412 (大屋敷)
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

II. 分担研究報告

MDS における RNA スプライシング関連分子異常

主任研究者 小川 誠司 東京大学医学部附属病院がんゲノミクスプロジェクト特任准教授

研究要旨 MDS における新規変異遺伝子の探索を目的に、次世代シーケンス技術を活用した全エクソン・シーケンス解析を MDS 29 症例に対して行った。解析の結果、計 271 個のタンパクの構造変化を伴う MDS 細胞に特異的な遺伝子変異が認められ、29 例中 16 例において *U2AF35*, *SRSF2*, *SF3B1*, *ZRSR2* などの RNA スプライシングに関わる遺伝子群に変異が同定された。多数例の骨髄系腫瘍の遺伝子解析の結果、本変異は MDS に特徴的かつ高頻度（45-85%）に排他的に認められた。MDS の分子病態において RNA スプライシング異常が重要であると推測され、今後、分子病態の理解と有効な治療法の開発が進むことが期待される。

A. 研究目的

難治性疾患である骨髄異形成症候群 (MDS) の治療成績の向上には、MDS の分子病態に即した分子標的療法を含む治療戦略を構築することが重要である。近年、MDS における遺伝子異常が明らかとなりつつあるが、MDS に特徴的な分子病態は分かっていない。そこで、高速シーケンス技術を用いた全エクソン領域の配列決定による網羅的な変異遺伝子の探索を行い、MDS の治療標的分子となり得る新規原因遺伝子の同定を目指した。

B. 研究方法

本研究目的に新規に収集された 29 例の MDS および MDS 関連疾患患者の骨髄細胞および正常細胞（末梢血 T 細胞または口腔粘膜）よりゲノム DNA を抽出し、解析に用いた。全ゲノムよりエクソン領域をアジレント社 SureSelect キットにより選択的に濃縮し、イルミナ社のシーケンサーを用いて配列決定を行った。本研究目的に独自に開発した解析プログラム Genomon を用いて、同時に解析を行った MDS 細胞特異的（後天的）な変異を抽出し、サンガーシーケンスにより変異の確認を行った。

（倫理面への配慮）

検討に用いた検体は、当該患者からインフォームドコンセントを得たのちに連結可能匿名化を施して検討に用いた。当院の倫理委員会の承認済みである。

C. 結果

MDS29 例の全エクソン・シーケンスにより、MDS 細胞特異的な変異候補が同定され、サンガーシーケンスにより 268 個（9.2 個/例）のタンパクの構造変化を伴う体細胞性変異が

確認された。うち 235 個は遺伝子変異の報告がない新規変異遺伝子であった。複数例に共通して観察された変異の多くは既知の変異遺伝子であったが、16 例に *U2AF35*, *SRSF2*, *ZRSR2*, *SF3B1* などの RNA スプライシングに重要な遺伝子群に変異が生じていることが明らかとなった。多数例の骨髄系腫瘍における変異頻度を調べたところ、本異常は MDS 症例の半数以上に観察され、かつ排他的に存在した。一方で AML や MPN などの骨髄系腫瘍においては稀であった。中でも *SF3B1* 遺伝子の変異は、環状鉄芽球を有する MDS 病型の約 75% と高頻度かつ特徴的に認められた。今回の解析で同定された代表的な変異遺伝子を細胞株に遺伝子導入を行うと、変異体を導入した細胞では RNA スプライシングに異常が生じていることが観察された。

D. 考察

ゲノム解析技術は近年著しい進歩を遂げ、様々な疾患研究に用いられ、未知の遺伝子異常が急速に明らかとなりつつある。本研究により、MDS において RNA スプライシングに関わる一連の遺伝子群に後天的変異が高頻度に生じていることを明らかとした。これまでも、いくつかの遺伝子変異が MDS 症例において生じていることが報告されてきたが、その多くは AML などの骨髄系腫瘍でも観察され、また変異頻度も低かった。本異常は MDS において頻度が高いのみならず、特徴的であり、本成果により MDS の病態研究が大きく進展することが期待される。

RNA スプライシングは、DNA から RNA として情報が読まれ、タンパク質合成に至る過程において重要な機構である。癌や一部の難病で、通常では観察されないスプライシングをされた RNA が検出されることが知られているが、

スプライシングを司る分子の変異が報告されたのは初めてである。今回見出された変異によりスプライシングに変化が生じることは確認されたが、RNA スプライシング分子に異常を来すことにより何故MDSになるのか、現時点では不明であり、今後の課題である。RNA スプライシング分子の阻害剤が抗腫瘍効果を呈することが報告されており、基礎研究が進められている。後天的変異によりスプライシング機能の低下した異常細胞は、本薬剤に対して感受性が高い可能性があり、難治性疾患であるMDSに有効な治療薬となることも期待される。

E. 結論

次世代シーケンシング技術を活用した全エクソン・シーケンシングにより、MDSにおいてRNA スプライシング関連分子に高頻度に変異が生じていることを明らかとした。本発見によりMDSの分子病態が明らかとなり、有効な治療法の開発が進むことが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M, Chalkidis G, Suzuki Y, Shiosaka M, Kawahata R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Ishiyama K, Mori H, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Sugano S, Haferlach C, Koeffler HP, Shih LY, Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S.: Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. Nature. 2011;478:64-9
- 2) Takita J, Yoshida K, Sanada M, Nishimura R, Okubo J, Motomura A, Hiwatari M, Oki K, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S.: Novel splicing-factor mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. Leukemia. 2012

Feb 20.

2 学会発表

- 1) Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M, Chalkidis G, Suzuki Y, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Ishiyama K, Mori H, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Sugano S, Haferlach C, Koeffler HP, Shih LY, Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S.: Frequent Pathway Mutations of Splicing Machinery in Myelodysplasia 53rd American Society of Hematology Annual Meeting.
- 2) Nagata Y, Sanada M, Kon A, Yoshida K, Shiraishi Y, Sato -Otsubo A, Mori H, Ishiyama K, Sakata-Yanagimoto M, Obara N, Nagasaki M, Miyawaki S, Chiba S, Miyano S, Lee Yung S, Koeffler HP, Ogawa S.: Mutational Spectrum Analysis of Interesting Correlation and Interrelationship Between RNA Splicing Pathway and Commonly Targeted Genes in Myelodysplastic Syndrome. 53rd American Society of Hematology Annual Meeting.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特になし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

「MDSにおける末梢遊離DNAを用いた遺伝子変異及びエピジェネティクス異常解析」
に関する研究

分担研究者 直江 知樹 名古屋大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科学 教授

研究要旨

骨髄異形成症候群（MDS）の病勢進行はしばしば緩徐である。病状および治療効果の把握には、末梢血検査所見の他、骨髄穿刺による芽球数、形態異常、遺伝子異常の確認が必要である。本研究においては、MDSにおける遺伝子およびエピジェネティクス異常を低侵襲で簡便に、経時的に検討する方法として、末梢血遊離DNA(PC-DNA)を用いたゲノム・エピゲノム解析法の確立を目的とした。末梢血血漿、血清より精製したDNAはクロマチン構造を背景として断片化され、その濃度は骨髄芽球数に相関する傾向が示唆された。PC-DNAを用いた遺伝子変異解析が可能であり、特定遺伝子変異の存在割合は骨髄中幹細胞分画における存在比率を反映する傾向が示唆された。また、特定遺伝子プロモーターのメチル化測定も可能であることが確認された。

A. 研究目的

MDS細胞におけるゲノム・エピゲノム異常を、簡便かつ低侵襲に経時的に観察することを可能とするため、末梢血血漿・血清中に存在する遊離DNA(PC-DNA)に着目し遺伝子解析法を確立する。

B. 研究方法

MDS患者より採取された血漿及び血清より遊離DNAを抽出し、目的とする遺伝子部位をPCR法にて増幅した後、パイロシークエンス法を用いて変異解析を行う。また、遺伝子をバイサルファイト処理した後パイロシークエンス法を施行し、プロモーター部位のCpGメチル化の割合を定量化する。

(倫理面への配慮)

検体採取とその保存、研究目的使用に関する同意を文書により取得した後に検討を行った。遺伝子解析を含む本研究内容は、当院倫理委員会にて承認を得ている。

C. 研究結果

MDS患者の骨髄細胞を用いたSNPアレイ

解析にて異常を認められた症例から *TET2* 遺伝子変異を同定した。骨髄細胞を抗CD34, 抗CD38抗体を用いてCD34(+)/38(-), CD34(-)/CD38(+), CD34(-)/CD38(-)の各分画にソーティングし、それぞれの分画に存在する *TET2* 遺伝子変異の割合を解析した。また経時的に採取された骨髄検体を用いて、同様の検討を行った。血漿・血清遊離DNAを用いて *TET2* 遺伝子変異をパイロシークエンス法にて検討したところ同一の変異が検出され、その存在割合は骨髄細胞を用いた解析と同様の傾向であることが確認された。また、*p15* 遺伝子プロモータを用いたメチル化解析では、血漿・血清遊離DNAを用いた際のメチル化存在割合の結果は骨髄細胞より得られた結果と同様の傾向を示した。これらのことから、末梢血遊離DNAにおける変異やメチル化の傾向は、骨髄細胞の状態をある程度反映することが示唆され、経時的観察において骨髄細胞の代用と

なりうる可能性が示唆された。

D. 考察

MDS の発症のみならず、病勢進行や薬剤に対する感受性を決定づける変異の探索は、種々の遺伝子変異の報告が蓄積して来た背景を踏まえると、今後の極めて重要な検討課題となることが予想される。末梢血遊離 DNA を用いた遺伝子解析技術は、骨髄細胞を用いた解析に比べて経時的な検体の収集を圧倒的に容易とし、また検体の郵送や保存など、その取り扱いがより簡便なものとなる。今後、アザシチジンなど MDS に対する新たな臨床研究を施行するにあたり、治療効果の経時的フォローアップや薬剤感受性を決定づける遺伝子変異の確認など、経時的に採取された検体の解析の重要性が更に増してくることが予想される。このような状況において末梢血遊離 DNA の解析は、各施設から治療経過とともに採取された経時的検体をより簡便に効率よく集積させるために、極めて有用な技術の一つとなる可能性がある。

E. 結論

血漿・血清遊離 DNA を用いた MDS の遺伝子解析は、骨髄細胞における遺伝子異常をある程度反映し、低侵襲で簡便な検体採取、解析法となり得る。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Sugimoto T, Tomita A, Abe A,

Iriyama C, Kiyoi H, and Naoe T. Chimeric antisense RNA derived from chromosomal translocation modulates target gene expression. *Haematologica*. 2012. (in press)

(2) Iriyama C, Tomita A, Hoshino H, Adachi-Shirahata M, Furukawa-Hibi Y, Yamada K, Kiyoi H, Naoe T. Using peripheral blood circulating DNAs to detect CpG global methylation status and genetic mutations in patients with myelodysplastic syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;419:662-9.

(3) Tomita A, Shirasugi Y, Ito T, Tsurumi H, Naoe T. Extravascular hemolytic attack after eculizumab therapy for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Ann Hematol*. 2011 Nov 15.(in press)

(4) Goto E, Tomita A, Hayakawa F, Atsumi A, Kiyoi H, Naoe T. Missense mutations in PML-RARA are critical for the lack of responsiveness to arsenic trioxide treatment. *Blood*. 2011;118:1600-9.

2. 学会発表

(1) Takashi Tokunaga, Akihiro Tomita, Junji Hiraga, Takumi Sugimoto, Kazuyuki Shimada, Keiki Sugimoto, Tomohiro Kinoshita, Tomoki Naoe CD20 Protein Immunohistochemistry-Positive / Flow Cytometry -Negative Diffuse

- Large B-Cell Lymphoma—Analyses of the Molecular Mechanisms and Rituximab Effectiveness. The American Society of Hematology, 53th Annual Meeting, Dec. 11, 2011, San Diego, CA, USA
- (2) Chisako Iriyama, Akihiro Tomita, Takashi Tokunaga, Keisuke Sugiyama, PJunji Hiraga, Tomohiro Kinoshita, Tomoki Naoe Clinical Significance of Genetic Mutations of *CD79B*, *CARD11*, *MYD88*, and *EZH2* Genes in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Patients. The American Society of Hematology, 53th Annual Meeting, Dec. 11, 2011, San Diego, CA, USA
- (3) Chisako Iriyama, Akihiro Tomita, Hideki Hoshino, hitoshi Kiyoi, Tomoki Naoe. Genetic Mutations And Promoter Methylation in MDS Patients Can Be Detected In The Circulating DNA By Pyrosequencing Strategy. JSH International Symposium, Apr. 23, 2011, Nagasaki, Japan
- (4) 後藤絵美、富田章裕、早川文彦、渥美晃秀、清井仁、直江知樹、PML-RARA のミスセンス変異は亜ヒ酸治療抵抗性に関与する、第 71 回 日本血液学会総会、(口演)、2011 年 10 月 16 日、名古屋
- (5) 徳永隆之、富田章裕、島田和之、杉本匠、平賀潤二、中村栄男、木下朝博、直江知樹、CD20 IHC(+)/FCM(-) B リンパ腫細胞の分子生物学的意義とリツキシマブ治療の妥当性の検討、第 71 回 日本血液学会総会、(口演)、2011 年 10 月 16 日、名古屋
- (6) 入山智沙子、富田章裕、徳永隆之、杉山恵亮、平賀潤二、木下朝博、直江知樹、DLBCL における *EZH2*, *CD79B*, *CARD11* 遺伝子変異の意義、第 71 回 日本血液学会総会、(口演)、2011 年 10 月 16 日、名古屋
- F. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)
1. 特許取得
該当無し。
 2. 実用新案登録
該当無し。
 3. その他
なし。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

13q 欠失を伴う骨髄不全の病態解析

研究分担者 中尾眞二 金沢大学医薬保健研究域医学系細胞移植学 教授

研究要旨： WHO分類において中間リスクの核型異常と定義されている13q欠失（13q-）の臨床的意義を明らかにするため、13q-陽性骨髄不全22例の臨床像と予後を検討した。骨髄には明らかな形態異常がないことから、診断は全例がMDS-Uであった。骨髄不全の免疫病態を反映するPNH型血球の増加は、13q-単独異常の16例では全例、付加的染色体異常を伴う6例では50%に認められた。免疫抑制療法は単独陽性例14例、付加的異常を伴う例の5例で施行され、有効率はそれぞれ100%、40%であり、各々の10年生存率は83%、67%であった。7例を対象としてSNPアレイを行ったところ、13q13.3 から13q14.3にかけて共通欠失領域があることが明らかになった。以上の所見から、13q-を伴う骨髄不全は、免疫病態による良性の骨髄不全であり、MDSとしてではなく再生不良性貧血として扱うべきであることが示唆された。

A. 研究目的

骨髄不全の患者では、7q 欠失や13q 欠失（13q-）などの染色体の数的異常がしばしば認められるが、骨髄異形成症候群（MDS）のWHO2008分類では、そのような骨髄不全は形態異常が乏しくてもMDS-unclassified（MDS-U）と定義されている。13q 欠失についてはこれまでに多数例の検討はないにもかかわらず、WHO分類では中間リスクの核型異常と定義されている。

一方、13q-は、骨髄が低形成で形態異常を認めない典型的な再生不良性貧血においても時に検出され、このような例は免疫抑制療法に対してむしろ反応しやすく、予後も良好であることを我々は以前に報告した。また、PNH形質の血球（PNH型血球）が検出される頻度を、染色体異常の種類別に検討した我々の検討では、8トリソミーや20q 欠失陽性例などと比べて、13q-陽性例におけるPNH型血球の陽性率は特に高値（73%）であった（Sugimori Net al, Blood ; 114: 447a, 2009

）。したがって、13q-は前白血病状態と

いうよりも、骨髄不全の免疫病態を反映している可能性がある。

そこで、13q-の臨床的意義を明らかにするため、多数の骨髄不全症例を対象として、臨床像と予後を検討した。

B. 研究方法

1999年5月から2010年6月にPNH型血球検査のため金沢大学血液内科に紹介された骨髄不全症例1228例を対象とし、13q-例の頻度、臨床像、PNH型血球の保有率、免疫抑制療法の反応性を検討した。また、DNAの入手が可能であった7例については、金沢大学ヒトゲノム解析研究倫理審査委員会の承認と患者の同意を得たのちAffymetrix 250K SNP arrayを行い、共通して欠失している遺伝子領域を同定した。実際の解析は、東京大学キャンサーボード小川誠司准教授の研究室で行われた。

C. 研究結果

13q-例は22例（1.8%）に認められ、その22例中13q-単独異常は16例、付加的異常を伴う例は6例であった。骨髄には