

201128157A

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

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 黒川 峰夫

平成24（2012）年5月

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

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 黒川 峰夫

平成24（2012）年5月

## 目次

### I. 総括研究報告書

特発性造血障害に関する調査研究	黒川 峰夫	1
資料1 班員構成および研究領域		33

### II. 分担研究報告書

・鉄過剰症モデルマウスを利用した過剰鉄の造血に与える影響の解析	小澤 敬也	37
・新規補体阻害剤（エクリズマブ）治療のPNH患者における血管外溶血顕在化の解析	金倉 譲	41
・「DNAメチル化酵素阻害剤治療効果に関わる因子の探索」に関する研究	直江 知樹	43
・HLA-A アレル欠失血球とHLAクラスIアレルの偏りからみた肝炎関連再生不良性貧血の特 殊性	中尾 眞二	45
・ABO-major 不適合ドナーからの同種造血幹細胞移植後に発症する赤芽球癆の後方視的疫学 研究	澤田 賢一	47
・本邦の原発性骨髄線維症の臨床像	赤司 浩一	49
・骨髄異形成症候群の国際予後スコアリングシステム改訂	宮崎 泰司	51
・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 に関する研究	高折 晃史	54
・骨髄異形成症候群に対する同種造血幹細胞移植後の移植関連合併症の予測に関する研究	岡本 真一郎	57
・造血障害を来す先天性疾患患者からの疾患特異的 iPS 細胞の樹立	中畑 龍俊	60
・臨床調査個人票による再生不良性貧血の基本的疫学特性の観察	太田 晶子	64

### III. 研究協力者報告書

・移植片対宿主病が骨髄における造血およびその微小環境に及ぼす影響の検討	今村 雅寛	71
・閉経に伴って血小板数の正常化を認めたMPL変異陽性の本態性血小板血症（ET）の1症例	大橋 春彦	73
・小児の骨髄異形成症候群（MDS）の研究	真部 淳	75
・自己免疫性溶血性貧血の免疫動態の検討：ST2の動態	亀崎 豊実	78
・造血におけるTET2の機能解析	下田 和哉	80
・GPIアンカー欠損症の解析	木下 タロウ	82

・骨髄異形成症候群を含む赤芽球低形成～無形成患者における CD8 <sup>+</sup> /Perforin <sup>+</sup> T 細胞の増加 はシクロスポリン療法の反応を予見する	木村昭郎	84
・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	高後 裕	86
・小児骨髄不全症における中央診断事業	小島 勢二	91
・JAK2 遺伝子変異の高感度検出	小松 則夫	93
・家族性血小板異常症由来誘導多能性幹細胞(iPS 細胞)の樹立	市川 幹	95
・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	谷本 光音	98
・不全型先天性角化不全症の新規診断法の開発	檀 和夫	100
・骨髄異形成症候群におけるゲノムおよびエピゲノムの解析	千葉 滋	104
・長期補体欠損における発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) 病態の解析	中熊 秀喜	107
・日本における後天性鉄芽球性貧血の病態	張替 秀郎	109
・del(5q)を伴う骨髄異形成症候群に対するレナリドミド療法：細胞形態学と細胞遺伝学を 中心とした検討	松田 晃	110
・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	松村 到	112
・小児科領域；先天性造血障害の診断システムの構築と、疾患別の至適移植方法の確立	矢部 普正	119
・わが国の再生不良性貧血患者の治療状況	島田 直樹	123
・「骨髄異形成症候群の病態に関わる遺伝子発現調節異常」に関する研究	富田 章裕	132
IV. 班会議関係資料		
平成 23 年度第 1 回班会議総会プログラム		135
平成 23 年度第 2 回班会議総会プログラム		139
V. 研究成果の刊行に関する一覧表		
145		
VI. 研究成果の刊行物・別刷		
177		

# I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
総括研究報告書

特発性造血障害に関する調査研究

研究代表者：黒川 峰夫（東京大学大学院医学系 血液腫瘍内科学・教授）

研究要旨

本研究班では、再生不良性貧血（再不貧）、溶血性貧血、不応性貧血（骨髄異形成症候群：MDS）、骨髄線維症の4疾患を主な対象として疫学・病因・病態・診断・治療・予後などを包摂した研究を推進してきた。

再生不良性貧血の領域では、高頻度欠失 HLA クラス I アレルの意義とそれによって提示される自己抗原を同定するため、免疫機序の関与が濃厚な肝炎後再生不良性貧血（HAA）症例を解析し、4つのアレルによって提示される自己抗原が発症に強く関与していることを示した。ABO 不適合同種造血幹細胞移植後の赤芽球癆の調査研究を終了した。日本人におけるリンパ球サブセットの標準値設定を報告した。再生不良性貧血の臨床調査個人票を解析し、2009年度の受給者の特性、および、治療、治療効果の実態について明らかにした。

溶血性貧血の領域では、発作性夜間血色素尿症（PNH）に関して、国際 PNH 専門家会議において患者登録や情報交換を行った。日本 PNH 研究会と連携し、診断検査の一元化、全国規模の患者登録体制の確立を進めた。新規補体阻害剤の妊娠管理、適正投与間隔の検討、本邦不応例の解析を行った。PNH クローン拡大機序に関する研究を継続した。

骨髄異形成症候群の領域では、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・追跡調査を進めた。骨髄異形成症候群についての新たな予後因子探索ならびに予後予測スコアリング作成の国際プロジェクトに参加した。DNA 脱メチル化剤治療を施行された MDS 患者の末梢血遊離 DNA のメチレーションの変化率が単核球における変化よりも急速である可能性を示した。またヒストン修飾関連因子の発現が治療進行により発現量の正常化が認められる可能性を示した。低リスク MDS に対する DNA 脱メチル化剤の評価を行う臨床研究のプロトコールを作成した。鉄過剰症の臨床研究を進め、モデルマウスの解析によって鉄過剰症が骨髄微小環境へ影響することを見いだした。

骨髄線維症の領域では、前方視的症例登録を継続している。治療法選択のための予後予測として、診断時の層別化に加えダイナミックモデルの検討を行い、本邦の患者にも適応できることを示した。

## 研究分担者

小澤 敬也

自治医科大学 内科学講座血液学部門 教授

金倉 譲

大阪大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学 教授

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 教授

澤田 賢一

秋田大学大学院医学系研究科 血液・腎臓病・膠原病内科学分野 教授

赤司 浩一

九州大学大学院医学研究院 病態修復内科学 教授

宮崎 泰司

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科附属原爆後障害医療研究施設分子医療部門分子治療研究分野 教授

高折 晃史

京都大学医学研究科医学専攻 臨床医学系 内科学講座 血液・腫瘍内科学研究分野 教授

岡本 眞一郎

慶應義塾大学医学部血液内科 教授

中畑 龍俊

京都大学 iPS 細胞研究所 臨床応用研究部門 疾患再現研究分野 特定拠点 教授

太田 晶子

埼玉医科大学医学部公衆衛生学 専任講師

研究を進展させつつ、先進性や国際化の視点を取り入れて本領域の疫学・病因・病態・診断・治療・予後などを包摂した研究を推進する。わが国を代表する専門医の力を結集し、疫学の専門家、全国の診療施設や関係学会の参加の下に、小児・成人にわたり本疾患群の全容解明を目指して基礎・臨床双方からのアプローチと大規模な研究推進を行うことが、本研究の特徴である。具体的には、これまでの調査に基づき赤芽球癆の治療法を確立するとともに、移植後赤芽球癆などの病態解明に取り組む。再不貧患者の約10%で造血幹細胞の特定のHLAアレルが欠失することを手がかりに再不貧発症の自己抗原の同定を行う。MDSについて一元的な多施設症例登録と中央診断制度を構築し、診断の統一と症例の追跡・解析を行う。現在進行中の予後予測システムに関する国際共同研究にわが国を代表して参加する。MDS発症前の血液異常からの病態進展リスクを予測することを目指す。また難治性造血障害の患者からiPS細胞を作製し、病態解明を推進する。骨髄線維症については造血細胞だけでなく、間質細胞が病態形成に果たす役割を解明する。病態研究についてはMDS重点研究班とも密接に連携して行う。また本領域では新規治療法が数多く登場しつつあるため、本研究では国際的な視点とわが国の実状に即した視点の双方から新規治療法の適切な使用方法や効果を予測する因子を探索する。具体的には発作性夜間血色素尿症に対する補体阻害薬の使用法、輸血後鉄過剰症の臓器・造血障害に対する鉄キレート剤の改善効果、MDSに対するDNAメチル化阻害剤、レナリドミドの病型別効果などを検討する。造血幹細胞移植の適応や移植前後の治療法について、関係学会とも連携して検討する。これらの知見に基づき、現造血障害班から発表予定の疾患別「診療の参照ガイド」を必要に応じて改訂し、全国の診療施設で利用可能とする。

## A. 研究目的

再生不良性貧血（再不貧）、溶血性貧血、不応性貧血（骨髄異形成症候群：MDS）、骨髄線維症の4疾患を主な対象として調査研究を進めてきた「特発性造血障害に関する調査研究班（造血障害班）（研究代表者 小澤敬也）」が平成22年度で終了した。本領域では新たな疾患概念が明らかになる一方で、未解決の課題も数多く残され、疾患の実態把握や的確な診断・治療法の確立がより一層求められている。そこで本研究班では今までの調査

## B. 研究方法

本領域でわが国を代表する専門家に、研究分担者・研究協力者として全国から参加を得て、密接な連携のもとで全国規模の共同研究を推進した。全国の主要病院、日本血液学会、日本造血細胞移植学会、日本小児血液学会など関連諸学会の協力を得た。また厚生労働科学研究費補助金難治性疾

患克服研究事業の「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）」とも密接に連携した。全国の施設から参加者を得て班会議総会を年2回開催した。

## 1. 再生不良性貧血（再不貧）・赤芽球癆

① 肝炎関連再生不良性貧血 (hepatitis-associated aplastic anemia, HAA) における免疫病態を明らかにするため、HAA17例を対象として、6番染色体短腕の uniparental disomy (6pUPD) による HLA-A アレル欠失血球の存在と、欠失 HLA ハプロタイプに高頻度に含まれる4つのクラス I アレル (HLA-A\*02:01, A\*02:06, A\*31:01, B\*40:02) の保有頻度を検討した。2010年3月以降、金沢大学を受診し、HLA-A アレル欠失血球の有無が SNP アレイまたはフローサイトメトリーで検索された328症例を対象とした。このうち、特発性 AA は311例、HAA は17例であった。全例で HLA アレルを決定した。HLA アレル頻度の比較対照として、日本骨髄バンクに登録された健康ドナーの HLA データを用いた。

② ABO-major 不適合ドナーからの同種造血幹細胞移植後に発症する赤芽球癆に対する診療ガイドを作成することを目的とし、日本造血細胞移植学会が管理するデータベース (TRUMP) に登録されている2,846例の ABO-major 不適合移植症例から赤血球造血回復遅延症例145例を抽出し、当該移植施設へ診断の確認と2次アンケート調査に関する協力依頼を行った。研究協力の同意の得られた施設に調査票を送付し、回答の得られた46例の移植後赤芽球癆のコホートが確立された。

③ 再生不良性貧血の性、年齢、発病年齢、病型、重症度などの基本的疫学特性を、個人票を利用して明らかにすることを目的とし、2011年8月現在電子入力済みの、2003年度から2010年度までの再生不良性貧血の個人票を調査した。個人票は厚生労働省に文書で利用申請し、使用許可を得た。新規申請患者、更新申請患者の各々について、1. 各治療法の選択状況、2. 年齢、発病後年数、病型、重症度と各治療法の選択状況との関連、3. 各治療法の効果を検討した。

④ 先天性角化不全症 (DKC) や不全型 DKC の診断は、テロメア長の短縮化を検索することが有用である。テロメア長の短縮化の検索法として Real time PCR 法の有用性を検討した。対象は DKC1 症例、不全型 DKC2 症例、同世代の健康人13人。検量線は

Flow FISH 法との比較をすることが容易になるように1301細胞から抽出したDNAを用いた。

## 2. 溶血性貧血

① 発作性夜間血色素尿症 (PNH) に関して、エクリズマブにより PNH の血管内溶血は著明に抑制されるものの、貧血の改善が十分でない症例が存在する。そのことより赤血球膜のオプソニン化によって血管外溶血が顕在化している可能性が考えられ、それを検証するために、オプソニン化に関与する C3b の赤血球膜への蓄積を経時的に検討した。エクリズマブ投与中 (4例) または投与予定 (2例) の PNH 症例、エクリズマブ非投与の PNH 症例 (5例)、健康コントロール (5例) を対象に、赤血球膜上への C3b の蓄積を検討した。抗体は、FITC-conjugated anti-C3 Ab、PE-conjugated anti-CD59 Ab を用いた。

② 炎症やアレルギーのマーカーの1つである ST2 の血中濃度は、AIHA の病態を反映している可能性が示唆される。それを検証するため、自治医科大学附属病院に赤血球結合 IgG 定量を依頼され、1年後の主治医へのアンケートにより溶血性貧血患者と診断された症例 (20歳以上、かつステロイド治療前) から、Coombs 陽性 AIHA 群20例、Coombs 陰性 AIHA 群86例、非 AIHA 群17例を抽出した。検査依頼時の血液生化学検査結果、ならびに赤血球結合 IgG 量、ELISA 法により測定した ST2 血中濃度について3群間で比較検討した。白血球分画については、過去2年の63症例について再アンケートし、ST2 濃度と相関を検討した。

③ PNH における *HMG2* の発現上昇を伴う GPI 欠損細胞のクローナルな拡大に関わる新たな遺伝子を探索するため、末梢血の好中球のほぼ100%が GPI 欠損細胞で占められている PNH 患者の好中球と、正常コントロールのゲノム DNA をシーケンシングし、異常細胞由来のゲノム上にのみある変異を探索した。一方高アルカリフォスファターゼ (ALP) 血症・重度精神運動発達遅滞を特徴とする Mabry 症候群が GPI アンカー合成に必須な PIGV の遺伝子異常に起因する先天性 PIGV 欠損症であることが最近明らかになったが、その高 ALP 血症の発症機序を明らかにするために GPI アンカー型蛋白である胎盤型アルカリフォスファターゼ (PLAP) をレポーターとして PIGV 欠損あるいは他のステップの遺伝子欠損 CHO 細胞に発現させ活性測定により、培養液

中への遊離を解析した。また培養上清中の PLAP を精製しその切断部位を質量分析で解析した。  
④後期補体 C9 先天性欠損の日本人 PNH 症例を通して、エクリズマブが提起する長期の後期補体抑制の安全性や血管外溶血の分子病態などの検証を試みた。

### 3. 骨髄異形成症候群(MDS)

①本研究班参加施設において新規に診断された再不貧、MDS、ならびに診断困難な血球減少症を前方視的に登録し、1年ごとに追跡調査を行っている。登録例のうち骨髄の芽球割合が5%未満の症例については、骨髄ならびに末梢血塗抹標本と病理組織標本のセントラルレビューを行った。  
②IPSS の改訂作業が執り行われることとなり、日本を代表して本班もその作業に参加した。世界の18データベースよりMDSデータが収集された。初発、原則無治療例のデータである。国内からは埼玉医科大学データベース、特発性造血障害調査研究班データ、長崎大学データベースから合計439例のデータが提出された。各国から収集されたデータは統計解析によって無白血病生存期間、全生存期間にかかわる因子が抽出され、それらの組み合わせによるスコアリングシステムの作製が試みられた。  
③MDS 患者に対するアザシチジン治療の反応性を、治療開始前もしくは開始後のより早期に予測しうる因子を探索することを目的として、MDS 患者より採取された血漿及び血清から遊離 DNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動にてその状態を確認した。また、血漿・血清遊離 DNA と末梢血単核球から採取されたゲノム DNA を用いて、LINE-1 遺伝子プロモーター CpG 部位のメチル化解析を行った。LINE-1 プロモーターのメチル化状態は細胞内のグローバルメチレーションの程度を反映すると報告されている。抽出された遊離 DNA をバイサルファイト処理後にパイロシーケンスを施行し、特定 CpG 部位のメチル化を定量化し、経時的に採取された検体間における変化の割合を統計解析した。複数の患者検体を用いて同様の解析を施行し、病勢進行やアザシチジン治療効果との関連性を検討した。  
④脱メチル化剤であるアザシチジンは、高リスク MDS に対して生命予後を延長することが示されているが、低リスク MDS におけるアザシチジンの有効性はよくわかっていない。そこで、血液学的改

善を主評価項目として臨床研究を計画した。

⑤家族性に骨髄造血不全をきたす疾患である家族性血小板異常症 (FPD) の検体から誘導多能性幹細胞 (iPS 細胞) を樹立することを目的にして患者の皮膚組織を培養してリプログラミング 4 因子 (MYC, SOX2, KLF4, OCT3/4) を導入した。

⑥過剰鉄が造血系に与える影響を検討するため、鉄過剰症モデルマウスの解析を行った。マウス腹腔内にデキストラン鉄を4週間かけて総量200 mg 投与し、鉄過剰マウスを作成した。そして得られた鉄過剰マウスより末梢血および骨髄を採取し、1. 末梢血血球数の変化、2. 骨髄内未分化造血細胞分画の変化、3. 造血幹細胞活性の変化を FACS および骨髄移植実験によって検討した。また、過剰鉄の骨髄微小環境への影響を調べるため、正常マウスから鉄過剰マウスへの移植実験を行い、生着の経過を観察した。さらに、鉄過剰が造血支持分子産生に与える影響を検討するため、骨髄内非血液細胞 (ストローマ細胞) における造血支持分子の発現を検討し、血清エリスロポエチン (EPO) 値、肝臓におけるトロンボポエチン (TPO) 産生についても検討を行った。

⑦T 細胞の役割を明らかにするため赤芽球低形成～無形成患者の T 細胞サブセットと治療反応性について解析した。22 例の赤芽球低形成～無形成を伴う疾患群の骨髄か末梢血単核球を分離、シクロスポリン奏功群と非奏功群の治療前の T 細胞サブセットを比較した。

⑧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った。

⑨再生不良性貧血の鑑別が困難な症例に注目し骨髄異形成症候群と診断され種々の期間診療が行なわれていた患者8例について、骨髄単核球 DNA の全エクソンシーケンスを行い、骨髄形態との対比を行なった。

⑩日本における後天性鉄芽球性貧血の病態を調査票による臨床データの解析によって明らかにした。

⑪del(5q)を伴うMDS患者11例を対象にレナリドミド (Len) の貧血改善効果、細胞形態学的効果、細胞遺伝学的効果を前方視的に検討した。

⑫染色体相互転座の転座部位より発現するキメラ遺伝子産物がアンチセンス RNA として機能し、

標的遺伝子発現をノックダウンさせる可能性を検証した。

#### 4. 骨髄線維症

①本邦における原発性骨髄線維症の臨床像、予後を明らかにするために、日本血液学会認定施設を対象に、原発性骨髄線維症と新規診断した症例をアンケート調査により集積した。1999年以降の診断例に関し、予後調査を行った。臨床情報、予後をもとに、原発性骨髄線維症のリスクファクター、予後予測の検討をおこなった。

②JAK2 遺伝子変異を高感度に検出可能な新規技術を検討した。

③TET2 遺伝子の、造血における機能を明らかにするために、トラップベクターが *TET2* のイントロン 2 に挿入されている Ayu17-449 マウス（胎性致死）の胎生 14.5 日の肝細胞 (E14.5 FL) を用いて、TET2 発現、酵素活性、造血能の解析を行った。

④MPL 遺伝子変異を有する ET 患者の経過中に血小板数の正常化（自然寛解）を認めた患者の改善の機序を明らかにするために、改善後の MPL 遺伝子の変異解析を行った。

#### 5. 造血幹細胞移植

①MDS を含む造血器腫瘍の移植前の臓器障害の程度が移植成績に及ぼす影響を前向き臨床試験として検証するために、2007年8月から2009年7月までに、関東造血幹細胞移植共同研究グループ (KSGCT) に参加する 14 施設で同種造血幹細胞移植を施行されたすべての症例を、移植に関連する様々な情報（移植前処置、造血幹細胞ソース、GVHD 予防、移植対象疾患と病期など）とともに HCT-CI スコアとともに移植前に登録し 2 年間の経過観察を行った。研究の実施にあたっては各参加施設の承認を得た。

②移植片対宿主病が骨髄における造血およびその微小環境に及ぼす影響の検討を行うため、北海道大学病院において同種造血細胞移植を受けた 28 症例で、骨髄生検を施行後、HE 染色、CD56 染色にて骨芽細胞を同定し、臨床経過、血球の推移と併せて検討した。

③骨髄非破壊的前処置の有用性を検討するために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 に対する骨髄非破壊的前処置を用いた同種造血細胞移植の成績を解析した。

#### 6. 小児科領域

①造血障害をきたす様々な疾患の患者から iPS 細胞の樹立し、造血障害の病態を解析し、新規治療法の開発を目的とした。正常ヒト iPS 細胞から安定して血球系へ分化させる培養法を確立するため、血清やフィーダー細胞の有無、培養液の種類、サイトカインの種類と添加時期などについて検討した。各種先天性造血障害を持つ患者の皮膚を生検により採取し、培養にて線維芽細胞のストックを作成した。iPS 細胞の樹立は、標準的手法である 4 因子 (Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2) をレトロウイルスベクターやセンダイウイルスベクターで導入する方法でおこなった。この方法で樹立不能な例では最近開発されたエピゾーマルベクターを試みた。また、樹立困難例では線維芽細胞段階で遺伝子修復後、iPS 細胞の樹立を試みた。

②小児期発症の造血障害の頻度や病態を解析して至適移植時期を検討するために、東海大学小児科・細胞移植科にて行った 124 例の再生不良性貧血 (AA) に対する移植を検討した。対象の内訳は先天性 AA ではファンコニ貧血 (FA) が 58 例、先天性角化不全症 (DKC) が 4 例、ダイヤモンドブラックファン貧血 (DBA) が 3 例、後天性 AA が 57 例であった。

③RCC (Refractory cytopenia of Childhood) は、WHO2008 で提起された小児特有の病型である。当該疾患が国内にどの程度存在するかを把握することを試みた。

④再生不良性貧血 (AA)、骨髄異形成症候群 (MDS) および先天性骨髄不全症候群 (CBFS) を対象とした中央診断事業を行った。

#### (倫理面への配慮)

全国規模の臨床情報の調査にあたっては、「疫学研究に関する倫理指針」に基づき、患者の人権擁護と個人情報保護の観点から資料の収集と取り扱いに十分留意する。公費負担対象疾患の臨床調査個人票データの取り扱い保管は、評価委員会の勧告に従う。前方視治療研究、病態研究では、「臨床研究に関する倫理指針」に基づき、研究者の所属施設毎に施設内倫理審査委員会に諮り、事前に承認を得る。その他の医学研究あるいは患者検体の収集と利用に関しては、十分な説明の上、患者の自由意思による同意（インフォームド・コンセント）を取得する。ヒト遺伝子解析研究に該当する

場合は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守する。治療研究に伴う健康被害対策としては、班研究者は医師賠償責任保険に加入する。研究の進行中に遭遇した重大な健康危険情報に関しては、研究代表者を通じて速やかに報告することを周知徹底する。

また実験動物を用いた研究については、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」に基づき、動物愛護の観点から適切な対処法を講ずるなど、所属施設の動物実験指針規定に沿って行う。

## C. 研究結果

### 1. 再生不良性貧血（再不貧）・赤芽球癆

①HLA 欠失血球陽性例の頻度は、AA では 311 例中 40 例（13%）であったのに対して、HAA では 17 例中 5 例（29%）と有意に高頻度であった（ $P=0.05$ ）。一方、HLA-A\*02:01、A\*02:06、A\*31:01、B\*40:02 の 4 アレルの少なくとも一つを保有している例の割合は、AA では 311 例中 190 例（61%）、HAA では 26 例中 19 例（73%）と、HAA で保有率がより高い傾向がみられた。また、それぞれが健常対照者（4091 例中 1491 例、36%）よりも有意に高値であった（ $P<0.001$ ）。したがって、HAA においては、ハイリスクアレルによって提示される造血幹細胞抗原に特異的な CTL が、骨髄不全の発症に特に強く関与していることが示唆された。また、免疫抑制療法の前後で経過を観察できた 2 症例において、HLA 欠失顆粒球割合の推移を見たところ、造血が回復したにもかかわらずその割合は不変であった。したがって、造血幹細胞抗原特異的 CTL は再不貧発症の初期相においてのみ造血幹細胞の減少に関与しており、その後の造血抑制に関与しているのはサイトカインのような非特異的な因子であると考えられた。

② ABO-major 不適合ドナーからの同種造血幹細胞移植後に発症する赤芽球癆に対する輸血以外の治療として免疫抑制薬の急速減量、副腎皮質ステロイドあるいは免疫抑制薬の追加などが 22 例に実施されていた。これらの治療による奏効率は 54.5%であったが、網赤血球数回復に要する日数および総輸血量は治療介入の有無により差がみられなかった。移植後赤芽球癆症例の生存率に負の影響を与える因子として、男性患者、重症急性 GVHD、慢性 GVHD、原病の悪化および赤芽球癆に対する治療介入の 5 因子が単変量解析により抽出さ

れたが、多変量解析により移植後赤芽球癆に対する治療が唯一生存に影響を与える有意な因子であることが判明した。赤芽球癆に対する治療介入群（22 例）および非介入群（24 例）における死亡はそれぞれ 11 例、2 例であり、介入群における死因は 11 例中 7 例が感染症に関連していた。

③再生不良性貧血の個人票を用いて、基本的臨床疫学特性を観察した。その結果、以下の事項がわかった。入力率は 2009 年度が 79%と最も高く、その他の年度は 50~70%であった。2009 年度の入力件数は 7,505（新規 1,015, 更新 6,490）であった。最近の新規受給者全数は年間約 1,200~1,700 と推計された。受給者の年齢は 30 歳代に小さなピークが認められ、65~79 歳でピークを示した。35 歳以降、年齢が高くなるに従い高齢では女が多くなって性比（女/男）は高くなっていった。発病年齢は 10~20 歳代と 60 歳代に明確なピークを示した。男女とも全体よりも新規で発病年齢が高い者が多いことが分かる。病型は、新規で特発性 90.6%、2 次性 2.4%、特殊型 4.9%であった。肝炎後は男に多く若年に多い。PNH 症候群をとともなうものは、女に多く、高年に多い。Fanconi 貧血は若年に多い。重症度は、新規では Stage3、4、5（やや重症、重症、最重症）が 61.1%を占め、治療後の更新患者ではこれらは 16.5%と少なくなっている。発病後期間別の重症度をみると、発病後 1 年未満では Stage4、5（重症、最重症）が 50%を占めるが、1 年以降、2 年以降と経過とともに速やかに重症は少なくなり、発病後 3 年以降では変化が少ない。各治療法の選択状況は更新申請患者では新規申請患者に比較して、成分輸血、サイトカイン類といった支持療法が大きく減少し、免疫抑制療法も減少していた一方で、経過観察、アンドロゲン療法、造血細胞移植療法が増加していた。病型別にみた治療状況は二次性は特発性に比較して経過観察、造血細胞移植療法が少なく、支持療法（成分輸血、サイトカイン類）が多かった。

④Southern blotting 法によるテロメア長測定では、DKC 症例と不全型 DKC 症例は age match コントロールと比較して明らかにテロメア長の短縮を認めた。またもう一例の不全型 DKC 症例は、age match コントロールと比較して軽度のテロメア長の短縮を認めた。Real time PCR 法によるテロメア長測定では、DKC 症例と不全型 DKC 症例は age match コントロールと比較して明らかにテロメア

長の短縮を認めた。また Southern blotting 法と同様に不全型 DKC 症例は、age match コントロールと比較して軽度のテロメア長の短縮を認めた。

## 2. 溶血性貧血

①健常人では CD59 陰性細胞 (PNH 型血球) はなく、C3b の蓄積も認めない。エクリズマブ非投与の PNH 症例 (投与前の PNH 症例) では、CD59 陽性細胞と陰性細胞いずれにおいても C3b の蓄積を認めなかった。投与症例では、程度の差はあるものの全例において、CD59 陰性細胞分画中に C3b の蓄積が確認された (1.8-39.8%)。投与前から経過観察できた 2 例では、投与後から経時的に CD59 陰性分画中に C3b の蓄積が増強することが確認された。さらに、投与中の症例も含めた 6 例について、15 ヶ月の間隔をあけて解析したところ、全例で CD59 陰性分画中における C3b 蓄積が増加していた。

②Coombs 陽性 AIHA 群、Coombs 陰性 AIHA 群、非 AIHA 群の 3 群間で、ST2、白血球数、Hb、赤血球結合 IgG 量は有意差を認めた。4 項目間では、白血球数と ST2 の間で正の相関が認められた。白血球各分画数と ST2 血中濃度との間では、好中球が ST2 濃度と正の相関を示し、好酸球は負の相関を示した。

③GPI 欠損細胞のクローナな拡大に関わる遺伝子探索については 2 例のシーケンスを終え、現在解析中である。先天性 PIGV 欠損症における高 ALP 血症の機序については、PLAP の遊離にはタンパク質 C 末端の GPI アンカー付加シグナルを切断し、GPI アンカーと置き換える GPI トランスアミダーゼが働くことが明らかになった。すなわち GPI アンカー欠損下では PLAP のタンパク部分がその ω サイトで GPI トランスアミダーゼによって切断されるものの、GPI が付加されないために一部が培養液中に遊離されることが明らかになった。培養液中への遊離はマンノースを含む GPI 中間体が蓄積する PIGV 以降の後期の GPI 生合成遺伝子の欠損で、効率よく起こり、トランスアミダーゼの欠損株では全く起こらなかった。

④1972年に発見された先天性 C9 欠損合併 PNH の患者は、僅かな血管内溶血に加えて潜在的血管外溶血の共存があるものの、良質の生活を一貫して堅持していた。このことは、30年以上の長期の、また高齢の PNH 患者における C9 欠損 (およびエクリズマブ) による後期補体抑制の安全性と有効性を支持する。またこの患者ではステロイド反応性の軽度の造血障害がみられた。全血球は単一 PNH ク

ローン由来で、単一クローンのみによる造血が 13 年以上維持されていた。

## 3. 骨髄異形成症候群

①<症例登録>総患者登録数は 168 例となった。施設診断別登録数は、再不貧 38 例、MDS 113 例、診断不能・その他 16 例であった。

<セントラルレビュー>本年度からは、登録症例数の増加に対応できるようにセントラル・レビュー担当施設を 2 施設から 6 施設 (埼玉医科大学、川崎医科大学、長崎大学、東京大学医科学研究所、自治医科大学、京都大学) に拡大した。それぞれの症例について 2 施設の専門家が形態診断を行い、診断が一致しない症例については年に 2 回行われる合同顕鏡会にて最終診断を行った。平成 24 年 3 月末までに 103 例のセントラルレビューが終了し、その結果は各施設に随時報告されている。

<追跡調査>平成 23 年末に、登録症例の追跡調査を行い、116 例についての追跡情報が得られている。施設診断で再不貧あるいは低リスク MDS とされてセントラルレビューが行われた症例のうち 5 例が ICUS (意義不明の特発性血球減少症)、7 例が再不貧と MDS との判別困難とされた。これら ICUS+ 診断困難症例 (ICUS+) の臨床的な特徴について、再不貧 (n=25) および芽球増加を伴わない MDS である RCMD (n=28) と比較した。ICUS+ の発症年齢中央値は 71 歳で、これは再不貧の 57 歳、RCMD の 62.5 歳と比べて高かった。ICUS+ と RCMD は男性優位であったのに対して、再不貧は女性に多かった。また、ICUS+ と RCMD は診断時の血球減少の程度が再不貧に比較して軽度であった。これらの特徴から、診断時の ICUS+ は再不貧よりも RCMD に近い臨床像を呈していることが示された。PNH 血球陽性例は、これら 3 つのいずれの分類でもみられた。染色体異常は RCMD では半数以上にみられたが、ICUS+ および再不貧では各 1 例にみられたのみであった。ICUS+ の 12 例中、11 例で平均 2.5 年間の追跡情報が得られた。ICUS+ に対する治療は、7 例では経過観察あるいは輸血のみ、3 例ではシクロスポリン A または ATG による免疫抑制療法、1 例では輸血 + G-CSF 投与が行われていた。追跡期間中、2 例は免疫抑制療法で血球回復、2 例は自然回復、4 例は血球数が横ばい、3 例は血球減少が進行した。1 例では染色体異常が出現し、明らかな MDS へと移行した。

②7012例のデータが解析に用いられた。染色体核型の解析と予後の関連が調べられ、これまでに用いられてきた3群のグループ分け(良好、中間、不良)から、5群に分類する方法が採用されたこれによって生存期間の中央値はそれぞれ60.8ヶ月、48.6ヶ月、26ヶ月、15.8ヶ月、5.9ヶ月に分離できる。この他に因子として選ばれたのは骨髄芽球割合で、(2%以下、2%を超えて5%未満、5%以上10%以下、10%を超えて30%以下)の4群に分けられた。オリジナルのIPSSでは5%未満が2%を境にして二つに分けられたことになる。また、血球減少もヘモグロビン、好中球、血小板の値がオリジナルのIPSSと変更になった。また、患者年齢は全生存に対して有意な因子だが、白血病化には関連しない。それをスコアとしてどのように取り扱うか検討されている。現在これらの因子を元にして最終的なスコアリングの作製が行われている。

③MDS患者から得られた血漿、血清遊離DNAをアガロースゲル電気泳動法にて解析したところ、DNAはラダー状となって検出され、ゲノムDNAが断片化され、クロマチン構造をある程度反映する状態であることが示唆された。また、DNA濃度はそれぞれの患者の芽球数に比例する傾向が示唆され、また、血漿における遊離DNA濃度の方が血清DNAに比べて概して高い傾向が確認された。アザシチジン治療を受けた複数のMDS患者より経時的に採取された末梢血より、血漿・血清遊離DNAを採取し、LINE-1プロモーター特定部位のCpGについてのメチル化定量解析を行った。血漿遊離DNAを用いた解析では、アザシチジン投与開始後3-4日目において、メチル化割合の有意な低下が確認された。末梢血単核球を用いた同様の検討では、治療開始後6日目でメチル化割合の低下が有意となり、血漿遊離DNAを用いた検討の方がより早くメチル化割合の変化をとらえることが可能であった。また、メチル化割合は、治療開始後約2週間かけて低下傾向を示し、その後4週間までに再度上昇することが確認された。

④低リスクMDSに対するアザシチジンのプロトコールの作成委員会を結成し、プロトコールを作製した。アザシチジンによる効果を導入期と維持期に分けて検討を行うこととした。

⑤FPDの患者由来の皮膚細胞から計9つのiPS細胞クローンを得た。iPS細胞クローンは、本患者の有するRUNX1の変異を有していることが確認された。このようにして樹立したiPS細胞を、フィーダー

細胞フリーの培養系で血球に分化させることが可能であった。

⑥鉄投与マウスは、皮下に色素沈着が認められ、組織学的にも鉄過剰状態にあることが確認された。鉄過剰マウスの末梢血は血球減少は認められず、骨髄ではLin-Sca1+c-Kit+ (LSK) 分画、Common Myeloid Progenitor、Myeloid Progenitor、Granulocyte-Macrophage Progenitorの増加が認められたが、CD34-LSKやCD150+CD48-LSKなどの未分化造血幹細胞分画に変化は見られなかった。また、鉄過剰マウスおよびコントロールマウスより $1 \times 10^6$ 個の骨髄細胞を正常マウスに移植したところ、その造血再建能については移植後8週間にわたって差は認められなかった。逆に、正常マウスより $1 \times 10^6$ 個の骨髄細胞を採取し、これらを鉄過剰マウスおよびコントロールマウスに移植したところ、移植後2週間では全血球、移植後4週間においても白血球と血小板の回復が鉄過剰マウスにおいて有意に遅延しており、鉄過剰マウスでは造血支持環境が障害されていることが示唆された。そこで、骨髄より非血液細胞(CD45-Ter119-細胞)を分離し、造血支持分子の発現を解析したところ、鉄過剰マウスでは、CXCL12、VCAM-1、Kit-ligand、IGF1の発現が有意に低下していた。また、鉄過剰マウスにおいては、血清EPO濃度や肝臓でのTPO発現量が有意に低下しており、これらの造血支持分子の低下が造血回復遅延に影響しているものと考えられた。骨髄の活性酸素種は、鉄過剰マウスでは有意に増加していた。また、肝臓におけるmalondialdehyde (MDA)も増加しており、鉄過剰マウスでは酸化ストレスが増加していることが示された。

⑦CD8+/perforin+ T細胞がシクロスポリン奏功群で有意に増加していた。さらにシクロスポリン奏功群の4症例において、シクロスポリン療法による寛解期にはCD8+/perforin+ T細胞分画が減少していた。

⑧NTBI測定システムにおいては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信頼性の高い安定した測定システムを構築できた。ヘプシジン測定では、3種類のisoformsの同時定量を可能としたLC-MS/MSシステムを用いて患者血清ヘプシジン測定を進めた。

⑨低形成MDSは再生不良性貧血(AA)との鑑別が困難であった。3例の全エクソンシーケンスの結果は、2例では全エクソン解析で遺伝子変異が全く同

定されず、他の 1 例では多数の体細胞性遺伝子変異が同定された。

⑩47 例の RARS, 72 例の RCMD が確認された。治療については、RARS 47 例中 17 例に、RCMD 72 例中 26 例に Vit. B6 が投与されていた。RARS 1 例で major response が得られており、RARS 3 例、RCMD 1 例で minor response が得られていた。平均観察期間 23 カ月で RARS 47 例中 6 例が死亡し、平均観察期間 19.5 カ月で RCMD 72 例中 20 例が死亡していた。

⑪レナリドミドを投与した全例で赤芽球比率は治療前より増加し、major erythroid response が認められた。治療前の巨核球の形態学的評価が可能であった全例 (10 例) の低分葉巨核球の比率は高率 (巨核球の 40%以上) であった。治療中の骨髄の del(5q) 細胞の比率は低分葉巨核球の比率と連動した。

⑫染色体相互転座 t(12;17)により発現する融合転写産物 TEL-TAOK1ap mRNA は、TEL 遺伝子が TAOK1 遺伝子の相補鎖に連結したものであり、内因性の TAOK1 の発現を抑制することが確認された。

#### 4. 骨髄線維症

①553 例の原発性骨髄線維症の新規症例を集積した。発症年齢中央値は 66 歳、男女比は 2.03:1 である。Hb 10g/dl 未満の貧血を 69%に、血小板数 10 万/ $\mu$ L 未満を 32%に、50 万/ $\mu$ L 以上を 11%に認めた。末梢血への芽球の出現は 55%に認めている。JAK2 変異の検索は 102 例に施行されており、変異が 55%に認められた。5 年生存率は 40.7%であった。観察期間中に 249 例の死亡が確認されており、死因は感染症 67 例、白血化 41 例である。原発性骨髄線維症の現時点での治癒的治療法は造血幹細胞移植であるため、経過観察、あるいは薬物療法を選択した場合、どの時点で再び治療法の変更、再検討を必要とするかの指標が望まれている。経過観察中にはじめて血小板 $<$ 5 万/ $\mu$ L、芽球 $\geq$ 10%、17 番染色体異常のいずれかの項目を満たした場合、それ以降の平均生存期間は 0.8 年であった。いずれも該当しない場合は 5.2 年である。

②JAK2V617F アレルバーデン既知のサンプルを用いて新規技術により JAK2V617F 遺伝子の検出を試みたところ、JAK2V617F アレルバーデン 0.01%までにおいて、再現性よく JAK2V617F 遺伝子の検出が可能であった。

③Ayu17-449 マウスの *TET2* mRNA の発現は野生型マウスの約 20%に低下していた。胎生 14.5 日の Ayu17-449 マウスの造血幹細胞分画は、約 3 倍に増加していた。これを移植したレシピエントマウスの血球数は、*TET2* の発現低下により変化しないものの、単球のわずかな増加、軽度の脾腫、髄外造血 (脾、肝、肺) を認めた。一方、*TET2* の発現低下により造血幹細胞活性は著明に増加しており、*TET2* 低発現 FL と野生型骨髄細胞を同数個移植すると、レシピエントマウスの造血の大部分は *TET2* 低発現細胞により占められた。

④ET の経過中に血小板数が正常化した時点での顆粒球では、MPL 遺伝子の変異は認めなかった。

#### 5. 造血幹細胞移植

①2 年間で 14 施設より 244 例の登録があった。移植前処置は骨髄破壊的 167 例、RIST 77 例であった。移植された造血幹細胞ソースは骨髄と末梢血が 85%を占めていた。登録された症例の co-morbidity では、軽度および中等度の肺障害の頻度が高く (27.6%、24.3%)、続いて軽度肝障害 14.6%、感染症 9.3%、精神・神経障害 4.8%、糖尿病 (耐糖能異常) 3.6%、中等度および高度肝障害 2.8%、固形がん 2.8%であった。腎機能、心臓・血管系に関する co-morbidity を有する症例は認められなかった。スコアと移植後の死因との間には有意な相関は認められず、スコア 0、スコア 1-2、スコア 3 以上の間で有意な差は認められなかったが、スコア 3 以上の症例では肺炎および敗血症の占める割合が高く、GVHD の占める割合が低かった。全症例を用いた解析では、移植前 HCT-CI スコアと移植後の非再発死亡率の間には有意差は認められなかった。急性骨髄性白血病と MDS 142 例における移植前 HCT-CI スコアと移植後の非再発死亡率の間には有意差は認められず、生存率、再発率に関しても有意差は認められなかった。

②今回検討した 28 症例の 49%で急性移植片対宿主病がみられ、grade I は 28.5%、grade II は 25.0%で、それ以上の重症度は認められなかった。急性 GVHD によると思われる血球減少を呈した症例はいなかった。慢性移植片対宿主病は 41.8%にみられ、限局型 10.75%、広範囲型 31.5%であった。慢性移植片対宿主病によると思われる血球減少は 2 例 (限局型と慢性型各 1 例) に認められ、骨髄生検において骨芽細胞の減少を認めた。

③全 34 例中 21 例が死亡し、死因は原疾患の増悪が 8 例、感染症 7 例、その他、生着不全、急性 GVHD、VOD、脳出血などがあった。4 例が長期生存の後に死亡していた。1 例が移植後 4 年での髄外再発、3 例が移植後 3 年以上経過した後の「原疾患の増悪以外」の原因により死亡しており、移植後患者における長期の合併症管理の重要性を示唆した。RAEB 症例 18 例のうち 9 例が生存中であり、1 年を越えた段階から生存曲線はプラトーに達した。Overt leukemia および解析不能例を除いた 25 例に関して IPSS における低リスク群と高リスク群を比較したところ、有意差は認めなかった。

## 6. 小児科領域

①ヒト iPS 細胞から安定した分化系を構築するため、フィーダーフリー、無血清の二次元培養で血球を分化させる系を開発した。正常ヒト iPS 細胞から血球の発生過程を模倣する形で中胚葉分化、血液、血管内皮共通の母細胞であるヘマンジオブラストを経て各種血液細胞が産生される系を構築できた。赤芽球、赤血球、好中球、単球・マクロファージ、巨核球など様々な血球が産生され、それらの多くは正常な機能を有していた。患者の病態解析に使用できる可能性を示唆された。Fanconi 貧血 (FANCA)、Kostmann 症候群、細網異形性症、などの先天性造血障害を持つ患者から皮膚生検後、培養にて線維芽細胞のストックを作成した。Kostmann 症候群患者では、レトロウイルスベクターを用いた標準的手法で線維芽細胞から iPS 細胞が樹立された。一方、Fanconi 貧血 (FANCA)、細網異形性症では標準的な方法で iPS 細胞を樹立することは困難であった。これら症例に対しては、最近開発されたエピゾーマルベクターを用いた方法を試みた。まだ不完全ではあるが iPS 細胞様のコロニーが観察されている。現在、線維芽細胞の段階で遺伝子修復してから iPS 細胞樹立を行い、樹立後修復遺伝子を消去する検討も開始している。

②124 例中 102 例 (82%) が生存中であり、先天性 AA の 69%、後天性 AA の 89% が生存している。1999 年までの移植に比べ、2000 年以降の移植成績が有意に良好 (71% vs 90%,  $p=0.04$ ) だが、後天性 AA では時期別の有意差を認めず、先天性 AA、特に FA の MDS/白血病化例や二次癌が死因の多くを占めた。DKC では肺線維症で 1 例が死亡したが、Flu を導入し CY を減量した移植では長期生存が可能になった。DBA は 3 例とも長期生存中である。15 歳以

上の FA は東海大学病院へ紹介・問い合わせのあった FA の 96 例中 20 例で、最高齢は 38 歳であった。うち 12 例は MDS/AML へと進行しており、2 例に口腔内がんがみられた。17 例に造血細胞移植が施行され 14 例が生存している。死亡の 3 例は AML 症例であり、移植後発がんは 3 例にみられた。幼少時に移植を受けた別の 2 例で成人期に固形がんを発症した。

③RCC 症例について検討を行った。8 例の患者がフォローされている。発症年齢は 1 歳から 16 歳。男児 5 例/女児 3 例。Hgb は 3.8 から 13.1、MCV は 82 から 110.7、網状赤血球数は 17,000 から 101,600、好中球数は 716 から 2576、血小板は 21,000 から 115,000 で、全例正常核型だった。赤血球輸血は 2 例で行われ、また免疫抑制療法は 3 例 (2 例は Cyclosporin 単独、1 例は ATG+Cyclosporin)。造血幹細胞移植を受けた症例はなかった。発症後の年数は 1 年から 18 年で、現在の年齢は 7 歳から 20 歳であり、全例が生存している。

④31 ヶ月間で 500 例がレビューされた。その中で AA/refractory cytopenia of childhood (RCC)/CBFS が 266 例を占めた。病理医と小児科医の診断がともに AA であったのが 64 例 (24%)、ともに RCC であったのが 71 例 (27%)、病理医と小児科医の診断が一致しなかったのが 41 例 (15%) であった。40 例 (18%) は検体不良で診断が困難であった。そのほか、肝炎関連 AA が 22 例 (8%)、CBFS が 20 例 (8%) みられた。CBFS のうちわけは Fanconi 貧血が 7 例 (3%)、先天性角化不全症が 3 例 (1%)、Shwachman-Diamond 症候群が 5 例 (2%) であった。各 CBFS については、疾患担当施設での遺伝子診断をすすめた。

## D. 考察

### 1. 再生不良性貧血 (再不貧) :

①均一な免疫病態によると考えられる HAA において、HLA-A 欠失血球が高頻度に検出されたことから、この血球の存在は、CTL による造血幹細胞の傷害という、AA の免疫病態を示唆するものであることが裏付けられた。一方、HAA では、先行する肝炎のピークが過ぎてから骨髓抑制が発症することが知られているが、この時差が見られる機序は不明であった。今回の検討により、この再不貧発症の「遅れ」は、肝細胞と造血幹細胞の両者を認識する CTL

が、まず肝炎と造血幹細胞プールの縮小を引き起こすが、造血抑制はその後に産生されるサイトカインによって引き起こされるためであることが示唆された。

②重症急性GVHDの発症が治療介入群により多くみられたため、治療介入と予後における交絡因子として作用している可能性があるが、多変量解析では有意な因子として抽出されなかった。免疫抑制薬による治療介入は感染症を誘発し、予後不良に関連している可能性が示唆された。

③個人票は、再生不良性貧血の疫学特性を全国規模で経年的に把握できる貴重な情報源である。今後の課題として、重症度と臨床所見との関連の検討や重症度の（個人の）変化に関連する要因の検討を行うことが考えられる。今後、年次推移の検討や縦断的な検討も行う事が有用であると考えられる。

④Real time PCR法は、Southern blotting法やFlow FISH法と同様にテロメア長の短縮を検索することが可能であった。Real time PCR法は半定量性もあると考えられた。今後 BMF のテロメア長は、まず Real time PCR法にてスクリーニングを行い、テロメア長の短縮化が疑われる症例は、Flow FISH法か Southern blotting法でテロメア長の短縮化を確定するという方法が良いのではないかと考えられた。

## 2. 溶血性貧血

①エクリズマブ投与により、オプソニン化に重要な C3b が、PNH 症例全例で、かつ経時的に CD59 陰性分画中の赤血球膜に蓄積していくことが確認された。C3b の分解調節因子としては、CD55 (DAF) が重要であるが、PNH 血球では欠損している。エクリズマブにより C5 以降の補体経路をブロックしたことで、顕在化したものと思われる。C3b の分解調節因子としては、H 因子、complement receptor type 1 (CR1) 等も重要で、これらの分子の発現量も解析する必要があると思われた。

②可溶性 ST2 は、心不全の新たなマーカーとして近年注目されており、その背景には血管内皮の炎症が想定されている。また、潰瘍性大腸炎などの炎症性疾患や気管支喘息などのアレルギー性疾患、膠原病などの自己免疫性疾患でも高値を示すことが報告されており、Th2 細胞や白血球でも発現していることから免疫の調整機能が推定されている。今回の検討では、好中球が ST2 濃度と正の相関を

示し、好酸球が負の相関を示したことから、アレルギー疾患の合併ではなく何らかの炎症病態が AIHA の成因に関与している可能性が示唆された。また、Coombs 陽性 AIHA で Coombs 陰性 AIHA より高値を示したことから、貧血や溶血の程度と ST2 や白血球が関係していることも推測された。

③HMGA2 は、良性の間葉系腫瘍の発症に関わることが知られており、PNH 患者の末梢血で発現が亢進していた。HMGA2 の発現亢進を来す上流の遺伝子の検索は非常に重要であるのでエクソーム解析を完成させる必要がある。高アルカリフォスファターゼ血症が、PIGM 欠損症や最近報告された PIGL 欠損症では見られないことから CHO 細胞を使った上記の実験結果は GPI 欠損症においても同様の傾向であると考えられた。

④後期補体 C9 の欠損は長期でも、また高齢の PNH 患者でも意外と安全であり、同じく後期補体を抑制するエクリズマブの安全性も支持する。ただし、この患者においてはエクリズマブと異なり C5a や C5b-C8 の機能が温存されるため、弱い溶血が残るものの免疫機能が保持されて、高い QOL が維持されている可能性もある。その意味で C9 標的療法は新たな PNH 治療法として有望である。他に、PNH では強烈な血管内容血の陰に隠れているが血管外溶血も常時準備状態にある。どうやら血管内外溶血が共に亢進する感染症性溶血発作をエクリズマブ単独では抑制できないと思われる。

## 3. 骨髄異形成症候群

①現在、本データベースには、200 例を超える登録時データと、そのうち 120 例を超える追跡調査データが含まれており、様々な解析に用いることが可能な規模になってきた。本データベースを十分に活用して、その研究成果を広く一般に公開していくことが重要と考えられる。

セントラルレビューに関しては、データベースの診断確度の担保という意味合い以外に、診断情報の登録施設への還元という目的を果たしてきた。また、年に 2 回の合同検鏡会を開催しており、これも各施設の診断確度の向上に役立っている。

②7000 例を超える極めて多数の MDS 症例データを用いて IPSS 改訂版 (Revised IPSS, IPSS-R) が作製されている。IPSS 作成時の 9 倍以上の症例を用いた解析であり、より詳細な予後予測が可能となると期待される。その現れとして、染色体、骨髄芽球割合、血球数のカテゴリー数が以前より増える

と予想される。以前の単純なスコアと比して複雑にはなるが、最終版の確定とその後の臨床における評価が必要であろう。今回、オリジナルIPSSと比べると染色体ならびに骨髄芽球割合が特に大きく変更になっている。骨髄芽球割合は特に、施設でのばらつきが大きくなるとも考えられ、様々な点からの評価が行われる必要がある。

③末梢血遊離 DNA におけるアザシチジン投与後のメチル化割合の変化は、末梢血単核球に比べて血漿遊離 DNA においてより鋭敏に検出されることが示唆された。MDS における異常血球は、正常血球に比べてより脆弱であることが予想され、抗腫瘍薬の投与によってアポトーシスを来たした細胞から末梢血中に容易に DNA が放出されることが予想される。このため、MDS クローンにおけるエピジェネティックな変化を、末梢血遊離 DNA はより鋭敏に反映する可能性が考察される。よって、末梢血遊離 DNA におけるメチル化割合がより大きく変化する症例において、アザシチジンに対する感受性がより高い可能性も考慮され、この末梢血遊離 DNA におけるメチル化割合の変化が治療効果を予測する因子となりうる可能性がある。今後、さらに症例数を蓄積し、臨床症状とリンクした解析が望まれる。

④低リスク MDS におけるアザシチジンの有効性を評価する臨床試験のデザインとして、以下の様に設定した。導入期には 75mg/m<sup>2</sup> 5 日間投与 6 コースによる血液学的改善率を主評価項目として、改善が得られた患者を対象としてアザシチジン 75mg/m<sup>2</sup> 5 日間投与による維持療法を行う群と行わない群に分け、両群の効果維持率を主評価項目とした。

⑤RUNX1 変異によって造血不全をきたす家族性疾患である FPD の疾患由来 iPS 細胞の樹立に成功した。また、本 iPS 細胞から造血細胞を分化誘導させる系の確立にも成功した。今後、この iPS 細胞由来の血小板造血を詳細に解析することにより FPD における血小板造血障害の詳細な解析が可能となるほか、分子標的の探索、候補となる治療薬に対する反応などにも応用できる有用なツールとると考えられた。

⑥鉄キレート療法後に血球が回復することは、過剰鉄が造血に対して負に作用することを示唆する。しかし本モデルマウスでは当初の予想と異なり、過剰鉄による血球減少は認められなかった。また、骨髄内の未分化造血幹細胞分画に変化は見られず、

骨髄移植実験でも造血幹細胞活性の低下は認められなかった。従って、少なくとも今回我々が用いた鉄投与系では、造血幹細胞は過剰鉄に対して耐性を示すものと考えられる。一方、鉄過剰マウスでは骨髄移植後の造血回復が有意に遅れることが明らかとなった。鉄過剰マウスの骨髄では CXCL12 や Kit-ligand、IGF1 など造血幹細胞の維持、増殖、分化に必須な分子の発現が著明に低下しており、さらに血中 EPO 濃度や肝臓での TPO 産生も有意に減少していたことから、これらの骨髄微小環境の障害、肝臓・腎臓におけるサイトカイン産生障害が赤血球や血小板の回復遅延に影響している可能性が示唆された。そして、これらの臓器では有意に活性酸素量が増加していたため、組織障害は過剰鉄によって産生された活性酸素が原因である可能性が高いと考えられる。本研究では鉄過剰症による造血幹細胞への直接影響について証明することはできなかったが、過剰鉄が骨髄ストローマ細胞および腎臓・肝臓における造血支持分子産生を抑制することにより、造血に負の影響を与えていることが明らかとなった。

⑦赤芽球低形成～無形成の疾患群の中にはシクロスポリンが奏功する症例群が確かに存在すると考えられた。

⑧NTBI およびヘプシジンに関する信頼度の高い測定系が確立した。

⑨再生不良性貧血との鑑別が困難な例では、全エクソンシーケンスの結果が「変異あり」および「変異なし」に分かれ、MDS と AA との鑑別の困難さが改めて浮き彫りになった。

⑩RARS と比較して RCMD の予後が不良であることが示唆された。Vit. B6 の有効性は認められても一過性であること、また他の治療薬の詳細が不明であることから MDS-RS に対する Vit. B6 治療の有効性は限定的であると考えられる。

⑪今回の検討では、細胞遺伝学的効果と低分葉巨核球の比率の減少の関連が示唆された。また、貧血の改善と細胞遺伝学的効果の関係には種々のタイプがあり、貧血改善のメカニズムは、Len による del(5q) 細胞の抑制のみでは説明不能であった。

⑫一つの遺伝子配列が他方の遺伝子配列の相補鎖に融合することで、相補鎖部分の配列が標的遺伝子に対してアンチセンス RNA として機能するという、新しい遺伝子発現調節異常の可能性を示した。

#### 4. 骨髄線維症

①本邦の原発性骨髄線維症の5年生存率は40.7%と不良である。経過観察中にはじめて血小板 $<5$ 万/ $\mu$ L、芽球 $\geq 10\%$ 、17番染色体異常のいずれかの項目を満たした場合、それ以降の平均生存期間は0.8年、いずれも該当しない場合は5.2年であり、この3項目は、経過観察中、あるいは薬物療法中の骨髄線維症患者の予後予測に有用である。

②本研究において確立した新規技術は JAK2V617F アレルバーデン 0.01%を確実に判別可能であり、既往の報告と比較しても遜色ない感度であった。偽陽性も非情に低く抑制可能であった。

③TET2の発現が低下すると造血幹細胞活性が亢進し、レシピエントマウスの造血は、TET2低発現細胞により占められるようになった。これが、骨髄増殖性腫瘍がクロナリティーを獲得する機序のひとつと考えられる。

④本症例においては初診時から過多月経と鉄欠乏性貧血が存在し、閉経と同時に貧血と血小板増多の改善を認めた。本症例におけるETの自然寛解には閉経に伴う何らかの要因が関与していた可能性が考えられ、さらに本症例におけるMPL変異陽性のETクローンの増殖に当初から月経に関わる因子が影響を与えていた可能性も考えられた。

#### 5. 造血幹細胞移植

①今回の前向き臨床試験の結果、欧米で頻用されるHCT-CIスコアは、本邦の移植後非再発死亡の予測には、必ずしも有用でないことが明らかにされた。これに関しては、その理由としては、支持療法の進歩、移植医療の多様化（幹細胞ソース、前処置、適応疾患など）に加えて、各co-morbiditiesの重み付け(scoring)の本邦における妥当性などが示唆された。最近では、Barbaraらが0-3, 4-5, 5<とスコアリングを変更するflexible HCT-CIを提唱している。確かに、欧米で報告されたco-morbidityの頻度と、この研究で確認されたco-morbidityには明らかな相違があり、今後は、新たなスコアリングやフェリチンなどの指標を加えた新たな予測システムを検討する必要があると考えられた。

②マウスと異なり、ヒトでの検討で急性移植片対宿主病の際に骨芽細胞障害が見られなかった理由として、重症度が軽いものが多かったためと考えられる。

③MDSに対するRISTは十分な抗腫瘍効果を発揮し

た。しかし、高齢者および臓器障害のある患者を対象にしている本治療においては、晩期合併症による問題は残存している。

#### 6. 小児科領域

①結果に示すように血球分化系とその評価に成功している。さらに、正常な機能を持った赤血球(酸素運搬能)、好中球(遊走能や貪食能、殺菌能)、単球系細胞(貪食能、抗原提示能など)、巨核球などの細胞を産生することに成功した。今後、患者由来iPS細胞を用いて血球分化を行い、障害を受けている分化段階の同定、起っている異常の分子メカニズムを明らかにする予定である。

②先天性AAにおいてはFA, DKC, DBAともFluの導入によってCYの減量も可能となり、かつ生着率も良好なことから、特に代替ドナー移植の成績向上が得られた。CYの減量はFAに対する前処置では必須であるが、DKCにおいては肺線維症の予防、DBAにおいては心筋障害の予防に寄与する可能性があり、長期QOLの向上が得られるものと予想された。後天性AAにおいても、特に頻回輸血例や代替移植例においてFluの導入が成績向上に繋がっていた。FA, DKCでは造血細胞移植後も扁平上皮癌のリスクは年齢とともに増加するため、慎重な経過観察が必要である。慢性GVHDは扁平上皮癌のリスクとなるが、移植年齢が高くなるほど慢性GVHDも合併しやすいため、思春期以降の移植例では慢性GVHD対策が重要である。一方、思春期以降のFAではMDS/白血病移行例が増加し、前処置強化の必要性からQOLの低下を招きやすく、造血障害合併例では思春期前の移植が望ましい。診断のうえでは、成人期に診断されるFAは内臓異常をはじめ、身体異常の軽症例が多く、染色体脆弱検査では断裂のみ見られないリバージョン・モザイク例が2例含まれていたことから、診断困難例が多い可能性が推測された。

③経験したRCCの症例は、8例中7例が無治療で経過観察されており、小児から成人に移行しつつある。今後、若年成人においてRCC様の疾患がみられるかどうかを調査する必要がある。また同時に、小児血液・がん学会の中央診断および追跡調査の結果を解析し、全国の症例の特徴を把握する計画を立てている。

④RCCは2008年のWHO分類で提唱された新しい疾患概念であり、従来、わが国では、RCCという診断はおこなわれていなかった。今回の結果からは、

従来、わが国で診断された AA の半数が RCC と診断名が変わる可能性がある。両疾患の治療への反応、MDS への移行を含め、長期予後について前方視的研究が今後必要であろう。また、免疫学的、分子生物学的検討をおこない、両疾患の生物学的な違いについての検討も必須であろう。

## E. 結論

### 1. 再生不良性貧血・赤芽球癆

- ①HAA では、ハイリスクアレルによって提示される造血幹細胞抗原に特異的な CTL が発症に強く関与している。この、CTL は AA 発症の初期相において肝細胞と造血幹細胞を同時に傷害するが、その後の病像形成に関与しているのはサイトカインのような非特異的なメカニズムであると考えられる。
- ②ABO-major 不適合移植後に発症する赤芽球癆に対して、輸血以外の治療介入の利益は証明されなかった。
- ③臨床調査個人票を利用し、再生不良性貧血の基本的疫学特性を明らかにした。
- ④Real time PCR 法は、Southern blotting 法や Flow FISH 法と同様にテロメア長の短縮を検索することが可能であった。検索に必要な DNA 量は、Southern blotting 法や Flow FISH 法に比べ約 1/5~1/10 であり BMF 症例の臨床検査としては有用であった。

### 2. 溶血性貧血

- ①新規治療薬であるエクリズマブは、PNH の溶血を著明に抑制するが、C3b が PNH 血球に蓄積したことによる血管外溶血という新たな病態が明らかとなった。C3b の蓄積は、経時的に増加するので、今後の経過を注意深くフォローする必要がある。血管外溶血が臨床上問題となっている症例があれば、C3b の蓄積に加え、H 因子、CR1 等の発現量も解析することが重要である。
- ②ST2 の動態や好中球との関連から、AIHA の発症機序に炎症が関与している可能性が推測された。
- ③先天性 PIGV 欠損症の高アルカリフォスファターゼ血症は GPI アンカー型蛋白であるアルカリフォスファターゼが GPI トランスアミダーゼによって切断され血清中に遊離されて起こるが、この遊離は PIGV 以降の後期の GPI 生合成の欠損で見られることが明らかになった。
- ④後期補体抑制療法は長期間でも安全性と有効性が高く、C9 分子標的療法を新しい PNH 治療法とし

て提案できる。PNH 患者でも血管外溶血は常に準備状態にあり、その程度は血管内容血のそれと反比例する。

### 3. 骨髄異形成症候群

- ①本研究によって、本邦における再不貧および MDS の診断確度の高い有用なデータベースが構築されつつある。今後さらなる登録症例数の増加と追跡調査、およびデータの詳細な解析によって、実地臨床に有用な日本人における両疾患のエビデンスや指針を提供していくように研究を推進していきたい。
- ②MDS の予後予測システム IPSS-R の作成作業が進んでおり、これまでより詳細な予後予測が可能となる予定である。診療に役立つことが期待される。
- ③末梢血遊離 DNA を用いて、MDS のエピゲノム解析が可能である。血漿遊離 DNA を用いたアザシチジン投与後の *LIN28B* プロモーターメチル化割合の減少は、単核球を用いた検討に比べてより鋭敏であり、MDS クローンにおける変化を反映している可能性がある。
- ④低リスク MDS におけるアザシチジンの有効性を評価する臨床試験のプロトコールの作成を行っている。
- ⑤家族性造血障害の一つである家族性血小板異常症 (FPD) の疾患由来 iPS 細胞の樹立に成功した。
- ⑥鉄過剰症は骨髄における造血微小環境を障害し、腎臓、肝臓における EPO や TPO など重要なサイトカイン産生を抑制することによって造血に負の影響を与えている可能性が考えられた。
- ⑦CD8<sup>+</sup>/perforin<sup>+</sup> T 細胞の増加は赤芽球低形成～無形成患者のシクロスポリン反応性において有用で簡便な予測マーカーになり得る。
- ⑧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が蓄積しつつある。
- ⑨全エクソンシーケンスと形態観察の対比から、骨髄異形成症候群と再生不良性貧血との境界例で、骨髄形態から遺伝子変異の有無を予測することが困難であることが明らかになった。
- ⑩日本における後天性鉄芽球貧血の予後と治療の実態が明らかとなった。
- ⑪ 5q-症候群の共通欠失領域に存在する遺伝子のハプロ不全が、巨核球の核の低分葉の原因である可能性を示唆すると思われた。貧血改善のメカニズムは、Len による del(5q)細胞の抑制のみでは、

説明不能であった。

⑫TEL-TAOK1ap 融合転写産物は、TAOK1 mRNA に対するアンチセンス RNA として機能し、内因性 TAOK1 蛋白の発現をノックダウンする可能性が示唆された。

#### 4. 骨髄線維症

①本邦の原発性骨髄線維症 553 例の臨床情報を集積した。血小板 $<5$  万/ $\mu$ L、芽球 $\geq 10\%$ 、17 番染色体異常の 3 項目は、経過観察中、あるいは薬物療法中の骨髄線維症患者の予後予測に有用である。

②JAK2 遺伝子変異を高感度に検出可能な新規技術を開発した。

③TET2 の発現低下により、5-mC を 5-hmC に変換する酵素活性が低下し、造血幹細胞活性が増加する。

④閉経と同時期に自然寛解となった MPL 変異陽性の ET 患者にの検討から、この症例における MPL 変異陽性の ET クローンの増殖には月経に関わる因子が影響を与えていた可能性が考えられた。

#### 5. 造血幹細胞移植

①欧米で用いられている HCT-CI スコアは、本邦の急性骨髄性白血病・MDS に対する同種造血幹細胞移植後の非再発死亡の予測には有用でないことが示唆された。今後は我が国の現状に合った臓器障害のスコアリングを検討する必要がある。

②移植片対宿主病マウスモデルにおけると同様に、ヒト同種造血細胞移植後に骨髄に対する移植片対宿主病が誘導され、骨芽細胞障害と血球減少が認められることが示唆されたしかし、ヒトでは急性型移植片対宿主病で骨髄に対する移植片対宿主病が認められるか否かは今後の課題である。

③高齢者または臓器障害を有する MDS に対する RIST は短期的には安全に行え、予後の改善効果期待できるが、晩期合併症に対する十分なケアが必要である。

#### 6. 小児科領域

①正常ヒト iPS 細胞から中胚葉分化、へマンジオブラストを経て各種血液細胞が産生される系を構築した。産生される血球の多くは正常な機能を有していた。Fanconi 貧血、Kostmann 症候群、細網異形性症などの先天性造血障害を持つ患者から疾患特異的な iPS 細胞の樹立を開始し、極めて樹立

困難な疾患の存在が明らかとなってきた。

②先天性 AA においては病態に合わせた移植前処置を選択し、後天性 AA においては前治療歴を考慮した前処置の工夫を行うことにより、代替ドナー移植でも成績向上が得られた。

③RCC は、血小板数減少で発見されることがあり、長い経過の中で小児から成人に移行する。今後、思春期あるいは若年成人における調査が必要と考えられる。また、一部に症例で Cyclosporin 単独療法は効果を示した。

④小児 AA、MDS および CBFS を対象とした中央診断を行うことにより、必ずしも診断が容易ではないこれらの疾患の診断の精度があがったと考えられる。今後はとくに、RCC についての臨床的意義を検討する必要がある。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Nakagawa M, Shimabe M, Watanabe-Okochi N, Arai S, Yoshimi A, Shinohara A, Nishimoto N, Kataoka K, Sato T, Kumano K, Nannya Y, Ichikawa M, Imai Y, Kurokawa M. AML1/RUNX1 functions as a cytoplasmic attenuator of NF- $\kappa$ B signaling in the repression of myeloid tumors. *Blood* 118: 6626-6637, 2011.
- Nishimoto N, Arai S, Ichikawa M, Nakagawa M, Goyama S, Kumano K, Takahashi T, Kamikubo Y, Imai Y, Kurokawa M. Loss of AML1/Runx1 accelerates the development of MLL-ENL leukemia through down-regulation of p19ARF. *Blood* 118: 2541-2550, 2011.
- Arai S, Yoshimi A, Shimabe M, Ichikawa M, Nakagawa M, Imai Y, Goyama S, Kurokawa M. Evi-1 is a transcriptional target of mixed-lineage leukemia oncoproteins in hematopoietic stem cells. *Blood* 117: 6304-6314, 2011.
- Ogura M, Todo T, Tanaka M, Nannya Y, Ichikawa M, Nakamura F, Kurokawa M. Temozolomide may induce therapy-related acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 154: 663-665, 2011.
- Yamazaki S, Nakamura F, Nasu R, Nannya Y, Ichikawa M, Kurokawa M. Haemophagocytic lymphohistiocytosis is a recurrent and specific complication of acute erythroid leukaemia. *Br J Haematol.* 153: 669-672, 2011.
- Yoshiki Y, Asai T, Ichikawa M, Hangaishi A, Ota S, Imai Y, Takahashi T, Kurokawa M. A