

### 3. その他

真部淳。骨髄異形成症候群 MDS。日本小児血液学会編。小児白血病・リンパ腫の診療ガイドライン 2011 年版(第 2 版)。金原出版(東京)、p66-72, 2011

## 自己免疫性溶血性貧血の免疫動態の検討：ST2の動態

研究協力者： 亀崎豊実(自治医科大学地域医療学センター准教授)、豊辻智則、梶井英治

### 研究要旨

炎症マーカーの1つであるST2の血中濃度は、非AIHA、Coombs陰性AIHA群、Coombs陽性AIHA群の順に有意に高値を示した。Coombs陽性AIHAとCoombs陰性AIHAの間で有意差が認められた血中ST2濃度、白血球数、Hb値、赤血球結合IgG量について、多変量での調整を行うと、ST2と白血球数と間で有意な正の相関を認め、白血球分画については、ST2と好中球の間に有意な正の相関を認め、好酸球との間には有意な負の相関を認めた。AIHAの免疫病態や病状に何らかの炎症が関与していることが推測された。

### A. 研究目的

自己免疫性溶血性貧血(autoimmune hemolytic anemia: AIHA)は、赤血球に対する自己抗体産生が中心病態と考えられている。自己抗体産生機序としては、T helper 2細胞(Th2)が優位な病態が想定されているが、疾患モデルマウスの解析からは、T helper 1細胞(Th1)優位な病態も指摘されており、議論が分かれている。また、AIHAの約10%に認めるCoombs陰性AIHAの病態・病因については未だ明らかになっていない。

自己抗体産生に関与するサイトカインの血中濃度をCoombs陰性AIHAとCoombs陽性AIHAにおいて比較すると、Th2活性化をきたすIL4とTh1活性化・Th2抑制をきたすIL12においてCoombs陽性AIHAとCoombs陰性AIHAで逆の傾向を示したことから、Coombs陰性AIHA特異的な病態の存在が予想された。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、非AIHA群、Coombs陰性AIHA群、Coombs陽性AIHA群の順に有意に高く、AIHAの病態を反映している可能性が示唆されることを昨年(2019年)の班会議で報告した。今回、AIHAの免疫病態解明を目的にST2の動態に関係する因子について解析をおこなった。

### B. 研究方法

当院に赤血球結合IgG定量依頼され、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。

### (倫理面への配慮)

本研究は、自治医科大学臨床研究倫理審査委員会および生命倫理委員会で承認されている(臨A07-63号)。

### C. 研究結果

Coombs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。

### D. 考察

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 ST や白血球が関係していることも推測された。

今後、IL17 や IL33 などの他の炎症マーカーの動態についても、AIHA 患者で検討を進めたいと考えている。

#### E. 結論

ST2 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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nakata J, Tamaki H, Ikegame K, Kato R, Yoshihara S, Kaida K, Inoue T, Kamesaki T, Okada M, Ogawa H. Direct antiglobulin test-negative autoimmune hemolytic anemia associated with HLA-haploidentical stem cell transplantation. *Int J Hematol* 93(4): 558-560, 2011

##### 2. 学会発表

Tomonori Toyotsuji, Toyomi Kamesaki, Eiji Kajii. Coombs-positive and negative autoimmune hemolytic anemia might immunologically differ. *臨床血液*52巻9号 Page461, 2011. 第73回日本血液学会総会, 2011年10月14日~16日, 名古屋.

Mikachi Hayashi, AZUMA Daisuke, IZUMI Youichi, OGITA Kaori, NAKAMURA Kozue, KOYAMA Takayuki, KAMESEKI Toyomi, KIKUCHI Akira. Partial improvement by rituximab treatment in a child with primary chronic cold agglutinin disease. *臨床血液* 52 巻 9 号 Page463, 2011. 第 73 回日本血液学会総会, 2011 年 10 月 14 日~16 日, 名古屋.

神尾直, 林俊誠, 斉藤明生, 星野匠臣, 三井健揮, 内海英貴, 半田寛, 野島美久, 横濱章彦, 小磯博美, 斉藤貴之, 塚本憲史, 亀崎豊実. Fludarabine、rituximab 併用療法により Coombs 陰性 AIHA を来した CLL. *臨床血液* 52 巻 8 号 Page726, 2011.

元山華穂子, 越智琢司, 佐藤泰弘, 泉陽一, 加賀文彩, 萩田佳織, 林美佳智, 豊田彰史, 中村こずえ, 小山隆之, 亀崎豊実, 菊地陽. CMV 感染症に関連したクームス陰性自己免疫性溶血性貧血の乳児例. *小児がん* 48 巻プログラム・総会号 Page307, 2011.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし

## 造血における TET2 の機能解析

研究協力者：下田和哉（宮崎大学・教授）

### 研究要旨

骨髄異形成症候群、急性骨髄性白血病、骨髄増殖性腫瘍などの骨髄系腫瘍の 10-20%に *TET2* の機能欠失型変異がみられる。TET2 の発現が低下すると、5-methylcytosine を 5-hydroxy methylcytosine 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。TET2 の機能低下は、骨髄増殖性腫瘍における造血クロナリティー獲得に寄与している。

### A. 研究目的

骨髄異形成症候群、急性骨髄性白血病、骨髄増殖性腫瘍などの骨髄系腫瘍の 10-20%に機能欠失型変異がみられる TET2 の、造血における機能を明らかにする。

### B. 研究方法

ジーントラップ法で作成された Ayu17-449 マウス (Tang et al 2008) は、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。このマウスは生後 3 日以内に死亡するため、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。

### (倫理面への配慮)

宮崎大学遺伝子組み換え実験、動物実験の承認のもと、実験動物に対する十分な苦痛軽減を行って施行した。

### C. 研究結果

Ayu17-449 マウスの *TET2* mRNA の発現は野生型マウスの約 20%に低下しており、Ayu17-449 マウスは *TET2* 低発現マウスであることが判明した。TET2 は 5-methylcytosine (5-mC) を 5-hydroxy methylcytosine (5-hmC) に変換する酵素活性を有している。TET2 低発現マウスでは、E14.5 FL、骨髄細胞、脾細胞のいずれにおいても DNA の 5-hmC 量が減少していた。

E14.5 FL の造血幹細胞分画は、TET2 発現低下により約 3 倍に増加していた。E14.5 FL 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。骨髄系細胞のみではなく、B 細胞、T 細胞においても TET2 低発現細胞が大多数を占めていた。

### D. 考察

TET2 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。

### E. 結論

TET2 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。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

●Shide K, Kameda T, Markovtsov V, Shimoda HK, Tonkin E, Fang S, Liu C, Gelman M, Lang W, Romero J, McLaughlin J, Bhamidipati S, Clough J,

該当なし

Low C, Reitsma A, Siu S, Pine P, Park G, Tomeros A, Duan M, Singh R, Payan DG, Matsunaga T, Hitoshi Y, Shimoda K: R723, a selective JAK2 inhibitor, effectively treats JAK2V617F-induced murine myeloproliferative neoplasia. Blood 2011; 117(6866-6875)

●Nakaya Y, Shide K, Niwa T, Homan J, Sugahara S, Horio T, Kuramoto K, Kotera T, Shibayama H, Hori K, Naito H, Shimoda K: Efficacy of NS-018, a potent and selective JAK2/Src inhibitor, in primary cells and mouse models of myeloproliferative neoplasms. Blood Cancer J. 2011;1: e29; doi:10.1038/bcj.2011.29, 2011 <http://www.nature.com/bci/journal/v1/n7/full/bci201129a.html>

## 2. 学会発表

●Shide K, Kameda T, Shimoda H, Kamiunten A, Sekine M, Hidaka T, Katayose K, Kubuki Y, Kitanaka A, Shimoda K. TET2 is essential for survival in mice, and decreased TET2 expression enlarges HSC compartment and alters cell differentiation. American Society of Hematology 53<sup>th</sup> Annual Meeting, 2011.12.10-13, San Diego, CA, USA

●Shide K, Nakaya Y, Kameda T, Shimoda H, Hidaka T, Katayose K, Kubuki Y, Matsunaga T, Homan J, Kotere T, Shibayama H, Naito H, Shimoda K. NS-018, a potent novel JAK2 inhibitor, effectively treats murine MPN induced by JAK2V617F mutant. 第 73 回日本血液学会学術集会, 2011. 10. 14-16, 名古屋

●Nakaya Y, Shide K, Niwa T, Horio T, Homan J, Sugahara S, Kuramoto K, Hori K, Naito H, Shimoda K. Selective and preferential inhibition of an activated form of JAK2 by a novel JAK2 inhibitor, NS-018. 第 73 回日本血液学会学術集会, 2011. 10. 14-16, 名古屋

●Shimoda H, Toyama T, Shide K, Kameda T, Kubuki Y, Hidaka T, Katayose K, Sekine M, Kamiunten A, Shimoda K. A familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy with haploinsufficiency of RUNX1. 第73回日本血液学会学術集会, 2011. 10. 14-16, 名古屋

## G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得  
該当なし

2. 実用新案登録  
該当なし

3. その他

## GPIアンカー欠損症の解析

研究協力者 木下 タロウ (大阪大学微生物病研究所・教授)

### 研究要旨

昨年度までに我々はPNH患者において末梢血、骨髄における *HMGA2* の発現を解析し、12番染色体異常を持たない患者の約3分の2において末梢血で *HMGA2* の発現が有意に高いことを報告したが、その発現上昇の機序については未だ不明である。そこで *HMGA2* の発現上昇を伴う GPI 欠損細胞のクローナな拡大に関わる新たな遺伝子の探索のため、PNH 患者の好中球由来の異常細胞と頬部粘膜由来の正常細胞のゲノム配列の解析に着手した。

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した。

### A. 研究目的

我々はPNHにおける GPI 欠損細胞の拡大機序の解明を目指している。昨年度 12 番染色体異常を持たない PNH 患者の末梢血において転写調節因子 *HMGA2* の発現が有意に亢進している事、マウスを使った実験で造血幹細胞における *HMGA2* の発現亢進がクローナルな増殖を来す事を報告した。今年度は PNH 患者において *HMGA2* の発現亢進を介して、あるいは直接に造血幹細胞の増殖に関わる遺伝子の変異を探索する。また新たに発見された先天性 PIGV 欠損症に特徴的な高 ALP 血症についてその発症機序を明らかにすることを合わせて目的とした。

### B. 研究方法

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、正常コントロールとして同じ患者の頬粘膜細胞由来のゲノム DNA を抽出して、エクソン領域をアジレント社のキットで濃縮し、次世代シー

クエンサー SOLiD4 で全配列をシーケンスし、異常細胞由来のゲノム上にのみある変異を抽出する。抽出した変異をサンガー法でシーケンスの確認をすると共に機能解析を行う。一方先天性 PIGV 欠損症の高 ALP 血症については 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。

(倫理面への配慮) 患者の解析については学内のヒト・ゲノム倫理委員会に申請し承認を受けているとともに、インフォームドコンセントを得ている。

### C. 研究結果

前半のエクソームの解析については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。

#### D. 考察

HMGA2 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亢進している。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る。

#### E. 結論

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。

#### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

●Murakami Y, Kanzawa N, Saito K, Krawitz PM, Mundlos S, Robinson PN, Karadimitris A, Maeda Y, Kinoshita T. Mechanism for release of alkaline phosphatase caused by glycosylphosphatidylinositol deficiency in patients with hyperphosphatasia mental retardation syndrome. J Biol Chem. 2012; 287(9): 6318-25.

●Murakami Y, Inoue N, Shichishima T, Ohta R, Noji H, Maeda Y, Nishimura J, Kanakura Y, Kinoshita T. Deregulated expression of HMGA2 is implicated in clonal expansion of PIGA deficient cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. Br J Haematol. 2012; 156(3): 383-7.

#### 2. 学会発表

●Murakami, Y., Krawitz, PM., Robinson, PN, Mundlos, S., Maeda Y., and Kinoshita, T., :Release of alkaline phosphatase caused by PIGV mutations in patients with Hyperphosphatasia-Mental Retardation syndrome (HPMR), recently found second inherited GPI anchor deficiency.: Glyco 21 2011.8.22, Vienna.

●村上良子、太田里永子、井上徳光、木下タロウ:発作性夜間血色素尿症をはじめとする GPI 欠損症について:第 48 回補体シンポジウム 招待講演、2011. 9. 3. 名古屋

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当無し
3. その他 該当無し

骨髓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

研究協力者 木村昭郎 (広島大学原爆放射線医科学研究所 血液・腫瘍内科・教授)  
新田英昭 (広島大学原爆放射線医科学研究所 血液・腫瘍内科・医科診療医)  
原田結花 (広島大学原爆放射線医科学研究所 被ばく資料調査解析部・助教)  
兵頭英出夫 (広島大学原爆放射線医科学研究所 血液・腫瘍内科・准教授)  
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

骨髓赤芽球低形成～無形成は骨髓異形成症候群の特殊型、後天性赤芽球癆や再生不良性貧血を含む血液学的疾患単位である。22 例の赤芽球低形成～無形成を伴う疾患群の骨髓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ところ、CD8<sup>+</sup>/perforin<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>/perforin<sup>+</sup> T 細胞分画が減少していた。このことから CD8<sup>+</sup>/perforin<sup>+</sup> T 細胞が免疫学的な機序を介して赤芽球系前駆細胞を減少させることが示唆され、CD8<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の有用で簡便なマーカーになり得ると考えられた。

#### A. 研究目的

赤芽球低形成～無形成を伴う疾患群は、骨髓異形成症候群の特殊型、後天性赤芽球癆、再生不良性貧血を含む血液学的疾患単位である。赤芽球低形成～無形成の患者は輸血依存、免疫学的異常、シクロスポリンや ATG などの免疫抑制療法が奏功するなどの共通した特徴を有している。赤芽球低形成～無形成の発症機序は T 細胞介在性の機序が最も有力であるが十分には解明されていない。我々は胸腺腫関連赤芽球癆患者の骨髓においてオリゴクローナルな CD8<sup>+</sup>/perforin<sup>+</sup> T 細胞が増殖しており、そのオリゴクロナリティは CD4<sup>+</sup> T 細胞には検出されなかったことを既に報告している。そこで T 細胞の役割をさらに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。

#### B. 研究方法

広島大学病院で 2000 年から 2011 年 6 月までで WHO 分類に基づき診断された計 253 例の骨髓異形成症候群のうち 12 例 (4.7%) が赤芽球低形成、無形成を呈していた。計 22 例の赤芽球低形成～無形成を伴う疾患群 (赤芽球低形成～無形成を伴う骨髓異形成症候群 8 例、特発性赤芽球癆 3 例、胸腺腫関連赤芽球癆 3 例、再生不良性貧血 8 例) をこの研究の対象とした。ウイルス感染に伴う赤芽球低形成～無形成の可能性は除外した。またシクロスポリン単剤の治療効果と赤芽球細胞密度はすべての症例において骨髓穿刺、生検を施行し確認した。対象症例はシクロスポリン単剤による治療を受け、貧血改善の程度に関しては MDS の IWG2006、再生不良性貧血と後天性赤芽球癆のガイドラインに従い評価を行った。T 細胞サブセットを解析するため、骨髓や末梢血の単核球を分離し、正常コントロールとして計 30 例、赤芽球低形成を伴わない骨髓異形成症候群計 30 例も同様に解析を行った。CD8 subpopulation を解析するため、FITC 標識 CD8 抗体、PE 標識 perforin と CCR7 (CD197) 抗体、PerCP 標識 CD62L と CD28 抗体、APC 標識 CD27、CD45RA と CD45RO 抗体を用いた。Regulatory T 細胞 (Treg)

を解析するため FITC 標識 CD4 抗体、PE 標識 FoxP3 抗体、APC 標識 CD25 抗体を使用した。また Th17 細胞を解析するため PE 標識 IL-17 抗体、PerCP 標識 CD4 抗体を使用した。Perforin、FoxP3、IL-17 など細胞内の抗原を解析する際は固定後に染色を行った。データは CellQuest software により解析を行った。

(倫理面への配慮)

患者にはインフォームドコンセントを行い、文書で同意を得た。

#### C. 研究結果

22 例のうち計 10 例はシクロスポリン療法に 2 週から 8 週で良好な反応を示し、Hb 値は平均 6.5g/dL から 9.3g/dL とベースラインが 2.8g/dL 上昇した。シクロスポリン奏功群と非奏功群の T 細胞サブセットを比較したところ CD8<sup>+</sup>/perforin<sup>+</sup> T 細胞がシクロスポリン奏功群で有意に増加していた (奏功群: 45.7±8.6%, n=10, 非奏功群: 18.5±8.5%, n=12, P 値<0.0001, 正常コントロール: 16.9±7.0%, n=30)。さらにシクロスポリン奏功群の 4 症例において、寛解期には骨髓や末梢血中の CD8<sup>+</sup>/perforin<sup>+</sup> T 細胞の実数と割合が減少していることが確認された。CD8<sup>+</sup>/perforin<sup>+</sup> T 細胞の subpopulation は CD27<sup>+</sup> CD62L<sup>low</sup> CCR7<sup>low</sup> CD45RA<sup>++</sup> CD45RO<sup>+</sup> を発現しており effector memory T 細胞のサブセットと一致していた。それに対し Treg (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> FoxP3<sup>+</sup>) と Th17 (CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>) 細胞の population は赤芽球低形成～無形成患者においてシクロスポリン療法の反応性に関連していなかった。

#### D. 考察

シクロスポリンに良好な反応を示した赤芽球低形成～無形成患者では CD8<sup>+</sup>/perforin<sup>+</sup> T 細胞が骨髓や末梢血で増加していた。これは CD8<sup>+</sup>/perforin<sup>+</sup> T 細胞が免疫学的な機序を介して赤芽球系前駆細胞を減少させる機能を有することを示唆するものであり、赤芽球低形成～無形成の疾患群の中にはシ



クロスボリンが奏功する症例群が確かに存在する  
と考えられた。

#### E. 結論

骨髄や末梢血における CD8<sup>+</sup>/perforin<sup>+</sup> T 細胞の増加がシクロスポリン療法に対する感受性と強く相関することから、CD8<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。またこのような症例に対しては積極的にシクロスポリン療法を試みるべきであると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

●Nitta H, Harada Y, Okikawa Y, Fujii M, Arihiro K, Kimura A, Harada H : Good's syndrome-associated pure red cell aplasia with myelodysplastic syndrome. *Internal Medicine* 50(18) :2011-2014, 2011.

●Nitta H, Harada Y, Hyodo H, Kimura A, Harada H : Expansion of CD8<sup>+</sup>/perforin<sup>+</sup> T-cells predicts response to ciclosporin A therapy in patients with erythroid hypoplasia/aplasia. *Brit. J. Haemtol.* (in press)

##### 2. 学会発表

●Nitta H, Harada Y, Hyodo H, Kimura A, Harada H : Expansion of CD8<sup>+</sup>/perforin<sup>+</sup> T-cell subset in patients predicts response to cyclosporin A therapy in patients with erythroid hypoplasia/aqplasia. 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego, USA, 2011.

●Nitta H, Harada Y, Kimura A, Harada H : Myelodysplastic syndrome with pure red cell aplasia, clinical new entity. 73rd Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Nagoya, 2011.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし

## 血清非トランスフェリン結合鉄 (NTBI) およびヘプシジンの定量

研究協力者 高後 裕 (旭川医科大学 内科学講座 消化器・血液腫瘍制御内科学分野 教授)

### 研究要旨

骨髄不全症候群患者における体内鉄動態に関する臨床研究、および、輸血後鉄過剰症に対する鉄キレート療法の有用性（臓器障害の予防改善効果）に関する臨床研究の延長に伴い、付随研究としての血清 NTBI およびヘプシジンの測定期間も延長した。NTBI 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その問題点を明らかにし、改善を進めてきた結果、現時点で最も信頼性の高い安定した測定システムを再構築することができ、ルーチンに患者血清 NTBI 測定を進めている。並行して、本測定システムのオペレーターの育成も進めている。一方、ヘプシジン測定には、3 種類の isoforms (hepc-20、hepc-22、hepc-25) の同時定量を可能とした liquid chromatography - tandem mass spectrometry (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ている。本臨床研究に登録済みのうちの延べ 111 検体について NTBI 値およびヘプシジン値が算出されており、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。

### A. 研究目的

骨髄不全症候群患者における体内鉄動態に関する臨床研究、および、輸血後鉄過剰症に対する鉄キレート療法の有用性（臓器障害の予防改善効果）に関する臨床研究の付随研究として、血清 NTBI およびヘプシジンの測定を行い、疾患別、治療前後、経過過程におけるデータを集積する。さらに、健常人血清 NTBI 値ならびにヘプシジン値を基準に各種疾患の診断、治療、効果、予後評価などのバイオ・マーカーとしての可能性を追求する。

### B. 研究方法

【NTBI 測定】 Nonmetallic PEEK (polyether-ethylketone) tube を用いた 2796 BioSeparation Module with 2998 Photodiode Array Detector (Waters) に、OmniSpher 5 C18, G100 × 3 Repl, glass column with ChromSep guard column SS (Varian

brand/Agilent Technologies) を装着した non-metal HPLC システムを選択した。しかし、使用する蒸留水や試薬に混在する鉄によりベースラインが引き上げられ、不安定な測定系となっていることが判明した。これに対して、Chelex 100 Resin (Bio-Rad) やポリアミン系樹脂による除鉄処理を施すことによりバックグラウンド低減に成功し、結果、低濃度領域における血中 NTBI 値を信頼性の高い数値として定量、表記することが可能となった。健常人 36 名の血清 NTBI の平均値が、男性 :  $0.206 \pm 0.091 \mu\text{M}$  (n=20)、女性 :  $0.212 \pm 0.095 \mu\text{M}$  (n=16) であることを報告してきた (Sasaki K., Ikuta K., Kohgo Y., et al., Mol. Med. Reports 2011, 4:913-8)。

【ヘプシジン測定】ヘプシジン測定は API4000QTRAP (Applied Biosystems/Life Technologies) に UPLC ACQUITY TM systems (Waters) を組み合わせた LC-MS/MS を構築し、3 種類の isoform (hepc-20, -22,

-25) の同時定量を世界で初めて可能とした。健常人 40 名の血清ヘプシジン濃度が、hepc-20: 男性  $3.767 \pm 2.565$  ng/ml (n=21)、女性  $1.387 \pm 1.882$  ng/ml (n=19)、 hepc-22: 男性  $1.212 \pm 0.574$  ng/ml、女性  $0.702 \pm 0.519$  ng/ml、 hepc-25: 男性  $16.240 \pm 12.940$  ng/ml、女性  $8.159 \pm 13.830$  ng/ml であることを、平成 21 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、研究代表者: 高後裕、「特発性造血障害患者生体試料の安定的収集法の確立による鉄代謝異常関連造血障害の解析」の研究報告書(平成 22(2010)年 3 月発行)にまとめ、国内の関係機関および試料提供協力施設等に配布し、難治対策の推進を図ってきた。

【生体試料の取り扱い】当該研究期間の延長により旭川医科大学における臨床研究の延長を申請し承認を受けた。当施設に送られてきた試料の保管管理に関しては専用の冷凍庫を準備し、扉には施錠を施した。この冷凍庫は暗証番号式ドアロック設置の部屋に固定し、試料の紛失防止策を講じた。測定直前に血清を解凍し、NTBI ならびにヘプシジン測定のための前処置をそれぞれ行い測定システムにアプライした。

【倫理面への配慮】当施設に送られてきた試料については、個人を特定可能な名前、ID 番号、カルテ番号とは無関係に設定した「施設別患者匿名化 ID」を運用し、個人情報漏洩防止に努めた。

## C. 研究結果

【登録患者検体の NTBI ならびにヘプシジン測定】骨髄不全症候群患者における体内鉄動態に関する臨床研究に登録の患者血清 19 検体、および、輸血後鉄過剰症に対する鉄キレート療法の有用性(臓器障害の予防改善効果)に関する臨床研究に登録の患者血清 92 検体について、NTBI ならびにヘプシジンの測定が終了し、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。

【Deferasirox (DFX) が血清鉄や UIBC などの鉄動態評価項目に与える影響の解析】本研究班での検体を利用した検討ではないが、deferasirox による鉄キレート療法施行中に、血清鉄や UIBC・TIBC といったマーカーが説明がつかない異常高値を示す症例が存在することが経験的に知られていた。我々はこの点に関して、iron-free DFX や DFX-Fe の血清中での存在が、血清鉄や UIBC 測定を行う比色法に直接影響を与えてしまうことを解明し、論文化した(Ikuta K, et al: Interference of deferasirox with assays for serum iron and serum unsaturated iron binding capacity during iron chelating therapy. Clin Chim Acta. 2011 Nov, 412(23-24):2261-6)。

## D. 考察

現在まで 111 検体の測定を実施してきたが、測定結果に影響を及ぼす試料上の問題およびシステム上の問題は発生しておらず、加えて、標準品による検量線も常に安定して描けていることから、得られた測定数値は信頼性の高い結果であると判断することができる。

骨髄不全症候群患者における体内鉄動態に関する臨床研究に登録の患者血清 19 検体、および、輸血後鉄過剰症に対する鉄キレート療法の有用性(臓器障害の予防改善効果)に関する臨床研究に登録の患者血清 92 検体の NTBI 値ならびにヘプシジン値より、現段階では一部、疾患別、治療前後、経過過程における血清 NTBI 値ならびにヘプシジン値の変動を把握することが可能な状況にある。平成 24 年度以降も引き続き当臨床研究登録患者の血清 NTBI ならびにヘプシジンを測定し、当初の目標検体数に到達することで、信頼性の高い内容となり、結果、本臨床研究の対象疾患における病態と鉄代謝の関係について世界的に新しい貴重な情報を生み出すことが期待される。

また、iron-free DFX や DFX-Fe の血清中での存在が、血清鉄や UIBC 測定を行う比色法に直接影響を与えてしまうことを解明したことは、今後、特に輸血後鉄過剰症に対する鉄キレート療法の有用性を解析していく際、血清鉄や UIBC の動きを検討するのに重要な情報を与えるものである。

#### E. 結論

NTBI 測定には non-metal HPLC システムを、ヘプシジン測定には LC-MS/MS システムをそれぞれ導入し、測定条件の最適化を検討し信頼性の高い高感度測定システムを維持することができている。その結果、NTBI 測定に関しては特に低濃度領域の安定した測定が可能となり、一方、ヘプシジン測定に関しては3種類の isoforms を同時に測定することが可能となった。これらのシステムを用いて得られた健常人の血清 NTBI 値ならびにヘプシジン (hepc-20, hepc-22, hepc-25) 濃度を基に、本臨床研究の対象疾患における病態と鉄代謝の関係について、一部ではあるが、疾患別、治療前後、経過過程における血清 NTBI 値ならびにヘプシジン値の変動を評価することが可能な段階にまで進んだ。

さらに、iron-free DFX や DFX-Fe の血清中での存在が、血清鉄や UIBC 測定を行う比色法に直接影響を与えてしまうことを解明したことは、輸血後鉄過剰症に対する鉄キレート療法の有用性を解析していく際に重要な情報を与えるものである。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

● Ikuta K, Ito S, Tanaka H, Sasaki K, Torimoto Y, Fujiya M and Kohgo Y : Interference of deferasirox with assays for serum iron and serum unsaturated iron binding capacity during iron chelating therapy. Clin Chim Acta. 2011 Nov,

412(23-24) :2261-6

● Tanaka H, Li Z, Ikuta K, Addo L, Akutsu H, Nakamura M, Sasaki K, Ohtake T, Fujiya M, Torimoto Y, Glass J and Kohgo Y : Iron facilitator LS081 reduces hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  protein and functions as anticancer agent in hepatocellular carcinoma. Cancer Sci 2011, 103(4) :767-74

● Sasaki K, Ikuta K, Tanaka H, Ohtake T, Torimoto Y, Fujiya M and Kohgo Y : Improved quantification for non-transferrin-bound iron measurement using high performance liquid chromatography by reducing iron contamination. Mol Med Reports 2011, 4(5) :913-918

● Sato K, Torimoto Y, Hosoki T, Ikuta K, Takahashi H, Yamamoto M, Ito S, Okamura N, Ichiki K, Tanaka H, Shindo M, Hirai K, Mizukami Y, Otake T, Fujiya M, Sasaki K, and Kohgo Y : Loss of ABCB7 gene: pathogenesis of mitochondrial iron accumulation in erythroblasts in refractory anemia with ringed sideroblast with isodicentric (X) (q13). 2011, 93(3) :311-8

● Ohnishi K, Torimoto Y, Ikuta K, Tanaka H, Hosoki T, Tanaka S, Hamano A, Sato K, Fujiya M, Sasaki K, Kohgo Y. ; Detection of soluble HFE associated with soluble transferrin receptor in human serum. Int J Mol Med. 2011;27(3) :435-440

● 生田克哉. 臨床検査の分子生物学：鉄代謝関連マーカーの検査と消化器疾患. p48-53, 分子消化器病 vol.9 no.1, 2012年

● 生田克哉、高後裕：【内科 疾患インストラクションガイド 何をどう説明するか】 血液・造血器疾患 多血症. Medicina 48(11) :414-416 2011年

● 高後裕：鉄代謝と鉄過剰. 日本内科学会雑誌 100(9) :2412-2424 2011年

● 生田克哉、高後裕：【消化管の輸送体】 鉄輸送

体. G. I. Research 19(5) p455-461 2011年

- 生田克哉、高後裕：【腎臓と貧血】鉄代謝、腎と透析 71(2):199-204 2011年
- 鳥本悦宏、生田克哉、高後裕：【日常診療でみられる血液異常と血液疾患】診断と治療 99(7):1155-1161 2011年
- 細木卓明、生田克哉、佐々木勝則、鳥本悦宏、高後裕：鉄代謝状態の評価の現状と今後の展望. 血液内科 62(6):774-780 2011年
- 生田克哉、高後裕：【見直されつつある生体鉄】鉄の生理 鉄のリサイクリング機構. 血液フロンティア 21(6):813-820 2011年
- 生田克哉、高後裕. 鉄過剰症. 症候群ハンドブック, p312、中山書店、2011年5月9日

## 2. 学会発表

- 高後裕：鉄代謝と鉄過剰. 招請講演. 第108回日本内科学会講演会 2011年11月13日 横浜 (東日本大震災の影響に伴い、開催日が4月から11月に変更になっています)
- 長谷部拓夢、大竹孝明、中嶋駿介、澤田康司、阿部真美、大平賀子、生田克哉、鈴木康秋、鳥本悦宏、高後裕：過食マウスの鉄・Hepcidin代謝異常におけるBMP6を介したシグナル系の関与. ポスター発表. 第15回日本肝臓学会大会 2011年10月20-21日 福岡
- 生田克哉、田中宏樹、鳥本悦宏、高後裕：経口鉄キレート剤 deferasirox による血清鉄および不飽和鉄結合能測定系への影響. 一般口演. 第12回日本検査血液学会学術集会 2011年7月17-18日、川崎
- Ichiki K, Tanaka H, Ikuta K, Hosoki T, Ito S, Shindo M, Sasaki K, Torimoto Y and Kohgo Y: Effect of deferasirox on gene expression involved in iron metabolism in mouse iron overload model. Poster

presentation. The 73<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. October 14-14 2011. Nagoya

- 佐々木 勝則, 生田 克哉, 田中 宏樹, 市来 一彦, 伊藤 巧, 大竹 孝明, 鳥本 悦宏, 高後 裕: ヘプシジン mRNA における Splicing Variant の同定. 一般口演. 第35回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会 2011年9月13-14日. 徳島
- 市来 一彦, 田中 宏樹, 生田 克哉, 佐々木雄亮, 下中靖, 佐々木 勝則, 伊藤 巧, 大竹 孝明, 鳥本 悦宏, 高後 裕: インターフェロン $\alpha$ によるヘプシジン発現調節. 一般口演. 第35回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会 2011年9月13-14日. 徳島
- 大竹 孝, 佐々木 勝則, 阿部 真美, 長谷部 拓夢, 澤田 康司, 鈴木 康秋, 田中 宏樹, 生田 克哉, 鳥本 悦宏, 高後 裕: 肝硬変におけるNTBI測定 of the検討. 一般口演. 第35回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会 2011年9月13-14日. 徳島
- Ito S, Ikuta K, Tanaka H, Sasaki K, Torimoto Y and Kohgo Y: The effect of deferasirox on the spectrophotometric assays for serum iron and serum unsaturated iron binding capacity during iron chelation therapy for iron overload. Poster presentation. 2011 IBIS Meeting BioIron, 2011.05.22-26, Vancouver, Canada
- Ichiki K, Tanaka H, Ikuta K, Sasaki Y, Sasaki-Noguchi M, Shimonaka Y, Hosoki T, Sasaki K, Ito S, Ohtake T, Torimoto Y and Kohgo Y: An abnormal iron metabolism in intergerron treatment. Poster presentation. 2011 IBIS Meeting BioIron, 2011.05.22-26, Vancouver, Canada
- Hosoki T, Ikuta K, Ohtake T, Tanaka H, Sasaki K, Torimoto Y and Kohgo Y: Reliable quantification of non-transferrin-bound iron (NTBI) in healthy volunteers by improved high sensitive method

using HPLC. 2011 IBIS Meeting BioIron ,  
2011.05.22-26, Vancouver, Canada

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

発明の名称：「高分子鉄」キレート剤」、発明者：高  
後裕、生田克哉、佐々木勝則、西田雄三、国内出願  
日：2011年1月14日、国際出願日：2012年1月12  
日

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

## 小児骨髄不全症における中央診断事業

研究協力者 小島 勢二 名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 教授

研究要旨：日本小児血液学会は平成21年2月より再生不良性貧血(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開始した。レビューは骨髄および末梢血塗抹標本を2施設(名古屋大学、聖路加国際病院)で、骨髄病理標本を1施設(名古屋第一赤十字病院)で行っている。レビュー開始から31ヶ月間で500例がレビューされた。レビュー結果はAAが246例、MDSが53例、若年性骨髄単球性白血病(JMML)が45例、CBFSが45例、急性白血病が23例、その他が137例であった。稀少疾患である小児骨髄不全症においては、中央診断を行うことによりその診断精度が上昇することが期待される。

### A. 研究目的

小児AA、MDSおよびCBFSは稀な疾患で、その診断は必ずしも容易ではない。そこで日本小児血液学会においてAA、MDSおよびCBFSを対象とした中央診断を行うことになった。

### B. 研究方法

中央診断事務局を名古屋大学小児科に設置した。A、MDS、あるいはCBFSが疑われる症例が発生した場合は、各施設から事務局に連絡をもらい、登録番号を発行した。レビューは骨髄および末梢血塗抹標本を2施設(名古屋大学小児科、聖路加国際病院小児科)で、骨髄病理標本を1施設(名古屋第一赤十字病院病理部)で行った。

(倫理面への配慮)

中央診断およびそれに伴う検査については、名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得て、さらに患者及び患者保護者の同意を取得した後に行った。

### C. 研究結果

レビュー開始から31ヶ月間で500例がレビューされた。レビュー結果は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. 考案

RCC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

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. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Yagasaki H, Kojima S, Yabe H, Kato K, Kigasawa H, Sakamaki H, Tsuchida M, Kato S, Kawase T, Morishima Y, Kodera Y. Acceptable HLA-mismatching in unrelated donor bone marrow transplantation for patients with acquired severe aplastic anemia. *Blood*. 2011 Sep 15;118(11):3186-3190.
2. Nishio N, Takahashi Y, Ohashi H, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Shimada A, Yagasaki H, Kojima S. Reduced-intensity conditioning for alternative donor hematopoietic stem cell transplantation in patients with dyskeratosis congenita. *Pediatr Transplant*. 2011 Mar;15(2):161-6.
3. Pulsipher MA, Young NS, Tolar J, Risitano AM, Deeg HJ, Anderlini P, Calado R, Kojima S, Eapen M, Harris R, Scheinberg P, Savage S, Maciejewski JP, Tiu RV, Difronzo N, Horowitz MM, Antin JH. Optimization of Therapy for Severe Aplastic Anemia Based on Clinical, Biological and Treatment Response Parameters: Conclusions of an International Working Group on Severe Aplastic Anemia Convened by the Blood

and Marrow Transplant Clinical Trials Network, March 2010. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011 Mar;17(3):291-9.

4. Kamio T, Ito E, Ohara A, Kosaka Y, Tsuchida M, Yagasaki H, Mugishima H, Yabe H, Morimoto A, Ohga S, Muramatsu H, Hama A, Kaneko T, Nagasawa M, Kikuta A, Osugi Y, Bessho F, Nakahata T, Tsukimoto I, Kojima S; Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. Relapse of aplastic anemia in children after immunosuppressive therapy: a report from the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. *Haematologica*. 2011 Jun;96(6):814-9.
5. Yoshida N, Yagasaki H, Hama A, Takahashi Y, Kosaka Y, Kobayashi R, Yabe H, Kaneko T, Tsuchida M, Ohara A, Nakahata T, Kojima S. Predicting response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica*. 2011 May;96(5):771-4.
6. Kojima S, Nakao S, Young N, Bacigalupo A, Gerard G, Hirano N, Maciejewski J, Deeg J, Marsh J, Zhang FK, Lee JW, Ozawa K. The Third Consensus Conference on the treatment of aplastic anemia. *Int J Hematol*. 2011 Jun;93(6):832-7.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



## JAK2 遺伝子変異の高感度検出

研究協力者：小松 則夫（順天堂大学医学部血液内科学講座 教授）

### 研究要旨

従来の解離曲線解析技術に制限酵素処理と人工核酸である LNA プローブによる対立遺伝子の選択的増幅阻害を組み合わせ、JAK2 遺伝子変異を高感度に検出可能な新規技術を開発した。本技術は、対象の JAK2 アレルバーデンを 0.01%まで検出可能であり、擬陽性を生ずることがなく、確実に JAK2 変異の有無を検出可能であることから、臨床検査医学の分野への幅広い寄与が期待される。

### A. 研究目的

骨髄増殖性腫瘍（myeloproliferative neoplasm : MPN）において Janus Kinase 2 (JAK2) 遺伝子の点突然変異 (JAK2V617F) が報告された。一個体由来の血液試料であっても、野生型、ホモ型、ヘテロ型の血液細胞が混在しており、従来の SNP 解析のように、遺伝子変異の検出やタイピングでは正確に患者の変異の状況を把握することはできない。このような観点から、JAK2V617F アレルバーデンを定量する技術がいくつか報告されている。一方で、JAK2V617F 変異の有無は MPN の診断を確定させるために重要であるため、依然として高感度な JAK2V617F 検出技術へのニーズは高い。そこで本研究では JAK2V617F 変異を高感度に検出できる技術の確立を試みた。

### B. 研究方法

JAK2 野生型遺伝子と JAK2V617F 遺伝子に共通のプライマーセットを用いて、サンプル中の両遺伝子を競合的に増幅させた。増幅反応後のサンプルを BsaXI と呼ばれる制限酵素で処理するというサイクルを 2 回繰り返した。処理後のサンプルに人工核酸である LNA プローブを供試し、さらに PCR による増幅を実施した。LNA プローブは JAK2V617F 遺伝子に特異的に結合し、JAK2V617F 遺伝子の増幅を効率的に阻害する役割をもつ。増幅反応後、Q-probe と呼ばれる蛍光プローブを用いてサンプル中の JAK2V617F 遺伝子由来の産物の有無を検出した。

Q-probe は JAK2V617F 部位にオーバーラップするよう設計され、JAK2V617F 遺伝子にパーフェクトマッチとなるよう設計されている。そのため、JAK2 野生型遺伝子と Q-probe との結合にはミスマッチが生じ、JAK2V617F 遺伝子と結合した時と比較しプローブの解離温度が下がることとなる。これにより、JAK2 野生型遺伝子と JAK2V617F 遺伝子を区別できる。

### (倫理面への配慮)

本研究においては、研究対象者本人に文書ならびに口頭で説明を行い、十分理解を得たうえで文書による同意を得ることとした。このとき、同意が得られない場合には研究の対象としないものとした。

また、本研究では個人情報を含む情報を保護するため、提供された試料等は、『ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針』に定められた方法に従って、個人情報管理者およびその監督下にある研究分担者により連結可能匿名化を行い、その後解析に用いた。個人情報の管理は、他のコンピューターやネットワークと切り離されたコンピューターを用いて行い、その情報は外部記憶装置に保管して、個人情報管理者が厳重に保管するものとした。

### C. 研究結果

JAK2V617F 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

において再現性よく *JAK2V617F* 遺伝子の検出が可能であった。また、この際 *JAK2* 野生型遺伝子由来のノイズは確認されず、極めて正確、かつ、高感度に *JAK2V617F* 遺伝子の有無を判別できる手法であることがわかった。

該当なし

3. その他  
該当なし

#### D. 考察

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。また、既往の報告では *JAK2* 野生型遺伝子由来のシグナルが発せられることによる擬陽性が問題となっているが、本技術においては *JAK2* 野生型遺伝子由来のシグナルは確認されず、極めて正確に *JAK2V617F* 遺伝子の有無を判別できる。万が一、*JAK2* 野生型由来のシグナルが生じたとしても、本技術ではシグナルのピークの位置から容易に野生型、変異型の判別が可能である。本技術は、MPNの確定診断に大いに寄与すると考えられる。

#### E. 結論

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

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

● Morishita S, Komatsu N, Kirito K, Koda H A, Sekiguchi Y, Tsuneda S, and Noda N: Alternately binding probe competitive PCR as a simple, cost-effective, and accurate method for *JAK2V617F* allele burden in myeloproliferative neoplasms. *Leuk. Res.* 2011; 35 (1632-1636)

##### 2. 学会発表

● 該当なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

##### 1. 特許取得

野田尚宏, 関口勇地, 森下総司, 常田聡, 小松則夫, 蓮沼彩, 桐戸敬太, *JAK2* 遺伝子の変異解析方法, 特開 2012-034580

##### 2. 実用新案登録

## 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

研究協力者：市川幹 (東京大学医学部附属病院血液・腫瘍内科 講師)

### 研究要旨

骨髄不全症候群の病態解明、治療標的探索に有効な生物学的なモデルを構築するため、家族性造血不全症候群のひとつである家族性血小板異常症の患者から誘導多能性幹細胞(iPS 細胞)を樹立した。作成した iPS 細胞において多分化能および血球への分化を確認することができ、造血不全を *in vitro* で再現するモデルの構築に成功した。今後、この細胞株をツールとして、FPD における造血障害を詳細に解析するとともに、治療標的の探索を行ってゆきたい。

### A. 研究目的

骨髄不全症候群はその病因・治療標的ともに不明の点が多く、造血幹細胞移植以外に有効な治療がなく、疾患の発症機序の解明と治療標的の探索が望まれている。造血細胞に分化できる罹患者の細胞由来の幹細胞を作成することで、これらの探索に有効な生物学的なモデルとすることができると考えられる。そのため、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)の検体をもとに、誘導多能性幹細胞(iPS 細胞)を樹立することを試みた。

### B. 研究方法

FPD を基礎に白血病を発症し、造血幹細胞移植によって軽快した患者の皮膚組織を骨髄生検の際に採取し、真皮組織を線維芽細胞由来細胞株用の培地(DMEM, FCS 10%)で培養した。およそ2週間で線維芽細胞(ヒト皮膚線維芽細胞, HDF)の遊走と増殖が始まったため、十分に増殖したところで(継代を重ねすぎると iPS 細胞化の効率が下がることが知られているので 10 回継代以内に)凍結保存した。

レトロウイルスベクターpMXにリプログラミング4因子(MYC, SOX2, KLF4, OCT3/4)の cDNA を組み込み、レトロウイルスパッケージング細胞株

293GPG を用いて amphotropic なウイルスを作製した。この4種類のレトロウイルスを、最終濃度 5 $\mu$ g/mL の硫酸プロタミン(感染効率を高める試薬)と共に培養中の HDF に加え、4 因子を導入した (Day0)。Day7 に、準備しておいたマウス胚性線維芽細胞(MEF)のフィーダー上に HDF をまき直し、day9 に培地を線維芽細胞用のものから iPS 細胞用のものに変更した。このとき、リプログラミング効率を向上させるため、通常の iPS 細胞培地 (DMEM/F12, KSR, L-glutamine, NEAA, 2-ME, 10 $\mu$ g/mL bFGF)に、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である sodium butyrate を加えた。その後は培地交換しながら経過観察した。

### (倫理面への配慮)

本研究はヒトの検体を用い、また遺伝子解析を含んでいるため、「臨床研究に関する倫理指針」および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づき、本学の倫理委員会の承認のもと、十分な説明の上で患者の自由意思による同意 (インフォームド・コンセント) を取得の上実施した。

### C. 研究結果

以上の培養により、Day14 頃には不完全なリプログラミングの生じた pseudo コロニーが多数出現

し、day23 に iPS 細胞様のコロニーを認めた。Day34 までの培養で、計 9 つの iPS 細胞クローンを得ることに成功した。

これらのクローンについて、NANOG や OCT4, SOX2, REX といった、ES 細胞に特異的に発現している未分化マーカーが発現していることを RT-PCR で確認し、同じく ES 細胞に特異的に発現している未分化マーカーである TRA-1-60, SSEA-4 が発現していることを免疫染色で確認した。また、1 つの iPS 細胞クローンを免疫不全マウス (NOD/Shi-scid,IL-2R $\gamma$ KO, NOG) の精巣内に注射して数ヶ月の後に奇形腫を発症することを確認し、樹立した iPS 細胞クローンが多分化能を有していることを証明した。これらの iPS 細胞クローンは、本患者の有する RUNX1 の heterozygous mutation RUNX1R174X を確かに有しており、FPD 患者細胞由来の iPS 細胞であることが確認された。

また、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実験を行なった。Day0～day4 まで最終濃度 40ng/mL の BMP4 を添加して中胚葉分化を誘導し、day4～day6 まで同 40ng/mL の VEGF, 同 50ng/mL の SCF を添加して造血系への分化を誘導、day6 以降は造血サイトカイン(SCF, TPO, IL-3, FP6, EPO) を添加して造血細胞の増殖を刺激した。その結果、効率は不良であったが、造血系マーカー CD45 陽性の細胞を得ることができた。

#### D. 考察

本研究によって、RUNX1 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の評価などにも応用できる有用なツールとなると考えられた。

#### E. 結論

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。今後、この細胞株をツールとして、FPD における造血障害を詳細に解析するとともに、治療標的の探索を行ってゆきたい。

#### F. 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 case of myeloid sarcoma with correlation to JAK2V617F mutation, complicated by myelofibrosis and secondary acute myeloid leukemia. *Internal Medicine*, 50: 2649-2652, 2011.

##### 2. 学会発表

●Ichikawa M, Nannya Y, Kurokawa M. Use of second generation tyrosine kinase inhibitors for imatinib-induced renal dysfunction. 第 73 回日本血液学会学術集会, 2011 年 10 月 15 日, 名古屋