

201231006B

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 22—24 年度 総合研究報告書

研究代表者 小川 誠司

平成 25(2013)年 4 月

目 次

I. 総合研究報告書 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班 研究代表者 東京大学医学部附属病院 小川誠司	1
II. 骨髄異形成症候群に対する検体集積事業ならびに遺伝子解析研究 実施計画書（第4版）	15
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	25
IV. 研究成果の刊行物・別刷	31

I . 総合研究報告

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、この多様な病態を分子レベルで明らかにした上で、個々の病態に即した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) 研究基盤となるMDS 検体集積事業、2) 次世代シーケンス技術を活用した新規標的遺伝子の探索、3) MDSにおけるエピゲノム異常の解析、4) 骨髄不全における免疫病態研究を中心に行った。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、本研究班では138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226例を超えている。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）の治療研究（MDS212）と連携した検体集積が開始をされており、世界的にも有数のMDS 検体保存システムが構築されると期待される。2)においては、網羅的な新規変異遺伝子の探索を目的に、次世代シーケンサによるMDSの全エクソン・シーケンスを行い、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世界に先駆けて明らかとした。また20番長腕の共通欠失領域の標的候補遺伝子としてNCOA3 遺伝子変異を同定した。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、効果判定に有用な解析法として、全ゲノムDNAメチル化解析が可能なSingle molecule methylation assay (SMMA)法の開発、末梢血遊離DNAを用いた経時的なゲノム・エピゲノム解析の検討が行われ、臨床での応用が期待される。更には、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、5-aza投与によりK562細胞のヘモグロビンの生産量が増加はヘモグロビンの転写レベルへの作用ではなく、eEF1aやeIF2bによる翻訳効率の上昇が寄与していることを見いだした。TET2は脱メチル化過程で重要な働きを担う分子であるが、MDSで高頻度に不活化変異が観察される。MDS患者の骨髄単核球でヒドロキシメチルシトシン（5hmC）量は、健常人と比べ有意に少ないこと、正常に機能している骨髄においても、TET2変異を有するクローナル造血が観察されることを明らかとした。4)においては、再生不良性貧血例のSNPアレイ解析により、6番染色体短腕（6p）のHLA遺伝子領域を含むuniparental disomy (UPD)が13%の症例に認められ、特定のHLAによって提示されるCTLが骨髄不全の発症に関与し、HLA欠失のためCTLの攻撃を免れた6pUPD陽性造血幹細胞がクローン性に造血を支持していると考えられた。また、13q欠失で特徴づけられる骨髄不全例は、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。

研究分担者

- 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
- 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
- 石川 隆之 (H22年度)
京都大学医学研究科
血液・腫瘍内科学
- 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
- 千葉 滋
筑波大学大学院
人間総合科学研究科 教授
- 三谷 絹子 (H22-23年度)
獨協医科大学
内科学(血液・腫瘍) 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、この多様な病態を分子レベルで明らかにし、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、MDS の治療成績の向上に資することを目的として研究を行った。

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、高密度 SNP アレイによるゲノム解析に用いられた(小川)。また、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の治療研究との連携に向けた研究計画の作成など枠組み作りが行われた(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)

49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自己正常細胞(末梢血より純化したTリンパ球または頬粘膜)について行った。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った。出力されたデータは、独自に開発した解析パイプラインGenomonを用いて、東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターのスーパーコンピュータにより解析を行い、MDS細胞特異的（後天的）変異候補を抽出した。変異候補は、プールシーケンスまたはサンガーシーケンスにより検証を行った。複数例に同定さ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、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 の遺伝子等について、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、変異が認められた候補遺伝子について多数例の 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 を用いたゲノム及びエピゲノム解析（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。メチル化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、いずれもイル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ス上に貼付け、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。

D. 骨髄異形成症候群におけるDNA修飾に関する研究（千葉）

MDS患者骨髄細胞におけるDot-Blot法によりヒドロキシメチルシトシン (5hmC) 量を測定し、正常コントロールやMDS以外の造血器腫瘍細胞などにおける5hmC量と比較した。また、TET2遺伝子のノックダウンマウスおよびコントロールマウス骨髄よりLin⁻細胞をMACSにより分取後、同様に5hmCを定量した。さらに、AML細胞株にTET2変異体を導入した安定細胞株を作製し、hmCの定量および細胞増殖をMTT法により測定した。

4) 骨髄不全における免疫病態研究（中尾・小川）

「免疫病態の関与が濃厚な」再生不良性貧血症例および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について、高密度 SNP アレイによるゲノムコピー数・LOH解析を行

った。共通して観察されたHLA領域を含む6番染色体短腕UPDおよび13番染色体長腕欠失と免疫病態との関連を検討した。また、遺伝子変異によるクローナル造血を明らかにする目的で全エクソン・シーケンスを再生不良性貧血症例について行った。

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) 本研究班期間内に骨髓細胞 138 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、検体集積事業が開始された。

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)

MDS49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またはプールhシーケンスにより461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405個は造血器疾患で遺伝子変異の報告がない新規変異遺伝子であり、30例に*U2AF1*、*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。また、他にも新たな標的遺伝子変異として、*STAG2*、*RAD21*、*SMC3*に代表されるコヒーシン分子変異および*SETBP1*変異が同定された。コヒーシン異常は、MDSを含む骨髓系疾患の10-20%に広く観察された。*SETBP1*変異は、MDSからAMLへの進展過程で獲得されることが多く、本変異を有する症例の生命予後は不良であった。

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。非欠失例においては、発現低下が認められる症例は認められたが、変異例は見出されていない。

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、本事業で開発した蛍光標識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

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、シーケンサ解析の結果から、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。MDS患者由来や臍帯血由来の造血幹細胞を用いた赤

血球系への分化誘導実験により、先の翻訳因子の関与を検証した。

4) 骨髄不全における免疫病態研究 (中尾・小川)
再生不良性貧血患者306例の末梢血をSNPアレイで解析したところ、6番染色体短腕のHLA遺伝子領域を含むuniparental disomy (6pUPD)が13%に認められた。6pUPD陽性例のうち、末梢血白血球が入手できたHLA-Aヘテロ接合体19例について、HLA-A抗原の発現を調べたところ、片方のアレルを欠失した細胞が全例で、且つ全ての白血球系統に検出された。6pUPD陽性症例において高頻度に欠失しているHLAアレルはHLA-A*02:01、A*02:06、A*31:01、B*40:02であり、骨髄バンクに登録された407例のAA例におけるこれら4アレル頻度は、その他の血液疾患6206例における頻度に比べて、有意に高値であった。

13q-陽性骨髄不全22例の臨床像と予後を検討した。13q-例の骨髄像には形態異常が乏しいことから、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。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、むしろ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250 を超えており、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) 次世代シーケンス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、いくつもの遺伝子変異が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、特徴的である遺伝子異常である。現在、モデルマウスの作成を進めており、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。同じく、本研究で明らかとなったSETBP1変異は、変異例の予後は不良であり、治療選択において有用な分子マーカーとなると考えられた。

3) MDS におけるエピゲノム異常の解析研究
MDS における脱メチル化剤の臨床応用が開始され、移植の適応が難しい高齢者を中心に重要な治療薬と位置づけられており、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。

一方で、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。また、TET2 変異とヒドロキシメチル化の関係が明らかとなり、TET2 変異によりメチル化異常が生じ得ると考えられた。また、疾患に至る前にTET2 変異が生じた細胞がクローン性に拡大し、MDS の準備状態を形作っていることが示唆された。

4) 骨髄不全における免疫病態研究

患者末梢血中におけるHLA アレル欠失血球や6pUPD などを検出することにより、骨髄不全におけるCTL の関与を証明できる可能性が示唆された。したがって、再生不良性貧血かMDS かの診断に迷う症例に対してHLA アレルを決定し、HLA-A アレルヘテロ接合体であった場合には、それぞれのアレル発現をフローサイトメトリーで検出することにより、MDS と診断される例における免疫病態を迅速に診断できる可能性がある。さらに、今回の検討によって明らかとなった6pUPD 陽性造血幹細胞クローンによるクローン性造血は、ヒト造血が単一の造血幹細胞によって長期間維持されることを証明した初めてのモデルであることから、クローン性造血における血球の老化や分化のメカニズムを検討するための絶好の材料と考えられる。一方、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高い治療が行われてきた。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 の白血病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 の治療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。次世代シーケンサを活用した全エクソン・シーケンス解析を通じて、MDS に高頻度かに 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。

これまでに報告のある遺伝子異常と異なり、MDS に特徴的な異常であり、RNA スプライシングを介した研究を通じて、MDS の分子病態の理解が大きく進み、新たな治療戦略の開発に寄与することが期待される。MDS の治療薬として脱メチル化剤が臨床応用され、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、6p-UPD や 13q 欠失で特徴づけられる症例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、JALSG との連携も開始し、検体集積の充実とともに、MDS 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, Kato M, Kawahata R, Matsubara A, Takita J, Shih LY, Mori H, Koeffler HP, Ogawa S. A nonsense mutation of IDH1 in myelodysplastic syndromes and related disorders. *Leukemia*. 2011 Jan;25(1):184-6.

2)Oki K, Takita J, Hiwatari M, Nishimura R, Sanada M, Okubo J, Adachi M, Sotomatsu M, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. IDH1 and IDH2 mutations are rare in pediatric myeloid malignancies. *Leukemia*. 2011 Feb;25(2):382-4.

3)Ogawa S, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koeffler HP, Sanada M. Deregulated intracellular signaling by mutated c-CBL in myeloid neoplasms. *Clin Cancer Res*.

- 2010 Aug 1;16(15):3825-31.
- 4)Ogawa S, Sanada M, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koefler HP. Gain-of-function c-CBL mutations associated with uniparental disomy of 11q in myeloid neoplasms. *Cell Cycle*. 2010 Mar 23;9(6).
- 5)Ishikawa Y, Kiyoi H, Naoe T. Prevalence and clinical characteristics of N-terminally truncated WT1 expression in acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2011. [Epub ahead of print]
- 6) Miyawaki S, Hatsumi N, Tamaki T, Naoe T, Ozawa K, Kitamura K, Karasuno T, Mitani K, Kodaera Y, Yamagami T, Koga D. Prognostic potential of detection of WT1 mRNA level in peripheral blood in adult acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 51:1855-61, 2010.
- 7)Iio A, Nakagawa Y, Hirata I, Naoe T, Akao Y. Identification of non-coding RNAs embracing microRNA-143/145 cluster. *Mol Cancer*. 9:136, 2010.
- 8)Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi YL, Ueno T, Soda M, Hamada T, Haruta H, Takada S, Miyazaki Y, Kiyoi H, Ito E, Naoe T, Tomonaga M, Toyota M, Tajima S, Iwama A, Mano H. Array-based genomic resequencing of human leukemia. *Oncogene*. 29:3723-31, 2010.
- 9)Morita Y, Kanamaru A, Miyazaki Y, Imanishi D, Yagasaki F, Tanimoto M, Kuriyama K, Kobayashi T, Imoto S, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R. Comparative analysis of remission induction therapy for high-risk MDS and AML progressed from MDS in the MDS200 study of Japan Adult Leukemia Study Group. *Int J Hematol*. 91:97-103, 2010.
- 10)Qi Z, Takamatsu H, Espinoza JL, Lu X, Sugimori N, Yamazaki H, Okawa K, Nakao S. Autoantibodies specific to hnRNP K: a new diagnostic marker for immune pathophysiology in aplastic anemia. *Ann Hematol*, 89:1255-1263, 2010
- 11)Katagiri T, Qi Z, Ohtake S, Nakao S. GPI-anchored protein-deficient T cells in patients with aplastic anemia and low-risk myelodysplastic syndrome: implications for the immunopathophysiology of bone marrow failure. *Eur J Haematol*, 86:226-236 2011
- 12)Kanda J, Mizumoto C, Kawabata H, Ichinohe T, Tsuchida H, Tomosugi N, Matsuo K, Yamashita K, Kondo T, Ishikawa T, Uchiyama T.; Clinical significance of serum hepcidin levels on early infectious complications in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009 Aug;15(8):956-962.
- 13)Kitawaki T, Kadowaki N, Fukunaga K, Kasai Y, Maekawa T, Ohmori K, Itoh T, Shimizu A, Kuzushima K, Kondo T, Ishikawa T, Uchiyama T.; Cross-priming of CD8(+) T cells in vivo by dendritic cells pulsed with autologous apoptotic leukemic cells in immunotherapy for elderly patients with acute myeloid leukemia. *Exp Hematol*. 2011 Apr;39(4):424-433.
- 14)石川隆之. 骨髓異形成症候群 MDS の診断と分類 FAB 分類から WHO 分類へ. *臨床血液*. 2010;51(10):1470-9.
- 15)Okuya M, Kurosawa H, Kikuchi J, Furukawa Y, Matsui H, Aki D, Matsunaga T, Inukai T, Goto H, Altura RA, Sugita K, Arisaka O, Look AT, Inaba T. Upregulation of survivin by the E2A-HLF chimera is indispensable for the survival of t(17;19)-positive leukemia cells. *J. Biol. Chem*. 285: 1850-1860, 2010
- 16)Nagamachi A, Htun PW, Ma F, Miyazaki K, Yamasaki N, Kanno M, Inaba T, Honda I, Okuda T, Oda H, Tsuji K, Honda H. A 5' untranslated region containing the IRES element in the Runx1 gene is required for angiogenesis, hematopoiesis and leukemogenesis in a knock-in mouse model. *Dev Biol*. 345: 226-236, 2010
- 17)Mori N, Yoshinaga K, Tomita K, Ohwashi M, Kondoh T, Shimura H, Wang YH, Shiseki M, Okada M, Motoji T. Aberrant methylation of the RIZ1 gene in myelodysplastic syndrome and

- acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 35(4):516-21, 2011.
- 18) Akiyama N, Miyazawa K, Kanda Y, Tohyama K, Omine M, Mitani K, Ohyashiki K. Multicenter phase II trial of vitamin K2 plus 1 α -hydroxyvitamin D3 combination therapy for low-risk myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 34:1151-1157, 2010.
- 19) Miyawaki S, Hatsumi N, Tamaki T, Naoe T, Ozawa K, Kitamura K, Karasuno T, Mitani K, Kodaera Y, Yamagami T, Koga D. Prognostic potential of detection of WT1 mRNA level in peripheral blood in adult acute myeloid leukemia. *Leuk & Lymph* 51:1855-1861, 2010.
- 20) 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, Apr 8, 2010
- 21) 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
- 22) 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 20.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) 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)
- 26) 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
- 27) 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)
- 28) 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.
- 29) 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.
- 30) 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
- 31) 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
- 32) 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.
- 33) 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.
- 34) 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
- 35) Kusakabe M, Hasegawa K, Hamada M, Nakamura M, Ohsumi 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
- 36) 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
- 37) Shiraishi Y, Sato Y, Chiba K, Okuno Y, Nagata Y, Yoshida K, Shiba N, Hayashi Y, Kume H, Homma Y, Sanada M, Ogawa S, Miyano S. An empirical Bayesian framework for somatic mutation detection from cancer genome sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2013 in press
- 38) Kon S, Minegishi N, Tanabe K, Watanabe T, Funaki T, Wong WF, Sakamoto D, Higuchi Y, Kiyonari H, Asano K, Iwakura Y, Fukumoto M, Osato M, Sanada M, Ogawa S, Nakamura T, Satake M. Smap1 deficiency perturbs receptor trafficking and predisposes mice to myelodysplasia. *J Clin Invest.* 2013;123(3):1123-37.
- 39) Kunishima S, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Muramatsu H, Chiba K, Tanaka H, Miyazaki K, Sakai M, Ohtake M, Kobayashi R, Iguchi A, Niimi G, Otsu M, Takahashi Y, Miyano S, Saito H, Kojima S, Ogawa S. ACTN1 Mutations Cause Congenital Macrothrombocytopenia. *Am J Hum Genet.* 2013 Mar;92(3):431-8.
- 40) Ogawa S. Splicing factor mutations in myelodysplasia. *Int J Hematol.* 2012 Oct;96(4):438-42.
- 41) Ohba R, Furuyama K, Yoshida K, Fujiwara T, Fukuhara N, Onishi Y, Manabe A, Ito E, Ozawa K, Kojima S, Ogawa S, Harigae H. Clinical and genetic characteristics of congenital sideroblastic anemia: comparison with myelodysplastic syndrome with ring sideroblast (MDS-RS). *Ann Hematol.* 2013 Jan;92(1):1-9.
- 42) Meggendorfer M, Roller A, Haferlach T, Eder C, Dicker F, Grossmann V, Kohlmann A, Alpermann T, Yoshida K, Ogawa S, Koeffler HP, Kern W, Haferlach C, Schnittger S. SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Blood.* 2012 Oct ;120(15):3080-8.
- 43) Ueda T, Sanada M, Matsui H, Yamasaki N, Honda ZI, Shih LY, Mori H, Inaba T, Ogawa S, Honda H. EED mutants impair polycomb repressive complex 2 in myelodysplastic syndrome and related neoplasms. *Leukemia.* 2012 Dec;26(12):2557-60.
- 44) Sugimoto T, Tomita A, Abe A, Iriyama C, Kiyoi H, Naoe T. Chimeric antisense RNA

derived from chromosomal translocation modulates target gene expression. *Haematologica*. 2012 Aug;97(8):1278-80.

45) Shimada K, Tomita A, Minami Y, Abe A, Hind CK, Kiyoi H, Cragg MS, Naoe T. CML cells expressing the TEL/MDS1/EVI1 fusion are resistant to imatinib-induced apoptosis through inhibition of BAD, but are resensitized with ABT-737. *Exp Hematol*. 2012 Sep;40(9):724-737.

46) Naoe T, Kiyoi H. Genen mutations of acute myeloid leukemia in the genome era. *Int J Hematol*. 2013 Feb;97(2):165-74.

47) Hosokawa K, Katagiri T, Sugimori N, Ishiyama K, Sasaki Y, Seiki Y, Sato-Otsubo A, Sanada M, Ogawa S, Nakao S. Favorable outcome of patients who have 13q deletion: a suggestion for revision of the WHO 'MDS-U' designation. *Haematologica*. 2012;97:1845-9.

48) Katagiri T, Kawamoto H, Nakakuki T, Ishiyama K, Okada-Hatakeyama M, Ohtake S, Seiki Y, Hosokawa K, Nakao S. Individual hematopoietic stem cells in human bone marrow of patients with aplastic anemia or myelodysplastic syndrome stably give rise to limited cell lineages. *Stem cells*. 2013; in press.

49) Seiki Y, Sasaki Y, Hosokawa K, Saito C, Sugimori N, Yamazaki H, Takami A, Nakao S. Increased plasma thrombopoietin levels in patients with myelodysplastic syndrome: a reliable marker for a benign subset of bone marrow failure. *Haematologica*. 2013; in press.

50) Sakamoto S, Kawabata H, Kanda J, Uchiyama T, Mizumoto C, Kondo T, Yamashita K, Ichinohe T, Ishikawa T, Kadowaki N, Takaori-Kondo A. Differing impacts of pretransplant serum ferritin and C-reactive protein levels on the incidence of chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol*. 2013;97:109-16.

51) Chonabayashi K, Hishizawa M, Kawamata S, Nagai Y, Ohno T, Ishikawa T, Uchiyama T,

Takaori-Kondo A. Direct binding of Grb2 has an important role in the development of myeloproliferative disease induced by ETV6/FLT3. *Leukemia*. In press.

52) Shinohara M, Io K, Shindo K, Matsui M, Sakamoto T, Tada K, Kobayashi M, Kadowaki N, Takaori-Kondo A. APOBEC3B can impair genomic stability by inducing base substitutions in genomic DNA in human cells. *Sci Rep*. 2012;2:806,1-8.

53) Kawabata H, Doisaki S, Okamoto A, Uchiyama T, Sakamoto S, Hama A, Hosoda K, Fujikura J, Kanno H, Fujii H, Tomosugi N, Nakao K, Kojima S, Takaori-Kondo A. A case of congenital dyserythropoietic anemia type 1 in a Japanese adult with a CDAN1 gene mutation and an inappropriately low serum hepcidin-25 level. *Intern Med*. 2012;51:917-20.

54) Shi L, Fujioka K, Sun J, Kinomura A, Inaba T, Ikura T, Ohtaki M, Yoshida M, Kodama Y, Livingston GK, Kamiya K, Tashiro S. A modified system for analyzing ionizing radiation-induced chromosome abnormalities. *Radiat Res*. 177: 533-538, 2012

55) Ozaki Y, Matsui H, Asou H, Nagamachi A, Aki D, Honda H, Yasunaga S, Takihara Y, Yamamoto T, Izumi S, Ohsugi M, Inaba T. Poly-ADP ribosylation of Miki by tankyrase-1 promotes centrosome maturation. *Mol. Cell* 47: 694-706, 2012

56) Kobayashi Y, Matsui H, Kanai A, Tsumura M, Okada S, Miki M, Nakamura K, Kunishima S, Inaba T, Kobayashi M Identification of integrin $\beta 3$ L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant thrombocytopenia accompanied by anisocytosis. *Br J. Haematol* 160: 521-529, 2013

57) Goyama S, Takeuchi K, Kanda Y, Nannya Y, Chiba S, Fukayama M, Kurokawa M. Post-transplant endothelial disorder after hematopoietic SCT: a blinded autopsy study. *Bone Marrow Transplant* 47(9):1243-1245, 2012

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)

特願 2011-169662 (小川)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究班ホームページ

<http://www.mdsresearch.net/index.html>

Ⅱ 「骨髓異形成症候群に対する検体集積事業ならびに 遺伝子解析研究」実施計画書（第4版）

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」(班長 小川誠司)

「特発性造血障害に関する調査研究班」(班長 小澤敬也)

骨髄異形成症候群に対する検体集積事業ならびに

遺伝子解析研究

(第4版)

研究代表者 小川誠司

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)

東京大学医学部附属病院 キャンサーボード・がんゲノミクス
プロジェクト

検体集積事業総括責任者 高折 晃史

京都大学医学部血液・腫瘍内科

遺伝子解析研究総括責任者 三谷絹子

獨協医科大学血液・腫瘍内科

実施計画書

第1版 2005年8月22日

2005年8月24日改訂

2005年11月24日改訂

2006年1月11日改訂

第2版 2006年6月5日

2007年6月30日改訂

第3版 2007年11月13日

2007年12月21日改訂

第4版 2010年7月30日

2010年9月23日改訂

1、背景、目的

骨髓異形成症候群は血球形態異常と無効造血を特徴とする造血幹細胞腫瘍である。しばしば白血病に移行する。極めてヘテロな疾患であり、症例毎に背景となる分子異常が異なり、多様な病型・病像を示す。病型分類には WHO 分類が採用され、IPSS (international prognostic scoring system)あるいは WPSS (WHO-based prognostic scoring system)を用いたリスク分類がなされ、治療が層別化される。現在造血幹細胞移植が唯一の根治治療であるが、低リスク群には免疫抑制剤（シクロスポリン）あるいはレナリドマイド、高リスク群にはメチル化阻害剤が導入されつつある。しかしながら、これらの新規分子標的療法の奏功率は必ずしも高くなく、無視できない有害事象を伴うことから、治療前の効果予測が望まれる。分子病態の研究により、治療の層別化に直結した病型分類が可能になることが期待される。

このような背景のもと、2005 年 8 月より厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「骨髓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」（MDS 重点班）（班長 三谷絹子）では、「特発性造血障害に関する調査研究班」（班長 小澤敬也）との共同で「再生不良性貧血と骨髓異形成症候群の前方視症例登録・セントラルレビュー・追跡調査研究」とリンクした「骨髓異形成症候群に対する検体集積事業ならびに遺伝子解析研究」が開始された。これは臨床データを付帯する全国レベルでの検体集積を行うことにより、骨髓異形成症候群の発症・進展に至る遺伝子異常の解明、正確な診断あるいは適切な治療法選択のための有用な分子マーカーの同定、ならびに画期的治療法開発のための新規分子標的の同定を目的とする。本研究計画は第 3 版の改訂が 2007 年 11 月になされ、検体集積期間は 2009 年 3 月、解析期間は 2010 年 3 月に終了した。検体供与症例には、SNP アレイの解析結果を返却するシステムが構築され（小川誠司担当、）個別解析研究 1 件への検体配布も実施された。

今回、これまで集積された検体の多くは包括的同意が得られていること、骨髓異形成症候群に対する重点研究班が「不応性貧血の治療率向上を目指した分子・免疫病態研究」に改組になったことに伴い、新たな組織で「骨髓異形成症候群の検体集積事業と遺伝子解析研究」（第 4 版）を継続することとなった。臨床情報のみならずゲノム情報を付帯した検体を集積・解析することにより、さらに MDS の分子病態研究が進展することが期待される。

2、対象

- ・ 2010 年 7 月以降、「不応性貧血の治療率向上を目指した分子・免疫病態研究」および「特発性造血障害に関する調査研究班」参加施設で、「再生不良性貧血と骨髓異形成症候群の前方視症例登録・セントラルレビュー・追跡調査研究」（以下前方視的登録・追跡研究）に参加する骨髓異形成症候群、もしくは、その疑いのある患者由来の検体。
- ・ 両研究班参加施設で診断された「再生不良性貧血と骨髓異形成症候群の前方視症例登録・セントラルレビュー・追跡調査研究」に参加しない骨髓異形成症候群の各病型の患者由来の検体。この場合には、骨髓異形成症候群から進展したと考えられる急性骨髄性白血病患者（WHO 分類第 4 版の AML with myelodysplasia-related changes, therapy-related myeloid neoplasms）由来の検体を含むこととする。ただし、患者本人ないし代諾者から「骨髓異形成症候群に対する検体集積事業ならびに遺伝子解析研究」（以下本事業・研究）への参加に関する文書による同意が得られないものは除外する。
- ・ 各施設で遺伝子解析研究に対する包括的同意のもとに保管されている骨髓異形成症候群あるいは骨髓異形成症候群から進展したと考えられる急性骨髄性白血病患者の検体（2010 年 9 月の時点ですでに保管されているもの及びこれ以降に確定診断され保管されたものを含む）。

3、実施期間

検体集積期間は、本申請の倫理委員会承認日より、2015 年 3 月 31 日までとする。また、検体保管期限ならびに遺伝子

解析研究実施期間は2016年3月31日までとする。

4、方法

1) 検体集積事業

本事業・研究への参加の同意を得た患者に対して、診療上の目的で骨髄穿刺をする際に、通常の検査と別に2mlの骨髄液をヘパリンを加えて採取する。採取時の病期、病状は問わない。同一患者から複数回の検体提供を受ける際には、その都度同意取得を行う。

患者名の匿名化には、前方視的登録・追跡研究に参加した患者においてはそこで設けられた「登録UPN」を用いる。前方視的登録・追跡研究に登録されていない患者にたいしては、各施設の個人情報管理者が患者氏名、生年月日、施設カルテ番号などを含まない「匿名化ID」を設定する。前方視的登録・追跡研究で定められた各参加施設の登録責任者は、本事業・研究においては個人情報管理者としての役割をかねる。検体採取後、登録責任者は集積事業事務局（京都大学血液・腫瘍内科）と検体集積施設（東日本；獨協医科大学内科学（血液）、西日本；京都大学血液・腫瘍内科、なお、新潟県、長野県、静岡県を含みそれ以西を西日本、残りを東日本と定める。）に検体送付票と検体情報報告書（別紙3）をFAXで送るとともに、検体を運送業者による冷蔵輸送（0-5℃）により検体集積施設に送る。運送に関する費用は各施設の負担とする。検体集積施設では、骨髄より比重遠心法により単核球を回収し、 1×10^7 個ずつペレットとして凍結保存する。

すでに包括的同意が得られている検体についても、同様に登録責任者は集積事業事務局と検体集積施設に検体送付票と検体情報報告書（別紙3）をFAXで送るとともに、臨床情報を付けて液体窒素あるいはドライアイスで検体集積施設に郵送する。

2) 遺伝子解析研究

「不応性貧血の治癒率向上を目指した分子・免疫病態研究」および「特発性造血障害に関する調査研究班」の班員・班友は、本事業で集積された個別遺伝子解析を提案できる。個別遺伝子解析研究計画は、「不応性貧血の治癒率向上を目指した分子・免疫病態研究」および「特発性造血障害に関する調査研究班」で審議され承認を受けた後に、本研究計画書に組み込まれる。研究の施行に関して該当研究施設ならびに検体集積施設（獨協医科大学、京都大学）の倫理委員会の承認が必要なものとする。

研究の施行に当り、遺伝子解析施設は検体集積事業事務局（京都大学血液・腫瘍内科学）に解析を希望する患者の病態、希望解析患者数、検体量、必要な診療情報などを記した検体供与依頼票（別紙4）を提出する。検体集積事業事務局は該当する患者検体を同定したうえで、検体集積施設を介して検体を供与するとともに、「再生不良性貧血と骨髄異形成症候群の前方視症例登録・セントラルレビュー・追跡調査研究」における骨髄異形成症候群追跡調査研究担当施設（川崎医科大学検査診断学）に診療情報の提供を依頼する。

現時点で施行が決定しているものは以下のものである。

個別遺伝子解析研究1：造血器腫瘍における遺伝子異常の網羅的解析（別紙1）

（研究代表者：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 小川誠司）

研究目的の概略：種々の遺伝子解析技術を用いて、骨髄異形成症候群の発症の原因となる遺伝子異常をゲノムワイドに網羅的に同定し、解析することにより、造血器腫瘍の分子標的療法の基盤を構築する。

個別遺伝子解析研究 2：骨髄異形成症候群の分子病態の解析と層別化治療の確立（別紙 2）

（研究代表者：獨協医科大学内科学（血液・腫瘍）教授 三谷絹子）

研究目的の概略：骨髄異形成症候群の分子病態・遺伝子発現パターンに基づいた再分類とともに、治療層別化の方法を確立するため、造血細胞の分化・増殖、細胞周期回転、アポトーシス誘導、DNA 修復等に関与する遺伝子群の変異・発現および機能異常に関する解析や、骨髄異形成症候群に特徴的な染色体転座切断点の分子生物学的解析、マイクロアレイ技術を用いた遺伝子発現パターン解析による疾患サブグループ化を行う。

個別遺伝子解析研究 3：骨髄異形成症候群の SPARC(secreted protein acidic and rich in cysteine)発現ネットワーク解析（別紙 3）

（研究代表者：東京医科大学附属病院内科学第 1 講座 教授 大屋敷一馬）

研究目的の概略：5q-陽性 MDS に対するレナリドマイド治療の標的分子の 1 つであると考えられる SPARC 遺伝子の発現ネットワークを解析し、治療効果の指標となる遺伝子プロファイルを明らかにする。

個別遺伝子解析研究 4：骨髄不全症候群の酸化ストレス系遺伝子の発現ネットワーク解析（別紙 4）

（研究代表者：東京医科大学附属病院内科学第 1 講座 教授 大屋敷一馬）

研究目的の概略：骨髄不全患者に対する鉄キレート剤である ICL-670 投与における酸化ストレス遺伝子解析を行い、造血回復の遺伝子プロファイルを明らかにする。

3) 遺伝子解析研究の追加

「不応性貧血の治療率向上を目指した分子・免疫病態研究」および「特発性造血障害に関する調査研究班」に提案・承認され、研究の施行に関して該当研究施設ならびに検体集積施設（獨協医科大学、京都大学）の倫理委員会の承認が得られた際には、検体集積事業事務局（京都大学血液・腫瘍内科学）は改訂研究計画書を作成し、各参加施設に配付する。参加施設患者担当者は、同意取得時に何版の研究計画書をもとにしたものかを検体送付票に明記する。

5、個人情報の保護

本事業・研究ではヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針の趣旨に則り、以下の方法により個人情報の保護を行う。

前方視的登録・追跡研究登録患者においては、患者名は各担当施設の登録責任者により、個人を特定可能な名前、カルテ番号、各施設での患者 ID 番号と無関係に「施設別患者匿名化 ID」に置き換えられた後、登録センター事務局でさらに「登録 UPN」が設定されるという二重の匿名化がなされている。本事業・研究における検体および患者情報の識別は「登録 UPN」にて行われる。前方視的登録・追跡研究における各施設の登録責任者は遺伝子解析研究に関与しないものから選出されることとされており、前方視的登録・追跡研究における骨髄異形成症候群追跡調査研究担当施設、ならびに本事業・研究における検体集積事業事務局、検体集積施設、個別遺伝子解析研究実施施設、骨髄異形成症候群追跡調査研究担当施設のいずれにおいても登録 UPN ならびに検体とその由来する患者名との照合は不可能である。前方視的登録・追跡研究に登録されていない患者においても、検体採取施設で匿名化され、本事業・研究における検体集積施設、個別遺伝子解析研究実施施設のいずれにおいても患者名の照合は不可能である。

6、患者検体の利用と保存、廃棄