

201231017A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業

特発性造血障害に関する調査研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 黒川 峰夫

平成25（2013）年5月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業

特発性造血障害に関する調査研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 黒川 峰夫

平成25（2013）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	3
資料1 班員構成および研究領域		37

II. 分担研究報告書

・輸血後鉄過剰症に対する鉄キレート療法の有用性に関する臨床研究 中間報告	小澤 敬也	39
・本邦エクリズマブ不応PNH症例の解析	金倉 譲	44
・「MDSにおけるスプライス関連因子遺伝子変異とアザシチジン治療反応性との関連性」に関する研究	直江 知樹	46
・初診時再生不良性貧血におけるHLA-Aアレル欠失血球の検出頻度とクローンサイズ	中尾 眞二	49
・再発・難治性慢性赤芽球癆に対する標準的治療の確立を目的とする疫学研究	澤田 賢一	52
・本邦の原発性骨髄線維症の臨床像	赤司 浩一	54
・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	56
・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	59
・骨髄異形成症候群(MDS)に対する同種造血幹細胞移植後の最適化に関する研究	岡本 真一郎	64
・Fanconi貧血患者iPS細胞由来血液・血管内皮細胞はALDH2酵素活性により影響を受ける	中畑 龍俊	70
・臨床調査個人票データベースの入力率と有用性の検討	太田 晶子	75
・再生不良性貧血の記述疫学－重症度と臨床所見の関係－	太田 晶子	80

III. 研究協力者報告書

・初発時から鉄過剰症を合併し鉄キレート剤投与を行ったMDS-RARSの1症例	大橋 春彦	87
・小児の骨髄異形成症候群(MDS)の研究	真部 淳	89
・クームス陰性自己免疫性溶血性貧血154例の解析	亀崎 豊実	93
・本邦の二次性骨髄線維症	下田 和哉	85
・GPIアンカー欠損症の解析	木下 タロウ	97
・RUNX1変異とBMI1の協調作用によるMDS発症機序	原田 浩徳	99

・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	101
・小児再生不良性貧血に対するウサギ抗胸腺細胞グロブリンとシクロスポリン併用療法	小島 勢二	105
・MPL 遺伝子変異の検出法の開発	小松 則夫	107
・hypoplastic MDS (低形成性骨髄異形成症候群)に関する全国調査 (多施設共同後方視的研究)	市川 幹	109
・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	111
・DKC の遺伝子解析	檀 和夫	114
・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	117
・発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) クローンの拡大機序の解析	中熊 秀喜	120
・日本における後天性鉄芽球性貧血の病態	張替 秀郎	122
・骨髄異形成症候群の WHO 分類の病型と骨髄の芽球比率の cutpoint (2%)との関係	松田 晃	123
・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	125
・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	127
・再生不良性貧血患者の臨床像などに関する縦断的検討	島田 直樹	131
・「MDSにおけるヒストンメチル化酵素EZH2発現異常の意義」に関する研究	富田 章裕	136
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		139
平成 23 年度第 2 回班会議総会プログラム		
V. 研究成果の刊行に関する一覧表		
151		
VI. 研究成果の刊行物・別刷		
185		

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
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（骨髓異形成症候群：MDS）、骨髓線維症の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、疫学調査による診断・治療実態の把握、成人・小児例の比較と小児例の実態調査、発症に関与する自己抗原の特定が進み、その意義を明らかにする。赤芽球癆について治療確立に向けた前方視的登録を開始し、移植後赤芽球癆など新たな病態に調査を広げた。

溶血性貧血の領域では、発作性夜間血色素尿症（PNH）では国際PNH専門家会議や、日本PNH研究会との連携による全国規模の患者登録体制の確立、診断検査の一元化と抗体医薬の使用法の標準化、病態進展の機序解明を行った。自己免疫性溶血性貧血の特殊例や難治例の解析を進める。

骨髓異形成症候群の領域では、形態診断の中央診断を伴う一元登録と追跡調査を進め、病型診断、予後予測、治療効果を解析した。発症前の血液異常から発症リスクの評価や早期診断の方法を探索した。また予後予測システム構築に関する国際共同研究への中核的参加、遺伝子・エピゲノム異常を用いた診断法の確立、輸血後鉄過剰症や未輸血患者の体内鉄動態の調査、小児期造血不全の実態解明も推進した。鉄キレート剤、DNAメチル化阻害剤、レナリドミドなど新たな治療薬の効果を検討し、適切な使用法を明らかにするとともに、奏効性を予測する因子を探索した。小児からの移行症例の追跡調査、チロシンキナーゼ阻害剤使用後染色体異常の調査を開始する。

骨髓線維症の領域では、前方視的登録の継続、前線維期の実態調査による早期診断の可能性の探索、適切な治療法の選択や予後予測因子の検証、自覚症状調査、造血細胞と間質細胞の病態形成における役割の解明を行った。2次性骨髓線維症についても調査を行った。その他、造血障害全般について、患者からiPS細胞を作製し新たな病態研究を行い、また造血幹細胞移植の役割を明らかにする。

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 讓

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 真一郎

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

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、難治性赤芽球癆などの病態解明に取り組む。再不貧患者の約13%で造血幹細胞の特定のHLAクラスI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。我が国を代表して参加して作成に加わった国際的な予後予測システムの有用性を検討する。低形成性MDSの病態と治療法の解析を行う。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。MDS幹細胞の特性や機能を解析するとともに、幹細胞特異的な新規分子標的薬の開発を行う。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間質細胞が病態形成に果たす役割も解明する。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法や効果予測因子を探索する。2次性骨髄線維症の予後因子や病態の解明のため症例調査を行う。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新規薬剤を用いた治療法について、関係学会とも連携して検討する。疾患別「診療の参照ガイド」の改訂を行い、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、溶血性貧血、骨髄異形成症候群、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（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・治療法の確立が求められている。そこで本研究班では今までの調査研究を発展させつつ、先進性や国際化の視点をとりたい

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再生不良性貧血（AA）に対する免疫抑制療法（IST）の適応を適切に判断するため、AAにおいて第6染色体短腕の片親性二倍体（6pUPD）によるHLA-A アレル欠失血球（HLA-A allele-lacking leukocytes; HLA-LLs）の正確な頻度を調査することを目的とした。診断後間もないAA患者34症例を対象とした。すでにHLA-A アレルが決定されている患者については、HLA-A24、A2、A26、A31、A11に対する市販のモノクローナル抗体を用いてHLA-A アレル欠失顆粒球（HLA-A allele-lacking granulocytes; HLA-LGs）の有無を検索した。HLA-A アレルが不明の例については、凍結保存検体のCD33 陽性単球を対象としてHLA-A アレル欠失単球（HLA-A allele-lacking monocytes; HLA-LMs）を検出した。HLA-LMs が陽性であった症例については、その後新鮮血を再検し、HLA-LGsの割合を決定した。
- ②複数年度にわたる再生不良性貧血（AA）臨床調査個人票の個票データを患者単位でリンケージすることにより、臨床像、治療状況などについて縦断的に検討することを目的とした。2009年に新規申請したAA患者のうち2010年に更新申請した者を解析対象とした。新規申請から一年間の臨床像、治療状況などの変化を縦断的に検討した。
- ③次世代シーケンサーにより正確で効率的に先天性角化不全症（Dyskeratosis congenita: DKC）における原因遺伝子変異を同定することを目的とした。特徴的身体的所見を伴う、もしくはテロメア長の短縮が認められた不全型DKC症例を対象にDKC1、TERC、TERT、NOP10、NHP2、TINF2の既知の遺伝子変異遺伝子解析を行い、変異が同定出来なかった症例に関しては、次世代シーケンサーを用いて全 exon シーケンスを行い新規遺伝子が同定を行った。
- ④2012年8月現在電子入力済みの、2003年度から2011年度までの再生不良性貧血の個人票を利用し、個人票データベースの入力状況、データベースの仕組みの現状について、観察・検討し、データベースの有効活用、有用性について検討する。

⑤2004年度および2006年度に特発性造血障害調査研究班で集積した成人慢性赤芽球癆症例185例の中から抽出した特発性72例、胸腺腫関連41例、大顆粒リンパ球白血病関連14例を調査対象とし、調査可能な109例にアンケート調査を行った。

2. 溶血性貧血

- ①PNHの治療薬として抗C5ヒト化抗体（エクリズマブ）が開発され、PNH患者に多くの恩恵をもたらしている。しかし本邦の第2相臨床試験において、欧米では確認されていない2例の本剤不応例を認めている。この本邦特有のエクリズマブ不応性機序の解明を試みるため、PK/PDの解析結果等からC5（補体）に異常があると考え、不応例の血液サンプルを用いてC5ゲノムを解析した。
- ②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、次世代シーケンサーSOLiD5500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配列の確認をすると共に機能解析を行う。一方先天性GPI欠損症のスクリーニングとしては、原因不明の精神発達遅滞やてんかんを持つ患者を対象とし、血液からゲノムを抽出する。GPI生合成と修飾に関与する27個の遺伝子のエクソン部位にプライマーを設計し患者ゲノムを鋳型としてフラグメントライブラリーを作り、次世代シーケンサー（Ion PGM）で配列を読む。変異部位を確認して機能解析を行う。
- ③PNH発症に必要な変異クローンの拡大機序の解析を目的に、1つのPIGA変異クローンが8年以上にわたり全血球を占拠し続けている特異な症例において、変異クローンのPIGAとHMGA2の遺伝子解析およびフローサイトメトリーによるグリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）結合蛋白とNKG2Dリガンドの発現解析により変異クローン細胞特性を調べた。
- ④2003年から2010年の8年間に全国から精査依頼のあった582例（クームス陽性78例、クームス陰性480例）を対象とし、検査の1年後に主治医に対して臨床診断と経過についてのアンケートを行った。154例のクームス陰性自己免疫性溶血性貧血（AIHA）についてクームス陽性AIHA62例と比較可能で、ステロイドの有用性について検討した。

3. 骨髄異形成症候群 (MDS)

①輸血後鉄過剰症に対して DFX による鉄キレート療法を開始した患者 100 名を対象として最長 5 年間にわたって、鉄キレート療法の継続率、有害事象、治療後の造血回復などについて評価を行った。

②鉄過剰症に関する臨床研究の付随研究として、定期的に非トランスフェリン結合鉄 (NTBI) および血中ヘプシジンの測定を行い、鉄キレート療法後の NTBI およびヘプシジンの変化を測定した。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した。

③スプライス関連因子に変異を持つ MDS 症例における異常 mRNA の蓄積とアザシチジン治療反応性との関連性を検討するために、MDS 患者より採取された骨髄検体から単核球を分離し、ゲノム及び全 RNA を用いてスプライス関連因子 (SF3B1, SRSF2, U2AF1) の変異を確認した。cDNA を用いて、TET2 および RUNX1 遺伝子のエクソン-イントロン境界域における RT-PCR を行い、イントロン配列の残存する異常 RNA の検出を、半定量的に行いアザシチジン治療を行った MDS 患者より経時的に採取された骨髄検体を用いて、異常 RNA の発現量に変化が生じるかどうかについて、検討した。

④MDS 患者における EZH2 遺伝子異常、発現異常の有無とその分子生物学的・臨床的意義について明らかにするために、患者よりゲノム及び全 RNA を採取して解析に用いた。ゲノムの一部は特発性造血障害 MDS 検体集積事業により、SNP アレイを施行した。ゲノムもしくは cDNA を用いて EZH2 遺伝子の変異を確認した。また、定量的、半定量的 RT-PCR を施行し、EZH2 mRNA 発現量を確認した。EZH2 mRNA 発現が正常コントロールよりも高い傾向にある症例に関しては、cDNA クローニングを行い、10 クローン程度について遺伝子配列を確認し、スプライシングバリエント、塩基挿入、欠失の有無などについて、確認をした。同時にスプライシング関連因子 (SF3B1, SRSF2, U2AF1) における遺伝子変異を確認し、その変異の存在と、スプライスバリエント発現との関連について検討を加えた。

⑤今回、国際共同研究としてより多くの症例データを収集し、MDS の国際予後スコアリングシステム (International Prognostic Scoring System, IPSS) の改訂作業が執り行われた。世界の 18 デー

タベースより初発、原則無治療例の MDS データが収集された。国内からは合計 439 例のデータが提出された。各国から収集されたデータを用いて、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た。因子ごとに重み付けがなされ、点数が与えられた。そしてそれらの組み合わせによるスコアリングシステムによる予後予測システムが作製、発表された。

⑥上記の IPSS-R では、骨髄の芽球比率の cutpoints の変更がされ、新たに 2% という低い cutpoint が採用された。骨髄の芽球比率の 2% という cutpoint と WHO 分類の病型との関連について検討するために、我々の既報 (Blood 2005;106:2633-2640) の data set を用いた。この data set の患者は未治療の原発性 MDS (日本例、ドイツ例) で病型は FAB 分類の refractory anemia (FAB-RA) である。WHO 分類の 5q-症候群の患者は、今回の検討から除外した。患者を WHO 分類 (第 3 版) の refractory anemia (WHO-RA) と refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD) に分類し、WHO-RA と RCMD の骨髄の芽球比率を比較した

⑦再生不良性貧血 (再不貧) と骨髄異形成症候群 (MDS) の臨床像と治療成績の把握、診断一致率の向上、ならびに標準的治療法の開発のための基礎資料を作成するために、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患者を前方視的に登録し、追跡調査を行う。骨髄の芽球比率が 5%未満の症例については、骨髄・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。

⑧骨髄異形成症候群 (MDS) の一つの entity として、hypoplastic MDS (hMDS; 低形成性骨髄異形成症候群) という概念が提唱されているがその病態や最適な治療は不明である。そこで本研究では、各参加施設で診断された MDS 患者のうち、診断時に骨髄の cellularity (細胞密度) が 30%未満 (60 歳以上の場合 20%未満) の hMDS を対象として全国調査をおこなった。

⑨RUNX1 変異と協調遺伝子異常による骨髄系造血腫瘍の発症機序を明らかにすることを目的として、様々な骨髄系造血器腫瘍患者から得られた検体を用い、RUNX1 変異や各種遺伝子発現を解析した。レトロウイルスベクターを用いて RUNX1 変異体をヒト臍帯血由来 CD34+細胞に組み込み、単独あるいは BMI1 との共発現による生物学的影響を

検討した。またマウス BMT モデルを用いて生体内での影響を解析した。

⑩一部のリンパ腫では造血異常が見られるが骨髄でクローン性に増殖している前駆細胞を母地として発症し、これがリンパ腫における原因不明の造血異常の原因の一部であることを検証するために骨髄増殖性症候群 (MDS) や骨髄増殖性腫瘍 (MPN)、および MDS や MPN とは診断されないものの何らかの造血異常があり、これら造血異常と同時または後に悪性リンパ腫が発症した症例の経験について、国内 491 の血液内科専門施設にアンケート調査を行った。

⑪日本における後天性鉄芽球性貧血の病態を明らかにするために、遺伝子解析研究について所属施設の倫理委員会の承認を得て主治医に患者本人もしくは保護者への説明・同意の取得がなされた上で、遺伝子解析を行った。

⑫MDS を根絶するための重要な標的と考えられる MDS 幹細胞の特性や機能を解析するとともに、MDS 幹細胞特異的な新規分子標的薬の開発を行うことを目的として、MDS 幹細胞特異的表面抗原の同定を目指し、ハイリスク MDS 症例、及び MDS から AML 移行症例の骨髄造血幹細胞分画を分離、シングルセルレベルでの網羅的表面抗原解析を行った。

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。予後不良因子を同定し、治療成績向上をはかるために、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。

②本邦における二次性骨髄線維症の臨床像、予後、原発性骨髄線維症との相違を明らかにし、治療成績の向上をはかるため、日本血液学会認定施設を対象に、現在診療中の二次性骨髄線維症例数をアンケート調査した。このうち、2011-12 年に発症した症例に関し、原疾患、臨床症状、検査値、予後調査を行った。

③JAK2V617F 陰性骨髄増殖性腫瘍にみられるトロンボポエチン受容体 (myeloproliferative leukemia virus; MPL) 遺伝子の変異は、2 種類の変異 W515L と W515K が発見されており、それぞれ

の臨床的特徴は未だ明らかでない。本研究では、MPLW515L/K の 2 種類の変異を簡便に検出する技術の開発を目的とした。野生型 MPL と MPLW515L、W515K に共通のプライマーセットを設計し、MPLW515L/K 部位にオーバーラップするよう設計された Q-probe と呼ばれる蛍光プローブ解離温度の違いを検出することで野生型 MPL と MPLW515L、MPLW515K を区別できるかどうかを検討した。

5. 造血細胞移植

①骨髄異形成症候群 (MDS) に対する移植治療の最適化を図ることを目的として、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とともに HCT-CI スコアを移植前に登録し 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。対象は 16 歳以上の初回移植症例に限定したが、疾患に関してはすべての血液疾患を対象とした。

②MDS に対する reduced intensity stem cell transplantation (RIST:ミニ移植) の安全性と有効性を検証するため、2000 年 11 月から 2012 年 12 月まで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 MDS39 名に対する RIST を解析した。

6. 小児科領域

①iPS 細胞技術を用いて Fanconi 貧血 (FA) 患者の病態を、FA 患者由来 iPS 細胞を解析することで明らかにし新規治療法の開発を目的とする。iPS 細胞樹立には、OCT3/4、SOX2、KLF4、L-MYC、LIN28、shRNA による p53 ノックダウンシステムが発現するように設計されたエピソーマルベクターを用いた。この iPS 細胞の FANCA 遺伝子の変異、及び FANCD2 形成の欠損を調べることで、患者独自の表現型を持っていることを示した。FA 患者由来 iPS 細胞は血球細胞へ分化させ、血球・血管内皮前駆細胞を CD34 と KDR をマーカーとしてソートし、ALDH2mRNA の発現量を測定した。

②小児の骨髄異形成症候群 (MDS) は、頻度は低く診断は難しく予後は不良な症候群である。小児血液学会が 1999 年から 2008 年まで行ってきた小児 MDS 中央診断に登録された 618 例のうちなんらかの先天性素因、家族性素因を有する可能性がある 72 例について後方視的解析を行った。

③後天性再生不良性貧血の治療薬として使用され

るウサギ抗胸腺細胞グロブリン (rATG) が用いられている。rATG 使用状況と臨床効果の検討のため、わが国で rATG とシクロスポリンによる併用療法が初回治療として行われた小児再生不良性貧血患者 40 人について、臨床効果を検討した。

④FA による造血障害とそれに続く MDS/AML の発症機序の解明のために、東海大学小児科・細胞移植科において同種造血細胞移植を施行した FA 症例のうち、遺伝子診断で相補群が確定し、保存 DNA 量が十分でかつ本人あるいは両親から同意が得られた 55 例において、ALDH2 遺伝子型の検索を行った。野生型ホモの AA 型、変異型ヘテロの AG 型、変異型ホモの GG 型の臨床的特徴と、骨髓不全、MDS/AML 移行時期との相関を解析した。また STR 法で生着確認後ドナータイプ造血不全を呈した移植例に対し、①G-CSF/CyA 併用投与、②DLI あるいは前処置なしの PBSC 追加輸注、③長期フォスカビル投与、④再移植のいずれかを施行し、無効な場合に①から④の中の別の治療を試みた。

(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

①全患者のうち、HLA-A アレルがヘテロ接合体であったのは 21 例 (61.8%) であり、そのうち、6 例 (28.6%、全患者中 19.4%) に 3.9%~61.1% (中央値 21.8%) の HLA-LLs が検出された。HLA-LLs 陽性例のうち 2 例では、初回検索の時点でそれぞれ 2.1%、60.8% の HLA-LMs が検出され、その後の新鮮血の再検で、それぞれ 3.7%、61.1% と、HLA-LMs と同程度の HLA-LGs が検出された。従来の方法より検出感度の高い手法を採用したが、HLA-LLs 陽性率は約 20% とそれほど高くない結果であった。

②. 解析対象者は 521 名、年齢は 57.4±22.0 歳 (1~93 歳) であった。2009 年は 61.7% が重症 (Stage3~5) であったのに対して、2010 年は 41.6% に減少していた。2009 年から 2010 年にかけて改善した者は 195 名 (39.5%)、不変の者は 241 名 (48.9%)、悪化した者は 57 名 (11.6%) であった。貧血症状ありは 2009 年 77.6%、2010 年 64.2%、出血症状ありは 2009 年 52.9%、2010 年 42.5%、発熱ありは 2009 年 22.6%、2010 年 25.0% であり、2009 年から 2010 年にかけて貧血症状と出血症状は減少していたが、発熱は変化していなかった。2009 年から 2010 年にかけて「無症状で経過観察」が減少したのに対して、「造血細胞移植療法」「成分輸血」は大きな変化がなく、その他の治療は増加していた。

③DKC 症例、不全型 DKC 症例 16 症例を集積した。5 症例においては、サンガー法による直接塩基決定法では原因遺伝子が同定できなかったが、次世代高速シーケンサーによって既知の原因遺伝子の変異 (TINF2, DKC1, TERT) を同定することが出来た。既知の遺伝子変異がサンガー法や次世代高速シーケンサーにて同定されなかった症例に関して新規の遺伝子変異の探索・確認を進め、RECQL4、HSPBP1、BLM などの候補遺伝子が抽出されている。

④2012 年 8 月現在、個人票の入力率は、2009 年度が 79% と最も高く、その他の年度は約 50~70% であった。入力率は都道府県により大きく異なり、同じ県でも年度によって入力率は異なる。全体の入力率が 79% と最も高かった 2009 年度では、入力率が 95% 以上であるのは 31 県、10% 未満であるのは 3 県であった。入力率が最も低かった 2007 年度では、入力率が 95% 以上であるのは 14 県、10% 未満であるのは 14 県であった。

⑤免疫抑制療法に不応であった症例は、特発性 9

例、胸腺腫関連 8 例、大顆粒リンパ球白血病関連 1 例であった。そのうち 8 例が死亡しており、死因は感染症 3 例、臓器不全 2 例、脳梗塞 1 例、不明 2 例であった。単変量解析により、免疫抑制療法後の死亡に対するリスク因子として、寛解導入療法不応が抽出された ($p < 0.001$)。免疫抑制療法奏効例における死亡のリスク因子として貧血の再燃が抽出された ($p < 0.001$)。

2. 溶血性貧血

①不応 2 例の C5 ゲノムを解析したところ変異 (c. 2684G>A) を同定した。同変異は、反応例 7 例には認めなかった。本邦では 300 例以上に投与され 10 例の不応例が蓄積されているが、全例で同変異を確認した。健常人 288 例の解析でも 10 例に同変異を確認した (頻度 3.5%)。

②前半のエクソームの解析については 3 例のシーケンスを終え、合計 9 個の異常細胞に特異的な体細胞突然変異を認めたが、3 人の患者に共通に認められるものはなかった。また国内で初めて、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、難治性てんかんを呈する先天性 GPI 欠損症、PIGO 欠損症が見つかった。好中球の FACS 解析では CD59, DAF, CD16 等の GPI アンカー型蛋白質の発現が著明に低下していた。

③研究対象の患者ではステロイド反応性の軽度の造血障害が認められた。また末梢血の赤血球、顆粒球とリンパ球全てが GPI 蛋白質の DAF および CD59 を同時欠損する PNH 表現形を呈していた。顆粒球では PIGA のエクソン 2 の G (352) を欠損する単一変異クローン由来であった (図 2)。また患者の PNH クローンには脂肪腫などの良性腫瘍にみられる増殖亢進をもたらす HMGA2 発現亢進も検出された。

④温式 AIHA について、クームス陽性例と陰性例間で比較検討すると、年齢・性比、特発性/続発性比、Evans 合併割合に有意差を認めなかった。網赤血球、MCV、白血球数、総蛋白、赤血球結合 IgG 量、ハプトグロビンはクームス陽性 AIHA 例で有意に高く、ヘモグロビンは有意に低値であった。ステロイドの有効性と診断年後の生存率には有意差がなかった。クームス陰性 AIHA では、寛解維持に必要なステロイド量が有意に少なかった。多変量解析の結果、特発性クームス陰性 AIHA のステロイド反応性に総たんぱく量が関係しており (adjusted odds ratio [aOR], 1.36/[0.1 g/dl]; 95% CI, 1.01-1.84)、また、1 年後の生存に Evans 合併がリ

スク (aOR, 0.1; 95% CI, 0.01-0.88) となることが明らかになった。

3. 骨髄異形成症候群

①65 例の症例が登録された。再生不良性貧血 22 例、MDS 26 例、PRCA 8 例、原発性骨髄線維症 5 例、骨髄増殖性疾患 1 例、白血病 2 例、その他 (濾胞性リンパ腫) 1 例であった。65 症例のうち、投与中止症例は 30 例であった。副作用による中止は 2 例であり、鉄過剰症の改善に伴う治療終了は 3 例であった。6 ヶ月以上データが収集された MDS del(5q) 以外の症例は 47 症例であり、このうち鉄キレート療法との関連が示唆される血液学的改善を認めたのは 4 例 (8%) であった。

②鉄過剰症に関する臨床研究の付随研究では、189 検体分の NTBI 値および 124 検体分のヘプシジン値の測定が終了した。なお、健常人の血清 NTBI の平均値および各種ヘプシジン濃度を報告した。Non-metal HPLC を用いた血中 NTBI 測定方法に代わる多検体迅速測定方法の基礎性能評価が終了した。

③MDS (N=36) 症例におけるスプライス関連因子変異の頻度は、SF3B1 3/36 (8.3%)、SRSF2 3/36 (8.3%)、U2AF1 4/36 (11.1%) であった。それぞれの変異に重複はなかった。RUNX1 遺伝子と TET2 遺伝子のエクソン-イントロン境界部、及びエクソン-エクソン部分にそれぞれプライマーを設定し、正常 mRNA と異常 mRNA の発現を、半定量的 PCR にて解析したところ、症例ごとに異常 mRNA 発現量に有意な差を認めた。ゲノム DNA の混入を除外するため、それぞれのプロモーター部位に設定したプライマーを用いて同様の PCR を施行したが、増幅は確認されなかった。スプライス関連因子の変異と異常 RNA 発現量との関連性を検討したところ、SRSF2 遺伝子変異症例において、異常 RNA の発現が高い傾向が確認された。

④MDS (N=31) 症例における染色体分析において、EZH2 遺伝子を欠失することが予想される 7-/7q-を示す症例は 7 症例 (22.6%) であった。EZH2 mRNA 発現の定量的、半定量的解析では、その発現量は症例ごとに有意な差が認められ、発現が検出できない症例は 4 症例 (12.9%)、正常コントロールに比べて有意に発現が高い症例は 12 症例 (38.7%) であった。遺伝子発現が高い症例において、EZH2 の open reading frame 部分の遺伝子配列を確認したところ、エクソンスキッピング (Exon 5, 12, 13, 14, 15, 16, 20 など) や種々の塩基配列挿入、欠

失が多数確認された。中にはフレームシフトを来す欠失、挿入も確認され、それにより C 端に存在するヒストンメチル化酵素 (HMT) ドメインの欠失を来す可能性が推測された。このような異常 mRNA の発現とスプライス関連因子の変異症例との関連を検討したが、明らかな相関は確認されなかった。

⑤7012 例のデータが解析に用いられた。染色体核型による群分けは 5 群に分類する方法が採用された。骨髓芽球割合は IPSS の群分けとは異なる教会在設定され、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。血球減少については、ヘモグロビン値は 10 以上、8 以上 10 未満、8 未満の 3 群に、好中球数は 800 以上と未満の 2 群に、血小板は 10 万以上、5 万以上 10 万未満、5 万未満の 3 群にわけられ、それぞれに点数が与えられた。これらの因子の点数を合計して全体を 5 群に分ける新たなスコアリングシステムが完成し、発表された。患者年齢を組み込む計算式も作製され、この年齢調整 IPSS-R は全生存に対してのみ使用できるようになった。

⑥WHO-RA は 238 例 (日本例:96 例、ドイツ例:142 例)であった。RCMD は 448 例 (日本例:32 例、ドイツ例:416 例)であった。骨髓の芽球比率は RCMD 群 ($2.2 \pm 1.3\%$) では WHO-RA 群 ($1.8 \pm 1.1\%$) より有意に高値であった ($p=0.0011$)。骨髓の芽球比率が $>2 \sim <5\%$ の症例は WHO-RA 群 (28.2%) と比較し RCMD 群 (40.0%) で有意に高率であった ($p=0.0022$)。

⑦患者登録数は平成 24 年度末の時点で総登録数は 243 例となった。施設診断別登録数は、再不貧 50 例、MDS 168 例、診断不能・その他 25 例であった。提出されたそれぞれの骨髓標本について、少なくとも 2 施設の専門家が形態診断を行っている。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。これらの結果は随時、各施設に報告されている。平成 24 年度末時点で、175 例についての追跡情報が得られている。追跡期間中央値は 1.5 年であった。生存曲線は、再不貧、ICUS、MDS の RCUD と RCMD の予後良好群と、RAEB-1、RAEB-2 および AML (MDS 関連) の予後不良群に分かれた。再不貧、RCUD と RCMD 間で差が見られず、また、RAEB-1 と RAEB-2 の間でも差は見られなかった。MDS における年齢別の生存期間の解析では、50 歳未満の患者の予後が良好である一方、50 歳を越えると年齢層による生存期間の違いは見られなかった。MDS における染色体分析結果別の生存期間の解析では、4 つ以上の染色体異常を伴う複

雑核型とモノソミー 7 のいずれかを有する場合にきわめて予後不良であったが、正常核型と 1-2 個の染色体異常の患者群では、生存曲線に明らかな違いは見られなかった。

⑧現在 11 施設から hMDS を 98 症例、集計済みである。hMDS 患者の割合は全 MDS 中 7.2%を占め (1368 症例中 98 症例)、そのうち男性 66.3%、血液疾患ないし悪性腫瘍の既往歴を有する症例が 32.7%、IPSS の low/intermediate-1 risk が 59.2%、WHO 分類の RCUD/RCMD、MDS-U に該当する症例がそれぞれ 50.0%、9.2%であった。骨髓生検施行率は全 hMDS の 43.9%にとどまっております、骨髓細胞密度一致率 (穿刺と生検の骨髓細胞密度の差が 10%未満のものを一致とした場合) は 50.0%であった。hMDS に対する治療選択 (重複許容) は、全 hMDS の 15.3%に対して造血幹細胞移植、25.5%に対して経過観察、16.3%に対して支持療法、24.5%に対して vitamin D and/or vitamin K、19.0%に対して免疫抑制療法、15.3%に対して蛋白同化ステロイド、7.1%に対して azacitidine が、それぞれ施行されているという内訳であった。

⑨RUNX1 変異体 D171N をヒト CD34+細胞に導入すると、分化が阻害されて自己再生能が亢進し腫瘍細胞様となるが、増殖能を欠いており G1 arrest の状態であった。RUNX1 変異患者では BMI1 が高発現であり、両者を共発現させると増殖能の亢進が認められた。マウス BMT モデルでは、D171N 変異体と BMI1 高発現の協調により白血病発症が確認できた。RUNX1 変異と BMI1 高発現を併せ持つ患者およびマウスモデルでは、ARF/INK4A の発現低下が認められ、さらに BMI1 ノックダウンにより増殖能の低下が認められた。

⑩全国調査の結果、計 70 例での経験について回答を得た。このうち二次調査に協力可能と回答のあった 59 例について、二次調査を行うために計画書を作成し、二次調査研究について筑波大学倫理委員会の承認を得た。現在対象施設からの回答を待っている。

⑪後天性鉄芽球性貧血 (MDS) では、10 例中 8 例で SF3B1 遺伝子の変異が認められた。一方で、先天性鉄芽球性貧血では SF3B1 遺伝子の変異は認められなかった。

⑫ハイリスク MDS 症例の CD34+38-細胞分画において、急性骨髓性白血病の予後不良因子 Ev1 の発現を評価し、Ev1 高値、低値の細胞を用いて表面抗原の網羅的な解析を行った。その結果、Ev1 高値

の細胞に特徴的な表面抗原として、CD96, MAGED4, NCAM, CLEC2, ENGなどを同定した。

4. 骨髄線維症

①609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1.98:1である。Hb 10g/dl未満の貧血を68%に、血小板数10万/ μ L未満を35%に、50万/ μ L以上を12%に認めた。末梢血への芽球の出現は57%に認めている。JAK2変異の検索は135例に施行されており、変異が52%に認められた。5年生存率は41.4%であった。観察期間中に285例の死亡が確認されており、死因は感染症73例、白血化73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/ μ 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1.2年であった。いずれも該当しない場合は5.2年である。

②一次調査では、現在診療中の症例数114例あり、そのうち50例が二次調査へ登録された。二次性骨髄線維症の基礎疾患は、ET 46%、MDS 24%、PV 8%、CML 2%、その他の疾患が20%であった。このうち2011-12年に二次性骨髄線維症と診断された29例の年齢中央値は65歳、範囲は40-86歳であった。二次性骨髄線維症と診断時、なんらかの臨床症状が83%に認められている。全身倦怠感を24%に、発熱を24%に、体重減少を31%に認めている。平均Hbは8.8g/dL、Pltは21.7万/ μ L、末梢血の芽球は2.5%であった。

③確立した技術によって、野生型MPL, MPLW515L, MPLW515Kを明確、かつ簡便に判別できた。また、各々の遺伝子型を任意の割合で混合させた模擬サンプルを用いた検討では、本技術は10%程度までのMPL遺伝子変異を検出できることが示唆された。

5. 造血幹細胞移植

①全症例の2年OSは59%で非再発死亡率は20%で、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。骨髄性腫瘍(急性骨髄性白血病と骨髄異形成症候群)に限った解析を行ったが2年全生存率と非再発死亡率との間に有意な相関は認められなかった。しかし、標準リスク群(移植時病期が寛解)と高リスク群(そ

れ以外の群)に分けた場合には、flexible HCT-CIスコアは2年の全生存率と非再発死亡率と良好に相関した。

②年齢中央値は59歳で、男性34名、女性5名であった。全39例中13例が現在も生存を続けており、2年全生存率は42.7%、5年全生存率は25.8%であった。全体での死因は原疾患の増悪が8例、感染症9例、その他、生着不全(一次1例、二次1例)、急性GVHD、VOD、脳出血などがあった。3年以上生存した9例(うち7例が生存中)のうち3例に二次癌(1例:腎癌、2例:食道癌)の発症があった。病型による生存率に有意差はなかったが、RAEB症例18例のうち8例(RAEB-1:7例中3例、RAEB-2:11例中5例)が生存中であった。

6. 小児科領域

①国内で始めて、遺伝子を修復していないFA患者由来繊維芽細胞よりiPS細胞を作製することができた。血球分化の際に、FA患者由来iPS細胞は有意に血球分化障害を示した。また、血液・血管内皮前駆細胞の割合も修復株に比べて、若干の低下が認められた。この血液・血管内皮前駆細胞の遺伝子発現を調べると、ALDH2遺伝子が優位に増加していた。このことより、ALDH2のagonistであるAlda-1を添加し、再度実験を行ったところ、FA患者由来iPS細胞にのみ、有意に血液・血管内皮前駆細胞の割合の上昇が確認された。

②10例において遺伝性骨髄不全症候群の診断が確定された。すなわち、Shwachman-Diamond症候群(4例)、Fanconi貧血(3例)、先天性角化不全症(1例)、X連鎖性血小板減少症(1例)、Congenital dyserythropoietic anemia(1例)であった。これらの症例の骨髄像はRCMD(refractory cytopenia with multilineage dysplasia)やRAEBなどのMDSと酷似していた。8例において再生不良性貧血、汎血球減少、慢性特発性血小板減少性紫斑病、腎の悪性ラブドイド腫瘍、多発奇形、合趾症、先天性副腎不全、死産(各1例ずつ)の家族歴があった。合併所見としては、奇形徴候(21例)、低身長(14例)、発達遅延(6例)、けいれん(5例)、腓外分泌異常(4例)、色素沈着(3例)、指趾異常(3例)、肝機能障害(3例)、脳腫瘍(2例)、心奇形(2例)がみられた。

③年齢は1歳から15歳に分布し、その中央値は9歳であった。rATG投与後3ヶ月の時点で、complete response(CR)およびpartial response(PR)が

みられたのは8/40 (20%) にすぎなかったが、6ヶ月後には、CRが2 (5%) 例、PRが17例 (42.5%) と総計20例 (50%) に反応がみられた。6ヶ月以降も、6ヶ月の時点ではPRであった5例がCRに達し、non response (NR) であった4例もPRに達し、最終的な反応率は57.5%であった。2例が16、19ヶ月の時点で再発した。さらに、16例には非血縁ドナーからの同種血液幹細胞移植をおこない全例が生存中で、治療開始2年後の全生存率は50.3%であった。

④ALDH2 遺伝子型の分布は、健常日本人の分布と差を認めず、変異型ホモの2名においては、骨髄不全とMDSの発症が極めて早かった。移植後ドナー型造血不全は、先天性AAに対する同種造血細胞移植の73例では1例も合併せず、後天性AAの65例中6例に合併した。

後天性AAにおいて、血縁者間移植では平均7%の患者由来キメラ造血を認め、ドナーリンパ球輸注や末梢血幹細胞の追加輸注で改善した。非血縁移植では100%ドナータイプであり、CMV感染合併後にドナー型造血不全を発症した。G-CSF/CyA併用投与は3例中2例で有効、DLI/PBSCは7例中4例で有効、フォスカビルは2例中2例で有効であった。再移植は7例で施行され、有効は3例のみであった。

D. 考察

1. 再生不良性貧血 (再不貧) ・赤芽球癆

①細胞傷害性T細胞 (CTL) からのエスケープによる6pUPD陽性幹細胞・異常クローンの選択はAA発症のごく初期にのみ起こる。骨髄不全の進展にはCTLではなく造血抑制性のサイトカインが主に参与していると考えられる。治療前の検索でHLA-LLsが陰性であった例であっても、IST後の改善時に、現在のFCMの感度では同定できなかったわずかな6pUPDクローンが拡大するため、HLA-LLsが陽性化する可能性があり、今後の検証が必要である。本手法でのHLA-LLsの検出は、ISTに対する反応性を予測する上で必ずしも有用とは言えないが、より微少の6pUPDクローンを検出できるアッセイの開発により、ISTの治療反応性を判定する有用なマーカーとなる可能性がある。

②2009年から2010年にかけて、解析対象者の重症度は改善していて、同時期に「無症状で経過観察」が減少して、「アンドロゲン療法」「免疫抑制療法」「サイトカイン療法」が増加したことが関連

していると考えられた。一方、「造血細胞移植療法」は、診療の参照ガイドにおいて40歳未満の重症例が適応とされているため、大きな変化が認められなかったと考えられる。その一方で、自他覚症状の改善は小さかった。治療開始から1年という短期間では自他覚症状には顕著な改善を認めにくかった可能性がある。また「成分輸血」も大きな変化を認めなかった。これらに関連して、今後は末梢血液検査などの臨床所見の変化も検討する必要があると考えられ

③次世代高速シーケンサーによる遺伝子変異検索は、従来のサンガー法による直接塩基決定法と比較してより正確で効率的に既知の遺伝子変異を同定することができ有用であると考えられた。新規遺伝子探索に関しては、現在探索中ではあるが、早老症の一つとして考えられているロスモンド・トムソン症候群の原因遺伝子であるRECQL4のヘテロ変異が高率(4/11 (36.3%))に抽出された。また常染色体劣性遺伝疾患である毛細血管拡張性運動失調症の原因遺伝子であるATMと毛細血管拡張性運動失調症様疾患であるBloom症候群の原因遺伝子であるBLMのヘテロ変異を同時に認める症例があった。これらの遺伝子変異や、複数遺伝のヘテロ変異の共存がどのようにDKCの病態に関与しているのかの解明が今後の課題と考えられる。

④個人票は全国規模で経年的に疫学的知見が得られる有用な情報源と考える。個人票データベースには診断の妥当性、記載内容の正確性、個人票記載項目の有用性、入力率の問題、受給非継続者の受給中止理由が未把握である問題点がある。特に、受給非継続者の受給中止理由を把握することは、患者をフォローアップして観察していく上で重要な課題と考える。現状ではこのようなデータベースの特性を考慮した上で有効活用してみせるとともに、問題点については、具体的に改善を進めていく必要がある。

⑤特発性、胸腺腫関連および大顆粒リンパ球白血病関連赤芽球癆における死亡リスク因子は免疫抑制療法不応および免疫抑制療法奏効例における再発であることが明らかとなった。免疫抑制療法に伴う易感染性、輸血後鉄過剰症による臓器不全が死因に関連していることが推察されるが、今後の解析が必要である。

2. 溶血性貧血

①欧米で2000例以上に投与されているが、不応例

の報告はなく、日本人(アジア)固有の C5 遺伝子多型と考えられた。2684G>A 変異は、885 番目のアミノ酸がアルギニンからヒスチジンに変換することを意味し、C5 補体活性自体には異常は来さないものの、エクリズマブの結合に重要な変異であるため、薬剤不応性を来していると結論した。

②PNH 患者の GPI 欠損細胞特異的に体細胞突然変異が見つかったが、今後さらに症例を集めることにより複数の患者で共通して変異のある遺伝子を見つけて機能解析が可能になると考えられる。本研究では国内で初めての先天性 GPI 欠損症、PIGO 欠損症を発見した。今後も症例数を増やして症状や検査所見を詳細に観察し、疾患概念の確立と診断基準の制定を目指す。先天性 GPI 欠損症では、活性低下の程度や係わる生合成のステップによって様々な症状を来すと考えられ、本研究の結果は発症機序解明つながると考えられる。

③この患者では単一PIGA変異クローンによる造血が13年間以上続き、徐々に拡大してついに前血球を占拠している。この拡大には、特発性造血障害をもたらす免疫の候補として知られる NKG2D 免疫が働く病的造血環境における変異クローンの相対的優位生存、加えて HMG2 発現亢進による良性腫瘍様増殖特性獲得の双方が協調して寄与していると思われる。生存優位と増殖亢進と言う2つの細胞特性はお互いに排他的でなく協調して変異クローン拡大をもたらすことが臨床例で示された。多症例解析で確認ができれば、PNH の発症予防、早期診断、効果的治療法の確立など臨床現場への活用も期待される。

④本研究から、クームス陰性 AIHA 患者は、一般的に、クームス陽性 AIHA より貧血・溶血は軽度であり、同等のステロイド反応性と1年後生存率を示すことが明らかになった。クームス陰性 AIHA を診断する意義が改めて明らかになったといえる。

3. 骨髄異形成症候群

①本研究は、最近報告が増加している鉄キレート療法後の造血回復がどのような症例にどの程度の頻度で認められるのかを明らかにするため、症例を前向きに登録し血球回復の経過を追跡することを目的に計画された。登録年齢中央値は70歳と鉄キレート療法は高齢者に多く施行されている。これは、原疾患に MDS が多いことが影響しているためではないかと思われる。現時点で約半数(30例)の症例において DFX の投与が中止されており、そ

の原因は死亡、造血幹細胞移植が多かった。当初予想された副作用による中止は中止症例の6%に過ぎず、鉄過剰症改善に伴う治療終了は中止症例の10%であった。鉄過剰症改善による投与終了は現在のところ3例(中止症例の10%、全体の約5%)に留まっており、これは有効な鉄キレート療法の施行が容易ではないことを示していると考えられる。造血改善症例は4例に認められ、これは評価可能母集団の約8%であった。海外からは20%~40%台の改善率を報告するレポートが出ているが、わが国で診療に携わる医師にとってこの数値は大きすぎる印象がある。今回我々が認めた8%という数値は実臨床における印象に合致するものと考えられる。

②鉄過剰症に関する臨床研究の付随研究に関して、新規 HPLC 分析システム ACQUITY UPLC H-Class Bio システム (Waters) を導入し、現在まで 189 検体分の NTBI 値および 124 検体分のヘプシジン値の測定を実施してきたが、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検体の NTBI 値ならびにヘプシジン値より、現段階ではまだ一部ではあるが、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把握することが可能な状況にある。平成25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。

③アザシチジンの治療効果は、特定の DNA プロモーター部位における CpG アイランドメチル化を除去することによる、遺伝子発現の活性化、正常化が主な薬効と考えられてきた。ここ数年で、MDS におけるスプライス関連因子の変異が、30%以上の症例に存在することが明らかにされ、MDS における異常 RNA の意義に興味を持たれている。アザシチジンは、細胞内に取り込まれた後にそのほとんどが RNA に取り込まれることを考慮すると、アザシチジンが異常 RNA に取り込まれ、何らかの薬効を発揮する可能性も考慮される。

④これまでの報告によると、MDS における EZH2 遺伝子変異は、HMT 活性が低下する loss of function

型の変異とされている。MDS の病態として HMT 活性の低下が重要であるとする、EZHZ 発現低下については同様の病態として矛盾はないが、発現上昇については説明がつかない。高発現症例において、スプライシング異常や欠失挿入によって、C 端欠失 EZHZ の発現が優位となる場合には、結果として HMT 活性の低下を来すこととなり、同様の病態が誘導される可能性が示唆される。これを明らかとするために、蛋白発現や酵素活性に関する検討が今後必要となる

⑤7000 例を超える極めて多数の MDS 症例データを用いて IPSS-R が作製された。IPSS で用いられた臨床的な因子を利用できるように工夫されつつ、これまでより詳細な予後予測が可能となっている。特に、IPSS では染色体核型の予後に対する影響を十分に反映していない、という IPSS の問題点を染色体の群分けが詳細になったことで解決しており、重要な変更点である。また、今回の改定で芽球割合や血球減少の程度の取り扱いを変更したという特徴を持っている。さらに、年齢を調整因子として加えたことは臨床現場の要望を反映させたものでもある。今後はこのスコアリングが国内患者でも十分に利用できるのかの検証が重要と考えられる。

⑥RCMD は WHO-RA と比較し、予後は不良であることが報告されている。IPSS-R で骨髄の芽球比率で 2% という低い cutpoint が prognostic impact を示したが、これは骨髄の芽球比率が $>2\sim<5\%$ の症例の中に、RCMD が WHO-RA より高率に含まれることが関与する可能性が示唆された。

⑦再不貧や MDS の診療は変革の時期にある。こういった中で、本邦におけるこれらの疾患の診療実態を明らかにすることは、わが国における診療指針の作成上、極めて重要である。本研究によって、再不貧および MDS の診断確度の高い、かつ詳細な臨床情報を含んだデータベースが構築されつつある。今年度は、これを利用してさまざまな予後解析を実施したが、その結果は過去のさまざまな報告と矛盾しないものであった。多施設共同研究でもたらされたこれらの成果の一部は、日本血液学会総会などで公表されている。このほか、本研究では、年に 2 回の合同検鏡会の開催と各施設への中央診断結果の還元を通して、全国の血液内科医の形態診断技術の向上にも寄与している。

⑧本研究により、hMDS 患者に関する臨床的特徴が明らかにされつつあるが、骨髄生検によって骨髄

細胞密度を定量された症例は依然として少数にとどまっており、骨髄生検施行症例のみを用いた分析も必要になると考えられる。また、それぞれの治療がどのような臨床像の hMDS に対して選択されるべきかについては、今後の分析で明らかにする予定である。

⑨RUNX1 変異体は造血幹細胞の分化を阻害する作用を有しているが、片アレルの RUNX1 変異だけでは MDS/AML を発症しないことから、エピジェネティックな機序による変異体発現の抑制や付加的遺伝子異常の必要性が想定される。RAS 経路などの付加遺伝子異常などにより BMI1 が高発現となることが、MDS/AML 発症機序の一つと考えられ、BMI1 高発現による増殖能亢進機序が明らかになった。

⑩筆者らは悪性リンパ腫 9 例で腫瘍とともに骨髄についても TET2 遺伝子の全長をシークエンスした。腫瘍で TET2 遺伝子変異が認められたのは 7 例で、このうち 4 例で同一の変異が骨髄にも認められた。次の段階では、このようなケースにおいて、どのような造血異常が認められるのか、その異常がクローン性造血に基づくのか、などを多数例で明らかにする必要がある。

⑪これまでの報告通り、本邦においても SF3B1 の遺伝子変異が既報通りの頻度で認められること、先天性鉄芽球性貧血においては SF3B1 の遺伝子変異が認められないことが明らかとなった。これらの結果から後天性鉄芽球性貧血と先天性鉄芽球性貧血では発症原因が異なることが示唆された。

⑫今回、AML の予後不良因子 Evi1 を対象として、MDS から AML 移行において 5 遺伝子の発現パターンに相関を認めた。各遺伝子の発現意義についてはさらなる検討が必要であるが、病勢の進展に伴いより強く相関を認めることから、これらの遺伝子の発現は予後を判定するだけでなく、新たな MDS に対する治療標的となりうると考えられた。

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 41.7% である。経過観察中にはじめて血小板 <5 万/ μ 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、この 3 項目は、診断時のみならず、経過観察中の原発性骨髄線維症患者の治療方針を決定する指標となる。

②本邦の二次性骨髄線維症の原疾患は、原発性骨

髄線維症と同様に骨髄増殖性腫瘍に分類される PV, ET と、MDS が主であった。集積した症例数は少ないものの、発症年齢、臨床症状の頻度、検査成績は、原発性骨髄線維症のそれとほぼ同様であった。予後、および予後因子を、今後症例を集積して明らかにしていく必要がある。

③本研究において確立した新規技術は MPLW515L/K を 10%程度までの範囲において確実に判別可能であった。これによって変異の検出として一般的であるダイレクトシーケンス法と比較し高感度に変異を検出できる。また本技術は PCR による増幅反応後に蛍光強度を測定するのみで変異を検出でき、ダイレクトシーケンス法と比較し極めて簡便である。

5. 造血幹細胞移植

①同種造血幹細胞移植後の移植前臓器障害の程度から見た予後予測に関して、我が国では臓器障害の頻度に基づいた flexible HCT-CI スコアがある程度有効であることが示唆された。また、各 co-morbidities の重み付けの調整に加えて年齢・PS を総合的に評価することで移植成績をある程度正確に予測できることが明らかとなった。加えてこのデータからは、造血幹細胞ソースの効率良い供給体制の整備の重要性が示唆された。

②MDS に対する RIST は一定の抗腫瘍効果をもたらすことが示された。一方、晩期合併症については問題が残存しており、長期生存例についても良好な QOL を維持しているのは少数であった。高齢者または臓器障害を有する MDS に対する RIST は安全に施行可能であった。長期成績の解析・改善のため、良好な QOL を目指した長期フォローアップシステムの確立が必要と考えられた。

6. 小児科領域

①FA 患者由来 iPS 細胞において、エピソーマルベクター由来遺伝子の発現が残っていたこと、及び核型に異常が見られたことより、FA 経路は初期化において重要な働きをしていることが示唆された。血液・血管内皮前駆細胞において、ALDH2 遺伝子発現の亢進がみられたことは、発生段階において、内因性のアルデヒドが生じていることを示唆し、FA 患者由来 iPS 細胞より得られた前駆細胞において、特に高い発現がみられたことから、ALDH2 と FA 経路には何かしらのクロストークが存在している可能性が示唆された。Alda-1 添加により、血液・

血管内皮前駆細胞の分化障害は緩和されたが、血液細胞への分化を回復するに至らなかった。このことは、造血障害には、アルデヒド以外の因子が関わっていることを示唆すると考えられた。

②MDS が疑われて中央診断に登録された 618 例中 72 例 (12%) になんらかの先天性素因、家族性素因を疑う所見を認めた。このうち、遺伝性骨髄不全症候群と診断された 10 例の骨髄像は RCMD や RAEB と類似していた。小児の MDS を診断するにあたっては遺伝性骨髄不全症候群を考慮することがきわめて重要であることが再認識された。診断が確定しなかった例の大部分は最終診断にいたっておらず新規疾患が隠れている可能性がある。今後、エクソンシーケンスなどのゲノム解析により詳細な検討を加えることが必要である。

③rATG は hATG と比較して、6 ヶ月以降の反応例もみられることから、最終的に有効率を判定するには、12 ヶ月までの経過観察が必要と考えられる。rATG の反応率は hATG と比較してやや劣るが、hATG の入手が困難なわが国にあっては、HLA 一致血縁ドナーが得られなければ、試みてもよい治療法と思われる。

④今回 ALDH2 遺伝子の解析を行い、その変異が造血障害および MDS/AML の発症時期を大きく左右することが証明された。今後はアルデヒドを代謝する薬剤の開発や、FA 細胞あるいはモデルマウスにおける実験から治療法の開発につながると考えられた。後天性 AA における同種造血細胞移植後のドナー型造血不全は、系統的な診断あるいは治療的アプローチは確立されていない。今回の我々の解析では後天性 AA の移植後ドナー型造血不全には、一致同胞間移植では混合キメラ、代替ドナー移植では CMV 感染の関与が示唆された。

E. 結論

1. 再生不良性貧血・赤芽球癆

①HLA-LLs は初診時 AA 患者の約 2 割に検出されることが示された。

②個人票データベースは、いくつかの課題を含んでいるが、難病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り、現状ではこのようなデータベースの特性を考慮した上で有効活用してみせるとともに、問題点については、具体的に改善を進めていく必要がある。

③次世代高速シーケンサーによる遺伝子変異検索は、正確で効率的に DKC の既知の原因遺伝子変

異を同定することができた。また RECQL4、ATM、BLM といった常染色体劣性遺伝疾患のヘテロ変異が高率に認められ、DKC の病態への関与が考えられた。

④再生不良性貧血の臨床調査個人票（個人票）を利用し、個人票データベースの入力状況、データベースの仕組みの現状について、観察・検討し、本データベースの有効活用、有用性について議論した。

⑤成人慢性赤芽球癆における免疫抑制療法不応および再発は死亡リスクとなることが明らかとなった。再発・難治性慢性赤芽球癆に対する鉄キレート療法の役割が前方視的疫学研究により明らかにされることが今後期待される。

2. 溶血性貧血

①c. 2684G>A 変異は、885 番目のアミノ酸がアルギニンからヒスチジンに変換することを意味し、C5 補体活性自体には異常は来さないものの、エクリズマブの結合に重要な変異であるため、薬剤不応性を来していると結論した。

②PNH 患者の GPI 欠損細胞特異的に体細胞突然変異が合計 9 個見つかった。国内で初めての先天性 PIGA 欠損症の診断には、好中球の FACS 解析が有用で、痙攣発作にはビタミン B6 の投与が非常に有効であった。

③PNH 発症をもたらす PIGA 変異 (PNH) クローン の拡大は造血障害免疫の回避による選択的生存および良性腫瘍様の増殖獲得に依存することが特異な症例の解析により支持された。

④本研究から、クームス陰性 AIHA 患者は、一般的に、クームス陽性 AIHA より貧血・溶血は軽度であり、同等のステロイド反応性と 1 年後生存率を示すことが明らかになった。クームス陰性 AIHA を診断する意義が改めて明らかになったといえる。

3. 骨髄異形成症候群

①本邦における鉄キレート療法の施行は MDS と再生不良性貧血症例に多く、高齢者での使用が多いことが明らかとなった。また使用中止理由は死亡によるものが最も多く、予後不良疾患へのキレート療法施行が関係している可能性が示唆された。一方、血球改善症例は全体の 8% に認められた。

②NTBI 測定には non-metal HPLC システムを、ヘプシジン測定には LC-MS/MS システムを用いて各種濃度を算出した。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。

③特定の RNA スプライシング関連因子変異が、特定遺伝子部位の異常スプライシングと関連する可能性が示唆される。アザシチジン治療効果と異常 RNA の発現との関連性については、今後の検討課題である。

④MDS 症例において、スプライス異常、欠失挿入をもつ異常 mRNA の発現を確認した。生物学的意義については、今後の検討課題である。

⑤MDS の新たな予後予測システムとして IPSS-R が完成した。この作製には本班からも貢献出来た。今後は、国内症例への適用を進め、IPSS-R の有用性を検証する必要がある。

⑥今回の結果では、5q-症候群を除く未治療で原発性の FAB-RA において、WHO 分類の病型分類 (WHO-RA と RCMD) と骨髄の芽球比率 ($\leq 2\%$ と $> 2 \sim < 5\%$) とに関連が認められた。

⑦現在、本データベースには、セントラルレビューによって診断確度が担保された 280 例を超える登録時データと、170 例を超える追跡調査データが含まれている。今後も、さらにデータベースの充実を図っていくとともに、これをさまざまな研究に活用し、その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。

⑧hMDS の症例は現在、予定症例数の約半数まで登録済みであり、その患者背景や臨床像、治療選択の内訳などについても明らかになりつつある。

⑨RUNX1 変異と BMI1 の協調により MDS/AML を発症することを示した。

⑩造血異常と悪性リンパ腫の合併例について回答を得た。59 例について二次調査を行っている。

⑪後天性鉄芽球性貧血と先天性鉄芽球性貧血では発症機序が異なることが示唆された。

⑫MDS 幹細胞はその表現型や遺伝子発現パターンからも heterogeneous な集団であると考えられる。Single Cell PCR 法を用い、表面抗原、細胞内機能分子の発現を同時に解析することにより、特定の遺伝子発現を有する細胞集団に特異的な表面抗原の同定が可能であった。

4. 骨髄線維症

①本邦の原発性骨髄線維症 609 例の臨床情報を集積した。血小板 < 5 万/ μ 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。

②本邦の二次性骨髄線維症の臨床情報を集積した。二次性骨髄線維症の基礎疾患は、ET 46%、MDS 24%、PV 8%であった。

③2種類存在するMPL変異の型とMPNの臨床所見との関わりが明らかになれば、本検出法はMPN治療の予後予測に役立てられる可能性があり、治療方針の決定などに大いに寄与できると期待される。

5. 造血幹細胞移植

①同種造血幹細胞移植後の移植前臓器障害の程度から見た予後予測に関して、我が国では臓器障害の頻度に基づいたflexible HCT-CIスコアがある程度有効であることが示唆された。また、各co-morbiditiesの重み付けの調整に加えて年齢・PSを総合的に評価することで移植成績をある程度正確に予測できることが明らかとなった。加えてこのデータからは、造血幹細胞ソースの効率良い供給体制の整備の重要性が示唆された。

②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た。今後、良好なQOLを目指した長期フォローアップシステムの確立が必要と考えられた。

6. 小児科領域

①FA患者における造血不全は、造血幹細胞の維持に異常があることに起因していると考えられてきたが、我々の結果より、発生のより初期段階において異常が生じている可能性がある。FA患者由来iPS細胞を用いた疾患解析は、Alda-1のような新規化合物の有用性を評価するための良い手法になるだろう。

②MDSが疑われて中央診断に登録された小児618例中72例(12%)になんらかの先天性素因、家族性素因を疑う所見を認めた。このうち11例では最終的に既知の遺伝性骨髄不全症候群と診断が確定したが、大部分の症例では最終診断が得られなかった。新規疾患が含まれている可能性も高く、ゲノム検索による検討が望まれる。

③次世代高速シーケンサーによる遺伝子変異検索は、正確で効率的にDKCの既知の原因遺伝子変異を同定することができた。またRECQL4、ATM、BLMといった常染色体劣性遺伝疾患のヘテロ変異が高率に認められ、DKCの病態への関与が考えられた。

④FAにおける骨髄不全、MDS/AMLの発症にALDH2遺伝子が関与している可能性が示唆され、後天性AAの移植後ドナー型造血不全には、一致同胞間移

植では混合キメラ、代替ドナー移植ではCMV感染の関与が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Ichikawa M, Yoshimi A, Nakagawa M, Nishimoto N, Watanabe-Okochi N, Kurokawa M. A role for RUNX1 in hematopoiesis and myeloid leukemia. *Int J Hematol.* 2013 Apr 24. in press.
- Watanabe-Okochi N, Yoshimi A, Sato T, Ikeda T, Kumano K, Taoka K, Satoh Y, Shinohara A, Tsuruta T, Masuda A, Yokota H, Yatomi Y, Takahashi K, Kitaura J, Kitamura T, Kurokawa M. The shortest isoform of C/EBP β , Liver inhibitory protein (LIP), collaborates with Ev1 to induce AML in a mouse BMT model. *Blood.* 2013 Apr 1. in press
- Nagai Y, Osawa K, Fukushima H, Tamura Y, Aoki K, Ohya K, Yasuda H, Hikiji H, Takahashi M, Seta Y, Seo S, Kurokawa M, Kato S, Honda H, Nakamura I, Maki K, Jimi E. p130Cas plays important roles in osteoclastic bone resorption. *J Bone Miner Res.* 2013. in press
- Kanda Y, Oshima K, Kako S, Fukuda T, Uchida N, Miyamura K, Kondo Y, Nakao S, Nagafuji K, Miyamoto T, Kurokawa M, Okoshi Y, Chiba S, Ohashi Y, Takaue Y, Taniguchi S. In vivo T-cell depletion with alemtuzumab in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Combined results of two studies on aplastic anemia and HLA-mismatched haploidentical transplantation. *Am J Hematol.* 2013 Apr;88(4):294-300.
- Nishiwaki S, Miyamura K, Ohashi K, Kurokawa M, Taniguchi S, Fukuda T, Ikegame K, Takahashi S, Mori T, Imai K, Iida H, Hidaka M, Sakamaki H, Morishima Y, Kato K, Suzuki R, Tanaka J; for the Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Impact of a donor source on adult Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia: a retrospective analysis from the Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Ann Oncol.* 2013 Jan 31. in press.
- Yamazaki S, Nakamura F, Nannya Y, Nakagawa