

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

我々はPNH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ルな拡大に関わる新たな遺伝子の探索のため3人のPNH患者の好中球由来の異常細胞と頬粘膜由来の正常細胞の全エクソン配列の解析を行った。

一方海外との共同研究により先天性 GPI 欠損症である *PIGO* 欠損症を新たに報告した。また国内でも先天性 GPI 欠損症患者のスクリーニング系を立ち上げ、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したいと考えている。

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。PNH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がわかったが、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。また海外との共同研究によって続々と発見されている先天性 GPI 欠損症について、国内でもそのスクリーニング系を立ち上げて多くの患者を発見し疾患概念の確立と診断基準の制定を目指す。

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。

(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 欠損症がみつかった。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。てんかんの発症には神経細胞に発現する GPI アンカー型蛋白質である ALP の欠損が関係していると考えられる。ALP は細胞表面で、ピリドキサルリン酸を脱リン酸して細胞内に取り込める形のピリドキサルにし、細胞内に入ったピリドキサルは再びリン酸化されてピリドキサルリン酸となり、GABA(γ-アミノ酪酸)合成酵素の補酵素として働く。細胞膜上に ALP が発現しないと細胞内のピリドキサルリン酸が不足し GABA 合成が抑制される結果痙攣発作がおこると考えられる。実際、細胞内のピリドキサルを補うために、患者にビタミン B6 (ピリドキシン) の投与を行ったところけいれん発作が消失した。

D. 考察

PNH 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、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をする予定である。

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。その発症機序を明らかにしたいと考えている。

E. 結論

PNH 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 PIGO 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

●Krawitz PM, Murakami Y, Hecht J, et al. Mutations in PIGO, a member of the GPI-anchor-synthesis pathway, cause hyperphosphatasia with mental retardation. *Am J Hum Genet* 2012;**91**(1):146-51.

●Murakami Y, Kanzawa N, Saito K, et al. 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.

2. 学会発表

● Yoshiko Murakami, Norimitsu Inoue, Yusuke Maeda, Yukitoshi Takahashi and Taroh Kinoshita, : Screening patients with inherited GPI anchor deficiency to establish concept of the new disease : XXIV International Complement Workshop 2012.10.10-15, Chania, Greece.

●村上良子、井上徳光、金倉譲、西村純一、木下タロウ:発作性夜間血色素尿症における GPI 欠損細胞の拡大機序について : 第 49 回補体シンポジウム 2012. 8. 大阪

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

RUNX1 変異と BMI1 の協調作用による MDS 発症機序

研究協力者：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）
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）
北村 俊雄（東京大学医科学研究所細胞療法分野 教授）

研究要旨

RUNX1 変異 MDS 患者の CD34⁺細胞では *BMI1* が高発現であり、RUNX1 変異単独では増殖能を欠くが、両者の共発現によってヒト CD34⁺細胞、マウスモデル共に増殖性が亢進した。また、RUNX1 変異導入 CD34⁺細胞に BMI1 を後から導入すると、高リスク MDS 様の芽球増加を伴う緩やかな細胞増殖を認めた。以上より、BMI1 が RUNX1 変異と協調して MDS/AML 発症に関わることが示された。

A. 研究目的

RUNX1 点突然変異は、高率に白血病に移行する家族性血小板異常症 (FPD/AML) の責任遺伝子として同定され、様々な骨髄系造血器腫瘍に認められることが明らかになっている。われわれは de novo MDS や放射線・治療関連の MDS および AML で *RUNX1* 変異が高頻度であることを報告した。しかし FPD/AML 例からも明らかのように、*RUNX1* 変異だけでは MDS/AML 発症には至らず、白血病化には他の遺伝子異常の積み重ねが必要と考えられる。そこで *RUNX1* 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ため、*RUNX1* 変異体導入ヒト造血幹細胞およびマウスモデルの解析を行った。

B. 研究方法

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。

(倫理面への配慮)

広島大学医学部倫理委員会承認済みであり、同委

員会の定めるヒトゲノム遺伝子解析研究の指針に従って実施した。検体提供者にはインフォームドコンセントを行い、個人情報保護のため個々の試料情報は連結可能匿名化とした。動物実験は東大医科研において承認を得た上で、指針に従って実施した。

C. 研究結果

RUNX1 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。

D. 考察

RUNX1 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。

E. 結論

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

F. 研究発表

1. 論文発表

- Harada H, Harada Y: Molecular mechanisms that produce radiation-induced or therapy-related MDS/AML by RUNX1/AML1 point mutations. A New Challenge of Radiation Health Risk Management. Nakashima M, Takamura N, Suzuki K, Yamashita S eds. Nagasaki Newspaper Publish pp151-160, 2012.
- Matsuda A, Taniwaki M, Jinnai I, Harada H, Watanabe M, Suzuki K, Yanagita S, Suzuki T, Yoshida Y, Kimura A, Tsudo M, Tohyama K, Takatoku M, Ozawa K: Morphologic analysis in myelodysplastic syndromes with del(5q) treated with lenalidomide. A Japanese multiinstitutional study. *Leuk Res.* 36(5):575-580,2012.
- Oki T, Kitaura J, Watanabe-Okochi N, Nishimura K, Maehara A, Uchida T, Komeno Y, Nakahara F, Harada Y, Sonoki T, Harada H, Kitamura T: Aberrant expression of RasGRP1 cooperates with gain-of-function NOTCH1 mutations in T-cell leukemogenesis. *Leukemia* 26(5):1038-1045,2012.
- Nitta H, Harada Y, Hyodo H, Kimura A, Harada H: Expansion of CD8+/perforin+ T-cells predicts response to ciclosporin A therapy in patients with erythroid hypoplasia/aplasia. *Br J Haematol* 157(5):641-645,2012.
- Imagawa J, Tanaka H, Matsumoto K, Morita K, Harada Y, Harada H: A sharp fluctuation in peripheral blood cells shortly after dasatinib administration. *Int J Hematol* 96(2):194-199,2012.
- Harada Y, Inoue D, Ding Y, Imagawa J, Doki N, Matsui H, Yahata T, Matsushita H, Ando K, Sashida G, Iwama A, Kitamura T, Harada H: RUNX1/AML1 mutant collaborates with *BMI1* overexpression in the development of human and murine myelodysplastic syndromes. *Blood (in press)*,2013.

2. 学会発表

- Harada H, Harada Y: Molecular

mechanisms of myelodysplastic syndromes by RUNX1/AML1 mutations. The 3rd JSH International Symposium 2012 in Kawagoe, 2012.5.26-27, Kawagoe, Japan

- 原田浩徳：放射線関連MDS・白血病の発症機序におけるRUNX1/AML1変異の役割「放射線障害と血液疾患」。第52回日本リンパ網内系学会総会，2012.6.14-16，福島

- Harada H, Harada Y, Inoue D, Kitamura T: RUNX1/AML1 mutants collaborate with *BMI1* in the development of myelodysplastic syndromes. ISEH 41st Annual Scientific Meeting, 2012.8.23-26, Amsterdam, Netherland

- Harada H, Harada Y, Inoue D, Kitamura T: RUNX1/AML1 mutants collaborate with *BMI1* in the development of myelodysplastic syndromes. The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2012.9.19-21, Sapporo, Japan

- Harada H, Inoue D, Ding Y, Imagawa J, Harada Y, Kitamura T: RUNX1/AML1 mutants collaborate with *BMI1* in the development of myelodysplastic syndromes. The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, 2012.10.19-21, Kyoto, Japan

- Harada H, Inoue D, Doki N, Ding Y, Harada Y, Kitamura T: RUNX1/AML1 mutants collaborate with *BMI1* in the development of myelodysplastic syndromes (MDS) / acute myeloid leukemia (AML) in a mouse BMT model. The 54th ASH Annual Meeting and Exposition, 2012.12.8-11, Atlanta, GA, USA

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、分離・分析性能が向上した新規測定システムを導入し、患者血清 NTBI 測定を進めている。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検体について、189 検体分の NTBI 値および 124 検体分の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】生体試料に対して不活性な流路、高い回収とゼロキャリアオーバーで生体分子が変性することなくクロマトグラフィーを可能とした新規 HPLC 分析システム ACQUITY UPLC H-Class Bio システム (Waters) を新規導入した。

分離カラムはこれまで同様 OmniSpher 5 C18, G100 × 3 Repl, glass column with ChromSep guard column SS (Varian brand/Agilent Technologies) を装着し

た。

【ヘプシジン測定】ヘプシジン測定は、これまで通り API4000QTRAP (Applied Biosystems/Life Technologies) に UPLC ACQUITY TM systems (Waters) を組み合わせた LC-MS/MS を利用し、3 種類の isoform (hepc-20, -22, -25) の同時定量を進めている。

【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承認を受けた。当施設に送られてきた試料は施錠を施した専用の冷凍庫に保管管理している。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ている。

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について、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、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。

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は平成 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た。

【自動分析装置による NTBI 測定試薬の開発】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開発、臨床応用が望まれている。我々はこの点に関して、自動分析装置対応の NTBI 測定試薬の開発と臨床検査試薬としての実用化を進めており、NTBI 測定試薬としての基礎性能評価が終了した。なお、この基礎検討は本研究班での検体を利用したものでないことを付け加えておきます。

D. 考察

これまで採用してきた inert 型 HPLC 分析システム BioSeparation Modul (Waters) は十分な解析能力を示してきた。今回、経年劣化によりデータの信頼性が損失される危険性を事前に回避する目的で、より高い回収とゼロキャリーオーバーで生体分子が変性することなくクロマトグラフィーを可能とした新規 HPLC 分析システム ACQUITY UPLC H-Class Bio シス

テム (Waters) を導入した。

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、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。

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 システムを用いて各種濃度を算出した。すでに報告済みの健常人の血中 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。

一方で自動分析装置対応の NTBI 測定試薬の基礎性能の評価が終了し、臨床検査試薬としての有用性が期待できる結果を得ている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Goto T, Ikuta K, Inamoto Y, Kamoshita S, Yokohata E, Koyama D, Onodera K, Seto A, Watanabe K, Imahashi N, Tsukamoto S, Ozawa Y, Sasaki K, Ito M, Kohgo Y, Miyamura K : Hyperferritinemia after adult allogeneic hematopoietic cell transplantation: quantification of iron burden by determining non-transferrin-bound iron. Int J Hematol. 2013; 97: 125-134.
- Jiang L, Akatsuka S, Nagai H, Chew SH, Ohara H, Okazaki Y, Yamashita Y, Yoshikawa Y, Yasui H, Ikuta K, Sasaki K, Kohgo Y, Hirano S, Shinohara Y, Kohyama N, Takahashi T, Toyokuni S : Iron overload signature in chrysotile-induced malignant mesothelioma. J Pathol. 2012; 228: 366-377
- Tanaka H, Li Z, Ikuta K, Addo L, Akutsu H, Nakamura M, Sasaki K, Ohtake T, Fujiya M, Torimoto Y, Glass J, Kohgo Y : Iron facilitator LS081 reduces hypoxia-inducible factor-1 α protein and functions as anticancer agent in hepatocellular carcinoma. Cancer Sci 2012; 103: 767-774
- 生田 克哉 : MDS における deferasirox の臨床効果. 血液内科 65 巻(5) : 736-742 2012 年
- 伊藤 巧, 生田 克哉 : 経口鉄キレート剤が血清鉄・不飽和鉄結合能測定系に与える影響. Medical Technology 40 巻(10) : 1054-1057 2012 年
- 生田 克哉 : 【鉄代謝のバイオマーカー】鉄キレート剤が血清鉄・UIBC に及ぼす影響. 臨床検査

56 巻(10) : 1115-1119 2012 年

- 奈良 美保, 生田 克哉, 澤田 賢一 : 【鉄代謝のバイオマーカー】〈検査指標〉血清鉄と鉄結合能. 臨床検査 56 巻(10) : 1052-1057 2012 年
 - 佐々木勝則, 生田克哉, 鳥本悦宏, 高後裕 : 【鉄代謝のバイオマーカー】〈検査指標〉非トランスフェリン結合鉄. 臨床検査 56 巻(10) : 1070-1082 2012 年
 - 生田 克哉, 高後 裕 : 【慢性疾患患者への最新薬物療法の鉄則】 その他 貧血(鉄欠乏性貧血、悪性貧血など). 診断と治療 100 巻 Suppl : 410-415 2012 年
 - 生田 克哉 : 臨床検査の分子生物学(第 13 回) 鉄代謝関連マーカーの検査と消化器疾患. 分子消化器病 9 巻(1) : 48-53 2012 年
- ### 2. 学会発表
- 生田 克哉, 進藤 基博, 新関 紀康, 友田 豊, 紀野 修一, 伊藤 喜久, 高後 裕 : 血清中非トランスフェリン結合鉄(NTBI)定量法の確立. 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会 2012 年 11 月 29 日-12 月 2 日 京都
 - 生田 克哉, 進藤 基博, 新関 紀康, 友田 豊, 紀野 修一, 伊藤 喜久, 高後 裕 : ヒト血清中における鉄代謝調節因子ヘプシジン・アイソフォームの発現および産生機序の検討. 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会 2012 年 11 月 29 日-12 月 2 日 京都
 - 生田 克哉 : 鉄過剰症および鉄動態モニタリングと今後の展望. 第 36 回日本鉄バイオサイエンス学会 2012 年 9 月 1-2 日 札幌
 - 加藤 大介, 飯塚 直美, 生田 克哉, 佐々木 勝則, 高後 裕 : 自動分析装置による NTBI 測定試薬の開発. 第 36 回日本鉄バイオサイエンス学会 2012 年 9 月 1-2 日 札幌
 - 伊藤 巧, 佐々木 勝則, 生田 克哉, 進藤基

博, 鳥本 悦宏, 高後 裕: Cell-based bioassay を応用したヘプシジン活性測定法の開発. 第 36 回日本鉄バイオサイエンス学会 2012 年 9 月 1-2 日 札幌

• 佐々木 雄亮, 野口 真理子, 大森 由紀, 萬啓悟, 下中 靖, 生田 克哉, 高後 裕: 鉄過剰状態における C. E. R. A. の造血及び鉄代謝に与える影響. 第 36 回日本鉄バイオサイエンス学会 2012 年 9 月 1-2 日 札幌

• 池之上 辰義, 島崎 優, 河田 哲也, 橋本 整司, 生田 克哉, 佐々木 勝則, 高後 裕, 西尾 妙織: 血液透析での鉄剤投与方法が体内鉄動態・酸化ストレスに及ぼす影響. 第 57 回日本透析医学会学術集会・総会 2012 年 6 月 22-24 日 札幌

• 佐々木 雄亮, 野口 真理子, 大森 由紀, 萬啓悟, 下中 靖, 生田 克哉, 高後 裕: 鉄過剰状態における C. E. R. A. の造血及び鉄代謝に与える影響. 第 57 回日本透析医学会学術集会 2012 年 6 月 22-24 日 札幌

• 高後 裕: 鉄動態と貧血診療の新しい戦略. 第 13 回日本検査血液学会学術集会 2012 年 7 月 29 日 高槻

• 佐々木 勝則, 生田 克哉, 田中 宏樹, 大竹 孝明, 藤谷 幹浩, 鳥本 悦宏, 高後 裕: Non-metal HPLC を用いた高感度 NTBI 測定法の確立. 日本薬学会第 132 年会 2012 年 3 月 29-31 日 札幌

• Ito S, Ikuta K, Addo L, Sasaki Y, Shimonoka Y, Okamura N, Shindo M, Sasaki K, Torimoto Y, Kohgo Y: Investigation of the processing mechanism of the three isoforms of hepcidin. The 74th Annual Meeting of the JSH 2012. 10. 19-21, Kyoto

• Addo L, Ikuta K, Addo L, Ito S, Sasaki Y, Shimonoka Y, Shindo M, Sasaki K, Torimoto Y, Kohgo Y: Three isoforms of hepcidin measured in human serum by liquid chromatography-tandem mass

spectrometry. The 74th Annual Meeting of the JSH 2012. 10. 19-21, Kyoto

• Kohgo Y: Iron research in the Asia-Pacific region and future outlook. The 3rd Asia Pacific Iron Academy Conference 2012. 11. 3-4 Taipei, Taiwan

• Ito S, Ikuta K, Addo L, Shindo M, Sasaki K, Torimoto Y, Kohgo Y: The three isoforms of human hepcidin: Measurement and assessment of their processing in health and chronic kidney disease using LC-tandem MS. The 3rd Asia Pacific Iron Academy Conference 2012. 11. 3-4 Taipei, Taiwan

• Ito S, Ikuta K, Sasaki K, Shindo M, Torimoto Y, Kohgo Y. Nobel Non-Transferrin-Bound Iron (NTBI) Measuring System Utilizing Automatic Analyzer. ASH 2012 (Annual Meeting of American Society of Hematology, Dec 10th (presentation): Dec 8-11th, 2012 in Georgia World Congress Center, Atlanta) (Abstract 3207 Poster session III: 102. Regulation of Iron Metabolism)

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

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

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：小児再生不良性貧血 40 例に対し、ウサギ抗胸腺細胞グロブリンとシクロスポリンの併用療法をおこなった。投与後 6 ヶ月の時点で、20 例（50%）に反応が得られたが、それ以降も反応例は増加し、最終的な反応率は 57.5%であった。反応が見られない 16 例には、非血縁ドナーからの同種幹細胞移植が施行され、全例が生存中である。2 例が死亡し、治療開始後 2 年の全生存率は、それぞれ、93.8%、50.3%であった。

A. 研究目的

後天性再生不良性貧血の治療薬として、従来はウマ抗胸腺細胞グロブリン（hATG、リンホグロブリン、ゼンザイム）が使用されてきたが、同剤の販売が中止となり、代わって、ウサギ抗胸腺細胞グロブリン（rATG、サイモグロブリン、ゼンザイム）が用いられるようになってきている。米国NIHからの両製剤の前方視的無作為割り付け比較試験では、rATGはhATGと比較して反応率と生存率において、統計学的に有意に劣ることが示された。今回、わが国でrATGとシクロスポリンによる併用療法がおこな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。

B. 研究方法

初回治療としてrATGとシクロスポリンが投与された小児後天性再生不良性貧血40人を対象とした。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。重症度は、最重症（14例）、重症（10例）、中等症（16例）であった。また、診断から治療開始までの日数の中央値は22日（範囲：1～203日）であった。rATGは、3.5 mg/kg/日を5日間投与し、シクロスポリンは5 mg/kg/日をすくなくとも6ヶ月以上投与した。経過観察期間の中央値は22ヶ月（6～38ヶ月）である。

（倫理面への配慮）

治療にあたっては、事前に患者および家族に十分、利益、不利益を説明して、文書による同意を取得した。

C. 研究結果

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%) と合計 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。その後、2 例が 16、19 ヶ月の時点で再発した。反応がみられなかった 2 例は、rATG の 2 回目の投与がおこなわれたが反応はみられなかった。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

である。ドナーの内訳は 13 例が非血縁骨髄ドナー、3 例が HLA 不一致血縁ドナーであった。頭蓋内出血、ARDS による死亡例が 2 例でみられた。治療開始 2 年後の全生存率、transplantation-free-survival は 50.3%であった。

D. 考案

われわれの以前おこなったhATGによる同様な研究では、治療開始6ヶ月、12ヶ月後の反応率は、それぞれ、68%、70%で、6ヶ月以降に反応する例はみられなかった。rATG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である。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kojima S. Treatment of acquired aplastic anemia in children. Hematology. 2012 Apr;17 Suppl 1:S11-4.
- 2) Shimada A, Takahashi Y, Muramatsu H, Hama A, Ismael O, Narita A, Sakaguchi H, Doisaki S, Nishio N, Tanaka M, Yoshida N, Matsumoto K, Kato K, Watanabe N, Kojima S. Excellent outcome of allogeneic bone marrow transplantation for Fanconi anemia using fludarabine-based reduced-intensity conditioning regimen. Int J Hematol. 2012 Jun;95(6):675-9.
- 3) Jerez A, Sugimoto Y, Makishima H, Verma A, Jankowska AM, Przychodzen B, Visconte V, Tiu RV, O'Keefe CL, Mohamedali AM, Kulasekararaj AG, Pellagatti A, McGraw K, Muramatsu H, Moliterno AR, Sekeres MA, McDevitt MA, Kojima S, List A, Boultonwood J, Mufti GJ, Maciejewski JP. Loss of

heterozygosity in 7q myeloid disorders: clinical associations and genomic pathogenesis. *Blood*. 2012 Jun 21;119(25):6109-17.

- 4) Yang W, Zhang P, Hama A, Ito M, Kojima S, Zhu X. Diagnosis of acquired bone marrow failure syndrome during childhood using the 2008 World Health Organization classification system. *Int J Hematol*. 2012 Jul;96(1):34-8.
- 5) Wang X, Muramatsu H, Sakaguchi H, Xu Y, Narita A, Tsumura Y, Doisaki S, Tanaka M, Ismael O, Shimada A, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Mutation in the THPO gene is not associated with aplastic anaemia in Japanese children. *Br J Haematol*. 2012 Aug;158(4):553-5.
- 6) Doisaki S, Muramatsu H, Shimada A, Takahashi Y, Mori-Ezaki M, Sato M, Kawaguchi H, Kinoshita A, Sotomatsu M, Hayashi Y, Furukawa-Hibi Y, Yamada K, Hoshino H, Kiyoi H, Yoshida N, Sakaguchi H, Narita A, Wang X, Ismael O, Xu Y, Nishio N, Tanaka M, Hama A, Koike K, Kojima S. Somatic mosaicism for oncogenic NRAS mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2012 Aug 16;120(7):1485-8.
- 7) Sakaguchi H, Nakanishi K, Kojima S. Inherited bone marrow failure syndromes in 2012. *Int J Hematol*. 2013 Jan;97(1):20-9.

2. 学会発表

海外

- 1) Kojima S. Treatment of Acquired Aplastic Anemia in Children. 34th International Society of Hematology. Apr. 28, 2012. Cancun, Mexico.
- 2) Kojima S. Treatment of Acquired Aplastic Anemia in Children. Asia Pacific Transplant and Hematology Forum 2012. May. 12, 2012. Taipei, Taiwan.
- 3) Kojima S. Therapeutic Advances in Treatment of Aplastic Anemia. 2nd Annual Updates on Breakthrough in Hematology. Sep. 1, 2012. Bangkok, Thailand.
- 4) Kojima S. Review of Aplastic Anemia Guidelines. 2nd Annual Updates on Breakthrough in Hematology. Sep. 2, 2012. Bangkok, Thailand.
- 5) Kojima S. Asian Experience in Treatment of Aplastic Anemia. Aplastic Anemia Advisory

Board Meeting. Oct. 4, 2012. Cambridge, USA.

- 6) Kojima S. Unrelated donor transplant vs Immunosuppressive therapy in patients with severe aplastic anemia. 17th Meeting of the APBMT Group. Oct. 27, 2012. Hyderabad, India.
- 7) Hama A, Manabe A, Ito M, Hasegawa D, Nozawa K, Kawashima N, Narita A, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Nakanishi K, Takahashi Y, Ohara A, Kojima S. A comparison of clinical and laboratory findings among aplastic anemia, RCC and RCMD in 219 cases registered to the central review system. 6th International Symposium on MDS and Bone Marrow Failure Syndromes in Childhood. Nov. 7, 2012. Diplomat Hotel Prague, Prague, Czech Republic.
- 8) Kojima S. Diagnosis and treatment of aplastic anemia in children. Asian Aplastic Anemia expert meeting. Dec. 9, 2012. Atlanta, USA.
- 9) Kojima S. Upfront Transplant Strategies in Aplastic Anemia. BTG2013. Feb. 23, 2013. Hong Kong, China.

国内

- 1) 小島勢二. 全エクソン解析による先天性骨髄不全症候群に対する新規原因遺伝子の探索. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会. 2012年12月2日. パシフィコ横浜会議センター、横浜.
- 2) 小島勢二. Donor-type Aplasia after Bone Marrow Transplantation in Children with Acquired Aplastic Anemia. 第35回日本造血細胞移植学会総会. 2013年3月8日. 金沢.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

MPL 遺伝子変異の検出法の開発

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

解離曲線解析を用いた *MPL* 遺伝子変異の検出法を開発した。本技術によって本態性血小板血症や原発性骨髄線維症にみられる 2 種類の *MPL* 変異のタイプを簡便に判別できる。今後は *MPL* 変異のタイプと臨床所見との関係を明らかにすることで、骨髄増殖性腫瘍の予後予測に応用できる可能性がある。

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。一方、真性赤血球増加症（polycythemia vera; PV）を除く本態性血小板血症（essential thrombocythemia; ET）、原発性骨髄線維症（primary myelofibrois; PMF）では半数の症例が *JAK2V617F* 陰性であることから、*JAK2V617F* 以外に MPN でみられる変異がいくつか同定された。そのうちの一つがトロンボポエチン受容体（myeloproliferative leukemia virus; *MPL*）をコードする遺伝子の変異である。*MPL* 変異は、ET の 1~3%、PMF の 5~10%にみられる。上述のごとく陽性症例数は少ないが、*MPL* 遺伝子変異陽性の症例では血栓症を引き起こしやすいとの報告がある。また、*MPL* 変異は同一の領域に 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。

B. 研究方法

野生型 *MPL* と *MPLW515L*, *W515K* に共通のプライマーセットを設計した。また、mutagenesis PCR により野生型 *MPL* に変異を挿入し、*MPLW515L*, *W515K* の配列を作製した。作製した 3 種類の *MPL* 配列を鋳型として PCR を実施し、変異を含む領域を特異的に増幅させた。増幅反応後、Q-probe と呼ばれる蛍光プローブを用いて *MPL* 変異を検出できるか確

認した。Q-probe は *MPLW515L/K* 部位にオーバーラップするよう設計され、野生型 *MPL* にパーフェクトマッチとなるよう設計されている。野生型 *MPL* と比較し、*MPLW515L* は 1 塩基の変異、*MPLW515K* は 2 塩基の変異であるため、Q-probe と *MPLW515L*, *MPLW515K* との結合にはそれぞれ 1 塩基、2 塩基のミスマッチが生じ、野生型 *MPL* 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、野生型 *MPL* と *MPLW515L*, *MPLW515K* 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

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。

D. 考察

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。

E. 結論

2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。

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 *JAK2* V617F 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

該当なし

3. その他

該当なし

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)

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

低形成性骨髄異形成症候群(hMDS)については、患者背景や臨床像、治療反応性や予後など、あらゆる事柄について未だ解明されていない。本研究は、hMDSの臨床経過に関するデータを全国規模で後方視的に調査することにより、hMDSに対する最適な治療選択を解明することを、目的とする。現時点で11施設からhMDS 98症例のデータが集計されており、血液疾患・悪性腫瘍の既往歴を有する症例が多いこと、WHO分類でRCUD/RCMDに該当する症例が半数を占めること、IPSSのlow/intermediate-1に該当する症例が約6割を占めること、また、診断の際に骨髄生検を施行されている症例数が50%未満にとどまっていることなどが、明らかになった。本研究は現在も進行中であり、全国から参加する28施設から約200症例を集計して、hMDSに対する最適な治療選択が明らかになることが期待される。

A. 研究目的

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。hMDSはMDSのうち5~20%を占めると考えられている。再生不良性貧血との鑑別が困難であるほか、低形成骨髄ゆえに汎血球減少が顕著であるため、白血病化よりもむしろ骨髄不全によって死に至ることが懸念される。そのため、他のMDSに対して行われているような骨髄抑制を伴う治療の妥当性が不明であり、hMDSに対する適切な治療法やその効果などは未だ解明されていない。

そこで、本邦におけるhMDSの患者背景、臨床像、治療反応性、予後などを調査することにより、hMDSに対する最適な治療選択を解明することが、本研究の目的である。

本調査により、hMDSの臨床像や予後、また患者背景に応じてさまざまな治療法の中でいずれが選択されるべきかについても、新たな知見を得ることができるかと期待される。

B. 研究方法

調査対象疾患は、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歳以上の場合は20%未満)の、hMDSである。2003年4月1日から2012年3月31日に診断された症例を対象とする。これまでの治療法の種類や、年齢・性別などは問わない。調査対象となるデータは治療経過に関する既存の臨床データと予後に関するデータであり、新たな検体収集や測定は行わない。

本調査で収集するデータは患者の診断日、末梢血の血算値や骨髄穿刺・生検所見、選択された治療法やその治療効果などからなる。

(倫理面への配慮)

各施設の倫理委員会の承認を得て調査を行った。臨床像の調査は、患者名を匿名化して行っている。

C. 研究結果

本研究に参加する施設は28施設の予定であり、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、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。

D. 考察

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、骨髓生検によって骨髓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、骨髓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。

E. 結論

hMDS 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。今後、hMDS 症例の登録作業を進めつつ、最適な治療選択の解明に努めたい。

F. 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, in press
- Kobayashi T, Ichikawa M, Kamikubo Y, Kurokawa M. Acute myeloid leukemia

with cryptic CBFB-MYH11 type D. *Int J Clin Exp Pathol.* 6: 110-112, 2013

- Yamazaki S, Nakamura F, Nannya Y, Nakagawa M, Ichikawa M, Kurokawa M. Early-onset therapy-related myelodysplastic syndrome originating from prolonged myelosuppression after fludarabine-based therapy. *Intern Med.* 51: 3427-3430, 2012

- Hangai S, Nakamura F, Kamikubo Y, Honda A, Arai S, Nakagawa M, Ichikawa M, Kurokawa M. Erythroleukemia showing early erythroid and cytogenetic responses to azacitidine therapy. *Ann Hematol.* 92: 707-709, 2013

- Yoshimi M, Goyama S, Kawazu M, Nakagawa M, Ichikawa M, Imai Y, Kumano K, Asai T, Mulloy JC, Kraft AS, Takahashi T, Shirafuji N, Kurokawa M. Multiple phosphorylation sites are important for RUNX1 activity in early hematopoiesis and T-cell differentiation. *Eur J Immunol.* 42: 104-110, 2012

- Nakazaki K, Hosoi M, Hangaishi A, Ichikawa M, Nannya Y, Kurokawa M. Comparison between pulsed high-dose dexamethasone and daily corticosteroid therapy for adult primary immune thrombocytopenia: a retrospective study. *Intern Med.* 51: 859-863, 2012

2. 学会発表

- 市川幹 教育講演：MDS のリスク別治療方針、第 74 回日本血液学会学術集会、2012 年 10 月 20 日、京都市

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」

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

研究協力者 谷本光音（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻腫瘍制御学教授）

研究要旨

岡山大学において MDS 患者に対する骨髄非破壊的前処置を用いた同種造血細胞移植の治療成績を後方視的に解析し、有効性と安全性を検討した。2012 年には 5 例が新たに追加となった。39 例中 13 例が生存中で 10 名が移植後寛解を維持、1 例は再発後にドナーリンパ球輸注のみで再寛解となりその後長期寛解を維持している。移植後 3 年以上経過した 10 名のうち 3 名に二次がんの発症があり、長期フォローアップの必要性が示唆された。

A. 研究目的

岡山大学病院で行った高齢者または臓器障害を有する MDS に対する RIST の成績を解析し、安全性と有効性を検討する。

mg/m²/day x 5 days) + cyclophosphamide (30 mg/kg/day x 2 days) (Flu/Cy)、GVHD 予防として cyclosporine A と methotrexate (CyA/MTX)、もしくは② Flu (30 mg/m²/day x 6 days) + busulfan (4 mg/kg/day x 2 days) (Flu/Bu)、CyA/MTX を用いた。また、臍帯血移植においては全身放射線照射 (2Gy) を追加、CyA/ Mycophenolate Mofetil (MMF) を用いた。(倫理面への配慮) 日常診療の範囲内の後方向視的解析であり、倫理面の問題はない。

B. 研究方法

2000 年 11 月から 2012 年 12 月までに 39 名に RIST を行った。前年度の報告と同じく、拒絶に対する救援療法としての RIST、および骨髄破壊的移植に準じた量の Busulfan が投与されているものは除外した。

年齢中央値は 59 歳で、男性 34 名、女性 5 名であった。病型 (FAB 分類) は RA 8 例、RARS 1 例、CMML 5 例、RAEB 20 例 (RAEB-1: 8 例、RAEB-2: 12 例)、Overt leukemia 5 例であった。幹細胞ソースは血縁末梢血 13 例 (そのうち HLA 半合致血縁 5 例)、非血縁骨髄 19 例、臍帯血は 7 例であった。移植時病期は寛解 12 例、治療抵抗性 13 例で、無治療で移植となったものが 14 例であった。

移植前治療として① fludarabine (25

C. 研究結果

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 (図 1)。死亡した 26 例のうち、1 年以内の死亡は 20 例あり、うち 7 例が原疾患の増悪によるものであった。

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。

移植後 1 年以上経過した後に再発した症例

は3例に留まった。うち1例はドナーリンパ球輸注のみで再寛解となり、以後1年以上の完全寛解を維持している。また1例はCMMLにて化学療法継続中であった。死亡に至ったのは移植後4年での髄外再発の1例のみであった。

一方、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。

原疾患のフォローおよび慢性GVHD管理にとどまらない長期の合併症管理の重要性が示唆された。

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。一方、RA症例は8例中2例が生存中であった。死亡原因として原疾患の増悪は1例のみであったが、二次生着不全、非感染性肺合併症、細菌感染などが見られた。（図2）

Overt leukemia および解析不能例を除いた27例に関してIPSSにおける生存率を比較した。Low riskの2例を除いたInt-1, Int-2, Highの3群では有意差を認めなかった。（図3）

図1

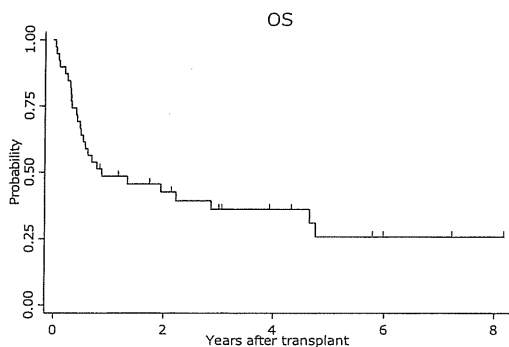


図2

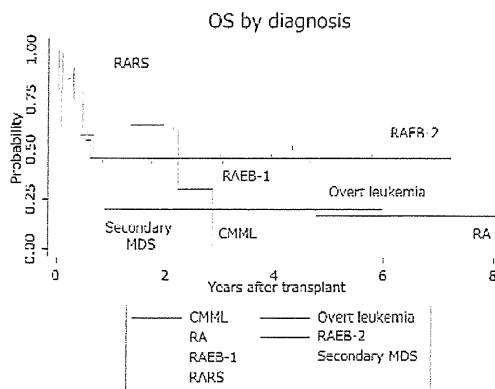
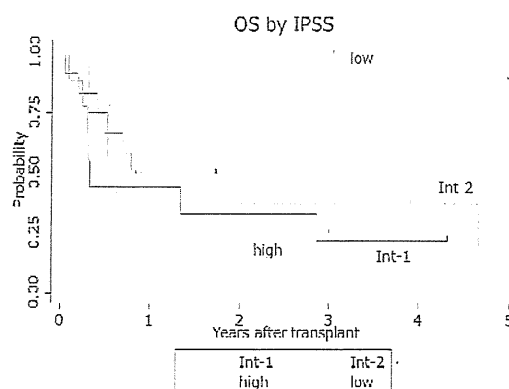


図3



D. 考察

原疾患の増悪による死亡は計8例、1年以上生存した18例中1例を除き原疾患の再発はなく、MDS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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

Takata K, Sato Y, Nakamura N, Tokunaka M, Miki Y, Yukie Kikuti Y, Igarashi K, Ito E, Harigae H, Kato S, Hayashi E, Oka T, Hoshii Y, Tari A, Okada H, Mohamad AA, Maeda Y, Tanimoto M, Kinoshita T, Yoshino T. Duodenal follicular lymphoma lacks AID but expresses BACH2 and has memory B-cell characteristics. Mod Pathol. 2013 Jan;26(1):22-31. doi:10.1038/modpathol.2012.127. Epub 2012 Aug 17.

2. 学会発表

1. Asano T, Fujii N, Saeki K, Hasegawa E, Kuroi T, Matsuoka K, Kondo E, Maeda Y, Shinagawa K, (Ichimura K), Tanimoto M. : Successful allogenic stem cell transplantation for MDS complicated by severe organizing pneumonia. 第 74 回
日本血液学会学術集会 2012.10.19(京都)

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

DKC の遺伝子解析

研究分担者 檀 和夫 (日本医科大学血液内科 教授)

山口博樹 (日本医科大学血液内科 講師)

研究要旨：先天性角化不全症(DKC)におけるテロメア関連遺伝子変異は診断に重要である。次世代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。また新規遺伝子変異の探索では、ロスモンド・トムソン症候群、毛細血管拡張性運動失調症、Bloom症候群の原因遺伝子であるRECQL4、ATM、BLM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。

A. 研究目的

先天性角化不全症(Dyskeratosis congenita: DKC)は網状色素沈着、爪の萎縮、舌の粘膜白斑症などといった特徴的身体的所見を伴う先天性の骨髄不全症(Bone marrow failure: BMF)である。10歳前後までに約80%以上の症例にこれらの特徴的的身体所見が付随しBMFを発症する。また約8%の症例に皮膚、上咽頭、消化管の扁平上皮癌や腺癌などの悪性腫瘍や、急性白血病などの造血器腫瘍の発症が認められる。遺伝型式はX連鎖劣性遺伝が35%、常染色体優性遺伝が5%、常染色体劣勢遺伝が数%に認められるが、残りの約60%近くが型式不明である。DKCの約60%の症例において原因遺伝子が同定され、テロメラーゼ複合体を構成する遺伝子群である、*DKC1*、*telomerase RNA component (TERC)*、*telomerase reverse transcriptase (TERT)*などや、Shelterin複合体を構成する蛋白である *TRF-interacting nuclear protein (TINF2)*に変異が認められている。

テロメラーゼ複合体は細胞分裂によるテロメアの短縮化に対しテロメアの複製、安定の役割をもち、Shelterin複合体はテロメアの先端部位の特異的な構造形成や保護などを行っている。DKCはこれらの遺伝子の変異によりテロメアが短縮

化し、その結果造血幹細胞などの増殖能に障害が起き上記の症候が形成されると考えられている。

これまでに我々はDKCの原因遺伝子である上述のテロメア制御遺伝子の変異が、一部の再生不良性貧血(aplastic anemia: AA)や骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndrome: MDS)に認められ、特徴的的身体所見を伴わず緩徐に発症する不全型DKCの存在が明らかにした(Lancet 2003;362:1628, Blood 2003;102:916, N Engl J Med. 2005 352: 1413)。不全型DKCは臨床的にAAやMDSと診断され、効果が得られない免疫抑制療法(immunosuppressive therapy: IST)が行われることがある。以上よりBMFの臨床診断において不全型DKCを鑑別することは重要である。

現在のところDKCや不全型DKCの診断基準は定まっておらず、臨床的には上述の特徴的身体的所見を伴うBMF、テロメア長の短縮、テロメア関連遺伝子の変異の同定によって診断を下している。しかしテロメア関連遺伝子の変異の同定に関しては原因遺伝子だけでも6種類存在し、その変異も一塩基変異から大欠失変異や片アレル欠失まで多彩で従来のサンガー法による変異のスクリーニングは効率的ではない。また約40%の症例は原因遺伝子が同定されていないことも問

題である。

近年次世代高速シーケンサーが登場し、これまでのサンガー法による直接塩基決定法よりより早く効率的に塩基配列の決定が可能となった。本研究は大欠失変異や片アレル欠失に関しては SNP アレイ解析で、一塩基変異に関しては次世代シーケンサーを応用し、効率的に原因遺伝子の変異が同定できるかを検討することを目的としている。また原因遺伝子が同定されていない症例に関しては、全 exon シーケンスを行い、新規原因遺伝子を同定することを目標としている。

B. 研究方法

研究対象は、特徴的身体的所見を伴う DKC 症例、もしくはテロメア長の短縮が認められた不全型 DKC 症例。目標症例数は 20 症例。

既知の遺伝子変異のスクリーニングは、*DKC1*、*TERC*、*TERT*、*NOPI0*、*NHP2*、*TINF2*を対象に遺伝子解析を行う。大欠失変異や片アレル欠失のスクリーニングは、東京大学医学部附属病院・がんセンターの SNP アレイ解析を用いて行う。一塩基変異などのスクリーニングは、日本医科大学生命科学センターの ABI Ion PGMTM シーケンサーもしくは、従来の direct sequence 法にて行う。

新規遺伝子変異の探索は、上記のスクリーニングにおいて変異が同定出来なかった症例に関して、東京大学医学部附属病院・がんセンターの次世代シーケンサーIllumina 社 GAI, GAIx, HiSeq2000 を用いて全 exon シーケンスを行う。新規遺伝子が同定された場合は、そのバリデーションや機能解析を日本医科大学生命科学センターにて行う。

倫理面への配慮として、本研究は当施設遺伝子倫理審査委員会において承認が得られており以下の配慮を予定している。生命倫理上の配慮に関しては、患者、及び健康ボランティアの人権、利益の保護について文書にて十分説明をしたうえ

で同意を得る。また研究への協力に同意した後であってもその同意を取り消すことができること、更に本研究への同意が得られない場合においても今後の治療などにはなんら不利益を被らないことを説明する。個人情報漏洩に対する取り組みとして研究組織とは別に個人情報管理者をおき連結可能匿名化をはかったうえで解析をおこなう。同意が撤回された場合は、検体、診療情報、遺伝情報はすべて匿名化されたまま焼却により破棄する。得られた結果は学会や論文として発表するが個人情報が出ることはない。遺伝子結果の開示を研究対象者が要求する場合は、倫理的問題を考慮し遺伝子カウンセリングを施行し、結果の告知は臨床遺伝専門医(遺伝カウンセラー)により行う。

C. 研究結果

1. 既知の遺伝子変異の次世代高速シーケンサーを用いたスクリーニング

2012 年 12 月現在、既知の原因遺伝子に変異を認めず、テロメア長の短縮が確認された DKC 症例、不全型 DKC 症例 16 症例を集積した。

その中で表 1 に示す様に、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を同定することが出来た。

表 1 次世代高速シーケンサーによって同定された既知の遺伝子変異

Pt No.	Gene	Mutation type	Mutation
299	<i>TINF2</i>	nonsynonymous SNV	c.G845A;p.R282H
300	<i>TINF2</i>	frameshift insertion	c.824_825insA;p.T275fs
301	<i>DKC1</i>	nonsynonymous SNV	c.T1193C;p.L398P
303	<i>DKC1</i>	nonsynonymous SNV	c.C91A;p.Q31K
385	<i>TERT</i>	nonsynonymous SNV	c.C1895G;p.P632R

2. 次世代高速シーケンサーを用いた新規遺伝子変異の探索

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現在新規の遺伝子変異の探索を行っている。現時点では表2に示す様な新規遺伝子変異の候補が抽出されている。

表2 次世代高速シーケンサーによって抽出された新規遺伝子変異候補

Pt No.	Gene	Mutation type	Mutation
378	<i>RECQL4</i>	nonsynonymous SNV	c.G3313C:p.G1105R
379	<i>HSPBP1</i>	nonsynonymous SNV	c.C92G:p.S31C
379	<i>HSPBP1</i>	nonsynonymous SNV	c.T91G:p.S31A
380	<i>TP53BP1</i>	nonsynonymous SNV	c.C2591G:p.T864R
384	<i>ATM</i>	nonsynonymous SNV	c.G3778A:p.V1260M
384	<i>BLM</i>	nonsynonymous SNV	c.G3385C:p.G1129R
385	<i>RECQL4</i>	nonsynonymous SNV	c.G1405A:p.V469M
386	<i>BLM</i>	nonsynonymous SNV	c.G2148C:p.L716F
386	<i>TP53BP2</i>	nonsynonymous SNV	c.A1375G:p.K459E
390	<i>RECQL4</i>	nonsynonymous SNV	c.C1394T:p.T465M
391	<i>RECQL4</i>	nonsynonymous SNV	c.C215T:p.A72V

D. 考察

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た。DKCのように原因遺伝子が多く、変異も一塩基変異から大欠失変異や片アレル欠失まで多彩である疾患において、臨床遺伝子診断をする場合に、次世代高速シーケンサーによるターゲットシーケンスは有用であると考えられる。

新規遺伝子探索に関しては、現在探索中ではあるが、表2に示すように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。ロスモンド・トムソン症候群は常染色体劣性遺伝疾患であるので *RECQL4* のヘテロ変異が DKC の病態にどのように関与しているのかは不明である。また症例384の様に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。*ATM* と *BLM* は遺伝子修復に関与する遺伝子群であり、これら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は不明だが、次世代高速シーケンサーで網羅的遺伝子変異探索をすることによって、既知の常染色体劣性遺伝疾患のヘテロ遺伝子変異の組み合わせによる新たな病態が明らかになるのかもしれない。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

山口博樹、檀 和夫. 骨髄不全症候群におけるテロメア制御異常. 血液フロンティア. 2012; 22(6): 941-952.

2. 学会発表

山口博樹、檀 和夫. 先天性造血障害の病態解明の進歩. 第54回日本小児血液がん学会学術集会. 2012年12月. 横浜.

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
該当なし。
3. その他
なし。