

201324004A

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 黒川 峰夫

平成26（2014）年3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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 黒川 峰夫

平成26（2014）年3月

目次

I. 総括研究報告書

特発性造血障害に関する調査研究	黒川 峰夫	1
資料 1 班員構成および研究領域		40

II. 分担研究報告書

・日本人 MDS 患者における血中エリスロポエチン値の調査研究	小澤 敬也	41
・本邦固有のエクリズマブ不応 PNH 症例における病態解析	金倉 譲	46
・細胞傷害性 T 細胞はその標的細胞が非造血幹細胞であっても再生不良性貧血を引き起こし得る	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後方視的疫学研究	澤田 賢一	52
・本邦の原発性骨髄線維症の臨床像	赤司 浩一	55
・骨髄異形成症候群の改訂国際予後スコアリングシステムの検証	宮崎 泰司	57
・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	60
・骨髄異形成症候群に対する現状把握と移植成績向上に関する検討	岡本 真一郎	65
・造血障害を来す先天性疾患患者からの疾患特異的 iPS 細胞の樹立	中畑 龍俊	68
・末梢血遊離 DNA を用いた MDS 遺伝子変異解析及びクローン拡大の検出	富田 章裕	74
・再生不良性貧血の罹患率の推計—臨床調査個人票の解析—	太田 晶子	77

III. 研究協力者報告書

・骨髄異形成症候群に対する治療法の検討	直江知樹	83
・小児の骨髄異形成症候群 (MDS) の研究	真部 淳	86
・IgA/IgM 型クームス陰性 AIHA 頻度の推定	亀崎 豊実	89
・骨髄線維症の自覚症状調査		

	下田 和哉	91
・ G P I アンカー欠損症の解析		
	木下 タロウ	93
・ RUNX1 変異と BMI1 の協調作用による MDS 発症機序		
	原田 浩徳	96
・ 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	98
・ 小児再生不良性貧血、骨髄異形成症候群および先天性造血不全症候群に対する中央診断システム		
の確立	小島 勢二	102
・ JAK2 遺伝子変異の高感度検出法の開発		
	小松 則夫	105
・ 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)	南谷 泰仁	107
・ 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	109
・ 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	112
・ PNH 造血障害の分子病態の解明～NKG2D 免疫の意義の確立～		
	中熊 秀喜	115
・ 鉄芽球性貧血の発症機序と治療法に関する研究		
	張替 秀郎	117
・ 不応性貧血における細胞形態学的異形成の系統と血球減少の系統との関係についての検討		
	松田 晃	118
・ 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	121
・ 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	124
・ 再生不良性貧血患者の新規申請から 3 年目までの縦断的検討		
	島田 直樹	127
・ 先天性角化不全症の新規原因遺伝子変異の探索		
	猪口孝一	130
・ 特発性造血障害に対する造血幹細胞移植		
	豊嶋崇徳	134

IV. 班会議関係資料

平成 25 年度第 1 回班会議総会プログラム	137
平成 25 年度第 2 回班会議総会プログラム	144

V. 市民公開講座プログラム	153
VI. 研究成果の刊行に関する一覧表	155
VII. 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、骨髄異形成症候群（MDS）、骨髄線維症の4疾患を主な対象として、造血幹細胞移植領域、小児科領域、疫学領域という観点からのアプローチも加えつつ、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した。赤芽球癆について再発・難治症例の治療確立に向けた疫学研究を行い、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、不応例の解析、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た。

骨髄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。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と本邦症例での検討を行った。細胞形態学的異形成の系統と血球減少の関係や、MDS患者のエリスロポエチン値、輸血後鉄過剰症や未輸血患者の体内鉄動態などの調査を通じた病態研究を行った。低形成性MDSの疫学、チロシンキナーゼ阻害剤使用後染色体異常に関して全国調査を行った。さらに末梢血遊離DNAを用いた変異解析やNTBIおよびヘプシジンの測定系の確立など、診断技術の開発も促進した。さらに鉄芽球性貧血、輸血後鉄過剰症や未輸血患者の体内鉄動態、RUNX1変異とBMI1などの転写因子等の解析を通じて、病態の解明を進めた。脱メチル化剤、造血幹細胞移植の役割など治療の最適化の検討も進めた。

骨髄線維症の領域では、前方視的患者登録の継続、適切な治療法の選択や予後予測因子の検証、患者の自覚症状の調査を行った。2次性骨髄線維症についても調査を行った。その他、JAK2遺伝子変異の高感度検出法の開発も行った。

造血幹細胞移植の領域では、MDSにおいてplerixaforを併用した移植前処置の開発を進めた。さらに実際の移植の達成率を検討する調査の準備やMDSに対する骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植の検討を行った。

小児科領域では、造血障害を来す先天性疾患患者からのiPS細胞の樹立を通じた基礎的な検討と、先天性造血不全症候群に対する中央診断システムを通じた疫学的検討を通じた両面から病態の把握を行った。

3年間の当研究班での研究成果や海外からの最新の知見を盛り込み、特発性造血障害領域の「診療の参照ガイド」の改訂作業を行った。これはweb上に公開を行うことによって、広く医療の現場で利用できるようにした。また、研究成果を国民へ還元するために、市民公開講座を開催した。

研究分担者

小澤 敬也

自治医科大学 内科学講座血液学部門 教授

金倉 謙

大阪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

長崎大学原爆後障害医療研究所原爆・ヒバクシャ医療部門血液内科学 教授

高折 晃史

京都大学大学院医学研究科血液・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

富田 章裕

名古屋大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学 講師

太田 晶子

埼玉医科大学医学部公衆衛生学 専任講師

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いれて本領域の疫学・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。

1. 再生不良性貧血（再不貧）・赤芽球癆

①細胞傷害性T細胞はその標的細胞が非造血幹細胞であっても再生不良性貧血を引き起こし得る

再生不良性貧血 (aplastic anemia; AA) の約30%では、第6染色体短腕 HLA 領域の片親性二倍体 (uniparental disomy; UPD) (6pUPD) の結果 HLA ハプロタイプのヘテロ接合性消失 (loss of heterozygosity; LOH) を来した造血幹細胞 (hematopoietic stem cells; HSCs) が存在し、これに由来する片側 HLA アレル欠失血球 (HLA allele-lacking leukocytes; HLA-LLs) が検出される。この所見は、HSCs 上の特定の HLA クラス I 分子によって提示される自己抗原に特異的な細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T-lymphocytes; CTLs) が、AA の発症に関与していることを示している。ただし、実際の骨髄不全は CTL そのものではなく、CTL による免疫反応の結果産生されるサイトカインであることが示唆されている。この仮説が正しいとすれば、CTL の標的は必ずしも HSCs である必要はなく、一部の細胞にしか分化できない造血前駆細胞 (hematopoietic progenitor cells; HPCs) であっても良い可能性がある。この可能性を検証するため、各白血球系統別に HLA-LLs の有無を検討した。

②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後方視的疫学研究

特発性慢性赤芽球癆および基礎疾患の治療に反応しない慢性赤芽球癆に対する第一選択薬は免疫抑制薬であり、特に特発性赤芽球癆および胸腺腫関連赤芽球癆においてはシクロスポリンが推奨されること、特発性慢性赤芽球癆において免疫抑制薬の中止は貧血の再燃と関連することが、本研究班の全国調査研究により既に明らかにされているが、免疫抑制療法後の再発・難治例に対する標準的治療は未確立である。本研究の目的は、再発・難治性慢性赤芽球癆の予後を明らかにし、標準的マネジメント法を確立することである。

③再生不良性貧血の罹患率の推計—臨床調査個人票の解析—

患者数の把握とその疫学特性の把握は疾病対策の基本である。再生不良性貧血の頻度については、受給者数（患者数つまり有病数）は厚生労働統計の衛生行政報告例から得られるが、この資料からは罹患数（例えば1年間に新たに罹患する者の数）は把握できない。再生不良性貧血は、厚生労働省の特定疾患治療研究事業として医療受給対象疾患に指定されている。特定疾患治療研究事業において、臨床調査個人票（個人票）は全ての医療受給申請で提出され、これにより患者（医療受給者）の基本的臨床情報を得ることができる。厚生労働省の難病患者認定適正化事業において、個人票の内容は、都道府県（あるいは保健所）によって、WISH（厚生労働省行政情報総合システム）に導入されている特定疾患調査解析システムに電子入力され、オンラインで厚生労働省ヘデータが届く仕組みになっている。2003年度以

来、本格的に電子入力されるようになり、その利用が可能となっている。本研究では、電子入力された臨床調査個人票を利用し、再生不良性貧血の罹患率の推計を試みた。さらに、その罹患率推計の方法について評価・検討する。

④再生不良性貧血患者の新規申請から3年目までの縦断的検討

近年の補充療法を含めた治療技術の進歩により、再生不良性貧血患者の生命予後は改善しており、長期間にわたり特定疾患治療研究事業の対象となる患者が少なからず存在する。そこで本研究では、複数年度にわたる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。

⑤先天性角化不全症の新規原因遺伝子変異の探索

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生が認められる。遺伝型は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7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。本研究は原因遺伝子が同定されていない症例に関して、次世代シーケンサーを用いて全 exon シーケンスを行い、新規原因遺伝子変異を同定することを目標としている。

2. 溶血性貧血

①本邦固有のエクリズマブ不応PNH症例における病態解析

厚生労働科研「特発性造血障害に関する調査研究班」では、溶血性貧血である発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) は、長年対象疾患として取り扱われている。PNH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。本邦第2相臨床試験において2例の不応例を認めたが、これまで欧米例では確認されていない。この本邦特有のエクリズマブ不応性機序の解明を試みた。

②IgA/IgM型クームス陰性AIHA頻度の推定

クームス陰性AIHAを来す機序には、以下の3つのタイプが知られている。1) クームス試験感度以下の赤血球結合IgG自己抗体、2) IgMまたはIgA自己抗体、3) 低親和性自己抗体。1)のタイプが主であるとされているが、クームス陰性AIHA内での実際の割合は知られていない。今回、IgMまたはIgA自己抗体によるクームス陰性AIHA内での割合を明らかにすることを目的に、全国から精査依頼された溶血性貧血症例の解析を行った。

③GPIアンカー欠損症の解析

海外の共同研究者がPIGAに変異がないPNH症例の顆粒球由来のゲノムと顆粒球細胞由来のゲノムのexome解析を行ったところ両者にPIGTのスプライングアクセプター部位の1塩基の変異と顆粒球ゲノムのみPIGTを含む領域84kbの欠失を認めた。Germlineの変異について機能解析を行った。また我々は最近ドイツのグループとの共同研究により、高アルカリフォスファターゼ血症・精神発達遅滞・てんかん・指の奇形等を主症状とするMabry syndromeがPIGV、PIGO、PGAP2を原因とする先天性GPI欠損症であることを明らかにした。他のグループからも次世代シーケンサー等による解析により、PIGN、PIGL、PIGAを原因とする先天性GPI欠損症が報告されており、これらは共通症状として精神発達障害・てんかん・顔貌異常・種々の奇形を呈する。国内では周知されていないので、症例を集めて疾患概念の確立することを目的にスクリーニングを始めた。

④PNH造血障害の分子病態の解明～NKG2D免疫の意義の確立～

日本に比較的多い特発性造血障害は厚生労働省指定の血液難病の再生不良性貧血 (AA) に加えて、骨髄異形成症候群 (MDS) やPNHの患者でも共通に見られ

る。我々はPNH患者の造血障害の発生機序を追究しNKG2D免疫の関与を提唱している。本研究はこの免疫を誘発するNKG2Dリガンドの血球膜および血中における病的発現を解析して造血障害との関連を裏付け、早期診断や新しい治療法の開発につなげることを目的とする。

3. 骨髄異形成症候群(MDS)

①日本人 MDS 患者における血中エリスロポエチン値の調査研究

貧血は骨髄異形成症候群 (MDS) 患者に認められる主要な臨床所見であり、様々な臓器障害や生活の質 (QOL) の低下を引き起こす。わが国では、国際予後スコアリングシステム (IPSS) の低リスク (Low)、中間-1 リスク (Int-1) 患者の貧血治療として蛋白同化ホルモン、免疫抑制剤、ビタミン剤などが使用されているが、これらの多くは保険適用外であり、有効性のエビデンスも十分ではない。一方海外では、赤血球造血刺激因子製剤 (ESAs) が血清エリスロポエチン (EPO) 値 500 mU/mL 以下の低リスク MDS 貧血患者に対する第一選択薬として推奨されており、貧血の改善に寄与している。しかし、わが国において ESA は保険適用外であることもあり使用例はほとんど報告されておらず、ESA の適応となる MDS 患者の血液学的特徴など、日本人患者における情報は極めて少ない。そこで今回我々は、当科を受診した成人 MDS 患者を対象に血清 EPO 値を測定し、ESA の適応となる患者の臨床的特徴を明らかにするため、血清 EPO 値と関連する臨床検査値について検討を行った。なお、本来 ESA は低リスク症例に対して推奨されているものであるが、本研究では MDS 全病型を対象に検討を行った。

②骨髄異形成症候群の改訂国際予後スコアリングシステムの検証

不応性貧血を含む骨髄異形成症候群 (Myelodysplastic syndromes, MDS) は極めて多彩な病態を示す難治性造血器疾患であり、治療方針決定には病型診断に加えて予後予測システムが必要である。1997年に発表された IPSS はこれまで世界で広く用いられてきたが、その後の研究成果を組み込む形で 2012年に国際共同研究として改訂がなされた。10,000例以上の MDS が集積され、その中の 7012例を用いて新たな予後スコアリング (IPSS-R) が作製された。日本を代表して本班もその作業に参加し、IPSS-R 作製に関わったが、国内 MDS 症例に対する IPSS-R の有用性については検証が必要である。

③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

本研究は、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の作成を目的としている。

④末梢血遊離 DNA を用いた MDS 遺伝子変異解析及びクローン拡大の検出

MDS の発症や病勢進行に種々の遺伝子変異が関与していることが推測されている。本研究においては、

MDS における経時的な遺伝子変異解析において PB-cfDNA が骨髄検査の代替となるかどうかを確認することを目的とする。本年度においては、MDS における PB-cfDNA の性状と臨床検査値などの相関を確認し、PB-cfDNA の基礎データを集積する。

⑤骨髄異形成症候群に対する治療法の検討

骨髄異形成症候群 (MDS) は、クローン性造血幹細胞疾患であり、造血不全を主体とするものから、芽球の増加を伴い白血病に移行する症例まで多様な病態を示す。その標準的治療法は確立しておらず、年齢などを考慮した症例毎の対応がとられている。近年、メチル化酵素阻害薬であるアザシチジンが使用可能となり、骨髄異形成症候群の予後の改善を示す臨床試験結果が報告されている。また、若年症例に対しては造血幹細胞移植も適応となる。このように治療法の選択肢が増えた医療状況における骨髄異形成症候群の予後、治療法の解析を行うことにより、今後の治療戦略開発の基礎的データを得ることを目的とする。

⑥RUNX1 変異と BMI1 の協調作用による MDS 発症機序
難治性造血障害である骨髄異形成症候群 (MDS) では RUNX1 変異が高頻度で、発症機序の中心的な役割を担っている。また、RUNX1 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) の責任遺伝子であることが知られている。われわれのこれまでの検討から、RUNX1 変異体は造血幹細胞の分化阻害作用を有するが増殖能を持たないため、単独では発症に至らないことが明らかになった。また片アレルの RUNX1 変異だけでは MDS/AML を発症しないことは、FPD/AML 家系からも明らかである。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。

⑦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

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。

⑧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

特発性造血障害の原因解明の一端として、悪性リンパ腫における造血異常に着目した。一部の悪性リンパ腫患者では、形態学的に腫瘍細胞浸潤のない骨髄において、腫瘍組織で見いだされる遺伝子変異と同一の変異が見いだされる。この場合、骨髄ではクローン性造血が行われており、これが悪性リンパ腫発生源地になっていると推察される。

⑨鉄芽球性貧血の発症機序と治療法に関する研究
鉄芽球性貧血の発症機序を明らかにし、新たな治療法を開発する。

⑩不応性貧血における細胞形態学的異形成の系統と

血球減少の系統との関係についての検討

骨髄異形成症候群 (MDS) の WHO 分類ブルーブックの Refractory cytopenia with unilineage dysplasia の章には、「多くの場合、“赤芽球の異形成と貧血”といった様に形態異常を示す系統と血球減少の系統とが一致する」と記載されている。しかし、5q-症候群では巨核球に明瞭な形態異常があるが、血小板数の低下は通常はない。最近、異形成を認める系統と血球減少の系統に明瞭な関係はないと報告された。しかし、その報告では芽球増多例も含まれているため、異形成と血球減少の関係を検討するには適していない。そこで、5q-症候群を除く FAB 分類の Refractory anemia (FAB-RA) に限定して血球形態異常と血球減少との関係を検討した。

⑪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

本研究は、骨髄異形成症候群 (MDS) を根絶するための重要な標的と考えられる MDS 幹細胞を同定し、その特性を解析することを目的とする。昨年度までに、MDS 幹細胞における single cell レベルでの網羅的遺伝子発現を解析しうる系を確立した。本年度は、本法を用いて生体内に存在する未分化な MDS 細胞の同定を目指し、幹細胞維持に重要な Bmi1 と既知の急性骨髄性白血病 (AML) の予後不良因子群の発現との相関について、AML および進行期 MDS 細胞を用いて解析を行った。

⑫低形成性骨髄異形成症候群に関する全国調査

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と期待される。

⑬低リスク MDS に対する低形成性骨髄異形成症候群に関する全国調査

低リスク MDS に対する治療は、造血不全による患者の生活の質の低下が問題となる。本研究では、血球減少をきたした低リスク MDS を対象として、6 コースのアザシチジン治療の有効性を前向き試験で検討する。また、血球回復が得られた患者を対象として、アザシチジンの維持療法の有効性を無作為化比較試験にて検討を行うものである。

4. 骨髄線維症

①本邦の原発性骨髄線維症の臨床像

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。

②骨髄線維症の自覚症状調査

骨髄線維症の病初期から、体重減少、発熱、夜間盗汗などの全身症状がみられる。本邦の骨髄線維症患者の自覚症状を呈する割合は海外からの報告に較べ少ないが、その原因は不明である。海外で行われた調査と同様な方法を用い、本邦の骨髄線維症に伴う自覚症状の評価法、およびその頻度を明らかにし、治療による症状改善のための資とする。

③JAK2 遺伝子変異の高感度検出法の開発

真性赤血球増加症 (PV) を含む骨髄増殖性腫瘍 (myeloproliferative neoplasm: MPN) において JAK2 チロシンキナーゼ遺伝子の点突然変異 (JAK2V617F) が報告された。JAK2V617F 変異の存在証明は WHO の 2008 年 MPN 診断基準にも盛り込まれており、MPN の診断確定に必須である。これまでに様々な JAK2V617F 検出技術が確立されてきたが、いずれも擬陽性の問題があり、対象が真に JAK2V617F 変異陽性であるか否か確実に判定することは困難であった。そこで本研究では、JAK2V617F 変異を高感度に、かつ、擬陽性なく検出できる技術の確立を試みた。

5. 造血細胞移植

①骨髄異形成症候群に対する現状把握と移植成績向上に関する検討

本研究では MDS 細胞の骨髄 niche との interaction を阻害する plerixafor を併用した前処置の安全性と、MDS 細胞の動員効果について検討をおこなった。また、高齢者 MDS に対する移植においては、血縁同胞も高齢となり、骨髄バンクや臍帯血バンクの造血幹細胞ドナーや保存臍帯血ユニットに依存することが多い。最近の法制化によって造血幹細胞供給事業の効率化が図られているが、その実態は明らかにされていない。そこで、今後の供給システムの更なる改善の指標とするために、現状における、MDS に対する移植の達成率を前向きに検討することとした。

②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

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。

③特発性造血障害に対する造血幹細胞移植

移植前の鉄過剰症が、同種造血幹細胞移植後の予後や合併症 (SOS、感染症など) に与える影響についてさまざまな報告があるが、一定の結論は得られていない。本研究では、同種造血幹細胞移植を施行された血液悪性腫瘍患者において、移植前の血清フェリチン値が、予後に与える影響について検討した。

6. 小児科領域

①造血障害を来す先天性疾患患者からの疾患特異的 iPS 細胞の樹立

小児期の骨髄不全の多くは先天要因を有する先天性骨髄不全 (inherited bone marrow failure: iBMF) である。ほとんどの疾患で遺伝子異常は明らかになってきたが、その病態の多くは解っていない。一方、

患者由来の細胞を用いた iPS 細胞は、様々な組織に分化でき、iPS 細胞からの目的とする細胞への分化過程を詳細に解析できることから、造血障害を来す疾患（特に先天性の造血障害）の病態解析に極めて有用だと考えられる。本研究では、造血障害をきたす様々な疾患の患者さんから iPS 細胞の樹立を試みる。iPS 細胞化が困難な造血障害患者から iPS 細胞を樹立する方法を確立する。樹立した iPS 細胞を用いて、造血障害の病態を解析し、新規治療法の開発を目指す。

②小児の骨髄異形成症候群 (MDS) の研究

小児の 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。2009 年に開始された小児血液・がん学会の再生不良性貧血・MDS 委員会による中央診断を用いた前方視的登録により、800 例を超える小児例が把握された。小児の MDS の大きな特徴として、先天性疾患あるいは家族性疾患が多いことがあげられるが、新たなカテゴリーに属する疾患も明らかになってきた。本研究では基礎研究のさらなる推進と治療方法の確立をめざす。本年度は遺伝性骨髄不全症候群が疑われる症例における血液学・形態学的特徴について検討を行った。

③小児再生不良性貧血、骨髄異形成症候群および先天性造血不全症候群に対する中央診断システムの確立

小児 AA、MDS および CBFS は比較的まれな疾患であり、その診断は必ずしも容易ではない。そこで日本小児血液・がん学会において AA、MDS および CBFS を対象とした中央診断を行うことになった。

④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

骨髄不全症候群には様々な病因と病態を呈する疾患が混在するが、薬物療法が無効で輸血依存な場合の治療法として造血細胞移植が選択される。近年、造血細胞移植後の生存率は改善しているが、ドナー細胞の生着を得ながら骨髄不全が再燃する症例が散見され、大きな問題となっている。この骨髄不全のリスク因子を同定し、造血細胞移植の標準的前処置の確立を目指す。

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。全国的主要病院、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。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細胞傷害性 T 細胞はその標的細胞が非造血幹細胞であっても再生不良性貧血を引き起こし得る

AA 患者 175 例の HLA-A アレルを決定し、HLA-A 座がヘテロ接合体と判明した患者の末梢血白血球における HLA-A アレル発現を、HLA-A2、A11、A24、A26、A31 に対する特異的モノクローナル抗体を用いた FCM 法により評価した。

②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後方視的疫学研究

2004 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、大顆粒リンパ球性白血病関連 14 例を調査対象とし、前回の調査で死亡していること、あるいはエンドフォローアップとなっている症例を除く 109 例にアンケート調査を行った。本研究は現存する診療録の調査のみからなる後方視的コホート研究であるため、個別の同意取得は行っていない。

③再生不良性貧血の罹患率の推計—臨床調査個人票の解析—

資料として、2013 年 7 月現在電子入力済みの、2004 年度から 2012 年度までの再生不良性貧血の個人票を利用した。個人票は厚生労働省に文書で利用申請し、使用許可を得た。同じ年度に新規、更新両方が入力されていた例については、新規のみ採用した。その他、同一症例が重複して入力されていた場合は 1 件のみを採用して解析した。個人票は必ずしもすべてが電子入力されているのではなく、その割合、入力率を確認することが必要である。そのための分母、受給者の全数を厚生労働統計である保健・衛生行政業務報告 (衛生行政報告例) 1)、2) から得た。入力率は電子入力された個人票件数 / 公表された受給者数として求めた。

罹患率の推計方法：個人票の発病年の情報を用い、2004～2012 年度の各登録年について発病 (罹患) 年別新規受給者数を求め、これを登録年の入力率で割り戻した値を (その登録年に登録された) 発病年別罹患数とした。発病 (罹患) 年別新規受給者数を 2004～2012 年度の全ての登録年度について合計したものをその年の罹患者数とした。式にすると次の通りである。

$$A_i = \sum_{j=i-1}^{2012} N_{ij} / P_j$$

i: 発病年 (i=2004, 2005, …, 2012)

j: 新規登録年度 (j=2004, 2005, …, 2012)

i ≤ j

A_i: i 年の「再生不良性貧血」罹患者数

N_{ij}: j 年に登録された i 年が発病年の「再生不良性貧血」患者数

P_j: j 年の「再生不良性貧血」の入力率

なお、罹患率の分母として、2005 年と 2010 年は国勢調査人口の、その他の年は推計人口の総人口 (10 月 1 日現在) を用いた。

④再生不良性貧血患者の新規申請から 3 年目までの縦断的検討

2003 年から 2012 年までの再生不良性貧血の臨床調査個人票の入力状況、当該年度の医療受給者証所持者数および入力率、登録者証所持者数を示す。入力率、対象者数を考慮して、①2008 年に新規申請して 2009 年、2010 年に更新申請した者、②2009 年に新規申請して 2010 年、2011 年に更新申請した者、③2010 年に新規申請して 2011 年、2012 年に更新申請した者、を解析対象とした。新規申請から 3 年目までの臨床像、治療状況などの推移を縦断的に検討した。

⑤先天性角化不全症の新規原因遺伝子変異の探索
研究対象は、原因遺伝子が同定されていない特徴的
身体的所見を伴う Hoyerall-Hreidarsson
syndrome (HHS) 症例、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。これらの症例に対して DKC1、TERC、TERT、
NOP10、NHP2、TINF2、TCAB1 といった既知の遺伝子
変異のスクリーニングを日本医科大学生命科学セン
ターの ABI Ion PGM[™] シークエンサーもしくは、従
来の direct sequence 法にて遺伝子解析を行う。
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対して、東京
大学医学部附属病院・キャンサーボードの次世代シ
ークエンサー Illumina 社 GAI, GAIx, HiSeq2000
を用いて全 exon シークエンスを行う。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。

2. 溶血性貧血

①本邦固有のエクリズマブ不応 PNH 症例における病
態解析

不応例のメカニズムを明らかにするため、不応例(コ
ントロールとして反応例および健康人)より血液を
採取して解析を行った。

②IgA/IgM 型クームス陰性 AIHA 頻度の推定

当研究室へ 2009 年～2011 年の 3 年間に全国から精
査依頼のあった 281 例(クームス陽性 13 例、クーム
ス陰性 268 例)中例を対象とした。全症例について、
特異的クームス試験(IgG, IgA, IgM, C3b3d)と赤血球
結合 IgG 定量を行った。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おこな
った。

③GPI アンカー欠損症の解析

PNH 症例については、PIGT 欠損 CHO 細胞に exon10
を抜いた PIGT 発現ベクターを導入して GPI アンカー
型タンパク質の発現を解析した。また日本国内にお
いて精神発達障害・てんかんを主症状とし、高アル
カリフォスファターゼ血症や手指の異常、奇形、顔
貌異常などを呈する 16 名の患者を選び、スクリー
ニングを行った。患者の末梢血よりゲノムを抽出し検
体とした。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 PCR でフラグメントライブラリー
を作って次世代シークエンサー (Ion PGM) で変異を
解析した。見出した変異を持つ遺伝子に関しては遺
伝子欠損の CHO 細胞を使って機能解析を行った。ま
た末梢血のフローサイトメトリーにより、GPI アン
カー型蛋白質の発現を解析した。

④PNH 造血障害の分子病態の解明～NKG2D 免疫の意
義の確立～

PNH と AA と MDS など特発性造血障害を呈する骨髄不
全症候群 (BFS) 患者の随時採血による血球膜および
血中の NKG2D リガンド (特に MICA) の発現を、それ
ぞれフローサイトメトリーと ELISA で測定するとと
もに、遊離リガンドによるリンパ球膜 NKG2D 受容体
発現への影響を in vitro で調べた。

3. 骨髄異形成症候群(MDS)

①日本人 MDS 患者における血中エリスロポエチン値
の調査研究

2011 年 5 月から 2013 年 9 月までの期間に自治医科
大学附属病院血液科で WHO あるいは FAB 分類に
て MDS と診断された成人患者を対象にインフォ
ムドコンセントを取得し、血清 EPO 値を測定した
(自治医科大学倫理委員会承認 臨 A12-118)。
そして、EPO 値と血液学的検査値 (ヘモグロビン
[Hb]、ヘマトクリット [Ht]、網赤血球数、白血球
数、血小板数)、および輸血依存の有無との相関に
ついて検討を行った。EPO 値と血液学的検査値の相
関については Spearman 順位相関係数検定によ
って検討を行い、回帰直線は単回帰分析によって決定
した。また、輸血依存の有無による EPO 値の差に
ついては、Welch's t 検定によって検討を行った。

②骨髄異形成症候群の改訂国際予後スコアリングシ
ステムの検証

国内データとして埼玉医科大学データベース、特発
性造血障害調査研究班データ、長崎大学データベ
ースから合計 523 例のデータが提出された。これらの
データを用いて IPSS-R によるスコアリングと予後
層別化を実施し、国内 MDS 症例に対する IPSS-R の
有用性を検討した。また、長崎データベースでは免
疫抑制療法を実施した低リスク MDS 症例に関しても
IPSS-R での層別化を検討した。

③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

本研究参加施設において新規に診断された再不貧、
MDS、ならびに診断困難な血球減少症患者を前方視
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う。

④末梢血遊離 DNA を用いた MDS 遺伝子変異解析及び
クローン拡大の検出

当院で診断され文書による同意が得られた MDS 症例
27 例 (AML へ進行した 7 例を含む)より骨髄細胞、
血漿、血清、末梢血単核球を採取し、それぞれから
全 DNA を採取した。血漿、血清から得られた cfDNA
をアガロースゲル電気泳動にて解析し、断片化した
DNA のサイズ及び濃度について、ゲル解析ソフトを
用いて解析した。また、同様の検体について、
Agilent Bioanalyzer を用いて定量解析を行った。
定量結果と、該当する MDS 患者の病型、国際予後ス
コア、臨床検査値などの相関の有無について、統
計学的に解析をした。また、TET2, SRSF2 変異を同
時に保有する 2 症例から、経時的に PB-cfDNA を採
取し、病勢進行とともに、それぞれの変異存在割合
が変化するかどうかについて、半定量解析を行った。

⑤骨髄異形成症候群に対する治療法の検討

名古屋大学病院にて 2003 年 1 月～2012 年 12 月に診
断された骨髄異形成症候群症例を対象とした患者
カルテより診療情報を取得することにより治療法、
予後の解析を行った。

⑥RUNX1 変異と BMI1 の協調作用による MDS 発症機序
患者 CD34+細胞を用い、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。

⑦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

【NTBI 測定】生体試料に対して不活性な流路を採用することで生体分子の変性を抑制し、高い回収とゼロキャリアオーバー・クロマトグラフィーを可能とした高感度 HPLC 分析システム ACQUITY UPLC H-Class Bio システム (Waters) を用いて測定を行った。

対象基準値としての健常人血清 NTBI 値はすでに報告済みであり、その平均値は、男性: $0.206 \pm 0.091 \mu\text{M}$ (n=20)、女性: $0.212 \pm 0.095 \mu\text{M}$ (n=16) である。

【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) の同時定量を行った。対象基準値としての健常人血清ヘプシジン値はすでに報告済みであり、hepc-20: 男性 $3.767 \pm 2.565 \text{ ng/ml}$ (n=21)、女性 $1.387 \pm 1.882 \text{ ng/ml}$ (n=19)、hepc-22: 男性 $1.212 \pm 0.574 \text{ ng/ml}$ 、女性 $0.702 \pm 0.519 \text{ ng/ml}$ 、hepc-25: 男性 $16.240 \pm 12.940 \text{ ng/ml}$ 、女性 $8.159 \pm 13.830 \text{ ng/ml}$ である。

【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済みである。当施設に送られてきた試料は施設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。

⑧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

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。合併例ありと回答した 39 施設に調査表を送付し、二次調査を行った。

⑨鉄芽球性貧血の発症機序と治療法に関する研究 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る。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、遺伝子解析を行う。

⑩不応性貧血における細胞形態学的異形成の系統と血球減少の系統との関係についての検討

日独共同研究で作成され、固定化された既報の data set (Leukemia 2007) を用いた。未治療原発性 FAB-RA から、WHO 分類の 5q-症候群例、異形成評価が不能であった fibrosis 例を除外した 100 例を対象とした。異形成の評価は、WHO 分類第 3 版を用いて行った。巨核球数 25 個、赤芽球 200 個、好中球 200 個

を鏡し、10%以上を異形成ありとした。dys Mgc は 40%の閾値でも評価した。各血球減少の定義は IPSS の定義である $\text{Hb} < 10\text{g/dL}$ 、 $\text{ANC} < 1,800/\mu\text{L}$ 、 $\text{Plt} < 10 \text{ 万}/\mu\text{L}$ とした。血球形態異常と各血球数などの情報を data set より抽出し検討した。

⑪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

1) 患者サンプル

(倫理面への配慮)

本研究で用いる患者細胞については、当科において、サンプル採取前に患者もしくはその家族に本プロジェクトについての説明を行い、口頭、文書の両方で同意を得た後に分離、保存したものをを用いた。

2) 腫瘍幹細胞分画における single cell レベルでの網羅的遺伝子発現解析

AML 患者 2 例 (case1: M1, case2: M2)、MDS 患者 1 例 (case3: MDS overt AML) のヘパリン加骨髄液 1ml よりフィコール重層法にて約 1×10^7 個の単核球を得たのち、FACS Aria にて CD34+CD38-細胞 (腫瘍幹細胞, CSC 分画) を sorting した。個々の細胞から RNA を抽出、cDNA 合成を行い、single cell レベルでの遺伝子発現を定量的 PCR により解析した。

⑫低形成性骨髄異形成症候群に関する全国調査

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した。これまでの治療法の種類や、年齢・性別などは問わず、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、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であった。新たな検体収集や測定は行わなかった。hMDS と non-hMDS の患者背景を比較し、生存分析、比例ハザード解析、競合リスク解析により、生存率、死亡・白血病化の cumulative incidenceなどを調べた。

⑬低リスク MDS に対する低形成性骨髄異形成症候群に関する全国調査

プロトコール作成委員会で試験デザインを検討し、臨床試験の IRB 審査およびヒトゲノム倫理審査を通じた。

4. 骨髄線維症

①本邦の原発性骨髄線維症の臨床像

日本血液学会認定施設を対象に、原発性骨髄線維症と新規診断した症例をアンケート調査により集積した。1999 年以降の診断例に関し、予後調査を行った。臨床情報、予後をもとに、原発性骨髄線維症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骨髄線維症の自覚症状調査

欧米において骨髄増殖性腫瘍患者の自覚症状調査に用いられている Myeloproliferative Neoplasm Symptom Assessment Form (MPN-SAF) を用い、骨髄線維症患者 37 名に、27 項目の自覚症状の有無を質問票

により調査した。

③JAK2 遺伝子変異の高感度検出法の開発

JAK2 野生型遺伝子と JAK2V617F 遺伝子に共通のプライマーセットを用いて、サンプル中の両アレルを競合的に増幅させた。増幅後、37°C、2 時間 BsaXI 処理した。処理後のサンプルを nested PCR により増幅させ、さらに BsaXI 処理した。処理後のサンプルを融解曲線解析のための反応液へ供試し、PCR による増幅と増幅後の融解曲線解析により、サンプル中の JAK2V617F の有無を確認した。反応液には、人工核酸プローブと蛍光プローブが添加されており、人工核酸プローブにより JAK2 野生型遺伝子の増幅は抑制され、蛍光プローブにより JAK2V617F 由来の産物の有無を確認できる。

5.造血細胞移植

①骨髄異形成症候群に対する現状把握と移植成績向上に関する検討

基本的には、全身放射線照射(12Gy)、キロサイド大量(24g/m²)に G-CSF 持続静注を併用する前処置に、Plerixafor を段階的に追加投与することとした。Plerixafor の移植前処置における併用薬としての安全性は確立していないため、投与量は以下の Level を設定した。Level 0=0.12mg/kgx2 Level 1=0.18mg/kgx2 Level 2=0.24mg/kgx2 Level 3=0.24mg/kgx3。コホート 1 は Level 1 から開始し、3 例評価する。別途定義する dose limiting toxicity (DLT) がなければ、Level 2 に増量し 3 例評価する。DLT がなければ Level 3 まで増量して 3 例まで評価する。DLT がなければ、さらに最大 3 例まで登録する(extended cohort: Level 3 で最大 6 例)。Level 3 以上の増量は行わないこととした。DLT の定義は移植後 28 日までの電解質異常を除く Grade 4 の非血液毒性(NCI-CTCAE v4)とあらゆる原因による死亡とする。造血幹細胞移植後には高頻度に一過性の肝機能異常がみられるため、肝機能異常については、Grade 4 となった後、2 週間以内に Grade 1 に戻った場合は、DLT としないこととした。

また、Plerixafor による腫瘍細胞の末梢血への動員に関する検討として、本試験への参加が決定した時点で評価可能な腫瘍細胞がある場合には flow cytometry を用いて腫瘍細胞の CXCR4 の発現を評価することとした。本研究は慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を得て開始した。

②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

2000 年 11 月から 2013 年 6 月末までに 43 名に対して RIST を行った。これまでの報告と同じく、拒絶に対する救済療法としての 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 38 名、女性 5 名であった。病型(FAB 分類)は RA 8 例、RARS 2 例、CMML 5 例、RAEB 22 例(RAEB-1: 8 例、RAEB-2: 14 例)、Overt leukemia 6 例であった。幹細胞ソースは血縁末梢血 16 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。今回、非血縁末梢血幹細胞の 1 例が加わった。移植時病期は寛解 13

例、治療抵抗性 15 例で、無治療で移植となったものが 15 例であった。移植前治療として①fludarabine (25 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。

③特発性造血障害に対する造血幹細胞移植

2007 年 1 月～2012 年 7 月まで、北海道大学病院血液内科において、初回の同種造血幹細胞移植を施行された 159 名の血液悪性腫瘍患者のうち、移植前に血清フェリチン値を測定した 136 名について後方視的に検討した。

6. 小児科領域

①造血障害を来す先天性疾患患者からの疾患特異的 iPS 細胞の樹立

各種先天性造血障害を持つ患者の皮膚を生検により採取し、培養にて線維芽細胞のストックを作成した。iPS 細胞の樹立は、近年開発された手法である 6 因子(Oct3/4, Klf4, L-Myc, Sox2, LIN28, shp53)をエピソームベクターで導入する方法でおこなった。血液細胞への分化は、以前に我々の研究室で開発された方法を改良したものを使用した。具体的には、hemato-angiogenic progenitor cells を従来の方法で誘導し、この細胞を CD34 マーカーでソート後、OP9 フィーダー細胞上、サイトカイン含有培地で培養することで血液細胞へと分化させた。

②小児の骨髄異形成症候群(MDS)の研究

小児血液・がん学会が 2009 年から行ってきた小児 MDS・再生不良性貧血の中央診断に登録された 882 例のうち、遺伝子検査、染色体断裂試験、テロメア長測定、臨床所見などから遺伝性骨髄不全症候群と診断された小児 51 例について検討を行った

③小児再生不良性貧血、骨髄異形成症候群および先天性造血不全症候群に対する中央診断システムの確立

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

④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

東海大学小児科・細胞移植科において 1998 年 12 月より 2012 年 3 月までに同種造血細胞移植を施行した 36 例を対象に、移植前の骨髄有核細胞数、前処置による骨髄抑制がどれだけ強く得られたかの指標として移植日当日の末梢血白血球数を調べ、移植後の骨髄不全、拒絶、免疫性血小板減少症合併との関連を検討した。

(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。

他にも、研究活動の公開性に配慮し、研究成果発表の場である班会議総会については、班研究者以外に関心をもつ他の研究者などにも広く通知するほか、患者支援団体への案内も行う。

C. 研究結果

1. 再生不良性貧血(再不貧)・赤芽球癆

①細胞傷害性 T 細胞はその標的細胞が非造血幹細胞であっても再生不良性貧血を引き起こし得る

HLA-A 座が上記アレルのいずれかによるヘテロ接合体であるため、解析が可能であった症例は 120 例(68.6%)であった。このうち HLA-LLs は 32 例(26.7%)で検出され、顆粒球(granulocytes; G)・単球(monocytes; M)・B 細胞(B-cells; B)・T 細胞(T-cells; T)の全系統で検出されたのは 7 例(HLA-LGs の割合; 中央値 54.2%(11.5-99.4%))、GMB は 11 例(HLA-LGs の割合; 中央値 88.4%(0.8-99.0%))、GM が 10 例(HLA-LGs の割合; 中央値 12.1%(3.9-92.0%))、MBT が 2 例(HLA-LMs の割合; 中央値 38.7%(20.9-56.5%))、B のみが 2 例(HLA-LBs の割合; 中央値 55.4%(%))であった。

②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後方視的疫学研究

アンケート回答率は 72%であった。観察期間中央値は 87.6 ヶ月である。生存期間中央値は特発性は未だ 50%に達せず、胸腺腫関連赤芽球癆は 142 ヶ月、大顆粒リンパ球性白血病は 148 ヶ月であった。単変量解析により死亡リスク因子として寛解導入療法に対する奏効が抽出され($p < 0.001$)、病因は有意差を認めなかった。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。免疫抑制療法有効例における死亡リスクとして貧血の再燃が抽出された

($p < 0.001$)。死亡は 22 例に観察され、死因は感染症 7 例、臓器不全 7 例、胸腺腫の進行 2 例、悪性腫瘍 2 例、糖尿病 1 例、脳血管障害 1 例、不明 2 例であった。

再発例に対する再寛解導入療法の効果について検討したところ、特発性赤芽球癆の再発に対するシクロスポリンの有効例は 10/12 (83%)、副腎皮質ステロイド 4/8 (50%)、シクロホスファミド 1/2 (50%)、ATG1/1 (100%)、蛋白同化ステロイド 1/1 (100%)であった。胸腺腫関連赤芽球癆の再発に対するシクロスポリンの奏効率は 5/10 (50%)であった。大顆粒リンパ球性白血病関連赤芽球癆の再発に対するシクロホスファミドの奏効率は 3/4 (75%)、シクロスポリン 1/1 (100%)であった。

鉄キレート療法は 7 例において施行されていたが、81 例については不明であり、鉄キレート療法の役割について明らかにすることはできなかった。

③再生不良性貧血の罹患率の推計—臨床調査個人票の解析—

1) 再生不良性貧血の個人票入力率

2004 年度から 2012 年度の再生不良性貧血個人票の入力件数、入力率(2013 年 7 月現在)を表 1 に示した。2004~2012 年度の各年の再生不良性貧血全受給者数は約 9,000~10,000、各年度の個人票電子入力件数は、約 4,500~8,400 となっている。各年度の入力率は約 50%~88%であり、2009 年度は 88%と最も高かった。都道府県別入力率の格差は大きく、ほぼ 100%の入力をしている県もあれば全く入力していない県もある。また同じ都道府県でも年によって、入力したりしなかったりする。全体の入力率が最も高かった 2009 年度データでは、入力率が 95%以上の県数は 32、10%未満の県数は 2 であった。

2) 再生不良性貧血の罹患率の推計

表 2 に各新規登録年度について、発病(罹患)年別新規受給者数を示した。発病(罹患)年別新規受給者数を、2004 年度~2012 年度の全ての登録年について合計し各年の罹患患者数を得た。ただし、ここで、各登録年度の発病(罹患)年別新規受給者数は、各登録年度の入力率で割り戻したものとしている。2004~2012 年の 9 年間の罹患数は 9,455、年間罹患数約 900~1,200 と推計された。同期間の罹患率は、8.2 (/100 万人年)と推計された。

表 3 に 2004~2012 年における性別罹患率を示した。罹患率は男 7.6 (/100 万人年)、女 8.8 (/100 万人年)、罹患率性比(女/男)は 1.16 であった。

2004~2012 年における年齢別、性別罹患率をみると、罹患率は、10~20 歳代と 70~80 歳代でピークが認められ、高齢のピークの方が高かった。

④再生不良性貧血患者の新規申請から 3 年目までの縦断的検討

解析対象者は①380 名、②436 名、③290 名の合計 1,106 名であった。①②③の 3 群で性別、年齢、発病年齢に有意差を認めなかったことから、ここからは 3 群をまとめて検討した。

性別は男性 478 名(43.2%)、女性 628 名(56.8%)であった。年齢は 54.6 ± 23.1 歳(0~95 歳)、発病年齢は 53.6 ± 23.5 歳(0~95 歳)であり、いずれも 50

歳代後半から増加して 70 歳代前半が最も多かった。全体の 85%が発病から 1 年以内に新規申請していた。

重症度の推移：新規、2 年目、3 年目と改善しており、新規では Stage4 が最も多かったのに対して、3 年目は半数以上が Stage1 になっていた。Stage1 および 2（軽症～中等症）の割合は新規 36.8%、2 年目 62.2%、3 年目 70.3%であった。

自他覚症状の推移：貧血症状、出血症状、発熱ともに新規、2 年目、3 年目と減少しており、3 年目は新規に比較して貧血症状 63.0%、出血症状 51.9%、発熱 77.2%となっていた。

治療状況の推移：「無治療で経過観察」は 2 年目に大きく減少したが、3 年目は少し増加した。「アンドロゲン療法」「免疫抑制療法」「サイトカイン療法」は 2 年目に増加したが 3 年目に減少した。特に「サイトカイン療法」は 3 年目に新規よりも減少した。新規、2 年目、3 年目と「造血細胞移植療法」が少しずつ増加した一方で、「成分輸血」は減少して、特に 2 年目から 3 年目にかけて大きく減少した。

⑤先天性角化不全症の新規原因遺伝子変異の探索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 1 に示す新規遺伝子変異の候補が抽出されている。

1. DNA ヘリカーゼ遺伝子群の変異

DNA ヘリカーゼ遺伝子である WRN 変異を 1 症例に、RECQL4 変異を 3 症例に、PIF1 変異を 2 症例に、BLM 変異を 2 症例に、RTEL1 変異を 3 症例に認めた。RTEL1 変異の 2 症例(症例 14、15)は、母に RTEL1 102+1G>A のヘテロ変異が認められ、症例においては 102+1G>A と F709L の両アレルに変異があると考えた。その他の変異はすべてヘテロ変異であった。しかし症例 6 に関してはヘテロの BLM 変異と PIF1 変異を、症例 11 に関してはヘテロの WRN 変異と RECQL4 変異を認めている。

2. テロメラーゼ複合体遺伝子群の変異

テロメラーゼ複合体遺伝子群のひとつである TEP1 変異を 2 症例に認めた。1 症例は nonsense mutation で 1 症例は frameshift mutation であった。

3. Shelterin 複合体遺伝子群の変異

Shelterin 複合体遺伝子群のひとつである ACD(TPP1)に変異を認めた。変異部位は Shelterin 複合体を形成し DKC の原因遺伝子変異を認める TINP2 との結合ドメインであった。

4. その他

毛細血管拡張性運動失調症の原因遺伝子で DNA 損傷修復反応の重要な機能を有する ATM のヘテロ変異を 1 症例に、顔面の奇形、免疫不全、網状皮斑、低身長を症候とする F1LS syndrome の原因遺伝子として同定された DNA ポリメラーゼの機能をもつ POLE のヘテロ変異を 1 症例に認めた。

2. 溶血性貧血

①本邦固有のエクリズマブ不応 PNH 症例における病態解析

エクリズマブ不応 2 例における PK/PD を解析した。エクリズマブの有効血中濃度は 35 $\mu\text{g/ml}$ 以上とされているが、エクリズマブ不応 2 例も有効例と同様に、投与開始直後より十分な有効血中濃度を保っていた。採取した血清を用いて溶血試験を行ったところ、有効例ではエクリズマブ投与開始直後より溶血活性がほぼ 100%抑制されたのに対して、不応 2 例では溶血活性が全く抑制されていなかった。さらに詳細に解析するために、エクリズマブ投与前血清を用いて溶血試験を行った。様々な濃度のエクリズマブ存在下で溶血試験を行ったところ、健常人および有効例では 12.5 $\mu\text{g/ml}$ で溶血活性がほぼ 100%抑制されたのに対して、不応 2 例では 2000 $\mu\text{g/ml}$ まで濃度を上げてもほとんど溶血活性が抑制されなかった。しかし、エクリズマブとはエピトープの異なる抗 C5 抗体 N19-8 の存在下で溶血試験を行ったところ、不応 2 例も健常人や有効例と同様、50 $\mu\text{g/ml}$ で溶血活性がほぼ 100%抑制された。

C5 遺伝子の変異を検索するため、エクリズマブ不応 2 例の C5 遺伝子の全エクソンをシーケンシングした。その結果、エクソン 21 上にヘテロの変異 c. 2654G>A を認めた。この変異は、アミノ酸配列において 885 番目のアルギニンがヒスチジンに変化することを意味した。エクリズマブ有効 7 例では、同変異を認めなかった。エクリズマブの承認後に確認された 9 例の新規不応例においても同変異をヘテロで認めた。結果、本邦エクリズマブ投与約 300 症例中 11 例(約 3.7%)に同変異を認めた。日本人の健常人 288 人(男性 200 人、女性 88 人)において同変異のスクリーニングを行ったところ、ヘテロの変異を 288 人中 10 人(約 3.5%)に認めた。以上より、本邦における c. 2654G>A の保有率は 3~4%であると結論した。同変異の人種間の広がりを検索したところ、白人(ブリティッシュ) 100 例とメキシコ原住民 90 例には検出されなかったが、中国漢民族 120 例中 1 例において検出された。

同変異を組み込んだ組み換え型 C5 蛋白を作成し、C5 除去血清を用いた溶血試験による機能解析を行ったところ、溶血活性は維持されているものの、エクリズマブでは抑制されず、N19-8 では抑制された。組み換え型 C5 蛋白(変異型/野生型)とエクリズマブとの結合を surface plasmon resonance (SPR) を用いて解析したところ、野生型とは nM の濃度で結合が確認されたが、変異型とは 1 μM まで濃度を上げて結合は確認できなかった。

②IgA/IgM 型クームス陰性 AIHA 頻度の推定

199 例についてアンケートの回答があった(71%)。アンケート回答例と非回答例の間に年齢・性比の優位差は無かった。回答例中 99 例が AIHA と診断され、クームス陽性 AIHA 12 例(温式 7 例、冷式 3 例、混合型 2 例)、クームス陰性 AIHA 87 例(温式 73 例、冷式 14 例)であった。クームス陰性温式 AIHA 中、IgA、IgM クームス陽性はそれぞれ 3 例ずつであった。1 年後 IgA-AIHA は 3 例とも生存していたが、IgM-AIHA は 3 例中 2 例死亡していた。低親和性自己抗体による AIHA は、1 例のみ認められた。

③GPI アンカー欠損症の解析

PNH 症例については exon10 をスキップするとフレームはずれないが著しく活性が低下することがわかった。また国内で初めて、高アルカリフォスファターゼ (ALP) 血症、重度精神運動発達障害、難治性てんかんを呈する先天性 GPI 欠損症、PIGO 欠損症を発見した。父母からそれぞれ PIGO 遺伝子の変異をもつアリル (R119W, A834fs*) を受け継いでいたが PIGO 欠損 CHO 細胞を使ったこれらの変異の機能解析により活性低下を確認した。また好中球の 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おり、血液の FACS がスクリーニングに有用であることがわかった。また診断後、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。赤血球の CD59 は低下しておらず、溶血も認められなかった。

④PNH 造血障害の分子病態の解明～NKG2D 免疫の意義の確立～

これまで PNH 14 例、AA 39 例、MDS (RA) 14 例の合計 67 例の解析を試みた。MICA の血球膜発現はそれぞれにおいて 7、17、3 例 (全体で、40%) に検出され、健常人 16 例にはなかった。また血中遊離体 (顆粒球数補正、血小板数補正でも同様の傾向) はそれぞれ 11、17、7 例 (全体で、52%) において健常人より多く検出された。興味あることに、これらの血中 MICA 増加症例ではそうでない症例と比較して血小板が有意に多い傾向が認められ、血中 MICA 増加と造血障害との間に負の関係が示唆された。予備実験の in vitro 共培養では可溶性 MICA によりリンパ球膜 NKG2D 受容体発現が抑制された。

3. 骨髄異形成症候群

①日本人 MDS 患者における血中エリスロポエチン値の調査研究

38 名の患者よりインフォームドコンセントを取得し EPO 値の測定を行ったが、1 名は登録後腎不全による ESA 投与中であることが判明、また 2 名は ICUS と診断されたため解析対象より除外した。解析対象となった 35 例の年齢中央値は 67.5 歳であり、9 例は腎障害 (CKD) stage 3 ($60 > eGFR \cdot 30$ mL/min) であり中等度の腎機能低下が認められた。また解析対象中 IPSS Low～Int-1 の低リスク症例は 24 例、Int-2～High の高リスク症例は 7 名、輸血依存症例は 16 例であった。

●血清 EPO 値と血液学的検査値の相関

血清 EPO 値は貧血が進行するに従って個体差が大きくなる傾向が認められたが (10～100 倍)、ヘモグロビンおよびヘマトクリットと強く相関していることが明らかとなった。

そして、EPO と Hb、Ht の間には、それぞれ

$$\text{Log EPO} = -0.23 \times \text{Hb} + 4.52$$

$$\text{Log EPO} = -0.078 \times \text{Ht} + 4.57$$

の近似式が成り立ち、

EPO 500 mIU/mL に相当する Hb、Ht 値はそれぞれ Hb 7.96 g/dL、Ht 23.7% と推定された。

EPO > 500 mIU/mL を示す症例は全て Hb < 8.0 g/dL であり、近似式との整合性が認められた。

●輸血依存と EPO 値の相関

輸血依存症例では有意に EPO 値が高値を示したが ($p = 0.02$)、輸血依存症例では Hb 値が有意に低く ($p < 0.00001$)、これは貧血による影響と考えられた。

②骨髄異形成症候群の改訂国際予後スコアリングシステムの検証

523 例の年齢中央値は 65 才で、男女比は 310/213=1.45 であった。全体の血球の分布としては、ヘモグロビン値は中央値 8.6 (4.0-16.2)、好中球実数中央値は 1405 (192-14600)、血小板数中央値は 5.7 万 (0.5 万-35 万)、骨髄芽球は 4.85% (0-21.7%) であった。FAB 分類では不応性貧血 (RA) が全体の 61.2% と最も多かった。芽球増加を伴う RA (RAEB) は 23.9%、形質転換期の RAEB は 4.4% であった。環状鉄芽球を伴う RA は 4.8% で、また、慢性骨髄単球性白血病を 5.4% 含んでいる。対象全例の生存期間中央値は 8.2 年であった。

これらの IPSS-R における染色体予後群の分布は、Very good 0.8%, Good 43.8%, Intermediate 14.2%, Poor 4.6%, Very poor 3.8% で、32.9% で十分なデータが得られなかった。

染色体データまで得られた 327 例に対して IPSS-R を適応したところ、予後群として Very Low 5.8%, Low 32.4%, Intermediate 33.9%, High 15.3%, Very High 12.5% という分布であった。それぞれについて生存期間の中央値は Very Low 未到達, Low 17.3 ヶ月, Intermediate 8.6 ヶ月, High 2.1 ヶ月, Very High 0.7 ヶ月と統計学的な有意差を持って予後群を層別化することが出来た。従来 IPSS による層別化と比較して、よりはっきりと予後群を分けることが出来ており、今回のデータを用いた解析においては、国内 MDS 症例に対しても IPSS-R は有用であることが確認された。

長崎症例で免疫抑制療法を実施した低リスク MDS29 例を従来の IPSS によって分類したところ、1 例が Low リスク、27 例が Intermediate-1 リスク、1 例が Intermediate-2 リスクとなり、十分な層別化が出来たとは言えなかった。一方で IPSS-R を用いたところ Low リスク 4 例、Intermediate リスク 20 例、High リスク 5 例という分類になった。しかし、IPSS-R リスク群と生存期間には有意な相関が得られなかった。

③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

<症例登録>平成 25 年には新たに 40 例が登録され、平成 25 年 11 月現在で総登録数は 275 例となった。登録時の施設診断は、再不貧 57 例、MDS 183 例、急性骨髄性白血病 (AML) 3 例、意義不確定の特発性血球減少症 (idiopathic cytopenia of undetermined significance, ICUS) 4 例、診断不能 20 例などであった。

<セントラルレビュー>提出されたそれぞれの骨髄標本について、埼玉医科大学 (松田晃)、川崎医科大学 (通山薫)、長崎大学 (波多智子)、東京大学医科学研究所 (在家裕司)、自治医科大学 (鈴木隆浩)、京都大学 (川端浩) のうち少なくとも 2 施設の専門家が形態診断を行い、診断が一致しない症例については年に 2 回行われる合同検鏡会にて最終診断を行

っている。これまでに 225 例の中央診断が終了している。主な最終診断名は、再不貧 49 例、MDS 155 例、ICUS 10 例、AML 10 例などとなっている。これらの結果は随時、各施設に報告されている。

＜追跡調査＞登録症例のうち 24 例は診断から症例登録までの期間が 1 年を超えており、前方視的登録の主旨からはずれるために追跡調査不適格とした。これらを除き、平成 25 年 11 月時点で 198 例についての追跡情報が得られている。

最終診断が再不貧の 49 症例のうち、38 例で追跡情報が得られている。これらの診断時の年齢中央値は 61.5 歳、4 例に染色体異常が認められ、観察期間中央値 1.5 年で 35 人が生存され、3 人が診断から 44～833 日後に亡くなっていた。

再不貧の 38 例中 2 例、MDS では RCUD 26 例中 0 例、RCMD 55 例中 6 例、RAEB-1 の 18 例中 3 例、RAEB-2 の 16 例中 7 例、AML (主に AML-MRC) では 9 例中 4 例で同種造血幹細胞移植が行われていた。生存曲線は、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。

年齢別の MDS 患者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、3 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患者群で極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。診断時の骨髓芽球割合別の生存解析では、芽球割合が 2% 以下の症例では比較的予後が良好であったのに対し、2% から 20% までの各群間では生存期間に有意な差は見られなかった。

④末梢血遊離 DNA を用いた MDS 遺伝子変異解析及びクローン拡大の検出

血漿および血清より抽出された cfDNA の濃度に有意な相関を認め ($P=0.0002$)、血漿由来 cfDNA は血清由来に比べ濃度が有意に高いことを確認した。臨床検査値との関連について、PB-cfDNA 濃度は白血球数や骨髓細胞数との相関は確認できず、末梢血芽球数 ($P=0.0284$) や LDH 値 ($P<0.0001$) との間に有意な相関を認めた。

IPSS スコアの高い症例 (Int-2~High) において PB-cfDNA 濃度が有意に高いことを確認した ($P=0.0323$)。

TET2 変異と SRSF2 変異を認めた 2 症例中 1 症例では、病勢進行にともない TET2 変異存在割合の増加を認めた。もう一症例においては、その存在割合に有意な変化は確認されなかった。

⑤骨髓異形成症候群に対する治療法の検討

対象患者数：94 名 (男性 68 名、女性 26 名)

年齢中央値は 69 才であったが、70-79 才の症例が 36 例と最も多かった。

IPSS Int-1 の症例が最も多く、33%であった。

造血幹細胞移植施行症例は 15 例であり、9 例は生存退院した。今回の解析カットオフでの生存は 7 例で

あった。最長で 5 年 5 か月の生存が得られている。アザシチジン施行症例は 8 例であった。奏効率は 25%であった。病勢が進行してからの投与が多い傾向にあった。

IPSS によるリスク分類は生存予測において有用であることが示された。

原病以外に感染症、治療関連による死亡が 44%に認められた。

⑥RUNX1 変異と BMI1 の協調作用による MDS 発症機序
RUNX1 変異体 D171N を導入したヒト CD34+細胞は、増殖能を欠き G1 arrest の状態で、遺伝子発現アレイ解析では BMI1 が低発現であった。一方 RUNX1 変異患者では、逆に BMI1 は高発現であった。BMI1 自体は腫瘍原性作用を持たないが、ヒト CD34+細胞に D171N/BMI1 を共発現させたところ増殖能が亢進し、ARF/INK4A 発現低下によることが確認された。RUNX1 変異患者の CD34+細胞でも BMI1 高発現例では ARF/INK4A 低発現であり、BMI1 ノックダウンにより増殖能の低下が認められた。マウス BMT モデルでも D171N/BMI1 共発現により白血病発症が早まり、Arf/Ink4a の発現低下が確認できた。

⑦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

【登録患者検体の NTBI ならびにヘプシジン測定】骨髓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、登録患者検体の血清 NTBI ならびにヘプシジンの測定を継続実施した。

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済みである。

【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。本測定系ではトランスフェリン結合鉄の影響を受けることなく、0.34 - 5 μ M の範囲で非常に高い直線性・定量性が確認できた。さらに本測定法で得られた NTBI 値は HPLC 法測定値と高い相関が得られた。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。

⑧骨髓異形成症候群におけるゲノムおよびエピゲノムの解析

全国調査の結果、214 施設から回答があり、このうち 39 施設が計 66 例について合併例ありと回答した。これらの 39 施設に対する二次調査は、施設名、診療科名、施設内症例識別番号、記載医師名、患者性別、対象となる造血異常症の診断名 (分類名)、対象となる造血異常症診断時の患者年齢、悪性リンパ腫の診断名、悪性リンパ腫の発症時期、対象となる造血異

常症に対する治療、他の悪性腫瘍の既往歴、合併症、それらの治療歴、対象となる造血異常症診断時の血算（日付）、対象となる造血異常症診断時の染色体検査結果（日付）、悪性リンパ腫診断時の血算（日付）、悪性リンパ腫生検検体の染色体検査結果（日付）、悪性リンパ腫の主要な免疫染色の結果、転帰、生存者における造血異常症の状態、生存者における悪性リンパ腫の状態とし、研究計画について筑波大学倫理委員会の承認を得たのち、調査を依頼した。その結果、造血異常症と悪性リンパ腫の同時発症 26 例、逐次発症 19 例について、回答が得られた（表 1）。

対象疾患では MDS との合併例が最も多く、同時発症では 26 例中 16 例、逐次発症 19 例中 12 例であった。悪性リンパ腫の中では、びまん性大細胞 B リンパ腫が同時・逐次発症とも最も多く（13/26、9/19）、濾胞性リンパ腫がこれに次いだ（5/26、1/19）。

⑨鉄芽球性貧血の発症機序と治療法に関する研究

遺伝性鉄芽球性貧血では、19 例中 8 例で ALAS2 遺伝子の変異が認められた。ALAS2 遺伝子以外の既知の鉄芽球性貧血の原因遺伝子の変異はこのほかには認められなかった。ALAS2 が合成する ALA を赤血球細胞株に投与したところ、ミトコンドリアフェリチンの低下、ヘモグロビン合成の促進が認められた。

⑩不応性貧血における細胞形態学的異形成の系統と血球減少の系統との関係についての検討

1. 異形成の系統と血球数との関係

a. 赤芽球系

赤芽球系では、全例に DysE10%以上を認めた。

b. 顆粒球系

顆粒球系では、染色不良例（特に顆粒の観察不能）を除く 96 例で DysG を検討した。好中球数は DysG10%以上群（17 例、中央値 1394（492-6201））と DysG10%未満群（79 例、中央値 1397（260-4708））に有意差を認めなかった（ $p=0.83$ ）。また、両群で好中球減少の定義を満たすのはそれぞれ 13 例（76.5%）、48 例（60.8%）で、両群に有意差を認めなかった（ $p=0.22$ ）。Pelger 核異常は評価不能例 1 例を除く 99 例で検討可能であった。好中球数は Pelger10%以上群（12 例、中央値 1364（492-6201））と Pelger10%未満群（87 例、中央値 1397（260-4708））とで有意差を認めなかった（ $p=0.86$ ）。また、両群で好中球減少を呈していたのはそれぞれ 9 例（75.5%）、55 例（63.2%）であり、両群に有意差を認めなかった（ $p=0.42$ ）。

c. 巨核球系

巨核球系では、評価不能例（検討 MgK 数が 25 細胞に満たない例）を除く 81 例で検討した。血小板数は、DysMgk10%以上群（69 例、中央値 48（8-760））が DysMgk10%未満群（12 例、中央値 26（5-313））よりも高い傾向にあった（ $p=0.08$ ）。両群で血小板減少の定義を満たすのはそれぞれ 51 例（73.9%）、11 例（91.7%）で、両群に有意差を認めなかった（ $p=0.18$ ）。40%の閾値での検討では、DysMgk40%以上群（38 例、中央値 70（15-760））が DysMgk40%未満群（43 例、中央値 36（5-343））よりも血小板数が有意に高値であった（ $p=0.02$ ）。両群で血小板減少の定義を満たすのはそれぞれ 26 例（68.4%）、36 例（83.7%）で、DysMgk40%以上群で高率の傾向があった（ $p=0.10$ ）。

また、mMgk10%以上の症例は 12 例存在したが、全例が DysMgk40%以上の症例であった。mMgk10%以上群（12 例、中央値 99（29-760））が mMgk10%未満群（88 例、中央値 33（4-390））よりも血小板数が有意に高値であった（ $p=0.004$ ）。両群で血小板減少の定義を満たすのはそれぞれ 7 例（58.3%）、7 例（84.1%）で、mMgk10%以上群で有意に高率であった（ $p=0.03$ ）。

2. 単一血球系血球減少症患者における異形成の系統

単一血球系血球減少症患者において、血球減少と同じ系統に異形成を認めるかを検討した。血球系統が単独に減少した症例は 19 例（貧血のみ：4 例、好中球減少のみ：4 例、血小板減少のみ：11 例）であった。17 例は 2 系統以上に異形成を示した。2 例は異形成を 1 系統のみに示したが、その系統は血球減少の系統とは異なる系統であった。

2. 単一血球系に異形成を示す患者における血球減少の系統

血球異形成が単独血球系の症例は 11 例で、全例が異形成を赤芽球系に認めた。9 例は 2 系統以上に血球減少を示した。2 例の血球減少は 1 系統のみであったが、貧血ではなく血小板減少であった。

⑪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

1) 幹細胞マーカーと既知の AML の予後不良因子との発現の相関

Bmi1 は、幹細胞が自己複製するために必須の分子で、様々な正常組織幹細胞および CSC で高発現していることが報告されている。そこで、CSC 分画における Bmi1 の発現パターンを single cell レベルで解析すると同時に、AML の予後不良因子として知られる Evi1、BAALC、MN1、ENG の発現パターンを解析し、より未分化な MDS 細胞の同定を試みた。AML 2 症例、MDS overt AML 1 症例、および健常人から得た細胞を対象に、CD34+38-細胞 96 個における各遺伝子の発現を定量 PCR にて解析した。横軸に解析した 96 細胞、縦軸に各細胞における解析遺伝子の発現強度をプロットし、スピアマンの順位相関係数を算出、相関を検討した。その結果、症例間を通して Bmi1 と Evi1、ERG の発現との間に相関を認めた（Fig. 1）。一方、ERG は健常人 CD34+CD38-細胞においても Bmi1 と相関を認めたことから、解析した予後不良因子の中で、Evi1 がより未分化な MDS 細胞に特徴的な因子であると考えられた。

2) Evi1 高発現 MDS 細胞に特異的な表面抗原の同定
次に、MDS から AML に移行した症例（case3）を対象に、Evi1 を高発現している細胞、低発現している細胞を用いて個々の細胞における表面抗原の発現を網羅的に解析した。横軸に解析した細胞（低発現 2 細胞、高発現 3 細胞）、縦軸に各細胞における CD1-350 および、その他の細胞表面マーカー遺伝子の発現強度をマッピング（内在コントロール GAPDH との比で 100 以上の場合に黄色で色づけ）したものを示す（Fig. 2）。その結果、細胞表面への蛋白レベルでの発現、および、正常幹細胞における発現に関しての解析は必要ではあるが、Evi1 を高発現している MDS 細胞に特異的に発現している細胞表面マーカーを複数同定した。

⑫低形成性骨髄異形成症候群に関する全国調査