

「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」

研究分担者：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

研究要旨

末梢血無細胞遊離 DNA (Peripheral blood cell free DNA; PB-cfDNA) は血漿・血清中に存在する DNA である。これまでに我々は、骨髄異形成症候群 (MDS) 患者の骨髄細胞に認められる遺伝子異常が PB-cfDNA を用いて検出可能であることを示してきたが、MDS における PB-cfDNA 性状の患者ごとの差異については、詳細が不明であった。本研究では、MDS 患者 (n=30) から得られた PB-cfDNA のサイズ、濃度を定量解析し、臨床検査値などとの関連について解析した。PB-cfDNA (血漿由来) 濃度は、MDS 患者の末梢血芽球数 ( $P=0.0284$ )、LDH 値 ( $P<0.0001$ )、IPSS リスク (Higher vs. lower;  $P=0.0323$ ) にそれぞれ有意に相関することが確認された。また *TET2*, *SRSF2* 遺伝子変異の存在割合を、病勢進行にともない経時的に検討することも可能であった。本検査法は、MDS に認める遺伝子変異の経時的解析において、骨髄穿刺に代わる低侵襲の検査法として有望と考えられる。

A. 研究目的

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との相関を確認し、PB-cfDNA の基礎データを集積する。

B. 研究方法

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、臨床検査値などと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。

(倫理面への配慮)

検体採取とその保存、研究目的使用に関する同意を文書により取得した後に検討を行った。遺伝子解析を含む本研究内容は、当院倫理委員会にて承認を得ている。

C. 研究結果

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髄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。

#### D. 考察

PB-cfDNA濃度は、末梢血芽球数、LDH値と有意な相関を認めた。MDSは無効造血を特徴としており、PB-cfDNAがより脆弱な芽球由来とする可能性が示唆された。また我々のこれまでの検討では、骨髄細胞に比べPB-cfDNAにおいてMDS特有の遺伝子変異をより高い率で検出できる症例を認め、その遺伝子変異の存在割合を検討することで、病勢進行をより早く検出できる可能性も示唆される。これらの結果から、PB-cfDNAは、MDSにおける経時的なゲノム解析のソースとして、骨髄検体の代替となる可能性がある

#### E. 結論

- (1) PB-cfDNA濃度は、MDS患者の末梢血芽球数、LDH値、IPSSリスクに有意に相関する
- (2) PB-cfDNAは、MDSにおける遺伝子異常、病勢進行の検出に有用である可能性がある

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Tokunaga T, Tomita A, Sugimoto K, Shimada K, Iriyama C, Hirose T, Shirahata-Adachi M, Suzuki Y, Mizuno H, Kiyoi H, Asano N,

Nakamura S, Kinoshita T, Naoe T. De novo DLBCL with a CD20 IHC(+) and FCM(-) phenotype: molecular mechanisms and correlation with rituximab sensitivity. **Cancer Sci.** 2013.(in press)

2. Kato S, Miyata T, Takata K, Shimada S, Ito Y, Tomita A, Elsayed AA, Takahashi E, Asano N, Kinoshita T, Kimura H, Nakamura S. Epstein-Barr virus-positive cytotoxic T-cell lymphoma followed by chronic active Epstein-Barr virus infection-associated T/NK-cell lymphoproliferative disorder: a case report. **Hum Pathol.** 2013. (in press)
3. Tomita A, Kiyoi H, Naoe T. Mechanisms of action and resistance to all-trans retinoic acid (ATRA) and arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in acute promyelocytic leukemia. **Int J Hematol.** 2013;97(6):717-25.
4. Ohashi H, Arita K, Suzuki Y, Tomita A, Naoe T, Hattori A, Tatsumi Y, Kato K, Nagai H. Iron chelation therapy for a case of transfusion-independent MDS-RARS with significant iron overload. **Int J Hematol.** 2013 97(1):151-3.

##### 2. 学会発表

1. 富田章裕. DLBCLにおけるCD20発現異常と薬剤感受性、第75日本血液学会総会、(口演、コーポレートセミナー)、2013年10月12日、札幌
2. 富田章裕. 悪性リンパ腫における遺伝子変異 -その意義と治療開発への応用- 第75回日本血液学会総会、

- (教育講演)、2013年10月12日、札幌
3. Kazuyuki Shimada, Akihiro Tomita, Takashi Tokunaga, Chisako Iriyama, Tomohiro Kinoshita, Hitoshi Kiyoi, Cragg Mark, Tomoki Naoe. Analysis of rituximab resistance mechanism in CD20 positive B-cell lymphoma cells. 第75回日本血液学会総会、2013年10月12日、札幌
  4. Erina Yamamoto, Akihiro Tomita, Chisako Iriyama, Kazuyuki Shimada, Tatsuya Hirose, Keisuke Sugiyama, Hiroki Mizuno, Norio Kaneda, Hitoshi Kiyoi, Tomoki Naoe. MYD88 L265P mutation in B-cell lymphoproliferative disorders. 第75回日本血液学会総会、2013年10月12日、札幌
  5. Yusuke Takagi, Kazuyuki Shimada, Akihiro Tomita, Satoko Shimada, Mizuno Shirahata, Yasuhiro Suzuki, Erina Yamamoto, Shunsuke Noguchi, Shigeo Nakamura, Hitoshi Kiyoi, Tomoki Naoe. Implication of the Ets family transcription factor, SPIB, as the novel prognostic factor in DLBCL. 第75回日本血液学会総会、2013年10月12日、札幌
  6. Yasuhiro Suzuki, Akihiro Tomita, Chisako Iriyama, Mizuho Shirahata, Kazuyuki Shimada, Hitoshi Kiyoi, Tomoki Naoe. Using peripheral blood circulating DNAs to detect genetic mutations and clonal expansion in MDS. 第75回日本血液学会総会、2013年10月12日、札幌
- G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
1. 特許取得  
該当無し
  2. 実用新案登録  
該当なし
  3. その他  
該当無し

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）  
分担研究報告書

再生不良性貧血の罹患率の推計—臨床調査個人票の解析—

研究分担者：太田晶子（埼玉医科大学医学部公衆衛生学・講師）

研究協力者：島田直樹（国際医療福祉大学基礎医学研究センター・教授）

研究要旨

再生不良性貧血の頻度について、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。本研究では、臨床調査個人票を利用し、我が国の再生不良性貧血の罹患数（罹患率）の推計を試みた。資料として、2013年7月現在電子入力済みの、2004～2012年度の再生不良性貧血臨床調査個人票を利用した。2004～2012年の各年の罹患数の推計は、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。

我が国の再生不良性貧血の2004～2012年の9年間の罹患数は9,455、罹患率は8.2（/100万人年）と推計された。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。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。

最近の我が国の再生不良性貧血の罹患率を明らかにした。我が国の罹患率は欧米諸国のそれに比べて高かった。臨床調査個人票データベースを用いることで、全国規模の集団から罹患率を推計できた。

A. 研究目的

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へ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。

## B. 研究方法

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）<sup>1)</sup>、<sup>2)</sup>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。

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

i: 発病年 (i=2004, 2005, …, 2012)

j: 新規登録年度 (j=2004, 2005, …, 2012)

$i \leq j$

$A_i$ : i年の「再生不良性貧血」罹患数

$N_{ij}$ : 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。

（倫理面への配慮）

本研究は、特定疾患治療研究事業における臨床調査個人票の研究目的利用に関する要綱に基づき実施した。利用したデータには、個人名、住所など個人を同定できるものは含まれていない。

## C. 研究結果

### 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。

図1に、2004～2012年における年齢別、性別罹患率を示した。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。

#### D. 考察

臨床調査個人票を用いて、我が国の再生不良性貧血の罹患率を推計した。我が国の 2004～2012 年の 9 年間の罹患率は、8.2 (100 万人年) と推計された。欧米諸国における罹患率は 1.4～6.8(100 万人年)と報告されており<sup>3),4)</sup>、本研究の罹患率は、これらに比べて高い。これまで、アジア人の罹患率は 3.9～7.4(100 万人年)と報告されており<sup>4)</sup>、欧米諸国に比べ高いことが知られている。

これまでの罹患率の報告の多くは、患者数が 50～300 程度の比較的小さな集団から得られた値である。一方、本研究の罹患率は、全国規模のデータベースに基づく大きな患者数 (約 6,500 : 2004 年～2012 年) から得られた有用性の高い知見である。

本研究で得られた各年の罹患数は、(もちろん受給申請しない患者は数えられていないが) 少なくとも、各年に新規発症して登録された患者数の推計にはなっているものと考えられる。

臨床調査個人票データベースを用いて推計した罹患率を評価する上で、考慮すべきことを以下に示す。1) 診断の正確性の問題がある。例えば、患者の利益のために、診断が多少曖昧でも受給させようという臨床家の判断が紛れ込む余地がある。県は専門医による認定審査を行っているが、これがどこまで厳格であるかという問題もあるかもしれない。2) 個人票の記載内容が正確でなければ、認定審査も確実にはできず、そこから得られる発病年などの情報も正確性が下がる。3) 患者であっても受給しなければその者は個人票データベース (受給者データ) からは漏れている。例えば、収入が充分で医療費補助のメリットがないと考える者、他の保健福祉制度を利用するため受給しない患者はある程度いると考えられる。例えば、小児は市町村が医療費助成をしているので受給者デ

ータからは漏れやすい。また生活保護を受けている者は、その医療扶助を受けた方が有利で受給者登録されにくい。本研究における若年者の罹患率は過小評価である可能性がある。

#### E. 結論

2004～2012 年の 9 年間における、我が国の再生不良性貧血の罹患率を明らかにした。臨床調査個人票データベースを用いることで、全国規模の集団から罹患率を推計できた。

#### 文献

- 1) 厚生労働省大臣官房統計情報部編：保健・衛生行政業務報告(衛生行政報告例) (平成 16、17、18、19、20 年度)。
- 2) 厚生労働省大臣官房統計情報部編：衛生行政報告例 (平成 21、22、23 年度)。
- 3) Mary JY, Baumelou E, Guiguet M. Epidemiology of aplastic anemia in France: a prospective multicentric study. The French Cooperative Group for Epidemiological Study of Aplastic Anemia. Blood. 1990; 75: 1646-53.
- 4) Young NS, Kaufman DW. The epidemiology of acquired aplastic anemia. Haematologica. 2008; 93: 489-92.

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表
  - 1) 太田晶子、仁科基子、島田直樹、永井正規. 臨床調査個人票データベースの入力率と有用性の検討. 第 72 回日本公衆衛生学会総会、2013 年 10 月 23-25 日、三重。
  - 2) 島田直樹、太田晶子、中尾眞二、黒川峰夫. 再生不良性貧血患者の臨床像などに関する縦断的検討. 第 78 回日本民族衛生学会総会、2013 年 11 月 15-16 日、佐賀。

#### 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」

表1. 再生不良性貧血臨床調査個人票入力率（2013年7月現在）

年度	入力件数 ①	特定疾患医療受給 者数証所持者数* ②	入力率 ①/②	登録者証 所持者数*	
				③	②+③
2004	6,162	9,173	0.672	1,336	10,509
2005	5,835	8,997	0.649	1,825	10,822
2006	5,081	9,010	0.564	2,149	11,159
2007	4,558	9,162	0.497	2,515	11,677
2008	6,565	9,301	0.706	2,714	12,015
2009	8,363	9,479	0.882	2,914	12,393
2010**	7,211	9,417	0.766	2,952	12,369
2011	8,146	10,148	0.803	3,200	13,348
2012	6,098		0.601		

\*各年度の保健・衛生行政業務報告(衛生行政報告例)による

\*\*2010年度は東日本大震災の影響により、宮城県及び福島県が含まれていない。

表2. 再生不良性貧血、2004～2012年度の新規登録（受給）年度における発病年別新規受給者数（2013年7月現在）

発病年	新規登録(受給)年度									合計	罹患率 (/100万人年)
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012		
2004	630	122	27	20	18	10	10	11	7	855	6.7
2005	92	780	112	38	34	16	18	14	10	1,114	8.7
2006		77	739	111	43	26	13	6	10	1,025	8.0
2007			60	783	113	36	21	24	13	1,050	8.2
2008				105	795	95	51	20	12	1,077	8.4
2009					71	676	125	46	15	933	7.3
2010						58	919	140	38	1,155	9.0
2011							61	938	155	1,154	9.0
2012								52	1040	1,092	8.6
合計										9,455	8.2

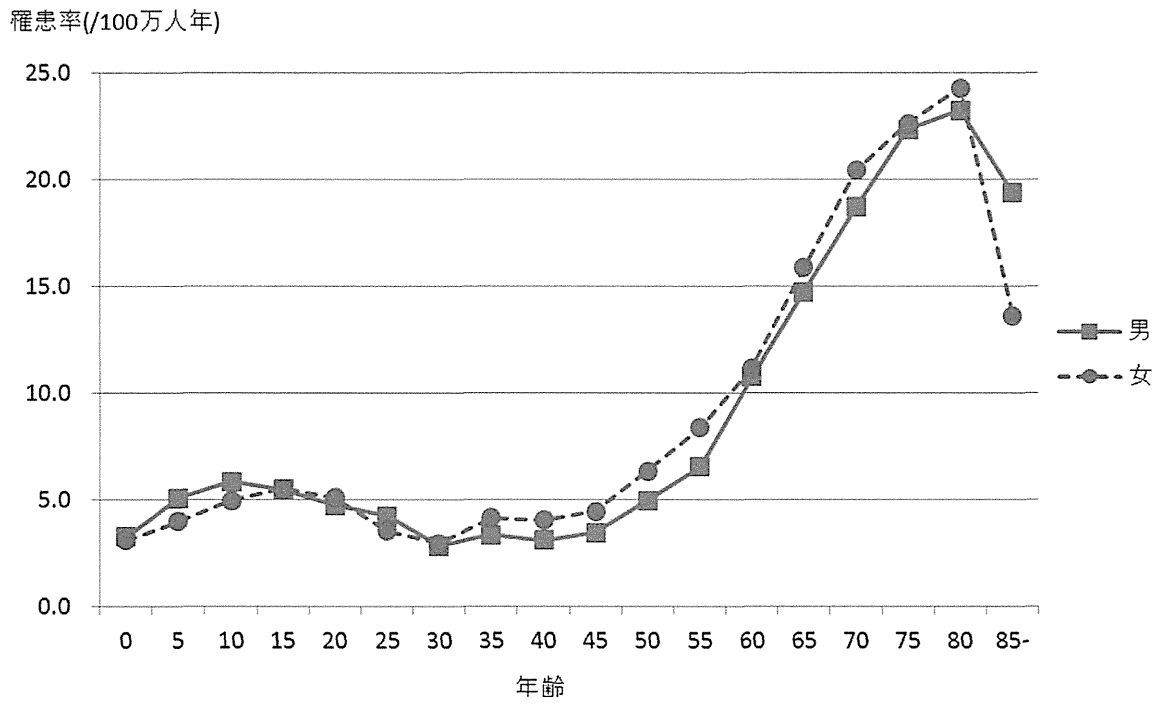
各登録年度の発病年別新規受給者数は、各登録年度の入力率で割り戻した値である。

2004年の発病者の一部（1月～3月発病の一部）は2003年度に登録されているがこれらは集計対象に入っていない。

表3. 再生不良性貧血の罹患率、性別、2004～2012年

罹患年	推計罹患数				推計罹患率(/100万人年)			
	総数	男	女	性比(女/男)	総数	男	女	性比(女/男)
2004	855	419	436	1.04	6.7	6.7	6.7	0.99
2005	1,114	494	620	1.26	8.7	7.9	9.5	1.20
2006	1,025	459	566	1.23	8.0	7.4	8.6	1.17
2007	1,050	430	621	1.45	8.2	6.9	9.5	1.38
2008	1,077	504	573	1.14	8.4	8.1	8.7	1.08
2009	933	427	506	1.19	7.3	6.9	7.7	1.13
2010	1,155	525	630	1.20	9.0	8.4	9.6	1.14
2011	1,154	500	653	1.31	9.0	8.0	10.0	1.24
2012	1,092	505	588	1.16	8.6	8.1	9.0	1.10
合計	9,455	4,262	5,192	1.22	8.2	7.6	8.8	1.16

図1. 再生不良性貧血の罹患率、年齢別、性別、2004~2012年





### III. 研究協力者報告書

## 骨髓異形成症候群に対する治療法の検討

研究協力者：直江知樹（国立病院機構名古屋医療センター・院長）

### 研究要旨

骨髓異形成症候群は造血幹細胞のクローン性増殖疾患であるが、その病態は多様である。近年、造血幹細胞移植の進歩やメチル化阻害剤の開発などにより、治療成績の改善が期待されている。当研究では最近 10 年間の名古屋大学病院での骨髓異形成症候群の治療・予後を解析し、近年の治療法の有効性を検討した。造血幹細胞移植施行症例では IPSS 高リスク症例においても長期生存症例が得られている。メチル化酵素阻害剤の投与時期などは今後の検討課題と考えられる。

### A. 研究目的

骨髓異形成症候群（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、骨髓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髓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。

### B. 研究方法

名古屋大学病院にて 2003 年 1 月～2012 年 12 月に診断された骨髓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。

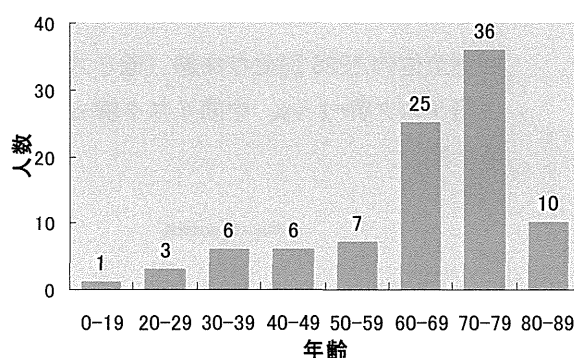
（倫理面への配慮）

後方視的研究であり、個人の特定につながる情報は収集していない。

### C. 研究結果

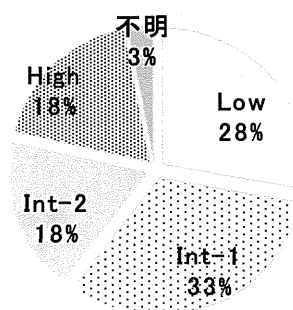
対象患者数：94 名（男性 68 名、女性 26 名）

#### 診断時年齢



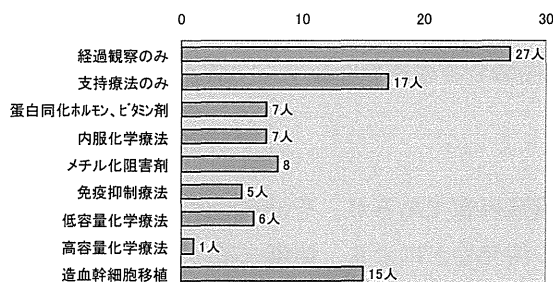
年齢中央値は 69 才であったが、70-79 才の症例が 36 例と最も多かった。

#### 診断時の IPSS のリスク分類



IPSS Int-1 の症例が最も多く、33%であった。

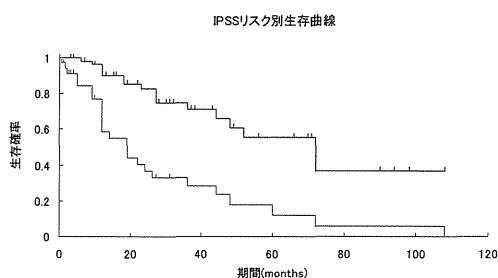
## 治療内容別症例数



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。

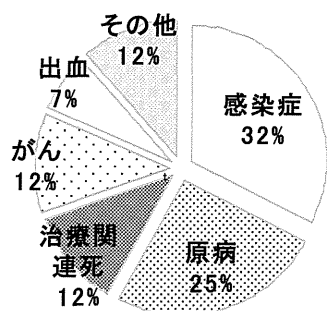
アザシチジン施行症例は 8 例であった。奏効率は 25% であった。病勢が進行してからの投与が多い傾向にあった。

症例全体の IPSS 別生存曲線（低リスク群+中間リスク群-1 vs. 中間リスク群-2+高リスク群）



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。

死亡原因 (45 症例)



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。

## D. 考察

骨髄異形成症候群は高齢者に多いが、若年症例では造血幹細胞移植などの適応により、長期寛解が得られる可能性がある。低リスク症例および高齢者では経過観察、支持療法のみでの対応も少なくない。メチル化阻害剤の使用例は限定的であったが、一部奏効症例もあり、今後の検討が必要と考えられる。

## E. 結論

骨髄異形成症候群では新規薬剤、造血幹細胞移植などにより、予後の改善が期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Ohashi H, Arita K, Suzuki Y, Tomita A, Naoe T, Hattori A, Tatsumi Y, Kato K, Nagai H: Iron chelation therapy for a case of transfusion-independent MDS-RARS with significant iron overload. *Int J Hematol.* 2013 Jan;97(1):151-3.

Ueda Y, Mizutani C, Nannya Y, Kurokawa M, Kobayashi S, Takeuchi J, Tamura H, Ogata K, Dan K, Shibayama H, Kanakura Y, Niimi K, Sasaki K, Watanabe M, Emi N, Teramura M, Motoji T, Kida M, Usuki K, Takada S, Sakura T, Ito Y, Ohyashiki K, Ogawa H, Suzuki T, Ozawa K, Imai K, Kasai M, Hata T, Miyazaki Y, Morita Y, Kanamaru A, Matsuda A, Tohyama K, Koga D, Tamaki H, Mitani K, Naoe T, Sugiyama H, Takaku F: Clinical evaluation of WT1 mRNA expression levels in peripheral blood and bone marrow in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma.* 2013 Jul;54(7):1450-8.

### 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

該当なし

2. 実用新案登録  
該当なし

3. その他  
該当なし

## 特発性造血障害に関する調査研究

### 小児の骨髄異形成症候群（MDS）の研究

研究協力者：真部 淳（聖路加国際病院小児科医長）

#### 研究要旨

小児の骨髄不全として先天性あるいは家族性疾患が一定の割合を占める、中でも遺伝性骨髄不全症候群は重要なカテゴリーと考えられる。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。遺伝性骨髄不全症候群51例の内訳は、Congenital dyserythropoietic anemia (CDA) 5例、Diamond-Blackfan 貧血 (DBA) 19例、Dyskeratosis congenita (DC) 4例、Fanconi 貧血 (FA) 11例、Severe congenital neutropenia (SCN) 5例、Shwachman-Diamond 症候群 (SDS) 7例であった。CDA、DBA、SCN は各々、単一系統の異常であり、再生不良性貧血/MDS との鑑別に苦慮する可能性は少ないと考えられた。一方、DC、FA、SDS では多系統の血球減少を呈した。DC と FA では低形成髄で軽度～中等度の異形成を呈し、SDS では正形成髄で中等度以上の異形成が認められた。FA の多くの例で合併症・外表奇形がなく、DC や SDS でも特徴的な表現型の目立たない症例が散見されるため、再生不良性貧血/MDS 診断時にはこれらの鑑別を念頭に置くべきであろう。本邦では現在、骨髄不全症例に対してテロメア長の測定が行われているが、今後、遺伝性骨髄不全症候群をどのようにスクリーニングするかを決定する必要がある。

#### A. 研究目的

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。

#### B. 研究方法

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。

（倫理面への配慮）

本研究で行われる臨床試験は、

- ① ヘルシンキ宣言に則り、患者の利益を最優先に考えて実施する。
- ② 調査フィールドとなる各施設における倫理委員会で承認を得て実施する。
- ③ 患者および家族に対して面談・介入開始時に統一した説明文を用いて文書による同意を得る。同意説明文では、調査を行う目的、介入・面談の内容、協力者に

起こりうる利益・不利益について、未成年者の場合には年齢に応じた説明をする。

- ④ 協力によって得られたデータは、個人情報保護を厳重に行い、研究目的以外には利用しないことを文書による同意を得て実施する。

### C. 研究結果

遺伝性骨髄不全症候群 51 例の内訳は、Congenital dyserythropoietic anemia (CDA) 5 例、Diamond-Blackfan 貧血 (DBA) 19 例、Dyskeratosis congenita (DC) 4 例、Fanconi 貧血 (FA) 11 例、Severe congenital neutropenia (SCN) 5 例、Shwachman-Diamond 症候群 (SDS) 7 例である。

CDA の 5 例のうち、合併奇形を有する例は 1 例、CDAN1 変異を有する例は 1 例であり、異常核型を有する例はなかった。DBA の 19 例のうち、合併奇形を有する例は 9 例であり、異常核型を有する例はなかった。DC の 4 例全例で合併奇形がみられ、DKC 変異は 2 例あったが、異常核型を有する例はなかった。FA の 11 例のうち、合併奇形を有する例は 7 例であり、11 例全例で染色体断裂試験は陽性であったが、異常核型を有する例はなかった。SCN の 5 例のうち、合併奇形はなく、ELANE 変異は 4 例あったが、異常核型を有する例はなかった。SDS の 7 例のうち、全例で合併奇形があり、SBDS 変異は 3 例あり、異常核型は 5 例でみられた。

末梢血血算については、CDA と DBA では貧血のみがみられ、DC では貧血と血小板減少がみられ、FA では 3 系統すべての減少がみられたが、SCN では好中球減少のみがみられた。SDS では好中球減少と軽度の血小板減少がみられた。

骨髄の密度については、DC と FA は低形成

髄を呈し、赤芽球系の異形成を認めた。SDS では正形成髄を呈し、巨核球系の異形成が目立った。

### D. 考察

再生不良性貧血/MDS と診断された成人例における 2-4%が潜在性 DC であると報告されている (H Yamaguchi. Blood 2003 & NEJM 2005)。一方、小児の再生不良性貧血/低形成 MDS でも約 2%でテロメラーゼ複合体関連遺伝子の変異が報告されている (CA Ortmann. Haematologica 2006, J Liang, Haematologica, 2006)。小児に特有な MDS である RCC と診断された 117 例中 17 例で染色体断裂試験が陽性で、そのうち 9 例 (8%) では FA を疑わせる所見や家族歴がなかった (A Yoshimi. BJH 2012)。

一方、RCC と診断された 120 例において SBDS 遺伝子を解析したが、潜在性 SDS は認められなかった (A Karow. Haematologica 2011)。

本研究において遺伝性骨髄不全症候群の各病型の特徴が明らかになった。CDA、DBA、SCN は各々、単一系統の異常であり、再生不良性貧血/MDS との鑑別に苦慮する可能性は少ないと考えられた。一方、DC、FA、SDS では多系統の血球減少を呈した。DC と FA では低形成髄で軽度～中等度の異形成を呈し、SDS では正形成髄で中等度以上の異形成が認められた。

FA の多くの例で合併症・外表奇形がなく、DC や SDS でも特徴的な表現型の目立たない症例が散見されるため、再生不良性貧血/MDS 診断時にはこれらの鑑別を念頭に置くべきであろう。本邦では現在、骨髄不全症例に対してテロメア長の測定が行われているが、今後、遺伝性骨髄不全症候群をどのようにスクリーニングするかを決定する必要がある。

## E. 結論

前方視的中央診断により、4年間に51例が遺伝性骨髄不全症候群症例と診断された。CDA、DBA、DC、FA、SCN、SDSの6病型各々の特徴が明らかになったが、合併奇形のない例も多く、今後、スクリーニング方法の確立が望まれる。

共同研究者：長谷川大輔、吉原宏樹（聖路加国際病院小児科）

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ohba R, Furuyama K, Yoshida K, Fujiwara T, Fukuhara N, Onishi Y, Manabe A, Ito E, Ozawa K, Kojima S, Ogawa S, Harigae H: Clinical and genetic characteristics of congenital sideroblastic anemia: comparison with myelodysplastic syndrome with ring sideroblast (MDS-RS). *Ann Hematol*;92:1-9, 2013
- 2) Yoshimi A, Kamachi Y, Imai K, Watanabe N, Nakadate H, Kanazawa T, Ozono S, Kobayashi R, Yoshida M, Kobayashi C, Hama A, Muramatsu H, Sasahara Y, Jakob M, Morio T, Ehl S, Manabe A, Niemeyer C, Kojima S. Wiskott-Aldrich syndrome presenting with a clinical picture mimicking juvenile myelomonocytic leukaemia. *Pediatr Blood Cancer* 60:836-841, 2013
- 3) Kato M, Yasui N, Seki M, Kishimoto H, Sato-Otsubo A, Hasegawa D, Kiyokawa N, Hanada R, Ogawa S, Manabe A, Takita J, Koh K: Aggressive transformation of juvenile myelomonocytic leukemia associated

with duplication of oncogenic KRAS in consequence of acquired uniparental disomy. *J Pediatr* 162:1285-1288, 2013

- 4) Horibe K, Saito AM, Takimoto T, Tsuchida M, Manabe A, Shima M, Ohara A, Mizutani S. Incidence and survival rates of hematological malignancies in Japanese children and adolescents (2006-2010): based on registry data from the Japanese Society of Pediatric Hematology. *Int J Hematol* 98:74-88, 2013
- 5) 長谷川大輔、真部淳。小児血液疾患。G-CSFの基礎と臨床（東條有伸編）、医薬ジャーナル社（大阪）、in press
- 6) 濱麻人、長谷川大輔、野沢和江、高橋義行、小島勢二、伊藤雅文、真部淳。再生不良性貧血・MDS委員会活動報告。小児血液・がん学会雑誌、in press

### 2. 学会発表

- 1) Hasegawa D, Hama A, Nozawa K, Sakaguchi H, Yabe M, Ito E, Ito M, Kojima S, Nakahata T, Manabe A. Hematological and morphological characteristics of inherited bone marrow failure syndromes (IBMFS). 日本血液学会総会（2013年10月11-13日、札幌）

## 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

## IgA/IgM 型クームス陰性 AIHA 頻度の推定

研究協力者：亀崎豊実（自治医科大学地域医療学センター・教授）、梶井英治

### 研究要旨

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。各タイプの割合を明らかにするため、全国から精査依頼された溶血性貧血症例について 3 タイプの分類を試みたところ、IgM または IgA 自己抗体による AIHA はそれぞれ 4 % の頻度であり、低親和性自己抗体による AIHA は 1 % であることが明らかになった。3 つの機序を考慮したクームス陰性 AIHA の診断フローチャートを作成した。

### A. 研究目的

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。

### B. 研究方法

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。

（倫理面への配慮）

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

### C. 研究結果

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。

### D. 考察

クームス陰性 AIHA において、IgA または IgM 自己抗体による AIHA の割合は、共に 4 % で併せて 8 % を占めた。

低親和性自己抗体による AIHA は 1 割程度あるとの報告が見られるが、今回の検討では 1 % のみ認められた。クームス試験法としてカラム法が普及しつつあり、低親和性自己抗体が洗浄操作を必要としないカラム法によるクームス試験でクームス陽性と判定されている可能性がある。

3 タイプの割合を考慮したクームス陰性 AIHA の診断フローチャートを作成した（図）。



E. 結論

クームス陰性 AIHA において、IgA または IgM 自己抗体による AIHA の割合は共に 4% で、低親和性自己抗体による AIHA は 1% であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

● 中村こずえ, 元山華穂子, 越智琢司, 佐藤泰弘, 泉陽一, 荻田佳織, 小山隆之, 亀崎豊実, 菊地陽: サイトメガロウイルス感染症に関連したクームス陰性自己免疫性溶血性貧血の乳児例. 日本小児血液・がん学会雑誌. 2013;50(258-262)

● Komaru Y, Higuchi T, Koyamada R, Haji Y, Okada M, Kamesaki T, and Okada S: Primary Sjögren syndrome presenting with hemolytic anemia and pure red cell aplasia after delivery due to Coombs-negative autoimmune hemolytic anemia and hemophagocytosis. Internal Medicine.2013; 52(2343-2346)

● Kaneko S, Sato M, Sasaki G, Eguchi H, Oh-ishi T, Kamesaki T, and Kawaguchi H: Case of cytomegalovirus-associated anti-globulin test-negative autoimmune hemolytic anemia. Pediatrics International.2013;56

● Kamesaki T, Toyotsuji T, and Kajii E: Characterization of direct antiglobulin test-negative autoimmune hemolytic anemia: A study of 154 case. Am J Hematol. 2013; 88 (93-96)

2. 学会発表

● Kamesaki T, Kajii E. Prevalence of Coombs-negative autoimmune hemolytic anemia associated with RBC-bound IgM and IgA. 第 75 回日本血液学会学術集会, 2013. 10. 11-13, 札幌

● Noji H, Kamesaki T, Shichishima A, Onishi Y, Kimura S, Takahashi S, Kimura H, Hamanaka S, Yamaguchi K, Murai K, Mita M, Suzuki I, Kohno K, Saitoh Y, Katsuoka Y, Michishita Y, Nara M, Fujishima N, Kanbayashi H, Takada K, Yokoyama H, Saitoh S, Omoto E, Ogawa K, Kato J, Ishida Y, Harigae H, Sawada K, Takeishi Y, Shichishima T. A study on IgG and C3 bound to erythrocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) patients. 第 75 回日本血液学会学術集会, 2013. 10. 11-13, 札幌

● 吉村卓朗, 中根孝彦 稲葉晃子, 康秀男, 中尾吉孝, 中前博久, 日野雅之, 藤野恵三, 向井悟, 亀崎豊実. Evans 症候群発症後 20 年の経過を経てクームス陰性溶血性貧血を伴う DLBCL を合併した 1 例. 第 99 回近畿血液学地方会, 2013. 6. 22, 大阪

● 亀崎豊実. 直接クームス陰性の自己免疫性溶血性貧血の診断と治療. 第 61 回日本輸血・細胞治療学会総会, 2013. 5. 16, 横浜

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

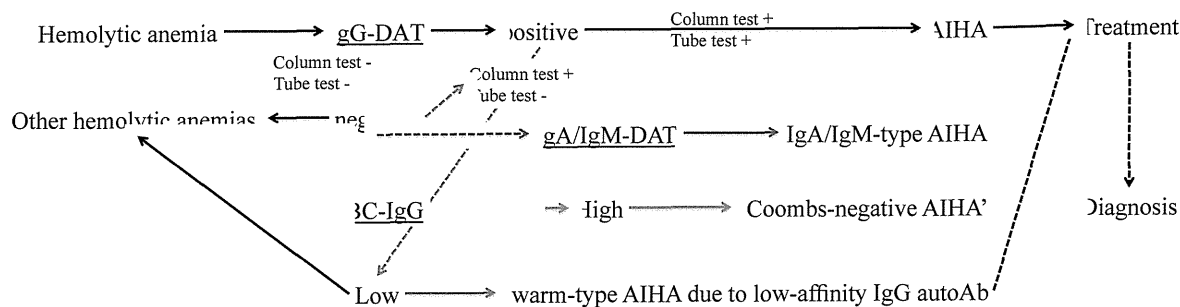


図. クームス陰性 AIHA の 3 つの機序を考慮した診断フローチャート

## 骨髄線維症の自覚症状調査

研究協力者：下田和哉（宮崎大学・教授）

### 研究要旨

骨髄線維症に伴う全身症状（全身倦怠感、発熱、意図しない体重減少）の頻度は、患者自身による評価によると、それぞれ 78.4%、10.8%、32.4%であり、医師による評価に較べ高値を示した。発熱、体重減少に関しては、日本人と欧米人の間に有症状の割合に差を認めた。

#### A. 研究目的

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。

#### B. 研究方法

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。

#### (倫理面への配慮)

宮崎大学及び各施設の倫理委員会の承認を得て調査を行った。自覚症状の調査は、患者名を匿名化して行っている。

#### C. 研究結果

患者自身が骨髄線維症に伴う症状の有無を評価し記録する方法によると、全身倦怠感、発熱、意図しない体重減少の頻度は、それぞれ 78.4%、10.8%、32.4%であった。従来の主治医による評価では、全身倦怠感、発熱、意

図しない体重減少の頻度は、33.0%、4.6%、11.3%であり、いずれの項目においても、有症状の割合は、患者自身による評価が、主治医による評価より高値を示した。欧米人における患者による自覚症状評価では、全身倦怠感、発熱、意図しない体重減少の頻度は 98.9%、29.0%、48.9%と報告されており、発熱、体重減少に関しては、日本人と欧米人の間に有症状の頻度の差を認めた。

#### D. 考察

患者自身による骨髄線維症に伴う症状評価を行うと、有症状の割合は、医師による評価に較べ高値を示した。発熱、体重減少に関しては、依然、日本人と欧米人の間に症状の頻度の差を認めた。

#### E. 結論

患者自身が骨髄線維症に伴う症状の有無を評価し記録する方法によると、全身倦怠感、発熱、意図しない体重減少の頻度は、それぞれ 78.4%、10.8%、32.4%であった。有症状の割合は、医師による評価に較べ高値を示した。発熱、体重減少に関しては、依然、日本人と欧米人の間に症状の頻度の差を認めた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

● Muromoto R, Nakajima M,  
Hirashima K, Hirao T, Kon S, Shimoda

K, Oritani K, Matsuda T.: Jun activation domain-binding protein1(JAB1)is required for the optimal response to interferons. J.Biol.Chem.2013; in press

Development of new therapies for myelofibrosis(MF) that target the transcription factor USF1. 第75回日本血液学会学術集会 2013, 10, 11-13, 札幌

2. 学会発表

●Kameda T, Shide K, Sekine M, Kamiunten A, Hidaka T, Kubuki Y, Kameda T, Kitanaka A, Shimoda K, Marutsuka K: The impact of TET2 deficiency on MPN induced by JAK2V617F mutation. 第75回日本血液学会学術集会 2013, 10, 11-13, 札幌

●Shide K, Kameda T, Shimoda H, Kamiunten A, Sekine M, Hidaka T, Kubuki Y, Kameda T, Kitanaka A, Shimoda K:

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。

## 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

発作性夜間血色素尿症 (PNH) は後天的な造血幹細胞における GPI 欠損症であり、大多数の患者は PIGA 遺伝子の突然変異によって発症する。これは GPI 生合成に必要な遺伝子のうち PIGA のみが X 染色体上の遺伝子で 1 回の変異で GPI 欠損細胞となることで説明できるが、最近常染色体上の遺伝子 PIGT を原因遺伝子とする PNH が見つかった。一方のアリルの PIGT に先天的な変異がある人で、造血幹細胞においても一方のアリルに突然変異が起こって GPI 欠損細胞となり PNH を発症していた。一方新たな疾患として先天性 GPI 欠損症 (IGD) が脚光を浴びている。現在までに GPI アンカー型タンパク質の生合成や修飾に関与する 27 個の遺伝子のうち 8 種の遺伝子を原因とする IGD が見つかっている。この場合も母親の X 染色体に PIGA 変異があれば男児が必ず発症するので PIGA 欠損症の頻度が高いことが予想される。GPI アンカーの完全欠損は胎生致死になるので IGD は部分欠損であり、特に赤血球においては CD59 の発現低下がみられないので溶血発作は起こらず、精神発達障害やけいれんを主症状とし、PNH とは異なる疾患である。国内で対象患者のゲノム DNA を集めて GPI 関連遺伝子の配列について解析した結果、国内で初めての先天性 GPI 欠損症が見つかったので報告する。

### A. 研究目的

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類粘膜細胞由来のゲノムの exome 解析を行ったところ両者に PIGT のスプライシングアクセプター部位の 1 塩基の変異と顆粒球ゲノムだけに 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。

### B. 研究方法

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ケンサー (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