

により、GPI アンカー型蛋白質の発現を解析した。

(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た。

C. 研究結果

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。

D. 考察

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、ピリドキサールリン酸 (PLP) を脱リン酸化して細胞内に取り込める形のピリドキサール (PL) にし、細胞内に入った PL は再びリン酸化されて PLP 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ールリン酸が不足し 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。即ち GPI 欠損症におけるけいれんの治療にピリドキシンの補充療法が有効な可能性がある。

E. 結論

国内で初めての先天性 GPI 欠損症を報告したが今後のスクリーニングによってさらに症例が増えると考えられる。PNH についても PIGA に変異がない症例では、他の PIG 遺伝子の変異が原因である可能性が高い。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Kuki, I., Y. Takahashi, Okazaki, Ebara, N. Inoue, T. Kinoshita and Y. Murakami. Case report with vitamin B6 responsive epilepsy due to inherited GPI deficiency. *Neurology*, 2013;81(16):1467-9.
- Krawitz, P. M., B. Höchsmann, Y. Murakami, B. Teubner, U. Krüger, E. Klopocki, H. Neitzel, A. Höllein, D. Parkhomchuk, J. Hecht, P. N. Robinson, S. Mundlos, T. Kinoshita and H. Schrezenmeier. A case of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) caused by a germline mutation and a somatic mutation in *PIGT*. *Blood*, 2013;122(7):1312-5
- Krawitz, P. M., Y. Murakami, A. Riess, M. Hietala, U. Krueger, N. Zhu, T. Kinoshita, S. Mundlos, J. Hecht, P. N. Robinson and D. Horn. *PGAP2* mutations, affecting the GPI-anchor-synthesis-pathway, cause hyperphosphatasia with mental retardation syndrome. *Am. J. Hum. Genet.*, 2013;92:584-589
- Hansen, L., H. Tawamie, Y. Murakami, Y. Mang, S. ur Rehman, R. Buchert, S. Schaffer, S. Muhammad, M. Bak, M. M. Noethen, E. P. Bennett, Y. Maeda, M. Aigner, A. Reis, T. Kinoshita, N. Tommerup, S. M. Baig, R. A. Jamra. Hypomorphic mutations in *PGAP2*, encoding a GPI-anchor-remodeling protein, cause autosomal-recessive intellectual disability. *Am. J. Hum. Genet.*, 2013;92:575-583.
- Hanaoka, N., Y. Murakami, M. Nagata, K. Horikawa, S. Nagakura, Y. Yonemura, S. Murata, T. Sonoki, T.

- Kinoshita and H. Nakakuma.
Occupancy of whole blood cells by a single *PIGA*-mutant clone with *HMG2* amplification in a paroxysmal nocturnal haemoglobinuria patient having blood cells with NKG2D ligands. *Br. J. Haematol.*, 2013;160:114-116.
- Inoue, N., Y. Murakami and T. Kinoshita.
Glycosylphosphatidylinositol-N-acetylglucosaminyltransferase (GPI-GlcNAc transferase): A complex comprised of PIGA, PIGC, PIGH, PIGQ, PIGP, PIGY and DPM2. N. Taniguchi, K. Honke, *et. al* In Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes, 2nd ed., Springer *in press*, 2013.
2. 学会発表
- 村上良子、井上徳光、九鬼一郎、高橋幸利、木下タロウ、精神発達遅滞・てんかんを主症状とする疾患:先天性 GPI 欠損症の疾患概念の確立に向けて。第 55 回日本小児神経学会学術集会 2013. 5. 30-6. 1 大分
 - 村上良子、井上徳光、九鬼一郎、高橋幸利、木下タロウ、精神発達遅滞・てんかんを主症状とする疾患-先天性 GPI 欠損症 第 50 回補体シンポジウム 2013. 7. 5-7 旭川
 - 村上良子 先天性 GPI 欠損症-発達障害・てんかんを主症状とする新たな疾患- (特別講演) 第 7 回南大阪遺伝診療研究会 2013. 9. 27 大阪
 - Taroh Kinoshita Self-nonsel Discrimination in Complement System: Roles of GPI-anchored Complement Regulators CD55 and CD59 (招待講演)韓国薬学会 2013.10.17 韓国
 - Murakami, Y.; Kato, M.; Saito, H.; Kikuchi, K.; Watanabe, S.; Iai, M.; Matsuura, R.; Takayama, R.; Ohba C.; Hamano, S.; Osaka H.; Hayasaka, K.; Matsumoto, N. Kinoshita, T. Inherited GPI-anchor deficiencies caused by the hypomorphic mutations in *PIGA* gene: comparison to paroxysmal nocturnal hemoglobinuria 55th ASH Annual Meeting 2013.12.7-10 New Orleans, LA
- 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、順天堂大学医学部血液内科 准教授）

原田 結花（広島大学、順天堂大学医学部血液内科 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 変異による MDS/AML 発症機序の解明を試み、*RUNX1* 変異と *BMI1* 過剰発現が協調的に働いて MDS/AML 発症に至ることをヒト CD34⁺細胞およびマウス BMT モデルで実証した。*RUNX1* 変異導入細胞は *BMI1* 低発現で増殖能を欠くが、*BMI1* を共発現させることによって増殖性を獲得し、その作用には *BMI1* による *ARF/INK4A* 発現低下が関与していた。

A. 研究目的

難治性造血障害である骨髓異形成症候群（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髓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

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。

（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、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。

D. 考察

RUNX1 変異に *BMI1* 高発現による増殖能亢進機序が加わって MDS/AML 発症に至る機序が明らかになった。*BMI1* 高発現は *RUNX1* 変異による直接的な作用ではなく、付加的な遺伝子異常などによって生じていると考えられる。*BMI1* はエピジェネティック

調節因子であり、転写因子変異とエピジェネティック異常の組み合わせによる新たな MDS/AML 発症機序と考えられた。

E. 結論

RUNX1 変異と *BMI1* 過剰発現が協調的に働いて MDS/AML 発症に至ることをヒト CD34⁺細胞およびマウス BMT モデルで実証した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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* 2013; 121 (3434-3446)
- Imagawa J, Imagawa J, Harada Y, Shimomura T, Tanaka H, Okikawa Y, Harada H: High early death rate in elderly patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid combined chemotherapy. *Int J Hematol.* 2013; 98 (264-266)
- Inoue D, Kitaura J, Togami K, Nishimura K, Enomoto Y, Uchida T, Kagiya Y, Kawabata KC, Nakahara F, Izawa K, Oki T, Maehara A, Isobe M, Tsuchiya A, Harada Y, Harada H, Ochiya T, Aburatani H, Kimura H, Thol F, Heuser M, Levine RL, Abdel-Wahab O, Kitamura T: Myelodysplastic syndromes are induced by histone methylation-altering *ASXL1* mutations. *J Clin Invest* 2013; 123 (4627-4640)

2. 学会発表

- Harada H, Harada Y, Inoue D, Kitamura K. *RUNX1/AML1* mutants collaborate with *BMI1* in the development of myelodysplastic syndromes. *EMBO Workshop RUNX transcription factors in development & disease (19th International RUNX Workshop)*, 2013.6.16-19, Wilsede, Germany
- 原田浩徳：アザシチジンによるMDS治療。[ランチョンセミナー：骨髄異形成症候群（MDS）の分子病態、診断と治療]。第11回日本臨床腫瘍学会学術集会，2013. 8. 29-31，仙台

- Kobayashi T, Nannya Y, Ichikawa M, Kohara T, Kobune M, Harada H, Yonemura Y, Matsuda A, Kawabata H, Tohyama K, Miyazaki Y, Kurokawa M: A nationwide survey of hypoplastic myelodysplastic syndrome (a multicenter retrospective study). The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, 2013.10.11-13, Sapporo, Japan
- Shibayama H, Harada H, Jun Ho Jang, Suzuki K, Tsudo M, Ishikawa T, Uike N, Hidaka M, Usuki K, Shimizu S, Kim Y-J, Kim H, Kizaki M, Chiba S, Nannya Y, Yonemura Y, Sawa M, Ogura H, Nakazato T, Kumagai T, Kiguchi T, Takahashi T, Irie S, Yoon S-S, Shin J-J, Young Don Joo, Yoo Hong Min, Sohn S-K, Mitani K, Sawada K, Lee J-H, Kim H-J: Preliminary results of a randomized dose-finding study of darbepoetin alfa in MDS in Japan and Korea. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, 2013.10.11-13, Sapporo, Japan
- Uchida T, Kitaura J, Nakahara F, Togami K, Inoue D, Kawabata K, Sada A, Kitayama Y, Matsui T, Harada Y, Harada H, Kitamura T: The roles of *Hes1* in the myeloid leukemogenesis. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, 2013.10.11-13, Sapporo, Japan
- Harada H, Harada Y, Inoue D, Ding Y, Matsui H, Sashida G, Iwama A, Kitamura T: *RUNX1* mutant collaborates with *BMI1* overexpression in the development of human and murine MDS/AML. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, 2013.10.11-13, Sapporo, Japan
- Miyama T, Harada Y, Ichinose T, Harada H: *RUNX3* overexpression may participate in the development of MDS/AML. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, 2013.10.11-13, Sapporo, Japan

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効性 (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 測定には分析性能を改善した高感度の non-metal high-performance liquid chromatography (HPLC) システムを用いて、登録患者の血清 NTBI 値算出を進めてきた。一方、ヘプシジン (hepc) 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、登録患者の血清ヘプシジン値算出を進めてきた。健常人の血清 NTBI 値ならびにヘプシジン・アイソフォーム濃度を基に、本研究の対象疾患における病態と鉄代謝の関係について、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。

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効性 (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

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、個人情報漏洩防止策をとっている。

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、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。

D. 考察

測定機器の経年劣化によるデータの信頼性低下・損失などを事前に回避する目的で、より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) を導入し、引き続き血清 NTBI 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。

また、汎用されている自動分析装置対応の NTBI 用測定試薬の有効性が確認されたことは、多数検体の安価な同時測定 (high-throughput) を可能とし、NTBI レベルと疾患との関係を網羅的に解析していく上で有用であると考えられる。

E. 結論

NTBI 測定には新規 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々濃度を算出した。すでに報告済みの健常人の血清 NTBI 値ならびにヘプシジン・アイソフォーム濃度を基に、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、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 測定試薬の臨床検査試薬としての有用性が期待できる結果を得た。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Ichiki K, Ikuta K, Addo L, Tanaka H, Sasaki Y, Shimonaka Y, Sasaki K, Ito S, Shindo M, Ohtake T, Fujiya M, Torimoto Y, Kohgo Y.: Up-regulation of iron regulatory hormone hepcidin by interferon α . J Gastroenterol Hepatol. 2013 Aug 8. doi: 10.1111/jgh.12348.

- 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.

2. 学会発表

- 生田 克哉, 伊藤 巧, 新関 紀康, 紀野 修一, 高後 裕: 自動分析装置による血清中非トランスフェリン結合鉄 (NTBI) 測定. 第60回日本臨床検査医学会学術集会 2013年10月31日-11月3日 神戸
- 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: 肝癌由来細胞株における鉄代謝関連遺伝子の網羅的変異解析. 第1回がんと代謝研究 2013年10月30日-11月1日 鶴岡
- 加藤 大介, 飯塚 直美, 生田 克哉, 佐々木 勝則, 高後 裕: 自動化試薬を用いた血清中 NTBI の測定. 第37回日本鉄バイオサイエンス学会 2013年9月7-8日 東京
- 田中 宏樹, アド リンダ, 生田 克哉, 伊藤 巧, 加藤 大介, 佐々木 勝則, 大竹 孝明, 鳥本 悦宏, 藤谷 幹浩, 高後 裕: トランスクリプトーム解析により検出されたマウス鉄過剰肝組織における NGF の発現亢進. 第37回日本鉄バイオサイエンス学会 2013年9月7-8日 東京
- 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: エクソームシーケンシングによる肝癌由来細胞株の鉄代謝関連遺伝子の網羅的変異解析. 第37回日本鉄バイオサイエンス学会 2013年9月7-8日 東京
- 佐々木 勝則, 生田 克哉, 田中 宏樹, 伊藤 巧, 大竹 孝明, 藤谷 幹浩, 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. 日本薬学会第133年会 2013年3月28-30日 横浜
- Yamamoto M, Tanaka H, Addo L, Ito S, Shindo M, Ikuta K, Sasaki K, Ohtake T, Fujiya M, Torimoto Y, Kohgo Y: Increased expression of

NGF in hepatocytes is an early event in iron overload mouse by transcriptome analysis. 55th ASH Annual Meeting and Exposition 2013.12.7-10, New Orleans, LA

- Ito S, Ikuta K, Addo L, Hatayama M, Yoki Y, Tanaka H, Inamura J, Shindo M, Torimoto Y, Kohgo Y: Functional validation and clinical significance of a newly established non-transferrin-bound iron (NTBI) assay system utilizing conventional automated analyzer. 55th ASH Annual Meeting and Exposition 2013.12.7-10, New Orleans, LA
- Inamura J, Ikuta K, Kato D, Iizuka N, Hatayama N, Toki Y, Tanaka H, Sasaki K, Shindo M, Torimoto Y, Kohgo Y: Nobel quantification system for non-transferrin-bound iron utilizing conventional automated analyzer. The 75th Annual Meeting of the JSH 2013.10.11-13, Sapporo
- Tanaka H, Addo L, Ito S, Ikuta K, Torimoto Y, Fujiya M, Ohtake T, Kohgo Y: Increased expression of NGF in hepatocytes is an early event in iron overload mouse by transcriptome analysis. The 72th Annual Meeting of the JCA 2013.10.3-5, Yokohama
- Sasaki K, Ikuta K, Tanaka H, Ohtake T, Torimoto Y, Fujiya M, Kohgo Y: Splicing abnormality of *HAMP* transcript by frameshift-causing deletion of *SF1* gene. The 72th Annual Meeting of the JCA 2013.10.3-5, Yokohama
- Sasaki K, Ikuta K, Tanaka H, Ohtake T, Torimoto Y, Fujiya M, Kohgo Y: Identification of *HAMP* transcript variant coding for an abnormal polypeptide in human hepatoma-derived cell line HLF. 12th Human Proteome Organization World Congress 2013.9.14-18, Yokohama

• Ikuta K, Ito S, Addo L, Hatayama M, Toki Y, Inamura J, Shindo M, Tanaka H, Sasaki K, Torimoto Y, Kohgo Y : Nobel quantification system of non-transferrin-bound iron (NTBI) utilizing automatic analyzer. 2013 IBIS Meeting BioIron 2013.4.14-18, London, UK

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

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

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

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)
研究支援者 濱 麻人 (名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 助教)

研究要旨

日本小児血液・がん学会は平成 21 年 2 月より再生不良性貧血(AA)、骨髄異形成症候群(MDS)および先天性造血不全症候群(CBFS)を対象とした中央診断を開始した。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、聖路加国際病院)で、骨髄病理標本を 1 施設(名古屋第一赤十字病院)で行っている。レビュー開始から 4 年 9 ヶ月間で 1,000 例がレビューされた。レビュー結果は AA が 137 例、refractory cytopenia of childhood (RCC) が 236 例、refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD) が 103 例、refractory anemia with excess blasts (RAEB) が 24 例、二次性 MDS が 6 例、治療関連 MDS が 21 例、若年性骨髄単球性白血病(JMML)が 82 例、CBFS が 58 例であった。AA、MDS および CBFS の診断は必ずしも容易ではなく、中央診断を行うことによりその診断の精度が上昇したと考えられる。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

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。

(倫理面への配慮)

中央診断およびそれに伴う検査については、名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得て、患者および患者保護者の同意を取得した後に行った。

C. 研究結果

平成 21 年 2 月から 2013 年 10 月までに 1,000 例(男 536 例、女 464 例、年齢:0-39 歳)が中央診断に登録され、レビューを受けた。病理標本のレビューは 838 例で行われた。骨髄不全症は 575 例で全体の 57%を占めていた。内訳は AA 137 例(24%)、RCC 236 例(40%)、RCMD 103 例(18%)、肝炎関連造血障害 38 例(7%)、CBMF58 例(10%)であった。CBMF においては Fanconi 貧血が 21 例で最も多く、次いで Shwachman 症候群が 12 例、Dyskeratosis congenita が 8 例であった。病歴から CBMF が疑われながらも診断を確定できない症例が 17 例みられた。進行期 MDS においては RAEB が 24 例、二次性 MDS が 6 例、治療関連 MDS が 21 例みられた。JMML は 82 例みられ、遺伝子解析結果は PTPN11 : 18%、NRAS : 26%、KRAS : 8%、CBL : 11%、NF1 : 4%、変異なし : 33%であった。

D. 考察

2008 年に改訂された WHO 分類に記載され

ている RCC を導入したところ、骨髄不全症の 40% を占めることが明らかになった。成人の RCMD の基準を満たす症例も 18% みられることがわかった。一方で AA が 24% にとどまり、従来、中等症 AA と診断されてきた症例が RCC、RCMD と診断されているものと考えられる。

また、病歴や身体所見から CBMF が疑われながらも確定診断がついていない症例が 17 例みられることから、CBMF に関連する遺伝子を網羅的に解析できるシステムの確立が必要と考えられる。

E. 結論

病理診断を含めた AA・MDS の中央診断システムを確立したことで、診断精度が上昇したと考えられる。また、本邦で発生する骨髄不全症の全体像が明らかになった。今後は CBMF の診断精度を上げるため、網羅的遺伝子解析システムの確立が望まれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Jeong DC, Chung NG, Cho B, Zou Y, Ruan M, Takahashi Y, Muramatsu H, Ohara A, Kosaka Y, Yang W, Kim HK, Zhu X, Kojima S. Long-term outcome after immunosuppressive therapy with horse or rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine for severe aplastic anemia in children. *Haematologica*. 2013 Nov 8. [Epub ahead of print]
- Yoshida K, Toki T, Okuno Y, Kanezaki R, Shiraishi Y, Sato-Otsubo A, Sanada M, Park MJ, Terui K, Suzuki H, Kon A, Nagata Y, Sato Y, Wang R, Shiba N, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Muramatsu H, Hasegawa D, Nakamura K, Kanegane H, Tsukamoto K, Adachi S, Kawakami K, Kato K, Nishimura R, Izraeli S, Hayashi Y, Miyano S, Kojima S, Ito E and Ogawa S. The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders. *Nat Genet*. 2013 Nov;45(11):1293-1299.
- Hira A, Yabe H, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Nakamura J, Kojima S, Ogawa S, Matsuo K, Takata M and Yabe M. Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients. *Blood*. 2013 Oct 31;122(18):3206-3209.
- Makishima H, Yoshida K, Nguyen N, Przychodzen B, Sanada M, Okuno Y, Ng KP, Gudmundsson KO, Vishwakarma BA, Jerez A, Gomez-Segui I, Takahashi M, Shiraishi Y, Nagata Y, Guinta K, Mori H, Sekeres MA, Chiba K, Tanaka H, Muramatsu H, Sakaguchi H, Paquette RL, McDevitt MA, Kojima S, Sauntharajah Y, Miyano S, Shih LY, Du Y, Ogawa S and Maciejewski JP. Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies. *Nat Genet*. 2013 Aug;45(8):942-946.
- Sakaguchi H, Okuno Y, Muramatsu H, Yoshida K, Shiraishi Y, Takahashi M, Kon A, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Makishima H, Wang X, Xu Y, Doisaki S, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Yoshida N, Maciejewski JP, Miyano S, Ogawa S and Kojima S. Exome sequencing identifies secondary mutations of SETBP1 and JAK3 in juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat*

Genet. 2013 Aug;45(8):937-941.

2. 学会発表

- Kojima S. The Asia Pacific prospective randomised study of standard vs low dose rabbit ATG in aplastic anemia. 39th Annual Meeting of the EBMT. Apr. 8, 2013. London, UK
- Kojima S. Aplastic Anemia : Therapeutic updated in HSCT. 2013 International Forum on Bone Marrow Failure. Aug.16, 2013. Tianjin, China
- Kojima S. Alternative Donor Transplant for Aplastic Anemia. The 3rd International Annual Updates on Breathrouhgs in Hematology. Aug.29, 2013. Bangkok, Thailand
- Kojima S. Haploidentical vs Matched Unrelated Donor Transplant. The 3rd International Annual Updates on Breathrouhgs in Hematology. Aug.29, 2013. Bangkok, Thailand
- Kojima S. Reports from APBMT Working Group. 18th APBMT 2013. Nov.1, 2013. Ho Chi Minh, Vietnam
- Kojima S. Clonal Evolution from Aplastic Anemia to Myelodysplastic Syndrome with Monosomy7. 7th International Congress on Shwachman-Diamond Syndrome. Nov. 3-6, 2013. Toronto, Canada

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
該当なし

JAK2 遺伝子変異の高感度検出法の開発

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

制限酵素処理と人工核酸プローブを用いて、*JAK2* 遺伝子変異を高感度に検出可能な技術を開発した。本技術は、対象の *JAK2* 遺伝子変異を 0.05%まで、擬陽性を生ずることなく検出できるため、骨髄増殖性腫瘍の診断確定に有用である。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

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 *Bsa*XI 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 *Bsa*XI 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。

(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、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

JAK2V617F 陽性率が既知のサンプルを用いて、本手法の検出感度を検討したところ、0.05%までの変異を検出できた。また、健常者コントロール 30 検体を用いた擬陽性率の検討 (10 名で 3 回アッセイ) では、一例も擬陽性は検出されなかった。さらに、MPN が疑われる症例 38 検体を対象とし、本技術により *JAK2V617F* 変異の有無を確認したところ、PV と二次性の多血症を明確に区別できた。

D. 考察

本研究において確立した新規技術は *JAK2V617F* 変異を 0.05%まで確実に判別可能であり、既往の報告と比較しても遜色ない感度であった。また、既

往の報告ではおよそ 10%の割合で擬陽性を生じることが問題となっているが、本技術では、健常人サンプルを用いた擬陽性率の検討で *JAK2*野生型遺伝子由来のシグナルは確認されず、擬陽性を生じることなく対象の *JAK2V617F* 変異を明確に判別できると期待される。さらに、変異の検出を試みた MPN 検体 38 症例のうち、特に PV が疑われる 3 症例に着目すると、1 例が *JAK2V617F* 変異陽性、2 例が陰性であった。これらのヘモグロビン濃度、赤血球数を過去に遡って経時的に追跡したところ、変異が陰性であった症例はいずれも二次性の多血症であったことが強く示唆された。このことから、本技術は臨床情報に則した結果を得られることがわかった。本技術は、MPN の確定診断に大いに寄与するものと考えられる。

E. 結論

本検出法は今後さらに発見されるであろうと予想される種々の遺伝子マーカーの検出・定量へ

も応用可能であり、臨床検査医学の分野への幅広い貢献が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

● 森下総司, 高橋廣智, 弘中由美, 角南義孝, 枝廣陽子, 八幡悠里子, 荒木真理人, 大坂顕道, 関口勇地, 野田尚宏, 常田聡, 小松則夫. 「高感度, 高信頼な *JAK2V617F* 検出技術の開発」第 75 回に本血液学会学術集会, 2013. 10. 11-13, 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

森下総司, 小松則夫. 「*JAK2* 変異遺伝子の検出方法」特願 2013-207818

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: 南谷 泰仁(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)の臨床的特徴を明らかにするため、21施設および central review database から集計された hMDS のデータ 143 症例分を non-hMDS のデータ 143 症例分と比較しつつ後方視的に解析した。hMDS では non-hMDS に比べて FAB 分類の RA ないし WHO 分類の RCUD が特に多く、血球数の減少も有意に低下していることが確認された。生存分析では hMDS の全生存率・非白血病生存率は共に non-hMDS よりも高く、特に IPSS-R の低リスク群においてその傾向が認められた。また、hMDS は non-hMDS に比べて白血病のリスクは低く、逆に骨髄不全死のリスクは高かった。最適な治療選択を明らかにするには、更に大規模の臨床研究を要する。

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、低形成性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・白血病化のリスク因子、白血病化および骨髄不全死の cumulative incidence などを調べた。

(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

2013年9月7日までに21施設および central review team から143症例の hMDS データが集計され、これらを143症例の non-hMDS データと比較した。

hMDS の患者背景は non-hMDS に比べ、FAB 分類の RA, WHO 分類の RCUD の割合が特に多かった他、血球減少もより重度であった。家族歴・喫煙歴を有する患者は寧ろ少なかった。

生存分析では、hMDS の overall survival (OS), AML progression-free survival (AML-PFS) は共に non-hMDS よりも高く、特に顕著な差が認められたのは 50 歳未満および IPSS の低リスク群(low and intermediate-1)における AML-PFS、および IPSS-R の低リスク群(very low - intermediate)における OS と AML-PFS であった。

競合リスク解析により白血病化と骨髄不全死のリスクを調べたところ、hMDS は non-hMDS に比べて白血病化のリスクが低く、骨髄不全死のリス

クは高かった。hMDS の白血病のリスクは non-hMDS に比べ、年齢に関しては全年齢層に亘り低かったが、IPSS, IPSS-R に関しては低リスク群で hMDS の方が non-hMDS に比べて有意に低かった。一方、骨髄不全死のリスクは特に 50 歳以上および IPSS-R の高リスク群 (high and very high) において hMDS の方が non-hMDS より有意に高かった。

比例ハザード解析により、男性、PS ≥ 2 , および IPSS-R の核型に関する高リスク群 (poor and very poor) が hMDS の死亡および白血病化の有意な危険因子であることが判明した (non-hMDS および全 MDS でも PS および核型は有意な危険因子であった)。

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、hMDS 患者のデータ集積は 143 症例でも不十分であり、適切な治療選択を解明するには、更に大規模な調査研究を要する。

E. 結論

hMDS が non-hMDS に比べて全生存率・非白血病化生存率ともに高く、また白血病化のリスクは低い骨髄不全死のリスクは高いことも示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

● Nakazaki K, Nannya Y, and Kurokawa M.

Distribution of serum erythropoietin levels in lower risk myelodysplastic syndrome cases with anemia. *Int J Hematol* 2014 Jan;99(1):53-6.

● Nukina A, Kagoya Y, Watanabe-Okochi N, Arai S, Ueda K, Yoshimi A, Nannya Y, and Kurokawa M. Single-cell gene expression analysis reveals clonal architecture of blast-phase chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2014 [Epub ahead of print] PMID: 24401018

● Hangai S, Nakamura F, Kamikubo Y, Honda A, Arai S, Nakagawa M, Ichikawa M, and Kurokawa M. Erythroleukemia showing early erythroid and cytogenetic responses to azacitidine therapy. *Ann Hematol* 92: 707-9, 2013.

● Ichikawa M, Yoshimi A, Nakagawa M, Nishimoto N, Watanabe-Okochi N, and Kurokawa M. A role for RUNX1 in hematopoiesis and myeloid leukemia. *Int*

J Hematol 97: 726-34, 2013.

● Kobayashi T, Ichikawa M, Kamikubo Y, and Kurokawa M. Acute myeloid leukemia with cryptic CBFβ-MYH11 type D. *Int J Clin Exp Pathol* 6: 110-2, 2013.

● Kobayashi T, Ichikawa M, Nannya Y, and Kurokawa M. The effect of decreased-dose idarubicin for elderly patients with acute myeloid leukemia. *Jpn J Clin Oncol* 43: 1047-51, 2013.

● Watanabe-Okochi N, Yoshimi A, Sato T, Ikeda T, Kumano K, Taoka K, Satoh Y, Shinohara A, Tsuruta T, Masuda A, Yokota H, Yatomi Y, Takahashi K, Kitaura J, Kitamura T, and Kurokawa M. The shortest isoform of C/EBPβ, liver inhibitory protein (LIP), collaborates with Evi1 to induce AML in a mouse BMT model. *Blood* 121: 4142-55, 2013.

2. 学会発表

● 中崎久美、南谷泰仁、黒川峰夫 Outcome of off-guideline treatments for severe aplastic anemia: A single center study 第75回日本血液学会学術集会 札幌 2013.10.12-14

● 小林隆、南谷泰仁、市川幹、小原尚恵、小船雅義、原田浩徳、米村雄士、松田晃、川端浩、遠山薫、宮崎泰司、黒川峰夫 A nationwide survey of hypoplastic myelodysplastic syndrome (A multicenter retrospective study) 第75回日本血液学会学術集会 札幌 2013.10.12-14

● Yoshimi A, Toya T, Nakagawa M, Kawazu M, Nannya Y, Ichikawa M, Arai S, Harada H, Usuki K, Hayashi Y, Ito E, Kirito K, Nakajima H, Mano H, and Kurokawa M. The genetic landscape of FPD/AML revealed CDC25 C mutation as a driver that promotes malignant transformation. The American Society of Hematology Annual Meeting, New Orleans, U SA, Dec.7-10, 2013

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。2013 年 6 月末までに計 43 例に対して同治療を施行し、2013 年 12 月時点で解析を行った。43 例中 16 例 (37.2%) が生存中、そのうち 14 名が移植後寛解を維持していた。昨年報告した再発後にドナーリンパ球輸注のみで再寛解となった 1 例は現在も再発なく長期寛解を維持している。

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。

B. 研究方法

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 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 ① fludarabine (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。

(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。

C. 研究結果

全 43 例中 16 例が現在も生存を続けており、生存期間の中央値は 490 日であった (図 1)。死亡した 27 例のうち、1 年以内の死亡は 21 例あり、うち 8 例が原疾患の増悪によるものであった。また、移植後 1 年経過後に原疾患の増悪で死亡したのは 1 例に留まった。

前回報告したドナーリンパ球輸注のみで再寛解となった RAEB-1 症例は現在も完全寛解を維持している。また、3 例の二次癌 (1 例: 腎癌、2 例: 食道癌) 症例は加療により現在も生存中であった。

今回の解析でもこれまでと同様、病型による生存率に有意差はなかった。(図 2、3)

Overt leukemia および解析不能例を除いた 29 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4)。

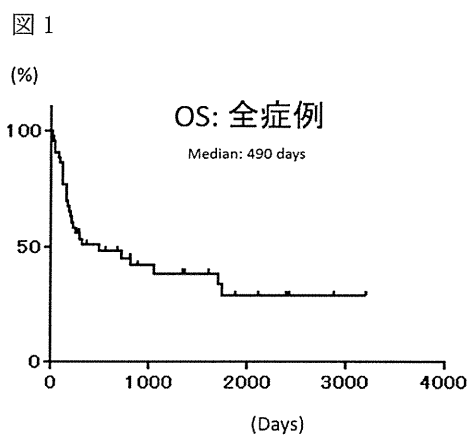


図2

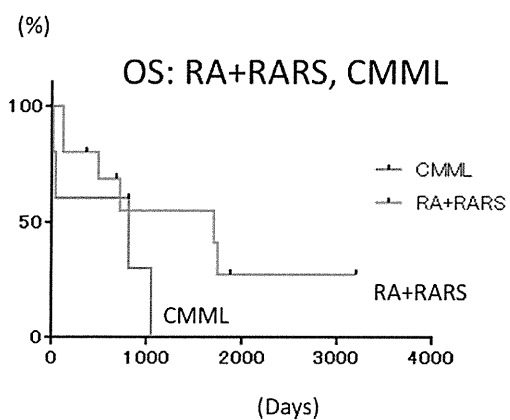


図3

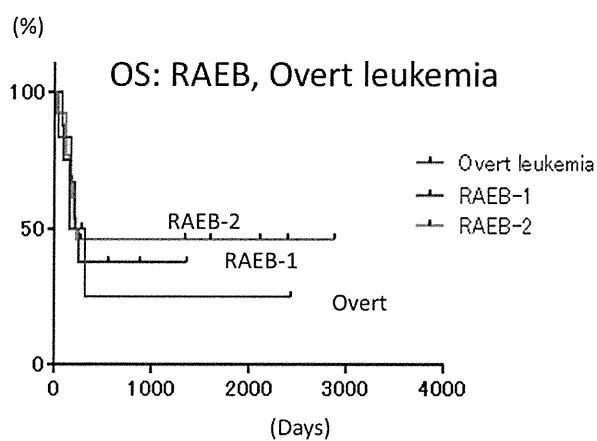
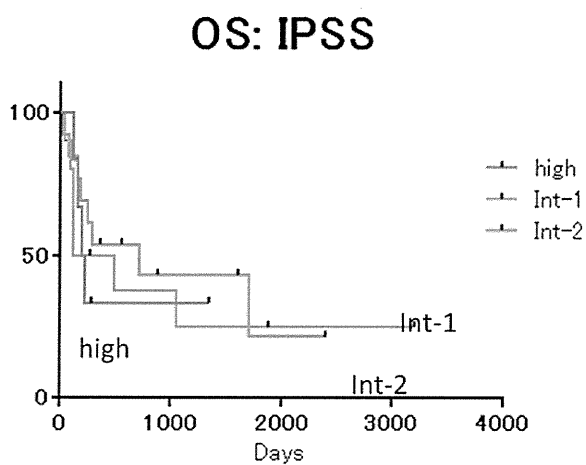


図4



D. 考察

MDS に対する RIST は一定の抗腫瘍効果をもたらし、移植前病期に関わらず治癒の可能性があることが確認された。

E. 研究発表

1. 論文発表

Asada N, Katayama Y, Sato M, Minagawa K, Wakahashi K, Kawano H, Kawano Y, Sada A, Ikeda K, Matsui T, **Tanimoto M.** Stem Cell. 2013 Jun 6;12(6):737-47

2. 学会発表

1) 浅野豪、近藤英生、佐伯恭昌、長谷川詠子、黒井大雅、西森久和、松岡賢市、浅田騰、藤井敬子、藤井伸治、前田嘉信、品川克至、谷本光音 : 当院造血細胞移植症例における Disease Risk Index の有用性の検討 第 75 回
日本造血細胞移植学会総会 2013. 3. 9(金沢)

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おけるゲノムおよびエピゲノムの解析

研究協力者：千葉 滋（筑波大学・教授）

研究要旨

骨髄異形成症候群患者における近年の TET2 遺伝子異常の報告、および筆者ら自身による患者検体の TET2 遺伝子シーケンスなどの結果から、一部のリンパ腫が骨髄でクローン性に増殖している前駆細胞を母地として発症し、これがリンパ腫における原因不明の造血異常の原因の一部であることが推察される。そこで造血異常症と悪性リンパ腫合併に関する全国アンケート調査を行った。一次調査では 39 施設から 66 例について合併例ありとの回答を得た。これらの施設にアンケート用紙を発送して二次調査を行い、同時発症 26 例、逐次発症 19 例について詳細な情報が得られた。

A. 研究目的

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症母地になっていると推察される。

B. 研究方法

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に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。

（倫理面への配慮）

患者情報の収集にあたっては、ヘルシンキ宣言（2008 年ソウル修正）を遵守し、また「疫学研究に関する倫理指針」（平成 14 年 6 月 17 日；文部科学省、厚生労働省；平成 20 年 12 月 1 日一部改正）を遵守した上で、施設

倫理委員会の承認を経て遂行した。

C. 研究結果

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 例がであった。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)。

	同時発 症 (N=26)	逐次発 症 (N=19)	P
年齢 65 以上	16	16	0.182
男：女	16:10	10:9	0.761
対象疾患			
MDS	16	12	1
リンパ腫			
DLBCL	13	9	1
リンパ腫			
FL	5	1	0.222
悪性腫瘍既往(+)	3	2	1
抗癌剤投与(+)	0	0	1
放射線歴(+)	2	0	0.501
Hb12 未満	23 (N=25)	13	0.06
Plt10 万以下	13 (N=25)	10	1
WBC3000 未満	7 (N=25)	13	0.014
染色体異常(+)	12 (N=24)	3 (N=15)	0.093
8 番トリソミー	4 (N=24)	0 (N=15)	0.146
7 番関連の異常	3 (N=24)	1 (N=15)	1
20 番関連の異常	2 (N=24)	2 (N=15)	0.631

D. 考察

別途、悪性リンパ腫患者の腫瘍組織や血液から細胞を分離して TET2 や DNMT3A 遺伝子の変異解析を進めており、造血幹細胞から腫瘍発症にいたる過程を明らかにしつつある。造血異常症と悪性リンパ腫の合併例は、クローン性に拡大した共通の母地から発症していると推察される。

E. 結論

造血異常と悪性リンパ腫の合併例 45 例について詳細な臨床情報が得られた。今後は検体の DNA 解析を行うことを計画している

F. 研究発表

1. 論文発表

● Kurita N, Obara N, Fukuda K, Nishikii H, Sato S, Inagawa S, Kurokawa T, Owada Y, Ninomiya H, Chiba S. Perisurgical induction of eculizumab in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. its inhibition of surgery-triggered hemolysis and the consequence of subsequent discontinuation. Blood Coagul Fibrin. 2013; 24(658-662)