

201324004B

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23年度～25年度 総合研究報告書

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23年度～25年度 総合研究報告書

研究代表者 黒川 峰夫

平成26（2014）年 3月

目 次

I. 総合研究報告

特発性造血障害に関する調査研究 ----- 1

黒川 峰夫

(資料1) 市民公開講座パンフレット

II. 研究成果の刊行物に関する一覧表 ----- 29

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 73

I. 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
（総合）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。

再不貧の領域では、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、細胞傷害性T細胞の病的意義の解明が進み、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い。本邦固有のエクリズマブ不応PNH症例の解析・遺伝子変異特定がなされた。また、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。

MDS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い特許取得が成された。

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。血液悪性腫瘍患者において、同種造血幹細胞移植前の血清フェリチン値高値が予後不良因子であることも示された。

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。これは当研究班のホームページ上で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

直江 知樹

名古屋大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学 教授

中尾 眞二

金沢大学医薬保健研究域医学系 教授

澤田 賢一

秋田大学大学院医学系研究科 血液・腎臓病・膠原病内科学分野 教授

赤司 浩一

九州大学大学院医学研究院 病態修復内科学 教授

宮崎 泰司

長崎大学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

冨田 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

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」慢性赤芽球癆において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。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を目指す。ABO-major 不適合ドナーからの同種造血幹細胞移植後に発症する赤芽球癆に対する標準的治療を確立する。

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。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より正確な推計を試みた。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いる。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)には先天性の骨髄不全症(Bone marrow failure: BMF)が合併し急性白血病などの造血器腫瘍の発生が認められる。DKCの約40%の症例は原因遺伝子変異が同定されていない。次世代シーケンサーを用いてDKCや不全型DKCにおける新規の原因遺伝子変異の探索を行った。

A. 研究目的

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」

造血幹細胞上の特定の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(CTLs)が、AAの発症に関与している可能性を検討するため、各白血球系統別に片側HLAアレル欠失血球(HLA-LLs)の有無を検討した。

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」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が本邦第 2 相臨床試験において 2 例の不応例を認めた。本邦特有のエクリズマブ不応性機序の解明を試みた。

②「自己免疫性溶血性貧血のデータベースの構築と臨床病態の解明」今回、IgM または IgA 自己抗体によるクームス陰性自己免疫性溶血性貧血 (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。

③「GPI アンカー欠損症の解析」近年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。症例を集積調査し疾患概念の確立することを目的にスクリーニングを開始した。

④「PNH 造血障害の分子病態の解明～NKG2D 免疫の意義の確立～」再生不良性貧血 (AA) と似た特発性造血障害を呈する PNH の病態解析を進め、新しい診断と治療法の確立を目指している。

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」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に関する臨床研究」成

人 骨髄異形成症候群 (MDS) 患者を対象に血清 EPO 値を測定し、赤血球造血刺激因子製剤 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 値と相関する臨床検査値について検討を行った。また輸血後鉄過剰症に対する鉄キレート療法後に造血能の改善が認められる症例が存在するが詳細については依然不明で、本研究班では鉄キレート施行症例を前向きに登録・調査し臨床的特徴について検討を行った

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」2012 年に本班も参加した国際共同研究として予後予測スコアリングシステム改訂がなされ (IPSS-R) が作製された。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「MDS における遺伝子異常と DNA メチル化酵素阻害剤治療反応性に関する研究」MDS におけるゲノム・エピゲノム異常をより簡便に経時的に検出する方法の確立をめざし、また治療反応性に関する可能性が推測されている遺伝子異常に着目し、その頻度や病態への関与について明らかにする。

⑤「骨髄異形成症候群に対する治療法の検討」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。

⑥「RUNX1 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。*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」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「骨髄増殖性腫瘍でみられる遺伝子変異の高感度検出技術」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。

⑨「低形成性骨髄異形成症候群に関する全国調査」本邦における低形成骨髄異形成症候群 (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 への最適な治療選択を解明する。

⑩「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」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。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可能性について検討する。

⑪「日本における後天性鉄芽球性貧血の病態」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。

⑫「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 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が詳細は不明である。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。

⑬「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。

⑭「骨髄異形成症候群 (MDS) の形態診断に関する包括的取組み」骨髄異形成症候群 (MDS) の形態診断の標準化とその普及啓発を目指す。

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と二次性骨髄線維症の

基礎疾患」本邦の骨髓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。海外で行われた調査と同様な方法を用い、本邦の骨髓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比較する。本邦の骨髓線維症に伴う自覚症状、および本邦における二次性骨髓線維症の基礎疾患を明らかにする。

5. 造血幹細胞移植

①「骨髓異形成症候群に対する同種造血幹細胞移植の最適化に関する研究」同種造血幹細胞移植によって骨髓異形成症候群 (MDS) 患者の完璧な社会復帰に至る治癒を達成するために、移植患者選択および移植前処置の最適化について検討する。

②「骨髓異形成症候群に対する骨髓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に与える影響については一定の結論は得られていない。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」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「小児の骨髓異形成症候群 (MDS) の研究」本研究では小児 MDS 基礎研究のさらなる推進と治療方法の確立をめざす。特に遺伝性骨髓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「小児骨髓不全症における中央診断およびその臨床像の比較」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い実態把握を行った。

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」先天性造血障害に対する効率的な診断法の確立をめざし、様々な診断方法を検討する。正確な病態把握を行い指摘移植方法を確立、成績向上を目指す。

B. 研究方法

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。移植後赤芽球癆については日本造血細胞移植学会のデータベースを用い後方視的解析を行った。

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—」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。

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」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 Hoyeraal-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。DKC1、TERC、TERT、NOP10、MHP2、TINF2、TCAB1 といった既知の遺伝子変異のスクリーニングを従来方法にて遺伝子解析を行い。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次世代シーケンサーを用いて全 exon シーケンスを行う。

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常人）より血液を採取して解析を行った。

②「自己免疫性溶血性貧血のデータベースの構築と臨床病態の解明」データベースの溶血性貧血582例の解析から、クームス陽性温式AIHA 62例とクームス陰性温式AIHA 154例について比較検討した。クームス陰性AIHAを来す3つの機序（クームス試験感度以下の赤血球結合IgG自己抗体、IgMまたはIgA自己抗体、低親和性自己抗体）を元に分類を試みた。炎症性サイトカインの1つであるST2の血中濃度を、本データベースで検索した。

③「GPI 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臨床所見の合致する 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次世代シーケンサー（Ion PGM）で遺伝子変異を解析した。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。

④「PNH 造血障害の分子病態の解明～NKG2D 免疫の意義の確立～」 C9 欠損 PNH 症例の過去 30 年以上の臨床経過における溶血、血栓症、造血障害などの主病態の変遷、治療効果、生活の質 (QOL) を評価した 1 つの *PIGA* 変異クローンが 8 年以上、患者の全血球を占拠している PNH 例において、変異クローンの *PIGA* と *HMG2* の遺伝子解析、フローサイトメトリーによる GPI 結合蛋白と NKG2D リガンドの発現解析をした。PNH と AA と骨髄異形成症候群 (MDS) などの 67 人の BFS 患者の血球膜と血中の NKG2D リガンド (MICA) の発現を、それぞれフローサイトメトリーと ELISA で測定した。

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」 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に関する臨床研究」
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ームドコンセントを取得し、血清 EPO 値を測定した。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。輸血後鉄過剰症と診断され鉄キレート療法を開始した患者 100 名を対象とした。最長 5 年間にわたって、輸血量・原疾患の状

態などの基本データ、血清フェリチンなどの鉄代謝マーカー、血液学的データ、生化学データを収集し、鉄キレート療法の継続率、有害事象、治療後の造血回復などについて評価を行った。

②「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」 埼玉医科大学、特発性造血障害調査研究班、長崎大学から合計 523 例のデータが提出され、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 IPSS-R の有用性を検討した。

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「MDS における遺伝子異常と DNA メチル化酵素阻害剤治療反応性に関する研究」 MDS 患者より採取された PB-cfDNA を抽出し、断片のパターンや濃度を定量し、臨床検査値との関連性を検討した。ゲノム DNA を用いて、*L1NE-1* 遺伝子プロモーター CpG 部位のメチル化解析を行った。抽出された遊離 DNA をバイサルファイト処理後にパイロシーケンスを施行し、特定 CpG 部位のメチル化を定量化し統計解析した。MDS 患者骨髄検体よりゲノム DNA、mRNA、全細胞溶解液を抽出し、遺伝子変異、遺伝子発現定量、蛋白発現の検討を行った。

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。

⑥「RUNX1 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】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。【ヘプシジン測定】 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。

⑧「骨髄増殖性腫瘍でみられる遺伝子変異の高感度検出技術」*JAK2* 野生型遺伝子と *JAK2*V617F 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 *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 *JAK2*V617F の有無を確認した。

⑨「低形成性骨髄異形成症候群に関する全国調査」

2003年4月1日から2012年3月31日に診断された低形成性 MDS 症例を対象として患者背景、臨床像、治療反応性、予後などを調査した。

⑩「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。

⑪「日本における後天性鉄芽球性貧血の病態」日本国内の血液診療施設に対し、調査票を送付し、臨床データを回収し、解析を行った。実施に当たっては、倫理委員会での承認を得た。

⑫「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。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。

⑬「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」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。

⑭「骨髄異形成症候群 (MDS) の形態診断に関する包括的取組み」多施設共同研究として本研究に参加している施設において新規に診断された再生不良性貧血、MDS、あるいは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が、骨髄の芽球比率 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実施する。

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、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と二次性骨髄線維症の基礎疾患」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。

5. 造血幹細胞移植

①「骨髄異形成症候群に対する同種造血幹細胞移

植の最適化に関する研究」移植前臓器障害 (co-morbidity) の総合的指標である HCT-CI スコアを用い、急性骨髄性白血病・MDS147 例を含む 244 例を prospective に 2 年間経過観察し、HCTCI スコアが移植後の生存率、非再発死亡率、再発率に及ぼす影響について検討した。移植前処置に関しては、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の臨床第 I 相試験を計画実施した。

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 名に対して骨髄非破壊的移植を行った。年齢中央値は 59 歳で、男性 38 名、女性 5 名であった。2013 年 12 月時点で解析を行い治療効果を検討した。

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」種先天性造血障害を持つ患者の皮膚から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 因子をエピソーマル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、

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「小児骨髄不全症における中央診断およびその臨床像の比較」中央診断事務局を名古屋大学小児科に設置した。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」先天性造血障害として診断/造血細胞移植目的で東海大学小児科・細胞移植科に紹介された 90 例の FA において、DEB を含む染色体脆弱性検査、MLPA 法、RT-PCR 法および全エクソーム解析を施行した。また小児再生不良性貧血 (AA) の移植成績を解析し、後天性 AA における生着後造血不全の臨床像を解析した。

(倫理面への配慮:本研究班全体)

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-LLs は 32/120 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%(%)1))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」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 ($p<0.001$)。移植後赤芽球癆に関しては46例の移植後赤芽球癆ぶ輸血以外の治療として免疫抑制薬の急速減量、副腎皮質ステロイドあるいは免疫抑制薬の追加などが22例に実施されていた。治療による奏効率は54.5%であったが、網赤血球数回復に要する日数および総輸血量は治療介入の有無により差は見られなかった。

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—」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。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。

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」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)であった。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%で年数を追って改善する傾向にあり、貧血症状、出血症状、発熱ともに新規、2年目、3年目と減少していた。治療に関しては新規、2年目、3年目と「造血細胞移植療法」が少しずつ増加し、「成分輸血」は減少した。

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 Hoyeraal-Hreidarsson syndrome 1症例、DKC4症例、不全型DKC13症例に対して検討を行った。DNAヘリカーゼ遺伝子群では *RTEL1* 変異などが、テロメラーゼ複合体遺伝子群では *TEPI1* 変異が、Shelterin複合体遺伝子群では *ACD(TPPI)* 変異が新規の原因遺伝子変異の候補として発見された。

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」不応例のC5ゲノムを解析したところ変異 (c.2684G>A)を同定し、反応例7例には認めなかった。上市後に把握された不応例全例で同変異を確認した。健常人288例の解析でも10例に同変異を確認した (頻度3.5%)。同変異の人種間の広がりを探したところ、白人 (ブリティッシュ)と

メキシコ原住民には検出されなかったが、中国漢民族において検出された。同変異を組み込んだ組み換え型変異蛋白の溶血活性は維持されていたが、エクリズマブとは結合できなかつた。

②「自己免疫性溶血性貧血のデータベースの構築と臨床病態の解明」特発性クームス陰性 AIHA のステロイド反応性に血清総たんぱく量が関係しており、Evans 症候群の合併が短期予後のリスクとなった。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。ST2 と白血球数と間で有意な正の相関を認め、白血球分画については、ST2 と好中球の間に有意な正の相関を認め、好酸球との間には有意な負の相関を認めた。

③「G P I 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が著しく活性が低下することがわかつた。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、PIG0 欠損症を発見した。

④「PNH 造血障害の分子病態の解明～NKG2D 免疫の意義の確立～」1972 年に診断された先天性 C9 欠損合併 PNH の患者は 78 歳の今でも、僅かな血管内溶血と潜在的血管外溶血を認めるが、溶血発作、血栓症、重篤感染症はなく、良質の生活を堅持している。約 40 年の長期間、また高齢の患者における後期補体抑制療法の安全性と有効性を支持した。患者の全血球が単一の PIGA 変異クローンで占拠され、造血障害は軽度であった。血球膜に NKG2D

免疫を誘発するリガンドが病的発現し NKG2D 免疫による造血障害を支持した。この免疫ではリガンドの一つである ULBP (GPI 結合) を欠損する PNH クローンは生存優位を獲得する。また PNH クローンには良性腫瘍様増殖をもたらす *HMG2* 発現亢進も検出された。BFS 患者 6 7 例 (PNH 1 4 例を含む) の約半数に MICA の血球膜病的発現が検出された。

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」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に関する臨床研究」

表2 血液学的パラメータと EPO 値の相関

	n	相関係数 rs	p値
ヘモグロビン	35	-0.72	2.4×10 ⁻⁵
ヘマトクリット	35	-0.72	2.4×10 ⁻⁵
網状赤血球	30	-0.28	0.13 (NS)
白血球数	35	-0.32	0.06 (NS)
血小板数	35	-0.17	0.33 (NS)

EPO はヘモグロビン (Hb) およびヘマトクリット (Ht) 値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 は、 $\text{Log EPO} = -0.23 \times \text{Hb} + 4.52$ で近似されることが明らかとなり、EPO 500 mIU/mL に相当する Hb は 7.96 g/dL と推定された。また国内では高齢の MDS あるいは再生不良性貧血患者に対して多くキレート療法が施行されていることが明らかとなった。そして約半数の症例でキレート療法が中止されており、その理由は死亡と造血幹細胞移植が最も多く、鉄過剰症の改善に伴うものは全体の 5% 程度に過ぎないことが明らかとなった。また、造血改善は全体の 8% 程度に認められた。

②「骨髄異形成症候群の改訂国際予後スコアリン

「グシシステムの検証」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。

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」平成 25 年には 11 月までに新たに 40 例の症例登録があり、通算登録症例数は 275 例となった。これらの登録症例のうち、骨髄芽球が 5% 未満の症例については骨髄標本のセントラルレビューを行い、計 225 例の中央診断が終了している。平成 25 年末には 5 回目の追跡調査を実施し、これまでに 198 症例についての生存期間を含めた臨床情報が得られている（下図 1）。

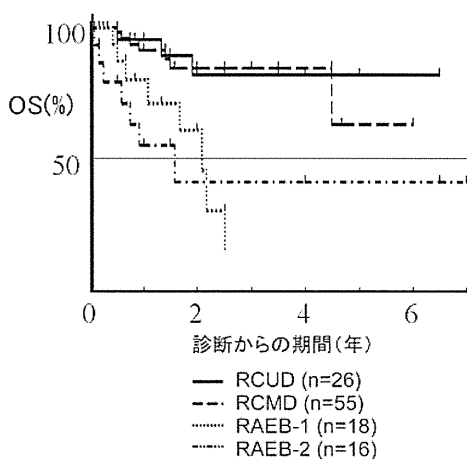


図1 中央診断別のMDSの全生存期間。

骨髄異形成症候群に関するこれまでの解析では、初診時年齢 50 歳以上、骨髄芽球 2% 超、複雑核型

またはモノソミー 7 の存在が、有意な予後不良因子として抽出されている。

④「MDS における遺伝子異常と DNA メチル化酵素阻害剤治療反応性に関する研究」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 がより脆弱な芽球を由来とする可能性が示唆された。また、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が示唆された。PB-cfDNA を用いたゲノム・エピゲノム解析は、従来の骨髄細胞を採取しての遺伝子解析の代替法として有望である可能性が示唆された。

⑤「骨髄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。アザシチジン施行症例は 8 例で奏効率は 25%であった。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。

⑥「RUNX1 変異と BMI1 の協調作用による MDS 発症機序」*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。

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】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。【自動分析装置による NTBI 測定試薬の開発】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。

⑧「骨髄増殖性腫瘍でみられる遺伝子変異の高感度検出技術」*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、健常者では一例も擬陽性は検出されなかった。MPN が疑われる症例 38 検体を対象に *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。

⑨「低形成性骨髄異形成症候群に関する全国調査」低形成性 MDS(hMDS) 143 症例を非低形成性 MDS(non-hMDS)143 症例と比較したところ、hMDS の 5 年全生存率は 62%、5 年非白血病化生存率は 61%で、いずれも non-hMDS より予後良好であることが示された。また、hMDS の 5 年累積白血病化率は 18%で non-hMDS よりも低かったが、5 年累積骨髄不全死率は 20%で non-hMDS よりも高かった。

⑩「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」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 例について悪性リンパ腫と造血障害合併例ありと回答し調査を

依頼した。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。

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)。

⑪「日本における後天性鉄芽球性貧血の病態」後天性鉄芽球性貧血への VitB6 の効果は限定的であり、RCMD は RARS と比較してより予後が不良であった。遺伝子解析結果、後天性鉄芽球性貧血 (MDS) では本邦においても *SF3B1* の遺伝子変異が既報通りの頻度で認められ先天性鉄芽球性貧血においては *SF3B1* の遺伝子変異が認められなかった。遺伝性鉄芽球性貧血では *ALAS2* 遺伝子の変異が最も多かった。

⑫「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」好中球数は DysG10%以上の症例と DysG10%未満の症例に有意差を認めなかった ($p=0.83$)。血小板数は、DysMgk10%以上の症例が DysMgk10%未満の症例よりも高い傾向 ($p=0.08$) にあり、DysMgk40%以上の症例は DysMgk40%未満の症例よりも有意に高値であった ($p=0.02$)。微小巨核球 (mMgk) 10%以上の症例は mMgk10%未満の症例よりも有意に血小板数が高値であった ($p=0.004$)。赤芽球系では、全例に DysE10%以上を認めた。血球減少の系統と形態学的異形成の系統とは一致しなかった。

⑬「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)症例間を通して Bmi1 と Evi1, ERG の発現との間に相関を認めた。一方、ERG は健康人 CD34+CD38-細胞においても Bmi1 と相関を認めた。2) 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。

⑭「骨髄異形成症候群 (MDS) の形態診断に関する包括的取組み」前方視的症例登録・セントラルレビュー・追跡調査が進行した。平成 24 年度に骨髄検査技師認定制度が正式に発足し、24 年 9 月に受験予定者を対象に講習会を、25 年 3 月に第 1 回目の認定試験を実施した。

4. 骨髄線維症

①「本邦の原発性骨髄線維症の臨床像」本邦の原発性骨髄線維症 619 例の臨床情報を集積、解析した。生存期間の中央値は 4.0 年で、5 年生存率 41% である。国際的な予後スコアリングシステムである DIPSS-Plus (Dynamic International Prognostic Scoring System for PMF-Plus) を本邦の症例に適用すると、予後不良群の抽出が可能であり、本邦においても予後指標として有用であった。

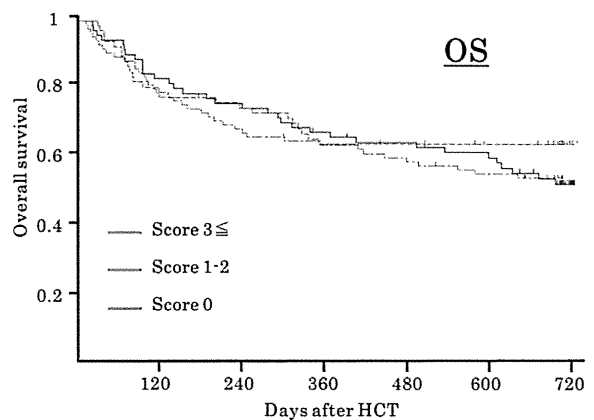
②「骨髄線維症の自覚症状と二次性骨髄線維症の基礎疾患」骨髄線維症に伴う全身倦怠感、発熱、意図しない体重減少の頻度は、患者自身による評価によると、それぞれ 78.4%、10.8%、32.4% であり、医師による評価に比べ高値を示した。発熱、体重減少に関しては、日本人と欧米人の間に有症状の割合に差を認めた。本邦の二次性骨髄線維症

の基礎疾患は、ET 46%、MDS 24%、PV 8% であった。

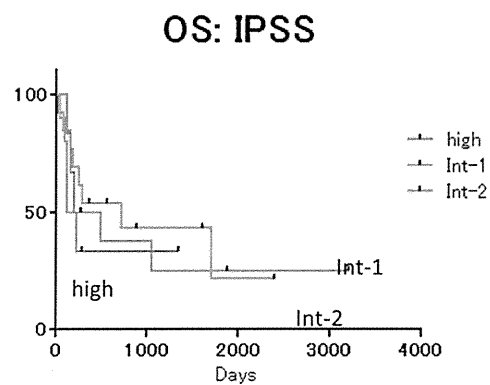
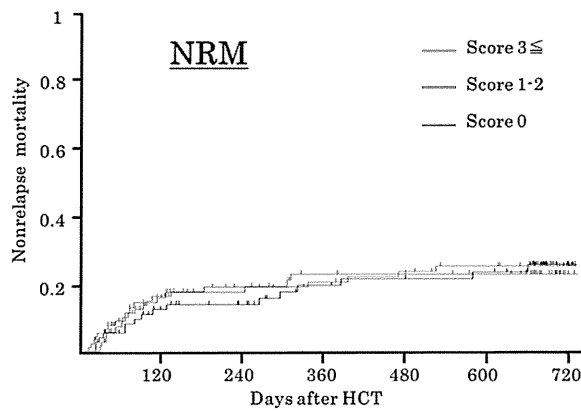
5. 造血幹細胞移植

①「骨髄異形成症候群に対する同種造血幹細胞移植の最適化に関する研究」移植前臓器障害 (co-morbidity) の総合的指標 HCT-CI スコアについては、移植後 2 年の時点での非再発死亡率・生存率との相関関係は明らかではなかった (下図)。また Plerixafor 併用前処置の安全性がほぼ確認され、約 50% の症例で MDS 細胞の動員効果があることが示唆された。

・ HCT-CI score 別移植後 2 年生存率

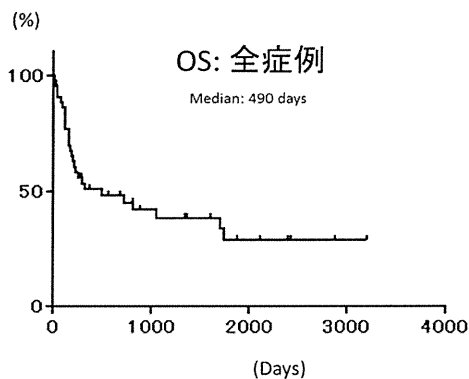


・ HCT-CI score 別移植後 2 年非再発死亡率



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」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（下図 1）。死亡した 27 例のうち 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。

・図 1 全症例の生存率



病型による生存率に有意差はなかった。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 Int-1, Int-2, High の 3 群では有意差を認めなかった（下図 2）。

・図 2 IPSS 別の全生存率

③「特発性造血障害に対する造血幹細胞移植」血清フェリチン値が 2000ng/mL 以上の症例を高フェリチン群 (n=26)、2000ng/mL 未満を低フェリチン群 (n=110) とし患者背景において 2 群に有意な差を認めなかった。高フェリチン群は、High-risk 群、HCT-CI3 以上群と並び単変量解析において OS の予後不良因子として挙げられた。

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」Fanconi 貧血 (FANCA)、細網異型性症ではエピゾーマルベクターを用いた方法を試みた。結果、多能性幹細胞と同様の特徴を持ち、尚且つ FA 経路が欠損した細胞株を樹立することができた。FA 患者由来 iPS 細胞は、コントロール細胞株と比較して、造血前駆細胞、骨髄系細胞、赤血球系細胞において、数が劇的に減少していた。一方、血管内皮においては、FANCA 欠損株で明らかな欠損は認められなかった。

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 1999 年から 2008 年まで行ってきた小児 MDS 中央診断に登録された 618 例のうち