

2014/5097A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等政策研究事業

(難治性疾患政策研究事業)

特発性造血障害に関する調査研究

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 黒川 峰夫

平成27(2015)年3月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等政策研究事業

(難治性疾患政策研究事業)

特発性造血障害に関する調査研究

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 黒川 峰夫

平成27(2015)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	3
班員構成および研究領域		43

II. 分担研究報告書

1. 造血不全疾患における体内鉄代謝マーカーの解析	小澤 敬也	47
2. エクリズマブ不応PNH症例の病態解析	金倉 譲	52
3. 骨髄不全患者を対象としたHLA-A アレル欠失血球の検出：観察研究の中間解析	中尾 眞二	55
4. 後天性慢性赤芽球癆の長期予後と予後因子	澤田 賢一	58
5. 本邦の原発性骨髄線維症の臨床像	赤司 浩一	61
6. 国際予後スコアリングシステムを利用した国内骨髄異形成症候群の検討	宮崎 泰司	64
7. 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	67
8. 骨髄異形成症候群(MDS)に対する造血幹細胞の現状把握と移植の最適化に関する検討	岡本 真一	72
9. 先天性造血不全症候群の研究	中畑 龍俊	76
10. 特発性造血障害の治療決断に関するデータの二次利用解析系の構築	神田 善伸	80
11. 再生不良性貧血の受給継続率の把握—臨床調査個人票の解析—	太田 晶子	82

III. 協力者研究報告書

1. 骨髄異形成症候群に対する同種造血幹細胞移植法の検討
直江 知樹 89
2. 先天性造血不全症候群の研究
真部 淳 92
3. 冷温保存検体におけるクームス試験陽転化の意義
亀崎 豊実 95
4. 骨髄線維症に対する脾照射
下田 和哉 97
5. PIGA 変異によらない非典型的 PNH の存在について
木下 タロウ 99
6. 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 101
7. 我が国における骨髄増殖性腫瘍患者の変異スペクトラム解析
小松 則夫 104
8. 骨髄異形成症候群に対する同種造血幹細胞移植に関する研究
谷本 光音 108
9. 成人慢性好中球減少症におけるゲノム解析
千葉 滋 112
10. 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
11. 再生不良性貧血における細胞形態学的異形成の臨床的意義：
「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」
松田 晃 119
12. 骨髄異形成症候群の病期進行に関わる分子メカニズムの解析
松村 到 123
13. 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 126
14. 重症再生不良性貧血患者の改善に関連する要因
島田 直樹 130

15.	本邦における先天性各課不全症の臨床的遺伝学的特徴	猪口 孝一	135
16.	特発性造血障害に対する造血幹細胞移植	豊嶋 崇徳	140
17.	骨髄異形成症候群における末梢血無細胞遊離 DNA を用いた遺伝子変異解析	清井 仁	142
IV. 班会議関係資料			
	平成 26 年度第 1 回班会議総会プログラム		149
	平成 26 年度第 2 回班会議総会プログラム		155
V. 研究成果の刊行に関する一覧表			
VI. 研究成果の刊行物・別刷			199

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）
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（AA）の領域では前方視的症例登録・追跡調査研究とセントラルレビューをおこなったほか、本疾患でしばしば認められる第6染色体短腕の uniparental disomy によって生じる HLA-A アレル欠失血球の検出頻度を、多数例でさまざまな血球系統の検体を用いて行った。また、後天性慢性赤芽球癆に対する免疫抑制療法後の長期生命予後に関する疫学研究を行った。また、AA に対する免疫抑制療法における早期死亡の疫学的解析をメタアナリシスの手法を用いて行ため、対象とする臨床研究の取捨選択を行った。また、指定難病の臨床調査個人票を用いて再生不良性貧血の受給継続率を明らかにした。

溶血性貧血の領域では、発作性夜間血色素尿症（PNH）について、C5 遺伝子多型によるエクリズマブ不応例として本邦の症例より c. 2654G>A (p. Arg885His)、またアジア系アルゼンチン原住民の症例より c. 2653C>T (p. Arg885Cys) を見出した。この結果から p. Arg885 がエクリズマブ不応の hot spot であることが示唆された。

骨髄異形成症候群（MDS）の領域では、前方視的症例登録・追跡調査研究とセントラルレビューをおこなった。改訂国際予後スコアリングシステム（Revised IPSS, IPSS-R）の国内 MDS 症例に対する有用性について疫学的に検討した。また、WT-1 発現定量の MDS 診断補助における意義について検討した。また、MDS や AA における体内鉄動態を各種鉄代謝マーカー測定によって検討した。

骨髄線維症の領域では、これまでに前方視的に登録した本邦の原発性骨髄線維症 718 例の臨床情報を集積、解析したほか、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) の予後指標としての意義を検討した。造血幹細胞移植の領域では、MDS を対象として移植方針決定からの前方視的調査と cross sectional survey により、MDS に対する移植の実態と至適なドナー数や移植適応症例の選択法を明らかにする計画を作成した。

小児科領域では、遺伝性骨髄不全症候群と診断された Fanconi 貧血 21 例、Shwachman 症候群 12 例、Dyskeratosis congenita 8 例、Diamond-Blackfan 貧血 28 例、先天性重症好中球減少症 7 例、先天性血小板減少症 21 例などの疫学的検討を行った。

本年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

研究分担者

小澤 敬也

東京大学医科学研究所先端医療研究センター教授

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

神田 善伸

自治医科大学 内科学講座血液学部門 教授

太田 晶子

埼玉医科大学医学部公衆衛生学 講師

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、各疾患の症例登録システムの構築・運用を行い、大規模な疫学データを収集・解析することで病態の把握・解明を行い、診断基準の策定やガイドラインの作成を目指す。また、国際的な視点とわが国の実状に即した視点の双方から新規治療法の適切な使用法や効果予測因子を探索する。これらの成果は疾患別「診療の参照ガイド」の改訂に反映し、全国の診療施設で利用可能とする。

1. 再生不良性貧血（再不貧）・赤芽球癆

①骨髄不全患者を対象とした HLA-A アレル欠失血球の検出：観察研究の中間解析

再生不良性貧血 (aplastic anemia; AA) の約 13%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、これまでの検討は全て後方視的になされたものであるため、AA 患者における HLA-LLs の正確な検出頻度は不明であった。

これを明らかにするため、特発性造血障害に関する調査研究班の参加施設を主な対象として、AA

症例の登録を受け付け、HLA アレルを決定したのち、HLA-LLs の検出頻度を決定するという前向きな観察研究を 2012 年 7 月よ

り開始した。今回はその中間解析を実施した。

②後天性慢性赤芽球癆の長期予後と予後因子についての疫学研究

特発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、寛解後の維持療法を行うべき期間は明らかにされておらず、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、慢性赤芽球癆に対する

A. 研究目的

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 黒川峰夫)」が平成25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これまでの調査研究を発展させ、本領域の疫学・病因・病態・診断・治療・予後な

免疫抑制療法後の長期予後と死亡に関するリスク因子を明らかにすることである。

③再生不良性貧血の受給継続率の把握—臨床調査個人票の解析—

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、電子化された臨床調査個人票データベースを利用し、再生不良性貧血の医療受給継続率を明らかにする。また、性、年齢、重症度別に受給継続率（継続率）を明らかにし、受給継続に影響を与える要因を明らかにする。

④再生不良性貧血における細胞形態学的異形成の臨床的意義

再生不良性貧血における細胞形態学的異形成の臨床的意義を明らかに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%、常染色体劣性遺伝が数%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。

⑥重症再生不良性貧血患者の改善に関連する要因

再生不良性貧血は、厚生労働省の特定疾患治療研究事業におい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では、臨床調査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、臨床調査個人票の内容は、都道府県によって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年以降、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。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いると考えられるが、いまだ治療が奏効しない重症例も少なくない。そこで、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、重症再生不良性貧血患者の改善に関連する要因を検討することを目的とした。

2. 溶血性貧血

①エクリズマブ不応 PNH 症例の解析

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。溶血が全く抑制されない本邦固有の不応例を認め、エクリズマブ不応性機序を解明した。現在は、各国からの不応例についても解析を行っている。

②冷温保存検体におけるクームス試験陽転化の意義

クームス陰性自己免疫性溶血性貧血 (AIHA) 診断目的に当教室へ赤血球結合 IgG 定量を依頼されたクームス試験陰性溶血性貧血検体は、4℃に数日保存後検査となるが、一部の症例で補体特異的クームス試験の陽転化を認める。今回、冷温保存後の補体クームス陽転化の意義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。

③PIGA 変異によらない非典型的 PNH の解析

PIGA 変異によらない PNH 症例、すなわち常染色体遺伝子である PIGT の germline 変異と体細胞変異が重なったことによる PNH 症例が、2013 年にドイツから報告された。特異な症状を有する PNH 症例の精査を行い、本症の診療の質の向上に資することを目的とした。

3. 骨髄異形成症候群(MDS)

①国際予後スコアリングシステムを利用した国内骨髄異形成症候群の検討

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腫瘍であり、治療方針決定に必要な予後予測には病型分類のみでは不十分である。1997 年に発表された IPSS の改訂のために国際共同研究としてより多くの症例データが収集され、改訂 IPSS (IPSS-R) が策定された。こうした予後予測スコアが本邦の症例にも適応可能であるかは、国内の MDS 診療において極めて重要である。これまでの検討で IPSS-R も国内症例に適応可能であることが示されつつあるが、一方でこうした多数例のデータを解析することで欧米と本邦の MDS 病態に差がある可能性もあがってきている。これは、より適切な治療を考えるうえで重要な情報であり、IPSS-R のために袖手されたデータをもちいて本邦の MDS の特徴を明らかにすべく、検討を行った。また、MDS の診断は境界領域症例では時に困難である。そのため、分子マーカーである WT-1 の発現が MDS 診断に有用であるかどうかについて当科の症例を対象として検証した。

②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 (myelodysplastic syndromes, MDS) の臨床像と治療成績の把握、診断一致率の向上、ならびに本邦における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。

③造血不全疾患における体内鉄代謝マーカーの解析

長期間の赤血球輸血は鉄過剰症の原因となり、肝障害や心不全などを引き起こし、一部の疾患では予後短縮の原因となる。このため、輸血を原因とする鉄過剰症では臓器障害の予防および治療目的に鉄キレート剤が用いられる。

一方、骨髄異形成症候群 (MDS) や再生不良性貧血 (AA) などの造血不全疾患では赤血球造血が低下しているため、輸血歴がなくても鉄代謝は過剰側に傾くと考えられ、鉄毒性の存在が予想される。しかし、これらの患者における鉄動態については未だよく解析されていない。また、MDS のように無効造血がある場合は、消化管からの鉄吸収が亢進し、鉄過剰になりやすいことも知られている。

そこで、本研究では MDS や AA などの造血不全疾患における鉄動態について解析を行い、これらの疾患における潜在的な鉄毒性の状態について検討を行った。

④我が国における骨髄増殖性腫瘍患者の変異スペクトラム解析

フィラデルフィア染色体陰性古典的骨髄増殖性腫瘍 (myeloproliferative neoplasms; MPN) に分類される真性赤血球増加症 (真性多血症) (polycythemia vera; PV)、本態性血小板血症 (essential thrombocythemia; ET)、原発性骨髄線維症 (primary myelofibrosis; PMF) には、*JAK2*、*CALR*、*MPL* 遺伝子の変異が見つかっている。これらの遺伝子変異は相互排他的である。PV においては *JAK2* 変異が 95% 認められるのに対して、ET、PMF においては *JAK2* 変異、*CALR* 変異、*MPL* 変異がそれぞれ 60%、20%、5% 程度認められる。ところが、MPN の遺伝子解析と疫学的調査は殆どが欧米諸国からの報告であり、アジア人での解析は限られている。そこで本研究では、日本全国から骨髄増殖性腫瘍の症例を収集し、これらの変異スペクトラムと臨床的特徴との相関を調査した。

⑤骨髄異形成症候群の病期進行に関する解析

我々はこれまでに、MDS 患者骨髄を用いた遺伝子発現プロファイルの結果から、MDS の病期進行に伴い、造血幹/前駆細胞 (HSC/HPCs) 分画で発現が著明に上昇する分子として、C-type lectin domain family 1, member B (CLEC-2) を同定した。本研究は、CLEC-2 およびその受容体である podoplanin (Pdpn) を介した MDS 細胞と骨髄微小環境 (ニッチ) との相互作用を明らかにすることを目的とする。

⑥骨髄異形成症候群における末梢血無細胞遊離DNAを用いた遺伝子変異解析

MDSにおける種々の遺伝子異常が報告されている。これまでに我々は、MDS患者の骨髄細胞に認められる遺伝子変異が、PB-cfDNAを用いて検出可能であることを、一部の遺伝子変異に着目して検討してきた。本研究においては、MDS患者骨髄細胞に存在する遺伝子変異がPB-cfDNAにおいても忠実に反映されているかどうかについてtarget sequence法を用いて解析し、他の結果とも合わせて、PB-cfDNAが主に腫瘍由来であるかどうかを明らかにし、MDS遺伝子変異解析においてPB-cfDNAが有用であることを確認する。

⑦骨髄異形成症候群に対する同種造血幹細胞移植法の検討

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、造血不全あるいは白血病に移行する難治性の疾患である。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、MDSの予後の改善が期待されているが、根治を目指す治療法は造血幹細胞移植のみである。元来高齢者に多い疾患のため移植適応となる患者は少なかったが、最近の移植方法の発展により、移植対象年齢の上限は上昇しており、今後造血幹細胞移植を施行する症例は増加すると考えられる。そこで、これまで当院で行ったMDSに対する移植成績を後方視的に検討することにより、今後の移植成績向上、治療戦略開発の基礎的データを得ることを目的とする。

⑧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。

⑨成人慢性好中球減少症におけるゲノム解析
実態解明が遅れている成人の慢性好中球減少症について、先天性あるいは体細胞突然変異による遺伝子異常が病態に寄与していることを想定し、遺伝子解析を行った。

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骨髄線維症に対する脾照射

脾腫は骨髄線維症患者において高頻度にみられる臨床所見である。巨大脾腫に伴う痛み、血球減少、門脈圧亢進に伴う症状等を呈し、薬物療法では十分な症状の改善が得られない患者に対してQOLの改善を目的とした脾照射が行われてきたが、本邦よりのまとまった報告は無い。本研究では、これまでの全国調査で見いだされた脾照射を実施された骨髄線維症患者について、治療効果および合併症の頻度とその程度を調査

し、本邦における骨髄線維症に対する脾照射の実態を明らかにすることを目的とする。

5. 造血細胞移植

①骨髄異形成症候群(MDS)に対する造血幹細胞

の現状把握と移植の最適化に関する検討に関する検討

様々な分子標的療法が開発・臨床応用され、多くの造血器腫瘍の治療成績は着実に向上している一方で、high-risk骨髄異形成症候群では、同種造血幹細胞移植が最も有効かつ唯一の治療として盛んに施行されている。しかし、ここ10年間、その移植成績、特に高齢者における移植成績に有意な改善は認められていない。

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。患者、ドナーの高齢化が進行する中で、移植に必要な様々なリソースの最適化を図る必要がある。

本研究では、現状での進行期MDSの診断から移植までに至るclinical practiceにおける実態を調査とともに、至適な移植適応症例の選択法について検討を加え、その移植成績向上に必要な因子を明らかにすることを目的とした。

②特発性造血障害の治療決断に関するデータの二次利用解析系の構築

再生不良性貧血の初期治療の決断のために必要となる情報として、免疫抑制療法における早期死亡の解析をメタアナリシスの手法を用いて行う。さらに免疫抑制療法と造血幹細胞移植の成績と比較する臨床決断分析を計画する。これらの研究成果を元にして、再生不良性貧血患者の移植適応について再考し、ガイドラインに反映させる。

③骨髄異形成症候群に対する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MDSに対する同種造血幹細胞移植の成績を解析し、安全性と有効性を検討する。

④特発性造血障害に対する造血幹細胞移植

少子高齢化社会を迎えた日本では、HLA適合同胞ドナーの確保が困難となり、移植が必要な患者に遅滞なく移植医療を提供する体制を整備する必要がある。HLA半合致移植はこの目的に合致し、とくに移植後大量シクロホスファミドを用いたHLA半合致移植の日本人の骨髄異形性症候群/骨髄増殖腫瘍での安全性と有効性を検討する。

6. 小児科領域

①先天性造血不全症候群の研究

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、1000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。本研究では病因・診断・治療・予後等に関する調査研究を推進する。その結果を各疾患の診断基準・重症度分類に反映させ、診療ガイドとして公表し、全国の医療機関で使用可能とすることにより、我が国全体の診療の標準化と診療レベルの向上が期待される。

②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。

③本邦における先天性角化不全症の臨床的遺伝学的特徴

先天性角化不全症(Dyskeratosis congenita(DKC))は網状色素沈着、爪の萎縮、舌などの粘膜白斑症を伴う骨髄不全症(Bone marrow failure: BMF)で10歳前後までに約80%以上の症例にこれらの特徴的身体所見が付随しBMFを発症する。遺伝型はX連鎖劣性遺伝が約35%、常染色体優性遺伝が約15%、常染色体劣性遺伝が数%に認められるが、残りの約40%近くが型式不明である。DKCはその病態や臨床像が多彩であるが、これまでのDKCの臨床症例の蓄積は主に欧米が中心でアジア人においては少数の症例報告のみである。欧米人以外の人種におけるDKCの臨床的特徴やその原因遺伝子の頻度などは明らかになっていない。本研究は日本人におけるDKCの臨床的特徴、原因遺伝子の頻度などを明らかにすることが目的である。

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

小児期に発症する骨髄不全症候群にはFanconi貧血(FA)など、遺伝性疾患が含まれるため、効率的な診断システムの構築と病態に合った移植方法の確立、さらに移植後の生活の質(QOL)の維持が重要である。以上につき、診断・治療の参照ガイドの改訂を含めて検討した。

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。全国の主要病院、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骨髄不全患者を対象としたHLA-Aアレル欠失血球の検出：観察研究の中間解析
施設の倫理委員会で本観察研究に関する承認が得られた施設でAAと診断され、採血及びHLA-LLsの検出に同意した患者を対象とした。すでにHLA-Aアレルが決定されている患者については、HLA-A24、A2、A26、A31、A11に対する市販のモノクローナル抗体を用いてHLA-Aアレル欠失顆粒球(HLA-A allele-lacking granulocytes; HLA-LGs)の有無を検索した。HLA-Aアレルが不明の例については末梢血単核細胞を凍結保存し、HLA-Aアレルが判明したのちに、解凍後のCD33陽性単球を対象としてHLA-Aアレル欠失単球(HLA-A allele-lacking monocytes; HLA-LMs)を検出した。HLA-LMsが陽性であった症例については、その後新鮮血を再検し、HLA-LGsの割合を決定した。

②後天性慢性赤芽球癆の長期予後と予後因子についての疫学研究

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再生不良性貧血の受給継続率の把握—臨床調査個人票の解析—

2014年8月現在入力済みの2008年度から2012年度の臨床調査個人票を用いた。都道府県によりデータの電子入力状況十分でないため各年度の入力状況を都道府県別に確認し、入力率(入力された受給者数/衛生行政報告例から得られる受給者数(全数))が2009~2012年度ともに0.90以上、2008年度のそれが0.80以上の13都県(岩手、茨城、栃木、群馬、東京、富山、福井、山梨、兵庫、山口、愛媛、熊本、沖縄)を解析対象とした。2008年度医療受給者の1年後、2年後、3年後、4年後の受給継続の有無を確認し、2008年度受給者のうち2009年度、2010年度、2011年度、2012年度に受給している割合をそれぞれ1年後、2年後、3年後、4年後受給継続率として算出した。

④再生不良性貧血における細胞形態学的異形成の臨床的意義

「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」の登録例の中で、中央診断が再生不良性貧血

(AA)と診断された例は、異形成の無い群(non-dys AA)と異形成を伴う群(AA with miniD)に細分類されている。今回、この2群の臨床像を前方視的に調査した。中央診断は2名以上で行い、いずれかの診断に不一致があった場合は、共同検鏡により中央診断を確定した。

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。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・がんセンタ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 シーケンスを行う。新規遺伝子が同定された場合は、そのバリデーションや機能解析を日本医科大学生命科学センターにて行う。

⑥重症再生不良性貧血患者の改善に関連する要因

入力率、対象者数を考慮して、①2010年に新規申請して2011年に更新申請した625名、②2011年に新規申請して2012年に更新申請した615名、③2012年に新規申請して2013年に更新申請した380名の合計1,620名を解析母集団とした。①②③の3群で性別、年齢に有意差を認めなかったことから、3群をまとめて検討した。

解析母集団から、初年度に造血幹細胞移植療法を実施した者を除外した上で、初年度は Stage5 だったが次年度に Stage1 に改善した 45 名(改善群)と、初年度は Stage5 で次年度も Stage5 のままだった 69 名(不変群)を抽出して、両群の患者特性、臨床像、治療状況を比較検討した。

2. 溶血性貧血

①本邦固有のエクリズマブ不応 PNH 症例の解析
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冷温保存検体におけるクームス試験陽転化の意義

当研究室へ2012年～2014年の3年間に全国から精査依頼のあったクームス試験陰性溶血性貧血 374 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。

③PIGA 変異によらない非典型的 PNH の解析
非典型的な症状を有する PNH 症例の遺伝子解析と症状の精査を行った。

3. 骨髄異形成症候群(MDS)

①国際予後スコアリングシステムを利用した国内骨髄異形成症候群の検討

IPSS-R 作製のために収集された症例データを日本人(全体の約3%)とその他に分け、日本人(アジア人)と欧米人(コーカシアン)の種々のデータを比較解析した。その中からセンター効果を超えて有意差を持つものがないか検討した。

WT-1 の有用性に関する研究は、当科を受診した患者を対象に実施され、WT-1 の値と診断との関連を検討した。

②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生不良性貧血、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、追跡調査を行った。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った。登録時の臨床情報、セントラルレビューの結果、および、最大10年分の追跡情報は、ファイルメーカーを元に作成したデータベース内に一元的に管理した。

③造血不全疾患における体内鉄代謝マーカーの解析

2008年12月から2011年12月までに全国の参加施設で登録された、輸血未施行、鉄剤非投与の MDS、AA、慢性赤芽球癆、原発性骨髄線維症患者を対象に、登録時および登録1年後の鉄代謝マーカー(フェリチン、血清鉄、トランスフェリン飽和度、非トランスフェリン結合鉄 (NTBI)、ヘプシジン 25) の状況について解析を行った。解析は Fisher 検定、Mann-Whitney U 検定、Kruskal-Wallis 検定、Spearman の順位相関検定を用いて行った。

④我が国における骨髄増殖性腫瘍患者の変異スペクトラム解析

WHO2008 分類で診断された PV 66 例、ET 112 例、PMF 23 例を対象に、*JAK2* 変異、*CALR* 変異、*MPL* 変異の陽性率を解析した。解析には我々のグループにおいて開発された PCR 法をベースとした検出技術を用いて既報の変異を検出するとともに、次世代シークエンサーによって上記3遺伝子上に未知の変異が見出されるか探索した。

⑤骨髄異形成症候群の病期進行に関する解析

1) 骨髄単核球における CLEC-2、Pdpm の発現解析

CLEC-2 は、主に血小板に発現する膜蛋白として知られるが、その他の血球を含めた生体内組織での発現分布については明らかにされていない。MDS、AML 患者骨髄より得た単核球を表面抗原により分離し、造血細胞、造血支持細胞の各系統における CLEC-2、Pdpn の発現を定量的 RT-PCR 法、および FACS により解析した。

2) 造血支持細胞における CLEC-2 の機能解析
CLEC-2 は、ホモフィリックな結合、あるいは Pdpn など腫瘍抗原との結合を介して血小板を活性化する分子として報告されているが、MDS 細胞、あるいは骨髄ニッチを構成する造血支持細胞における機能は明らかにされていない。骨髄ストローマ細胞株 MS-5 に CLEC-2 を強制発現させた細胞株を樹立し、HSC/HPCs あるいは未分化な MDS 細胞と種々サイトカイン存在下に共培養することで、培養後に得られた血球の特性を解析した。

⑥骨髄異形成症候群における末梢血無細胞遊離 DNA を用いた遺伝子変異解析

当院で診断され文書による同意が得られた MDS 患者より骨髄細胞、血漿、血清、末梢血単核球を採取し (N=32)、それぞれから全 DNA を採取した。また同意の得られた正常人末梢血より、同様に DNA を採取した (N=14)。血漿、血清由来 PB-cfDNA を用いてアガロースゲル電気泳動を行い、ゲル解析ソフトおよび Agilent Bioanalyzer を用いて定量解析を行った。また、MDS 患者から得られた骨髄細胞由来ゲノム DNA 及び血漿由来 PB-cfDNA を用いて、illumina MiSeq, TruSight Myeloid Sequencing Panel による target sequencing を行った。変異解析は、illumina Variant Studio App, The Broad's IGV を用いて行った。また、個々の遺伝子変異の検出には、従来法の Sanger sequence 法 (Dye terminator 法) を行った。

⑦骨髄異形成症候群に対する同種造血幹細胞移植法の検討

2004 年 1 月～2013 年 12 月に名古屋医療センターで施行された MDS に対する同種造血幹細胞移植を症例について、患者カルテより診療情報を取得することにより背景因子、移植成績の解析を行った。

⑧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は、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。

⑨成人慢性好中球減少症におけるゲノム解析

成人の好中球減少症患者 (好中球数 $1,500/\mu\text{L}$ 未満) を対象に、末梢血および頬粘膜細胞を採取し、これらからゲノム DNA を抽出した。これらを用いて骨髄異形成症候群 (MDS) や急性骨髄性白血病 (AML) で異常がみられる遺伝子を中心

に、次世代シーケンサーを用いたターゲット解析を行った。また大顆粒リンパ球白血病 (LGL) で変異がみられる STAT3 についても解析を行った。

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骨髄線維症に対する脾照射

これまでに日常診療のなかで脾照射が実施された症例について、調査票を用いて後方視的に臨床情報の集積を行った。

5.造血細胞移植

①骨髄異形成症候群 (MDS) に対する造血幹細胞の

現状把握と移植の最適化に関する検討

まず、最近の同種造血幹細胞移植の動向について、日本骨髄バンクおよび日本造血細胞移植データセンターの資料を用いて現状の移植の動向を検討した。

MDS に対する移植達成率の評価に関しては、前方視的コホート研究を関東造血細胞移植検討会との共同研究として進めるとともに、cross-sectional な実態調査を準備した。前者は、MDS と診断され、同種造血幹細胞移植の施行を決断した 20 歳以上の患者を対象とする。試験登録後、下記に記載する項目に関する情報を前向きに収集する。移植後の情報は主に日本造血細胞移植学会 (JSHCT) の移植登録一元管理プログラム (TRUMP) データを利用する。試験登録から 1 年以上移植非実施症例 (移植前死亡、もしくは登録から 1 年以上移植実施できない場合) に関しては、移植非実施のまま 1 年が経過した時点で試験登録からそれまでの経過に関する CRF を収集する。移植決断のタイミング、移植までの治療戦略、移植方法に関しては規定しない。移植実施症例では移植から 1 年を追跡期間とし、移植非実施症例では登録から 1 年を追跡期間とする。収集する情報は (1) 移植決定時の MDS subtypes と選択理由 (planned, ad hoc, deferred)

(2) 移植までの治療内容 (化学療法、AZA の使用の有無)、治療選択理由 (3) 移植決定時と施行時の HCT-CI で評価した臓器障害スコアの変化

(4) 移植施行時の MDS subtypes とその他の臨床像 (5) 移植を施行しなかった場合の理由 (6) 移植前治療による MDS の down staging 率、継時的に見た移植前 MDS subtypes および臓器障害

scores の変化と移植後生存率の相関を検討する。具体的な研究計画を図 1, 2 に示した。

移植を検討する高齢者 MDS の選択基準に関しては、2014 年にこれまでの HCT-CI スコアに年齢を加えた新たなスコアリングシステムが提唱された。今回は、HCT-CI スコアの validation に使用したデータセットを用いて、新規のスコアリングの妥当性についても検証を行った。

②特発性造血障害の治療決断に関するデータの二次利用解析系の構築

平成 26 年度はメタアナリシスの研究計画を立案した。さらに、対象となる臨床研究の検索を行い、抽出された研究について綿密な調査に基づき、メタアナリシスに含めるべき研究の取捨選択を行った。

③骨髄異形成症候群に対する同種造血幹細胞移植に関する研究

1999 年 1 月から 2014 年 12 月までに同種造血幹細胞移植を行った MDS 患者、計 61 症例を対象とした。

年齢中央値は 57 歳 (18-70 歳) で、男性 49 名、女性 12 名であった。病型 (FAB 分類) は RA 11 例、RARS 1 例、CMML 8 例、RAEB 41 例 (RAEB-1: 13 例、RAEB-2: 28 例) であった。幹細胞ソースは末梢血 19 例、骨髄 33 例、臍帯血は 9 例であり、19 例が血縁、42 例が非血縁であった。移植前処置は骨髄非破壊的 (RIC) が 49 例と 8 割を占め、骨髄破壊的 (MAC) は 12 例に留まった。移植時病期は寛解 10 例、非寛解 30 例で、無治療で移植は 21 例であった。

④特発性造血障害に対する造血幹細胞移植

2013 年 5 月より全国多施設共同第 II 相試験として、移植後大量シクロホスファミドを用いた血縁者間 HLA 半合致移植の安全性と有効性の検討 JSCT-Haplo13 試験、2014 年からは JSCT-Haplo14 試験を実施した。この中で、慢性骨髄単球性白血病 (CMML) 1 例、骨髄異形成症候群由来白血病 (MDS-AML) 1 例で本法を用いた移植を実施した。

6. 小児科領域

①先天性造血不全症候群の研究

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 1000 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例について検討を行った。

②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。

③本邦における先天性角化不全症の臨床的遺伝学的特徴

本邦における臨床的に DKC が疑われた症例、DKC 以外の先天性骨髄不全症が否定的なテロメア長の短縮化を認めた家族性 BMF、免疫抑制療法に不応性 BMF でテロメア長の著明な短縮化を認めた症例、BMF を合併した家族性肺線維症の症例を対象とした。診断に関しては、皮膚の網状色素沈着、舌白斑症、爪の委縮のいずれかの身体異常とテロメア長の短縮を有する骨髄不全症症例を DKC の疑い症例とし、またそれ以外の症例を不全型 DKC 症例とした。

テロメア長解析はサザンブロット法の TeloTAGGG kit (ロッシュ社)、flow-fluorescence in situ hybridization (flow-FISH) 法の Telomere PNA kit (ダコ社)、Real time PCR 法を用いた。既知の遺伝子変異解析は、従来のサンガー法以外に一部の症例に関しては次世代シーケンサーにおける exon シークエンスならびにゲノムコピー数解析を用いた。

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・細胞移植科にて、先天性および後天性再生不良性貧血に対し、1985 年 6 月より 2001 年 11 月までに同種骨髄移植を受け、妊娠、挙児に至った 10 例について前処置などの移植条件を検討した。調査方法は既存資料による後方視的解析で行った。

FA 患者における ALDH2 の遺伝子解析は従来より継続しており、骨髄不全の発症時期、造血細胞移植の経過を検討した。

(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骨髄不全患者を対象としたHLA-Aアレル欠失血球の検出：観察研究の中間解析

2015年1月9日までに14施設から計35例(AA34例、PNH1例)の登録があった。HLAタイピングが終了している30例中、解析が可能なHLA-A座ヘテロ症例は25例(83.3%)であった。患者背景は、年齢中央値66歳(17-84)、男9例/女16例、PNH型血球陽性17例/陰性4例/不明4例、SAA13例/NSAA12例、未治療7例/既治療23例。解析の結果、HLA-Aアレル欠失血球陽性頻度は16.7%(5/30例)に検出され、クローンサイズは1.1%-92.8%(中央値27.5%)、血球系統パターンGMBT1例、GMB2例、GM1例、B1例であった。

②後天性慢性赤芽球癆の長期予後と予後因子についての疫学研究

アンケート回答率は72%であった。観察期間中央値は87.6ヵ月(0.5~274.3ヵ月)である。特発性赤芽球癆のKaplan-Meier曲線は未だ50%に達せず、生存期間中央値は算出できなかった。胸腺腫関連赤芽球癆および大顆粒リンパ球白血病関連赤芽球癆の予測生存期間中央値は142.1ヵ月、147.8ヵ月であった。これら3病型の生存期間は有意差がなかった。

再発に免疫抑制療法の効果を初回寛解導入療法の奏効と比較すると、特発性および胸腺腫関連赤芽球癆において、再発時に治療の奏効率が低下することが判明した。

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($p=0.002$)、病因には有意差を認めなかった。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($p<0.001$)。治療奏効および寛解後の再燃はいずれも時間依存性変数であるためMantel-Byar法による生存時間分析を行ったところ、寛解導入療法に対する奏効および寛解後の再燃はいずれも生存時間に影響を与えていることが明らかにされた。

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1例、悪性腫瘍2例、糖尿病1例、脳血管障害1例、不明3例であった。

③再生不良性貧血の受給継続率の把握—臨床調査個人票の解析—

2008年度受給者の解析対象数は、2,357(男989、女1,368)であった。新規・更新別では、新規313、更新2,044であった。

表1に2008年度受給者の受給継続率を示した。全体の受給継続率は、1年後82.3%、2年後75.4%、3年後66.5%、4年後60.8%であった。受給開始後1年で継続率は大きく低下し、その後は緩やかに低下していた。性別にみると、4年後継続率は男55.8%、女64.4%と、女が男に比べて高かった。観察期間が長くなるほど性差が拡大していた。年齢別では30歳代~60歳代で継続率が比較的高かった。重症度分類stage1,2,3,4,5で、4年後継続率は、それぞれ64.0%、68.6%、54.1%、48.0%、28.3%であり、重症度が高いほど継続率は低かった。

新規受給者の継続率は更新受給者に比べて低かった。新規の継続率は、1年後69.3%、2年後59.4%、3年後52.4%、4年後46.6%であり、受給開始後1年で継続率は大きく低下し、その後は緩やかに低下していた。

④再生不良性貧血における細胞形態学的異形成の臨床的意義

2004年3月から2014年3月の期間に「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」に登録され中央診断が再生不良性貧血と診断された57例を対象とした。

1. 細胞形態学的評価

各系統の異形成はWHO分類の基準にしたがい、10%以上で陽性とした。AAの14例は1系統に異形成を認めた。異形成の系統は全例が赤芽球系であった。2系統に10%以上の異形成を認めた例はなかった。AAはnon-dys AA 43例とAA with miniD 14例に細分類できた。

2. non-dys AA と AA with miniD の臨床像の比較

1) 診断時臨床像

2群の性($p=0.81$)、診断時年齢($p=0.49$)、に有意差を認めなかった。染色体所見の得られた中で、染色体異常の保有はnon-dysAA群が3例(8.3%)、AA miniD群は4例(28.6%)で、AA with miniD群に多い傾向があった($p=0.06$)。重症度では、non-dysAA群では重症は15例(35.7%)、非重症は27例(64.3%)、重症度不明は1例であった。AA with miniD群では重症は5例(35.7%)、非重症は9例(64.3%)であった。両群の重症度に有意差は認められなかった($p>0.99$)。

2) ISTに対する反応性

ISTは25例に行われた。ISTに対する反応性に関して、評価可能な情報が得られたのは、non-dys AA群17例、AA with miniD群6例であった。ISTに対するresponderはnon-dys AA群は14例(重症例:5例、非重症例:9例)、AA with

miniD群は6例(重症例:4例、非重症例:2例)であった。両群のISTに対する反応性に有意差は認められなかった(p=0.27)。

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TINF2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FILS 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。

⑥重症再生不良性貧血患者の改善に関連する要因

1. 患者特性

改善群と不変群とで新規申請年の分布には有意差を認めなかった。男性割合は改善群60.0%、不変群50.7%で有意差を認めなかった。年齢(平均±標準偏差)は改善群31.4±25.5歳、不変群57.2±22.1歳で有意差を認めた(二標本t検定:p=0.000)。住所(都道府県)、出生都道府県とも不変群の方が西日本に多い傾向が認められた。特に不変群の1割以上が九州・沖縄だったのに対して、改善群には九州・沖縄はいなかった。

日常生活状況(正常、やや不自由であるが独

力で可能)は改善群83.7%、不変群82.5%で有意差を認めなかった。血液疾患の家歴(有り)は両群とも1名のみであった。病型(特発性)は改善群93.2%、不変群92.8%で有意差を認めなかった。

2. 初年度の症状及び所見

初年度の自他覚症状3項目および血液生化学3項目は改善群と不変群とで有意差を認めなかった。初年度の末梢血検査所見では、白血球数は改善群が不変群よりも有意に多かった(Mann-WhitneyのU検定:p=0.031)。一方、好中球百分率は不変群が改善群よりも有意に高かった(Mann-WhitneyのU検定:p=0.009)。但し、好中球数は有意差を認めなかった。それ以外の検査項目も改善群と不変群とで有意差を認めなかった。初年度の骨髓生検所見は、両群とも全員が低形成だった。造血細胞の形態異常(なし)は改善群90.7%、不変群94.0%で有意差を認めなかった。骨髓染色体検査(正常)は改善群92.0%、不変群97.4%で有意差を認めなかった。Ham試験は大部分が未施行だった(改善群87.2%、不変群86.0%)。

3. 初年度の治療状況

初年度の治療状況の中で、アンドロゲン療法は不変群が改善群よりも施行率が高い傾向が認められた(Fisherの直接法:p=0.067)。それ以外の無治療で経過観察、免疫抑制療法、成分輸血、サイトカイン類の施行率は改善群と不変群とで有意差を認めなかった。

2. 溶血性貧血

①本邦固有のエクリズマブ不応PNH症例の解析
C5遺伝子の変異を検索するため、エクリズマブ不応例のC5遺伝子の全エクソンをシーケンストした。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。エクリズマブ有効例では、同変異を認めなかった。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、結合エピトープの異なる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10⁴倍濃度を上げても結合は確認できなかった。アジア系アルゼンチン原住民のエクリズマブ不応症患者の紹介を受け、同様に解析したところ、きわめて類似するヘテロ変異c.2653C>Tを認め、p.Arg885Cysが予測された。エクリズマブの承認後に確認された13例の新規不応例においても同変異をヘテロで認め、本邦エクリズマブ投与約400症例

中 15 例 (約 3.8%) 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 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探したところ、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。一方、アルゼンチン患者に見いだされた c. 2653C>T 変異は、100 例前後の解析では英国人、中国漢民族、メキシコ原住民いずれにおいても検出されず、保有率がさらに低い可能性が示唆された。

②冷温保存検体におけるクームス試験陽転化の意義

クームス試験陰性溶血性貧血 374 例中 72 例が、4℃ に数日保存後のクームス試験で陽性を示した。IgG 陽性 13 例、IgA 陽性 5 例、IgG+IgA 陽性 1 例、IgM 陽性 3 例であった。補体のみ陽性であった 50 例とクームス陰性のままであった 302 例について 1 年後の臨床診断を見ると、AIHA81 例、非 AIHA83 例であった。AIHA 症例の内訳は温式 77 例、寒冷凝集素症 (CAD) 4 例で、補体クームス陽転例 20 例の内訳は、温式 AIHA14 例、CAD1 例、非 AIHA5 例であった。すなわち、補体クームス陽転例の 75% が AIHA と診断された。補体クームス陽転温式 AIHA14 例とクームス陰性温式 AIHA63 例の臨床データを比較すると、補体クームス陽転例で網赤血球比率と貧血は有意に高値であり、赤血球結合 IgG は補体クームス陽転例で高い傾向にあった。採血時の抗凝固剤 (EDTA もしくはヘパリン) 間での有意な陽転率の違いは認められなかった。

③PIGA 変異によらない非典型的 PNH の解析

PIGT 変異による PNH 症例を見いだした。本症例は、血管内容血に加え、じんましん、頻回の好中球遊走性髄膜炎といった特異症状を伴っていた。

3. 骨髄異形成症候群

①国際予後スコアリングシステムを利用した国内骨髄異形成症候群の検討

IPSS-R で収集された様々な臨床データを欧米人、日本人において比較検討したところ、いくつかの因子において両群間に有意差が見られた。下記はその一部である。

(1) 年齢、(2) 染色体以上 del15q 頻度、(3) 染色体 del16q 頻度、(4) 血小板数、(5) 好中球実数、(6) IPSS および IPSS-R におけるリスク群、(7) 全生存期間など。

いずれも $P < 0.005$ で統計学的有意差を認めた。しかし、欧米人と日本人の差、欧米センター間でのデータの差、日本データベース間の差を比較するとそれぞれのパターンは異なっていた。

低リスク MDS では一般に異形成は軽度であり、診断に苦慮する症例も少なくない。WT1 mRNA は、AML や MDS で高発現することが報告されている。MDS では病期の進展にしたがって WT1 mRNA の発現が高くなることが示されており、MDS の診断、経過観察に用いられている。しかし、WT1 mRNA が MDS と他の造血不全症との鑑別に有用であるかどうかについては、症例が少なく、十分な検討が行なわれているとはいえない。今回、MDS56 例とその他の造血不全症 47 例において骨髄の WT1 mRNA 発現を後方視的に比較検討したところ、有意差を認めた。低リスク MDS や、低形成 MDS でも有意差を認めた。WT-1 mRNA は MDS の鑑別診断の一助となりうる可能性がある。

②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

(1) 症例登録とセントラルレビュー

2014 年には 34 例の登録があり、累計で 315 例の登録数となった。このうち 2015 年 1 月までに 294 例の中央診断が行われた。内訳は、再不貧が 62 例、MDS 191 例、急性骨髄性白血病 10 例、意義不明の特発性血球減少症 (idiopathic cytopenias of undetermined significance, ICUS) 9 例などとなっている。中央診断においても診断不能または診断保留となったものが 17 例あり、このうち 7 例は標本不良とされた。再不貧の診断時年齢中央値は 57.5 歳、男女比は 1 対 1.07 とほぼ半々で、診断時の病期は軽症が 11 例、中等症 17 例、やや重症 12 例、重症 17 例、最重症 5 例であった。発作性夜間血色素尿症 (Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH) 型血球は、調べられている 34 例中 21 例 (62%) で検出された。染色体異常は 10 例に認められ、このうちクローン性の定義を満たすものは、-Y が 3 例、-X が 1 例、del (20q) が 1 例、add (1p) と add (13q) の 2 つの異常も有する症例が 1 例であった。

FAB 分類で MDS に該当する症例は 198 例あり、これらの発症年齢の中央値は 68 歳で、男女比は 1.8 対 1 と男性に多かった。これらの WHO 分類での病型の内訳は、RCUD 36 例、RCMD 79 例、RAEB-1 が 23 例、RAEB-2 が 17 例、MDS-U が 11 例、CMML が 8 例などであった。このうち抗がん剤または放射線治療歴が 29 例 (15%) でみられた (治療関連 MDS)。PNH 型血球は、調べられている 35 例中 11 例 (31%) に検出された。染色体異常は、調べられている 195 例中 105 例 (54%) で認められた。3 個以上の異常を伴う複雑核型は、特発性の MDS の 16% にみられたのに対し、治療関連 MDS では 30% と高頻度であった。4 個以上の異常を伴う高度複雑核型では、そのほとんどで極めて予後不良とされるモノソーマル核型を認めた。

(2) 追跡調査研究

診断から1年以上を経過して登録された症例は、前方視的研究の趣旨に鑑みて、追跡調査から除外した。また、診断から4週未満で転医などのために追跡終了となった症例も、追跡調査の対象から除外した。これらを除くと、2014年末時点で247例についての追跡情報が得られている。再不貧では、追跡情報の得られた47例のうち、30例(64%)で免疫抑制療法、3例で同種造血幹細胞移植が行われていた。生存者の追跡期間中央値が2年で、2年生存率は90%以上と良好であった。

MDSでは、追跡調査適格は160例で、生存者の追跡期間中央値は2年であった。改訂国際予後スコア化システム(Revised International Prognostic Scoring System, IPSS-R)によるMDSの予後解析では、5つのリスク群で生存曲線がきれいに分離された。生存期間中央値は、Intermediate群で49ヶ月、High群で19ヶ月、Very high群で11ヶ月であった。

IPSS-RでHighおよびVery highに該当する高リスクMDSの治療に関する解析を行った。4週間以上の追跡情報のある高リスクMDSの43例のうち、診断から6ヶ月以内に11例でアザシチジン、6例で造血幹細胞移植、4例で通常量の抗がん剤治療が行われていた。65歳以下の高リスクMDSの26症例中、最終的には18症例(69%)で造血幹細胞移植が行われていた。診断から移植までの期間の中央値は229日で、移植後の死亡の多くは1年以内に見られた。66歳以上の高リスクMDSでは、生存期間中央値が9ヶ月で、2年以上の生存者は見られなかった。

③造血不全疾患における体内鉄代謝マーカーの解析

全国の参加施設より63例の症例登録があった。

1. 登録時の各種鉄マーカーに関する解析
登録時の各種鉄代謝マーカーについて、疾患との関連などについて解析を行った。その結果、全症例における各種マーカー値の中央値は、フェリチン(Fer)184 ng/mL、血清鉄(Fe)125 µg/dL、トランスフェリン飽和度(Tsat)39.4%、NTBI 0.75 µM、ヘプシジン25 15.5 ng/mLであった。フェリチン値について、正常参考値を考慮して300 ng/mL以上を異常値とすると、異常値を示した症例割合は、AA 11.1%、MDS 40.5%でありMDSで有意に異常値を示す症例が多かった(p=0.034)。しかし、フェリチン値の分布について両者を比較すると有意差は認められず、MDSでは異常フェリチン値をきたす症例は多いものの、フェリチン値自体の分布には有意差を認めなかった。

MDSは造血不全による血球減少が問題となる低リスク症例(Lower-risk MDS: LR-MDS)と腫瘍増殖が問題となる高リスク症例(Higher-risk MDS: HR-MDS)に分けられ、両者で鉄動態が異なる

可能性が指摘されている。このため、MDSのうち、RA, RCUD, RCMD, RARSをLR-MDS、RAEBをHR-MDSとしてAA, LR-MDS, HR-MDSの3者でフェリチン値を比較した。その結果、AAとLR-MDSを比較した場合、異常値を示す症例はLR-MDSで有意に多かったものの(11.1% vs 52.0%, p=0.009)、フェリチン値の分布については、LR-MDSでやや高値である傾向は認められたものの、AA, LR-MDS, HR-MDSで有意差は認められなかった(p=0.072)。NTBIについては、正常参考値を考慮して0.4 µM以上を異常値とすると、異常値を示した症例割合は、AA 71.4%、MDS 70.4%であり、AA, MDS共に正常参考値を超過する症例が多く認められたものの、両者に差は認められなかった。また、AA, LR-MDS, HR-MDSの3者における比較でもNTBIの分布に有意差は認められなかった。また、NTBIと血清鉄、トランスフェリン飽和度、フェリチンの間にも有意な相関は認められなかった。ヘプシジン25についても、値の分布にAA, LR-MDS, HR-MDSで有意な差は認められなかった。また、フェリチン、血清鉄、トランスフェリン飽和度、NTBIとヘプシジン25の相関について検討したところ、フェリチンとの間に有意な相関を認めたが(p=0.02)、相関係数(rs)は0.34であり相関は軽度であった。

2. 登録時および登録一年後の鉄代謝マーカーの変化についての解析

登録時および観察終了時双方について検討可能であった症例についてフェリチン、トランスフェリン飽和度、NTBIおよびヘプシジン25の変化を検討したところ、フェリチン、トランスフェリン飽和度、ヘプシジン25には観察期間前後で有意差は認められなかったものの、NTBI値は有意に低下している事が明らかとなった。NTBIの有意な低下は、AA, MDS共に認められた。

④我が国における骨髄増殖性腫瘍患者の変異スペクトラム解析

JAK2 変異陽性の割合はPV 64例(97%)、ET 61例(54.5%)、PMF 11例(47.8%)であった。*CALR* 変異はET 22例(19.6%)、PMF 7例(30.4%)、*MPL* 変異はET 7例(6.3%)、PMF 1例(4.3%)で認められた。また、ETの患者において*JAK2* 変異と*MPL* 変異の両方を有する症例と、*JAK2* 変異と*CALR* 変異の両方を有する症例がそれぞれ1例ずつ認められた。PCR法で*JAK2*、*CALR*、*MPL* 変異が全て陰性であったtriple-negative症例は、*JAK2*、*CALR*、*MPL* の全エクソンをシーケンスした結果においてもすべて陰性であった。Triple negative症例はET 22例(19.6%)、PMF 4例(17.4%)で認められた。

⑤骨髄異形成症候群の病期進行に関する解析

1) MDS, AML患者骨髄におけるCLEC-2, Pdpnの発現
健康人、および低リスクMDS患者骨髄を用いた

解析では、巨核球、および血小板に CLEC-2 の強い発現を認めた。造血幹細胞分画における CLEC-2 の発現は認めなかったが、前駆細胞分画では一部の細胞に強い遺伝子発現を認め、FACSにて細胞表面での発現を確認した。一方、間質細胞では CLEC-2 の発現は認めず、また、造血細胞、間質細胞いずれにおいても Pdpn の発現は認めなかった。高リスク MDS、および AML (MDS overt AML を含む) 患者骨髄では、症例間で発現量に差は認めるものの、未分化な細胞分画に CLEC-2 の発現を認めた。また、これらの症例では、間質細胞の一部に CLEC-2、Pdpn を強く発現する分画を認めた。

2) 造血支持細胞における CLEC-2 が造血細胞の増殖、分化に及ぼす影響

CLEC-2 を発現しない骨髄ストローマ細胞株 MS-5 に、Mock および CLEC-2 をレトロウイルスを用いて遺伝子導入し、CLEC-2 の発現量の多い (high)、あるいは少ない (dim) 株を樹立した。各細胞株と造血細胞を SCF、FL、TPO 存在下で 7 日間共培養した結果、正常 HSC/HPCs では Mock, dim, high と CLEC-2 の発現量が多くなるに従い、生じる血球数が有意に減少し、増殖抑制を認めた。表面抗原上は、未分化な細胞の有意な減少と、顆粒球系、単球系マーカー陽性細胞の増加を認め、骨髄球系への分化が促進していると考えられた。一方 MDS 細胞では、MS-5 における CLEC-2 の発現量が多くなるに従い、未分化な細胞が維持され、生じる血球数も有意に増加した。

⑥骨髄異形成症候群における末梢血無細胞遊離 DNA を用いた遺伝子変異解析

PB-cfDNA の濃度解析では、MDS 患者血漿由来 PB-cfDNA は正常人血漿由来に比べて有意に高いことが確認され ($p=0.0405$)、また国際予後分類 (IPSS) 高リスク群 (Int-2, High) における血漿 PB-cfDNA の濃度は、低リスク群 (Low, Int-1) に比べて有意に濃度が高いことが示された ($p=0.0339$)。また、同一症例の同時期に採取された骨髄細胞と血漿 PB-cfDNA を用いた Target sequence 法による複数症例における遺伝子変異解析では、骨髄細胞由来 DNA 及び PB-cfDNA より同様の遺伝子変異 (*CDKN2A* (H66R), *U2AF1* (S34Y), *SETBP1* (D868N, I871T), *TP53* (R175H) など) が確認された。

⑦骨髄異形成症候群に対する同種造血幹細胞移植法の検討

期間中、初回同種造血幹細胞移植を受けた MDS および MDS から進展した白血病患者数は 13 例であった。診断時 RAEB-2 の患者の全例が移植時白血病化していた。白血病の状態で移植した 6 例全例が移植前に化学療法を受けていたが、寛解に至ったのは 2 例のみであった。他にアザシジン治療を受けた患者も 2 例あったが、いずれも無効であった。診断時 IPSS で Intermediate-2 以上の患者 10 例のうち、途中

で通院を自己中断した 1 例を除く 9 例の移植までの中央値は 145 日であった。移植後 2 年の全生存率は 43.3% であった。白血病状態で移植した症例とそれ以外の症例とでは、全生存率に大きな差を認めなかった。本解析の時点で 5 例が生存しており、8 例が死亡していた。急性 GVHD や肺合併症といった治療関連死亡が 7 例であり、原疾患の再発・悪化による死亡は 1 例のみであった。治療関連死亡例のうち 4 例が移植後 100 日以内に死亡していた。

⑧鉄芽球性貧血の発症機序と治療法に関する研究

本邦の遺伝性鉄芽球性貧血では、赤血球系細胞におけるヘム合成系の初発遺伝子である ALAS2 遺伝子の変異が最も高頻度で認められた。ALAS2 が合成する ALA を人為的に ALAS2 の発現を低下させた iPS 由来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。さらにこの ALA の取り込みは SLC36A1 を介していることが明らかになった。

⑨成人慢性好中球減少症におけるゲノム解析

①患者背景:成人慢性好中球減少症 13 例から試験登録の同意が得られた。うち 2 例が好中球数最低値が $500/\mu\text{L}$ 未満の重症であり、5 例が $1,000/\mu\text{L}$ 未満の中等症であった。3 例に家族歴がみられた。また 2 例は周期性の好中球減少症を呈していたが、家族歴はなかった。

②STAT3 遺伝子解析:好中球減少の原因として、顕在化していない LGL の存在を仮定し、LGL で高頻度に変異がみられる STAT3 について次世代シーケンサーによる変異解析を行った。現在までに 12 例を解析したが、変異は認められなかった。

③MDS・AML で変異がみられる遺伝子の網羅的解析:計 32 遺伝子について、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析を行った。

4. 骨髄線維症

①本邦の原発性骨髄線維症の臨床像

273 施設より計 718 例の原発性骨髄線維症の新規症例を集積した。発症年齢中央値は 66 歳、男女比は 2.0:1 である。Hb 10g/dl 未満の貧血を 68% に、血小板数 $10\text{万}/\mu\text{L}$ 未満を 35% に、 $50\text{万}/\mu\text{L}$ 以上を 12% に認めた。末梢血への芽球の出現は 57% に認めている。JAK2 変異の検索は 185 例に施行されており、変異が 52% に認められた。生存期間の中央値は 3.9 年であり、3 年生存率は 59.0% であった。死因は感染症、白血化の順に多く見られた。

国際予後スコアリングシステムを用いて 1999 年以降 2014 年までに前向きに経過観察している本邦の原発性骨髄線維症の予後を診断時のリスク因子を用いて分類した。DIPSS-Plus (Dynamic International Prognostic Scoring