

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 5 年 6 ヶ月間で 1,200 例がレビューされた。レビュー結果は AA が 154 例、refractory cytopenia of childhood (RCC) が 275 例、refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD) が 137 例、refractory anemia with excess blasts (RAEB) が 29 例、二次性 MDS が 7 例、治療関連 MDS が 26 例、若年性骨髄単球性白血病 (JMML) が 93 例、CBFS が 65 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。

(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を行った。

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。

C. 研究結果

平成 21 年 2 月から 2014 年 8 月までに 1,200 例(男 655 例、女 545 例、年齢:0-39 歳)が中央診断に登録され、レビューを受けた。骨髄不全症は 678 例で全体の 57%を占めていた。内訳は AA 154 例(23%)、RCC 275 例(41%)、RCMD 137 例(20%)、肝炎関連造血障害 43 例(6%)、CBMF 65 例(10%)であった。CBMF においては Fanconi 貧血が 25 例で最も多く、次いで Shwachman 症候群が 13 例、Dyskeratosis congenita が 9 例であった。病歴から CBFM

が疑われながらも診断を確定できない症例が18例みられた。進行期MDSにおいてはRAEBが29例、二次性MDSが7例、治療関連MDSが26例みられた。

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41%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20%みられることがわかった。一方でAAが23%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18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

1) 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*. 2014 Apr;99(4):664-671.

2) Kawashima N, Narita A, Wang X, Xu Y, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Kojima S. Aldehyde dehydrogenase-2 polymorphism contributes to the progression of bone marrow failure in children with idiopathic aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 2014 Sep 11.

3) Kobayashi R, Yabe H, Kikuchi A, Kudo K, Yoshida N, Watanabe K, Muramatsu H, Takahashi Y, Inoue M, Koh K, Inagaki J, Okamoto Y, Sakamaki H, Kawa K, Kato K, Suzuki R, Kojima S. Bloodstream infection after stem cell transplantation in children with idiopathic aplastic anemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 Aug;20(8):1145-1149.

4) Kojima S. Treatment of aplastic anemia in children. *Rinsho Ketsueki*. 2014 Oct;55(10):1769-76.

5) Yagasaki H, Shichino H, Ohara A, Kobayashi R, Yabe H, Ohga S, Hamamoto K, Ohtsuka Y, Shimada H, Inoue M, Muramatsu H, Takahashi Y, Kojima S. Immunosuppressive therapy with horse anti-thymocyte globulin and cyclosporine as treatment for fulminant aplastic anemia in children. *Ann Hematol*. 2014 May;93(5):747-752.

- | | |
|--|--|
| <p>6) Yoshida N, Kobayashi R, Yabe H, Kosaka Y, Yagasaki H, Watanabe KI, Kudo K, Morimoto A, Ohga S, Muramatsu H, Takahashi Y, Kato K, Suzuki R, Ohara A, Kojima S. First-line treatment for severe aplastic anemia in children: bone marrow transplantation from a matched family donor vs. immunosuppressive therapy. <i>Haematologica</i>. 2014 Dec;99(12):1784-1791.</p> | <p>1. 特許取得
該当なし</p> <p>2. 実用新案登録
該当なし</p> <p>3. その他
該当なし</p> |
|--|--|

2. 学会発表

- 1) Hama A. Central Review of morphology in childhood aplastic anemia and myelodysplastic syndrome in Japan-summary of 1,000 cases. 25th Annual Meeting of the International BFM Study Group. Clarion Congress Hotel Apr. 26, 2014. Czech, Praha.
- 2) Kojima S. Expert Meeting at Wuhan Union Hospital Jul.15, 2014. Wuhan, China.
- 3) Kojima S. Expert Meeting at Wharton International Hotel. Jul.16, 2014. Wharton, China.
- 4) 高橋 義行. 造血細胞移植後にみられる感染症に対する治療の進歩. 第 117 回日本小児科学会学術集会. 2014年4月11日. 名古屋.
- 5) 小島勢二. 小児再生不良性貧血の治療. 第 76 回日本血液学会学術集会. 2014 年 11 月 2 日. 大阪.

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

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

研究協力者：小松 則夫（順天堂大学・教授）

研究要旨

全国より骨髄増殖性腫瘍の患者検体を収集し、WHO2008 分類に基づいて、201 例の診断を確定させた。このコホートを対象とし、JAK2 変異、CALR 変異、MPL 変異の頻度を解析した。その結果、JAK2 変異、CALR 変異、MPL 変異の検出頻度は真性赤血球増加症ではそれぞれ 97%、0%、0%、本態性血小板血症では 54.5%、19.6%、6.3%、原発性骨髄線維症ではそれぞれ 47.8%、30.4%、4.3%であった。この割合や臨床的特徴は欧米諸国からの報告とほぼ一致していた。しかし、JAK2 変異、CALR 変異、MPL 変異のいずれの変異も検出されない“triple negative”患者群は、他の遺伝子変異陽性群と比べて有意に年齢が低かった。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

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、次世代シーケ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。

（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

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。

D. 考察

ET では CALR 変異群と MPL 変異群は、JAK2 変異群と比較して白血球数が低値で血小板数が高値であった。CALR 変異群は赤血球数の値が低い傾向があった。ET において JAK2 変異は女性に多く、CALR 変異は男性に多く認められた。これらの特徴は欧米からの報告と同様であった。しかしながら、triple negative ET 患者群は他の 3 つの変異群とそれぞれ比較して 14 歳以上も平均年齢が低く、統計学的な有意差を認めた。同様の傾向は PMF においても認められ、我が国のコホートに特徴的なものであった。以上の結果は triple negative ET と PMF

の発症に人種的な違いが存在し、その違いが早期発症に関わっていることが示唆された。

E. 結論

我が国における骨髄増殖性腫瘍の変異スペクトラムを同定できた。特に、JAK2 変異、CALR 変異、MPL 変異のいずれも陰性である患者群は他のコホートと比較しても有意に若年層で発症しており、我が国に特徴的なものとして、さらなる解析が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

● Harada-Shirado K, Ikeda K, Ogawa K, Ohkawara H, Kimura H, Kai T, Noji H, Morishita S, Komatsu N, Takeishi Y: Dysregulation of the MIRLET7/HMGA2 axis with methylation of the CDKN2A promoter in myeloproliferative neoplasms. *Br J Haematol.* 2015; 168(3):338-349.

● Mitumori T, Nozaki Y, Kawashima I, Yamamoto T, Shobu Y, Nakajima K, Morishita S, Komatsu N, Kirito K. Hypoxia inhibits JAK2V617F activation via suppression of SHP-2 function in MPN cells. *Experimental hematology.* 2014; 42(9):783-792.

● Edahiro Y, Morishita S, Takahashi K, Hironaka Y, Yahata Y, Sunami Y, Shirane S, Tsutsui M, Noguchi M, Koike M, Imai K, Kirito K, Noda N, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Ohsaka A, Araki M, Komatsu N:

JAK2V617F mutation status and allele burden in classical Ph-negative myeloproliferative neoplasms in Japan. *Int J Hematol.* 2014; 99(5) 625-634

● Takei H, Morishita S, Araki M, Eda Hiro Y, Sunami Y, Hironaka Y, Noda N, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Ohsaka A, Komatsu N: Detection of MPLW515L/K mutations and determination of allele frequencies with a single-tube PCR assay. *PLoS ONE.* 2014; 9(8) e104958

● Shirane S, Araki M, Morishita S, Eda Hiro Y, Takei H, Yoo Y, Choi M, Sunami Y, Hironaka Y, Noguchi M, Koike M, Noda N, Ohsaka A, Komatsu N: JAK2, CALR, and MPL mutation spectrum in Japanese patients with myeloproliferative neoplasms. *Haematologica.* 2015; 100(2) e46-8

● Shirane S, Araki M, Morishita S, Eda Hiro Y, Sunami Y, Hironaka Y, Noguchi M, Koike M, Sato E, Ohsaka A, Komatsu N: Consequences of the JAK2V617F allele burden for the prediction of transformation into myelofibrosis from polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Int J Hematol.* 2015; 101(2) 148-53

● Morishita S, Takahashi K, Araki M, Hironaka Y, Sunami Y, Eda Hiro Y, Tsutsui M, Ohsaka A, Tsuneda S, Komatsu N: Melting curve analysis after T allele enrichment

(MelcaTle) as a highly sensitive and reliable method for detecting the JAK2V617F mutation. *PLoS ONE.* In press

2. 学会発表

● Sunami Y, Araki M, Ito A, Hironaka Y, Ohsaka A, Yoshida M, Komatsu N. Histone acetyltransferase PCAF is required for ATRA-induced granulocytic differentiation in acute promyelocytic leukemia cells. The American Society of Hematology 56th Annual Meeting, 2014.12.6-9, San Francisco, CA, USA

● Shirane S, Araki M, Morishita S, Hironaka Y, Noguchi M, Koike M, Hirano T, Ohsaka A, Komatsu N. Dynamic increase in JAK2V617F allele burden is a predictive parameter for the transformation into myelofibrosis from polycythemia vera and essential thrombocythosis. The American Society of Hematology 56th Annual Meeting, 2014.12.6-9, San Francisco, CA, USA

● Sunami Y, Araki M, Ito A, Hironaka Y, Ohsaka A, Yoshida M, Komatsu N. Histone acetyltransferase PCAF is required for ATRA-induced granulocytic differentiation in APL cells. The 35th World Congress of the International Society of Hematology, 2014.9.4-7, Beijing, China

● Sunami Y, Araki M, Ito A, Hironaka Y, Ohsaka A, Yoshida M, Komatsu N. PCAF, a

histone acetyltransferase, is required for ATRA-dependent granulocytic differentiation in APL cells. The 5th Japanese Society of Hematology International Symposium, 2014.5.24-25, Hamamatsu, Shizuoka, Japan

● Sunami Y, Araki M, Ito A, Hironaka Y, Ohsaka A, Yoshida M, Komatsu N. ATRA induces APL cell granulocytic differentiation through the PCAF overexpression. The 76th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. 2014.10.31-11.2, Osaka, Osaka, Japan

● Takei H, Morishita S, Araki M, Edahiro Y, Sunami Y, Hironaka Y, Noda N, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Ohsaka A, Komatsu N. Establishment of a novel assay for MPLW515/K detection and allele burden measurement. The 76th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. 2014.10.31-11.2, Osaka, Osaka, Japan

● Tsutsui M, Araki M, Sunami Y, Hironaka Y, Ohsaka A. Establishment of acute erythroid leukemia cell line, EL-1. The 76th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, 2014.10.31-11.2, Osaka, Osaka, Japan

● Shirane S, Araki M, Morishita S, Edahiro Y, Sunami Y, Hironaka Y, Ohsaka A, Komatsu N. JaK2V617F allele burden is a

potential prognostic factor for the transformation into myelofibrosis. The 76th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, 2014.10.31-11.2, Osaka, Osaka, Japan

● Edahiro Y, Shirane S, Takei H, Morishita S, Sunami Y, Hironaka Y, Tsuneda S, Ohsaka A, Araki M, Komatsu N. MPL mutation analysis of Ph-negative myeloproliferative neoplasms in Japan. The 76th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, 2014.10.31-11.2, Osaka, Osaka, 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

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

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

これまで岡山大学において MDS 患者に対する骨髄非破壊的前処置 (Reduced intensity conditioning: RIC) を用いた同種造血細胞移植の治療成績を報告してきた。今回、骨髄破壊的前処置 (Myeloablative conditioning: MAC) を用いた患者も含め、計 61 例の MDS 患者に対する移植成績を後方視的に解析した。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

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。

(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、倫理面の問題は無い。

C. 研究結果

OS の中央値は 217 日、PFS は 146 日であった。

長期生存は 23.1% であった (図 1)。移植前処置の強度については、RIC が良い傾向であったが有意差は認めなかった (図 2)。非再発死亡および原疾患の悪化がそれぞれ 42%, 36% に上り、やはり非再発死亡率の低下が治療成績の向上に必須であると考えられた (図 3)。

死亡した 40 例のうち、再発あるいは原疾患の進行によるものが 19 例 (48%)、非再発死亡が 21 例 (52%) であった。非再発死亡のうちわけは、急性 GVHD 4 例、呼吸不全 3 例、TMA 1 例、VOD/SOS 2 例、感染症 10 例 (細菌 7 例、真菌 1 例、ウイルス 2 例)、肺がん 1 例であった。

急性 GVHD の累積発症率は 48% であったが、治療を要した II 度以上は 26%、III 度以上は 8% であった (図 4)。慢性 GVHD の累積発症率は 37% であった (図 5)。慢性 GVHD 発症群のほうが OS が良好な傾向が見られたが、有意差は認めなかった (図 6)。

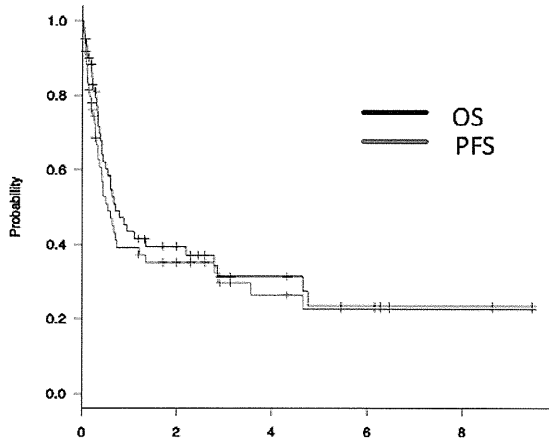


図1 OS & PFS

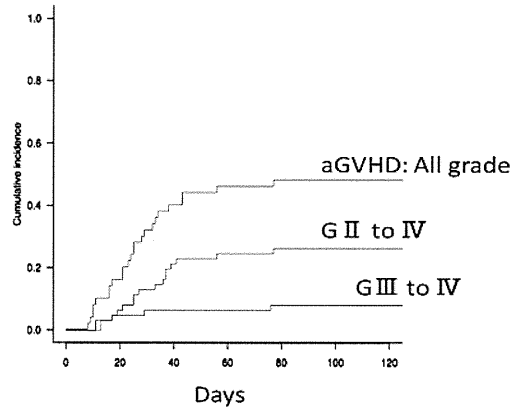


図4 急性GVHD

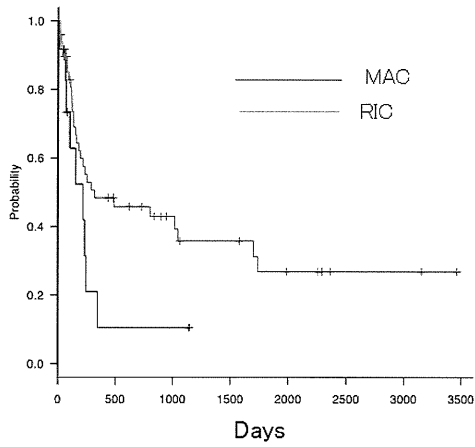


図2 OS (MAC と RIC の比較)

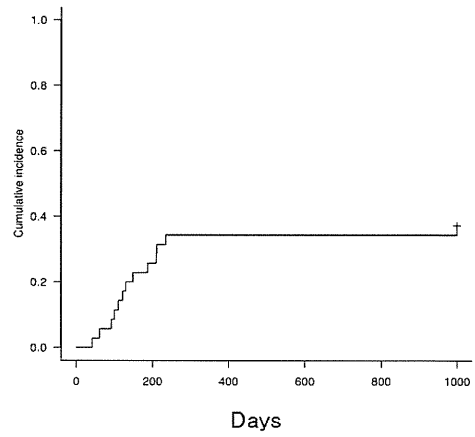


図5 慢性GVHD (累積発症率)

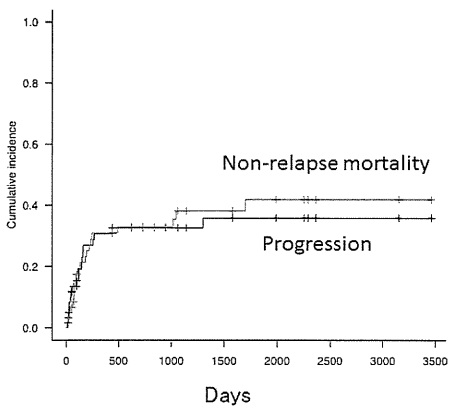


図3 非再発死亡と原疾患の悪化

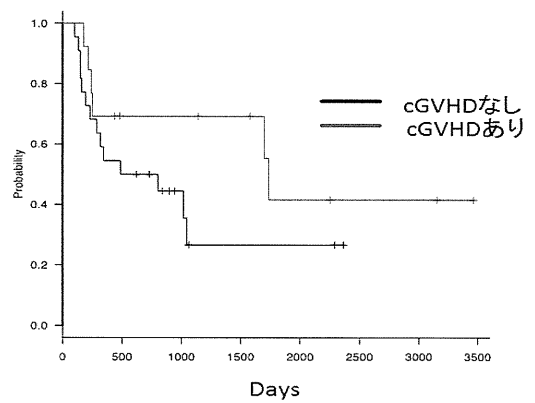


図6 OS と慢性GVHD

D. 考察

当院における MDS の同種造血幹細胞移植は約 20%の症例で長期生存が得られており、一定の効果が確認できた。

疾患の性質上、高齢者に対して RIC による前処置で施行しているケースが多くを占めた。非再発死亡の多さが治療成績に影響しており、治療成績の向上には移植関連合併症をいかに回避するかが重要であることが再確認できた。

E. 結論

MDS に対する造血幹細胞移植を後方視的に解析した。今後、非再発死亡を回避するための患者リスクの評価、および支持療法のさらなる改良が必要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sugiyama H, Maeda Y, Nishimori H, Yamasuji Y, Matsuoka K, Fujii N, Kondo E, Shinagawa K, Tanaka T, Takeuchi K, Teshima T, **Tanimoto M**. Mammalian target of rapamycin inhibitors permit regulatory T cell reconstitution and inhibit experimental chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 Feb;20(2):183-91
2. Fujii N, Nakase K, Asakura S, Matsuo K, Nawa Y, Sunami K, Nishimori H, Matsuoka K, Kondo E, Maeda Y, Shinagawa K, Hara M, **Tanimoto M**. Bronchiolitis obliterans with allogeneic hematopoietic cell transplantation: a 10-year experience of the Okayama BMT Group. *Int J Hematol*. 2014 May;99(5):644-51

3. Fujiwara H, Maeda Y, Kobayashi K, Nishimori H, Matsuoka K, Fujii N, Kondo E, Tanaka T, Chen L, Azuma M, Yagita H, **Tanimoto M**. Programmed death-1 pathway in host tissues ameliorates Th17/Th1-mediated experimental chronic graft-versus-host disease. *J Immunol*. 2014 Sep 1;193(5):2565-73

4. Asano T, Fujii N, Niiya D, Nishimori H, Fujii K, Matsuoka K, Ichimura K, Hamada T, Kondo E, Maeda Y, Tanimoto Y, Shinagawa K, **Tanimoto M**. Complete resolution of steroid-resistant organizing pneumonia associated with myelodysplastic syndrome following allogeneic hematopoietic cell transplantation.

5. Okamoto S, Fujiwara H, Nishimori H, Matsuoka K, Fujii N, Kondo E, Tanaka T, Yoshimura A, **Tanimoto M**, Maeda Y. Anti-IL-12/23 p40 Antibody Attenuates Experimental Chronic Graft-versus-Host Disease via Suppression of IFN- γ /IL-17-Producing Cells. *J Immunol*. 2015 Feb 1;194(3):1357-63

2. 学会発表

1. Hideaki Fujiwara, Yoshinobu Maeda, Yasunaga Sando, Makoto Nakamura, Katsuma Tani, Takanori Ishikawa, Hisakazu Nishimori, Ken-ichi Matsuoka, Nobuharu Fujii, Eisei Kondo, **Mitsune Tanimoto**. Use of Recombinant Thrombomodulin for Thrombotic Microangiopathy after Hematopoietic Stem

Cell Transplantation Ameliorate Disease Severity. 56th American Society of hematology 20141206 SanFrancisco

2. Taiga Kuroi, Sachiyo Okamoto, Kyosuke Saeki, Yujin Kobayashi, Hisakazu Nishimori, Hideaki Fujiwara, Ken-ichi Matsuoka, Nobuharu Fujii, Eisei Kondo, **Mitsune Tanimoto** and Yoshinobu Maeda. Anti-IL-12/23 p40 Antibody Attenuates Chronic Graft Versus Host Disease Via Suppression of IFN- γ /IL-17-Producing Cells. 56th American Society of hematology 20141206 SanFrancisco

3. Takanori Yoshioka, Ken-ichi Matsuoka , Yusuke Meguri, Takeru Asano, (Taro Masunari, Kumiko Kagawa, Koichi Nakase), Yoshinobu Maeda, **Mitsune Tanimoto**. Homeostatic Expansion of Regulatory T Cells with the Predominant Effector/Memory Phenotype May Stabilize Immune Recovery in the First Month after HSCT. 56th American Society of hematology 20141207 SanFrancisco

4. Takeru Asano, (Haesook T. Kim, John Koreth, Robert J Soiffer), Yusuke Meguri, Takanori Yoshioka, (Hideo Yagita), **Mitsune Tanimoto**, (Jerome Ritz) and Ken-ichi Matsuoka. Enhanced expression of PD-1 modulates CD4+Foxp3+ regulatory T cell homeostasis during low-dose IL-2 therapy. in patients with chronic Graft-versus-Host disease. 56th American Society of hematology 20141208 SanFrancisco

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

成人慢性好中球減少症におけるゲノム解析

研究協力者：千葉 滋（筑波大学・教授）

研究要旨

成人慢性好中球減少症において、先天性遺伝子変異、体細胞性遺伝子変異双方の観点からターゲットシーケンス解析を行い、候補遺伝子について validation 中である。今後標的遺伝子をさらに増やして解析する予定である。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

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。これらを用いて骨髓異形成症候群（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。

（倫理面への配慮）

ヘルシンキ宣言（2008 年ソウル修正）、臨床研究に関する倫理指針（平成 20 年）およびヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 25 年改正）に従って本試験を実施した。試験計画は施設倫理委員会の承認を得た。検体採取にあたっては、承認された計画に従い患者からインフォームド・コンセントを得た。

C. 研究結果

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。

診断時年齢	中央値 45 歳	(23 – 75 歳)
性別	男性 2	女性 11
家族歴	なし 10	あり 3
重症度	軽症 6	中等症 5
		重症 2
周期性	なし 11	あり 2

表 1 登録患者背景

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。候補遺伝子について現在 validation 中である。

D. 考察

患者背景から、家族歴があり先天性の好中球減少症と思われるにもかかわらず成人まで診断されない例があること、一般に遺伝性とされる周期性好中球減少症だが成人発症の孤発性が

存在することなどが再確認された。網羅的遺伝子解析から抽出された候補についてバリデーション中である。

E. 結論

成人慢性好中球減少症においては、先天性遺伝子変異、体細胞性遺伝子変異のいずれも発見される可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yokoyama Y, Chiba S: Disease-Specific Mutations in Mature Lymphoid Neoplasms-Recent Advances. *Cancer Sci* 2014; 105 (623-629)
- Lee SY, Okoshi Y, Kurita N, Seki M, Yokoyama Y, Maie K, Hasegawa Y, Chiba S: Prognosis Factors in Japanese Elderly Patients with Primary Central Nervous System Lymphoma Treated with a Nonradiation, Intermediate-Dose Methotrexate-Containing Regimen. *Oncol Res Treat* 2014; 37 (378-383)
- Maie K, Yokoyama Y, Kurita N, Minohara H, Yanagimoto S, Hasegawa Y, Homma M, Chiba S: Hypouricemic effect and safety of febuxostat used for prevention of tumor lysis syndrome. *SpringerPlus* 2014; 3 e501
- Kato T, Sakata-Yanagimoto M, Nishikii H, Miyake Y, Yokoyama Y, Asabe Y, Kamada Y, Ueno M, Obara N, Suzukawa K, Hasegawa Y, Kitabayashi I, Uchida K, Hirao A, Yagita H, Kageyama R, Chiba S: Hes1 suppresses acute myeloid leukemia development through FLT3 repression. *Leukemia*, 2014 Epub ahead of print

- Nakamoto-Matsubara R, Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yoshida K, Yanagimoto S, Shiozawa Y, Nanmoku T, Satomi K, Muto H, Obara N, Kato T, Kurita N, Yokoyama Y, Izutsu K, Ota Y, Sanada M, Shimizu S, Komeno T, Sato Y, Ito T, Kitabayashi I, Takeuchi K, Nakamura N, Ogawa S, Chiba S: Detection of the G17V RHOA mutation in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and related lymphomas using quantitative allele-specific PCR. *PLoS One* 2014; 9 (e109714)
- Muto H, Sakata-Yanagimoto M, Nagae G, Shiozawa Y, Miyake Y, Yoshida K, Enami T, Kamada Y, Kato T, Uchiba K, Nanmoku T, Obara N, Suzukawa K, Sanada M, Nakamura N, Aburatani H, Ogawa S, Chiba S: Reduced TET2 Function Leads to T-cell Lymphoma with Follicular Helper T cell-like Features in mice. *Blood Cancer J* 2014; 4 (e264)
- Truong P, Sakata-Yanagimoto M, Yamada M, Nagae G, Enami T, Nakamoto-Matsubara R, Aburatani H, Chiba S: Age-Dependent Decrease of DNA Hydroxymethylation in Human T Cells. *J Clin Exp Hematopathol* in press
- Iriyama N, Fujisawa S, Yoshida C, Wakita H, Chiba S, Okamoto S, Kawakami K, Takezako N, Kumagai T, Inokuchi K, Ohyashiki K, Taguchi J, Yano S, Igarashi T, Kouzai Y, Morita S, Sakamoto J, Sakamaki H: Shorter halving time of BCR-ABL1 transcripts is a novel predictor for achievement of molecular responses in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia

treated with dasatinib: results of the D-First study of Kanto CML Study Group. Am J Hematol 2014; Epub ahead of print

2. 学会発表

●Shigeru Chiba. Origin of and its clonal evolution in angioimmunoblastic T-cell lymphoma . 1st Taiwan-Japan Hematology Forum, 2014.4.13, Taipei, Taiwan

●Shigeru Chiba. Pre-cancer stem cells in malignant lymphoma . 2014 SNUCRI Cancer Symposium, 2014.4.16-19, Mokpo, Korea

● Shinichi Ogawa , Masanori Seki , Tatsuhiro Sakamoto , Naoki Kurita , Yasuhisa Yokoyama , Mamiko Sakata-Yanagimoto , Naoshi Obara , Yuichi Hasegawa, Daisuke Kudo, Atsushi Shinagawa, Shigeru Chiba. Prognostic factors associated with overall survival in elderly patients with acute myeloid leukemia: a retrospective multi-center study on 109 patients. The 5th JSH International Symposium 2014 in HAMAMATSU , 2014.5.24-25 , Hamamatsu

● Takayasu Kato , Mamiko Sakata-Yanagimoto, Yasuyuki Miyake, Hidekazu Nishikii, Yasuhisa Yokoyama, Naoshi Obara, Kazumi Suzukawa, Issay Kitabayashi, Hideo Yagita, Ryoichiro Kageyama, Shigeru Chiba . Hes1 Suppresses Acute Myeloid Leukemia Development in Conjunction with FLT3 Repression. The 5th JSH International Symposium 2014 in HAMAMATSU , 2014.5.24-25, Hamamatsu

●Mamiko Sakata-Yanagimoto, Shigeru Chiba . Discrimination of mutations arising in pre-malignant cells and those in lymphoma cells in angioimmunoblastic t-cell lymphoma. The 12th Stem Cell Research Symposium , 2014.5.30-31 , Fukuoka

● Mamiko Sakata-Yanagimoto , Yukitsugu Asabe, Kenichi Yoshida, Hideharu Muto, Rie Nakamoto-Matsubara, Koji Izutsu, Naoya Nakamura, Kengo Takeuchi, Seishi Ogawa, Shigeru Chiba . Discrimination of Mutations Arising in Pre-Malignant Cells and Those in Lymphoma Cells in Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma. 19th Congress of the EHA 2014, 2014.6.12-15, Milano, Italy

● Terukazu Enami , Mamiko Sakata-Yanagimoto, Kenichi Yoshida, Ryohei Ishii, Aiko Sato-Otsubo, Yusuke Sato, Masashi Sanada, Osamu Nureki, Seishi Ogawa, Shigeru Chiba. Impaired RHOA Function Leads to Development of Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma. 19th Congress of the EHA 2014 , 2014.6.12-15, Milano, Italy

● Hidekazu Nishikii , Yury Goltsev, Yosuke Kanazawa, Terumasa Umemoto, Yu Matsuzaki, Kenji Matsushita, Garry Nolan, Masayuki Yamato, Robert Negrin Shigeru Chiba . Monopotent Megakaryopoietic Pathway Bridging Hematopoietic Stem Cells and Megakaryocytes . International Society for Stem Cell Research 12th annual meeting , 2014.6.18-21 , Vancouver, Canada

●Mamiko Sakata-Yanagimoto, Shigeru Chiba. Multistep tumorigenesis in peripheral T-cell lymphoma. 第73回 日本癌学会学術総会, 2014.9.25-27, 横浜

●Mamiko Sakata-Yanagimoto, Shigeru Chiba. Identification of multistep genetic abnormalities in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. 第73回 日本癌学会学術総会, 2014.9.25-27, 横浜

●Terukazu Enami, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Kenichi Yoshida, Ryohei Ishii, Aiko Sato, Yusuke Sato, Masashi Sanada, Osamu Nureki, Seishi Ogawa, Shigeru Chiba. Impaired RHOA function leads to development of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. 第73回 日本癌学会学術総会, 2014.9.25-27, 横浜

●松原(中本)理絵, 坂田(柳元)麻実子, 榎並輝和, 武藤秀治, 伊藤孝美, 米野琢哉, 千葉 滋. Detecting disease specific mutation for AITL in circulating DNA. 第73回 日本癌学会学術総会, 2014.9.25-27, 横浜

●Mamiko Sakata-Yanagimoto, Shigeru Chiba. Mutations in epigenetic and metabolic regulators in peripheral T-cell lymphoma. 第76回 日本血液学会学術集会, 2014.10.31-11/2, 大阪

●Naoshi Obara, Haruhiko Ninomiya, Shigeru Chiba, Kensuke Usuki, Kaichi Nishiwaki, Itaru Matsumura, Tsutomu Shichishima, Shinichiro Okamoto, Jun-ichi Nishimura, Kazuma Ohyashiki, Shinji Nakao, Kiyoshi Ando, Tastyu Kawaguchi, Hideki Nakakuma, Taroh Kinoshita, Keiya Ozawa, Mitsuhiro Omine, Yuzuru Kanakura. Factors which might affect improvement of anemia b

y eculizumab in PNH patients. 第76回 日本血液学会学術集会, 2014.10.31-11.2, 大阪

●Naoshi Obara, Tatsuhiro Sakamoto, Shigeru Chiba. Localization of nestin-expressing cells in bone marrow and the role of Notch signaling. 第76回 日本血液学会学術集会, 2014.10.31-11.2, 大阪

●Yasuhisa Yokoyama, Naoshi Obara, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Takayasu Kato, Hideharu Muto, Naoki Kurita, Masanori Seki, Yuichi Hasegawa, Shigeru Chiba. Adult chronic neutropenia in Japan -questionnaire investigation-. 第76回 日本血液学会学術集会, 2014.10.31-11.2, 大阪

●Tran Bich Nguyen, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Yukitsugu Asabe, Kenichi Yoshida, Hideharu Muto, Rie Nakamoto-Matsubara, Koji Izutsu, Naoya Nakamura, Kengo Takeuchi, Seishi Ogawa, Shigeru Chiba. Identification of Cell-Type-Specific Mutations in Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma. The American Society of Hematology 56th Annual Meeting and Exposition, 2014.12.6-9, San Francisco, CA, USA

●Shigeru Chiba. Clonal origin of microenvironmental cells in malignant lymphoma. Joint International Symposium on TGF- β Family and Cancer Signal Network in Tumor Microenvironment, 2015.1.12-13, Tsukuba

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。

鉄芽球性貧血の発症機序と治療法に関する研究

研究協力者：張替 秀郎（東北大学大学院医学系研究科 教授）

研究要旨

鉄芽球性貧血に対する新規治療法を確立するために、アミノレブリン酸（ALA）に注目し基礎的研究を行った。その結果、その結果、*ALAS2* 遺伝子の変異による ALA の合成不全で発症する遺伝性鉄芽球性貧血においては ALA の投与が有効である可能性が示唆された。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

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。

D. 考察

In vitro で鉄芽球を作成する実験系が確立されていないため、ALA が実際に鉄芽球性貧血の治療薬としての有効であるかどうかについては、in vivo のモデル作成を含め、今後さらに検討する必要がある。

E. 結論

ALAS2 遺伝子変異による鉄芽球性貧血には ALA が有効である可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Fujiwara T, Okamoto K, Niikuni R, Takahashi K, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Nakamura Y, Nakajima M, Tanaka T, Harigae H.

Effect of 5-aminolevulinic acid on erythropoiesis:

A preclinical in vitro characterization for the treatment of congenital sideroblastic anemia.

Biochem Biophys Res Commun. 2014 ;454:102-8.

2. 学会発表

Niikuni R, Fujiwara T, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Tanaka T, Harigae H. Exploring the potential usefulness of 5-aminolevulinic acid (ALA) for sideroblastic anemia. 第 76 回日本血液学会 2014 年 10 月 (大阪)

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

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」

研究協力者：松田 晃（埼玉医科大学国際医療センター造血器腫瘍科 教授）

研究分担者：高折 晃史（京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学講座 教授）

研究協力者：通山 薫（川崎医科大学 検査診断学 教授）

研究要旨

2004年3月から2014年3月までに登録された「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)であった57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群の診断時臨床像と前方視的に免疫抑制療法(IST)への反応性を調査した。non-dys AA群は43例(重症例:15例、非重症例:27例、重症度不明:1例)であった。AA with miniD群は14例(重症例:5例、非重症例:9例)であった。両群の重症度に有意差は認められなかった($p>0.99$)。AA with miniD群に認められた異形成は赤芽球系の1系統のみであった。性、診断時年齢は両群に有意差は認められなかったが、染色体異常の保有はAA with miniD群で多い傾向があった(non-dys AA:8.3%, AA with miniD:28.6%, $p=0.06$)。ISTに対する効果判定が可能な症例はnon-dys AA群は17例(重症例:5例、非重症例:12例)で、AA with miniD群は6例(重症例:4例、非重症例:2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)で、AA with miniD群は全例がresponder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($p=0.27$)。

A. 研究目的

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。

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。

B. 研究方法

「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

(倫理面への配慮)

「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・追跡調査研究」参加各施設の倫理委員会の承認を受け、匿名化を行っている。

C. 研究結果

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($p=0.27$)。

D. 考察

AAと診断した例においても、1系統に10%以上の異形成が認められる例があった。2系統以上に異形成が認められる例は無く、10%以上の異形成ある系統は赤芽球系のみであった。性、年齢、重症度、ISTへの反応性に関しては、non-dys AA群とAA with miniD群に差は認められなかったが、染色体異常の保有はAA with miniD群に多い傾向があった($p=0.06$)。

最近、AAにおいても遺伝子変異を有するクローンが存在することが明らかになっている。遺伝子変異を有するクローンを持つAAは、変異クローン有さないAAとISTに対する反応性に差はないが、その後のMDS/AMLへの移行が高率であると報告されている。このように、AAとMDSの境界が不明確になってきている。WHO分類にしたがえば、骨髄低形成で異形成があり、芽球増加がない小児例は、小児不応性血球減少症(RCC)となる。成人例では、そのような例は「低形成性MDS」の範疇になる。5q-の染色体異常がない低リスクMDSの中で、血清EPO濃度 $>500\text{mU/mL}$ で骨髄が低形成の場合は、NCCNのガイドラインではISTが選択される。今回の検討でのAA with miniDは、診断医により、AAと診断される可能性もあれば、MDSと診断される可能性もあると推測される。成人の場合、どちらの場合でも薬物療法の第一選択はISTになる。しかし、診断がAAである場合とMDSである場合では、ISTが無効であった場合の次の治療選択は異なってくる。今後、MDS/AMLへの移行に関する追跡調査が必要である。