

別添 1

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 29 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 三谷 絹子

平成 30 年 (2018) 年 5 月

別添 2

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	三谷 絹子	3
II. 分担研究報告書		
1. 発作性夜間ヘモグロビン尿症における血管内容血と尿沈渣ヘモジデリン	金倉 譲	19
2. 再生不良性貧血の治療に関するフローチャートの改訂	中尾 眞二	21
3. 後天性慢性赤芽球癆の長期予後に関する前向き観察研究	廣川 誠	24
4. わが国の原発性骨髄線維症の臨床像	赤司 浩一	26
5. 日本と欧米骨髄異形成症候群の臨床像の比較	宮崎 泰司	28
6. 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	30
7. 骨髄異形成症候群の治療法・予後に関する全国調査	黒川 峰夫	34
8. 特発性造血障害に対する造血幹細胞移植	神田 善伸	35
9. 特発性造血障害に関する調査研究小児科領域	真部 淳	37
10. 重症再生不良性貧血の記述疫学—臨床調査個人票の解析	太田 晶子	40
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		43
IV. 研究成果の刊行物・別刷		50

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業）
「特発性造血障害に関する調査研究」
総括研究報告書

研究代表者：三谷 絹子（獨協医科大学 血液・腫瘍内科・教授）

研究要旨

本研究班では、再生不良性貧血、赤芽球癆、溶血性貧血、骨髄異形成症候群（MDS）、骨髄線維症の5疾患を主な対象として、造血幹細胞移植、小児領域、疫学調査の観点からの解析も加えつつ、疫学・病因・病態・診断・治療・予後などの幅広い領域にわたって全国規模の調査研究を推進した。

再生不良性貧血の領域では、2017年8月に、再生不良性貧血に対するシクロスポリンの適応が非重症再生不良性貧血に拡大されるとともに、トロンボポエチンレセプター作動薬であるエルトロンボパグが難治性再生不良性貧血とATG療法を受ける初発再生不良性貧血の両者に保険適応となった。これを受けて、再生不良性貧血の「治療の参照ガイド」のワーキンググループ内で意見を交換することにより、改訂版を作成した。主な変更点は、stage 1と輸血不要なstage 2aに対してはシクロスポリンで治療を開始すること、輸血が必要なstage 2bとstage 3～5に対してはATG＋シクロスポリンにエルトロンボパグを加えることである。疫学領域では、臨床調査個人票のデータベースを用いて、2013年度受給者の重症度分布、重症度別の治療実態を明らかにした。新規発症例におけるstage 3～5（やや重症、重症、最重症）の割合は65%で、更新症例のそれは18.6%であった。新規発症例の約15%、更新症例の約60%が軽症のstage 1で、stage 1の更新受給者のうち17.7%が無治療で経過観察されていた。

赤芽球癆の領域では、後天性慢性赤芽球癆の予後改善の有無および難治例における鉄キレート療法の有効性を明らかにすることを目的として、日本血液学会との共同による前向き観察研究を計画した。全国から181例の後天性赤芽球癆症例について登録医による研究参加同意が得られ、患者同意の取得後に臨床調査票の回収を行い、2018年1月6日時点で96例の登録を得た。最大181例の新たな後天性赤芽球癆症例について、予後調査が可能となることが期待される。

溶血性貧血の領域では、発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）における血管内容血と尿沈渣ヘモジデリン顆粒との関係を解析した。尿中に出現するヘモジデリン顆粒は血管内容血を反映する簡便な検査法であるが、エクリズマブに代表される抗補体薬により溶血を抑制した際には、治療期間が2年半以上の11例全例で消失し、腎障害の要因が解除されていた。

MDSの領域では、再生不良性貧血とMDSの臨床像と治療成績の把握を目的とした前方視的症例登録・追跡調査研究と、これらの疾患の診断一致率の向上を目指したセントラルレビューを継続した。平成29年末までの登録症例数は380例で、このうち骨髄芽球が5%未満の症例については末梢血標本および骨髄標本のセントラルレビューを行った。また、登録された症例について毎年追跡調査を実施している。今回は、中央診断が再生不良性貧血、意義不明の特発性血球減少症（ICUS）、もしくはFAB分類でのMDSの患者についての予後解析を行った。その結果、ICUSの予後は本邦においては再生不良性貧血と同様に良好であること、MDSの予後はWHO分類による病型ごとに大きく異なること、多系統の異形成を伴うMDSのうち環状核

芽球を有するものの予後は欧米と異なり不良であることが示された。さらに、芽球増加がみられない MDS のうち、診断時の網状赤血球数が維持されている群は網状赤血球数が減少している群に比べて全生存期間が長いことが示された。また、MDS の様々な臨床像に関して、日本人と欧米人とで比較した。症例の年齢構成では、日本人例で若年症例が多かった。血液学的な検査では、日本人例では貧血、好中球減少、血小板減少の程度が欧米人例と比較して優位に強く、末梢血及び骨髄の芽球割合は有意に低かった。核型では、5 番染色体長腕の欠失が日本人で有意に少なく、20 番染色体長腕の欠失を含めた複数の染色体異常を伴う核型が有意に多かった。全生存期間は日本人で有意に延長していたが、白血病移行までの期間には差が無かった。一般的に予後予測に利用される臨床的因子（血球減少、芽球割合、染色体核型）が症例の生存期間、白血病移行までの期間に与えるインパクトには日本人と欧米人とで差が見られ、予後因子としての意義にも違いが存在した。こうした結果は、MDS の臨床像に民族間差があることを示唆していた。最後に、本邦における治療方法の選択や予後についての現状把握のためのアンケート調査を計画した。

骨髄線維症の領域では、17 年間で 782 例の臨床情報を集積した。生存期間の中央値は 4.0 年で、3 年生存率は 59%である。主な死因は、感染症、白血病への移行であった。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)は、わが国の症例においても予後不良群の抽出が可能で、予後指標として有用であった。

造血幹細胞移植の領域では、造血幹細胞移植の至適化を目指し、MDS については移植決断時点からの前方視的コホート研究を、再生不良性貧血については造血幹細胞移植と免疫抑制療法を比較する臨床決断分析を実施する。前者については平成 29 年度に症例登録を完了し、今後観察期間に移行する。後者については、免疫抑制療法群のデータベースの確立が今後の課題である。

小児領域では、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 1500 例のうち、遺伝子検査、染色体断裂試験、テロメア長測定、臨床所見などから再生不良性貧血・RCC・先天性骨髄不全と診断されたのは 823 例 (55%)、進行期 MDS または AML と診断されたものは 132 例 (9%)、JMML が大部分を占める骨髄増殖性疾患は 160 例 (11%)、その他の貧血は 119 例 (8%)、血小板減少症は 82 例 (5%)、好中球減少症は 44 例 (3%)、その他が 140 例 (9%) であった。いまだに診断困難な症例も数多く存在することから、今後網羅的な診断システムを確立し、予後追跡を行って検証する必要があると思われる。また、本研究ではさらに病因・診断・治療・予後等に関する調査研究を推進し、その結果を各疾患の診断基準・重症度分類に反映させ、2017 年 4 月に診療ガイドとして公表した。本年度は新たな知見を加えて内容を更新した。最後に、先天性骨髄不全は、小児期のみならず成人してから発症する例も多いことがわかってきた。GATA2 の生殖細胞系列変異を有する MDS も思春期から若年成人（いわゆる AYA 世代）に多くみられる。今後、本研究班の成人領域の研究者との共同研究が推進される予定である。

研究分担者

金倉 謙

大阪大学大学院医学系研究科
血液・腫瘍内科 教授

中尾 眞二

金沢大学医薬保健研究域医学系
血液・呼吸器内科 教授

廣川 誠

秋田大学大学院医学系研究科
総合診療・検査診断学 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・ヒパクシャ
医療部門 血液内科学研究分野 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

黒川峰夫

東京大学大学院医学研究科
血液・腫瘍病態学講座 教授

岡本 真一郎

慶應義塾大学医学部
血液内科学 教授

神田善伸

自治医科大学 内科学講座
血液学部門・総合医学第1講座 教授

真部 淳

聖路加国際大学・聖路加国際病院・医長

太田晶子

埼玉医科大学医学部
社会医学 准教授

A. 研究目的

本研究班では再生不良性貧血、赤芽球癆、溶血性貧血、骨髄異形成症候群（MDS）、骨髄線維症を

対象として、疫学・病因・病態・診断・治療・予後などの幅広い領域にわたって全国規模の調査研究を推進する。そのために各疾患において症例登録システムを充実させ患者の実態把握を行い、海外の研究との比較も取り入れて、本邦の実態に即した治療法の開発・最適化に努める。さらに、難治性疾患実用化研究事業（「オミクス解析技術と人工知能技術による難治性造血器疾患の病因解明と診断向上に貢献する解析基盤の開発」とも協力する。得られた知見は、診断基準の策定や「診療の参照ガイド」の改訂作業を通じて、広く臨床の場で利用できるようにする。

1. 再生不良性貧血

臨床研究

2017年8月25日に、トロンボポエチンレセプター作動薬であるエルトロンボパグ（EPAG）が難治性再生不良性貧血とATG療法を受ける初発再生不良性貧血の両者に保険適応となった。また同時に、シクロスポリンの適応も非重症再生不良性貧血に拡大された。このため、これらの2剤を取り入れた治療ガイドラインの改訂が必要と考えられた。そこで、特発性造血障害に関する調査研究の「再生不良性貧血の治療の参照ガイド作成ワーキンググループ」内で、治療に関するフローチャートの刷新を目的に検討を開始した。

疫学研究

現在利用可能な2014年までの（従来の）臨床調査個人票データベースを用いて、再生不良性貧血の重症度分布、重症度別の治療実態の分析を行うことにより最新の実態を明らかにした。2015年1月以降の重症度基準の導入や登録システムの変更が今後の受給者データの疫学特性に及ぼす影響を検討するための基礎資料とする。

2. 赤芽球癆

後天性慢性赤芽球癆に対する至適治療の確立のため、前向きコホート研究を実施した。一次エンドポイントは全生存、二次エンドポイントは免疫

抑制療法の奏効率、輸血依存症例の割合、輸血依存症例における鉄キレート療法の実施状況と予後である。

3. 溶血性貧血

エクリズマブに代表される抗補体薬により治療を受けた発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) 患者を対象に、尿沈渣ヘモジデリンと他の血管内溶血の指標の動向を検討した。

4. 骨髄異形成症候群 (MDS)

前方視的症例登録・追跡調査研究とセントラルレビュー

再生不良性貧血と 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。

日本と欧米 MDS の臨床像の比較

MDS において民族間で病態・予後が異なるのかどうかを検討し、欧米の症例を中心に作成された予後予測スコアリングシステムが本邦においても利用可能なのかどうかを検討した。

治療法・予後に関する全国調査

低リスク群と IPSS-R 中間リスク群の MDS における臨床像・治療選択の実情・予後を把握することによって、より適正化された治療選択を目指す。

5. 骨髄線維症

わが国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

6. 造血幹細胞移植

再生不良性貧血、MDS などの特発性造血障害に対する造血幹細胞移植の実態調査を行い、患者の社会復帰を目指した質の向上とリソース利用の最適化を追究する。また、疫学的解析から移植療法の適応と時期についての検討を行う。

7. 小児領域

小児の骨髄不全および MDS は、頻度が低く、診断は難しく、予後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、1700 例を超える小児例が把握された。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した。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、研究を推進する。日本血液学会、日本造血細胞移植学会、日本小児血液学会等の関連諸学会の協力も得た。全国の施設から参加者を得て、班会議総会を本年度 2 回開催した。

1. 再生不良性貧血

臨床研究

輸血が不要な stage 1 と 2 の再生不良性貧血と stage 2 のうち輸血が必要な例 (stage 2b) と stage 3~5 に対する治療のフローチャート改訂案を作成した。2018 年 1 月 12 日に開催された「特発性造血障害に関する調査研究」第二回班会議総会でフローチャート改訂案を紹介し、班員の意見を求めた。

疫学研究

資料として、2017 年 7 月現在電子入力済みの 2003~2014 年度の再生不良性貧血臨床調査個人票を用いた。個人票は厚生労働省に文書で利用申請を行い、使用許可を得た。各年度のデータ入力率を確認した上で、入力率が比較的高い最新年次の 2013 年度データを対象として、重症度分布、重症度別治療状況を新規・更新別に解析した。

2. 赤芽球癆

前向きコホート縦断的観察研究 (cohort longitudinal observational study) をデザインした。登録対象症例の抽出は、2006~2015 年度の 10 年間に日本血液学会血液疾患登録および国立病院機構血液疾患登録データベースに登録された成人赤芽球癆症例の登録施設名、登録医師名、匿名

化システム番号の提供を依頼することにより行った。登録医に研究協力を依頼し、承諾の得られた登録医に症例登録票を送付した。宿主因子、診断に関連する項目、治療奏効などを調査した。フォローアップは1年に1回行う。一次エンドポイントは後天性慢性赤芽球癆の全生存、二次エンドポイントは免疫抑制療法の奏効率、輸血依存症例の割合、輸血依存症例における鉄キレート療法の実施状況と予後である。5年で中間解析を行い、10年で試験を終了する。

3. 溶血性貧血

大阪大学医学部附属病院に通院中で、エクリズマブに代表される抗補体薬治療を受けているPNH患者（2008年2月～2017年11月に開始）16例を対象として、尿沈渣ヘモジデリン顆粒の有無を定期的に検査した。尿沈渣中ヘモジデリン顆粒が、便宜的に100/HPF以上を多数、99～1/HPFを中等度、1/HPF未満を少数、認めないものを認めずと判定した。ハプトグロビン値、LDH値、血清補体価（CH50）などの血管内容血の指標の推移と経時的に比較した。

4. 骨髄異形成症候群（MDS）

前方視的症例登録・追跡調査研究とセントラルレビュー

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、データベース内に一元的に管理している。これらの情報をもとに、診断時の臨床情報と予後との関連の解析を行った。

日本と欧米MDSの臨床像の比較

日本人症例と欧米人症例とで主に改訂版国際予後スコアリングシステム（IPSS-R）に関連する臨床因子の比較を実施した。国内症例の一部は特発性

造血障害に関する調査研究班を通じて収集された。欧米症例は世界の13データベースから収集された。その中で民族情報が明らかな症例を対象とし、最終的に日本人症例300例、欧米症例5,838例を用いて、臨床的背景、血液学的パラメータ、染色体核型の種類、白血球化を含む予後について比較した。臨床因子の予後および白血球化に与えるインパクトはDxy指数として示した。

治療法・予後に関する全国調査

低リスク群MDSの治療方法の選択や予後について現状を把握するために、アンケートによる全国調査を計画する。後方視的に各MDS症例に対し、IPSS、IPSS-Rによるリスク分類を行ない、輸血依存の有無、血清LDH値、血清フェリチン値、PNH型血球の有無、治療選択、および、予後（全生存、AMLへの進展率）との関係を調べる。

5. 骨髄線維症

日本血液学会認定施設で新規に原発性骨髄線維症と診断した症例をアンケート調査により集積した。1999年から2015年3月までの診断例に関し、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危険因子、予後予測の検討を行った。

6. 造血幹細胞移植

MDSに対して移植を決定した時点から移植後観察期間までの前方視的コホート研究を実施した。また、再生不良性貧血の初期治療としての造血幹細胞移植と免疫抑制療法を比較する臨床決断分析を実施する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予定である。十分な情報が得られた時点で、免疫抑制療法と造血幹細胞移植の成績を比較する臨床決断分析を実施する。

7. 小児領域

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1500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。

(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、「人を対象とする医学系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は十分留意する。公費負担対象疾患の臨床調査個人票データの取り扱い、および、保管に関しては、施設の倫理審査を受ける。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には、「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。

C. 研究結果

1. 再生不良性貧血

臨床研究

主な変更点は、stage 1と輸血不要な stage 2a の重症度の患者に対しては比較的少量(3.5 mg/kg)のシクロスポリンを 8 週間投与し、反応をみるという点と、HLA 一致同胞ドナーからの移植適応がない輸血が必要な stage 2b あるいは stage 3~5 の患者に対しては ATG+シクロスポリンに EPAG を加えるという点である。シクロスポリンによる改善の徴候が見られなかった非重症例において、血球減少が進行し、輸血が必要になった場合には、重症例に準じて ATG+シクロスポリン+EPAG 療法を行う。血球減少が進行するが、輸血までは必要としない例に対しては、二次治療として EPAG を投与する。これも無効であった場合は、タンパク同化ステロイドを考慮する。ATG+シクロスポリン療法を受ける患者に対しては原則として全例に EPAG を併用するが、「EPAG によって、染色体異常を持つ造血幹細胞の増殖が誘発される可能性が否定できないため、PNH 型血球や HLA クラス I アレル欠失血球などの免疫病態マーカーが陽性の若年者に対しては、EPAG の併用は慎重に行う。」という但し書きを加える

こととした。これらの原案を班会議総会で紹介したところ異論は見られず、承認が得られた。

疫学研究

重症度分布の検討では、新規における stage 3~5 (やや重症、重症、最重症) の割合は 65%で、更新のそれは 18.6%であった。軽症 stage 1 の割合は、新規 14.5%、更新 61.4%であり、更新において軽症の割合が高かった。stage 3~5 の重症の割合は、新規では 30 歳未満で低年齢になるほど高く、また、60 歳以上の高齢になるほど高かった。新規における stage 1 の占める割合は、年齢によりやや異なっていたが、更新では大きな違いは認められなかった。重症度別の治療状況としては、新規、更新ともに stage 3~5 の重症では stage 1~2 の軽症・中等症に比べて無治療での経過観察が少なく、免疫抑制療法、造血幹細胞移植療法、その他の支持療法が多かった。stage 1 においては、新規では無治療経過観察が 33.3%、更新では 17.7%を占めていた。

2. 赤芽球癆

平成 30 年 1 月 6 日時点で回収された症例調査票は 96 症例、特発性赤芽球癆 48 例、続発性 45 例、病型不明 3 名である。免疫抑制薬の初回寛解導入療法奏効率(完全寛解および部分寛解)は、特発性赤芽球癆においてはプレドニゾロン 11/15 (73%)、シクロスポリン 23/28(82%)、胸腺腫関連赤芽球癆ではプレドニゾロン 1/1(100%)、シクロスポリン 10/12(83%)、大顆粒リンパ球性白血病関連赤芽球癆ではシクロスポリン 2/3(67%)、シクロホスファミド 1/2(50%)であった。96 例中 20 例の死亡が確認され、特発性 11 例、続発性 9 例で、死因は感染症 7 例、臓器不全 3 例、両者の合併 1 例、その他 9 例であった。

3. 溶血性貧血

抗補体薬治療を受けている PNH 患者 16 例中、全例で CH50 は速やかに検出感度以下になった。2 年半以上に渡って治療されている 11 例では、全例が尿中ヘモジデリンが消失していた。残りの 5 例は

治療歴が短く消失には至っていないが、段階的に減少している。5例でハプトグロビンが検出されたが、いずれも尿中へモジデリンは消失していた。ハプトグロビンが検出されるようになった5例では、1例を除いてLDH値は正常化していた。治療開始前から尿中へモジデリン消失まで経過の追えた3例では、治療開始後概ね2~3年で尿中へモジデリンは完全に消失した。ハプトグロビンを検出した5例のうち2例で尿中へモジデリン消失までの経時的観察が行えたが、いずれもハプトグロビンの検出が尿中へモジデリン消失に先行していた。

4. 骨髄異形成症候群 (MDS)

前方視的症例登録・追跡調査研究とセントラルレビュー

2017年には18例の登録があり、累計で380例の登録数となった。セントラルレビュー後の中央診断の内訳は、再生不良性貧血82例、WHO 2017分類でのMDS 206例、急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 9例、MDS/骨髄増殖性腫瘍 (myeloproliferative neoplasms, MPN) 21例、意義不明の特発性血球減少症 (idiopathic cytopenias of undetermined significance, ICUS) 11例、意義未確定の特発性骨髄異形成症 (idiopathic dysplasia of uncertain significance, IDUS) 3例などであった。診断時年齢中央値は、再生不良性貧血で56歳、FAB分類でのMDS (WHO分類のMDS, MDS/MPN, 芽球30%未満のAML)では69歳であった。FAB分類でのMDSのうち16%は抗がん剤治療あるいは放射線治療後の二次性MDSであった。男女比は、再生不良性貧血で0.9対1とほぼ半々、FAB分類でのMDSでは1.8対1と男性に多かった。

追跡不適格例を除いた症例について、中央診断別に追跡データを解析した。再生不良性貧血もしくはICUS患者の全生存期間(OS)は良好であった。一方、MDSもしくはFAB分類でMDSに属する慢性骨髄単球性白血病(CMML)と診断された患者のOSは、WHO分類上の病型によって大きく異なっていた。す

なわち、MDS-SLDのOSは比較的良好で、MDS-EB1, EB2, およびCMMLのOSは不良であった。MDS-MLDの生存曲線はこれらの中に位置していたが、環状鉄芽球を有するMDS-RS-MLDの予後はMDS-EBと同様に不良であった。

日本と欧米MDSの臨床像の比較

症例の年齢構成では、日本人例で若年症例が多かった。男女比には差は見られなかった。血液学的な検査としては、日本人例では貧血、好中球減少、血小板減少の程度が欧米症例と比較して有意に強く、末梢血及び骨髄の芽球割合は有意に低かった。FAB分類、WHO分類における症例分布にも有意差が見られた。骨髄細胞の核型では、両群間で正常染色体症例の割合には差は見られなかった。しかしながら、5番染色体長腕の欠失は日本人症例で有意に少なく、20番染色体長腕の欠失を含めた複数の染色体異常を伴う核型が有意に多かった。その中には、1番と7番染色体に見られる派生染色体[der(1;7)]も含まれていた。全生存期間は日本人で有意に長かったが、白血病移行までの期間には差がなかった。一般に予後予測に利用される臨床的な因子(血球減少、芽球割合、染色体核型)が症例の生存期間、白血病移行までの期間に与えるインパクトには、日本人と欧米人とで差が見られた。日本人症例において、血球減少は予後への影響が小さく、骨髄芽割合のそれは大きかった。染色体核型の種類は、日本人例で予後への影響が大きいものの白血病化への影響は逆に小さかった。治療法・予後に関する全国調査

本年度は単施設における予備調査として、2012年1月~2017年3月までにMDSと診断された79症例に対して、治療選択、全生存率、および、AMLへの進展率を解析した。IPSS-Rにおけるvery low/ low群では、約半数が輸血も含めて未治療であった。治療には、輸血、赤血球造血刺激因子製剤、免疫抑制剤、あるいは、その併用等が選択されていた。予備調査結果に基づき、全国アンケート調査に向けて項目を作成し、内容の検討を実施した。

5. 骨髄線維症

294 施設より計 782 例の原発性骨髄線維症の新規症例を集積した。初回アンケート調査への返信率は 48%、フォローアップ調査への返信率は 64%であった。主な調査終了理由は、患者死亡、転院であった。発症年齢中央値は 66 歳、男女比は 2:1 である。診断時に自覚症状を有する症例は全体の約 20%で、検査値異常が初回受診の主な理由であった。*JAK2* 変異の検索は 185 例に施行されており、変異が 56%に認められた。生存期間の中央値は 4.0 年であり、3 年生存率は 59.0%であった。死因は感染症、白血病への移行、出血、原疾患の増悪、の順に多く見られた。

1999 年以降 2015 年までに前向きに経過を観察しているわが国の原発性骨髄線維症の予後を診断時のリスク因子別に解析すると、DIPSS plus (Dynamic International Prognostic Scoring System for PMF-Plus) が最もわが国の原発性骨髄線維症の予後予測に有用であった。また、DIPSS-Plus は、診断時だけでなく、臨床経過中の任意の時点においても、高リスク群の分離が可能であった。

治療として、同種造血幹細胞移植を受けた 43 例の移植後 3 年生存率は 84%と良好で、生存期間の有意な延長がみられている。

6. 造血幹細胞移植

MDS については、移植を決断した時点からの前方視的コホート研究(関東造血幹細胞移植共同研究グループにおける多施設共同研究)を継続実施した。平成 30 年 1 月末時点で目標の 100 症例に到達し、予定通りに登録を終了した。

再生不良性貧血については、免疫抑制療法群の既存のデータが存在しないため、データベースの確立の方策を検討している。

7. 小児領域

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 1712 例のうち、遺伝子検査、染色体断裂試験、テ

ロメア長測定、臨床所見などから再生不良性貧血・RCC・先天性骨髄不全と診断されたのは 939 例 (55%)、進行期 MDS または AML と診断されたものは 152 例 (9%)、JMML が大部分を占める骨髄増殖性疾患は 176 例 (10%)、その他の貧血は 149 例 (8%)、血小板減少は 96 例 (6%)、好中球減少は 49 例 (3%)、その他が 151 例 (9%) であった。

成人領域との共同研究として、先天性骨髄不全からは CDA (Congenital dyserythropoietic anemia) を、MDS としては *GATA2* の生殖細胞系列変異を有する症例を取り上げた。無効造血と骨髄形態異常から CDA II と診断した 6 症例のうち 2 例 (33%) で先天性溶血性貧血の原因遺伝子が同定された。先天性溶血性貧血で形態学的に CDA と鑑別困難な症例が存在するため、CDA が疑われる症例では、全エクソーム解析またはターゲットシーケンスによる網羅的な遺伝子解析を行うことが望ましい。一方、非家族性小児 MDS の約 10% に生殖細胞系列の *GATA2* 変異を認め、特に AYA 世代に多いことが知られている。

D. 考察

1. 再生不良性貧血

臨床研究

改訂フローチャートに従って治療を行うことにより、非重症・重症再生不良性貧血の治療成績が飛躍的に向上することが期待できる。EPAG は初回 ATG 投与例だけでなく、シクロスポリンが無効であった非重症例に対する救済療法としても使用できるため、従来難治性とされていた罹病期間の長い症例も改善させられる可能性が高い。また、かつて ATG 療法を受けたものの無効であったため、治療関連死亡率の高い非血縁ドナーからの移植を待っていた患者も EPAG によって輸血が不要となる可能性が高いことから、非血縁ドナーからの移植を必要とする例が激減する可能性もある。ただし、これらの治療は経験の少ない治療であるため、多数例を対象とした前向きの臨床試験によって真の

有用性を確認する必要がある。現在、西日本臨床研究グループを母体とする臨床試験を計画している。

疫学研究

本疫学研究は、再生不良性貧血の最新の実態を把握するとともに、今後受給者データを活用するうえで考慮すべき事項となる制度変更の影響、つまり、医療費助成認定基準に重症度基準を導入して軽症者 stage 1 を対象外とする変更が、受給者データから得られる疫学特性（受給者数、性・年齢、重症度分布、臨床所見など）にどのような影響を及ぼすのかを検討するための基礎資料になる。今後、さらに詳細に重症度と臨床所見、治療等の関連を検討する。また、2018年度以降利用可能となる予定の新たな難病登録システムによるデータの現状を確認するとともに、2015年1月からの難病法施行による難病対策の制度変更が受給者データにどのような影響を及ぼすのかを評価・検討した上で、新たなデータベースでの疫学像の把握を試みる。

2. 赤芽球癆

本事業により国内外で類を見ない規模の後天性慢性赤芽球癆のコホート研究が遂行されるものと期待される。

3. 溶血性貧血

PNH患者に対し抗補体薬治療を開始した場合、概ね2~3年で尿中ヘモジデリンは段階的に減少し、最終的に消失する。ヘモジデリンが消失したのは16例中11例に対し、ハプトグロビンが検出されたのは5例であった。これには、ハプトグロビンの産生に個人差が大きいことも影響しているが、血管内溶血のマーカーとしてはハプトグロビンがより鋭敏であることを示唆しているのかもしれない。

4. 骨髄異形成症候群 (MDS)

前方視的症例登録・追跡調査研究とセントラルレビュー

今年度も、新規登録症例についての中央診断を行うとともに、登録症例の追跡調査を継続した。

今年度の解析では、ICUSの生命予後が再生不良性貧血と同程度に良好であることが示された。また、MDS患者のWHO分類別の生存解析では、芽球の増加したMDS-EBの予後が不良であることのほかに、多系統に異形成を伴うMDS-MLDの中でRSを有するMDS-RS-MLDの生命予後が不良であることが示された。この結果は、過去の欧米からの報告と合致せず、*SF3B1*などの遺伝子変異解析も含めたさらなる検証が必要である。このほか、本研究では中央診断で検鏡者間の診断に不一致がみられた症例を対象とした合同検鏡会を開催している。この活動は、血液疾患の形態診断の啓蒙にも有用である。

日本と欧米MDSの臨床像の比較

本研究では、これまで日本、韓国、中国、タイなどより報告されてきた当該国のMDS症例と欧米症例の差に関する検討を、より大規模、かつ、詳細に実施した。これにより、日本人と欧米人のMDSでは臨床的な差があることが示唆された。一方で、今回の検討では、総合的な予後予測スコアリングシステムは日本人症例においても十分有用であることも示された。これは、複数因子をスコア化しているIPSS-Rの有利な点と思われる。今後、こうした臨床的な差を基礎として、ゲノムの比較検討を進めていく必要がある。

治療法・予後に関する全国調査

予備調査は少数例の解析であり、低リスクMDSにおける最適化された治療選択を行う為、多施設の現状を把握することが望ましい。

5. 骨髄線維症

現時点でわが国において診断時の予後予測には、これまで提唱されている予後予測モデルの中で、DIPSS plusの適応が最もよく、診断時および経過観察中の原発性骨髄線維症患者の治療方針を決定する指標としても有用であると考えられた。

6. 造血幹細胞移植

MDSについては、平成30年度は登録された症例の観察を継続するとともに、観察期間が終了した症例のデータ回収を行い、平成31年度には全登録

症例のデータを固定し、解析を開始する。

再生不良性貧血については、臨床決断分析を実施するための十分なデータがそろっていないため、今後のデータベースの構築が重要である。

7. 小児領域

2009年に開始された小児の造血不全およびMDSの中央診断は着実に症例数の蓄積が進んでおり、遺伝子検査、染色体断裂試験、テロメア長測定の結果を臨床所見と合わせることで、特徴が明らかになってきた。本研究ではさらに、病因・診断・治療・予後等に関する調査研究を推進し、その結果を各疾患の診断基準・重症度分類に反映させ、2017年4月に診療ガイドとして公表した。診療ガイドが全国の医療機関で使用されることにより、わ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。

先天性骨髄不全は、小児期のみならず成人してから発症する例も多いことがわかってきた。また、GATA2の生殖細胞系列変異を有するMDSも、思春期から若年成人（いわゆるAYA世代）に多くみられる。本研究班に参加している小児領域と成人領域の専門家との議論を密にし、今後、診断および治療に関する共同研究が行われる予定である。

E. 結論

1. 再生不良性貧血

臨床研究

新規に使用できるようになった「非重症例に対するシクロスポリン」とEPAGの両者を取り入れて「再生不良性貧血の診療の参照ガイド」の治療のフローチャートを改定した。

ワーキンググループ作成委員：中尾眞二（金沢大学）、小島勢二・濱 麻人（名古屋大学）、大橋春彦（トヨタ記念病院）、小原 明（東邦大学）、臼杵憲祐（NTT 関東病院）、猪口孝一（日本医科大学）、鈴木隆浩（北里大学）、小原 直（筑波大学）、小笠原洋治（慈恵医大）、太田晶子（埼玉医科大学）、島田直樹（国際医療福祉大学）、黒川峰夫（東京大学）

疫学研究

再生不良性貧血の受給者の重症度分布、重症度別治療実態を明らかにした。本研究結果は、再生不良性貧血の最新の実態を把握するとともに、2015年1月の難病法施行による医療費助成認定における重症度基準の導入や登録システムの変更などの制度変更が、今後の受給者データとそこから得られる疫学特性にどのような影響を及ぼすのか、データの有効利用が可能性かどうかを評価・検討するのに資すると考える。

2. 赤芽球癆

最大181例の新たな後天性赤芽球癆症例について予後調査が可能となる

3. 溶血性貧血

PNHの尿中ヘモジデリンの検査は、血管内容血の指標であると同時に、抗補体薬治療投与後、腎臓への鉄沈着による腎障害のリスクが回避されたことを確認する良い指標になる可能性がある。

4. 骨髄異形成症候群（MDS）

前方視的症例登録・追跡調査研究とセントラルレビュー

今回の解析では、わが国の再生不良性貧血、ICUS、および病型別のMDS患者の予後に関する貴重な情報が得られた。本研究で構築されているデータベースには、セントラルレビューにより診断が担保されている多くの症例の登録時データと、追跡調査データが蓄積されている。今後、さらなる症例登録と追跡調査によって本邦における再生不良性貧血およびMDSの特徴を分析し、これに基づいた診療指針を作成し公開していくことが重要であると考えられる。

日本と欧米MDSの臨床像の比較

日本人と欧米人のMDSには臨床像に差が見られる可能性がある。それは民族差による可能性があるが、ゲノムの検討を含めた今後の解析が待たれる。

治療法・予後に関する全国調査

予備調査の結果に基づいて全国調査を行う準備

を開始しており、調査票・項目について検討した。
多施設の疫学調査に向けて準備中である。

5. 骨髄線維症

わが国の原発性骨髄線維症 780 例の臨床情報を集積した。国際予後スコアリングシステムの DIPSS-Plus は、わが国の原発性骨髄線維症の予後予測に有用である。

6. 造血幹細胞移植

国際的にも特発性造血障害に対する造血幹細胞移植の適応や至適な実施時期についての研究は少なく、本研究の成果は本調査研究班の「診療の参照ガイド」や日本造血細胞移植学会のガイドラインを通して全国の診療施設で利用可能とすることによって、広く社会に還元されることが期待される。

7. 小児領域

小児の骨髄不全および MDS は、頻度が低く、診断は難しく、また予後不良な疾患群である。全国の患者を対象とした病理中央診断ならびに遺伝子検索を含む詳細な解析により、多くの患者で的確な診断が行われるようになってきた。その結果を各疾患の診断基準・重症度分類に反映させ、2017 年 4 月に診療ガイドとして公表しており、わ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。

先天性骨髄不全は、小児期のみならず成人してから発症する例も多いことがわかってきた。また *GATA2* の生殖細胞系列変異を有する MDS も、思春期から若年成人（いわゆる AYA 世代）に多くみられる。今後、本研究班の成人領域の研究者との共同研究が推進される予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Maruyama K, Aotsuka N, Kumano Y, Sato N, Kawashima N, Onda Y, Maruyama H, Katagiri T, Zaimoku Y, Nakagawa N, Hosomichi K, Ogawa S, Nakao S.: Immune-Mediated Hematopoietic Failure after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Common Cause of Late Graft Failure in Patients with Complete Donor Chimerism. *Biol Blood Marrow Transplant* 24:43-49, 2018.
2. Espinoza JL, Elbadry MI, Chonabayashi K, Yoshida Y, Katagiri T, Harada K, Nakagawa N, Zaimoku Y, Imi T, Hassanein HA, Khalifa ANA, Takenaka K, Akashi K, Hamana H, Kishi H, Akatsuka Y, Nakao S.: Hematopoiesis by iPSC-derived hematopoietic stem cells of aplastic anemia that escape cytotoxic T-cell attack. *Blood Adv* 2:390-400, 2018.
3. Zaimoku Y, Takamatsu H, Hosomichi K, Ozawa T, Nakagawa N, Imi T, Maruyama H, Katagiri T, Kishi H, Tajima A, Muraguchi A, Kashiwase K, Nakao S.: Identification of an HLA class I allele closely involved in the autoantigen presentation in acquired aplastic anemia. *Blood* 129:2908-2916, 2017.
4. ●廣川 誠. 赤芽球癆. 血液疾患最新の治療 2017-2019, 小澤敬也, 中尾眞二, 松村 到(編), 南江堂, 東京, 109-112, 2017.
5. ●廣川 誠. 赤芽球癆. 1336 専門家による私の治療 2017-18 年度版, 猿田享男, 北村惣一郎(編), 日本医事新報社, 東京, 693-694, 2017.
6. ●廣川 誠. 赤芽球癆. 貧血症診断と治療の ABC125, 桐戸啓太(編). 最新医学社、大阪、99-106, 2017.
7. ●廣川 誠. 赤芽球癆: 疾患概念・病因・病態. *日本臨床*, 75 (増刊号), 431-436, 2017.
8. ●廣川 誠. 後天性赤芽球癆の特徴と治療の実際. *新薬と臨床*, 66, 62-67, 2017.
9. ●Nagao T, Hirokawa M.: Diagnosis and treatment of macrocytic anemias in adults. *J Gen Fam Med* 18:200-204, 2017.
10. ●Nishimura J, Kinoshita T, Kanakura Y.: Clinical effects of eculizumab in PNH: Poor responders. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: From bench to bedside. (Kanakura Y, Kinoshita T, Nishimura J, eds.) Springer, Tokyo, 2017, pp297-pp306.
11. ●Ueda Y, Obara N, Yonemura Y, Noji H, Masuko M, Seki Y, Wada K, Matsuda T, Akiyama H, Ikezoe T, Chiba S, Kanda Y, Kawaguchi T, Shichishima T, Nakakuma H, Okamoto S, Nishimura JI, Kanakura Y, Ninomiya H.: Effects of eculizumab treatment on quality of life in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in Japan. *Int J Hematol* 2018 [Epub ahead of print]

12. Yamazaki H, Kondo T, Aoki K, Yamashita K, Takaori-Kondo A.: Occurrence and improvement of renal dysfunction and serum potassium abnormality during administration of liposomal amphotericin B in patients with hematological disorders: A retrospective analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 90:123-131, 2018.
13. Yamazaki H, Aoki K, Kondo T, Nishikori M, Kitano T, Hishizawa M, Yamashita K, Takaori-Kondo A.: Outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in cases of mature T/NK-cell neoplasms: a single-center retrospective analysis. *Ann Hematol* 96:323-326, 2017
14. Sugino N, Kawahara M, Tatsumi G, Kanai A, Matsui H, Yamamoto R, Nagai Y, Fujii S, Shimazu Y, Hishizawa M, Inaba T, Andoh A, Suzuki T, Takaori-Kondo A.: A novel LSD1 inhibitor NCD38 ameliorates MDS-related leukemia with complex karyotype by attenuating leukemia programs via activating super-enhancers. *Leukemia* 31:2303-2314, 2017.
15. Sakamoto S, Kawabata H, Kanda J, Uchiyama T, Mizumoto C, Kitano T, Kondo T, Hishizawa M, Tomosugi N, Takaori-Kondo A.: High pretransplant hepcidin levels are associated with poor overall survival and delayed platelet engraftment after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Med* 6:120-128, 2017.
16. Okuda H, Stanojevic B, Kanai A, Kawamura T, Takahashi S, Matsui H, Takaori-Kondo A, Yokoyama A.: Cooperative gene activation by AF4 and DOT1L drives MLL-rearranged leukemia. *J Clin Invest* 127:1918-1931, 2017.
17. Kobayashi T, Nannya Y, Ichikawa M, Oritani K, Kanakura Y, Tomita A, Kiyoi H, Kobune M, Kato J, Kawabata H, Shindo M, Torimoto Y, Yonemura Y, Hanaoka N, Nakakuma H, Hasegawa D, Manabe A, Fujishima N, Fujii N, Tanimoto M, Morita Y, Matsuda A, Fujieda A, Katayama N, Ohashi H, Nagai H, Terada Y, Hino M, Sato K, Obara N, Chiba S, Usuki K, Ohta M, Imataki O, Uemura M, Takaku T, Komatsu N, Kitanaka A, Shimoda K, Watanabe K, Tohyama K, Takaori-Kondo A, Harigae H, Arai S, Miyazaki Y, Ozawa K, Kurokawa M.: A nationwide survey of hypoplastic myelodysplastic syndrome (a multicenter retrospective study). *Am J Hematol* 92:1324-1332, 2017.
18. Kawabata H, Tohyama K, Matsuda A, Araseki K, Hata T, Suzuki T, Kayano H, Shimbo K, Zaike Y, Usuki K, Chiba S, Ishikawa T, Arima N, Nogawa M, Ohta A, Miyazaki Y, Mitani K, Ozawa K, Arai S, Kurokawa M, Takaori-Kondo A.: Validation of the revised International Prognostic Scoring System in patients with myelodysplastic syndrome in Japan: results from a prospective multicenter registry. *Int J Hematol* 106:375-384, 2017.
19. Jo T, Arai Y, Kondo T, Kitano T, Hishizawa M, Yamashita K, Takaori-Kondo A.: Chronic Kidney Disease in Long-Term Survivors after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Retrospective Analysis at a Single Institute. *Biol Blood Marrow Transplant* 23:2159-2165, 2017.
20. Chonabayashi K, Yoshida Y, Takaori-Kondo A.: Reprogramming technology reveals genetic and functional diversity of subclones in myelodysplastic syndromes. *Rinsho Ketsueki* 58:787-791, 2017.
21. Arai Y, Jo T, Matsui H, Kondo T, Takaori-Kondo A: Efficacy of antithymocyte globulin for allogeneic hematopoietic cell transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Leuk Lymphoma* 58:1840-1848, 2017.
22. Li L, Sheng Y, Li W, Hu C, Mittal N, Tohyama K, Seba A, Zhao Y, Ozer H, Zhu T, Qian Z: β -Catenin is a candidate therapeutic target for myeloid neoplasms with del(5q). *Cancer Res* 77:4116-4126, 2017.
23. Oben KZ, Alhakeem SS, McKenna MK, Brandon JA, Mani R, Noothi SK, Jinpeng L, Akunuru S, Dhar SK, Singh IP, Liang Y, Wang C, Abdel-Latif A, Stills Jr HF, St. Clair DK, Geiger H, Muthusamy N, Tohyama K, Gupta RC, Bondada S: Oxidative stress-induced JNK/AP-1 signaling is a major pathway involved in selective apoptosis of myelodysplastic syndrome cells by withaferin-A. *Oncotarget* 8:77436-77452, 2017.
24. 松田晃, 張替秀郎, 通山薫: 骨髓異形成症候群, 血液細胞アトラス第6版 (通山薫, 張替秀郎 編集), 文光堂(東京), pp271-282, 2018.
25. 松田晃. 骨髓異形成症候群の形態診断. *臨床血液* 58:336-346, 2017.
26. Horai M, Satoh S, Matsuo M, Iwanaga M, Horio K, Jo T, Takasaki Y, Kawaguchi Y, Tsushima H, Yoshida S, Taguchi M, Itonaga H, Sawayama Y, Taguchi J, Imaizumi Y, Hata T, Moriuchi Y, Haase D, Yoshiura KI, Miyazaki Y.: Chromosomal analysis of myelodysplastic syndromes among atomic bomb survivors in Nagasaki. *Br J Haematol* 180:381-390, 2018.
27. ●Minami M, Arita T, Iwasaki H, Muta T, Aoki T, Aoki K, Yamasaki S, Matsushima T, Kato K, Takenaka K, Tanimoto K,

- Kamimura T, Ogawa R, Akashi K, Miyamoto T.: Comparative analysis of pulmonary hypertension in patients treated with imatinib, nilotinib and dasatinib. *Br J Haematol.* 177: 578-587, 2017.
28. ● Miyawaki K, Iwasaki H, Jiromaru T, Kusumoto H, Yurino A, Sugio T, Uehara Y, Odawara J, Daitoku S, Kunisaki Y, Mori Y, Arinobu Y, Tsuzuki H, Kikushige Y, Iino T, Kato K, Takenaka K, Miyamoto T, Maeda T, Akashi K.: Identification of unipotent megakaryocyte progenitors in human hematopoiesis. *Blood* 129: 3332-3343, 2017.
 29. ● Yuda J, Miyamoto T, Odawara J, Ohkawa Y, Semba Y, Hayashi M, Miyamura K, Tanimoto M, Yamamoto K, Taniwaki M, Akashi K.: Persistent detection of alternatively spliced BCR-ABL variant results in a failure to achieve deep molecular response. *Cancer Sci.*: 108: 2204-2212, 2017.
 30. ● Kirito K, Okamoto S, Ohishi K, Tauchi T, Handa H, Saito S, Takenaka K, Shimoda K, Oritani K, Akashi K, Okada H, Amagasaki T, Suzuki K, Yonezu T, Komatsu N.: Evaluation of the dose and efficacy of ruxolitinib in Japanese patients with myelofibrosis. *Int J Hematol* 107: 92-97, 2018.
 31. ● Mizuno S, Iino T, Ozawa H, Arinobu Y, Chong Y, Akashi K.: Notch1 expression is regulated at the post-transcriptional level by the 3' untranslated region in hematopoietic stem cell development. *Int J Hematol* 107:311-319, 2018.
 32. ● Oritani K, Ohishi K, Okamoto S, Kirito K, Komatsu N, Tauchi T, Handa H, Saito S, Takenaka K, Shimoda K, Okada H, Amagasaki T, Wakase S, Shimozuma K, Akashi K.: Effect of ruxolitinib therapy on the quality-of-life of Japanese patients with myelofibrosis. *Curr Med Res Opin* 34: 531-537, 2018.
 33. ● Hayakawa J, Kanda J, Akahoshi Y, Harada N, Kameda K, Ugai T, Wada H, Ishihara Y, Kawamura K, Sakamoto K, Ashizawa M, Sato M, Terasako-Saito K, Kimura SI, Kikuchi M, Yamazaki R, Kako S, Kanda Y.: Meta-analysis of treatment with rabbit and horse antithymocyte globulin for aplastic anemia. *Int J Hematol* 105:578-586, 2017.
 34. ● Kako S, Kanda Y., Kato J, Yamamoto W, Kato S, Onizuka M, Yokota A, Tatara R, Yokoyama H, Hagihara M, Usuki K, Gotoh M, Watanabe R, Kawai N, Saitoh T, Kanamori H, Takahashi S, Okamoto S.: The bridge treatment selected at the decision for transplantation did not affect the outcomes in patients with MDS. *Hematol Oncol* 35,341-349, 2017.
 35. Kuwatsuka Y, Kanda J, Yamazaki H, Mori T, Miyamura K, Kako S, Uchida N, Ohashi K, Ozawa Y, Takahashi Y, Kato C, Iwato K, Ishiyama K, Kobayashi H, Eto T, Kahata K, Kato J, Miyamoto T, Kato K, Mori S, Atsuta Y, Kimura F, Kanda Y.: Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. A Comparison of Outcomes for Cord Blood Transplantation and Unrelated Bone Marrow Transplantation in Adult Aplastic Anemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 22:1836-1843, 2016.
 36. Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Sanada M, Takahashi Y, Kanno H, Yamaguchi H, Ohga S, Manabe A, Harigae H, Kunishima S, Ishii E, Kobayashi M, Koike K, Watanabe K, Ito E, Takata M, Yabe M, Ogawa S, Miyano S, Kojima S.: Clinical utility of next-generation sequencing for bone marrow failure syndrome. *Genet Med* 19:796-802, 2017.
 37. Kanamitsu K, Shimada A, Nishiuchi R, Shigemura T, Nakazawa Y, Koike K, Kodama Y, Shinkoda Y, Kawano Y, Yasui K, Sasaki K, Kajiwarra R, Tsukahara H, Manabe A.: Pediatric intestinal Behcet disease complicated by myeloid malignancies. *Int J Hematol* 105:377-382, 2017.
 38. Hirabayashi S, Seki M, Hasegawa D, Kato M, Hyakuna N, Shuo T, Kimura S, Yoshida K, Kataoka K, Fujii Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Kiyokawa N, Miyano S, Ogawa S, Takita J, Manabe A.: Constitutional abnormalities of IDH1 combined with secondary mutations predispose a patient with Maffucci syndrome to acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*, in press.
 39. Kobayashi T, Nannya Y, Ichikawa M, Oritani K, Kanakura Y, Tomita A, Kiyoi H, Kobune M, Kato J, Kawabata H, Shindo M, Torimoto Y, Yonemura Y, Hanaoka D, Nakamura H, Hasegawa D, Manabe A, Fujishima N, Fujii N, Tanimoto M, Morita Y, Matsuda A, Fujieda A, Katayama N, Ohashi H, Nagai H, Terada Y, Hino M, Sato K, Obara N, Chiba S, Usuki K, Ohta M, Imataki O, Uemura M, Takaku T, Komatsu N, Kitanaka A, Shimoda K, Watanabe K, Tohyama K, Takaori-Kondo A, Harigae H, Arai S, Miyazaki Y, Ozawa K, Kurokawa M.: A nationwide survey of hypoplastic myelodysplastic syndrome (a multicenter

- retrospective study). *Am J Hematol*, in press.
40. Ishiguro A, Ezinne CC, Michihata N, Nakadate H, Manabe A, Taki M, Shima M: Pediatric Thromboembolism: A National Survey in Japan. *Int J Hematol* 105:52-58, 2017.
 41. Hasegawa D, Manabe A: Myelodysplastic syndrome and JMML. In: Ishii E, editor. *Hematological disorders in children - Pathogenesis and treatment*, p87-108, 2017, Springer (Berlin).
 42. 平林真介、真部淳.: 家族性造血器腫瘍。臨床血液 58:1878-1883, 2017.
2. 学会発表
1. ● 廣川 誠、藤島直仁、澤田賢一、張替秀郎、松田 晃、小松則夫、通山 薫、米村雄士、中尾眞二、斎藤明子、松村 到、荒井俊也、黒川峰夫、三谷絹子. 後天性慢性赤芽球癆の長期予後を明らかにするための多施設共同前向き観察研究 (PRCA2016) 中間報告. 第 79 回日本血液学会学術集会、東京、2017.
 2. ● Hirokawa M, Sawada K, Fujishima N, Teramura M, Bessho M, Dan K, Tsurumi H, Nakao S, Urabe A, Fujisawa S, Yonemura Y, Kawano F, Oshimi K, Sugimoto K, Matsuda A, Karasama M, Arai A, Komatsu N, Harigae H, Tohyama K, Saito A, Matsumura I, Omine M, Ozawa K, Kurokawa M, Arai T, Mitani K. Identification of adverse risk factors for survival in acquired pure red cell aplasia receiving immunosuppressive therapy by the Japan PRCA2004/2006 study and introduction to the new cohort study PRCA2016. 59th ASH Annual Meeting, December 9-12, 2017, Atlanta (誌上发表)
 3. ● Osato M, Murakami Y, Murata S, Nishimura J, Ueda Y, Kinoshita T, Kanakura Y. Elucidation of autoinflammatory mechanism in PIGT-PNH. The American Society of Hematology 59th Annual Meeting, 2017.12.9-12, Atlanta, USA.
 4. ● Jang JH, Okamoto S, Sakurai M, Chou W, Kim JS, Wilson A, Nishimura J, Chiou T, Lee JW, Kanakura Y. Comparison of baseline clinical characteristics between Asian vs. Non-Asian patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) from international PNH registry. The American Society of Hematology 59th Annual Meeting, 2017.12.9-12, Atlanta, USA.
 5. ● Yonemura Y, Kawaguchi T, Ishiyama K, Sugimori C, Hosokawa K, Obara N, Noji H, Shirasugi Y, Ueda Y, Shichishima T, Chiba S, Ninomiya H, Ando K, Nishimura J, Kanakura Y, Takahashi M, Nakao S. Baseline assessment of patients with newly-diagnosed acquired bone marrow failure enrolled in a prospective observational study, "Search for unidentified links between PNH clone size and the related clinical manifestations by high precision flow cytometry (SUPREMACY)". The American Society of Hematology 59th Annual Meeting, 2017.12.9-12, Atlanta, USA.
 6. 松田晃. 骨髄不全の診断-血小板減少に潜むゴージェ病の可能性-第 79 回日本血液学会学術集会 (東京) 2017 年 10 月 22 日 (東京)
 7. 前田智也、松田晃、佐伯豪士、阿久澤有、岡村大輔、石川真帆、郡美佳、高橋直樹、塚崎邦弘、川井信孝、麻生範雄、別所正美. 骨髄異形成症候群 30 例におけるアザシチジン治療反応の解析 第 79 回日本血液学会学術集会 (東京) 2017 年 10 月 20 日 (東京)
 8. 廣川誠、藤島直仁、澤田賢一、張替秀郎、松田晃、小松則夫、通山薫、米村雄士、中尾眞二、斎藤明子、松村到、荒井俊也、黒川峰夫. 後天性慢性赤芽球癆の長期予後を明らかにするための多施設共同前向き観察試験 (PRCA2016) 中間報告 第 79 回日本血液学会学術集会 (東京) 2017 年 10 月 22 日 (東京)
 9. ● 赤司浩一: 「がん幹細胞研究の進歩と治療開発」第 114 回日本内科学会総会・講演会、2017 年 4 月 14 日、東京国際フォーラム、東京
 10. ● 赤司浩一: 「ヒト白血病幹細胞研究の進歩」第 54 回日本臨床分子医学会学術集会、2017 年 4 月 14 日、東京国際フォーラム、東京
 11. ● 赤司浩一: 「ヒトがん幹細胞研究の進歩」第 21 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2017 年 6 月 16 日、九州大学医学部百年講堂・同窓会館、福岡
 12. ● 赤司浩一: 「骨髄性白血病幹細胞成立における TIM-3/Gal-9 オートクラインシグナルの役割」第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月 28-30 日、パシフィコ横浜、横浜
 13. Hasegawa D, Hirabayashi S, Nishimura A, Aiga S, Yamamoto S, Hosoya Y, Fujiwara T, Harigae H, Manabe A: Clonal evolution with monosomy 7 in Pearson syndrome. International Meeting on childhood MDS and SAA. Rome, Italy, September 28-30, 2017.
 14. Hama A, Manabe A, Hasegawa D, Nozawa K, Suzuki K, Narita A, Muramatsu H, Takahashi Y, Watanabe K, Ohara A, Ito M, Kojima S: Bone marrow transplantation for children with acquired bone marrow failure. International Meeting on childhood MDS and SAA. Rome, Italy, September 28-30, 2017.
 15. Narita A, Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Wang X, Kojima D, Xu Y, Kawashima N, Nishio N,

Hama A, Takahashi Y, Hasegawa D, Manabe A, Sakaguchi H, Yoshida N, Kato K, Miyano S, Ito M, Ogawa S, Kojima S: Genetic background of idiopathic bone marrow failure syndromes in children. International Meeting on childhood MDS and SAA. Rome, Italy, September 28-30, 2017.

16. Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Sanada M, Takahashi Y, Kanno H, Yamaguchi H, Ohga S, Manabe A, Harigae H, Kunishima S, Ishii E, Kobayashi M, Koike K, Watanabe K, Ito E, Takata M, Yabe M, Ogawa S, Miyano S, Kojima S: Clinical sequencing of 375 patients with inherited and acquired bone marrow failure syndromes. International Meeting on childhood MDS and SAA. Rome, Italy, September 28-30, 2017.
17. Ohta A, Nagai M, Nishina M, Kamei M, Shimada N, Nakao S, Arai S, Kurakawa M. Incidence of aplastic anemia in Japan. The 21st international Epidemiological Association(IEA) World Congress of Epidemiology 2017(August), Saitama.
18. 仁科基子、太田晶子、永井正規、亀井美登里。再生不良性貧血の重症度分布 臨床調査個人票の解析。第76回日本公衆衛生学会総会、2017. 11. 鹿児島。

H. 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

研究班ホームページ：

<http://zoketsushogaihan.umin.jp>

研究分担者：金倉 譲 （大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科学講座 教授）

研究要旨

PNHにおける血管内溶血と尿沈渣ヘモジデリン

発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）は補体介在性の溶血を主徴とするが、血管内溶血によるヘモジデリンの腎臓への沈着は、PNHにおける腎障害の要因となっている。尿中に出現するヘモジデリン顆粒は血管内溶血を反映する簡便な検査法であるが、エクリズマブに代表される抗補体薬により溶血を抑制した時の尿沈渣ヘモジデリンの動向を検討したところ、治療期間が2年半以上の11例全例で消失し、腎障害の要因が解除されていた。

A. 研究目的

発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）が、H27年より新たに指定難病に認定されたことを受け、当班が中心となり診断基準、重症度分類を含むPNH診療の参照ガイドをH28年度に改訂を行った。PNHは、補体介在性の血管内溶血に起因する貧血、ヘモグロビン尿を主徴とする後天性の造血幹細胞疾患である。血管内溶血が起こると、遊離Hbが血中に溶出しハプトグロビンと複合体を形成するが、ハプトグロビンは容易に枯渇する。余剰の遊離Hbは糸球体でろ過されるが、近位尿細管細胞に再吸収され、酸化されてヘモジデリンになる。この腎臓での鉄の沈着が、PNHにおける腎障害の要因となっている。最終的に変性崩壊して尿中にはがれ落ちたものを、尿中ヘモジデリンとして検出している。PNH溶血の治療薬としてヒト化抗C5抗体（エクリズマブ）が開発され、顕著な溶血抑制効果が示されている。一方で、反応が十分でない要因として、C5遺伝子多型、血管内溶血、血管外溶血、骨髄不全、腎性貧血などがあげられる。エクリズマブに代表される抗補体薬により治療を受けた患者を対象に、尿沈渣ヘモジデリンと他の血管内溶血の指標の動向を検討した。

B. 研究方法

大阪大学医学部付属病院に通院中で、エクリズマ

ブに代表される抗補体薬治療を受けている患者（2008年2月～2017年11月に開始）16例を対象とした。2015年1月より尿沈渣ヘモジデリン顆粒の有無を定期的に検証した。尿沈渣中ヘモジデリン顆粒が、便宜的に100/HPF異常を多数、99~1/HPFを中等度、1/HPF未満を少数、認めないものを認めずと判定した。ハプトグロビン値、LDH値、血清補体価（CH50）などの血管内溶血の指標の推移と経時的に比較検討した。

（倫理面への配慮）

本臨床研究については、通常診療の範囲内で行われるものである。

C. 研究結果

抗補体薬治療を受けている患者16例中、全例でCH50は速やかに検出感度以下になった。2年半以上に渡って治療されている11例では、全例で尿中ヘモジデリンが消失していた。残りの5例は治療歴が浅く消失に至っていないが、段階的に減少している。5例でハプトグロビンが検出されたが、いずれも尿中ヘモジデリンは消失していた。ハプトグロビンが検出されるようになった5例では、1例を除いてLDH値は正常化していた。治療開始前から尿中ヘモジデリン消失まで経過の追えた3例では、治療開始後概ね2~3年で尿中ヘモジデリンは完全消失した。ハプトグロビンを検出した5例

のうち 2 例で尿中ヘモジデリン消失までの経時的観察が行えたが、いずれもハプトグロビンの検出が尿中ヘモジデリン消失に先行していた。

D. 考察

PNH 患者に対し抗補体薬治療を開始した場合、概ね 2~3 年で尿中ヘモジデリンは段階的に減少し、最終的に消失する。ヘモジデリンが消失したのは 16 例中 11 例に対し、ハプトグロビンが検出されたのは 5 例であった。これは、ハプトグロビンの産生に個人差が大きいことも影響しているが、血管内溶血のマーカーとしてはハプトグロビンがより鋭敏であることを示唆しているのかもしれない。

E. 結論

尿中ヘモジデリンを検査は、血管内溶血の指標であると同時に、PNH 患者に対し抗補体薬治療投与後、腎臓への鉄沈着による腎障害のリスクが回避されたことを確認する良い指標になるかもしれない。

F. 研究発表

1. 論文発表

● Nishimura J, Kinoshita T, and Kanakura Y. Clinical effects of eculizumab in PNH: Poor responders. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: From bench to bedside. (Kanakura Y, Kinoshita T, Nishimura J, eds.) Springer, Tokyo, 2017, pp297-pp306.

● Ueda Y, Obara N, Yonemura Y, Noji H, Masuko M, Seki Y, Wada K, Matsuda T, Akiyama H, Ikezoe T, Chiba S, Kanda Y, Kawaguchi T, Shichishima T, Nakakuma H, Okamoto S, Nishimura JI, Kanakura Y, Ninomiya H. Effects of eculizumab treatment on quality of life in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in Japan. *Int J Hematol*. 2018 [Epub ahead of print]

2. 学会発表

● Osato M, Murakami Y, Murata S, Nishimura J, Ueda Y, Kinoshita T, Kanakura Y. Elucidation of autoinflammatory mechanism in PIGT-PNH. The American Society of Hematology 59th Annual Meeting, 2017. 12.9-12, Atlanta, USA

● Jang JH, Okamoto S, Sakurai M, Chou W, Kim JS, Wilson A, Nishimura J, Chiou T, Lee JW, Kanakura Y. Comparison of baseline clinical characteristics between Asian vs. Non-Asian patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) from international PNH registry. The American Society of Hematology 59th Annual Meeting, 2017. 12.9-12, Atlanta, USA

● Yonemura Y, Kawaguchi T, Ishiyama K, Sugimori C, Hosokawa K, Obara N, Noji H, Shirasugi Y, Ueda Y, Shichishima T, Chiba S, Ninomiya H, Ando K, Nishimura J, Kanakura Y, Takahashi M, Nakao S. Baseline assessment of patients with newly-diagnosed acquired bone marrow failure enrolled in a prospective observational study, “Search for unidentified links between PNH clone size and the related clinical manifestations by high precision flow cytometry (SUPREMACY)”. The American Society of Hematology 59th Annual Meeting, 2017. 12.9-12, Atlanta, USA

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

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
「特発性造血障害に関する調査研究」
分担研究報告書

再生不良性貧血の治療に関するフローチャートの改訂

研究分担者 中尾眞二 金沢大学医薬保健研究域医学系細胞移植学 教授

研究要旨:2017年8月に、再生不良性貧血に対するシクロスポリン(CsA)の適応が非重症再生不良性貧血に拡大されると共に、トロンボポエチンレセプター作動薬であるエルトロンボパグ(EPAG)の保険適応が難治性再生不良性貧血と、ATG療法を受ける新規再生不良性貧血の両者に認められた。これを受けて、再生不良性貧血の治療参照ガイドで示されていた治療に関するフローチャートの改訂が必要となった。再生不良性貧血の治療参照ガイド作成ワーキンググループ内で意見を交換することにより、輸血が不要のステージ1、2aと、ステージ2のうち輸血が必要な例(ステージ2b)とステージ3-5に対する治療の新規フローチャートを作成した。主な変更点は、ステージ1と輸血不要なステージ2aに対してはシクロスポリンで治療を開始し、輸血が必要なステージ2bとステージ3-5に対してはATG+シクロスポリンにEPAGを加えるというものである。これらの方針の妥当性は、今後前向きな臨床試験で検証していく予定である。

A. 研究目的

我が国における再生不良性貧血治療における大きな問題点は、①治療開始が早ければ早いほど免疫抑制療法の奏効率が高いにも関わらず、非重症例に対するシクロスポリンの保険適応が認められていないことと、②ウマ抗胸腺細胞グロブリン(hATG)に比べて効果が劣るウサギATG(rATG)しか使用できず、重症再生不良性貧血に対する6か月時点での奏効率が50%弱であること、であった。

後者の問題に関しては、hATG+シクロスポリンにエルトロンボパグ(EPAG)を追加することによって、奏効率が著明に上昇することがアメリカ国立衛生研究所の報告で明らかになったことから、日本でもEPAGの保険適応拡大が待望されていた。2017年8月25日に、EPAGの難治性再生不良性貧血と、初回rATG療法を受ける再生不良性貧血患者に対するrATGとの併用の両者に保険適応が認められた。また、同時にシクロスポリンの非重症再生不良性貧血に対する適応拡大も承認された。これらの二つの適

応拡大は、今後の再生不良性貧血治療を大きく変える可能性がある。

このため、これらの2剤を取り入れた治療ガイドラインの改訂が必要と考えられた。そこで、特発性造血障害に関する調査研究の「再生不良性貧血の治療参照ガイド作成ワーキンググループ」内で、治療に関するフローチャートの刷新を目的に検討を開始した。

B. 研究方法

①輸血が不要なステージ1、2の再生不良性貧血と、②ステージ2のうち輸血が必要な例(ステージ2b)とステージ3-5に対する治療のフローチャート原案をワーキンググループ長の中尾が作成し、メーリングリストにより、各委員との意見交換により最終案を作成した。2018年1月12日に開催された「特発性造血障害に関する調査研究」第二回班会議総会でフローチャート改訂案を紹介し、班員の意見を求めた。

C. 研究結果

主な変更点は、ステージ1と輸血不要なステージ

2a の重症度の患者に対しては比較的少量(3.5 mg/kg)のシクロスポリンを 8 週間投与し、反応をみるという点と、HLA 一致同胞ドナーからの移植適応がない輸血が必要なステージ 2b・ステージ 3-5 の患者に対しては ATG+シクロスポリンに EPAG を加えるというものである。

シクロスポリンによる改善の徴候が見られなかった非重症例において血球減少が進行し、輸血が必要になった場合には、重症例に準じて ATG+シクロスポリン+EPAG 療法を行う。血球減少が進行するが、輸血までは必要としない例に対しては、二次治療として EPAG を投与する。これも無効であった場合はタンパク同化ステロイドを考慮する。

ATG+シクロスポリン療法を受ける患者に対しては原則として全例に EPAG を併用するが、「EPAG によって、染色体異常を持つ造血幹細胞の増殖が誘発される可能性が否定できないため、PNH 型血球や HLA クラス I アレル欠失血球などの免疫病態マーカーが陽性の若年者に対しては、EPAG の併用は慎重に行う。」という但し書きを加えることとした。

これらの原案を班会議総会で紹介したところ異論は見られず、承認が得られた。

D. 考察

改訂フローチャートにしたがって治療を行うことにより、非重症・重症再生不良性貧血の治療成績が飛躍的に向上することが期待できる。EPAG は初回 ATG 投与例だけでなく、シクロスポリンが無効であった非重症例に対する救済療法としても使用できるため、従来難治性とされていた罹病期間の長い症例も改善させられる可能性が高い。また、かつて ATG 療法を受けたものの無効であったため、治療関連死亡率の高い非血縁ドナーからの移植を待っていた患者も EPAG によって輸血が不要となる可能性が高いことから、非血縁ドナーからの移植を必要とする例が激減する可能性もある。ただし、これらの治療は経験の少ない治療であるため、多数例を対象とした前向き臨床試験によって真の有用性を確認する必要がある。

る。現在、西日本臨床研究グループを母体とする臨床試験を計画している。

E. 結論

新規に使用できるようになった「非重症例に対するシクロスポリン」とエルトロンボパグの両者を取り入れた「再生不良性貧血の治療参照ガイド」における新しい治療のフローチャートを作成した。

ワーキンググループ作成委員:中尾眞二(金沢大学)、小島勢二・濱 麻人(名古屋大学)、大橋春彦(トヨタ記念病院)、小原 明(東邦大学)、臼杵憲祐(NTT 関東病院)、猪口孝一(日本医科大学)、鈴木隆浩(北里大学)、小原 直(筑波大学)、小笠原洋治(慈恵医大)、太田晶子(埼玉医科大学)、島田直樹(国際医療福祉大学)、黒川峰夫(東京大学)

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Maruyama K, Aotsuka N, Kumano Y, Sato N, Kawashima N, Onda Y, Maruyama H, Katagiri T, Zaimoku Y, Nakagawa N, Hosomichi K, Ogawa S, Nakao S: Immune-Mediated Hematopoietic Failure after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Common Cause of Late Graft Failure in Patients with Complete Donor Chimerism. *Biol Blood Marrow Transplant* 24:43-49, 2018
2. Espinoza JL, Elbadry MI, Chonabayashi K, Yoshida Y, Katagiri T, Harada K, Nakagawa N, Zaimoku Y, Imi T, Hassanein HA, Khalifa ANA, Takenaka K, Akashi K, Hamana H, Kishi H, Akatsuka Y, Nakao S: Hematopoiesis by iPSC-derived hematopoietic stem cells of aplastic anemia that escape cytotoxic T-cell attack. *Blood Adv* 2:390-400, 2018
3. Zaimoku Y, Takamatsu H, Hosomichi K, Ozawa T, Nakagawa N, Imi T, Maruyama H, Katagiri T, Kishi H, Tajima A, Muraguchi A, Kashiwase

K, Nakao S: Identification of an HLA class I allele closely involved in the autoantigen presentation in acquired aplastic anemia. Blood 129:2908-2916, 2017

2. 学会発表

本ガイドライン作成に関する学会発表は行っていない。

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

厚生労働省科学研究費補助金（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」

分担研究報告書

後天性慢性赤芽球癆の長期予後に関する前向き観察研究

研究分担者：廣川 誠（秋田大学大学院医学系研究科総合診療・検査診断学講座・教授）

研究要旨

2004年度から本研究班が実施した全国調査により、特発性、胸腺腫関連および大顆粒リンパ球性白血病関連赤芽球癆、悪性リンパ腫関連赤芽球癆、そして ABO major 不適合同種造血幹細胞移植後赤芽球癆に対する治療の有効性と予後が明らかにされ、これらの研究成果をもとに病因別の赤芽球癆診療の参照ガイドが 2011 年度に作成された。これによる後天性慢性赤芽球癆の予後改善の有無および難治例における鉄キレート療法の有効性を明らかにすることを目的として、日本血液学会との共同による前向き観察研究を計画した。全国から 181 例の後天性赤芽球癆症例について登録医による研究参加同意が得られ、現在、研究参加に対する患者同意の取得および臨床調査票の回収を行い、2018 年 1 月 6 日時点で 96 例の登録を得た。最大 181 例の新たな後天性赤芽球癆症例について予後調査が可能となることが期待される。

A. 研究目的

後天性慢性赤芽球癆は赤血球系前駆細胞の増殖・分化の障害による難治性貧血であり、平成 27 年 7 月に指定難病として認定された。後天性慢性赤芽球癆に対する至適治療の確立のため、前向きコホート研究のデザインのもとに、一次エンドポイントとして後天性慢性赤芽球癆の全生存、二次エンドポイントとして免疫抑制療法の奏効率、輸血依存症例の割合、輸血依存症例における鉄キレート療法の実施状況と予後を縦断的に調査する。

B. 研究方法

- 1) 研究デザイン：前向きコホート縦断的観察研究 (cohort longitudinal observational study)
- 2) 介入：なし
- 3) 登録対象症例の抽出：2006～2015 年度の 10 年間に日本血液学会血液疾患登録および国立病院機構血液疾患登録データベースに登録された成人赤芽球癆症例の登録施設名、登録医師名、匿名化

システム番号の提供を依頼。登録医に研究協力依頼し、承諾の得られた登録医に症例登録票を送付する。

4) 調査項目：宿主因子、診断に関連する項目、治療奏効など。

5) フォローアップ：1 年に 1 回調査票を登録医に送付。

6) エンドポイント：一次エンドポイントは後天性慢性赤芽球癆の全生存、二次エンドポイントは免疫抑制療法の奏効率、輸血依存症例の割合、輸血依存症例における鉄キレート療法の実施状況と予後とする。

7) 研究期間：最後に登録された症例の観察期間が 5 年を経過した時点で中間解析を行い、同じく 10 年を経過した時点で試験を終了する。

(倫理面への配慮)

本研究は「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針平成 29 年 2 月 28 日一部改正」に則り、原

則登録対象者より研究参加への同意（以下 IC）を取得する（文書 IC、あるいは口頭 IC+診療録に記録を残す）こととし、IC 取得困難な場合には匿名化情報の提供について機関の長の承諾を得ることとする。なお本研究計画の概要は特発性造血障害に関する調査研究班のホームページに公開し、UMIN-CTR に登録している（UMIN000024807）。

C. 研究結果

本研究計画は平成 28 年 2 月に秋田大学研究倫理審査委員会および日本血液学会学術・統計調査委員会および倫理委員会で承認された。2006～2015 年度の 10 年間に日本血液学会血液疾患登録および国立病院機構血液疾患登録データベースに登録された成人赤芽球癆症例 554 例が抽出され、日本血液学会学術・統計調査委員会よりデータの提供を受けた。登録医に本研究への参加同意について問い合わせをし、181 例について同意を得た。平成 30 年 1 月 6 日時点で回収された症例調査票は 96 症例、特発性赤芽球癆 48 例、続発性 45 例、病型不明 3 名である。免疫抑制薬の初回寛解導入療法奏効率(完全寛解および部分寛解)は、特発性赤芽球癆においてプレドニゾロン 11/15 (73%)、シクロスポリン 23/28(82%)、胸腺腫関連赤芽球癆ではプレドニゾロン 1/1(100%)、シクロスポリン 10/12(83%)、大顆粒リンパ球性白血病関連赤芽球癆ではシクロスポリン 2/3(67%)、シクロホスファミド 1/2(50%)であった。96 例中 20 例の死亡が確認され、特発性 11 例、続発性 9 例で、死因は感染症 7 例、臓器不全 3 例、両者の合併 1 例、その他 9 例であった。症例調査票の回収を継続し、生存例については予後調査を行う予定である。

D. 考察

本事業により国内外で類を見ない規模の後天性慢性赤芽球癆のコホート研究が遂行されるものと期待される。

E. 結論

最大 181 例の新たな後天性赤芽球癆症例について予後調査が可能となる。

F. 健康危険情報 該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 廣川 誠. 赤芽球癆. 血液疾患最新の治療 2017-2019, 小澤敬也, 中尾眞二, 松村 到 (編), 南江堂, 東京, 109-112, 2017.
- 廣川 誠. 赤芽球癆. 1336 専門家による私の治療 2017-18 年度版, 猿田享男, 北村惣一郎 (編), 日本医事新報社, 東京, 693-694, 2017.
- 廣川 誠. 赤芽球癆. 貧血症診断と治療の ABC125, 桐戸啓太 (編). 最新医学社、大阪、99-106, 2017.
- 廣川 誠. 赤芽球癆: 疾患概念・病因・病態. 日本臨床, 75 (増刊号), 431-436, 2017.
- 廣川 誠. 後天性赤芽球癆の特徴と治療の実際. 新薬と臨床, 66, 62-67, 2017
- Nagao T, Hirokawa M. Diagnosis and treatment of macrocytic anemias in adults. J Gen Fam Med 2017;18:200-204.

2. 学会発表

- 廣川 誠、藤島直仁、澤田賢一、張替秀郎、松田 晃、小松則夫、通山 薫、米村雄士、中尾眞二、斎藤明子、松村 到、荒井俊也、黒川峰夫、三谷絹子. 後天性慢性赤芽球癆の長期予後を明らかにするための多施設共同前向き観察研究 (PRCA2016) 中間報告. 第 79 回日本血液学会学術集会、東京、2017
- Hirokawa M, Sawada K, Fujishima N, Teramura M, Bessho M, Dan K, Tsurumi H, Nakao S, Urabe A, Fujisawa S, Yonemura Y, Kawano F, Oshimi K, Sugimoto K, Matsuda A, Karasama M, Arai A, Komatsu N, Harigae H, Tohyama K, Saito A, Matsumura I, Omine M, Ozawa K, Kurokawa M, Arai T, Mitani K. Identification of adverse risk factors for survival in acquired pure red cell aplasia receiving immunosuppressive therapy by the Japan PRCA2004/2006 study and introduction to the new cohort study PRCA2016. 59th ASH Annual Meeting, December 9-12, 2017, Atlanta (誌上発表)

H. 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

厚生労働省科学研究費補助金（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」

分担研究報告書

わが国の原発性骨髄線維症の臨床像

研究分担者：赤司浩一（九州大学病態修復内科学・教授）

研究要旨

わが国の原発性骨髄線維症について、17年間で782例の臨床情報を集積し、解析した。生存期間の中央値は4.0年で、3年生存率59%である。主な死因は、感染症、白血病への移行であった。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)は、わが国の症例においても、予後不良群の抽出が可能で、予後指標として有用であった。

A. 研究目的

わが国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。

B. 研究方法

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年から2015年3月までの診断例に関し、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。

(倫理面への配慮)

臨床調査は、患者名を匿名化して行っている。

C. 研究結果

294施設より計782例の原発性骨髄線維症の新規症例を集積した。初回アンケート調査への返信率は48%、フォローアップ調査への返信率は64%であった。主な調査終了理由は、患者死亡、転院であった。発症年齢中央値は66歳、男女比は2:1である。診断時に自覚症状を有する症例は全体の約20%で、検査値異常が初回受診時の主な理由であ

った。*JAK2*変異の検索は185例に施行されており、変異が56%に認められた。生存期間の中央値は4.0年であり、3年生存率は59.0%であった。死因は感染症、白血病への移行、出血、原疾患の増悪、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2015年までに前向きに経過観察しているわが国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すると、DIPSS plus (Dynamic International Prognostic Scoring System for PMF-Plus)が最もわが国の原発性骨髄線維症の予後予測に有用であった。また、DIPSS-Plusは、診断時だけでなく、臨床経過中の任意の時点においても、高リスク群の分離が可能であった。

治療として、同種造血幹細胞移植を受けた43零の移植後3年生存率は84%と良好で、生存期間の有意な延長がみられている。

D. 考察

現時点でわが国において診断時の予後予測には、これまで提唱されている予後予測モデルの中で、DIPSS plusの適応が最もよく、診断時および経過観察中の原発性骨髄線維症患者の治療方針を決定

する指標として有用であると考えられた。

E. 結論

わが国の原発性骨髄線維症 780 例の臨床情報を集積した。国際予後スコアリングシステムの DIPSS-Plus は、わが国の予後予測に有用である。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

●Minami M, Arita T, Iwasaki H, Muta T, Aoki T, Aoki K, Yamasaki S, Matsushima T, Kato K, Takenaka K, Tanimoto K, Kamimura T, Ogawa R, Akashi K, Miyamoto T. Comparative analysis of pulmonary hypertension in patients treated with imatinib, nilotinib and dasatinib. *Br J Haematol.* 177: 578-587, 2017.

●Miyawaki K, Iwasaki H, Jiromaru T, Kusumoto H, Yurino A, Sugio T, Uehara Y, Odawara J, Daitoku S, Kunisaki Y, Mori Y, Arinobu Y, Tsuzuki H, Kikushige Y, Iino T, Kato K, Takenaka K, Miyamoto T, Maeda T, Akashi K. Identification of unipotent megakaryocyte progenitors in human hematopoiesis. *Blood* 129: 3332-3343, 2017.

●Yuda J, Miyamoto T, Odawara J, Ohkawa Y, Semba Y, Hayashi M, Miyamura K, Tanimoto M, Yamamoto K, Taniwaki M, Akashi K. Persistent detection of alternatively spliced BCR-ABL variant results in a failure to achieve deep molecular response. *Cancer Sci.* 108: 2204-2212, 2017.

●Kirito K, Okamoto S, Ohishi K, Tauchi T, Handa H, Saito S, Takenaka K, Shimoda K, Oritani K, Akashi K, Okada H, Amagasaki T, Suzuki K, Yonezu T, Komatsu N. Evaluation of the dose and efficacy of ruxolitinib in Japanese patients with myelofibrosis. *Int J Hematol.* 107: 92-97, 2018.

●Mizuno S, Iino T, Ozawa H, Arinobu Y, Chong Y, Akashi K. Notch1 expression is regulated at the post-transcriptional level by the 3' untranslated region in hematopoietic stem cell development. *Int J Hematol.* 107: 311-319, 2018.

●Oritani K, Ohishi K, Okamoto S, Kirito K, Komatsu N, Tauchi T, Handa H, Saito S, Takenaka K, Shimoda K, Okada H, Amagasaki T, Wakase S, Shimozuma K, Akashi K. Effect of ruxolitinib therapy on the quality-of-life of Japanese patients with myelofibrosis. *Curr Med Res Opin.* 34: 531-537, 2018.

2. 学会発表

●赤司浩一：「がん幹細胞研究の進歩と治療開発」第114回日本内科学会総会・講演会、2017年4月14日、東京国際フォーラム、東京

●赤司浩一：「ヒト白血病幹細胞研究の進歩」第54回日本臨床分子医学会学術集会、2017年4月14日、東京国際フォーラム、東京

●赤司浩一：「ヒトがん幹細胞研究の進歩」第21回日本がん分子標的治療学会学術集会、2017年6月16日、九州大学医学部百年講堂・同窓会館、福岡

●赤司浩一：「骨髄性白血病幹細胞成立におけるTIM-3/Gal-9オートクラインシグナルの役割」第76回日本癌学会学術総会、2017年9月28-30日、パシフィコ横浜、横浜

H. 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」

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業）
分担研究報告書

特発性造血障害に関する調査研究

分担研究者：宮崎 泰司 国立大学法人長崎大学原爆後障害医療研究所 教授

研究要旨

骨髄異形成症候群の様々な臨床像に日本人と欧米人とで差が見られるのか比較することで、本疾患における民族間差が存在するのかを検討した。その結果、症例の年齢構成で日本人例では若年症例が多かった。血液学的な検査として日本人例では貧血、好中球減少、血小板減少の程度が欧米症例と比較して優位に強く、末梢血及び骨髄の芽球割合は有意に低下していた。核型では5番染色体長腕の欠失が日本人で有意に少なく、20番染色体長腕の欠失を含めた複数の核型が有意に増加していた。全生存時間は日本人で有意に延長していたが、白血病移行までの期間には差が無かった。一般に予後予測に利用される臨床的な因子（血球減少、芽球割合、染色体核型）が症例の生存期間、白血病移行までの期間に与えるインパクトには日本人と欧米人とで差が見られ、予後因子としての意義にも違いが存在した。こうした結果は、骨髄異形成症候群の臨床像に民族間差があることを示唆していた。

A. 研究目的

骨髄異形成症候群は未分化な造血細胞に遺伝子異常が蓄積した結果生ずる血液疾患である。特異的な染色体異常やゲノム変異が、特徴的な臨床病態と関連する病型もあることから、骨髄異形成症候群は種々のゲノム変異と強く関連していると考えられている。造血疾患では民族によるゲノム背景の差が疾患の頻度と関連するものが知られており、例えば慢性リンパ性白血病が日本人を含むアジアでは欧米と比較して著しく少ないことはよく知られている。今回、骨髄異形成症候群において民族差によってどのような病態、予後が異なるのかを検討し、欧米の症例を中心に作成されてきている予後予測スコアリングシステムが本邦においても同様に利用可能なのか、検討することとした。

B. 研究方法

骨髄異形成症候群の予後予測スコアリングシステムである International Prognostic Scoring System (IPSS)は1997年に発表されたが、その改訂を目的に7,000例を超える骨髄異形成症候群症例が集積された。2012年にそれらの情報を基に改訂 IPSS (Revised IPSS, IPSS-R)が作成された。そのおりに集積された症例を用

いて、日本人症例と欧米人症例とで主に IPSS-Rに関連する臨床的因子の比較を実施した。国内症例の一部は特発性造血障害に関する調査研究班を通じて収集された。欧米症例は世界の13データベースから収集された。

そのデータベースを基として民族情報が明らかな症例を対象とし、最終的に日本人症例300例、欧米症例5,838例を用いて一般臨床的背景、血液学的パラメータ、染色体核型のタイプ、白血病かを含む予後について比較した。臨床因子の予後および白血病化に与えるインパクトはDxy指数として示した。

C. 研究結果

症例の年齢構成で日本人例では若年症例が多かった。男女比には差は見られなかった。血液学的な検査として日本人例では貧血、好中球減少、血小板減少の程度が欧米症例と比較して優位に強く、末梢血及び骨髄の芽球割合は有意に低下していた。その反映の一部としてFAB分類、WHO分類における症例分布にも有意差が見られた。骨髄細胞の核型では、両群間で正常染色体症例の割合には差が見られなかった。しかし、5番染色体長腕の欠失は日本人症例で有意に少なく、20番染色体長腕の欠失を含めた複数の核型が有意に増加していた。その中には1番

と7番染色体に見られる派生染色体[der(1;7)]も含まれていた。全生存時間は日本人で有意に延長していたが、白血病移行までの期間には差が無かった。一般に予後予測に利用される臨床的な因子(血球減少、芽球割合、染色体核型)が症例の生存期間、白血病移行までの期間に与えるインパクトには日本人と欧米人とで差が見られた。血球減少は日本人症例において予後への影響が小さく、骨髄芽球は日本人例で予後へのインパクトがより大きかった。染色体核型のタイプは、日本人例で予後への影響が大きいものの白血病化への影響は逆に小さかった。このように予後因子としての意義にも二つの群で違いが存在した。

D. 考察

本研究では、これまで日本、韓国、中国、タイなどより報告されてきたそれぞれの骨髄異形成症候群症例と欧米症例の差に関する検討をより大規模、且つ詳細に実施した。それによって日本人と欧米人の骨髄異形成症候群では臨床的な差があることが示唆された。

しかし、こうした差が民族というゲノム背景のみに起因するかどうかについては確定されたものではない。食生活、住環境、医療へのアクセス、疾患への考え方、合併症の内容など、今回の比較に影響を与えうる様々な要因も存在している。

一方で、今回の検討では総合的な予後予測スコアリングシステムは日本人症例においても十分予後予測に利用できることも示された。これは、複数因子をスコア化しているというIPSS-Rの有利な点と思われる。今後、こうした臨床的な差を基本としてゲノムの比較に基づく検討へと進めていく必要がある。

E. 結論

日本人と欧米人の骨髄異形成症候群には臨床像に差が見られる可能性がある。それは民族差による可能性があるが、ゲノムの検討を含めた今後の解析が待たれる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Chromosomal analysis of myelodysplastic syndromes among atomic bomb survivors in Nagasaki.

Horai M, Satoh S, Matsuo M, Iwanaga M, Horio K, Jo T, Takasaki Y, Kawaguchi Y, Tsushima H, Yoshida S, Taguchi M, Itonaga H, Sawayama Y, Taguchi J, Imaizumi Y, Hata T, Moriuchi Y, Haase D, Yoshiura KI, Miyazaki Y.

Br J Haematol. 2018 Feb;180(3):381-390.

A nationwide survey of hypoplastic myelodysplastic syndrome (a multicenter retrospective study).

Kobayashi T, Nannya Y, Ichikawa M, Oritani K, Kanakura Y, Tomita A, Kiyoi H, Kobune M, Kato J, Kawabata H, Shindo M, Torimoto Y, Yonemura Y, Hanaoka N, Nakakuma H, Hasegawa D, Manabe A, Fujishima N, Fujii N, Tanimoto M, Morita Y, Matsuda A, Fujieda A, Katayama N, Ohashi H, Nagai H, Terada Y, Hino M, Sato K, Obara N, Chiba S, Usuki K, Ohta M, Imataki O, Uemura M, Takaku T, Komatsu N, Kitanaka A, Shimoda K, Watanabe K, Tohyama K, Takaori-Kondo A, Harigae H, Arai S, Miyazaki Y, Ozawa K, Kurokawa M; for National Research Group on Idiopathic Bone Marrow Failure Syndromes.

Am J Hematol. 2017 Dec;92(12):1324-1332.

Validation of the revised International Prognostic Scoring System in patients with myelodysplastic syndrome in Japan: results from a prospective multicenter registry.

Kawabata H, Tohyama K, Matsuda A, Araseki K, Hata T, Suzuki T, Kayano H, Shimbo K, Zaike Y, Usuki K, Chiba S, Ishikawa T, Arima N, Nogawa M, Ohta A, Miyazaki Y, Mitani K, Ozawa K, Arai S, Kurokawa M, Takaori-Kondo A; Japanese National Research Group on Idiopathic Bone Marrow Failure Syndromes.

Int J Hematol. 2017 Sep;106(3):375-384.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

厚生労働省科学研究費補助金（難治性克服疾患研究事業）
分担研究報告書

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

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）

研究要旨

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を目的とした前方視的症例登録・追跡調査研究と、これらの疾患の診断一致率の向上を目指したセントラルレビューからなる。平成 29 年末までの通算登録症例数は 380 例で、このうち骨髄芽球が 5 %未満の症例については末梢血標本および骨髄標本のセントラルレビューを行った。また、登録された症例について毎年追跡調査を実施している。今回は、中央診断が再不貧、意義不明の特発性血球減少症（ICUS）、もしくは FAB 分類での MDS の患者についての予後解析を行った。その結果、ICUS の予後は本邦においては再不貧と同様に良好であること、MDS の予後は WHO 分類による病型ごとに大きく異なること、多系統に異形成を伴う MDS のうち環状鉄芽球を有するものの予後は欧米と異なり不良であることが示された。さらに、芽球増加がみられない MDS のうち、診断時の網状赤血球数が維持されている群は網状赤血球数が減少している群に比べて全生存期間が長いことが示された。今後さらなる症例の集積と追跡調査を行って、本データベースをさまざまな研究に活用し、その成果を広く公開していくことが重要と考えられる。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

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、データベース内に一元的に管理している。これらの情報をもとに、診断時の臨床情報と予後との関連の解析を行った。

（倫理面への配慮）

本研究の施行においては、疫学研究に関する倫理指針に基づき、各参加施設での倫理審査委員会での承認を受け、患者登録に際しての文書による同意を取得した。患者情報は連結可能匿名化を行っている。

C. 研究結果

（1）症例登録とセントラルレビュー

2017 年には 18 例の登録があり、累計で 380 例の登録数となった。セントラルレビュー後の中央診断の内訳は、再不貧 82 例、WHO 2017 分類での MDS 206 例、急性骨髄性白血病（acute myeloid leukemia, AML）9 例、MDS/骨髄増殖性腫瘍（myeloproliferative neoplasms, MPN）21 例、意義不明の特発性血球減少症（idiopathic cytopenias of undetermined significance, ICUS）11 例、意義未確定の特発性骨髄異形成症（idiopathic dysplasia of uncertain significance, IDUS）3 例などであった。診断時年齢中央値は、再不貧で 56 歳、FAB 分類での MDS（WHO 分類の MDS, MDS/MPN, 芽球 30%未満の AML）では 69 歳であった。FAB 分類での MDS のうち 16%は抗がん剤治療あるいは放射線治療後の二次性 MDS であった。男女比は、再不貧で 0.9 対 1 とほぼ半々、FAB 分類での MDS では 1.8 対 1 と男性に多かった。

（2）MDS 患者の追跡調査

追跡不適格例（診断から 1 年以上を経て登録、あるいは追跡期間が 4 週間未満）を除いた症例について、中央診断別に追跡データを解析した。AA

もしくは ICUS 患者の全生存期間 (OS) は良好であった (図 1)。

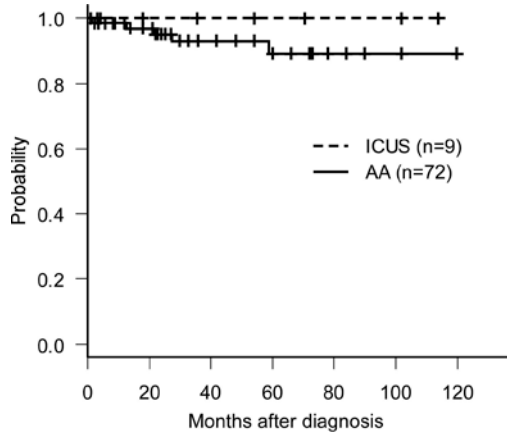


図1 再生不良性貧血および ICUS の全生存率

一方、MDS、もしくは FAB 分類で MDS に属する慢性骨髄単球性白血病 (CMML) と診断された患者の OS は、WHO 分類上の病型によって大きく異なっていた (図 2)。すなわち、MDS-SLD の OS は比較的良好で、MDS-EB1, EB2, および CMML の OS は不良であった。MDS-MLD の生存曲線はこれらの中に位置していたが、環状鉄芽球を有する MDS-RS-MLD の予後は MDS-EB と同様に不良であった。

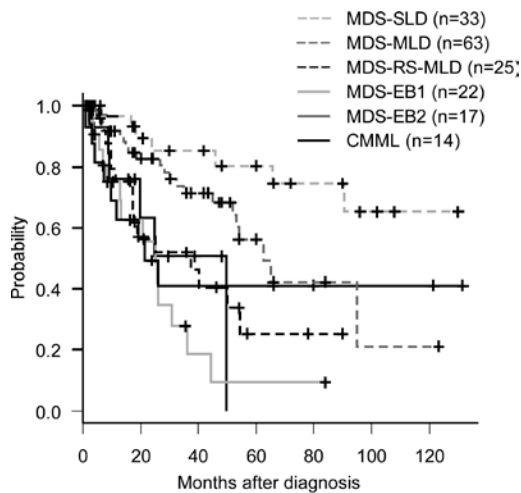


図2 MDSおよびCMMLの病型別全生存率

今回はさらに、芽球が 5%未満の MDS における、診断時の血球パラメーターによる予後の解析をおこなった。その結果、網状赤血球数が 4 万/ μ l 以上の群では 4 万/ μ l 未満の群に比べて有意に OS が長かった (図 3)。また、赤血球平均容積 (MCV) が大きい群で OS が長い傾向にあった。

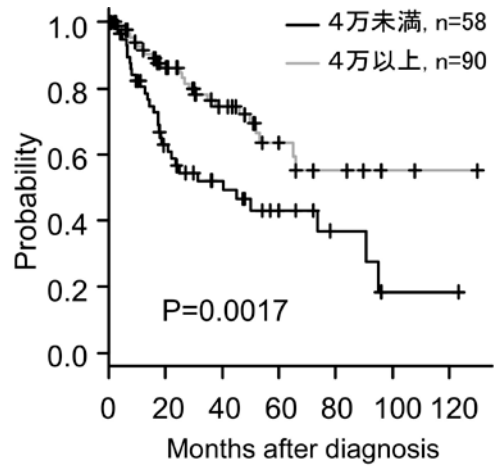


図3 芽球5%未満のMDSにおける網状赤血球数別の全生存率

D. 考察

今年度も、新規登録症例についての中央診断を行うとともに、登録症例の追跡調査を継続した。

今年度の解析では、ICUS の生命予後が再不貧と同程度に良好であることが示された。また、MDS 患者の WHO 分類別の生存解析では、芽球の増加した MDS-EB の予後が不良であることのほかに、多系統に異形成を伴う MDS-MLD の中で RS を有する MDS-RS-MLD の生命予後が不良であることが示された。この結果は、過去の欧米からの報告と合致せず、*SF3B1* などの遺伝子変異解析も含めたさらなる検証が必要である。芽球が 5%未満の MDS における診断時の血球パラメーターと予後との関連解析では、初診時に網状赤血球数の減少がみられない群で、減少がみられる群に比べて OS が長いという新知見が得られた。

このほか、本研究では中央診断で検鏡者間の所見に不一致がみられた症例を対象とした合同検鏡会を開催している。この活動は、血液疾患の形態診断の啓蒙にも役立っているものと思われる。

E. 結論

今回の解析では、わが国の再不貧、ICUS、および病型別の MDS 患者の予後に関する貴重な情報が得られた。本研究で構築されているデータベースには、セントラルレビューにより診断が担保されている多くの症例の登録時データと、追跡調査データが蓄積されている。今後、さらなる症例登録と追跡調査によって本邦における再不貧および MDS の特徴を分析し、これに基づいた診療指針を作成し公開していくことが重要と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamazaki H, Kondo T, Aoki K, Yamashita

- K, Takaori-Kondo A: Occurrence and improvement of renal dysfunction and serum potassium abnormality during administration of liposomal amphotericin B in patients with hematological disorders: A retrospective analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2018;90 (123-131)
- 2) Yamazaki H, Aoki K, Kondo T, Nishikori M, Kitano T, Hishizawa M, Yamashita K, Takaori-Kondo A: Outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in cases of mature T/NK-cell neoplasms: a single-center retrospective analysis. *Ann Hematol* 2017;96 (323-326)
 - 3) Sugino N, Kawahara M, Tatsumi G, Kanai A, Matsui H, Yamamoto R, Nagai Y, Fujii S, Shimazu Y, Hishizawa M, Inaba T, Andoh A, Suzuki T, Takaori-Kondo A: A novel LSD1 inhibitor NCD38 ameliorates MDS-related leukemia with complex karyotype by attenuating leukemia programs via activating super-enhancers. *Leukemia* 2017;31 (2303-2314)
 - 4) Sakamoto S, Kawabata H, Kanda J, Uchiyama T, Mizumoto C, Kitano T, Kondo T, Hishizawa M, Tomosugi N, Takaori-Kondo A: High pretransplant hepcidin levels are associated with poor overall survival and delayed platelet engraftment after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Med* 2017;6 (120-128)
 - 5) Okuda H, Stanojevic B, Kanai A, Kawamura T, Takahashi S, Matsui H, Takaori-Kondo A, Yokoyama A: Cooperative gene activation by AF4 and DOT1L drives MLL-rearranged leukemia. *J Clin Invest* 2017;127 (1918-1931)
 - 6) Kobayashi T, Nannya Y, Ichikawa M, Oritani K, Kanakura Y, Tomita A, Kiyoi H, Kobune M, Kato J, Kawabata H, Shindo M, Torimoto Y, Yonemura Y, Hanaoka N, Nakakuma H, Hasegawa D, Manabe A, Fujishima N, Fujii N, Tanimoto M, Morita Y, Matsuda A, Fujieda A, Katayama N, Ohashi H, Nagai H, Terada Y, Hino M, Sato K, Obara N, Chiba S, Usuki K, Ohta M, Imataki O, Uemura M, Takaku T, Komatsu N, Kitanaka A, Shimoda K, Watanabe K, Tohyama K, Takaori-Kondo A, Harigae H, Arai S, Miyazaki Y, Ozawa K, Kurokawa M: A nationwide survey of hypoplastic myelodysplastic syndrome (a multicenter retrospective study). *Am J Hematol* 2017;92 (1324-1332)
 - 7) Kawabata H, Tohyama K, Matsuda A, Araseki K, Hata T, Suzuki T, Kayano H, Shimbo K, Zaike Y, Usuki K, Chiba S, Ishikawa T, Arima N, Nogawa M, Ohta A, Miyazaki Y, Mitani K, Ozawa K, Arai S, Kurokawa M, Takaori-Kondo A: Validation of the revised International Prognostic Scoring System in patients with myelodysplastic syndrome in Japan: results from a prospective multicenter registry. *Int J Hematol* 2017;106 (375-384)
 - 8) Jo T, Arai Y, Kondo T, Kitano T, Hishizawa M, Yamashita K, Takaori-Kondo A: Chronic Kidney Disease in Long-Term Survivors after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Retrospective Analysis at a Single Institute. *Biol Blood Marrow Transplant* 2017;23 (2159-2165)
 - 9) Chonabayashi K, Yoshida Y, Takaori-Kondo A: Reprogramming technology reveals genetic and functional diversity of subclones in myelodysplastic syndromes. *Rinsho Ketsueki* 2017;58 (787-791)
 - 10) Arai Y, Jo T, Matsui H, Kondo T, Takaori-Kondo A: Efficacy of antithymocyte globulin for allogeneic hematopoietic cell transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Leuk Lymphoma* 2017;58 (1840-1848)
 - 11) Li L, Sheng Y, Li W, Hu C, Mittal N, Tohyama K, Seba A, Zhao Y, Ozer H, Zhu T, Qian Z: β -Catenin is a candidate therapeutic target for myeloid neoplasms with del(5q). *Cancer Res* 2017;77 (4116-4126)
 - 12) Oben KZ, Alhakeem SS, McKenna MK, Brandon JA, Mani R, Noothi SK, Jinpeng L, Akunuru S, Dhar SK, Singh IP, Liang Y, Wang C, Abdel-Latif A, Stills Jr HF, St. Clair DK, Geiger H, Muthusamy N, Tohyama K, Gupta RC, Bondada S: Oxidative stress-induced JNK/AP-1 signaling is a major pathway involved in selective apoptosis of myelodysplastic syndrome cells by withaferin-A. *Oncotarget* 2017;8 (77436-77452)
 - 13) 松田晃, 張替秀郎, 通山薫: 骨髓異形成症候群, 血液細胞アトラス第6版(通山薫, 張替秀郎 編集), 文光堂(東京), 2018; 271-282
 - 14) 松田晃. 骨髓異形成症候群の形態診断. *臨床血液* 2017;58(336-346)
2. 学会発表
 - 1) 松田晃. 骨髓不全の診断-血小板減少に潜む骨髓病の可能性-第79回日本血液学会学術集会(東京) 2017年10月22日(東京)
 - 2) 前田智也, 松田晃, 佐伯豪士, 阿久澤有, 岡村大輔, 石川真帆, 郡美佳, 高橋直樹, 塚崎邦弘, 川井信孝, 麻生範雄, 別所正美. 骨髓異形成症候群30例におけるアザシチジン治療反応の解析 第79回日本血液学会学術集会(東京) 2017年10月20日(東京)
 - 3) 廣川誠, 藤島直仁, 澤田賢一, 張替秀郎, 松田晃, 小松則夫, 通山薫, 米村雄士, 中尾眞

二、齊藤明子、松村到、荒井俊也、黒川峰夫. 後天性慢性赤芽球癆の長期予後を明らかにするための多施設共同前向き観察試験 (PRCA2016)中間報告 第 79 回日本血液学会学術集会 (東京) 2017 年 10 月 22 日 (東京)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3.その他

該当なし。

特発性造血障害に関する調査研究

研究分担者 黒川 峰夫 東京大学医学部附属病院 教授

研究要旨

低リスク群MDSの治療方法は様々あり、治療方法の選択や予後について現状把握のために、アンケートによる全国調査実施を計画する。

A. 研究目的

2012年にMDSの予後予測指標として、改訂国際予後予測指標(IPSS-R)が提唱された。IPSS-Rでは、それ以前に使用されたIPSSに更に染色体異常を細分化した指標を加えた指標で治療選択に重要な指標として用いられ始めているが、現在もIPSSに基づく治療選択も行われている。MDSの低リスク群はサイトカイン製剤、メチル化阻害剤、輸血、鉄キレート療法、5q-症候群に対するレナリドミドなど様々な治療選択がある群である。本研究では低リスク群とIPSS-R中間型リスク群のMDSにおいて、臨床像・現在・予後の治療選択の実情を把握することによって、より適正化された治療選択を目指すことを目的とする。

B. 研究方法

低リスク群MDSの治療方法の選択や予後について現状把握のために、アンケートによる全国調査実施を計画する。後方視的に各MDS症例に対し、IPSS、IPSS-Rによるリスク分類を行ない、輸血依存の有無、血清LDH、血清フェリチン値、PNH型血球の有無や治療選択、予後（全生存、AMLへの進展率）との関係を調べる。

（倫理面への配慮）

介入を伴わない疫学的な研究に該当する。現在全国調査については倫理委員会申請準備である。予備調査として施行した単施設における後方視解析については東大病院倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

本年度は単施設における予備調査として、2012年1月～2017年3月までに骨髄異形成症候群と診断された79症例に対して、治療選択・全生存率、AMLへの進展率を解析した。IPSS-Rにおけるvery low/ low群では、約半数が輸血も含めて未治療であった。治療選択は輸血・赤血球造血刺激因子製剤・免疫抑制剤やその併用等が行われた。予備調査結果に基づき、全国アンケート調査に向け、項目を作成し内容の検討を実施した。

D. 考察

予備調査では少数例の解析であり、低リスク

MDSにおける最適化された治療選択を行う為、多施設の現状を把握することが望ましい。

E. 結論

上記結果に基づいて全国調査を行う準備を開始しており調査票・項目について検討した。多施設の疫学調査に向けて準備中である。

F. 健康危険情報

該当しない。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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」

分担研究報告書

課題名：特発性造血障害に対する造血幹細胞移植

研究分担者：神田 善伸（自治医科大学内科学講座血液学部門・総合医学第1講座・教授）

岡本 真一郎（慶應義塾大学医学部血液内科学・教授）

研究要旨

再生不良性貧血、骨髄異形成症候群などの特発性造血障害に対する造血幹細胞移植の至適化を目指し、骨髄異形成症候群については移植決断時点からの前方視的コホート研究を、再生不良性貧血については造血幹細胞移植と免疫抑制療法を比較する臨床決断分析を実施する。前者については平成29年度に症例登録を完了し、今後、観察期間に移行する。後者については免疫抑制療法群のデータベースの確立が今後の課題である。

A．研究目的

再生不良性貧血、骨髄異形成症候群などの特発性造血障害に対する造血幹細胞移植の実態調査を行い、患者の社会復帰を目指した質の向上とリソース利用の最適化を追究する。また、疫学的解析から移植療法の適応と時期についての検討を行う。造血幹細胞移植のリソース利用の最適化のために、適応や実態について、関係学会とも連携して検討する。

B．研究方法

骨髄異形成症候群に対して移植を決断した時点から移植後観察期間までの前方視的コホート研究を実施する。移植決断時点で登録することによって、これまでの移植症例を対象とした後方視的研究の欠点を補うことができる。また、再生不良性貧血の初期治療としての造血幹細胞移植と免疫抑制療法を比較する臨床決断分析を実施する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。十分な情報が得られた時点で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

実施する。

（倫理面への配慮）

全ての研究は倫理委員会での審査、承認を受けて実施する。前方視的コホート研究については被験者から文書での同意を得た上で研究に登録する。

C．研究結果

骨髄異形成症候群に対して移植を決断した時点からの前方視的コホート研究(関東造血幹細胞移植共同研究グループにおける多施設共同研究)を継続実施した。平成30年1月末時点で目標の100症例に到達し、予定通りに登録を終了した。

再生不良性貧血については免疫抑制療法群の既存のデータが存在しないため、データベースの確立の方策を検討している。

D．考察

平成30年度は上記研究に登録された症例の観察を継続するとともに、観察期間が終了した症例についてはデータの回収を行い、平成31年度には全登録症例のデータを固定し、解析を開始する。

再生不良性貧血については臨床決断分析を実施するための十分なデータがそろっていないため、今後のデータベースの構築が重要である。また、前班において、ウマ ATG はウサギ ATG よりも優れている可能性が高いことをメタアナリシスによって示したが、現状において日本国内ではウマ ATG を使用することができない。ウマ ATG 製剤である ATGAM は 1990 年代に国内治験が完了しているため、当該薬について「医療上の必要性の高い未承認薬・適応外薬検討会議」に提出した。

E . 結論

国際的にもこれらの疾患に対する造血幹細胞移植の適応や至適な実施時期についての研究は少なく、本研究の成果は本調査研究班の「診療の参照ガイド」や日本造血細胞移植学会のガイドラインを通して全国の診療施設で利用可能とすることによって、広く社会に還元されることが期待できる。

F . 研究発表

1. 論文発表

Hayakawa J, Kanda J, Akahoshi Y, Harada N, Kameda K, Ugai T, Wada H, Ishihara Y, Kawamura K, Sakamoto K, Ashizawa M, Sato M, Terasako-Saito K, Kimura SI, Kikuchi M, Yamazaki R, Kako S, Kanda Y. Meta-analysis of treatment with rabbit and horse antithymocyte globulin for aplastic anemia. *Int J Hematol* 105:578-586, 2017

Kako S, Kanda Y, Kato J, Yamamoto W, Kato S, Onizuka M, Yokota A, Tatara R, Yokoyama H, Hagihara M, Usuki K, Gotoh M, Watanabe R, Kawai N, Saitoh T, Kanamori H, Takahashi S, Okamoto S. The bridge treatment selected at the decision for transplantation did not affect the outcomes in patients with MDS. *Hematol Oncol* 35,341-349,2017

Kuwatsuka Y, Kanda J, Yamazaki H, Mori T, Miyamura K, Kako S, Uchida N, Ohashi K, Ozawa Y, Takahashi Y, Kato C, Iwato K, Ishiyama K, Kobayashi H, Eto T, Kahata K, Kato J, Miyamoto T, Kato K, Mori S, Atsuta Y, Kimura F, Kanda Y; Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. A Comparison of Outcomes for Cord Blood Transplantation and Unrelat

ted Bone Marrow Transplantation in Adult Aplastic Anemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 22:1836-1843, 2016

2. 学会発表 該当無し

G . 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得 該当なし

2. 実用新案登録 該当なし

3. 該当なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業）
分担研究報告書

特発性造血障害に関する調査研究
小児科領域

研究分担者 真部 淳 聖路加国際大学 聖路加国際病院 医長

研究要旨：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1500例のうち、遺伝子検査、染色体断裂試験、テロメア長測定、臨床所見などから再生不良性貧血・RCC・先天性骨髄不全と診断されたのは823例（55%）、進行期MDSまたはAMLと診断されたものは132例（9%）、JMMLが大部分を占める骨髄増殖性疾患は160例（11%）、その他の貧血は119例（8%）、血小板減少は82例（5%）、好中球減少は44例（3%）、その他が140例（9%）であった。いまだに診断困難な症例も数多く存在することから、今後、網羅的な診断システムを確立し、予後追跡を行って検証する必要があると思われる。

本研究ではさらに、病因・診断・治療・予後等に関する調査研究を推進し、その結果を各疾患の診断基準・重症度分類に反映させ、2017年4月に診療ガイドとして公表した。本年度は新たな知見を加えて内容を更新した。診療ガイドが全国の医療機関で使用されることにより、わ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。

最後に、先天性骨髄不全は、小児期のみならず成人してから発症する例も多いことがわかってきた。またGATA2の生殖細胞系列変異を有するMDSもまた、思春期から若年成人（いわゆるAYA世代）に多くみられる。今後、本研究班の成人領域の研究者との共同研究が推進される予定である。

A. 研究目的

小児の骨髄不全および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、1700例を超える小児例が把握された。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。

B. 研究方法

小児血液・がん学会が2009年から行ってきた小児MDS・再生不良性貧血の中央診断に登録された1500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。

（倫理面への配慮）

- ① ヘルシンキ宣言に則り、患者の利益を最優先に考えて実施する。
- ② 調査フィールドとなる各施設における倫理委員会で承認を得て実施する。

- ③ 患者および家族に対して面談・介入開始時に統一した説明文を用いて文書による同意を得る。同意説明文では、調査を行う目的、介入・面談の内容、協力者に起こりうる利益・不利益について、未成年者の場合には年齢に応じた説明をする。
- ④ 協力によって得られたデータは、個人情報保護を厳重に行い、研究目的以外には利用しないことを文書による同意を得て実施する。

C. 研究結果

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1712例のうち、遺伝子検査、染色体断裂試験、テロメア長測定、臨床所見などから再生不良性貧血・RCC・先天性骨髄不全と診断されたのは939例（55%）、進行期MDSまたはAMLと診断されたものは152例（9%）、JMMLが大部分を占める骨髄増殖性疾患は176例（10%）、その他の貧血は149例（8%）、血小板減少は96例（6%）、好中球減少は49例（3%）、その他が151例（9%）であった。

成人領域との共同研究の提案としては、先天性骨髄不全からはCDA（Congenital dyserythropoietic anemia）を、MDSとしてはGATA2の生殖細胞系列変異

を有する症例を取り上げた。無効造血と骨髄形態異常からCDA IIと診断した6症例のうち2例(33%)で先天性溶血性貧血の原因遺伝子が同定された。先天性溶血性貧血で形態学的にCDAと鑑別困難な症例が存在するため、CDAが疑われる症例では、全エクソーム解析またはターゲットシーケンスによる網羅的な遺伝子解析を行うことが望ましい。一方、非家族性小児MDSの約10%に生殖細胞系列のGATA2異常を認め、とくにAYA世代に多いことが知られている。

D. 考察

2009年に開始された小児の造血不全およびMDSの中央診断は着実に症例数の蓄積が進んでおり、遺伝子検査、染色体断裂試験、テロメア長測定、臨床所見と合わせ、特徴が明らかになってきた。

本研究ではさらに、病因・診断・治療・予後等に関する調査研究を推進し、その結果を各疾患の診断基準・重症度分類に反映させ、2017年4月に診療ガイドとして公表した。診療ガイドが全国の医療機関で使用されることにより、わ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。

先天性骨髄不全は、小児期のみならず成人してから発症する例も多いことがわかってきた。またGATA2の生殖細胞系列変異を有するMDSもまた、思春期から若年成人（いわゆるAYA世代）に多くみられる。本研究班に参加している小児領域と成人領域の専門家との議論を密にし、今後、診断、治療についての同意を得るべく、共同研究が行われる予定である。

E. 結論

小児の骨髄不全およびMDSは、頻度は低く、診断は難しく、また予後不良な疾患群である。全国の患者を対象とした病理中央診断ならびに遺伝子検査を含む詳細な解析により、多くの患者で的確な診断が行われるようになってきた。その結果を各疾患の診断基準・重症度分類に反映させ、2017年4月に診療ガイドとして公表しており、わ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。

先天性骨髄不全は、小児期のみならず成人してから発症する例も多いことがわかってきた。またGATA2の生殖細胞系列変異を有するMDSもまた、思春期から若年成人（いわゆるAYA世代）に多くみられる。今後、本研究班の成人領域の研究者との共同研究が推進される予定である。

F. 健康危険情報

該当せず

研究協力者

小島勢二、高橋義行、濱 麻人、村松秀城（名古屋大学小児科）、長谷川大輔、平林真介（聖路加国際病院小児科）、矢部普正（東海大学小児科）、小原明（東邦大学小児科）、渡辺健一郎（静岡こども病院）、伊藤悦朗（弘前大学小児科）

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Sanada M, Takahashi Y, Kanno H, Yamaguchi H, Ohga S, Manabe A, Harigae H, Kunishima S, Ishii E, Kobayashi M, Koike K, Watanabe K, Ito E, Takata M, Yabe M, Ogawa S, Miyano S, Kojima S: Clinical utility of next-generation sequencing for bone marrow failure syndrome. *Genet Med* 19:796-802, 2017
- 2 Kanamitsu K, Shimada A, Nishiuchi R, Shigemura T, Nakazawa Y, Koike K, Kodama Y, Shinkoda Y, Kawano Y, Yasui K, Sasaki K, Kajiwara R, Tsukahara H, Manabe A: Pediatric intestinal Behcet disease complicated by myeloid malignancies. *Int J Hematol* 105:377-382, 2017
- 3 Hirabayashi S, Seki M, Hasegawa D, Kato M, Hyakuna N, Shuo T, Kimura S, Yoshida K, Kataoka K, Fujii Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Kiyokawa N, Miyano S, Ogawa S, Takita J, Manabe A: Constitutional abnormalities of IDH1 combined with secondary mutations predispose a patient with Maffucci syndrome to acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*, in press
- 4 Kobayashi T, Nannya Y, Ichikawa M, Oritani K, Kanakura Y, Tomita A, Kiyoi H, Kobune M, Kato J, Kawabata H, Shindo M, Torimoto Y, Yonemura Y, Hanaoka D, Nakamura H, Hasegawa D, Manabe A, Fujishima N, Fujii N, Tanimoto M, Morita Y, Matsuda A, Fujieda A, Katayama N, Ohashi H, Nagai H, Terada Y, Hino M, Sato K, Obara N, Chiba S, Usuki K, Ohta M, Imataki O, Uemura M, Takaku T, Komatsu N, Kitanaka A, Shimoda K, Watanabe K, Tohyama K, Takaori-Kondo A, Harigae H, Arai S, Miyazaki Y, Ozawa K, Kurokawa M: A nationwide survey of hypoplastic myelodysplastic syndrome (a multicenter retrospective study). *Am J Hematol*, in press
- 5 Ishiguro A, Ezinne CC, Michihata N, Nakadate H, Manabe A, Taki M, Shima M: Pediatric

Thromboembolism: A National Survey in Japan.
Int J Hematol 105:52-58, 2017

3. その他
該当なし

- 6 Hasegawa D, Manabe A: Myelodysplastic syndrome and JMML. In: Ishii E, editor. Hematological disorders in children - Pathogenesis and treatment, p87-108, 2017, Springer (Berlin)
- 7 平林真介、真部淳。家族性造血器腫瘍。臨床血液 58:1878-1883, 2017

2. 学会発表

- 1 Hasegawa D, Hirabayashi S, Nishimura A, Aiga S, Yamamoto S, Hosoya Y, Fujiwara T, Harigae H, Manabe A: Clonal evolution with monosomy 7 in Pearson syndrome. International Meeting on childhood MDS and SAA. Rome, Italy, September 28-30, 2017
- 2 Hama A, Manabe A, Hasegawa D, Nozawa K, Suzuki K, Narita A, Muramatsu H, Takahashi Y, Watanabe K, Ohara A, Ito M, Kojima S: Bone marrow transplantation for children with acquired bone marrow failure. International Meeting on childhood MDS and SAA. Rome, Italy, September 28-30, 2017
- 3 Narita A, Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Wang X, Kojima D, Xu Y, Kawashima N, Nishio N, Hama A, Takahashi Y, Hasegawa D, Manabe A, Sakaguchi H, Yoshida N, Kato K, Miyano S, Ito M, Ogawa S, Kojima S: Genetic background of idiopathic bone marrow failure syndromes in children. International Meeting on childhood MDS and SAA. Rome, Italy, September 28-30, 2017
- 4 Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Sanada M, Takahashi Y, Kanno H, Yamaguchi H, Ohga S, Manabe A, Harigae H, Kunishima S, Ishii E, Kobayashi M, Koike K, Watanabe K, Ito E, Takata M, Yabe M, Ogawa S, Miyano S, Kojima S: Clinical sequencing of 375 patients with inherited and acquired bone marrow failure syndromes. International Meeting on childhood MDS and SAA. Rome, Italy, September 28-30, 2017

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし

厚生労働省科学研究費補助金（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」
分担研究報告書

重症再生不良性貧血の記述疫学—臨床調査個人票の解析—

研究分担者 太田 晶子（埼玉医科大学医学部社会医学・准教授）
研究協力者 島田 直樹（国際医療福祉大学基礎医学研究センター・教授）

研究要旨

臨床調査個人票データベースを用いて、2013 年度受給者の再生不良性貧血の重症度分布、重症度別の治療実態を明らかにした。新規における stage3～stage5（やや重症、重症、最重症）の割合は 65% で、更新のそれは 18.6%であった。新規の約 15%、更新の約 60%が軽症の stage1 で、stage1 の更新受給者のうち 17.7%が無治療で経過観察の状況でフォローされていた。本研究結果は、再生不良性貧血の最新の実態を把握するとともに、2015 年 1 月難病法施行による医療費助成認定における重症度基準の導入や登録システムの変更などの制度変更が、今後の受給者データ、そこから得られる疫学特性にどのような影響を及ぼすのか、データの利用可能性、有用性の評価・検討に資すると考える。

A. 研究目的

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きた。2015 年 1 月からは、難病法施行による難病対策の制度変更により、難病法に基づく指定難病として医療費助成対象となっている。この制度変更により、指定難病の医療費助成認定に重症度基準が導入され、再生不良性貧血の医療費助成対象は重症度分類 stage1～stage5 から stage2～stage5 と変更になり、stage1 の軽症者は助成対象外となった。

これまでの特定疾患治療研究事業は、患者の医療費の自己負担分を公費で補助し、受療を促進することで多くの患者情報を得て病因解明や治療法開発などの調査研究を推進しようとするものである。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。個人票の内容は、厚生労働省の難病患者認定適正化事業において、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り、個人票データの有効活用が進められてきた。2015 年 1 月難病法施行の制度変更に伴い、国は臨床調査個人票登録システムを現在改変しており、新たな

データベースの利用は 2018 年度以降可能となるといわれている。

本研究は、現在利用可能な 2014 年までの（従来の）臨床調査個人票データベースを用いて、再生不良性貧血の重症度分布、重症度別の治療実態の分析を行い最新の実態を明らかにし、2015 年 1 月以降の重症度基準の導入や登録システムの変更などの制度変更が、今後の受給者データ、その疫学特性にどのような影響を及ぼすのか、データの利用可能性の評価・検討のための基礎資料に資することを目的とする。

B. 研究方法

資料として、2017 年 7 月現在電子入力済みの、2003～2014 年度の再生不良性貧血臨床調査個人票を用いた。個人票は厚生労働省に文書で利用申請し、使用許可を得た。

個人票は必ずしもすべてが電子入力されているのではなく、そのデータ入力率を確認することが必要である。そのための分母、受給者の全数を厚生労働統計である衛生行政報告例 1)、2)から得た。入力率は、電子入力された個人票件数/公表された受給者数として求めた。各年度のデータ入力率を確認した上で、入力率が比較的高い最新年度の 2013 年度データを対象として、重症度分布、重症度別治療状況を新規・更新別に観察した。

（倫理面への配慮）本研究は、特定疾患治療研究事業に

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

C. 研究結果

再生不良性貧血個人票の入力件数、入力率（2017年7月現在）を表1に示した。入力が十分でない2014年度を除き、2003年度～2013年度の入力件数は、約4,500～8,400であり、各年度の入力率は約50%～88%であった。表には示さないが、入力率が100%でないのは、都道府県により入力率が異なるためである。

本研究では、入力率が比較的高い最近年次の2013年度データを解析対象とした。入力件数5,462のうち、重症度不明の79例を除いた5,383例（新規681、更新4,702）を解析対象とした。

再生不良性貧血の重症度分布を性別、新規・更新別に図1に示した。新規におけるstage3～stage5（やや重症、重症、最重症）の割合は65%で、更新のそれは18.6%であった。軽症stage1の割合は、新規14.5%、更新61.4%であり、更新において軽症の割合が高かった。新規、更新ともに性別によって重症度の構成割合に大きな違いはなかった。

年齢別重症度分布を図2（全体）、図3（新規）、図4（更新）に示した。stage3～stage5の重症の割合は、新規では30歳未満で低年齢になるほど高く、また60歳以上高齢になるほど高かった。新規におけるstage1の占める割合は年齢によりやや異なっていたが、更新では大きな違いは認められなかった。

重症度別の治療状況を新規・更新別に表2、表3に示した。新規、更新ともにstage3～stage5の重症ではstage1～stage2の軽症・中等症に比べて無治療で経過観察が少なく、免疫抑制療法、造血細胞移植療法、その他の支持療法が多かった。stage1において、新規では無治療で経過観察が33.3%、更新では17.7%を占めていた。

D. 考察

再生不良性貧血の受給者の重症度分布、重症度別治療実態を明らかにした。新規におけるstage3～stage5（やや重症、重症、最重症）の割合は65%で、更新のそれは18.6%であった。新規の約15%、更新の約60%が軽症のstage1で、stage1の更新受給者のうち17.7%が無治療で経過観察の状況でフォローされていた。本研究結果は、再生不良性貧血の最新の実態を把握する

とともに、今後受給者データを活用するうえで考慮すべき事項となる制度変更の影響、つまり、医療費助成認定基準に重症度基準を導入し軽症者stage1を対象外とする変更が、受給者データから得られる疫学特性（受給者数、性・年齢、重症度分布、臨床所見など）にどのような影響をおよぼすかを検討するための基礎資料になると考える。今後、さらに詳細に重症度と臨床所見、治療等の関連を検討したい。

個人票データベースの有用性については、個人票は全国規模で経年的に疫学的知見が得られる有用な情報源と考える。個人票データベースの全体の入力率（約50～88%）は一部の県の入力率が著しく低いことの反映である。入力率は、データの代表性に関わることである。考え方として患者の特性が都道府県によって異なっているということでないなら、入力された患者についての所見が全体に当てはまる、患者全体と大きな違いはないだろうと期待できると考えられる。

入力率の問題のほかに、これまでの個人票データベースにはいくつかの問題点があった。診断の妥当性、記載内容の正確性、個人票記載項目の有用性、受給非継続者の受給中止理由が未把握である問題などである。特に、受給非継続者の受給中止理由を把握することは、患者をフォローアップして観察していく上で重要な課題と考える。これまでの個人票データベースは、このような課題を含んでいるが、難病の疫学特性を全国規模で経年的に把握できる貴重な情報源であり、現状ではこのようなデータベースの特性を考慮した上で有効活用を行ってきた。今後、2018年度以降利用可能となる予定の新たな難病登録システムによるデータの現状を確認するとともに、制度変更が受給者データにどのような影響を及ぼすのかを評価・検討したうえで、新たなデータベースでの疫学像の把握を試みたい。

E. 結論

再生不良性貧血の受給者の重症度分布、重症度別治療実態を明らかにした。本研究結果は、再生不良性貧血の最新の実態を把握するとともに、2015年1月難病法施行による医療費助成認定における重症度基準の導入や登録システムの変更などの制度変更が、今後の受給者データ、そこから得られる疫学特性にどのような影響を及ぼすのか、データの利用可能性、有用性の評価・検討に資すると考える。

文献

- 厚生労働省大臣官房統計情報部編：保健・衛生行政業務報告(衛生行政報告例) (平成17～平成20年度).
- 厚生労働省大臣官房統計情報部編：衛生行政報告例(平成21～平成28年度).

F. 研究発表

- 論文発表
なし
- 学会発表

1) Ohta A, Nagai M, Nishina M, Kamei M, Shimada N, Nakao S, Arai S, kurakaw M. Incidence of aplastic anemia in Japan. The 21st international Epidemiological Association(IEA) World Congress of Epidemiology 2017(August), Saitama.

2) 仁科基子、太田晶子、永井正規、亀井美登里. 再生不良性貧血の重症度分布 臨床調査個人票の解析. 第76回日本公衆衛生学会総会、2017.11. 鹿児島.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

- 特許取得
該当なし
- 実用新案登録
該当なし
- その他
該当なし

表1 臨床調査個人票入力率、再生不良性貧血 (2017年7月現在)

年度	入力件数 ①	特定疾患医療受給者数 ②	入力率 ①/②	登録者数 ③	②*③
2003	6,956	9,680	0.719		9,680
2004	6,162	9,173	0.672	1,336	10,509
2005	5,835	8,997	0.649	1,825	10,822
2006	5,081	9,010	0.564	2,149	11,159
2007	4,558	9,162	0.497	2,515	11,677
2008	6,565	9,301	0.706	2,714	12,015
2009	8,363	9,479	0.882	2,914	12,393
2010*	7,211	9,417	0.766	2,952	12,369
2011	8,146	10,148	0.803	3,200	13,348
2012	7,661	10,287	0.745	3,217	13,504
2013	5,462	10,428	0.524	3,581	14,009
2014	1,181	11,152	0.106	3,568	14,720

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

図1 再生不良性貧血の重症度分布、新規・更新別、性別

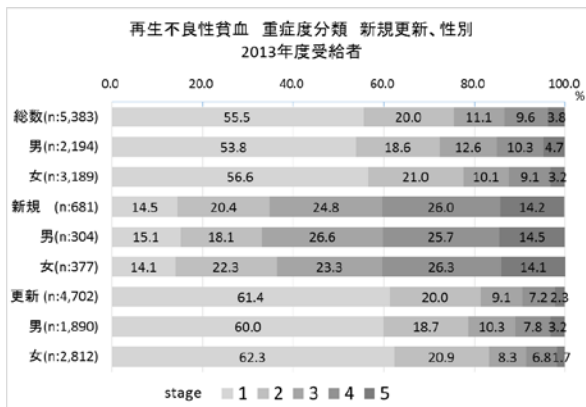


図2 再生不良性貧血の重症度分布、年齢別、全体

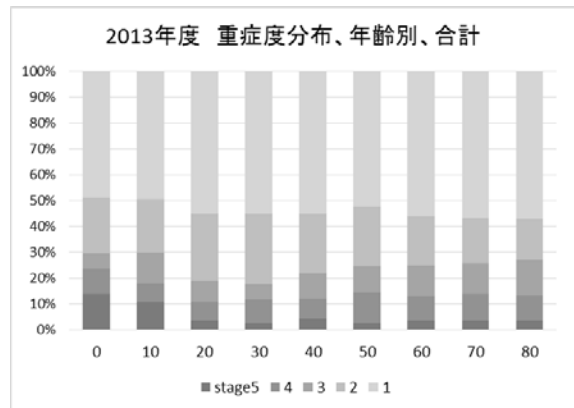


図3 再生不良性貧血の重症度分布、年齢別、新規

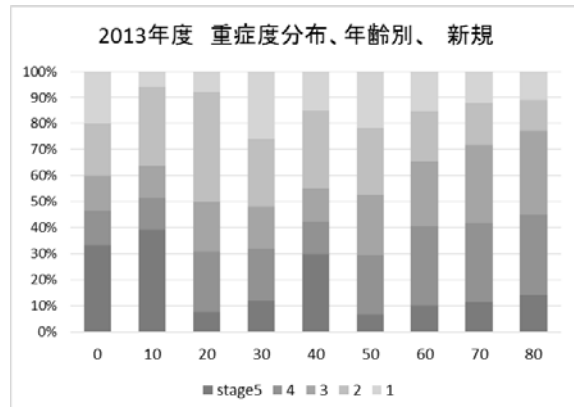


図4 再生不良性貧血の重症度分布、年齢別、更新

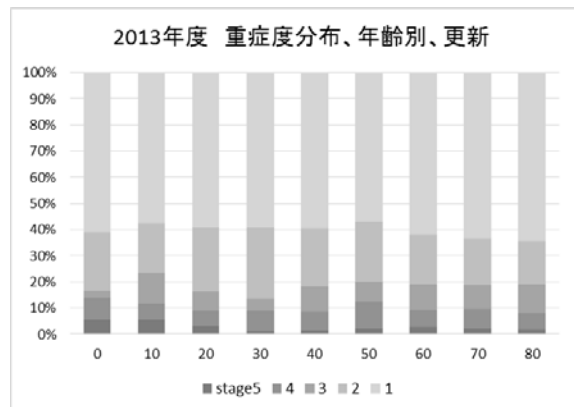


表2 再生不良性貧血の治療状況、重症度別、新規

	Stage										合計	
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5		
1無治療で経過観察	33	33.3	34	24.5	11	6.5	7	4.0	3	3.1	88	12.9
2アンドロゲン療法	23	23.2	30	21.6	41	24.3	33	18.6	12	12.4	139	20.4
3免疫抑制療法	40	40.4	74	53.2	111	65.7	124	70.1	71	73.2	420	61.7
4造血細胞移植療法	1	1.0	3	2.2	2	1.2	4	2.3	13	13.4	23	3.38
5その他	20	20.2	25	18.0	84	49.7	108	61.0	51	52.6	288	42.3

表3 再生不良性貧血の治療状況、重症度別、更新

	Stage										合計	
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5		
1無治療で経過観察	2887	100	940	100	428	100	338	100	109	100	4702	100
2アンドロゲン療法	512	17.7	147	15.6	14	3.3	12	3.6	5	4.6	690	14.7
3免疫抑制療法	767	26.6	293	31.2	143	33.4	102	30.2	30	27.5	1335	28.4
4造血細胞移植療法	1615	55.9	539	57.3	277	64.7	208	61.5	72	66.1	2711	57.7
5その他	168	5.8	17	1.8	15	3.5	20	5.9	18	16.5	238	5.1
	399	13.8	199	21.2	234	54.7	198	58.6	55	50.5	1085	23.1

III. 研究成果の刊行に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
廣川 誠	赤芽球癆	小澤敬也、 中尾眞二、 松村 到	血液疾患最新の 治療 2017-2019	南江堂	東京	2017	109-112
廣川 誠	赤芽球癆	猿田享男、 北村惣一郎	1336 専門家によ る私の治療 2017-18 年度版	日本医事新 報社	東京	2017	693-694
廣川 誠	赤芽球癆	桐戸敬太	貧血症 診断と治 療の ABC 125	最新医学社	大阪	2017	99-106
松田 晃、 張替秀郎、 通山薫	骨髄異形成症候群	通山 薫、 張替秀郎	血液細胞アトラス 第6版	文光堂	東京	2018	271-282

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ueda Y, Obara N, Yonemura Y, Noji H, Masuko M, Seki Y, Wada K, Matsuda T, Akiyama H, Ikezoe T, Chiba S, Kanda Y, Kawaguchi T, Shichishima T, Nakakuma H, Okamoto S, Nishimura JI, Kanakura Y, Ninomiya H.	Effects of eculizumab treatment on quality of life in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in Japan.	Int J Hematol	(in press)		2018
Ishibashi T, Yokota T, Sato Y, Ichii M, Sudo T, Doi Y, Ueda T, Nagate Y, Hamanaka Y, Tanimura A, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y.	Identification of MS4A3 as a reliable marker for early myeloid differentiation in human hematopoiesis.	Biochem Biophys Res Commun	495	2338-2343	2018
Ichii M, Oritani K, Murase M, Komatsu K, Yamazaki M, Kyoden R, Kito N, Nozaki Y, Saito M, Iwamura H, Kanakura Y.	Molecular targeting of inosine-5'-monophospha te dehydrogenase by FF-10501 promotes erythropoiesis via ROS/MAPK pathway.	Leuk Lymphoma	59	448-459	2018

Maruyama K, Aotsuka N, Kumano Y, Sato N, Kawashima N, Onda Y, Maruyama H, Katagiri T, Zaimoku Y, Nakagawa N, Hosomichi K, Ogawa S, Nakao S.	Immune-Mediated Hematopoietic Failure after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Common Cause of Late Graft Failure in Patients with Complete Donor Chimerism	Biol Blood Marrow Transplant	24	43-49	2018
Espinoza JL, Elbadry MI, Chonabayashi K, Yoshida Y, Katagiri T, Harada K, Nakagawa N, Zaimoku Y, Imi T, Hassanein HA, Khalifa ANA, Takenaka K, Akashi K, Hamana H, Kishi H, Akatsuka Y, Nakao S.	Hematopoiesis by iPSC-derived hematopoietic stem cells of aplastic anemia that escape cytotoxic T-cell attack	Blood Adv	2	390-400	2018
Zaimoku Y, Takamatsu H, Hosomichi K, Ozawa T, Nakagawa N, Imi T, Maruyama H, Katagiri T, Kishi H, Tajima A, Muraguchi A, Kashiwase K, Nakao S.	Identification of an HLA class I allele closely involved in the autoantigen presentation in acquired aplastic anemia	Blood	129	2908-2916	2017
Minami M, Arita T, Iwasaki H, Muta T, Aoki T, Aoki K, Yamasaki S, Matsushima T, Kato K, Takenaka K, Tanimoto K, Kamimura T, Ogawa R, Akashi K, Miyamoto T.	Comparative analysis of pulmonary hypertension in patients treated with imatinib, nilotinib and dasatinib.	Br J Haematol	177	578-587	2017
Miyawaki K, Iwasaki H, Jiromaru T, Kusumoto H, Yurino A, Sugio T, Uehara Y, Odawara J, Daitoku S, Kunisaki Y, Mori Y, Arinobu Y, Tsuzuki H, Kikushige Y, Iino T, Kato K, Takenaka K, Miyamoto T, Maeda T, Akashi K.	Identification of unipotent megakaryocyte progenitors in human hematopoiesis.	Blood	129	3332-3342	2017

Yuda J, Miyamoto T, Odawara J, Ohkawa Y, Semba Y, Hayashi M, Miyamura K, Tanimoto M, Yamamoto K, Taniwaki M, Akashi K.	Persistent detection of alternatively spliced BCR-ABL variant results in a failure to achieve deep molecular response.	Cancer Sci	108	2204-2212	2017
Kikushige Y, Miyamoto T, Akashi K.	Progress in the leukemic stem cell study and a novel therapeutic approach targeting leukemic stem cells.	Rinsho Ketsueki	58	1838-1843	2017
Kirito K, Okamoto S, Ohishi K, Tauchi T, Handa H, Saito S, Takenaka K, Shimoda K, Oritani K, Akashi K, Okada H, Amagasaki T, Suzuki K, Yonezu T, Komatsu N.	Evaluation of the dose and efficacy of ruxolitinib in Japanese patients with myelofibrosis.	Int J Hematol	107	92-97	2018
Mizuno S, Iino T, Ozawa H, Arinobu Y, Chong Y, Akashi K.	Notch1 expression is regulated at the post-transcriptional level by the 3' untranslated region in hematopoietic stem cell development.	Int J Hematol	107	311-319	2018
Kawabata H, Tohyama K, Matsuda A, Araseki K, Hata T, Suzuki T, Kayano H, Shimbo K, Zaike Y, Usuki K, Chiba S, Ishikawa T, Arima N, Nogawa M, Ohta A, Miyazaki Y, Mitani K, Ozawa K, Arai S, Kurokawa M, Takaori-Kondo A.	Validation of the revised International Prognostic Scoring System in patients with myelodysplastic syndrome in Japan: results from a prospective multicenter registry.	Int J Hematol	106	375-384	2017
Horai M, Satoh S, Matsuo M, Iwanaga M, Horio K, Jo T, Takasaki Y, Kawaguchi Y, Tsushima H, Yoshida S, Taguchi M, Itonaga H, Sawayama Y, Taguchi J, Imaizumi Y, Hata T, Moriuchi Y, Haase D, Yoshiura KI, Miyazaki Y.	Chromosomal analysis of myelodysplastic syndromes among atomic bomb survivors in Nagasaki.	Br J Haematol	180	381-390	2018


<p>Kuwatsuka Y, Kanda J, Yamazaki H, Mori T, Miyamura K, Kako S, Uchida N, Ohashi K, Ozawa Y, Takahashi Y, Kato C, Iwato K, Ishiyama K, Kobayashi H, Eto T, Kahata K, Kato J, Miyamoto T, Kato K, Mori S, Atsuta Y, Kimura F, Kanda Y. ; Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation.</p>	<p>A Comparison of Outcomes for Cord Blood Transplantation and Unrelated Bone Marrow Transplantation in Adult Aplastic Anemia.</p>	<p>Biol Blood Marrow Transplant</p>	<p>22</p>	<p>1836-1843</p>	<p>2016</p>
<p>Sugino N, Kawahara M, Tatsumi G, Kanai A, Matsui H, Yamamoto R, Nagai Y, Fujii S, Shimazu Y, Hishizawa M, Inaba T, Andoh A, Suzuki T, Takaori-Kondo A.</p>	<p>A novel LSD1 inhibitor NCD38 ameliorates MDS-related leukemia with complex karyotype by attenuating leukemia programs via activating super-enhancers.</p>	<p>Leukemia</p>	<p>31</p>	<p>2303-2314</p>	<p>2017</p>
<p>Kobayashi T, Nannya Y, Ichikawa M, Oritani K, Kanakura Y, Tomita A, Kiyoi H, Kobune M, Kato J, Kawabata H, Shindo M, Torimoto Y, Yonemura Y, Hanaoka N, Nakakuma H, Hasegawa D, Manabe A, Fujishima N, Fujii N, Tanimoto M, Morita Y, Matsuda A, Fujieda A, Katayama N, Ohashi H, Nagai H, Terada Y, Hino M, Sato K, Obara N, Chiba S, Usuki K, Ohta M, Imataki O, Uemura M, Takaku T, Komatsu N, Kitanaka A, Shimoda K, Watanabe K, Tohyama K, Takaori-Kondo A, Harigae H, Arai S, Miyazaki Y, Ozawa K, Kurokawa M; for National Research Group on Idiopathic Bone Marrow Failure Syndromes.</p>	<p>A nationwide survey of hypoplastic myelodysplastic syndrome (a multicenter retrospective study).</p>	<p>Am J Hematol</p>	<p>92</p>	<p>1324-1332</p>	<p>2017</p>

Li L, Sheng Y, Li W, Hu C, Mittal N, Tohyama K, Seba A, Zhao Y, Ozer H, Zhu T, Qian Z.	β -Catenin is a candidate therapeutic target for myeloid neoplasms with del(5q).	Cancer Res	77	4116-4226	2017
Oben KZ, Alhakeem SS, McKenna MK, Brandon JA, Mani R, Noothi SK, Jinpeng L, Akunuru S, Dhar SK, Singh IP, Liang Y, Wang C, Abdel-Latif A, Stills Jr HF, St. Clair DK, Geiger H, Muthusamy N, Tohyama K, Gupta RC, Bondada S.	Oxidative stress-induced JNK/AP-1 signaling is a major pathway involved in selective apoptosis of myelodysplastic syndrome cells by withaferin-A.	Oncotarget	8	77436-77452	2017
松田晃	骨髓異形成症候群の形態診断	臨床血液	58	336-346	2017
Hayakawa J, Kanda J, Akahoshi Y, Harada N, Kameda K, Ugai T, Wada H, Ishihara Y, Kawamura K, Sakamoto K, Ashizawa M, Sato M, Terasako-Saito K, Kimura SI, Kikuchi M, Yamazaki R, Kako S, Kanda Y.	Meta-analysis of treatment with rabbit and horse antithymocyte globulin for aplastic anemia.	Int J Hematol	105	578-586	2017
Kako S, Kanda Y, Kato J, Yamamoto W, Kato S, Onizuka M, Yokota A, Tataru R, Yokoyama H, Hagihara M, Usuki K, Gotoh M, Watanabe R, Kawai N, Saitoh T, Kanamori H, Takahashi S, Okamoto S.	The bridge treatment selected at the decision for transplantation did not affect the outcomes in patients with MDS.	Hematol Oncol	35	341-349	2017
Kanamitsu K, Shimada A, Nishiuchi R, Shigemura T, Nakazawa Y, Koike K, Kodama Y, Shinkoda Y, Kawano Y, Yasui K, Sasaki K, Kajiwara R, Tsukahara H, Manabe A.	Pediatric intestinal Behcet disease complicated by myeloid malignancies.	Int J Hematol	105	377-382	2017

<p>Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Sanada M, Takahashi Y, Kanno H, Yamaguchi H, Ohga S, Manabe A, Harigae H, Kunishima S, Ishii E, Kobayashi M, Koike K, Watanabe K, Ito E, Takata M, Yabe M, Ogawa S, Miyano S, Kojima S.</p>	<p>Clinical utility of next-generation sequencing for bone marrow failure syndrome.</p>	<p>Genet Med</p>	<p>19</p>	<p>796-802</p>	<p>2017</p>
--	---	------------------	-----------	----------------	-------------

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Validation of the revised International Prognostic Scoring System in patients with myelodysplastic syndrome in Japan: results from a prospective multicenter registry

Hiroshi Kawabata^{1,2}  · Kaoru Tohyama³ · Akira Matsuda⁴ · Kayano Araseki⁵ · Tomoko Hata⁶ · Takahiro Suzuki^{7,8} · Hidekazu Kayano⁹ · Kei Shimbo¹⁰ · Yuji Zaike¹¹ · Kensuke Usuki¹² · Shigeru Chiba¹³ · Takayuki Ishikawa¹⁴ · Nobuyoshi Arima¹⁵ · Masaharu Nogawa¹⁶ · Akiko Ohta¹⁷ · Yasushi Miyazaki⁶ · Kinuko Mitani¹⁸ · Keiya Ozawa^{7,19} · Shunya Arai²⁰ · Mineo Kurokawa²⁰ · Akifumi Takaori-Kondo¹ · The Japanese National Research Group on Idiopathic Bone Marrow Failure Syndromes

Received: 28 February 2017 / Revised: 8 May 2017 / Accepted: 9 May 2017 / Published online: 11 May 2017
© The Japanese Society of Hematology 2017

Abstract The Japanese National Research Group on Idiopathic Bone Marrow Failure Syndromes has been conducting prospective registration, central review, and follow-up study for patients with aplastic anemia and myelodysplastic syndrome (MDS) since 2006. Using this database, we retrospectively analyzed the prognosis of patients with MDS. As of May 2016, 351 cases were registered in this database, 186 of which were eligible for the present study. Kaplan–Meier analysis showed that overall survival (OS) curves of the five risk categories stipulated by the revised international prognostic scoring system (IPSS-R) were reasonably

separated. 2-year OS rates for the very low-, low-, intermediate-, high-, and very high-risk categories were 95, 89, 79, 35, and 12%, respectively. In the same categories, incidence of leukemic transformation at 2 years was 0, 10, 8, 56, and 40%, respectively. Multivariate analysis revealed that male sex, low platelet counts, increased blast percentage (>2%), and high-risk karyotype abnormalities were independent risk factors for poor OS. Based on these data, we classified Japanese MDS patients who were classified as intermediate-risk in IPSS-R, into the lower risk MDS category, highlighting the need for careful assessment of treatments within low- and high-risk treatment protocols.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12185-017-2250-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Hiroshi Kawabata
hkawabat@kuhp.kyoto-u.ac.jp

- 1 Department of Hematology and Oncology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan
- 2 Department of Hematology and Immunology, Kanazawa Medical University, Uchinada, Ishikawa 920-0293, Japan
- 3 Department of Laboratory Medicine, Kawasaki Medical School, Okayama, Japan
- 4 Department of Hemato-Oncology, Saitama International Medical Center, Saitama Medical University, Hidaka, Saitama, Japan
- 5 Division of Hematology, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Saitama Medical University, Moroyama, Saitama, Japan
- 6 Atomic Bomb Disease and Hibakusha Medicine Unit, Department of Hematology, Atomic Bomb Disease Institute, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki, Japan
- 7 Division of Hematology, Jichi Medical University, Shimotsuke, Tochigi, Japan

- 8 Department of Hematology, Kitasato University School of Medicine, Sagami, Japan
- 9 School of Medical Technology and Health, Faculty of Health and Medical Care, Saitama Medical University, Hidaka, Saitama, Japan
- 10 Center for Clinical Laboratory, Dokkyo Medical University Hospital, Mibu, Japan
- 11 Clinical Laboratory, Research Hospital, The Institution of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan
- 12 Department of Hematology, NTT Medical Center Tokyo, Tokyo, Japan
- 13 Department of Hematology, Faculty of Medicine, University of Tsukuba, Ibaraki, Japan
- 14 Department of Hematology, Kobe City Medical Center General Hospital, Kobe, Japan
- 15 Department of Hematology, Medical Research Institute Kitano Hospital, Osaka, Japan
- 16 Department of Hematology, Japanese Red Cross Wakayama Medical Center, Wakayama, Japan

Keywords Myelodysplastic syndrome · International prognostic scoring system · Leukemic transformation

Introduction

Myelodysplastic syndrome (MDS) is a heterogeneous group of hematopoietic stem cell disorders, characterized by ineffective hematopoiesis and a high propensity to transform into acute myeloid leukemia (AML). The clinical course of MDS is highly variable; the disease may progress into AML quickly, or it may remain in a stable condition for years without any interventions. Disease risk stratification is important for selecting optimal treatments for individual patients. Various systems, including international prognostic scoring system (IPSS) [1, 2], World Health Organization prognostic scoring system [3], Global MD Anderson risk model score for MDS [4], and a gene-only model [5] have been developed for this purpose [6].

IPSS, which was proposed in 1997, remains the most commonly used among the systems. According to the IPSS, patients are categorized into 4 risk groups by calculating risk scores, which are determined by percentages of bone marrow (BM) blasts, karyotypes, and number of cytopenias. The low- and int-1-risk groups in the IPSS are generally regarded as the lower risk MDS, and the int-2- and high-risk groups are regarded as the higher risk MDS. The former groups are often indolent, and the latter groups are prone to progress to AML. If a patient is categorized into the higher risk MDS group, either hematopoietic stem cell transplantation (SCT), intensive chemotherapy, or treatment with hypomethylating agents is proposed depending on age and comorbidities [7]. Revised IPSS (IPSS-R) has recently been developed based on the multivariate analysis of overall survival (OS) and time to AML transformation data for more than 7000 patients with MDS registered worldwide [8]. This system underscores the contribution of chromosomal abnormalities to the prognosis of patients with MDS, and a refined cytogenetic scoring system including 5 risk categories was adapted [9]. In the IPSS-R, patients are stratified into five risk categories (very low, low, intermediate, high, and very high) with significantly different median OS (8.8, 5.3, 3, 1.6, and 0.8 years, respectively) established

based on five main features, including cytogenetics, BM blast percentage (≤ 2 , 2–5, 5–10, and $\geq 10\%$), and depth of cytopenias [Hb (≥ 10 , 8–10, and < 8 g/dL), platelet count (≥ 100 , 50–99, and < 50 K/ μ L), and absolute neutrophil count (≥ 0.8 and < 0.8 K/ μ L)]. The OS curves for the 5 categories have been shown to have clear separation in several recent studies [10–12]. The very low- and low-risk categories in IPSS-R are regarded as lower risk MDS, and the high- and very high-risk categories are higher risk MDS. Patients with the latter categories are candidates for intensive treatments including SCT. However, the optimal treatments for patients in the IPSS-R intermediate-risk category remain ambiguous [8]. In addition, given that IPSS-R was developed from the data for patients who did not receive disease-altering treatments, such as hypomethylating agents, intensive chemotherapy, and SCT, during their MDS phases, the actual prognosis of patients with MDS including those who received such treatments may be different. Furthermore, IPSS-R has not been verified in a large MDS cohort in Japan.

Since 2006, the Japanese National Research Group on Idiopathic Bone Marrow Failure Syndromes has been conducting the prospective registration, central review, and follow-up study for aplastic anemia and MDS. Using the database of this study cohort, we retrospectively analyzed the OS and leukemia-free survival (LFS) of patients with MDS according to IPSS- and IPSS-R-risk categories to verify these systems in the real-world practice in Japan. We also investigated the ratios of patients who received SCT in each risk category.

Methods

Patient database

We used the data from the Prospective Registration, Central Review, and Follow-up Study for Aplastic Anemia and MDS conducted by the Japanese National Research Group on Idiopathic Bone Marrow Failure Syndromes. This prospective registration system collected newly diagnosed cases with aplastic anemia and MDS using the definition of French–American–British (FAB) classification [13] as well as cases with cytopenias with unknown etiologies from 16 institutions in Japan (Supplementary Table S1). After registration, patients with BM blasts $< 5\%$ were subjected to central review for final diagnosis. At least two hematologists and one pathologist reviewed the peripheral blood and BM smear specimens, BM biopsy and/or clot sections, and chromosomal karyotype data for each case, and diagnosed separately. Morphological diagnoses were essentially based on the criteria of the International Working Group on Morphology of MDS [14, 15]. If the diagnosis was inconsistent,

¹⁷ Division of Public Health, Department of Social Medicine, Faculty of Medicine, Saitama Medical University, Moroyama, Saitama, Japan

¹⁸ Department of Hematology and Oncology, Dokkyo Medical University School of Medicine, Mibu, Japan

¹⁹ Institute of Medical Science, IMSUT Hospital, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

²⁰ Department of Hematology and Oncology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

the final diagnosis was determined by inspection and discussion in regular inspection meetings held twice a year. We did not take into account the patients' prior history of cytotoxic therapy in the diagnosis. Medical records of registered cases were collected every 6 months. This study was performed in accordance with the Helsinki Declaration. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Kyoto University Graduate School and Faculty of Medicine and by the ethics committee of each participating institution. Written informed consent was obtained from the participating patients. Cases registered between April 2006 and May 2016 were enrolled in this study.

Statistics

OS was defined as the time from the initial diagnosis to death. LFS was defined as the time until death or the date on which the patient was found with >20% blasts in either peripheral blood or BM. Patients who had been alive at the last follow-up were censored. The Kaplan–Meier method was used for the survival analysis, and comparison between groups was performed using the log-rank test. Cumulative incidences of leukemic transformation were compared using Gray's test [16]. Possible risk factors including age, gender, hemoglobin (Hb), neutrophil counts, platelet counts, BM blast percentage, and chromosomal abnormalities were also analyzed using the Cox proportional hazards model. A multivariate analysis was performed using a stepwise logistic regression model. p values <0.05 were considered to be statistically significant. All the analyses were conducted using EZR, version 1.30 [17].

Results

Patient characteristics

A total of 351 cases were registered to the registry by May 2016. Among these cases, 215 were diagnosed as having MDS as defined by FAB classification in the central review system (Supplementary Table S2). After excluding those who were not registered within 1 year after the institutional diagnosis and those whose follow-up periods were shorter than 4 weeks, 186 MDS cases remained to be analyzed for the study. One hundred and nineteen were male; the median age at diagnosis was 68 and the median follow-up time of survivors was 24 months. According to the WHO classification 2008 [18], this cohort included 30 refractory cytopenia with unilineage dysplasia; 78 refractory cytopenia with multilineage dysplasia; 2 refractory anemia with ring sideroblasts; 2 MDS with isolated deletion 5q; 14 MDS, unclassified; 21 refractory anemia with excess blast-1 (RAEB-1); 16 RAEB-2; 3 MDS with fibrosis; 12

myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (mostly chronic myelomonocytic leukemia); and 8 AML with BM blast <30% patients. The number of cases in the low-, int-1-, int-2-, and high-risk groups according to the IPSS were 37, 94, 44, and 11, respectively. According to the IPSS-R, the number of cases in the very low-, low-, intermediate-, high-, and very high-risk categories was 21, 69, 49, 23, and 24, respectively.

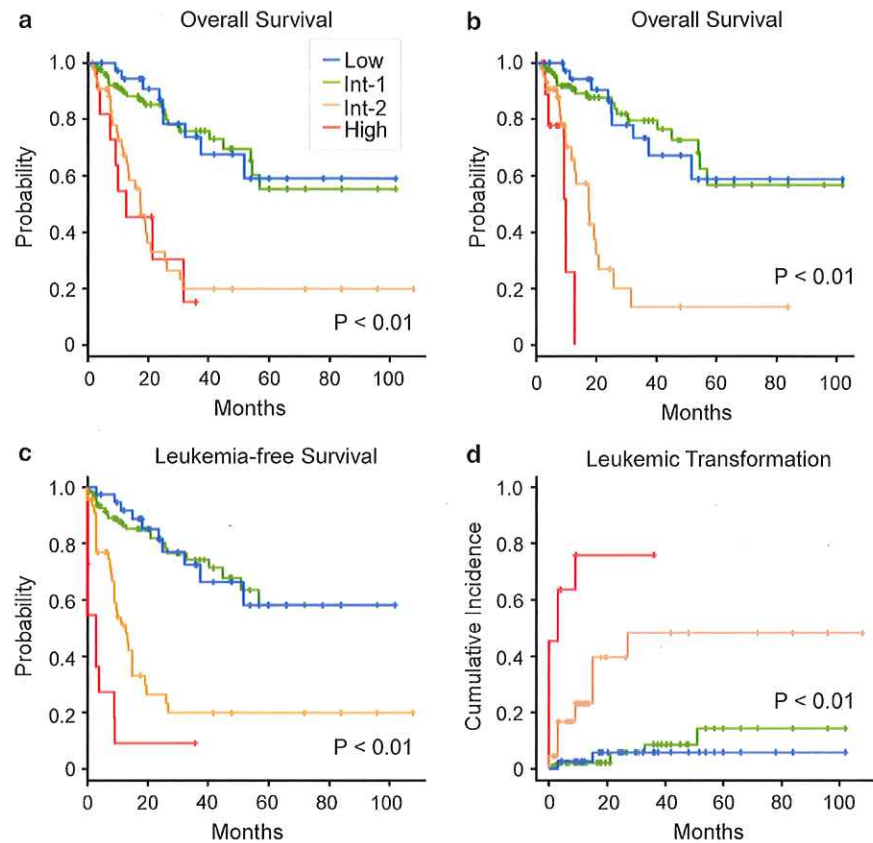
Prognostic significance of age and gender in patients with MDS

Patients were divided into 5 age groups (under 50 years, in their 50s, 60s, 70s, and 80 years or above), and their prognoses were analyzed using the Kaplan–Meier method. Younger age groups tended to show better OS ($p = 0.06$) and LFS ($p = 0.18$) as compared with the elderly groups, but not statistically significant (Supplementary Fig. S1, panels a, b). The cumulative incidences of leukemic transformation were not different between these groups (Supplementary Fig. S1c). When we divided the patients into young (under 60) and elderly (60 or over) groups, those in the former group showed significantly better OS compared with those in the latter group ($p = 0.03$, Supplementary Fig. S1d). However, the LFS and cumulative incidences of leukemic transformation were not different between these groups (Supplementary Fig. S1, panels e, f). Subsequently, we examined the effect of sex on the survival of patients with MDS. Kaplan–Meier analyses showed that the survival curves of OS and LFS were superior in the female patients over the male patients, but the differences were not statistically significant (Supplementary Fig. S2, panels a, b). No significant differences of cumulative incidences of leukemic transformation were observed between genders (Supplementary Fig. S2c).

OS, LFS, and the incidence of leukemic transformation in IPSS risk groups

In a Kaplan–Meier analysis, the OS curves of the low- and int-1-risk groups by the IPSS were almost completely overlapped, and those of the int-2- and high-risk groups were nearly overlapped (Fig. 1a). The curves of the former two and the latter two were clearly separated. The 2-year OS rates of the low-, int-1-, int-2-, and high-risk groups were 87, 85, 33, and 30%, respectively. If patients were censored when they received allogeneic SCT, the OS curve height of the high-risk group became lower than that in Fig. 1a, but OS curves of the other groups were essentially the same as Fig. 1a (Fig. 1b). The LFS curves of the low- and int-1-risk groups were almost completely overlapped, and these were clearly superior to those of the int-2- and high-risk groups (Fig. 1c). The 2-year LFS of the low-, int-1-, int-2-,

Fig. 1 Survival probabilities and cumulative incidences of leukemic transformation according to the IPSS. **a** Overall survival. **b** Overall survival if patients were censored when they received allogeneic SCT. **c** Leukemia-free survival. **d** Cumulative incidences of leukemic transformation



and high-risk groups were 82, 81, 26, and 9%, respectively (Fig. 1c). The cumulative incidence curves of leukemic transformation showed that approximately half of the patients with the int-2- and high-risk groups progressed into AML within 2 years, while less than 20% of those with the low- and int-1-risk groups developed AML during the same duration (Fig. 1d).

OS, LFS, and the incidence of leukemic transformation in IPSS-R risk categories

The OS curves of the 5 risk categories by the IPSS-R were reasonably separated. The 2-year OS rates of the very low-, low-, intermediate-, high-, and very high-risk categories were 95, 89, 79, 35, and 12%, respectively (Fig. 2a). The OS curve of the intermediate-risk category was closer to that of the low-risk category than to that of the high-risk category; the OS curve of the very low-risk category was clearly superior to the curves of the other 4 categories. If patients were censored when they received allogeneic SCT, the OS curves of the high- and very high-risk categories further dropped, which were clearly separated from those of the other 3 categories (Fig. 2b). The LFS curves of these 5 categories were also well separated by Kaplan–Meier analysis. However, similar to the OS curves, the LFS curve

of the intermediate-risk category was closer to that of the low-risk category rather than that of the high-risk category, and that of the very low-risk category was clearly superior to those of the other 4 categories (Fig. 2c). The 2-year LFS of the very low-, low-, intermediate-, high-, and very high-risk categories were 95, 80, 71, 30, and 11%, respectively. Approximately half of the patients with the high- and very high-risk categories progressed into AML within 2 years, while less than 20% of the other 3 risk categories progressed into AML during the same duration (Fig. 2d). The incidences of leukemic transformation of the very low-, low-, intermediate-, high-, and very high-risk categories at 2 years of diagnosis were 0, 10, 8, 56, and 40%, respectively.

Stratification of the IPSS-defined risk groups by the IPSS-R

To compare the IPSS and IPSS-R in our cohort, we stratified the IPSS-defined risk groups by the IPSS-R. As expected, most of the patients in the IPSS-defined low-risk group were classified into either the very low- or low-risk category, and most of those in the IPSS-defined high-risk group were classified into the high- or very high-risk category in IPSS-R (Fig. 3a). In contrast, the IPSS-defined

Fig. 2 Survival probabilities and cumulative incidences of leukemic transformation according to the IPSS-R. **a** Overall survival. **b** Overall survival if patients were censored when they received allogeneic SCT. **c** Leukemia-free survival. **d** Cumulative incidences of leukemic transformation

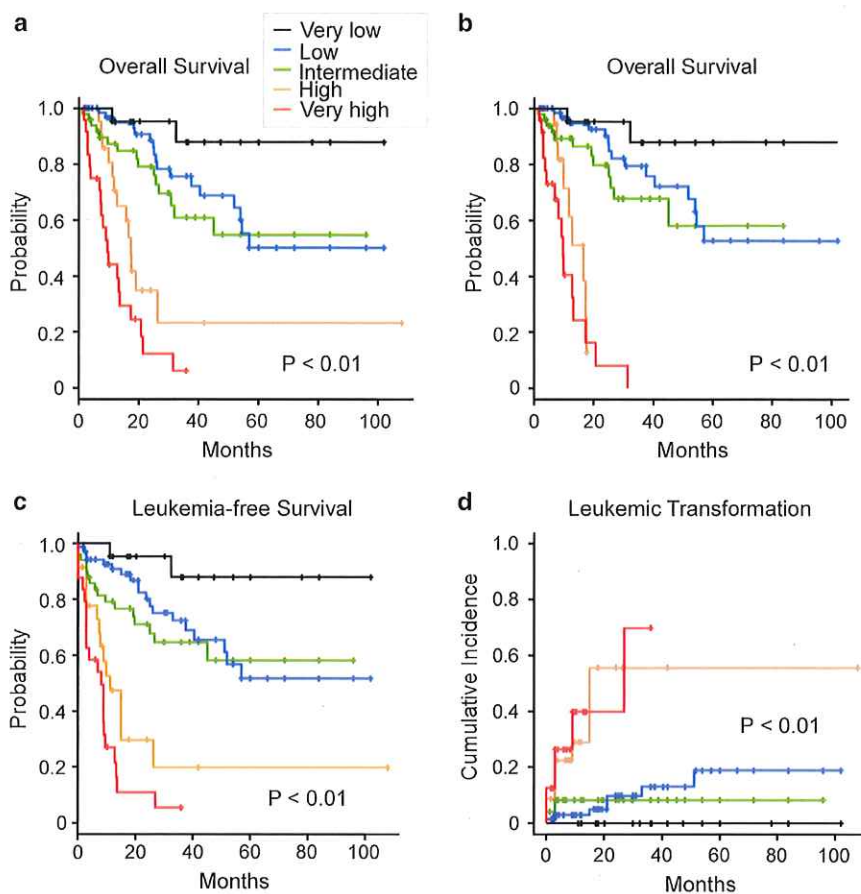
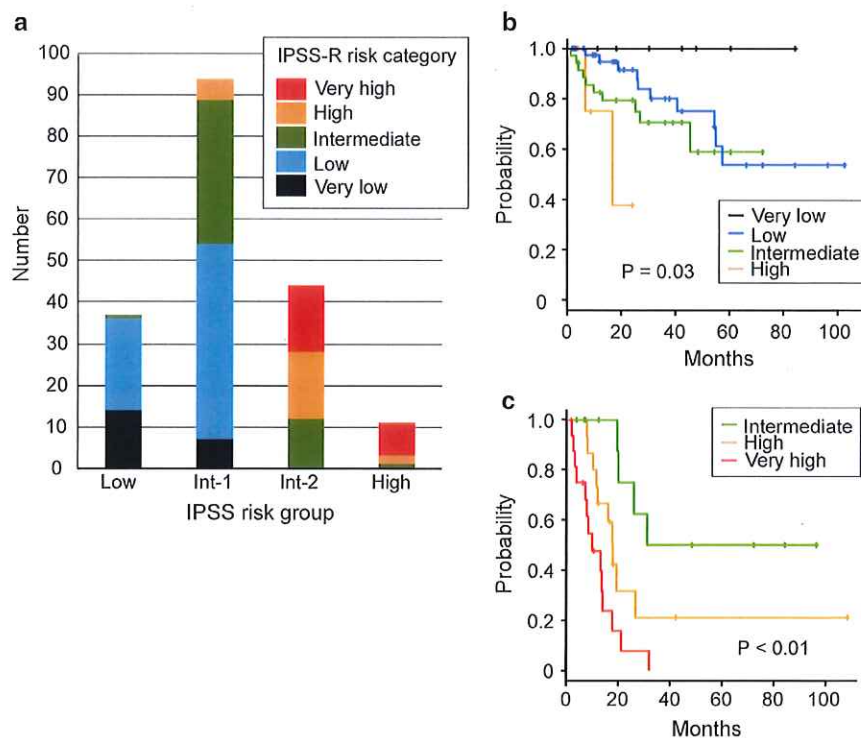


Fig. 3 Stratification of the IPSS-defined risk groups into five IPSS-R-defined risk categories. **a** Numbers of cases in each IPSS-defined risk group are shown in a stacked bar chart. **b** Overall survival of each IPSS-R category among the IPSS-defined int-1-risk group. **c** Overall survival of each IPSS-R category among the IPSS-defined int-2-risk group



int-1- and int-2-risk groups could be further separated by IPSS-R into 4 and 3 risk categories, respectively. The majority of patients in the IPSS-defined int-1-group were classified into the low- or intermediate-risk category in IPSS-R; however, a certain number of patients in this group were classified into the very low- and high-risk categories (Fig. 3a). OS curves of these 4 categories were reasonably separated (Fig. 3b); it is noteworthy that no death was recorded among the patients in the very low-risk category. Patients with the IPSS-defined int-2-risk group were divided into nearly equal proportions of 3 risk categories, from intermediate to very high (Fig. 3a). The OS curves of these categories were also well separated (Fig. 3c).

Risk factors for OS

In the IPSS-R, chromosomal karyotype, BM blast percentage, Hb, neutrophil counts, and platelet counts were categorized and incorporated into the calculation. We divided the patients with MDS into 5 groups according to karyotype categories of the IPSS-R [9] and assessed their OS by the Kaplan–Meier method. The OS curves of patients with the very good-, good-, or intermediate-risk karyotypes were nearly overlapped, and these were clearly superior to those with the poor- and very poor-risk karyotypes (Fig. 4a). We then divided the patients into 4 groups by BM blast percentages: $\leq 2\%$, 2–5%, 5–10%, and $>10\%$. The OS curve of patients with BM blasts $\leq 2\%$ was evidently superior to those of the other 3 groups (Fig. 4b). Therefore, we set the cutoff of blast percentage to be 2%. Then, we assessed the risk factors for OS by univariate analysis (Table 1). The cut-off values of Hb (8.0 g/dL), neutrophil counts (800/ μL), and platelet counts (100,000/ μL) were taken from the IPSS-R. Age (cutoff 60 years) and gender were also included as confounders in the model. Age ≥ 60 years, Hb < 8 g/dL, platelet counts $< 100,000/\mu\text{L}$, BM blast $> 2\%$, and the high- and very high-karyotype risks were significantly associated with poor OS, whereas gender and neutrophil counts $< 800/\mu\text{L}$ were not. In a multivariate analysis, male sex, low platelet counts ($< 100,000/\mu\text{L}$), increased blast percentage ($> 2\%$), and the high-risk karyotype abnormalities (the high or very high-risk groups) were shown to be independent risk factors for poor OS. The highest hazard ratio of > 10 was observed in the high-risk karyotype abnormalities (Table 1).

Ratios of patients receiving SCT

We evaluated the ratios of patients who received SCT among those ≤ 65 years old, because patients > 65 years are generally regarded not to be eligible for SCT. In the IPSS, less than 20% of those with the low- and int-1-risk groups received SCT, while more than 60% of those

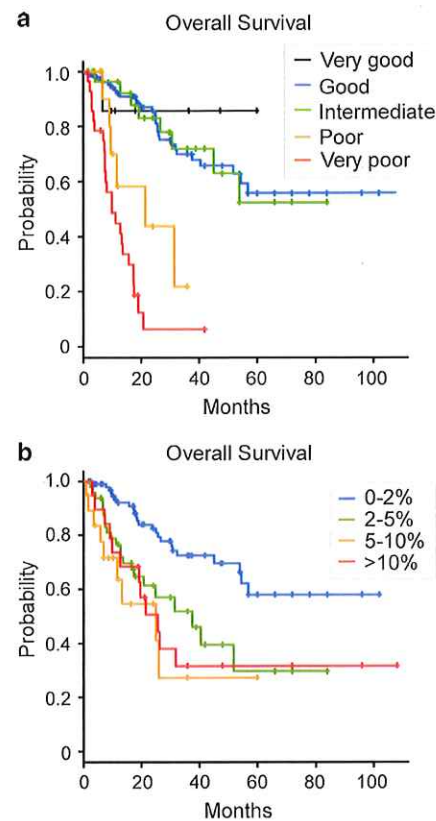


Fig. 4 Survival probabilities according to **a** karyotype risks by IPSS-R and **b** bone marrow blast percentage

with the int-2- and high-risk groups received SCT during their follow-up periods (Fig. 5a). When the patients were divided according to IPSS-R categories, a third of those in the intermediate-risk category, three-fourths of those in the high-risk category, and nearly half of those in the very high-risk category underwent SCT during the follow-up period, while very few in the very low- and low-risk categories underwent SCT (Fig. 5b).

Discussion

In this study, we analyzed the OS and LFS of patients with MDS in Japan. When we divided our patients according to IPSS, the OS curves for the low- and int-1-risk groups almost completely overlapped, and those for the int-2- and high-risk groups nearly overlapped; the former two were clearly superior to the latter two (Fig. 1). These results are consistent with our understanding that, in the IPSS, the low- and int-1-risk groups are regarded as the lower risk MDS and the int-2- and high-risk groups are the higher risk MDS. When we divided the patients according to the IPSS-R, the OS curves of risk categories were well separated,

Table 1 Risk factors of OS

Categories	Criteria	n	Median OS (months)	Univariate analysis	Multivariate analysis	
				p	Hazard ratio (95% confidence intervals)	p
Age	<60 years	48	NR	0.009	1	0.004
	≥60 years	138	45		2.58 (1.36–4.88)	
Gender	Female	67	NR	0.294	1	0.017
	Male	119	52		1.96 (1.13–3.43)	
Hemoglobin	≥8 g/dL	126	NR	0.003		
	<8 g/dL	60	26			
Neutrophil counts	≥800	139	54	0.094		
	<800	47	26			
Platelet counts	≥100,000	82	NR	0.051	1	0.041
	<100,000	104	45		1.69 (1.02–2.81)	
BM blast percentages	≤2%	99	NR	< 0.001	1	0.031
	>2%	79	26		1.79 (1.06–3.05)	
Karyotype risks (IPSS-R)	Very low, low, or intermediate	146	NR	< 0.001	1	< 0.001
	Poor or very poor	40	12		10.35 (5.66–18.95)	

p values <0.05 are shown in bold

OS overall survival; NR not reached; BM bone marrow; IPSS-R revised-international prognostic scoring system

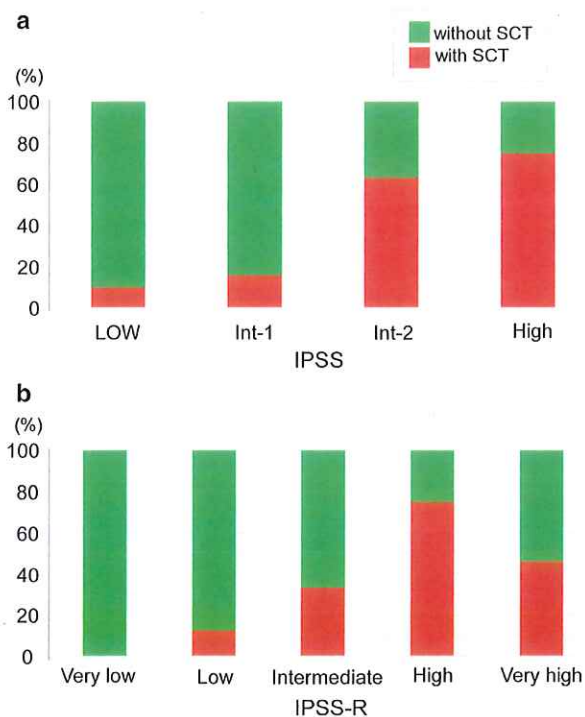


Fig. 5 Ratios of patients receiving allogeneic stem cell transplantation among those ≤65 years according to the **a** IPSS and **b** IPSS-R

and their estimated survivals were comparable with those by the original IPSS-R and its validation studies that followed [8, 10–12]. However, the OS and LFS curves for the low- and intermediate-risk categories were relatively close, and those for the high- and very high-risk categories were also close; furthermore, the curve of the very low-risk category was clearly superior to those of the other 4 categories (Fig. 2, panels a, b). Thus, the IPSS-R seems to be quite useful into identifying the very low-risk patients with extremely favorable prognosis, who could not be stratified by conventional IPSS.

In this study, we found that the IPSS-R can be utilized for restratification of each of the IPSS-defined risk groups (Fig. 3a). Indeed, the IPSS-R allowed reclassification of the IPSS-defined int-1-risk group, which included the largest number of MDS patients, into various prognostic subgroups, from the very low- to high-risk categories. Among patients in the IPSS-defined int-1-risk group, no death was observed for those classified into the IPSS-R-defined very low-risk category during the observation period, while the median OS for those classified into the high-risk category was only 1.4 years (Fig. 3b). Thus, patients with IPSS-defined int-1 risk group could be stratified more precisely by IPSS-R.

One of the main questions in the current study was whether Japanese patients with MDS in the intermediate-risk category in the IPSS-R should be treated as the lower risk or higher risk MDS. A German study group investigated the OS and incidence of leukemic transformation of 1313 patients with MDS including those who received

disease-altering therapies [10]. In this study, the OS curve and cumulative incidence of leukemic transformation of patients in the intermediate-risk category by IPSS-R were clearly inferior to that of the low-risk category, rather close to that of the high-risk category. Recently, a similar study from The Netherlands was published [19]. In this study, 222 patients with MDS by the definition of WHO classification from a single institute were analyzed; the median OS of the intermediate-risk category was 22 months, which was closer to that of the high-risk category (19 months) than that of the low-risk category (49 months). These studies suggest that the intermediate-risk category in IPSS-R is a group to consider aggressive treatments for the higher risk MDS including SCT. In contrast, a report from a Serbian study group showed different results [12]. They analyzed 173 patients with MDS using the definition of FAB classification excluding those who received disease-altering therapies. Their results showed that the OS curve of the intermediate-risk category was closer to that of the low-risk category rather than that of the high-risk category (the median OS of the low-, intermediate-, and high-risk categories were 35, 22, and 7 months, respectively). Another study from an Italian group validated the IPSS-R using 380 patients with MDS including those who were treated with lenalidomide, azacitidine, and cytotoxic agents [20]. In their cohort, the survival curves for the high- and very high-risk categories were nearly overlapped, and the curve for the intermediate-risk category was located in between those of the low- and high-risk categories [20]. Thus, ethnic differences may exist in the prognosis of patients in this disease category. In our study cohort, in contrast to the aforementioned German and Dutch studies, the OS curves for the low- and intermediate-risk categories were relatively close, and those for the high- and very high-risk categories were also close; the former were clearly superior to the latter (Fig. 2, panels a, b). The cumulative incidences of leukemic transformation were low in the former categories, less than 20% in 24 months, whereas those of the latter categories were clearly high (Fig. 2d). These results support the idea that Japanese patients with MDS with the IPSS-R intermediate-risk category should be regarded as the lower risk MDS together with those in the low- and very low-risk categories. However, among patients ≤ 65 years, 33% of those in the intermediate-risk category received SCT, whereas only less than 12.5% of those in the low-risk category received it. Taken together, as suggested in the original paper of IPSS-R [8], we suggest to classify Japanese patients with MDS with intermediate-risk category in IPSS-R into the lower risk MDS regarding their potential therapeutic management, but simultaneously, we suggest to carefully assess optimal treatments of these patients within low- and high-risk treatment protocols.

This study has several study limitations. First, the number of enrolled patients is relatively small. Second, the registration period was relatively long; thus, the treatment strategies, which may have affect their prognosis, was not consistent during the enrolment period. Third, because a considerable proportion of patients were referred to local hospitals or clinics after diagnosis, the median follow-up period (24 months) was relatively short. Fourth, given that informed consent was required prior to enrolment patients into this study, those with very poor performance status were likely to be excluded. Fifth, only relatively large institutes participated in this study, which may have caused selection bias to relatively young patients. A large proportion of elderly patients were probably managed by physicians in much smaller local hospitals or clinics. According to a study by Chihara et al., the incidence of MDS in Japan sharply increases with age, particularly in those over age 70 years, and the median age of MDS diagnosis in Japan is 76 [21], which is much higher than that in our cohort (69 years). To approach these problems, it is necessary to continue the research systematically under the cooperation of all over Japan.

The results of this study was based on a database of a multicenter Japanese MDS and aplastic anemia patient registry, and the diagnosis of each case was strictly made by a central review system including morphological inspection at the time of registration. Although there are several study limitations as mentioned above, we believe that this study provides valuable basic data of the real-world prognosis of patients with MDS in Japan.

Acknowledgements The authors thank the patients, their families, all the investigators including Drs Yukiharu Nakabo (The Center for Hematological Diseases, Takeda General Hospital), Takahiko Utsumi (Department of Hematology and Oncology, Shiga Medical Center for Adults), Tatsuo Ichinohe (Department of Hematology and Oncology, Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University), Hirohiko Shibayama (Department of Hematology and Oncology, Osaka University Graduate School of Medicine), Yasuyoshi Morita (Division of Hematology and Rheumatology, Department of Internal Medicine, Kindai University Faculty of Medicine), Masayuki Shisek (Department of Hematology, Tokyo Women's Medical University), Masayoshi Kobune (Department of Hematology, Sapporo Medical University School of Medicine), Naoshi Obara (Department of Hematology, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, Tsukuba University), Wataru Takahashi (Department of Hematology and Oncology, Dokkyo Medical University Hospital), and nurses in the participating institutions of this study. The authors also thank Drs. Maki Shindo-Ueda, Kazue Miyamoto-Arimoto, Tasuki Uchiyama, and Ms. Yukiko Takada, and Nana Kawabe for their technical assistance with the construction of the database. This study was supported in part by the National Research Group on Idiopathic Bone Marrow Failure Syndromes, granted by the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan (H26-Nanchi-Ippan-062).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest Dr. Kawabata reports Grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan, during the conduct of the

study; personal fees from Nippon Shinyaku Co., Ltd., personal fees from Celgene Corporation, outside the submitted work; Dr. Matsuda reports personal fees from Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd., personal fees from Nippon Shinyaku Co., Ltd., personal fees from Alexion Pharmaceuticals Inc., personal fees from Sanofi K.K., personal fees from GlaxoSmithKline K.K., outside the submitted work; Dr. Suzuki reports Grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan, during the conduct of the study; personal fees from Nippon Shinyaku Co., Ltd., Grants and personal fees from Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd., outside the submitted work; Dr. Usuki reports Grants from Fujimoto Pharmaceutical Corporation, Grants from Astellas Pharma Inc., Grants from Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Grants from Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd., Grants from Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd., Grants from Daiichi Sankyo Co., Ltd., personal fees from Novartis Pharma K.K., outside the submitted work; Dr. Chiba reports grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan, during the conduct of the study; Grants from Nippon Shinyaku Co., Ltd., personal fees from Celgene Corporation, outside the submitted work; Dr. Arima reports Grants from Nippon Shinyaku Co., Ltd., Grants from Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd., Grants from Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., Grants from Teijin Pharma Ltd., Grants from CSL Behring K.K., Grants from Japan Blood Products Organization, Grants from Taiho Pharmaceutical Co., Ltd., outside the submitted work; Dr. Ohta reports Grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan, during the conduct of the study; Dr. Miyazaki reports Grants from the Ministry of Health Labour and Welfare, Japan, during the conduct of the study; personal fees from Nippon Shinyaku Co., Ltd., personal fees from Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd., personal fees from Celgene Corporation, personal fees from Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd., personal fees from Novartis Pharma K.K., personal fees from Chugai Pharmaceutical Co. Ltd., outside the submitted work; Dr. Mitani reports Grants and personal fees from Kyowa-Hakko Kirin, Grants and personal fees from Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., Grants and personal fees from Novartis Pharma K.K., Grants from Teijin Pharma Ltd., Grants from Japan Blood Products Organization, Grants from Ono Pharmaceutical Co., Ltd., Grants from Takeda Pharmaceutical Co., Ltd., Grants from Toyama Chemical Co., Ltd., Grants from Astellas Pharma Inc., Grants from Taiho Pharmaceutical Co., Ltd., Grants from Pfizer Japan Inc., Grants from Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd., Grants from MSD K.K., Grants from Mochida Pharmaceutical Co., Ltd., Grants from Nihon Pharmaceutical Co., Ltd., outside the submitted work; Dr. Arai reports Grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan, during the conduct of the study; Grants from Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd., Grants from Nippon Shinyaku, Co., Ltd., outside the submitted work; Dr. Kurokawa reports Grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan, during the conduct of the study, Grants from Kyowa Hakko Kirin Pharma Inc., Grants from Nippon Shinyaku, Co., Ltd., Grants from Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., outside the submitted work; personal fees from Kyowa Hakko Kirin Pharma Inc., Nippon Shinyaku, Co., Ltd., Celgene Corporation outside the submitted work; Dr. Takaori-Kondo reports Grants from Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan, during the conduct of the study; personal fees from Bristol-Myers Squibb, personal fees from Yanssen Pharmaceutical K.K., Grants from Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd., Grants from Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., Grants from Takeda Pharmaceutical Co., Ltd., outside the submitted work.

References

- Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997;89:2079–88.
- Balduini CL, Guarnone R, Pecci A, Centenara E, Ascarì E. International prognostic scoring system and other prognostic systems for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997;90:4232–4.
- Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, et al. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2007;25:3503–10.
- Kantarjian H, O'Brien S, Ravandi F, Cortes J, Shan J, Bennett JM, et al. Proposal for a new risk model in myelodysplastic syndrome that accounts for events not considered in the original international prognostic scoring system. *Cancer*. 2008;113:1351–61.
- Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014;28:241–7.
- Bejar R. Prognostic models in myelodysplastic syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:504–10.
- Lyons RM. Myelodysplastic syndromes: therapy and outlook. *Am J Med*. 2012;125:S18–23.
- Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Sole F, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;120:2454–65.
- Schanz J, Tuechler H, Sole F, Mallo M, Luno E, Cervera J, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol*. 2012;30:820–9.
- Neukirchen J, Lauseker M, Blum S, Giagounidis A, Lubbert M, Martino S, et al. Validation of the revised international prognostic scoring system (IPSS-R) in patients with myelodysplastic syndrome: a multicenter study. *Leuk Res*. 2014;38:57–64.
- de Swart L, Smith A, Johnston TW, Haase D, Droste J, Fenaux P, et al. Validation of the revised international prognostic scoring system (IPSS-R) in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes: a report from the prospective European LeukaemiaNet MDS (EUMDS) registry. *Br J Haematol*. 2015;170:372–83.
- Savic A, Marisavljevic D, Kvrjic V, Stanisavljevic N. Validation of the revised international prognostic scoring system for patients with myelodysplastic syndromes. *Acta Haematol*. 2014;131:231–8.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 1982;51:189–99.
- Goasguen JE, Bennett JM, Bain BJ, Brunning R, Vallespi MT, Tomonaga M, et al. Proposal for refining the definition of dysgranulopoiesis in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2014;38:447–53.
- Mufti GJ, Bennett JM, Goasguen J, Bain BJ, Baumann I, Brunning R, et al. Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International working group on morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. *Haematologica*. 2008;93:1712–7.
- Gray RJ. A class of k-sample tests for comparing the cumulative incidence of a competing risk. *Ann Stat*. 1988;16:1141–54.
- Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZ' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48:452–8.
- Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114:937–51.
- van Spronsen MF, Ossenkoppele GJ, Holman R, van de Loosdrecht AA. Improved risk stratification by the integration of

- the revised international prognostic scoring system with the myelodysplastic syndromes comorbidity index. *Eur J Cancer*. 2014;50:3198–205.
20. Voso MT, Fenu S, Latagliata R, Buccisano F, Piciocchi A, Aloe-Spiriti MA, et al. Revised International Prognostic Scoring System (IPSS) predicts survival and leukemic evolution of myelodysplastic syndromes significantly better than IPSS and WHO prognostic scoring system: validation by the Gruppo Romano Mielodisplasie Italian Regional Database. *J Clin Oncol*. 2013;31:2671–7.
21. Chihara D, Ito H, Katanoda K, Shibata A, Matsuda T, Sobue T, et al. Incidence of myelodysplastic syndrome in Japan. *J Epidemiol*. 2014;24:469–73.

A nationwide survey of hypoplastic myelodysplastic syndrome (a multicenter retrospective study)

Takashi Kobayashi¹  | Yasuhito Nannya¹ | Motoshi Ichikawa¹ | Kenji Oritani² | Yuzuru Kanakura² | Akihiro Tomita^{3,4} | Hitoshi Kiyoi³ | Masayoshi Kobune⁵ | Junji Kato⁵ | Hiroshi Kawabata⁶ | Motohiro Shindo⁷ | Yoshihiro Torimoto⁸ | Yuji Yonemura⁹ | Nobuyoshi Hanaoka¹⁰ | Hideki Nakakuma¹⁰ | Daisuke Hasegawa¹¹ | Atsushi Manabe¹¹ | Naohito Fujishima¹² | Nobuharu Fujii¹³ | Mitsune Tanimoto¹³ | Yasuyoshi Morita¹⁴ | Akira Matsuda¹⁵ | Atsushi Fujieda¹⁶ | Naoyuki Katayama¹⁶ | Haruhiko Ohashi¹⁷ | Hirokazu Nagai¹⁸ | Yoshiki Terada¹⁹ | Masayuki Hino¹⁹ | Ken Sato²⁰ | Naoshi Obara²¹ | Shigeru Chiba²¹ | Kensuke Usuki²² | Masatsugu Ohta²³ | Osamu Imataki²⁴  | Makiko Uemura²⁴ | Tomoiku Takaku²⁵ | Norio Komatsu²⁵ | Akira Kitanaka²⁶ | Kazuya Shimoda²⁶ | Kenichiro Watanabe²⁷ | Kaoru Tohyama²⁸ | Akifumi Takaori-Kondo⁶ | Hideo Harigae²⁹ | Shunya Arai¹ | Yasushi Miyazaki³⁰ | Keiya Ozawa^{31,32} | Mineo Kurokawa¹  | for National Research Group on Idiopathic Bone Marrow Failure Syndromes

¹Department of Hematology and Oncology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan; ²Department of Hematology and Oncology, Graduate School of Medicine, Osaka University, Osaka, Japan; ³Department of Hematology and Oncology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan; ⁴Department of Hematology, Fujita Health University School of Medicine, Aichi, Japan; ⁵Department of Medical Oncology and Hematology, Sapporo Medical University School of Medicine, Sapporo, Japan; ⁶Department of Hematology and Oncology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan; ⁷Division of Gastroenterology and Hematology/Oncology, Department of Medicine, Asahikawa Medical University, Asahikawa, Japan; ⁸Oncology Center, Asahikawa Medical University Hospital, Asahikawa, Japan; ⁹Department of Transfusion Medicine and Cell Therapy, Kumamoto University Hospital, Kumamoto, Japan; ¹⁰Department of Hematology/Oncology, Wakayama Medical University, Wakayama, Japan; ¹¹Department of Pediatrics, St. Luke's International Hospital, Tokyo, Japan; ¹²Division of Blood Transfusion, Akita University Hospital, Akita, Japan; ¹³Department of Hematology and Oncology, Okayama University Hospital, Okayama, Japan; ¹⁴Division of Hematology and Rheumatology, Department of Internal Medicine, Kindai University Faculty of Medicine, Osaka-Sayama, Japan; ¹⁵Department of Hemato-Oncology, Saitama International Medical Center, Saitama Medical University, Hidaka, Saitama, Japan; ¹⁶Department of Hematology and Oncology, Mie University Graduate School of Medicine, Tsu, Mie, Japan; ¹⁷Clinical Research Center, National Hospital Organization Nagoya Medical Center, Nagoya, Japan; ¹⁸Department of Hematology, National Hospital Organization Nagoya Medical Center, Nagoya, Japan; ¹⁹Hematology, Graduate School of Medicine, Osaka City University, Osaka, Japan; ²⁰Division of Hematology, Department of Internal Medicine, National Defense Medical College, Saitama, Japan; ²¹Department of Hematology, Faculty of Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, Japan; ²²Department of Hematology, NTT Medical Center Tokyo, Tokyo, Japan; ²³Department of Hematology, Fukushima Medical University Aizu Medical Center, Fukushima, Japan; ²⁴Division of Hematology, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Kagawa University, Kagawa, Japan; ²⁵Department of Hematology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan; ²⁶Department of Gastroenterology and Hematology, Faculty of Medicine, University of Miyazaki, Miyazaki, Japan; ²⁷Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan; ²⁸Department of Laboratory Medicine (Laboratory Hematology), Kawasaki Medical School, Okayama, Japan; ²⁹Department of Hematology and Rheumatology, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan; ³⁰Department of Hematology, Atomic Bomb Disease and Hibakusha Medicine Unit, Atomic Bomb Disease Institute, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki, Japan; ³¹Division of Hematology, Jichi Medical University, Tochigi, Japan; ³²IMSUT Hospital, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

Correspondence

Mineo Kurokawa, Department of Hematology and Oncology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Hongo 7-3-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan.
Email: kurokawa-ky@umin.ac.jp

Funding information

National Research Group on Idiopathic Bone Marrow Failure Syndromes; Ministry of Health, Labour and Welfare (H26-Nanchi-Ippan-062)

Abstract

Hypoplastic myelodysplastic syndrome (hMDS) is a distinct entity with bone marrow (BM) hypocellularity and the risk of death from BM failure (BMF). To elucidate the characteristics of hMDS, the data of 129 patients diagnosed between April 2003 and March 2012 were collected from 20 institutions and the central review team of the National Research Group on Idiopathic Bone Marrow Failure Syndromes, and compared with 115 non-hMDS patients. More RA and fewer CMMoL and RAEB-t in French-American-British (FAB) and more RCUD and MDS-U and fewer RCMD in World Health Organization (WHO) classifications were found in hMDS than non-hMDS with significant differences. The overall survival (OS) and AML progression-free survival (AML-PFS) of hMDS were higher than those of non-hMDS, especially in patients at age ≥ 50 and of lower risk in Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R). In competing risks analysis, hMDS exhibited decreased risk of AML-progression in lower IPSS or IPSS-R risk patients, and higher risk of death from BMF in patients at age ≥ 50 . Poor performance status (PS ≥ 2) and high karyotype risks in IPSS-R (high and very high) were significant risk factors of death and AML-progression in Cox proportional hazards analysis.

1 | INTRODUCTION

Hypoplastic MDS (hMDS) is a distinct disease entity of myelodysplastic syndrome (MDS) characterized by bone marrow (BM) hypocellularity and dysplasia.¹ The BM cellularity $<30\%$ had been the criterion for hMDS in the early literature.^{1,2} However, based on the evidence that BM cellularity decreases with aging,³ the stratified criteria of BM cellularity $<30\%$ for patients younger than age 60 and $<20\%$ for patients older than (or equal to) age 60 have been proposed for the definition of hMDS.^{4,5} More than 50% of hMDS patients were refractory anemia (RA) in FAB classification,⁶ but other background information, such as past medical histories, family histories, and smoking habits, has hardly been discussed.

The hMDS was originally reported to be of more favorable prognosis with less frequent chromosomal abnormalities than non-hMDS,¹ while some other reports exhibited similar prognostic outcomes of hMDS compared with non-hMDS,² so the prognosis of hMDS is still controversial. A study by Huang TC et al. showed that hMDS has more favorable prognosis than non-hMDS, especially in lower risk groups (low and intermediate-1 in the International Prognostic Scoring System (IPSS)), and that hMDS also has lower risk to progress to acute leukemia.⁶ Since Revised IPSS (IPSS-R) was made available and proved to predict the clinical outcomes of MDS better than IPSS,⁷ it is desirable to investigate the outcomes of hMDS according to IPSS-R as well.

The standard therapy for hMDS remains unknown. Because of severe pancytopenia, the patients with hMDS may be at higher risk of death from BM failure (BMF) rather than the risk of progression to acute myeloid leukemia (AML), and therefore, the adequacy of applying the intensive therapies to hMDS is still controversial.^{8,9} A report from Czech included 9 hMDS patients to whom cyclosporine A (CsA) was administered, and 8 of them (80%) responded well to CsA alone or in combination with other agents such as erythropoietin (EPO),¹⁰ while the hMDS patients responded poorly to CsA in another study.¹¹ The patients in these studies did not progress to acute leukemia after

immunosuppressive therapy (IST), but there is a report on a patient with hMDS who transformed to AML after the administration of CsA,¹² so it remains to be clarified to what extent IST is indicated for hMDS. Some studies on successful allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) included patients with hMDS,¹³⁻¹⁵ but their ages were much younger than the median age of hMDS patients, which varied from 46 to 69.^{1,2,5,16,17} Therefore, accumulation of data on the outcomes of HSCT for hMDS including the elderly patients is desired.

The purpose of this study is to elucidate the patient background, clinical characteristics, treatment response, and prognosis of patients with hMDS by conducting a nationwide multicenter survey, and retrospectively analyze the survival and risk factors of these patients. In particular, this study is focused on the prognosis of subpopulations according to the age and risk groups of hMDS.

2 | METHODS

The medical institutions participating in the National Research Group on Idiopathic Bone Marrow Failure Syndromes and its central review team were contacted, and the nationwide survey data were collected from the institutions that participated in this study. The protocol of this study was approved by the Research Ethics Committee of the Graduate School of Medicine and Faculty of Medicine, The University of Tokyo, and by the ethics committee of each participating institution. The criteria for the hypocellularity of hMDS are the BM cellularity $<30\%$ for patients at age <60 , and $<20\%$ for age ≥ 60 in BM biopsy specimens^{4,5}; for patients diagnosed without BM biopsy, the same criteria were applied to the clot samples of the BM aspirates. The hMDS cases previously untreated and newly diagnosed by BM biopsy and/or aspiration between April 2003 and March 2012 according to the French-American-British (FAB) classification were enrolled in this study, and their medical records and data were studied throughout the same period. The data collected for analysis included the patients'

clinical characteristics such as age at diagnosis, sex, past medical history of malignancies and/or hematological diseases, family history of malignancies and/or hematological diseases, performance status (PS), complete blood counts (CBC), blasts in peripheral blood (PB) and BM, cellularity of BM, chromosome abnormalities, FAB and World Health Organization (WHO) classifications, risk groups in IPSS and IPSS-R, treatments, the dates of initial diagnosis, progression to AML, and death or the last follow-up. The data of the hMDS patients were compared with those of non-hMDS patients in terms of clinical characteristics, survival, risk factors, causes of death, and responses to treatments. The clinical characteristics of hMDS patients and non-hMDS patients were analyzed using *t*-test for parametric variables and BM blasts, and Fisher's exact test for categorical data.

Overall survival (OS) was defined as the time from the initial diagnosis to death; patients who had been alive at the last follow-up were censored. The AML progression-free survival (AML-PFS) was defined as the survival time until the date on which the patient was found with leukemia either by CBC or BM analysis. The Kaplan-Meier method was used for the survival analysis, and log-rank test was used to compare the survival distributions of hMDS and non-hMDS. The risk factors were also analyzed using the Cox proportional hazards model. In the multivariate analysis of Cox proportional hazards model, variables were optimized using Akaike's information criterion (AIC).¹⁸ Although discussed and defined pathologically, there have been no proposed threshold values to diagnose BMF. For the purpose of this study, death from BMF was defined as the death with cytopenia of at least two lineages (the actual causes of deaths shall be given below). The risks of progression to AML and death from BMF were analyzed by competing risks analysis.

The original definition of hypocellularity for hMDS was given only by BM biopsy, so the clinical study of hMDS only with the histology-proven patients would be ideal. However, less than 50% of the hMDS patients were diagnosed by BM biopsy, so the clot-diagnosed hMDS were included in this study, and a subset analysis of only the histology-proven MDS patients (i.e., the MDS patients diagnosed by BM biopsy) was studied as well. Furthermore, in order to investigate whether the subset of histology-proven patients represents the characteristics of the entire population, two-sample Kolmogorov-Smirnov test was applied to the subpopulations of histology-proven patients and the other patients.¹⁹

The MDS patients were classified according to their initial treatments, and the OS was studied for each treatment from the days on which the treatment started (patients with best supportive care (BSC) and no treatment were observed from the day on which they were diagnosed).

Throughout this study, all of the statistical analyses were performed using R version 3.2.1.

3 | RESULTS

Thirty-four of the 54 institutions responded to the preliminary survey (63.0%); 27 institutions agreed to participating in the study, 4 institutions had no hMDS cases, and 3 institutions withdrew from the study. The data of 129 patients with hMDS were collected from 20

TABLE 1 Patient characteristics at initial diagnosis

Variables	hMDS (N = 129)	non-hMDS (N = 115)	P-value
Age, years			.22
Median (range)	65 (16–89)	66 (19–88)	
Sex			.061
Male (%)	75 (58)	81 (70)	
Female (%)	53 (41)	34 (30)	
Unknown (%)	1 (0.78)	0 (0)	
Past illness (%) ^b	41 (32)	32 (28)	.74
Family history (%) ^b	20 (16)	38 (33)	<.001 ^a
Smoking (%)	32 (25)	58 (50)	<.001 ^a
Hemoglobin, g/dL			.32
Median (range)	9.2 (4.9–14)	8.9 (4.4–15)	
Platelet, ×10 ⁴ /μL			.0079 ^a
Median (range)	7.0 (0.60–44)	8.5 (0.50–87)	
Neutrophil, ×10 ³ /μL			.0019 ^a
Median (range)	1.2 (0.042–9.9)	1.3 (0.11–36)	
PB blast, %			.016 ^a
Median (range)	0 (0–19)	0 (0–16)	
BM blast, %			.069
Median (range)	1.8 (0–28)	3.0 (0–25)	
FAB classification (%)			.021 ^a
RA	84 (65)	55 (48)	
RARS	3 (2.3)	6 (5.2)	
RAEB	32 (25)	27 (23)	
RAEB-t	2 (1.6)	6 (5.2)	
CMMoL	2 (1.6)	14 (12)	
Unknown/others	6 (4.7)	7 (6.1)	
WHO classification			<.001 ^a
RCUD	40 (31)	8 (7.0)	
RARS	2 (1.6)	2 (1.7)	
RCMD	33 (26)	55 (48)	
RAEB-1	22 (17)	16 (14)	
RAEB-2	12 (9.3)	17 (15)	
MDS-U	11 (8.5)	3 (2.6)	
5q-	1 (0.78)	0 (0)	
Unknown/others	8 (6.2)	14 (12)	
IPSS			.31
Low (%)	19 (15)	18 (16)	
Intermediate-1 (%)	63 (49)	55 (48)	
Intermediate-2 (%)	33 (26)	27 (23)	
High (%)	7 (5.4)	13 (11)	
Unknown (%)	7 (5.4)	2 (1.7)	
IPSS-R			.17
Very low (%)	10 (7.8)	6 (5.2)	
Low (%)	36 (28)	35 (30)	
Intermediate (%)	33 (26)	28 (24)	
High (%)	22 (17)	18 (16)	
Very high (%)	18 (14)	26 (23)	
Unknown (%)	10 (7.8)	2 (1.7)	

^aStatistically significant.

^bMalignancies and/or hematological diseases.

BM, bone marrow; FAB, French-American-British; IPSS, International Prognostic Scoring System; IPSS-R, Revised IPSS; PB, peripheral blood; WHO, World Health Organization.

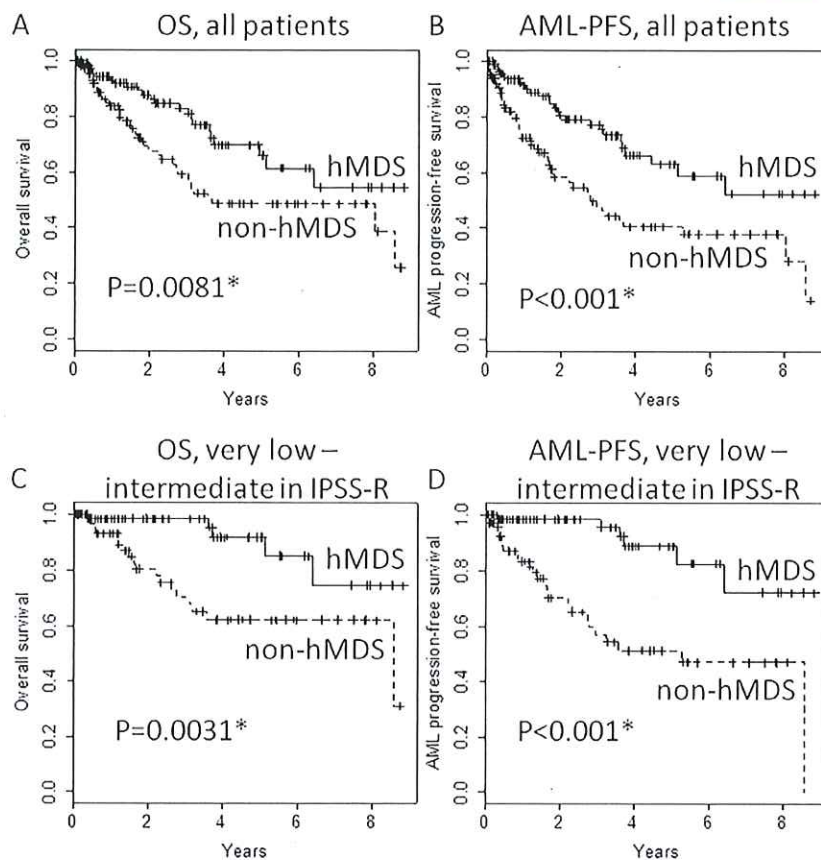


FIGURE 1 OS and AML-PFS, hMDS versus non-hMDS. (A) Overall survival (OS). hMDS patients exhibited significantly higher rates of OS than non-hMDS patients. hMDS: hypoplastic myelodysplastic syndrome (MDS). (B) AML progression-free survival (AML-PFS). hMDS patients exhibited significantly higher rates of AML-PFS than non-hMDS patients. AML: acute myeloid leukemia. (C) OS, lower risk groups (very low, low and intermediate) in IPSS-R. (D) AML-PFS, lower risk groups in IPSS-R. The hMDS of lower risk groups exhibited significantly higher rates of OS and AML-PFS than non-hMDS patients. IPSS-R: Revised International Prognostic Scoring System. *: statistically significant

institutions and from the central review team of the National Research Group on Idiopathic Bone Marrow Failure Syndromes by September 7, 2013. These data were compared with 115 non-hMDS cases of The University of Tokyo Hospital (Supporting Information Table S1). Excluding 2 institutions whose total numbers of MDS patients were unknown, the percentage of hMDS patients was 6.4% (125/1957).

Table 1 provides the demographic and clinical characteristics of patients at their initial diagnoses. The numbers of hMDS patients with family histories of malignancies and/or hematological diseases and with smoking habits were significantly fewer than those of non-hMDS patients ($P < .001$ and $P < .001$, respectively). Patients with hMDS exhibited significantly lower platelet, neutrophil and blast counts in PB than non-hMDS patients ($P = .0079$, $P = .0019$, and $P = .016$, respectively). Also, statistically significant differences between hMDS and non-hMDS patients were found in both FAB and WHO classifications: in particular, the percentage of RCUD was higher in hMDS than in non-hMDS (31% versus 7.0%), whereas that of RCMD was lower in hMDS than in non-hMDS (26% versus 48%), and more MDS-U patients were found in hMDS than in non-hMDS (8.5% versus 2.6%),

whereas fewer patients with RAEB-t and CMMoL were found in hMDS than in non-hMDS (1.6% versus 5.2%, and 1.6% versus 12%, respectively). The differences between hMDS and non-hMDS in other characteristics such as past medical histories were not statistically significant.

The OS and the AML-PFS of hMDS patients were evaluated by Kaplan-Meier method, and analyzed further by dividing the hMDS patients into two groups according to the age, IPSS, or IPSS-R (Supporting Information Figure S1). The 5-year OS of hMDS patients was 66% (95% confidence interval (C. I.) = 54 to 81%) (Supporting Information Figure S1A), whereas their 5-year AML-PFS was 63% (95% C. I. = 51 to 78%) (Supporting Information Figure S1B). Patients at age < 50 showed significantly higher 5-year AML-PFS than patients at age ≥ 50 (94% versus 57% ($P = .032$)) (Supporting Information Figure S1F), and their 5-year OS exhibited similar results as well (Supporting Information Figure S1E). According to the IPSS, 5-year OS and AML-PFS were significantly higher in low and intermediate-1 risk groups than in intermediate-2 and high risk groups (81% versus 37% ($P = .0052$), and 80% versus 30% ($P < .001$), respectively) (Supporting Information

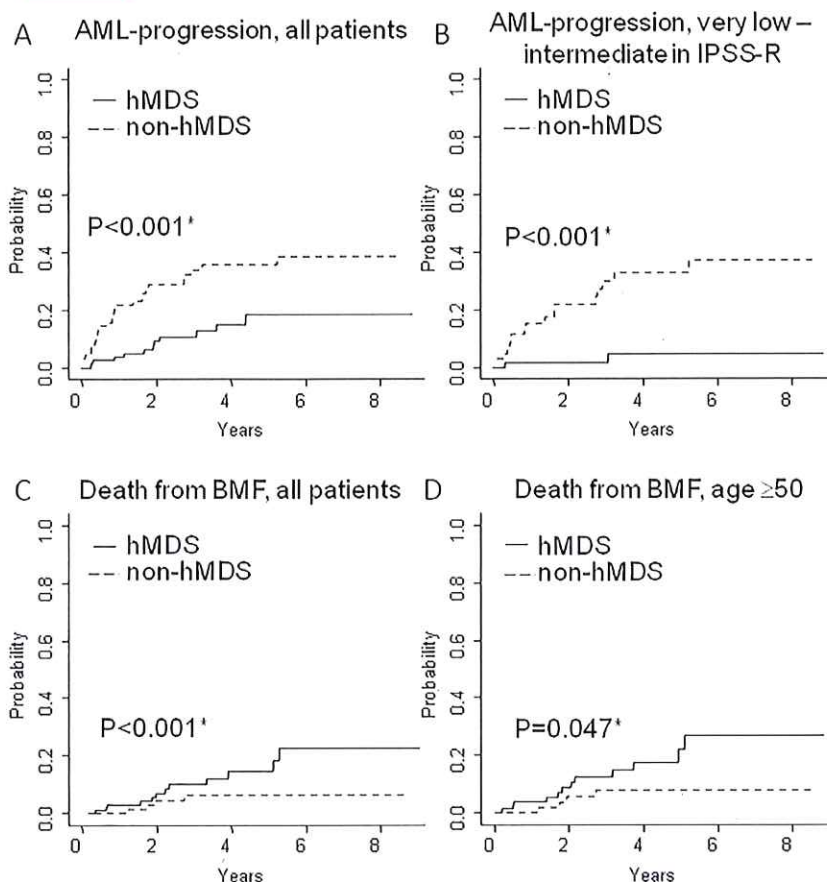


FIGURE 2 The risks of progression to AML and of death from bone marrow failure (BMF) by competing risks analysis. (A) AML-progression, all patients. AML: acute myeloid leukemia. (B) AML-progression, very low, low and intermediate risk groups in IPSS-R. The hMDS patients exhibited significantly lower risk of AML-progression than non-hMDS patients, especially in lower risk groups of IPSS-R. IPSS-R: Revised International Prognostic Scoring System. (C) Death from bone marrow failure (BMF), all patients. (D) Death from BMF, age ≥ 50 . The hMDS patients exhibited higher risk of death from BMF than non-hMDS, especially at age ≥ 50 . The death from BMF is defined as the death caused by cytopenia of at least two lineages. *: statistically significant

Figure S1I,J); likewise, the 5-year OS and AML-PFS in very low, low and intermediate risk groups in IPSS-R were significantly higher than in high and very high risk groups (92% versus 11% ($P < .001$), and 89% versus 11% ($P < .001$), respectively) (Supporting Information Figure S1M,N).

Then, OS and AML-PFS of hMDS were compared with those of non-hMDS (Figure 1, Supporting Information Figure S2). The difference in the OS between hMDS and non-hMDS was statistically significant ($P = .0081$), and their 5-year rates of OS were 66% and 49%, respectively (Figure 1A). The difference in the AML-PFS between them was also statistically significant ($P < .001$), with their 5-year rates being 63% and 41%, respectively (Figure 1B). Based on the findings in Supporting Information Figure S1, hMDS and non-hMDS patients were divided into two groups by IPSS, IPSS-R and age (Supporting Information Figure S1C,D,G,H,K,L). The OS and AML-PFS of patients in low and intermediate-1 risk groups of IPSS were analyzed separately from those in intermediate-2 and high risk groups (Supporting Information Figure S2). For low and intermediate-1, 5-year OS and AML-PFS of

hMDS patients exhibited significantly higher rates than those of non-hMDS patients (81% versus 57%) ($P = .034$), and 80% versus 49% ($P = .0027$), respectively) (Supporting Information Figure S2A,B). In intermediate-2 and high risk groups of IPSS, hMDS patients failed to show better OS but did show significantly superior AML-PFS compared to those of non-hMDS patients (37% versus 33% ($P = .11$), and 30% versus 23% ($P = .024$), respectively) (Supporting Information Figure S2C,D). Likewise, OS and AML-PFS of patients in very low, low and intermediate risk groups of IPSS-R were analyzed separately from high and very high risk groups. The 5-year OS and AML-PFS of hMDS patients in very low, low and intermediate risk groups were significantly higher than those of non-hMDS patients (92% versus 62% ($P = .0031$), and 89% versus 51% ($P < .001$), respectively) (Figure 1C,D), whereas the OS and AML-PFS in high and very high risk groups were as low in hMDS as in non-hMDS (11% versus 13% ($P = .50$), and 11% versus 25% ($P = .40$), respectively) (Supporting Information Figure S2E, F). Therefore, the higher survival rates of hMDS than those of non-hMDS were attributed to the favorable outcomes of lower-risk hMDS.

TABLE 2 Cox proportional hazards analysis, hMDS patients (N = 129)

Univariate hMDS	Overall survival			AML progression-free survival		
	Hazard ratio	95% C. I.	P-value	Hazard ratio	95% C. I.	P-value
Sex	3.4	1.2-10	.025 ^a	4.3	1.5-12	.0075 ^a
Age	1.0	0.99-1.0	.25	1.0	1.0-1.1	.12
Past illness ^b	3.0	1.3-6.7	.010 ^a	2.5	1.2-5.3	.018 ^a
Family history ^b	1.6	0.58-4.3	.38	1.3	0.48-3.4	.63
Smoking	2.4	0.89-6.4	.083	3.2	1.3-8.1	.015 ^a
Hemoglobin	0.88	0.74-1.1	.16	0.91	0.77-1.1	.23
Platelet count	0.90	0.81-0.99	.026 ^a	0.94	0.88-1.0	.092
Neutrophil count	1.0	1.0-1.0	.034 ^a	1.0	1.0-1.0	.053
PB blast	0.96	0.78-1.2	.68	0.95	0.78-1.2	.63
BM blast	1.1	1.0-1.1	.055	1.1	1.0-1.2	<.001 ^a
Performance status	7.1	2.5-20	<.001 ^a	5.3	2.1-14	<.001 ^a
Karyotype risks in IPSS-R	3.3	1.2-8.8	.019 ^a	3.8	1.6-9.0	.0030 ^a
Multivariate hMDS	Overall survival			AML progression-free survival		
	Hazard ratio	95% C. I.	P-value	Hazard ratio	95% C. I.	P-value
Sex	6.3	1.3-30	.020 ^a	5.4	1.2-24	.11
Platelet count	0.87	0.75-1.0	.062			
BM blast				1.1	1.0-1.2	.0033 ^a
Performance status	4.1	1.3-13	.016 ^a	4.5	1.7-12	.0029 ^a
Karyotype risks in IPSS-R	3.5	0.99-12	.051	5.2	1.7-15	.001 ^a

C.I.: confidence interval.

^aStatistically significant. Sex: 1 for male, 0 for female.

^bPast illness/family history of malignancy/hematological disease.

PB, peripheral blood; BM, bone marrow. Performance status (PS): 1 for score ≥ 2 , 0 for score ≤ 1 . Karyotype risks in IPSS-R, 1 for poor and very poor risk groups, 0 for very good, good and intermediate risk groups; IPSS-R, Revised International Prognostic Scoring System.

For both age < 50 and age ≥ 50 , the survival rates of hMDS tended to be higher than those of non-hMDS (Supporting Information Figure S2G-J), especially with statistically significant differences in OS and AML-PFS for age ≥ 50 (61% versus 42% ($P = .011$), and 57% versus 34% ($P < .001$), respectively) (Supporting Information Figure S2I,J).

The risks of progression to AML and death from BMF were investigated by competing risks analysis (Figure 2, Supporting Information Figure S3). The difference in the risk of AML-progression between hMDS and non-hMDS was statistically significant ($P < .001$), with the 5-year cumulative incidence of 18% and 36%, respectively (Figure 2A). Therefore, hMDS patients face lower risk to progress to AML than non-hMDS patients. Dividing the patients into two groups by IPSS, IPSS-R or age revealed that the hMDS patients have significantly lower risk of AML-progression than non-hMDS patients also in the subpopulations of low and intermediate-1 risk groups in IPSS (5-year cumulative incidence = 5.0% versus 31% ($P < .001$)) (Supporting Information Figure S3A), very low, low and intermediate risk groups in IPSS-R (5-year cumulative incidence = 4.5% versus 33% ($P < .001$)) (Figure 2B), and age ≥ 50 (5-year cumulative incidence = 21% versus 39% ($P = .0015$)) (Supporting Information Figure S3E). As given

above, the criterion of death caused by cytopenia of at least two lineages was used for the death from BMF (the actual causes of deaths for hMDS patients are given in Supporting Information Table S2). Applying this criterion to the analysis revealed that the 5-year cumulative incidence of hMDS patients to die from BMF was significantly higher than that of non-hMDS patients (18% versus 6.3% ($P < .001$)), implying that hMDS patients face higher risk of death from BMF than non-hMDS patients (Figure 2C). It was revealed further that hMDS patients face higher risk of death from BMF than non-hMDS patients at age ≥ 50 (5-year cumulative incidence = 22% versus 8.0% ($P = .047$)) (Figure 2D).

The univariate and multivariate Cox proportional hazards models were used to analyze which characteristics of patients served as the risk factors to affect the rates of OS and AML-PFS (Table 2, Supporting Information S4). Among the statistically significant risk factors of survivals for hMDS (N = 129) in the univariate proportional hazards analysis, sex (male = 1, female = 0) and PS remained significant risk factors of OS in multivariate analysis, whereas BM blast, PS and karyotype risks in IPSS-R (poor and very poor risk groups) remained significant risk factors of AML-PFS in multivariate analysis, respectively (Table 2).

Similar results were exhibited for all patients ($N = 244$) and non-hMDS patients ($N = 115$) as well (Supporting Information Table S4).

The subset analysis of histology-proven patients is given in Supporting Information Figure S4. The rates of OS and AML-PFS for this subpopulation exhibited similar results as those for the entire population including patients who were diagnosed by BM aspiration alone; 5-year OS and AML-PFS for histology-proven hMDS were 69% (95% C.I. = 52 to 94%) and 68% (95% C.I. = 51 to 91%), respectively (Supporting Information Figure S4A,B). The hMDS patients exhibited trends for higher rates of survival for both OS and AML-PFS than the non-hMDS patients, especially the latter with statistical significance (5-year OS = 69% versus 40% ($P = .10$), and 5-year AML-PFS = 68% versus 36% ($P = .011$), respectively) (Supporting Information Figure S4C,D). Competing risks analysis for histology-proven patients also exhibited similar results as those for all patients; 5-year cumulative incidences of AML-progression for hMDS and non-hMDS were 14% versus 38% ($P = .0040$), and 5-year cumulative incidences of death from BMF for hMDS and non-hMDS were 24% versus 9.7% ($P = .34$), respectively (Supporting Information Figure S4E,F). Therefore, it was confirmed that hMDS patients face lower risk of AML-progression and higher risk of death from BMF in this subset analysis as well.

Applying two-sample Kolmogorov-Smirnov test to the subpopulations of histology-proven patients and the other patients confirmed that all of the background continuous variables for histology-proven patients, except for neutrophil count, follow the same distributions as those of the other patients (Supporting Information Table S3). Therefore, the data of all patients, including the data of those who were diagnosed by BM aspiration alone, can be interpreted to represent the clinical characteristics of hMDS patients, even though the importance of diagnosing by BM biopsy cannot be overemphasized.

The OS of patients according to their initial treatments were also analyzed (Supporting Information Figure S5), but the OS between hMDS and non-hMDS did not exhibit statistically significant differences in any treatment, at least in part due to the limited sample sizes. Twenty-seven percent of hMDS patients received no treatments throughout the entire clinical courses, 17% were administered vitamins as their first treatment, and 10% underwent hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) as their initial treatments (Supporting Information Table S5).

4 | DISCUSSION

There have been a few reports of hMDS exhibiting poorer prognosis than aplastic anemia (AA) and better prognosis than non-hMDS, but they dealt with a limited number of hMDS patients, and a study with a larger sample size was desirable.^{6,17} Since IPSS-R has already been acknowledged worldwide, the prognosis of hMDS needs to be discussed according to IPSS-R.⁷ This study is the first multicenter study with the data of >100 hMDS patients on hMDS that dealt with IPSS-R. The fact that in neither OS nor AML-PFS did the hMDS patients differ significantly from non-hMDS patients in higher risk groups of IPSS-R may reflect some advantages of IPSS-R to predict high risk patients

compared with IPSS because in int-2 and high risk groups of IPSS, AML-PFS was significantly prolonged in hMDS patients. Furthermore, the very low–intermediate risk groups of hMDS exhibited higher OS and AML-PFS than those of non-hMDS patients with statistically significant differences, implying that treatments for hMDS patients in very low–intermediate risk groups of IPSS-R should be considered separately from those for non-hMDS in the same risk groups.

It is often difficult to distinguish hMDS from AA, because both the clinical courses and pathological findings of hMDS may overlap with those of AA, while treatments and prognosis of these two entities may differ.^{20–22} Although there have been several reports to propose the criteria for distinction, such as CD34-positive BM cell analysis and measurement of tumor necrosis factor receptors,^{21,23} the morphological study of the BM still remains the standard means to diagnose hMDS and distinguishing it from AA. The diagnosis of hMDS for the current study is based on the morphological dysplasia, but there remains the need for the methods of diagnosis with more objective criteria.²⁴

In addition to the finding in Table 1 that more than half of the hMDS patients were classified as RA in FAB classification, which coincides with the previously reported literature,⁶ it was exhibited in this study that there were significant differences between hMDS and non-hMDS in WHO classification. On the other hand, the marrow blast percentages of hMDS and non-hMDS were not significantly different, which yielded similar fractions of RAEB-1/2; therefore, the significant differences in WHO classification were mainly due to the higher percentage of RCUD and the lower percentage of RCMD. A recent study suggests that RCUD exhibits higher rates of OS than RCMD,²⁵ but the OS of hMDS in the current study did not exhibit statistically significant difference between RCUD and RCMD (data and graph not shown).

High hazard ratios of PS and karyotype risks for both OS and AML-PFS of hMDS patients in Cox proportional hazards analysis coincide with the previously published literature,^{26,27} but it was shown further in univariate Cox proportional hazards analysis that other factors such as the male gender, past illnesses and smoking habits can also be the risk factors of death and AML-progression for hMDS.

Competing risks analysis revealed that hMDS is less likely to progress to AML than non-hMDS, as Huang et al. exhibited.⁶ However, the anticipation that hMDS may have higher risk of death from BMF had never been confirmed before. Applying a criterion of death from BMF for the purpose of this study confirmed that hMDS has higher risk of death from BMF. Therefore, there may be some hMDS patients for whom myelo-suppressing therapies are not indicated.

The cytogenetic abnormalities of hMDS in this study were summarized into the karyotype risk groups of IPSS-R. According to Koh Y et al., the difference between the AML-PFS of hMDS patients with cytogenetic abnormalities and of those without were not significant.¹⁷ IPSS-R classifies some chromosomal abnormalities into the same risk group as the normal karyotype, and there exist some hMDS patients with chromosomal abnormalities that have more favorable outcomes than those without. Therefore, survival analyses by IPSS-R exhibited earlier may give more adequate assessments for the prognoses of hMDS.

Abnormalities in fluorescent in situ hybridization (FISH) were not dealt with in this study. It has been reported that AA positive of trisomy 1q by FISH progressed to acute leukemia frequently, whereas no single karyotype or FISH abnormality in hMDS predicted leukemic progression.¹⁷ Therefore, it is likely that FISH analysis for the data of hMDS patients in this study would not have yielded significant outcomes.

Another recent report suggests that hMDS acquires fewer somatic mutations than hyperplastic MDS, and exhibits genomic differences in driver clones when compared with hyperplastic MDS,²⁸ so a combined analysis of genetic data and clinical outcomes of hMDS in comparison with those of non-hMDS is also desired.

Comparison of OS between hMDS and non-hMDS according to the initial treatments did not exhibit statistically significant differences between hMDS and non-hMDS because of the limited sample size and also due to the fact that treatments for hMDS were selected at clinicians' own discretions. Therefore, treatment choices according to the characters and factors of the patients, as well as their adequacies, need to be investigated with even a larger size of population.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the National Research Group on Idiopathic Bone Marrow Failure Syndromes, granted by the Ministry of Health, Labour and Welfare (H26-Nanchi-Ippan-062).

CONFLICT OF INTERESTS

Mineo Kurokawa reports grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan, during the conduct of the study, grants from Kyowa Hakko Kirin Pharma Inc., grants from Nippon Shinyaku, Co., LTD., grants from Chugai Pharmaceutical Co. Ltd. outside the submitted work; personal fees from Kyowa Hakko Kirin Pharma Inc., personal fees from Nippon Shinyaku, Co., LTD., from Celgene Corporation outside the submitted work. Yasuhiro Nannya and Shunya Arai receive research funding from Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd. and honoraria from Novartis Pharma K. K. and Pfizer Japan, Inc.; Yuzuru Kanakura receives research funding from Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd., Nippon Shinyaku Co., Ltd., and Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.; Hitoshi Kiyoi receives research funding from Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd., Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., Zenyaku Kogyo Co., Ltd., Fujifilm Corporation, Nippon Boehringer Ingelheim Co., Ltd., Celgene Corporation, Astellas Pharma Inc., and Bristol-Myers Squibb, consultancy from Astellas Pharma Inc., and honoraria from Bristol-Myers Squibb; Akira Matsuda receives honoraria from Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd., Nippon Shinyaku Co., Ltd., Alexion Pharmaceuticals, Inc., Sanofi K.K., and GlaxoSmithKline K.K.; Naoyuki Katayama receives honoraria from Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd., Bristol-Myers Squibb, Nippon Shinyaku Co., Ltd., Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd., Pfizer Japn, Inc., Taisho Toyama Pharmaceutical Co., Ltd., Celgene Corporation, Alexion Pharmaceuticals, Inc., Shire Plc, Takeda Pharmaceutical Co., Ltd., Astellas Pharma Inc., Shionogi & Co., Ltd., Daiichi Sankyo Co., Ltd., and Eisai Co., Ltd., and research funding from Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd., Astellas Pharma

Inc., and Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.; Hirokazu Nagai receives research funding from Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd., and Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., and honoraria from Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.; Masayuki Hino receives research funding from Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd., Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., Teijin Ltd., Astellas Pharma Inc., Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd., Takeda Pharmaceutical Co., Ltd., Taiho Pharma, Japan Blood Products Organization, and Ono Pharmaceutical Co., Ltd.; Kensuke Usuki receives research funding from Symbio pharmaceuticals Ltd., MSD K. K., Fujimoto Pharmaceutical Corporation, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Astellas Pharma Inc., GlaxoSmithKline K. K., Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd., Novartis Pharma K. K., Shire Plc., Celgene Corporation, Pfizer Japan, Inc., and Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd., and honoraria from Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd., Novartis Pharma K. K., Bristol-Myers Squibb, and Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd.; Akifumi Takaori-Kondo receives honoraria from Bristol-Myers Squibb and Yanssen Pharmaceutical K.K., and research funding from Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd., Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., and Takeda Pharmaceutical Co., Ltd.; Hideo Harigae receives honoraria from Chugai Pharmaceutical Co., Ltd. and Celgene Corporation, and research funding from Novartis Pharma K. K., AbbVie GK, Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd., Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd., Astellas Pharma Inc., Ono Pharmaceutical Co., Ltd., Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation, and Takeda Pharmaceutical Co., Ltd.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

T. Kobayashi analyzed the data and wrote the manuscript; Y. Nannya designed the entire study and helped write the final version of the manuscript; K. Oritani, A. Tomita, M. Kobune, H. Kawabata, M. Shindo, Y. Yonemura, N. Hanaoka, D. Hasegawa, N. Fujishima, N. Fujii, Y. Morita, A. Matsuda, A. Fujieda, H. Suzuki, Y. Terada, and K. Sato collected the data; H. Kawabata offered the data base of the central review team of the National Research Group on Idiopathic Bone Marrow Failure Syndromes; M. Kurokawa supervised the entire study and wrote the manuscript; and all authors reviewed and approved the final version of the manuscript.

ORCID

Takashi Kobayashi  <http://orcid.org/0000-0001-7776-6846>

Osamu Imataki  <http://orcid.org/0000-0001-5332-1316>

Mineo Kurokawa  <http://orcid.org/0000-0002-4034-2422>

REFERENCES

- [1] Nand S, Godwin JE. Hypoplastic myelodysplastic syndrome. *Cancer*. 1988;62:958-964.
- [2] Maschek H, Kaloutsi V, Rodriguez-Kaiser M, et al. Hypoplastic myelodysplastic syndrome: incidence, morphology, cytogenetics, and prognosis. *Ann Hematol*. 1993;66:117-122.
- [3] Hartsock RJ, Smith EB, Petty CS. Normal variations with aging of the amount of hematopoietic tissue in bone marrow from the anterior iliac crest. A study made from 177 cases of sudden death examined by necropsy. *Am J Clin Pathol*. 1965;43:326-331.

- [4] Orazi A, Czader MB. Myelodysplastic syndromes. *Am J Clin Pathol*. 2009;132:290–305.
- [5] Tuzuner N, Cox C, Rowe JM, et al. Hypocellular myelodysplastic syndromes (MDS): new proposals. *Br J Haematol*. 1995;91:612–617.
- [6] Huang TC, Ko BS, Tang JL, et al. Comparison of hypoplastic myelodysplastic syndrome (MDS) with normo-/hypercellular MDS by International Prognostic Scoring System, cytogenetic and genetic studies. *Leukemia*. 2008;22:544–550.
- [7] Voso MT, Fenu S, Latagliata R, et al. Revised International Prognostic Scoring System (IPSS) predicts survival and leukemic evolution of myelodysplastic syndromes significantly better than IPSS and WHO Prognostic Scoring System: validation by the Gruppo Romano Mielo-displasie Italian Regional Database. *J Clin Oncol*. 2013;31:2671–2677.
- [8] Malcovati L, Hellström-Lindberg E, Bowen D, et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood*. 2013;122:2943–2964.
- [9] Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol*. 2002;20:2429–2440.
- [10] Jonášova A, Neuvirtová R, Cermák J, et al. Cyclosporin A therapy in hypoplastic MDS patients and certain refractory anaemias without hypoplastic bone marrow. *Br J Haematol*. 1998;100:304–309.
- [11] Atoyebi W, Bywater L, Rawlings L, et al. Treatment of myelodysplasia with oral cyclosporin. *Clin Lab Haematol*. 2002;24:211–214.
- [12] Gologan R, Ostroveanu D, Dobrea C, Gioadã L. Hypoplastic myelodysplastic syndrome transformed in acute myeloid leukemia after androgens and cyclosporin. A treatment. *Rom J Intern Med*. 2003;41:447–455.
- [13] Rzepecki P, Sarosiek T, Szczylik C. Alemtuzumab, fludarabine and melphalan as a conditioning therapy in severe aplastic anemia and hypoplastic myelodysplastic syndrome—single center experience. *Jpn J Clin Oncol*. 2006;36:46–49.
- [14] Kim H, Lee JH, Joo YD, et al. Cooperative Study Group A for Hematology (COHA). A randomized comparison of cyclophosphamide vs. reduced dose cyclophosphamide plus fludarabine for allogeneic hematopoietic cell transplantation in patients with aplastic anemia and hypoplastic myelodysplastic syndrome. *Ann Hematol*. 2012;91:1459–1469.
- [15] Hasegawa D, Chen X, Hirabayashi S, et al. Clinical characteristics and treatment outcome in 65 cases with refractory cytopenia of childhood defined according to the WHO 2008 classification. *Br J Haematol*. 2014;166:758–766.
- [16] Yoshida Y, Oguma S, Uchino H, Maekawa T. Refractory myelodysplastic anaemias with hypocellular bone marrow. *J Clin Pathol*. 1988;41:763–767.
- [17] Koh Y, Lee HR, Song EY, et al. Hypoplastic myelodysplastic syndrome (h-MDS) is a distinctive clinical entity with poorer prognosis and frequent karyotypic and FISH abnormalities compared to aplastic anemia (AA). *Leuk Res*. 2010;34:1344–1350.
- [18] Akaike H. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In: Petrov BN, Csáki F, eds. 2nd International Symposium on Information Theory, Tsahkadsor, Armenia, USSR, September 2–8, 1971. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1973:267–281.
- [19] Conover WJ. *Practical Nonparametric Statistics*. New York, NY: John Wiley & Sons; 1971.
- [20] Barrett J, Sauntharajah Y, Molldrem J. Myelodysplastic syndrome and aplastic anemia: distinct entities or diseases linked by a common pathophysiology? *Semin Hematol*. 2000;37:15–29.
- [21] Matsui WH, Brodsky RA, Smith BD, et al. Quantitative analysis of bone marrow CD34 cells in aplastic anemia and hypoplastic myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2006;20:458–462.
- [22] Young NS. Acquired aplastic anemia. *Ann Intern Med*. 2002;136:534–546.
- [23] Kasahara S, Hara T, Itoh H, et al. Hypoplastic myelodysplastic syndromes can be distinguished from acquired aplastic anaemia by bone marrow stem cell expression of the tumour necrosis factor receptor. *Br J Haematol*. 2002;118:181–188.
- [24] Della Porta MG, Travaglino E, Boveri E, et al. Minimal morphological criteria for defining bone marrow dysplasia: a basis for clinical implementation of WHO classification of myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2015;29:66–75.
- [25] Maassen A, Strupp C, Giagounidis A, et al. Validation and proposals for a refinement of the WHO 2008 classification of myelodysplastic syndromes without excess of blasts. *Leuk Res*. 2013;37:64–70.
- [26] Wang R, Gross CP, Halene S, Ma X. Comorbidities and survival in a large cohort of patients with newly diagnosed myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2009;33:1594–1598.
- [27] Bernasconi P, Alessandrino EP, Boni M, et al. Karyotype in myelodysplastic syndromes: relations to morphology, clinical evolution, and survival. *Am J Hematol*. 1994;46:270–277.
- [28] Nazha A, Seastone D, Radivoyevitch T, et al. Genomic patterns associated with hypoplastic compared to hyperplastic myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2015;100:e434–e437.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Kobayashi T, Nannya Y, Ichikawa M, et al. A nationwide survey of hypoplastic myelodysplastic syndrome (a multicenter retrospective study). *Am J Hematol*. 2017;92:1324–1332. <https://doi.org/10.1002/ajh.24905>

Clinical utility of next-generation sequencing for inherited bone marrow failure syndromes

Hideki Muramatsu, MD, PhD¹, Yusuke Okuno, MD, PhD¹, Kenichi Yoshida, MD, PhD², Yuichi Shiraishi, PhD³, Sayoko Doisaki, MD, PhD¹, Atsushi Narita, MD, PhD¹, Hirotochi Sakaguchi, MD, PhD¹, Nozomu Kawashima, MD, PhD¹, Xinan Wang, MD, PhD¹, Yinyan Xu, MD, PhD¹, Kenichi Chiba, PhD³, Hiroko Tanaka, PhD³, Asahito Hama, MD, PhD¹, Masashi Sanada, MD, PhD^{2,4}, Yoshiyuki Takahashi, MD, PhD¹, Hitoshi Kanno, MD, PhD⁵, Hiroki Yamaguchi, MD, PhD⁶, Shouichi Ohga, MD, PhD⁷, Atsushi Manabe, MD, PhD⁸, Hideo Harigae, MD, PhD⁹, Shinji Kunishima, PhD⁴, Eiichi Ishii, MD, PhD¹⁰, Masao Kobayashi, MD, PhD¹¹, Kenichi Koike, MD, PhD¹², Kenichiro Watanabe, MD, PhD¹³, Etsuro Ito, MD, PhD¹⁴, Minoru Takata, MD, PhD¹⁵, Miharuru Yabe, MD, PhD¹⁶, Seishi Ogawa, MD, PhD², Satoru Miyano, PhD^{3,17} and Seiji Kojima, MD, PhD¹

Purpose: Precise genetic diagnosis of inherited bone marrow failure syndromes (IBMFS), a heterogeneous group of genetic disorders, is challenging but essential for precise clinical decision making.

Methods: We analyzed 121 IBMFS patients using a targeted sequencing covering 184 associated genes and 250 IBMFS patients using whole-exome sequencing (WES).

Results: We achieved successful genetic diagnoses for 53 of 121 patients (44%) using targeted sequencing and for 68 of 250 patients (27%) using WES. In the majority of cases (targeted sequencing: 45/53, 85%; WES: 63/68, 93%), the detected variants were concordant

with, and therefore supported, the clinical diagnoses. However, in the remaining 13 cases (8 patients by target sequencing and 5 patients by WES), the clinical diagnoses were incompatible with the detected variants.

Conclusion: Our approach utilizing targeted sequencing and WES achieved satisfactory diagnostic rates and supported the efficacy of massive parallel sequencing as a diagnostic tool for IBMFS.

Genet Med advance online publication 19 January 2017

Key Words: Fanconi anemia; inherited bone marrow failure; next-generation sequencing; target sequencing; whole-exome sequencing

INTRODUCTION

Inherited bone marrow failure syndromes (IBMFS) are part of a heterogeneous disease category involving a family history in which at least one hematopoietic cell lineage is decreased in the bone marrow. IBMFS consist of more than 25 defined disease entities, including Fanconi anemia (FA), Diamond-Blackfan anemia (DBA), and dyskeratosis congenita (DC).¹ Certain IBMFS have been associated with an increased risk of secondary malignancies. The diagnosis is based on hematological

and physical findings with the aid of several disease-specific diagnostic tests such as the chromosomal breakage test for FA and molecular diagnosis with conventional Sanger sequencing for a very limited number of the causative genes. With recent advances in clinical molecular studies that revealed a considerable amount of pathognomonic molecular lesions in IBMFS,²⁻⁴ the role of genetic tests has become more important in the diagnosis of these diseases. However, because clinical and laboratory findings can overlap among different IBMFS, the selection

The first three authors contributed equally to this work.

¹Department of Pediatrics, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan; ²Department of Pathology and Tumor Biology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan; ³Laboratory of DNA Information Analysis, Human Genome Center, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan; ⁴Department of Advanced Diagnosis, Clinical Research Center, National Hospital Organization Nagoya Medical Center, Nagoya, Japan; ⁵Department of Transfusion Medicine and Cell Processing, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan; ⁶Department of Hematology, Nippon Medical School, Tokyo, Japan; ⁷Department of Pediatrics, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, Ube, Japan; ⁸Department of Pediatrics, St. Luke's International Hospital, Tokyo, Japan; ⁹Department of Hematology and Rheumatology, Tohoku University Graduate School, Sendai, Japan; ¹⁰Department of Pediatrics, Ehime University Graduate School of Medicine, Ehime, Japan; ¹¹Department of Pediatrics, Hiroshima University Hospital, Hiroshima, Japan; ¹²Department of Pediatrics, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto, Japan; ¹³Department of Hematology/Oncology, Shizuoka Children's Hospital, Shizuoka, Japan; ¹⁴Department of Pediatrics, Hirosaki University Graduate School of Medicine, Hirosaki, Japan; ¹⁵Laboratory of DNA Damage Signaling, Department of Late Effects Studies, Radiation Biology Center, Kyoto University, Kyoto, Japan; ¹⁶Department of Cell Transplantation and Regenerative Medicine, Tokai University Hospital, Isehara, Japan; ¹⁷Laboratory of Sequence Analysis, Human Genome Center, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan. Correspondence: Seiji Kojima (kojimas@med.nagoya-u.ac.jp)

Submitted 15 September 2016; accepted 16 October 2016; advance online publication 19 January 2017. doi:10.1038/gim.2016.197

of targeted genes for genetic diagnosis is difficult. Therefore, a comprehensive genetic diagnostic approach is warranted for patients with a suspicious diagnosis of IBMFS due to the increased number of genes to be analyzed.

Next-generation sequencing (NGS) encompasses a broad range of techniques that enable the simultaneous sequencing of a massive amount of nucleic acid molecules.⁵ These complementary approaches include targeted gene sequencing, whole-exome sequencing (WES), and whole-genome sequencing (WGS), each with distinct advantages and disadvantages. Compared with WES/WGS, targeted gene sequencing is a relatively inexpensive approach for the identification of pathogenic mutations in more than 100 genes and has relatively higher sequence coverage. NGS has been used for research studies regarding certain IBMFS, but its clinical utility is limited. Only two studies used targeted gene sequencing with NGS technology to diagnose patients with distinct IBMFS.^{6,7} The majority of these patients had previously undergone extensive genetic testing, all of which yielded negative results. Targeted gene sequencing efficiently identified causative mutations in both studies, which supported the utilization of NGS for genetic screening of patients with IBMFS.

In this study, we developed a targeted gene sequencing platform with 184 genes that were specifically designed for the diagnosis of IBMFS. This platform was used as a first-line diagnostic test for 121 patients clinically diagnosed with IBMFS. In addition, we performed diagnostic WES for 250 patients with IBMFS who could not be genetically diagnosed using conventional genetic tests.

MATERIALS AND METHODS

Patients for targeted sequencing

A total of 121 consecutive patients who were clinically diagnosed with IBMFS at Nagoya University Hospital and other nationwide institutions were included in this study. None of the patients had previously undergone genetic tests. Clinical diagnoses included DBA ($n = 26$), DC ($n = 13$), FA ($n = 22$), Shwachman-Diamond syndrome (SDS, $n = 6$), severe congenital neutropenia (SCN, $n = 7$), other anemia ($n = 21$), other neutropenia ($n = 3$), other thrombocytopenia ($n = 13$), and other bone marrow failure (BMF) (cytopenia with ≥ 2 lineages; $n = 10$) (Table 1, Supplementary Table S1 online and Supplementary Figure S1 online).

Whole-exome sequencing of patients

In 2011, we established a government-supported nationwide program, the Research on Measures for Intractable Diseases Project of the Ministry of Health, Labor, and Welfare, for rare inherited blood disorders. As of December 2013, a total of 733 patients were registered with the program (Supplementary Table S1 online) and had clinical diagnoses including FA ($n = 117$), DBA ($n = 110$), congenital hemolytic anemia (HA; $n = 261$), DC ($n = 62$), congenital dyserythropoietic anemia (CDA; $n = 21$), congenital sideroblastic anemia (CSA; $n = 34$), congenital amegakaryocytic thrombocytopenia (CAMT; $n = 10$),

hereditary hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH; $n = 65$), SCN ($n = 47$), and unclassified IBMFS ($n = 6$). Conventional genotyping such as Sanger sequencing had confirmed the clinical diagnoses of 262 patients; however, no causative candidate germline variants were identified ($n = 267$) or no genotyping was performed ($n = 204$) for the remaining 471 patients. Of these 471 patients, 250 patients with FA ($n = 73$), DBA ($n = 61$), HA ($n = 44$), DC ($n = 29$), CDA ($n = 12$), CSA ($n = 9$), CAMT ($n = 7$), HLH ($n = 6$), SCN ($n = 3$), and unclassified IBMFS ($n = 6$) were enrolled in the present study (Table 2, Supplementary Tables S2 and S3 online). Most of these patients (182/250, 73%) underwent various genetic tests with negative results before WES analysis, whereas the remaining 68 (27%) patients were not evaluated with genetic tests other than WES.

Sample preparation and next-generation sequencing

Written informed consent was obtained from patients or their legal guardians. This study was approved by the ethics committees of Nagoya University Graduate School of Medicine and Graduate School of Medicine, Kyoto University.

Genomic DNA was extracted from peripheral blood, bone marrow, and Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cell lines (EBV-LCL) using a QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). For targeted sequencing, the target region of the genomic DNA was enriched using SureSelect custom bait (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) covering the exons and 10 bases surrounding the exons of 184 genes (Supplementary Table S4 online). For WES, genomic DNA was captured using SureSelect Human All Exon 50M, V4, or V5 Kits (Agilent Technologies). Captured genomic DNA was analyzed by massively parallel sequencing using a HiSeq 2000 or 2500 (Illumina, San Diego, CA) next-generation sequencer with a 100×2 paired-end option.

Detection of causative variants

We detected germline variants using our established pipeline (Genomon-exome, <http://genomon.hgc.jp/exome/>). In brief, sequence reads were aligned to the hg19 reference genome using the Burrows-Wheeler Aligner; variants were detected using our in-house variant caller. Variant allele frequency (VAF) >0.2 (20%) was used as the cut-off value.

Following the guidelines published by the American College of Medical Genetics and Genomics,⁸ we removed common single-nucleotide polymorphisms (SNPs) showing minor allele frequency values of more than 1% in (i) the ESP6500 exome variant server (the National Heart, Lung, and Blood Institute Exome Sequencing Project, Seattle, WA; <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>, as of April 2014); (ii) the 1000 genomes project;⁹ or (iii) our in-house SNP database.¹⁰ These variants were considered the causative variants that were previously reported to be pathogenic (category 1) or were otherwise highly expected to cause the associated disorders (e.g., nonsense, frameshift, and splice site variants) (category 2). Other variants of unknown significance such as missense variants without further evidence of pathogenicity were treated as

Table 1 Summary of clinical and genetic diagnosis by target sequencing

Categories of clinical diagnosis	N	Patients with genetic diagnosis	Clinical and genetic diagnosis		Identified gene mutations (n)
			Matched	Unmatched	
FA	22	15 (68%)	15	0	FANCA (11), FANCF (1), FANCG (3)
DBA	26	12 (46%)	11	1	RPL5 (3), RPS17 (3), RPS19 (4), RPS24 (1), SPTB (1)
CHA	8	4 (50%)	4	0	PIEZO1 (2), SPTB (2)
DC	13	5 (38%)	4	1	DKC1 (2), SBDS (1), TINF2 (2)
CDA	9	2 (22%)	2	0	KLF1 (1), CDAN1 (1)
CSA	4	2 (50%)	2	0	ALAS2 (1), SLC25A38 (1)
CAMT	2	1 (50%)	0	1	RUNX1 (1)
HLH	0	0	0	0	-
SCN	7	2 (29%)	2	0	ELANE (1), HAX1 (1)
SDS	6	4 (67%)	4	0	SBDS (4)
Other neutropenia	3	0	0	0	-
Other thrombocytopenia	11	3 (27%)	1	2	RUNX1 (2), VWF (1)
Other BMF	10	3 (30%)	0	3	FANCG (1), RPL5 (1), SBDS (1)
Total cohort	121	53 (44%)	45	8	

BMF, bone marrow failure; CAMT, congenital amegaryocytic thrombocytopenia; CDA, congenital dyserythropoietic anemia; CHA, congenital hemolytic anemia; CSA, congenital sideroblastic anemia; DBA, Diamond-Blackfan anemia; DC, dyskeratosis congenita; FA, Fanconi anemia; HLH, hereditary hemophagocytic lymphohistiocytosis; SCN, severe congenital neutropenia; SDS, Shwachman-Diamond syndrome.

Table 2 Summary of genetic diagnoses by whole-exome sequencing

Categories of clinical diagnosis	Total cohort		Without previous genetic tests		With previous genetic tests		Clinical and genetic diagnoses		Identified gene mutations (n)
	N	Patients with genetic diagnosis	n	Patients with genetic diagnosis	n	Patients with genetic diagnosis	Matched	Unmatched	
FA	73	35 (48%)	16	10 (63%)	57	25 (44%)	35	0	FANCG (17), FANCA (14), FANCB (1), FANCF (1), SLX4 (1), BRCA2 (1)
DBA	61	11 (18%)	0	0	61	11 (18%)	11	0	RPS26 (3), RPS7 (2), RPS19 (2), RPL5 (2), RPL35A (1), RPL11 (1)
HA	44	7 (16%)	44	7 (16%)	0	0	6	1	SPTA1 (2), SPTB (2), ANK1 (2), CDAN1 (1)
DC	29	7 (24%)	2	1 (50%)	27	6 (22%)	7	0	TERT (3), TINF2 (2), DKC1 (2)
CDA	12	3 (25%)	0	0	12	3 (25%)	1	2	CDAN1 (1), SPTA1 (1), ANK1 (1)
CSA	9	0	0	0	9	0	0	0	
CAMT	7	1 (14%)	0	0	7	1 (14%)	0	1	TINF2 (1)
HLH	6	3 (50%)	0	0	6	3 (50%)	2	1	UNC13D (1), XIAP (1), MVK (1)
SCN	3	0	0	0	3	0	0	0	
SDS	0	0	0	0	0	0	0	0	
Other BMF	6	1 (17%)	6	1 (17%)	0	0	1	0	RUNX1 (1)
Total	250	68 (27%)	68	19 (28%)	182	49 (27%)	63	5	

BMF, bone marrow failure; CAMT, congenital amegaryocytic thrombocytopenia; CDA, congenital dyserythropoietic anemia; CSA, congenital sideroblastic anemia; DBA, Diamond-Blackfan anemia; DC, dyskeratosis congenita; FA, Fanconi anemia; HA, hemolytic anemia; HLH, hereditary hemophagocytic lymphohistiocytosis; SCN, severe congenital neutropenia; SDS, Shwachman-Diamond syndrome.

non-diagnostic in this study. For the specific pathogenicity of each variant, we used the Human Genome Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>, as of March 2014) and performed an extensive search of the literature in PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). The results of the literature search were discussed with physicians who were experts in that particular disease area and genetic diagnoses were made based on the mode of inheritance of each disease. Finally, causative variants were validated by Sanger sequencing.

Using targeted sequencing data, we performed copy-number analysis as described previously.¹¹ In brief, the coverage of each exon normalized by the mean coverage of the entire sample was compared with that of 12 unrelated reference samples. Exons exhibiting normalized coverage greater than 3 standard deviations from the coverage of reference samples were determined to be candidates for copy-number alterations. All candidate exons were visually inspected using the Integrative Genomics Viewer.

RESULTS

Genetic diagnosis by targeted sequencing

Capture-based targeted sequencing covered 99.4% of the target region in 184 genes with more than 20 independent reads. With this coverage, our in-house pipeline detected 227 (201–267) coding variants per patient, of which common SNPs with >1% minor allele frequency accounted for 97% of all detected variants. In total, we identified 69 variants that were considered to be in category 1 (i.e., previously reported alleles) or category 2 (i.e., previously unknown but highly probable variants within known causative genes for each disease subtype). In addition, we were able to identify pathognomonic copy-number aberrations in 11 patients (*FANCA* ($n = 5$; UPN-1028, -1082, -1084, -1372, and -1373), *RPS17* ($n = 3$; UPN-1174, -1186, and -1304), *RUNX1* ($n = 1$, UPN-1222), *SBDS* ($n = 1$, UPN-1212), and *SPTB* ($n = 1$, UPN-1350) (Figure 1).

We calculated genetic diagnostic rates by our targeted sequencing pipeline based on the estimated mode of inheritance. For instance, we genetically diagnosed patients harboring homozygous or compound heterozygous mutations of known causative genes for autosomal recessive diseases such as FA. Patients with a clinical diagnosis of FA (15/22, 68%) and SDS (4/6, 67%) achieved relatively high genetic diagnostic rates. The genetic diagnosis was achieved in approximately half of the patients with DBA (12/26, 46%) and DC (5/13, 38%). Genetic diagnostic rates of other categories were as follows: SCN (2/7, 29%), other anemia (9/21, 43%), other neutropenia (0/3, 0%), other thrombocytopenia (4/13, 33%), and other BMF (3/10,

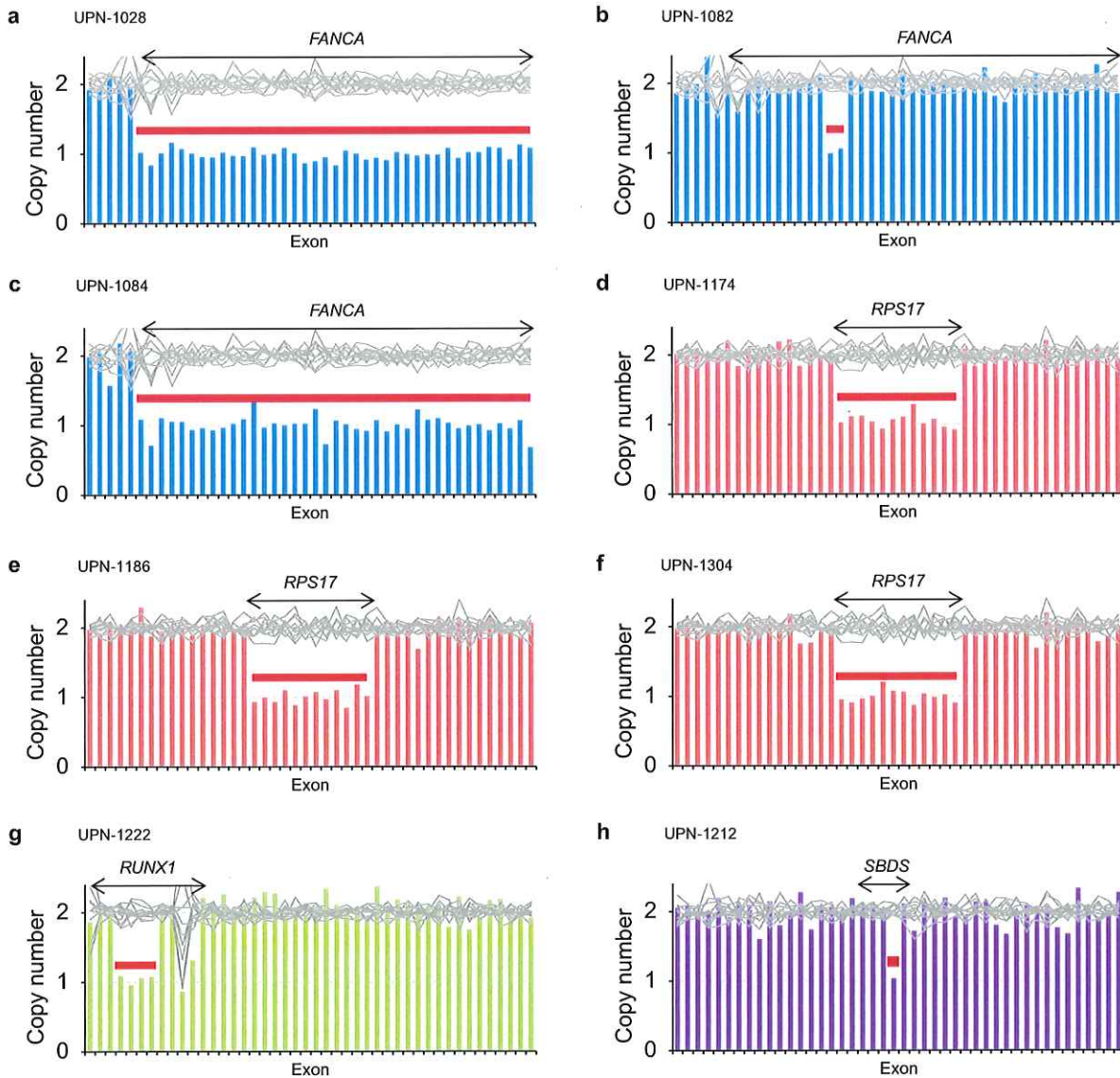


Figure 1 Copy-number analysis. The estimated copy number of each exon was based on the number of reads obtained from the targeted sequence. Analysis revealed pathogenic heterozygous gene deletion in eight patients. Each bar represents an exon and the y-axis represents the estimated copy numbers. Gray lines indicate estimated copy numbers obtained from 12 unrelated samples. Red bars indicate estimated deleted regions.

30%). In total, our targeted sequencing pipeline genetically diagnosed 53 of 121 patients (44%) (Table 1, Supplementary Table S1 online). No patient had two or more genetic diagnoses.

Genetic diagnosis by whole-exome sequencing

WES covered more than 80% (56%–91% with SureSelect 50M) to 90% (79–98% with SureSelect V4 or V5) of the coding region with more than 20 independent reads (Supplementary Figure S2 online). At this coverage level, our in-house pipeline detected 19,574 (13,811–21,945) coding variants per patient. Common SNPs with >1% minor allele frequency accounted for 97% of all detected variants.

We identified 64 category 1 variants (previously reported alleles) and 23 category 2 variants (previously unknown but highly probable variants within known causative genes for each disease subtype) (Supplementary Table S3 online). These 87 variants established genetic diagnoses for 68 (27%) patients (Table 2). Diagnostic efficacy was comparable between patients with or without prior genetic testing (26 and 27%, respectively). No patient received more than one genetic diagnosis.

The highest diagnostic efficacy was achieved in patients with FA; in these patients, one or more highly putative causative variants were detected by WES in 35 of 73 patients (48%), followed by DBA (11/61, 18%), HA (7/44, 16%), DC (7/29, 24%), CDA (3/12, 25%), and HLH (3/6, 50%). In contrast, candidate variants were detected or otherwise not identified in only a small fraction of patients with CSA (0/9), CAMT (1/7), and SCN (0/3).

Discordance between clinical diagnosis and genetic variants by targeted sequencing and whole-exome sequencing

In the majority of cases (target sequencing: 45/53, 85%; WES: 63/68, 93%), the detected variants were concordant with, and therefore supported, the clinical diagnoses. However, for the remaining 13 cases (8 patients by target sequencing and 5 patients by WES), the clinical diagnoses were incompatible with the detected variants (Table 3, Supplementary Data online).

UPN-1350, one of the discordant patients clinically diagnosed with DBA, harbored a known pathognomonic *SPTB* gene deletion and was genetically diagnosed as hereditary spherocytosis. Two patients with thrombocytopenia (congenital amegakaryocytic thrombocytopenia (UPN-1222) and idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP); UPN-1277) were reallocated as familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy (FPD/AML) with *RUNX1* gene alterations¹² (microdeletion (UPN-1222, Figure 1) and p.P330fs (UPN-1277)). Three patients had IBMFS but not otherwise specified obtained genetic diagnoses as a result of our analysis (UPN-1324, DBA; UPN-1348, SDS; and UPN-1355, FA). Similarly, genetic sequencing analysis corrected the diagnoses of two other patients (UPN-1289 (from DC to SDS) and UPN-1098 (from chronic ITP to von Willebrand disease (VWD) 2B)). In UPN-355, the initial clinical diagnosis was HA, but the detected variants (*CDAN1* p.N599S and p.P146fs) supported the diagnosis of CDA. Conversely, in UPN-216 and UPN-485, the suspected clinical diagnosis of CDA was revised to

Table 3 Genetic diagnoses unmatched with clinical diagnoses

UPN	Sequencing	Clinical Dx	Genetic Dx	Gene mutation (1)	Zygoty	Gene mutation (2)	Zygoty
UPN-1350	Target	DBA	Hereditary spherocytosis	<i>SPTB</i> Deletion	Hetero		
UPN-1289	Target	DC	SDS	<i>SBDS</i> p.K33E	Hetero	<i>SBDS</i> p.244_245del	Hetero
UPN-1098	Target	Chronic ITP	VWD 2B	<i>VWF</i> p.A1461D	Hetero		
UPN-1222	Target	CAMT	FPD/AML	<i>RUNX1</i> Deletion	Hetero		
UPN-1277	Target	ITP	FPD/AML	<i>RUNX1</i> p.P330fs	Hetero		
UPN-1324	Target	IBMFS, NOS	DBA	<i>RPL5</i> p.Y219X	Hetero		
UPN-1348	Target	IBMFS, NOS	SDS	<i>SBDS</i> p.K62X	Hetero	<i>SBDS</i> Splice site (c.258+2T>C)	Hetero
UPN-1355	Target	IBMFS, NOS	FA	<i>FANCG</i> p.Q356X	Hetero	<i>FANCG</i> Splice site (c.307+1G>C)	Hetero
UPN-355	WES	HA	CDA	<i>CDAN1</i> p.N599S	Hetero	<i>CDAN1</i> p.P146RfsX9	Hetero
UPN-216	WES	CDA	HA	<i>SPTA1</i> p.R28H	Hetero		
UPN-485	WES	CDA	HA	<i>ANK1</i> p.R935X	Hetero		
UPN-83	WES	CAMT	DC	<i>TINF2</i> p.R276X	Hetero		
UPN-312	WES	HLH	Hyper IgD syndrome	<i>MVK</i> Splice site (c.227-1G>A)	Hetero		

CAMT, congenital amegakaryocytic thrombocytopenia; DBA, Diamond-Blackfan anemia; DC, dyskeratosis congenita; Dx, diagnosis; FA, Fanconi anemia; FPD/AML, familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy; Hetero, heterozygous; ITP, idiopathic thrombocytopenic purpura; IBMFS, inherited bone marrow failure syndrome; NOS, not otherwise specified; SDS, Shwachman-Diamond syndrome; UPN, unique patient number; VWD, von Willebrand disease; WES, whole-exome sequencing.

HA as a result of identification of mutations (*SPTA1* p.R28H in UPN-216 and *ANK1* p.R935X in UPN-485) that are typically associated with HA. In these cases, the inconsistency was most likely due to an overlap of clinical phenotypes between HA and CDA; both of which are characterized by hemolysis. In UPN-83, a patient clinically diagnosed with possible CAMT, the genetic diagnosis of DC was reached with causative variants in *TINF2* (p.R276X). In UPN-312, the clinical diagnosis of HLH was revised to hyperimmunoglobulin D syndrome, a type of hyperinflammatory syndrome, based on the causative variants in *MVK* (p.A147T and c.227-1G>A).

DISCUSSION

Recent advances in genetic research identified a large number of causative genes of IBMFS and reinforced the need for a comprehensive genetic diagnostic system in both clinical practice and research.⁶ Here, we developed a molecular diagnostic system using WES and a targeted sequencing pipeline covering 184 associated genes for IBMFS. We were successful in providing genetic diagnoses for 53 of 121 patients (44%) by targeted sequencing (Table 1) and for 68 of 250 patients (27%) by WES (Table 2). Although the possibility of concomitant diagnoses remains, 13 patients with discordant clinical and genetic diagnoses clearly demonstrated the clinical value of next-generation sequencing (Table 3).

The diagnostic rate of our targeted sequencing platform was significantly higher than those demonstrated in a previous study by Zhang *et al.*⁶ (53/121 (44%) vs. 17/85 (20%); $P < 0.001$), thus reflecting the difference between patient characteristics and genetic regions covered. Although we used a non-biased approach analyzing 121 consecutive patients who were clinically suspected to have IBMFS without preceding genetic screening, Zhang *et al.* resequenced patients who remained unclassified after a conventional genetic workup using a sequencing platform with a smaller gene number (85 genes) and a lower coverage rate ($>10\times$ coverage in 98.2% of bases).⁶ Nine patients in our study had diagnostic variants in four genes that were not included in the gene panel of Zhang *et al.* (*PIEZO1* ($n = 2$), *RPS17* ($n = 3$), *SPTB* ($n = 3$), and *VWF* ($n = 1$)). Ghemla *et al.* reported similar diagnostic rates (59/158, 37%) using a multiplex polymerase chain reaction (PCR) platform covering 72 genes⁷; however, the detection rate of copy-number variants was significantly lower than that of our study (2/158 (2%) vs. 11/121 (9%); $P = 0.003$), thus reflecting the superiority of the capture-based platform over multiplex PCR in copy-number analysis. In addition, 10 patients in our study had diagnostic variants in 7 genes that were not included in the gene panel utilized by Ghemla *et al.* (*ALAS2* ($n = 1$), *CDAN1* ($n = 1$), *KLF1* ($n = 1$), *PIEZO1* ($n = 2$), *SLC25A38* ($n = 1$), *SPTB* ($n = 3$), and *VWF* ($n = 1$)).

Unsuspected genetic diagnosis has a positive effect on the clinical management of patients, particularly for gene mutations conferring cancer predisposition. Patients with most categories of IBMFS, including DBA,¹³ DC,¹⁴ FA,¹⁵ SDS,¹⁶ and SCN,¹⁷ have a significantly higher probability of hematological

malignancies than the general population. In addition, we identified three *RUNX1* gene alterations (mutation/deletion) among four patients with thrombocytopenia in the targeted sequencing cohort who were diagnosed with FPD/AML. All three patients developed thrombocytopenia during infancy, suggesting that FPD/AML should be included in the differential diagnosis of infantile thrombocytopenia. In total, we genetically diagnosed 43 patients with cancer predisposition in the targeted sequencing cohort (DBA, $n = 12$; DC, $n = 4$; FA, $n = 16$; SDS, $n = 6$; SCN, $n = 2$; FPD/AML, $n = 3$) and 55 patients in the WES cohort (DBA, $n = 11$; DC, $n = 8$; FA, $n = 35$; FPD/AML, $n = 1$). These patients need to be continually and regularly evaluated by complete blood counts and physical examination to screen for the development of hematological malignancies. In addition, appropriate genetic counseling and familial genetic screening are mandatory.

The diagnostic rate of WES was inferior to that of target sequencing (53/121 (44%) vs. 68/250 (27%); $P = 0.002$), mainly due to the conventional genetic testing conducted before enrollment in the WES cohort. For example, the highest diagnostic rate was demonstrated for FA (15/22, 68%) in the target sequencing cohort, reflecting the ability of the chromosomal breakage test to achieve a precise clinical diagnosis. In contrast, the diagnostic efficacy of WES in patients with FA and prior genetic testing tended to be lower (43%, 25/57), whereas WES in patients with FA without prior genetic testing showed diagnostic rates (62%, 10/16) comparable to that of target sequencing. In addition, our target sequencing platform was able to identify copy-number variants in 11 of 121 patients (9%); however, we could not perform a reliable copy-number analysis in the WES cohort due to relatively low coverage.

Compared to WES, targeted sequencing can achieve similar results at a lower cost for sequencing and computing resources. Although we did not identify any incidental, medically actionable genetic discovery that was not associated with the targeted hematological disease categories in our WES cohort, targeted sequencing could decrease the risk of incidental genetic discovery, which may cause serious ethical problems in a clinical setting.¹⁸

Future accumulation of data regarding genotype-phenotype correlation and functional studies of variants with unknown significance will promote the accuracy of genetic testing for IBMFS. The diagnostic yield of our WES analysis (27%) suggested the insufficiency of current knowledge about missense mutations. A combination of WES and array comparative genomic hybridization, RNA sequencing, and capture sequencing of intron lesions may complement efforts to find small deletion and splicing defects caused by missense, synonymous, and deep-in-intron variants in known causative genes.¹⁹ In addition, WES/WGS applications will certainly identify novel IBMFS causative genes, which should continue to increase the genetic diagnostic rate of next-generation sequencing.^{20,21} In this context, periodic reanalysis of the results is desirable. Furthermore, a meticulous combination of clinical judgment and analysis with genetic information is required.

In summary, we analyzed 371 IBMFS patients with two next-generation sequencing platforms and successfully diagnosed 53 of 121 (44%) and 68 of 250 (27%) patients using target sequencing and WES, respectively. Our results demonstrate the efficacy of massive parallel sequencing as a diagnostic tool for IBMFS in clinical practice.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is linked to the online version of the paper at <http://www.nature.com/gim>

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Research on Measures for Intractable Diseases Project from Ministry of Health, Labor, and Welfare and a grant-in-aid from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan (H23-TA012). The authors thank all the clinicians, patients, and families who made this study possible by providing samples. The authors also thank Yoshie Miura, Yuko Imanishi, Akitaka Sugishita, and Hiroe Namizaki for their valuable assistance. The authors acknowledge the Division for Medical Research Engineering, Nagoya University Graduate School of Medicine for technical support of the NGS. The authors acknowledge the Human Genome Center, Institute of Medical Science, University of Tokyo for providing supercomputing resources (<http://sc.hgc.jp/shirokane.html>). Finally, the authors are grateful to Enago (<http://www.enago.jp>) for the English-language review.

DISCLOSURE

S.K. received a research grant from Sanofi K.K. The other authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Sakaguchi H, Nakanishi K, Kojima S. Inherited bone marrow failure syndromes in 2012. *Int J Hematol* 2013;97:20–29.
2. Longerich S, Li J, Xiong Y, Sung P, Kupfer GM. Stress and DNA repair biology of the Fanconi anemia pathway. *Blood* 2014;124:2812–2819.
3. Ruggero D, Shimamura A. Marrow failure: a window into ribosome biology. *Blood* 2014;124:2784–2792.
4. Townsley DM, Dumitriu B, Young NS. Bone marrow failure and the telomeropathies. *Blood* 2014;124:2775–2783.
5. Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, *et al.* Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet* 2011;12:745–755.
6. Zhang MY, Keel SB, Walsh T, *et al.* Genomic analysis of bone marrow failure and myelodysplastic syndromes reveals phenotypic and diagnostic complexity. *Haematologica* 2015;100:42–48.
7. Ghemlas I, Li H, Zlateska B, *et al.* Improving diagnostic precision, care and syndrome definitions using comprehensive next-generation sequencing for the inherited bone marrow failure syndromes. *J Med Genet* 2015;52:575–584.
8. Richards CS, Bale S, Bellissimo DB, *et al.*; Molecular Subcommittee of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. ACMG recommendations for standards for interpretation and reporting of sequence variations: revisions 2007. *Genet Med* 2008;10:294–300.
9. Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, *et al.*; 1000 Genomes Project Consortium. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 2012;491:56–65.
10. Kunishima S, Okuno Y, Yoshida K, *et al.* ACTN1 mutations cause congenital macrothrombocytopenia. *Am J Hum Genet* 2013;92:431–438.
11. Sakaguchi H, Okuno Y, Muramatsu H, *et al.* Exome sequencing identifies secondary mutations of SETBP1 and JAK3 in juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat Genet* 2013;45:937–941.
12. Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, *et al.* Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet* 1999;23:166–175.
13. Vlachos A, Rosenberg PS, Atsidaftos E, Alter BP, Lipton JM. Incidence of neoplasia in Diamond Blackfan anemia: a report from the Diamond Blackfan Anemia Registry. *Blood* 2012;119:3815–3819.
14. Alter BP, Giri N, Savage SA, Rosenberg PS. Cancer in dyskeratosis congenita. *Blood* 2009;113:6549–6557.
15. Kutler DI, Singh B, Satagopan J, *et al.* A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood* 2003;101:1249–1256.
16. Myers KC, Bolyard AA, Otto B, *et al.* Variable clinical presentation of Shwachman-Diamond syndrome: update from the North American Shwachman-Diamond Syndrome Registry. *J Pediatr* 2014;164:866–870.
17. Welte K, Zeidler C. Severe congenital neutropenia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009;23:307–320.
18. Amendola LM, Dorschner MO, Robertson PD, *et al.* Actionable exomic incidental findings in 6503 participants: challenges of variant classification. *Genome Res* 2015;25:305–315.
19. Chandrasekharappa SC, Lach FP, Kimble DC, *et al.*; NISC Comparative Sequencing Program. Massively parallel sequencing, aCGH, and RNA-Seq technologies provide a comprehensive molecular diagnosis of Fanconi anemia. *Blood* 2013;121:e138–e148.
20. Wang R, Yoshida K, Toki T, *et al.* Loss of function mutations in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol* 2015;168:854–864.
21. Hira A, Yoshida K, Sato K, *et al.* Mutations in the gene encoding the E2 conjugating enzyme UBE2T cause Fanconi anemia. *Am J Hum Genet* 2015;96:1001–1007.