

## MDS 患者における GSTT1 遺伝子異常と臨床的特徴

金丸 昭久、前田 裕弘、炭本 至康  
松田 光弘 (近畿大学第三内科)

### [はじめに]

Glutathione S-Transferase (GST) は生物界の多くの組織、細胞に分布し、生体の解毒機構に関与する多機能酵素である。また、セレン非依存性ペルオキシダーゼ作用をもち、有機過酸化物の還元解毒に関与している。癌組織では正常組織に比べ GST 遺伝子の発現亢進を認めることがあり、抗癌剤耐性の獲得に重要な意義を持つ酵素である。アイソフォームとして  $\alpha$ 、 $\mu$ 、 $\pi$ 、 $\theta$  の4種類がある。骨髓異形成症候群 (MDS) 患者における GST theta-1 (GSTT-1) の遺伝子異常として、MDS 患者の GSTT-1 遺伝子は欠落していて、null genotype を示し、正常コントロール群と比較して有意に null genotype の頻度が高かったと報告した (Chen et al., Lancet 347:295, 1996, Basu et al., Lancet 349: 1450, 1996)。その後、null genotype の頻度は正常人と比較して有意差が存在しないという報告例が相次いだ (Atoyebi et al., Lancet 349:1450, 1996, Okada et al., Int. J. Hematol., 66:393, 1997, Pseudohomme et al., Leukemia 11:1580, 1997)。そこで、今回、われわれは MDS 患者における GSTT-1 遺伝子の発現型と臨床的特徴について検討すると同時に、mutant 型 GSTT-1 遺伝子の機能について検討した。

### [方法]

1. MDS 患者20例を対象に骨髓液より RNA を抽出し、通常の方法により、RT 反応を行った後、cDNA を template に5' 側と3' 側に primer を設定し、PCR で増幅し、その size により wild 型と mutant 型に分けた。
2. 623 bp の wild 型および500 bp の mutant 型 GSTT-1 遺伝子を発現 vector pSV2neo に挿入し、Jurkat、MOLT-4、HL-60および U937の細胞株に

transfect し、細胞増殖に対する影響を Tetra-color1 で観察した。

### [結果]

1. Wild 型および mutant 型 GSTT-1遺伝子の DNA sequencing の結果、exon 4を含んだ3' 側123bp の deletion を確認した。
2. RT-PCR の結果、表1に示すように、mutant 型は白血化症例に多い傾向が認められた。

表1 MDS患者におけるRT-PCR法によるGSTT-1遺伝子の発現様式

No.	FAB Type	wild type	mutant type
1	RA	yes	no
2	RA	no	yes
3	RA	yes	no
4	RA	no	yes
5	RA	no	yes
6	RAEB	yes	no
7	RAEB	yes	no
8	RAEB	no	no
9	RAEB	yes	no
10	RAEB	yes	no
11	RAEB in T	no	yes
12	CMMoL	yes	no
13	Overt (M1)	no	yes
14	Overt (M1)	no	no
15	Overt (M1)	no	no
16	Overt (M4)	no	yes
17	Overt (M4)	no	yes
18	Overt (M6)	yes	no
19	Overt (M7)	no	yes
20	Overt (M2)	no	yes

3. mutant 型 GSTT-1 遺伝子が挿入されたpSV2 GSTT500の導入で U937および HL-60の骨髓系細胞株において細胞増殖の増強が観察された (図1)。
4. mutant 型 GSTT-1 遺伝子の homology 検索では、human FKBP-rapamycin associated protein (FRAP)<sup>1),2)</sup> または mammalian target of rapamycin (mTOR)<sup>3)</sup> と64%の homology を認めた。

### [考察]

MDS患者での mutant 型 GSTT-1 遺伝子の発現は白血化症例に多い傾向が認められた。そこで、

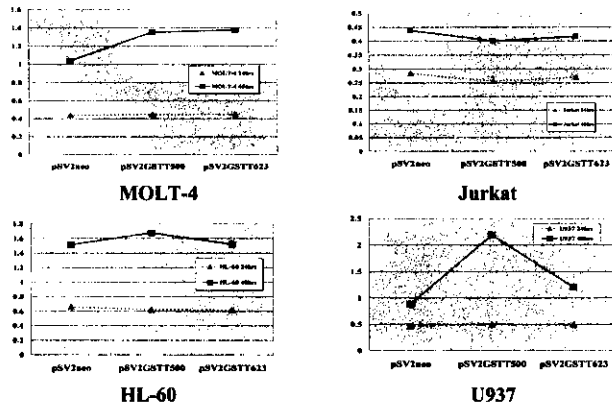


図1 Wild型GSTT-1遺伝子およびmutant型GSTT-1遺伝子導入による各種細胞株の増殖に及ぼす影響

500 bpの mutant 型 GSTT-1 遺伝子を発現 vector に挿入し、各種細胞株に導入した場合、骨髄系細胞株のみ細胞増殖の亢進が認められた。さらに、この mutant 型 GSTT-1 遺伝子の homology 検索では、human FKBP-rapamycin associated protein (FRAP) と 64% の homology を認めた。human

FKBP-rapamycin associated proteinは 免疫抑制剤 Rapamycin の標的分子であり、現在は mammalian target of rapamycin (mTOR) と呼ばれている 289 kDa の巨大分子である。N 末端に PI-3 kinase domain を有し、リン脂質のリン酸化活性および蛋白質リン酸化活性を持ち、細胞周期のG1期からS期の進行に不可欠な分子であると考えられている。以上より、mutant 型 GSTT-1 遺伝子は MDS からの白血病への進展に重要な役割を持っている可能性が示唆された (図2)。また、MDS の免疫抑制剤による治療的観点からも、興味深い結果であると考えられた (図2)。

[文献]

1. Brown EJ, et al, Nature 369, 756, 1994
2. Chen J, et al, Proc Natl Acad Sci USA 92, 4947, 1995
3. Lorenz MC, et al, J Biol Chem 270, 27531, 1995

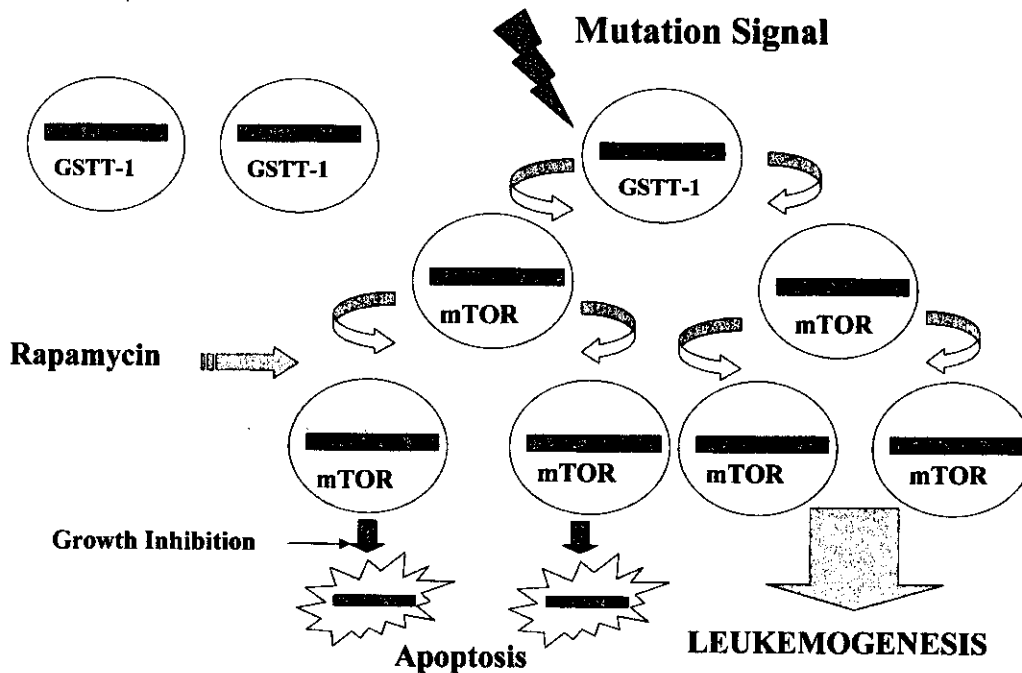


図2 Mutant型GSTT-1遺伝子の白血化における役割とmTORを標的としたrapamycinによる治療の可能性

骨髓異形成症候群における  
血小板シグナル伝達異常の解析

小峰 光博、大庭 礼美、多田 淳一  
北詰 浩一、島本 健至、中川 陽子  
山科 聡子、高橋 直樹、樋口 敬和  
原田 浩史、森 啓、新倉 春男

(昭和大学藤が丘病院 内科血液)

【はじめに】

骨髓異形成症候群 (MDS) は、血球の数的異常のみならず質的異常を特徴とするが、我々は、MDS 患者の77%で血小板のコラーゲン凝集能が低下していることを報告してきた (表1)。また、血小板のコラーゲン凝集には、複数のタンパクのチロシンリン酸化によるシグナル伝達が重要であることが知られている。以上より、MDS 患者血小板には、コラーゲン受容体を介するシグナル伝達系に何らかの異常が存在すると予想された。そこで、本研究では MDS 患者血小板をコラーゲンで刺激したときのチロシンリン酸化反応の解析を試みるとともに、その結果をもとに正常血小板におけるキナーゼ蛋白の細胞内局在とリン酸化の関係を調べた。

表1 MDS 患者における血小板機能

凝集能低下	
ADP	20/48 (41.7%)
epinephrine	29/48 (60.4%)
Collagen	37/48 (77.1%)
ADP含量低下	
	24/39 (61.5%)
ADP放出低下	
	21/39 (53.8%)
【対象症例】	
48例 (男30, 女18) 年齢25~82歳 (平均58.6)	
不応性貧血(RA)	14
鉄芽球性RA(RAS)	3
芽球増加を伴うRA(RAEB)	14
移行期RAEB(RAEB-T)	10
慢性骨髓単球性白血病(CMML)	7

【対象と方法】

患者は RA 2人、RAEB 3人、CMMoL 1人の計6人 (表2)。PGE1 および Apyrase 加 ACD 液で採取した患者または健常者静脈血より、PRP を作成、ゲル濾過の後、Aggregometer で攪拌しながらコラーゲン (5 $\mu$ M) で刺激し (0, 15", 30" 1', 2', 3', 5'), 1/5容の5 $\times$ Triton X-100 (TX) lysis buffer を添加し、TX 可溶化分画および非可溶化分画を Western blot にて解析した。また、細胞分画 (subcellular fractionation) は健常者血小板を同様に刺激し、等量の NaN<sub>3</sub> を含む等張 buffer を添加、超音波破碎、debris 除去後100Kgで超遠心し、上清 (S100, サイトゾル分画) および沈渣 (P100, 膜分画) を Western blot に供した。免疫沈降のためには後者を RIPA buffer で可溶化し用いた。

表2 患者プロフィール (下線は異常値)

	年齢	性	疾患分類	WBC	Hb	MCV	Plt	Collagen 凝集 (5 $\mu$ M) [55.2-80.0]	ATP放出 [1.5-7.7 $\mu$ M]
Pt.1	73	M	RA	4600	<u>8.6</u>	<u>105.2</u>	25.2	70.0%	<u>0.39</u>
Pt.2	64	M	RA	<u>3800</u>	<u>13.4</u>	<u>103.8</u>	17.6	68.0%	2.50
Pt.3	85	M	RAEB	<u>3300</u>	<u>6.5</u>	<u>115.1</u>	9.8	<u>49.0%</u>	<u>0.10</u>
Pt.4	68	M	RAEB	<u>3030</u>	<u>8.8</u>	90.0	<u>80.8</u>	<u>20.8%</u>	0
Pt.5	75	M	RAEB	6130	<u>8.8</u>	<u>101.4</u>	18.0	63.5%	1.21
Pt.6	72	M	CMMoL	6400	16.2	96.3	12.4	72.0%	1.30

【結果】

1. 正常血小板においては、コラーゲン刺激により TX 可溶化分画で1分をピークとする非受容体型チロシンキナーゼ Syk, PLC $\gamma$ 2 およびそれに引き続く非受容体型チロシンキナーゼ FAK, 未知の 40,64,100kDa のタンパクのチロシンリン酸化が認められた。また非受容体型チロシンキナーゼ Src は、構成的に強くチロシンリン酸化を受けていた。TX 非可溶化分画 (cytoskeleton 分画) には、未刺激時にはチロシンキナーゼは存在しないが、刺激1分後には Syk, Fyn, Src, Lyn が転位 (translocation: TL) し、遅れて pp64 も TL した。
2. MDS 患者血小板の TX 可溶化分画の解析から、コラーゲン受容体を介するシグナルに重要であるキナーゼタンパク (Syk, PLC $\gamma$ 2, Lyn, Fyn および Src) の量は、健常者とほぼ同等であった。一方未刺激状態でも既に Lyn や Syk のリン酸化が亢進している症例を認めた。また、刺激前より既に Syk (3例)、Src (1例) が cytoskeleton 分画に TL している、刺激後の Syk (2例) や Lyn (3例) の TL が悪い、または Lyn (1例) の TL が遅いなど健常者との相違がみられた。しかし、刺激後に TL してきたキナーゼや pp64 のリン酸化は概ね正常であった。特に、上記の刺激前から cytoskeleton 分画に認められる Syk は、まったくリン酸化されおらず、刺激後のリン酸化亢進はすべて TL してきた Syk によると考えられた。一方、刺激前に Cytoskeleton 分画に存在した Src は Triton X-100 可溶化分画と同様、構成的にリン酸化を受けていた (図1~4)。
3. 上記の結果をふまえ、キナーゼ蛋白の細胞内局在とリン酸化の関係を調べる目的で細胞分画法を施行した。Src ファミリーチロシンキナーゼは膜結合領域を有し、細胞分画すると膜分画に存在すると予想されるが、Lyn, Fyn は予想通りすべて膜分画に存在する一方、Src はほとんどがサイトゾルに存在し、刺激後にはじめて膜分画に TL した。Syk は膜に結合するモチーフを持たないにもかかわらず、約1/3が膜分画に存在した。免疫沈降により、Src は刺激や位置にかかわらず構成的にリン酸化されている一方、Syk はサイトゾル分画のものは刺激の前後ともまったくリン酸化を受けず、膜分画の Syk のみ刺激依存性にリン酸化されていた。

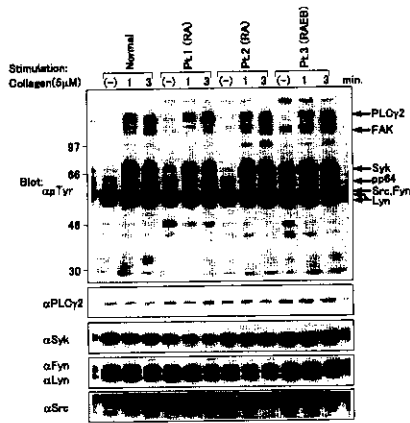


図1 Collagen 刺激による正常および MDS 患者血小板の Triton-X-100可溶化分画のチロシンリン酸化パターン

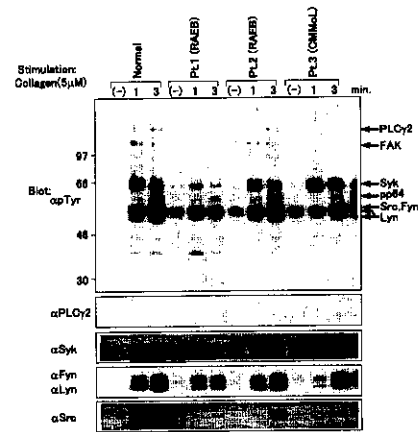


図3 Collagen 刺激による正常および MDS 患者血小板の Triton-X-100非可溶化分画のチロシンリン酸化パターン

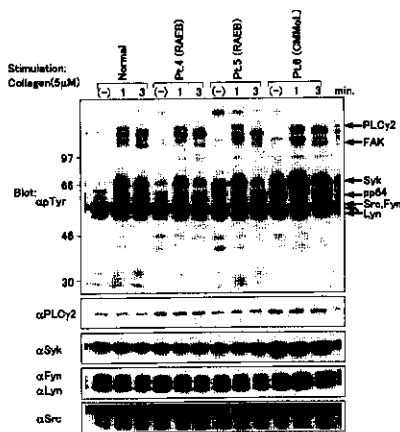


図2 Collagen 刺激による正常および MDS 患者血小板の Triton-X-100可溶化分画のチロシンリン酸化パターン

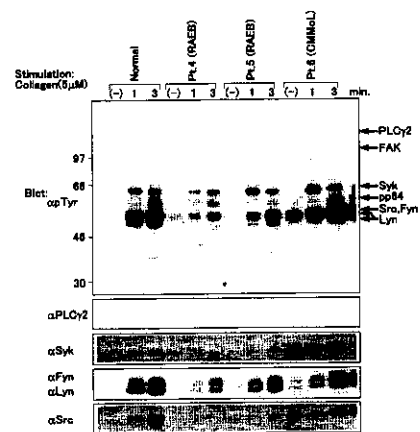


図4 Collagen 刺激による正常および MDS 患者血小板の Triton-X-100非可溶化分画のチロシンリン酸化パターン

[考案・結論]

1. MDS 患者血小板の、コラーゲン受容体を介するシグナルに重要であるチロシンキナーゼ (Syk, PLC $\gamma$ 2, Lyn, Fyn および Src) の量は、すべての症例で健常者とはほぼ同等であったが、定常状態で細胞内のキナーゼ分布に異常を有するものがみられた。
2. MDS 患者血小板ではコラーゲン受容体下流のチロシンリン酸化を介するシグナル伝達の減弱や、細胞骨格への TL に異常を認めることが多いが、その異常は単一ではなく、症例ごとに多様であった。
3. 正常血小板の解析で、サイトゾルだけでなく、膜分画にも Syk が存在し、コラーゲン受容体刺激により、膜分画の Syk のみがリン酸化され、このシグナル伝達経路では膜分画の Syk のみが関与すると考えられた。一方、Src は定常状態ではサイトゾルにのみあり、刺激によらず構成的にリン酸

化を受けており、コラーゲン刺激によりサイトゾルから膜分画にTLし、位置を変えることでこのシグナル伝達に参与している可能性が示唆された。

4. 以上より、MDS 患者血小板のコラーゲン刺激時の機能異常はシグナル伝達にかかわるタンパクの量的異常よりも、それらのタンパクを正常な位置に局在化させるための構造に異常があるためと考えられた。

[文献]

1. Poole A, et al. EMBO J, 16, 2333-2341, 1997
2. Watson SP, Gibbins J, Immunology Today, 19, 260-264, 1998

IMPDH を標的とする免疫抑制剤 Mizoribine  
 および Mycophenolate mofetil (MPM) による  
 MDS の治療

上田 孝典、今村 信、津谷 寛

(福井医科大学, 第一内科)

稲井 邦博 (福井医科大学, 第二病理)

[はじめに]

IMP dehydrogenase (IMPDH) はグアニンヌクレオチド de novo 合成系速酵素で、この酵素はすべての増殖細胞で増加しており、この活性抑制により細胞内 GTP level を低下させることで種々の腫瘍細胞株が分化誘導されることが報告されている。今回、既に臨床投与可能な IMPDH 阻害剤 mizoribine (MZB) 及び臨床試験が進行中の mycophenolate mofetil (MPM) の非リンパ性白血病初代培養細胞に対する分化誘導効果を検討し、この結果に基づき骨髄異形成症候群患者の分化誘導療法を試みた。

[対象と方法]

1. 細胞培養：骨髄性白血病細胞株 HL-60、単球性白血病細胞株 U937 を 10% FCS 加 RPMI1640 培地に浮遊し、各種濃度の MZB、mycophenolic acid (MPA)、MPM を用いて実験した。
2. 患者細胞：予め informed consent を得た急性非リンパ性白血病 (AML) 患者 23 名 (表 1) から、化学療法開始前にヘパリン加末梢血または骨髄液を採取し得られた白血病芽球を 15% FCS 加 RPMI1640 培地で培養し実験に用いた。
3. 分化誘導の指標：細胞分化は細胞形態、細胞表面抗原、酵素学的分化の指標を用いて検討した。細胞形態は細胞遠心塗抹標本を作製後、可視的に評価し、細胞表面抗原は CD11b、CD14 発現率をフローサイトメーターを用いて検討した。酵素学的分化は NBT 還元反応によって検討した。これら 3 種類のマーカーのうち 2 つ以上が陽性となった場合、分化誘導されたものと判定した。
4. 細胞内 GTP level 測定：細胞内 GTP level は、

表 1 患者リストおよび分化誘導実験結果

No	Age/Sex	FAB criteria	WBC (/ $\mu$ l)	Blast (%)	CD11b	NBT
1	59/F	M1	11700	81	3(2)	11(5)
2	45/M	M1	24100	78	20(19)	ND
3	82/M	M2	286500	67	19(10)	45(33)
4	68/M	M2	9100	32	27(23)	29(9)
5	78/F	M2	2500	31	2(3)	21(22)
6	53/F	M2	2200	73	1(1)	ND
7	72/F	M2	12200	42	3(2)	35(33)
8	64/M	M3	3200	95	2(1)	ND
9	38/F	M3	1400	42	2(1)	30(15)
10	34/M	M4	12900	85	4(3)	12(14)
1	42/F	M0	12900	91	15(12)	13(8)
2	73/F	M1	2800	92	1(1)	5(6)
3	25/M	M2	11800	70	35(20)	ND
4	47/M	M2	45200	97	23(16)	64(36)
5	35/F	M2	18000	80	30(16)	50(12)
6	72/F	M2	88500	91	1(1)	1(2)
7	65/M	M2	1100	83	6(4)	30(5)
8	50/F	M3	1600	84	4(3)	34(16)
9	50/F	Mixed leukemia	340500	91	44(23)	78(16)
10	79/F	MDS/Overt	900	32	12(13)	48(21)
11	72/F	MDS/Overt	19500	81	12(10)	36(18)
12	58/M	MDS/Overt	15800	88	9(9)	5(4)
13	27/M	CML crisis	302000	27	51(40)	92(31)

上段は MZB、下段は MPM 処理  
 () 内は未処理コントロール値を表す。  
 太字の No. は分化誘導された細胞を示す。

薬剤存在下で一定時間培養した細胞から酸可溶性分画を抽出し、HPLC 法により測定した。

5. Mizoribine 間歇投与プロトコール：2日間連続して、体重 1 kg あたり 1 日 10 mg の MZB を第 1-3 週にわたり服用し、第 4 週は休薬する治療を 1 クールとした。

6. 血中 MZB 濃度測定：MZB 投与開始後から 48 時間にわたり経時的に末梢血を採血し、採血後ただちに分離、凍結した血漿を用いて、HPLC 法で血漿中 MZB 濃度を測定した。

[結果]

1. IMPDH 阻害剤の非リンパ性白血病細胞株に対する分化誘導効果：20 mM 以上の MZB、0.3 mM 以上の MPA、MPM 処理で HL-60、U937 は成熟好中球あるいは単球様形態を示し、CD11b、CD14、NBT 還元能陽性細胞数が有意に増加した<sup>1,2)</sup>。
2. IMPDH 阻害剤の細胞内 GTP level 低下効果：薬剤処理開始後、GTP level は 12 時間で処理前の 20-30% まで急速に低下し、MPA 存在下では以降も同レベルで推移したが、MZB 処理時は 24 時間以降に GTP level は回復し前値の 50-60% レベルで一定となった。
3. IMPDH 阻害剤の非リンパ性白血病初代培養細胞に対する分化誘導効果：AML 初代培養細胞に臨床投与可能な MZB、MPM を添加して培養する

と、MZB 処理を行った10例の AML 細胞中 M2 の 2例、MPM 処理を行った13例中7例 (M2:3例、Mixed leukemia:1例、MDS overt leukemia:3例、CML myeloid crisis:1例) に分化誘導効果が得られた (表1)。

4. IMPDH 阻害剤によって分化誘導される AML 細胞の特徴 (図1) : MPM によって分化誘導された細胞の特徴を検討すると、分化誘導された細胞は CD11b、CD14、NBT 還元反応陽性率が、分化誘導されなかった細胞に比べ、予めから有意に増加していた。また、分化誘導された細胞は GTP level 低下が認められ、分化誘導には GTP 低下は 24時間程度で十分であった<sup>3)</sup>。

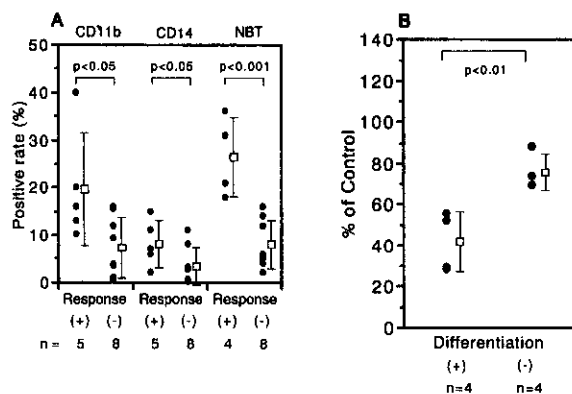


図1 分化誘導された非リンパ性白血病初代培養細胞の特徴。A: 分化誘導された細胞と分化誘導されなかった細胞の薬剤未処理コントロールの特徴を比較した。B: 分化誘導された細胞と分化誘導されなかった細胞の細胞内 GTP level を HPLC で検討した。

5. MDS 症例における MZB 治療効果 (表2) : 基礎的検討に基づき、MDS を対象に IMPDH 阻害剤による分化誘導療法を試みた。予め informed consent が得られた MDS 4例 (RA:3例、RAEB:1例) に MZB 間歇投与を行った。いずれの症例も治療に伴う副作用はなく、RAEB 症例で網状赤血球数が増加したが、血液学的改善は得られなかった。

6. 血漿 MZB 濃度の推移: 治療期間中、血漿 MZB 濃度を経時的に測定した。4例の血漿 MZB 濃度

表2 MZB 治療を行った症例リストと結果

No.	Age	Sex	FAB	WBC (/ $\mu$ l)	RBC ( $\times 10^6$ )	Hb (g/dl)	Ht (%)	Plt ( $\times 10^4$ )	Outcome
1	75	M	RA	4700	1.97	6.1	17.8	28.1	PD
2	61	M	RA	2900	2.68	8.0	24.1	1.8	NC
3	64	M	RA	6800	4.19	14.3	41.8	0.5	NC
4	68	F	RAEB	5300	2.72	10.4	30.6	0.8	NC (on going)

RA: refractory anemia, RAEB: refractory anemia with excess of blast  
PD: progressive disease, NC: no change

(Cmax) は、 $16.1 \pm 0.1 \mu\text{M}$  で血漿中濃度が  $20 \mu\text{M}$  以上に上昇した症例は1例のみに留まった。

#### [考察・結論]

IMPDH 阻害剤はすでに免疫抑制剤として臨床投与され、また種々の細胞株に分化誘導効果を示すことが知られているが、IMPDH 阻害剤を用いた分化誘導療法はまだ確立されていない。今回の検討で、IMPDH 阻害剤 MZB、MPM は AML 初代培養細胞のうち、分化傾向を有するものを臨床到達可能濃度で分化誘導した。しかも分化誘導は病型に限定されることなく生じていた。これらの結果は IMPDH 阻害剤による分化誘導療法は従来からの分化誘導物質と異なり、適応症例が広がる可能性を示唆させる<sup>4,5)</sup>。

今回、MDS 4症例に MZB の臨床投与を試みた。分化誘導が24時間程度の薬剤処理で認められていた基礎実験の結果に基づき、一定時間血漿 MZB 濃度を  $20 \mu\text{M}$  以上に上昇させることを目標に、通常量の2-5倍に相当する  $10\text{mg/kg/day}$  を投与した。治療によって副作用は認められなかったが、1例で網状赤血球数増加が生じたものの、明かな分化誘導効果は得られず、血漿中濃度が目標に達したのは1例のみであった。この原因は投与した薬剤が十分な GTP 低下を来すのには少量であった可能性が高いが、グアニンヌクレオチド de novo 合成系抑制の結果、salvage 合成系が活性化され、MZB の GTP 低下作用を減弱させた可能性もある。したがって、IMPDH 阻害剤による分化誘導を進めるためには、さらなる増量による研究に加えて、salvage 合成系抑制も検討する課題と推測された。

#### [参考文献]

- Inai K, et al, Int J Hematol 66, 335-344, 1997
- Inai K, et al, Proceeding AACR 39, 108, 1998
- Inai K, et al, Adv Exp Med Biol 431, 549-553, 1998
- 稲井 邦博他: プリン・ピリミジン代謝, 22, 125-131, 1998
- Inai K, et al, Leukemia Res, in submission

## MDSおよびpost-MDS AMLにおける ビタミンK2 (VK2) 療法の実態調査 -VK2療法のprospective trial に向けて-

大屋敷一馬、宮澤 啓介、西巻治朗  
(東京医科大学 第一内科)

### [はじめに]

ビタミンK2 (以下VK2) が in vitro で白血病細胞および MDS 芽球のアポトーシスを誘導することが明らかとなり<sup>1,2)</sup>、以後RAならびに RAEB-T を中心とする MDS 症例においても、その有効性を示唆する症例報告が各施設より散発的に行われている<sup>3,4)</sup>。VK2 は骨粗鬆症の臨床治療薬として既にその有効性と安全性が確立しており、長期間の服用も可能である<sup>5)</sup>。このような状況下で、本研究班においても高齢者の MDS を対象とした VK2 の多施設臨床研究を試みる気運が高まってきた。今回、VK2 療法の prospective trial に向けての前段階として、既に VK2 を投与された MDS および post-MDS AML 症例を対象に実態調査を行い、有効性の有無、有効な病型、VK2 の投与量・投与方法、効果発現までに要する期間等の概要の把握を試みた。

### [対象と方法]

1999年9月上旬、「特発性造血障害に関する研究班」に所属するの班員・研究協力者の各施設に対して、VK2 投与を行った MDS および post-MDS AML 患者を対象とするアンケート調査票を同年12月末日を期日として送付した (図1)。12施設より計50症例の登録が行われた。内、3例は VK2 投与期間が1ヶ月未満等の理由により「判定不能」と回答されたため対象外とし、47症例についての評価を行った。

対象患者の年齢、性別、病型は表1で示す通りである。また、VK2 の投与量・投与経路に関しては、大部分の症例 (83%) が45mg/day 経口投与を受けており、静脈内投与は2例のみであった。さらに、55%の症例で VK2 と PSL、ビタミンD3、

ubenimex 等の他の薬剤との同時併用投与が行われていた。

### [結果]

1. MDS および post-MDS AML の40症例において、著効例3例を含む計17例 (36.2%) で VK2 投与による血液学的改善効果が報告された。
2. MDS 病型間での比較では、RA 20% (3/15) で cytopenia の改善効果が認められ、RAEB-T では72.7% (8/11)、post-MDS AML では50% (6/12) の症例に VK2 による芽球の増殖抑制を示唆する効果が報告された。また、RAEB (n=6)、CMML (n=3) においては全例無効であった (図2)。
3. VK2 投与開始から効果発現までの期間は平均1.75ヶ月であり、ある一定期間の継続投与の必要性が示唆された。
4. 調査対象症例の83% (39/47) の投与量・投与方法が VK2 45 mg/day 経口であったために、その至適投与量、投与経路を抽出することはできなかった。また、VK2 単剤 vs. VK2+ 他剤併用においては、後者により高い有効率を認めた (22.2% vs. 50%)。その理由としては、VK2+他剤併用群には、VK2 の有効率の高かった RAEB-T、post-MDS AML が多く含まれていたためと考えられる。
5. 評価対象症例 全例に副作用は報告されなかった。

### [考察]

今回の調査より、MDS における VK2 の有用性は、RA における cytopenia の改善もさることながら、leukemic transformation 後の芽球の増殖を抑制する効果がより期待できることが明らかとなった。安全性は極めて高く高齢者においても長期連用が可能であることを考慮すると、今後の prospective study においては以下の項目における客観的評価が重要と考える。1. RA における cytopenia の改善効果、2. 長期投与による MDS の disease progression および leukemic transformation の予防効果-chemoprevention-、3. RAEB-T、post MDS AML における他剤との併用による寛解導入

増強効果、4. RAEB-T、post MDS AMLにおける化学療法後の寛解維持効果。

[文献]

1. Yaguchi M, Miyazawa K, Otawa M, Katagiri T, Nishimaki J, Uchida Y, Iwase O, Gotoh A, Kawanishi Y, Toyama K, Leukemia 12, 1392-1397, 1998
2. Nishimaki J, Miyazawa K, Yaguchi M, Katagiri T, Kawanishi Y, Toyama K, Ohyashiki K, Hashimoto S, Nakaya K, Takiguchi T, Leukemia 13, 1399-1405, 1999
3. Takami A, Nakao S, Ontachi Y, Yamauchi H, Matsuda T, Int J Hematol 69, 24-26, 1999
4. Yaguchi M, Miyazawa K, Otawa M, Ito Y, Kawanishi Y, Toyama K, Leukemia 13, 144-145, 1999
5. Orimo H, Shiraki M, Tomita A, Morri H, Fujita T, Ohata M, J Bone Miner Metab 16, 106-112, 1998

表1 MDS およびpost-MDS AML47症例の患者背景

年齢：26～87歳（中央値：66歳）  
 男／女：30 / 17  
 VK2 療法開始時の病型：

RA	15
RAEB	6
RAEB-T	11
CMML	3
post-MDS AML	12

MDS・post-MDS AMLにおけるビタミンK2投与症例調査票

内にチェックをお願いします。

施設名 \_\_\_\_\_ 報告者名 \_\_\_\_\_

【症例】  
 患者イニシャル \_\_\_\_\_ 施設内カルテ番号 \_\_\_\_\_

男 女 年齢 \_\_\_\_\_ 歳または生年月日 M T S 年 月 日  
 身長 \_\_\_\_\_ cm 体重 \_\_\_\_\_ kg

【診断】  
RA RARS RAEB RAEB-T CMML post-MDS AML  
 【発症/診断時期】 S 日 年 月

【ビタミンK2投与方法/投与期間】  
経口投与（グラケール） 45 mg/day (3 cap/day) 90 mg/day その他 \_\_\_\_\_ mg/day  
経静脈投与（ケイツーN）1vial (10 mg) /day 2 vial /day その他 \_\_\_\_\_ mg/day

投与期間（現在投与継続中 投与を中止している）  
1ヶ月未満 1ヶ月以上6ヶ月未満 6ヶ月以上1年未満 1年以上

【併用薬剤】  
無 有 有の場合の併用薬剤名 \_\_\_\_\_

【有効性】  
有効 無効 評価不能：投与開始から効果発現までの期間 \_\_\_\_\_ ヶ月

有効あるいは有効と判断した根拠（1つ以上記入可）  
cytopeniaの改善（Hb WBC PLT 3系統全て）  
輸血回数の減少または輸血非依存性となる 骨髄中の芽球比率の低下  
末梢血中の芽球比率の低下 芽球の増殖速度の低下 異常核型の消失  
正常核型の出現または正常核型比率の増加  
その他 \_\_\_\_\_

有効性について何かコメントがあれば記入して下さい \_\_\_\_\_

【副作用の有無】  
無 有 有の場合その内容を具体的に記入して下さい \_\_\_\_\_

図1 調査票

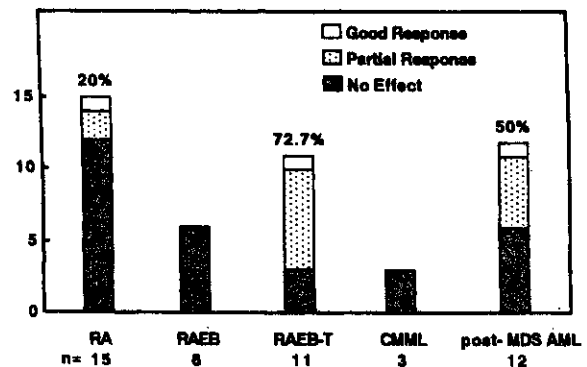


図2 各病型におけるVK2の有効率

表2：症例登録施設

施設名	班員／報告者
岩手医大第3内科	厨 信一郎／榎本さなえ
東海大学血液・リウマチ内科	堀田 知光／福田 竜基
東京女子医大	寺村 正尚／小林 祥子
NTT東日本関東病院血液内科	浦部 晶夫／臼杵 憲祐
金沢大学第3内科	中尾 真二／高見 昭良
埼玉医大第1内科	別所 正美／松田 晃・川井 信孝
大阪大学血液・腫瘍内科	金倉 譲／菅原 浩之
名古屋大学第1内科	村手 隆
福井医大第1内科	上田 孝典／岩崎 博道
九州大学第1内科	仁保 喜之／岡村 孝
近畿大学第3内科	金丸 昭久／川西 一信
東京医大第1内科	大屋敷一馬／宮澤 啓介・西巻 治朗



## CMMoL に対する nonmyeloablative transplantation の試み

原田 実根、前田 嘉信、池田 和真  
品川 克至、竹中 克斗

(岡山大学第二内科、輸血部)

### [はじめに]

同種造血幹細胞移植は、予後不良の骨髄異形成症候群に対して、治癒を期待できる治療法である。しかし、骨髄異形成症候群は高齢者に診断されることが多く、また、併存する臓器障害を有することが多い。このために、治療関連毒性の強い骨髄破壊的前治療を併用する同種造血幹細胞移植が行えないことも多い。近年、造血器悪性腫瘍に対する同種造血幹細胞では、大量の抗癌剤・放射線照射による抗腫瘍効果の他に、ドナー由来の免疫担当細胞による抗腫瘍効果が大きな役割を果たしていることが明らかとなってきている。これを踏まえて、抗癌剤・放射線の投与量を減らした非骨髄破壊的前治療の後に、同種造血幹細胞移植を行い、この免疫学的抗腫瘍効果を利用するいわゆる「ミニトランスプラント」が、種々の造血器腫瘍に試みられ、その治療成績が報告されつつある<sup>1)</sup>。本研究では、CMMoL に対して非骨髄破壊的前治療を組み合わせた同種造血幹細胞移植を行い、生着能とキメリズムの解析を行った。

### [対象と方法]

#### 1. 症例

49歳の男性。

主訴：全身倦怠感

現病歴：平成10年7月、貧血、血小板減少が認められ、9月末より末梢血中に幼若球が出現したため、10月12日に当科を紹介され、10月16日に精査加療を目的として入院となった。

入院時現症：身長161cm、体重55.6kg、BMI 21.4。リンパ節：触知せず。結膜は貧血様、黄疸なし。歯肉腫脹なし。胸部所見；呼吸音は清、ラ音聴取せず。心音；整、雑音聴取せず。腹部；肝

1横指、脾6.5横指触知。左下肢に軽度浮腫あり。神経学的異常なし。

検査：

RBC  $175 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 、Hb 6.6 g/dl、Ht 20.6 %、WBC  $8600 / \mu\text{l}$  (seg 32%、stab 11%、lymph 10%、mono 34%、blasts 9%、metamyelo 2%、myelo 2%)、Plt  $3.5 \times 10^3 / \mu\text{l}$ 。

骨髄：NCC  $49.8 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 、erythro 16.0%、promyelo 18.2%、myelo 14.6%、metamyelo 5.6%、stab 4.2%、seg 6.2%、eosino 1.4%、baso 0.8%、mono 9.6%、lymph 3.2%、plasma 0.6%、blasts 9.2%、promono 9.8% (megaloblastic change(+)、円形多核の巨核球(+)、blastsはペルオキシダーゼ一部弱陽性)

骨髄細胞の染色体：

A; 46,XY, t(3;17)(q29;q11), 13/20

B; 46,XY, 7/20

#### 2. 非骨髄破壊的前治療と同種末梢血幹細胞移植

ハイドロキシウレア投与にて、白血球数を  $2700 / \mu\text{l}$  まで減少させた後、HLA 適合の妹から G-CSF ( $10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 、5日間の皮下注) で動員後にアフエレーシスで採取した  $4.34 \times 10^6 \text{ kg}$  の CD34 陽性細胞を含む末梢血幹細胞を移植した。前処置として、脾臓への 10 Gy の放射線照射と、Ara-C  $2 \text{ g}/\text{m}^2 \times 2/\text{day}$  (day -5、-4) と CY  $60 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$  (day -3、-2) の投与を行った。GVHD 予防としては、CyA + mPSL を用いた。day 30、day 61、day 83にそれぞれ、 $5 \times 10^5 / \text{kg}$ 、 $5 \times 10^6 / \text{kg}$ 、 $3 \times 10^7 / \text{kg}$  の donor lymphocyte infusion (DLI) を行った。キメリズムの解析は、FISH による末梢血細胞の染色体分析によって行った。ドナーからの幹細胞採取と患者への同種造血幹細胞移植はいずれも informed consent を得た上で行った。

### [結果]

#### 1. 生着：

好中球  $500 / \mu\text{l}$ 、網状赤血球 1%、血小板  $2 \text{ 万} / \mu\text{l}$  までの回復に要した日数は、13日、15日、42日であった。治療関連毒性は、血液学的毒性以外は観察されず、また、GVHD もみられなかった。

#### 2. キメリズム：

末梢血のFISHによるキメリズムの解析の結果、ドナー核型が移植後5日目に67%、16日目に70%、22日目に85%と増加し、30日目に $5 \times 10^5$  /kgのドナーリンパ球を輸注したところ、一時ドナー核型が94%まで増加したが、その後36%まで低下した。そこで、61日目に $5 \times 10^6$  /kg、83日目に $3 \times 10^7$  /kgのドナーリンパ球の輸注を行ったが、その後は大半の細胞が患者の核型を示した。

**【考察・結論】**

Ara-C  $2 \text{g/m}^2 \times 2/\text{day}$ 、2日間および CY 60 mg/kg/day、2日間による非骨髄破壊的前治療と組み合わせた同種末梢血幹細胞移植は、骨髄抑制以外の治療関連毒性を認めず、donor 細胞の速やかな生着が得られ安全に施行し得た。しかし、抗腫瘍効果については、移植後、CMMoL 腫瘍量の減少が得られたが、効果は一時的で治癒には至らず、DLI の施行後も腫瘍量の増大を抑制し得なかった。非骨髄破壊的前処置と組み合わせて用いる同種造血幹細胞としては、CD34陽性細胞数とリンパ球の両者がより多く得られる末梢血が骨髄より

も望ましいと考えられ、ドナーにおける造血幹細胞動員への G-CSF の保険適応拡大が期待される。一方、既報の多くの非骨髄破壊的前治療と組み合わせた同種造血幹細胞移植で用いられているフルダラビンは、日本では平成11年秋に慢性リンパ性白血病に対して認可されたが、他の疾患に対しては現在のところ保険適応となる見通しは立たず、望ましい前治療を模索していく上で課題となっている。

今後、非骨髄破壊的前治療と組み合わせた同種末梢血幹細胞移植は、治療関連毒性が少なく早期の造血能の再構築が期待できるが、GVL 効果を最も効果的に得られる、疾患、病期、前処置、GVHD 予防、DLI における輸注細胞数と輸注スケジュールを検討していく必要があると考えられた。

**【文献】**

1. Giralt S, et al, Blood 89, 4531, 1997
2. Khouri IF, et al, J Clin Oncol 16, 2817, 1998
3. Slavin S, et al, 91, 756, 1998

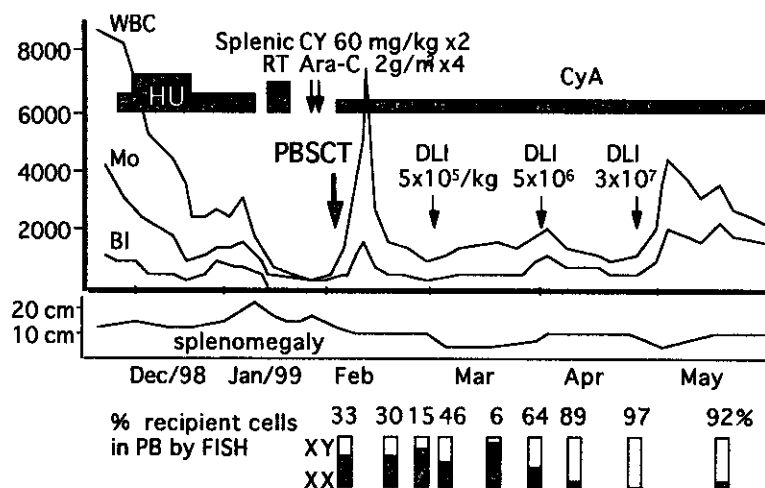


図 CMMoLに対する非骨髄破壊的同種末梢血幹細胞移植の経過

レトロウイルスベクターを用いた  
G-CSF receptor 遺伝子導入による  
MDS 細胞株の分化誘導効果

大野 竜三、中村 悟己

(浜松医科大学、内科学第三講座)

通山 薫 (京都大学、検査部)

[背景]

骨髄異形成症候群 (MDS) は造血幹細胞のクローン性異常に基づく慢性進行性の造血障害であるが有効な治療法がなく、より確実に安全な治療法の開発が望まれている<sup>1),2)</sup>。AML 患者と健常人の末梢血顆粒球の G-CSF 受容体 (G-CSFR) 数の検討において、AML 患者での G-CSFR 数の減少が報告されており<sup>3)</sup>、我々は MDS 患者と健常人の末梢血顆粒球の G-CSFR の数を検討し、MDS 患者で G-CSFR 数の有意な減少を報告した<sup>4)</sup>。MDS 細胞では G-CSFR の減少が分化能の障害の一部に関与している可能性が考えられた。そこで、MDS 細胞株にレトロウイルスベクターを用い G-CSFRcDNA を導入し、分化誘導の可能性を検討した。

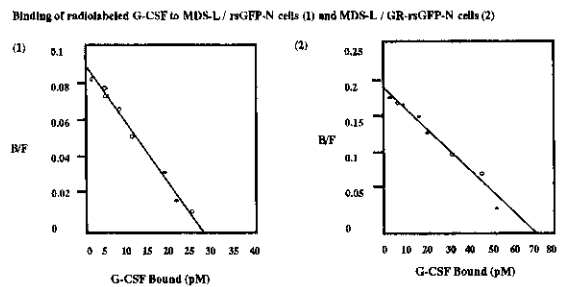
[対象及び方法]

レトロウイルスベクター (pMX)<sup>5)</sup>を用い、G-CSFR 遺伝子を含むウイルスを産生する高効率レトロウイルスプロデューサー細胞を作製した。このプロデューサー細胞から産生されるベクター (GR ベクター) を本研究で使用した。また、GFP とネオマイシン耐性遺伝子を組み込んだコントロールベクター (GFP ベクター) も同時に作製した。通山らが MDS (RARS) 患者から樹立した MDS-L 細胞 (MDS92<sup>6),7)</sup>を親株とする)に、GR ベクターにて G-CSFR 遺伝子を導入 (MDS-L/GR-rsGFP-N) し、ウエスタンブロット法及び Scatcard 解析<sup>8)</sup>にて、GFP ベクターを感染させた MDS-L 細胞 (MDS-L/rsGFP-N) と G-CSFR 発現量を比較検討した。MDS-L/GR-rsGFP-N における G-CSF 刺激による分化誘導効果を<sup>9)</sup>[3H]-TdR による細胞増殖

抑制効果を IL-3 存在、非存在下及び G-CSF 存在、非存在にて検討した。NBT 還元活性、表面抗原 CD11b 測定、形態学的変化について MDS-L/GR-rsGFP-N 細胞における G-CSF 刺激による分化誘導効果、コントロール MDS-L/rsGFP-N 細胞と比較検討した。

[結果]

1. ウエスタンブロット法では MDS-L/GR-rsGFP-N 細胞において MDS-L/rsGFP-N 細胞と比較して G-CSFR 発現量の増加が確認され、Scatcard 解析でも約5倍の G-CSFR 数の増加が確認された (図1)。



MDS-L / rsGFP-N cells	G-CSF receptors	MDS-L / GR-rsGFP-N cells
470	Sites per Cell	2305
279	Kd (pM)	475

図1 Scatchard 解析による G-CSFR 数の検討

2. MDS-L/GR-rsGFP-N 細胞は MDS-L/rsGFP-N 細胞と比較して、G-CSF 刺激により<sup>10)</sup>[3H]-TdR でみた細胞増殖が40%抑制された (図2)

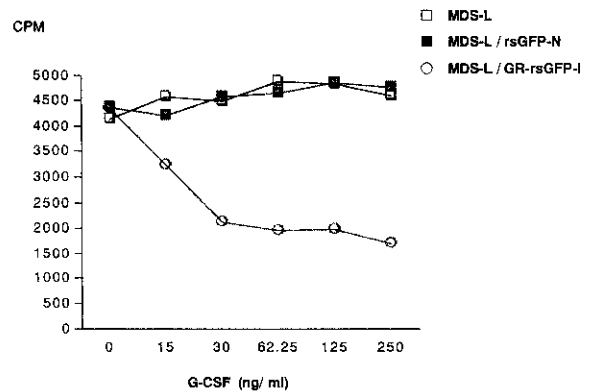


図2 G-CSF 刺激による [3H]-TdR における増殖抑制効果

3. NBT還元活性と細胞表面抗原CD11b発現についても、MDS-L/GR-rsGFP-N細胞はMDS-L/rsGFP-N細胞と比較して、それぞれ4倍(図3)、2.5倍(図4)の増強効果が認められた。

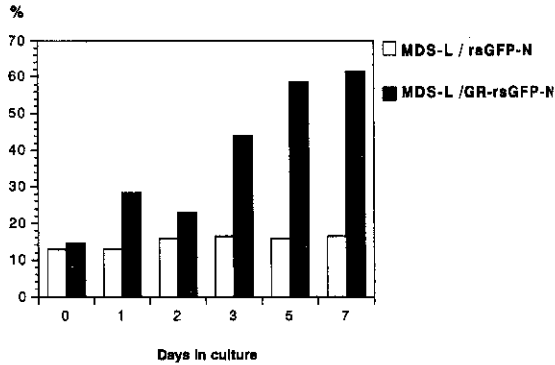


図3 G-CSF刺激後のNBT reduction activity増強効果

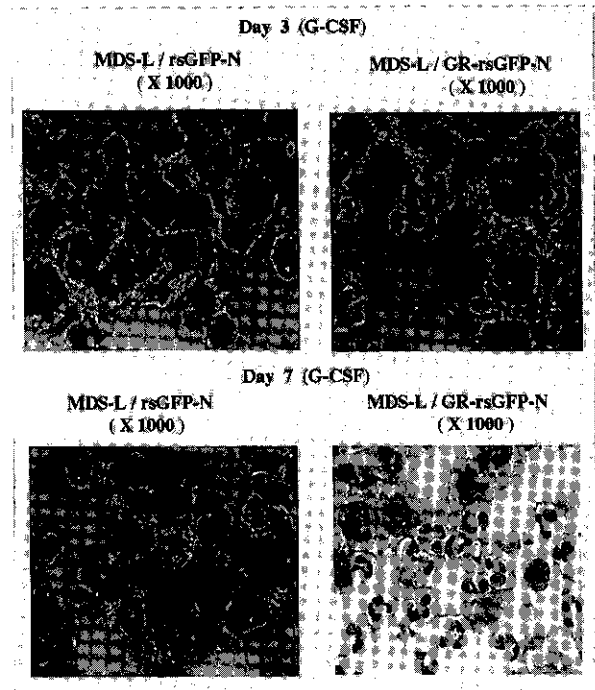


図5 G-CSF刺激後、3、7日目の形態学的変化の比較

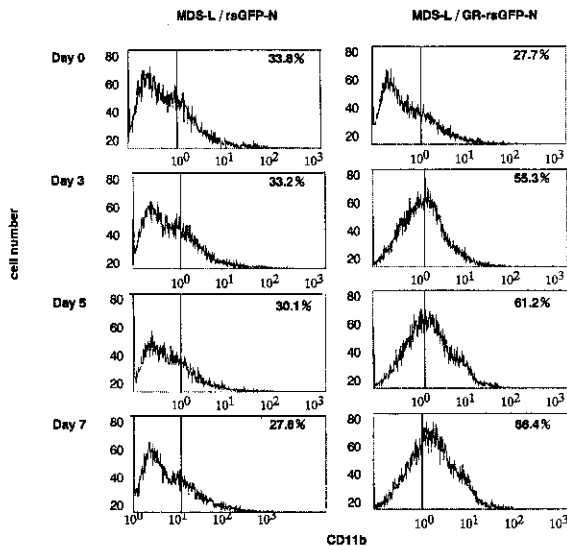


図4 G-CSF刺激によるCD11b発現の比較

4. MDS-L/GR-rsGFP-N細胞では、形態学的にも約70%に分葉核を持つ顆粒球細胞が認められた(図5)。MDS-L細胞株において、G-CSFRの強制発現によりG-CSF刺激により分化誘導が可能であった。

[結語]

本研究において、骨髓芽球性MDS-L細胞がG-CSF刺激に反応し、好中球への十分な分化傾向が認められ、G-CSFRの発現がMDS細胞の分化誘導効果を可能にすることを示した。レトロウイルスベクターを用いることで細胞内で安定してG-CSFRの発現が認められ、G-CSFRの強制発現が分化傾向に乏しい細胞の分化誘導に有効であったと考えられ、今後のMDSの新たな治療の可能性が示された。また、G-CSFRには増殖シグナルと分化シグナルの解明に役立つだけでなく、MDSにおける病態解明に役立つと考えられた。

[参考文献]

1. Cheson B.D, Ann Int Med 112, 932, 1999
2. Ohno R, et al, BLOOD 81, 1152, 1993
3. Leo M, et al, BLOOD 74, 2668, 1989
4. Shinjo K, et al, Leuk Lymphoma 25, 37, 1997
5. Onishi M, et al, Exp Hematol 24, 324, 1996
6. Tohyama K, et al, Br J Heamatol 87, 235, 1994
7. Tohyama K, et al, Br J Heamatol 91, 795, 1995
8. Scatchard G, et al, Ann NY Acad Sci 51, 660, 1949

## シクロスポリン治療が奏功した低形成性 骨髄異形成症候群の造血回復メカニズム

厨 信一郎、榎本さなえ、小宅 達郎、  
槍澤 大樹、千葉 浩子、石田 陽治

(岩手医科大学医学部)

内科学第三講座血液部門)

### [はじめに]

再生不良性貧血に対する免疫抑制療法の有効性はすでに確立された事実であるが、1990年代になって骨髄異形成症候群 (MDS) の一部の症例に対しても免疫抑制療法が有効であることが報告されてきた。しかし MDS に対しても免疫抑制療法がどのような機序で効果を発揮するのかについては、いまだ明らかにされていない。一方、MDS においては造血前駆細胞レベルにおける過剰のアポトーシスに基づく無効造血が末梢血球減少の主因と考えられているが、われわれは最近、顆粒球系、赤芽球系および巨核球系のそれぞれの前駆細胞について個別にアポトーシスの程度をフローサイメトリーを用いて定量する方法を開発した。今回われわれはその方法に加えて、従来から行ってきたX染色体上に位置する遺伝子の多型性を利用した骨髄造血細胞のクロナリティ解析法とを用いて、シクロスポリン (CyA) 治療が奏功した低形成性 MDS の造血回復メカニズムを検討した。

### [対象と方法]

対象は自験低形成性 MDS (FAB 分類不応性貧血: RA) の女性3例である。CyA 治療前と CyA 治療後に血液像が改善した時点における3症例の末梢血液所見を表1に示した。このうち KM 例は初診時の骨髄細胞密度は高かったが、CyA 治療前には高度の骨髄低形成を示していた。CyA 治療前の検索ではいずれの症例も、骨髄細胞に異形成を認め、骨髄造血細胞のクロナリティ解析では単クローン性造血パターンを示した。

骨髄造血細胞のクロナリティ解析は、X染色体上に位置している human androgen receptor

		シクロスポリン		
診断		投与前		投与後
Case1 K.M.	MDS(RA)	WBC Hb retl. PLT	1,950 / $\mu$ l 3.2 g/dl 8,190 / $\mu$ l <10,000 / $\mu$ l	2,290 / $\mu$ l 14.8 g/dl 77,700 / $\mu$ l 49,000 / $\mu$ l
Case2 T.H.	MDS(RA) or AA	WBC Hb retl. PLT	2,090 / $\mu$ l 6.7 g/dl 2300 / $\mu$ l 31,000 / $\mu$ l	6,800 / $\mu$ l 9.9 g/dl 84,900 / $\mu$ l 38,000 / $\mu$ l
Case3 I.A.	MDS(RA) or AA	WBC Hb retl. PLT	950 / $\mu$ l 8.2 g/dl 4,920 / $\mu$ l <10,000 / $\mu$ l	3,610 / $\mu$ l 10.4 g/dl 66,000 / $\mu$ l 86,000 / $\mu$ l

表1 対象症例の診断とシクロスポリン投与前後の末梢血液所見

(HUMARA) 遺伝子あるいは phosphoglycerate kinase (PGK) 遺伝子の多型性を利用した解析法によって行った。顆粒球系、赤芽球系、巨核球系、それぞれにおけるアポトーシスに陥っている造血前駆細胞比率の定量は抗 CD34 抗体、各血球系に特異的な表面マーカー (顆粒球系: CD33、赤芽球系: glycophorin-A、巨核球系: CD41) に対する抗体、ならびに annexin V 抗体の3者を用いて、3色フローサイメトリー法で解析した。CyA 治療前後における骨髄細胞形態の観察は、それぞれの塗抹ライトギムザ染色標本を顕鏡して行った。

### [結果]

1. 骨髄の単クローン性造血所見は CyA 治療の前後において、いずれの症例においても消失しなかった。
2. KM 例における各血球系前駆細胞のアポトーシスに陥っている比率は CyA 治療後には明らかに低下したが、正常ヒト対照に比較すると明らかに高い状態が持続していた。KM 例の CyA 治療前後における赤芽球系前駆細胞のアポトーシスパターンの変化を図1に、代表的なパターンとして示しておく。他の2例に関しては CyA 治療前には検討しえなかったが、CyA 治療後に血液像の改善を見た時点での検討では正常ヒト対照に比較して明らかにアポトーシスに陥った細胞の比率が高かった。
3. 3症例のいずれにおいても CyA 治療前に認められたと同様の骨髄細胞形態異常が、CyA 治療後に末梢血液像の改善を見た時点でも継続して観察

された。以上の観察結果を表2に一括して示しておいた。

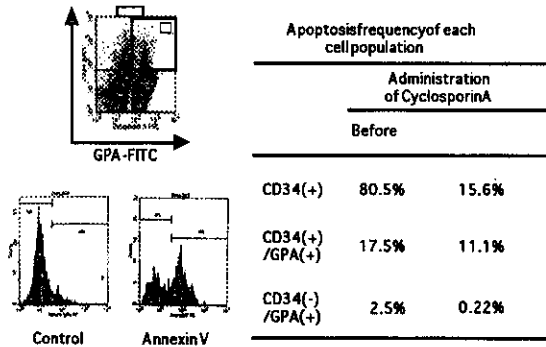


図1 骨髓造血前駆細胞 (CD34+細胞)、前期赤芽球系前駆細胞 (CD34+/Glycophorin A+細胞)、および後期赤芽球系前駆細胞 (CD34-/Glycophorin A+細胞) の、シクロスポリン投与前後におけるアポトーシス頻度の変化 (KM例)

末梢血データ CyA投与後	形態学 CyA投与 前後	Monoclonality CyA投与 前後	Apoptosis CyA投与 前後
Case 1 K.M.	軽快 異形成 (+) (+)	(+) (+)	(卅) (+)
Case 2 T.H.	軽快 異形成 (+) (+)	(+) (+)	(未) (+)
Case 3 I.A.	軽快 異形成 (+) (+)	(+) (+)	(未) (+)

表2 シクロスポリン投与前後における骨髓細胞形態、骨髓単クローン性造血及び骨髓造血前駆細胞 (CD34+細胞) のアポトーシスの変化

[考察と結論]

1990年代初頭以来、低形成性 MDS、ことに RA 患者の一部に副腎皮質ステロイド薬大量、CyA あるいは抗ヒト胸腺細胞抗体などを用いた免疫抑制療法が有効であることが報告されてきた。その後、骨髓細胞密度や MDS の病型にかかわらず免疫抑制療法が有効であるとの観察結果も報告されるようになってきた。本治療法の有効例においては治療後も骨髓細胞の形態異常が継続したとの

観察結果から、免疫抑制療法後に増加した末梢血球は MDS クローン由来であることが予想される一方、メチルプレドニゾン大量投与を含む治療の後に骨髓細胞の染色体異常が消失したという観察結果に基づいて、本治療法によって回復する血液細胞は正常クローンであるとする意見もあり、本治療法の正確な効果発現機序は不明のまま残されていた。今回われわれは、CyA 治療によって血液像が改善した低形成性 RA の3女性例についてその効果発現機序を検討し前述のような成績を得た。われわれの観察結果は、CyA 治療が有効であった低形成性 RA 症例における末梢血液像の改善が正常造血細胞の回復によるものではなく、MDS クローンに由来した造血前駆細胞のアポトーシスが一部解除されたことに基づいていることを強く示唆していると解釈されよう。この解釈が正しければ、少なくとも低形成性 RA における CyA の作用機序は、同薬が有効な再生不良性貧血の場合と異なることを意味していることになる。すなわち、MDS においては CyA の使用によって異常クローンの生存を助長し、腫瘍性疾患としての進展をも指示する可能性も考えておくべきであり、この点は今後さらに検討すべき課題であるろう。

[参考文献]

1. Biesma DH, et al, Cancer 79, 1548-1551, 1997.
2. Utsugisawa T, et al, Myelodysplastic Syndromes : Advances in Research and Treatment, edited by Nomura T, Yoshida Y, pp113-120, Elsevier, Tokyo, 1995
3. Jonasova A, et al, Br J Haematol 100, 304-309, 1998
4. Mollidrem JJ, et al, Br J Haematol 99, 699-705, 1997
5. Imai Y, et al. Br J Haematol 93, 146-150, 1996.

## IV 溶血性貧血

## PNH 優勢クローンによる 長期間の造血維持

金倉 謙、西村 純一、弘田 稔幸  
桑山 真輝、待井 隆志

(大阪大学医学部血液・腫瘍内科)

木下タロウ (大阪大学微生物病研究所免疫不全)

陰山 克 (大阪医科大学第二内科)

### [はじめに]

発作性夜間血色素尿症 (PNH) は、細胞膜表面の GPI アンカー型蛋白の欠損を特徴とする、クローナルな血液幹細胞性疾患である。PNH 患者では、GPI アンカー型蛋白である補体制御因子 (CD55 (DAF)、CD59) が欠損するので、補体の活性化に伴い溶血や血色素尿を呈する。GPI アンカー型蛋白欠損の責任遺伝子として PIG-A 遺伝子が単離されたが、報告されたほぼ全例で PNH 患者に PIG-A 遺伝子変異が同定されている<sup>1)</sup>。詳細な解析から、少なくとも2割近くの症例が2つ以上の変異クローンを有することが示されたり。我々は以前、一人の PNH 患者 J19 から2種類の表現型の異なる PNH 細胞株を樹立し、最終的に4種類の変異クローンを同定した<sup>2)</sup>。これらのうち、TK-14-型変異クローン (Mutation 1) が明らかに優勢クローンであり、その他の変異クローン (Mutation 2-4) は劣勢であった<sup>2)</sup>。今回我々は、この TK-14-型変異クローンが長期に渡り優勢を維持しているのか、それとも劣勢クローンが時間とともに優勢クローンを凌駕しクローンの交代現象が起こっているのかを検証するために、初期の解析から8年後、これらのクローンの変遷を追跡した。

### [対象と方法]

患者末梢血より赤血球、単核球、多型核白血球を分離し、DAF、CD59などの GPI アンカー型蛋白の発現を調べた。また患者骨髄より単核球を分離し、GPI アンカー型蛋白の発現を調べた。さらに、骨髄単核球より Stem Sep™ を用い造血前駆細胞

を濃縮し、GPI アンカー型蛋白と CD34の発現を調べた。

これらの末梢血単核球分画、および多型核白血球分画、骨髄単核球分画、および CD34陽性分画よりゲノム DNA を分離し、PIG-A 遺伝子の解析を行った。

さらに、初期の PIG-A 遺伝子解析から6-9年経過している他の3例 (J11、J12、J16 (SS-1<sup>-</sup>)) についても、同様に PIG-A 遺伝子の解析を行った。

### [結果]

患者末梢血より赤血球、単核球、多型核白血球を分離し、GPI アンカー型蛋白の発現を調べたところ、約80%の赤血球、約30%のリンパ球、約70%の単球、約60%の多型核白血球で GPI アンカー型蛋白陰性であった。また患者骨髄より単核球を分離し、GPI アンカー型蛋白の発現を調べたところ、約90%の細胞が GPI アンカー型蛋白陰性であった。さらに、骨髄単核球より造血前駆細胞を濃縮し、GPI アンカー型蛋白と CD34の発現を調べたところ、ほとんどの細胞が CD34陽性 CD59陰性であった。

これらの末梢血単核球分画、および多型核白血球分画、骨髄単核球分画、および CD34陽性分画のゲノム DNA について PIG-A 遺伝子の解析を行ったところ、優勢クローンである TK-14-型変異 (Mutation 1) は、いずれの分画においても明らかに優位を占めていた。一方、TK-1-型変異 (Mutation 2) は骨髄単核球分画中で1/16クローン同定されたが、その他の変異 (Mutation 3、4) は検出されず、新たな変異も見つからなかった (表1)。

そこで、初期の PIG-A 遺伝子解析から6-9年経過している他の3例 (J11、J12、J16) についても、再度 PIG-A 遺伝子の解析を行った。いずれの症例においても既知の変異クローンが現在も優勢クローンとして存在していることが確認された。(表2)。



表1 初回および今回の解析で同定された、PNH 患者 J19における PIG-A 遺伝子変異

Mutation	Nucleotides	Frequency of Mutation (First Analysis)		Frequency of Mutation (Current Analysis)			
		Hematopoietic Progenitor Colonies/Bursts	Granulocyte DNA clones	PB		BM	
				MNC DNA clones	PMN DNA clones	MNC DNA clones	CD34 <sup>+</sup> DNA clones
Mutation 1 (TK-14)	987 T	13/25	14/27	7/10	5/18	10/10	34/25
Mutation 2 (TK-1)	338 T to C	2/25	ND	0/15	0/15	1/16	0/16
Mutation 3	1003 G to T	4/25	2/27	0/10	0/10	0/10	0/25
Mutation 4	1028 AA	2/25	0/27	0/10	0/10	0/10	0/25

表2 初回および今回の解析で同定された、PNH 患者 J11、J12、J16における PIG-A 遺伝子変異

Patient	Sex	Mutation	First Analysis		Current Analysis	
			PMN/CD59 <sup>+</sup>	PMN/DNA (MNC/DNA)	PMN/CD59 <sup>+</sup>	PMN/DNA Clones
J11	M	408T del	83%	+	82%	7/18
J12	M	936A del	94%	14/20 (2/19)	33%	4/16
		322A del		1/12 (0/12)		
J16(88-1)	F	Intron 5,5' Splice Site T del	98%	+	ND	4/18

[考察・結論]

4例の PNH 患者 (J19、J11、J12、J16) の優勢クローンは、初期の解析から6-9年後の今も優勢を保っていた。

このことは1つの PNH 幹細胞クローンが6-9年に渡って造血を維持し得ることを示唆するものである。

[文献]

1. Nishimura J, et al, J Hematol 62, 175 - 182, 1999
2. Nishimura J, et al, Blood 89, 3470 - 3476, 1997

PNH患者PIG-Aミスセンス変異による  
PIG-A蛋白の機能異常

木下タロウ、渡辺 玲香、大石 一人  
西村 純一 (大阪大学微生物病研究所免疫不全)  
金倉 譲、桑山 真輝、弘田 稔幸  
待井 隆志 (大阪大学医学部血液・腫瘍内科)

[はじめに]

発作性夜間血色素尿症 (PNH) 患者では GPI アンカー型蛋白 (GPI-AP) が欠損するが、この GPI-AP 生合成の第1ステップに関与する PIG-A 遺伝子が PNH の責任遺伝子として単離された。PIG-A 蛋白は、GPI-AP 生合成第1ステップに働く他の3つの遺伝子産物 (PIG-C、PIG-H、GPII) と複合体を形成し、in vitro で GPI-GlcNAc 転移酵素活性を有することが分かっており、PIG-A 遺伝子の変異によりこの GPI-GlcNAc 転移酵素活性が低下する<sup>1,2)</sup>。実際にこれまでに報告された PNH 患

者の PIG-A 変異をみてもとフレームシフトが圧倒的に多いが、ミスセンス変異も報告されており、これらの中には GPI-AP の部分欠損 (II型) が指摘されている例も含まれている<sup>3)</sup>。この様な例では、PIG-A 蛋白自身の活性低下に加え、蛋白複合体形成に影響を及ぼし、結果として酵素活性の低下を引き起こしているものがあると予想される。今回我々は実際に報告されている各国の24症例21種のミスセンス変異について PIG-A 蛋白の機能を詳細に解析した (表1)。

[対象と方法]

変異 PIG-A cDNA を PIG-A 欠損型B細胞株 JY5 に導入し、CD59の発現回復をみた。変異 PIG-A cDNA を導入した JY5における GlcNAc 転移酵素活性を測定した<sup>2)</sup>。変異 PIG-A cDNA と種々の組み合わせで PIG-C、PIG-H、GPII cDNAs を JY5 に共導入または追加導入し、変異 PIG-A のみを導入した時の発現回復の程度と比較した。

表1 各国の PNH24症例21種のミスセンス変異の表面発現型とその変異の導入による発現回復と GPI-GnT 活性

	phenotype	FACS(single transfection)	FACS(complex transfection)	GPI-GnT activity
wild pig A		++	++	+
H 33 R	III	++	++	+
I 35 K	III	±	±	※
G 48 S	III + II	-	-	※
V 49 L	II	++	++	±
T 102 P	II	±	+	※
L 113 P	II	++	++	±
H 126 R	III	±	±	※
S 129 R	III	±	±	※
S 155 F	III	-	-	※
L 156 R	II	±	±	※
C 183 W	II	-	-	※
C 183 F	II	±	+	※
C 183 Y	III	±	+	※
G 239 V	III	-	-	※
G 239 E	※	-	±	※
G 263 R	III	++	++	±
G 265 E	III	++	++	±
N 297 D	II	++	++	+
G 335 R	II	±	±	※
I 377 N	III	++	++	±
A 405 V	II	++	++	+

※ Not done

### [結果]

21種の変異 PIG-A cDNA を JY5に導入すると、完全回復型 (8種)、部分回復型 (8種)、無回復型 (5種) に分けられた (表1)。完全回復型8種について GlcNAc 転移酵素活性を測定すると、3種 (H33R、N297D、A405V) を除いて明らかな活性低下を認めた (表1)。変異 PIG-A と PIG-C、PIG-H、GPII cDNAs を JY5に共導入すると、4種 (T102P、C183F、C183Y、G239E) で発現回復の増強が認められたので (表1)、あらかじめ変異 PIG-A cDNA を導入した JY5に PIG-C、PIG-H、GPII cDNAs を追加導入したところ、3種 (T102P、C183F、C183Y) で、発現回復の増強を認めた。さらに、あらかじめ変異 PIG-A cDNA を導入した JY5に種々の組み合わせで PIG-C、PIG-H、GPII cDNAs を追加導入したところ、2種 (T102P、C183F) において GPIIによる発現回復の増強がより顕著であった。

### [考察・結論]

PIG-A ミスセンス変異の導入実験と GlcNAc 転移酵素活性の結果から、3種を除く18種については、それぞれの変異が PNH の原因となっている

ことが確かめられた。PIG-A はグラム陰性細菌のリポポリサッカライドの合成に関与する GlcNAc 転移酵素とされている RfaK に相同性があることから、PIG-A 自身が GlcNAc 転移の触媒サブユニットであると推定される。I377N における GlcNAc 転移酵素活性が低下していたことから、377番目のアミノ酸 (イソロイシン) が Glc-Nac 転移酵素活性に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。JY5への変異 PIG-A cDNA と種々の組み合わせの PIG-C、PIG-H、GPII cDNAs の共導入および追加導入の実験から、アミノ酸 (T102P、C183F、C183Y) が、他の蛋白との結合に重要であることが示され、さらに102番目 (スレオニン) と183番目 (システイン) のアミノ酸が GPIIとの結合に重要である可能性が示唆された。

### [文献]

1. Watanabe R, et al, J. Biol. Chem 271, 26868, 1996
2. Watanabe R, et al, EMBO J 17, 877, 1998
3. Hong Y, et al, J. Biol. Chem 274, 18582, 1999
4. Nishimura J, et al, Am. J. Hematol 62, 175, 1999

再生不良性貧血・MDS における  
PNH 顆粒球検出の意義

中尾 眞二、中条 達也、王 紅波

(金沢大学医学部第三内科)

溝口 秀昭 (東京女子医大血液内科)

[はじめに]

再生不良性貧血患者の10~30%では、GPI アンカー膜蛋白の欠損血球が末梢血中に増加していることが従来から報告されてきた<sup>1)</sup>。最近 NIH の研究者らは、このような発作性夜間血色素尿症 (PNH) の形質をもつ顆粒球 (PNH顆粒球) が、RA や RAEB などの MDS 患者の末梢血にも少数検出され、PNH 顆粒球が増加している例は免疫抑制療法に反応しやすいことを報告した<sup>2)</sup>。一方、Luzzatto らは、NIH の研究者らよりも数十倍感度の高いフローサイトメトリーを用いることにより、健常者においても、ごく少数の PNH 顆粒球が末梢血中に存在することを明らかにした<sup>3)</sup>。したがって、免疫学的な機序が多くの例で発症に関与していると考えられる再生不良性貧血患者においては、高感度のアッセイを用いれば、従来の報告よりもさらに高い頻度で PNH 顆粒球が検出される可能性がある。また、PNH 顆粒球の存在が、免疫病態の予測に役立つ可能性も考えられる。そこで、われわれは健常者を対象として、Luzzatto らの方法の再現性を検証するとともに、再生不良性貧血と MDS 患者の末梢血について PNH 顆粒球の検出を試みた。

[対象と方法]

健常者62人、再生不良性貧血93人 (未治療の新規症例24人、既治療症例69人)、MDS 46人 (RA 30例、RAEB 14例、RARS 2例) のヘパリン加血を塩化アンモニウム緩衝液で溶血後、PE標識抗 CD11b 抗体、および FITC 標識抗 CD55、CD59抗体とインキュベートした。顆粒球ゲート内の CD11b<sup>+</sup>細胞10万個についてCD55<sup>+</sup>CD59<sup>-</sup>細胞 (PNH 顆粒球) の割合を決定した。

[結果]

PNH 顆粒球の割合は健常者62人では0~0.002%であり、0.003%を越える例は皆無であった (図1)。

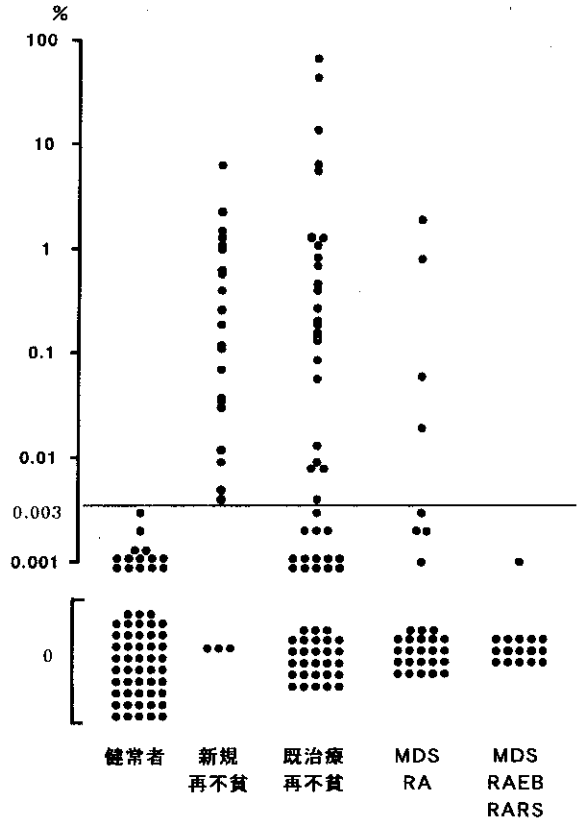


図1 末梢血顆粒球中の PNH 細胞の割合

再生不良性貧血患者では、PNH 顆粒球の有意な増加 ( $\geq 0.003\%$ ) が全体の53%に認められた (表1)。未治療の新規症例ではこの割合は87%と

表1 PNH 顆粒球陽性例

	例数	PNH顆粒球陽性例	(%)
健常者	62	0	0
AA	93	49	52.7
新規症例	24	21	87.5
既治療例	69	28	40.6
MDS	46	4	13.3
RA	30	4	16.7
RAEB	14	0	0
RARS	2	0	0