

Fanconi 貧血の分子病態： FANCA と BRG1 の結合

小澤 敬也、大月 哲也

(自治医科大学、内科学講座 血液学部門)

[はじめに]

Fanconi 貧血は遺伝性疾患であり、骨髄低形成の発症の一つの特徴とする。Fanconi 貧血は少なくとも7つの相補性群から成り、近年、その原因遺伝子が続々とクローニングされている。しかし、Fanconi 貧血原因遺伝子産物の機能は明らかとなっておらず、骨髄低形成発症のメカニズム等は不明のままである。我々は、Fanconi 貧血原因遺伝子産物の機能を明らかにすることにより、Fanconi 貧血の分子病態を解明したいと考え、以下の実験を行った。

[対象と方法]

蛋白質同士の関連を明らかにすることによりその機能の本態に迫れるのではないかと考え、Fanconi 貧血原因遺伝子産物の一つである FANCA を bait として、yeast two-hybrid 法により FANCA に結合する蛋白質をスクリーニングした。クロマチンリモデリング因子 (SWI/SNF 複合体) の精製は抗 BRG1 抗体を用いて免疫沈降法により行った。Fanconi 貧血 A 群患者由来細胞とこれに正常 FANCA cDNA を導入して補正した細胞から SWI/SNF 複合体を精製し、クロマチンリモデリング活性を比較した。

[結果]

上記実験から、SWI/SNF 複合体の重要な構成要素の一つである BRG1 が FANCA 結合蛋白質として同定された。FANCA と BRG1 の結合は免疫共沈実験からも確認できた。抗 BRG1 抗体を用いて、Fanconi 貧血 A 群患者由来細胞とこれに正常 FANCA cDNA を導入して補正した細胞から SWI/SNF 複合体を精製し、電気泳動後に銀染色を行いそのアセンブリーパターンを比較したとこ

ろ、両者には違いがあることがわかった (図1)。つまり、後者の細胞由来の SWI/SNF 複合体のアセンブリーパターンは正常リンパ球のものと同じであるが、前者の細胞由来のものは正常リンパ球のアセンブリーパターンとは異なることがわかった。また、同じくこれらの細胞から精製した SWI/SNF 複合体のクロマチンリモデリング活性を比較したところ、両者の活性に明らかな差は認めなかった (図2)。

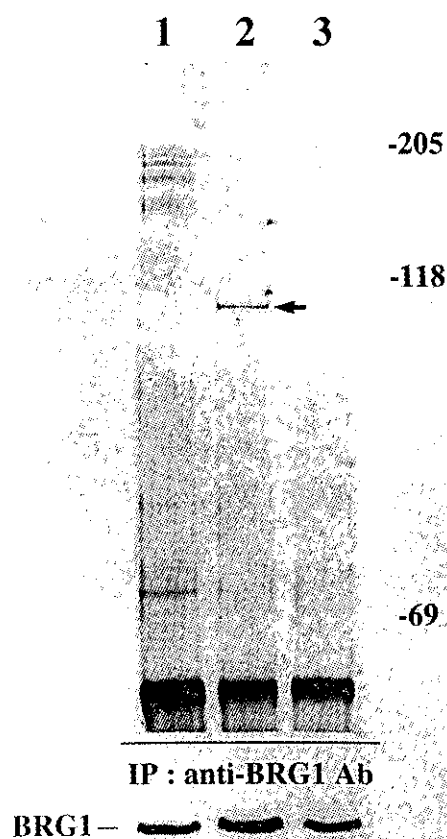


図1：SWI/SNF複合体のアセンブリーパターンの比較
抗 BRG1 抗体を用いて細胞可溶化液から SWI/SNF 複合体を精製し、電気泳動後に銀染色を行いそのアセンブリーパターンを比較した。Fanconi 貧血A群患者細胞由来の SWI/SNF 複合体には矢印で示したバンドが強く見られた。抗 BRG1 抗体を用いて各細胞可溶化液のイムノプロットを行い、各 lane の下に示した。

Lane 1: 正常リンパ球由来

Lane 2: Fanconi 貧血A群患者細胞由来

Lane 3: Fanconi 貧血A群患者細胞に正常 FANCA cDNA を導入して補正した細胞由来

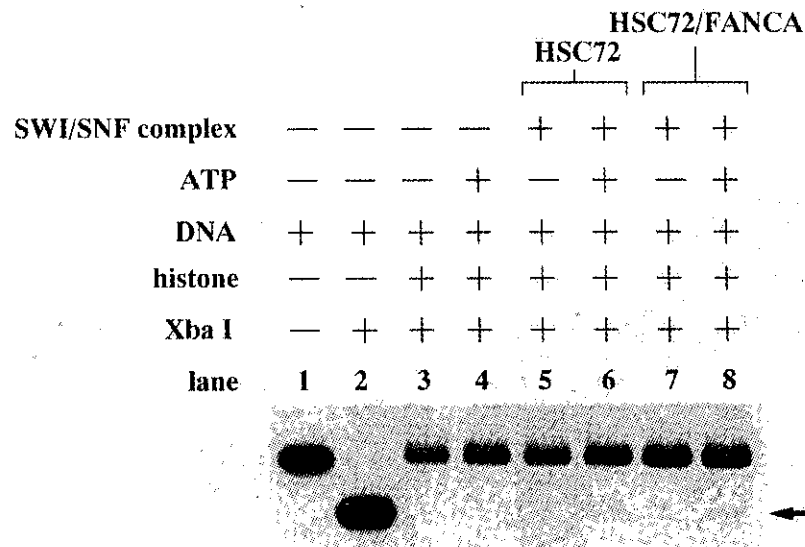


図2：クロマチンリモデリング活性

末端を32Pでラベルした DNA を精製したヒストンに巻き付け、人工的にクロマチンを合成した。DNA には1カ所の XbaI site が存在し、クロマチン構造をとる場合には XbaI による切断を受けないが、リモデリングを受けてクロマチン構造が開くと XbaI による切断を受ける。クロマチンリモデリング活性により出現したバンドを矢印で示す。HSC72は Fanconi 貧血 A 群患者由来の B リンパ球細胞であり、HSC72/FANCA はこれに正常 FANCA cDNA を導入して補正した細胞である。

[考察]

SWI/SNF 複合体は ATP に依存してクロマチン構造を開く活性を有しており、転写調節等に重要な働きをしていることが知られている。SWI/SNF 複合体は多数の構成要素からなる分子量 2MDa の巨大分子であるが、BRG1 はその構成要素の一つであり、クロマチンリモデリング活性を示すにあたり中心的な働きをしている。FANCA はこの BRG1 と結合することが示され、SWI/SNF 複合体のアセンブリーに関与している可能性が示唆された。しかし、図2の実験結果からは FANCA の有無は SWI/SNF 複合体の活性自体には影響を及ぼさないことが示された。SWI/SNF 複合体の機能における FANCA の意義を解明することは今後の興味ある課題である。最近、FANCC 蛋白質が転写因子型蛋白質 (FAZF) と結合することが報告された。本研究の結果と考え合わせると、少なくとも Fanconi 貧血原因遺伝子産物の機能の一部は転写調節と関連があるものと推察される。

[文献]

1. Phelan ML, et al, Mol Cell 20, 6380, 2000
2. Khavari PA, et al, Nature 366, 170, 1993
3. Otsuki T, et al, Biochem Biophys Res Comm 265, 630, 1999

Fanconi 貧血の分子病態の解析

浅野 茂隆 (東京大学医科学研究所付属病院、
先端医療研究センター)

山下 孝之 (東京大学医科学研究所、ゲノム情報応
用診断研究部門)

谷ヶ崎 博 (東京大学医科学研究所、先端医療研究
センター)

[はじめに]

Fanconi 貧血 (FA) は、小児期に進行性の骨髄機能不全を発症し、その後に高率に MDS/AML への移行を示す常染色体劣性遺伝疾患である。患者細胞は特に mitomycin C (MMC) など DNA 架橋剤の存在下に著明な染色体不安定性を示すことを特徴とする。FA は遺伝的に異なる少なくとも 8 群 (A, B, C, D1, D2, E, F, G 群) に分類され、このうち 6 遺伝子 (FANCA, C, D2, E, F, G) が最近までにクローニングされた。これらの分子は、既知の分子やお互いとホモロジーをもたず、相互作用しつつ新しい分子経路を形成することが強く示唆されている。この分子経路の制御機構や機能は明らかではなく、これを解明することは造血幹細胞におけるゲノムの維持機構を理解する上に重要であると考えられる。FA の細胞は DNA 損傷などのストレスに弱いため、HLA 適合同胞以外からの造血幹細胞移植の成績は不良である。したがって、遺伝子治療などにより造血幹細胞を再生させる手段の開発が将来の治療の方向性として期待される。

私達は、FA の発症機構の解明と、その知見に基づく新しい診断法の開発、また、これを使用した患者病態の解析を目的として研究を行っている。

[対象と方法]

患者末梢血から単核球を分離し、genomic DNA を抽出し、さらにカラムを用いて B 細胞と T 細胞に分離した。B 細胞からは EB virus によりリンパ芽球を樹立し、細胞周期、免疫プロットなどに

よる蛋白の解析、レトロウイルスによる機能補正などの解析に用いた。T 細胞は PHA、IL-2 の存在下に培養し、細胞周期の解析、蛋白の解析に用いた。genomic DNA から FANCA の各エクソンと両端にイントロンの一部を含む断片を PCR により増幅し、塩基配列の解析を行った。

[結果]

1. 正常人および患者末梢血から分離した T 細胞を PHA 存在下で培養し、経時的に細胞周期の変化を解析したところ、FA 患者 (9 例) の T 細胞は 72-96 時間をピークとして対照群 (9 例) と比較して著明な G2 期への蓄積 ($13.4 \pm 3.2\%$ vs. $36.03 \pm 2.9\%$) を示した。(図 1)。

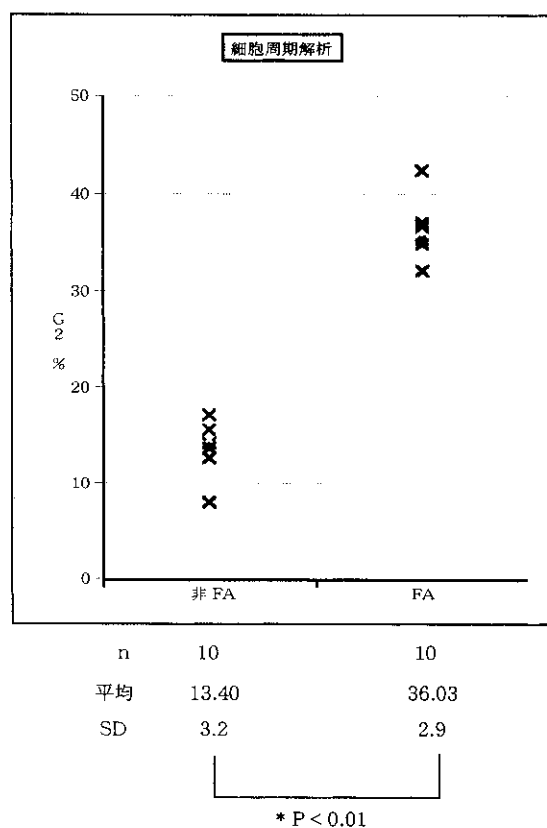


図 1 Fanconi 貧血 (FA) 患者における末梢血 T 細胞の G2 期の延長

末梢血 T 細胞を PHA を添加した培養液中で 96 時間培養後、細胞周期の解析を行い、FA 群、非 FA 群各 10 例で比較検討した。非 FA 群での G2 期は 13.4% (平均) であるの対し、FA 群では 36.03% (平均) と有意な G2 期の延長を示した。

2. 日本人 FA 患者の多くの例において、リンパ芽球や T 細胞を用いた免疫プロットによる解析で、FANCA 蛋白発現の著明～中等度の低下が認められた。しかし、これらの患者の中には FANCG の発現の低下あるいは消失を認めるものも見られた。これは、FANCA と FANCG が複合体を作って互いに安定化する働きがあるためと考えられる。したがって、蛋白の解析のみでは、いずれに属するのか断定が困難な例が存在した。

3. FANCC の変異の hotspot に変異が見出されなかった日本人 FA 患者 25 例について FANCA の塩基配列を解析した。その結果 10 例で病的意義を持つと考えられる配列の変化を見出した (表 1)。しかし、ほとんど全ての例で一方の allele の変異しか検出できなかった。これは大きな欠失変異などが多いために PCR がかからない allele が存在することがひとつの原因と考えられる。2456delC は 10 例のうち半数に見出された。これは他のグループの報告とほぼ一致しており、日本人における founder 変異と考えられる。また、その他にも 1303C>T などが日本人に特徴的な変異として見出された。

表 1 日本人 Fanconi 貧血患者における FANCA 遺伝子の病的変異

患者	変異	蛋白	ホモ/ヘテロ
FA11	3916insT	1312X	Home
FA17	505G>T 2170A>C	169X Thr724Pro	Hetero Hetero
FA20	2546delC	888X	Hetero
FA21	1303C>T	Arg435Cys	Hetero
FA23	2546delC	888X	Hetero
FA24	1303C>T	Arg435Cys	Hetero
FA28	978-979del	337X	Hetero
FA35	2546delC	888X	Hetero
FA47	2546delC	888X	Hetero
FA48	2546delC	888X	Hetero

4. 患者リンパ芽球を用いて正常 FANCA 遺伝子を導入し、細胞表現型 (細胞周期の異常) の変化を観察した。患者リンパ芽球は低濃度の MMC の存

在により著明な G2 期の延長を示す。患者リンパ芽球へのレトロウイルスによる正常 FANCA 遺伝子の導入を行ったところ、蛋白の解析から A 群であることが疑われた細胞で G2 期の延長が補正された。一方、正常者由来あるいは FANCA 蛋白が正常に発現されていた患者細胞では、細胞周期に大きな変化は見られなかった。したがって、この遺伝子導入による機能的補正を解析する方法は、どの FA 遺伝子に異常があるかを特定する上に信頼できる方法と考えられる。

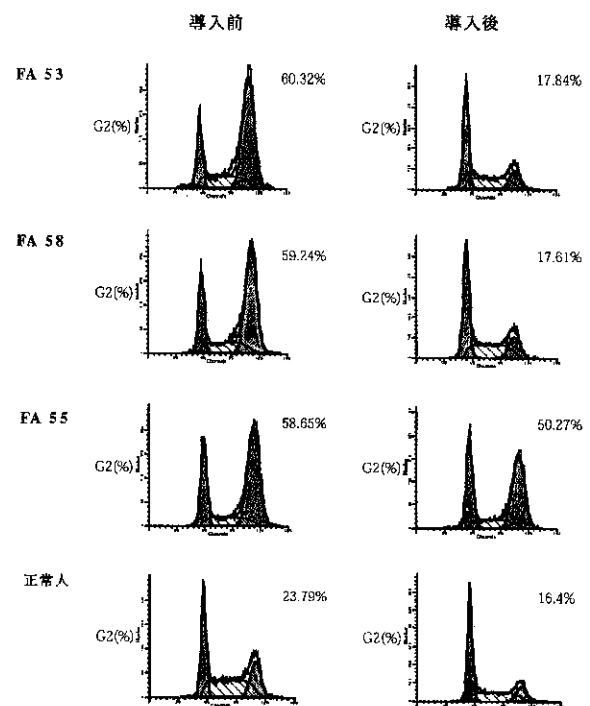


図 2 正常 FANCA 遺伝子の導入による細胞表現型の補正

FANCA 蛋白の発現解析から A 群であることが疑われる患者 (FA53, FA58) のリンパ芽球では、レトロウイルスによる正常 FANCA 遺伝子の導入後、MMC 添加による G2 期 (%) の延長が補正された。これに対し、非 A 群と考えられる患者 (FA55) や正常人のリンパ芽球においては、正常 FANCA 遺伝子を導入しても G2 期の大きな変化を認めなかった。

5. 最近クローニングされた FANCD2 遺伝子産物は、他のほぼすべての FA 蛋白に依存して DNA 損傷によりユビキチン化を受ける。したがって、FANCD2 のユビキチン化の測定は FA の新しい診断法となりうる。私達は、FA 患者のリンパ芽球や T 細胞を用いて検討したところ、予想通り患

者細胞では FANCD2 のユビキチン化が欠損していることが確認できた。また、この方法は FA 分子経路の後天的異常を解析する上に非常に有用であると考えられる。

[考案・結論]

本年度の研究で、FA 患者の診断法および分子病態の解明に大きな進展が認められた。特に、(1) 細胞表現型を用いた診断で、患者T細胞を用いた細胞周期解析の有用性の確立、(2) 蛋白の解析による異常遺伝子のスクリーニングを補完、確認する手段としてレトロウイルスによる正常 FA 遺伝子導入を用いた機能補正を利用した方法の開発、(3) FANCD2 のユビキチン化を利用した新しい FA 診断法の開発、である。また、私達はこれまでに日本人 FA 患者で FANCC 遺伝子の特徴的な変異を報告したが、今年度の解析で FANCA 遺伝子においても日本人に特徴的な変異が存在することが確認された。この知見は今後日本人の FA 患者の分子診断に有用と考えられる。

しかし一方で、以下のような今後の課題が明らかとなった。(1) FA 患者からのリンパ芽球の樹立には時間がかかり、成功率も低い。したがって、今後は患者末梢血T細胞を用いてレトロウイルスによる complementation を行う方法を開発する必要がある。(2) 日本人で最も頻度が高いと考えられる FANCA の変異の検出率は、塩基配列の解析のみでは不十分と考えられる。欠失を検出する他の方法を組み合わせることが必要と考えられる。(3) FA 分子経路と種々の病態との関係を明らかにするために、ユビキチン化 FANCD2 を測定する迅速で高感度な方法の開発が望まれる。

[参考文献]

1. Futaki M, et al, Blood 95, 1493, 2000
2. Yamashita T, et al, Int J Hematol (in press)
3. Garcia-Higuera I, et al, Mol Cell 7, 249, 2001

Ⅲ 不応性貧血

MDS 患者における免疫抑制療法の レトロスペクティブ調査

通山 薫 (京都大学臨床病態検査学)

内山 卓、石川 隆之

(京都大学血液病態学)

[はじめに]

骨髓異形成症候群 (MDS) に対して再生不良性貧血に準じた、いわゆる免疫抑制療法の報告が近年国内外にて散見され、しばしば有望な成績も報じられている¹⁾。今後あらたな治療法の開発に向けて、本研究ではまず参加各施設において MDS 患者における免疫抑制療法の現状や有効性等についての実態調査を行った。

[対象と方法]

1998 年以降に免疫抑制療法を行った MDS 症例について、アンケート方式でレトロスペクティブ調査を行った。1 次アンケート調査項目としては、病型、前治療の有無とその内容・治療効果、今回の免疫抑制療法の内容・治療効果とその判定時期・判定根拠、合併症についても記載を求めた。なおシクロスポリン (CyA) 単独療法施行例に対しては、効果判定や副作用などさらに詳細な 2 次アンケート調査を行った。

[結果]

最初に 1 次アンケート調査の結果を述べる。15 施設から 49 症例の回答を得た。男女比 25/24、年齢 18~77 歳 (中央値 58 歳)、病型は RA 42 例、RARS 1 例、RAEB 4 例、その他 2 例であった。22 例は前治療なし、27 例は輸血以外にステロイド少量ないし中等量、蛋白同化ホルモン、種々のサイトカイン、ビタミン D や K などの前治療を受けていた。前治療の詳細を表 1 に示す。

免疫抑制療法としては計 54 コース施行された。CyA 単独またはステロイド (CS) や G-CSF 併用が 34 コース、CyA+ATG(+CS) 6 コース、ATG(+CS) 3 コース、CS パルス 10 コースであっ

た。主治医の判断では著効 9 例、有効 13 例 (合計 22 例、これは評価不能 5 コースを除く 49 例中 45% に相当)、無効 27 例であった。とくに CyA 単独または CS や G-CSF 併用 34 コース中 17 コースが有効以上 (うち著効 7 例) であったのに対して、ATG を含む治療法では 9 コース中 2 コースのみが有効 (著効なし) にとどまった。免疫抑制療法の内容とその効果を表 2 に示す。さらに免疫抑制療法の効果を表 3 にまとめた。なお判定時期は 1~21 ヶ月後 (中央値 3 ヶ月、平均 5 ヶ月) で、有効の場合その根拠としては、血球減少の改善 21 例、輸血回数の軽減 8 例、一方芽球比率の減少や核型の改善を示した例はなかった。今回報告された合併症および病型移行について表 4 に示す。以上の成績から、CyA 単独療法が比較的有望と考えられたため、CyA 単独療法が施行された症例に絞って 2 次アンケート調査を行った。内容は CyA の用量・用法・投与期間、具体的な血算値、副作用・有害事象の詳細である。28 症例についての回答が得られた。効果判定可能 27 例中 16 例 (59%) に血球増加反応が見られた (効果判定には International Working Group による Hematological Improvement の基準 4 を参考にした)。反応ありと判定されたのは投与開始後 2~10 ヶ月で、16 例中 14 例は 6 ヶ月以内に判定された。なお 27 例の中で 4 例に可逆性ながら腎機能障害が見られた。また投与後 RAEB-t への移行、急性骨髄性白血病への移行が各 1 例ずつ見られたが、自然経過との判別はできなかった。

表 1 前治療の内容と効果

前治療	例数	有効	無効	評価不能
ステロイド (パルス以外)	12	1	11	0
蛋白同化ホルモン	11	1	10	0
サイトカイン	7	3	4	0
G-CSF	2	1	1	0
EPO	1	0	1	0
G-CSF+EPO	1	1	0	0
IL-1	1	0	1	0
IL-6	1	0	1	0
TPO	1	1	0	0
ビタミン D	5	0	5	0
ビタミン K	4	0	3	1
ビタミン B6+葉酸	1	0	0	1
抗腫瘍化学療法	2	0	2	0
CyA	1	0	1	0
ATG+パルス+G-CSF	1	1	0	0

[考案]

表2 免疫抑制療法の内容と効果

	コース数	著効	有効	無効	評価不能
CyA 単独	32	6	9	12	5
CyA+G-CSF	1	0	1	0	0
CyA+パルス	1	1	0	0	0
CyA+ATG/ALG	2	0	0	2	0
CyA+ATG/ALG+パルス	4	0	1	3	0
ATG/ALG単独	1	0	0	1	0
ATG/ALG+パルス	1	0	0	1	0
ATG/ALG+パルス+FK	1	0	1	0	0
パルス療法単独	10	2	1	7	0
不明	1	0	0	1	0
計	54	9	13	27	5

(49症例について計54コース実施)

表3 免疫抑制療法の効果のまとめ

	コース数	著効+有効	無効	有効率
CyAを含む治療法	40	18	17	51%
ATG/ALGを含む治療法	9	2	7	22%
CyAを含むがATG/ALGを 含まない治療法	34	17	12	59%
ステロイドパルス療法	10	3	7	30%

表4 免疫抑制療法に伴った合併症および病型移行

合併症	
感染症	2例 (CyA+ATG/ALG+パルス後、パルス後)
出血	2例 (CyA+ATG/ALG+パルス後下血、CyA後硝子体出血)
腎障害	3例 (CyA後2例)
心不全	1例 (CyA後)
内分泌異常	2例 (耐糖能異常、パセドウ病)
病型移行	3例 (RA→hypoMDS、ATTP→hypoMDS、RA→AML)

今回の2度にわたるアンケート調査から、本邦においてMDSに対して種々の免疫抑制療法が施行され、半数弱の症例で血球増加反応が見られることが示された。とくにCyAの効果期待できよう。一方腎機能障害を中心とする副作用や病型移行も危惧される。今後共通プロトコールによる緻密な臨床試験が必要であろう。なお本調査にて症例をご提示いただいた以下の施設に謝意を表す。札幌医大第4内科、岩手医大第3内科、埼玉医大第1内科、自治医大血液内科、獨協医大血液内科、東京大第3内科、東京医大第1内科、東京女子医大血液内科、NTT 関東病院血液内科、金沢大第3内科、京都大第1内科、近畿大第3内科、広島大原医研内科、九州大第1内科、長崎大原研内科。

[文献]

1. Mollidrem JJ, et al, Br J Haematol 99, 699, 1997
2. Jonasova A, et al, Br J Haematol 100, 304, 1998
3. Catalano L, et al, Hematologica 85, 133, 2000
4. Cheson BD, et al, Blood 96, 3671, 2000

低リスクMDSに対するシクロスポリン療法の有効性に関する共同研究の提案

内山 卓、石川 隆之

(京都大学血液病態学)

通山 薫 (京都大学臨床病態検査学)

【はじめに】

骨髄異形成症候群 (MDS) に対して再生不良性貧血に準じた、いわゆる免疫抑制療法の報告が近年国内外にて散見され、有望な成績も報じられている。今後あらたな治療法の開発に向けて、本研究ではまず参加各施設において MDS 患者における免疫抑制療法の現状や有効性等についてのレトロスペクティブ調査を行ったところ、評価可能な45例中21例で血球増加反応が見られた。とくにシクロスポリン単独投与27例中16例に反応が認められた。この結果に基づき、多施設共同臨床研究として低リスク MDS 患者を対象にシクロスポリン療法による血球回復効果のプロスペクティブな検討を今回提案するに至った。

【目的】

低リスク MDS 患者を対象に、シクロスポリン療法による血球回復効果の検討をおこなう。あわせて効果の持続性、本治療の耐受性、有害反応の有無を検討する (治療研究)。さらに本薬剤の作用機序および薬物感受性に関する遺伝子学的解析を含めた検討を行う (シクロスポリンの作用機序および薬物感受性に関する基礎的研究)。

【対象】

対象は年齢18才以上70才以下で、厚生省特発性造血障害調査研究班による診断基準を満たし、診断確定後1年以内の MDS で、IPSS で Low もしくは Int-1 のカテゴリーに合致する症例とし、ヒト遺伝子研究の審議を含めた施設内審査委員会および患者の同意が得られた症例に限る。主要臓器障害や活動性感染症のある症例、悪性腫瘍を有する (既往を含む) 症例や免疫抑制剤投与症例、前

治療の影響があると判断された症例は除外する。

【研究方法】

オープンスタディで FAX による中央登録方式とする (事務局は京都大学血液病態学におく)。試験薬剤シクロスポリンは事務局より供給される。本薬剤内服 4 mg/kg/day で開始し、目標血中濃度 (トラフ値150-200ng/ml) を維持しつつ24週間投与する。観察・検査項目としては臨床所見・輸血状況、一般臨床検査・血液学的検査項目に加えて、HUMARA 法によるクロナリティ解析 (東海大学第四内科)、HLA-DNA タイピング (HLA 研究所)、TCR レパトア検査 (塩野義製薬創薬研究所)、PNH 顆粒球の検索 (金沢大学第三内科) を予定している。24週後の時点で International Working Group の提唱する基準 (Cheson, et al: Blood, 2000) に従って効果判定を行う。minor response 以上の場合に限りさらに 8 週間継続投与を行い、再度効果を判定する。これを primary endpoint とする。32週以降の後治療は自由とする。secondary endpoint としては、有害事象発生率 (NCI-CTC に基づく)・治療遂行率、血液学的改善効果の持続性、progression free survival・生存期間の検討を予定している。さらに遺伝子解析等により有効性に関する基礎的評価を予定している。各項目に応じて適切な統計学的解析を行う。

登録期間 2 年間で50名の登録を目標とし、追跡期間は各々 3 年間とする。なお当初の25例について安全性の中間評価を行い、病型移行のリスクやその他重大な問題点につき協議する。

以上が多施設共同臨床研究提案の骨子である。

【計画実施に向けての問題点】

試験薬剤の提供についてはほぼ解決済みであるが、供給の具体的な方法および最終提供量についてメーカーと協議中である。本試験に係る医療補償問題への対応の準備については、現在小峰研究代表者が中心となって担当省部局・メーカーサイドと交渉中である。

[文献]

1. Molldrem JJ et al : Br J Haematol 99, 699-705, 1997
2. Jonasova A et al : Br J Haematol 100, 304-309, 1998.
3. Catalano L et al : Hematologica 85, 133-138, 2000.
4. Cheson BD et al : Blood 96, 3671-3674, 2000.

附1) 登録と検査の流れ

1. 該当患者に治療研究への同意の取得

機序・予測因子に関する研究への同意も確認する

2. 患者登録表を事務局に FAX で送付
3. 事務局は適格性を確認し、適格例には患者登録確認書を試験担当医師に FAX で返信
4. 事務局は調査票、採血管、ならびに32週分の薬剤を試験担当医師宛に発送
5. 調査票、採血管を受け取った後、治療開始前の末梢血検体を発送

TCR レパトア解析→ 塩野義製薬創薬研究所

HLA 検査→ HLA 研究所

HUMARA 法→ 東海大学第四内科

PNH 顆粒球→ 金沢大学第三内科

6. シクロスポリン投与開始

初期投与量 4 mg/kg/day

7、14、28日目に血中濃度トラフ値を測定、150-200ng/mlになるように投与量を調節

2週間ごとに CBC、生化学検査、(4週後以降) 4週間ごとの血中濃度トラフ値の測定を24週間継続
<減量基準>

血清クレアチニン値の上昇等のため、担当医師が目標血中濃度の維持が困難と判断した際には、投与量の減量を50%以内で認める

<休薬基準>

腎障害、感染症併発時、その他休薬が望ましいと判断された場合は最大2週間シクロスポリンを休薬できる
休薬期間中に限り必要に応じて G-CSF、副腎皮質ステロイド剤の使用が認められる

7. 第1回効果判定(投与開始24週後)

末梢血所見、輸血必要性から Cheson らの評価基準により判定

骨髄検査、特殊検査

TCR レパトア解析→ 塩野義製薬創薬研究所

HUMARA 法→ 東海大学第四内科

PNH 顆粒球→ 金沢大学第三内科

1項目でも minor response 以上の効果が見られれば反応有りとし、それ以外は無効とする

無効例ではすみやかにシクロスポリン投与を中止する

調査票に必要事項を記載し、末梢血・骨髄標本、ならびに残薬とともに事務局に返却

登録1年後から6ヶ月ごとに3年間アンケート調査

(以下24週後に反応が見られた例)

8. さらに8週間薬剤投与ならびに CBC、生化学検査、血中濃度トラフ値の測定を継続

9. 第2回効果判定(投与開始32週後)

第1回の効果判定で確認された効果が持続してみられれば有効と判定、それ以外は無効

32週以降の治療は自由とする

調査票に必要事項を記載し、末梢血・骨髄標本、ならびに残薬とともに事務局に送付

登録1年後から6ヶ月ごとに3年間アンケート調査

骨髓異形成症候群と妊娠
— 自験例 4 例と文献的考察 —

大野 竜三 (愛知県がんセンター)
大西 一功、藤沢 紳哉、竹下 明裕
(浜松医科大学第三内科)

[はじめに]

骨髓異形成症候群 (MDS) は高齢者に好発することもあり、妊娠を合併する症例はまれとされてきた。しかし疾患概念の浸透と出産の高齢化により、近年その報告が散見されるようになった。欧米からの報告では、MDS 合併妊娠はその後 MDS の進展を認め予後不良の症例が多い。本邦では約 25 例の報告があるが、大半は RA であり、妊娠中の一時的な血球減少の進行はあるが、出産後は血液学的改善を認めている。今回当科で 4 例の MDS 合併妊娠例を経験したので文献的考察も含め、妊娠の MDS に与える影響を検討した。

[対象と方法]

MDS 合併妊娠自験例 4 例の出産前後の臨床経過を検討し、本邦および欧米の報告と比較した。

[結果]

MDS 合併妊娠自験例 4 例の病型は全例不応性貧血 (RA) であり、4 例中 3 例で染色体が検索され、うち 2 例は正常核型、1 例は trisomy8 を呈した。妊娠初診時の血算は、Hb6.4-11.5 g/dl, WBC 1800-5300/ μ l, Plt 1.7-6.2 $\times 10^4$ / μ l で妊娠の進行とともに血球減少が進行し、非妊娠時に比較し 4 例中 3 例で血小板または赤血球輸血の頻度が増加し、出産時は全例で輸血を必要とした。出産後の血算は、全例で非妊娠時の値、またはそれ以上に回復し、妊娠出産が MDS の増悪や白血病への移行に関与したと思われる症例は認めなかった (代表的症例の経過を図 1 に示す)。出産後 4 ~ 61 ヶ月が経過しているが、いずれも生存中である (表 1)。

本邦での MDS 合併妊娠報告例では、妊娠前に血液疾患を指摘されたのが 14 例、妊娠中に血液疾患を指摘されたのが 11 例の合計 25 例あり、うち MDS と確定診断されたものは 18 例であった。18 例中 15 例では、妊娠中に血小板減少と貧血の進行があり、3 例で汎血球減少を呈した。25 例中 23 例では経過中に血小板輸血や赤血球輸血を必要とした。25 例中 21 例は妊娠継続し、21 例中 5 例で経膈分娩、16 例で帝王切開術が施行された。21 例全例で、出産後 3 ヶ月以内に血液学的改善を認めた。

表 1 MDS 合併妊娠の自験例 4 例

Age	FAB	CBC			Chromosome	After delivery	Survival month
		HGB g/dl	WBC / μ l	PLT $\times 10^4$ / μ l			
38	RA	7.1	1800	1.7	46XX	observation	61 alive
32	RA	6.4	2500	1.7	not done	observation	21 alive
30	RA	11.5	5300	6.2	47XX,+8	observation	5 alive
28	RA	8.4	3500	4.3	46XX	observation	5 alive

[考察・結論]

欧米のMDS合併妊娠例11例の報告では、出産後5例が急性骨髄性白血病へ移行し、それらを含む6例が約2年以内に死亡している(表2)。この妊娠出産後の不良な予後について、estrogenとleukemic cloneの増殖との関連が示唆されるものの、確定的な結論には至っていない。一方、わが国で経験されたMDS合併妊娠例は、自験例4例を含め全例で、出産後に血液学的改善を認め、妊娠出産がMDSの増悪に関与したと思われる症例は認めていない。これらの長期予後について引き

続き経過観察と症例の蓄積が必要であるととも、将来の増悪時に備え、分娩時に臍帯血の採取、保存を行うことも、今後考慮していかなければならない問題であろう。

[参考文献]

1. Tariq Siddiqui, et al, Cancer 66, 377, 1990
2. Paglica A, et al, Euro J Haematol 47, 310, 1991
3. 鹿野 共暁他：日本産婦人科・新生児血液学会誌 9, 35, 2000

表2 欧米でのMDS合併妊娠例

Age	FAB	CBC			Chromosome	After delivery	Survival month
		HGB g/dl	WBC / μ l	PLT $\times 10^4/\mu$ l			
20	RA	6.7	3300	2.8	47XX+del1p11	transfusion	5 alive
22	RA	7.1	6100	33.4	46XX	transfusion	48 alive
28	RA	8.0	4200	25.0	46XX	AML,chemo	44 dead
31	RAEB	8.5	4400	20.0	not done	AML,chemo	24 dead
32	RA	5.9	500	6.1	46XX	AML,chemo	10 dead
31	RA	7.0	2000	1.4	not done	allo BMT	1 dead
22	RAEB/AML	7.7	1200	6.2	not done	AML,chemo	24 dead
28	RA	6.8	3800	6.5	46XX+8	AML,chemo	18 dead
30	RAEB	9.1	7600	2.8	46XX+8	allo BMT	14 alive
28	RA/RAEB	9.2	6700	23.1	complex	allo BMT	12 alive
32	RA	10.6	2100	20.0	46XX	transfusion	8 alive

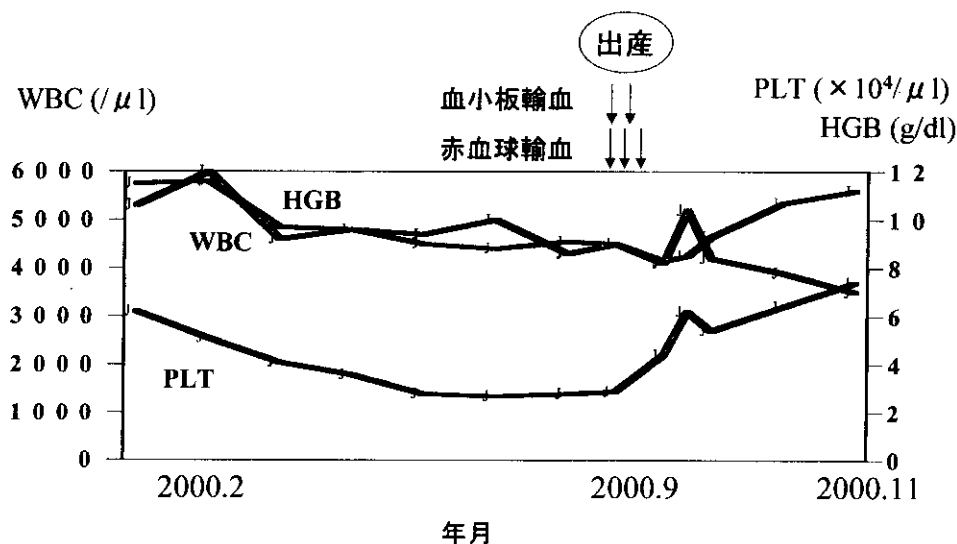


図1 30歳1経妊1経産婦の妊娠中の血算の推移

[結果]

骨髓異形成症候群分類の問題

大屋敷一馬、西巻 治朗、莊司奈穂子
宮澤 啓介、木村 之彦

(東京医科大学内科第1講座)

[はじめに]

1999年、リンパ球系悪性腫瘍の診断分類として提案されたWHO分類では骨髓系悪性腫瘍の分類にも言及し、急性骨髄性白血病(AML)とMDSの境界を従来の骨髓での芽球30%から20%に引き下げることが提唱しRAEB in transformation (RAEBt)をMDS分類より削除した。FAB分類ではRAEBを末梢血での芽球を1%以上あるいは骨髓での芽球を5%以上、RAEBtを末梢血での芽球5%以上あるいは骨髓での芽球を20~30%と設定した。一方、WHO分類ではAMLを骨髓での芽球を20%以上としている。すなわち、従来FAB分類ではRAEBtとされていたものがWHO分類では存在せず、これらはAMLとして扱うことになる。それでは、果たしてFAB分類でRAEBtと診断されていたMDS症例がすべてAMLに包含されるのだろうか。

WHO分類では骨髓での芽球比率のみでMDSとAMLの境界を定義している。一方、FAB分類では末梢血の芽球比率と骨髓での芽球比率およびAuer小体の存在によりRAEBtの診断をくだすと定義されている。すなわちFAB分類でのRAEBtは骨髓での芽球比率が20~30%を示すものだけではないことになる。つまりRAEBtには少なくとも骨髓での芽球比率で診断されるものと、末梢血の芽球比率で規定される2群より構成されており、前者がWHO分類ではAMLに帰属することになる。さらにBennettはMDS 2000分類を提唱し、WHO分類を補足している。そこで、これらの分類の妥当性を検証する。

[対象と方法]

当科で経験したMDS 112例を対象とし、FAB分類、WHO分類、MDS 2000分類により再検討した。

末梢血の芽球比率により診断されたRAEBt症例に比べ、骨髓での芽球比率によりRAEBtと診断される症例は高齢者が多く予後良好の傾向がみられる。この群では骨髓での芽球比率が高いにもかかわらず、末梢血での芽球の出現率は有意に低い。この意味するところは、少なくとも骨髓での芽球比率が20~30%により従来RAEBtと診断されていた症例はde novo AMLとは異なり特異的染色体転座を示す症例が極めて少なく、明らかにAMLと生物学的に異なる疾患単位であることが示唆される。一方、末梢血の芽球比率により従来RAEBtと診断されていた症例はWHO分類ではRAEBとされる。我々の経験でもFAB分類でRAEBtと診断された13例中5例がこの群に属し、必ずしも無視できうる一群ではないことが理解されよう。この群では5例中4例に-5/5q-あるいは-7/7q-を含む複雑型染色体異常がみられ、極めて予後不良であった。白血病化率は60%で、骨髓での芽球比率が20~30%により診断されたRAEBtでの62.5%と差を認めない(表1)。

Table 1 : Hematologic and Clinical Features of Refractory Anemia with Excess Blasts in Transformation

	RAEBt with PB blasts >5%	RAEBt with BM blasts 20-30%	P value
No. of patients	5	8	
Age (years)	48.2 ± 14.0	62.8 ± 7.4	0.098#
Sex (male/female)	3 : 2	2 : 6	
Peripheral blood			
Leukocytes (x 10 ⁹ /L)	7,540 ± 6,919	2,450 ± 1,828	0.1427#
Hemoglobin (g/L)	75.6 ± 15.8	79.5 ± 17.0	0.06069#
Platelets (x 10 ⁹ /L)	66.2 ± 23.7	96.0 ± 140.5	0.4201#
Blasts (%)	9.0 ± 2.4	1.5 ± 2.3	0.0032#
Marrow blasts (%)	9.4 ± 4.6	24.5 ± 3.9	0.0034#
Leukemic transformation	3/5 (60.0%)	5/8 (62.5%)	0.9282*
Survival (days)	222.8 ± 121.5	625.4 ± 439.2	0.057#
MDS duration (days)	184.0 ± 156.9	388.8 ± 370.2	0.3798#
Cytogenetics			
Normal karyotypes	1	3	
One abnormality	0	4	0.0397*
Two abnormalities	0	0	
Complex abnormalities	4 (4)	1 (0)	
IPSS			
INT-2	2	1	0.2522*
High	3	7	

Cytogenetics: Parentheses indicate number of patients with multiple chromosome abnormalities, involving -5/5q- and/or -7/7q-.

#: determined by using the Mann-Whitney-U test, and * determined by the chi-square test.

これら末梢血の芽球比率により診断された RAEBt は WHO 分類では RAEB、MDS 2000分類では RAEB-II と診断される。従来 FAB 分類で RAEB と診断されていた群を芽球比率でわけると (表 2)、生存期間に有意差がみられるが、末梢血の芽球比率により診断された RAEBt を RAEB-II として再分類しなおすと、より明瞭な生存期間の差、予後因子の違いが判明するとともに、MDS 期間の差、染色体様式の差が明らかになる (表 3)。

[考察・結論]

このことは、骨髄での芽球比率20%以上を AML として RAEBt を削除している WHO 分類では MDS を十分に把握しきれていないことを示すと同時に、WHO 分類では RAEB においても、その極めて多様な臨床像を無視していることになる。一方、骨髄での芽球比率20%以上の症例を AML として MDS から削除することが認められるならば、MDS 2000分類は MDS の診断、治療に有効な分類となるものと思われる。

[参考文献]

1. Bennett JM, et al, Br J Haematol 51, 189, 1982
2. Mufti GJ, et al, Br J Haematol 59, 425, 1985
3. Greenberg P, et al, Blood 89, 2079, 1997
4. Harris NL, et al, J Clin Oncol 17, 3838, 1999
5. Bennett JM, Int J Hematol 72, 131, 2000

Table 2 : Hematologic and clinical features of refractory anemia with excess blasts

	RAEB with BM blasts 5-10%	RAEB with BM blasts 11-19%	P value
No. of patients	16	7	
Age (years)	62.7 ± 10.9	64.7 ± 11.6	0.7381#
Sex (male/female)	15 : 1	6 : 1	
Peripheral blood			
Leukocytes (x 10 ⁶ /L)	3,712 ± 2,327	2,857 ± 1,866	0.4027#
Hemoglobin (g/L)	95.1 ± 22.7	70.3 ± 16.5	0.0122#
Platelets (x 10 ⁹ /L)	115.6 ± 82.1	104.4 ± 105.2	0.6398#
Blasts (%)	0.8 ± 1.2	0.9 ± 1.5	0.7528#
Marrow blasts (%)	7.4 ± 2.2	15.1 ± 1.0	0.0002#
Leukemic transformation	6/16 (37.5%)	3/7 (42.9%)	0.3828*
Survival (days)	742.1 ± 663.2	336.0 ± 558.3	0.0274#
MDS duration (days)	673.0 ± 683.7	261.0 ± 367.1	0.1243#
Cytogenetics			
Normal karyotypes	11	2	
One abnormality	2	1	0.2806*
Two abnormalities	1	1	
Complex abnormalities	2 (2)	3 (3)	
IPSS			
Low	1	0	
INT-1	12	0	0.0012*
INT-2	3	3	
High	0	4	

Cytogenetics: Parentheses indicate number of patients with multiple chromosome abnormalities, involving -5/5q- and/or -7/7q-.

#. determined by using the Mann-Whitney-U test, and * determined by the chi-square test.

Table 3 : Hematologic and clinical features of refractory anemia with excess blasts

	RAEB-I	RAEB-II including RAEBt PB blasts ≥5%	P value
No. of patients	16	12	
Age (years)	62.7 ± 10.9	57.8 ± 14.8	0.3291#
Sex (male/female)	15 : 1	9 : 3	
Peripheral blood			
Leukocytes (x 10 ⁶ /L)	3,712 ± 2,327	3,352 ± 5,032	0.8343#
Hemoglobin (g/L)	95.1 ± 22.7	72.5 ± 15.7	0.0061#
Platelets (x 10 ⁹ /L)	115.6 ± 82.1	88.5 ± 81.4	0.3651#
Blasts (%)	0.8 ± 1.2	4.3 ± 4.6	0.0263#
Marrow blasts (%)	7.4 ± 2.2	12.7 ± 4.1	0.0014#
Leukemic transformation	6/16 (37.5%)	6/12 (50.0%)	0.3811*
Survival (days)	742.1 ± 663.2	288.9 ± 422.8	0.0081#
MDS duration (days)	673.0 ± 683.7	228.2 ± 289.9	0.0512#
Cytogenetics			
Normal	11	3	
One	2	1	0.0641*
Two	1	1	
Complex	2 (2)	7 (7)	
IPSS			
Low	1	0	
INT-1	12	0	0.0001*
INT-2	3	5	
High	0	7	

Cytogenetics: Parentheses indicate number of patients with multiple chromosome abnormalities, involving -5/5q- and/or -7/7q-.

#. determined by using the Mann-Whitney-U test, and * determined by the chi-square test.

WHO 分類における MDS 診断基準の検討； RAEB-t の取扱について

朝長万左男、森 弘行、井上 順子
陣内 逸郎、栗山 一考

(長崎大学医学部 原研内科)

[はじめに]

1982年に FAB グループによる MDS の病型分類が提唱されて以来、この分類が広く受け入れられ、ほとんど全ての臨床研究がこれに基づいて行われてきたといっても過言ではない。その後約20年を経過したが、この間に MDS が独立した疾患単位として十分整理されたとは言えず、むしろより不明確になった部分もある。このような中で WHO 分類の改訂が行われ、その最も大きな変更点の一つは、急性白血病を芽球20%以上で定義し直した点である¹⁾。それに伴い、従来 MDS の一病型として規定されていた RAEB-t は、急性骨髄性白血病 (AML) の中に吸収されることになった。その意義と問題点について自験例をもとに若干の検討を行った。

[対象と方法]

これまでに当科において RAEB-t と診断した14症例 (表1) を対象とし、他の MDS 病型から移行した症例およびその他の前治療歴を有する二次性と考えられる症例は除外した。診断時の骨髄スメア標本を巨核球数とその形態異常、さらに顆粒球系、赤芽球系の形態異常などについて評価し、新たな WHO の診断基準に基づいて再分類した。

[結果]

RAEB-t 14例は、新 WHO 分類では AML with multilineage dysplasia (AML-MLD) 7例とその他の AML 7例 (M2 6例、M6 1例) に分類された (表2)。AML with maturation (M2) に分類された症例についても、芽球増加傾向に乏しく、臨床経過の上から典型的な急性白血病とは異なるものも見られた。

14例中7例では、1骨髄スメア標本中に50個以上の巨核球が観察されており、これらの症例では3血球系ともに強い形態異常を伴う傾向が見られた。巨核球が増加している例 (≥ 50 個/スメア) では、生存期間の中央値が60週 (20-159週) であり、減少している症例の34週 (9-64週) に比べ、生存期間が長い傾向が示唆されたが、両者の診断時点での芽球%、年齢や芽球30%以上で定義した白血病への移行頻度には差は見られなかった (表2)。

[考案・結論]

新 WHO 分類では、急性白血病を芽球20%以上と定義しており、従来の FAB 分類における RAEB-t は AML として扱われることになっている。当科においては、芽球が30%未満であっても、繰り返し骨髄穿刺を行うことで芽球が増加傾向を示し早期白血病と考えられるものや t(8;21) などの特異的な染色体異常を有するものなどは、これまでも RAEB-t の診断からは除外してきた。しかしながら、このような症例を除外しても、なお RAEB-t は不均一な病態群であることが窺われた。

新しい WHO 分類では、これまで RAEB-t と診断された症例は、特異的な染色体異常を持たない AML として FAB 分類における M1、M3 以外の各 AML 病型、あるいは AML-MLD と同一のカテゴリーの中に分類されることになる。特に巨核球数の増加を伴う症例では、他の血球系にも強い形態異常を伴うことが多く、新 WHO の基準では AML-MLD 病型の中に分類された。このような巨核球数の増加を伴う例では比較的生存期間が長い傾向が見られ、この中には MDS (RAEB) に連続する病態がより多く含まれるのではないかと推察された。また、これまで RAEB-t として MDS の中に含まれていたものが、従来 de novo の白血病として AML-TLD (AML with trilineage myelodysplasia) と診断されていた一群と同一に扱われることの是非に関しては、さらに検討を要する問題である。

新分類では、RAEB-t は急性白血病として扱われることとなったが、その約半数はなお典型的な

AMLとは異なる病態である可能性が示唆され、治療法選択についても慎重な取扱いが求められる。WHO分類でのRAEB-tの削除は、AMLとRAEB-tの予後が同等であることをその根拠の一つとしているが、その是非については病態の点からもさらに検討が必要ではないかと考えられた。

[文献]

1. Harris NL, et al. J Clin Oncol, 17, 3835, 1999

表1 対象症例

症例No.	年齢/性別	ヘモグロビン (g/dl)	白血球数 (/μl)	芽球 (%)	血小板数 (万/μl)	染色体異常	治療
1.	67/M	13.8	2000	0	7.1		
2.	56/F	6.9	7700	0	28.5	-8, -10, etc.	
3.	56/M	9.4	3500	1	0.4	45, XY, -22, t(5;11)	
4.	64/M	5.7	3700	1	3.5	normal	
5.	56/M	7.7	4950	0.5	7.8		
6.	36/M	7.8	3250	1	0.5	complex	Ara-C, VP-16
7.	70/F	11.7	3600	3	14.5	normal	G-CSF
8.	84/F	3.9	33850	30	15.8		Ara-C
9.	67/M	10.6	12200	11.5	3.1	normal	
10.	78/M	6.1	1300	1	15.2	47, XY, +8	
11.	63/M	5.8	1700	30	2.5		G-CSF, EPO
12.	36/F	6.8	7750	13	24.5	normal	
13.	70/F	10.8	2800	1	3.5	45, XX, 5q-, -12, etc.	CAG
14.	59/M	8.6	2100	1	10.0		Ara-C

表2 診断時骨髄所見とWHO分類

症例No.	芽球% (Auer)	顆粒球% (dysplasia)	赤芽球% (dysplasia)	巨核球数* (dysplasia)	生存(週)	白血病化	WHO分類
1.	4.4(+)	71.4(2+)	7.0(1+)	6(-)	64	(+)	AML with maturation(M2)
2.	4.6(+)	38.2(2+)	31.4(3+)	79(3+)	20+	(-)	AML with MLD
3.	10.4(+)	53.6(3+)	24.6(3+)	162(3+)	90	(+)	AML with MLD
4.	11.4(+)	27.8(2+)	51.4(2+)	159(1+)	47	(+)	AML with MLD(M6?)
5.	12.2(-)	24.4(2+)	54.8(3+)	12(-)	9	(-)	Acute erythro. leukemia(M6)
6.	15.8(+)	48.2(1+)	23.8(2+)	0(-)	22+	(+)	AML with maturation(M2)
7.	17.8(+)	7.7(3+)	1.2(2+)	>200(3+)	60	(-)	AML with MLD
8.	19.0(+)	32.0(2+)	43.8(3+)	0(-)	34	(+)	AML with maturation(M2)
9.	20.0(-)	59.2(2+)	2.4(1+)	0(-)	35	(-)	AML with maturation(M2)
10.	21.6(-)	20.6(2+)	40.2(2+)	50(2+)	90	(+)	AML with MLD
11.	23.1(-)	61.6(3+)	3.9(2+)	>200(3+)	25	(-)	AML with MLD
12.	24.0(-)	38.8(2+)	28.2(3+)	>200(2+)	159	(+)	AML with MLD
13.	24.6(-)	38.2(3+)	18.4(1+)	14(1+)	60+	(+)	AML with maturation(M2)
14.	29.6(-)	42.0(1+)	21.6(1+)	13(1+)	21	(-)	AML with maturation(M2)

骨髓異形成症候群における顆粒球系、
赤芽球系、巨核球系未熟ならびに
成熟細胞のアポトーシス

石田 陽治、小宅 達郎、伊藤 薫樹
檜澤 大樹、村井 一範、厨信 一郎
(岩手医科大学第3内科血液部門)

[はじめに]

骨髓異形成症候群 (MDS) は血球減少と血液細胞の異形成を特徴とするクローナルな疾患である。多くの症例に認められる血球減少と骨髓細胞密度の増加は過剰のアポトーシスによって引き起こされる無効造血によるものと説明されている。

今までに骨髓細胞がアポトーシスをおこしているという報告は多く認められるが、各血球系の未熟あるいは成熟細胞のアポトーシスについての詳細な検討は報告がない。今回、われわれは MDS 患者を対象にフローサイトメトリを用いた three color 解析を行ない、赤芽球系、顆粒球系、巨核球系の未熟ならびに成熟細胞を同定し、それぞれのアポトーシスの割合を検討した。さらに芽球のアポトーシスの割合と臨床データとを比較検討したので報告する。

[対象と方法]

岩手医科大学を受診した MDS 患者20名と正常コントロール5名とを対象とした。MDS 患者の内訳は9例の RA、6例の RAEB、5例の RAEB-t である。患者骨髓細胞から単核球を得、PECY 抗 CD34抗体と FITC 抗グライコフォリン抗体 (あるいは FITC 抗 CD33 抗体、あるいは FITC 抗 CD41 抗体) で染色した。洗浄後、binding buffer 中に細胞を浮遊させ Annexin V-PE を加えた。フローサイトメトリにて threecolor 解析を行なった。Annexin V-PE のヒストグラムを作成し PE 陰性細胞群と陽性細胞群に分けアポトーシスの割合を求めた。解析例を図1 (MDS-RA)、図2 (MDS-RAEB) に示した。MDS-RAEB、RAEB-t の芽球の表面抗原を CD45blast gating によって求めたところ全て

が CD34(+) CD33dim であった。これらを芽球細胞群としてゲートをかけ同様にアポトーシスの割合を求めた。

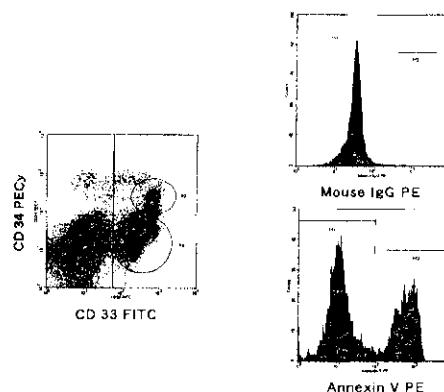


図1 MDS-RAのアポトーシス解析

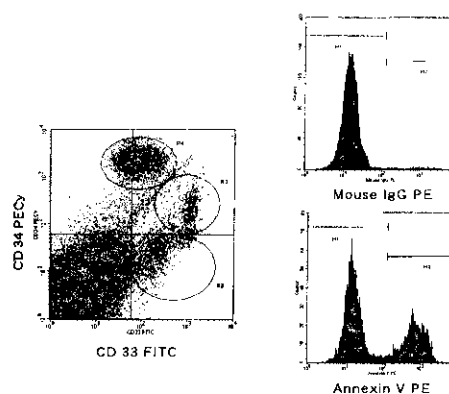


図2 MDS-RAEBのアポトーシス解析

[結果]

MDS (RA、RAEB、RAEB-t) においては CD34(+)GP(+) 細胞群のアポトーシスの割合は正常コントロールに比べ有意に高かったものの CD34(-)GP(+) 細胞群では症例によっては高いものも認められたが有意ではなかった (図3 a)。

CD34(+)CD33(+) 細胞群、CD34(-)CD33(+) 細胞群、CD34(+)CD41(+) 細胞群、CD34(-)CD41(+) 細胞群においても同様な結果であった (図3 b, c)。末梢血の好中球数、Hb 値、血小板数とそれぞれの未熟細胞のアポトーシスの割合との間には相関は認められなかった。一方、RAEB、RAEB-t での芽球のアポトーシスの割合は3%から25%まで様々であったが、8%未満のものは半年以内に白血病に移行した。白血病に移行した群と移行しなかった群の間には芽球のアポトーシスの割合に有意差を認めた (図4)。

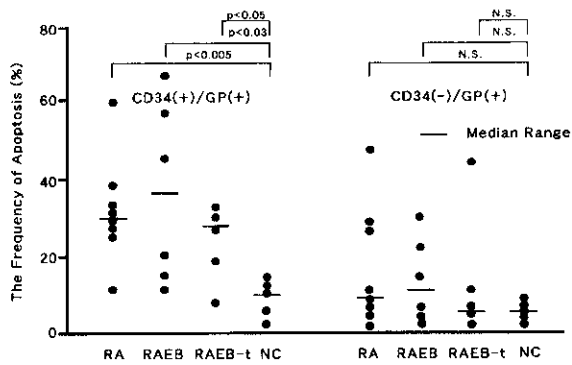


図 3 a CD34(+/-)GP(+) 細胞群のアポトーシス

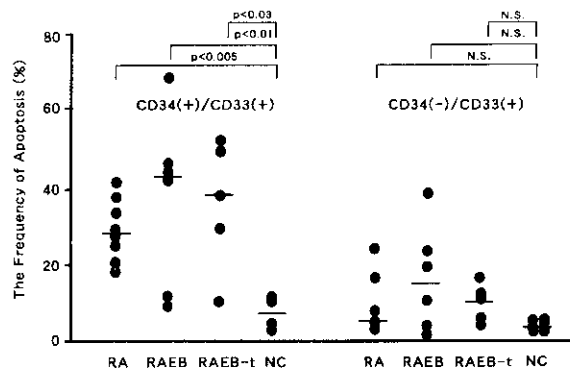


図 3 b CD34(+/-)CD33(+) 細胞群のアポトーシス

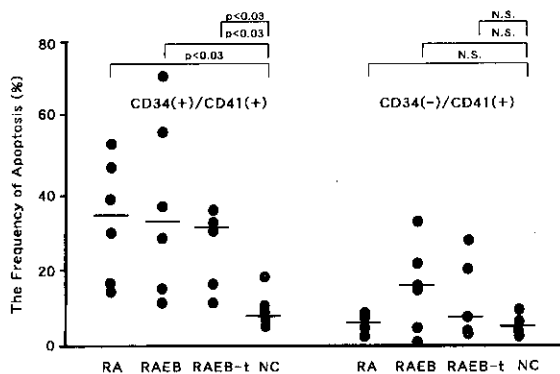


図 3 c CD34(+/-)CD41(+) 細胞群のアポトーシス

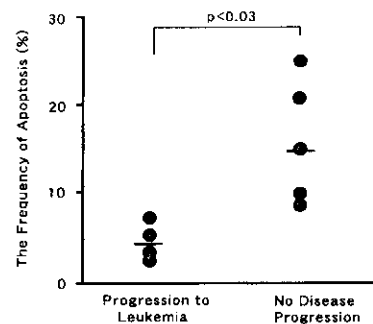


図 4 芽球のアポトーシスの割合と白血病への移行

[考案]

CD34(+)GP(+), CD34(+)CD33(+), CD34(+)CD41(+) 細胞群はそれぞれ CFU-E、CFU-GEMM~CFU-G、CFU-Meg の分化段階の細胞だと考えられる。これらのアポトーシスが亢進していることは、MDS において未熟細胞のレベルで既にアポトーシスがおき、無効造血を呈していると考えられる。また各血球系の成熟細胞のアポトーシスの割合がそんなに高くないことは未熟細胞レベルでアポトーシスをおこさなかった細胞のみが成熟できるものの、成熟過程においてもアポトーシスがおこりうることを意味している。一方、RAEB、RAEB-t での芽球のアポトーシス割合の低い症例が短期間で leukemic transformation を起こしやすいというデータは、白血化を考える上で非常に興味深い。つまり leukemic transformation には更に何らかの hit が必要で、芽球はアポトーシスから逸脱してしまい白血化にいたるものと考えられる。芽球のアポトーシスの割合は治療時期の選択をするうえでの重要な情報となりうるである

う。

[まとめ]

MDS の各血球系の未熟ならびに成熟細胞のアポトーシスの割合を定量した。未熟細胞群のアポトーシスの割合が有意に高かった。芽球のアポトーシスの割合も定量したところ、低い症例が短期間で leukemic transformation を起こしていた。これらのデータは MDS の病態、病気の進行、治療時期の選択を考える上で重要な情報となりうると思われる。

[文献]

1. Utsugisawa T, et al, Myelodysplastic Syndromes: Advances in Research and Treatment (eds: T. Nomura and Y. Yoshida) 113, 1995

ヒト c-Kit 陽性 CFU-E の SCF による apoptosis 抑制機序

澤田 賢一、遠藤 知之、西尾 充史
長谷山美仁、高島 英典、小池 隆夫

(北海道大学大学院医学研究科・分子病
態制御学講座)

小田 淳 (同・環境医学講座)

[はじめに]

ヒトの造血系では、様々な系を介したアポトーシスにより、造血調節がなされていることが知られている。一方で stem cell factor (SCF) や erythropoietin (EPO) などの造血因子は血球の分化・増殖に働くとともに、その存在がアポトーシス回避に働くことが報告されている。しかし、赤芽球系前駆細胞の Apoptosis に対する SCF の作用に関しては、相反する報告があり明らかではない。我々は、高度に純化したヒト赤芽球系前駆細胞 (CFU-E) から、さらに c-Kit 陽性細胞を純化し SCF による CFU-E の apoptosis 抑制機序を検討した。

[対象と方法]

1. CFU-E の分化・増殖誘導

純化ヒト CD34⁺細胞を EPO、SCF 及び IL-3 とともに液体培養し、赤芽球系への分化・増殖誘導を行った。7 日目に細胞を回収し CFU-E に相当する細胞を得た (Day7 細胞)。

2. GPA⁺/c-kit⁺細胞の純化と GPA⁺/c-kit⁻細胞、非赤芽球系細胞の誘導

Day7 細胞から、抗 c-kit 抗体を用い MACS system で、GPA⁺/c-kit⁺細胞を得た。また、Day7 細胞を EPO 単独でさらに 2 日間培養して GPA⁺/c-kit⁻細胞を得た。CD34⁺細胞を、EPO の入らない条件下で 7 日間培養し、非赤芽球系細胞を得た。

3. コロニー形成法

EPO (2U/mL) を含む 0.25mL の無血清 fibrin clot 培地に細胞を 1,000 個/mL 濃度で植え込み、5%CO₂/10%O₂ incubator で 7 日間培養後、固定し hemoglobin (Hb) 染色を行った。Hb 陽性細胞 2 個以上からなるものを赤芽球コロニーとして算定した。

4. 液体培養

1 × 10⁵~5 × 10⁶個/mL の細胞を EPO (2U/mL) を含む無血清液体培地に浮遊して検討した。

5. 免疫沈降・ゲル電気泳動・western blotting 既報 (1) のごとく行った。

6. アポトーシス

DNA 断片化は ELISA キット (Cell Death Detection ELISATM, Boehringer Mannheim) を用い、cytosolic oligonucleosome 結合 DNA を定量した。また DNA 電気泳動により DNA 断片化を視覚的に確認した。アポトーシスの早期に細胞表面に出現するフォスファチジルセリンを AnnexinV を用いてフローサイトメーターで解析した。

[結果]

1. SCF は GPA⁺/c-kit⁻細胞の DNA 断片化を抑制する GPA⁺/c-kit⁻細胞では、サイトカイン free では、4 時間目から 6 時間目にかけて、著明な DNA 断片化が認められた。この断片化は EPO や SCF によって明らかに抑制された (図 1)。この SCF の効果は生理的濃度 (5ng/ml 前後) で認められた。一方、GPA⁺/c-kit⁻細胞と非赤芽球系細胞では、サイトカインの有無に関わらず、24 時間以内の検討では DNA 断片化の増加を認めなかった。

2. SCF は GPA⁺/c-kit⁺細胞の赤芽球コロニー形成能を一時的に維持する GPA⁺/c-kit⁺細胞を各種サイトカイン存在下で培養した後の、コロニー形成能を検討した。EPO や EPO+SCF ではコロニー形成能の著明な増加が認められた。サイトカイン free では、コロニー形成能が培養時間とともに有意に低下した。SCF は、一時的にこれを阻止した (図 2)。

3. SCF による apoptosis の抑制は Src family kinase を介する

EPO と SCF は細胞内のシグナル伝達において Src family kinase である Lyn などの活性化を来すことが報告されている。そこで Src family kinase の特異的拮抗剤 PP2 を用いて、SCF の apoptosis 抑制作用を検討した。

PP2 もしくはその非活性型 analog PP3 は EPO もしくは EPO+SCF による DNA 断片化の解除に影響を及ぼさなかった。PP2 は SCF による DNA 断片化の解除を完全に阻止したが非活性型 analog PP3 にその働きはなかった (図 3)。