

図1 GPA+/c-kit+細胞のDNA断片化
NONE (□), EPO (○), SCF (●), EPO+SCF (■)

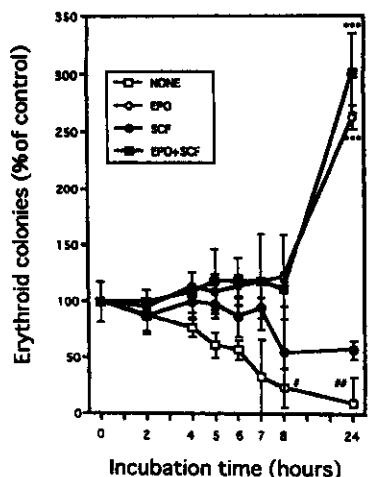


図2 GPA+/c-kit+細胞のコロニー形成能
NONE (□), EPO (○), SCF (●), EPO+SCF (■)

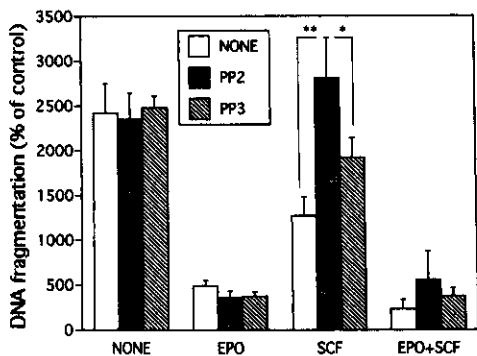


図3 SCFによるDNA断片化の抑制に対するPP2・PP3の効果
DMSO (□) PP2 (□) PP3 (■)

4. AKTのリン酸化はPP2によって阻害される。

Day7細胞をDMSOおよびPI-3Kの阻害剤であるLY294002で15分処理した後、SCF 100ng/mlを加えて時間毎のAKTのリン酸化を測定した。

DMSOでは5~10分をピークにAKTのリン酸化が認められたが、LY294002によってAKTのリン酸化は阻害された(図4A)。PP2の添加によ

ってもAKTのリン酸化が阻害された(図4B)。

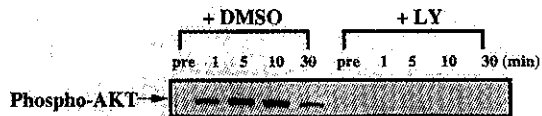


図4A LY294002によるAKTリン酸化の抑制

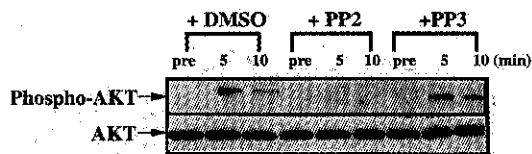


図4B PP2によるAKTリン酸化の抑制

[考察・結論]

骨髓異形成症候群(MDS)の無効造血にはapoptosisが関与していると考えられている。また、MDSに限らず再生不良性貧血など、様々な疾患においてapoptosisが重要な役割を果たしていると報告されている。しかし、その多くにおいて、これらの現象を司る機序については不明である。今回、ヒト赤芽球系前駆細胞を用いて、apoptosis抑制におけるSCFの役割についてその細胞内メカニズムを検討した。今回の報告で、SCFはsrc family kinaseからPI-3K/AKTを介してc-kit+赤芽球系前駆細胞のapoptosisを抑制する機序が示唆された。これらの機序は赤芽球系のみならず種々の細胞の造血制御に深く関わっている可能性がある。より有効な治療法を開発するために、細胞の分化・増殖と生存・死にかかわる決定機構を解明し、種々の造血障害の機構について理解を深めていきたい。

[文献]

1. Haseyama Y, et al, Blood 94, 1568, 1999

骨髓異形成症候群における GSTT-1 遺伝子異常と rapamycin による apoptosis の誘導

前田 裕弘、嶋田 高広、松田 光弘
金丸 昭久 (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、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と報告されている。アイソフォームとして a、m、p、q の 4 種類がある。骨髓異形成症候群 (MDS) 患者における遺伝子異常として、ras、fms、p53、NF-1、rb および IRF-1 などの異常発現が報告されている。今回、われわれは、MDS 患者の GST theta-1 (GSTT-1) 遺伝子の RNA レベルでの発現様式について検討した。すなわち、GSTT-1 遺伝子発現は野生型と変異型があり、変異型の一部の DNA 配列が Target of rapamycin (TOR) と 64% の相同性を有することが判明した。TOR は以前 human FKBP-rapamycin associated protein と呼ばれていた 289 kDa の巨大分子であり、免疫抑制剤 Rapamycin の標的分子である。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。野生型および変異型 GSTT-1 遺伝子を発現ベクターにクローニングし、K562 および HL-60 に導入し、恒常的に発現する細胞株を作製し、rapamycin の影響を観察すると同時に rapamycin の治療的応用についても考察した。

[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 により野生型と変

異型に分けた。

2. 623 bp の野生型および 500 bp の変異型 GSTT-1 遺伝子を発現 vector pTARGET に挿入し、K562 および HL-60 に electroporation 法にて遺伝子導入し、G418 selection で安定型発現細胞株を作製した。

3. これらの細胞に rapamycin を最終濃度 1nM、10pM の濃度で添加し、細胞増殖への影響および apoptosis 誘導への影響を観察した。

[結果]

1. 図 1 に示すように、変異型 GSTT-1 を発現する K562p500 および HL-60p500 は rapamycin の濃度依存的に増殖抑制が観察された。一方、野生型 GSTT-1 を発現する k562p623 および HL-60p623 の増殖は変化しなかった。

2. また、rapamycin 添加後 6 時間で、Annexin V assay を行った。その結果、図 2 に示すように、変異型 GSTT-1 を発現する K562p500 のみ early apoptosis が観察された。

3. 同時に、rapamycin 添加後 12 時間、24 時間、48 時間で genomic DNA を抽出し、アガロース電気泳動を行った。その結果、時間依存的に DNA fragmentation が観察された (図 3)。

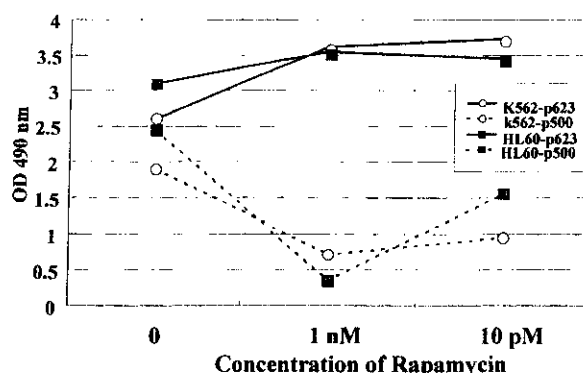


図 1 野生型 GSTT-1 遺伝子および変異型 GSTT-1 遺伝子導入による K562 および HL-60 の各種細胞株の増殖に及ぼす rapamycin の影響

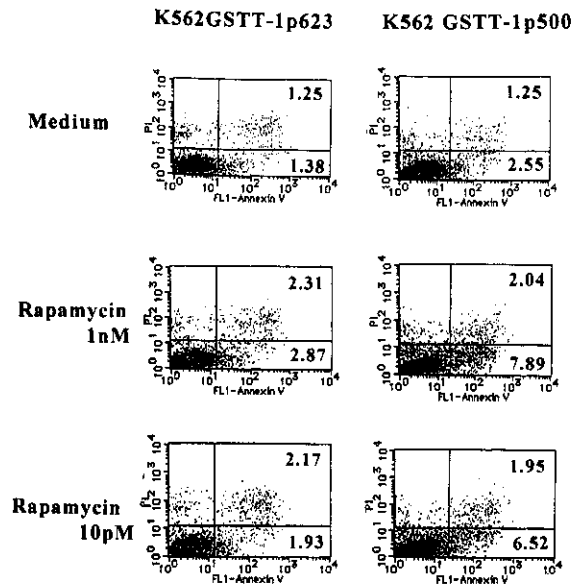


図2 rapamycin 添加後6時間での early apoptosis の検出 (Annexin V assay)

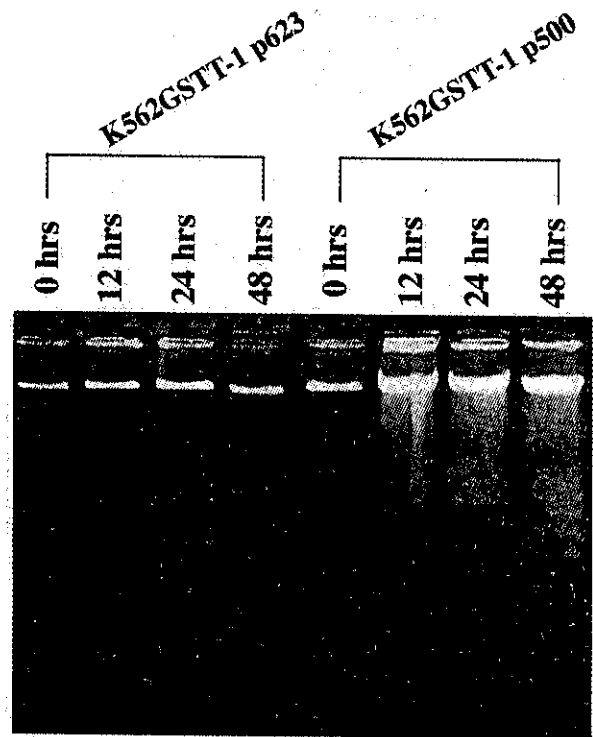


図3 rapamycin 添加後12時間、24時間、48時間での DNA Fragmentation の誘導

[考察]

MDS 患者での変異型 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。また、変異型 GSTT-1 の一部の DNA 配列が TOR に homology を持つことが、判明した。この分子は以前は human FKBP-rapamycin associated protein (FRAP) と呼ばれていた蛋白であり、免疫抑制剤 Rapamycin の標的分子であり、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。変異型 GSTT-1 遺伝子を発現 vector に挿入し、K562 および HL-60 に導入した後、rapamycin を添加すると著明な増殖抑制と同時に時間依存的に apoptosis の誘導が観察された。これらのことより、変異型 GSTT-1 遺伝子を発現する MDS 患者に対して、rapamycin はひとつの治療の選択肢になる可能性が示唆される。

[文献]

1. Pemble S, et al, Biochem J 300, 271, 1994
2. Lorenz MC, et al, I Biol Chem 270, 27531, 1995

骨髓異形成症候群における CD34 陰性 幹細胞の解析

安藤 潔、沖 将行、堀田 知光

(東海大学 血液リウマチ内科)

中村 嘉彦 (東海大学 細胞移植研究センター)

[はじめに]

従来ヒト造血幹細胞は CD34 陽性細胞分画に存在することが示されてきたが、最近、CD34 陰性分画においても存在することが報告されている。我々はこれらの細胞を純化培養するシステムを報告^{1,3)}してきた。骨髓異形成症候群 (MDS) において造血前駆・幹細胞の様々なレベルでの異常が病態発症に関与していることが明らかにされている。そこで、我々は MDS における CD34 陰性幹細胞の病態への関与を以下のように解析した。

[対象と方法]

trisomy 8 (+8) : 3 例 (RAEB 1, overt AML 2)、5q- : 1 例 (RAEB)、monosomy 7 (-7) : 1 例 (RAEB-T) の計 5 例の患者骨髓を採取し、Ficoll 分離後 FACS Vantage にて CD45-APC 陽性かつ各種分化マーカー (CD2, 3, 4, 14, 16, 19, 20, 24, 41, 56, Gly-A-FITC) 陰性 (Lin-) の CD34-PE 陽性及び陰性幹細胞をソートした。その後両細胞群よりサイトスピン標本を作成し、FISH 法にてそれぞれの染色体異常の有無を検討した。

[結果]

表 1 に示すように、+8 の 1 例を除き全例で Lin- CD34 陽性及び陰性幹細胞両群に染色体異常を認めた。+8 の 1 例は CD34 陽性幹細胞においては 76.0% と陽性であるのに対し、CD34 陰性幹細胞においては 0.9% と染色体異常がなかった (図 1)。

表 1 患者背景と Lin-CD34 陽性及び Lin-CD34 陰性細胞における染色体異常の割合

pt	F AB	karyotype	% of chromosomal aberrations	
			Lin-CD34+	Lin-CD34-
T.Y	RAEB	+8	76.0	0.9
I.H	RAEB-M2	+8	75.5	80.2
M.T	RA	+8	95.0	93.2
S.S	RAEB-T	-7	78.8	54.3
S.T	RAEB	5q-	97.4	98.1

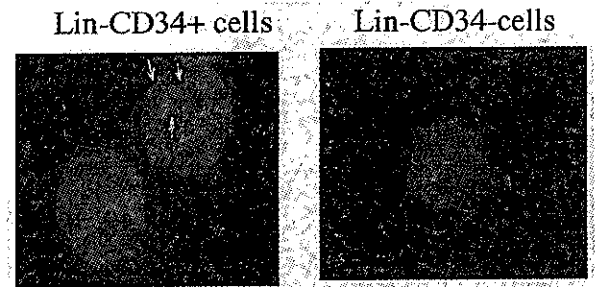


図 1 Lin-CD34 陰性細胞において染色体異常を認めなかった +8 の FISH の顕微鏡写真

[考案・結論]

MDS は heterogenous な疾患であり、検討症例数が少なく断定できないが、ほとんどの例で Lin-CD34 陽性及び Lin-CD34 陰性幹細胞両分画で染色体異常を有した。一方、Lin-CD34 陰性細胞において染色体異常を認めなかった +8 の一例は化学療法後 6 ヶ月となるが寛解を維持している。MDS の病態、予後を考察する上で興味深い所見であり、多数例での検討が今後必要と考えられた。

[文献]

1. Ando K, et al, Exp Hem 28, 690, 2000
2. Nakamura Y, et al, Br J Hematol 108, 801, 2000
3. Nakamura Y, et al, Blood 94, 4053, 1999
4. Saitoh K, et al, Blood 92, 2886, 1998
5. Nilsson L, et al, Blood 96, 2012, 2000

骨髓異形成症候群患者末梢血および 骨髓における T 細胞レパトアの解析

寺村 正尚、岩部 弘治、増田 道彦
溝口 秀昭 (東京女子医科大学血液内科)

【はじめに】

骨髓異形成症候群 (MDS) は造血幹細胞レベルでの異常が原因となって引き起こされるクローナルな疾患と考えられている。近年になって、再生不良性貧血に効果が認められるシクロスポリンや抗胸腺細胞グロブリン (ATG) といった免疫抑制剤が、MDS (特に不応性貧血) の血球減少に対しても有効性を示し、輸血が不要になる症例があるとの報告が海外でなされるようになり、注目されている。このことは MDS についても再生不良性貧血と同様に、その病態に免疫学的な機序が関与していることを示唆しているものと考えられる。

本研究は MDS の病態にクローナルな T 細胞が関与している可能性について明らかにすることを目的とする。

【対象と方法】

患者は MDS (RA) で膠原病などの他の疾患や、感染症などが無い者を対象とした。MDS (RA) 患者および正常人の末梢血、骨髓液からリンパ球分画を採取する。このリンパ球細胞から RNA を抽出し、RT-PCR・SSCP 法にて T 細胞レセプター (TCR) β 鎖の complementarity determining region 3 (CDR3) 領域のレパトアの解析を行った。また、各 $V\beta$ family の usage を、PCR-Southern 法にて検討した。これらの結果から、ある特定の $V\beta$ 遺伝子を発現している T 細胞の中にクローナルな増殖が強く示唆された場合、その $V\beta$ 陽性 T 細胞の CDR3 領域の塩基配列、アミノ酸配列を確認し、クローナルな T 細胞の存在を確定するとともに、それらのクローナルな T 細胞がその $V\beta$ 陽性 T 細胞の中のどのくらいの割合を占めているかを検討した。

【結果】

正常人の場合、RT-PCR・SSCP 法にて TCR β 鎖のレパトアの解析を行うと、末梢血、骨髓とも程度の差はあれ、ほとんどすべての $V\beta$ subfamily でスメアー状となり、ポリクローナルであることがわかる。一方、MDS 患者の場合多くの $V\beta$ subfamily においてオリゴクローナルな T 細胞の存在を示唆する明瞭なバンドが認められた。

こうした MDS (RA) 患者のうちの 1 症例において、末梢血の TCR $V\beta$ のレパトア解析でオリゴクローナルな T 細胞の存在を示唆するバンドが認められた $V\beta$ subfamily のうちの 1 つである $V\beta 11$ の CDR3 領域の塩基配列を解析した。その結果、 $V\beta 11$ については、その 55% が単一のクローンであることが判明した。この患者については、1 ヶ月後に再度採血し、再度 $V\beta 11$ の CDR3 領域の塩基配列を解析したところ、やはりその 60% が前回と全く同じクローンで占められていた。

また、これとは別の MDS (RA) 患者 (患者(2)) の骨髓においても同様に、はっきりとしたバンドが認められた $V\beta$ subfamily のうちのいくつかについて、CDR3 領域の塩基配列の解析を行った。その結果 $V\beta 11$ 、 $V\beta 16$ については、複数のオリゴクローナルな T 細胞クローンの存在が明らかになり、さらに $V\beta 8$ についてはすべてが単一の T 細胞クローンのみであることが明らかになった。この患者については、これらの $V\beta$ subfamily において、骨髓検査と同時に採取した末梢血を用いて解析すると骨髓で認められたバンドがはっきりせず、スメアー状となるなど、末梢血と骨髓との間で SSCP の結果に相違が認められた (図 1)。そのうちの $V\beta 8$ 、 $V\beta 16$ について末梢血、骨髓両方の CDR3 領域の塩基配列の解析を行った結果、骨髓においては前述のようにクローナルな T 細胞の存在が認められたが、末梢血においては、クローン性の T 細胞の存在が全く認められなかった (表 1、2)。さらに $V\beta 8$ については末梢血に比べて骨髓において $V\beta 8$ の usage が高くなっていた (図 2)。

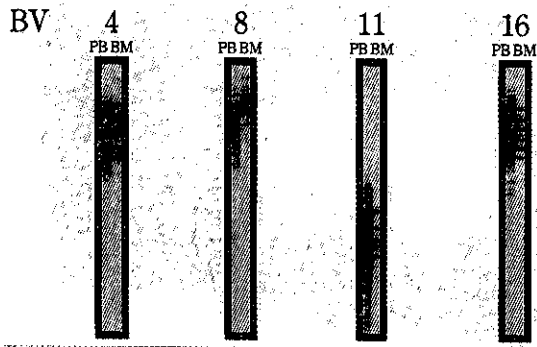


図1 RT-PCR/SSCP 法による MDS (RA) 患者 (2) の末梢血、骨髄 T リンパ球の TCR BV の解析

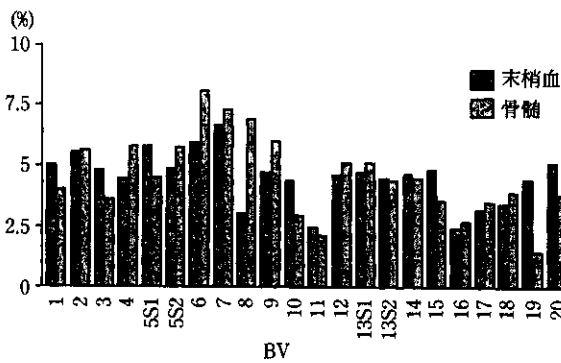


図2 MDS (RA) 患者 (2) の末梢血および骨髄の各 V beta subfamily の割合

[考案・結論]

①MDS (RA) 患者の末梢血、骨髄にはクローナルなT細胞が存在することが明らかになった。
 ②同時期に採取した末梢血と骨髄の TCR V beta のレパトアおよび各 V beta family の usage を解析すると、骨髄におけるクローナルなT細胞の増殖が著明である症例が認められる。我々は MDS においては、異常な造血細胞の増殖に対する正常な生体反応として、それらを抑制する T リンパ球が骨髄内に集積し、その結果として免疫学的な機序で骨髄中の造血細胞がアポトーシスを来たし、血球減少が生じるとの仮説をたてているが、これらのクローナルなT細胞がこうした免疫学的な機序に関与している可能性が考えられた。

表1 MDS (RA) 患者 (2) 骨髄

BV8 (骨髄)			
BV	NDN	BJ	(total 24)
CASS	FSTCSA	NYGYTF	J1S2 24 (100%)

表2 MDS (RA) 患者 (2) 末梢血

BV8(末梢血)				
BV	NDN	BJ	(total 22)	
CASS	RGGY	YEQYF	J2S7	1 (4.5%)
CASS	FQATQG	EQYF	J2S7	1 (4.5%)
CASS	FGR	SYEQYF	J2S7	1 (4.5%)
CASS	WEVLG	EOYF	J2S7	1 (4.5%)
CASS	LST	SYEQYF	J2S7	1 (4.5%)
CASL	RLAV	NEQF	J2S1	1 (4.5%)
CAS	RPASGRG	NEQF	J2S1	1 (4.5%)
CASS	FYGTV	NTGELF	J2S2	1 (4.5%)
CAS	TPRGFRA	TGELF	J2S2	1 (4.5%)
CASSL	AGTGV	TGELF	J2S2	1 (4.5%)
CAS	TTSTR	TGELF	J2S2	1 (4.5%)
CASS	LRGGH	YGYTF	J1S2	1 (4.5%)
CASSL	YPWSD	GYTF	J1S2	1 (4.5%)
CASS	RGLGGE	H	J1S5	1 (4.5%)
CASSL	VGVG	QPQH	J1S5	1 (4.5%)
CASS	FMGG	NQPQH	J1S5	1 (4.5%)

以下省略

[文献]

1. Kato T, et al, J Immunol 159, 5143, 1997
2. Zeng W, et al, Blood 93, 3008, 1999

骨髄異形成症候群 (MDS) における HbF レベルと新規遺伝子 FKLf 発現との相関

村手 隆 (名古屋大学医学部保健学科)
浅野 治彦、青木恵津子、木下 朝博
齋藤 英彦 (名古屋大学医学部第一内科)

[はじめに]

脊椎動物において、赤血球ヘモグロビンは発達に伴って変化する (Hemoglobin switching)。ヒトにおいては2回 switching が起こることが知られている。出生時がその2回目であり、胎児型 (HbF) から成人型 (HbA₂) へと変化する。しかしながら、正常成人においても少数の細胞に HbF の発現がみとめられ、このような細胞を F cell と呼ぶ。さらに貧血を呈する各種の血液疾患においては HbF の発現が亢進し、F cell が増加すると報告されている^{1,2,3)}。HbF の構成要素である g-globin の再活性化は、日本人にはすくないもののサラセミアなどの治療に寄与する可能性が高くその研究意義は大きいと考えられる。しかしながら g-globin 遺伝子の発現調節の分子機構については現在の所、全く分かっていない。MDS をはじめとする血液疾患患者において HbF の発現が増加しているか否かに関しては必ずしも明らかではない。今回我々は造血障害患者における F cell の増加の有無について調べるとともに、最近我々によってクローニングされ、g-globin 遺伝子の発現調節因子の可能性を有する FKLf⁴⁾、FKLf-2⁵⁾ 遺伝子の発現レベルをこれら患者骨髄を用いて半定量的に検討した。この2種類の新規遺伝子は g-globin を発現するヒト胎児肝臓由来の赤芽球より mRNA を抽出し、合成した cDNA について zinc finger protein をねらった PCR スクリーニングにて得られた新規 KLF family に属する遺伝子で、in vitro の実験から g-globin 遺伝子のプロモーターを活性化することが明らかにされている。

[対象と方法]

調査した患者は MDS が5例、再生不良性貧血

が2例、発作性夜間血色素尿症が1例、貧血が無く骨髄浸潤もない非ホジキンリンパ腫 (正常対照として) が1例である。検査のための検体採取の合意を得たのち、骨髄および末梢血を採取した。末梢血ではヘモグロビン値を測定し、骨髄標本では古典的な酸溶出法⁶⁾にもとずいての F cell の割合を算出した。骨髄の全単核球から tRNA を抽出し、ランダムプライマーを用いて cDNA を合成した。半定量的 RT-PCR は浅野らの報告に従い、FKLf、FKLf-2 に特異的なプライマーを設定し行った。予備実験として各種細胞株から cDNA を調製して発現の程度ならびに実験系の検定を行った。半定量的のために28S rRNA について増幅を行った。すなわち16、19、22サイクル毎に一定量のサンプルを採取し、2% agarose gel にてバンドの強さを解析した。28S rRNA の増幅パターンがほぼ同等になるようにサンプル cDNA 濃度を調整し FKLf、FKLf-2 cDNA を増幅した。28、30、32サイクル増幅しバンドの強さにより発現の程度を一から+++の4段階で評価した。

[結果]

臍帯血、および正常人末梢血塗沫標本にて F cell の頻度を確認した。臍帯血ではほぼ100%、正常人 (N=10) では0.3%が上限であった。患者骨髄標本での F cell の割合は表1のごとく0.1から20%に分布していた。F cell の割合の高い症例に特有な臨床的特徴は認めなかった。また F cell の頻度と患者ヘモグロビン値とに有意な相関は認めなかった。

細胞株における半定量的 RT-PCR の結果、FKLf は、erythroid の形質を有する細胞株である K562、TF1、ML1、MEG-O1 で中等度 (++) の発現が認められた。一方単球系やリンパ球系細胞株では、発現は弱いかほとんど認められなかった。FKLf-2 の発現は、erythroid 系細胞株で強く、リンパ球系細胞で弱い傾向があったが、細胞株間で著明な差異は認められなかった。図1に代表的な細胞株および症例の結果を提示する。患者骨髄の全単核球を用いた FKLf および FKLf-2 の発現解析ではほとんどの症例で++程度の発現を認め、

特に貧血の程度とは相関しなかった。

表1 mRNA expression of FKLF and FKLF-2 in patients with MDS/AA

patient	diagnosis	Hb (g/dL)	F cell (%)	FKLF	FKLF-2
1	AA	6.4	20.3	+	++
2	AA/HS	6.5	6.0	ND	ND
3	PNH	6.4	0.4	+	++
4	MDS	7.7	0.1	++	++
5	MDS	7.8	7.0	++	++
6	MDS	9.2	0.1	++	++
7	MDS	10.0	0.1	++	++
8	MDS	11.0	12.5	+	++
9	NHL	14.0	0.3	+	+

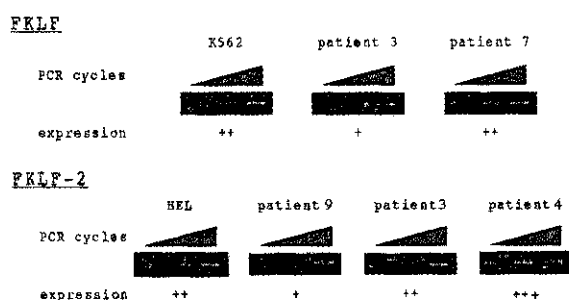


図1 代表的な FKLF および FKLF-2 のRT-PCR

[考察]

これまで成人における HbF の増加はサラセミアや Hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH) 症などの遺伝子異常症の解析がほとんどで、特にヘモグロビンに構造異常のない各種血液疾患ではごく簡単な報告を少数認めるのみであ

る。なぜ貧血患者において Hb F が発現してくるのかその機構は解明されていない。今回の解析によりこれまでの報告とは異なる点が明らかとなった。まず貧血の強度な患者のすべてが F cell の頻度が高くない事実である。貧血の患者エリスロポイエチン (EPO) は当然高値であることが予想されるので、これは単純な EPO 依存性の転写活性化ではないことを推測させる。もちろん今回の解析は MDS 患者が主体で鉄欠乏貧血などのより単純な貧血患者多数例でどのようになっているか解析が必要と思われる。今回の FKLF、FKLF-2 の発現解析は骨髓の全単核球の mRNA を材料にした。赤血球系単独の解析では無いため発現の強弱の判定および意味付けが困難であった。また28S rRNA を内部対照としているが、これも glycophorin A 等の赤血球系の形質でとくに対照として問題のないものを選択すべきことが判定のために重要と思われた。上記のように F cell の頻度が直接ヘモグロビン値と相関が無いことから、はたして成人骨髓由来赤血球系コロニーのヘモグロビンF産生がコロニーレベルで all or none なのかそれとも各コロニーでの発現の定量的問題なのか今後さらに解析すべき問題と思われた。

[文献]

1. Passmore SJ, et al, Blood 85, 1742, 1995
2. Craig JE, et al, Br J Haematol 93, 601, 1996
3. Reinhardt D, et al, Ann Hematol 76, 135, 1998
4. Asano H, et al, Mol Cell Biol 19, 3571, 1999
5. Asano H, et al, Blood 95, 3578, 2000
6. Bekte K, et al, Blut 4, 241, 1958

骨髄異形成症候群および骨髄性白血病における Survivin 遺伝子の発現

上田 孝典、吉田 明、今村 信

(福井医科大学 医学部 第一内科)

【はじめに】

近年、骨髄異形成症候群の病態に、骨髄細胞のアポトーシス亢進による無効造血が関与しているのではないかと考えられるようになった。

アポトーシスの制御は、生体におけるホメオスタシスの維持にとって極めて重要であり、またアポトーシスの制御の異常は種々の悪性腫瘍に共通する特徴の一つであると近年考えられるようになった。さらに、アポトーシス抵抗性という概念は、抗癌剤を用いた化学療法に対する抵抗性や耐性を説明しうる可能性があり注目されている。

SurvivinはAmbrosiniらにより同定された遺伝子で、そのコードする蛋白(分子量約16kDa)は、アポトーシスを抑制する作用を持つ蛋白質群 IAP (inhibitor of apoptosis protein) ファミリーの一種である¹⁾。Survivin 遺伝子がコードする蛋白の構造は他の IAP ファミリーのタンパクとは異なっている。すなわち、バキュロウイルス IAP リピートは単一であり、C末端の ring finger domain を欠如している。Survivin 蛋白は細胞内において Caspase3/7 を抑制すると考えられている。Survivin 遺伝子は胎生期の組織においては発現し

ているが正常な成人の組織においては発現していない。しかしながら Survivin は種々の癌細胞において非常に強く発現していることが知られている。具体的には、肺癌、大腸癌、前立腺癌、膵癌、乳癌、および悪性リンパ腫などにおいて高く発現していることが報告されている²⁾。また Survivin の発現の程度は、悪性腫瘍の予後と関連していることも報告されている。

今回、我々は骨髄異形成症候群および骨髄性白血病の患者の単核球における Survivin 発現の検出をおこなったので報告する。

【方法】

1. 単核球分離およびmRNA抽出。

同意の得られた患者からの末梢血または骨髄血より単核球を分離した後、RNA easy kit (Qiagen) を用い Total RNA を分離した。症例の内訳は MDS (CMMOL を含む) 18例、CML10例、AML12例 合計40サンプルである。

2. cDNA は superscript preamplification system (life Technologies, USA) を用いて合成した。Survivin cDNA の増幅のためのプライマーは exon 1 に対応する forward primer 5'-CACCGCATCTCTACATTCAA-3' Exon 4 に対応する reverse primer 5'-CACTTTCCTTCGCAGTTTCCT-3' (図1) を用い 30 cycle の増幅を実施した。PCR 産物は1.8%アガロースゲルを用い分析した。また、Actin を内部標準として用いた。

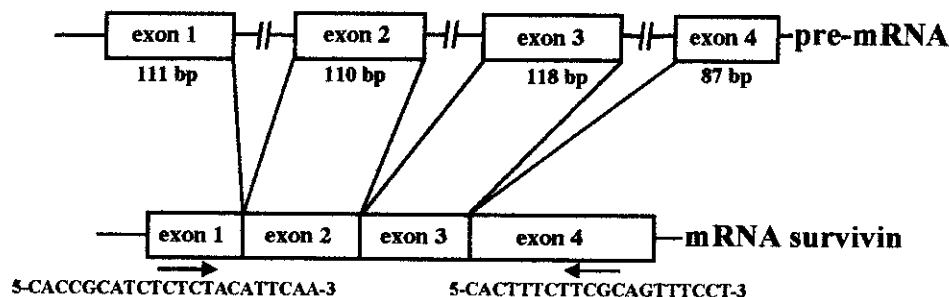


図1 Survivin 遺伝子の構造と PCR primer

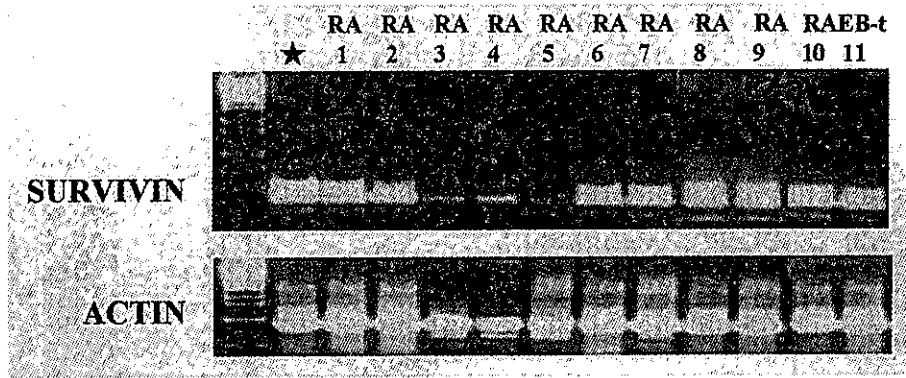


図2 MDS 症例における surivin の発現

★ HL-60 細胞株を陽性コントロールと使用した。

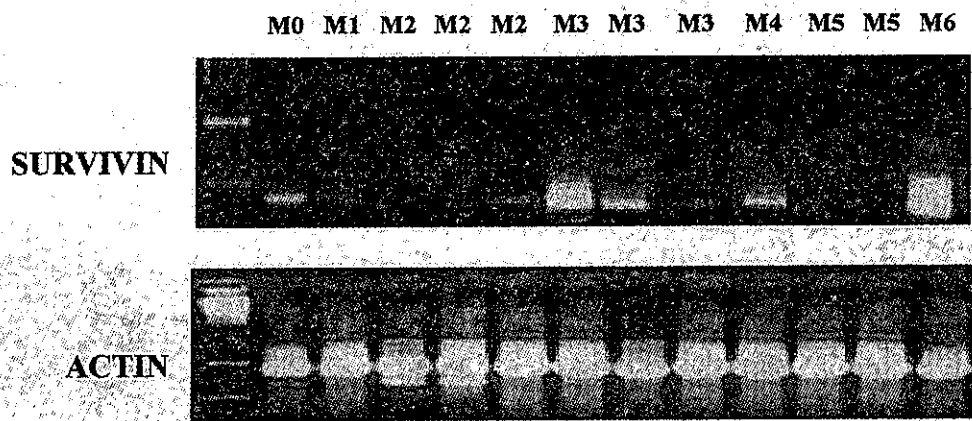


図3 AML 症例における surivin の発現

[結果]

1. MDS (RA) では 9 例中 7 例に比較的強い発現を認めた (図 2)
2. CMMoL では、Survivin の発現は低い傾向がみられた。
3. AML では、調べたえた範囲の症例においては、FAB 分類と Survivin 発現の間に一定の関係を見いだせなかった (図 3)。
4. CML 慢性期の症例全例においてその発現はみられなかったが急性転化症例の全例において発現がみられた。

[考察]

Survivin の発現パターンからみると、MDS (RA) においても強い発現を示す症例を認めたことより、MDS の骨髓細胞は従来いわれてきたごとくアポトーシス亢進状態とは、必ずしも言えない可能性がある。実際に Horikawa らは MDS の患

者から分離された単核球は *in vitro* においてアポトーシス抵抗性を示すことを報告している³⁾。Survivin の発現パターンを調べることは、MDS (RA) を診断する際の有用な所見となりうる可能性が考えられる。

[参考文献]

1. Ambrosini G, et al, Nature Med 3, 917, 1997
2. Adida C, et al, Blood 96, 1921, 2000
3. Horikawa K, et al, Blood 90, 2716, 1997

AML1/ETO による赤血球系の分化抑制機序

木村 昭郎、原田 浩徳、原田 結花

(広島大学原爆放射能医学研究所 血液内科)

[はじめに]

AML1 遺伝子は二次造血の発生に必須で、白血病や骨髓異形成症候群の発症に最も関与する転写因子である。8;21 転座型骨髓性白血病で見られる AML1/ETO は造血幹細胞から好中球への分化を阻害すると考えられている。この白血病化は造血幹細胞レベルで生じており、骨髓球系のみならず、赤芽球系細胞にも AML1/ETO が存在している。また 8;21 転座をもつ白血病・骨髓異形成症候群では有意に赤芽球系細胞が減少している。ところが、AML1/ETO が赤血球系へ及ぼす影響は解析されていない。そこで AML1/ETO を赤血球系細胞株に強制発現させる系を樹立し、AML1/ETO が赤血球系分化に及ぼす影響を調べた。さらにこの細胞株を用いて、赤血球分化に関与する AML1 の標的遺伝子の同定を試みた。

[対象と方法]

1. マウス赤白血病 (MEL) 細胞株にテトラサイクリン誘導 AML1/ETO 発現システムを導入し、DMSO を用いた分化誘導に及ぼす影響を検討した。
2. 野生型 (WT) MEL 細胞と AML1/ETO 発現 MEL 細胞から RNA を回収し、WT-MEL をテスター、AML1/ETO-MEL をドライバーとして Representational difference analysis (RDA) を行った。得られた断片を用い、マウス脾臓ライブラリーをスクリーニングして、ART-1 遺伝子をクローニングした。
3. 同定した ART-1 遺伝子の発現を各種臓器・細胞株で検討した。

[結果]

1. 野生型 MEL 細胞は AML1 蛋白を発現しており、DMSO によって分化誘導される。図 1 に示

すように、AML1/ETO を強制発現させた MEL 細胞 (tet-) では分化及びグロビン産生が抑制された。形態的にも分化がみられなかった。AML1/ETO は脱アセチル化酵素を呼び寄せて転写を抑制すると推測されているが、AML1/ETO 強制発現による MEL 細胞の分化抑制は、脱アセチル化酵素阻害剤 (TSA) で部分的に回避された。

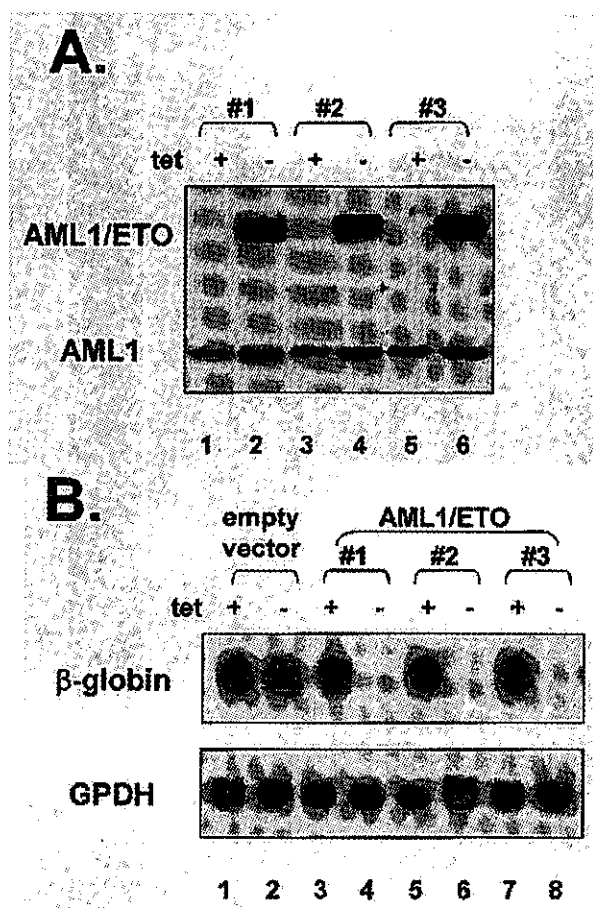


図 1 Tetracycline-regulated AML1/ETO overexpression system in MEL cells

2. この細胞を用いた RDA により、新規 cDNA ART-1 (AML1-regulated transmembrane protein 1) をクローニングした。ART-1 は 229 アミノ酸よりなり、膜を 4 回貫通する tetraspan superfamily の一つで、類似の蛋白に CD81 がある (図 2A)。またヒト遺伝子解析から、ART-1 と相同性を示す蛋白として TSSC6 が同定されている。ART-1 を COS 細胞に強制発現させ、FLAG タグにより 25.6kDa の蛋白を同定した (図 2B)。

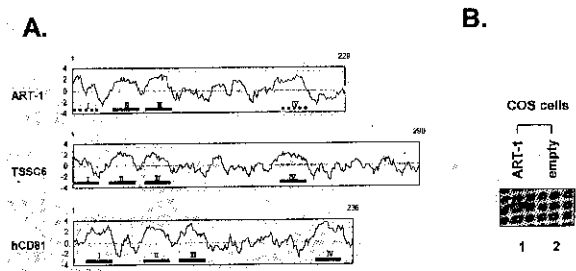


図2 Tetramembrane spanning protein, ART-1

3. ART-1 遺伝子は造血組織特異的で、骨髄で強く、脾臓・胸腺では弱く発現しており、リンパ節や末梢血ではほとんど発現していなかった。マウス白血病細胞株 (T 細胞、B 細胞、骨髄球、赤芽球) での検討では、すべての血球系において発現がみられた。また、MEL 細胞において ART-1 の発現は AML1/ETO を過剰発現させると低下し (図 3A)、AML1 を過剰発現させると増加した (図 3B)。更に、DMSO 誘導による MEL 細胞分化に伴い、ART-1 の発現も増加した (図 4)。

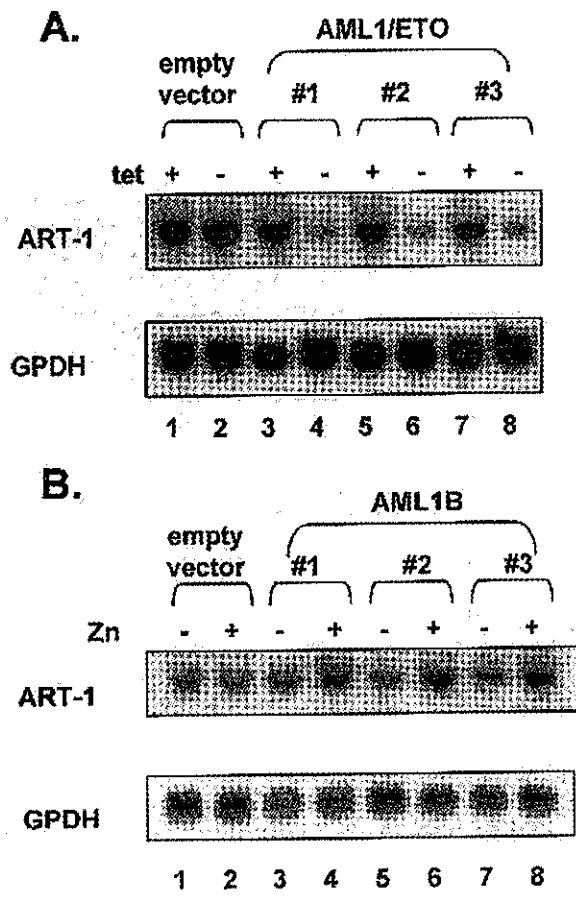


図3 ART-1 expression pattern in AML1/ETO- and AML1- overexpression system

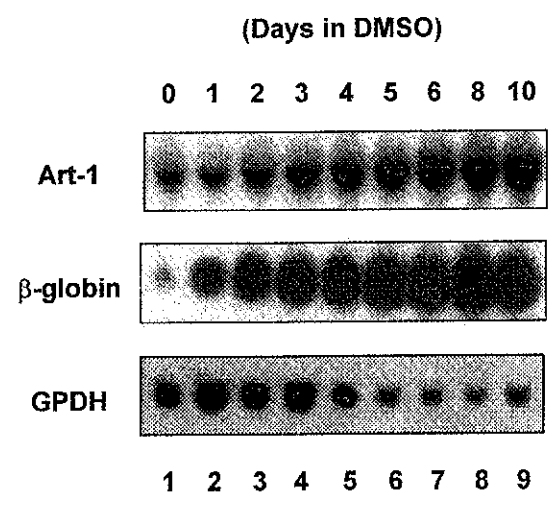


図4 Expression pattern of ART-1 during MEL cell differentiation

[考案・結論]

1. AML1/ETO が骨髄球系のみならず赤血球系細胞においても AML1 依存性の転写を抑制し、赤芽球の分化を阻害することを示した。このことは、8;21 転座をもつ白血病や骨髄異形成症候群における貧血の一因となっている可能性があると思われる。
2. tetraspansuperfamily の一つである新規膜蛋白 ART-1 を同定した。このファミリーに属する膜蛋白群の多くが血球膜に存在し、他のファミリー蛋白などと結合する。そしてシグナル伝達を仲介して細胞の増殖、分化、癌化などに関与している。ART-1 の機能はまだ明らかでないが、同様な役割を担っていると推測される。
3. ART-1 は AML1 の標的遺伝子として赤血球分化に重要な役割を担っている可能性があり、今後更に解析が必要である。

[文献]

1. Harada H, et al, Mol Cell Biol 19, 3808, 1999
2. Harada Y, et al, submitted

Evi-1によるTGF β シグナルの抑制機構の解析

平井 久丸、伊豆津宏二、黒川 峰夫
(東京大学医学部血液・腫瘍内科)

[はじめに]

Evi-1は、ヒト染色体の3q26に遺伝子座をもつ癌遺伝子である。この遺伝子座は、骨髄異形成症候群(MDS)や、骨髄性白血病においてしばしば染色体異常をきたすことが知られている。Evi-1は、正常の骨髄細胞ではほとんど発現がみられないが、この遺伝子座に異常を持つMDS、骨髄性白血病において、異所性の高発現が認められる。このことから、Evi-1の発現がMDS、白血病の発症・進展に関与していると考えられている。TGF β は、細胞の増殖、分化を制御するサイトカインである。多くの血液細胞において、TGF β は細胞増殖を抑制的に制御したり、分化を促進する働きを持つことが知られている。一方で、TGF β シグナル伝達の破綻が、増殖抑制および分化刺激に対する不応性を介して、血液腫瘍の発症に結びつく可能性が示唆されている。以前、我々はEvi-1による血液腫瘍発症機序の一つとして、Evi-1が、TGF β シグナルを伝える転写因子、Smad3と直接結合することによりTGF β シグナルを抑制することを明らかにした。今回の研究では、この機序を明らかにする為、実験的な検討を行った。

[方法]

Evi-1の欠失変異体を作成し、これらをHepG2細胞にp3TP-Luxレポーターと共に遺伝子導入しTGF β による転写活性を調べる。これにより、Evi-1の中の転写抑制に重要な領域を明らかにする。Evi-1およびEvi-1欠失変異体をCOS7細胞に導入し、免疫沈降実験によりCtBPとの結合能について調べる。次に、CtBP結合配列をアミノ酸置換した変異体を作成する。これらの変異体を用いて免疫沈降実験を行い、CtBPとの結合責任配列を明らかにする。また、これらの変異体を用

いて、レポーターアッセイを行い、Evi-1による転写抑制とCtBP結合の関連を明らかにする。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤トリコスタチンを用いてレポーターアッセイを行い、Evi-1による転写抑制におけるヒストン脱アセチル化酵素の関与をみる。

[結果]

1. Evi-1アミノ酸544-607番領域は転写抑制領域である。これまでの我々の研究により、Evi-1は第1 Znフィンガー領域を介してSmad3と結合すること、アミノ酸608-732番領域が転写抑制領域であることが明らかになっていた。それ以外の領域のTGF β 抑制における関与を調べるため、各種欠失変異体を作成して、これらとTGF β によって転写活性化がみられるp3TP-LuxレポーターをHepG2細胞に遺伝子導入して、レポーターアッセイを行った。これにより、Evi-1の第2 Znフィンガー領域のN端側(アミノ酸544-607番)に、新たな転写抑制領域があることを見いだした。

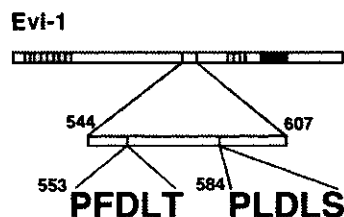


図1 Evi-1のCtBP結合配列

2. Evi-1はPLDLS配列を介してCtBPと結合する。Evi-1の544-607番アミノ酸領域には転写のコリプレッサー蛋白質CtBPが結合するアミノ酸配列(PXDLS/T)が2箇所存在していた。このことから、Evi-1による転写抑制におけるCtBPの役割を検討した。まず、COS7細胞にCtBPとEvi1またはEvi-1欠失変異体を遺伝子導入して、免疫沈降実験を行った。これにより、Evi-1は544-607番アミノ酸領域を介してCtBPと結合することが明らかになった。さらに、2つのCtBP結合様アミノ酸配列、PFDLT、PLDLSの一方、あるいは両方のDLをASに置換した変異体(AS/DL、

DL/AS、AS/AS) を作成して同様の免疫沈降実験を行った。これにより、PLDLS のみが CtBP との結合に関与していることが明らかになった。

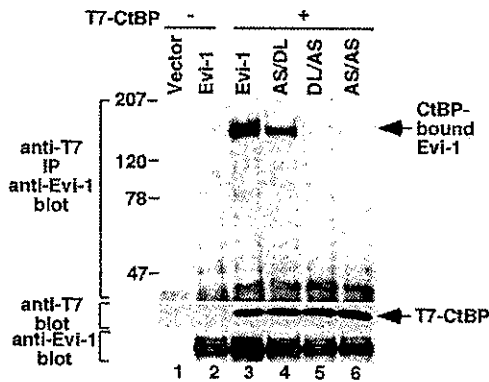


図2 in vivo での Evi-1 と CtBP の結合

3. Evi-1-CtBP 結合が TGFβシグナル伝達の抑制に必要である。Evi-1 のアミノ酸置換変異体 AS/DL、DL/AS、AS/AS を用いて上記と同様のレポーターアッセイを行った。CtBP と結合可能な AS/DL は野生型 Evi-1 と同様の転写抑制を示したが、CtBP と結合できない、DL/AS と AS/AS では転写抑制能が減弱していた。よって、Evi-1 による転写抑制には CtBP との結合が必要であることが明らかになった。

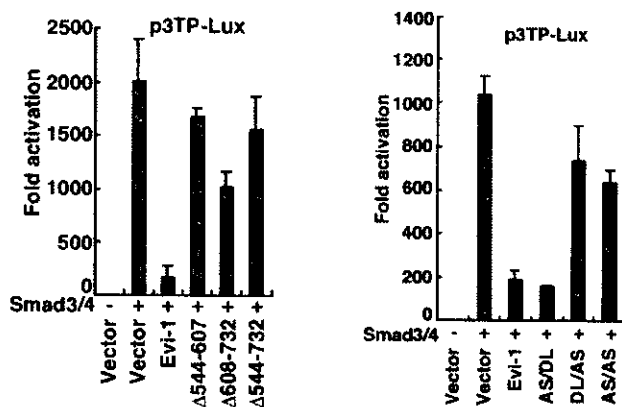


図3 Evi-1-CtBP 結合と TGFβシグナル伝達抑制

4. ヒストン脱アセチル化酵素の関与

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、トリコスタチン (TSA) を用いて上記のレポーターアッセイを行った。基本転写活性と、TGFβ添加による転写活性化能は、トリコスタチン存在下において差

が認められなかったが、トリコスタチン存在下では Evi-1 による転写抑制は明らかに減弱していた。よって、Evi-1 による転写抑制にはヒストン脱アセチル化酵素が関与している可能性が示唆される。

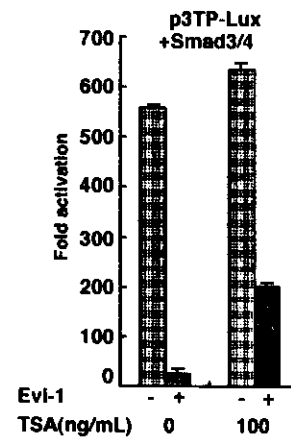


図4 Evi-1 による転写抑制は TSA により解除される

[考察・結論]

今回の研究により、Evi-1 が Smad3 と結合して TGFβシグナルを抑制する際に、CtBP-HDAC からなる、転写のコリプレッサー複合体が機能していることが明らかになった。HDAC の特異的阻害剤は、既に急性前骨髄球性白血病の治療への応用が検討されている。Evi-1 が発症に関与している骨髄異形成症候群・骨髄性白血病は従来の治療に対して抵抗性で、新たな考えに基づく治療が望まれている。コリプレッサー複合体の機能の抑制による治療の可能性を探ることが今後の検討課題である。

[文献]

1. Kurokawa M, et al, Nature 394, 92, 1998
2. Kurokawa M, et al, Blood 92, 4003, 1998
3. Izutsu K, et al, Blood in press

骨髓異形成症候群及び急性骨髄性白血病における Smad4 遺伝子変異の解析

三谷 絹子 (獨協医科大学、血液内科)

今井 陽一 (東京大学 血液・腫瘍内科)

〔はじめに〕

Smad 蛋白質は TGF- β 、アクチビン、BMP よりなる TGF- β ファミリーの細胞内シグナル伝達物質である。TGF- β は細胞の増殖・分化・アポトーシスの制御を司っており、そのシグナルは癌抑制シグナルである。Smad 蛋白質は、受容体活性化 Smad (R-Smad)、共通パートナー Smad (Co-Smad)、抑制 Smad (anti-Smad) の3つのグループに分類される。Smad2 及び Smad3 は TGF- β /アクチビンシグナルを伝える R-Smad であり、Smad1、Smad5、及び Smad8 は BMP シグナルを伝える R-Smad である。Smad4 は唯一の Co-Smad である。R-Smad と Co-Smad は N 末端及び C 末端で相同性を有し、同部分はそれぞれ MH1 及び MH2 と命名されている。これらの領域の中間部分にはプロリン豊富リンカー領域が存在する。リガンド刺激により、セリン/スレオニンキナーゼ受容体が R-Smad をリン酸化し、リン酸化された R-Smad は Co-Smad とヘテロダイマーを形成し核内に移行する。そして、核内で協調的に標的遺伝子の転写を活性化する。Smad4 は TGF- β シグナルの中で非常に重要な役割を担っている。すなわち、Smad4 欠失腫瘍細胞株では、R-Smad が機能出来ず TGF- β シグナルが伝わらない。一方、Smad4 は癌抑制機能を発揮するという点においても重要である。Smad4 の変異や欠失は発癌に関与している。

最近、私達は白血病発症に関与する EVI-1 が Smad3 を標的として TGF- β シグナルを遮断することを明らかにした。このことは、TGF- β シグナルの破綻が造血器腫瘍発症につながることを意味している。今回、骨髓異形成症候群 (MDS) 及び急性骨髄性白血病 (AML) における Smad4 の遺伝子変異について検討した。

〔方法と結果〕

1. Smad4 遺伝子変異の検討

Smad 蛋白質の MH1 領域は DNA 結合に関与しており、MH2 領域はホモあるいはヘテロダイマー形成に関与している。また、膵癌及び大腸癌に観察される Smad4 の遺伝子変異は主に MH1 あるいは MH2 に存在する。従って、MH1 及び MH2 をコードするエクソン 1-3 及び 7-11 について変異の有無を検討した。用いた検体は AML 患者より樹立された12の白血病細胞株、22例の AML 細胞 (FAB-M1 3例、M2 9例、M3 3例、M4 2例、M5 5例) 及び37例の MDS 細胞 (RA 18例、RAEB 2例、CMMoL 5例、RAEB-t 2例、MDS/AML 10例) であり、RT-PCR-SSCP 法でスクリーニングを行った。その結果、M1 の症例 1 例と急性単球性白血病患者より樹立した白血病細胞株 CTV-1 で変異バンドが認められた。シーケンス解析により、前者の変異は MH1 をコードするエクソン 2 のミスセンス変異 (P102L; CCT to CTT) であり、後者は MH2 をコードするエクソン 11 のフレームシフト変異 (Δ (483-552); コドン 483 への AATA の挿入) であることが明らかになった。特に、後者はこれまでも膵癌で報告されているエクソン 10 の後のスプライス・ドナー部位の変異であった。これらの変異は heterozygous であった。MDS 症例には変異は観察されなかった。

2. Smad4 変異体の機能解析

これらの変異体の機能的変化を明らかにする目的で、転写活性化能について検討した。正常 Smad3 及び Smad4 の発現ベクターと PAI-1 プロモーター (p3TP-Lux) を HepG2 細胞に遺伝子導入すると顕著な転写活性化が観察された。一方、P102L 変異体及び Δ (483-552) 変異体は PAI-1 プロモーターの活性化を示さず、正常 Smad3/Smad4 の転写活性化能を dominant negative に抑制した。

Smad3 と Smad4 は MH2 領域でホモあるいはヘテロダイマーを形成しており、このヘテロダイマー形成は Smad4 が機能を発揮する上で重要である。そこで、これらの変異体と正常 Smad3 あるいは Smad4 とのヘテロダイマー形成能についてプルダウン・アッセイにより検討した。TGF- β の非刺激下で、Cos-7 細胞に過剰発現している Smad4 と Smad3 は結合しているが、これらの 2 つの変異体には正常 Smad3/Smad4 複合体と結合

する能力が存在した。次に、正常 Smad4 と Δ (483-552) 変異体の細胞内局在を免疫組織染色により検討した。Smad4 は細胞質内でホモダイマーを形成し、TGF- β 刺激に伴って核内に移行した。一方、 Δ (483-552) と Smad4 は TGF- β の刺激の有無にかかわらずともに細胞質内に存在した。従って、 Δ (483-552) 変異体には核内移行能力がなく、リガンド刺激後も正常 Smad4 を細胞質内に留めておく作用があると考えられた。この正常 Smad4 の核内移行の阻害機能が、 Δ (483-552) 変異体の dominant negative 効果の分子基盤であると推測された。一方、P102L 変異体には核内移行能力が保存されており、正常 Smad4 の核内移行を妨げないことが明らかになった。

さらに、EMSA を用いて P102L 変異体の Smad 結合部位に対する DNA 結合能について検討した。P102L 変異体は DNA 結合能を示さず、この DNA 結合能の消失により転写活性化能を失っているものと考えられた。続いて、P102L 変異体存在下での正常 Smad4 の DNA 結合能について検討した所、P102L 変異体を共存させると正常 Smad4 の DNA 結合能は著明に減弱することが明らかになった。従って、P102L 変異体は正常 Smad4 の DNA 結合を阻止し、その為に正常 Smad4 の転写活性化能を dominant negative に抑制すると結論された。

最後に、これらの変異体が実際に TGF- β の造血細胞に対する増殖抑制効果を阻止するかどうかを検討した。そのために、IL-3 依存性に増殖し、TGF- β により増殖抑制のかかる 32D 細胞にこれらの変異遺伝子を導入し、安定クローンを得た。これらのクローンは TGF- β 刺激下で変異体の発現量に依存して TGF- β の増殖抑制効果からのがれることが明らかになった。さらに、 Δ (483-552) 変異体発現ヒト白血病細胞株 CTV-1 細胞も TGF- β による増殖抑制がかからなかった。以上より、これらの変異体は造血細胞において TGF- β の生物学的効果を遮断することが明らかになった。

[考察・結論]

AML 及び MDS 検体を RT-PCR-SSCP 法でスクリーニングすることにより、AML 検体に 2 つの Smad4 遺伝子変異を検出した。AML での変異類

度は 5.7% であった。一方、MDS では変異は観察されなかった。これらの知見は Smad 遺伝子の変異による TGF- β シグナルの遮断が白血病発症に関与し得ることを示している。今回検出された変異はいずれも正常アレルの残存する heterozygous なものであったが、2 つの変異体は正常 Smad4 の転写活性を dominant negative に抑制したことから、これらの変異体を有する白血病細胞では Smad4 の機能は廃絶していると考えられた。すなわち、Smad4 の機能的失活がヒト白血病を発症させると推論される。

P102L 変異は、DNA 結合領域である MH1 領域に存在する。P102L 変異体は核内移行能力を有していたが、DNA 結合能力は消失しており、しかも正常 Smad4 の DNA 結合を阻害した。本知見は、MH1 領域の変異が正常 Smad4 に対して dominant negative に作用する機序を示した最初のものである。

Δ (483-552) 変異は MH2 領域に存在する。 Δ (483-552) 変異体は正常 Smad4 と結合するが TGF- β 刺激により核内へ移行することが出来ない。従って、 Δ (483-552) 変異体の存在下では TGF- β 刺激によっても Smad3/Smad4 複合体は核へ移行出来ないと考えられる。同様の機能は膀胱癌で観察された Δ (515-552) 変異体でも証明されている。これらの結果より、MH2 領域の 515-552 アミノ酸部分に核内移行の責任領域があり、483-552 アミノ酸の領域が正常 Smad との結合を支配していると推論される。

また、白血病細胞で観察された Smad4 遺伝子変異が TGF- β の増殖抑制作用をマウス骨髄細胞において阻止することを証明した。本研究は、Smad4 が造血細胞において TGF- β のシグナル伝達に重要な役割を担っていることを示した最初の報告であり、Smad4 遺伝子の変異がヒト白血病発症に関与することを明らかにしたものである。一方、MDS においても TGF- β シグナルの遮断はその発症に関与していることが示されているが、Smad4 遺伝子変異による遮断は稀であると推論された。

[文献]

1. Imai Y, et al, Blood 96, 3154, 2000

造血器悪性腫瘍に対する非骨髄破壊的 造血幹細胞移植の試み

原田 実根、藤井 信治、前田 嘉信
小島 研介、品川 克至、石丸 文彦
池田 和真（岡山大学第二内科）

【はじめに】

造血器悪性腫瘍に対する同種造血幹細胞移植は、大量の抗癌剤・放射線による骨髄破壊的治療によって腫瘍細胞を根絶し、造血機能を救済する手段として行われてきた。しかしながら、GVHD発症例で白血病の再発率が低いこと、T細胞を除去した細胞の移植や同系移植では再発率が高いこと、同種骨髄移植を受けた慢性骨髄性白血病の再発例に対するドナーリンパ球輸注による再寛解導入効果などから、その治療効果において、移植細胞による腫瘍細胞に対する抗腫瘍免疫機能が重要であることが明らかとなってきた¹⁾。同種造血幹細胞移植の治療成績は、骨髄破壊的な前治療による治療関連毒性（RRT regimen related toxicity）により予後が大きく左右される。そこで、高年齢や臓器障害を持つ症例において、前治療を軽減した骨髄非破壊的前治療と同種造血幹細胞移植を組み合わせ、RRTの軽減をはかる一方、graft versus leukemia (GVL) 効果を利用する治療が試みられ、その成績が報告されている⁵⁻¹²⁾。Childsらは、fludarabine (25mg/m²、5日間) + cyclophosphamide (60 mg/kg、2日間) による移植前治療を併用した同種末梢血幹細胞移植を8例の造血器腫瘍と7例の固形腫瘍患者に行い、5例が原病の進展のために死亡したが、8例が移植後121~409日の時点で生存し、30日以上生存した14例中10例でday30以後に腫瘍量の減少が見られ、腎癌1例、CML2例で13、12、5ヶ月間持続している完全寛解が得られたと報告している。彼らの報告では、治療関連死は2例で、day100までの治療関連死亡は1例であった¹²⁾。これらの報告を参考にして、高齢または臓器障害を有するために通常の同種造血幹細胞移植の対象とならない造血器悪性腫瘍症

例を対象として、Childsらのプロトコールの移植前治療における cyclophosphamide 投与量を半量とし、GVHD 予防として cyclosporine に短期 methotrexate を加えたプロトコールの安全性と有効性を検討した。

【対象と方法】

症例1：53歳女性、自家末梢血幹細胞移植後に再発し、治療抵抗性の非ホジキンリンパ腫。症例2：40歳女性、治療抵抗性で、薬剤性の腎障害を有する急性骨髄性白血病。症例3：58歳男性、自家末梢血幹細胞移植で寛解導入不能であった非ホジキンリンパ腫。症例4：67歳男性、骨髄異形成症候群（RAEB）。症例5：66歳男性、治療抵抗性の非ホジキンリンパ腫。インフォームドコンセントを得たHLA一致同胞に、10 μ /kgのG-CSFを5日間投与して、G-CSF投与4日目と5日目に末梢血幹細胞を採取した。移植前治療としてフルダラビン25mg/m²/dayを5日間、サイクロフォスファミド30mg/kgを2日間投与した。GVHD予防として、シクロスポリンAとメソトレキセートを投与した。

【結果】

症例1、2、3、5のドナーからは、それぞれ2回の採取により、2.9、5.0、5.1、1.8 x 10⁶のCD34陽性細胞を含む末梢血幹細胞を採取できた。症例4のドナーは、1回目の採取において血管迷走神経反射のため0.8 x 10⁶のCD34陽性細胞しか採取できず、4週間後に骨髄から1.2 x 10⁶のCD34陽性細胞を含む幹細胞を採取した。移植前治療の後、症例1、2、3、4、5にそれぞれ2.9、4.8、5.1、2.0、1.8 x 10⁶のCD34陽性細胞を含む採取細胞を輸注した。VNTRによるCD3陽性細胞のキメリズム解析の結果、症例1、2、3、5では7-14日目にドナータイプが85%を超え、遅れて非CD3陽性細胞のドナータイプとなった。好中球>500/ μ l、血小板数>2万/ μ lまでの回復に要した日数は、症例1、2、3、5で、それぞれ、12、11、18、7日及び8、25、9、12日であった。Common Toxicity Criteriaのgrade3以上の

移植関連副作用は、症例4にみられた幹細胞輸注時の血圧上昇 (grade 3) のみであった。症例1は原病の進行により死亡した。症例2は progression-free の状態で、DLI (donor lymphocyte infusion) を行いながら外来通院中である。症例3はIII度の急性GVHD (stage: 皮膚3、消化管2) を発症し、引き続いて発症した感染症により死亡した。症例4では、CD3陽性細胞では移植後早期からドナータイプが dominant であったが、非CD3陽性細胞は移植後70日でもレシピエントタイプが dominant であったため、DLIを行い経過観察中である。

[考案・結論]

今回用いたプロトコルによる非骨髄破壊的同種造血幹細胞移植は、高齢者や臓器障害を有する症例に対しても安全に行うことができ、5例中4例で早期の生着を認めた。さらに症例を重ね、症例の選択、移植前治療、GVHD 予防について検討を加える必要があると考えられる。

[文献]

1. Horowitz, M M, et al, Blood 75, 555, 1990
2. Gale, R P, et al, Ann Intern Med 120, 646, 1994
3. Kolb, H J, et al, Blood 86, 2041, 1995
4. Collins, R H, Jr., et al, J Clin Oncol 15, 433, 1997
5. Giralt S, et al, Blood 89, 4531, 1997
6. Khouri I F, et al, J Clin Oncol 16, 2817, 1998
7. Slavin S, et al, Blood 91, 756, 1998
8. Kelemen E, et al, Bone Marrow Transplant 21, 747, 1998
9. Sykes M, et al, Lancet 353, 1755, 1999
10. Carella A M, et al, Haematologica 83, 904, 1998
11. Grigg A, et al, Bone Marrow Transplant 23, 107, 1999
12. Childs R, et al, Blood 94, 3234, 1999

IV 溶血性貧血

共同研究 発作性夜間血色素尿症患者における臨床病歴と自然歴の日米比較調査

金倉 讓、西村 純一

(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)

金丸 昭久 (近畿大学医学部第三内科)

小峰 光博 (昭和大学藤が丘病院内科血液)

[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。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 患者中に PIG-A 遺伝子変異が同定されている。しかしながら、症例ごとで PNH 細胞の割合は様々で、またその拡大の程度も区々である。この複雑な PNH クローン拡大の機序を明らかにするために、フローサイトメトリーを用いて、Duke 大学の268例と日本の233例について解析した。

[対象と方法]

1. 米国側調査

1966年以降で Duke 大学を受診または検体の送付を受け登録されている PNH 患者268例 (DP) について解析した。

2. 日本側調査

厚生省特発性造血障害に関する研究班関連施設および任意協力施設より得られた調査票をもとに、FACS 解析を施行されている233例の患者 (JP) について解析した。

[結果]

Duke の268例中127 male (47.6%) と140 female (52.4%) であった。日本の233例中132 male (56.9%) と100 female (43.1%) であった。診断確定年齢は、Duke が33.5±1.1歳 (range:4-72才)、日本が45.1±1.2歳 (range:10-86才) (P<0.0001) であった。

Duke における初回解析時の CD55 と CD59 の平均欠損率は、赤血球でそれぞれ38.7±2.4% (n=133) と44.3±2.2% (n=152) (not significant (NS))、多型核白血球で71.3±3.4% (n=87) と67.4±3.4% (n=93) (NS) であった。CD55 と CD59 の欠損率は、赤血球 (n=131、Correlation 0.8) においても多型核白血球 (n=86、Correlation 1.0) においてもよく相関していた。赤血球と多型核白血球の欠損率も、CD55 (n=80、Correlation 0.5) においても CD59 (n=89、Correlation 0.6) においても相対的に相関していた。

日本における初回解析時の CD55 と CD59 の平均欠損率は、赤血球で43.4±3.8% (n=63) と43.8±2.5% (n=133) (NS)、多型核白血球で55.5±5.0% (n=55) と47.2±3.9% (n=81) (NS) であった。

2国間の比較において、赤血球の CD59 欠損率には有意差を認めなかったが、多型核白血球の CD59 欠損率には有意差を認めた (P=0.0001)。

Duke 症例における Type II (中間型発現) と Type III (完全欠損) の分布を調べたところ、赤血球の CD59 において3例が I+II、6例が I+II+III、2例が II+III、86例が I+III と Type II を持つ症例は66例 (43.4%) であった。この66例のうち Type II が Type III に対して優位となっている例は、16例 (24.2%) であった。また、多型核白血球で Type II を持つ9例中8例は赤血球でも Type II を持っていた。

診断後の PNH クローンの拡大を検証するために、初回解析と最終解析の期間が少なくとも1年以上 (range:1-7年) あいている症例について、CD59 欠損細胞の増減を比較した。

Duke の赤血球と多型核白血球における欠損率は、それぞれ初回解析時が54.7±3.8% (n=52) と74.5±4.4% (n=37)、最終解析時が60.7±4.1% (NS) と69.9±5.2% (NS) と増加は示さなかった。

そこで、初回検査時に欠損率の低かった症例 (初回解析時赤血球欠損率が60%以下、多型核白血球欠損率が70%以下) に絞って追跡した。赤血球と多型核白血球における欠損率は、それぞれ初