

回解析時が $30.1 \pm 2.7\%$ (n=26) と $41.7 \pm 6.4\%$ (n=12)、最終解析時が $49.3 \pm 5.6\%$ (P=0.0008) と $43.2 \pm 7.7\%$ (NS) で、有意な増加は認めなかった。

日本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 $41.9 \pm 3.8\%$ (n=49) と $37.3 \pm 8.3\%$ (n=21)、最終解析時が $40.3 \pm 4.6\%$ (NS) と $48.5 \pm 8.8\%$ (NS) と増加は示さなかった。

そこで、経過中に造血不全を合併した症例 (Hypo PNH) とそうでない症例 (De novo PNH) に分けて解析した。Hypo PNH と De novo PNH の赤血球における欠損率は、それぞれ初回解析時が $39.6 \pm 5.7\%$ (n=23) と $44.0 \pm 5.3\%$ (n=26)、最終解析時が $32.3 \pm 6.7\%$ (NS) と $47.4 \pm 6.2\%$ (NS) であった。多型核白血球における欠損率は、それぞれ初回解析時が $46.0 \pm 18.8\%$ (n=7) と $33.0 \pm 8.5\%$ (n=14)、最終解析時が $38.5 \pm 12.4\%$ (NS) と $53.3 \pm 11.7\%$ (NS) であった。

[考察・結論]

症例ごとに PNH 細胞の割合は様々で、また多型核白血球におけるその増減は98%増加したのから84%減少したものまでであった。PNH 多型核白血球の増減は、安定群 ($\pm 10\%$) が27 DP と 3 JP、増加群 ($> +10\%$) が2 DP と 8 JP、減少群 ($> -10\%$) が8 DP と 8 JP であった。

Hypo PNH と De novo PNH の赤血球と多型核白血球における欠損率の増減は、統計学的には有意差はでなかったが、Hypo PNH では明らかに減少したのに対し、De novo PNH では増加していた。

これらの結果は、PNH 患者におけるクローン性拡大の複雑性と多様性を示すものである。このクローナルな拡大および縮小と造血不全からの回復や合併との関連性は、PNH 患者の自然歴と病態の理解に役立つものと思われる。

[文献]

1. Nishimura J, et al, Am J Hematol 62, 175, 1999
2. Ware R, et al, N Engl J Med 325, 991, 1991
3. Hillmen P, et al, N Engl J Med 333, 1253, 1995
4. Socie G, et al, Lancet 31, 573, 1996

PNH優勢クローンによる長期間の造血維持

木下タロウ、西村 純一

(大阪大学微生物病研究所免疫不全)

金倉 譲、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)

[はじめに]

発作性夜間血色素尿症 (PNH) は、GPI アンカー型蛋白 (GPI-AP) 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-AP である補体制御因子 (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-AP 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。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。我々は以前、PNH 患者 J19 から 2 種の表現型の異なる PNH 細胞株を樹立し、最終的に 4 種の変異クローンを同定した。これらのうち、TK-14- 型変異クローン (Mutation 1) が優勢クローンで、他の変異クローン (Mutation 2-4) は

劣勢であった。今回我々は、この様な優勢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優勢クローンを凌駕しクローンの交代が起こっているのかを知りたいと思い、J19 を含む PIG-A 変異が既に同定されている 9 例について、初期解析から 6-10 年後、変異クローンの変遷を追跡した。

[対象と方法]

患者末梢血多型核白血球及び骨髓単核球を分離し、CD59 などの GPI-AP を調べた。これらの末梢多型核白血球分画、骨髓単核球分画よりゲノム DNA を抽出し、サブクローニング法を用い、PIG-A 遺伝子を解析した。

[結果]

PNH クローンの拡大を検証するために、患者末梢血多型核白血球の CD59 発現を初回解析と 6-10 年後の今回を比較したところ、初回 $83.4 \pm 5.6\%$ から今回 $70.8 \pm 7.9\%$ とやや減少したが、有意差はなかった (表 1、図 1)。しかしながら、その変化の仕方は様々で、増加群 2 例 (J4, 5)、減少群 3 例 (J12, 15, 16)、不変群 4 例 (J3, 11, 13, 19) であった。

表 1 9 例の PNH 患者に同定された PIG-A 変異クローンの変遷

Patient	Gender/ Age (yrs)	Mutation	Previous Analysis			Current Analysis			Duration (yrs) from 1st Analysis (from diagnosis)	Clinical course
			PMN CD59 ⁻ (%)	PMN mRNA	BM (Colonies) DNA (AS)	PMN CD59 ⁻ (%)	PMN DNA	BM (MNC) DNA (AS)		
J4	Female 56	298C to T 273C to A	50	11/22 0/10		98	3/10 2/10	7 (11)	PNH → PNH	
J5	Male 39	1309C del	65	10/20		97	9/9	7 (8)	PNH → PNH	
J12	Male 50	936A del 322A del	94	14/20 1/12		33	4/16 2/11	6 (17)	PNH → PNH	
J15	Male 58	Int 5 3'splice site G to A 368A ins	99 (Major)			57	4/10 (4/10) 1/9 (0/9)	7 (31)	PNH → PNHaplasia	
J16	Female 62	Int 5 5'splice site T del	98	5/5		43	4/18	10(24)	PNH → PNHaplasia	
J3	Female 53	383A to G	97	18/20		93	4/10	7 (11)	PNH → PNH	
J11	Male 46	408T del	83	15/20		82	7/18	7 (12)	AA-PNH → AA-PNH	
J13	Female 69	116C to A	87	18/20		73	7/10	7 (8)	PNH → PNH	
J19	Male 70	987 T ins 338 T to C 1003 G to T 1028 AA del	78	14/27 (13/25) ND (2/25) 2/27 (4/25) 0/27 (2/25)		61	5/10 (10/10) 0/15 (1/16) 0/10 (0/10) 0/10 (0/10)	8 (14)	PNH → PNH	

AS, amplified subclones

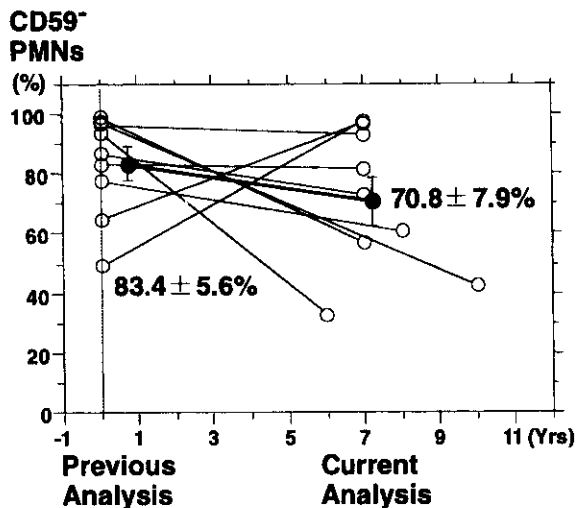


図1 9例のPNH患者のCD59欠損末梢血多型核白血球の変遷

これらの末梢血多型核白血球分画のゲノムDNAについてPIG-A変異クローンの割合を比較したところ、いずれの症例においても以前の優勢クローンは現在も優勢を維持していた。増加群のうちJ5では優勢クローンの増加によってPNHクローンが拡大したと考えられたが、J4では新規の変異クローンの出現によると思われた。一方減少群では、J12とJ15の劣勢クローンはほぼ一定であったが、優勢クローンが衰退したために

PNHクローンが減少したと思われた。このように優勢クローンの拡大や縮小によって、J4やJ12では優勢クローンと劣勢クローンが拮抗している。不変群では、いずれの症例でも優勢クローンが安定していたが、4種の変異クローンを有するJ19も優勢クローンであるTK-14-型変異(Mutation 1)が、明らかに優位を占めていた。一方、TK-1-型変異(Mutation 2)は骨髓単核球分画中で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。

[考察・結論]

9例のPNH患者の優勢クローンは、初期の解析から6-10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6-10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, Am J Hematol 62, 175, 1999
2. Nishimura J, et al, Blood 89, 3470, 1997
3. Miyata T, et al, N Engl J Med 330, 249, 1994

Rh 抗原発現制御メカニズムの解析

梶井 英治、岩本 禎彦、小山田隆
 亀崎 豊実、奥田 浩、熊田 真樹

(自治医科大学 法医学・人類遺伝学)

小峰 光博 (昭和大 学藤が丘病院 内科血液)

[はじめに]

温式自己免疫性溶血性貧血 (AIHA) における主要な自己抗原は、Rh と band3 抗原系に乗っており、なかでも、RhCE 抗原系が重要な位置を占めることが、リコンビナント抗原を使った実験から明らかになった (図 1)。Rh 血液型抗原の発現には二つの遺伝子座、すなわち 1p36-34 に存在する RHCE と RHD 遺伝子、そして 6p12 に乗っている RHAG 遺伝子の産物が必要とされる。Rh 抗原を全て欠損する Rhnull 表現型の遺伝的背景の多くで RHAG 遺伝子に異常が見いだされている。従って、RHAG 遺伝子にコードされる RhAG 糖蛋白質が Rh コンプレックス形成に不可欠のファクターと考えられ、この遺伝子の発現を制御すれば、RhCE と D 抗原を同時にコントロールすることができると考えられた。そこで、Rh 抗原発現を抑制する方法の開発をめざして、RHAG 遺伝子の発現制御領域の機能解析を行った。

[方法]

RHAG 遺伝子のプロモーターを PCR 法を用いてクローニングし、その機能解析を行った。K562、HEL、HeLa、MEL 細胞を用いて、赤芽球特異的な RHAG 遺伝子の DNaseI 高感受性領域のマッピングを行い、それを含むヒトおよびマウス DNA フラグメントをクローニングし、塩基配列を決定するとともに配列の比較を行った。ヒトの DNA フラグメントはルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入し、K562細胞に遺伝子導入してその機能解析を行い、エンハンサー領域を同定した。さらに、フットプリンティング、ゲルシフトアッセイを行って、エンハンサー配列における機能ドメインの同定を行った。

抗 原						症例数 n=20
cE/B-3	ce	cE	CE	D	B-3	
■	■	■	■	■	■	4 20%
■	■	■	■	■	■	6 30%
■	■	■	■	■	■	3 15%
■	■	■	■	■	■	1 5%
■	■	■	■	■	■	1 5%
■	■	■	■	■	■	5 25%

■ ■ ■ ■ ■ 抗体反応性+, B-3: Band 3.

図 1 20例の AIHA 患者から得られた抗赤血球自己抗体の特異性解析

[結果]

プロモーター領域のクローニングと解析を行った結果、-53bp に存在する逆位の GATA 配列が K562 および HEL 細胞におけるプロモーター活性にとって重要であり、この GATA 配列に変異を導入するとその転写活性を失うことが明らかになった。しかし、それより上流の配列はむしろ抑制的に働き、-1.9kb のクローンは転写活性をほぼ失ってしまうことが解った。この結果から、さらに離れた部位に転写調節部位が存在している可能性が示唆され、そのクローニングを試みた。ヒト RHAG 遺伝子では転写開始部位から上流約10kb、マウス rhag 遺伝子では上流約 5 kb に赤芽球系細胞特異的な DNaseI 高感受性領域を認め (図 2)、これを含む DNA フラグメントをクローニングした。それらの配列比較によってそれぞれの DNaseI 高感受性領域は高度に保存されていることが明らかになった。さらに、ヒトの15kb フラグメントをルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込み、K562に遺伝子導入してその機能を解析した結果、DNaseI 高感受性領域に一致した部位にエンハンサー活性が存在することが明らかになった (図 3)。ミュータジェネシスによって、その中の GATA 配列が最も重要なモチーフとして働いていることが明らかになった。また、フットプリンティングとゲルシフトアッセイによって GATA 配列には、赤芽球系細胞特異的な転写因子である GATA-1 の結合が明らかになった。

[考察]

正常赤芽球における RhAG の発現は BFU-e レベルで始まり、赤芽球の成熟とともに増加する。今回、RHAG 遺伝子の発現が主に GATA-1 によって制御されていることが示唆された。赤血球造血における GATA-1 の重要性から GATA-1 の発現制御による RHAG 遺伝子の発現抑制は現実的ではない。しかし、今回の解析から GATA-1 の機能を修飾するようなモチーフの存在も示唆され、今後はそれらの分子の同定を進める必要があると考えられる。

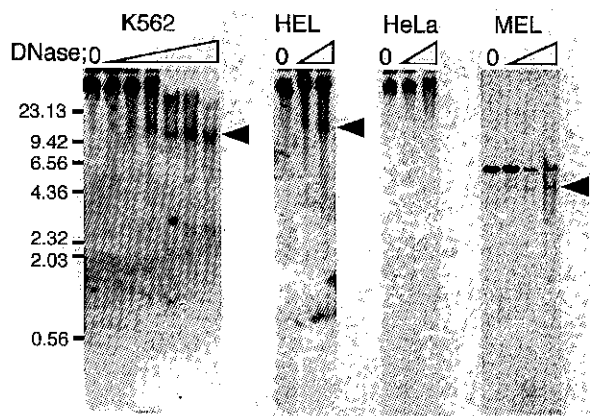


図2 K562、HEL、HeLa 細胞の *RHAG* 遺伝子および MEL 細胞の *rhag* 遺伝子における DNase I 高感受性領域のマッピング

[文献]

1. Iwamoto S, et al, J Biol Chem 275, 27324, 2000
2. Iwamoto S, et al, Biochem Biophys Res Commun 243, 233, 1998
3. Iwamoto S, et al, Int J Hematol 68, 257, 1998

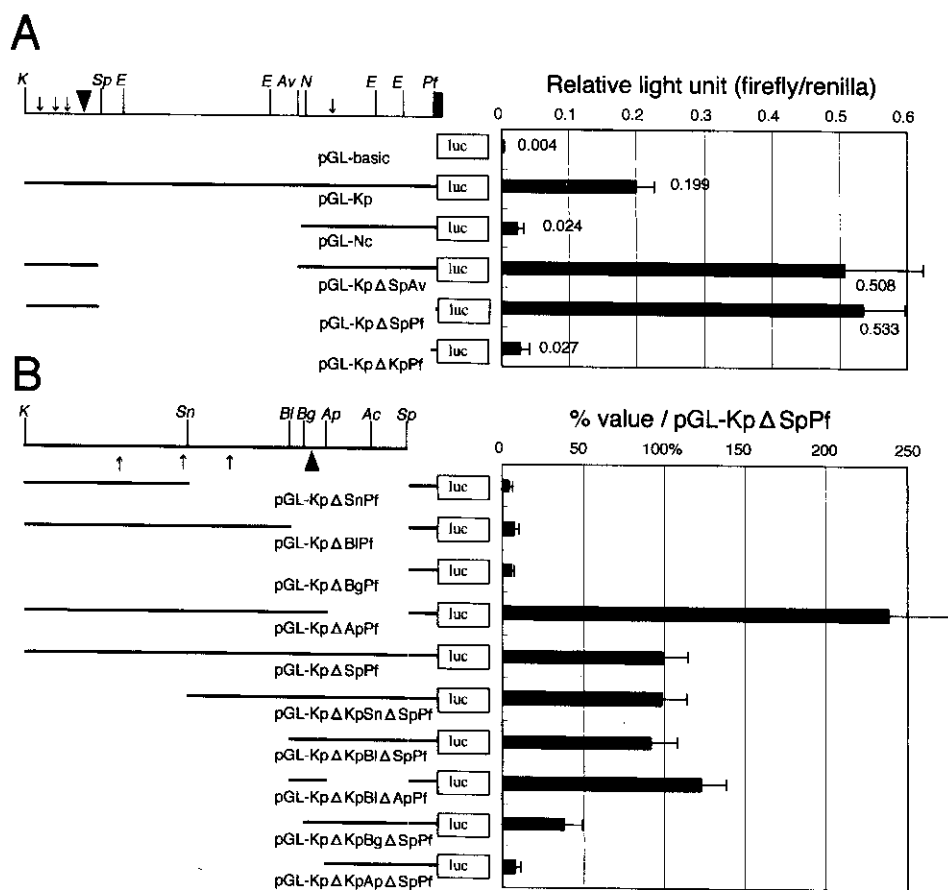


図3 *RHAG* 遺伝子 5' フランキング領域のルシフェラーゼアッセイ

赤血球膜蛋白遺伝子とその蛋白発現に 関する Gene Methylation の意義

八幡 義人、山田 治、杉原 尚
神崎 暁郎、和出 秀穂、八幡 愛弓
賀来万由美、中西秀和

(川崎医科大学 血液内科)

[はじめに]

私たちは溶血性貧血症例、特に赤血球膜異常症について、病因膜蛋白の検索 (phenotype) と、その当該遺伝子の同定 (genotype の決定) を行って来た。この研究の中で、明らかに溶血病態を呈しながら、遺伝子自体には変異が全く認められない症例が存在することが判明するに至った。そこで、正常および病態遺伝子に関して、その遺伝子発現の制御機構を明らかにする必要性に迫られることになった。そこで、epigenetic control としての gene methylation の立場から、3種の赤血球膜蛋白、すなわち (1) 細胞骨格蛋白質としての β -spectrin (β -Sp)、(2) 構造蛋白質としての band 3 (anion transporter I: AE-I)、(3) anchor 蛋白質としての protein 4.2 (P4.2) を選び、各々の遺伝子、すなわち、SPTB、EPB3、ELB42、についてその methylation の程度と意義を検討した。

[試料および方法]

使用した genomic DNA 試料は、(1) ヒト末梢血単核細胞、(2) ヒト末梢血 BFU-E を用いた二相性液体培養法 (Wada, H. et al: Blood 75: 505-511, 1990 および Wada, H. et al: Exp Hematol 27: 54-62, 1999) による各成熟段階の培養赤芽球、(3) ヒト正常骨髓由来の各成熟段階の赤芽球、(4) 赤芽球に committ する培養樹立株 (UT-7、AS-E2、K562) などを用いた。検索方法は、抽出 DNA を 0.3M NaOH 処理 (95°C) の後、bisulfite 処理 (Zeschngk, M. et al: Hum Molec Genet 6: 387-395, 1997) を行った。処理 DNA について、PCR 増幅の後、各 PCR 産物について cloning、さらに個々の clone について sequencing を行った。その結果、

bisulfite 処理前後の sequence の違いから、unmethylated (U) と methylated (M) とを判定し、各々の 5'-CpG-3' sites の methyl 化度を、少なくとも 10 clones について検討した。

[成績]

1. SPTB、EPB3、ELB42 における 5'-CpG-3' sites 分布特性 (図 1) : 各遺伝子について、その sequence 上における 5'-CpG-3' sites の数と部位を各 initiation site から上流約 600 余塩基の領域について検索した。その結果、5'-CpG-3' sites 数は SPTB で著しく多く (CpG-rich)、house-keeping gene である可能性が高い。EPB3 では、SPTB よりもかなり少ないが、ELB42 が最も少なかった。

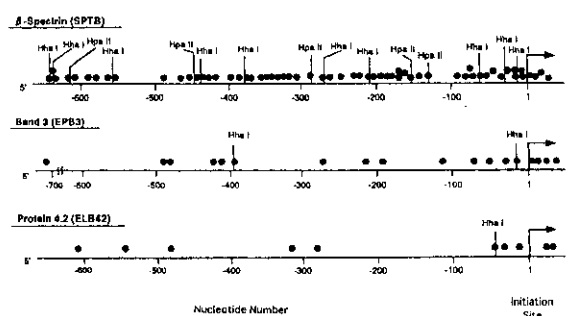


図 1 Number and Location of 5'-CpG-3' Sites and Endonuclease Cleavage Sites in the Promoter Regions of Red Cell Membrane Protein Genes (SPTB, EPB3, and ELB42)

2. 上記 3 遺伝子の 5'-CpG-3' site における methylation 特性 (図 2) : SPTB では、正常人 35 名、250 clones について検索したところ、promoter 領域に存在する 5'-CpG-3' sites は全て完全に unmethylated であった。次に、EPB3 では、40 名 588 clones の検討の結果、全体として約 2/3 の methylation を認めたが、一部の 5'-CpG-3' sites では methyl 化度が低く (hypomethylated)、たとえば E site では 37%、G site では 36% であった。ELB42 の 23 名 180 clones の検索では、coding region 内の 5'-CpG-3' sites が約 90% の methyl 化度を呈するのに対して、promoter 領域の 5'-CpG-3' sites は平均約 66% の methyl 化度であり、site B は 40%、site C では 58% と、中等度の methyl 化度を示した。

3. Gene methylation の erythroid 特異性について :

ヒト BFU-E を用いた二相性液体培養法によっ

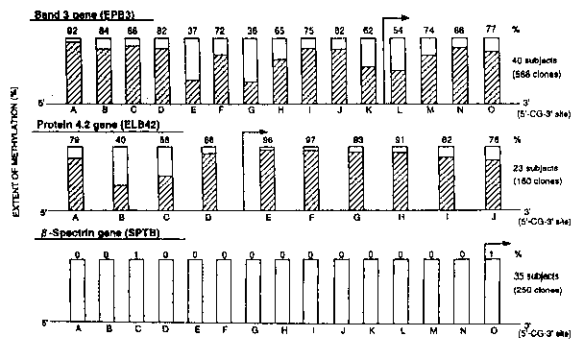


図2 The Extent of Methylation (%) at the 5'-CG-3' Sites of the Promoter Region to Genomic DNA of Band 3, Protein 4.2 and β -Spectrin Genes From Normal Human Mononuclear Cells in Peripheral Blood

て得られた第二相 day 15 の試料では、赤芽球比率は約92%であった。この培養赤芽球について、gene methylation を検索したところ、SPTB では、末梢血単核細胞による成績と同様に、完全に unmethylated であり、EPB3 でも sites E および G の hypomethylation を含めて同様の所見であり、ELB42 でも site B の中等度の methyl 化度を含めて、やはり同様の所見であった。したがって、赤芽球に特異的とされるこれら 3 遺伝子 (SPTB、EPB3、ELB42) については、末梢血単核細胞の genomic DNA を用いても、問題はないことは判明した。

4. 樹立培養細胞 (UT-7/EPO) における gene methylation : UT-7/EPO cell line は、erythropoietin の存在下に赤芽球系に分化しうる樹立培養株である。本細胞における SPTB は末梢血単核細胞の場合と同様に完全に unmethylated であった。これに対して、EPB3 は、末梢血単核細胞におけるメチル化度は低く (hypomethylated)、全体として約 50% であった。特筆される点は、sites E と G であり、両者ともほぼ完全に unmethylated であった。この所見は、EPB3 の場合、gene methylation に関して sites E と G とは、他の 5'-CpG-3' sites とは異なり、特殊な機能部位であると推定される。さらに注目されるのは、ELB42 であって、promoter 領域および coding region のいずれであっても、その 5'-CpG-3' sites は全て unmethylated であった。これらの所見は、他の樹立培養細胞株 AS-E2 や K-562 でも同様であった。

[まとめ]

以上の諸点から、赤血球膜の立体的超微構造において、その細胞骨格蛋白質の基本をなす β -spectrin の遺伝子 (SPTB) が多数の 5'-CpG-3' sites を有し、いわゆる CpG-rich な house-keeping gene であることは興味深い。この点で、赤芽球系細胞の分化・成熟を通じて unmethylated であることは重要な知見である。また、 β -spectrin が α -spectrin と比較して、膜蛋白質としての spectrin 合成上 rate-limiting であることが知られていることを合わせて考えると注目されるべき点である。

次に、protein 4.2 (P4.2) の発現に関する gene methylation の関与の可能性である。我々は、赤血球膜構造の構築において、spectrin、band 3 は赤芽球成熟段階早期にすでに発現するのに対して、P4.2 は正染性赤芽球あるいは網赤血球段階において始めて発現すること、その mRNA は二相性液体培養法の第 2 相の day 0 では発現しておらず、day 3 に至って始めて発現することを既報した。今回の ELB42 におけるメチル化の程度は、この day 3 段階ではすでに methylated となっているが、それよりも幼弱段階と推定される樹立培養株 (UT-7、AS-E2、K-562 など) では、ELB42 の 5'-CpG-3' sites は promoter 領域のみならず、coding region であっても、完全に unmethylated であった。以上の諸点を考慮すると、P4.2 蛋白質の発現は、P4.2 の mRNA の発現に続き、この mRNA 発現は、unmethylated から methylated での転換を契機としている可能性が考えられ、gene methylation による赤血球膜蛋白質の発現制御の存在を示唆しているといえよう (図 3)。

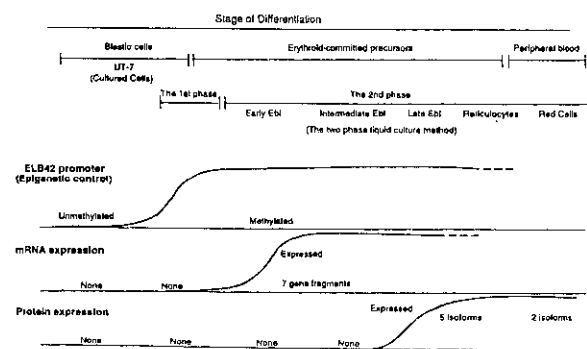


図3 The Sequential Event of Expression of Protein 4.2 in Human Erythroid Cells

V 骨髓纖維症

原発性慢性骨髄線維症
—第二次全国調査中間成績—

仁保 喜之 (国家公務員共済組合連合会 千早病院)
岡村 孝 (九州大学 第一内科)

【はじめに】

原発性慢性骨髄線維症 (MF) は、幹細胞レベルでのクローナルな増殖をきたした疾患であり、慢性骨髄増殖性疾患の一型に属する。MF に特異的な病態は、広範な骨髄の反応性線維化であり、このため造血障害をきたし、髄外造血のため肝脾腫をきたす。この反応性線維化のメカニズムについては、現在も詳細については不明であるが、異常幹細胞あるいはこれから分化した細胞が、線維芽細胞の増殖因子、骨芽細胞増殖因子ならびに血管新生因子などを局所で産生分泌しているものと推定されている。MF の臨床的実態については、欧米からのいくつかの報告がみられるが、日本においては、平成 9 年に本班会議において全国調査を行い、過去10年間の MF 患者336例をまとめ、予後、治療、予後不良因子の同定、重症度分類などがあきらかとなった^{2,3)}。今回は、第二次調査として prospective な調査を行い、さらに症例の蓄積とその解析を行うことによる臨床像の明確化および治療法のガイドライン作成をめざした研究を施行している。その中間報告を行う。

【対象および方法】

日本血液学会により認定された510施設の血液疾患担当医にアンケートを送付し、225施設から回答を得た (回答率: 44.1%)。

【結果】

平成11年度および平成12年度 (2年間) の MF 発症数は57例であり、年齢は28-89歳で平均60.4歳であった。男女比は1.9:1 で男が約2倍であった。自覚症状を有する例は39例 (70%) であり、無症状例は17例であった。症状としては貧血症状 (34%)、腹部症状 (13%)、出血症状 (11%) で

あり、合併症は22例 (40%) にみられ、門脈圧亢進症、高尿酸血症、高血圧症などがみられた。家族集積例はなかった。染色体検査は、41例に施行され、22例が正常核型、5例で解析不能であったが、異常例は14例でみられた。del (13) が4例で最も多く、次いで多数の複雑核型を呈したものが3例であり、+8 は2例であった。前回調査と同様に特異的染色体異常はみられなかった。治療は、35例において無治療であり、輸血を含む対症療法が主体であることがわかる。22例において何らかの治療がなされ、ハイドレアやブスルファンなどの抗腫瘍剤が8例、プレドニン投与例が6例、プリモボラン投与6例、脾照射2例、摘脾1例、ならびにエリスロポイエチン投与2例であった。5例が死亡し、死因としては肺炎2例、心不全1例、白血球急激増加1例、老衰1例である。表1に示す重症度分類では、重症型25例、中等症型19例および軽症型12例と分類される。

表1 重症度分類 (末梢血検査による)

項目	Hb (g/dl)	Platelet (X10 ³ /μl)	Blast (%)
A	<6	<30	>=5
B	>=6, <10	>=30, <100	>=3, <5

重症 A 1項目以上 あるいは B 2項目以上
中等症 B 1項目のみ
軽症 上記以外

【考察・結論】

第1次全国調査では、336例の MF 患者を対象として臨床的検討を行った^{2,3)}。このうち298例の予後調査では、5年生存率は68.63%であり平均生存期間は10年であった (図1)。予後解析では、予後不良因子として年齢、男性、自覚症状有り、などで、検査所見としては、貧血、血小板減少、芽球の増加などが有意差をもって予後不良となり、この検査所見から重症度分類を行った (図2)。また、染色体異常の有無による予後の差はなく (図3)、欧米での報告との違いがみられた⁴⁾。今回の調査は、まだ症例数が57例と統計解析するにはまだ十分な数ではなく、今後も長期的症例登録および予後調査の継続が必要となる。

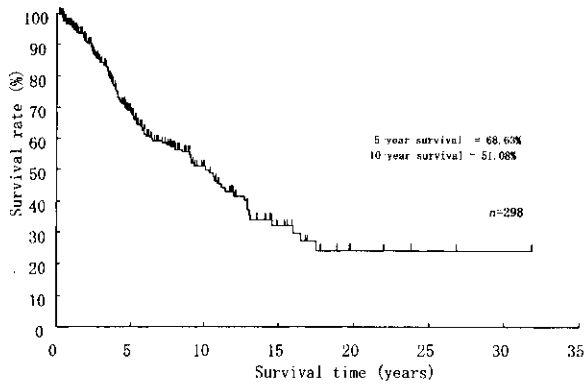


図 1 Survival curve for patients with PCMF

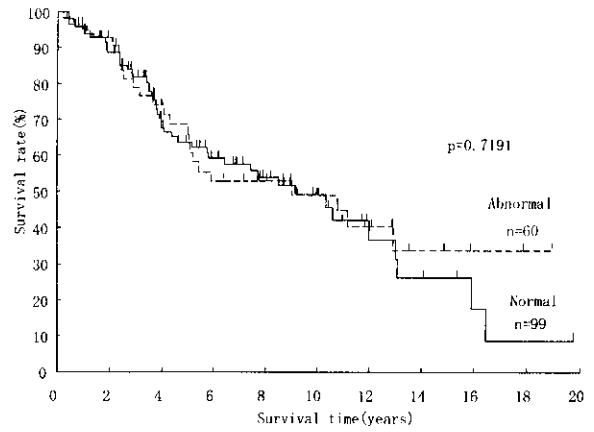


図 3 Karyotype

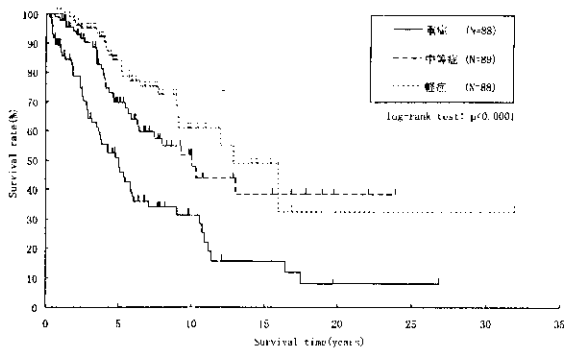


図 2 Severity grading

[文献]

1. Tefferi A, N Engl J Med 342, 1255, 2000
2. Okamura T, et al, Int J Hematol 73, 194, 2001
3. 岡村 孝, 他, 原発性骨髄線維症の病態と予後 : Annual Review血液2000 p103-111, 中外医学社
4. Reilly JT, et al, Br J Haematol 98, 96, 1997

AML1-ETO 発現誘導マウス

仁保 喜之 (国家公務員共済組合連合会 千早病院)
樋口 雅一 (国家公務員共済組合連合会 浜の町病院)

[はじめに]

今回我々は、急性骨髄性白血病で最も多く認められる t(8;21) 転座によって形成される AML1-ETO 融合遺伝子の白血病発症への関与を調べるために、AML1-ETO 遺伝子発現誘導マウスを作製し検討した。

[方法]

胎生期には AML1-ETO の発現を止め、成長後に誘導可能な AML1-ETO 条件発現誘導ノックインマウスを作製した。そのために、転写を強力に途絶させる転写停止配列と P1 バクテリオファージの Cre-loxP システムを利用した。AML1-ETO ノックインコンストラクトの上流に、loxP 配列で挟んだ転写停止配列を挿入し、ノックインアレルを作製した (図 1)。このアレルでは、挿入された転写停止配列で転写が途絶し AML1-ETO は発現しないが、Cre リコンビナーゼ存在下では組換えが起こり転写停止配列がアレルから削除され、発現が誘導される。一旦削除されると、AML1-ETO の発現は、内因性の AML1 プロモーターに制御されることになり、正確に t(8;21) 転座を模倣することになる。このノックインマウスの骨髄を採取して、Cre リコンビナーゼと緑色蛍光蛋白 (GFP) の両方の遺伝子を同時に発現するレトロウイルス MSCV-Cre を感染させ、GFP でソーティングすることによって Cre 蛋白を発現している骨髄細胞を集めて解析した。次に、このノックインマウスを、IFN- α/β によって Cre 蛋白が発現する *Mx1-Cre* トランスジェニックマウスと交配し、ダブルトランスジェニックマウスを得た。このマウスに、内因性 IFN を誘導する合成二重鎖

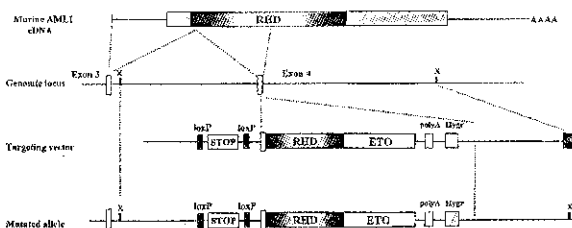


図 1 AML1-ETO 条件発現誘導ノックインアレルの構造

RNA の pI-pC を腹腔内投与して AML1-ETO の発現を誘導した後、定期的に血算を行い、健康状態を慎重に観察した。また適宜、骨髄細胞を採取し *in vitro* にて解析した。次に、pI-pC で AML1-ETO の発現を誘導したマウスの一部に、アルキル化剤の一種である ENU を投与して遺伝子変異を誘発し、同様に経過を観察した。

[結果]

AML1-ETO 条件発現誘導ノックインマウスは、メンデルの法則に従った確率で生まれ、胎性致死ではなかった。生後も正常に成長した。

MSCV-Cre を感染させた AML1-ETO 条件発現誘導ノックインマウスの骨髄細胞だけが AML1-ETO 蛋白を発現しており、長期に渡り高いコロニー形成能を示した (図 2)。

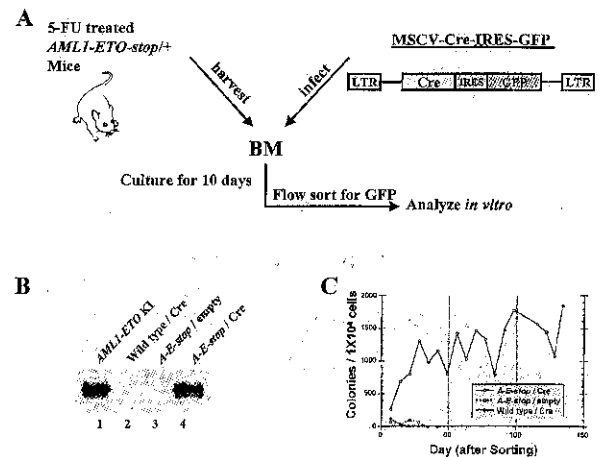


図 2 *in vitro* における AML1-ETO 発現誘導

ダブルトランスジェニックマウスの骨髄細胞は、AML1-ETO 蛋白を pI-pC を投与後、1年以上の長期にわたり発現していた。多機能性幹細胞として12日目の CFU-S₁₂ と CFU-Mix における AML1-ETO mRNA の発現を確認した。こうして AML1-ETO を発現誘導したマウスを経過観察したが、骨髄前駆細胞が僅かに増加していたものの、末梢血所見や造血組織に異常を認めなかった。また、AML1-ETO 発現誘導後11ヶ月まで造血器悪性腫瘍は発症しなかった。*in vivo* で AML1-ETO の発現を誘導したマウスの骨髄細胞を、培養したところ、高いコロニー形成能を示し、顆粒球系細胞は容易に不死化した。その生存と増殖のためには外因性のサイトカインが必要だった。

pI-pC で AML1-ETO の発現を誘導したマウスに、ENU を投与した。対照のマウスでは、7%

がリンパ腫を発症しただけだが、AML1-ETO 発現誘導マウスのうち ENU 投与後 2～10ヶ月で 33%に顆粒球肉腫が発症した(図3)。顆粒球肉腫は、ヒトと同様に、頭蓋骨をはじめ、胸骨、上腕骨や、後腹膜腔・背部の軟部組織などに生じ、ミエロペルオキシダーゼ免疫染色陽性の骨髄芽球様細胞で形成されていた。顆粒球肉腫が発症すると、全身の臓器に腫瘍細胞が播種して速やかに死に至った。顆粒球肉腫の腫瘍細胞は、AML1-ETO 蛋白を発現し、培養にて容易に不死化した。AML1-ETO を発現させただけの骨髄細胞と異なり、これらの腫瘍細胞は、外因性サイトカイン非依存性の増殖を示した。この条件下で、腫瘍細胞の一部は、顆粒球系・赤芽球系の細胞へ分化した。その染色体は、二倍体を維持しており、付加的な転座は認められなかった。更に、これらの腫瘍細胞は、同系マウスへの移植が可能で、レシピエントには、同様の腫瘍が発症した。

[考察]

以前我々は、通常の手法を使って AML1-ETO のノックインマウスを作製した²⁾。AML1-ETO ヘテロ接合体の胎仔は、AML1 欠失マウスと同様に、成体型造血が欠除しており胎生致死であり、高い自己複製能をもった異型なコロニーを形成し、容易に不死化する胎仔肝臓の造血細胞を同系マウスに移植しても白血病は生じなかった。そこで今回我々は、成長後に AML1-ETO を発現誘導できるマウスを作製し、白血病発症への関与を更に検討

した。*in vitro* 及び *in vivo* で骨髄細胞に AML1-ETO を発現させることが可能で、それぞれの顆粒球系細胞は高いコロニー形成能を示し、後者で CFU-S₁₂ が増加していたが、造血器悪性腫瘍は発症しなかった。また、他のグループの *in vitro* の研究で多数報告されているような造血細胞の分化のブロックは、我々の AML1-ETO 発現誘導マウスでは認められていない。我々の内因性の AML1 プロモーターを使用するノックインマウスとは異なる他のグループのトランスジェニックマウスの系でも同様の結果が報告されている²⁾。以上より、白血病発症には、付随する二次的な遺伝子変異が必要と考えられたため、AML1-ETO 発現誘導マウスにアルキル化剤の一種である ENU を投与して遺伝子変異を誘発したところ AML-M2 に高頻度に合併する顆粒球肉腫が発症した。これらの結果は、骨髄球系悪性腫瘍発症に AML1-ETO およびそれに伴う二次的な遺伝子変異が関与することを、初めて動物実験モデルで明らかに示したものである。

[結論]

1. *in vitro* の研究結果と異なり、我々のマウスでは、AML1-ETO の発現によって、造血細胞の分化はブロックされなかったが、顆粒球系前駆細胞は高いコロニー形成能を示した。
2. AML1-ETO の発現だけでは、白血病は発症しなかった。
3. AML1-ETO 発現マウスに、二次的な遺伝子変異を誘発することにより、AML-M2 に高率に合併する顆粒球肉腫を発症させることができた。

最後に、我々のマウスモデルは、AML1-ETO 発現下で、顆粒球系悪性腫瘍の発症に関与する二次的な遺伝子変異を特定し、AML1-ETO やそのシグナル伝達系路を標的にした新しい治療を開発する非常に有効な手段になると思われる。

[謝辞]

以上の研究は、米国留学中にテネシー州メンフィスの聖ユダ小児研究病院病理部門で行われたものであり、適切なご指導を頂いた James R. Downing 博士に深謝いたします。

[文献]

1. Okuda T, et al, Blood 91, 3134, 1998
2. Rhoades KL, et al, Blood 96, 2108, 2000

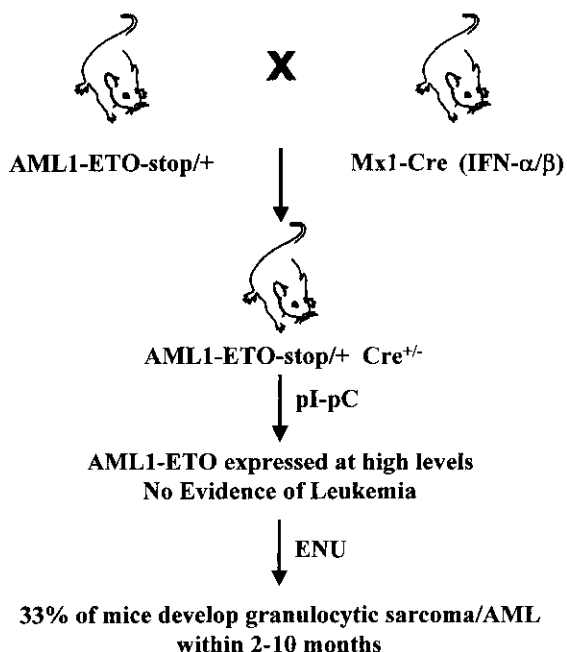


図3 AML1-ETO 発現誘導マウスの作成と顆粒球肉腫の発症

本態性血小板血症患者造血前駆細胞に
おけるSmadを介さないTGF- β
シグナル伝達系の証明

新津洋司郎、坂牧 純夫、黒田 裕行
日下部俊朗、小沼 祐一、松永 卓也
平山 泰生、藤見 彰仁

(札幌医大 第四内科)

[はじめに]

我々はこれまで Transforming Growth Factor- β (以下、TGF- β) が、巨核球造血の negative regulator であり血小板産生調節に重要な働きをしていることを明らかにし報告してきた^{1,2)}。血小板中に豊富に存在する TGF- β が、濃度依存性に骨髄ストローマ細胞の Thrombopoietin (TPO) mRNA 発現を増強し、増加した TPO は幹細胞を巨核球系にコミットさせる。一方 TGF- β 濃度が高い状態では、巨核球造血は TGF- β 受容体を介して増殖抑制されるといふ、TGF- β による負の生理的調節機構が存在することが明らかにした (図 1)。これまで TGF- β によるシグナル伝達は Smad を介した経路が報告されており、TGF- β が II 型受容体に結合すると II 型受容体がリン酸化され、更に I 型受容体をリン酸化して Smad2・3・5 などの R-Smad を活性化して Co-Smad である Smad4 と 3 重体を形成しながら細胞質から核へ移行し、細胞周期を抑制することが明らかとなっている (図 2)。一方、我々は乳癌培養細胞株 MCF-7 において TGF- β による細胞内シグナル伝達系には Smad を介さない経路が存在することを明らかにしてきた。すなわち proteinphosphatase 2A (PP2A)/p53 を介するもう一つの経路が存在すること明らかにした。ところで本態性血小板血症 (以下、ET) 患者では健常人に比較して、増加した血小板のため、血漿及び骨髄 TGF- β 濃度が高いにも関わらず、血小板増加・巨核球増加を認める。以上から、本症の巨核球系細胞は TGF- β による増殖抑制シグナルから逸脱していると考えられる。そこで本研究では、健常人および ET 患者

の巨核球系造血前駆細胞において TGF- β の新たなシグナル伝達系である PP2A/p53 の経路が存在するかどうか確認するとともに、TGF- β の ET 患者巨核前駆細胞に対する増殖抑制作用や、ET 患者巨核前駆細胞における TGF- β シグナル伝達に関与する I 型および II 型 TGF- β 受容体・Smad2・Smad4・Smad5 の遺伝子発現について検討した。

[対象と方法]

1. 健常人と ET 患者の骨髄単核球を Ficoll 分離後、20% 空腹時健常人血漿存在下の a-MEM に TPO 100 ng/ml を添加し、骨髄単核球 1.0×10^6 /ml となるようにして 14 日間の液体培養後、TGF- β 1.0 ng/ml 添加し p53/PP2A のモノクローナル抗体を用いて免疫蛍光染色し細胞質/核移行を共焦点レーザー顕微鏡および Western ブロット法にて定量的に検討した (図 3)。PP2A の阻害剤であるオカダ酸処理を行い、同様に p53/PP2A の細胞内移動を検討した。
2. 対象として同意のもとに健常人 5 例と ET 患者 5 例の骨髄穿刺を施行し、骨髄単核球を Ficoll 分離後、20% 空腹時健常人血漿存在下の a-MEM に TPO 100 ng/ml を添加し、骨髄単核球 1.0×10^6 /ml となるようにして 0.8% メチルセルロース下 CFU-Meg アッセイを行った。更に TGF- β 濃度をそれぞれ 0、0.1、1.0 ng/ml にして、5% O₂、5% CO₂ の条件で 37°C で 14 日間培養し、コロニー数を測定した (図 7)。
3. ET 患者 5 例と健常人 3 例の骨髄単核球を、TPO 100 ng/ml・20% 空腹時健常人血漿存在下の RPMI1640 に骨髄単核球 1×10^6 /ml 濃度にて、5% O₂、5% CO₂ の条件で 37°C で 14 日間培養した。培養後、細胞を回収し RNA を調整後 RT-PCR を行った (図 10)。プライマーの塩基配列は、Smad2 の 5' primer は CGAAATGCCACGGTAGAAAT、3' primer は CGGCTTCAAACCCTGATTA とした。Smad4 の 5' primer は GTGAAGATCAGGCCACCT、3' primer は TGTCTGAGCATTGTGCATAG とした。Smad5 の 5' primer は GAAGCTTGCTGGT-AAGAATTTTC、3' primer は GCTTGTATCCATA-GGCTGGGAA とした。条件は、94°C、2 min、

94℃、57℃、30sec、68℃、1 minで35cycle、68℃、7minでPCRを施行した。

4. ET患者3例と健常人3例の骨髓単核球を用いて上記の方法でRNAを調整し、Smad4 mRNAの定量化をTaq-Man RT-PCRにて施行した(図11)。Smad4の5' primerはACTGGCCTGTTTACAATGAGCを3' primerはACCAATACTCAGGAGCAGGATGAを用いた。また、Taq-Manプローブとして5'-Fam-TGCATTCCAGCCTCCCATTTCCA-3'を用いた。Smad4ベクターを作りmRNA合成を行ってSmad4 mRNA発現のスタンダードカーブを作製し定量化を行った。RT-PCRの条件は、50℃、2 min→60℃、30minにてcDNAを合成、95℃、5 minでdenatureの後、94℃、20sec→60℃で50 cycleにてPCRを施行した。

[結果]

1. これまで我々は乳癌細胞株MCF-7において、TGF- β 添加によりp53の脱リン酸化を明らかにし、図3Aの免疫蛍光染色に示すように活性化したp53が細胞質から核へ移行することを確認した。A中段はp53のphosphataseであるPP2Aに免疫蛍光染色で、p53に附随してTGF- β 添加により細胞質から核へ移行することを確認した。以上から、TGF- β はp53の脱リン酸化を促し、p53やPP2Aを細胞質から核へ移行させることを明らかにした。図3B上段にMCF7をTGF- β 添加後に核と細胞質に分離しp53発現についてWesternプロットにて定量化したものであるが、TGF- β 添加により細胞質のp53発現は経時的に低下し、一方核のp53発現は経時的に増加することを確認した。図3B下段に示すようにp53を免疫沈降した後にPP2Aで行ったWesternプロットではTGF- β 添加によりPP2Aはp53に附随して動くことを確認した。

2. 図4にTGF- β II型受容体をCosに遺伝子導入した後、FLAG-tagで免沈しPP2Acで行ったWesternプロットを示す。TGF- β 添加後PP2Aは経時的にTGF- β II型受容体に結合し離れることが明らかとなった。以上より、図4下段のシエーマに示すように非活性型PP2AはTGF- β II型受容

体にリクルートされ、結合コンポーネントであるPP2Abがリン酸化を活性型となることが想定された。

3. 以上の結果から考えられるシエーマを図5に示す。TGF- β はPP2Aを活性化して、p53の脱リン酸化を促し、p53を核へ移行させて細胞周期を抑制すると考えられた。

4. 更に我々は腫瘍細胞株だけでなく実際の健常人においても同様の検討した。図6上段に示すように、TGF- β 添加によりp53が細胞質から核へ移行することを明らかにし、PP2Aのインヒビターであるオカダ酸にてp53の核移行がブロックされることを確認した。また図6下段に示すようにWesternプロットでも定量的に細胞質から核へ移行することと、オカダ酸にてp53の核移行がブロックされることを確認した。以上からTGF- β 添加によりp53が細胞質から核へ移行する上でPP2Aが関与する現象が、腫瘍細胞株だけでなく生理的にも認められることを証明された。

5. ところで、ET症例における血小板増多がTGF- β による巨核球系造血抑制からの逸脱による可能性を考え、TGF- β 添加によるCFU-Megアッセイを施行した(図7)。健常人CFU-Megコロニー数はTGF- β 1.0 ng/ml添加することにより平均92.1%とほぼ完全に抑制されるが、ET症例では平均51.5%と抑制率は軽度であった。このことより、実際にET患者の巨核球造血では、TGF- β による巨核球造血抑制からエスケープしていることを確認した。そこでその逸脱の機序が、p53を介するものなのかそれともSmadを介するものなのかを検討した。

6. 図8に示すように、ET患者巨核球系細胞においてTGF- β 添加によりp53が細胞質から核へ移行することを免疫蛍光染色にて確認し、PP2Aもp53に附随して核へ移行することを確認した。このことからET症例でも、健常人に認められたp53を介した生理的なTGF- β による巨核球造血抑制が関与していると考えられた。そこでET患者と健常人での、TGF- β 添加によるp53の核陽性細胞数に相違があるかについて検討を行った。

7. 図9はp53免疫蛍光染色での核染色陽性細胞数

の割合であるが、ETと健常人の両者に差は認められなかった。

8. 次に我々はET症例のCFU-MegにおいてSmad2やSmad5発現はET患者と正常人に差を認めず、ET患者のSmad4発現だけが正常人に比較して低下していることが明らかとなった。

9. そこでSmad4発現をTaqMan RT-PCRにて定量化したところ、ET患者のSmad4発現は正常人に比較して約1/10程度に低下していることが確認された(図11)。

[考案・結論]

1. 腫瘍細胞株MCF-7で認められたPP2A/p53を介するTGF-βによるシグナル伝達系は腫瘍細胞株ばかりでなく健常人骨髄巨核球前駆細胞においても生理的に認められることが明らかになった。
2. またET患者巨核球前駆細胞でもPP2A/p53を介するTGF-βによる細胞増殖抑制機構は健常人同様存在するが、Smad4遺伝子発現が低下しているため、TGF-βによる巨核球造血抑制調節から部分的に逸脱している病態が想定された。

[参考文献]

1. Hirayama Y, et al, Blood 92, 46, 1998
2. Sakamaki S, et al, Blood 94, 1961, 1999

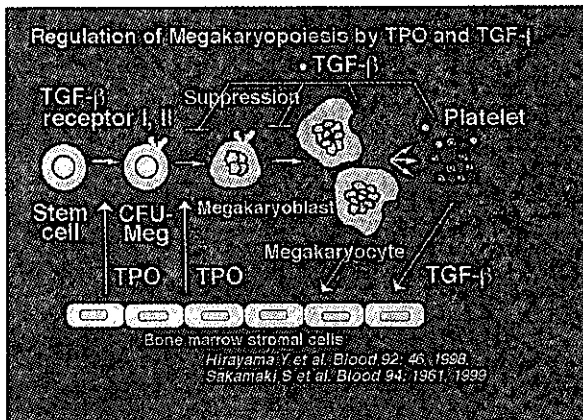


図 1

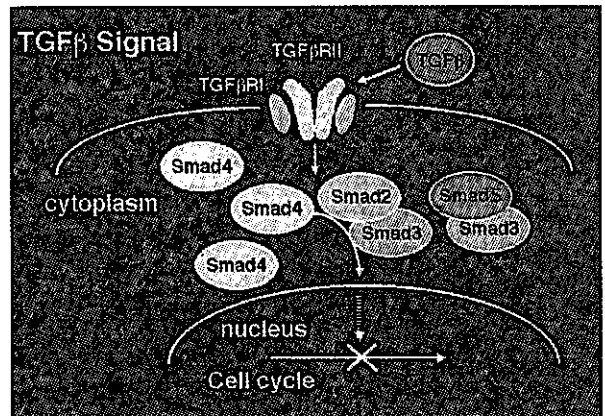


図 2

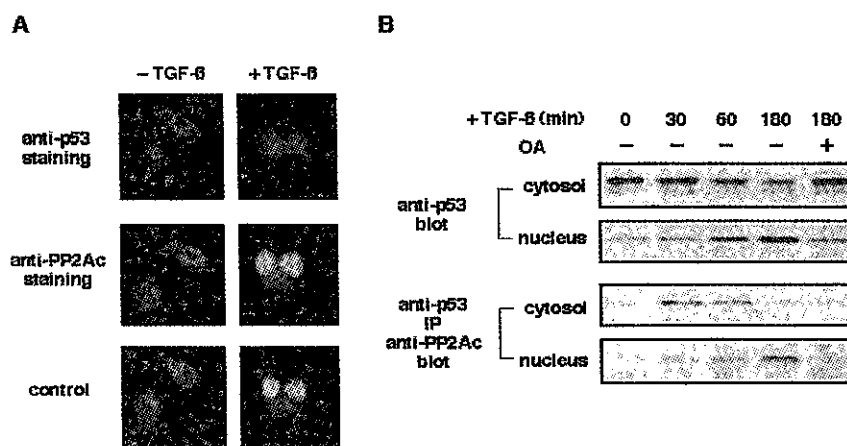


図 3

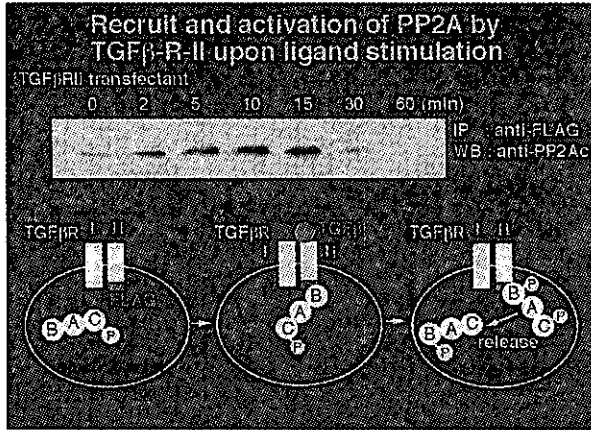


図 4

巨核球系造血前駆細胞におけるTGF- β による細胞増殖抑制

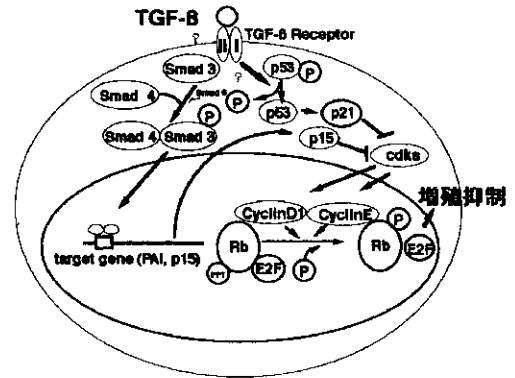


図 5

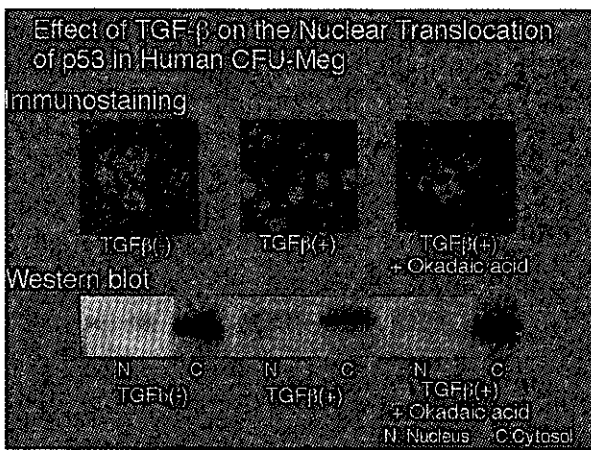


図 6

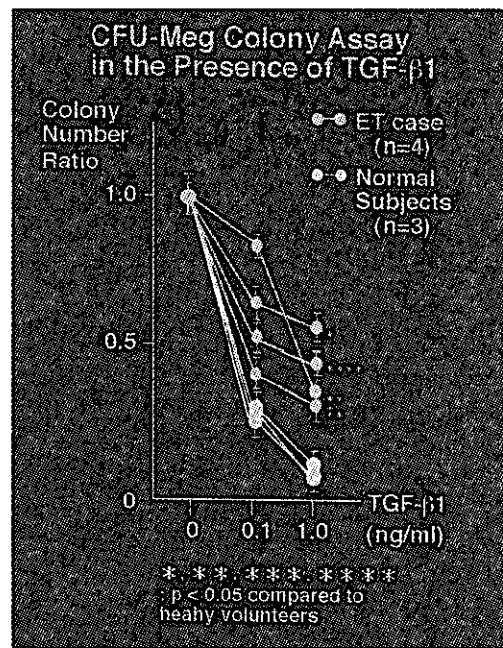


図 7

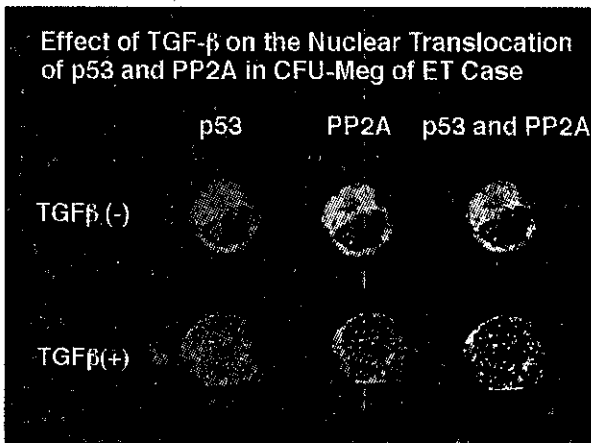


図 8

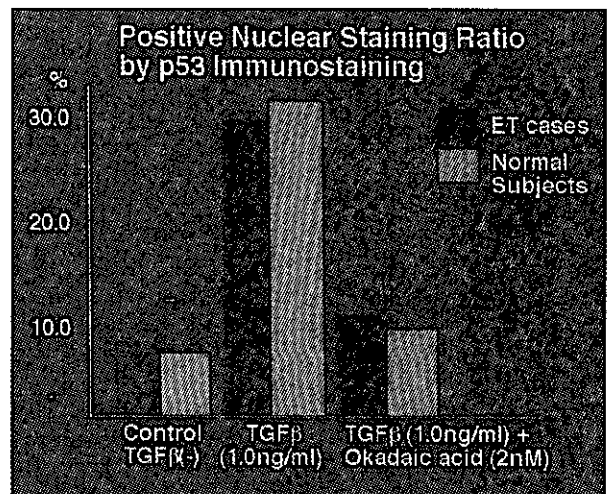


図 9

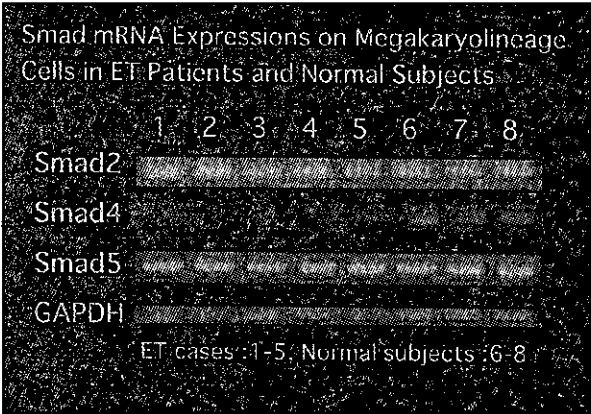


図 1 0

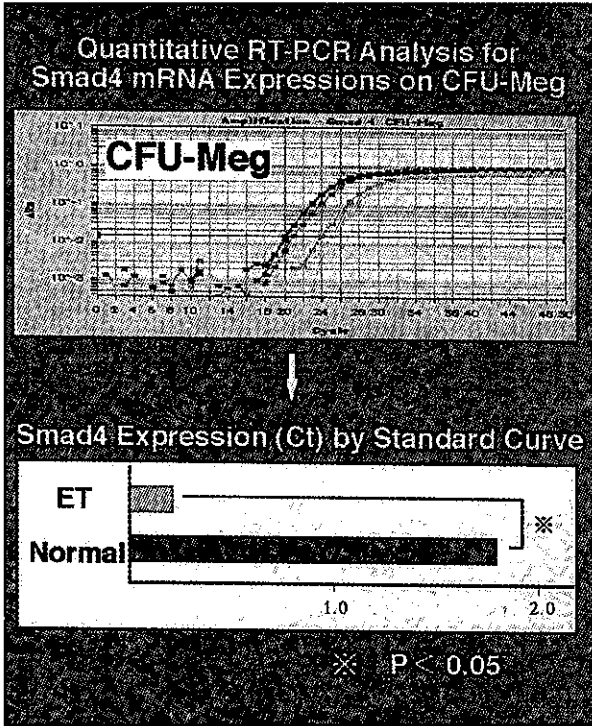


図 1 1

発表文献リスト

発表文献リスト

国際・国内学会雑誌への発表文献リスト

平成12年度の本研究に当たってなされた研究業績のうち既発表または印刷中の原著論文、学会発表抄録、単行本を関連分野別に区分し、原則として、英文、和文の順序で、それぞれを原著、抄録に整理し、班構成員名簿の記載順に配列した。

著者名のアンダーラインは本研究班の構成員を示し、通し番号の肩につけた*印は抄録を示す。

1. 再生不良性貧血に関する研究業績

1. Futaki M, Yamashita T, Yagasaki H, Toda T, Yabe M, Kato S, Asano S, Nakahata T : The IVS4 + 4 A to T mutation of the fanconi anemia gene FANCC is not associated with a severe phenotype in Japanese patients. Blood 95 : 1493 - 1498, 2000
2. Yamaguchi M, Machii T, Azenishi Y, Nishimura J, Shibano M, Kanakura Y, Kitani T : Detection of small populations of CD59-deficient erythrocytes in patients with aplastic anemia or myelodysplastic syndrome and normal individuals. Blood Cells Molecules and Diseases 26 (3) : 247 - 254, 2000
3. Matsuo Y, Iwanaga M, Mori H, Yoshida S, Kawaguchi Y, Yakata Y, Murata K, Nagai K, Jinnai I Matsuo T, Kuriyama K, Tomonaga M : Recovery of hematopoietic progenitor cells in patients with severe aplastic anemia who obtained good clinical responses with a combination therapy of immunosuppressive agents and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. Int J Hematol 72 : 37 - 43, 2000
4. Otawa M, Kawanishi Y, Shoji N, Miyazawa K, Ohyashiki K : Comparative multi-color flow cytometric analysis of cell surface antigens in bone marrow hematopoietic progenitors between refractory anemia and aplastic anemia. Leukemia Research 24 : 359 - 366, 2000
5. Sashida G, Tauchi T, Katagiri T, Kuriya S, Ohyashiki K : Transformation of severe aplastic anaemia into myelodysplastic syndrome with monosomy 7: Monoclonal origin detected by the HUMARA gene analysis at the aplastic anaemia phase. Haematologica 85 : 665 - 666, 2000
6. Saitoh T, Karasawa M, Sakuraya M, Nakamura N, Tohma J, Shirakawa K, Matsushima T, Tsukamoto N, Nojima Y, Murakami H : Improvement of extrathymic T cell type of large granular lymphocyte (LGL) leukemia by cyclosporin A: the serum level of FAS ligand is a marker of LGL leukemia activity. Eur J Haematol 65 : 272 - 275, 2000
7. Tanaka H, Imamura N, Oguma N, Shintani T, Tanaka K, Hyodo H, Oda K, Kimura A : Acute myelogenous leukemia with *PIG-A* gene mutation evolved from aplastic anemia-paroxysmal nocturnal hemoglobinuria

syndrome. *Int J Hematol* 73 : 206 - 212, 2001

8. Kojima S, Nakao S, Tomonaga M, Hows J, Marsh J, Socie G, Bacigalupo A, Mizoguchi H : Consensus conference on the treatment of aplastic anemia. *Int J Hematol* 72 : 118 - 123, 2000
9. Kojima S, Hibi S, Kosaka Y, Yamamoto M, Tsuchida M, Mugishima H, Sugita K, Yabe H, Ohara A, Tsukimoto I : Immunosuppressive therapy using antithymocyte globulin, cyclosporine, and danazol with or without human granulocyte colony-stimulating factor in children with acquired aplastic anemia. *Blood* 96 : 2049 - 2054, 2000
10. Kondo M, Kudo K, Kimura H, Inaba J, Kato K, Kojima S, Matsuyama T, Horibe K : Real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of AML1-MTG8 fusion transcripts in t (8 ; 21)-positive acute myelogenous leukemia. *Leuk Res* 24 : 951 - 956, 2000
11. Kojima S, Horibe K, Inaba J, Yoshimi A, Takahashi Y, Kudo K, Kato K, Matsuyama T : Long-term outcome of acquired aplastic anaemia in children: comparison between immunosuppressive therapy and bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 111 : 321 - 328, 2000
12. Kudo K, Nagai H, Numata S, Ichihara M, Kinoshita T, Horibe K, Kato K, Matsuyama T, Kodera Y, Kojima S : Absence of mutations in the granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor gene in patients with myelodysplastic syndrome/acute myeloblastic leukemia occurring after treatment of aplastic anaemia with G-CSF. *Br J Haematol* 111 : 656 - 658, 2000
13. Oda A, Sawada K : Signal transduction in primary cultured human erythroid cells. *J Hematotherapy & Stem Cell Res* 9 : 417 - 423, 2000
14. Kashii Y, Kirito K, Tanaka M, Uchida M, Nishijima K, Ando T, Koizumi K, Endo T, Sawada K, Momoi M, Miura Y, Ozawa K, Komatsu N : A member of forkhead family transcription factor FKHRL1 is one of the downstream molecule of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt activation pathway in erythropoietin signal transduction. *Blood* 96 : 941 - 949, 2000
15. Nishio M, Oda A, Koizumi K, Sato I, Haseyama Y, Endo T, Takashima H, Tsutsumi A, Fujihara M, Ikebuchi K, Ikeda H, Koike T, Sawada K : Stem cell factor prevents Fas-mediated apoptosis of human erythroid precursor cells with Src-family kinase dependency. *Exp Hematol* 29 : 19 - 29, 2001
16. Nakao S : Role of T-lymphocytes in the pathophysiology of aplastic anemia. *Aplastic Anemia*, Cambridge University Press, UK : 41 - 57, 2000
17. Wang H, Chuhjo T, Yamazaki H, Shiobara S, Teramura M, Mizoguchi H, Nakao S : Relative increase of granulocytes with a paroxysmal nocturnal haemoglobinuria phenotype in aplastic anaemia patients : the high prevalence at diagnosis. *Eur J Haematol* : in press, 2001