

表2 PNH細胞増加 RA 症例の背景

Patient	Age	Gender	% of PNH cells	Presentation of HLA-DR 15 alleles	Therapy	Response	
1	O. A.	69	F	0.01	1502	Danazol	(+)
2	M. S.	58	F	0.016	NT	(-)	NE
3	M. M.	60	F	0.02	1501	Ubenimex	(+)
4	T. T.	51	M	0.04	1501/1502	(-)	NE
5	Y. H.	73	F	0.06	NT	(-)	(+)
6	D. S.	68	M	0.08	1502	CyA	(-)
7	I. T.	54	F	0.1	(-)	CyA	(+)
8	K. R.	17	F	0.12	1501	CyA	(+)
9	S. Y.	59	M	0.19	1501	CyA	(+)
10	K. K.	77	F	0.27	1501/1502	(-)	NE
11	Y. K.	79	F	0.3	1501	Vit K	(-)
12	T. H.	67	F	0.36	1502	Vit D	(+)
13	T. H.	60	F	0.37	NT	Metenolone	(+)
14	N. T.	48	M	0.56	NT	(-)	NE
15	T. K.	68	F	1.05	1502	CyA	(-)
16	M. T.	39	F	1.24	NT	(-)	NE
17	H. S.	40	M	1.92	NT	Oxymetholone	(+)
18	F. M.	61	F	2.4	1502	CyA	(+)

NT : not tested, NE : not evaluable

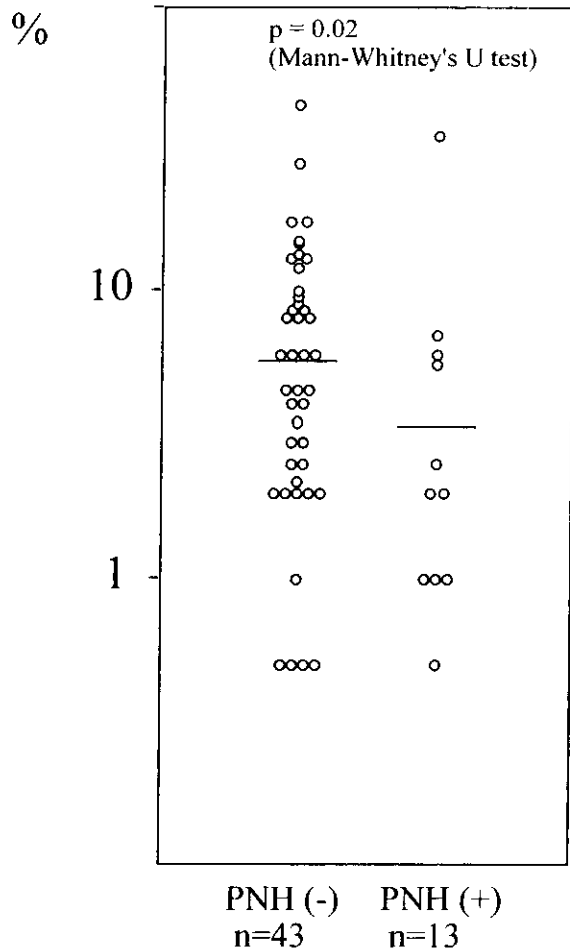


図2 偽ベルゲル核異常を持つ好中球の割合

期間中に PNH RA 群中の 4 例が AML に移行したが、PNH RA 群の中にはこのような進展例はなかった。PNH RA 群に認められた PNH 赤血球中には、MN→NN への変異赤血球はほとんどみられず、赤血球全体の中で GPA 遺伝子変異赤血球の占める割合は、PNH RA 群の方が PNH RA 群より低い傾向がみられた。

[考 察]

微小 PNH 細胞の存在は造血幹細胞の質的異常とは無関係であり、むしろ免疫学的造血抑制機序の存在を示唆する所見と考えられた。このため、骨髄不全患者において PNH 細胞を検出することは、適切な治療を選択する上で極めて重要と考えられる。

[文 献]

1. Wang H-B, et al, Eur J Haematol 66, 200, 2001

再生不良性貧血に対する
非血縁者間同種骨髄移植の治療成績

小島 勢二、稲葉 淳、吉見 礼見、
高橋 義行、渡辺 修大、工藤 寿子、
堀部 敬三、前田 尚子、加藤 剛二、
松山 孝治

(名古屋大学 成長発達医学/小児科)

(名古屋第1赤十字病院 小児医療センター)

【はじめに】

わが国においても、再生不良性貧血（再不貧）に対する非血縁ドナーからの移植症例数は、骨髄バンクの充実にともない増加が著しい。しかし欧米からの初期の報告では、再不貧に対する非血縁者間同種骨髄移植（UBMT）の治療成績は生着不全や急性 GVHD の頻度が高く、より優れた前治療法や急性 GVHD の予防法の開発が必要とされている。今回、当科が開発したサイクロフォスファミド（CY）、抗胸腺リンパ球グロブリン（ATG）、全身放射線照射（TBI）による前治療法の有用性の検討をおこなった。

【対象と方法】

1993年10月から2000年11月までの期間に両施設で非血縁者間同種骨髄移植（UBMT）を施行した20歳以下の小児再不貧16例を対象とした（表1）。全例が免疫抑制療法に不応で、頻回の輸血歴を有していた。診断から移植までの期間の中央値は63カ月（13-98カ月）で、10例が診断後2年以上経過していた。移植前治療は、CY（60mg/kg/日、day -4, -3）、ATG（2.5mg/kg/日、day -5～day -2）、TBI（2.5Gy×2/日、day -2, -1）でおこなった。11人はGVHD予防として短期メソトレキセートとシクロスポリンを投与し、最近の5人についてはシクロスポリンをタクロリムスに変更した。ドナーは血清学的には全例がHLA A、B、DR座が一致していたが、DNAタイピングでは4例が1座不一致であった。

【結 果】

全例において、すみやかな生着が得られた。好中球数が500/ μ lを超えた日数の中央値は14日（12-28日）であった。II-IV度の急性GVHDが5/16（31%）にみられたが、うち1例はEBウイルスリンパ増殖症（EBLPD）に対するドナーリン

表1 症例

症例	年齢	性	診断から移植 までの期間 (月)	移植前治療	輸血歴			DNAタイピング によるHLAミスマッチ
					赤血球 (U)	血小板 (回)	血小板輸注不応	
1	11	F	65	ATG(×2), HDMP, CSA, DAN, G-CSF	150	140	+	NT
2	3	M	15	ATG, CSA, DAN, G-CSF	30	61	-	NT
3	15	F	74	ATG(×2), HDMP, CSA, DAN, G-CSF	292	255	+	B
4	16	M	41	ATG, HDMP, CSA, DAN, G-CSF	170	126	-	-
5	12	M	61	ATG, HDMP, CSA, DAN, G-CSF	32	87	+	-
6	4	F	12	ATG, CSA, DAN, G-CSF	24	44	-	-
7	6	F	29	CSA, HDMP, G-CSF	32	108	-	-
8	6	M	34	ATG, CSA, DAN, G-CSF	19	120	-	-
9	8	M	8	ATG, CSA, DAN, G-CSF	10	30	-	-
10	19	F	66	ATG, CSA, DAN, G-CSF	34	21	-	-
11	11	F	14	ATG, HDMP, CSA, AND, G-CSF	8	20	-	-
12	8	F	23	ATG(×2), CSA, DAN, G-CSF	87	114	-	DRB1
13	5	M	24	ATG, CSA, G-CSF	9	0	-	-
14	17	M	88	ATG, CSA	150	5	-	A
15	13	F	82	ATG, CSA, HDMP, AND, G-CSF	31	46	-	B
16	15	M	30	ATG, HDMP, CSA, G-CSF	82	84	-	-

ATG, antithymocyte globulin; HDMP, high-dose methylprednisolone; CSA, cyclosporin;
DAN, danazol; AND, androgen; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; NT, not tested

表2 治療結果

症例	生着日	GVHD		合併症	移植後生存期間
		急性	慢性		
1	13	0	-		>98
2	28	0	-		>96
3	14	0	-		>89
4	12	0	-		>84
5	12	0	-		>82
6	14	2	-	網膜炎	>78
7	15	3	-		>71
8	22	0	-		>63
9	16	1	Limited	出血性膀胱炎	>51
10	13	2	Extensive	間質性肺炎, EBLPD, 麻疹肺炎	38
11	21	0	-	TMA	>34
12	14	3	-	TMA, ADEM	>34
13	21	0	-		>21
14	13	0	-		>21
15	14	2	-		>13
16	14	0	-		>13

CMV, cytomegalovirus; TMA, thrombotic microangiopathy;

ADEM, acute disseminated encephalomyelitis; EBV-LPD, Epstein-Barr Virus-lymphoproliferative disease

パル輸注 (DLI) 後に発症した。慢性 GVHD は 2 例に発症した。ウイルス感染症としてサイトメガロウイルス網膜炎、EBLPD、麻疹肺炎が各 1 例に発症した。他に 2 例が thrombotic microangiopathy (TMA) に罹患し、難治性下痢症が遷延した。慢性 GVHD の経過中に麻疹肺炎に罹患した 1 例が移植後 38 カ月で死亡した。他の 15 例は、移植後 13-98 カ月 (中央値: 63 カ月) になるが、全例がカルノフスキー 100% で生存中である。

[考案・結論]

これまでの欧米からの報告では、再不貧に対する UMBT の長期生存率は 30~50% にすぎない。しかし最近のロンドンの小児病院からの報告では、移植前治療として、CY、Campath、TBI を用いることにより、非血縁ドナーから移植した 8 例の再不貧小児の全例が生存しており、前治療法の改善により、移植成績が向上する可能性が示された²⁾。われわれの開発した CY、ATG、TBI 療法によっても全例にすみやかな生着が得られ、15/16 (94%) が長期生存しており、有望な治療法と考えられた。しかし ATG を含む前治療法は、

EBLPD をはじめ移植後ウイルス感染症の頻度が増加することが知られており、その対策が重要である³⁾。小児においては、TBI にともなう長期後遺症である低身長や内分泌障害は重大な問題であり、今後は TBI の線量を減らす方向での検討が必要である。

[参考文献]

1. Kojima S, et al, Br J Haematol 114, 706, 2001
2. Vassiliou GS, et al, Br J Haematol 114, 701, 2001
3. Hoshino Y, et al, Br J Haematol 115, 105, 2001

診断時骨髄に染色体異常を認めた小児再生不良性貧血の治療反応性に関する研究

月本 一郎、小原 明

(東邦大学第一小児科)

大賀 正一 (九州大学大学院成長発達医学)

小島 勢二 (名古屋大学大学院成長発達医学)

中畑 龍俊 (京都大学大学院発達小児科学)

[はじめに]

再生不良性貧血(再不貧)では、細胞遺伝学的異常が診断時に認められることはまれであり、特発性再不貧と“細胞遺伝学的異常を有する再不貧(aplastic anemia with cytogenetic abnormality)”を形態学的に鑑別することは難しい。近年、発作性夜間血色素尿症(PNH)、骨髄異形成症候群/急性骨髄性白血病(MDS/AML)などのlate clonal diseaseがIST療法をうけた長期follow-up中の患者において注目されるようになった。再不貧長期生存例の5~15%にMDS/AMLが発症するとされてきたが、このclonal異常が再不貧診断時に既に存在していたのか、治療関連によるものかは明らかでない。一方、ISTに反応する低形成MDS(不応性貧血:RA)も報告されている¹⁾。

小児再不貧の治療方針を確立するため、再不貧診断時の骨髄に染色体異常を有した症例を登録174例から抽出し治療反応性を検討した。

[対象と方法]

小児血液学会再不貧委員会にて追跡調査されている症例のうち、1994~1998年に登録された16歳未満の新規診断再不貧217例を対象とした。174例(80.2%)に診断時の細胞遺伝学的検査が施行された。このうち染色体異常が検出された10例に二次アンケート調査を行い、臨床検査成績、治療法、染色体異常の種類と頻度の変化、予後などを後方視的に検討した。再不貧の重症度は厚生省分類に従った。また、骨髄標本をセントラルレビューにて形態学的に再評価した。未刺激骨髄細胞を24~48hr培養しG-bandingによる核型分析を行った。

同じ構造異常か過剰染色体が2細胞以上に認められたもの、また同じ染色体欠失が3細胞異常に認められたものをclonal異常と定義した。図1に示すように1988年4月~1999年3月の登録655例中、染色体検査は439例(67%)に施行され、378例(86%)に核板が得られた。

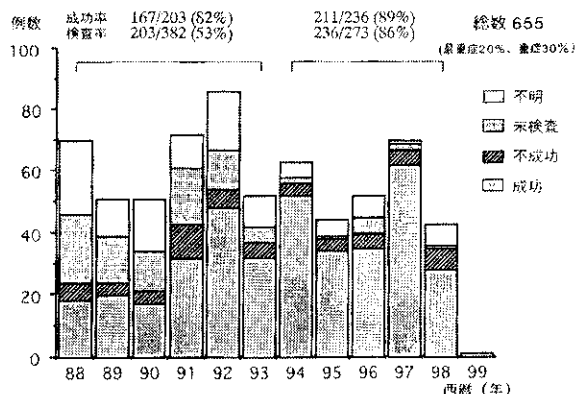


図1 再不貧診断時骨髄の染色体検査実施状況

[結果]

染色体異常の種類と頻度 染色体異常は174例中Robertson転座1例(症例10)を除く9例(5.2%)に検出された(表1)。部分欠失が7例にみられ、6番染色体が2例、16番が2例、5番、13番および20番が各1例であった。1例は9番付加で、-7は1例であった。症例6と症例8は各1細胞の異常であった。従って、分析細胞が20細胞以上で、細胞遺伝学的なcloneの定義を満たしたものは7症例であった(4.0%)であった。

診断時所見 10例の診断時の所見を表1に示す。年齢は1~14歳で平均8.3歳、男女比は8:2で女児が優位。全例に初診時溶血なく、家族歴も特記すべきことなし。Robertson転座を除く9例を非移植で寛解した6例と移植を必要とした3例と比較したとき、重症度、血液一般検査、骨髄のリンパ球比率に差はなかった。しかし、骨髄M/E比は非移植群が0.95で移植群の2.36よりも有意に低値であった。非移植群は全例1.5以上であった。

治療反応性 移植を必要としなかった6例のうち、症例3は9か月後に自然寛解した。Clone異常を有する7症例のうち、ATG+CsA療法に反応した4例(Pt 1, 2, 4, 5)と不応で移植を受けた2例

表1 Clinical characteristics of childhood aplastic anemia with chromosomal aberration at diagnosis

Pt	Karyotype	Analysed cells*	Grade	at diagnosis							IST	Response	Chromosomal abnormality after IST	BMT (days after Dx)	Observation (days)		
				Hb g/dl	MCV fL	Pl x10 ⁹ /dl	WBC x10 ⁹ /dl	Neut %	NCC x10 ⁹ /dl	BMLy %						M/E ratio	
1	46,XX,del(5)(q13q23)	[2/40]	14/F	m	7.7	108	2.6	2400	624	5.0	30.8	1.2	ALG,CsA,mPSL,GCSF	good (3m)	remain		1049+
2	46,XY,del(6)(p21)	[19/20]	11/M	m	9.9	104	2.5	2900	609	6.0	55.5	0.7	ALG,CsA,mPSL,GCSF,DZ	good (6m)	remain		2120+
3	46,XX,del(6)(p23)	[26/30]	13/F	m	11.9	97	7.1	3000	810	1.7	16.5	1.5	no	spont.(9m)	disappear		700+
4	46,XX,-7	[1/20]	7/F	m	6.9	92	1.9	3300	297	4.2	68.8	0.9	ALG,CsA,PSL	good (15m)	disappear		1899+
	46,XX,-18	[1/20]															
5	46,XX,add(9)(p24)	[3/8]	11/F	s	4.0	113	1.6	2200	792	6.6	59.2	0.8	ALG,CsA,PSL,GCSF,DZ	good (3m)	disappear		1904+
	48,XX,add(9)(p24),+16,+18	[1/8]															
6	46,XY,del(16)	[1/16]	5/F	m	7.9	95	3.3	4760	476	8.5	20.5	0.6	CsA,mPSL,PSL,EPO,IVIG,GCSF,DZ,AD	good (6m)	disappear		2319+
7	46,XX,del(13)(q12q14)	[7/20]	13/F	vs	5.3	90	0.6	2300	92	1.6	93.6	2.2	AT,G2,CsA,mPSL,PSL,GCSF,DZ	poor	disappear	u-BMT (596)	756
8	46,XY,del(16)(q22)	[1/6]	17/M	s	5.1	96	1.1	4500	585	2.7	49.2	3.0	ALG,CsA	no	disappear	u-BMT (548)	1211+
9	46,XY,del(20)(q1?)	[5/20]	5/F	m	9.3	104	3.5	3600	792	3.2	38.0	1.9	ALG,CsA,mPSL,PSL,GCSF	poor	transformed	u-BMT (782)	1895+
10	45,XY,der(14;15)(q10q10)	[18/18]	3/F	vs	8.1	88	0.2	1800	0	1.2	82.0	0.0	GCSF	Robertsonian		u-BMT (309)	1919+

ALG: anti-lymphocyte globulin, CsA: cyclosporin-A, PSL: prednisolone, mPSL: methyl-prednisolone pulse therapy, EPO: erythropoietin, G-CSF: granulocyte-colony stimulating factor, DZ: danazol, IVIG: intravenous γ -globulin, IST: immunosuppressive therapy, Hb: hemoglobin, MCV: mean corpuscular volume, Plt: platelet, WBC: white blood cell, Neut: neutrophil, NCC: nucleated cell count, BMLy: bone marrow lymphocyte, M/E: myeloid/erythroid, m: moderate, s: severe, vs: very severe, BMT: bone marrow transplantation, u-BMT: BMT from unrelated donor, Dx: diagnosis
* The parenthesis represents the number of cells having chromosomal abnormality per the analysed cell counts.

(Pt 7, 9) の臨床経過を図2Aに示す。症例1は初回のISTに速やかに反応後、30% (6/20) の染色体異常を残したまま無治療寛解を維持している。症例2は再不貧の診断時にほとんどの細胞がdel(6)(p21)を有していたが血液学的には軽症を維持していた。39か月後に重症化しISTを受け6か月以内に反応し軽症となった。しかし、染色体異

常は40%に残り、重症度と相関しなかった。症例4はIST3か月以降には-7、+18ともに消失し12か月に軽症再不貧となった。血小板が少ないため経口プレドニゾロン(PSL)のみ続けている。症例5はISTに反応し染色体異常も消失、付加的異常が8%に一度出現したものの消失し血液学的にも寛解無治療である。

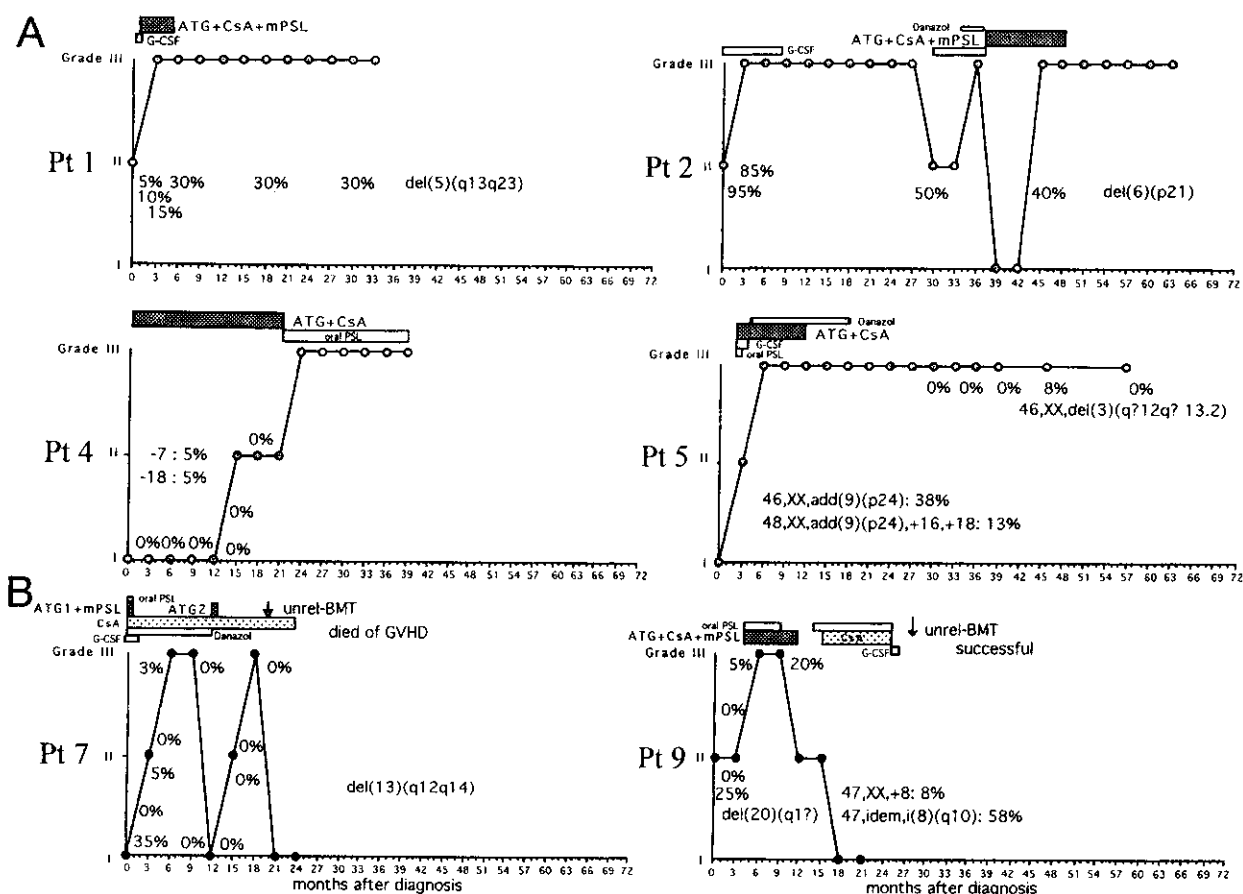


図2 ATG+CsA療法に対する反応性 A: 反応群 B: 不応群

一方、IST 不応の 2 例はいずれも一時的に反応したものの重症化し非血縁者間骨髄移植 (BMT) をうけた (図 2B)。症例 7 は初回 ATG+CsA 療法後、血液学的また細胞遺伝学的にも一旦寛解したが再発し、2 回目の ATG も無効であった。発症より 596 日目に BMT をうけ day160 に腸管 GVHD にて死亡した。症例 9 は診断時に del (20) を認め、IST にて一旦軽快したが再発しその後 +8、idem、i(8)(q10) の付加的異常が出現した。BMT をうけ生着後、現在無治療寛解である。

骨髄形態のセントラルレビュー 症例 1、2、および 9 には多核赤芽球や大型好中球などの異型細胞をわずかに認めたが、再不貧の診断を否定するものではなかった。IST 反応例 (症例 2) と不応例 (症例 9) の初回 IST 前後の骨髄を経時的に観察したが、いずれも染色体異常の頻度、細胞密度および形態学的変化に相関なく、低形成が進行していた。MDS/AML 移行例はなかった。

[考案と結論]

再不貧診断時骨髄の染色体異常の頻度は 4% ~ 6.7% と報告されている^{2,3)}。今回の小児例も 4% でこれまでの成人例とほぼ同等であった (表 2)。

表 2 初診時骨髄に染色体異常 (clonal) を有する再不貧の頻度

頻度 (%)	異常症例数 / 核型解析症例数	対象	文献
4.0	7 / 176	成人	4
15.9	11 / 69	成人	5
21.4	3 / 14	成人	6
4.0	4 / 174	小児	本研究

診断時骨髄に染色体異常を有する AA は、これまでに 22 例が報告されている。小児例はなく男女比は 11 : 8 で、付加的異常が多く、+6 が 9 例 41%、+8 が 4 例 18% で -7 は 1 例である。私たちの症例とあわせると半数の 12 例が IST に反応している。反応不良群には +6 が多いこと (p=0.03) 以外に初診時の予測因子はない。反応例でも今回の症例と同様に染色体異常が残っているものがある。近年、IST により血液学的にも細胞遺伝学的にも寛解した RA の報告が散見される^{2,3)}。今回の解析から、診断時骨髄に染色体異常のある再不貧には HLA 一致同胞がいなければ、1st line として IST を試してもよいことが示唆される。さらに、前方視的解析が必要である。

[文 献]

1. Ohara A, et al, Blood 90, 1009, 1997
2. Jonasova A, et al, Br J Haematol 100, 304, 1998
3. Molldrem JJ, et al, Br J Haematol 99, 699, 1997
4. Appelbaum F, et al, Exp Hematol 15, 1134, 1987
5. Mikhailova N, et al, Haematologica 81:418, 1996
6. Keung YK, et al, Am J Hematol 66, 167, 2001

再生不良性貧血における 染色体不安定性の解析

別所 正美、矢ヶ崎史治、松田 晃

(埼玉医科大学、第1内科)

【はじめに】

再生不良性貧血 (AA) における clonal evolution では、骨髄異形性症候群 (MDS) や急性骨髄性白血病 (AML) への移行例で -7 や +8 などの数的染色体異常を高頻度に認める。我々は AA における潜在的な -7 minor clone の存在と clonal evolution との関連性を Two-color FISH 法を用いて検討してきた。その結果、AA 初診時に存在する -7 minor clone は早期に clonal evolution するものと、治療後に測定感度以下に消退するものがあることが明らかになった。前者では -7 が clonal disease の early event である可能性を示唆するが、本質的に低形成性 MDS との異同が問題となる。後者では治療経過中に上昇傾向を示す症例もあり、経過観察が重要と考えられた。今回我々は後者の数的染色体異常の発生原因として、染色体分配異常を引き起こす染色体不安定性 (CIS) が AA で亢進している可能性を考え、CIS を示唆すると考えられる premature chromatid separation (PCS) の分裂期染色体における出現頻度を検討した。

【対象と方法】

対象は健常者コントロール 6 例、AA 初診時 15 例、治療後 3 例。患者骨髄細胞をコルセミド (0.01 μ g/ml) 添加培養液で 18 時間培養し分裂前中期染色体における PCS の発生比率を CEP7/D7S486 (VYSIS, IL, USA) を用い FISH 法により検討した。分裂前中期染色体を少なくとも 20 個以上観察し、完全に姉妹染色体が分離しているものを PCS としてカウントした。

【結 果】

PCS の発生比率は AA 治療前 (n=15) で 18.8 \pm

10.9% (median \pm SD) (range : 0-37.4) であり健常者骨髄 (n=6) では 12.1 \pm 1.9% (median \pm SD) (range : 9-14.5) であった。両群間に有意差は認められなかったが (p=0.087; Mann-Whitney U)、AA では PCS の発生比率が高い症例 (PCS > 20%) が 53% (8/15) に認められることから、AA の多くの例では CIS が亢進していると考えられた (図 1)。

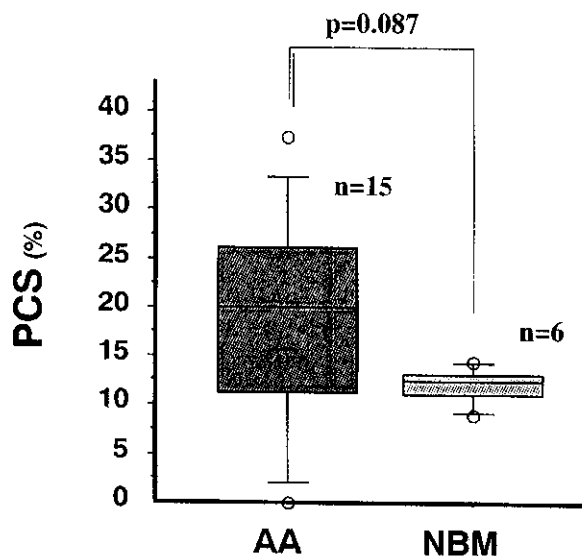


図 1 AA および健常者の骨髄細胞における PCS の頻度分布

また PCS の発生比率は、1 例であった軽症群を除き、重症と中等症の両群間に差は認めなかった。AA で認められた典型的 PCS 像を図 2 に示す。さらに個々の症例の治療経過と PCS の推移を検討すると、初診時に PCS 高値を示した 2 例 (37.4、27.0%) はいずれも IST 反応後に 5.0% に低下しており、うち 1 例は AA 再燃時に PCS の再上昇

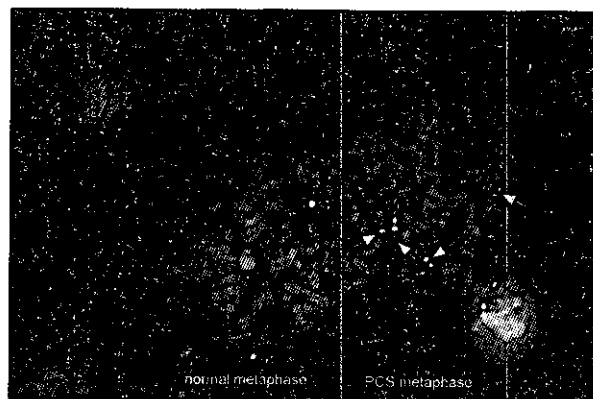


図 2 Two color FISH 法による分裂期染色体の解析例
↑ は分離した姉妹染色体を示す

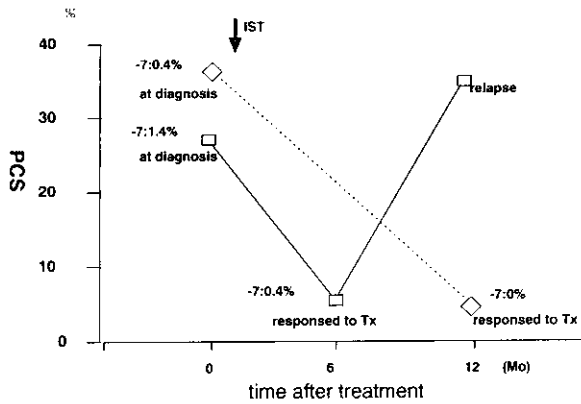


図3 AAにおけるIST後のPCSと-7の変化

(34.5%)を認めた(図3)。また初診時PCSが0%であった症例ではISTに全く反応が認められず、PCSはAAの病態の違いや変化を反映している可能性があると考えられた。

さらに-7 minor cloneとPCSの関係(図4)では、分裂像が得られず早期に病態移行した小児例を除いて、-7陽性症例(≥1%)では、いずれもPCSは20%以上と高値を示していた。

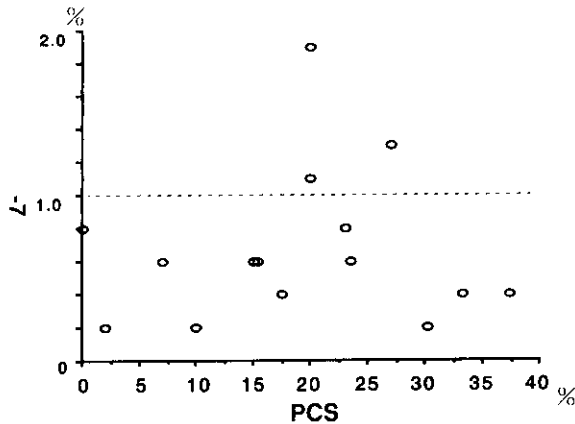


図4 -7 minor clone と PCS の相関

[考察・結論]

今日まで、癌細胞における数的染色体異常は癌化の結果生ずる染色体不安定性に起因してり、二次的なものと考えられてきたが、近年、mitotic check point 遺伝子である MAD2の haplo-insufficiency によって check point が破綻し、ICS により減数性染色体異常が発生すること、マウスの実験では長期の潜伏後に肺癌が発生することが報告され、注目されている。また mitotic check point 機構に異常が発生すると、紡錘糸阻害剤存在

下でも、cohesin の分解により姉妹染色体の早期解離現象 PCS が発生する。また Kajii らによって PCS 家系よりホモ接合体と考えられる 2 児が出生し、1 例に Wilms 腫瘍が発生したことも報告され、CIS が発癌の initiation になりうることを示唆されている。

今回の検討では、AA の半数例で PCS 高値を示し、治療反応例では PCS が低下することから、治療抵抗性 AA では CIS の亢進した状態が持続し、clonal evolution のリスクが高まると予想される。さらに治療反応群においても、PCS 高値が持続する症例も存在し注意が必要である。さらに -7 minor clone 陽性群では全例で PCS>20%であることから、これらの -7 minor clone は CIS によって生じ、AA における免疫学的選択圧の負荷により expand した innocent clone とも考えられる。

以上より、今後さらに AA における CIS の亢進が clonal evolution に与える影響を解明する必要があると考えられた。

[文 献]

1. Michel LS, et al, Nature, 409, 355, 2001
2. Kajii T, et al, Am J Med Genet, 78, 245, 1998

再生不良性貧血の末梢血ヘルパー T 細胞の Th1/2 バランス

浦部 晶夫、臼杵 憲祐、壺岐 聖子

(NTT 関東病院血液内科)

〔はじめに〕

再生不良性貧血では免疫抑制療法が有効であることから、自己免疫の関与が考えられている¹⁾。ヘルパー T 細胞は Th0・Th1・Th2 のサブクラスに分けられ、Th1/2 バランスの不均衡が自己免疫疾患で大きな役割を果たしていることが示唆されている²⁾。われわれは肝炎後再生不良性貧血 1 例を含む 10 例の再生不良性貧血患者のヘルパー T 細胞のサブクラスを解析した。

〔対象と方法〕

症例は 7 例が男性で、3 例は女性であり、平均年齢は 44.2 才であった (18~75 才)。6 例は未治療例であり、残り 4 例は再燃例または免疫抑制療法に抵抗性の症例であった。再生不良性貧血の重症度は、重症 6 例、中等症 3 例、軽症 1 例であった。

末梢血のリンパ球サブセットは、CD3、4、8、

20 と HLA-DR に対するモノクローナル抗体を用いて FACS で解析した。さらに、末梢血の CD4 陽性細胞を Brefeldin-A 存在下に TPA と Ionomycin で刺激し、細胞膜透過処理後に INF- γ と IL-4 に対する抗体を用いて FACS で末梢血ヘルパー T 細胞のサブクラスを解析した。

〔結 果〕

図に示すように T 細胞 (CD3⁺ 細胞) は、未治療例 3 例 (症例 2、3、6) と再燃例 1 例 (症例 10) の 4 例で増加していた。再生不良性貧血 10 例全体 (平均 \pm 標準偏差; $88.6 \pm 5.2\%$) では T 細胞比率はわずかに増加していた (正常値; 66~89%)。

B 細胞 (CD20⁺ 細胞) は、未治療例 2 例 (症例 2、3) でわずかに減少しており、未治療例 1 例 (症例 4) と再燃例 2 例 (症例 7、8) の 3 例でわずかに増加していた。再生不良性貧血 10 例全体 ($9.0 \pm 5.1\%$) では B 細胞比率は正常範囲内であった (4~13%)。

ヘルパー T 細胞 (CD4⁺ 細胞) は、未治療例 2 例 (症例 2、3) で増加しており、未治療例 2 例 (症例 1、5) と再燃例 2 例 (症例 8、9) の 4 例で減少していた。再生不良性貧血 10 例全体 ($35.7 \pm 22.8\%$) ではヘルパー T 細胞比率は正常範囲内であった (25~56%)。活性化ヘルパー T 細胞

表 症例のプロフィール

症例	年齢	性	診断	重症度	白血球 (/ μ l)	好中球 (/ μ l)	Hb (g/dl)	網赤血球 ($\times 10^4$ / μ l)	血小板 ($\times 10^4$ / μ l)
1	28	男	未	重症 肝炎後	4000*	3600*	9.3	5.7	3.4
2	74	女	未	重症	1400	105	8.3	1.1	0.7
3	22	女	未	重症	1600	80	8.4	0.3	0.7
4	20	男	未	重症	900	243	7.1	0.5	1.5
5	75	男	未	中等症	2500	1425	7.2	5.1	4.4
6	44	男	未	中等症	4700	1998	5.8	4.4	3.1
7	53	男	再	重症	800	304	5.6	0.2	2.2
8	18	男	再	重症	5800	4930	7.3	1.7	0.7
9	37	男	再	中等症	3100	2000	6.0	3.2	2.4
10	71	女	再	軽症	2300	13111	1.4	7.7	2.3

* G-CSF 投与中；未、未治療例；再、再燃例または免疫抑制療法抵抗性例。

(CD4⁺/HLA-DR⁺細胞)は、未治療例2例(症例1、5)と再燃例1例(症例10)の3例でわずかに増加していた。再生不良性貧血10例全体(5.2±3.1%)ではヘルパーT細胞比率は正常範囲内であった(≤7%)。

サプレッサーT細胞(CD8⁺細胞)は、未治療例1例(症例2)でわずかに減少し、未治療例3例(症例1、5、6)と再燃例1例(症例9)の4例で増加していた。再生不良性貧血10例全体(40.7±15.0%)ではサプレッサーT細胞比率は正常範囲内であった(17~44%)。活性化サプレッサーT細胞(CD8⁺/HLA-DR⁺細胞)は、未治療例3例(症例1、3、5)で増加していた。再生不良性貧血10例全体(15.4±14.4%)では活性化サプレッサーT細胞比率はわずかに増加していた(<14%)。

CD4/8比は、未治療例1例(症例2)で上昇し、未治療例2例(症例1、5)と再燃例2例(症例8、9)の4例で低下していた。再生不良性貧血10例全体(1.25±1.33)ではCD4/8比は正常範囲内であった(0.6~2.9)。

Th1細胞(INF-γ⁺/IL-4⁻細胞)は、未治療例1例(症例5)と再燃例2例(症例8、9)の3例で増加し、未治療例2例(症例1、2)で減少していた。再生不良性貧血10例全体(25.0±16.0%)ではTh1細胞比率は正常範囲内であった(8.9~39.1%)。

Th2細胞(INF-γ⁻/IL-4⁺細胞)は、未治療例1例(症例5)で増加し、未治療例1例(症例1)で減少していた。再生不良性貧血10例全体(2.7±2.4%)ではTh2細胞比率は正常範囲内であった(0.6~4.3%)。

Th1/2比は、未治療例1例(症例1)と再燃例1例(症例9)の2例で著明に上昇していた。再生不良性貧血10例全体(17.0±18.6)ではTh1/2比は正常範囲内であった(1.4~20.5)。

[考案・結論]

Th1細胞比率の増加は3例(症例5、8、9)で認められた。そのうちの1例(症例9)はTh1/2比の上昇を示した。その他の1例(症例1)も

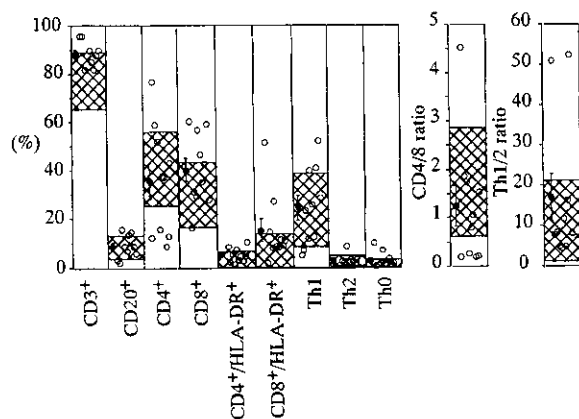


図 再生不良性貧血におけるリンパ球サブセット。白丸はそれぞれの症例での値を示し、黒丸と棒は再生不良性貧血10例の平均値と標準偏差を示し、網線部分は正常範囲を示す。

Th1/2比の上昇を示した。一方、Th2細胞比率の増加は1例(症例2)のみに認め、その症例ではTh1細胞比率の増加も認めTh1/2比は正常範囲内であった。まとめると、Th1細胞比率またはTh1/2比の増加は再生不良性貧血10例中4例で認められた。これらの結果から、再生不良性貧血の病態生理においてTh1細胞が重要な役割を果たしていることが示唆され、Th1細胞は臓器特異的な自己免疫疾患の発症に関与していることと合致する結果であった²⁾。

一方、約半数の症例ではTh1/2バランスの不均衡はみられなかった。Maciejewskiらは再生不良性貧血において活性化CD8⁺細胞比率の増加は末梢血よりも骨髄でよくみられることを報告している³⁾。さらに、再生不良性貧血におけるINF-γ発現が末梢血と骨髄で大きく異なることから、再生不良性貧血の病変の主座は末梢血ではなく骨髄に限定されていると考えられている⁴⁾。そこで、再生不良性貧血ではTh1/2バランスの不均衡が自己免疫の標的臓器である骨髄において末梢血よりも頻度が高く見出される可能性を今後、検討する必要がある。

[文 献]

1. Young NS, Semin Hematol 37, 3, 2000
2. Liblau RS, et al, Immunol Today 16, 34, 1995
3. Maciejewski JP, et al, Exp Hematol 22, 1102, 1994
4. Nakao, S, et al, Blood 79, 2532, 1992

難治性貧血に合併したNK/T細胞性
顆粒リンパ球増多症

唐沢 正光 (群馬大学輸血部)
三井 健揮、横濱 章彦、塚本 憲史
野島 美久 (群馬大学第3内科)

[はじめに]

NK (natural killer) 受容体と T 細胞受容体 (TCR) をあわせ持つ NK/T 細胞は形態的に細胞質に顆粒を有する顆粒リンパ球 (LGL) として同定される。このような LGL がクローン性に増殖する疾患が知られており、顆粒リンパ球増多症 (GLPD; Granular lymphocyte proliferative disorders) または顆粒リンパ球性白血病と称される。われわれは難治性貧血に高度な LGL 増多を示す症例を経験した。増多 LGL の性状を明らかにするため、フローサイトメトリーによる詳細な表面形質および LGL 細胞の TCRVbeta 使用頻度とクローン性の検討を行った。

[対象・方法と結果]

1. 検査成績

難治性貧血に合併したNK/T細胞性顆粒リンパ球増多症8例(男性4例、女性4例)の治療前検査成績を表1に示した。年齢の中央値は66歳、血液所見の平均値±SDはヘモグロビン濃度; 8.2±2.1 g/dl、血小板数; 29.0±23.9万/μl、白血球数; 7288±5130/μl、好中球; 28.0±11.2%、リンパ球; 64.6±12.9%、顆粒リンパ球; 49.4±18.9% (全白血球に対する比率)であった。全症例で好中球の絶対数の減少または比率の低下を認め、3例が血小板減少を示した。

表 1

	Age	Hb (g/dl)	Plt (x10 ⁴ /μl)	WBC (x10 ³ /μl)	Neu (%)	Lym (%)	LGL (%)
Case1-1	44	5.2	38.3	3000	49.0	47.5	33.5
Case1-2	49	5.9	47.4	6400	30.5	62.0	55.5
Case2-1	68	7.3	46.7	4900	26.5	64.5	48.0
Case2-2	68	8.6	64.9	12800	23.5	66.5	50.5
Case2-3	64	11.2	24.2	17100	13.0	84.5	69.5
Case3-1	74	8.8	4.2	7300	16.5	81.5	79.5
Case3-2	26	8.1	3.9	2300	35.5	56.5	22.5
Case3-3	67	10.8	2.6	4500	29.5	53.5	36.0

2. 表面形質

a. T/NK 細胞マーカー

溶血法により末梢血白血球浮遊液を作成し、side scatter (SSC) および CD45 (PerCP 標識) によりリンパ球にゲートをかけ、FITC と PE 標識抗体による 3 color で各症例の細胞表面形質を解析した (表2a)。まず、CD16と CD56の陽性度によりCD16陽性・CD56陰性/弱陽性群と CD16陰性/弱陽性・CD56陽性群に大別可能で、前者はさらに T 細胞受容体 (TCR) により TCR-gamma/delta (TCRgd) および TCR-alpha/beta (TCRab) の 2 群に分類できた。1 例を除き、すべての症例の CD3 陽性 CD16/CD56陽性細胞は CD4 陰性 CD8 陽性を示したが、Case3-1 のみ CD4/CD8 ダブルポジティブ (DP) と CD8 単独陽性の 2 種類の細胞増多を認めた (CD4 と CD8 陽性細胞の総和が100%を超えている)。このDP細胞のCD8はCD8alpha/alphaホモダイマーを示した。TCRgd 陽性 2 例中 1 例のみ検索し得たが同様にホモダイマーで、ほかの TCRab 陽性例は CD8alpha/beta ヘテロダイマーであった。

b. NK受容体

上記の CD45ゲートにより定義されたリンパ球のNK受容体の発現を検討した (表2b)。Case1-1 および Case1-2 は TCRgd FITC、Case2-2は CD16

表 2

a	T/NK cell marker					
	CD3	TCRgd	CD4	CD8	CD16	CD56
A. CD16+56- [TCRgd]						
Case1-1	78.0	52.9	21.3	63.8	60.5	10.2
Case1-2	97.0	34.7	35.1	61.4	42.8	2.5
[TCRab]						
Case2-1	97.2	0.4	24.6	71.7	64	0.8
Case2-2	99.8	0.1	7.9	91.4	92.2	1.6
Case2-3	97.9	5.7	10.3	83.1	78.5	8.4
B. CD16low 56+						
Case3-1	87.2	0.6	63.4	78.5	4.3	76.9
Case3-2	86.1	4.1	34.6	53.5	9.1	34.0
Case3-3	97.8	1.7	39.1	62.1	14.6	45.1

b	NK receptor				
	CD158a	CD158b	NKB1	CD94	CD161
A. CD16+56- [TCRgd]					
Case1-1	0.6 ^{*1}	2.9 ^{*1}	0.3 ^{*1}	79.4 ^{*1}	44.8 ^{*1}
Case1-2	7.1 ^{*1}	5.8 ^{*1}	0.6 ^{*1}	58.2 ^{*1}	68.9 ^{*1}
[TCRab]					
Case2-1	ND	ND	ND	ND	ND
Case2-2	0.5 ^{*2}	40.7 ^{*2}	0.1 ^{*2}	81.0 ^{*2}	3.2 ^{*2}
Case2-3	0.5	1.4	0.2	22.4	38.8
B. CD16low 56+					
Case3-1	0.8	67.0	0.8	10.8	5.4
Case3-2	1.2	4.0	24.4	34.4	15.3
Case3-3	0.1	14.5	0.5	9.4	10.2

TCRgd; TCR gamma/delta, TCRab; TCR alpha/beta, ND; not done
*1; percentage in TCRgd+cells, *2; percentage in CD16+cells

FITC 陽性細胞中の各 NK 受容体陽性率で、ほかはすべて CD3FITC 陽性細胞中の陽性率を示す。CD158a (KIR2D、p58.1)、CD158b (KIR2D、p58.2)、NKB1 (KIR3D、p70) などの免疫グロブリンタイプと比較し、CD94や CD161 (NKR-P1) などのレクチンタイプ NK 受容体の陽性頻度が高い傾向を示した。Case3-3 を除くすべての症例が少なくとも 1 つ以上の NK 受容体を擁し、CD16 および CD56 以外にも NK 細胞の性状を有することが明らかとなった。また分化度の面では NK 受容体陽性であることから成熟した NK/T 細胞の増殖症であることを示している。

3. CDR3 size spectratyping による TCRVbeta repertoire 遺伝子の解析

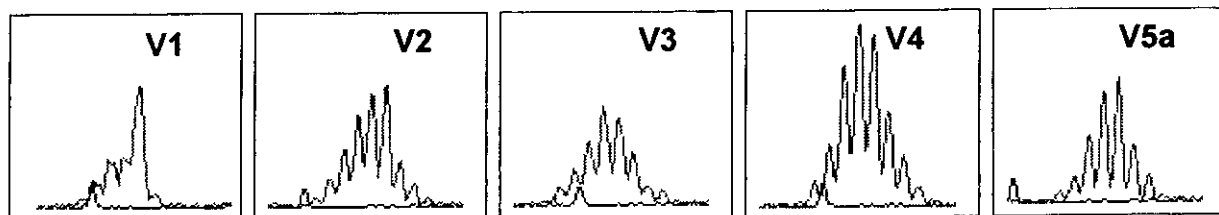
比重遠心法により末梢血より分離した単核細胞より RNA を抽出し、ランダムプライマーにより

cDNA を合成した。未標識の各 23 種の TCRVbeta サブファミリー特異的 Forward primer と FAM で 5' 領域を蛍光標識した 3' Reverse primer とで TCRVbeta 遺伝子の増幅を行った。一本鎖とした試料を ABI PRISM 310 によりキャピラリー電気泳動し、Genescan、Genotyper ソフトウェアにより解析した。代表的な結果の一部を図 1 に示した。上段の正常コントロールはほぼ多クローン性を示すが、下段の Case2-3 は Vbeta1 にクローン性パターンを認め、ほかの repertoire は顕著に抑制されている。表 3 に TCRVbeta repertoire の結果の要約を示した。Case3-3 が単クローンなバンドを欠く以外は、単独または複数のクローン性の変化を認めた。

4. 抗 TCRVbeta 特異抗体による解析

上記の TCRVbeta repertoire 解析の結果より、抗

Normal control



Case 2-3

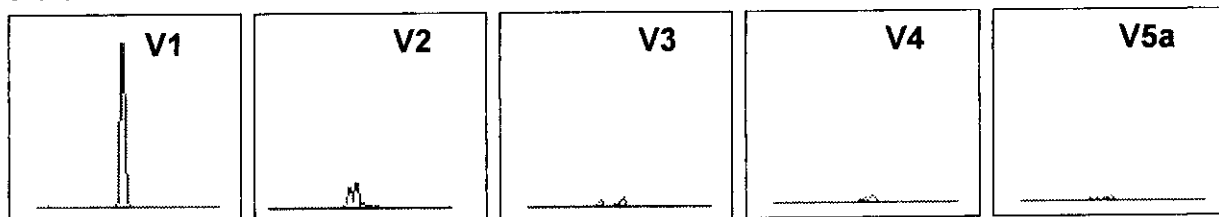


図 1

表 3

	Clonal TCRVbeta gene subfamily	Positive percentage of TCRVbeta monoclonal antibodies					
		Vbeta1	Vbeta2	Vbeta3	Vbeta5.2	Vbeta13.1	Vbeta22
Case2-1	Vbeta13, and Vbeta22	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Case2-2	Vbeta3	0.2 ^{*1}	0.2 ^{*1}	7.3 ^{*1}	0.1 ^{*1}	0.1 ^{*1}	0.2 ^{*1}
Case2-3	Vbeta1, and Vbeta22	0.2 ^{*1}	0.2 ^{*1}	0.8 ^{*1}	1.9 ^{*1}	0.1 ^{*1}	99.0 ^{*1}
Case3-1	Vbeta2, Vbeta5b, Vbeta1, and Vbeta22	0.7 ^{*2}	99.5 ^{*2}	0.1 ^{*2}	0.0 ^{*2}	0.0 ^{*2}	0.1 ^{*2}
Case3-2	Vbeta22	1.3 ^{*3}	0.3 ^{*3}	8.3 ^{*3}	0.2 ^{*3}	0.2 ^{*3}	36.3 ^{*3}
Case3-3	poly	2.2 ^{*4}	2.7 ^{*4}	7.7 ^{*4}	0.4 ^{*4}	2.1 ^{*4}	37.0 ^{*4}
		3.7 ^{*4}	0.8 ^{*4}	13.1 ^{*4}	0.3 ^{*4}	3.7 ^{*4}	0.8 ^{*4}

*1; percentage in CD16⁺ cells, *2; percentage in CD4⁺CD8⁺ cells
*3; percentage in CD4⁺CD8⁺ cells, *4; percentage in CD3⁺CD8⁺ cells

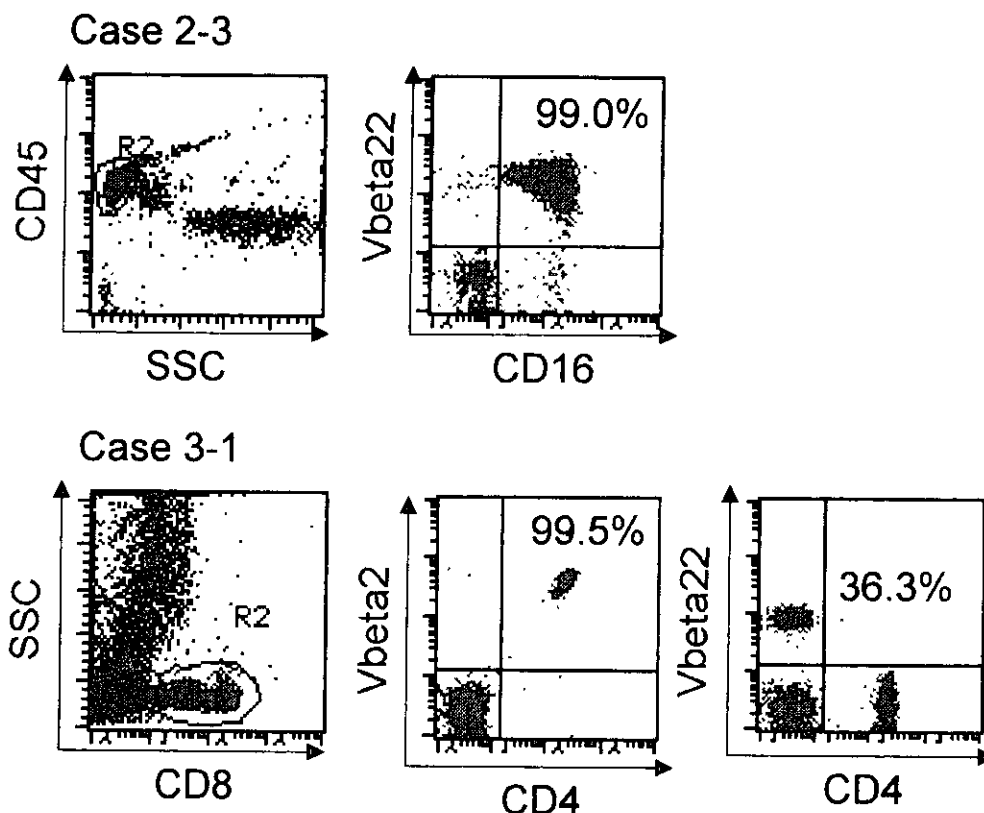


図 2

Vbeta1、2、3、5.2、13.1、22抗体をもちいて TCRab 陽性症例の細胞表面 TCRVbeta の発現を検討した。代表的な結果の一部を図 2 に示した。上段は Case2-3 の結果で、CD45PerCP と SSC で定義したリンパ球分画の陽性率を CD16FITC と各種 Vbeta PE 抗体により検討した。CD16陽性細胞中 (4 分画の右上下) の Vbeta22 の陽性率 (右上) は 99.0%であったが、repertoire 解析で同様にクローン性を示した Vbeta1 抗体の陽性率は 0.2%にすぎなかった。下段は Case3-1 の結果で、CD8PerCP と SSC で定義した CD8 陽性細胞分画を CD4FITC 抗体により検討した。CD4/CD8 ダブルポジティブ細胞 (4 分画の右上下) における Vbeta2 の陽性率は 99.5%であった。CD4 陰性 CD8 単独陽性細胞の結果を右端に示した。CD4FITC 陰性細胞中 (4 分画の左上下) の Vbeta22 の陽性率は 36.3%であった。Case2-3 の結果と同様、repertoire 解析でクローン性を示した残りの Vbeta5b、Vbeta13.1 に対応した抗体に反応する細胞の増加は認められなかった (表 3)。

[考 察]

難治性貧血に合併した NK/T 細胞性顆粒リンパ球増多症 8 例の表面形質を解析した。CD16 陽性・CD56 陰性/弱陽性群と CD16 陰性/弱陽性・CD56 陽性群に、また前者は TCRab 型と TCRgd 型に分類された。検索し得た 7 例中 6 例では、いずれかの NK 細胞受容体 (CD158a、CD158b、NKB1、CD161、CD94) が陽性であった。TCRab 陽性例の T 細胞受容体遺伝子の CDR3 size spectratyping 解析では 6 例中 3 症例が複数のクローナルバンドを認めたが、抗 TCRVbeta 抗体解析では多くの症例が単一の抗体陽性細胞増殖を示した。

[文 献]

1. Kluijn-Nelemans JC, et al. Blood, 87, 3795, 1996
2. Langerak AW, et al. Blood 98, 165, 2001

Fanconi 貧血蛋白 FANCA の 患者由来変異蛋白の機能解析

浅野 茂隆 (東京大学医科学研究所附属病院・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)

足立 大樹 (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、先天性の骨髄不全症候群のひとつで、小児期に発症し、その後 MDS/AML への移行を高率に示す常染色体劣性遺伝疾患である。その臨床表現型は軽症から重症まできわめて幅が広いことで知られる。FA の細胞は、低濃度の mitomycin C (MMC) など DNA 架橋剤の存在下に染色体異常と細胞死を起こすことを特徴とし、これは標準的な診断法として利用されている。

FA は 8 群 (A, B, C, D1, D2, E, F, G 群) 以上の遺伝的に異なるグループに分類され、このうち 6 遺伝子 (FANCA, C, D2, E, F, G) がこれまでにクローニングされている。これらの分子はいずれも既知の分子やお互いのホモロジーをもたない。最近の結果は、これらの分子が相互作用しつつ共通の分子経路で働くことを強く示唆している。この分子経路のモデルは 2 段階よりなる。第 1 段階で、FANCA, C, G が細胞質で複合体を形成し核内に移行し、さらに FANCE, F が複合体に集合する。第 2 段階で、この複合体に依存して DNA 損傷により FANCD2 が翻訳後修飾により活性化になり、DNA 損傷部位に乳癌感受性蛋白 BRCA1 などとともに局在し、DNA 修復に関与する。

FANCA 蛋白は 1455 個のアミノ酸からなる約 163kD の蛋白である。N 末に核局在シグナル (NLS) を持ち、C 末から約 3 分の 1 の位置に leucine-zipper 様の構造を持つ。FANCG は FANCA の NLS を含む N 末部分に直接に結合する。FANCE は FANCA に直接結合し、FANCC は FANCE に直接結合することが示唆されている。また、細胞質でセリンキナーゼが FA 蛋白複合体

に含まれ FANCA をリン酸化することを、我々は最近明らかにした。しかし、FA 蛋白の相互作用と核移行および FANCA のリン酸化の分子機構はまだ十分明らかではない。

FA 患者の 60-70% は FANCA の異常による。この遺伝子は不安定で、遺伝子全体にわたって 100 種類以上の mutation が報告されている。その大半は、premature termination や large deletion を生ずる null mutation である。一方、missense mutation と単独ないし少数のアミノ酸の in-frame deletion を生じる mutation が約 30 種類報告されており、これらは変異蛋白を産生すると考えられる。しかし、1 アミノ酸置換による病的 mutation と良性 polymorphism との鑑別は困難である。最近、null mutation のホモ接合体は、変異蛋白を産生する mutation を持つ患者より重症度が高いことが示唆された。しかし、このような遺伝子型・表現型相関のメカニズムは、ほとんど判明していない。

本研究では、FANCA の患者由来の変異蛋白 20 種類を FANCA(-) 細胞に発現させ、MMC 感受性の補正、FA 分子経路への影響を解析した。今回得られた結果は、上述のような種々の問題点の解明に有用な情報を与えると考えられる。

[対象と方法]

レトロウイルスベクターに挿入された FANCA に、患者で報告された種々の mutation を site-directed mutagenesis 法で導入し、変異蛋白を患者由来の FANCA(-) fibroblast GM6914 に発現させた。これらの transformants を用いて、(1) MMC 感受性、(2) FANCA と FANCC、FANCG の相互作用、(3) FANCA のリン酸化、(4) FANCA の細胞内局在、(5) FANCD2 のユビキチン化、を解析した。

[結 果] (表 1、図 1 を参照)

1. MMC 感受性：20 個の変異蛋白のうち 5 個は野生型蛋白とほぼ同様に MMC 感受性を補正し (I 群)、11 個の mutant は感受性をほとんど補正せず (II 群)、4 個の mutant はその中間の補正能 (III 群) を示した。
2. FANCA 変異蛋白の FANCC および FANCG との結合：I 群の変異蛋白は野生型蛋白と同様に強く FANCC と相互作用した。これに対して II 群の

表1 FANCA 変異蛋白の機能のまとめ

群	変異	MMC (IC50)(nM)	細胞内局在	FANCC 結合	FANCG 結合	FANCD2 ヒノユビキチン化
	Mock	3.7	-	-	-	-
	Wild Type	30.5	核	+++	+++	+++
I	D598N	30.6	核	+++	+++	+++
	Q1128E	15.8	核	+++	+++	+++
	T1131A	17.0	核	+++	+++	+++
	F1263del	30.5	核	+++	+++	+++
	H1417D	32.7	核	+++	+++	+++
II	R435C	4.2	細胞質	+	+++	+
	H492R	5.0	細胞質	+	+++	+
	L845P	5.7	細胞質	+	+++	+
	FQ868-869del	5.5	細胞質	+	+++	+
	R1055L	4.7	核	+	+++	+
	H1110P	7.4	細胞質	+	+++	+
	F1135del	6.7	細胞質	+	+++	+
	W1174del	9.2	細胞質	+	+++	+
	1239-1243del	4.0	細胞質	+	+++	+
	F1263del	4.8	細胞質	+	+++	+
	W1302R	4.3	細胞質	+	+++	+
III	L817P	16.7	核	++	+++	++
	P1324L	22.6	細胞質	++	+++	++
	D1359Y	21.8	細胞質	++	+++	++
	M1360I	26.9	細胞質	++	+++	++

+: 弱; ++: 中弱; +++: 強 (野生型と同等)

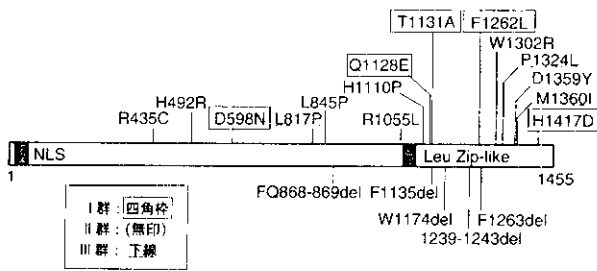


図1 FANCA 蛋白の構造と変異

NLS: Nuclear Localization Signal

Leu Zip: Leucine Zipper

変異蛋白と FANCC の相互作用はきわめて弱かった。III 群の変異蛋白は両グループの中間レベルの相互作用を示した。これに対して、FANCG との相互作用は、どの群においてもほぼ同様であった。

3. 各 FANCA 変異蛋白のリン酸化：I 群の変異蛋白は wild-type 蛋白と同様にリン酸化され、II 群の変異蛋白はリン酸化のレベルが著明に減少していた。III 群の変異蛋白は両グループの中間程度のリン酸化レベルを示した。

4. FANCA の細胞内局在：I 群の変異蛋白は野生型蛋白と同様、主に核に局在した。これに対して、II 群と III 群の変異蛋白は大部分が細胞質に局在した。例外的に、II 群の R1055L と III 群の L817P は核に優位に局在した。

5. FANCD2 のモノユビキチン化：I 群変異蛋白は野生型蛋白と同様に FANCD2 のユビキチン化を起こしたが、II 群および III 群変異蛋白はきわめて弱いユビキチン化しか見られなかった。MMC で細胞を処理すると、I 群と II 群の差はより明確になり、III 群では両者の中間レベルの FANCD2 のユビキチン化を引き起こした。

FANCA は明らかな機能ドメインがほとんどないこと、蛋白が比較的大きい (163 kD) こと、mutation の明確な hotspot がないことなどの理由により、構造機能相関についての研究に乏しい。これと表裏の関係にある問題として、deletion mutant や premature termination の場合は病的な mutation と考えられるが、1 アミノ酸の変化は病的な mutation か良性的 polymorphism かの鑑別は困難である。いくつかの missense あるいは small deletion mutant はその機能や FA 分子経路の活性化能について部分的な解析が報告されているが、FANCA 分子の広汎な領域の多数の mutation を機能的に解析した研究はこれまでなかった。

今回の結果から、II 群と III 群の変異蛋白は機能が障害されていることがはっきりした。I 群の変異蛋白は、過剰発現により機能が增强されている可能性があるが、良性 polymorphism である可能性も考えられる。このように、報告されている変異蛋白に機能的な相違があることが明らかとなった。また、FA 分子経路の活性化能が MMC 感受性ときわめてよく相関することが示され、この分子経路の重要性が強く示唆された。

FA 分子経路の各 event はきわめてよく相関したが、2 群の変異蛋白において例外が見出された。すなわち、II 群の R1055L と III 群の L817P は核移行したが、MMC 感受性の補正や他の FA 分子経路の活性化は障害されていた。これは、核移行が、リン酸化、FANCC の結合、核内機能と分離できることを示唆する。

II 群の変異蛋白を発現させた transformant と FANCA(-) 細胞を比較すると、MMC 感受性は同等であったが、FA 分子経路活性化能にはわずかの差が見られた。これは、null mutation の homozygote よりも変異蛋白を産生する mutant を持つ患者のほうがより重症の表現型を示すことを、一部説明すると考えられる。

[参考文献]

1. Garcia-Higuera I, et al, Mol Cell 7,249, 2001
 2. Yagasaki H, et al, Blood 98, 3650, 2001

Fanconi 貧血の分子病態：
クロマチンリモデリング因子との関連

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 (FA) は遺伝性疾患であり、骨髓低形成の発症を一つの特徴とする。FA は少なくとも 8 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、FA 蛋白質の機能は明らかとなっておらず、骨髓低形成発症のメカニズムや DNA 不安定性がおこる機序等は依然として不明のままである。我々は、FA 蛋白質の機能を明らかにすることにより、FA

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、FA 蛋白質の一つである 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。その結果、クロマチンリモデリング因子 (SWI/SNF 複合体) の重要な構成要素の一つである BRG1 を FANCA 結合蛋白質として同定した。両者の結合の生理的意義を明らかにするため、種々の細胞可溶化液から FANCA 抗体または BRG1 抗体を用いて免疫沈降を行った後、ウエスタンブロット法により、共沈した蛋白質の解析を行った。

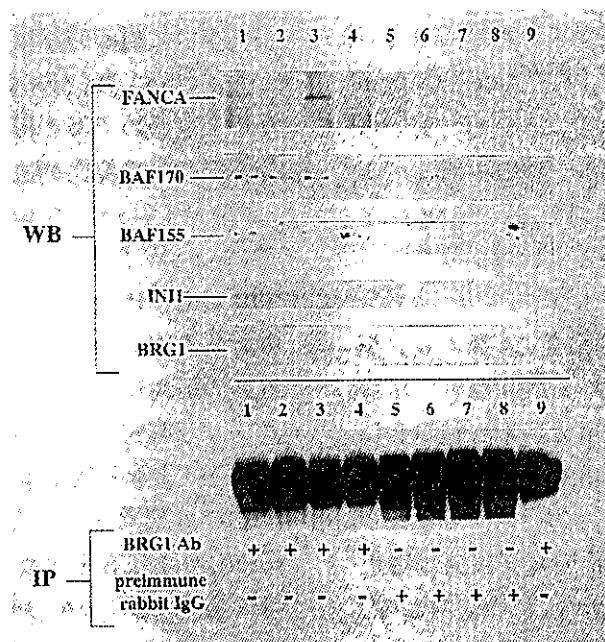


図1 BRG1 抗体を用いた免疫共沈実験

BRG1 抗体を用いて細胞可溶化液から免疫沈降を行い、共沈した蛋白質に対し、図に示す各種抗体にてウエスタンブロットを行った。

Lanes 1, 5: 正常リンパ球

Lanes 2, 6: Fanconi 貧血 A 群患者細胞 (HSC72)

Lanes 3, 7: Fanconi 貧血 A 群患者細胞に正常 FANCA cDNA を導入した細胞 (HSC72/FANCA)

Lanes 4, 8: BRG1 を欠損した細胞 (SW13)

Lanes 1-4 では BRG1 抗体 (rabbit, polyclonal) を用いて免疫沈降を行い、lanes 5-8 では pre-immune rabbit serum で免疫沈降を行った。Lane 9 では、細胞可溶化に使用した buffer に BRG1 抗体を加えて免疫沈降を行った。

[結 果]

細胞可溶化液から FANCA 抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、BRG1 以外にも BAF170、BAF155、INI1 という SWI/SNF 複合体を構成する蛋白質が共沈した (図 1)。逆に、BRG1 抗体で免疫沈降した場合にも、FANCA が共沈することがわかった (図 2)。

[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。図 1、2 の実験結果から FANCA (FA 蛋白質複合体) が SWI/SNF 複合体とクロストークすることによりクロマチンリモデリングに関連している可能性が示唆された。クロマチン構造を変化させることは、DNA 修復の際にも必要と考えられ、FA 細胞における DNA 不安定性の分子病態を解明する上でも興味深い知見であると思われる。

[文 献]

1. Otsuki T, et al, Biochem Biophys Res Comm 265, 630, 1999
2. Otsuki T, et al, Hum Mol Genet 10, 2651-2660 2001

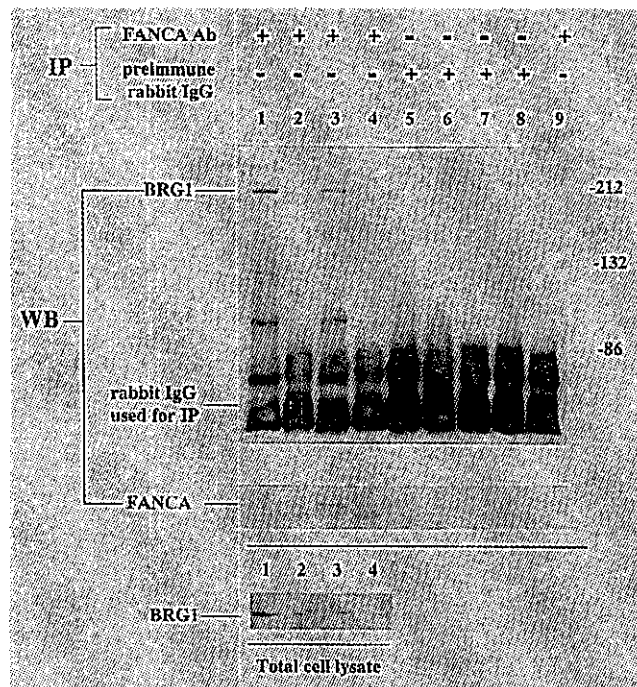


図 2 FANCA 抗体を用いた免疫共沈実験
FANCA 抗体を用いて図 1 と同様に実験を行った。

TNF- α による赤血球造血抑制機構の解析

澤田 賢一、肖 衛国、西尾 充史、
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・第二内科)

[はじめに]

TNF- α は炎症急性期において最も早期に産生されるサイトカインであり、サイトカインネットワークの initiator として種々の血液病態に関与する。赤血球造血においては抑制的に作用するが、その標的は前期赤芽球系前駆細胞 (BFU-E) であり、後期赤芽球系前駆細胞 (CFU-E) は抑制しないとの報告もある。非赤芽球系前駆細胞に対しては造血刺激として作用する。TNF- α によって誘導される非赤芽球系細胞は従来、顆粒球・マクロファージコロニー形成細胞 (CFU-GM) と称されてきたが、我々はこれらの細胞が CFU-GM ではなく、樹状細胞 (DC) の形質を有することを見出した。DC は CD34+ 細胞から分化・増殖し、初期段階では旺盛な細胞接着や食作用を有する一方、これらの機能は DC の成熟とともに消失して抗原提示細胞 (APC) として働く。我々は、TNF- α の赤血球造血抑制機序として未熟 DC の関与を推定し以下の検討を進めた。

[対象と方法]

1. コロニー形成法

血清含有 fibrin clot 培地に細胞を 500-1,000 個/mL 濃度で植え込み、stem cell factor (SCF)、interleukin-3 (IL-3)、erythropoietin (EPO) 存在下、5% CO₂ incubator で培養後、固定し hemoglobin (Hb) 染色を行った。Hb 陽性細胞 100 個以上からなるものを BFU-E、8-49 個を CFU-E、2-7 個を small erythroid (SE) として算定した。

2. 赤芽球系特異的分化・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・増殖誘導を行なうとともに、TNF- α と interleukin-4 (IL-4) の影響を検討した。本培養系で 7 日目に回収され

る細胞の成熟段階は CFU-E に相当した (Day7 細胞) 。

3. 表面形質

赤芽球系前駆細胞に対する特異的表面形質 glycophorin A (GPA) の発現を検討するとともに、リンパ球系マーカー (CD3、CD8、CD19、CD20) および DC 系マーカー (CD1a、CD4、CD11c、CD14、CD40、CD80、CD83、CD86、IL-3R、CD45RA、HLA-A,B,C、HLA-DR) について検討した。

[結 果]

1. TNF- α による BFU-E の抑制

TNF- α は純化ヒト CD34+ 細胞から形成される BFU-E コロニーを濃度依存性に抑制した。一方、純化 CFU-E のコロニー形成に対しては 1,000 ng/ml の高濃度でも影響を認めなかった (図1)。TNF- α は 1~100 ng/ml の濃度で非赤芽球系コロニーの形成を促進した。

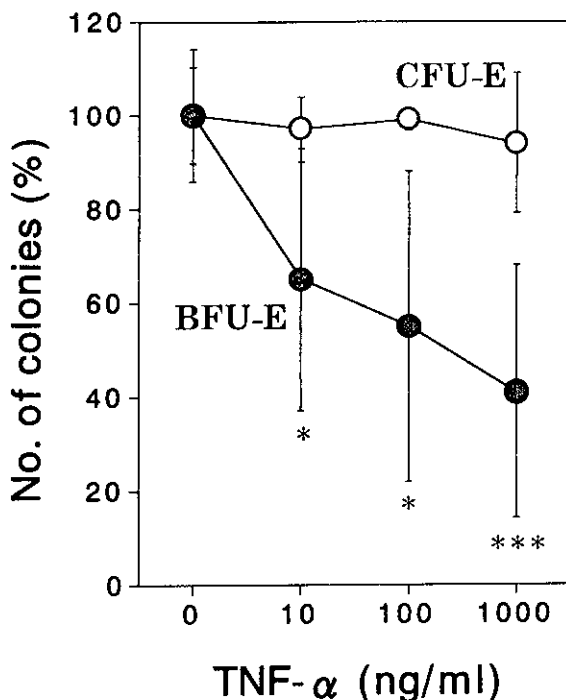


図1 BFU-E/CFU-E コロニー形成に及ぼす TNF- α の影響

2. TNF- α による GPA+ 細胞産生抑制

純化ヒト CD34+ 細胞を SCF、IL-3、EPO 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。GPA+ 細胞の出現は培養 3 日後から認め

られた。7日間培養後、TNF- α はGPA+細胞を減少させるとともにGPA-細胞の産生を促進した(図2)。

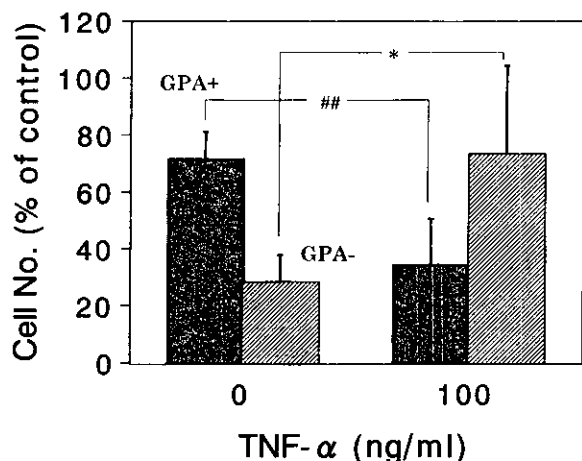


図2 CD34+細胞からのGPA+細胞の誘導に及ぼすTNF- α の影響

3. TNF- α による樹状細胞(DC)の誘導

GPA-細胞の表面形質の解析では、TNF- α によるリンパ球系マーカー(CD3、CD8、CD19、CD20)の発現は陰性、DC系マーカーのうちCD1a、CD4、CD11c、CD14、CD40、CD80、CD83、CD86、HLA-A,B,Cの著明な発現亢進を認めた(図3)。

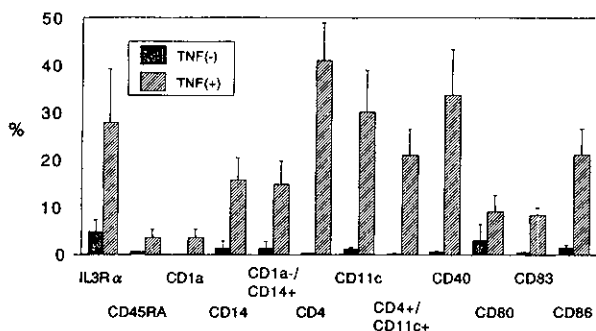


図3 TNF- α による樹状細胞(DC)の誘導

純化ヒトCD34+細胞をSCF、IL-3、EPOとともに液体培養し、赤芽球系への分化・増殖誘導を行ってGPA-細胞のDC系表面形質を検討した。

4. TNF- α によるGPA+細胞産生抑制におけるIL-4の効果

IL-4は単球・マクロファージ系細胞の増殖を抑制するとともにDCの分化を促進することが報告されている。そこでTNF- α によるCD34+細胞からのGPA+細胞産生抑制におけるIL-4の効果を

検討した。図4に示すごとくIL-4は濃度依存性にTNF- α によるGPA+細胞産生抑制を解除した。

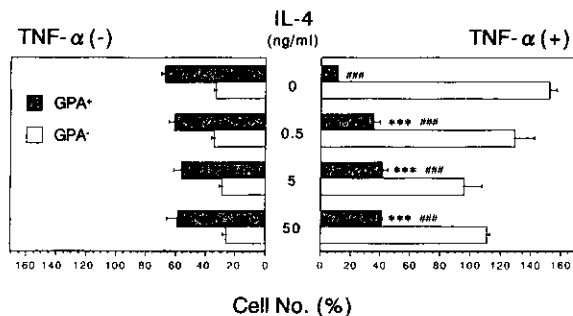


図4 CD34+細胞からのGPA+細胞の誘導に及ぼすTNF- α とIL-4の影響(7日間培養)

5. IL-4によるGPA-細胞の表面形質の変化

CD34+細胞からのGPA+細胞の誘導においてTNF- α はDC系マーカーを有するGPA-細胞の産生を亢進した。IL-4はGPA-細胞の総数には有意な変化を与えなかったがCD1a+/CD14-細胞の増加とCD1a-/CD14+細胞の減少、またCD40+細胞の減少とCD80+細胞の増加など、TNF- α によって誘導されるGPA-細胞の分化を促進していることが示唆された(図5)。

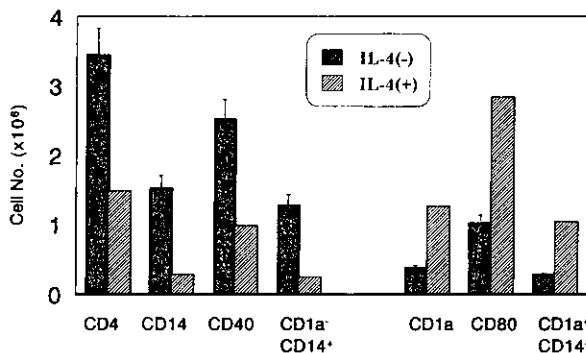


図5 CD34+細胞から誘導されるGPA-細胞のDC系表面形質とIL-4の影響(7日間培養)

[考察・結論]

我々はTNF- α の赤血球造血抑制機序を検討していく過程で、その手法として従来のコロニー形成法とともに液体培養法を導入し、赤芽球系前駆細胞の分化増殖過程におけるTNF- α の影響をGPA発現との相関のもとに検討した。その結果、①TNF- α の赤血球造血抑制には非赤芽球系細胞(GPA-細胞)の増幅を伴うこと、②このGPA-細胞は従来考えられてきたCFU-GMではなく樹状

前駆細胞を含む樹状細胞（DC）であること、③ IL-4 による DC のポピュレーションの変化と④ TNF- α 誘導赤血球造血抑制の IL-4 による解除を認めた。炎症急性期には造血に関与する種々のサイトカインが産生される。なかでも TNF- α は最も早期に産生されるサイトカインであり、サイトカインネットワークの initiator として種々の血液病態に関与するとともに、最も強力な DC 誘導因子のひとつである。造血の領域における DC の意義は不明であるが、造血不全の病態成立機序に関与している可能性がある。たとえば再生不良性貧

血などその原因に自己免疫が推定されている疾患において自己反応性リンパ球の関与が推定されているが、どのようにして自己免疫が成立するのかその機序はいまだ不明である。自己免疫疾患の病態を T 細胞から検討した場合、最も強い抗原提示活性を持つ樹状細胞（DC）に遡ることは当然の帰結と考えられる。IL-4 による TNF- α の効果抑制機序の詳細について現在検討中である。

[文 献]

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