

反応例 9 例の臨床経過を表 4 に示した。免疫抑制療法に反応した 9 例中 8 例 (88%) は 1 年 7 ヶ月から 8 年 (中央値 2 年 7 ヶ月) 効果が持続している。不反応の中からは、1 例が心不全で死亡し 1 例が白血病に転化し死亡した。CyA の副作用は、腎障害、高血圧、高尿酸血症、高脂血症等であった。腎障害により CyA を中止した 1 例は、FK506 に変更し反応している。1 例では腸管感染症を契機に投与を中止したが、他の例は継続している。8 年に及ぶ最長期投与例は減量に伴い血球減少が進行し、再増量で改善がみられるなど、CyA に依存した造血が維持されている。

[結 論]

MDS に対する免疫抑制療法の効果は、再生不良性貧血とは異なり、血小板や好中球系に比べ、赤血球系の反応が中心で輸血からの離脱が可能となる特徴がある。CyA の副作用は重篤なもののみならず、ほとんどの例で長期投与が可能であったが、反応例では CyA 依存性の造血がみられる傾向があり、治療中止あるいは減量の判断が困難である。現在のところ反応例には MDS の病型の進行や白血化は認められていないが、長期的な影響に関しては、さらに経過観察が必要である。

表 4 反応例の臨床経過

Pt No.	Response			反応の持続	CSA投与量 (トラフ値)	副作用
	Hb	Neutro.	Plt			
5	GR	GR	PR	6y2m+	100-200mg (100-200ng/ml)	Cr上昇,浮腫
10	GR	NR	NR	2y2m+	100mg前後 (60-100ng/ml)	高尿酸血症 Cr上昇
12	GR	MR	MR	4y+	150mg前後 (100-200ng/ml)	-
22	GR	NR	MR	2y7m+	150mg (90-148ng/ml)	-
25	GR	NR	MR	1y7m+	FK506 1.5mg→1mg, (4-7ng)	Cr上昇
26	PR	NR	MR	2y	200→100→150mg (100-240ng/ml)	血圧上昇
28	GR	NR	MR	8y+	200mg→中止,汎血球減少→100mg再開	γGTP,Tcho,Cr上昇
29	GR	NR	PR	3y1m+	150mg(100-267ng/ml)帯状疱疹後→100mg	TB上昇、高脂血症、帯状疱疹
30	GR	PR	PR	2y7m+	300→250→150mg(300-200-90ng/ml)	尿酸上昇,

小児 MDS の臨床統計と診断における問題点

中畑 龍俊 (京都大学・発達小児科学)

真部 淳 (東京大学医科研・細胞療法)

[はじめに]

従来、MDS は高齢者に多発し、小児ではあまり見られない疾患と考えられていたが、最近、小児例の報告が急増してきている。小児期に発生する MDS が成人に見られるものと同様の病態や治療に対する反応性を示すのか充分には解っていない。今回、小児 MDS の診断の問題点について検討した。

[対象と方法]

日本小児血液学会には MDS 委員会が発足し、1998年度から 1 年に 1 回学会員にアンケートを送付し、わが国で発症する 16 歳以下で発症する小児 MDS の実態調査を毎年行っている。今回、この調査をもとに小児 MDS の診断の問題点を解析した。また、小児 MDS の診断の困難さが明らかとなってきたことから、1999 年 7 月より小児 MDS の診断を前方視的に行うことが提案され、前方視的登録と病理中央診断 (セントラルレビュー) が開始されている。今回、前方視的登録された症例についても検討した。

[結 果]

1. 過去の症例の後方視的解析

1990 年 4 月以後に発症した 16 歳未満の MDS 症例の臨床データを集積した。診断は各診療施設において行われた。1999 年末までに発症した 293 例の内訳は、一次性 MDS は 174 例 (RA 36、RARS 0、RAEB 20、RAEBT 29、CMML 15、JCML/JMML 60、病型不明 14)、Constitutional な要因のあるもの 48 例 (Down 症候群 18、Fanconi 貧血 11、神経線維腫症 4、Pearson 症候群 1、その他 14)、二次性 MDS は 71 例 (免疫抑制剤投与後 30、化学療法あるいは放射線治療後 41) だった。JMML の疾患概念は受け入れられてきた (表 1)。核型検査は

95% の症例で行われていたが、骨髓生検検査は約 10% の症例でしか行われていなかった。全症例の 4 年 EFS は 48% (一次性 56%、constitutional 49%、二次性 29%) だったが、一次性 MDS では核型異常が、一次性 MDS と二次性 MDS では幹細胞移植を行ったかどうかで予後に差があった (図 1) ²⁾。

2. 前方視的登録と病理中央診断 (セントラルレビュー)

対象は、16 歳未満発症の MDS 疑い症例である。塗抹標本は 2 カ所、生検標本は 1 カ所でレビューされた。1999 年 7 月から 2001 年 11 月末までに 94 例が登録された。生検実施は 30 例だった。一次性 MDS は 49 例、constitutional なものは 14 例、二次性 MDS は 7 例だった。MDS 以外の疾患としては、再不貧、AML、ITP などがあった。新しい WHO 分類が小児に適用できるのかも検討している。

[考案と結論]

MDS は、均一の疾患ではない。末梢血において血球減少があり、骨髓において無効造血があり、3 血球系統の細胞が異型性を示すような、造血幹細胞のクローナルな異常を MDS と総称している。また、MDS は急性白血病に移行する危険性の高い疾患 (前白血病状態) と考えられている。現在のところ、成人と同様に FAB 分類を用いることに大きな問題はないと考えられているが、将来的には治療法の選択に有用な小児独自の分類方法も必要であろう。FAB 分類の問題点がいくつかあげられている。先天性骨髓不全症候群 (congenital bone marrow failure syndrome : Fanconi 貧血などが含まれる) にさいしては FAB 分類をあてはめることが難しい ³⁾。ミトコンドリア異常症 (Pearson 症候群などが含まれる) は、クローナルな疾患ではないが、MDS と区別することが難しい。また、経過を追わないとどの病期にあるのか判断できない場合も多い。すなわち、RA のまま 1 年以上病勢が落ち着いている症例もあれば、急速に急性白血病に移行するものもみられる。小児にみられる CMML の大部分は、従来 JCML

(juvenile chronic myelogenous leukemia) と呼ばれていたものであり、欧米の研究者により最近では JMML (juvenile myelomonocytic leukemia) と名称を変えることが提案されているが、その場合には、CMML の基準に従いながらも、末梢血芽球 $\geq 5\%$ は認めた方がよいと考えられている。

小児期にわが国で発症する MDS の実態が明らかにされた。今後、WHO 分類も含め、小児 MDS の診断基準を作成することが必要と考えられる。

[文 献]

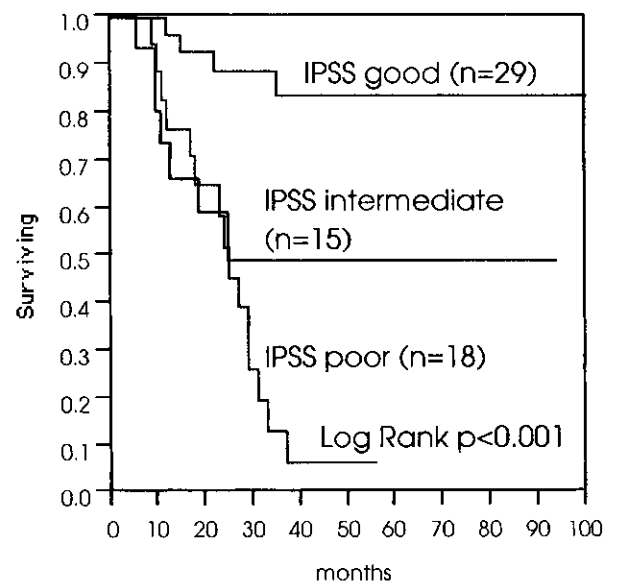
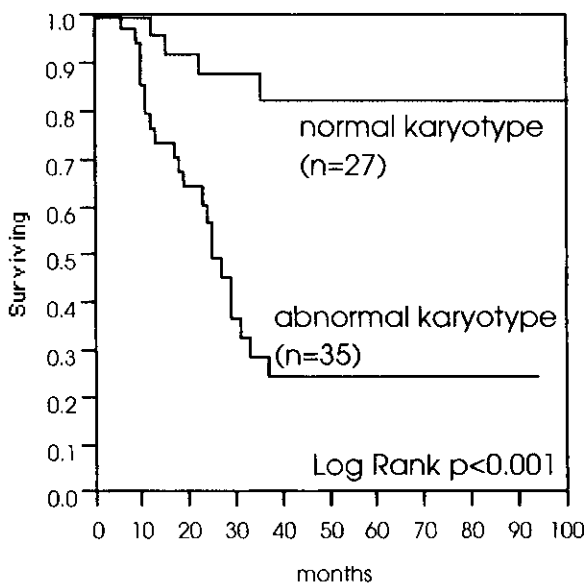
1. 中畑龍俊他, 日小血会誌, 15, 54, 2001
2. Sasaki H, et al, Leukemia 15, 1713, 2001
3. Yamashita T, et al, Int J Hematol, 74, 33, 2001
4. Lin YW, et al, Int J Hematol, 74, 86, 2001
5. Hamahata K, et al, Mutation Research, in press

表1 各病型におけるFAB分類

	一次性	先天性	二次性
RA	26	7	17
RARS	0	1	0
RAEB	18	8	10
RAEBT	25	5	13
JMML/CMML	53	3	3
計	122	24	43

図1

**Primary MDS (n=62)
(RA, RAEB, RAEBT)**



Stratified with IPSS cytogenetics

表1 患者背景

Patient	Sex	Age	Diagnosis	Peripheral blood				
				WBC/ μ L	Lym(%)	Mon(%)	Blasts(%)	
CML in Chronic Phase	1	F	48	CML	4000	55	2	0
	2	M	64	CML	3800	22	11	0
	3	M	39	CML	5500	11	5	0
	4	F	61	CML	5400	19	13	0
	5	M	57	CML	7200	35	7	0
	6	F	40	CML	3500	39	3	0
MDS	7	M	83	RA	2200	53	6	0
	8	M	78	RA	4400	20	7	0
	9	M	59	RA	2400	24	35	2
	10	M	55	RAEB	2000	57	5	0
	11	F	26	RAEB	1200	83	6	0
	12	F	31	RAEB	2500	55	9	0
	13	M	73	RAEB	2000	30	10	0
	14	M	57	RAEB	2400	32	15	1
	15	M	67	RAEB	3200	38	14	1
	16	M	50	RAEB	2200	26	7	5
AML In CR	17	M	61	RAEB	2000	29	0	6
	18	F	63	CMML	4600	18	38	0
AML In Non-CR	19	M	39	M3	8400	27	7	0
	20	M	59	M3	4400	21	12	0
	21	M	35	M3	5000	28	17	0
	22	M	53	M4	1700	39	5	0
	23	M	58	M2	1700	36	12	0
AML in Non-CR	24	F	61	M2**	19400	22	21	18
	25	F	67	M7	10600	22	7	27
	26	M	37	M2	9800	19	21	30
	27	F	47	M1	4700	38	3	33
	28	M	63	M2**	36200	5	10	33
	29	M	66	M2	3400	34	0	60
	30	M	57	M1	14100	2	1	94

WBC: white Blood count; Lym: lymphocyte; Mon: monocyte

骨髓異形成症候群における IL-12 の in vitro 処理による微小残存病変除去に関する検討

大野 竜三 (愛知県がんセンター)

大西 一功、潘 峻、内藤 健助、

竹下 明裕、竹下 香、藤澤 紳哉、

重野 一幸、佐原 直日

(浜松医科大学第三内科)

[はじめに]

IL-12 は、主に単球より産生されるサイトカインでNK細胞や細胞障害性T細胞を増殖刺激するとともにIFN γ の産生を誘導し、その活性を高める事が知られている。更にマウスモデルでは各種腫瘍移植マウスに著明な抗腫瘍効果が認められている。またWT1 (Wilms' tumor gene 1) 遺伝子は、白血病細胞において高発現されており、WT1 mRNA は白血病患者における微小残存病変(MRD)の指標として有用である事が報告されている。

本研究では骨髓異形成症候群(MDS)および白血病患者の末梢血単核球(PBMNC)のIL-12処理によるその殺細胞効果に対する影響、そしてIL-12のMDS・白血病のMRDの除去における有用性について検討した。

[対象と方法]

対象はMDS・白血病患者30例で、内訳はMDS 12例(RA 3例、RAEB 8例、CMML 1例)、AML 12例(M1 2例、M2 5例、M3 3例、M4 1例、M7 1例、うち5例は寛解期、7例は非寛解期)、CML 6例であり、末梢血にはそれぞれ0~94%の芽球を含んでいた(表1)。

IL-12はHoffmann-La Rocheより供与を受け、 5×10^5 cell/mlの細胞にIL-12 100 units/mlを添加し、37°Cで3日間共培養を行った。

PBMNCの殺細胞効果はChangの方法によりフローサイトメトリーを用いて測定した。すなわち3,3'-dioctadecyloxycarbocyanine perchlorateにより標識した標的細胞を用いてpropidium iodide染色

により測定した。標的細胞はK562を用いE:T比を10:1、20:1の比率でPBMNCを加え37°Cで24時間共培養を行った。

WT1 mRNAの定量は、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 コピーのcompetitor RNAを用いcompetitive RT-PCR法により測定した。

[結果]

1. K562に対するMDS・白血病患者PBMNCのIL-12による殺細胞効果の増強

殺細胞効果測定の至適条件はIL-12 100 units/ml添加による3日間の共培養であった。E:T比20:1におけるこの条件下の殺細胞効果は、IL-12非存在下では正常コントロール25.7 \pm 8.4%に比べMDS・白血病患者では13.4 \pm 9.3%と有意に減少していたが、IL-12添加により30.8 \pm 17.8%と有意に増加した(正常コントロールは41.8 \pm 6.0%)。AMLの寛解期と非寛解期の患者の比較では、IL-12添加時39.5 \pm 20.3%対17.8 \pm 13.6%と寛解期の患者で有意の増強が認められた。殺細胞効果のIL-12による増強はCML 6例中6例、MDS 12例中11例、寛解期AML 5例中4例、非寛解期AML 7例中3例で認められた(表2)。

2. 芽球を含むPBMNCにおけるIL-12添加によるWT-1 mRNA量の変化

表2 IL-12のMDS・白血病患者PBMNCの殺細胞効果に対する影響

Patient number	Cytotoxicity (%)			
	IL-12(-)		IL-12(+)	
	E:T 10:1	E:T 20:1	E:T 10:1	E:T 20:1
CML				
1	4.1	5.7	14.1	25.7
2	4.6	8.1	18.3	37.5
3	3.4	5.6	14.8	17.1
4	5.7	10.9	15.3	27.3
5	8.3	15.7	18.3	31.3
6	17.5	30.5	41.6	64.1
MDS				
7	10.7	21.1	27.9	36.1
8	17.3	31.5	55.6	74.2
9	3.3	5.1	12.6	17.3
10	3.5	3.6	8.6	42.1
11	13.3	23.3	22.3	41.1
12	15.5	24.9	21.7	32.3
13	8.7	13.5	19.5	36.5
14	2.4	3.9	5.5	13.9
15	5.0	5.7	6.1	6.7
16	2.0	2.8	10.5	15.8
17	8.3	16.2	20.7	32.6
18	10.3	34.3	20.9	44.2
AM in CR				
19	8.3	18.1	19.2	40.9
20	3.7	6.4	18.4	28.5
21	13.4	22.4	37.1	60.2
22	8.1	14.3	44.3	56.6
23	4.7	8.5	7.7	11.2
AML in non-CR				
24	13.9	16.0	23.5	36.7
25	2.9	5.2	10.3	23.2
26	3.6	7.0	6.3	7.2
27	13.6	19.9	17.6	31.2
28	1.5	2.4	1.8	2.7
29	7.7	15.2	12.0	20.0
30	1.3	3.3	3.1	3.5
Mean±SD	7.5±4.9	13.4±9.3	18.5±12.5*	30.8±17.8**

* P = 0.0004 and ** P = 0.0002 compared with the respective control value by the Student's paired t-test

芽球を0～94%含むPBMNCをIL-12 100 units/ml 3日間培養前後のWT-1 mRNA量をcompetitive RT-PCR法で定量した。WT-1 mRNA量はK562細胞では 10^7 コピー/μg (total RNA)以上、正常人PBMNCでは 10^3 コピー/μg (total RNA)以下であった。

MDS患者では $10^{5.4}$ から $10^{4.8}$ コピー/μgの減少、うちCMMLの1例では $10^{6.0}$ から $10^{4.0}$ コピー/μgと2オーダーの減少が見られ、CML患者のPBMNCでは $10^{4.8}$ から $10^{4.2}$ コピー/μgに減少が認められた。寛解期AMLでは 10^5 から $10^{4.2}$ コピー/μgの減少、非寛解期AMLでは減少は7例中2例のみであった

た(図1)。

3. 患者PBMNCのK562に対するIL-12による殺細胞効果の増強とWT1 mRNAの減少量の間には有意の相関($r=0.439, p=0.015$)が認められた。

【考察・結論】

1. MDS・白血病患者PBMNCのK562に対する殺細胞効果は、正常人に比べ有意に低く、IL-12 100 units/ml 3日間共培養により正常人に近くまで回復した。
2. 殺細胞効果の改善はMDS、CML、寛解期AMLでは大半の症例に認められたが、非寛解期AMLでは7例中3例のみに認められた。
3. 芽球を含むPBMNCのIL-12 100 units/ml 3日間の共培養によるWT-1 mRNA量の変化は、MDS、CML、寛解期AMLでは0.6～2オーダーの比率で減少が認められたが非寛解期AML患者では、7例中2例のみに減少が認められた。
4. IL-12添加によるPBMNCの殺細胞効果の増加(%)とWT-1 mRNAの減少量(コピー/μg)の間には、弱いながらも有意の相関が認められた。
5. IL-12のin vivo投与は第I相臨床試験により重篤な副作用が報告されたが、今回の検討ではIL-12の自己造血幹細胞移植等におけるin vitroのMRD除去に対する有用性が示された。IL-2等の他のサイトカインとの併用により更に除去効果を高める事も可能と考えられた。

【文 献】

1. Ogata K, et al. Br J Haematol, 90, 15, 1995
2. Brunda MJ, et al. J Exp Med, 178, 1223, 1993
3. Inoue K, et al. Blood, 88, 2267, 1996

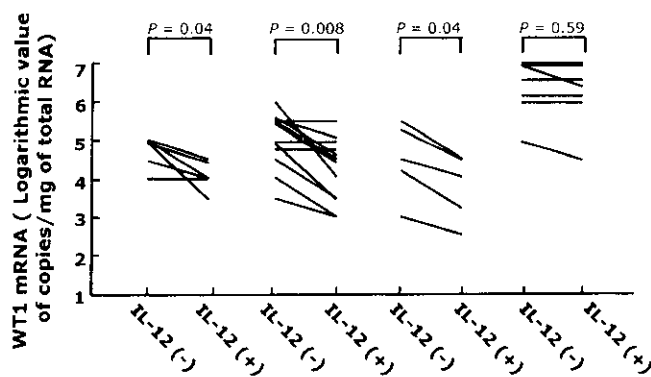


図1 IL-12添加による芽球を含むMDS・白血病患者PBMNC中のWT-1 mRNA発現量の変化

骨髓異形成症候群における変異型 GSTT-1 遺伝子の機能と rapamycin による効果

金丸 昭久、前田 裕弘、嶋田 高広、
松田 光弘 (近畿大学第三内科)

【はじめに】

Glutathione S-Transferase (GST) は生物界の多くの組織、細胞に分布し、生体の解毒機構に関与する多機能酵素である。また、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 α 、 μ 、 π 、 θ 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。MDS における GST theta-1 (GSTT-1) の遺伝子異常として、Chen ら³⁾ は、MDS 患者の GSTT-1 遺伝子は欠落していて、null genotype を示し、正常コントロール群と比較して有意に null genotype の頻度が高かったと報告した。その後、null genotype の頻度は正常人と比較して有意差が存在しないという報告例が相次いだ^{3,6)}。今回、われわれは、MDS 患者の GST GSTT-1 遺伝子の RNA レベルでの発現様式およびその機能について検討した。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)^{7,8)} 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。今回、われわれは野生型および変異型 GSTT-1 遺伝子を恒常的に発現する細胞株を作製し、rapamycin 添加前後の GSTT-1 遺伝子の発現および rapamycin の治療的応用の可能性についても考察した。

【方 法】

1. 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。
2. これらの細胞に rapamycin を最終濃度 1nM、10pM の濃度で添加し、48時間培養後 GSTT-1 mRNA の発現を RT-PCR 法にて観察した。
3. MDS 患者骨髓より RNA を抽出し、RT-PCR にて GSTT-1 mRNA の発現様式を観察した。また、rapamycin 添加培養後の GSTT-1 mRNA の発現も比較検討した。

【結 果】

1. 図 1 に示すように、変異型 GSTT-1 を発現する K562p500 は rapamycin の添加により、GSTT-1

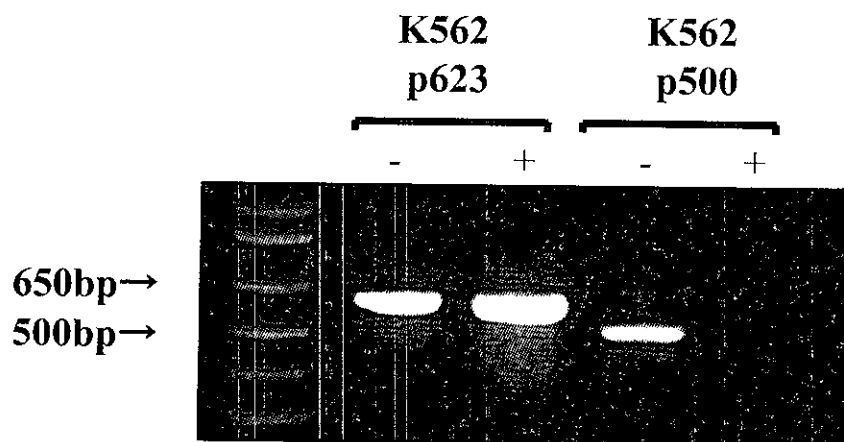


図 1 野生型 GSTT-1 遺伝子および変異型 GSTT-1 遺伝子導入による K562 における発現および rapamycin の影響

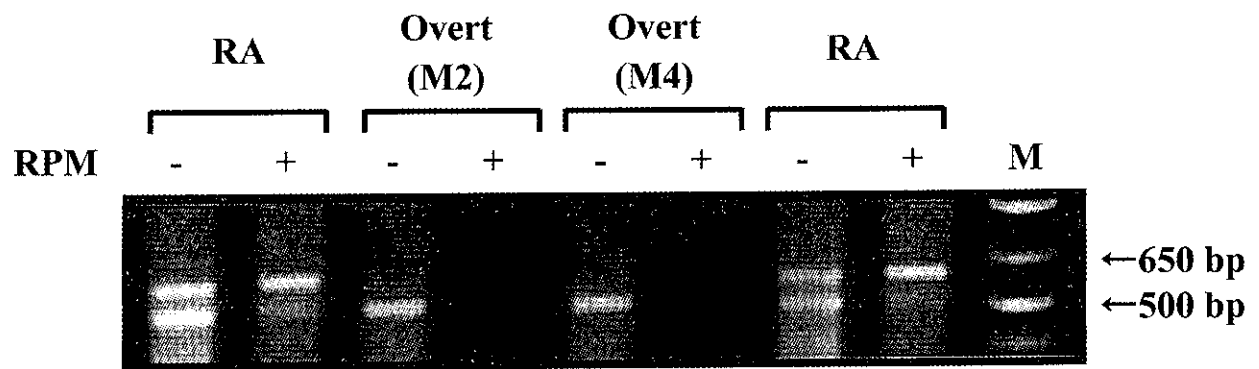


図2 MDS 症例における GSTT-1 mRNA の発現および rapamycin の影響

mRNA の発現が消失する現象が確認された。一方、野生型 GSTT-1 を発現する k562p623 ではその発現は変化しなかった。

2. RA 2 症例、Overt 症例 2 症例で GSTT-1 mRNA の発現を観察した。その結果、2 症例の RA では野生型および変異型の両方の GSTT-1 mRNA の発現が観察された。Overt 症例では変異型 GSTT-1 のみの発現が観察された。Rapamycin 添加により、RA 症例では変異型 GSTT-1 mRNA の発現が抑制される反面、野生型の発現は変化しなかった。Overt 症例の変異型 GSTT-1 mRNA バンドは rapamycin の添加により全く消失してしまう現象が観察された (図2)。

[考 察]

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。われわれは、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、安定型発現細胞を作製した。これらの細胞に、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 の誘導が観察される現象を報告してきた。最近、rapamycin を用いての癌治療の報告がなされている^{9,10}。機序は rapamycin により mTOR の機能の抑制である。すなわち、cyclin D1 や c-

myc の発現の抑制および cyclin dependent kinase inhibitor、p27kip-1 の発現増強によるものである。われわれの実験においても、野生型および変異型 GSTT-1 遺伝子発現細胞株を混合後、rapamycin を添加48時間後、変異型クローンが消失している現象が確認され (結果未発表)、変異型 GSTT-1 遺伝子細胞特異的に作用している現象が確認された。この変異型 GSTT-1 発現細胞群が MDS クローンの一つである可能性も示唆されると同時に、rapamycin による治療の可能性も示唆された。

[文 献]

1. Pemble S, et al, Biochem J 300, 271, 1994
2. Chen H, et al, Lancet 347, 295, 1996
3. Okada N, et al, Int J Hematol 66, 393, 1997
4. Basu T, et al, Lancet 349, 1450, 1997
5. Stoyebi W, et al, Lancet 349, 1450, 1997
6. Pseudohomme C, et al, Leukemia 11, 1580, 1997
7. Brown EJ, et al, Nature 369, 756, 1994
8. Schmelzle T and Hall MN. Cell 103, 253, 2000
9. Hidalgo M, et al, Oncogene 19, 6680, 2000
10. Georger B, et al, Cancer Res 61, 1527, 2001

骨髓異形成症候群における 抗アポトーシス分子 survivin の発現解析

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]

アポトーシスの制御は、生体におけるホメオスターシスの維持にとって極めて重要であり、また、そ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。特に、アポトーシス抵抗性の獲得という概念は、発癌のメカニズムや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る。アポトーシスを抑制する分子として XIAP、cIAP-1、cIAP-2 などの IAP (Inhibitor of apoptosis protein) ファミリーと呼ばれている蛋白が知られている¹⁾。近年、survivin と命名された興味深い特徴を有する IAP (Inhibitor of apoptosis protein) ファミリーに属する蛋白が注目を集めるようになった²⁾。Survivin は胎生期の組織においては強い発現がみられるが正常な成人の組織においては発現していない。Altieri らは、その発現を腸上皮や骨髄においても検討したが認められなかったと報告している³⁾。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。この癌細胞に強い発現がみられるという点は、survivin のもっとも大きな特徴点であり、他の IAP ファミリーの蛋白にはみられないものである。また Survivin の発現の程度は、胃癌⁴⁾、大腸癌⁵⁾、肺癌⁶⁾、悪性リンパ腫⁷⁾の予後と相関していることも報告されている。

骨髓異形成症候群 (MDS) は極めて難治性の疾患であり、その病因、病態に関しては未解明な点が多い。Raza らは、骨髓標本の形態学的な所見を根拠として、MDS 特に Refractory anemia ではアポトーシスが亢進していると報告している。しかしながら、このアポトーシスの亢進を分子レベルより強く具体的に支持する所見は報告されていない。一方で、細胞の癌化には、むしろアポト

ーシス抵抗性の獲得が重要ではないかという考察も可能である。

今回、我々は骨髓異形成症候群および骨髓性白血病の患者の単核球における抗アポトーシス分子 survivin 発現を RT-PCR を用いて検討し、さらに骨髓標本に対しては survivin の抗体を用いて免疫染色をおこない検討したので報告する。

[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髓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) 20例、CML10例、AML 12例 合計42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'-CACCGCATCTCTA-CATTCAA-3' Exon 4 に対応する reverse primer 5'-CACTTTCTTCGCAGTTTCCT-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。

3. ヒト survivin に対する rabbit ポリクローナル抗体を 1 次抗体として使用し、骨髓スメア標本に対して LSAB キット (アルカリホスファターゼによる発色、DAKO 社) による免疫染色をおこない観察した。

[結 果]

1. RT-PCR を用いた検討により以下の結果が得られた。① MDS (RA) では 10 例中 7 例に比較的強い発現を認めた。② RAEBt では 3 例全例において強い発現を認めた (図 1)。③ CMMoL では、survivin の発現は低い傾向がみられた (図 2)。④ 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。

2. ヒト survivin に対するポリクローナル抗体を用いた免疫染色では、特に RAEBt 症例においての

骨髓芽球において強い発現が見られることが確認された。

[考 察]

Survivin の発現パターンを調べた結果、MDS の RA および RAEB において強い発現を示す症例を高率に認めた。しかしながら、一方で、CMMoL では survivin の発現は低い傾向にあり、CMMoL は他の MDS のサブカテゴリーの疾患と好対照を示すことがわかった (図 3)。MDS は、骨髓における血球の形態異常に基づいて診断されるが、特に Refractory anemia は、形態異常が軽微であることもあり診断は必ずしも容易ではない。

また現在までのところ、診断をサポートする客観的な分子マーカーは存在しない。したがって、survivin の高発現は Refractory anemia を診断する際の有用な分子マーカーとなる可能性がある。

[参考文献]

1. LaCasse EC, et al, Oncogene 17, 3247, 1998
2. Ambrosini G, et al, Nat Med 3, 917, 1997
3. Altieri DC, et al, Lab Invest 79, 1327, 1999
4. Lu C-D, et al, Cancer Res 58, 1808, 1998
5. Kawasaki H, et al, Cancer Res 58, 5071, 1998
6. Monzo M, et al, J Clin Oncol, 17, 2100, 1999
7. Adida C, et al, Blood, 96, 1921, 2000

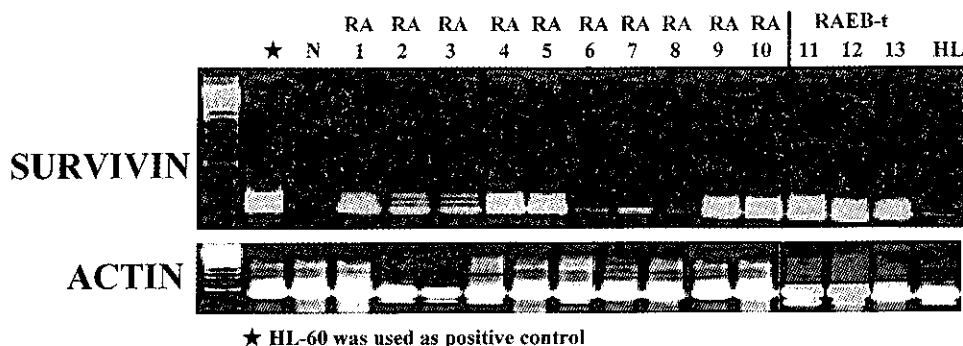


図 1 MDS (RA, RAEB-t) における survivin の発現

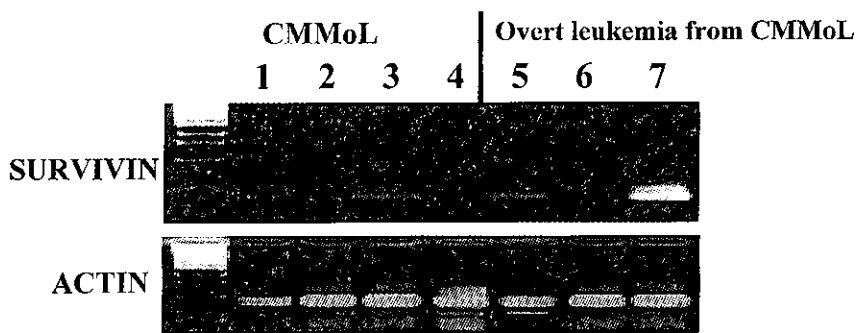


図 2 CMMoL における survivin の発現

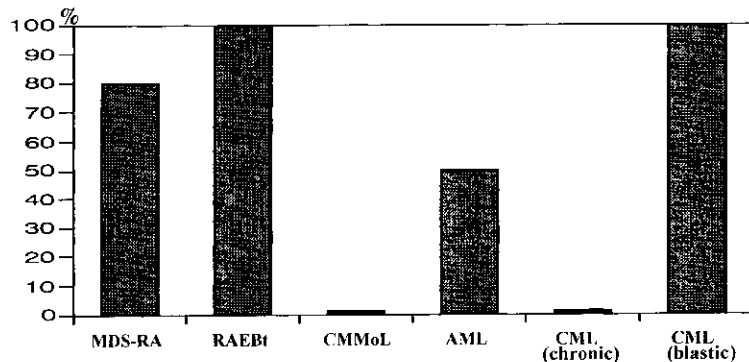


図 3 病型別の survivin 発現頻度のまとめ

骨髓異形成症候群患者骨髓 BFU-E での FKLF/FKLF-2 と γ globin 遺伝子発現の相関

村手 隆、青木恵津子、浅野 治彦、
幡野その子、木下 朝博、齋藤 英彦

(名古屋大学医学部保健学科、同第一内科)

[はじめに]

骨髓異形成症候群 (MDS)、再生不良性貧血 (AA) などの慢性貧血において、末梢血中の HbF レベルが上昇することが報告されている。一方、当教室の浅野らは最近、 γ globin の転写活性化因子として Krüppel-like zinc finger protein、FKLF、FKLF-2 をクローニングし、これらが *in vitro* で γ globin の転写を活性化することを報告した。昨年の当班研究において、我々は MDS、AA の骨髓単核球分画における FKLF/FKLF-2 遺伝子発現と HbF 発現細胞数の相関を検討したが、両者に相関は認められなかった。もともと HbF レベルは HbA レベルを凌駕することはないので、骨髓単核球全体のレベルの検索では遺伝子発現と HbF レベルとの相関を見ることは、困難であると考えられる。むしろ造血前駆細胞レベルで、個々のコロニーでその遺伝子発現がどのように調節されているかをみるのが本質的と考えられるので、今回、MDS 患者から得られた各 BFU-E において FKLF/FKLF-2 遺伝子と γ globin 遺伝子発現の間に相関が見られるかどうかを real time PCR 法を用いて検討した。

[対象と方法]

末梢血 HbF 陽性赤血球の増加を確認し、予備実験にて造血コロニーの形成を確認できた MDS (RAEB-T、Hb 11.0g/dl) の男性患者 1 名の骨髓より単核球分画 (BMMNC) を分離し、Erythropoietin、SCF 等の存在下に Methocult GF H4434 (Stem Cell Inc、Canada) を用いて progenitor assay を行った。形成された BFU-E を day12 に全て顕微鏡下に採取、それぞれのコロニーから total RNA を抽出し、random primer を用い

て cDNA を作成した。各 cDNA について、FKLF、FKLF-2、 γ globin mRNA の発現をそれぞれに特異的な primer を用いて real time PCR 法により定量した。各々の遺伝子発現の real time PCR 法での定量性の検討は昨年の本班研究報告書に記載している。既知量の標準サンプルとして K562 細胞株の希釈系列を用いた。各コロニーにおける RNA の量と質の差は、GAPDH を内部コントロールとして補正した。FKLF/FKLF-2 と γ globin mRNA 発現の相関は、Spearman 順位相関法により解析した。

[結 果]

本患者骨髓の progenitor assay より BFU-E が 70 コロニー形成された。評価可能であった 62 コロニーにおいて、FKLF mRNA と γ globin mRNA 発現量の間の相関係数 (ρ 値) は 0.68 であり、FKLF-2 mRNA と γ globin mRNA 発現量の間では 0.41 であった (図 1、2)。

[考 察]

出生後ヘモグロビンは HbA の発現が大半を占めている。HbA の発現には KLF の一つである EKLF が必須であることが知られている。しかし胎児型である HbF についてはまだ発現調節機序の詳細が知られておらず、転写因子 KLF family では我々が報告した FKLF および FKLF2 がその候補として知られているのみである。成人においても各種の貧血時には一部の症例にて HbF が増加することが知られており、一種の代償機序とも考えられる。今回 MDS の病態解析の一環として HbF 陽性赤血球の増加の認められ、解析に十分な赤血球系コロニーの形成を認めた一例の MDS 患者骨髓において各赤血球コロニー毎に FKLF、FKLF-2、 γ globin mRNA の発現を定量的に解析した。上記の定量的 RT-PCR の結果より、BFU-E における FKLF の発現と γ globin の発現の間には相関が認められ、FKLF の発現が、このような MDS 症例においても γ globin 発現の上昇に何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。一方、FKLF-2 と γ globin の発現の間には有意な相

関関係は認められなかった。MDS においては十分な赤血球系コロニー形成の認められる症例が少ないが、現在さらに数例の症例と正常者由来のコロニーについて同様な検討を行い、コロニーレベルでの γ globin 発現の上昇とFKLFおよび FKLF2 との間の相関について解析を続けている。

[文 献]

1. Asano, et al, Mol Cell Biol, 19, 3571, 1999
2. Asano, et al, Blood, 95, 3578, 2000
3. Reinhardt, et al, Ann Hematol, 76, 135, 1998
4. Bryan, et al, Blood 54, 805, 1979

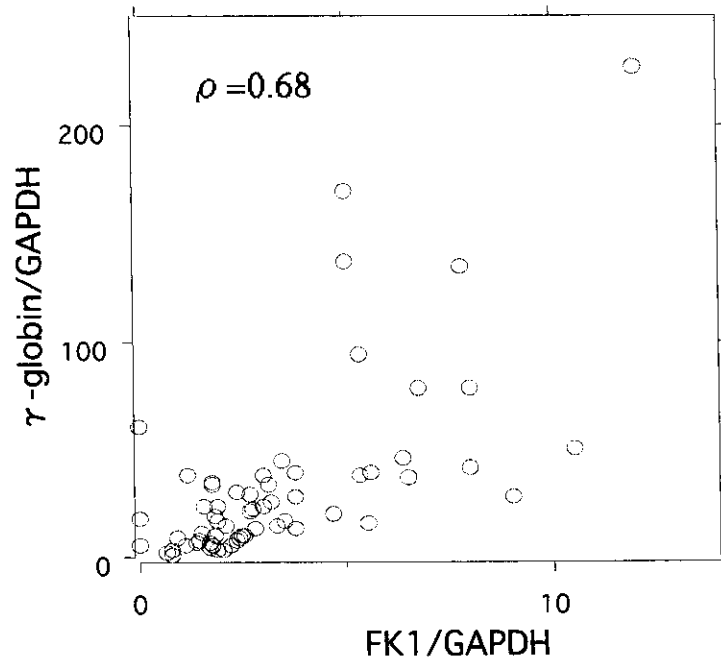


図1 FKLF/GAPDH と γ globin/GAPDH mRNA 発現の相関

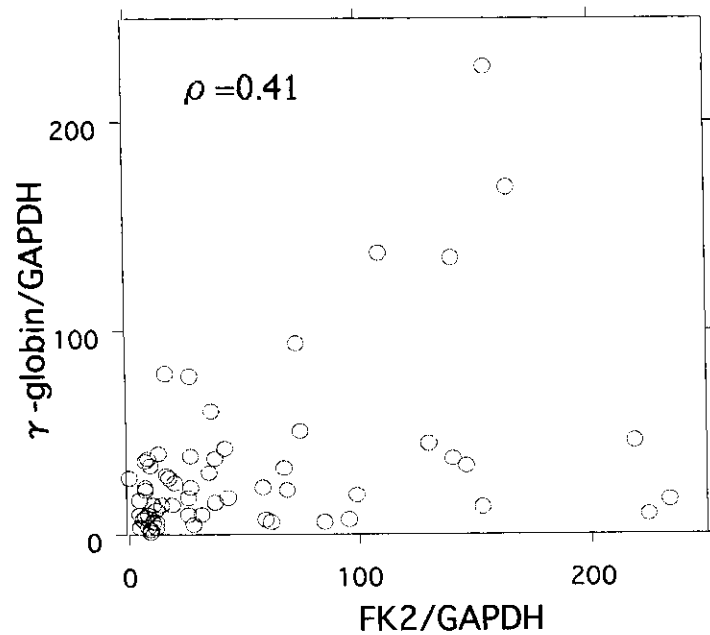


図2 FKLF-2/GAPDH と γ globin/GAPDH mRNA 発現の相関

TPA による単球分化における PI3-K/Akt1 経路の役割

石田 陽治、檜澤 大樹

(岩手医科大学第3内科血液部門)

[はじめに]

骨髓異形成症候群 (MDS) では、単球・マクロファージにおける接着分子の発現や貪食能の低下などの機能異常が報告されている。しかし、単球分化におけるシグナル伝達機構は解明されていない部分が多い。本研究では単球分化におけるシグナル伝達経路を解明するために、単球性白血病細胞株および MDS より進展したと考えられる単球性白血病 (M5) 患者より得た白血病細胞を TPA にて分化誘導した際のシグナル伝達について解析した。

[対象と方法]

AML (M5) with tri-lineage dysplasia (TLD) の患者より、説明と同意のもとにヘパリン採血した白血病細胞 (M5 細胞) および単球性白血病細胞株 U937 を TPA (5nM) にて刺激し、PBS で洗浄した後回収した。1% NP-40 lysis buffer にてタンパクを可溶化し全タンパク抽出液とし、免疫沈降およびウエスタンブロットに用いた。細胞分画は、U937 を 0.05% NP-40 hypotonic buffer にて 5 分間処理した後 160Kg で超遠心し上清を細胞質 (cytosol 分画) とした。沈渣を 1% NP-40 lysis buffer にて可溶化し細胞膜分画とし、それぞれをウエスタンブロットに用いた。抗 Akt1 ヤギポリクローナル抗体による免疫沈降物複合体と Crosstide を [γ - 32 P] ATP の存在下でインキュベートし、Crosstid に取り込まれた ATP 量を液体シンチレーションカウンターにて測定した。抗 p85 ラビットポリクローナル抗体による免疫沈降物複合体と phosphatidylinositol (PI) を [γ - 32 P] ATP の存在下でインキュベートし、薄層クロマトグラフィーにより展開し、リン酸化された PI (PIP) の量を測定した。抗 ILK ラビットポリクローナル抗体による免疫沈降物複合体と GST-Akt-kinase dead (KD) を [γ - 32 P] ATP の存在下でインキュベートし SDS-PAGE で分離し、オートラジオグラフィーにて ILK の自己リン酸化を解析した。HA タグ付き野性型 Akt1 (HA-Akt1-wt) および Src 膜局在シグナルを N 末端に、HA タグを C 末端に付加した、細胞膜局在型/恒常活性型の Akt1

(Myr-Akt1-HA) をリポフェクション法にて U937 に遺伝子導入し、G418 添加によって安定発現株を得た。単球分化および細胞死の解析にはフローサイトメーターを用いた。

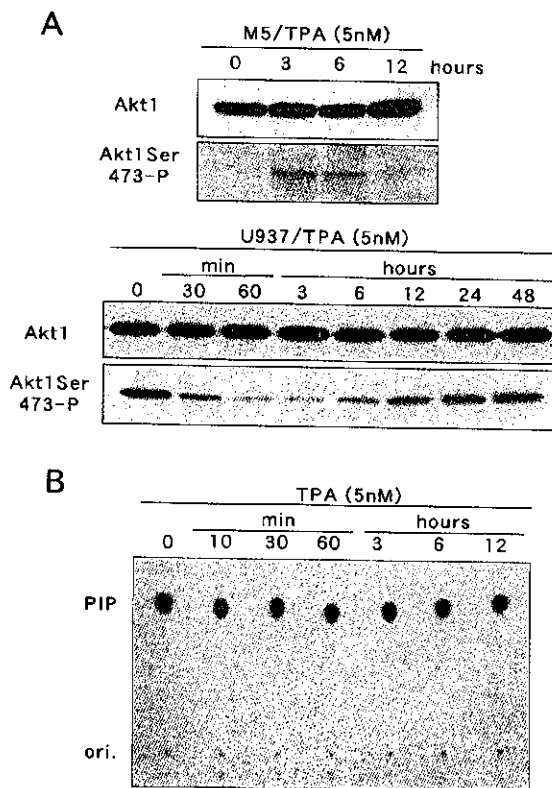


図1 TPA 刺激による (A) M5 細胞および U937 における Akt1 Ser473 のリン酸化の変化 (B) U937 における PI3-K 活性の変化

[結果]

M5 細胞および U937 では、TPA 刺激後に細胞接着、マクロファージ様の形態変化および PI3-K 非依存性の Akt1 Ser 473 のリン酸化と kinase 活性の増大が観察された。U937 では、リン酸化に先立って定常状態でも Akt1 Ser 473 のリン酸化がみられたが、TPA 刺激によって速やかに脱リン酸化された。(図 1) TPA のターゲットである PKC δ と、Akt1 Ser 473 脱リン酸化酵素である PP2A は構造的に会合しており、TPA 刺激による PKC δ の細胞膜移行にともなって解離した。PKC δ の阻害剤である rottlerin により、単球・マクロファージへの分化は阻害され、Akt1 Ser 473 の脱リン酸化も阻害された。PP2A の阻害剤である okadaic acid は Akt1 Ser 473 の脱リン酸化を濃度依存性に阻害した。(図 2) 恒常活性型 Akt1 を過剰発現させた U937 では、Akt1 Ser 473 の脱リン酸化は認められず TPA 刺激に対して不応性であった。(図 3) Akt1 Ser 473 kinase である ILK は、TPA 刺激後に

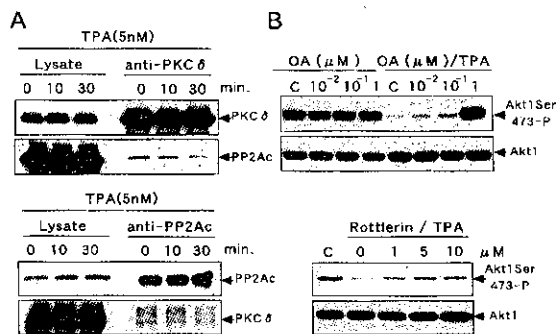


図2 TAP 刺激による (A) U937における PKC δ と PP2A catalytic subunit との会合 (B) okadaic acid (OA) および rottlerin による Akt1 Ser473 の脱リン酸化の阻害

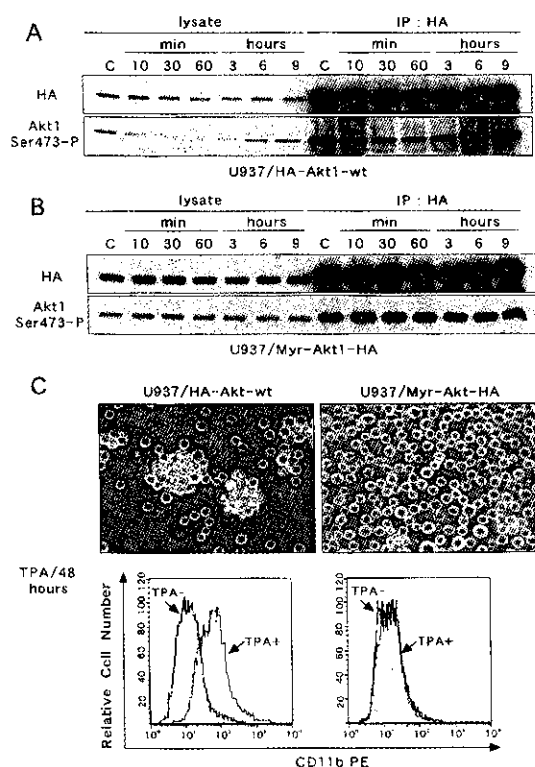


図3 (A) 野生型 Akt1 (HA-Akt-1) および (B) 恒常活性化型 Akt1 (Myr-Akt1-HA) 安定発現 U937 における TPA 刺激後の Akt1 Ser473 のリン酸化の変化および (C) 細胞形態と細胞表面 CD11b の発現の変化

自己リン酸化され、同時に cytoplasmic p21^{wal1/Cip1} の発現が誘導されたが、細胞接着を攪拌により阻害すると ILK の自己リン酸化と Akt1 Ser 473 のリン酸化は阻害され、cytoplasmic p21^{wal1/Cip1} の発現は誘導されなかった。フローサイトメーターによる細胞周期の解析では細胞死 (anoikis) が観察された。(図 4)

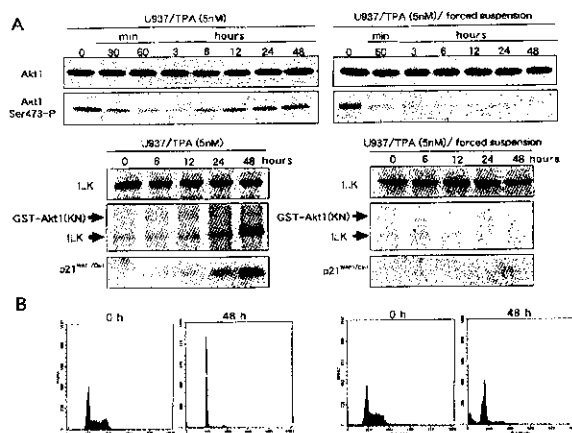


図4 (A) TAP 刺激による細胞接着を阻止した場合の Akt1、ILK のリン酸化の p21^{wal1/Cip1} の発現の変化および (B) 細胞周期の変化

[考案・結果]

TPA の単球性白血病細胞に対する分化誘導作用は、患者細胞でも細胞株でも認められ、単球分化のシグナル伝達の解析や分化誘導のターゲットの発見に有用だと考えられる。これまで、細胞分化と PI3-K/Akt1 経路の関わりについては明らかではなかったが、M5 細胞では TPA による Akt1 Ser473 のリン酸化がみとめられ、U937 の単球分化のモデルでは、PKC δ の細胞膜移行による PP2A との解離および、PP2A の活性化によると考えられる Akt1 Ser473 の脱リン酸化による速やかな不活化が、同残基のリン酸化に先立ってみとめられた。分化誘導による細胞接着を阻止すると、Akt1 Ser 473 kinase である ILK の自己リン酸化と Akt1 Ser473 のリン酸化が阻害された。ILK は integrin からシグナルを細胞内に伝える働きを有しており、integrin からの outside-in のシグナルが ILK を経て Akt1 Ser473 をリン酸化し、過去に報告にあるように IKK/I κ B を経て、NF κ B を活性化することで cytoplasmic p21^{wal1/Cip1} の発現が誘導され、分化した細胞の生存に寄与している可能性が示唆された。MDS での単球・マクロファージの機能異常には上記のシグナル伝達経路の異常が関与している可能性があり、単球系へ白血化した際の maturation arrest にも関与している可能性があると考えられた。

[文 献]

1. Pennington KN, et al, Mol Cell Biol, 21, 1930, 2001
2. Deszo EL, et al, J Biol Chem, 276, 10212, 2001

続発性白血病における AML1 遺伝子変異の関与

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]

近年悪性腫瘍に対する治療強化と生存期間延長に伴い、続発性骨髄異形成症候群 (MDS) や急性骨髄性白血病 (AML) の患者数が増加傾向にある。また、われわれは広島原爆被爆者が被爆後数十年を経て MDS を高頻度に発症することを明らかにしてきた。続発性白血病/MDS は造血幹細胞レベルで複数の遺伝子異常により発症すると考えられているが、われわれは原因となる遺伝子異常を分析するなかで AML1 遺伝子に注目した。AML1 は造血に必須の転写因子で、白血病において最も高頻度に染色体転座による融合遺伝子 (キメラ) を発現するが、点突然変異も低頻度 (5%以下) ながら MDS や AML の発症に関与していると報告されている。そこで、原爆被爆後の MDS 症例および固形腫瘍や慢性骨髄増殖性疾患に対して化学療法や放射線療法を施行した後に発症した MDS/AML 症例における AML1 遺伝子の点突然変異を検索した。

[対象と方法]

患者サンプル (骨髄液または末梢血) から単核球を分離して DNA を抽出した。AML1 遺伝子第 3、第 4、第 5 エクソンそれぞれの PCR プライマーを作製し、PCR-SSCP 法を用いて DNA 変異のスクリーニングを行った。異常バンドの見られた症例は、PCR 産物の遺伝子配列を明らかにした。更に AML1 変異の見られた症例では、第 3～5 エクソンの RT-PCR を行って遺伝子配列を決定し、cDNA での AML1 変異を確認した。

[結 果]

1. MDS 患者症例における AML1 遺伝子の点突然変異を検索したところ、既報の症例では 228 症例

中 7 例 (3.1%) に変異が認められたが、自験例では 87 例中 8 例 (9.2%) とやや高率であった。このうち、広島原爆被爆者で低線量被曝を受けたと推測される MDS 13 例中 6 例 (46%) に点突然変異を認めた (ミスセンス 3 例、ノンセンス 1 例、サイレンス 2 例)。一方、非被爆者 (散発性) の MDS では 74 例中 2 例 (2.7%) に変異を認めるのみでこれまでの報告と同程度の頻度であった。また、血液学的に異常を認めない近距離被爆者 (1 km 以内) 8 例では、AML1 の変異を認めなかった。毒ガス曝露症例ではノンセンス変異を認めた。尚、これまで検討した 297 例中サイレンス変異は原爆被爆者の 2 例のみであった (表 1)。

表 1 MDS における AML1 遺伝子の点突然変異

Subtypes of MDS	Previous studies					This study		
	Osato (1999)	Song (1999)	Praudhomme (2000)	Imai (2000)	Nakao (2001)	total	A-Bomb	
MDS RA	0		0/13	0/18		1/24	1/4	0/20
RAEB	0		0/4	0		0/1	0/0	0/1
RAEBt	0		0/23	0/2		0/21	0/1	0/20
RAEBt	0		0/27	0/5		0/24	4/7	2/17
CMML	0		0/27	1/2		0/4	0/0	0/4
MDS-Leukemia	0/6			1/10		1/13	1/1	0/12
Total	0/6 (0%)	1/14 (7.1%)	0/94 (0%)	2/37 (5.4%)	4/77 (5.2%)	8/87 (9.2%)	6/13 (46%)	2/74 (2.7%)

p<0.0001

2. 次に、悪性腫瘍に対して化学療法・放射線治療が行われた後、MDS/AML を発症した 3 例について AML1 の点突然変異を検索した (表 2)。3 例中 2 例 (67%) にミスセンス変異を認めた。神経膠芽状細胞腫に対して化学療法と大量放射線療法 (124Gy) を発症後 10 年間繰り返された RAEBt 症例と悪性リンパ腫 (B 細胞) に対して超大量化学療法施行 4 年後に発症した AMLM0 症例であった。両症例ともトポイソメラーゼ阻害剤が使用されていた。

表 2 続発性白血病/MDS における AML1 遺伝子の突然変異率

Diseases	Frequency of AML1 mutation
MDS among atomic bomb survivors	6/13 (46%)
Therapy related MDS/AML	2/3 (67%)
Leukemia secondary to MPD	3/7 (43%)

3. 更に、慢性骨髄増殖性疾患及び特発性造血器疾患 77 例について AML1 の点突然変異を検索した。慢性期症例 (骨髄線維症 13 例、本態性血小板血症 21 例、真性多血症 12 例、発作性夜間血色素尿症 1 例、非典型 MPD 1 例)、および慢性骨髄性白血病

(慢性期19例、急性転化2例)では変異を認めなかったが、MPDからの白血病化7例中3例(43%)にミスセンス変異2例とノンセンス変異1例を認めた。3症例とも長期間(5-12年)慢性期にアルキル化剤を投与され、また骨髓線維症症例は巨大脾腫に放射線治療(40Gy)を受けていた。3症例中、検索し得た慢性期2例においてAML1の点突然変異は認められず、また2例は白血病化時に染色体異常はなくAML1の点突然変異だけが認められた遺伝学的異常であった。

4. 続発性AML/MDSの23症例中11例(48%)にAML1の点突然変異を認め、G42R変異以外の変異はDNA結合及びCBF β とヘテロダイマーを形成する結合領域であるラントドメインに位置していた(図1)。今回検索した症例において、21番染色体や11q23染色体の異常を有するものはなく、またAMLにおいてC/EBP α の点突然変異の存在が知られているが、C/EBP α 全領域に変異は認められなかった。

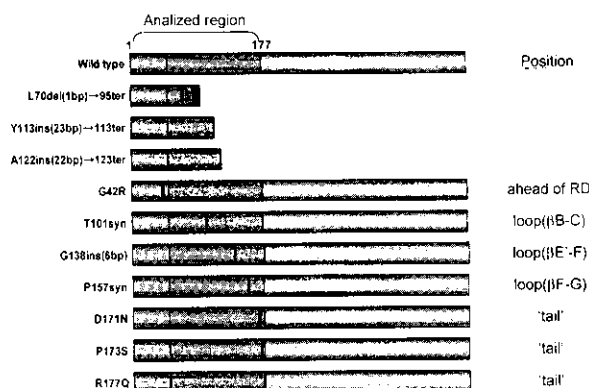


図1 AML1 遺伝子の点突然変異部位

[考案・結論]

1. 原爆被爆後、各種固形腫瘍や白血病の発症率が増加したことはよく知られている。原爆による放射線誘発白血病の発症は2-3年の潜伏期間ののち6-7年後にその発症がピークとなるが、放射線誘発固形腫瘍の場合は10年以上の潜伏期間があると言われている。我々は、原爆被爆者が被爆後数十年を経てMDSを高頻度に発症することを明らかにしてきた。また、一般に、化学療法を受けた長期生存者の5-17%に治療関連白血病/MDSが認め

られている。続発性白血病/MDSにおける基本メカニズムとして、DNA合成やミスマッチ修復のようなDNA修復の制御に関与する遺伝子の突然変異、染色体の不安定性誘発などが考えられている。一方、AML1は治療関連の転座型白血病において高頻度の標的遺伝子であるが、今回続発性白血病/MDSにおいてAML1の点突然変異が関与していることが明らかになった。AML1遺伝子の半数機能不全が高率に白血病に移行する先天性血小板異常症(FPD/AML)の素因であることが示され、散発性AMLにおいてもAML1の点突然変異を認めている。続発性白血病/MDSのひとつの発症プロセスにAML1の点突然変異が存在するといえる。AML1遺伝子変異がMDSやAML発症に果たす役割の上で、化学療法や放射線曝露によるDNA損傷とAML1点突然変異の関連がひとつの鍵を握っていることが示唆された。

2. AML1はラントドメインのループ(β A'-B)(77-84)、ループ(β E'-F)(139-145)、及びテール(170-177)を含む3領域で直接DNAと結合する。ラントドメイン内で終了する突然変異タイプ(95ter、113ter、123ter)はその機能が消失(不全)していると考えられるが、DNAと直接結合する3領域に変異を有するタイプ(G138ins、D171N、P173S、R177Q)はヘテロダイマー形成能が残っており正常AML1に対して拮抗的に働くと推測される。更に、白血病化におけるAML1変異体の生物学的役割の解析が必要である。

[文献]

1. Song W-J, et al, Nat Genet, 23,166, 1999
2. Bravo J, et al, Nat Struct Biol, 8, 371, 2001

造血器悪性腫瘍に対する 骨髄非破壊的造血幹細胞移植の試み

原田 実根、下田 和哉、権藤 久司

(九州大学 第一内科)

増田 浩三、池田 和真、品川 克至、

谷本 光音 (岡山大学 第二内科)

〔はじめに〕

同種造血幹細胞移植は、予後不良の造血器悪性腫瘍に治療をもたらさうる治療である。しかし、大量の抗癌剤・放射線による骨髄破壊的治療による治療関連毒性 (RRT) のために、高齢者や臓器障害のある症例を適応とすることはできないと考えられてきた。しかしながら、同種造血幹細胞移植の抗腫瘍効果において、骨髄破壊的治療の他に、移植細胞による腫瘍細胞に対する抗腫瘍免疫機能が大きな役割を果たしていることが明らかとなってきている¹⁾。高年齢や臓器障害を持つ症例において、移植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¹⁶⁻¹⁹⁾。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 らのプロトコールにおける cyclophosphamide 投与量を半量とした移植前治療を基本として、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〕

対象は、予後不良の AML 4 例、NHL 4 例、MDS 3 例、ALL 1 例の合計12例で、年齢中央値 58 (17~68) 歳、男性 6 例、女性 6 例で、骨髄非破壊的同種移植を行った理由は、高年齢が 6 例、高年齢で自家移植後が 2 例、同種移植後が 1 例、臓器障害が 3 例であった。同種末梢血幹細胞採取、移植前治療、GVHD 予防は原則として、以下の

方法で行った。同種末梢血幹細胞採取：インフォームドコンセントを得た HLA 一致同胞に、 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 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。移植前治療：フルダラビン $25\text{mg}/\text{m}^2/\text{day}$ を 5 日間、サイクロフォスファミド $30\text{mg}/\text{kg}$ を 2 日間投与。GVHD 予防：シクロスポリン A とメソトレキセートを投与。移植前治療として、ALL 不応 1 例、AML 再発 1 例にブスルファンを、マントルリンパ腫不応 1 例に Rituximab を追加し、AML 再発 1 例に FLAG/IDA 療法を用いた。ドナーの中央値は、50 (21~63) 歳、男性 5 例、女性 7 例であった。

〔結 果〕

ドナーから採取できた CD34 陽性細胞数の中央値は $3.9 (0.8\sim 8.6) \times 10^6/\text{kg}$ で、1 回目の採取において血管迷走神経反射のため 0.8×10^6 の CD34 陽性細胞しか採取できなかったドナーからは、4 週間後に骨髄から 1.2×10^6 の CD34 陽性細胞を含む幹細胞を採取した。移植した CD34 および CD3 陽性細胞数の中央値はそれぞれ、 $4.0 (1.8\sim 4.9) \times 10^6/\text{kg}$ 、 $4.0 (1.3\sim 6.0) \times 10^8/\text{kg}$ で、好中球 $>500/\mu\text{l}$ 、血小板数 $>2 \text{万}/\mu\text{l}$ までの回復に要した日数の中央値はそれぞれ、14 (7~18) 日、10 (8~30) 日であった。ほぼ 2 週間間隔で行ったキメリズム解析でドナータイプが 85% を越えたのは、day7、day28、day46 がそれぞれ 1 例、day14 が 8 例で、85% に達する前に悪性細胞が増殖した症例が 1 例であった。ドナーリンパ球輸注は、生着促進、再発予防、再発治療を目的としてそれぞれ 1 例ずつ施行された。Common Toxicity Criteria の grade 3 以上の移植関連副作用として、幹細胞輸注時の血圧上昇 (grade 3) (1 例)、抗真菌剤による肝障害 (grade 3) (1 例) がみられた。II 度以上の急性 GVHD は 5 例 (II 度：1 例、III 度：4 例) にみられた。観察期間中央値は 129 (41~4430) 日で、3 例が原病の悪化で day150、day107、day60 で、1 例が急性 GVHD と引き続く感染症により day54 で死亡し、5 例が完全寛解 (day394+、day317+、day256+、day188+、day77+) を維持し、3 例が原病の治療を続けている。

[考案・結論]

今回用いたプロトコルによる骨髄非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た。一部の症例では、一過性あるいは持続的な混合キメラとなる症例もあったが、多くの症例で完全キメラを得ることができた。急性 GVHD は比較的高頻度に発生したが、1例を除きコントロール可能で、治療不応例や再発例においても、完全寛解を得られる症例があった。しかしながら、急性 GVHD により死亡した症例も1例あり、持続的な抗腫瘍効果が得られている症例では、慢性 GVHD を発症しており、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 MM, et al, Blood 75, 555, 1990
2. Gale RP, et al, Ann Intern Med 120, 646, 1994
3. Kolb HJ, et al, Blood 86, 2041, 1995
4. Collins RH, et al, J Clin Oncol 15, 433, 1997
5. Giralt S, et al, Blood 89, 4531, 1997
6. Khouri IF, et al, J Clin Oncol 16, 2817, 1998
7. Slavin S, et al, Blood 91, 756, 1998
8. Sykes M, et al, Lancet 353, 1755, 1999
9. Childs R, et al, Blood 94, 3234, 1999
10. Carella AM, et al, J Clin Oncol 18, 3918, 2000
11. Childs R, et al, N Engl J Med 343, 750, 2000
12. Weissinger F, et al, Blood 98, 3584, 2001

IV 骨髓纖維症

原発性慢性骨髄線維症新規登録症例の 臨床像と移植症例の解析

仁保 喜之 (国家公務員共済組合連合会千早病院)
岡村 孝 (久留米大学医学部第2内科)
高瀬 謙、下田 和哉、権藤 久司、
原田実根 (九州大学研究院病態修復内科学)

原発性慢性骨髄線維症は、造血幹細胞のクローナルな異常増殖により、反応性に全身骨髄の線維化およびそれに伴う髄外造血がみられる慢性骨髄増殖性疾患の一型である。日本におけるこの疾患の臨床像に関しては、1997年に厚生省特定疾患研究事業造血障害分科会(会長：溝口秀昭教授)により全国アンケート調査を行い、その結果を報告した¹²⁾。それに引き続き臨床像の解析および唯一の生命予後を改善させる治療と考えられている同種造血幹細胞移植術につき、本邦での実態調査を行った。

〔臨床病態〕

調査を行った1999年から2001年の3年間で新たに発生した骨髄線維症患者は92例であり、本邦では年間約30例の新規患者が発症している。発症年齢は平均で63歳(中央値61歳)、男女比2.07と男性に多く、診断時に主訴を有していた症例は53%であり、合併症を44%に有していた。Hb 9.5 ± 8.6 g/dl、WBC $13,700 \pm 24,310 / \mu\text{l}$ 、Plt $20.2 \pm 18 \times 10^4 / \mu\text{l}$ であった。

1999年から2001年の3年間に新たに発生した骨髄線維症92例のうち、60例に染色体分析が施行され、結果が得られた57例の解析では、32例が正常核型であり、25例(43%)に異常が見られた。+8が4例、13q-、20q-、der(1;7)(q10;p10)が3例ずつに見られており、複雑核型異常を呈する例もあった。

染色体20q-および13q-は比較的骨髄線維症に特異的であり、その切断点は20q11.2-13.1および13q12-22と同定されている。しかし、この欠失部に位置し、本疾患発症と直接関係する遺伝子およ

びその機能は依然として未知であり、病態との関連も不明である。これらの部位の欠失は原発性の骨髄線維症のみではなく、真性赤血球増加症(PV)や本態性血小板血症(ET)由来の骨髄線維症にもみられ、頻度は低い骨髄異形成症候群(MDS)でもみられる異常である。また、+8、およびt(1;7)などはMDSでも頻度の高い染色体異常である。これらのことは、骨髄線維症で見られる染色体異常は疾患特異的でなく、骨髄増殖性疾患やMDSなどとの生物学的相似性を示すものと思われる。

染色体異常の存在は、予後不良予測因子の一つであるとの報告が多かったが、われわれが1997年に施行した日本でのアンケート調査結果では、染色体異常と予後の相関はなく、予後不良として同定された因子は、性(男性)、年齢(>60歳)、Hb(<10g/dl)、血小板数(<100,000/ μl)、白血球数(<3,000/ μl および>30,000/ μl)および末梢血芽球5%以上であった¹²⁾。本調査に登録された92例をprospectiveにfollowすることにより、前回抽出された予後因子の妥当性と、我が国における骨髄線維症での染色体異常と予後の相関を明らかにする必要がある。

〔治療〕

原発性慢性骨髄線維症については、造血幹細胞移植以外に特異的な治療がなく、またある程度の長期生存が望めることから対症療法が主体であり、症状が軽く、重篤な合併症のない場合は無治療で経過をみることが多い。唯一の生命予後を改善させる治療と考えられている同種造血幹細胞移植術につき、本邦での実態調査を行った。

9施設で17例の移植症例があった。1993年に1例施行されているが、残りの16症例は1997年以降に移植が行われており、特に2000年5例、2001年4例と近年に主に行われている。平均年齢は49.0歳(39-62歳)、中央値は48歳(39-62歳)であり、男性10例、女性7例である。血縁者間移植が15例(骨髄移植9例、末梢血幹細胞移植6例)、非血縁者間骨髄移植が2例である。血縁者間末梢血幹細胞移植の1例でHLAが1座不一致であった以外

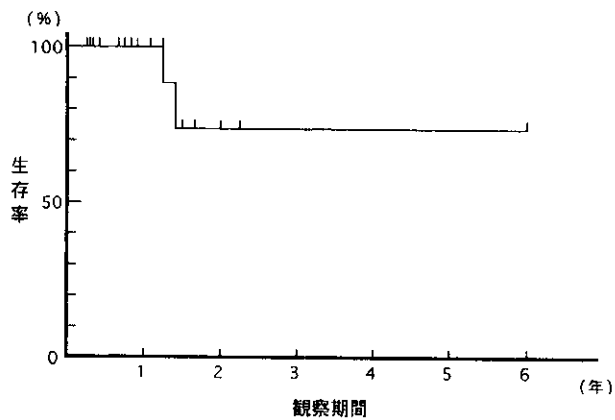


図 myelofibrosis に対する移植後の生存率

は、全例 HLA 一致のドナーから移植を受けている。移植前治療は、BU を含むレジメが 9 例、TBI を含むレジメが 6 例である。GVHD 予防は 13 例が CyA + short term MTX、3 例が FK506 + short term MTX、1 例が FK506 のみで行われている。血小板の生着が認められなかった移植後 450 日で死亡した 1 例を除いて全例生着が認められており、中央値 17 日である。17 例中 10 例に急性 GVHD が認められ、grade I が 2 例、grade II が 7 例、grade III の GVHD が 1 例生じている。17 例中 15 例が生きており、2 年推定生存率 73% (観察期間中央

値 15 ヶ月) である。死亡した 2 例は、それぞれ移植後 510 日、450 日で死亡しており、死因は慢性 GVHD と多臓器不全、肺炎である。骨髄の線維化は、評価可能な 14 例中 10 名で消失、4 名では造血は回復しているにも関わらず残存していた。Guardiola らの 66 例の解析では、原発性慢性骨髄線維症に対し移植を受けた 45 歳以上の患者の 5 年生存率はわずか 14% であり 45 歳未満の患者の 5 年生存率が 62% であることを考えると、同種移植適応を考えるとときに年齢は重要な因子となると報告している³⁾。今回の調査では、17 例中 13 例が 45 歳以上であり、50 歳以上も 8 例存在した。個々の症例の全身状態に依存すると思われるが、海外の報告と異なり、本邦ではもっと高齢者にまで移植の適応を考えて良いと思われる。

[文 献]

1. Okamura T, et al, Int J Hemat. 73, 194, 2001
2. 岡村孝 他: Annual Review 血液, 2002 (中外医学社) (印刷中)
3. Guardiola P, et al, Blood 93, 2381, 1999