

151,2002

3. Ohga S, Kojima S et al: Treatment responses of childhood aplastic anaemia with chromosomal aberrations at diagnosis. Br J Haematol. 118: 313, 202

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

微少 PNH 血球陽性骨髄不全患者の病態解析： クロナリティと免疫抑制療法に対する反応性

中尾 眞二¹、石山 謙¹、中条 達也¹、小峰 光博²

金沢大学大学院医学系研究科 細胞移植学¹、昭和大学藤が丘病院 内科血液²

研究要旨 骨髄不全における微少 PNH 血球と顆粒球造血のクロナリティとの関係を検討したところ、PNH 血球増加 (PNH⁺) 例ではクロナリティを示す例の割合が再生不良性貧血患者 (21 %対 43 %)、MDS 不応性貧血患者 (0 %対 45 %) とともに非増加 (PNH⁻) 例に比べて有意に低かった。クロナリティ陰性患者の ATG+CyA 療法に対する反応性 (74 %) は陽性患者 (33 %) より有意に高かった。以上の結果から、PNH⁺ 骨髄不全では造血は多クローン性であり、免疫病態が存在することが示唆された。

A. 研究目的

再生不良性貧血 (AA) と骨髄異形成症候群 (MDS) は血球減少を主徴とする症候群である。基本的な病態は、AA が何らかの免疫学的機序による良性の造血障害であるのに対し、MDS は異常造血幹細胞によるクローン性の造血障害であると考えられている。しかし、MDS は主に形態に基づいて診断されるため、両者の鑑別は主治医の主観的な判断に委ねられている。今のところ両者の病態を区別する確かなマーカーは存在しない。

MDS 症例の中でも、微少の PNH 血球を認める不応性貧血 (RA) 例の多くは、AA と同様の良性の経過をたどる¹。しかし、PNH 血球の増加は、*PIG-A* 遺伝子に変異を持つ異常造血幹細胞の増加を意味しているため、GPI アンカー膜蛋白欠損のない非 PNH 型造血幹細胞にも遺伝子異常がある可能性がある^{2,3}。そこで今回我々は、PNH 血球の有無による造血の質の違いを評価するために、多数の骨髄不全症例について、ヒトアンドロゲンレセプター (*HUMARA*) 遺伝子の不活化現象を利用することにより、末梢血顆粒球中にクローン性の細胞集団 (クロナリティ) があるか否かを検討し、さらにクロナリティの有無と免疫抑制療法に対する反応性との関係を検討した。

B. 研究方法

表 1 に患者背景を示す。EDTA 加末梢血 2 ~ 10 ml から、Ficoll-Hypaque を用いて単核球と顆粒球を分離した。単核球からはプラスチックプレー

ト・SRBC を用いて T 細胞を精製した。顆粒球・T 細胞のそれぞれから DNA を抽出し、一部は *HhaI* にて酵素処理を行った。*HhaI* 処理および未処理 DNA を、蛍光標識 (6-FAM) したプライマーを用いて増幅し、その産物を ABI-Prism 310 で電気泳動した⁴。増幅された各アレルの DNA 量を gene scan にて測定後、顆粒球・T 細胞それぞれにおける X 染色体不活化パターン (X chromosome inactivation pattern; XCIP) の偏りを算定した。

C. 研究成果

1. 出現するアレルの解釈とクロナリティの判定基準

表 1 患者背景

Diagnosis	Number of patients	Age (median)
Aplastic anemia	68	12-86 (53)
moderate	42	
severe	26	
Myelodysplastic syndrome refractory anemia	44	17-88 (71)
refractory anemia with excess of blasts	4	37-78 (65)
Acute myeloid leukemia	4	29-65 (46)
Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria	4	37-51 (46)

出現するアレルを図 1 のように A、B、A'、B' と定め、XCIP の偏りの程度を $C = (A/B) / (A'/B')$ で表した。

健常者の顆粒球と T 細胞における XCIP の偏り

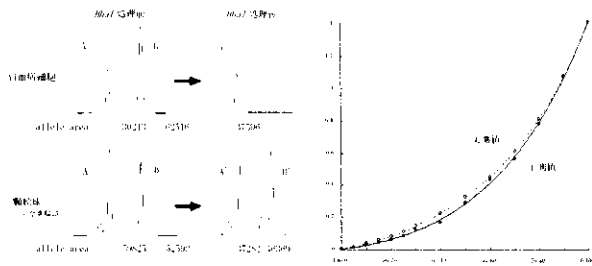


図1 HUMARA アッセイにより出現するアレルとクローン性造血の検出精度

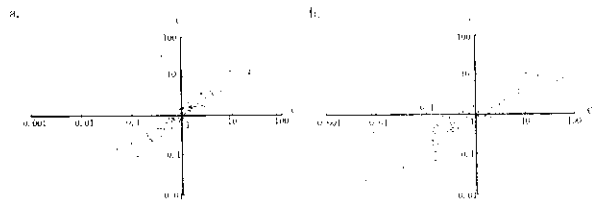


図2 健常者顆粒球とT細胞におけるXCIPの関係

の関係を図2に示す。70歳未満の比較的若年者(図2a)では、顆粒球・T細胞間でXCIPの偏りに正の相関がみられた。したがって、T細胞を対照とすることにより、顆粒球における生理的および加齢に伴うXCIPの偏りを補正できると考えられた。このため、顆粒球におけるC値(Cg)とT細胞におけるC値(Cl)との比(Cg/Cl)をとり、それが1より大きく離れている(|logCg/Cl|=S値が大きい)場合にクロナリティがあると判定した。一方、70歳以上の高齢者(図2b)では、両者に相関はみられるものの、加齢に伴う顆粒球の偏りのため、両者の間に解離を認める例が若年者より多かった。このためS値の正常値は、健常者70歳未満群の95%、70歳以上群の90%が含まれるように、70歳未満:S<0.3、70歳以上:S<0.4と設定した。

2. 高感度 HUMARA アッセイによるクロナリティの検出精度

本アッセイによるクロナリティの検出精度を調べるためミキシング実験を行った(図2)。AML患者の白血病細胞由来DNAにHhaI処理を行ったところ、aに示すようにアレルBが完全に消失した。このDNAと、同じ患者の完全寛解時の顆

粒球DNAをさまざまな割合で混合した後にHhaI処理しCg値を求めたところ、図bのように実測値は理論上の値とほぼ一致した。

T細胞に生理的偏りが無い(C_L=1)場合、S=|logCg|となる。したがってbに示す曲線から、S値が異常を示す検体には、70歳未満群で約35%以上、70歳以上群で約45%以上のモノクローナルな細胞集団が含まれていることになる。

3. S値異常(クロナリティ)を示す例の疾患別頻度

骨髄不全患者112人、MDS-RAEB4人、PNH4人におけるクロナリティ解析の結果を示す。RAEB例、PNH例では全例でS値は異常高値を示した。

表2 S値異常(クロナリティ)を示す例の割合

Diagnosis	70歳以上	70歳未満
AA	18/51 (35%)	4/17 (24%)
MDS-RA	4/22 (18%)	9/22 (41%)
MDS-RAEB	2/2 (100%)	2/2 (100%)
PNH	4/4 (100%)	-

4. 健常者及び骨髄不全患者におけるPNH顆粒球の割合とクロナリティ

AA群の49%、RA群の34%に有意(≥0.005%)なPNH血球の増加が見られた。クロナリティを示す(クロナリティ陽性)患者の多くはPNH-群に含まれていた。

5. PNH血球増加・非増加例別にみたS値異常の頻度

PNH血球増加例・非増加例の間でS値の分布を比較したところ、70歳未満の比較的若年群ではAA(51例)、RA患者(22例)ともにPNH血球増加群の方が非増加群よりもポリクローナルな造血を示す例の割合が有意に高かった(AA:16% vs 47%、RA:0% vs 33%)。また70歳以上の高齢者においても、RA群(22例)では同様の傾向が認められた(0% vs 53%)。

6. クロナリティの有無と免疫抑制療法の奏効率との関係

AA 42 人、RA 15 人の計 57 人に対して行われた ATG+CyA あるいは CyA 単独による免疫抑制療法の奏効率をクロナリティの有無で比較したところ、ATG+CyA 療法を受けた例では、クロナリティ陰性例の方がクロナリティ陽性例より奏効率が有意に高かった (83 % vs 36 %)。また、PNH 血球増加例 (PNH⁺) の中でも、クロナリティ陰性例は陽性例に比べて免疫抑制療法の奏効率が有意に高かった (96 % vs 67 %)。

D. 考 察

キャピラリーシーケエンサーにより定量性を向上させ、顆粒球の XCIP の偏りを T 細胞の XCIP の偏りで補正することにより、70 歳未満では約 35 %、70 歳以上の高齢者では約 45 % 以上のモノクローナルな細胞集団がある「クロナリティ陽性」例を、それ以外の「クロナリティ陰性」例と区別することができた。クロナリティ陽性例の頻度は、PNH⁺AA 患者では 21 % であったのに対し、PNH⁻AA 患者では 43 % と、微少 PNH 血球を認めない群で有意に高率であった。同様の傾向は不応性貧血患者でも認められた (0 % vs 45 %)。免疫抑制療法の奏効率は、クロナリティ陰性群が陽性群に比べて有意に高かった。また、微少 PNH 血球陽性群では陰性群に比べて有意に奏効率がよく、その中でもクロナリティが検出されなかった群では免疫抑制療法の奏効率が特に高かった。

E. 結 論

- ・骨髄不全症例における微少 PNH 血球の存在は、クローン性の造血障害とは無関係であり、むしろ多クローン性造血と関連している。
- ・微少 PNH 血球に加えてクロナリティを検索することは、骨髄不全患者の免疫抑制療法に対する反応性を予測する上で有用と思われる。
- ・これらのマーカーの意義を明らかにするためには、プロスペクティブ研究が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Wang H, et al.: Clinical significance of a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells in bone marrow failure syndrome. *Blood* 100, 3897-3902, 2002
2. Miura Y, et al.: Cytokine and chemokine profiles in autologous graft-versus-host disease (GVHD): interleukin 10 and interferon gamma may be critical mediators for the development of autologous GVHD. *Blood* 100, 2650-2658, 2002
3. Ishiyama K, et al.: Aplastic anaemia with 13q-: a benign subset of bone marrow failure responsive to immunosuppressive therapy. *Br J Haematol* 117: 747-750, 2002
4. Takami A, et al.: Chronic graft-versus-host disease following allogeneic peripheral blood and bone marrow stem cell transplants: a single center experience. *Haematologica* 87, 664-666, 2002
5. Takami A, et al.: Relapse of chronic myeloid leukemia (CML) in lymphoid crisis after allogeneic bone marrow transplantation for CML in chronic phase with busulfan plus cyclophosphamide regimen. *Haematologica* 87, 659-661, 2002

2. 学会発表

1. Chuhjo T, et al. Ribosomal Protein L14: An Autoantigen in Immune-Mediated Aplastic Anemia. *Blood* 2002; 100: 189a.
2. Ishiyama K, et al. Polyclonal Hematopoiesis Is Maintained in Bone Marrow Failure Patients Harboring a Minor Population of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria-Type Cells: Analysis of Clonality with an Improved HUMARA Assay. *Blood* 2002; 100: 231a.
3. Sugimori C, et al. Aplastic Anemia and Refractory Anemia with the HLA-DR15 Haplotype: A Bone Marrow Failure Syndrome Caused by Common Immune-Mechanisms. *Blood* 2002; 100: 233a.

G. 知的所有権の取得状況

なし

H. 参考文献

1. Wang H, et al, Blood 100: 3897, 2001
2. Maciejewski JP, et al, Br J Haematol 115: 1015, 2001
3. Jin JY, et al, Br J Haematol 94: 510, 1996
4. Karasawa M, et al, Int J Hematol 74: 281, 2001

間期核 FISH 法を用いた再生不良性貧血における数的染色体異常の解析

別所 正美、矢ヶ崎史治、松田 晃

埼玉医科大学 第一内科

研究要旨 未治療 AA 21 例の骨髓単核球を対象に間期核 FISH 法による、1、6、7、8、17 番染色体の異数性と、分裂期染色体における Premature Chromatid Separation (PCS) の出現頻度との相関を検討した。異数性 (+) 群 (11 例) では PCS は $25.1 \pm 7.5\%$ で、(-) 群の $11.3 \pm 8.9\%$ に比して有意に高かった。また様々な染色体の数的異常が個々の細胞に出現する mosaic aneuploidy を呈していた。内訳では減数性で -7:6 例、-8:1 例、-6:5 例、増数性では +8:4 例、+6:4 例、+1:3 例の順に多く、クローン性疾患移行時に好発する染色体異常に類似していた。AA では染色体分配異常による 6、7、8 番の染色体異数性が発生しやすい病態が存在すると考えられた。

A. 研究目的

我々は、AA において染色体分配異常のマーカーと考えられる premature chromatid separation (PCS)¹ の発生率と 7、6、8 番染色体異数性との間に有意な相関を見出し、AA では染色体分配異常が亢進している可能性を報告してきた²。今回は間期核 FISH 法により、治療前 AA を対象に、解析染色体数を増やして (1、6、7、8、17 番)、AA における染色体異数性を検討し、染色体別に見た染色体異数性と PCS との相関関係を解析した。

B. 研究方法

再生不良性貧血 21 例 (重症 11 例、中等症 10 例) および健常者 5 例の骨髓細胞における染色体異数性と PCS を以下の方法で検討した。CEP7 と 7q31 上の D7S486 に対する dual color probe を cohybridization し間期核 500 個を観察し、両者の signal が一ヶのものを -7 とした。CEP6、CEP8 および CEP1、CEP17 をそれぞれ cohybridization し間期核 200 個における signal 数をカウントした。さらに骨髓液に colcemid $0.01 \mu\text{g/ml}$ を添加し、 37°C 、18 時間培養。常法に従って、低張および固定処理した。上記の FISH 標本における分裂前期から中期の染色体を最低 20 細胞観察し PCS の出現頻度を解析した (1 例のみ、分裂不良の為 8 細胞の観察)。

C. 研究成果

異数性 (+) 群 (11 例) では PCS は $25.1 \pm 7.5\%$ で、(-) 群 (10 例) PCS $11.3 \pm 8.9\%$ に比して有意に PCS が高かった ($p=0.003$) (Fig. 1)。

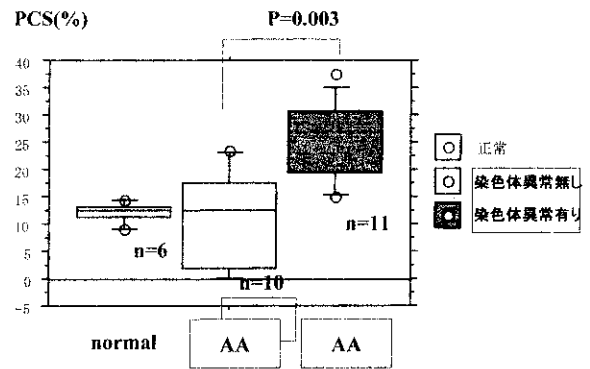


Fig. 1 PCS の発生頻度の分布図

Table 1 染色体異数性と PCS の発生比率 (アンダーラインは健常者対照に比して異数性有りを示す)

RESULTS	Dx	Chr. Abn.	-7	+8	-8	+6	-6	+1	-1	+17	-17	PCS (%)
1. AAs	N.D.		.2	.4	8.2	0.0	3.8	1.0	4.0	0.0	10.0	10.0
2. AAm	N.D.		.2	1.1	3.6	1.1	3.2	3.0	3.0	0.0	10.0	2.0
3. AAs	-1		.6	0.0	9.0	1.0	10.1	1.0	5.0	0.0	12.5	15.4
4. AAs	N.D.		.6	.4	4.3	0.0	7.3	0.0	2.0	0.0	8.0	15.0
5. AAs	N.D.		.6	.5	4.5	1.5	8.5	1.0	3.5	1.0	11.0	7.0
6. AAm	+8/+6/+1/+17		.4	4.2	8.8	2.3	8.3	2.5	3.5	4.0	11.5	37.4
7. AAm	N.D.		.6	0.0	3.3	0.0	3.8	2.0	2.5	0.0	10.6	23.5
8. AAs	-7		1.1	.5	3.5	0.0	4.5	2.5	2.0	1.0	6.0	20.0
9. AAs	N.D.		.8	0.0	4.5	0.0	7.0	1.0	3.5	0.0	11.0	0.0
10. AAm	N.D.		.4	0.0	2.5	0.0	2.0					17.5
11. AAs	+8/-6/-1		.6	2.5	5.5	0.0	15.5	3.5	6.5	0.0	11.5	30.6
12. AAm	+8/+1		.2	1.0	2.8	3.2	3.7	5.0	3.5	3.0	9.0	30.2
13. AAs	N.D.		.4	0.0	9.0	0	13.0	0.0	2.5	0.0	12.5	0.0
14. AAs	-7/+8/+6		1.8	4.0	4.9	3.6	7.1	1.0	4.0	1.5	8.5	19.2
15. AAm	N.D.		.4	0.0	5.0	0.0	8.0	4.0	3.0	.5	14.0	15.0
16. AAs	-7/-6/-17		1.3	.3	8.5	.3	21.5	0.0	3.5	0.0	16.5	27.0
17. AAm	-7/+8/-6/-1		1.8	2.5	7.0	1.5	13.5	1.0	5.0	1.0	12.5	15.0
18. AAm	N.D.		.8	.5	4.4	0.0	5.9	0.0	4.0	0.0	12.0	23.0
19. AAm	-7/-6		1.2	.5	5.5	.5	14.0	3.5	3.5	2.5	11.5	28.0
20. AAs	-8/-6/-1/+17		.4	0.0	12.9	.4	18.4	1.5	5.0	0.0	15.0	33.3
21. AAm	-7/+8/+1		1.9	.8	3.9	1.6	5.4	5.5	3.0	.5	7.0	20.0

N.D.: not detected

Table 1で示すように、様々な染色体の数的異常が個々の細胞に出現しており mosaic aneuploidyを呈していた。異数性の内訳を見ると減数性では-7:6例、-8:1例、-6:5例、-1:4例、-17:2例、増数性では+8:4例、+6:4例、+1:3例、+17:1例であり、clonal complicationの際に好発する-7、+8、+6などの頻度が高かった (Table 2)。PCS と各染色体異数性の出現頻度との関係では、-7、-8を除いて、1、6、8、17番染色体異数性と PCS とに正の相関がある可能性が示唆された (Fig. 2-4)。

Table 2 染色体別に見た異数性の頻度

chr.	%	case	range (%)	normal control (n=5) mean±SD (%)
-7	29	(6/21)	1.1-1.9	0.4 ± 0.2
-8	5	(1/21)	12.9	7.9 ± 2.1
-6	24	(5/21)	14.0-21.5	8.0 ± 0.9
-1	19	(4/21)	5-6.5	3.3 ± 1.0
-17	10	(2/21)	15.0-16.5	10.7 ± 2.9

chr.	%	case	range	mean±SD
+8	19	(4/21)	2.5-4.2	0.7 ± 0.6
+6	19	(4/21)	1.6-3.6	0.7 ± 0.3
+1	14	(3/21)	2.5-5.5	1.9 ± 1.7
+17	5	(1/21)	4.0	1.0 ± 1.5

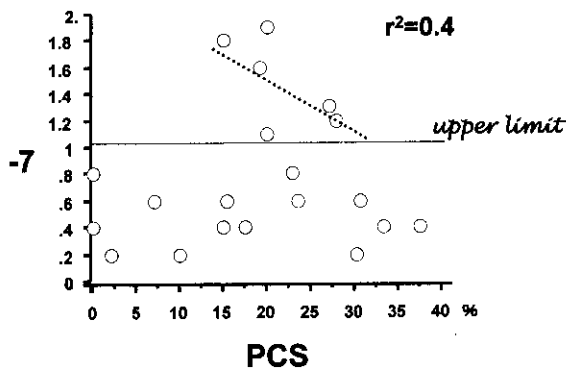


Fig. 2 PCS と 7 番染色体異数性との相関

D. 考 察

AA では約半数の症例で PCS が亢進し、様々な染色体の分配異常が生じていると考えられる。結果として、-7、+8 や +6 が好発する傾向にあり、これらの染色体異常が細胞の生物学的活性にどのような影響を与えているのかは、今後の課題である。また今回の解析では PCS や、微少の染色体異数性が、late clonal complication の危険因子になりうるかは、以前として不明であり、今後更に症例を増やし観察期間を延長して検討する必要がある。

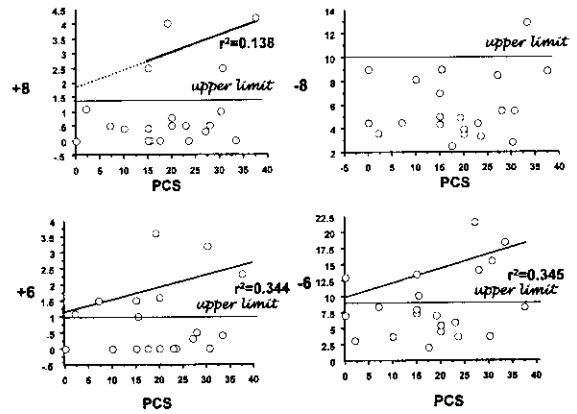


Fig. 3 PCS と 6、8 番染色体異数性との相関

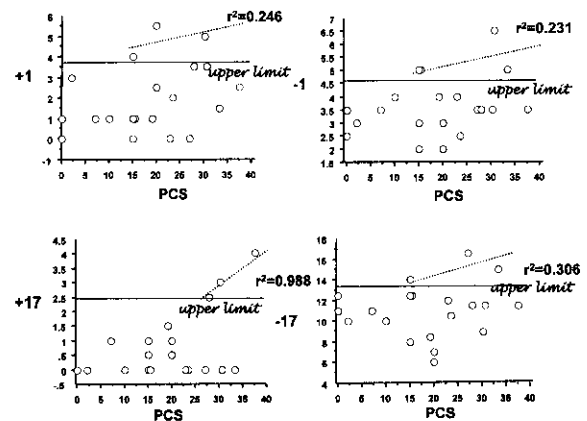


Fig. 4 PCS と 1、17 番染色体異数性との相関

E. 結 論

AA では染色体分配異常が亢進し、6、7、8 番染色体の異数製が出現しやすい病態が存在すると考えられる。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

H. 参考文献

1. Michel LS, et al, Nature, 409, 355, 2001
2. 別所正美, 他 特発性造血障害に関する研究班, 平成 13 年度研究事業報告書, 65, 2002

遺伝性造血障害 Fanconi 貧血の分子病態

浅野 茂隆、山下 孝之

東京大学 医科学研究所

研究要旨 Fanconi 貧血 (FA) は常染色体劣性の遺伝性造血疾患で、7つの責任遺伝子が同定されている。これらの産物蛋白のうち FANCA/C/E/F/G が形成する核内複合体に依存して、FANCD2 が活性化されてゲノム安定化に作用すると考えられている。我々は種々の FANCA 変異体の機能を解析し、FANCD2 活性化に FA 蛋白の安定な複合体の形成は必須ではなく、これと独立して FANCA の核移行とリン酸化が重要な役割を果たすことを見出した。また日本において、非血縁 10 家系の G 群患者を見出し、その大部分が 2 種類の founder 変異を持つことを明らかにした。

A. 研究目的

Fanconi 貧血 (FA) は、小児期に発症する造血不全と続発する骨髄異形成症候群や急性白血病、固形腫瘍の合併、細胞の染色体不安定性、mitomycin C (MMC) など DNA 架橋剤への高感受性を特徴とする常染色体劣性遺伝疾患である。遺伝的に異なる 8 群 (A、B、C、D1、D2、E、F、G 群) に分類され、7 群の遺伝子が同定された。これらのうち FANCA/C/E/F/G の核内複合体形成が FANCD2 をモノユビキチン化により活性化する FA 分子経路モデルが提唱されている。活性化 FANCD2 が BRCA1 と相互作用すること、さらに D1 群の責任遺伝子が BRCA2 であることが判明し、FA/BRCA 経路としてゲノム安定化の機構が注目を受けている。本研究では、種々の FANCA 変異体を用いて FA 分子経路の機構を解析した。FA 遺伝子の変異解析は欧米において広範に行われ、FANCA (65%)、FANCC (15%)、FANCG (10%) が大多数の患者の責任遺伝子であるが、その比率や変異のタイプは民族によって大きな相違があることが示されている。我々は、日本人 FA 患者の遺伝子異常を明らかにするために、これまでに 60 家系以上の FA 検体を収集し、各遺伝子の変異解析を行っている。

B. 研究方法

1. FANCA cDNA に site-directed mutagenesis により種々の変異を導入し、レトロウイルスで FANCA 欠損細胞に発現させ、MMC 感受性と FA

分子経路の活性化を解析した。

2. FANCG mRNA の RT-PCR 産物をシーケンスし、ゲノム解析で変異を確認した。

C. 研究成果

1. FANCA は 1455 アミノ酸からなる蛋白である。以前に、C 末 3 分の 2 に分布する 21 種類の患者由来変異蛋白を FANCA 欠損細胞に発現させて機能を解析したところ、各変異体の MMC 補正能と FA 分子経路活性化は密接に関連し、これまでの FA 分子経路モデルとよく合致した。今回、核局在シグナル (NLS) と FANCG 結合領域を持つ FANCA の N 末領域の機能を明らかにするために、図 1 に示したような変異体を作成した。これまでの FA 分子経路モデルに反して、L25P、LL25/26AA は、FA 蛋白複合体形成を強く障害されたが、核に移行し、FANCD2 モノユビキチン

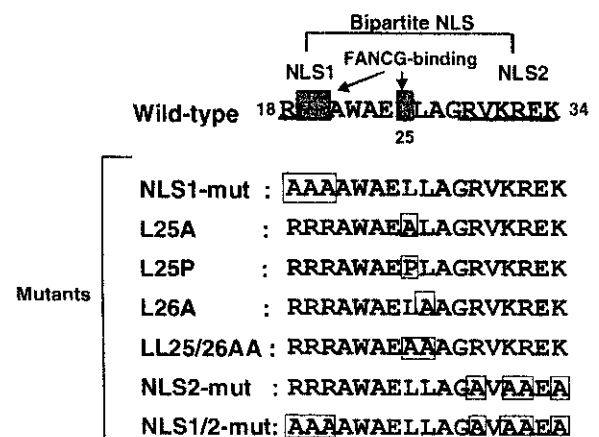


図 1 FANCA N 末変異体の構造

表 FANCA N 末変異体の機能のまとめ

FANCA 蛋白(変異体)	細胞内局在	リン酸化	FANCG との結合	FANCC/F との結合	FANCE との結合	FANCD2 モノユビキチン化	MMC感受性補正
Mock	-	-	-	-	-	-	-
WT	N>C	+++	+++	+++	+++	+++	+++
NLS1変異	N>C	+++	++	++	++	+++	+++
L25A	N>C	+++	+++	+++	+++	+++	+++
L25P	N>C	+++	-	-	-	++	+++
L26A	N>C	+++	++	++	++	+++	+++
LL25/26AA	N>C	+++	-	-	-	++	+++
NLS2変異	C>N	-	-	-	-	+	++
NLS1/NLS2変異	C>>N	+++	-	-	-	-	-
H1110P	C>>N	+	+++	-	-	-	-

細胞内局在: N>C,核優位; C>N, 細胞質優位 ; H1110P は患者由来(III 群)C 末変異体の代表

化を中等度誘導し、MMC 感受性を補正した(表)。NLS2 変異、NLS1/NLS2 変異も同様に複合体は形成せず、核移行の障害に相関して FANCD2 モノユビキチン化と MMC 感受性補正能も障害された。一方、リン酸化は N 末の変異によって障害されなかった。

2. FANCG 両アリの変異を持つ 10 例の非血縁患者を同定した。9 家系で IVS3+1G>C が見出され、このうち 4 家系がホモ、3 家系が 1066 C>T との複合ヘテロ、2 家系がその他の変異との複合ヘテロ接合体であった。また韓国系の 1 家系で 1066 C>T のホモ接合体を認めた。IVS3+1G>C、1066 C>T は全例で固有の haplotype と関連しており、founder 変異であることが示された。

D. 考 察

1. FANCA 変異体を用いた解析から図 2 のようなモデルが考えられる。すなわち、FANCA の複合体形成と核移行は、いずれも N 末領域と C 末約 2/3 部分の高次構造の両方により制御される。安定な FA 複合体の形成は FANCD2 活性化に促進的に働くが、必須ではない。むしろ FANCA の核移行と C 末の高次構造がより重要である。FANCA リン酸化は C 末高次構造により影響され、FA 分子経路の制御に参与する可能性が示唆される。

2. 日本の FA 患者の約 20 % が G 群に属し、大半の患者では FANCG の 2 種類の founder 変異が原因である。

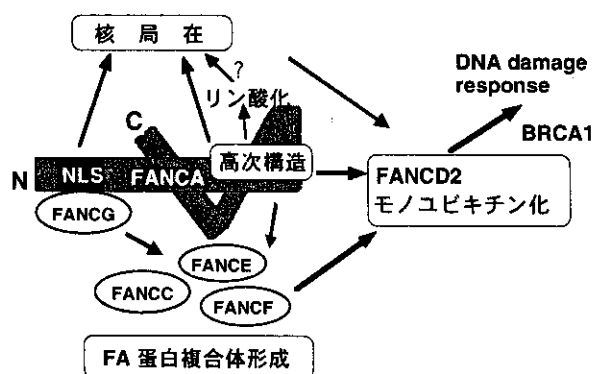


図 2 FANCA の構造と FA 分子経路の制御 (モデル)

E. 結 論

FA 分子経路の新しい制御機構と日本人における FANCG 変異の特徴を明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Adachi D, Asano S et al.: Heterogenous activation of the Fanconi anemia pathway by patient-derived FANCA mutants. Hum Mol Genet 11: 3125-3134, 2002
2. Yagasaki H, Asano S et al.: Two common founder mutations of the Fanconi anemia group G gene FANCG/XRCC in the Japanese population. Hum Mutat (印刷中)

2. 学会発表

1. 谷ヶ崎博, 浅野茂隆ら: 我が国の Fanconi 貧血患者における遺伝子変異の解析 第 64 回日本血液学会総会 (平成 14 年) 抄録集 p. 87

2. 足立大樹, 浅野茂隆ら: Fanconi 貧血蛋白 FANCA の患者由来変異体の機能解析 第 64 回日本血液学会総会 (平成 14 年) 抄録集 p.120

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 参考文献

1. D'Andrea AD, Grompe M: Nat Rev Cancer 3: 23-34, 2003

血清 SCGF 定量による AA/MDS の診断および鑑別法の確立

堀田 知光、伊東 千絵、安藤 潔

東海大学 血液腫瘍リウマチ内科

研究要旨 Stem cell growth factor (SCGF) は、1997 年に平岡らにより白血病細胞株の培養上清からクローニングされた新規造血因子であり、血清 SCGF は、骨髄中の造血機能を反映していると考えられている。今回、種々の血液疾患患者の血清 SCGF 値を測定し、再生不良性貧血 (AA) の診断や、骨髄異形成症候群 (MDS) との鑑別の補助因子となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

Stem cell growth factor (SCGF) は、1997 年に平岡らにより白血病細胞株の培養上清からクローニングされた新規造血因子であり、試験管内でコロニー形成支持能を有するが、その体内での動態は明らかにされていない。

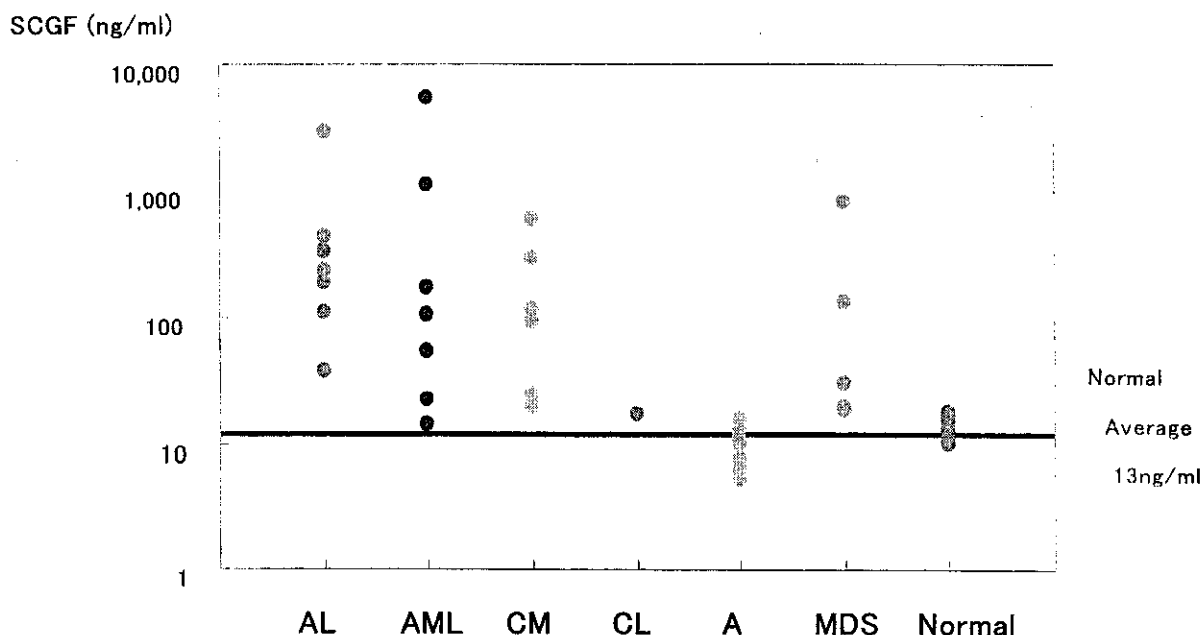
我々は、SCGF の ELISA 法による測定系を確立し、実際に造血幹細胞移植後の患者血清を定量した。この結果、血清中の SCGF 値が移植後の骨髄回復の評価因子となりうる可能性を見いだした²⁾。さらに、SCGF が骨髄中の CD33⁺、34⁺ 前駆細胞群で発現されていることを確認した。今回われわれは、造血機能に異常を来す種々の血液疾患患者において血清 SCGF 値を測定し、各疾患との関連性を検討した。またその結果を利用して、

AA/MDS といった骨髄不全の鑑別診断法として有用か検討を行った。

B. 研究方法

対象は、急性リンパ性白血病 (ALL) 7 例、急性骨髄性白血病 (AML) 7 例、慢性骨髄性白血病 (CML) 6 例、(慢性期 3 例、移行期 1 例、急性転化 2 例)、慢性リンパ性白血病 (CLL) 18 例、再生不良性貧血 (AA) 7 例、骨髄異形成症候群 (MDS) 5 例 (RA 2 例、RAEB 1 例、overt leukemia 2 例) の計 33 症例、および健常人 10 例をコントロールとした。方法は、各症例とも初発未治療時に血清を採取し、ELISA 法により血清 SCGF 値を測定した。

各種造血疾患における SCGF 値



C. 研究成果

健常人の血清 SCGF 値は、 13.2 ± 2.6 ng/ml であった。急性白血病、CML、および MDS 例では健常人と比べ、高値をとる傾向が見られ、AA 群では健常人と比べ有意に低値であった。MDS では、健常人と比べ有意に高値である ($P=0.04$) とともに、RA では低く、RAEB、overt 症例で高い値をとる傾向が見られた。

D. 考 察

造血幹細胞移植後の血清 SCGF の変動は、移植後の骨髓機能の回復を反映しており、また SCGF は骨髓中の CD33⁺、34⁺ 前駆細胞群で発現されていたことより、骨髓中の造血機能を反映していると考えられている。今回の各種血液疾患の血清 SCGF 値の測定結果からは、急性白血病および慢性骨髄性白血病で健常人より高値、AA 群で低値を示しており、骨髓中の造血機能との関連性が示唆された。また MDS では健常人より高値であり、さらに RA より RAEB、overt で高く、白血病細胞の増加を反映している可能性が考えられた。AA と MDS の間には、しばしば鑑別困難な骨髓不全を呈する疾患群が存在する。現状ではこの判定を行うための客観的なマーカーは存在しない³⁾。最近になり、染色体や遺伝子検査による異常クローンの証明等が、骨髓不全の病態判定に有用として利用されるようになってきている。今回の結果をもとに、今後血清 SCGF 値に健常人とのカットオフ値を設定することで、AA の診断に有用となる可能性が示唆され、MDS との鑑別が困難な症例においても、鑑別の補助因子となる可能性が示唆された。また我々の手法は、ELISA 法による簡便な検査である。今後多施設共同研究により症例数を増やし、診断的意義の確立を検討していく。

E. 結 論

血清 SCGF 定量は、ELISA 法による簡便な検査であり、AA と MDS との鑑別の補助診断として、また予後予測因子として有用である可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ito C, Sato H, Ando K, Watanabe S, Yoshida F, Kishi K, Furuya A, Shitara K, Sugimoto S, Kohno H, Hiraoka A, Hotta T. Serum stem cell growth factor (SCGF) for monitoring hematopoietic recovery following stem cell transplantation (SCT). Bone Marrow Transplant, in press

2. 学会発表

1. 伊東千絵, 安藤潔, 渡邊茂樹, 吉場史朗, 岸賢治, 堀田知光, 佐藤秀尚, 古谷安希子, 設楽研也, 杉本整治, 河野弘明 移植後造血機能回復の評価因子としての血清 SCGF 値の変化 第 64 回日本血液学会総会, 2002 年
2. 伊東千絵, 安藤潔, 渡邊茂樹, 吉場史朗, 岸賢治, 堀田知光, 佐藤秀尚, 古谷安希子, 設楽研也, 杉本整治, 河野弘明 各種造血疾患における血清 Stem cell growth factor (SCGF) の定量 第 65 回日本血液学会総会, 2003 年発表予定

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

発明の名称：白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患の判定方法及び診断薬

出願番号：特願 2002-106786 号

出願日：平成 14 年 4 月 9 日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 参考文献

1. Hiraoka A, Sugimura A, Seki T, et al. Cloning, expression, and characterization of a cDNA encoding a novel human growth factor for primitive hematopoietic progenitor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 7577-7582, 1997
2. Ito C, Sato H, Ando K, et al. Serum stem cell growth factor (SCGF) for monitoring hematopoietic recovery following stem cell transplantation (SCT). Bone Marrow Transplant, in press
3. 中尾真二: 総論. 再生不良性貧血と MDS -最近の話題- 血液フロンティア 12, 1075-1082, 2002

CD11c⁺ 細胞による自己赤芽球系前駆細胞の接着

澤田 賢一¹、深谷 博志^{1,2}、鈴木世志子^{1,3}、小松 田敦¹、

廣川 誠¹、川端 良成¹、肖 衛国⁴、高田 五郎²

秋田大3内¹、秋田大小児科²、秋田大輸血部³、中国医科大血液⁴

研究要旨 ヒト純化 CD34⁺ 細胞は、IL-3/EPO/SCF 存在下で赤芽球系 (glycophorin A⁺: GPA⁺) 細胞へ系特異的に分化・増殖する。この過程で TNF- α 存在下での細胞増殖は GPA⁺ 細胞と GPA⁻ 細胞からなる凝集塊の形成を伴っていた。凝集塊は樹状細胞 (DCs) を含み、CD11c⁺DC 細胞が GPA⁺ 死細胞由来の自己抗原を選択的に取り込むことによって造血器疾患における自己免疫と免疫寛容の成立に関与していると推定された。

A. 研究目的

ヒト純化 CD34⁺ 細胞は、interleukin-3 (IL-3)、erythropoietin (EPO)、stem cell factor (SCF) 存在下で赤芽球系 (glycophorin A⁺: GPA⁺) 細胞へ系特異的に分化・増殖する。この過程で腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- α : TNF- α) は GPA⁺ 細胞の産生を抑制し、非赤芽球系細胞 (GPA⁻ 細胞) を増加させる¹⁾。この過程における GPA⁻ 細胞の形質と局在およびその生物学的意義について検討した。

B. 研究方法

顆粒球コロニー刺激因子で動員したヒト末梢血細胞から CD34⁺ 細胞を純化し、IL-3/EPO/SCF 存在下で GPA⁺ 細胞へ系特異的に分化・増殖誘導した。TNF- α 存在下で同時に発生する GPA⁻ 細胞の形質と局在および生物学的意義を FACS、酵素抗体染色、共焦点顕微鏡を用いて検討した。

C. 研究成果

①TNF- α 存在下での細胞増殖は凝集塊の形成を伴っていた。②GPA⁺ 細胞は凝集塊中に存在した。③凝集塊は樹状細胞 (DCs) を含み自己の GPA⁺ 細胞と接着していた。④DCs の発生は3日以内と極めて早期の現象であった。⑤CD11c⁺DC 細胞は選択的に GPA⁺ 死細胞と接着し自己抗原を取り込んでいた。

D. 考 察

TNF- α は赤血球造血を抑制する一方で、非赤芽球系細胞に対して増殖刺激として働く。これらの非赤芽球系細胞は従来、顆粒球・マクロファージ系であると考えられており、その性状については不明な点が多かった。本研究により、これら GPA⁻ 細胞が DCs、もしくは DC 前駆細胞であることが明らかとなった。さらにこれら DCs のうち、CD11c⁺ 細胞が同時に発生した GPA⁺ 死細胞の細胞成分を選択的に取り込む現象から、その後の抗原提示が示唆される。TNF- α は炎症や組織損傷時に最も早期に増加するサイトカインの一つである。従って本研究は、すべての急性期反応が、骨髄における自然免疫の急速な発動を促し、自己抗原による自己免疫や免疫寛容の成立に関与することを示唆するものと考えられる。

E. 結 論

造血幹・前駆細胞からの TNF- α による DCs の発生とその生物学的意義についてその一端を明らかにした。自己免疫と寛容の成立機序を解明するためには、造血幹細胞レベルからの解析が必要であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamaguchi M, Hirayama F, Murahashi H, Azuma H, Sato N, Miyazaki H, Fukazawa K, Sawada K, Koike T, Kuwabara M, Ikeda H,

- Ikebuchi K: Ex vivo expansion of human UC blood primitive hematopoietic progenitors and transplantable stem cells using human primary BM stromal cells and human AB serum. *Cytotherapy* Vol.4, No.2, 109-118, 2002
2. Koizumi K, Haseyama Y, Machino R, Y Sato, Sawada K, Koike T: Hemophagocytic syndrome (HPS) in prostatic cancer revealed by disseminated carcinosarcoma of the bone marrow. *J Urology*. Vol.168, 1101-1102, 2002
 3. Osawa M, Yamaguchi T, Nakamura Y, Kaneko S, Onodera A, Sawada K, A Jegalian, H Wu, Nakauchi H, Iwama A : Erythroid expansion mediated by Gfi-1B zinc finger protein : role in normal hematopoiesis. *Blood*, 15 October. Vol 100, No 8, 2769-2777, 2002
 4. Goto H, Wakui H, Komatsuda A, Ohtani H, Imai H, Sawada K, Kobayashi R : Renal Alpha-Actinin-4 : Purification and Puromycin Aminonucleoside-Binding Property : *Nephron Exp Nephrol*; 93: e27-e35, 2003
 5. W Xiao, Koizumi K, Nishio M, Endo T, Osawa M, Fujimoto K, Sato I, Sasaki T, Koike T, Sawada K : Tumor necrosis factor- α inhibits generation of glycophorin A⁺ cells by CD34⁺ cells : *Experimental Hematology* 30 1238-1247, 2002
 6. Itoh H, Komatsuda A, Ohtani H, Wakui H, Imai H, Sawada K, Otaka M, Ogura M, Suzuki A, Hamada F: Mammalian HSP60 is quickly sorted into the mitochondria under conditions of dehydration : *Eur.J.Biochem.*269, 5931-5938, 2002
 7. Hirokawa M, Matsutani T, Saitoh H, Ichikawa Y, Kawabata Y, Horiuchi T, Kitabayashi A, Yoshioka T, Tsuruta Y, Suzuki R, Miura IAB, Sawada K: Distinct TCRAV and TCRBV repertoire and CDR3 sequence of T lymphocytes clonally expanded in blood and GVHD lesions after human allogeneic bone marrow transplantation *Bone Marrow Transplantation* 30, 915-923, 2002
 8. Matsumori M, Itoh H, Toyoshima I, Komatsuda A, Sawada K, Fukuda J, Tanaka T, Okubo A, Kinouchi H, Mizoi K, Hama T, Suzuki A, Hamada F, Otaka M, Shoji Y, Takada G : Characterization of the 105-kDa molecular chaperone identification, biochemical properties, and localization. *Eur.j.Biochem.*269, 5632-5641, 2002
 9. Kawabata Y, Hirokawa M, Komatsuda A, Sawada K: Clinical Application of CD34⁺-selected Peripheral Blood Stem Cells. *Therapeutic Apheresis*, in press
2. 学会発表
なし
- G. 知的所有権の取得状況
なし
- H. 参考文献
1. Xiao W et al. *Exp Hematol* 30: 1238-1247, 2002

不死化ヒト骨髄ストローマ細胞を用いた CD34 陽性細胞からの赤芽球増幅に関する検討

新津洋司郎、松永 卓也、藤見 章仁、田中 育太

札幌医科大学医学部内科学第四講座

研究要旨 我々はこれまで、ヒト骨髄ストローマ細胞に不死化遺伝子であるヒト telomerase catalytic unit (hTERT) を導入して細胞株を樹立し、それを用いたヒト臍帯血造血幹細胞の長期無血清培養システムを確立した。本研究ではまず、新しい赤血球製剤を開発する目的で、この造血幹細胞増幅システムを用いて、臍帯血造血幹細胞から、大量の赤血球を分化／増幅することを試みた。その結果、妊婦 1 人分の臍帯血から濃厚赤血球製剤 1 単位に相当する 2.0×10^{12} 個の赤血球を産生可能な事を明らかにした。

更に、MDS (RA) 患者の骨髄 CD34 陽性細胞を、この赤芽球増幅システムを用いて培養すると、骨髄低形成の症例群と骨髄正形成の症例群との間で、赤芽球の増幅率に明らかな差があることが確認された。

A. 研究目的

現在臨床の場で用いられている赤血球輸血製剤は、献血由来のためドナー不足の問題があり、新しい輸血製剤の開発が必要と考えられる。新しい赤血球輸血製剤の作製法としては、臍帯血造血幹細胞から分化／増殖させた赤血球を製剤化する方法が最も現実的なものと考えられる。我々は、ヒト骨髄ストローマ細胞に不死化遺伝子であるヒト telomerase catalytic unit (hTERT) を導入して細胞株を樹立し、それを用いたヒト臍帯血造血幹細胞の長期無血清培養システムを確立した (Blood 101, 2003) ¹⁾。本研究では、まず、この培養システムと我々が既に開発して報告した赤芽球液体培養システム (Blood 83, 1994) ²⁾ とを組み合わせて赤芽球を効率的に増幅させることを試みる。次に、Nagata らが赤芽球が出す eat me signal をマクロファージが認識して貪食することで、赤芽球の脱核が促進する事を明らかにした報告 (Science 292, 2001; Nature 417, 2002) に基づき、増幅させた赤芽球をマクロファージと共培養する事により in vitro で脱核させて、大量の赤血球を産生させる事を試みる。更に、MDS (RA) 患者の骨髄 CD34 陽性細胞を、この赤芽球増幅システムを用いて培養することで、その病態解明に役立つか否かを検討する。

B. 研究方法

(1) 臍帯血 CD34 陽性細胞からの in vitro における赤芽球分化／増殖

赤血球への分化増殖は三段階によった。1st phase (day 0~14) では、臍帯血 CD34 陽性細胞を、既報¹⁾ のように樹立した hTERT 遺伝子導入骨髄ストローマ細胞と共に、SCF、TPO、FL の存在下で14日間培養した。2nd phase (day 14~28) では、SCF、IL-3、EPO の存在下で 14 日間液体培養した。3rd phase (day 28~34) では、EPO 4 U/ml の存在下でマクロファージと 3 日間共培養した。

(2) MDS (RA) 患者 CD34 陽性細胞からの in vitro における赤芽球分化／増殖

5名の MDS (RA) 患者の骨髄 CD34 陽性細胞を上記 (1) の臍帯血と同様に 2nd phase まで培養した。

C. 研究成果

(1) 臍帯血 CD34 陽性細胞からの in vitro における赤芽球分化／増殖

1st phase の共培養にて総細胞数は 7,200 倍に増幅された。さらに 2nd phase の液体培養で 100 倍に増幅され (total 720,000 倍)、3rd phase でさらに 2.8 倍に増幅された (total 2,000,000 倍)。Day 34 の時点では glycoprotein A 陽性細胞は、総細胞の 98 %であった。つまり、赤芽球の効率的な増

幅に成功した。Day 28 において成熟赤血球の割合は、総細胞のわずか 0.7% であったが、day 34 まで 6 日間マクロファージと共培養することで赤芽球は脱核し、成熟赤血球は総細胞の 33.4% まで増加した。即ち、day 34 において、妊婦 1 人の臍帯血から 2.0×10^{12} 個の成熟赤血球を産生する事に成功したことになる。Day 28 においては、ほとんどが赤芽球系細胞であり、好塩基性赤芽球、多染性赤芽球が主体であったが、day 34 においては、多染性赤芽球が主体となり、脱核した成熟赤血球を多数認めた。マクロファージを赤芽球系細胞

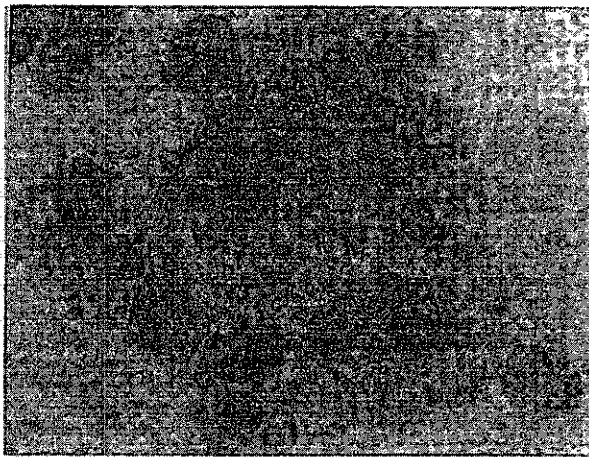


図1 マクロファージの共培養による赤芽球の脱核像

胞が取り囲むように存在し、いわゆる赤血球小島 (Erythroblastic Island) を形成していた (図1)。

(2) MDS (RA) 患者 CD34 陽性細胞からの in vitro における赤芽球分化/増殖

1st phase の共培養にて、総細胞数は骨髓正形成の 2 症例では各々 5.4 倍、72 倍に増幅されたのに対して、骨髓低形成の 3 症例においては各々 0 倍、

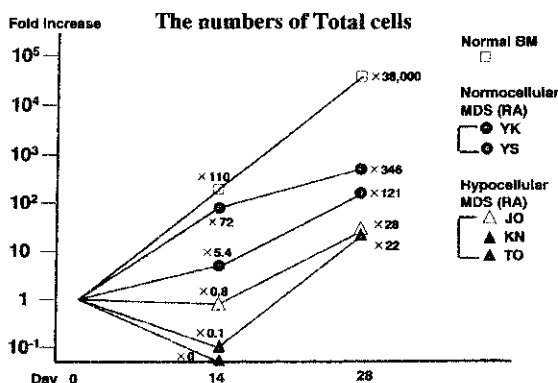


図2 MDS (RA) 患者 CD34 陽性細胞からの赤芽球の分化/増殖

0.1 倍、0.8 倍の増幅に留まった。つまり、2 症例群間に明らかな差を認めた。なお、2nd phase の増幅率には、2 症例群間で差を認めなかった (図 2)。

D. 考 察

1. hTERT 遺伝子導入ストローマ細胞を用いて増幅させた臍帯血 CD34 陽性細胞を特異的に赤血球へ分化させ、妊婦 1 人の臍帯血から 1 単位の濃厚赤血球製剤 (RC-MAP) を得ることが可能なことが示唆された。

2. 本赤芽球培養システムは、MDS (RA) の病態解析に有用な可能性が示唆された。

E. 結 論

我々が開発した hTERT 遺伝子導入ストローマ細胞を用いて、臍帯血 CD34 陽性細胞から in vitro で大量の赤血球 (赤芽球) を分化/増幅するシステムは、赤血球輸血製剤の新しい作製法として有用であるばかりでなく、MDS (RA) の病態解析にも有用と考えられる。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 参考文献

1. Kawano Y, Kobune M, Yamaguchi M, Nakamura K, Ito Y, Sasaki K, Takahashi S, Nakamura T, Chiba H, Sato T, Matsunaga T, Azuma H, Ikebuchi K, Ikeda H, Kato J, Niitsu Y, Hamada H. Ex vivo expansion of human umbilical cord hematopoietic progenitor cells using a coculture system with human telomerase catalytic subunit (hTERT) - transfected human stromal cells. Blood, 2003, 101:

532-540.

2. Shintani N, Kohgo Y, Kato J, Kondo H, Fujikawa K, Miyazaki E, Niitsu Y. Expression and extracellular release of transferrin receptors during peripheral erythroid progenitor cell differentiation in liquid culture. *Blood*, 1994, 83: 1209-1215.

抑制性 NK 細胞受容体陽性細胞による 同種造血細胞移植後の移植片対宿主病の制御

今村 雅寛、田中 淳司、堤 豊、三浦 洋子、東梅 友美

北海道大学 血液内科

研究要旨 同種造血細胞移植後に認められる移植片対宿主病 (GVHD) は、移植患者の約半数に起り、その克服は重要な課題である。移植後早期に抑制性NK細胞受容体を有する NK 細胞が増加し、急性 GVHD の制御にかかわっており、その後に増加する抑制性 NK 細胞受容体陽性 T 細胞は慢性 GVHD の制御に重要な役割を果たしている。

A. 研究目的

同種造血細胞移植後に起る移植片対宿主病 (GVHD) を制御することで、その成績は飛躍的に向上する。本研究では、移植後の免疫寛容の解析を抑制性 NK 細胞受容体を有する NK 細胞と T 細胞の面より行い、その意義を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

移植患者の末梢血を定期的に採取し、末梢血単核球を分離した。CD3、CD8、CD158a、CD158b、CD94、NKG2A に対するモノクローナル抗体を用いて、フローサイトメトリーでこれらの細胞の比率を算定した。また、各症例における GVHD の消長とこれらの細胞比率の推移を見ることで、抑制性 NK 細胞受容体陽性細胞の役割を検討した。

C. 研究成果

移植後 2 ヶ月以内には CD158b⁺/CD3⁻ の抑制性 NK 細胞受容体陽性 NK 細胞の増加が見られ、3 ヶ月以上経つと CD158b⁺/CD3⁻ の抑制性 NK 細胞受容体陽性 T 細胞が増加した (表 1)。後者ではそのほとんどが CD8 陽性 T 細胞からなっていた。CD158b⁺/CD3⁻ の抑制性 NK 細胞受容体陽性 NK 細胞の増加した症例では、慢性 GVHD が少なく、急性 GVHD の抑制と関連しているものと考えられた。一方、CD158b⁺/CD3⁻ の抑制性 NK 細胞受容体陽性 NK 細胞の増加した症例では、慢性 GVHD の頻度が高いことが明らかとなったが、臨床経過を加味した解析では、これらの細胞が増

加すると、慢性 GVHD の予後は良好であり、増加しない症例では慢性 GVHD の遷延化や重篤化が見られた。これらの事実は、抑制性NK細胞受容体陽性T細胞が慢性 GVHD に伴い増加し、それを抑制する働きを担っていることを示唆する。同様の結果は、CD94/NKG2A 陽性細胞においても示された (表 2)。

表 1 同種造血幹細胞移植後の末梢血単核球における KIR 表現

細胞表面抗原	移植前	KIR 表現 (%)		
		<2 ヶ月	3-6 ヶ月	>6 ヶ月
CD158b ⁺ /CD3	3.3	15.4	8.5	7.0
CD158b ⁺ /CD3 ⁻	1.1	1.7	5.1	3.0
CD158b ⁻ /CD8 ⁻	1.0	2.1	4.7	2.6

表 2 同種造血幹細胞移植後の末梢血単核球における CD94 発現

細胞表面抗原	正常人	慢性GVHD(-)	慢性GVHD(+)	
			予後良好	予後不良
CD94 ⁺ /CD3	8.4	20.8	15.7	10.9
CD94 ⁺ /CD3 ⁺	3.7	5.9	12.3	1.8
CD94 ⁺ /CD8 ⁺	1.5	5.3	8.7	0.6

D. 考 察

CD158b は immunoglobulin superfamily に属する killer cell inhibitory receptor/killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) のひとつであり、標的細胞の HLA-Cw1、3、7、8 を特異的に認識し、その発現が正常になされている場合には

傷害しないが、減弱している場合には傷害する。さらに、CD94はC型レクチンファミリーに属する抑制性NK細胞受容体でNKG2とヘテロダイマーを形成する。CD94/NKG2AはKIRと同様に、特定の抗原（HLA-E）を認識して、その発現量が正常であると細胞傷害を抑制することが知られている。本研究では、移植後早期にこれら抑制性NK細胞受容体を有するNK細胞が増加すると、慢性GVHDの発症率が低下していることが明らかとなった。したがって、これらの細胞が急性GVHDを抑制したことを意味している。さらに、移植後3ヶ月以降に抑制性NK細胞受容体を有するT細胞が増加するのは、慢性GVHDを抑制するために合目的的に増加したためと考えられる。実際、個々の症例での解析では、予後良好群でその顕著な増加が認められた。また、先の抑制性NK細胞受容体を有するNK細胞との協調作用も重要であると考えられた。両者の出現に時間的な差が存在するのは、NK細胞は自然免疫を担う細胞であるのに比し、ドナー由来の前駆T細胞が胸腺での自己・非自己の教育を受けて、成熟型T細胞となって末梢へ流出するまでに、すなわちT細胞への分化・増殖に時間がかかることと符合する。抑制性NK細胞受容体を有するT細胞が3ヶ月以降に増加するのは、丁度慢性GVHDの出現する時期に一致していることもそれを裏付けている。さらに、抑制性NK細胞受容体の発現誘導には持続的な同種抗原刺激の必要性もあり、数ヶ月を要したものと考えられる。

いずれにしても、本研究で確認されたこれらの細胞は、GVHDの制御に重要な役割を果たしており、その効果的な増幅と臨床応用が期待される。

E. 結 論

抑制性NK細胞受容体陽性NK細胞およびT細胞はGVHDの制御に重要であり、その効果的な増幅は予後の改善につながる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka J, et al. Br J Haematol 108, 778, 2000.

2. Tanaka J, et al. Bone Marrow Transplant 26, 287, 2000.
3. Tanaka J, et al. Transplant Proc 32, 2447, 2000.
4. Tanaka J, et al. Acta Haematol 105, 89, 2001.
5. Tanaka J, et al.: Br J Haematol 117, 751, 2002.
6. Imamura M. Int J Hematol (Suppl I), 191, 2002.

2. 学会発表

1. 堤 豊, 今村雅寛: 造血細胞移植後の免疫系の再構築. 第23回日本炎症・再生医学会 ワークショップ「血液・免疫疾患と再生医学」, 東京, 2002年
2. Tanaka J: Regulation of GVHD/GVL by inhibitory NK cell receptor expressing cells. 第64回日本血液学会総会シンポジウム 移植免疫: 基礎から臨床へ, 横浜, 2002年
3. Imamura M: Immunological reconstitution and immunoregulatory cells in hematopoietic stem cell transplantation. The 29th World Congress of the International Society of Hematology. Seoul, 2002
4. Tanaka J, et al: Cytolytic activity of inhibitory NK cell receptors (CD94/NKG2A) positive cells expanded from donor granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells. The 44th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Philadelphia, 2002

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

抑制性NK細胞受容体陽性細胞の増幅法

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 参考文献

1. Moretta A, et al. Immunol Rev 155, 105, 1997
2. Braud VM, et al. Nature 391, 795, 1998

造血細胞への遺伝子導入をめざした AAV ベクター作製過程の改良

大西 一功、中村 悟己

浜松医科大学 第三内科

研究要旨 従来の AAV ベクターの作製は煩雑で手間がかかるため、我々はレンチウイルスベクターを用い、Rep/Cap、アデノウイルスの E2A、VA RNA、E4 遺伝子を 293T 細胞に導入し、パッケージング細胞を樹立し、AAV ベクタープラスミドのみのトランスフェクションで高力価の AAV ベクターを作製することを可能にした。パッケージング細胞を用い作製した AAV ベクターにより CD34 陽性造血細胞への遺伝子導入が可能であった。

A. 研究目的

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター・システムは、ベクター作製過程が煩雑で手間がかかったり。今回、我々はレンチウイルスベクターを用い、Rep/Cap、アデノウイルスの E2A、VA RNA、E4 遺伝子を順次、293T 細胞に導入し、AAV ベクター作製の為のパッケージング細胞を樹立することにより、AAV ベクター作製を簡略化し、作製した AAV ベクターの造血細胞への遺伝子導入効率を検討することを目的とした。

B. 研究方法

AAV パッケージング細胞を樹立するために、パッケージングに必要な Rep/Cap、VA RNA、E2A、E4 遺伝子をレンチウイルスベクターに組み込んだ 4 種類のベクターを作製した。まず、Rep/Cap 遺伝子を 293T 細胞に遺伝子導入し、限界希釈法にて得られた高力価 AAV ベクターパッケージング細胞に VA RNA 遺伝子を導入、同様の操作過程を経て 4 種類の遺伝子を含むパッケージング細胞を数種類得た。このパッケージング細胞から作製した AAV ベクターを用い、ヒト末梢血の CD34 陽性細胞に遺伝子導入を行った。

C. 研究成果

樹立した AAV ベクター産生細胞株では導入遺伝子の発現が認められ (図 1)、AAV ベクタープラスミドのみのトランスフェクションのみで比較的高力価の AAV ベクターを得ることが可能であった。また、得られた細胞株は継代による力価の

低下も軽度であり (図 2)、Rep/Cap および E4 遺伝子生成物の細胞毒性も著明なもの認められなかった。細胞株作製過程において、E4 遺伝子を含まない細胞からも AAV ベクターの作製が可能であった。CD34 陽性細胞への遺伝子導入も約 50%程度認められた (図 3)。

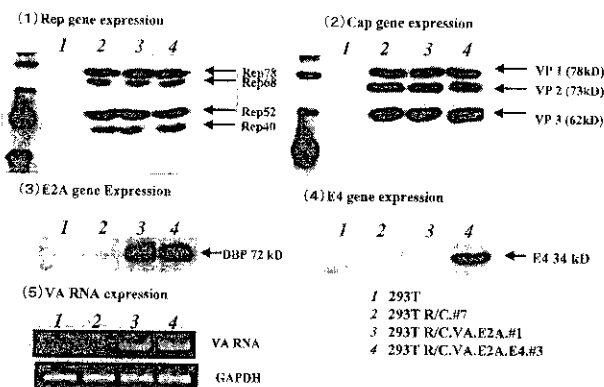


図 1 AAV 産生細胞株における導入遺伝子の発現

Packaging cells	rAAV-LacZ (T.U./10-cm plate)
293T R/C. cells #7	5.1 X 10 ⁸
293T R/C.VA.E2A. cells #1	6.2 X 10 ⁷
293T R/C.VA.E2A.E4. cells #3	1.3 X 10 ⁸

図 2 AAV ベクターの titer 比較 (10 継代後)

AAV packaging cells	MOI	% transduced cells
293T R/C.VA.E2A. cells #1	200	27.1 %
293T R/C.VA.E2A.E4. cells #3	500	58.4 %

図 3 ヒト CD34 陽性細胞への GFP 遺伝子導入効率