

#### D. 考 察

本件研究において得られた AAV ベクターパッケージング細胞株の長期継代における産生ベクター力価の推移と E4 遺伝子の AAV ベクター作製における役割についてさらに検討が必要である。また、遺伝子導入した CD34 陽性細胞の分化と長期遺伝子発現を追跡する必要がある。

#### E. 結 論

本件研究において得られた AAV ベクターパッケージング細胞株は AAV ベクターの作製をより簡略化・単純化することにより、遺伝子導入に AAV ベクターを使用しやすくすることを可能にした。作製した AAV ベクターは血液細胞への遺伝子導入も容易に可能であった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 研究発表

1. 中村悟己 et al.: レンチウイルスベクターを用いた AAV 作製遺伝子導入によるアデノ随伴ウイルス産生細胞株の開発 第 64 回日本血液学会: 2002 年
2. Satoki Nakamura et al.: Development of novel packaging cell lines for generation of adeno-associated virus vectors by lentiviral gene transfer of trans-complementing components. 44th annual meeting of the American Society of Hematology: 2002

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

2002 年 特許申請中

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

#### H. 参考文献

1. Collaco, R. F., et al, Gene. 238, 397, 1999.
2. Inoue, N., et al, J Virol, 72, 7024, 1998.
3. Naldini, L., et al, Science, 272, 263, 1996.

# 選択的増幅遺伝子を利用した慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療

小澤 敬也<sup>1</sup>、久米 晃啓<sup>2</sup>

自治医科大学 内科学講座血液学部門、遺伝子治療研究部<sup>1</sup>、自治医科大学 遺伝子治療研究部<sup>2</sup>

**研究要旨** 遺伝子導入造血細胞を随意的に体内増幅する「選択的増幅遺伝子 (SAG)」システムの有用性を、X連鎖型慢性肉芽腫症 (X-CGD) モデルマウスを用いて検討した。治療用遺伝子と SAG が組み込まれた細胞が、薬剤刺激に反応してモデルマウス体内で増加した。SAG による細胞増幅は遺伝子治療効果の増強に寄与することが *in vivo* の系で示された。

## A. 研究目的

造血幹細胞遺伝子治療における遺伝子導入効率の低さを補完して治療効果を増強するため、造血因子受容体と分子スイッチとのキメラ蛋白質をコードする「選択的増幅遺伝子 (SAG)」によって、遺伝子導入細胞を随意的に体内増幅するシステムを開発している<sup>1,3)</sup>。本年度は、gp91 欠損による X 連鎖型慢性肉芽腫症 (X-CGD) 遺伝子治療モデルにおける SAG の有用性を検討した。

## B. 研究方法

X-CGD 遺伝子治療の効率は、好中球の活性酸素産生能回復で判定した。遺伝子導入細胞増幅のために、顆粒球コロニー刺激因子受容体 (GcR) をベースにしたキメラ蛋白質 (GcRER) をエストロゲンで制御するシステムと、トロンボポエチン受容体 (Mpl) をベースにしたキメラ蛋白質 (EpoRMpl) をエリスロポエチンで制御するシ

テムを構築した。レトロウイルスベクターを用いて X-CGD マウスの骨髓細胞に gp91 遺伝子と SAG (GcRER 遺伝子または EpoRMpl 遺伝子) を同時に導入し、致死量放射線照射した X-CGD レシピエントに移植した。造血系再構築後、エストロゲンまたはエリスロポエチンを投与し、機能回復した好中球の割合と絶対数をフローサイトメトリーで測定した。

## C. 研究成果

gp91 遺伝子及び GcRER 遺伝子導入細胞移植 6 週後にエストロゲン投与を開始したマウスでは、開始 2 週以内に機能回復好中球が増加した (図 1 実線)。非投与群 (図 1 破線) との有意差は、エストロゲン反復投与 (4 週毎 6 回) により 6 ヶ月以上持続した。また、当初の非投与群で移植後 9 ヶ月に初めてエストロゲンを投与した場合、機能回復好中球は大きく増加した (図 1 破線)。gp91

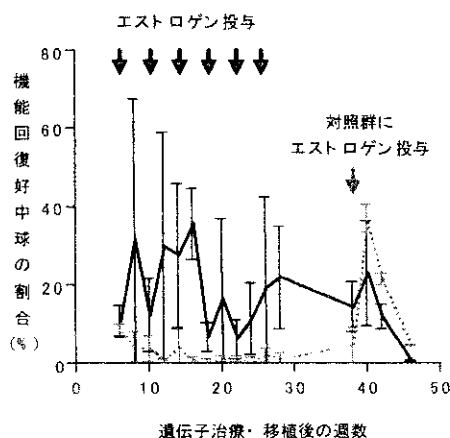


図 1 エストロゲン反応型 SAG による機能回復好中球の増幅

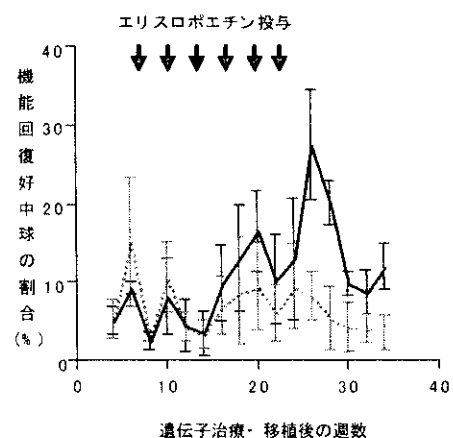


図 2 エリスロポエチン反応型 SAG による機能回復好中球の増幅

遺伝子及び EpoRMpl 遺伝子導入細胞を移植したマウスには、移植 8 週後からエリスロポエチン投与を開始したが (4 週毎 6 回)、細胞増幅効果は投与 3 回目以後から出現し、5 回投与後に最高値を迎えた (図 2 実線)。すなわち、いずれの SAG を用いた場合にも、X-CGD マウスにおいて機能回復好中球を増幅することができた。

#### D. 考 察

SAG システムにより遺伝子導入造血細胞の体内増幅が可能であるが、用いるシグナル分子によって細胞増幅の様式が異なることが示唆された。すなわち、GcR シグナルは主に顆粒球単球系前駆細胞レベルの増幅に有効であり、Mpl シグナルはより若い前駆細胞・幹細胞レベルの増幅に有効と考えられる。対象となる疾患や標的細胞によって、増幅シグナルの最適化が必要である。

#### E. 結 論

選択的増幅遺伝子によって遺伝子導入造血細胞の体内増幅が可能であり、治療効果の増強に寄与しうる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Nagashima T, et al.: New selective amplifier genes containing c-mpl for hematopoietic cell expansion. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 170-176, 2003
2. Kume A, et al.: In vivo expansion of transduced murine hematopoietic cells with a selective amplifier gene. *J Gene Med* 5: 175-181, 2003.
3. Hanazono Y, et al.: Introduction of the green fluorescent protein gene into hematopoietic stem cells results in prolonged discrepancy of in vivo transduction levels between bone marrow progenitors and peripheral blood cells in nonhuman primates. *J Gene Med* 4: 470-477, 2002
4. Hanazono Y, et al.: In vivo selective expansion of gene-modified hematopoietic cells in a nonhuman

primate model. *Gene Ther* 9: 1055-1064, 2002

##### 2. 学会発表

1. Takatoku M, et al.: The selective amplifier gene promotes multiclonal expansion of hematopoietic stem/progenitor cells in a nonhuman primate model. The 5th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2002. 6. 8, Boston, MA, USA
2. Nagashima T, et al.: In vivo expansion of gene-modified hematopoietic cells with a novel selective amplifier gene consisting of the erythropoietin receptor and MPL genes. The 5th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2002. 6. 8, Boston, MA, USA
3. Nagashima T, et al.: Second generation selective amplifier gene for efficient in vivo expansion of gene-modified hematopoietic cells. 第 8 回日本遺伝子治療学会 2002. 7. 18, 東京
4. Takatoku M et al.: Clonal insertion analysis of gene-modified hematopoietic cells after hematopoietic reconstitution with retrovirally-transduced CD34<sup>+</sup> cells in nonhuman primates. 第 8 回日本遺伝子治療学会, 2002. 7. 19, 東京
5. Hara T, et al.: Hematopoietic stem cell gene therapy using a selective amplifier gene in a murine X-CGD model. The 44th Annual Meeting of the American Society of Hematology, 2002. 12. 10, Philadelphia, PA, USA
6. 原武志ら: 慢性肉芽腫症モデルマウスにおける選択的増幅遺伝子を応用した造血幹細胞遺伝子治療、第 64 回日本血液学会総会, 2002. 9. 13, 横浜
7. 高德正昭ら: 選択的増幅遺伝子システムを用いた遺伝子改変造血細胞の体内増幅とそのクローン解析, 第 64 回日本血液学会総会, 2002. 9. 13, 横浜

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

特許願「選択的増殖性を付与する遺伝子」、  
出願番号：特願平8-47796、国際特許分類：  
C12N 15/62、平成8年3月5日提出。

## H. 参考文献

1. Ito K, et al. Blood 90, 3884, 1997
2. Matsuda KM, et al. Gene Ther 6, 1038, 1999
3. Xu R, et al. J Gene Med 1, 236, 1999

## II. 溶血性貧血

## Rh 抗原エピトープ群の解析

梶井 英治<sup>1</sup>、亀崎 豊実<sup>1</sup>、小山田 隆<sup>1</sup>、熊田 真樹<sup>1</sup>  
近江 俊徳<sup>1</sup>、奥田 浩<sup>1</sup>、岩本 禎彦<sup>1</sup>、小峰 光博<sup>2</sup>  
自治医科大学 法医学・人類遺伝学<sup>1</sup>、昭和大学藤が丘病院 内科血液<sup>2</sup>

**研究要旨** Rh システムの variant である weak D の遺伝子解析により、RHD 遺伝子の変異部位を明らかにすることができた。同変異が Rh ポリペプチドが有する複数の細胞外ループを変化させることにより、RhD 抗原の質的異常を引き起こしていること、さらに膜内安定性もしくは膜への組込みを減弱させ、Rh ポリペプチドの量的異常をも誘導していることを示唆する成績を得た。

### A. 研究目的

温式自己免疫性溶血性貧血の主要な自己抗原である Rh 蛋白は conformational 抗原である Rh 抗原を発現している。RhD 変異型である weak D 型赤血球は、抗 RhD 抗体に対して陰性もしくは非常に弱い反応性を呈し、抗グロブリン試験により weak D と判定される。Weak D 赤血球の RhD ポリペプチドには抗原性を変化させる質的な異常はなく、量的な異常があるだけとされてきた。しかし、1999 年、白色人種 weak D 161 例の RhD ポリペプチド全例に mutation が検出され、16 の型に分類された<sup>1)</sup>。さらに、これらの mutation の多くが膜貫通ドメインをコードする領域に集中しており、モノクローナル抗 RhD 抗体と weak D 赤血球との反応性の検討により型特異的な抗原密度と抗体反応性が認められたことから、weak D の RhD ポリペプチドに質的異常が存在することが強く示唆されている<sup>2)</sup>。

今回、我々は、日本人 weak D の RhD ポリペプチドにおいて、白色人種と同様な mutation が検出されるかどうかを検討するため、日本人 weak D 6 例について、RHD 遺伝子の全 10 exon の PCR-direct sequence 解析を行った<sup>3,4)</sup>。さらに、weak D 赤血球で示唆されている mutation と RhD ポリペプチドの質的・量的変化との関係を直接的に証明するため、weak D type 1 (V270G)、type 2 (G385A) ならびに本邦 weak D に見いだした mutation (G212C) を導入した RhD ポリペプチドを K562 細胞に発現させ、RhD ポリペプチド発現量ならびに RhD 抗原性の変化を検討した<sup>5)</sup>。

### B. 研究方法

血清学的に weak D と判定された血縁関係のない日本人 6 例より、インフォームドコンセントを得た後、末梢血液を採取し、ゲノム DNA を抽出した。RHD 遺伝子各 exon の前後に RHD 特異的プライマーを設定し、PCR-direct sequence 解析を行った。RHDcDNA をクローニングし、3' 端に GFP を導入した。PCR を用いた site-directed mutagenesis 法により、遺伝子変異 G212C ならびに type 1 (V270G)、type 2 (G385A) の mutation を導入した発現プラスミドを作製した。発現プラスミドを electroporation 法により赤白血病細胞株 K562 細胞に導入し、24 時間後に 23 種類のモノクローナル抗 RhD 抗体との反応性と GFP 発現量についてフローサイトメトリー解析を行った。

### C. 研究結果

1. RHD 特異的 PCR-direct sequence 解析により、日本人 weak D 6 例中 1 例に exon 4 の新たな mutation (634 G→T : 212 Gly→Cys)、2 例に exon 7 の新たな mutation (1013 T→C : 338 Leu→Pro)、1 例に Wagner らの報告している exon 4 の mutation である weak D type 15 (845 G→A : 282 Gly→Asp) を検出した。他の 2 例においては異常は検出されなかった。白色人種の weak D の 70.3 % が type 1 であり、18 % が type 2 であると報告されていることから、本邦の weak D の遺伝的背景が白色人種のそれと異なることが示唆された。

表1 各種モノクローナル抗 RhD 抗体と K562、K562/wild D、K562/G212C、K562/V270G and K562/G385A 細胞の反応性

抗体	RhD エピトープ	Mean fluorescence intensity				
		K562/wild D	K562/G212C	K562/V270G	K562/G385A	K562
LHM169/81	1a	95.4	87.2	93.2	64.8	63.0
LHM70/45	1b	50.2	41.4	41.0	37.2	47.4
LHM74/102	1b	53.8	54.4	46.8	41.4	47.4
P3X249	2	93.8	74.0	67.4	54.0	63.8
P3X290	2	120.2	78.4	94.4	56.4	71.6
LHM76/55	3	126.4	126.4	122.0	106.0	85.6
OSK3-3	4	116.2	115.4	109.4	105.2	80.0
P3X241	5	132.6	106.4	115.2	87.2	87.8
HIRO-6	5a	147.2	140.8	136.4	113.6	107.2
P3X35	5d	71.8	59.4	61.0	49.6	52.0
P3X61	6/7	150.2	130.4	144.0	121.6	115.2
RUM-1	6/7a	150.4	146.6	139.8	127.0	111.4
OSK3-2	6/7b	129.6	111.6	113.6	81.6	83.4
OSK3-1	6/7b	111.8	83.8	104.6	79.6	67.6
OSK3	6/7d	119.2	96.8	101.8	64.0	74.4
LHM169/80	6/7d	109.6	104.0	100.2	90.8	75.4
HM16	6/7f	132.0	106.6	128.6	96.2	85.2
HM10	6/7g	144.6	118.6	142.8	109.4	99.0
LHM59/20	6/7g	89.8	49.0	69.8	54.8	63.6
HIRO-2	6/7j	114.4	103.0	110.4	81.6	74.6
P3X212 11F1	8	120.2	112.4	120.2	101.4	111.6
LHM59/19	8	108.4	99.8	100.6	75.6	67.2
HIRO-4	9a	73.6	78.0	63.2	49.4	49.6
LHM77/64	9a	101.6	90.6	90.4	63.2	55.6
P3X212 23B10	9a	134.0	116.4	130.6	101.2	99.0

2. フローサイトメトリーにより、遺伝子変異を導入した細胞群について、RhD ポリペプチドの膜への発現量を GFP 発現量を指標にして wild RhD と比較すると、V270G と G212C では約 5%、G385A においては約 15% の発現量低下が認められた。GFP 発現量を RhD ポリペプチド発現量の指標とすることにより、種々の抗原性の変化が予想されているタンパクの発現量を抗体との反応性から推測することなく、直接的に各変異での発現量の低下が示された。

3. 発現 RhD ポリペプチドの各種モノクローナル抗 RhD 抗体との反応性を RhD 抗原の 9 エピトープ (epD1~epD9) について検討すると、抗体により種々に抗原性の減弱が検出された (表 1)。すなわち、G212C 変異発現細胞 (K562/G212C) では epD1b、epD2、epD5d、epD6/7g、epD8 が減弱しており、epD9a はやや増強していた。K562/V270G 細胞では、epD1b、epD2、epD5d、

epD6/7g、epD9 が減弱し、K562/G385A 細胞では epD3、epD4 以外のすべてが減弱していた。

#### D. 考 察

Conformational 抗原として赤血球上に発現している RhD 抗原には、多数の抗 RhD 抗体により規定される複数のエピトープが想定されており、RhD ポリペプチドの複数の赤血球膜外ループと膜貫通部分の立体的な組み合わせにより、それぞれのエピトープが発現している。今回、このような RhD 抗原性の変化は、これら膜貫通部の mutation が、RhD ポリペプチドの 3 次構造を変化させることにより、複数のエピトープに影響を与えた結果と推測される。

#### E. 結 論

Weak D に検出された mutation が、Rh ポリペプチドの複数の細胞外ループを変化させることによ

り、RhD 抗原の質的異常の原因となり、膜内安定性もしくは膜への組み込みを減弱させることにより Rh ポリペプチドの量的異常をも引き起こしている可能性が示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kamesaki T, et al.: Molecular characterization of weak D phenotypes by site-directed mutagenesis and expression of mutant Rh-green fluorescence protein fusions in K562 cells. *Vox Sang.* 81(4): 254-8. 2001.
2. Kamesaki T, et al.: A novel mutation in the RHD gene in Japanese individuals with weak D, encoding an amino acid change in the 11th transmembranous domain of the RhD protein transmembranous portion of the RhD protein. *Vox Sang.* 84(2): 141. 2003.
3. 亀崎豊実, 他: 日本人 Weak D 6 例の分子遺伝学的解析. *DNA 多型* 10: 86-190. 2002.

### 2. 学会発表

1. 亀崎豊実, 他: Weak D 症例における RHD 遺伝子発現量の解析. 第 48 次日本輸血学会, 神戸 2000 年 5 月 25 日 (日輸血会誌 46: 172, 2000)
2. 亀崎豊実, 他: Weak D における D 抗原活性の低下機序. 第 85 次日本法医学会, 久留米 2001 年 4 月 12 日 (日法医学会誌 55: 71, 2001)

## 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. Wagner FF, et al, *Blood* 93, 385-93, 1999
2. Wagner FF, et al, *Blood* 95, 2699-708, 2000
3. Kamesaki T, et al, *Vox Sang* 81, 254-258, 2001
4. Kamesaki T, et al, *Vox Sang* 84, 141, 2003



# 発作性夜間血色素尿症 (PNH) の発症機序について

木下タロウ、村上 良子、前田 裕輔、西村 純一、井上 徳光、泉井 朋久

大阪大学微生物病研究所免疫不全疾患研究分野

**研究要旨** 我々は、発作性夜間血色素尿症 (PNH) において GPI 欠損造血幹細胞がクローナルに拡大するメカニズムを解析している。PNH がしばしば再生不良性貧血と併発することからそのメカニズムとして自己免疫的機序を想定し、GPI 欠損細胞がその攻撃から免れて選択されることを *in vitro* と *in vivo* の系において実験的に証明した。

## A. 研究目的

GPI アンカーの欠損は、GPI アンカー生合成に関わる PIG-A 遺伝子の異常のみで説明できる。しかし、PNH における変異細胞のクローナルな拡大には、Pig-a ノックアウトマウスの解析などから、PIG-A 以外の他の要因が関与していることが示唆されている。免疫的機序が発症の一要因である再生不良性貧血の経過中に高頻度で PNH が発症することから、GPI アンカー欠損細胞がその免疫的な攻撃から逃れることにより拡大が起るとする選択説が考えられている。この説を実証する目的で研究を組み立てた。

## B. 研究方法

再生不良性貧血の患者の骨髓細胞と T 細胞を共培養することにより自己造血幹細胞を攻撃する CD4 陽性細胞クローンが得られたという報告<sup>2)</sup>、また PNH 患者では再生不良性貧血の患者と同様 HLA DR2 に強い関連性がみられ、CD4 陽性細胞の TCR V $\beta$  に偏りが見られるという報告<sup>3)</sup> から我々は細胞障害性細胞として CD4 陽性 T 細胞を想定し、GPI 陰性及び陽性の血液細胞をターゲットとし *in vitro* 及び *in vivo* の実験モデルを組み立てた。

## C. 研究成果

図 1 に我々の仮説を示す。つまり GPI アンカー型蛋白が細胞障害性 T cell とその標的細胞との間に関わる可能性として (A)、(B) 2つの場合を考えた。(A) は抗原が GPI アンカー型蛋白の場合である。GPI 陰性の細胞では細胞表面に抗原が発

現しないので MHC classII に提示されず、T cell に認識されないという仮説である。(B) は抗原が GPI アンカー型蛋白でない場合でも GPI アンカー型蛋白が cofactor として機能しているために、GPI 欠損細胞は T cell に認識されにくいという仮説である。これらの仮説を卵白アルブミン (OVA) を抗原、GPI 陰性及び陽性の EL4 細胞を抗原提示細胞とし、OVA ペプチドを認識する CD4 陽性 T 細胞の *in vitro* の proliferation assay の系により実証した。さらにマウスを使った *in vivo* の実験で少なくとも多能性造血細胞で GPI 陰性細胞が GPI 陽性細胞より T 細胞の攻撃に抵抗性があることがわかった。

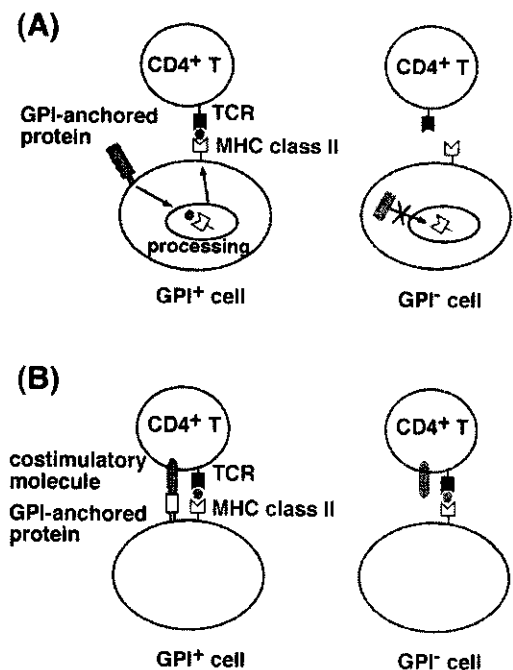


図 1

#### D. 考 察

数ある GPI アンカー型蛋白のうち、マウスでは CD48 がコファクターとしての活性を持つことがノックアウトの実験で実証されている<sup>4)</sup>。最近細胞膜上に存在する"ラフト"がシグナル伝達の間として注目されており、そこには GPI アンカー型蛋白も集積されている。それらがシグナル伝達をコファクターとして制御していると考えられる。

#### E. 結 論

GPI 欠損造血幹細胞は T 細胞の攻撃から逃れて拡大することができることを示唆し、選択説が実験的に正しいことがわかった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yoshiko Murakami et al. Inefficient response of T lymphocytes to glycosylphosphatidylinositol-anchor-negative cells: implications for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* vol. 100: 4116, 2002

##### 2. 学会発表

Yoshiko Murakami et al. Inefficient response of T lymphocytes to glycosylphosphatidylinositol-anchor-negative cells: implications for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Keystone symposium J8* 2003

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

#### H. 参考文献

1. Murakami, Y., Kinoshita, T., Maeda, Y., Nakano, T., Kosaka, H. & Takeda, J. *Blood* 94: 2963-2970, 1999
2. Nakao, S., Takami, A., Takamatsu, H., Zeng, W., Sugimori, N., Yamazaki, H., Miura, Y., Ueda, M., Shiobara, S., Yoshioka, T., Kaneshige, T., Yasukawa, M. & Matsuda, T. *Blood* 89: 3691-3699, 1997
3. Maciejewski, J. P., Follmann, D., Nakamura, R., Sauntharajah, Y., Rivera, C. E., Simonis, T., Brown, K. E., Barrett, J. A. & Young, N. S. *Blood* 98: 3513-3519, 2001
4. Gonzalez-Cabrero, J., Wise, C. J., Latchman, Y., Freeman, G. J., Sharpe, A. H. & Reiser, H. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 1019-1023, 1999

## PNH 異常幹細胞のクローナルな拡大メカニズム

金倉 譲<sup>1</sup>、桑山 真輝<sup>1</sup>、待井 隆志<sup>1</sup>、井上 徳光<sup>2</sup>

木下タロウ<sup>3</sup>、泉井 朋久<sup>3</sup>、西村 純一<sup>4</sup>

大阪大学医学部・血液・腫瘍内科<sup>1</sup>、大阪府立成人病センター研究所・免疫<sup>2</sup>

大阪大学微生物病研究所・免疫不全<sup>3</sup>、Duke 大学医学部<sup>4</sup>

**研究要旨** 我々は、発作性夜間血色素尿症 (PNH) において、GPI 欠損細胞がクローナルに拡大するメカニズムを解析している。その拡大には、自己免疫的な機序が考えられるが、末梢血のほとんどすべてを GPI 欠損異常細胞が占めてしまうような症例では、さらなる異常の関与が考えられる。我々は、12 番染色体に異常をもつ症例を経験し、その異常を同定し、その切断点から HMGA2 という転写促進因子を同定した。

### A. 研究目的

我々は、発作性夜間血色素尿症 (PNH) において、GPI アンカー欠損細胞がクローナルに拡大するメカニズムを解析している。PNH が、再生不良性貧血を合併することや HLA DRB1\*15 をもつ再生不良性貧血には高頻度で GPI 欠損細胞を認めることより、その拡大には自己免疫的な機序が考えられている<sup>1)</sup>。しかし、再生不良性貧血で見つかるような GPI 欠損細胞の比率はきわめて低く、末梢血のほとんどすべてを GPI 欠損異常細胞で占めるような症例では、さらなる異常の関与が考えられる。我々は、GPI 欠損細胞に 12 番染色体異常をもつ症例を経験し、その異常の同定を試みた。

### B. 研究方法

患者 GPI 欠損単球とマウスミエローマ細胞株から融合細胞を樹立し、患者異常 12 番染色体を 1 本ずつ持つ細胞株を樹立した。その細胞株から DNA を抽出し、STS マーカーによる PCR、inverse PCR、サザンプロテイングにより、12 番染色体におこっている切断点を同定した。最終的に、その切断点を挟むようなプライマーを設計し、PCR により、患者末梢血でもその異常が起きていることを確認した。

### C. 研究成果

患者 J20 の染色体異常は、一方の 12 番染色体

の q13-q15 領域の約 9.3 Mbp が欠失し、その断片のセントロメア端、テロメア端をそれぞれ 2.6kbp、9.5kbp 失った断片が、もう一方の 12 番染色体の q15 領域に 15kbp の欠失を伴い挿入していた (図 1)。さらに、その挿入部位のテロメア側には、欠失していた 12q13 領域由来の 2.6 kbp を含む断片の逆位挿入が見られた (図 1)。

12q15 領域の挿入部位には、HMGA2 (HMGI-C) 遺伝子が存在し、HMGA2 遺伝子の 3'UTR3kbp のうち、3'側 1.8 kbp が欠失していることがわかった。

### D. 考 察

HMGA2 は、胎児期には高発現しているが、大人ではほとんど発現していない転写促進因子である。HMGA2 の C 末領域の酸性アミノ酸に富む領域を欠損した異常蛋白が、脂肪腫、子宮筋腫、過誤腫などの良性の間葉系腫瘍の発症に関与することが知られている。3'UTR は、HMGA2 の転写産物の安定性に深く関与することが報告されており、間葉系腫瘍では、3'UTR を失うことにより HMGA2 の発現が誘導されていると考えられている。J20 においても、3'UTR を失うことにより、HMGA2 の発現が誘導され、この染色体異常を持つ異常造血幹細胞が良性腫瘍的に増加しているのではないかと考えられる。今後、J20 における HMGA2 の異常発現を調べ、他の症例で HMGA2 がどの程度関与しているかを明らかにしていく予定である。

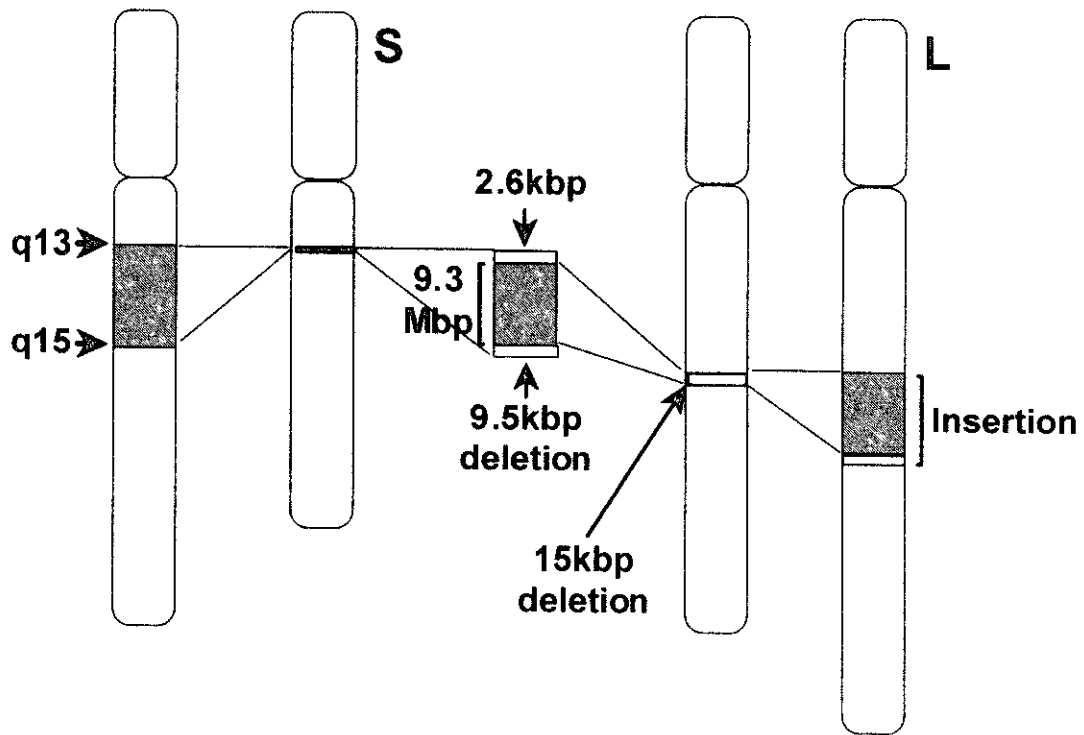


図1 患者 J20 の異常 12 番染色体の模式図

S、L は、それぞれ、欠失して短くなった 12 番染色体と挿入により長くなった染色体を示す。

## E. 結 論

今回の症例の解析から末梢血のほとんどを異常細胞で占めるような PNH の発症には、PIG-A の異常による GPI の欠損、自己免疫的な機序による GPI アンカー欠損細胞の選択に加え、良性腫瘍的に増加するために HMGA2 などの発現を誘導するような異常が必要であることが示唆された<sup>2)</sup>。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

N. Inoue et al.: A possible intrinsic mechanism for clonal expansion of PNH abnormal cells. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders. Ed. M. Omine and T. Kinoshita p114-126, Springer-Verlag, Tokyo 2003

### 2. 学会発表

泉井朋久 et al.: PNH クローンの拡大に関わる遺伝子変異およびそのモデルマウス作成への試み 第39回補体シンポジウム学術集会 東京, 2002

## 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. T. Kinoshita et al.: Relationship between aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Int J Hematol. 75(2): 117-122, 2002
2. N. Inoue et al.: Molecular genetics of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Int J Hematol. 77(2): 107-112, 2003

# PNH 患者の CD59<sup>-</sup> 顆粒球に特異的に発現する 遺伝子のスクリーニング

金丸 昭久

近畿大学・血液、腎臓、膠原病内科

**研究要旨** PNH では PIG-A 遺伝子の異常が検索された全ての症例で認められており、PIG-A 遺伝子が PNH の責任遺伝子であると考えられてきた。しかし、1999 年に Araten, DJ らが健常者にも PIG-A 遺伝子に異常のある好中球を見出したことから、PNH クローンの増加には PIG-A 遺伝子異常だけでは不十分であり、PIG-A 遺伝子異常以外の要因が必要であることが想定されている。

我々は PIG-A 遺伝子異常以外の要因を検出する足がかりとして PNH 患者の PNH クローンと非 PNH クローン間で、発現量に差のある遺伝子のスクリーニングを試みた。方法としては、cDNA サブトラクションと cDNA マクロアレイを用いた。

## A. 研究目的

PNH 患者における PNH クローンの増大に関わる要因を検出するため PNH クローンと非 PNH クローン間で、発現量に差のある遺伝子のスクリーニングを試みた。

## B. 研究方法

マグネットビーズで CD59<sup>-</sup> 顆粒球と CD59<sup>+</sup> 顆粒球を分離し、cDNA subtraction をおこなった。また cDNA マクロアレイを用いて約 3000 遺伝子について検討した。検出された候補遺伝子について他の PNH 症例 4 例で半定量的 RT-PCR 法で検討した。過去に報告のあった遺伝子について半定量的 RT-PCR 法で PNH 症例 7 例、健常者 5 例について検討した。

## C. 研究結果

一例の PNH 患者の CD59<sup>-</sup> 顆粒球で発現量が 2 倍以上に増加している遺伝子を 3 種類検出したが、他の症例ではあきらかな増加傾向を認めなかった。

過去に PNH 患者の顆粒球で増加している報告があった遺伝子 4 種類について検討したが、過去の報告とは異なり、PNH 患者の顆粒球での明らかな増加傾向を認めなかった。

## D. 考 察

今回の検討では PNH 患者で特異的に発現が増強している傾向のある遺伝子は検出されなかった。一定の傾向が認められなかった原因として顆粒球における RNA のこわれやすさが考えられる。今後本研究の目的を達成するためには、より少ない量の RNA で遺伝子の発現量を比較できる手法を用いて、幹細胞を用いて PNH クローンと非 PNH クローン間の遺伝子発現の比較が必要と考えられる。

## E. 結 論

著者らが検索し得た範囲では、PNH クローン、または PNH 患者で特異的に発現が増強している傾向のある遺伝子は検出し得なかった。

## F. 研究発表

1. 嶋田高広 他 Screening for the genes responsible for the survival advantage of PNH clones by cDNA subtraction. 30th Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology, Tokyo, Japan, 2001, 8
2. 嶋田高広 他 PNH 患者の CD59<sup>-</sup> 顆粒球に特異的に発現する遺伝子のスクリーニング 第 64 回日本血液学会総会, 第 44 回日本臨床血液学会総会, 横浜, 2002 年, 9 月

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

### Ⅲ. 不応性貧血

# 不応性貧血症例の新規登録—予後解析に向けて

通山 薫<sup>1</sup>、伊藤 満<sup>1</sup>、内山 卓<sup>2</sup>、石川 隆之<sup>2</sup>、小峰 光博<sup>3</sup>

川崎医科大学 検査診断学<sup>1</sup>、京都大学 血液病態学<sup>2</sup>、昭和大学藤が丘病院 内科血液<sup>3</sup>

**研究要旨** 研究班 MDS 新規症例登録データベースをもとに、解析可能な MDS 280 症例について IPSS 分類による予後解析を行った。MDS 全体での 3 年生存率は 61.8 %、IPSS による違いは Low 100 %、Int-1 75.6 %、Int-2 32.3 %、High 24.8 %であった。IPSS スコアによりさらにカテゴリーを細分化した生存率は、Int-1 内ではスコア 0.5 で 85.7 %、1.0 で 52.2 %、Int-2 内ではスコア 1.5 で 18.1 %、2.0 で 42.9 %であった。Int-1 であってもスコア 0.5 と 1.0 では予後に差が認められた ( $p=0.016$ )。従来の Low ~ High による 4 区分だけでなく、本邦における IPSS スコアと予後との相関の解析が必要であると考えられた。

## A. 研究目的

IPSS による大規模な予後解析は海外からは報告されているが、国内ではまだなされていない。そこで国内の MDS 症例について、IPSS 分類による予後解析を行った。以下は現時点でのその中間報告である。

## B. 研究方法

厚生労働科学研究班新規症例データベースに登録されている MDS 症例のうち、今回の解析に可能なデータの揃っている 280 症例について IPSS によるカテゴリー分けを行い、予後を比較した。その内訳は男 182、女 98、年齢 16 ~ 91 歳 (中央値 64 歳)、FAB 分類による病型 (主治医診断) は RA 120、RARS 15、RAEB 82、RAEBt 40、CMMoL 19、記載なし 4 であった。

## C. 研究成果

以下の生存率とは全て 3 年生存率である。MDS 全体での生存率は 61.8 % (Fig. 1)、FAB 分類病型による違いは、RA 89.8 %、RARS 90.9 %、RAEB 36.9 %、RAEBt 24.3 %、CMMoL 42.4 %であった (Fig. 2)。IPSS による違いは Low 100 % (N=47)、Int-1 75.6 % (N=128)、Int-2 32.3 % (N=70)、High 24.8 % (N=35) であった (Fig. 3)。IPSS スコアによりさらにカテゴリーを細分化した生存率は、Int-1 内ではスコア 0.5 で 85.7 % (N=81)、1.0 で 52.2 % (N=47)、Int-2 内ではスコア 1.5 で 18.1 % (N=25)、2.0 で 42.9 % (N=

45) であった (Fig. 4)。Wilcoxon 検定にての予後比較では、FAB 分類病型では RA vs RAEB/RAEBt/CMMoL、RARS vs RAEB/RAEBt/CMMoL、RAEB vs RAEBt で  $p<0.05$  であった。IPSS では Int-2 vs High を除いた全ての群間で  $p<0.01$  であった。IPSS スコアによる比較では 0 vs 0.5 以上、0.5 vs 1.0 以上、1.0 vs 1.5、1.0 vs 3.0 以上、2.0 vs 3.0 以上で  $p<0.05$  であった。

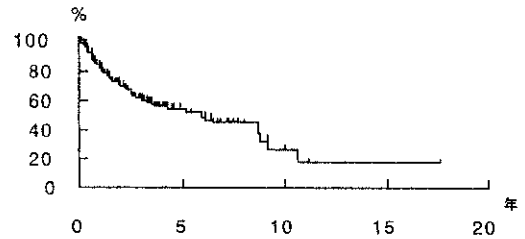


Fig. 1 : MDS 全体での overall survival

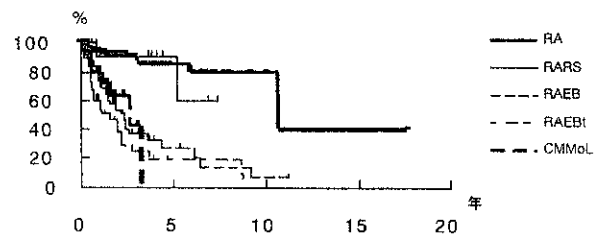


Fig. 2 : MDS 病型による overall survival の違い

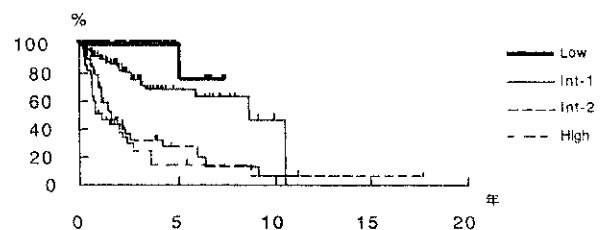


Fig. 3 : IPSS による overall survival の違い



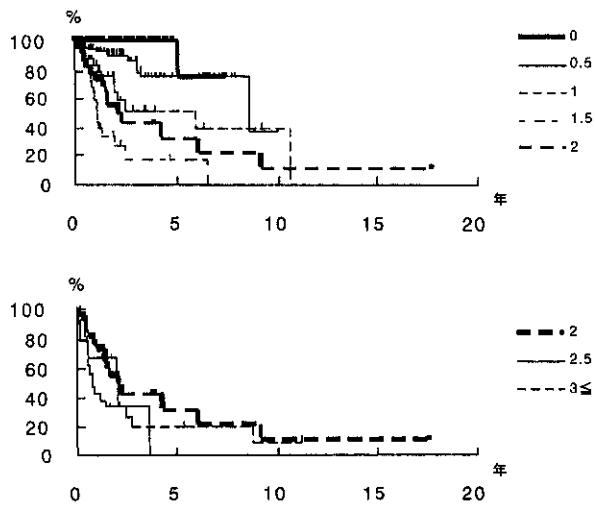


Fig. 4 : IPSS スコアによる overall survival の違い

#### D. 考 察

例えば Int-1 であってもスコア 0.5 と 1.0 では予後に差が認められるなど ( $p=0.016$ )、この時点でも興味深いデータが得られている。少なくとも従来の Low~High による 4 区分だけでは予後推定に十分といえない。今回使用したデータは蒐集途中のものを使用しており、今後登録症例数も増える予定である。なお造血幹細胞移植等治療法の進歩によって、最近の予後予測は IPSS 提唱当時のものから若干変化してきた可能性がある。今後パラメータを増やして、本邦における IPSS スコアと予後との相関の引き続きの解析が必要であると考えられた。

#### E. 結 論

中間報告のため該当なし

#### F. 研究発表

なし

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

# 低リスク骨髓異形成症候群に対するシクロスポリン療法 —安全性に関する予備的検討ならびに試験計画書の一部改訂

内山 卓<sup>1</sup>、通山 薫<sup>2</sup>、石川 隆之<sup>1</sup>

京都大学医学研究科血液・腫瘍内科学<sup>1</sup>、川崎医科大学検査部<sup>2</sup>

**研究要旨** 平成13年5月に当研究班による prospective study として開始された「低リスク MDS に対する CSA 療法の有効性に関する研究」の安全性に関する予備的検討を行った。現在まで白血病への進展や、長期間の治療中断を要する重篤な有害事象の報告はない。治療終了した患者の調査においても、1名で減量を要する腎機能障害を認めたものの、その他の有害事象は NCI CTC で grade 1 以下のものに限られていた。以上を踏まえて、当初予定していた試験期間の延長を含めて、患者登録の促進を目的とした臨床試験計画書の改訂を行った。

## A. 研究目的

International prognostic scoring system (IPSS) で Low または Int-1 に該当する低リスク群骨髓異形成症候群 (MDS) に対して免疫抑制療法が有効であるとの報告が見られる。当研究班により平成13年5月に「低リスク MDS に対する CSA 療法の有効性に関する研究」が多施設共同の prospective study として開始されたものの、現時点での患者登録は不十分であり、試験期間の延長などによる患者登録の促進が望ましいと考えた。一方、本研究の安全性中間評価は患者登録の遅れからいまだ行われていない。本研究の継続の是非を判断するため、研究事務局により、安全性に関する予備的検討を行った。

## B. 研究方法

平成13年5月1日より、平成15年2月28日までに9名の患者登録がなされ、うち5名では予定治療期間を終了した。調査票が回収できたのは3名で、残る2例においても書面により治療経過の概要を得た。これらの資料をもとに、安全性の検討を行った。

## C. 研究結果

現在まで研究計画書の中止基準 (現病の悪化、NCI の common toxicity criteria (CTC) grade 3 以上の有害事象など) をみたま有害事象の報告はない。予定治療期間を終了した5名での検討では、

患者の希望により CSA 療法が中断された1名を除き、CSA 療法での中断を要する有害事象は認められておらず、24もしくは32週間の治療が予定通り遂行された。全例で追跡調査を含めて病型移行は確認されていない。1名で CTC grade 1 の腎機能障害 (血清 creatinine 値上昇) を認め、CSA の減量を要したが、その後すみやかに回復した。感染症を疑わせる症状、もしくは臨床検査値における CRP 上昇はのべ3回認めたが、38度以上の発熱を認めたのは1回で、その有熱期間は1日であった。いずれも CSA の減量を行うことなく軽快した。その他、CTC grade 1 の肝酵素値 (AST、ALP) 上昇、低 Mg 血症が認められた。なお、5名中3名に minor response 以上の血球回復効果を認めている。

## D. 考 察

低リスク MDS 患者は免疫機能低下が予測され、また高齢者に多いことから、臨床試験にあたっては重篤な有害事象の発生が懸念されたが、幸いなことに今までのところ試験の中断を要する有害事象は見られていない。白血病化のみならず、FAB 分類や IPSS による、より進行した病型への移行も認められていない。現在のところ本臨床試験は研究の継続に支障を来す危険性を伴うものとは判断されない。

当初、試験期間を平成13年5月1日より2年間と定め、目標登録患者数を50名に設定したが、

試験終了を目前に控えた現在も登録患者数は十分ではない。本臨床試験をより有意義なものとするためには、患者登録の促進が不可欠である。そのため、研究計画書の一部改訂を平成 15 年 1 月の班会議で提案し、その場での議論を踏まえて、同年 3 月 7 日に臨床試験実施計画書を改訂した。改訂の骨子は 1) 臨床試験を班会議の参加施設以外にも拡大し、それらの施設では遺伝子解析研究への参加を必須としない、2) 適格患者基準から、「診断後 1 年以内」という限定をはずす、3) 試験期間を 1 年間延長する、の 3 点である。

## E. 結 論

低リスク MDS 患者に対する CSA 療法の予備的解析により、現時点では本臨床試験にともなう危険性は大きくないと判断された。今後さらに患者登録を進め、意義のある研究とするため、臨床試験実施計画書の一部改訂を行うこととした。

## F. 研究発表

なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

# MDS 診断の標準化

朝長万左男<sup>1</sup>、湖上 健吾<sup>1</sup>、井上 順子<sup>1</sup>、陣内 逸郎<sup>1</sup>、鶴田 一人<sup>2</sup>

長崎大学医学部原研内科<sup>1</sup>、長崎大学附属病院検査部<sup>2</sup>

**研究要旨** MDS 診断の標準化のために、血球系統別に MDS 診断に必要な異常所見を挙げ定量的に検討し、MDS 診断を満たす minimal dysplasia を定義し、診断の標準化を目指した。MDS において、好中球系では核クロマチン染色パターン (I、II、III) による好中球分類により、全症例で異常型 (II、III) 好中球の出現頻度が分析した好中球中 20 % 以上、赤芽球系では核融解像が 20 % 以上、血小板・巨核球系では巨核球中の異常巨核球の比率が 30 % 以上に認められ、健常人骨髄との間に差を認めた。MDS 診断においては、異常型クロマチン好中球、赤芽球核融解像、異常巨核球の出現頻度の定量的検討が有用であった。

## A. 研究目的

MDS の診断には、FAB 分類が長く用いられてきたが、新しい WHO 分類では、FAB 分類の CMML、RAEB-t が除かれ、RA は、RA と RCMD に分けられる等の重要な変更がなされている。なかでも WHO 分類の RA は、貧血と赤血球系のみ形態異常とされ、他の貧血疾患との鑑別がきわめて重要となる。今回、各血球系統別に MDS 診断に必要な異常所見を挙げ、MDS 診断を満たす minimal dysplasia を定義できるか検討した。

## B. 研究方法

### 1. 対象

MDS (RA) 52 例、健常人 10 例、AIHA 5 例、鉄欠乏性貧血 5 例、IDA 5 例、巨赤芽球性貧血 5 例、PNH 2 例、二次性貧血 6 例。

### 2. 今回検討した血球系統別形態異常

好中球系：脱顆粒、偽 Pelger 異常、過分葉好中球、核のクロマチンパターン異常 (粗大クロマチン凝集、核辺縁不整) の程度により好中球を分類 (type I~III) <sup>1)</sup>。赤芽球系：巨赤芽球様変化、多核巨大赤芽球、核間染色質橋、核の断片化、核の辺縁不整、核クロマチン構造の崩壊：核融解像 (karyolysis)。血小板系：単核微小巨核球 (I)、二核微小巨核球 (II)、単核小型巨核球 (III)、分離多核巨核球 (IV)、奇形核巨核球 (V 型) <sup>2)</sup>。

## C. 研究結果

MDS における血球系統別形態異常のまとめ

### 1) 好中球系

MDS 診断において、脱顆粒好中球の出現は MDS (RA) において特異的であったが、全症例中出现症例は 25 % 以下にとどまった。核クロマチン染色パターンによる好中球分類では、MDS では全症例で Type II+III が分析した 20 % 以上となり、20 % 未満の健常人と差を認めた。

### 2) 赤芽球系

巨赤芽球様変化の出現は、MDS 症例の 20 % に出現が認められたに過ぎず MDS に特異的とはいえなかった。核融解像は健常人を含めた全症例で観察されたが、健常人では赤芽球中の 20 % 未満、MDS では 20 % 以上に認められ差を認めた (図 1)。

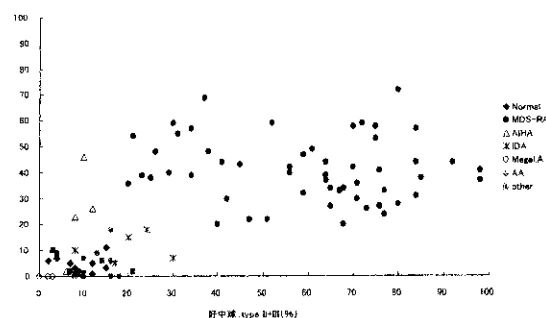


図 1 好中球 (type II+III) と赤芽球 karyolysis 出現頻度

### 3) 血小板、巨核球系

微小巨核球 (I、II 型) の出現は MDS に特異的であったが、出現が認められる症例の頻度は少なかった。MDS 症例では、巨核球中の異常巨核球 (I~V 型の総和) の比率を 30 % 以上認め、健常人では 25 % 以下であった (図 2)。