

Two-color フローサイトメトリーを用いた微小 PNH 血球検出の信頼性

中尾 眞二¹、杉盛 千春¹、中条 達也¹、平郡 雄二²、小峰 光博³

金沢大学大学院医学系研究科 細胞移植学¹、ビー・エム・エル総合研究所細胞形態学部細胞生物学課²

昭和大学藤が丘病院 内科血液³

研究要旨 少数の PNH 血球を検出することは骨髄不全の病態を診断する上で極めて重要であるが、その検出方法は未だに標準化されていない。10 万個の CD11b 陽性顆粒球および glycoprotein A 陽性赤血球中の CD55⁻CD59⁻ 細胞を検出するフローサイトメトリー法の信頼度を検証するため、過去に 0.005 ~ 0.1 % の PNH 血球を認めた再生不良性貧血患者 6 人の末梢血について、金沢大学と BML 社の両者で PNH 血球を同時測定した。その結果、検出された CD55⁻CD59⁻ 細胞の割合は両者間でほぼ一致しており、差異は ± 50 % 以内であった。PNH 赤血球が 0.1 % 以下の検体を対象として Ham 試験変法施行後にフローサイトメトリーを行ったところ、CD55⁻CD59⁻ 赤血球は消失していた。したがって、これらの抗体を用いた two-color フローサイトメトリーは微小の PNH 血球を正確に定量していると考えられた。

A. 研究目的

再生不良性貧血や骨髄異形成症候群の不正性貧血では、それぞれの約 50 %、20 % に、発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) 形質を持つ血球のごくわずかな増加が認められる。このような PNH 血球陽性の骨髄不全例は、PNH 血球陰性骨髄不全例に比べて、①免疫抑制療法に対する反応性が高い、②HLA-DRB1*1501 を保有する例の頻度が高い、③RAEB や AML に移行する頻度が低い、などの特徴がある。このため、微小の PNH 血球を正確に検出することは、骨髄不全患者に対してプライマリーケアを行ううえで最も重要と言っても過言ではない。

われわれは、当班会議参加施設を中心とする他施設の検体について、CD11b (顆粒球) または glycoprotein A (赤血球) と CD55、CD59 の各抗体を用いた two-color フローサイトメトリーにより CD11b⁺CD55⁻CD59⁻ 分画の顆粒球および glycoprotein A⁺CD55⁻CD59⁻ 分画の赤血球を PNH 血球と判定してきた。健常者 68 人の末梢血で検出される PNH 血球の平均 +4SD (顆粒球で 0.003 %、赤血球で 0.005 %) 以上の PNH 血球がみられる例を PNH 血球陽性としたときに、上記のような臨床像の明らかな違いが認められた。

しかし、このような PNH 血球の割合の cut off 値は、これまで報告されている他施設の cut off

値よりはるかに低値であるため、一般化するには至っていない。そこで、今回はこの two-color フローサイトメトリーの信頼性を検証するため、PNH 血球の割合が特に少数であった再生不良性貧血例の末梢血を対象として、PNH 血球の割合を BML 社と同時に測定するとともに、CD55⁻CD59⁻ 分画に存在する赤血球の補体感受性を検討した。

B. 研究方法

Araten らの原法を改変した既報の方法により、182 例の再生不良性貧血患者において PNH 血球の有無を検討した。一部の患者からは EDTA-2Na 血 5 ml を真空管にて 2 本採取し、一方を BML 社に 4 °C 移送し、他方は当科にて 4 °C 保存した。それぞれの施設でほぼ同時刻 (採血後約 24 時間後) に PNH 血球を測定した。

一部の検体に対しては、生理食塩水で約 50 % の赤血球浮遊液とし、トロンビン、非働化した牛胎児血清 (FCS) を加えたのち二分劃した。一方には非働化した同血液型血清、他方には非働化しない同血液型血清を加え、0.2 N 塩酸により pH を 6.8 としたのち 90 分間インキュベートした。この Ham 試験変法の後、両者についてフローサイトメトリーにより、赤血球 10 万個あたりの PNH 赤血球の割合を測定した。

C. 研究成果

1. 「PNH 血球陽性」と判定された再生不良性貧血症例における PNH 血球の割合

図 1 は、PNH 血球が陽性と判定された 118 例における PNH 血球の割合を示している。「陽性」の判定に用いた cut off 値は顆粒球で 0.003 %、赤血球で 0.005 %と低値ではあるが、実際に PNH 血球陽性と判定された例の多くは、PNH 血球の割合が 0.01 ~ 1.0 %に分布していた。

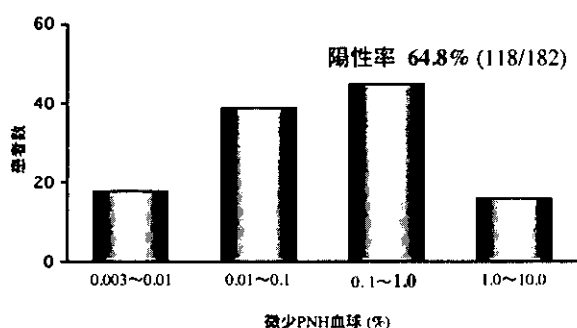


図 1. 「PNH 血球陽性」例における CD55-59-顆粒球の割合

2. BML 社との同時測定

計 6 例の患者について PNH 顆粒球を同時測定した。図 2 は 3 例の結果を示している。6 例における PNH 顆粒球の割合はそれぞれ 0.040 %/ 0.020 %、0.012 %/ 0.014 %、0.005 %/ 0.009 %、0.075 %/ 0.070 %、0.008 % / 0.008 %、0.025 %/ 0.020 %、であり、両者間の誤差は 50 %以内であった。分散分析では直線の相関が示された (P=0.0039)。

採血から測定までの時間が及ぼす影響をみたところ、顆粒球では 24 時間後には CD11b の発現が低下している症例も存在し、3 日目以降誤差が大きくなる傾向がみられた。一方、赤血球では 5 ~ 6 日経過しても測定値に大きな差はみられなかった。

3. Ham 試験変法による PNH 赤血球の証明

計 5 例の患者について Ham 試験変法による補体溶血試験を行った。図 3 は 2 例の結果を示している。非働化していない血清を加えた検体では全例において glycophorin A⁺CD55⁻CD59⁻ 血球が消失していた。

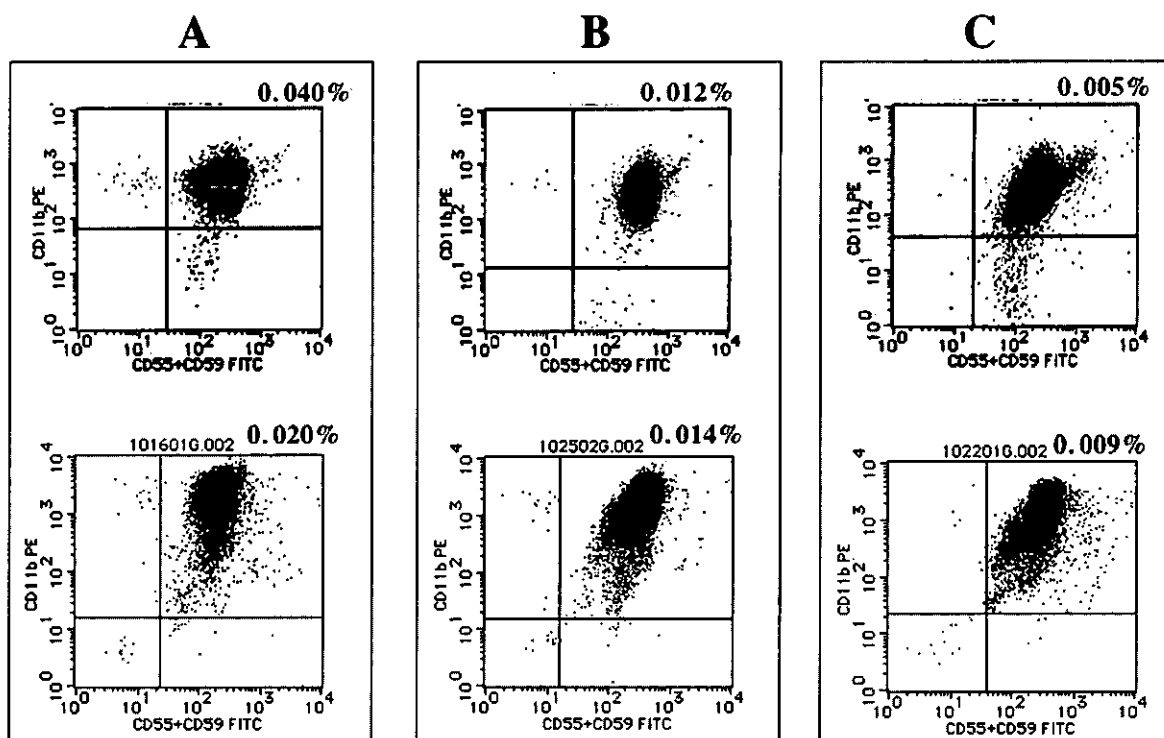


図 2. 異なる2施設における PNH 顆粒球の検出

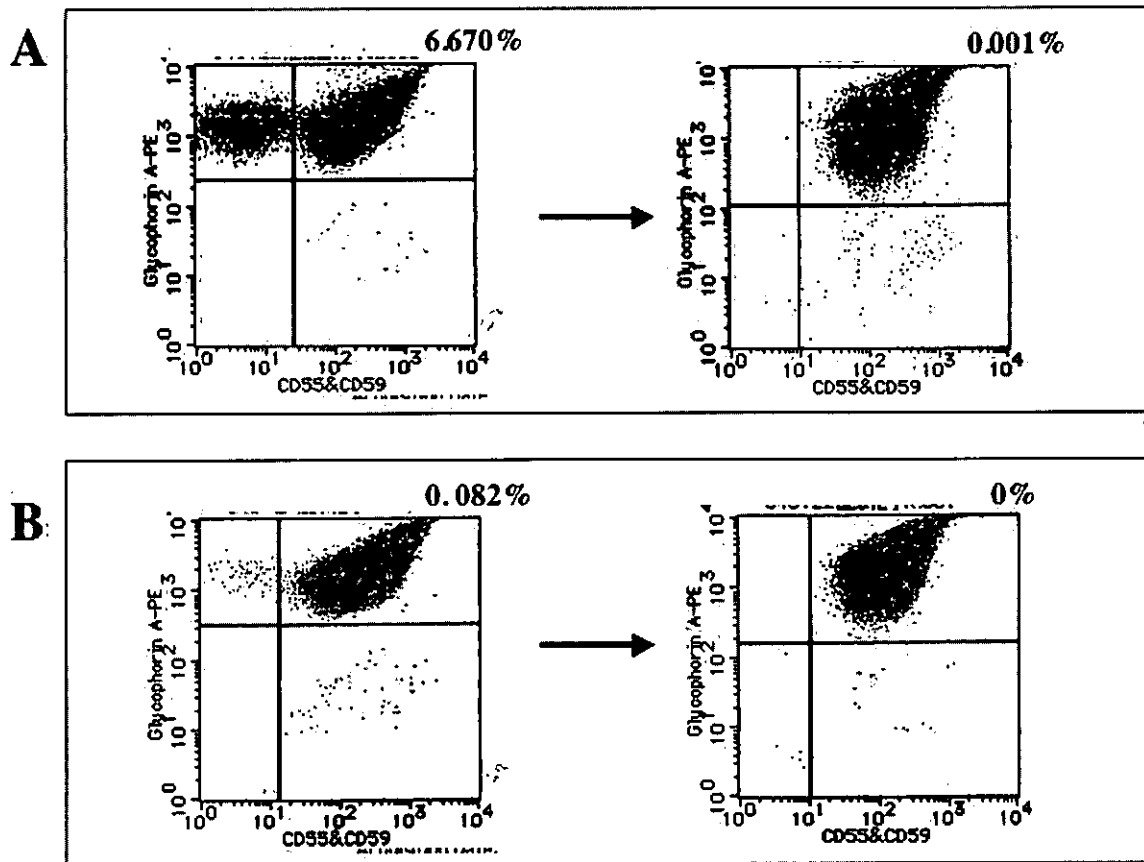


図3. Ham 試験変法による CD55⁻CD59⁻ 赤血球の溶血

D. 考 察

Araten らの方法を改変したフローサイトメトリーを用いることにより、0.1%以下の少量であっても、施設を問わずPNH形質の顆粒球をほぼ正確に定量できることが示された。赤血球については、抗glycophorin A抗体による凝集がBML社で問題となっているため、現在細部を調整中である。採血後の経過時間は、24時間までは測定結果に大きな影響を与えないことから、今後BML社への委託により、微量PNH血球が手軽に測定できるようになると思われる。

PNH型の赤血球は、glycophorin Aの発現強度が時間を経ても比較的安定しており、顆粒球に比べてCD55やCD59の欠失の程度が均一であるためか、PNH形質の血球がクラスターを形成することが多い。このため、赤血球の検索は、顆粒球中のCD55⁻CD59⁻血球を検出するよりも、微量なPNH血球を検出しやすいという特長がある。し

かし一方でDNA解析が行えないため、本当にPNH血球であるかどうかを確認することが困難であった。今回、トロンピンとFCSを添加したHam試験変法を併用することにより、これまでPNH血球と定義していた分画の赤血球が、補体の添加により実際に溶血して消失することが初めて示された。したがって、このtwo-colorフローサイトメトリーは微量PNH赤血球を検出する信頼性の高い検査であるといえる。一部の検体では、異種抗赤血球抗体を含むFCSの量が比較的少ない条件では、CD55・CD59の発現レベルの低い細胞が溶血試験後も残存した。これはPNH type IIの赤血球をみている可能性がある。通常のPNH赤血球では、非PNH赤血球との判別に迷うことは少ないが、境界領域の細胞が多い検体に対しては、今回のHam試験変法を同時に行うことによって、偽陽性の判定を避けることができるとと思われる。

E. 結 論

・Two-color フローサイトメトリーにより施設を問わず PNH 形質の顆粒球をほぼ正確に定量できることが示された。

・フローサイトメトリーで PNH 血球と定義していた分画の赤血球が補体の添加により溶血することが確認された。

・今後赤血球においてもフローサイトメトリーによる PNH 血球検査の施設間格差を検討する必要があると思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishiyama K, et al.: Polyclonal hematopoiesis maintained in patients with bone marrow failure harboring a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells. *Blood* 102: 1211-1216, 2003
2. Chuhjo T, et al.: Epstein-Barr virus (EBV)-associated post-transplantation lymphoproliferative disorder simultaneously affecting both B and T cells after allogeneic bone marrow transplantation. *Am J Hematol* 72: 255-258, 2003
3. Koizumi K, et al.: Severe aplastic anemia associated with thymic carcinoma and partial recovery of hematopoiesis after thymectomy. *Ann Hematol* 82: 367-370, 2003
4. Ontachi Y, et al.: Congenital predisposition to spontaneous intracranial hypotension: a case report. *Headache* 43: 678-680, 2003
5. Sugimori C, et al.: Persistent remission after immunosuppressive therapy of hairy cell leukemia mimicking aplastic anemia: two case reports. *Int J Hematol* 77: 391-394, 2003
6. Zhu J, et al.: The molecular mechanism of arsenic trioxide-induced apoptosis and oncosis in leukemia/lymphoma cell lines. *Acta Haematol* 110: 1-10, 2003
7. Zhu J, et al.: Arsenic trioxide induces apoptosis in leukemia/lymphoma cell lines via CD95/CD95L

system. *Oncol Rep* 10: 705-709, 2003

8. Asakura H, et al.: Antithrombotic role of nitric oxide in rats under physiological conditions. *Thromb Haemost.* 91: 71-75, 2004

9. Endo T, et al.: Successful treatment with rituximab for autoimmune hemolytic anemia concomitant with proliferation of Epstein-Barr virus and monoclonal gammopathy in a post-nonmyeloablative stem cell transplant patient. *Ann Hematol* 83: 114-116, 2004

2. 学会発表

1. Feng X, et al. Diazepam-binding inhibitor related sequence-1 (DRS-1): A candidate autoantigen in acquired aplastic anemia. *Blood* 2003; 102: 206a.
2. Sugimori C, et al. Roles of HLA-DR15 alleles in the immune mechanisms of acquired aplastic anemia: methods of contribution differ between DRB1*1501 and DRB1*1502. *Blood* 2003; 102: 508a.
3. Chuhjo T, et al. Genomic instability is less accelerated in bone marrow failure patients with a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH)-type blood cells than in those without such PNH-type cells. *Blood* 2003; 102: 822a.

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. Araten DJ, et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5209, 1999

Fanconi 貧血患者における FANCA 遺伝子の解析

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) は遺伝的に 11 群に分類され、8 群の遺伝子が同定されている。FANCA は世界的に約 60 % の患者で原因遺伝子となり、large deletion を含む多様な変異を示す。私達は、日本人患者検体で FANCA 異常の系統的解析を行い、27 家系で変異を同定し、large deletion の新しい発生機構を見出した。また、骨髓細胞系統に選択的な reversion とこれによる造血の長期的維持を示す症例を見出した。これは、FA における早期の遺伝子治療の有用性を示唆する。

A. 研究目的

Fanconi 貧血 (FA) は、小児期に発症する進行性の骨髓不全、急性骨髓性白血病や骨髓異形成症候群、固形腫瘍を含む悪性腫瘍の高頻度の合併などを特徴とする常染色体劣性遺伝疾患である。患者細胞は染色体不安定性を示し、特に mitomycin C (MMC) などの DNA 架橋剤に高感受性を示す。FA は遺伝的に異なる少なくとも 11 群に分類され、このうち 8 群に対応する遺伝子 (FANCA、C、D1/BRCA2、D2、E、F、G、L/PHF9) が同定されている。欧米の解析では、患者の約 90 % において FANCA、C、G 遺伝子のいずれかの変異が原因となるが、民族により変異のタイプは異なる。FANCA 遺伝子異常の頻度が 60-70 % と最も高く、その変異の特徴として多様性と large deletion が多いことが挙げられている。佐々木らのグループは日本人患者 20 例中 14 例で FANCA の変異を検出したが、large deletion の系統的解析は行われていない。私達は、これまでに日本人における FANCC、FANCG 変異について報告してきたが、今回、これらの遺伝子に変異が検出されなかった症例で、gene dosage assay による large deletion 検出を含む系統的な解析を行うことを目的とした。また、この解析中に造血細胞における reversion により長期間の造血が維持されている症例を見出したので、あわせて報告する。

B. 研究方法

(1) FANCA の遺伝子解析--- FANCA の 43 個の exon を PCR で増幅し塩基配列を決定した。また、

RNA の利用できるものについては RT-PCR で増幅した cDNA の塩基配列を決定し、さらに large deletion を見出すために、各 exon の DNA コピー数を定量 PCR で測定した。

(2) FANCA 蛋白、FANCD2 蛋白の解析---細胞の lysate を SDS 電気泳動し、それぞれに対する抗体を用いて免疫プロットを行った。

(3) FANCA 変異体の機能解析---変異体 FANCA をコードする cDNA をレトロウイルスで FANCA 欠損細胞に発現させ、種々の濃度の MMC 存在下に細胞生存を測定した。

C. 研究成果

(1) FANCC、FANCG 遺伝子に変異をもたない 35 人の患者 (非血縁) において FANCA 遺伝子を解析した結果、その結果、27 例において 48 個の FANCA 変異アレルを同定した (表)。この中には、8 個の missense 変異、15 個の splice 変異、15 個の frameshift、1 個の nonsense、1 個の in-frame deletion、8 個の large deletion が含まれた。これらの大部分は 1 家系のみに見出される「private 変異」であり、合計 29 種類の変異のうち 20 は新しいものであった。一方、いくつかの変異は繰り返し検出され、これらはいずれも日本人に特徴的な変異であった。特に、2546 delC は約 20 % のアレルに見出された。

FANCA には large deletion の多いことが知られ、これまでに同定された junction はすべて Alu 配列を介する相同組み換えによるものであった。我々は、8 個の large deletion のうち 2 個において

表 日本人における FANCA 変異解析結果

Patient	Mutation 1	Effect	Location	Mutation 2	Effect	Location
FA 8	2546delC	frameshift	exon 27	IVS27-1G>A	868-869delPheGln	IVS27
FA11	3918-3919insT	frameshift	exon 39	3918-3919insT	frameshift	exon 39
FA14	3720-3724del	aberrant splicing	exon 37	3720-3724del	aberrant splicing	exon 37
FA15	4240-4241del	frameshift	exon 42	IVS27-1G>A	868-869delPheGln	IVS27
FA17	2170A>C	Thr724Pro	exon 24	505G>T	Glu169Stop	exon 5
FA20	2546delC	frameshift	exon 27	not detected		
FA21	1303C>T	Arg435Cys	exon 14	exon3-3'UTRdel	deletion	*exon 3-3'UTR*
FA22	IVS27-2A>T	868-869delPheGln	IVS 27	IVS27-2A>T	868-869delPheGln	IVS27
FA23	2546delC	frameshift	exon 27	IVS39+2T>C	aberrant splicing	IVS39
FA25	exon12-26del	deletion	exon 12-26	not detected		
FA28	978-979del	frameshift	exon 11	exon 30del	deletion	*exon 30*
FA30	IVS9-1G>T	aberrant splicing	IVS9	not detected		
FA35	2546delC	frameshift	exon 27	not detected		
FA38	IVS41-1G>C	aberrant splicing	IVS41	IVS41-1G>C	aberrant splicing	IVS41
FA43	exon 3-6del	deletion	*exon3-6	exon 15-21del	deletion	exon 15-21*
FA48	2546delC	frameshift	exon 27	1303C>T	Arg435Cys	exon 14
FA50	exon3 - 3'UTRdel	deletion	*exon 3-3'UTR*	1303C>T	Arg435Cys	exon 14
FA52'	2546delC	frameshift	exon 27	exon 24-28del	deletion	exon 24-28
FA54	IVS27-2A>T	868-869delPheGln	IVS27	2602T>G	Phe868Val	exon 28
FA56	3638-3639del	frameshift	exon 37	4015-4017del	1339del Leu	exon 41
FA59	3163C>T	Arg1055Trp	exon 32	IVS37+1G>T	aberrant splicing	IVS37
FA60	3581C>T	Phe1194Leu	exon 36	not detected		
FA61	IVS36-2,-3del	aberrant splicing	IVS36	IVS36-2,-3del	aberrant splicing	IVS36
FA63	exon 3del	deletion	*exon 3*	2546delC	frameshift	exon 27
FA67	3720-3724del	aberrant splicing	exon 37	2546delC	frameshift	exon 27
FA72	2546delC	frameshift	exon 27	not detected		
FA73	2546delC	frameshift	exon 27	3350G>C	Arg1117Thr	exon 34

*はdeletionの断端が確定していないことを示す。新しい変異は太字で示す。

junction を同定し、その解析から、一方は従来の報告のように Alu 配列を介する相同組み換えによるものであるが、他方は非相同組み換えによることが判明し、このことから FANCA における large deletion の発生は種々の機構によることが示唆された。

(2) 体細胞の一部において疾患表現型が野生型表現型に戻る状態 (reverse mosaicism) の病態における意義が注目されている。FA の約 20% において、T リンパ球の reverse mosaicism が見られると報告されるが、その遺伝子レベルでのメカニズムや病態における意義は十分明らかではない。また、造血細胞で reverse mosaicism が起これば、骨髓不全の緩和あるいは自然回復する可能性が考えられるが、これまで証明されたケースはなかった。

我々は、約 20 年近くにわたり骨髓不全の進行が認められない FA 症例において、頬粘膜細胞および T 細胞では FANCA の両アレルの変異が見出されるが、顆粒球において一方の変異 2546 delC が 2546 C>T に変化して reading frame の回復をもたらすことを見出した。同一の患者から樹立したりリンパ芽球においても 2546 C>T が検出され、FANCA 蛋白発現の回復が確認され、さらに FANCA 欠損細胞にこの変異蛋白を発現させると機能が回復することを証明した。本症例では reversion mosaicism による造血の長期的維持が強く示唆される。また、骨髓系細胞に選択的に reversion が見られる可能性を世界ではじめて示した。

D. 考 察

FA 臨床検体において FANCA の変異を解析するために、各エクソンおよび cDNA の塩基配列の解析に加えて、large deletion の検出のために新しく開発した gene dosage assay を組み合わせることにより、変異を高率に同定することができた。また、本遺伝子における large deletion の新しい発生機構を示す知見を得た。しかし、まだすべてのアレルで変異が見出されておらず、今後の解析で新しい遺伝子の失活機構が明らかになる可能性がある。また、T 細胞の解析では気づかれない骨髄細胞系列に選択的な reverse mosaicism を示し、これが FA の臨床経過に大きな影響を及ぼしていると考えられる症例を見出した。今後、より多くの症例で骨髄細胞系列特異的な mosaicism を念頭において解析することが重要と考えられる。

E. 結 論

日本人 FA 患者の 27 例 (約 50 %) において、large deletion を含む、多様な FANCA 遺伝子変異を同定した。Large deletion の発生メカニズムとして、従来報告されている Alu 配列を介する相同組み換え以外に、非相同組み換えも関与する事を明らかにした。また、FANCA の reversion を含む細胞が骨髄系統において選択的に増加し、長期間の造血が維持されている例を見出した。

F. 発 表

1. 論文発表

1. Yagasaki H, Asano S, Yamashita T : Two common founder mutations of the Fanconi anemia group G gene FANCG/XRCC) in the Japanese population. Hum. Mutat. 21:555 (DOI: 10.1002/humu.9142), 2003
2. Yagasaki H, Asano S, Yamashita T, et al.: Identification and characterization of novel mutations of the major Fanconi anemia gene FANCA in the Japanese population. Hum. Mutat. (in press)

2. 学会発表

1. Hamanoue S, Asano S, Yamashita T, et al.: Persistent hematopoiesis associated with lineage-selective mosaicism in Fanconi anemia. Blood 102:505a, 2003

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. Tachibana A, et al. Hum Mutat 13: 237-244, 1999
2. Morgan NV, et al. Am J Hum Genet 65: 1330-1341, 1999

Pure Red Cell Aplasia を併発した $\gamma\delta$ T 細胞性顆粒リンパ球増多症における TCR 遺伝子再構成の解析

唐沢 正光¹、三井 健揮²、前川 出¹、横濱 章彦²、塚本 憲史²、野島 美久²

群馬大学医学部輸血部¹、群馬大学大学院生体統御内科学²

研究要旨 TCR $\gamma\delta$ 陽性顆粒リンパ球増多症 ($\gamma\delta$ T-LDGL) を伴った PRCA の 2 症例の TCR 遺伝子再構成を解析した。顆粒リンパ球 (LGL) の表面形質は両症例とも CD3⁺CD4⁻CD8⁺CD16⁺CD56⁻TCR $\gamma\delta$ ⁺であった。TCR δ 遺伝子はいずれも V δ 1 陽性、V δ 2,3 陰性であった。一例では初診時と 5 年の経過後とも同一の TCR $\gamma\delta$ 遺伝子再構成パターンを示した。

A. 研究目的

顆粒リンパ球増多症 (LDGL) はその表面形質によって T 細胞性 (CD3⁺, T-LDGL) と NK 細胞性 (CD3⁻, NK-LDGL) に大別され、T-LDGL の多くは TCR $\alpha\beta$ 陽性で、TCR $\gamma\delta$ 陽性症例は稀である。健常人の末梢血中では TCR $\gamma\delta$ 陽性 T 細胞は minor population (末梢 T 細胞中 0.5% ~ 5%) で、その subunit の多くは V γ 9V δ 2 の heterodimer よりなる。今回、我々は $\gamma\delta$ T-LDGL を伴った PRCA の 2 症例の TCR 遺伝子再構成を解析したので報告する。

B. 研究方法

【症例】 症例 1 は 48 歳男性。血算は Hb 7.5 g/dl、Plt 54.3 万 / μ l、WBC 6100 / μ l、顆粒リンパ球の表面形質は CD3⁺CD4⁻CD8⁺CD16⁺CD56⁻TCR $\gamma\delta$ ⁺であった。症例 2 は 45 歳女性。血算は Hb 6.2

g/dl、Plt 40.1 万 / μ l、WBC 3200 / μ l、顆粒リンパ球の表面形質は CD3⁺CD4⁻CD8⁺CD16⁺CD56⁻TCR $\gamma\delta$ ⁺であった。症例 1 の TCR $\gamma\delta$ 陽性率は 57.4%、症例 2 の TCR $\gamma\delta$ 陽性率は 58.7%。

【方法】 ①TCR $\gamma\delta$ 遺伝子再構成：末梢血単核球より DNA を抽出。Pongers-Willemsen ら (Leukemia 1999; 13: 110-118) ²⁾ に従い PCR 法にて TCR $\gamma\delta$ subunit を解析した。②表面形質：溶血法により白血球浮遊液を作成。表面形質は FACScalibur を使用し、データを CellQuest で解析した。Side scatter (SSC) 及び CD45 (Per-CP 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 TCR δ 1 の発現を解析した。

C. 研究成果

症例 1、2 ともに PCR 法で TCR δ 遺伝子は V δ 1 陽性、V δ 2,3 陰性であった (図 1A、B)。症例 2 はさらに FACS で細胞表面上の V δ 1 発現を確

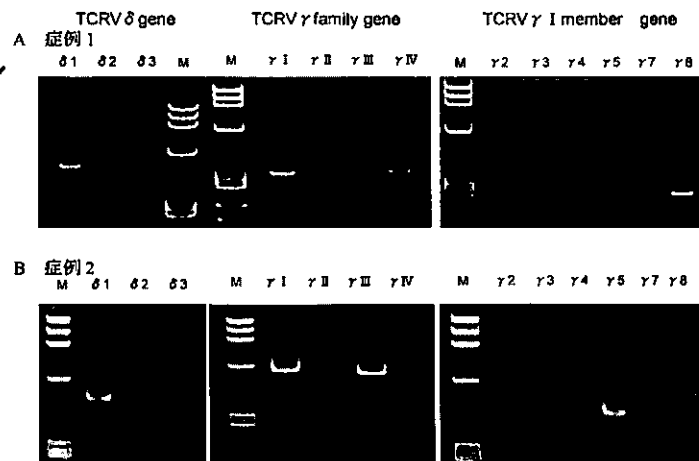


図 1. PCR 法による TCR $\gamma\delta$ 遺伝子再構成の解析

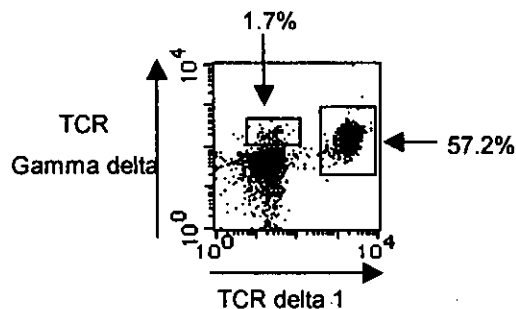


図2. FACSによる細胞表面Vδ1発現の解析

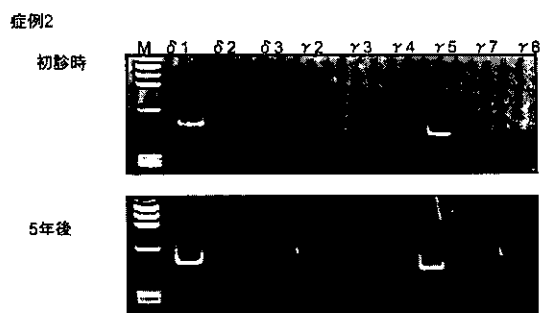


図3. 初診時と5年経過後のTCRγδ遺伝子再構成の解析

認した (図2)。TCR γ 遺伝子は V γ family は、症例1は V γ I、V γ IV陽性、症例2では V γ I、V γ III陽性であった。TCRV γ I memberでは症例1では V γ 8陽性、症例2では V γ 5陽性であった (図1A、B)。症例2は初診時と5年の経過後にTCR $\gamma\delta$ subunitの解析を行ったが、遺伝子再構成のパターンに変化は認められなかった (図3)。

D. 考 案

PRCAを併発した $\gamma\delta$ T-LDGL 2症例のTCR $\gamma\delta$ 遺伝子の再構成を解析した。末梢血中の $\gamma\delta$ T細胞は通常90%以上がV δ 2+V γ 9+だが、¹⁾今回我々の症例はいずれもV δ 1陽性で、症例2では5年の経過を経てもクローンの変化は認められなかった。これまでの報告では $\gamma\delta$ T-LDGLを伴ったPRCAの5例中4症例がV δ 1+のLGLの増加を伴っていた。²⁾また、V δ 遺伝子が解析された $\gamma\delta$ T-LDGL症例12症例中11症例がV δ 1陽性であった。³⁾今回我々の症例も、これまでの報告と同様V δ 1+のLGLの増加を伴っていた。

E. 結 論

増多 $\gamma\delta$ T-LGLが正常人末梢血において $\gamma\delta$ T細胞の90%以上を占めるV δ 2+V γ 9+ typeではなくV δ 1+ typeである点が注目される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Karasawa M, et al.: TCR V β repertoire analysis in CD56⁺ CD16^{dim/-} T-cell large granular lymphocyte leukaemia: association with CD4 single and CD4/CD8 double positive phenotypes. Br J Haematol. 123: 613-620, 2003

2. 学会発表

1. Mitsui T, et al. Characteristic Expansion of Abnormal CD45RA+CD27-CD28-CCR7-Effector Lymphocytes with Stable NK Receptor Expression in Lymphoproliferative Disease of Granular Lymphocytes. Blood 2003; 102: 865a

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. Hayday AC, Annu Rev Immunol, 18: 975, 2000
2. Pongers-Willems MJ, et al, Leukemia, 13: 110, 1999
3. Hara T, et al, Blood, 75: 941, 1990

MicroSAGE 法による赤芽球分化における初期段階の遺伝子発現解析

澤田 賢一、藤島 直仁、藤島 眞澄、市川 喜一
廣川 誠、深谷 博志、斉藤 邦江、川端 良成

秋田大学第三内科

研究要旨 赤芽球分化における初期段階の遺伝子発現を microSAGE (serial analysis of gene expression) 法によって解析した。純化 CD34+ 細胞を IL-3、EPO、SCF 存在下で赤芽球系に分化誘導し、mRNA を取った。CD34+ 細胞からは 945 種、赤芽球系前駆細胞から 1030 種の遺伝子を同定した。赤芽球系細胞ではヘモグロビン、フェリチン、リボソーム蛋白などの house-keeping 遺伝子が高発現し、また heat shock protein (HSP) 90 などの高発現も認めた。各遺伝子の相互作用については今後の課題である。

A. 研究目的

SAGE (serial analysis of gene expression) 法は既知の遺伝子のみならず予期しない遺伝子も含めた網羅的・定量的遺伝子発現を解析できる新しい方法である。我々は microSAGE 法を用いて、純化したヒト CD34+ 細胞を赤芽球系前駆細胞へ分化誘導し、赤芽球への分化に伴う遺伝子発現の解析を行った。

B. 研究方法

顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) で動員したヒト末梢血単核球から純度 98 % 以上の CD34+ 細胞を分離し、interleukin-3 (IL-3) / erythropoietin (EPO) / stem cell factor (SCF) 存在下で赤芽球系前駆細胞へ系特異的に分化誘導した。分化前の CD34+ 細胞と分化後の赤芽球系前駆細胞から各々 mRNA を抽出し、CATG に続く 10 塩基 (tag) を基本にして遺伝子を同定する SAGE 法を用いて、両者の遺伝子発現を解析した。

C. 研究成果

ヒト CD34+ 細胞から 945 種、赤芽球系前駆細胞から 1030 種の遺伝子を同定した。赤芽球系前駆細胞ではヘモグロビンやフェリチン遺伝子のほか ribosomal protein など house-keeping gene が高発現していた。一方、分化前の CD34+ 細胞に比べ赤芽球系前駆細胞では heat shock protein 90 (HSP90) などが高発現していた。HSP90 につき real time PCR による定量をしてみると、SAGE 法で示され

たように赤芽球系前駆細胞での高発現が確認された。HSP90 の発現は赤芽球系のみならず、樹状細胞やミエロイド系への分化によってもその発現増加がみられた。

D. 考 察

今回の研究では赤芽球系分化に伴いヘモグロビンやフェリチンなど一般に認知されている遺伝子に加え、LRBA、EEF1A1、HSP90、PILRB、RANBP1、NACA、SMURF などの遺伝子発現の影響が示唆された。なかでも HSP90 は赤芽球系分化のみならず、多系統の細胞分化に広く関与することが示唆された。

E. 結 論

MicroSAGE 法により赤芽球系分化に伴う予期しない遺伝子発現が観察された。各々の遺伝子における相互作用については現時点で不明な点も多く、今後の検討が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ichikawa Y, Hirokawa M, Aiba N, Fujishima N, Komatsuda A, Saitoh H, Kume M, Miura I, Sawada K : Monitoring the Expression Profiles of Doxorubicin- Resistant K562 Human Leukemia Cells by Serial Analysis of Gene Expression. International Journal of Hematology (in press)

2. 学会発表

1. 第 65 回日本血液学会総会・第 45 回日本臨床血液学会総会. PS-1-7 MicroSAGE 法によるヒト CD34+ 細胞から赤芽球系前駆細胞への分化に伴う遺伝子発現プロファイリング.
2. 45th Annual Meeting of the American Society of Hematology. Abstract# 4349 Gene Expression Profiling of Human Erythroid Progenitors by Micro-Serial Analysis of Gene Expression (MicroSAGE).

G. 知的所有権の取得状況

該当なし。

各種造血器疾患における血清 SCGF 定量の意義

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遺伝子クローニングされた新規造血因子であり、我々は血清 SCGF が、骨髄中の造血機能を反映していることを示した。今回は、昨年報告に加え、さらに種々の造血器疾患患者の血清 SCGF 値を測定した。血清 SCGF は、急性白血病や慢性骨髄性白血病 (CML) の急性転化例で高く、前回の報告の通り骨髄異形成症候群 (MDS) では白血病細胞が増えるに伴い増加していた。このことから、血清 SCGF 値は骨髄における造血機能、および白血病細胞の増減を反映していると考えられた。骨髄での造血機能の変動を予測できる可能性があることから、今後は再生不良性貧血 (AA) での治療効果判定法として、また MDS/AA の治療方法を選択する上での補助因子となりう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。

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、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。

昨年われわれは、白血病・骨髄異形成症候群 (MDS) ・再生不良性貧血 (AA) 患者の血清 SCGF 値を測定し、骨髄中の造血機能との関連性が示唆されたことを報告した。また慢性骨髄性白血病 (CML) や MDS では白血病細胞の増加を反映している可能性も示唆された。

本年はさらに、白血病以外の造血器疾患の血清 SCGF 値を測定し、比較検討を行うことで、造血器疾患におけるその測定意義を検討した。

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) 14 例、慢性骨髄性白血病 (CML) 7 例、(慢性期 4 例、移行期 1 例、急性転化 2 例)、慢性リンパ性白血病 (CLL) 1 例に加え、悪性リンパ腫 (NHL) 7 例、多発性骨髄

腫 (MM) 6 例とした。

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。

C. 研究成果

急性白血病群では、NHL および MM 群と比べ、有意に高値であった ($P < 0.001$)。

白血病群では、慢性リンパ性白血病と慢性骨髄性白血病の慢性期群では、他の白血病群と比べ低値をとる傾向が見られたが、健常人と比べ有意に高値であった ($P < 0.001$)。

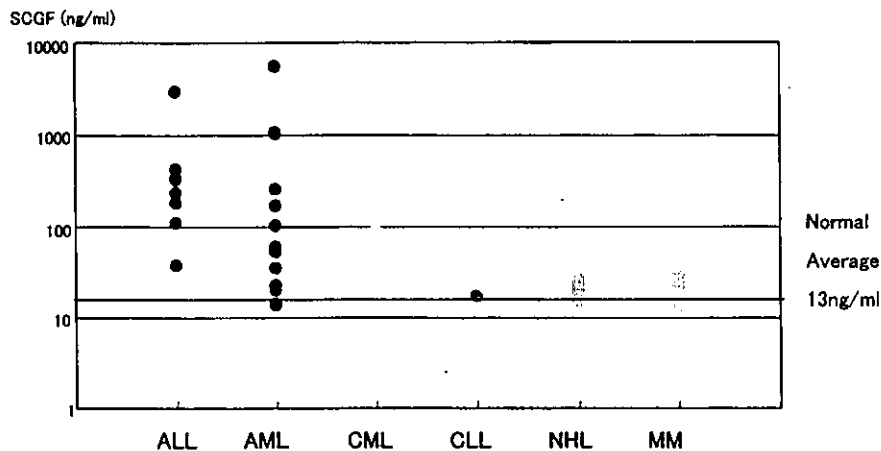
D. 考 察

造血幹細胞移植後の血清 SCGF の変動は、移植後の骨髄機能の回復を反映しており、また SCGF は骨髄中の CD33⁺、34⁺ 前駆細胞群で発現されていたことより、骨髄中の造血機能を反映していると考えられている²⁾。

昨年報告の通り、血清 SCGF 値は MDS 群で健常人より高値であるとともに、白血病細胞の増加を反映している可能性が考えられた。

今回の結果からは、白血病群でその他の造血器疾患に比べ血清 SCGF 値は有意に高く、白血病の中でも急性白血病で、慢性白血病に比べ高い傾向が見られた。これは、血清 SCGF 値が、骨髄における白血病細胞の急速な増加を反映していると考えられた。

各種造血器疾患における血清 SCGF 値



造血幹細胞移植後の SCGF の変動が、移植後の骨髄機能の回復の予測因子となる²⁾ことから、AA における治療効果判定法としての有用性が、また AA/MDS の初期治療法の選択において補助因子として利用できる可能性も示唆された。

今後さらに症例数を増やし、上記につきさらに検討するとともに、健常人とのカットオフ値を設定し、診断的意義の確立を継続して行っていく。

E. 結 論

血清 SCGF 値は、骨髄中の造血機能を反映しており、今回の結果からは骨髄における白血病細胞の増加も反映していると考えられた。AA/MDS における診断・治療において利用でき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 32, 391-398, 2003

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: 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

2. 伊東千絵, 安藤潔, 堀田知光, 佐藤秀尚, 守田和樹, 河野弘明: 治療経過に伴う血清 Stem cell growth factor (SCGF) の変動. 第 66 回日本血液学会総会, 2004 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

該当なし

3. その他

該当なし

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 32, 391-398, 2003

II. 溶血性貧血

Rh抗原エピトープ群の赤血球膜発現メカニズムの解析

梶井 英治¹、亀崎 豊実¹、小山田 隆¹、熊田 真樹¹
近江 俊徳¹、奥田 浩¹、岩本 禎彦¹、小峰 光博²

¹ 自治医科大学 法医学・人類遺伝学¹、² 昭和大学藤が丘病院 内科血液*

研究要旨 温式 AIHA の主要自己抗原である Rh 抗原エピトープ群分子の赤血球膜発現メカニズム解析を目的に、日本人 Rhmod 血液型家系の 4 症例の遺伝子解析をおこなった。RhD ならびに RhCE 遺伝子には異常は検出されなかったが、4 例すべてにおいて、RHAG 遺伝子に従来報告されていない塩基の欠失 (A deletion at 1183: AAC → AC: Asn³⁶⁵-frameshift-Glu⁴⁶¹) が検出された。この frameshift 変異により、細胞内の C 末端ペプチド鎖に 67mer のアミノ酸の追加が予想され、Rh 抗原エピトープ群分子の赤血球膜発現に、RhAG 蛋白 C 末側が重要な役割を果たしていることが予想された。

A. 研究目的

温式自己免疫性溶血性貧血 (AIHA) の主要な自己抗原である Rh 蛋白は、RhAG 蛋白と複合体を形成して赤血球膜に発現している。Rh 抗原と RhAG 蛋白が著しく減少している Rhmod 血液型は、完全欠損を示す Rhnull 血液型とともに Rh deficiency syndrome として知られている¹⁾。Rhnull は、RH 遺伝子の異常による amorph 型と Rh 抗原発現抑制遺伝子 (regulator 遺伝子) による regulator 型に分類され、RHAG 遺伝子のいくつかの mutant allele が regulator 遺伝子として報告されている²⁾。一方、Rhmod では、初期には、regulator 遺伝子とは異なる modifier 遺伝子による³⁾と考えられていたが、Rhmod 症例の RhAG 糖蛋白に S79N や M1I の異常が報告され、Rhnull 同様に RHAG 遺伝子の関与が考えられている³⁾。

今回、従来の Rhmod 家系と異なり親子二代にわたり遺伝が認められ、従来の regulator 型と異なる amorph 型家系と報告されている日本人 Rhmod 症例について、RH 遺伝子の解析を行った。

B. 研究方法

Sat 家系⁴⁾ (図 1) として報告されている Rhmod の 4 症例の末梢血白血球よりゲノム DNA を、また末梢血網赤血球より RNA を抽出し試料とした。

ゲノム DNA を試料として、Okuda ら⁵⁾の方法に従い、PCR 法により RhD ならびに RhCE の

genotype の判定を行った。

網赤血球由来 total RNA を試料とし、RT-PCR 法により各 cDNA をクローニングし、マルチキャピラリー DNA 解析システム (CEQ2000、BeckmanCoulter) をもちいて、RhD、RhCE ならびに RHAGcDNA のシーケンス解析を行った。

ゲノム DNA を試料とし、Iwamoto ら⁶⁾の報告した RHAG 遺伝子の promoter ならびに enhancer 領域を PCR 法により増幅し、シーケンス解析を行った。

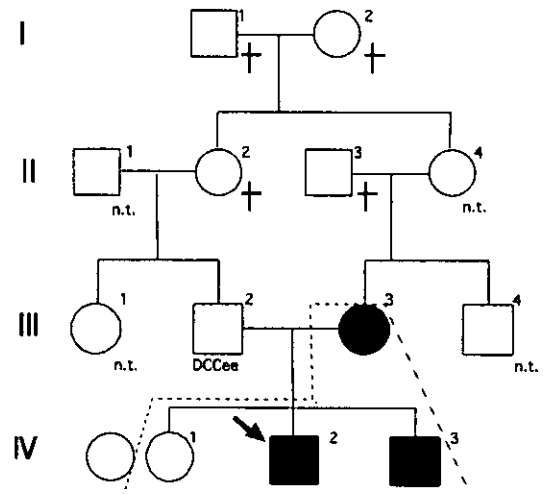


図 1. Pedigree of a family with Rhmod syndrome. Individuals in the region enclosed by the dotted line underwent a molecular analysis. The index subject, IV-2, is indicated by the arrow. Black squares and circles indicate affected individuals (III-3, IV-1 and IV-3). All affected subjects are positive for the deletion at nt 1183 (AAC→AC) of RHAG gene. "n.t." means "not tested".

網赤血球由来 total RNA を試料とし、*Band3* cDNA を内部コントロールとして、RT-PCR 法により *RHAG* ならびに *RHD* 遺伝子の発現量を健常人と量的比較を行った。

RhD と *RhCE* の intron 8 に存在する STR 領域の多型を、Fujiwara ら⁷⁾の方法に従い、検討した。

ゲノム DNA を試料とし、Huang ら⁸⁾の方法にしたがって、*RHAG* Exon9 を含む領域を PCR 法により増幅し、マルチキャピラリー DNA 解析システム (CEQ2000、BeckmanCoulter) をもちいて、ダイレクトシーケンス解析を行った。

C. 研究結果

1. *RhD* ならびに *RhCE* 遺伝子の genotyping

4 例ともに CCDee と判定された。また、*RhD* exon 2、3、5、7、10 において正規の PCR 産物が認められたことから、*RhD* 遺伝子には明らかな異常は検出できなかった。

2. *RhD*、*RhCE* ならびに *RhAG* 関連の STR 解析

RhCE の intron 8 ならびに *RhAG* の近傍 STR 領域において、ホモ接合であったが、*RhD* においてヘテロ接合の *Rhmod* 例が存在した。このことから、*Rhmod* 形質の発現に *RhDCE* 遺伝子の関与はないと考えられた。

3. *RhD*、*RhCE* ならびに *RHAG* cDNA のシーケンス解析

Sequencing により、*RhAG* cDNA に、従来報告されていない塩基の欠失 (A deletion at 1183: AAC → AC: Asn³⁹⁵-frameshift-Glu⁴⁶¹) を検出した。*RhD* ならびに *RhCE* cDNA においては異常は検出されなかった。また、*RHAG* 遺伝子の promotor と enhancer 領域のシーケンスにも異常は検出されなかった。

4. *RHAG* exon 9 の PCR-ダイレクトシーケンス解析

上記の塩基欠失は、ゲノム DNA を試料とした PCR-ダイレクトシーケンスによって確認された。また、今回検討した *Rhmod* 4 例はいずれも変異 *RHAG* 遺伝子のホモ接合と考えられた。

5. *RHAG* ならびに *RHD* 遺伝子の発現量解析

Band3 cDNA を内部コントロールとした RT-

PCR 法により、健常人と量的比較すると *RHAG* ならびに *RHD/CE* mRNA 量もほぼ正常であった。Sat 家系として報告されている *Rhmod* 4 例の *RhAG* 遺伝子に、従来報告されていない塩基欠失 (A deletion at 1183: AAC → AC: Asn³⁹⁵-frameshift-Glu⁴⁶¹) が検出された。*RHAG* 遺伝子の promotor と enhancer 領域には異常なく、*RHAG* 遺伝子の転写産物量も低下していないことから、転写後における異常の存在が想定される。

D. 考 察

従来報告されている *Rhnull* ならびに *Rhmod* での *RhAG* 遺伝子の異常では、塩基欠失による *Rhmod* の報告はなく、本例が最初の報告と思われる。また、frameshift が予想される変異では、C 末端側の短縮による Rh30 蛋白との相互作用の低下が予測されている。今回検出した変異は、frameshift により終止コドンの位置が変化し、細胞内の C 末端ペプチド鎖に 67mer の親水性のペプチド鎖が追加されることが予想され、C 末端側の蛋白質間相互作用に果たす役割を考えるうえで興味深い (図 2)。

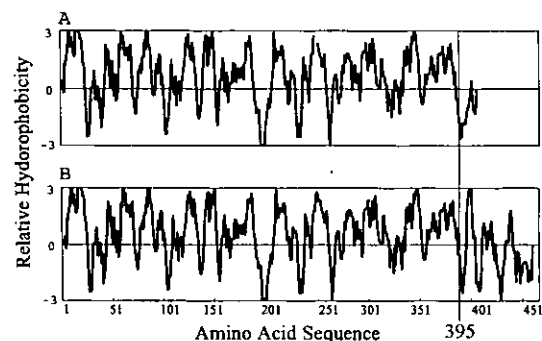


図 2. Hydropathy plot of RhAG amino acid sequence generated by Kyte-Doolittle analysis 8).

(A) Normal RhAG protein (409 residues). (B) Deduced amino acid sequence of mutant RhAG protein. Deletion introduces a frameshift after the codon for asparagine-395. The deduced RhAG protein consists of 461 residues including 67 altered residues at the intracellular C-terminal domain.

E. 結 論

Rhmod に検出された *RHAG* 遺伝子の mutation が、RhAG 蛋白の C 末の構造を変化させることにより、Rh 抗原エピトープ群分子の赤血球膜での発現を減弱させている可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kamesaki T, et al. A new mutation detected in RhAG of a Japanese family with Rh(mod) syndrome may form a longer RhAG protein. *Transfusion* 42(3): 383-384. 2002

2. 学会発表

亀崎豊実, 他: *RHAG* 遺伝子解析. 第 49 回日本輸血学会, 東京 2001 年 5 月 31 日 (日輸血会誌47: 228, 2001)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

H. 参考文献

1. Cartron JP, *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 12, 655-89, 1999
2. Cherif-Zahar B, et al, *Nat Genet* 12, 168-73, 1996
3. Huang C, et al, *Am J Hum Genet* 64, 108-17, 1999
4. Kami K, et al, *Blood Programme* 12, 219-220, 1989
5. 奥田浩, 他: *DNA 多型* 5, 126-130, 1997
6. Iwamoto S, et al, *J Biol Chem* 275, 27324-31, 2000
7. Fujiwara H, et al, *Hum Genet* 104, 301-6, 1999
8. Kyte J, et al, *J Mol Biol* 157, 105-32, 1982

PNH 異常幹細胞のクローナルな拡大メカニズム

木下タロウ、井上 徳光、泉井 朋久、村上 良子、植田 康敬

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、PNH において、GPI 欠損細胞が拡大する機序を解析するために、GPI 欠損細胞のみが 12 番染色体異常をもつ PNH 症例に注目し、その切断部位に存在する HMGA2 を同定した。本症例の骨髄においては HMGA2 mRNA の発現量が正常より有意に高く、発現している転写産物は、エクソン 5 を含まない異常なものであった。HMGA2 は、間葉系良性腫瘍において高頻度に異常となる遺伝子であり、PNH におけるクローナルな拡大にどのように関与しているか考察した。

A. 研究目的

我々は、末梢血のほとんどが 異常細胞で占められるような PNH の発症には、3 つのステップが必要であると考えている。造血幹細胞における PIG-A の異常による GPI アンカー欠損 (ステップ 1)、再生不良性貧血などの免疫学的機序による GPI 欠損細胞の選択 (ステップ 2)、その細胞にさらなる異常が起こり良性腫瘍的な増加 (ステップ 3) である。我々は、最後のステップ 3 に関わるメカニズムを解明する目的で、GPI 欠損細胞のみの 12 番染色体に異常を持つ症例 J20 の異常を明らかにし、PNH 細胞のクローナルな拡大に関わる遺伝子の同定を目指している。

B. 研究方法

患者 J20 の染色体異常は一方の 12 番染色体の 12q12-q14 領域の欠失、およびその領域の他方の 12q15 領域への挿入であり、その挿入部位の切断領域から転写促進因子 HMGA2 を同定したことはすでに報告している。C 末領域を欠失した HMGA2 の異常発現が、脂肪腫や子宮筋腫などの間葉系良性腫瘍の発症に深く関与することが報告されていることから、本症例においても異常細胞の増殖に関与している可能性を考え、患者 J20 の骨髄細胞における HMGA2 遺伝子の発現を TaqMan probe を用いたリアルタイム PCR 法により解析した。さらにどのような転写産物が発現しているかを明らかにするために、3' RACE-PCR を行い、予想される転写産物の領域をプローブにしてサザンブローディングをした。

C. 研究成果

リアルタイム PCR 法により、 β Actin を内部標準遺伝子として HMGA2 遺伝子の発現を 5 人の正常骨髄細胞と比較したところ、正常ではほとんど検出できなかったが、患者 J20 では、検出可能範囲まで上昇していた。また患者では、すでに脂肪腫で報告のある Inton 4 の領域の cryptic exon をもつ転写産物が特異的に発現しており (図)、それは 3' 領域の欠損した異常な HMGA2 アレルから発現していた。

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。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。最近、PNH において EGR1¹⁾ や RhoA²⁾ の発現の上昇が報告されている。また、RhoA により EGR1 と HMGA2 の発現が誘導されているという報告³⁾ もされていることから、この pathway の異常が、PNH におけるクローナルな拡大に関与することが想像される。現在我々は、本症例以外の他の PNH 患者における HMGA2 の異常の関与を解析中である。

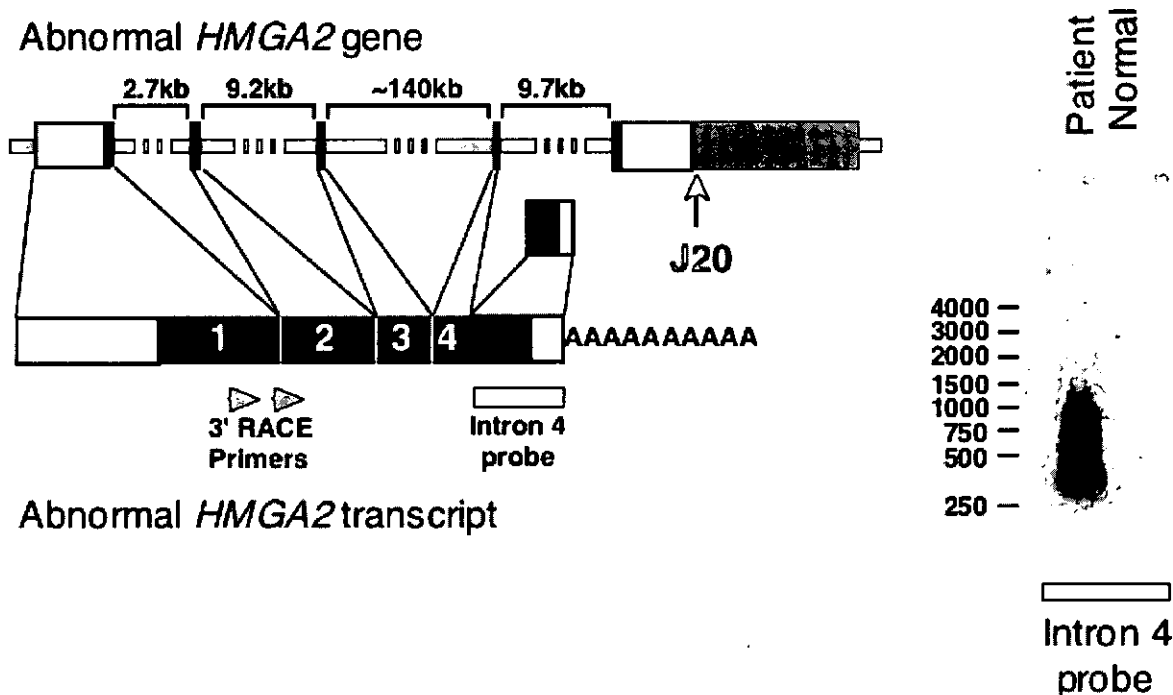


図 J20 で発現している HMGA2 の異常転写産物

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。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表
 1. 泉井朋久, 桑山真輝, 西村純一, 待井隆志, 金倉讓, 木下タロウ, 井上徳光: 発作性夜間血色素尿症 (PNH) における異常クローン拡大に関わる候補遺伝子. 第 45 回 臨床血液学会 (ワークショップ) 2003 年
 2. 泉井朋久, 桑山真輝, 西村純一, 待井隆志, 金倉讓, 木下タロウ, 井上徳光: 発作性夜間血色素尿症 (PNH) における異常クローン拡大に関わる候補遺伝子. 第 40 回 補体シンポジウム 2003 年

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

H. 参考文献

1. Lyakisheva A, et al, Exp Hematol. 30: 18-25, 2002
2. Heeney MM, et al, Mol Genet Metab. 78: 291-294, 2003
3. Teramoto H, et al, Oncogene 22: 2689-2697, 2003
研究成果の刊行に関する一覧表、発表文献リストに関しては該当するものなし。

補体 (C5、C8、C9) に対する RNA アプタマーを用いた PNH に対する溶血阻害薬の開発

金倉 讓¹、小峰 光博²、西村 純一³、Bruce Sullenger³、Russell Ware³

大阪大学医学部 血液・腫瘍内科¹、昭和大学大森が丘病院 内科血液²、Duke 大学医学部³

研究要旨 発作性夜間血色素尿症 (PNH) の溶血をコントロールする治療法はない。そこで、PNH の補体溶血に対する阻害薬の開発をめざし、SELEX システムを用い C8、C9 に対する RNA アプタマーを開発し、既知の C5 アプタマーと溶血阻止効果を比較した。C8 アプタマーは SELEX 4 ラウンド後、1 nM の Kd を有し、C5 アプタマーと同等の活性を認めた。C9 アプタマーは SELEX 10 ラウンド後、500 nM の Kd を有し、C5 アプタマーと同等の活性を認めた。補体に対する RNA アプタマーは PNH における溶血を十分コントロールすることが可能であり、治療法への応用が期待される。

A. 研究目的

発作性夜間血色素尿症 (PNH) は補体溶血を主徴とする造血幹細胞疾患であるが、溶血をコントロールする治療法は現在のところない¹⁾。最近ヒト化抗 C5 抗体による臨床治験の溶血に対する劇的な有効性が報告された (図 1)²⁾。しかし、PNH における溶血では CD59 分子の欠損が重要

で、この CD59 分子は C9 が C5b8 複合体に結合するのを阻害することから、C8 および C9 が PNH における溶血では重要な補体成分であると考えられる (図 1)。そこで RNA インヒビターのスクリーニングシステム (SELEX) を用いて (図 2)^{3,4)}、C8、C9 を標的とした RNA アプタマーのスクリーニングを開始し、PNH における補体溶血に対する阻止効果を判定した。

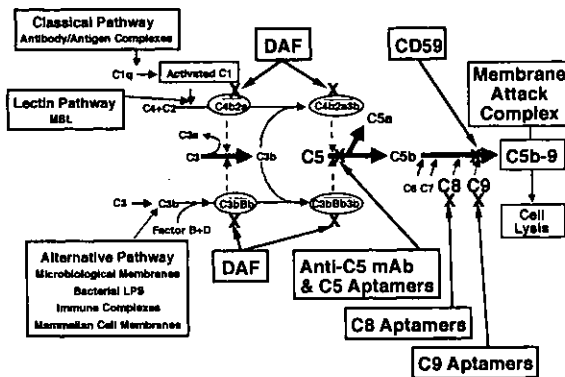


図 1. 補体活性化経路とインヒビター

B. 研究方法

SELEX (図 2)^{3,4)}: RNA アプタマーライブラリーと標的分子 (蛋白) を反応させ、標的蛋白と結合した分子のみを分離し、RT-PCR にて増幅した後、RNA に転写するというサイクルを繰り返す。数ラウンドの後 (通常 8-12)、選別された RNA リガンドをシーケンスし、標的蛋白に対する結合力と阻害活性を測定する。

Binding Assay: 標的蛋白と γ P³² にて末端標識した RNA アプタマーを反応させた後、RNA 蛋白複合物をニトロセルロースとナイロンメンブランにドットプロットし、放射活性を測定し結合率を計算する。

Hemolytic Assay: EA (抗体付着ヒツジ赤血球) と標的補体成分除去血清に希釈系列標的補体成分を加えて、50-80 % 溶血を誘導する標的補体分量を決定する。上記の条件を 100 % 溶血活性とし、RNA アプタマーを加えその溶血阻止活性を算出する。

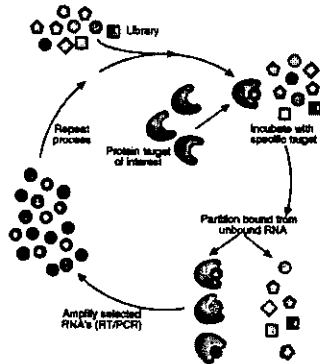


図 2. RNA アプタマー SELEX 法³⁾