

マイクロアレイによる造血器腫瘍の鑑別診断

自治医科大学ゲノム機能研究部

間野 博行

はじめに

ヒトゲノムプロジェクトの成果であるドラフトシーケンスが2001年2月に公表され¹⁾、また、ついに euchromatin の完全版配列決定が2003年4月14日に宣言された。現在、得られた配列上に遺伝子の割付作業が行われているが、近い将来にその成果が公表されると思われる。ヒト遺伝子の総数はおそらく3万種類前後になると予想されており、いよいよ「ポストゲノム時代」が訪れつつある。今後の医学研究においては、「膨大ではあるがあくまで有限なヒト遺伝子プール」のなかから特定の特徴を備えた遺伝子を効率良く同定することがますます重要になるであろう。現段階でこのような大規模発現スクリーニングに最も適した方法は、DNAチップ、DNAマイクロアレイ（以下、マイクロアレイ）といえる^{2, 3)}。

1. マイクロアレイの原理

では具体的に、マイクロアレイを用いて、組織Aと組織Bにおける遺伝子の網羅的発現解析を行う実験を考えてみよう（図1）。まず組織AとBからそれぞれメッセンジャーRNA（mRNA）を抽出し、オリゴdTプライマーを結合させる。これに逆転写酵素を加えて組織AとB由来の相補DNA（cDNA）を合成するわけであるが、その際に組織AのcDNAには緑色の蛍光色素Cy3を、また組織BのcDNAには赤色の蛍光色素Cy5を取り込ませる。その結果、組織AとBのcDNAは異なった波長の emission light を有する蛍光色素で標識されたことになる。これらを等量混合し、マイクロアレイとハイブリダイゼーションさせるわけである⁴⁾。

その結果、Cy3標識cDNAとCy5標識cDNAは、スポット上の各遺伝子の組織AとBにお

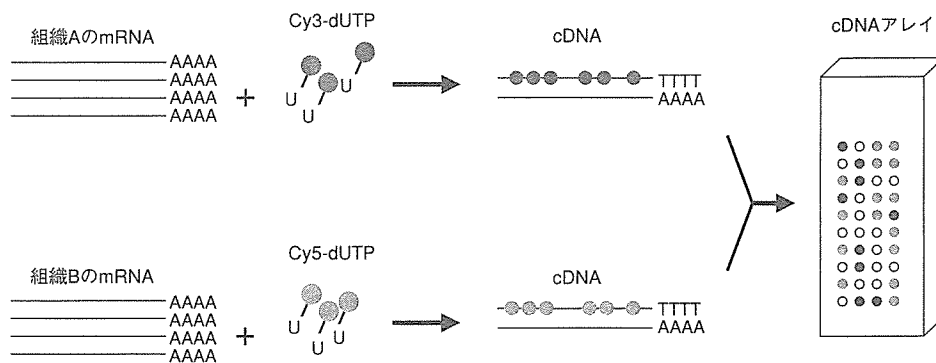


図1 DNAマイクロアレイを用いた発現解析の原理

組織AとBとの間で遺伝子発現プロファイルを比較したい場合、まず組織AとBそれぞれから等量のmRNAを調製する。次にこれらmRNAからオリゴdTプライマーと逆転写酵素を用いてcDNAを合成する。その際に蛍光色素であるCy3あるいはCy5で標識したdUTP（デオキシウリジン5'-三リン酸）を加えることで、各組織由来のcDNAをそれぞれ異なった蛍光色素で標識する。この標識cDNA混合物をDNAマイクロアレイとハイブリダイゼーションさせることで、各スポットに標識cDNAが結合する。その結果、任意のスポット上の遺伝子に関する組織Aと組織Bにおける発現量の比は、Cy3とCy5との蛍光強度の比で表されることになる。

ける発現量の比に応じた形でスポットに結合する。このマイクロアレイをレーザーで励起すると、あるスポット上の遺伝子が組織 A のみに発現していれば緑色のスポットとなり、B のみに発現していれば赤色のスポットとなる。また両組織においてほぼ等量に発現している遺伝子の場合、黄色のスポットとして見える。このようにして各スポットにおける両色素の蛍光強度を測定することで、それぞれのスポット上の遺伝子の測定サンプル間における発現比が定量できる。1枚のマイクロアレイ上には数千～数万の DNA 断片が配置されており、1回の実験でこれら数多くの遺伝子の発現変化を包括的に解析できるのである。

2. 白血病の鑑別診断

では、実際の白血病解析にマイクロアレイはどのように応用可能であろうか？ 旧来の白血病診断法では、①ペルオキシダーゼ、エステラーゼなどの特殊染色、②蛍光活性化セルソーター (FACS) を用いた細胞表面マーカーの解析、③遺伝子異常の解析 (免疫グロブリン遺伝子や T 細胞表面受容体遺伝子の再構成、*bcr-abl* 遺伝子、*PML-RAR α* 遺伝子などの有無)、④染色体型の解析、などの情報をもとにそれぞれの疾患における FAB 分類を行ってきた。これらを総合的に解析することで予後判定にある程度リンクした診断が行えるが、上記の解析をすべて行うのは煩雑であり多くの専門技術も必要とする。一方、1枚のマイクロアレイを用いることで旧来の方法で得られる情報がすべて解析可能となれば、診断はより簡便になり、かつ異なった施設間での診断の一致率も上昇するであろう。

たとえば、白血病 A と白血病 B を比べる場合を考えると、両患者から得られた mRNA を用いたマイクロアレイ実験を行うことで、どちらかの疾患に固有な発現パターンをとる遺伝子群を同定することが可能であろう。旧来の細胞形態学などでは困難であった新たな鑑

別診断法が、このようなアプローチで開発可能になると期待される。また病因解析に関しても、たとえば健康成人と白血病 A との mRNA をマイクロアレイで比較することにより、白血病 A においてのみ発現が亢進あるいは低下している遺伝子群を同定することが可能になり、そのなかには疾患の発症に直接関与する遺伝子が含まれている可能性が高い。このようにゲノム医学の手法を用いることで、白血病の病態解析に新たな知見が数多くもたらされると予想される。

マイクロアレイを用いた新しい鑑別診断の試みとして、Golub らは 6,817 遺伝子を配置したマイクロアレイによる急性骨髄性白血病 (AML) と急性リンパ性白血病 (ALL) とを鑑別する可能性について検討した。AML 11 例、ALL 27 例をこのマイクロアレイによって解析した結果、約 50 個の遺伝子が AML と ALL の間で偏って発現していることが明らかになった。そこでこれら “informative genes” から 20 個の遺伝子を選び、それらの発現量の偏りの程度を数値化したものに実際の発現量をかけあわせ、合計することで、それぞれの患者の AML あるいは ALL の確からしさを数値化した。本法を患者における AML と ALL の鑑別診断に応用してみると 38 例中 34 例で正しい診断が行われ、不明が 1 例、3 例が誤診であった。したがって、ある程度の確からしさをもってマイクロアレイによる疾患診断が可能であることがわかった⁵⁾。

小児 ALL は一般に治療反応性が良いが、*MLL* (mixed-lineage leukemia) 遺伝子の転座の存在は重要な予後不良因子である。11 番染色体長腕に存在する *MLL* 遺伝子は *HOX* 遺伝子の発現を制御する転写因子をコードすると考えられており、染色体転座の結果、*LTG4* など数多くの遺伝子と融合遺伝子産物を生じる。*MLL* 転座をもつ ALL は、*MLL* の名前の由来にあるように、ALL と AML の両方の細胞表面抗原をもつことが多い。Armstrong らは *MLL* 染色体転

座をもつ白血病が、はたして一般的な ALL と異なった遺伝子発現プロファイルをもつ疾患か否かについてマイクロアレイを用いて検証した⁶⁾。一般の ALL と *MLL* 転座型 ALL とで発現量が異なる遺伝子群をスクリーニングしたところ、後者に特異的な発現を示す遺伝子として、造血幹細胞マーカーである AC133 や FLT3 が同定された。さらに彼らは、*MLL* 転座型白血病がはたして AML, ALL のどちらにより近い疾患なのかをマイクロアレイデータをもとに考察している。まず AML と ALL 患者間で最も大きく発現量が異なる遺伝子 500 種類を選び、それら遺伝子群の発現パターンを比較した。500 種類の遺伝子の発現パターンは実際には互いに独立なわけではなく、患者間での発現の変化の仕方が似た遺伝子が多数存在している。そこで、発現変化が似た 2 つの遺伝子の中間パターンを示すような「仮想遺伝子」を作り出すことで 2 種類の遺伝子の発現パター

ンを 1 種類の遺伝子にて代用することができる。この方法を繰り返すことで、500 種類の遺伝子の発現パターンを任意の次元数まで「まとめる」ことができる。Armstrong らはこのような主成分分析法を用いて 500 種類の遺伝子の発現パターンを最終的に 3 種類まで絞り込み、これら 3 種類の仮想遺伝子の発現量をもとにサンプルを仮想空間に投射した (図 2)。その結果、興味深いことに、*MLL* 転座型白血病サンプルは AML や ALL のどちらとも異なる場所に位置することがわかった。

これらのデータは、マイクロアレイによる発現プロファイルに基づく新しい疾患概念の提唱が可能であることを示唆しており、意義深い。すなわち、マイクロアレイは旧来の診断カテゴリーに応じた鑑別診断マーカーを効率良く同定するだけでなく、診断カテゴリー自体を見直すうえでも有効なのである。

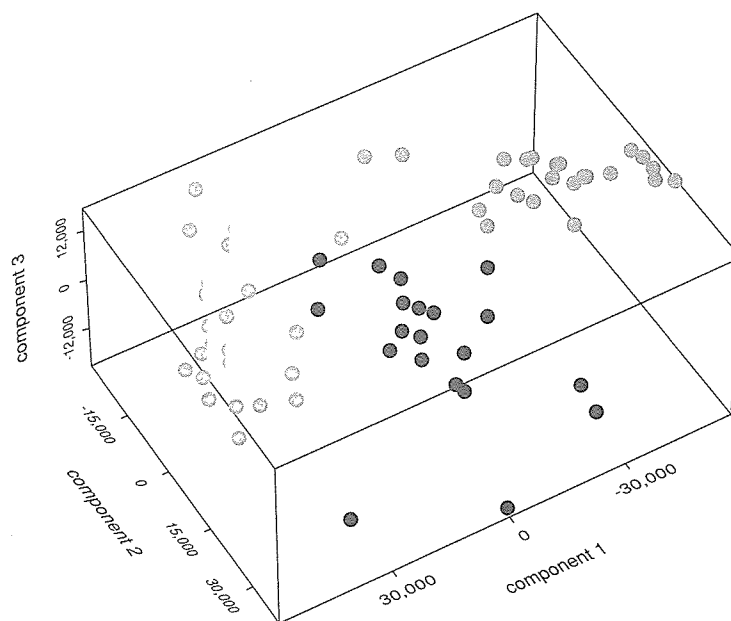


図 2 主成分分析による *MLL* 転座型白血病の独自性

AML と ALL とを鑑別する 500 種類の遺伝子の発現プロファイルより、3 種類の代表的発現パターンを主成分分析法により抽出し、それら仮想遺伝子上での各サンプルの発現量をもとに三次元空間にサンプルを投射した [AML: ○, *MLL* 転座型白血病: ●, ALL: ◐ で表す]。(文献 6 より引用)

3. びまん性悪性リンパ腫の鑑別診断

Bリンパ球由来のびまん性大細胞型リンパ腫 (DLBCL) は、日常の臨床で最も高頻度に遭遇する非Hodgkinリンパ腫のサブタイプである。同疾患はしばしばCHOP (シクロホスファミド + アドリアマイシン + ビンクリスチン + プレドニゾロン) 療法などアントラサイクリン系薬剤を中心とした化学療法が有効であるが、寛解となった症例のなかには再発を繰り返すものも多い。AlizadehらはDNAチップを用いて、DLBCLのなかで再発が少ない予後良好群と予後不良群とを鑑別する可能性を検討した⁷⁾。この目的のために、まず濾胞中心Bリンパ球および各種悪性リンパ腫のcDNAライブラリーから得られたcDNAなど計17,856遺伝子をスポットしたカスタムチップを用意し、DLBCL、濾胞性リンパ腫および慢性リンパ性白血病の患者サンプルを用いてDNAチップ解析を行った。また比較のために、健康成人より得られた各種リンパ組織サンプル、および刺激を加え活性化させた末梢B、Tリンパ球などについても検討している。

その結果、DLBCLには濾胞中心Bリンパ球に遺伝子発現パターンが似ている群と活性化Bリンパ球に似ている群が存在することが示され、しかも両群間で予後に有意な差が認められることが明らかになった。すなわち、活性化Bリンパ球に似た細胞からなるDLBCL患者の5年生存率 (16%) は、濾胞中心Bリンパ球に似た細胞からなるDLBCL患者のそれ (76%) に比べて有意に低いのである (図3)。このことはDNAチップによる解析で非Hodgkin悪性リンパ腫の新たなサブグループが定義可能なこと、しかもその分類が予後判定に有意な情報を与えることを示唆しており、今後の臨床におけるDNAチップの新たな可能性を示したものとして意義深い。

またRosenwaldらは、米国National Cancer Instituteにて作製したcDNAマイクロアレイ (Lymphochip, 約12,200種類のヒト遺伝子

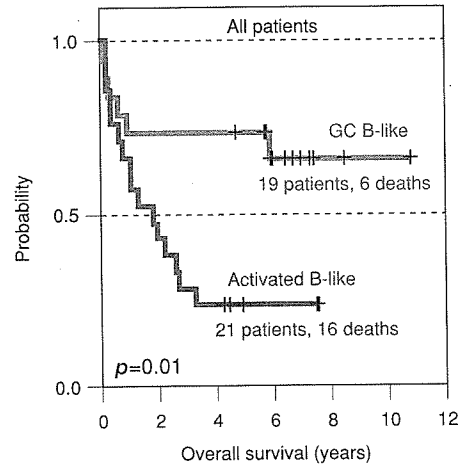


図3 DLBCLの予後

DLBCL患者を、リンパ節の遺伝子発現プロファイルから「濾胞中心Bリンパ球に発現パターンが似たサンプル群 (GC B-like)」と「活性化型Bリンパ球に似た群 (Activated B-like)」に分け、両者の生命予後をグラフにした。後者が有意に予後不良群であることがわかる。(文献7より引用)

cDNAを配置)を用いて、DLBCL 240例のサンプルにおいて遺伝子発現プロファイルを得た⁸⁾。Alizadehらが報告した「濾胞中心Bリンパ球に発現パターンが似たサンプル群」と「活性化型Bリンパ球に発現パターンが似たサンプル群」を鑑別するのに役立つ100種類の遺伝子における発現量をもとに240例のDLBCL症例をクラスタリングすると、サンプルがAlizadehらの提唱する2群とさらに第3のグループ“type 3 subgroup”に分けられることがわかり、また各グループの平均5年生存率はそれぞれ60%、35%および39%であった。旧来用いられてきた予後予測法 (International Prognostic Index; IPI)⁹⁾によるサブグループの割合はこれら3群間で分布に偏りがないため、遺伝子発現プロファイルはIPIスコアとは独立した予後予測法であることがわかった。

おわりに

マイクロアレイは意外にも偽陽性・偽陰性データの多い実験系であり、「両刃の剣」としての側面がある。慎重にデザインされた実験においてのみ、そのきわめて高いスクリーニ

ング能力が有意義な実験結果を生むと考えられる。ポスト・ゲノム時代における医学の発展のうえでマイクロアレイシステムが重要な役割を果たすことは間違いない。白血病類縁疾患においてもわが国に特徴的な疾患が数多くあり、これらの解析がマイクロアレイという新しいアッセイ系を得て大きく進歩することを期待したい。

文献

- 1) International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001, 409: 860-921.
- 2) Cheung VG, Morley M, Aguilar F, *et al.* Making and reading microarrays. *Nat Genet* 1999, 21(Suppl 1): 15-19.
- 3) Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, *et al.* Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 1999, 21(Suppl 1): 10-14.
- 4) 間野博行. DNA チップ法. 血液・固形腫瘍診断マニュアル, 改訂版, 横田昇平編, フジメディカル出版, 2002: 70-75.
- 5) Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, *et al.* Molecular classification of cancer: Class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999, 286: 531-537.
- 6) Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, *et al.* MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet* 2002, 30: 41-47.
- 7) Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, *et al.* Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000, 403: 503-511.
- 8) Rosenwald A, Wright G, Chan WC, *et al.* The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002, 346: 1937-1947.
- 9) The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1993, 329: 987-994.

General

1

血漿 Flt-3 リガンド濃度は局所分割放射線治療中の放射線誘発骨髄傷害と相関する

Plasma Flt-3 ligand concentration correlated with radiation-induced bone marrow damage during local fractionated radiotherapy

Huchet A, Belkacémi Y, Frick J, *et al.*
IRSN, DPHD/SARAM, B.P.
No. 17, Fontenay aux Roses
Cedex F-92262, France
Int J Radiat Oncol Biol Phys
2003, 57: 508-515.

目的：放射線治療 (RT) 後の患者血漿 Flt-3 リガンド (FL) 濃度の変動が、放射線誘発骨髄傷害の生物指標として有用かを検討する。方法と材料：27 例が RT 施行中に検討された。照射された骨髄容積を測定した。末梢血の血球数と血漿 FL 濃度を RT の前後で測定した。末梢血の血球で膜結合 FL の発現と mRNA の発現も測定した。結果：RT 施行中の血漿 FL 濃度と、末梢血の白血球および血小板の数の間には、負の相関が認められた。さらに、RT 施行中の患者における血中 FL の全量は、累積した放射線量と、照射された骨髄容積の比率と直接的に相関した。結論：血漿 FL 濃度の変動は、分割局所 RT 施行中の放射線誘発骨髄傷害を直接的に反映することが示された。FL のモニタリングが、RT 施行中の Grade 3~4 の白血球減少と血小板減少の発症を予測するための方法として使用できる可能性が示された。

2

VEGF は T 細胞の発達を阻害し、腫瘍誘導性免疫抑制の一因となる

VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression

Ohm JE, Gabrilovich DI, Sempowski GD, *et al.*
648 Preston Research Bldg,
Vanderbilt-Ingram Cancer
Center, Nashville, TN 37232-
6838, USA
Blood
2003, 101: 4878-4886.

T細胞の欠損や早期の胸腺の萎縮は、癌患者や腫瘍をもつ動物において生じる。著者らは、組み換え型の血管内皮増殖因子 (VEGF) を進行癌の患者に認められる程度の濃度でマウスに投与することで、この深刻な胸腺の萎縮を再現し、CD4⁺/CD8⁺ 胸腺細胞の劇的な減少により強調されることを明らかにした。著者らは、VEGF は胸腺のアポトーシスを促すわけではなく、むしろ胸腺において最も早期に認められる前駆細胞の数を急速に減少させることを明らかにした。胎児の胸腺組織の培養において、VEGF は胸腺細胞の成長を阻害するわけではない。このことは胸腺以前の影響を示唆する。著者らはまた、放射線照射を行った未処置の動物へ組み換え型 VEGF とともに注入された動物由来の骨髄前駆細胞は、対照の動物由来の前駆細胞に比べより効果的に胸腺にコロニーを再形成することを示した。このことは、VEGF の投与が骨髄において胸腺前駆細胞の数を増やしていることと関連していることを示唆する。著者らは、病態生理学的に関連した VEGF の濃度がこれらの前駆細胞の分化または移出のどちらか、もしくはその両方を阻害することにより、観察されるような胸腺の萎縮に至るとの仮説を立てた。

注入を中止したり、前駆細胞を類遺伝子系のホストに移すことにより VEGF を除去することは、リンパ球系前駆細胞を T 細胞系へ優先的に組み込むことを促し、そして胸腺の構成と細胞密度を正常へ修復することとなる。これらのデータは病態生理学的な VEGF の濃度が造血前駆細胞から T 細胞への発達を阻害することを証明するが、このことが腫瘍に関連した免疫不全へとつながるのだろう。

トランスフォーミング増殖因子- β 1 (TGF- β 1) はケモカイン stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) 発現を低下させる——細胞遊走と接着の機能的関連性

Transforming growth factor- β 1 down-regulates expression of chemokine stromal cell-derived factor-1: Functional consequences in cell migration and adhesion
Wright N, De Lera TL, García-Moruja C, *et al.*
Centro de Investigaciones Biológicas, Department of Immunology, Velázquez 144, 28006 Madrid, Spain
Blood
2003, 102: 1978-1984.

ケモカイン stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) は骨髓 (BM) 間質細胞で発現しており、BM 細胞遊走に重要な役割を果たす。その発現調節は、造血前駆細胞や白血病細胞のような骨髓を通行する細胞の遊走能力に影響を及ぼす。トランスフォーミング増殖因子- β 1 (transforming growth factor- β 1; TGF- β 1) は骨髓内に存在し、BM 細胞増殖や分化を制御する中心的分子である。著者らは、SDF-1 発現が、TGF- β 1 制御やその機能に重要性をもつかどうかを調べるモデルとして BM 間質細胞株 MS-5 を用いた。ここで著者らは、転写効率減少を含む mRNA レベルと、MS-5 の細胞抽出物および上清中の蛋白レベル双方で、TGF- β 1 は SDF-1 発現を低下させることを示した。TGF- β 1 処理 MS-5 細胞上清における SDF-1 レベルの減少は、非処理 MS-5 細胞上清に対する反応と比べて、SDF-1 依存性の走化性および BM モデル細胞株である NCI-H929 と Mo7e の内皮間を通過する遊走能の低下に関係していた。さらに、TGF- β 1 処理 MS-5 細胞上清は、非処理細胞と比べて NCI-H929 や Mo7e の可溶性血管細胞接着因子 (sVCAM-1) や CS-1 / フィブロネクチンへのインテグリン α 4 β 1 を介する接着を促進する機能は有意に低下していた。さらに、TGF- β 1 処理 MS-5 細胞上清と非処理細胞上清とを比較した場合、ヒト臍帯 CD34⁺ 造血前駆細胞では、処理によって SDF-1 依存性の走化性、内皮間を通過する遊走能の低下を示し、sVCAM-1 への接着が亢進した。これらのデータは、TGF- β 1 による SDF-1 発現低下は、BM 細胞の遊走と接着に影響を与え、骨髓を通行する細胞輸送に影響を及ぼすことを示す。

造血幹細胞

4

CD4⁺CD25⁺制御性T細胞は、骨髄移植後のGVHDを阻害する一方で、移植片対腫瘍(GVT)活性を保持している

CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation

Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, *et al.*
Division of Bone Marrow Transplantation, Department of Medicine, Stanford University School of Medicine, 300 Pasteur Drive, Stanford, CA 94305, USA
Nat Med
2003, 9: 1144-1150.

成熟ドナーT細胞はGVHDを引き起こすが、それらはまた同種骨髄移植における有用な移植片対腫瘍(GVT)活性の主要なメディエーターでもある。GVHDを抑制し、GVT活性を維持することは、臨床の移植における望ましい結果である。著者らは以前、マウスにおいてドナー由来のCD4⁺CD25⁺制御性T細胞が、同種骨髄移植後のMHCクラスI、クラスIIのバリアによって生じる致死的なGVHDを阻害することを示した。今回、著者らは、白血病やリンパ腫をもつ宿主マウスにおいて、CD4⁺CD25⁺制御性T細胞が同種反応性のドナーT細胞の早期の増殖を抑制し、そのIL-2レセプター(IL-2R) α 鎖の発現を抑制し、また、GVTエフェクター機能を損なうことなく、主にパーフォリン溶解経路により伝達されるGVHDを誘導する能力を抑制することを示す。以上のように、CD4⁺CD25⁺T細胞は、従来のドナーT細胞によって伝達されるGVHDとGVT活性を分けることができる強力な制御細胞である。

5

NOD/SCIDレシピエントマウスにおけるヒト臍帯血細胞の選択的増幅ではトロンボポイエチンが主要な制限因子である

Thrombopoietin is a major limiting factor for selective outgrowth of human umbilical cord blood cells in non-obese diabetic/severe combined immunodeficient recipient mice

Verstegen MMA, Wognum AW, Wagemaker G.
Institute of Hematology, Erasmus University Rotterdam, Dr Molewaterplein 50, 3000 DR Rotterdam, Netherlands
Br J Haematol
2003, 122: 837-846.

致死下放射線照射された非肥満性糖尿病/重度複合免疫不全(NOD/SCID)マウスに、 1.5×10^5 個のCD34⁺純化臍帯血(UCB)細胞を移植した直後、0.3 μ gの組み換え型ヒトトロンボポイエチン(TPO)を単回投与した。移植35日目に、骨髄(BM)におけるヒト細胞の存在を免疫表現型とコロニー培養法で解析した。TPO投与群ではヒトCD45⁺細胞の生着頻度と絶対数が2~6倍に増加していた。TPO投与にかかわらず、分化したヒト細胞の系統分布には差がなかったが、CD71⁺GpA⁻細胞には著明な増加が認められた。これはTPOによる増殖刺激を反映していると考えられる。未熟CD34⁺細胞とヒトGM-CFU、BFU-Eの頻度はTPO投与マウスでは非投与マウスと比較して差がなかったが、絶対数はヒト細胞の増加に比例して増加していた。この結果はヒトTPOが、NOD/SCIDマウスにおいて、ヒトUCB細胞の多系統への増殖の主要な制限因子であり、移植直後に単回投与することで補充可能であることを示す。TPOは移植マウスの生存を延長させず、未熟なCD34⁺CD38⁻細胞の数を増加させなかった。二次移植において、TPO投与は長期の造血再構

築能に有意な影響を及ぼさなかった。これらの結果は、移植後におけるヒト造血幹細胞の適切な増幅のためにTPOが必要であることを示している。さらに、TPOの単回投与が移植可能なヒト未熟前駆細胞を使用したNOD/SCIDマウスにおける解析の効果と再現性を高めるかもしれない。

長期造血幹細胞が個体発生で骨髄へ移動増殖するためにはストローマ細胞由来因子-1が必要である

Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny

Ara T, Tokoyoda K, Sugiyama T, *et al.*
Department of Medical Systems Control, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, 53 Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan
Immunity
2003, 19: 257-267.

造血幹細胞 (HSCs) に対するストローマ細胞由来因子-1 (SDF-1) の生理学的役割はよくわかっていない。長期再構築アッセイにおいて SDF-1^{-/-} 胎芽では、骨髄細胞と同様に HSCs の骨髄への移動増殖が著しく障害されていた。HSCs の脾臓への移動増殖もまた影響を受けていたが、骨髄より影響は少なかった。血管特異的 Tie-2 の調節配列下で SDF-1 を強制発現すると、SDF-1^{-/-} 骨髄での HSCs の減少を改善できたが、骨髄細胞の減少は改善できなかった。SDF-1 は胎児骨髄の血管内皮細胞の近傍で検出された。SDF-1 は個体発生において HSCs と骨髄細胞の骨髄への移動増殖に重要な働きをしており、その機序は HSCs と骨髄細胞とは異なっている。

ヒト原始造血細胞を NOD/SCID マウス骨髄へ直接注入することで、SCID 再構築細胞分析が高感度となる

A highly sensitive strategy for SCID-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow

Yahata T, Ando K, Sato T, *et al.*
Department of Hematology, Tokai University School of Medicine, Bohseidai, Isehara, Kanagawa 259-1193, Japan
Blood
2003, 101: 2905-2913.

ヒト造血幹細胞 (HSCs) の能力を測定するために、SCID 再構築細胞 (SRC) 分析が広く用いられている。慣例的にヒト HSCs は、非肥満性糖尿病/重度複合免疫不全 (NOD/SCID) マウスの尾静脈に注入されている。しかし、これらの細胞はマウス骨髄環境に達するまでさまざまな障害を乗り越えなければならず、それがこの分析法の効率が一般的に低い要因とされてきた。HSCs の能力はこの静注移植法では正確に研究できない可能性がある。真の SRC 能、すなわちレシピエント骨髄での自己再生と多分化能を明らかにするため、著者らは HSCs のホーミングを阻害しうる影響を減じた「細胞のマウス骨髄への直接注入法 (iBM)」を従来の静注法と比較検討した。臍帯血 CD34⁺ CD38⁻ 細胞を iBM 法で NOD/SCID マウスに移植した際の SRC 頻度は 1/44 CD34⁺ CD38⁻ 細胞であり、静注法での 1/660 CD34⁺ CD38⁻ 細胞と比べ 15 倍以上高率であった。さらに、iBM 法は二次移植でも生着が高率であった。移植前に

CD34⁺細胞を VLA (very late antigen) -4 または VLA-5 抗体でブロックした場合は部分的に生着が減少し、両者ともブロックした場合は完全に抑制したことから、VLA-4 および VLA-5 は生着に関して異なった過程で働いているか、または相補的に働いていると示唆される。著者らの結果から、iBM 法は感度よくヒト SRCs 能を測定できる直接的な方法であり、*in vivo* で HSCs と骨髄環境の相互関係を調べるために有用であることが示された。

強度を減弱した前処置による同種末梢血幹細胞移植を施行した患者の転帰における CD34⁺ 細胞数の影響

Impact of CD34⁺ cell dose on the outcome of patients undergoing reduced-intensity-conditioning allogeneic peripheral blood stem cell transplantation
Pérez-Simón JA, Díez-Campelo M, Martino R, *et al.*
Servicio de Hematología, Hospital Clínico, Universitario de Salamanca, Paseo de San Vicente s/n 37007, Salamanca, Spain
Blood
2003, 102: 1108-1113.

著者らは強度を減弱した前処置 (RIC) による同種末梢血幹細胞移植を行った 86 例の CD34⁺ 細胞数の影響を分析した。RIC とはフルダラビン 150mg/m² + メルファラン 140mg/m² またはブスルファン 10mg/kg を基本とする。輸注した CD34⁺ 細胞数は中央値で 5.68×10^6 /kg、CD3⁺ 細胞数は 2.86×10^8 /kg であった。75 パーセントイル (p75) より多い CD34⁺ 細胞数を輸注されたすべての患者は day 21 ~ 28 までに T リンパ球で完全キメラとなったが、p75 以下の細胞数を輸注した患者の完全キメラは 44% であった ($p = 0.046$)。全体の 30.3% の患者が grade 2 ~ 4 の急性 GVHD (aGVHD) に進展した。評価可能な 83 例のうち、55.8% が慢性 GVHD (cGVHD) に進展した。輸注した CD34⁺ 細胞数が cGVHD への進展に影響を及ぼし、進行性の cGVHD への累積頻度は、p75 より多い CD34⁺ 細胞数を輸注された患者と p75 以下の CD34⁺ 細胞数を輸注した患者で、それぞれ 74% および 47% であった ($p = 0.02$)。43 カ月における全生存率 (OS) と無病生存率 (EFS) はそれぞれ 60% と 46% であった。輸注した CD34⁺、CD3⁺ 細胞数ともに OS、EFS には有意な影響を及ぼさなかったが、高リスクに区分され p75 以下の CD34⁺ 細胞数を輸注した患者の 36% で再発または進展を認め、p75 以上の CD34⁺ 細胞数を輸注した患者ではわずか 9% であった ($p = 0.07$)。p75 以下の CD34⁺ 細胞数を輸注した高リスク患者の 36% が再発したが、低リスクまたは中間リスクの患者では 10% であり ($p = 0.004$)、p75 より多い CD34⁺ 細胞数を輸注した高リスク群と低/中間リスク群では再発率に明らかな差は認められなかった。このことは高用量の CD34⁺ 細胞数の輸注は移植時の進行病期によるネガティブな効果を改善することを示唆している。cGVHD は良好な EFS (移植後 43 カ月で cGVHD あり 63% vs cGVHD なし 16%, $p < 0.0001$)、および良好な OS (cGVHD あり 78% vs cGVHD なし 28%, $p < 0.001$) に関連していた。輸注する CD34⁺ 細胞数は低リスク患者群では cGVHD の進展を抑える程度に調整すべきであ

り、移植片対白血病効果が予後を決定するかもしれない高リスク患者群には高用量の CD34⁺ 細胞数を輸注すべきである。

感染・免疫

In vivo で Flt3 リガンド刺激で作製した樹状細胞と *in vitro* で作製した血液単球由来の樹状細胞の機能比較——特異的な生理的刺激による異なった機能調節

Functional comparison of DCs generated *in vivo* with Flt3 ligand or *in vitro* from blood monocytes: Differential regulation of function by specific classes of physiologic stimuli
 Jefford M, Schnurr M, Toy T, *et al.*
 Ludwig Institute Oncology Unit, Austin/Repatriation Medical Centre, Studley Rd, Heidelberg, Victoria 3084, Australia
Blood
 2003, 102: 1753-1763.

樹状細胞 (DC) は、T 細胞、B 細胞を介した病原体への免疫を開始させる白血球ファミリーである。感染部位からリンパ管流への DC の移動が T 細胞を介した免疫反応が開始する基礎となっている。ヒトでは、主要な末梢血中の DC (PBDC) 型の CD1c⁺ DC と、IL-3 レセプター陽性 (IL-3R⁺) 形質細胞様 DC は *in vivo* で Flt3 リガンド (FL) を使用することで有意に増幅する。DC 様細胞は単球の前駆体 (MoDC) から作製することもできる。(自家移植の条件下における) これらの DC の機能の詳細な比較は報告されていない。今回、FL で増幅された CD1c⁺ PBDC と自己 MoDC において、(1) 炎症を惹起する伝達物質、(2) 可溶性 CD40 リガンド三量体 (CD40L)、(3) 無傷細菌 (大腸菌)、の 3 つの異なった刺激に反応する機能を比較した。表現型の変化、移動能力、サイトカイン分泌、T 細胞刺激には、有意な差がみられた。MoDC は機能の発現に特異的な刺激を必要とした。これらの細胞は CD40L や大腸菌刺激に強く反応して、T 細胞で IFN- γ を調節することが知られているサイトカイン (IL-12p70, IL-18, IL-23) を産生する。しかし、ケモカインへの移動を刺激するにはプロスタグランジン E₂ (PGE₂) が必要だった。これに対して、PBDC は最低限の刺激によって成熟し、PGE₂ を含む刺激の必要なく急速に移動能を獲得する。サイトカインの産生能は低い。興味深いことに、同種 T 細胞増殖を刺激する能力や、細胞傷害性 T 細胞へのペプチド提示能力には両者で差がみられなかった。臨床応用でどの DC を選ぶか考慮するうえで、これらの明らかな機能の違いはとりわけ重要と思われる。

10

EBV 関連の Hodgkin リンパ腫および鼻咽頭癌に対する LMP1 ポリエピトープワクチン療法

Therapeutic LMP1 polyepitope vaccine for EBV-associated Hodgkin disease and nasopharyngeal carcinoma
 Duraiswamy J, Sherritt M, Thomson S, *et al.*
 Queensland Institute of Medical Research, Bancroft Centre, 300 Herston Rd, Brisbane, QLD 4029, Australia
Blood
 2003, 101: 3150-3156.

EBウイルス (EBV) 特異的 CD8⁺ 細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) の増幅を目的としたエピトープをベースとしたワクチン療法の発展は, EBV 関連の再発 Hodgkin リンパ腫 (HD) や鼻咽頭癌 (NPC) の治療に対して望ましい治療方法として考慮され始めている。EBV がコードする潜伏膜蛋白である LMP1 と LMP2 は, HD 患者と NPC 患者において治療的 CTL 増幅を起こすことが可能な標的抗原である。ここで著者らは LMP1 からできる 6 つの HLA-A2 拘束性エピトープからなるポリエピトープ蛋白をコードする, 組み換え型ポックスウイルスワクチンを用いた前臨床試験を行った。この組み換え型ポリエピトープを感染させたヒト細胞は HLA-A2 をもつ健康成人から樹立した LMP1 特異的 CTL 株によりよく認識された。さらに, このポリエピトープワクチンで HLA-A2/K^b (HLA-A2 を発現している) マウスを免疫すると, *ex vivo* でも *in vitro* でもどちらでも検知可能な, 6 つのエピトープのうち 5 つに対する強い LMP1 特異的 CTL 反応が起こっていた。さらに重要なことに, このポリエピトープワクチンは HLA-A2/K^b マウスの LMP1 発現腫瘍の増殖を反転させることに成功していた。この研究は EBV 関連 HD と NPC の治療のための免疫療法のツールとして, LMP をベースとしたポリエピトープワクチン療法発展のために重要な基盤を提供するものである。

11

抗原曝露後の CD8⁺ T 細胞は, パーフォリン, CD95L, TNFR1 および TRAIL に依存した細胞傷害の同時欠損モデルにおいて, 同種骨髄の生着を妨げる抵抗性に関与する

Antigen-primed CD8⁺ T cells can mediate resistance, preventing allogeneic marrow engraftment in the simultaneous absence of perforin-, CD95L-, TNFR1-, and TRAIL-dependent killing
 Komatsu M, Mammolenti M, Jones M, *et al.*
 University of Miami School of Medicine, Department of Microbiology and Immunology, PO Box 0106960 (R-138), Miami, FL 33101, USA
Blood

T/NK 細胞の発現するどの分子が生着の促進あるいは逆に拒絶にかかわっているのかを検討した研究である。同種骨髄 (BM) 移植後の生着不全は, T 細胞を取り除いた移植片を用いた移植, あるいは再生不良性貧血 (AA) に対する移植においてとくに臨床的に問題となる。現在のところ, リンパ球系および NK 細胞などによる免疫耐性がいわゆる “バリア機能” を果たしていると広く一般に考えられている。MHC 一致同種移植において, NK 細胞を介さないバリア作用のエフェクター経路について現在まで検討が加えられてきた。バリア機能は, 殺細胞にかかわる分子が正常あるいは欠損した B6 マウス (H-2^b) レシピエントを, BM 移植前にドナーのマイナー組織適合抗原 (MiHA) に曝露し, 検討した。レシピエントの移植片に対する抵抗性は, ドナー前駆細胞 (PC) の直接的評価のための CFU アッセイと, 末梢血におけるキメラを直接

2003, 101: 3991-3999.

みることで高感度に評価された。B6ホストの、CD4⁺細胞やNK1.1⁺細胞ではなくCD8⁺T細胞が、CFU-HPP (high-proliferative potential) でみた同種ドナー PC, および CFU-IL-3/GM でみた lineage に分化した後の同種ドナー PC の拒絶に関与していた。パーフォリンあるいは FasL のどちらかが欠損しているマウス, およびその両方が欠損しているマウス (cdd マウス) を用いて, どの分子が細胞傷害性経路に関与しているのか検討した。B6-cdd マウスは野生型 B6 マウスと同程度の拒絶能力を示し, それは CD8⁺T 細胞に依存していることが示された。“トリプル”細胞傷害性欠損モデルとして TNFR1^{-/-} (TNF レセプター 1 欠損マウス) の PC 移植片を用いて移植を行っても, B6-cdd レシピエントマウスの同種移植片拒絶能力に変わりはない。最後に, 抗 TRAIL (TNF 関連アポトーシス誘導リガンド) モノクローナル抗体を B6-cdd レシピエントマウスに投与したが, TNFR1^{-/-} の BM を拒絶することを抑えることはできなかった。結局, これらの研究によって CD8⁺ ホスト T 細胞は, パーフォリン, FasL, TNFR1 および TRAIL などに依存する細胞傷害とは別の独立した経路を介して, MHC 一致 MiHA 不一致ドナーの PC を有効に拒絶していることが示された。それゆえ, 感作されたレシピエントにおいてこういったエフェクター経路を阻害することにより PC 同種移植片で幹細胞生着を促進することはできなさそうである。

12

オンコスタチン M により誘導されるリンパ節微小環境の変化

Changes in the lymph node microenvironment induced by oncostatin M

Louis I, Dulude G, Corneau S, *et al.*
Guy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, 5415 de l'Assomption Blvd, Montreal, Qc, H1T 2M4, Canada
Blood
2003, 102: 1397-1404.

オンコスタチン M (OM) は, 大量の胸腺非依存性 T 細胞の発育と著しい記憶 T 細胞プールの拡大という, 2つの強烈な特徴をもった“スーパーリンパ系組織”へリンパ節を転換する。LckOM トランスジェニック (LckOM-t) マウスのリンパ節での T 細胞の発育が, シクロオキシゲナーゼ -2 (COX-2) 依存性の高内皮細静脈 (high endothelial venules; HEVs) を含む血管新生により調節されていることを著者らは報告する。このリンパ節 HEVs がとくに OM レセプター β 鎖に富んでいることは, LckOM-t マウスにおける胸腺外 T 細胞発育がリンパ節に限られていることを説明する。さらに, リンパ節のストローマ細胞による CCL20 ケモカインの産生亢進が, LckOM-t マウスに記憶型 CD4 T 細胞プールの拡大をもたらすことを著者らは見出した。この所見の普遍性は CCL20 と CCR6 の相互作用が, 胸腺 (非 LckOM-t マウス) または胸腺外 (LckOM-t マウス) 由来にかかわらず, CD62 リガンド低発現 (CD62L^{lo}) CD4 T 細胞の基礎増殖率を亢進させることから示された。著者らの知る限り, CCL20 は記憶型 CD4 T 細胞の増殖を亢進させることが明らか

となった初めての分子である。以上より、OMが胸腺の代替であるリンパ節 HEVs の新生と CCL20 による CD4 記憶 T 細胞分画の拡大とをもたらしうることが明らかとなった。

13

HTLV-1 関連脊髄症 (HAM/TSP) 症例におけるウイルス複製期間の HTLV-1 特異的 CD8⁺ T 細胞の退化した特異性

Degenerate specificity of HTLV-1-specific CD8⁺ T cells during viral replication in patients with HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP)

Kubota R, Furukawa Y, Izumo S, *et al.*
Third Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Kagoshima University, 8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890-8520, Japan
Blood
2003, 101: 3074-3081.

HTLV-1 関連脊髄症/熱帯性瘧疾対麻痺 (HAM/TSP) は HTLV-1 感染で引き起こされる炎症性神経疾患であり、HTLV-1 感染 CD4⁺ T 細胞と HTLV-1 特異的 CD8⁺ T 細胞が病因に関与している。HAM/TSP 症例ではウイルス特異的 CD8⁺ T 細胞による著明な反応があるにもかかわらず、プロウイルス量が多い。しかしながら、*in vivo* でウイルス除去に T 細胞が有効かどうかは不明である。HAM/TSP 症例における HTLV-1 特異的 CD8⁺ T 細胞反応の動態を明確にするため、HTLV-1 プロウイルス量の変化、免疫優性ウイルス抗原決定基のアミノ酸の変化、HTLV-1 特異的 T 細胞の頻度、T 細胞認識の退化について長期的変化を調べた。縦断的研究において、HTLV-1 特異的 CD8⁺ T 細胞の頻度と退化がプロウイルス量と相関することがわかった。HTLV-1 特異的 T 細胞の頻度が同程度としても退化が低い症例では、プロウイルス量がより多い傾向にあった。さらに数多くの症例をプロウイルス量により 2 群に分けると、高プロウイルス量群では、低プロウイルス量群よりも T 細胞認識の退化が低かった。塩基配列解析から、抗原決定基の変異は頻度、退化が最も低い症例で著しく増加していた。これらのデータから、退化した特異性をもった HTLV-1 特異的 CD8⁺ T 細胞はウイルス複製期間に増加し、ウイルス感染を調節していることがわかった。

14

骨髄非破壊的前処置による造血細胞移植後の免疫回復

Immunologic recovery after hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning

Maris M, Boeckh M, Storer B, *et al.*
Fred Hutchinson Cancer Research Center, 1100 Fairview Avenue N, Seattle, WA 98109-1024, USA
Exp Hematol

目的：著者らは、骨髄非破壊的処置後の HLA 一致造血細胞移植 (HCT) を施行した 51 例のレシピエントと、骨髄破壊的処置後の 67 例のレシピエント対照群との免疫構築について検討した。方法：骨髄非破壊的処置は 2Gy の全身照射 (TBI) ±フルダラビンと、移植後のシクロスポリン+ミコフェノール酸モフェチル (MMF) で構成された。全患者に G-CSF により動員された末梢血単核細胞を輸注した。患者はリンパ球サブセット数、抗体レベル、ウイルス誘導リンパ増殖能、サイトメガロウイルス (CMV)-T ヘルパー (T_H) 細胞の限界希釈分析により連続的

2003, 31: 941-952.

に評価した。移植後最初の1年以上で感染症の発症率を算出した。結果：移植後最初の180日までのリンパ球サブセットの絶対数は、(骨髄非破壊的処置を受けた患者の80日目における総リンパ球数とメモリーB細胞数を除いて)類似していた。しかし1年目では、総CD4数、ナイーブCD4数、およびナイーブCD8数は骨髄破壊的処置を受けた患者で高かった。抗体レベルはすべての時点とワクチン接種後で類似していた。ウイルス誘導リンパ増殖能により評価したCD4細胞機能も同様であった。しかし、CMV-TH細胞の絶対数は骨髄非破壊的処置後30日と90日で高かった(それぞれ $p = 0.002$, $p = 0.0003$)。明確な感染症合併率は移植後最初の90日以内では骨髄非破壊的処置を受けた患者で低かったが、その後は高くなった。骨髄非破壊的処置によるHCT後30日目と90日目のCMV特異的T細胞数の増加は、CMV感染の頻度の低い時期と一致していた。結論：HCT後早期では、骨髄非破壊的処置を受けた患者の免疫能は骨髄破壊的処置を受けた患者の免疫能より良いようにみえるが、後期では差はない。

15

骨髄移植患者の経口寛容の誘導がセミ同種移植マウスモデルのGVHDを抑制する

Induction of oral tolerance in bone marrow transplantation recipients suppresses graft-versus-host disease in a semiallogeneic mouse model

Nagler A, Ohana M, Alper R, et al.

Liver Unit, Department of Medicine, Hadassah University Hospital, PO Box 12000, Jerusalem 91120, Israel

Bone Marrow Transplant 2003, 32: 363-369.

GVHDは同種幹細胞移植(SCT)を成功させるにあたり最も障害となる病態である。罹患率および死亡率は高く、新しい治療戦略が求められている。今日の治療は主に免疫抑制であり、高い頻度で合併症を起こす。最近、マウスモデルにおいて、経口的に抗原を内服することにより誘導された低免疫反応は慢性GVHD(cGVHD)の進展を抑制することが観察された。本研究の目的は、マウスのセミ同種移植において寛容の誘導とGVHDの緩和が可能かどうかを評価することである。C57BL/6ドナーマウスから採取した 2×10^7 個の脾細胞を、移植前に7Gyの ^{60}Co を全身照射(TBI)した(C57BL/6 \times Balb/c)F1レシピエントマウスに輸注することにより、GVHDを発症させた。経口寛容は、移植後隔日にC57BL/6脾細胞から採取した5回分の蛋白($50 \mu\text{g}/\text{mouse}$)をレシピエントF1マウスに経口で与えることにより誘導した。*In vitro*で寛容マウスと非寛容マウスのリンパ球混合試験(MLR)を施行した。キメリズム、GVHDの臨床症状および病理所見をパラメーターとして、レシピエントマウスを観察した。非寛容マウスに対して寛容マウス脾細胞のMLR反応の著明な減少により、寛容の誘導が立証された。肝、小腸、皮膚におけるGVHDの臨床的、病理学的評価で著明な緩和が観察された。寛容の誘導で生着不全は認められなかった。これらの結果は、免疫機構の操作によりGVHDの頻度を減少させるためのステップを構

築するのもかもしれない。

貧血・輸血

16 TNF2 アレルは HLA-DR とは独立した重症再生不良性貧血の危険因子である

The TNF2 allele is a risk factor to severe aplastic anemia independent of HLA-DR

Peng J, Liu C, Zhu K, *et al.*
Department of Hematology,
Qilu Hospital of Shandong
University, Jinan, Shandong
250012, China
Hum Immunol
2003, 64: 896-901.

重症再生不良性貧血 (SAA) は自己免疫的要素をもった疾患である。SAA 発症率は MHC 上の遺伝子と強い関連がある。TNF- α 遺伝子は MHC 遺伝子座にコードされており、TNF- α は SAA の病因にかかわっている。TNF2 とよばれるプロモーター領域 -308 位での TNF- α の遺伝子多型 (-308A) は、いくつかの自己免疫疾患との関連が証明されている。本研究では、TNF- α の -308 位プロモーター多型と HLA-DRB1 アレルについて 75 例の SAA 患者、55 例の中等症再生不良性貧血 (MAA) 患者、128 例の対照群で調べた。SAA 患者では対照群と比較し、TNF2, HLA-DR3, -DR2 表現型の頻度が有意に高かった。層別化解析により、TNF2 アレルは HLA-DR3 や -DR2 とは独立して SAA の発症に関連することが確認された。この結果から、TNF2 アレルは SAA の独立した危険因子であることが示唆された。

17 MDS 患者における IFN- γ 産生性インバリアント NK T 細胞の重度で選択的な欠損

Severe and selective deficiency of interferon- γ -producing invariant natural killer T cells in patients with myelodysplastic syndromes

Fujii S, Shimizu K, Klimek V, *et al.*
Laboratory of Tumor
Immunology/Immunotherapy,
Rockefeller University, New
York, NY 10021, USA
Br J Haematol
2003, 122: 617-622.

著者らは、MDS 患者では糖脂質反応性 V α 24⁺/V β 11⁺ NK T 細胞の重度の欠損があるが、NK 細胞や CD4⁺, CD8⁺ T 細胞にはそのような欠損はないことを示した。MDS 患者の血液や骨髄中では NK T リガンドである α -ガラクトシルセラミドに反応する IFN- γ 産生性 NK T 細胞は検出できないが、インフルエンザウイルス特異的エフェクター T 細胞機能は保たれていた。このような免疫調節に重要な細胞の重度で選択的な欠損は MDS の病態に関与している可能性がある。

18

SLE 患者における赤血球結合 CD55 および CD59 発現低下

Deficiency of red cell bound CD55 and CD59 in patients with systemic lupus erythematosus
 Richaud-Patin Y, Pérez-Romano B, Carrillo-Maravilla E, *et al.*
 Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga No.15, Tlalpan, 14000 Mexico City DF, Mexico
Immunol Lett
 2003, 88: 95-99.

CD55 と CD59 は補体抑制活性を有するグリコシルホスファチジルイノシトールに結合している蛋白である。自己免疫性溶血性貧血 (AIHA) は抗リン脂質抗体 (APLA) と関連がある。本研究の目的は、原発性 AIHA や SLE からの二次性 AIHA 患者の赤血球において、APLA の発現と CD55 および CD59 の発現低下との関連性を評価することにある。24 例の患者 (原発性 AIHA 患者 8 例, AIHA 合併 SLE 患者 11 例, AIHA の合併していない SLE 患者 5 例) と健常対照群 20 例の赤血球における CD55 と CD59 の発現をフローサイトメーターで解析した。血清中のいくつかのリン脂質抗体が ELISA を用いて検討された。SLE だけの患者では CD55 と CD59 が正常に発現していたが, AIHA 合併 SLE 患者のほとんどと, 原発性 AIHA の少数患者は, これらの分子のうちどちらか, あるいは双方とも低下していたが, APLA 発現との関連性は認めなかった。著者らの結果は, 原発性および二次性 AIHA における CD55 と CD59 の発現低下を示したが, この低下は溶血機序においては引き金というよりもむしろ増悪因子として作用していると考えられた。さらに, この後天的な発現低下の原因としての APLA の役割は疑問の多いところである。

血栓・止血

19

ITP 血漿と純化した ITP モノクローナル自己抗体は *in vitro* で巨核球造血を抑制する

Immune thrombocytopenic purpura (ITP) plasma and purified ITP monoclonal autoantibodies inhibit megakaryocytopoiesis *in vitro*
 Chang M, Nakagawa PA, Williams SA, *et al.*
 Hemostasis and Thrombosis, Children's Hospital of Orange County, 455 S Main St, Orange, CA 92868, USA
Blood
 2003, 102: 887-895.

巨核球が血小板同様, ITP 自己抗体の標的になっているかどうかを明らかにするため, *in vitro* での ITP 血漿の巨核球造血に与える影響について調べた。臍帯血単核細胞をトロンボポイエチン存在下, および ITP 患者 (53 例) または健常ドナーの 10% 血漿存在下で培養した。抗血小板糖蛋白 Ib (GPIb) 自己抗体を含んだ ITP 血漿存在下では, 対照血漿, および抗 GPIIb/IIIa 自己抗体または抗 GPIb 自己抗体が認められなかった患者血漿に比べ, フローサイトメトリーで同定された巨核球数は有意に減少していた ($p < 0.001$)。ITP 血漿中の抗 GPIb 自己抗体を血小板吸着させると, 吸着を行わなかった同じ血漿と比べ, 巨核球産生が倍化した。一方, 対照血漿で同様の血小板吸着を行っても巨核球産生には何ら影響はなかった。さらに, ITP 患者から単離した 2 つのヒトモノク

ローナル自己抗体, ヒト血小板 GPIIb 重鎖特異的な 2E7, および活性化血小板に発現している GPIIIa の新規抗原特異的な 5E5 は, *in vitro* で有意に巨核球造血を抑制した ($p < 0.001$)。以上より, ITP 血漿中の血小板 GPIIb または GPIIb/GPIIIa に対する自己抗体は, 血小板破壊だけでなく血小板産生の抑制にもかかわっていることが示唆された。

造血器腫瘍・化学療法・移植

20

再発性の移植後 FSGS に対する血漿搬出の早期実施

Early use of plasmapheresis for recurrent post-transplant FSGS

Pradhan M, Petro J, Palmer J, *et al.*
Division of Nephrology,
Department of Pediatrics,
Children's Hospital of
Philadelphia, 34th Street and
Civic Center Boulevard,
Philadelphia, PA 19104, USA
Pediatr Nephrol
2003, 18: 934-938.

同種移植における巣状糸球体硬化症 (FSGS) の再発は, 移植不全が頻繁に起こるため困難な臨床状況である。著者らは, 再発 FSGS に対して早期に血漿搬出 (plasmapheresis) を実施した症例について報告する。腎生検で FSGS と証明された小児 18 例 (33%) に対し移植を施行したところ, 6 例が移植後に再発したため (尿蛋白/クレアチニン比の上昇), 血漿搬出を実施した。再発後 1 日以内に治療を受けた患者 (6 例中 4 例) は, 5~13 回の血漿搬出により治療開始後 5~27 日以内に寛解に入った。血漿搬出において反応がみられなかった患者 (6 例中 2 例) は, 蛋白尿が認められてからそれぞれ 7 日目と 17 日目に治療を受けた。そのうち 1 例は急性尿細管壊死, 急性拒絶反応から移植不全となり, 別の 1 例は急性拒絶反応, 進行性蛋白尿が認められ移植不全となった。移植後 22~53 ヶ月においても, 寛解に至った 4 例の移植片は良好な機能を維持している。著者らの経験では, FSGS における移植後の蛋白尿の再発には早期に血漿搬出を実施することが効果的であるといえる。

21

多発性骨髄腫の患者において, 骨髄破壊的同種幹細胞移植後の分子学的寛解はより優れた非再発生存期間を導く

Molecular remission after myeloablative allogeneic stem cell transplantation predicts a better relapse-free survival in patients with multiple myeloma

Corradini P, Cavo M,
Lokhorst H, *et al.*
Hematology-Bone Marrow
Transplantation Unit, Istituto
Nazionale per lo Studio e la

骨髄破壊的同種幹細胞移植 (allo-SCT) 後に臨床的完全寛解となった患者が, 分子学的モニタリングの予測価値を評価するための長期的な研究に組み込まれた。Ig 遺伝子再構成について PCR 法を用いることにより, 70 例のうち 48 例でクローン特異的な分子マーカーを生成することが可能となった。これら 48 例中 16 例 (33%) は, 移植後も長期にわたり PCR 陰性であった。しかし, 13 例 (27%) は PCR 陽性が続いており, 19 例 (40%) は陰性/陽性混合のパターンを示した。5 年間の再発累積リスク

Cura dei Tumori, Via
Venezian, 1, 20133, Milan,
Italy
Blood
2003, 102: 1927-1929.

はPCR陰性患者では0%であったのに対し、PCR陰性/陽性混合パターンの患者では33%、PCR陽性患者では100%であった。グループ内の研究では、PCR陰性の持続性についていかなる臨床的要因も特定できなかった。分子病の治療が寛解期間と生存期間を延ばしうるのか否かを評価するprospectiveな研究の計画をこれらの知見が促しうると考える。

コンディショニングレジメンとしてのATGは、CML患者の非血縁間造血幹細胞移植後の移植関連死（TRM）を減らし、全生存率を改善する

ATG as part of the conditioning regimen reduces transplant-related mortality (TRM) and improves overall survival after unrelated stem cell transplantation in patients with chronic myelogenous leukemia (CML)
Zander AR, Kröger N, Schleuning M, *et al.*
University Hospital Hamburg-Eppendorf, Department of Bone Marrow Transplantation, Martinistr 52, Hamburg 20246, Germany
Bone Marrow Transplant
2003, 32: 355-361.

適合した非血縁ドナーからの移植により、重篤なGVHDの危険と移植関連死（TRM）は増加する。抗胸腺細胞グロブリン（ATG）はGVHDを減じ、生着を促進すると報告された。著者らは、Fresenius ATG投与群（145例、平均90mg/kg体重、範囲40～90mg/kg体重）、またはATGなしの標準的な免疫抑制群（188例）の333例のCML患者のretrospectiveな解析を行った。両群は年齢、性別、HLA適合対不適合ドナーの分配において同等になるように考慮された。ATG Fresenius群は白血球の生着が迅速で、急性GVHDやTRMの発生を減少させ（それぞれ $p = 0.01$, $p = 0.03$ ）、全生存率もかなり良好であった（70%対57%, $p = 0.03$ ）。著者らは、造血幹細胞移植におけるATGの明確な役割を評価するためのprospectiveな無作為化試験が必要であると結論づけた。

IL-15によって伝達されるLFA-1の誘導は、ヒトNK細胞のCD34⁺ Lin⁻ 骨髄細胞からの細胞傷害性の分化に必要な後期のステップである

IL-15-mediated induction of LFA-1 is a late step required for cytotoxic differentiation of human NK cells from CD34⁺ Lin⁻ bone marrow cells
Barao I, Hudig D, Ascensao JL.
2150 Pennsylvania Avenue, NW, Washington, DC 20037, USA
J Immunol
2003, 171: 683-690.

細胞傷害性NK細胞の至適な分化は、骨髄移植後の患者に本来備わっている防御的な免疫能を供給するための重要なプロセスである。*In vitro*でのCD56⁺ CD3⁻ NK細胞の分化には数週間かかるが、IL-2, IL-7, IL-15などのサイトカインによって支持され、免疫療法に有用である。しかしながら、IL-2療法は*in vivo*においてはその効果は不確かであり、*in vitro*においてIL-7のみによって分化したNK細胞は細胞傷害性を欠く。著者らは、*in vitro*においてIL-7によってCD34⁺ Lin⁻ 骨髄細胞から初期分化させたヒトNK細胞がさらなるサイトカイン刺激によって細胞傷害性を獲得するか否か、そして、どのような変化が細胞傷害性を促進す

るかを評価した。IL-7存在下で培養された細胞は、過去の報告にあるように、すでに細胞傷害性の顆粒蛋白であるパーフォリンとともにグランザイムBを有していた。また、その細胞はLFA-1を有していなかった。IL-2またはIL-15による、IL-12やIL-18なしでの1週間の二次培養の後、IL-7により培養された細胞は細胞傷害性を獲得した。IL-2やIL-15もまた、LFA-1を誘導した。LFA-1サブユニットであるCD11aとCD18に対する抗体は、NK細胞による溶解を抑制し、この新しいLFA-1が*in vitro*で生成した細胞の細胞傷害能に関与しており、また、不可欠であることを示唆している。LFA-1はまた、*in vitro*で分化した細胞による標的細胞への結合にも関与している。この研究において、著者らはIL-15の新しい機能、すなわち、NK前駆細胞におけるLFA-1の誘導能を示し、また、IL-15はNK前駆細胞の増殖を単に支持する以上の働きをもつことを示した。わずか1週間のIL-15の投与によるこの効果は、ヒトの治療に実用的に役立つ有用な性質である。

24

抗原遺伝子を導入した造血幹細胞による骨髓移植を用いた生着腫瘍に対する免疫療法

Immunotherapy of established tumors using bone marrow transplantation with antigen gene-modified hematopoietic stem cells
Cui Y, Kelleher E, Straley E, *et al.*
Immunology and Hematopoiesis Division, Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Johns Hopkins, Baltimore, MD 21231, USA
Nat Med
2003, 9: 952-958.

現在の腫瘍免疫療法の焦点の1つは、樹状細胞(DC)による腫瘍抗原の提示を通してT細胞の反応を引き起こすという戦略を進展させることである。現在のワクチンは*in vivo*でDC上に効率よく抗原をのせる能力に限界がある。体外で培養・生成されたDCは抗原を効率よくのせるが、体内に戻された後は実際の抗原提示の場である二次リンパ組織へ移行するDCは少ない。DCによる抗原提示の能率と持続性を増すため、本研究ではモデル腫瘍抗原を造血幹前駆細胞(HSC)へ導入し、これを放射線照射したマウスに移植した。これにより、リンパ組織にあるドナー由来DCの大部分に導入した遺伝子の効率的な発現がみられた。遺伝子導入HSCを用いた骨髓移植(BMT)、DCを誘導し活性化するサイトカインなどの作用物質、および成熟T細胞の輸注の組み合わせにより、抗原特異的T細胞のかなりの増幅と活性化がもたらされた。この方法により増殖速度が速く、かつすでに生着している腫瘍に対する効果的な抗原特異的免疫療法が可能になるかもしれない。