

2. TP53

TP53 は最も有名な癌抑制遺伝子であり、多くの悪性腫瘍で TP53 遺伝子の突然変異が認められているが、MDS においても TP53 の遺伝子変異が認められる⁵⁾。*de novo* 発症の MDS や AML ではその変異率は 10% 弱と少ないが、アルキル化剤などの抗癌剤治療後に発症する治療関連 MDS や治療関連 AML では約 30% と高頻度に認められる。TP53 遺伝子変異を有する MDS では、複雑な染色体異常を示すことが多く、また治療に対して抵抗性であり、予後は不良である。

3. RAS

RAS は有名な癌遺伝子であり、RAS ファミリーに属する遺伝子には N-RAS, K-RAS, H-RAS がある。このうち、MDS において高頻度に遺伝子変異が認められるのは N-RAS であり、MDS 患者の約 10% に点突然変異を認める^{6~7)}。また頻度は低いが、K-RAS 遺伝子にも変異を認めることがある。N-RAS 遺伝子変異の多くは codon 12 に生じており、その結果、RAS が恒常的に活性化される。N-RAS 遺伝子変異も、やはり予後不良因子であることが示されている。また、MDS の中でも、N-RAS 遺伝子変異は慢性骨髄単球性白血病 (CMML: 約 50%) や若年性骨髄単球性白血病 (JMML: 約 30%) に特に高頻度に認められる。

4. RUNX1

RUNX1 は正常造血に必要な転写因子であると同時に、一部の MDS や急性白血病においてキメラ遺伝子の形成が認められており、造血器腫瘍の

発症においても最も重要な遺伝子の一つである。RUNX1 の機能抑制の機序として、前述のキメラ遺伝子の形成のほかに、点突然変異がある。これら変異 RUNX1 蛋白の多くは、正常アレルから翻訳された正常 RUNX1 蛋白に対しドミナントな抑制効果を有することが、*in vitro* や *in vivo* の実験で示されている。RUNX1 遺伝子の点突然変異は MDS 患者の 10% 前後で認められるが、治療関連 MDS では約 20% と高率に認められ⁸⁾、しかも不応性貧血 (RA) と比較し、進行期の MDS である芽球増加を伴う不応性貧血 (RA with excess blasts: RAEB, RAEB in transformation: REAB-t) では 20~40% と、さらに高頻度に認められている。その結果、RUNX1 遺伝子変異を有する MDS 患者は有意に予後不良であることが示されている。

5. TET2

最近、Single Nucleotide Polymorphism (SNP) アレイを用いた解析によって、MDS の 19~26%、CMML の約 50%、二次性 AML の 25%、そして骨髄増殖症候群の 12% に TET2 遺伝子変異が認められることが報告された⁹⁾。このように、TET2 遺伝子変異は幅広い骨髄系腫瘍に高頻度に認められることから、TET2 遺伝子変異は骨髄系腫瘍の発症の初期に共通して起こる遺伝子異常の一つであり、個々の腫瘍の病型の違いは、付加的なセカンドヒット・サードヒットによりもたらされると考えられている。同じように、複数の病型の骨髄系腫瘍に共通して見られる遺伝子異常に、後述の JAK2 遺伝子変異がある。TET2 遺伝子変異と JAK2 遺伝子変異は同時に観察されることも多いため、どちらがより腫瘍化の初期に発生する変異であるかについていくつかの

CMML (慢性骨髄単球性白血病) JMML (若年性骨髄単球性白血病) RA (不応性貧血) RAEB (RA with excess blasts) REAB-t (RAEB in transformation) REAB-t (RAEB in transformation) SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

研究がなされている。当初は TET2 変異が JAK2 変異より早期に起こるとされたが、骨髄増殖症候群の腫瘍細胞のコロニーアッセイを用いた詳細な解析により¹⁰⁾、現在では TET2 遺伝子変異と JAK2 遺伝子変異は独立して起こる事象であり、どちらの遺伝子に先に変異が起こる場合もあり得ると考えられている。

前述の TET2 遺伝子変異は SNP アレイの結果、Uniparental disomy (UPD) として見いだされ、DNA シークエンスの結果、TET2 遺伝子に変異が見つかった。UPD とは二本の相同染色体 (もしくは相同染色体の一部) を片方の親のみから受け継ぐことを意味するが、TET2 遺伝子変異の場合は、まず非常に未熟な造血前駆細胞の TET2 遺伝子の片方のアレルに変異がおこり、その後何らかの理由で染色体の微少な部分組み換えが生じ、両方のアレルの TET2 遺伝子に変異を有する細胞が誕生する。その様な細胞は他の細胞に対し優位に増殖することができるため、両方のアレルに遺伝子異常を有する細胞 (つまり acquired UPD : aUPD を示す細胞) の割合が増加し、最終的に MDS を含む骨髄系腫瘍を発症すると考えられている。このように両アレルに変異を生じた結果腫瘍を発生することから、TET2 遺伝子は癌抑制遺伝子であると考えられているが、その具体的な機能は最近まで不明であった。ごく最近、TET 蛋白 (TET1, TET2, TET3) はいずれも DNA の脱メチル化に関与している可能性が報告された¹¹⁾。変異 TET2 蛋白はこの脱メチル化活性を持たないため、造血細胞の増殖・分化等に重要な遺伝子の発現がメチル化により抑制されてしまい、MDS を始めとする骨髄系腫瘍の発症につながるという機序が考えられる。また、TET ファミリーのなかでも TET1 のみが ES 細胞の未分化性維持に重要な役割を果たすことも示された。このよう

に、TET ファミリーにおける役割分担があるため、骨髄系腫瘍に変異が認められる遺伝子は TET2 に偏っているのかもしれない。

また昨年、96 名の MDS 患者検体を用いた解析にて、TET2 遺伝子変異を有する患者が有意に予後良好だとする報告があったが、最近、355 名と多数の MDS 患者検体について、TET2 遺伝子変異を解析した報告がなされた。これによると、TET2 遺伝子変異の有無と、MDS の病型 (WHO), International Prognostic Scoring System (IPSS スコア), 白血病への移行との間には有意な相関は認められず、現時点では TET2 遺伝子変異には予後との関連はないと考えられる。この報告では末梢血の T リンパ球や骨髄中の CD34 陽性細胞にも TET2 遺伝子変異があることを観察しており、これらの結果は TET2 遺伝子変異が非常に未熟な造血細胞において発生することを裏付けるものである。

6. CBL

CBL 蛋白は E3 ユビキチンリガーゼ活性を有する酵素であり、受容体型チロシンキナーゼの分解を促進することで細胞増殖を負に制御する癌抑制遺伝子であることが知られている。TET2 同様 SNP アレイを用いた解析によって、骨髄系腫瘍の一部に 11q の aUPD を示す症例が観察され、DNA シークエンスにより、これらの症例では CBL 遺伝子に点突然変異が認められた¹²⁻¹³⁾。骨髄系腫瘍の中でもっとも高頻度に CBL 遺伝子変異を認めるのは CMML や JMML (15%前後) であるが、MDS を含む他の骨髄系腫瘍にも広く CBL 遺伝子変異が認められる。MDS においては、主に RAEB や RAEBt などの進行期の病型で CBL 遺伝子変異が観察される。

UPD (Uniparental disomy)

CBL 遺伝子の点突然変異に関して注目すべきは、前述の通り CBL 蛋白は癌抑制遺伝子と考えられているが、変異 CBL 蛋白は E3 ユビキチンリガーゼ活性を持たないだけでなく、正常の CBL 蛋白および CBL の Homolog である CBL-B 蛋白と結合し、これらの蛋白の機能をドミナントに抑制することである。その結果、正常の CBL 蛋白が残っていても片方のアレルに CBL 遺伝子変異が生じれば、活性化したチロシンキナーゼの分解が抑制されることで増殖優位性を獲得し異常クローンが拡大すると考えられる。その後 aUPD を獲得することで、そのような細胞はさらに増殖において優位になると考えられる。このような変異は gain of function 変異と呼ばれる。一方、CBL 遺伝子変異には前述の点突然変異以外に、塩基の欠失を伴う変異も認められている。点突然変異の多くが aUPD として見いだされるのに対し、塩基欠失を伴う変異の多くは逆に単独の変異として見つかり、正常 CBL アレルが残存していることが多い。このことは、欠失を伴う変異 CBL 蛋白は点突然変異 CBL 蛋白よりも変異原性が高い可能性を示しているが、実際に *in vitro* の実験で確認されている。

CBL 変異は AML にも観察されるが、面白いことに、FLT3, RAS, C-KIT などの変異とは相互排他的であることがわかっている。おそらくこれらの遺伝子変異は、CBL 変異と同様に受容体型チロシンキナーゼ変異に代表される増殖優位性を獲得する遺伝子変異であることから、CBL 遺伝子変異があればこれらの遺伝子の付加的異常は必要ないのだと考えられる。CBL 遺伝子変異がもっとも多く観察されるのは前述のように JMML であるが、JMML においても CBL 遺伝子変異は RAS や PTPN11 の遺伝子変異とは相互排他的である。また、MDS で主に CBL 変異が観察されるのは RAEB などの進行期の MDS であるが、これは CBL 変異が増殖優位性を獲得する変異であるこ

とから、無効造血を主体とする RA などの低リスク MDS では CBL 変異があまり見られないのだろうと考えられる。

7. ASXL1

ASXL1 はレチノイン酸受容体のコアクチベーターをコードする遺伝子であり、20 番染色体長腕 (20q) に位置する。ASXL1 蛋白はヒストン・アシルトランスフェラーゼ NCOA1 やヒストン・H3 デメチラーゼ LSD1 と直接結合し、レチノイン酸の標的遺伝子の発現を制御する。ASXL1 との相互作用により、LSD1 は転写活性化状態の指標である H3K4 を脱メチル化することで転写を抑制すると考えられている。ASXL1 遺伝子も、やはり SNP アレイを用いた検索にて MDS を含む骨髄系腫瘍に遺伝子変異が見つかった¹⁴⁾。MDS の約 10%、CMML の約 40%、AML の約 20% に ASXL1 遺伝子変異が認められ、その頻度は低リスク MDS よりも進行期の MDS において高くなっている。AML においては ASXL1 遺伝子変異は正常核型の AML に多く認められるが、正常核型の AML の約半数に認められ、予後良好因子である NPM1 遺伝子変異とは相互排他的である。また、CMML においては、ASXL1 遺伝子変異は予後不良因子であるとする報告もある。MDS において、ASXL1 遺伝子変異と予後との関連については現在のところ不明である。

8. EZH2

EZH2 遺伝子は、polycomb repressive complex (PRC2) の構成蛋白であるヒストン H3 メチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子である。EZH2 蛋白は H3K27 (ヒストン H3 のリジン 27) のメチル化酵素であり、ヒストンメチル化により標的遺伝子の発現を抑制する。

また、EZH2 は上皮細胞に強制発現するとトランスフォームを起こし、また siRNA によるノックダウンによりがん細胞の増殖抑制が認められることから、癌遺伝子であると考えられている遺伝子である。前述のように、7モノソミーや7番染色体長腕部分欠失は MDS において高頻度に認められる。これら-7/7q-MDS の原因遺伝子を同定する目的で SNP アレイを施行したところ、共通欠損領域として 7q36.1 が見いだされ、その部分に位置するいくつかの遺伝子の塩基配列を決定した結果、変異を有する遺伝子として EZH2 が同定された¹⁵⁾。EZH2 遺伝子変異は MDS 患者の約 15% に認められ、CMML や他の骨髄増殖症候群にも同程度の頻度で変異が認められている。MDS の中では RA など、むしろ低リスクの MDS における頻度が高いが、中でも RARS-T (血小板増加を伴う鉄芽球性貧血) では約 25% に認められ、最も頻度が高い。

変異 EZH2 蛋白はヒストン・メチルトランスフェラーゼ活性を持たないが³⁾、EZH2 遺伝子変異を有する MDS 症例の多くは 7q の UPD を示すことから、造血細胞において EZH2 は癌抑制遺伝子として機能することが予想される。実際に、造血幹細胞に EZH2 を強制発現させると自己複製能が失われることが³⁾、serial transplantation assay により示されており、この結果からも EZH2 は造血細胞では癌抑制遺伝子として機能すると考えられる。

最近、胚中心由来の慢性大細胞型 B 細胞性リンパ腫において EZH2 の点突然変異を認めるという報告があるが¹⁶⁾、リンパ腫における EZH2 変異は MDS に見られるものとは異なる単一の変異であり、しかも正常 EZH2 アレルは残存している。これらは、リンパ腫における EZH2 変異は gain of function 型の変異で癌遺伝子として機能

している可能性を示すもので、非常に興味深い。

9. JAK2

JAK2 遺伝子はエリスロポエチン受容体のシグナル伝達分子 JAK2 をコードする遺伝子であり、真性赤血球増加症の 90% 以上、本態性血小板血症・原発性骨髄線維症の約半数に JAK2 遺伝子変異 (V617F 変異) が認められる。JAK2-V617F 変異により JAK2 はエリスロポエチン刺激の有無にかかわらず恒常的に活性化し増殖シグナルを下流に伝え、真性赤血球増加症を始めとする骨髄増殖症候群の発症につながる。JAK2-V617F 変異も、片方のアレルに生じた変異が、病気の進展に伴う染色体の部分組み換えにより最終的に aUPD を呈することが多い。

MDS においても JAK2 変異の有無についての検討がなされており、頻度は少ないものの CMML の 3%、MDS の 5% に JAK2-V617F 変異が認められる¹⁷⁾。MDS の各病型では、RARS や RA などの低リスク MDS において比較的 JAK2 変異が多く見られる。中でも RARS-T では、約 50% に JAK2 変異が認められるとの報告がある¹⁸⁾。

これらの RARS-T の中には、RARS として発症した時には血小板はむしろ低値であり JAK2 変異を認めなかったが、経過中に JAK2 変異を獲得し血小板が増加し RARS-T へ進展している症例が複数あり、興味深い。

10. IDH1/IDH2

IDH1/IDH2 遺伝子は、クエン酸回路に関係する酵素である isocyanate dehydrogenase 1/2 をコードする遺伝子であり、グリオブラストーマの

PRC2 (polycomb repressive complex) RARS-T (血小板増加を伴う鉄芽球性貧血)

12%, アストロサイトーマやオリゴデンドログリオーマの約70%に IDH1 の遺伝子変異が報告されているほか, AML においても正常核型の AML の5~10%に IDH1 遺伝子変異が, また頻度は低いが IDH2 遺伝子にも変異が認められることが報告された。

今年になり, MDS においても IDH1/IDH2 遺伝子変異についての解析がなされ, MDS の約5%, 二次性 AML の約10%に IDH1/IDH2 の遺伝子変異が認められることがわかった^{19~20)}。一つの報告では, IDH1 の遺伝子変異を有する症例は生存期間が短く白血病への移行が高頻度に認められることから, IDH1 遺伝子変異は予後不良因子であるとしている。

IDH1/IDH2 遺伝子変異が MDS などの造血器腫瘍を発症する機序については, 今後の解析が必要である。

おわりに

本稿で概説したように, 最近見いだされた新規の MDS 関連遺伝子はほとんどが SNP アレイを用いて同定されている。SNP アレイを用いることで, 従来の染色体分析では検出できなかった染色体の微小な共通欠損領域 (microdeletion) や微小な UPD を検出することが可能となった。範囲を絞り込むことが出来れば候補遺伝子も少数に絞り込めるので, 塩基配列をシークエンスすることにより関連する遺伝子変異を同定することができるのである。SNP アレイを用いることで, 今後もさらなる MDS 関連遺伝子が同定されてくると思われる。

また, 最近同定された MDS 関連遺伝子のうち, TET2, ASXL1, EZH2 はヒストンあるいは DNA のメチル化を制御することにより標的遺伝子の発現を抑制する機能を有する。これらの遺伝子の同定以前に, メチル化阻害剤であるデシタビ

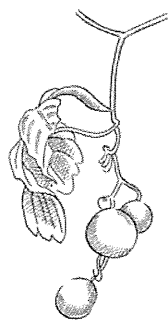
ンやアザシチジンが MDS に対する治療薬として米国で開発・承認されたことは非常に興味深い。

MDS 関連遺伝子に関する知見が蓄積されることにより, 今後も新規治療薬の開発が期待される。

文 献

- 1) Bejar R, Ebert BL : The genetic basis of myelodysplastic syndromes. *Hematol Oncol Clin North Am* **24** (2) : 295-315, 2010
- 2) Ebert BL, Pretz J, Bosco J et al : Identification of RPS14 as a 5q⁻ syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* **451** (7176) : 335-339, 2008
- 3) Pellagatti A, Jersten M, Forsblom AM, et al : Lenalidomide inhibits the malignant clone and up-regulates the SPARC gene mapping to the commonly deleted region in 5q⁻ syndrome patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** (27) : 11406-11411, 2007
- 4) Liu TX, Becker MW, Jelinek J, et al : Chromosome 5q deletion and epigenetic suppression of the gene encoding alpha-catenin (CTNNA1) in myeloid cell transformation. *Nat Med* **13** (1) : 78-83, 2007
- 5) Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J : Mutations with loss of heterozygosity of p53 are common in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype, and a poor prognosis. *J Clin Oncol* **19** (5) : 1405-1413, 2001
- 6) Hirai H, Kobayashi Y, Mano H, et al : A point mutation at codon 13 of the N-ras oncogene in myelodysplastic syndrome. *Nature* **327** (6121) : 430-432, 1987
- 7) Paquette RL, Landaw EM, Pierre RV, et al : N-ras mutations are associated with poor prognosis and increased risk of leukemia in myelodysplastic syndrome. *Blood* **82** (2) : 590-599, 1993
- 8) Harada H, Harada Y, Niimi H, et al : High inci-

- dence of somatic mutations in the AML1/RUNX1 gene in myelodysplastic syndrome and low blast percentage myeloid leukemia with myelodysplasia. *Blood* **103** (6) : 2316-2324, 2004
- 9) Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al : Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* **360** (22) : 2289-2301, 2009
 - 10) Schaub FX, Looser R, Li S, et al : Clonal analysis of TET2 and JAK2 mutations suggests that TET2 can be a late event in the progression of myeloproliferative neoplasms. *Blood* **115** (10) : 2003-2007, 2010
 - 11) Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, et al : Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* **466** (7310) : 1129-1133, 2010
 - 12) Dunbar AJ, Gondek LP, O'Keefe CL, et al : 250K single nucleotide polymorphism array karyotyping identifies acquired uniparental disomy and homozygous mutations, including novel missense substitutions of c-Cbl, in myeloid malignancies. *Cancer Res* **68** (24) : 10349-10357, 2008
 - 13) Sanada M, Suzuki T, Shih LY, et al : Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms. *Nature* **460** (7257) : 904-908, 2009
 - 14) Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adelaide J, et al : Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* **145** (6) : 788-800, 2009
 - 15) Nikoloski G, Langemeijer SM, Kuiper RP, et al : Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* **42** (8) : 665-667, 2010
 - 16) Morin RD, Johnson NA, Severson TM, et al : Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet* **42** (2) : 181-185, 2010
 - 17) Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, et al : The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical" myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood* **106** (4) : 1207-1209, 2005
 - 18) Malcovati L, Della Porta MG, Pietra D, et al : Molecular and clinical features of refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Blood* **114** (17) : 3538-3545, 2009
 - 19) Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Slama L, et al : Mutations of IDH1 and IDH2 genes in early and accelerated phases of myelodysplastic syndromes and MDS/myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* **24** (5) : 1094-1096, 2010
 - 20) Thol F, Weissinger EM, Krauter J, et al : IDH1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes are associated with an unfavorable prognosis. *Haematologica* **95** (10) : 1668-1674, 2010



3. MDS/AML における DNA メチル化異常の意義

中村 由香¹⁾・三谷 絹子²⁾
Nakamura Yuka Mitani Kinuko

獨協医科大学 内科学 (血液・腫瘍)¹⁾ 講師²⁾ 教授

Summary 近年のゲノムワイドな DNA メチル化解析により、MDS/AML では極めて多くの遺伝子が DNA メチル化を受けており、また、病型特異的に DNA のメチル化パターンが異なることが明らかになってきた。メチル化の標的となる遺伝子は癌抑制遺伝子をはじめ、細胞周期制御、アポトーシス、細胞接着などさまざまであり、DNA メチル化異常が腫瘍化において果たす役割は多岐にわたると考えられる。DNA メチル化異常は MDS/AML の新たな予後予測因子となり得るのみでなく、新たな治療標的としても注目されている。

はじめに

DNA のメチル化は、ヒストン蛋白の修飾とともに、エピジェネティックな遺伝情報制御、発現制御の重要なメカニズムの一つである。DNA メチル化の異常は多くの遺伝子におよび、また、白血病を含む様々ながんで普遍的に認められる現象であることが、近年のゲノムワイドな解析により明らかにされてきた。DNA メチル化異常は、白血病あるいは骨髄異形成症候群の発症・進展に重要な因子の一つであり、また、それらの治療反応性や予後に関連するものと考えられる。本稿では、AML/MDS における DNA メチル化異常の意義について、最近の知見を交えて概説する。

1. 分化における DNA メチル化

ゲノム上で遺伝子発現を調節するプロモーター領域やエンハンサー領域には、CpG アイランドと呼ばれる、シトシンにグアニンが続く配列 (CpG 配列) が反復した領域がしばしば認められる。DNA のメチル化は、CpG 配列のシトシン塩基にメチル基が付加されることである。遺伝子プロモーター領域が高度にメチル化された場合、その遺伝子発現は強く抑制される。すなわち、DNA のメチル化修飾は、遺伝子の実体である塩基配列を変えることなく、その発現を抑制する (エピジェネティック修飾)。

この DNA メチル化は、成体の発生・分化の過程における遺伝情報の発現制御にも重要な役割を担っている。特に、ヒトのように複雑な生物の体を正確に形づくるためには必須の仕組みである。

多細胞生物は、同一の遺伝情報 (DNA) を持つ細胞より成り、一つの受精卵から細胞分化の過程を経てそれぞれ形状や機能の違う様々な細胞を産生し、複雑な構造を持つ成体を構成している。同じ DNA を持っているにもかかわらず細胞の種類が異なっているのは、細胞によって発現している遺伝子が異なるためである。この遺伝子発現の制御を担っているものの一つが DNA のメチル化である。組織特異的に発現する遺伝子の多くがプロモーター領域に CpG アイランドを有しており、ゲノム DNA のメチル化パターンが遺伝子発現の調節を介して細胞の運命を決定する要因となっている。この遺伝子の DNA メチル化パターンは、細胞分裂において精密に娘細胞に受け継がれ、細胞の分化状態が維持される。例えば、造血細胞は分裂すると造血細胞になり、神経細胞や皮膚細胞などにはならない。これは、DNA 複製に伴ってメチル化パターンが正確に継承される事で、細胞分化状態が維持されるからである。

最近の ES 細胞に関する研究で、ヒストン H3-リジン (K) 27 のトリメチル化 (H3K27me3) および H3-K4 のメチル化 (H3K4me2/3) 修飾が、ES 細胞の維持と分化誘導の制御に深く関係していることが報告された¹⁾。H3-リジン (K) 27 のトリメチル化 (H3K27me3) は転写抑制に、H3-K4 のメチル化 (H3K4me2/3) は転写活性に働くが、ES 細胞では細胞分化に関わる分化制御遺伝子のプロモーター領域にこの2つの相反する作用を有する修飾が共存する bivalent domain が形成されることが明らかとなった。この結果、標的遺伝子発現の ON/OFF が緻密に制御され、ES 細胞の分化の方向性が決定されている。造血幹細胞においても血球分化に関連する遺伝子座には bivalent domain が検出されることから²⁾、ES 細胞と同様に bivalent domain を介した分化多能性の維持がなされている可能性がある。DNA メチル化異常は AML/MDS で高頻度に認められるが、何ら

かの原因によって DNA メチル化による厳密な分化制御機構が破綻することにより病的に未分化状態を獲得することが、白血病細胞形成の一つのメカニズムである可能性が考えられる。

2. 白血病における DNA メチル化の意義³⁾

白血病の発症に際しては、他の固形腫瘍と同様に、複数の遺伝子異常が蓄積した結果生じる多段階発がんの過程を経ることが、さまざまな白血病特異的融合遺伝子を用いたマウスモデルの解析で証明されている。急性白血病においては、造血細胞の増殖亢進に働くチロシンキナーゼなどの遺伝子変異 (クラス I 変異) と、造血細胞分化を調節する転写因子の遺伝子変異 (クラス II 変異) の2つの変異が最低必要であると考えられており、一つの白血病細胞中に、染色体異常に加えて二次的遺伝子変異やエピジェネティックな変化が加わることにより、白血病細胞が形成されると考えられる。

白血病細胞を用いた DNA メチル化の解析では、細胞周期やアポトーシスの制御因子である CDKN2B (p15^{INK4B})、CDKN2A (p16^{INK4A})、CDKN1C (p57^{KIP2})、あるいは癌抑制遺伝子として知られている TP73, FHIT, DAPK1, Rb などの遺伝子プロモーター領域がメチル化を受けており、遺伝子発現が減弱、消失していることが示されている。癌抑制遺伝子の DNA メチル化による発現抑制は、白血病の病型、サブタイプを問わず、ある程度普遍的に認められており、DNA メチル化異常は癌抑制遺伝子の不活化を介して、白血病の発症・進展に寄与していると考えられる。さらに、近年のゲノムワイドな解析により、白血病においても数千以上にわたる遺伝子のプロモーターが高度にメチル化されていることが示され、メチル化の標的となる遺伝子は癌抑制遺伝子のみでなく、転写因子なども多く含まれていることが示さ

れた。また、細胞の分化や増殖を制御しているmicroRNAも、DNAメチル化により発現異常が生じていることが明らかにされた。このことは、DNAメチル化異常が腫瘍化において果たす役割が、癌抑制遺伝子の不活化以外にも多岐にわたることを示唆している。

最近、AMLにおけるDNMT3A遺伝子の変異が報告されたが^{4, 5)}、DNMT3A遺伝子の変異の有無によって白血病細胞のメチル化DNA量や遺伝子発現パターンにそれほど差は認められず、DNMT3A遺伝子変異を伴う白血病の発症にDNAメチル化異常が関与している可能性は高くないと考えられた。白血病において、どのようにしてDNAメチル化の異常が引き起こされるか、そのメカニズムについては未だ不明である。

3. AMLの層別化とDNAメチル化

AMLは均一な疾患ではなく、さまざまな生物学的特徴をもつ疾患の集合体と考えられる。そのため、治療に対する反応もさまざまであり、AMLの治療戦略においては、予後因子に基づいて治療反応性を予測し、患者をいくつかのサブグループに層別化することにより、きめ細かく治療方法を工夫することが重要である。予後因子として報告されているものには、年齢、初診時白血球数、FAB分類病型、芽球のペルオキシダーゼ陽性率、Performance Status、染色体核型、寛解導入療法に対する反応およびLDHなどが挙げられる。なかでも染色体核型は、AMLの病態や予後を規定する因子として重要である。現在、AMLにおいては、白血病細胞の持つ染色体異常の種類により、予後良好群、中間群、予後不良群の3つのグループに分類している。しかしながら、AMLに占める染色体核型の40～50%は正常核型であることから、染色体核型だけでは十分にAMLを層別化できているとは言い難い。近年、正常核型の

白血病細胞においても様々な遺伝子変異を持つことが報告され、その中の一部は予後と関連の深いことが明らかとなった^{6, 7)}。正常染色体のAMLで予後と密接に関わる遺伝子変異には、NPM1、CEBPA、FLT3、MLLなどがある。FLT3 ITD陽性例は予後不良であるが、逆にCEBPA変異は予後良好であるとされる。NPM1変異はAMLの約35%、正常核型AMLに限れば約半数の症例に認められる変異であり、その頻度の高さからも注目されている。最近ではFLT3 ITD陰性かつNPM1変異陽性のAMLは、明らかな予後良好群を形成することが報告されている⁶⁾。

さらなる層別化を目指して、ゲノムワイドあるいはハイスループットの遺伝子解析により、多数の遺伝子の発現パターンによるAMLの層別化も報告されるようになった⁸⁻¹⁰⁾。Bullingerらは、AML患者サンプルを用いて92のプロモーター領域のメチル化状態を定量化し、クラスター解析を行った¹¹⁾。その結果、DNAメチル化パターンの違いにより生存率が異なることを示し、AMLの予後予測に有用であることを示した。

またFiguerolaらは、AML患者の白血病細胞を用いてゲノムワイドの大規模DNAメチル化解析を行い、生物学的あるいは臨床転機と関連のある16のサブグループを同定した¹²⁾。この中の5つのグループは既知の予後因子や細胞遺伝学的特徴では分類不能であり、メチル化パターンにより分類された新規の集団である。また、CEBPA異常の状態により3つのサブグループに分け、NPM1変異を持つAMLをメチル化状態の違いにより4つのサブグループに分類した。さらに、WHO分類で規定されている染色体転座(inv(16), t(8;21), t(15;17))を持つAMLは、DNAメチル化パターンにおいてもそれぞれ特異的特徴を示すことを明らかにした。そして最終的には、メチル化状態によりAML患者の予後を予見可能とする15個の遺伝子を同定した。

4. MDS における DNA メチル化の意義

MDS においても、他の悪性腫瘍で見られるようなエピジェネティック異常が報告されている。DNA メチル化による遺伝子発現異常としては、高リスク MDS におけるがん抑制遺伝子 CDKN2B

(p15^{INK4b}) が有名である^{13, 14)}。CDKN2B プロモーターのメチル化は、あらゆる病型の MDS 患者の 30～80% に認められる。特に、治療関連 MDS, RAEB-t, MDS から移行した AML では高頻度に CDKN2B プロモーターのメチル化が報告されている。また、CDKN2B プロモーターのメチル化は、年齢、5番あるいは7番染色体長腕欠失、予

表1 MDS において認められる遺伝子プロモーター領域の高メチル化

Gene (Other aliases)	Methylation frequency (%)	Function	Note
Calcitonin	50	Differentiation	
CDKN2B (p15 ^{INK4B})	23～80	Cyclin dependent kinase inhibitor ; cell cycle/proliferation	Tumor-suppressor ; methylation correlates with poor prognosis and progression to AML
DAPK	50	Proapoptotic serine/threonine kinase	
RASSF1	9	Negative regulator of RAS signaling	Tumor-suppressor
FHIT	50	Purine metabolism	Putative tumor-suppressor ; methylation correlates with poor prognosis and progression to AML
HIC1	32	Transcriptional repressor	Tumor-suppressor
CDH1 (E-Cadherin)	15～27	Adhesion and motility	Methylation correlates with poor prognosis and progression to AML
CTNNA1	10	Alpha catenin	
ER α	7～19	Estrogen receptor	
RIL	36～70	Proapoptotic, Tumor-suppressor	
CDH13	21	Adhesion and motility	
NOR1	15	Oxidored-nitro domain containing protein	
NPM2	20	Nucleophosmin/nucleoplasmin 2, involved in development	
OLIG2	41	Basic helix-loop-helix transcription factor	
PGRA	45	Progesterone receptor	
PGRB	45	Progesterone receptor	

(文献 15 より)

後不良と関連する。CDKN2B欠損マウスの解析によると、骨髄球前駆細胞の増多と赤芽球前駆細胞の減少が認められることから、プロモーターのメチル化によるCDKN2Bの発現抑制は、MDSの病態形成に重要な役割を果たしている可能性がある。MDSにおいてはCDKN2B以外にも、複数の遺伝子プロモーター領域の高メチル化が報告されている(表1)¹⁵⁾。細胞周期制御(CDKN2A)、アポトーシス(DAPK1, RIL)、細胞接着あるいは走化(CDH1, CDH13)などの機能に関連した遺伝子についてメチル化による発現低下があり、MDSの病態に関与していると考えられる。

MDSにおけるDNAメチル化状態は、予後や治療に対する反応性を予見する指標ともなり得る。Shenらは、MDS患者においてCpGアイランドのメチル化状態をスクリーニングし、プロモーター領域が高度にメチル化された10個の遺伝子をピックアップし、これらのメチル化状態を定量化することにより、メチル化状態が高度であるほど病期が進展しやすく予後が不良であることを報告した¹³⁾。また、JiangらはMDSの病期の進展にメチル化異常が進行することを明らかにし、高度にメチル化異常が認められた遺伝子としてFZD9を同定した¹⁶⁾。彼らは、メチル化異常がゲノムの広範囲に認められること、および病期の進展と密接に関連していることから、染色体異常よりもメチル化異常がMDSの進展に関して優位なメカニズムであると結論している。

SNP (Single Nucleotide Polymorphism) アレイを用いた解析により、MDSの19～26%、CMMLの約50%、二次性AMLの25%、骨髄増殖症候群の12%にTET2遺伝子変異が認められることが報告された¹⁷⁾。TET遺伝子は癌抑制遺伝子であると考えられているが、その具体的な機能は不明であった。最近、TET蛋白(TET1,

TET2, TET3)はいずれもDNAの脱メチル化に関与している可能性が報告された¹⁸⁾。変異TET2蛋白はこの脱メチル化活性を持たないため、造血細胞の分化・増殖などに重要な遺伝子の発現がメチル化により抑制されてしまい、MDSをはじめとする造血器腫瘍の発症に関与するという機序が考えられる。

5. MDSと脱メチル化薬

これまであまり有効な治療法がなかったMDSに対し、近年、DNAメチル化阻害剤と免疫修飾剤の2種類の治療薬が導入された。DNAメチル化阻害剤は、実験的にはメチル化された多くの遺伝子エンハンサー部分の脱メチル化によって悪性細胞の性質を正常側に戻す作用が確認されているものの、MDSクローンにおいて、実際にどのような遺伝子の脱メチル化によって臨床的な改善をもたらされているのかは不明である。意外なことに、DNAメチル化阻害剤の有効例で、メチル化が解除されてがん抑制遺伝子が活性化されている機序がはっきりとは証明されていない。また、治療の感受性とメチル化の程度に相関を認めないとの報告もある¹⁹⁾。現在のところ、治療前のメチル化の程度は予後不良因子であること、しかしメチル化の程度とメチル化阻害剤の治療効果とは相関しないことが知られている。

おわりに

近年のエピジェネティクス研究のめざましい発展により、DNAメチル化異常と腫瘍細胞の発生、進展に関する多くの情報が得られるようになった。メチル化を受けている遺伝子の種類、メチル化のパターンが詳細に解析され、病態におけ

SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

る層別化や予後との関連が明らかにされる一方で、どのような機序で DNA メチル化異常が引き起こされるのかについては未だ不明な点が多い。DNA メチル化異常のさらなる分子病態解析により、より詳細な病態の層別化や難治性造血器腫瘍に対する新たな治療法の開発が期待される。

文 献

- 1) Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, et al : Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* **125** : 301-313, 2006.
- 2) Cui K, Zang C, Roh TY, et al : Chromatin signatures in multipotent human hematopoietic stem cells indicate the fate of bivalent genes during differentiation. *Cell Stem Cell* **4** : 80-93, 2009.
- 3) 石前峰斉, 江口真理子 : 小児 ALL, 乳児白血病と DNA メチル化異常. *Annual Review 血液* **2011** : 137-146, 2011.
- 4) Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, et al : Array-based genomic resequencing of human leukemia. *Oncogene* **29** (25) : 3723-3731, 2010.
- 5) Ley TJ, Ding L, Walter MJ, et al : DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* **363** (25) : 2424-2433, 2010.
- 6) Schlenk RF, Dohner K, Krauter J, et al : Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* **358** (18) : 1909-1918, 2008.
- 7) Döhner K, Dohner H : Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica* **93** (7) : 976-982, 2008.
- 8) Marcucci G, Radmacher MD, Maharry K, et al : MicroRNA expression in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* **358** : 1919-1928, 2008.
- 9) Metzeler KH, Hummel M, Bloomfield CD, et al : An 86 probe set gene expression signature predicts survival in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood* **112** : 4193-4201, 2008.
- 10) Valk PJ, Verhaak RG, Beijnen MA, et al : Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* **350** : 1617-1628, 2004.
- 11) Bullinger L, Ehrich M, Döhner K, et al : Quantitative DNA methylation predicts survival in adult acute myeloid leukemia. *Blood* **115** : 636-642, 2010.
- 12) Figueroa ME, Lugthart S, Li Y, et al : DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* **17** (1) : 13-27, 2010.
- 13) Shen L, Kantarjian H, Guo Y, et al : DNA methylation predicts survival and response to therapy in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* **28** (4) : 605-613, 2010.
- 14) Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J : Methylation of *p15 INK4B* is common, is associated with deletion of genes on chromosome arm 7q and predicts a poor prognosis in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia* **17** (9) : 1813-1819, 2003.
- 15) Issa JP : Epigenetic change in the myelodysplastic syndrome. *Hematol Oncol Clin North Am* **24** (2) : 317-330, 2010.
- 16) Jiang Y, Dunbar A, Lukasz P, et al : Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood* **113** : 1315-1325, 2009.
- 17) Tefferi A, Lim KH, Levine R : Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* **361** (11) : 1117-1118, 2009.
- 18) Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, et al : Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* **466** (7310) : 1129-1133, 2010.
- 19) Issa JP, Garcia-Manero G, Giles FJ, et al : Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood* **103** (5) : 1635-1640, 2004.

Original Article

Treatment Outcome of Adult Burkitt Lymphoma in Japanese Patients with Modified LMB Protocol : A Single Center Retrospective Analysis

Hidekazu Nishikii,¹⁾ Naoya Nakamura,²⁾ Yuzuru Kondo,³⁾ Yasushi Okoshi,¹⁾ Kazumi Suzukawa,¹⁾ Yuichi Hasegawa,¹⁾ Yasuhisa Yokoyama,¹⁾ Mamiko Sakata-Yanagimoto,¹⁾ Terukazu Enami,¹⁾ Masayuki Noguchi,³⁾ and Shigeru Chiba¹⁾

The prognosis of adult Burkitt lymphoma (BL) has improved in western countries since the introduction of high-dose methotrexate (HD-MTX)-containing chemotherapy. Here we analyzed nine consecutive Japanese patients diagnosed with BL at our institution. All except for the three elderly (> 70 years) patients were treated with a regimen including 13 g/m² HD-MTX in total, divided into 3 cycles. The median follow-up period was 56 months (range 38-118). All the nine patients achieved complete remission and have not shown any disease progression, including the three elderly patients who received reduced doses or alternative treatments. These observations suggest that chemotherapy including 13 g/m² HD-MTX in total is tolerable and effective in Japanese adult BL patients aged < 70 and that BL is curable even if developed in those who are > 70 years. (*J Clin Exp Hematopathol* 51(2) : 109-114, 2011)

Keywords: Burkitt lymphoma, high-dose methotrexate, World Health Organization classification

INTRODUCTION

Burkitt lymphoma (BL) is a rare, highly aggressive B-cell lymphoma that preferentially occurs in children and young adults.^{1,2} Despite its highly aggressive course, the prognosis of BL has improved after the introduction of rapidly cycling, intensive chemotherapy regimens such as the "LMB (Lymphoma Malignancy B) protocol" (originally reported by a French group) and "CODOX-M/IVAC (cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, methotrexate/ifosfamide, etoposide, and cytarabine) therapy" that include high-dose methotrexate (HD-MTX).³⁻⁵ However, most of the studies testing these regimens were performed in European and North American

populations and their suitability for other populations remains to be determined.

Here, we report, after re-evaluation of diagnosis based on version 4 (v4) of the World Health Organization (WHO) classification, a retrospective analysis of eleven consecutive Japanese patients who were diagnosed with BL or B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma (iDLBCL/BL) and treated with an LMB-like regimen.

PATIENTS AND METHODS

Patients and re-evaluation

We reviewed the clinical records at Tsukuba University Hospital between 1996 and 2009, and identified 12 and 1 patients who, according to the v3 WHO classification, had been diagnosed with BL and Burkitt-like lymphoma (BLL), respectively (Table 1). One BL patient diagnosed in 1996 was excluded from this analysis because he received allogeneic stem cell transplantation after chemotherapy. Another BL patient was positive for human immunodeficiency virus (HIV) and was also excluded from the analysis. Thus, 10 BL and 1 BLL consecutive cases, all of which were negative for HIV, were re-evaluated for diagnosis on the basis of the v4

Received : April 1, 2011

Revised : July 7, 2011

Accepted : August 19, 2011

¹⁾Department of Hematology, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, Japan

²⁾Department of Pathology, Tokai University School of Medicine, Isehara, Kanagawa, Japan

³⁾Department of Pathology, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, Japan

Address correspondence and reprint requests to : Shigeru Chiba, M. Ph.D. Department of Hematology, University of Tsukuba, 1-1-1, Tennoudai, Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan

E-mail : schiba-t@md.tsukuba.ac.jp

Table 1. Clinical features, diagnosis according to the v3 WHO classification, stage, and survival of the patients

Case No.	Age/Sex	Main lesion	Bulky	CNS	BM	Stage	PS \geq 2	Initial diagnosis	CR	Current status	Follow up period (months)
1	46/F	jaw, stomach	+	-	-	III	Yes	BL	Yes	Alive	118
2	70/M	salivary gland	+	-	-	II	Yes	BL	Yes	Alive	112
3	65/F	salivary gland, stomach	+	-	-	III	Yes	BL	Yes	Alive	103
4	73/M	salivary gland	+	-	+	IV	Yes	BL	Yes	Alive	38
5	16/M	paraaorta, axillary	+	+	-	IV	No	BL	Yes	Alive	56
6	20/F	ovary, paraaorta	+	-	-	IV	Yes	BL	Yes	Alive	56
7	82/M	paraaorta, mediastinum	+	-	+	III	Yes	BL	Yes	Alive	41
8	54/M	pharynx	-	-	-	I	Yes	BL	Yes	Alive	38
9	40/F	ovary, paraaorta	+	-	-	III	No	BL	Yes	Alive	60
10	39/F*	ovary, paraaorta	+	-	-	IV	Yes	BLL	No	Death	3
11	42/M*	salivary gland, stomach	+	+	-	IV	Yes	BL	Yes	CNS relapse Death	7

The clinical stage of each case was defined by the Ann Arbor staging system. BL; Burkitt lymphoma, BLL; Burkitt-like lymphoma,*; Two patients were diagnosed as iDLBCL/BL after re-evaluation according to the v4 classification.

WHO classification.

For the re-evaluation, hematoxylin-eosin-stained specimens were reviewed by two pathologists who were not involved in the initial diagnosis. Immunocytochemical stainings of paraffin sections were added to evaluate the expression of CD10, CD20, BCL2, BCL6, MUM1, and Ki-67. Rearrangement of the *cMYC* and *BCL2* genes was studied by interphase fluorescence *in situ* hybridization (FISH) on thin-sliced paraffin sections. The probes used for FISH were Dual Fusion Translocation Probe IGH SG/MYC SO [for t(8;14); Vysis, Richmond, United Kingdom], BCL2 FISH DNA Probe Split Signal and MYC FISH DNA Probe Split Signal [for (14;18), and t(8;14) and t(2;8), respectively; DAKO, Carpinteria, CA, USA].⁶

The clinical stage of each case was defined by the Ann Arbor staging system. The bulky mass was defined as a tumor with a diameter of at least 10 cm.

Treatment

The 6BL patients who were < 70 years, as well as 2 iDLBCL/BL patients, were treated with intensive chemotherapy based on the LMB protocol as summarized in Fig. 1 (modified LMB protocol).⁷⁻¹⁰ The doses of cyclophosphamide (CPA) in induction therapy, and cytarabine (AraC) and etoposide (VP-16) in consolidation #1 were reduced compared with those in the original LMB protocol. AraC in original consolidation #2 was also changed to VP-16 on days 3-6.¹⁰ The induction regimen consisted of MTX (5,000 mg/m²) on day 1, CPA (1,000 mg/m²) on days 2 and 3, adriamycin (ADR, 60 mg/m²) on day 2, vincristine (VCR, 1.4 mg/m²) on days 1 and 7, prednisolone (PSL, 60 mg/m²) on days 1-10, and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF, 5 μ g/m²) on day 5, which was continued until absolute white blood cell count of > 5.0 \times 10³/mL with > 50% neutro-

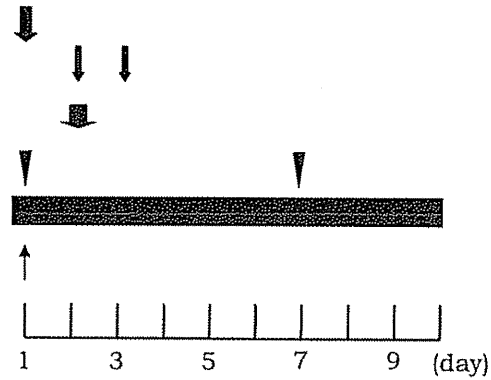
phils was achieved. As CNS prophylaxis, intrathecal therapy (IT) consisting of AraC (40 mg), MTX (15 mg), and PSL (20 mg) was applied on day 1. CNS prophylactic irradiation was not included at any point in the treatment plan. Leukovorin rescue was commenced 2 hr after the completion of HD-MTX administration and continued until the serum MTX level was decreased to < 5 \times 10⁻⁸ M. This regimen was repeated once for all patients. The 3 elderly BL patients principally received the same regimen except that the dose of MTX was reduced to 1,000 mg/m². To keep the intervals between regimens as short as possible, the next regimen was started when absolute neutrophil counts of > 1.5 \times 10³/mL and platelet counts of > 10 \times 10⁴/mL were achieved. For patients with a bulky mass or a poor general condition, pre-phase therapy with PSL alone, COP (CPA, VCR, and PSL), or CHOP (CPA, VCR, ADR, and PSL) was performed before induction therapy.

After complete remission (CR) or uncertain remission (CRu) was confirmed, and if absolute neutrophil and platelet counts were over 1.5 \times 10³/mL and 10 \times 10⁴/mL, respectively, the consolidation #1 regimen was started. This regimen consisted of IT on days 1 and 6, AraC (2,000 mg/m² \times 2) on days 3-5, and VP-16 (100 mg/m²) on days 3-6. Rituximab (375 mg/m²) was added to the consolidation #1 regimen (on day 1) for patients who were diagnosed after April, 2006.

If absolute neutrophil and platelet counts were over 1.5 \times 10³/mL and 10 \times 10⁴/mL, respectively, the consolidation #2 regimen was started. This regimen consisted of IT on days 1 and 6, MTX (3,000 mg/m²) on day 3, and VP-16 (60 mg/m²) on days 3-6. Rituximab (375 mg/m²) was added to the consolidation #2 regimen (on day 1) for patients who were diagnosed after April, 2006. G-CSF was used during neutropenia (< 500/mm³).

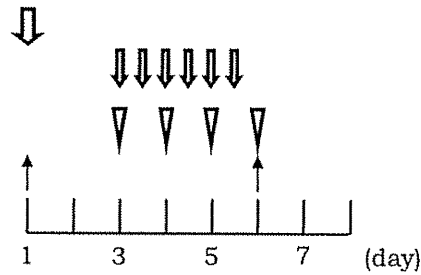
Induction protocol

Methotrexate: 5,000 mg/m², 6 hr, DIV day 1
 Cyclophosphamide: 1,000 mg/m², 2 hr, DIV day 2,3
 Adriamycin: 60 mg/m², IV, day 2
 Vincristine: 1.4 mg/m², IV, day 1,7
 Prednisolone: 60 mg/m², IV or PO, day 1-10
 IT*: day 1



Consolidation # 1

Rituximab: 375 mg/m², DIV, day 1
 Cytarabine: 2,000 mg/m² x 2, 2.5 hr, DIV, day 3- 5
 VP-16: 100 mg/m², 1 hr, DIV, day 3- 6
 IT*: day 1, 6



Consolidation # 2

Rituximab: 375 mg/m², DIV, day 1
 Methotrexate: 3,000 mg/m², 24 hr, DIV, day 3
 VP-16: 60mg/m², 1 hr, DIV, day 3- 6
 IT*: day 1, 6

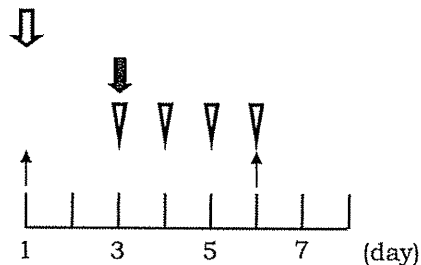


Fig. 1. Treatment scheme. The induction course was repeated once (2 induction courses in total). IV, intravenous injection; PO, orally; IT*, intrathecal chemotherapy (cytarabine 40 mg + methotrexate 15 mg + prednisolone 20 mg)

Assessment of remission and adverse events

Initial staging and prognosis factors were evaluated by obtaining a medical history, performing a physical examination and standard blood tests, including measurements of lactate dehydrogenase (LDH) and soluble interleukin-2 receptor (sIL-2R) levels, and conducting other examinations as follows: computed tomographic scan of the chest, abdomen, and pelvis; magnetic resonance imaging of the brain and spine; lumbar puncture [if central nervous system (CNS) involvement was suspected]; and bone marrow aspiration and biopsy. All cases were examined for anti-HIV antibody, hepatitis B surface (HBs) antigen, anti-HBs antibody, and hepati-

tis C antibody. Elevated serum LDH and sIL-2R levels were defined when greater than 245 U/L and 519 U/mL, respectively. Responses were evaluated according to the guidelines reported by Cheson *et al.*¹¹ Toxicities and adverse events related to chemotherapy were assessed and graded according to the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria, version 2.0.¹²

RESULTS

Re-evaluation based on the v4 WHO classification

The median age of patients was 46 years (range 16-82),

Table 2. Diagnosis and re-evaluation of the patients according to the v4 classification

Case No.	Age/Sex	Starry sky	Ki-67	CD10	CD20	BCL2	BCL6	MUM1	IgH/ cMYC	cMYC split	BCL2 split	G-band	Initial diagnosis (v3)	Reviewed diagnosis (v4)
1	46/F	+	≥ 90%	+	+	-	+	-	+	+	-	N. D*	BL	BL
2	70/M	+	≥ 90%	+	+	-	+	-	+	+	-	N. D*	BL	BL
3	65/F	+	≥ 90%	+	+	-	+	-	+	+	-	N. D*	BL	BL
4	73/M	+	≥ 90%	+	+	-	+	-	+	+	-	N. D*	BL	BL
5	16/M	+	≥ 90%	+	+	-	+	+	+	+	-	N. D*	BL	BL
6	20/F	+	≥ 90%	+	+	-	+	-	+	+	-	N. D*	BL	BL
7	82/M	+	≥ 90%	+	+	-	+	-	+	+	-	N. D*	BL	BL
8	54/M	+	≥ 90%	+	+	-	+	-	+	+	-	N. D*	BL	BL
9	40/F	+	≥ 90%	+	+	-	+	-	+	+	-	N. D*	BL	BL
10	39/F	-	≥ 90%	+	+	-	-	-	+	+	-	complex**	BLL	iDLBCL/BL
11	42/M	+	≥ 90%	+	+	+	-	-	+	+	-	N. D*	BL	iDLBCL/BL

The results of the morphological, immunophenotypical, and genetical analysis of the patients were shown. All patients were re-diagnosed according to the v4 classification. N.D.; not determined

complex** ; 50 XX, +3, add (6) (q21), del (6) (q?), +7, add (14) (q32), add (17) (q11,2)+18, +mar1

Table 3. Laboratory data at diagnosis

Case No.	Age/Sex	WBC (/μL)	Hgb (g/dL)	Plt (x 10 ⁴ /μL)	LDH (U/L)	CRP (mg/dL)	sIL-2R (U/mL)
1	46/F	4,300	14.1	25.8	299	1.04	571
2	70/M	8,110	13.9	21.4	396	3.42	692
3	65/F	5,400	11.2	29.2	203	0.78	490
4	73/M	4,900	15.9	16.5	929	0.25	753
5	16/M	7,600	17.5	35.0	374	0.08	983
6	20/F	27,900	12.2	58.7	751	29.33	11,826
7	82/M	5,700	14.0	25.4	149	0.01	279
8	54/M	7,400	11.3	24.2	564	2.52	4,560
9	40/F	6,500	9.4	46.0	312	0.47	580
10	39/F*	25,000	9.5	7.9	1,204	9.59	31,328
11	42/M*	4,500	12.3	32.1	1,004	4.03	1,596

WBC; white blood cell count, Hgb; hemoglobin level, Plt; platelet count, LDH; lactate dehydrogenase, CRP; C-reactive protein, sIL-2R; soluble interleukin-2 receptor, *; Patients with iDLBCL/BL

with 3 patients aged > 70 years. Nine out of 11 patients were in advanced stages (stage III or IV) at the diagnosis. Eight patients exhibited extranodal involvement (Table 1).

When all 11 cases were re-evaluated according to the v4 WHO classification (Table 2), 9 of the 10 cases originally diagnosed as BL showed typical "starry sky" morphology, positive staining for CD20 and BCL6, negative staining for BCL2, > 90% positive for Ki-67 staining, and *cMYC* rearrangement upon FISH analysis. Thus, the diagnosis of BL was unchanged for these cases.

The diagnosis of one (UNP11) of the ten cases whose original diagnosis was BL was changed to iDLBCL/BL because of strongly positive BCL2 staining, despite the fact that all other features were compatible with BL. None of the cases including UNP11 demonstrated *BCL2* rearrangement. The one case originally diagnosed as BLL (UNP10) was re-diagnosed as iDLBCL/BL because of the presence of large B cells that were recognizable as tumor cells, which matched the morphological criteria of iDLBCL/BL.

G-banding analysis in one iDLBCL/BL case (UNP10) showed a complex karyotype, while cytogenetic data were not available in other patients (Table 1).

LDH and sIL-2R levels were elevated in 7 BL patients. Two iDLBCL/BL patients had extranodal involvement with high LDH and sIL-2R levels (Tables 1 & 3).

Response to therapy and outcome

Of the 11 patients, "prephase" treatment was given to 10 patients (8 BL and 2 iDLBCL/BL) because they had bulky mass, as well as 7 patients (5 BL and 2 iDLBCL/BL) with a poor general condition (Table 1). As the prephase treatment, 5 patients (4 BL and 1 iDLBCL/BL) were given a COP or a CHOP regimen while the remaining 5 patients were given PSL alone.

After the two courses of induction regimen, 10 patients (9 BL and 1 iDLBCL/BL) achieved CR or CRu. All the 9 BL patients maintained progression-free survival for 38-118

months (median 56 months, Table 1). For reasons of old age (UNP 7) and poor general condition (UNP 2), the consolidation regimens were omitted in one case (UNP 7) and both the second induction regimen and the two consolidation regimens were omitted in another case (UNP 2); instead, radiation therapy for the residual lesion was provided. Both patients have shown no signs of relapse and are still alive 3 and 9 years later, respectively.

Both iDLBCL/BL patients died from infection after the first induction therapy and CNS relapse.

Toxicity of treatment

Myelosuppression was the main form of toxicity. Febrile neutropenia was observed in 7 (63%) patients after first induction regimen. Grade III/IV thrombocytopenia and anemia were observed in 4 (36%) and 2 (18%) patients, respectively (Table 4). Two patients suffered from acute renal dysfunction but recovered without recourse to hemodialysis. Tumor lysis syndrome during and after the first induction regimen was experienced in one iDLBCL/BL patient (UNP 10), who died from peritonitis and sepsis compromised by tumor lysis syndrome despite the prephase (CHOP) therapy.

The incidence of therapy-related toxicity was much lower in the second course of induction regimen than in the first course (grade III/IV thrombocytopenia, 36% vs. 10%; febrile neutropenia, 63% vs. 30% in the first and second courses, respectively; Table 4). However, grade III/IV hematologic toxicities and febrile neutropenia were frequently observed after consolidation #1 (anemia, 77%; thrombocytopenia, 87.5%; febrile neutropenia, 77%). Although grade III mucositis was documented in 36, 20, and 37% after the treatment, which included HD-MTX (first induction, second induction, and consolidation #2, respectively), the median period required for the recovery to the grade II level or less was 5 days. No grade IV mucositis was documented.

There were no obvious additional toxicities in patients who received rituximab.

DISCUSSION

Intensive chemotherapy regimens that include HD-MTX as well as high-dose AraC and CPA¹³ were developed for pediatric BL and later applied to adult BL. This development appears to have improved the prognosis of adult BL.^{3-5,8,10,14,15} The effectiveness of LMB protocol for adult BL was reported in 1995,¹⁰ which was one of the earliest reports describing successful treatment of adult BL using HD-MTX. The original CODOX-M/IVAC was also reported by Magrath *et al.* in 1996,³ although this protocol was modified through clinical studies;^{4,5} the reduction of MTX was among major changes because the principal cause of toxicity in the original CODOX-M/IVAC was the use of MTX at 6.7 g/m² in a single course. While there is a consensus on the necessity of HD-MTX for BL treatment, the MTX dose and timing are under debate.

Most of the ensuing confirmatory studies, however, in addition to the original LMB and CODOX-M/IVAC studies, were performed with European and North American populations, while a retrospective analysis using LMB protocol for adult BL was previously reported from a Korean group.⁷ This raises the question of whether the same results can be produced in Japanese populations. For this reason, we retrospectively analyzed whether a modified LMB protocol in adult Japanese BL patients would be efficient and feasible.

For the 9 patients < 70 years, MTX was given at 5 g/m² in the first and second courses of the induction regimen and at 3 g/m² in the consolidation #2 regimen, meaning that 13 g/m² was delivered in total over 4 courses of chemotherapy. The toxicities during the induction phase were well tolerated, with close monitoring of MTX level in the serum. All the 6 BL patients who received the modified LMB protocol as planned have survived for more than 3 years, which indicates that intensive chemotherapy including MTX at high doses such as 13 g/m² in total is both tolerable and effective for Japanese BL patients < 70 years. The LMB-like protocol may be suitable to treat Asian BL patients, as was suggested by a

Table 4. Frequency of adverse events during the treatment

Toxicity (%)	Induction 1	Induction 2	Consolidation 1	Consolidation 2
Anemia	18	0	75	11
Thrombocytopenia	36	10	87	0
Febrile neutropenia	63	30	77	11
Mucositis	36*	20	0	37*
Neuropathy	9*	0	0	0
Bilirubin	18*	0	0	0
Renal failure	18	0	0	0
Tumor lysis syndrome	18*	0	0	0

Grade III/IV toxicities and adverse events related to chemotherapy are shown. Toxicities and adverse events related to chemotherapy were assessed and graded according to the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria, version 2.0.

*; No Grade IV toxicity was documented.

previous report from Korea.⁷ Our results also suggest that BL could be curable with less intensive chemo-radiotherapy, given that all the 3 elderly patients who received a reduced dose have survived for more than 3 years.

In conclusion, not only the modified CODOX-M/IVAC protocol¹⁶ but also the modified LMB protocol is effective and tolerable in Japanese adult BL patients *aged* < 70. For elderly patients, reduced dose and/or cycles of chemotherapy may be required, and reduced doses could be effective.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Perkins AS, Friedberg JW: Burkitt lymphoma in adults. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 341-348, 2008
- 2 Blum KA, Lozanski G, Byrd JC: Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood* 104:3009-3020, 2004
- 3 Magrath I, Adde M, Shad A, Venzon D, Seibel N, *et al.*: Adults and children with small non-cleaved-cell lymphoma have a similar excellent outcome when treated with the same chemotherapy regimen. *J Clin Oncol* 14:925-934, 1996
- 4 Mead GM, Sydes MR, Walewski J, Grigg A, Hatton CS, *et al.*: An international evaluation of CODOX-M and CODOX-M alternating with IVAC in adult Burkitt's lymphoma: results of United Kingdom Lymphoma Group LY06 study. *Ann Oncol* 13:1264-1274, 2002
- 5 Mead GM, Barrans SL, Qian W, Walewski J, Radford JA, *et al.*: A prospective clinicopathologic study of dose-modified CODOX-M/IVAC in patients with sporadic Burkitt lymphoma defined using cytogenetic and immunophenotypic criteria (MRC/NCRI LY10 trial). *Blood* 112:2248-2260, 2008
- 6 Barrans SL, Evans PA, O'Connor SJ, Owen RG, Morgan GJ, *et al.*: The detection of t(14;18) in archival lymph nodes: development of a fluorescence in situ hybridization (FISH)-based method and evaluation by comparison with polymerase chain reaction. *J Mol Diagn* 5:168-175, 2003
- 7 Choi MK, Jun HJ, Lee SY, Kim KH, Lim do H, *et al.*: Treatment outcome of adult patients with Burkitt lymphoma: results using the LMB protocol in Korea. *Ann Hematol* 88:1099-1106, 2009
- 8 Divine M, Casassus P, Koscielny S, Bosq J, Sebban C, *et al.*: Burkitt lymphoma in adults: a prospective study of 72 patients treated with an adapted pediatric LMB protocol. *Ann Oncol* 16:1928-1935, 2005
- 9 Galicier L, Fieschi C, Borie R, Meignin V, Daniel MT, *et al.*: Intensive chemotherapy regimen (LMB86) for St Jude stage IV AIDS-related Burkitt lymphoma/leukemia: a prospective study. *Blood* 110:2846-2854, 2007
- 10 Soussain C, Patte C, Ostronoff M, Delmer A, Rigal-Huguet F, *et al.*: Small noncleaved cell lymphoma and leukemia in adults. A retrospective study of 65 adults treated with the LMB pediatric protocols. *Blood* 85:664-674, 1995
- 11 Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, *et al.*: Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. *J Clin Oncol* 17:1244, 1999
- 12 Trotti A, Byhardt R, Stetz J, Gwede C, Corn B, *et al.*: Common toxicity criteria: version 2.0. an improved reference for grading the acute effects of cancer treatment: impact on radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 47:13-47, 2000
- 13 Kujawski LA, Longo WL, Williams EC, Turman NJ, Brandt N, *et al.*: A 5-drug regimen maximizing the dose of cyclophosphamide is effective therapy for adult Burkitt or Burkitt-like lymphomas. *Cancer Invest* 25:87-93, 2007
- 14 Lee EJ, Petroni GR, Schiffer CA, Freter CE, Johnson JL, *et al.*: Brief-duration high-intensity chemotherapy for patients with small noncleaved-cell lymphoma or FAB L3 acute lymphocytic leukemia: results of cancer and leukemia group B study 9251. *J Clin Oncol* 19:4014-4022, 2001
- 15 Thomas DA, Faderl S, O'Brien S, Bueso-Ramos C, Cortes J, *et al.*: Chemoimmunotherapy with hyper-CVAD plus rituximab for the treatment of adult Burkitt and Burkitt-type lymphoma or acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 106:1569-1580, 2006
- 16 Maruyama D, Watanabe T, Maeshima AM, Nomoto J, Taniguchi H, *et al.*: Modified cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and methotrexate (CODOX-M)/ifosfamide, etoposide, and cytarabine (IVAC) therapy with or without rituximab in Japanese adult patients with Burkitt lymphoma (BL) and B cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B cell lymphoma and BL. *Int J Hematol* 92:732-743, 2010

Procoagulant properties of microparticles released from red blood cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria

Yukinori Kozuma, Yuka Sawahata,
Yumi Takei, Shigeru Chiba and
Haruhiko Ninomiya

*Institute of Clinical Medicine, University of
Tsukuba, Tsukuba, Japan*

Summary

Thrombosis in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) has been suggested to be due to several pathophysiological states: a suppressed fibrinolytic system, increased leucocyte-derived tissue factor, complement (C')-mediated damage to platelets and endothelia, or increased platelet- and endothelium-derived microparticles (MPs). Because haemolytic attack is often accompanied by thrombosis in PNH, we studied the role of C'-induced release of MPs in the thrombogenesis of PNH. C' activation induced procoagulant alteration in PNH red blood cells (RBC), when assessed by thrombin generation in the presence of C'-activated PNH RBC, which was abolished by their subsequent treatment with annexin V. Significant amounts of procoagulant MPs, measured by phosphatidylserine-binding prothrombinase activity, were released from PNH RBC in association with the formation of C5b-9, but not significantly before C5b-8. Generation of procoagulant, annexin V-binding, MPs from C'-activated RBC was studied also by flow cytometry. While phorbol 12-myristate 13-acetate, an activator of protein kinase C (PKC), induced the release of MPs from normal RBC as well as PNH RBC, C'-induced release of MPs from PNH RBC was Ca²⁺-independent and not associated with the activation of PKC, calpain or caspase. Procoagulant properties of MPs released from PNH RBC could contribute to the thrombogenesis of PNH.

Keywords: PNH, microparticle, thrombosis, RBC, PKC.

Received 31 August 2010; accepted for
publication 25 October 2010

Correspondence: Haruhiko Ninomiya, MD,
PhD, Institute of Clinical Medicine, University
of Tsukuba, Tennodai 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki
305-8575, Japan.

E-mail: ninomiya@sakura.cc.tsukuba.ac.jp

Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) is a rare acquired stem cell disorder caused by a somatic mutation of *PIGA*, diverse clinical manifestations of which include intravascular haemolysis, bone marrow failure and thrombosis (Parker *et al*, 2005). The most important factor related to the poor prognosis of PNH is the complication of visceral thrombosis, cerebrovascular thromboembolism and pulmonary embolism (Ziakas *et al*, 2008). Several factors involved in thrombogenesis in PNH have been proposed: (i) chronic haemolysis, (ii) impaired fibrinolytic system, (iii) microparticles (MPs) released from injured platelets and vascular endothelia (Ploug *et al*, 1992; Wiedmer *et al*, 1993; Ninomiya *et al*, 1999; Simak *et al*, 2004). Complement (C') sensitivity of PNH red blood cells (RBC) is due to a deficiency in the expression of glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane proteins with C'-regulatory activity, CD55 and CD59, on PNH-affected RBC (Wilcox *et al*, 1991; Parker *et al*, 2005; Brodsky, 2008). The clinical evidence that eculizumab

(Soliris, Alexion Pharmaceuticals, Chelshire, CT, USA), a humanized monoclonal anti-C5 antibody therapy, reduced the risk of clinical thromboembolism in addition to its reducing effect on intravascular haemolysis strongly suggests a major role of C'-induced haemolysis in thrombogenesis in PNH (Hillmen *et al*, 2004, 2007).

In the human RBC membrane, phospholipids are organized asymmetrically: phosphatidylserine (PS), phosphatidylethanolamine (PE) and probably phosphatidylinositol (PI) are located mainly in the inner monolayer while phosphatidylcholine (PC) and sphingomyelin (SM) are essentially in the outer monolayer (Devaux, 1991). An ATP-requiring mechanism responsible for the specific translocation of aminophospholipids (PS and PE), aminophospholipid translocase, has been demonstrated (Seigneuret & Devaux, 1984). An increase of the intracellular Ca²⁺ concentration in RBC is known to activate the scrambling of membrane phospholipids (Zhou *et al*, 1997; Bucki *et al*, 1998). Phospholipid scrambling plays a stimulatory role in MP

generation (Kamp *et al*, 2001), although little is known about the signalling that links cell injury to Ca^{2+} entry and subsequent activation of the phospholipid scramblase, leading to PS exposure. Phospholipid scrambling and MP generation have been shown, although closely regulated, to proceed by independent pathways (Bucki *et al*, 1998).

Human RBC contain protein kinase C (PKC), which mediates the phosphorylation of cytoskeletal proteins, such as band 4.1, 4.9 and, probably, adducin (Danilov & Cohen, 1989). It has been reported that PKC is involved in human RBC Ca^{2+} entry (Andrews *et al*, 2002) and subsequent PS exposure on RBC (de Jong *et al*, 2002). In the case of platelets, calpain (Bachelot-Loza *et al*, 2006) or caspase (Shcherbina & Remold-O'Donnell, 1999) is suggested to be involved in the mechanisms inducing PS exposure and/or MP release.

In this study, we investigated the release of procoagulant MPs from PNH RBC by C' activation. Ca^{2+} dependency and the role of PKC, calpain or caspase in the C'-induced release of procoagulant MPs from PNH RBC were also examined.

Materials and methods

Materials

A ZYMUPHEN-MP Activity enzyme-linked immunosorbent assay kit (HYPHEN BioMed, Neuville sur Oise, France) was used to measure MP procoagulant activity. Thrombin (IIa)-specific chromogenic substrate, Tos-Gry-Pro-Arg-ANBA-IPA (Sysmex, Kobe, Japan), was used for the enzymatic assay of IIa generation. Annexin V derived from human placenta was from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Goat antisera to human C5 (anti-C5) and human C9 (anti-C9) were from Cappel (Aurora, OH, USA). Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) was from Sigma. Calphostin C, a cell-permeable, highly specific PKC inhibitor, and RO-31-8220, a PKC inhibitor, were from Merck (Darmstadt, Germany). Calpain inhibitors, ALLN, E64d, PD150606, PD145305 and calpastatin peptide, were from Merck. A broad caspase inhibitor, z-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketone (z-VAD-fmk) was from Sigma. PHYCOERYTHRIN-labelled anti-human CD59 mouse IgG2a [p272(H19)] (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) and fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled annexin V (Sigma) were used for immunostaining. Phycoerythrin-labelled mouse IgG₂ (DakoCytomation, Kyoto, Japan) was used as an isotype-matched control antibody. Staining medium for flow cytometry (FCM) was phosphate-buffered saline, pH 7.2 (Nissui Pharmacology, Tokyo, Japan), containing 0.1% bovine serum albumin (BSA), 0.1% NaN_3 . FACSORT (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) was used for FCM and the data were analysed with CELL-QUEST (BD Bioscience, San Jose, CA, USA).

PNH patients and normal donors

Two patients with classical PNH and three normal individuals were used for the study. PNH Patients 1 and 2 had 44.8% and

92.2% CD59-negative (PNH-III) RBC, respectively. Freshly drawn blood with anticoagulant sodium citrate from normal individuals and PNH patients was used. RBC, washed and resuspended in 50 mmol/l Tris-buffered saline, pH 7.4 (TBS), were then treated by C'-activation in sucrose buffer as described below. C'-inactivated (56°C, 30 min) normal human serum (ABO-matched) and serum preincubated with anti-C5 or anti-C9 were also used in some experiments. Freshly drawn and separated normal human plasma was used as a source of coagulation factors for IIa-generation assays. Written informed consent was obtained from the patients and normal donors. This study was approved by the ethics committee of the University of Tsukuba.

C' activation of RBC in sucrose buffer

Sucrose buffer was prepared as 270 mmol/l sucrose dissolved in 5 mmol/l phosphate buffer, pH 6.5. C' activation of RBC was performed by incubation of 50 μl RBC ($2 \times 10^9/\text{ml}$ in TBS) with 50 μl freshly isolated ABO-matched serum (or inactivated serum) in 850 μl sucrose buffer (37°C, 30 min). For some experiments, serum was pretreated with anti-C5 or anti-C9 (4°C, 30 min). After C'-activation of RBC, the supernatants were isolated by centrifugation (2300 g, 5 min) and then used for procoagulant MPs activity assay or IIa-generation assay, as described below. C'-activated RBC were resuspended in TBS and then added to the IIa-generation assay, as described below.

IIa-generation assay

IIa generation in the plasma was assayed enzymatically with Tos-Gry-Pro-Arg-ANBA-IPA as a IIa-specific chromogenic substrate on a 96-well microplate (Nunc, Roskilde, Denmark): 50 μl of the samples (RBC suspensions or supernatants of RBC after C' activation) were added to wells containing 10 μl 4 mmol/l IIa-substrate, 20 μl 250 mmol/l CaCl_2 and 50 μl Tyrode buffer (135 mmol/l NaCl, 10 mmol/l HEPES, 5 mmol/l glucose, 2.9 mmol/l KCl, 1 mmol/l MgCl_2 , 12 mmol/l NaHCO_3 , 0.34 mmol/l Na_2HPO_4 , 0.3% BSA); and the assay was started by the addition of 50 μl normal human plasma, four-times diluted in TBS, to the wells. The optical density at 405 nm (OD_{405}) of the microplate wells were read at 23°C over time (0–120 min). For the IIa-generation assay in the presence of RBC, IIa-generation data were obtained by subtracting the data (OD_{405}) of the reference wells containing RBC plus plasma without IIa substrate and CaCl_2 on the same microplate. The rate of IIa generation was calculated from the change of OD_{405} using calibration curves generated with standard bovine α -thrombin (0, 15, 30, 60 and 120 u/l) (Fig 1A).

MP release from RBC by C' activation

MPs generated from C'-activated RBC in sucrose buffer were measured using a ZYMUPHEN MP-Activity Assay kit. Briefly,