

Polyclonal hematopoiesis maintained in patients with bone marrow failure harboring a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4644

【総説】

第二回 高安賞優秀賞受賞論文

論文 「Polyclonal hematopoiesis maintained in patients with bone marrow failure harboring a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells」

Blood.

Vol.102, No.4, pp.1211-1216

2003年8月掲載

微小PNH血球陽性骨髓不全症例では多クローン性造血が保たれている

石山 謙 (いしやま けん)

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

我々は、AAやMDSの不応性貧血 (RA) において、発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) でみられるCD55CD59細胞のごくわずかな増加が認められることを報告してきた。MDS症例の中でも、微小のPNH血球を認めるRA例の多くは、AAと同様の良性の経過をたどる¹⁾。しかし、PNH血球の増加は、PIG-A遺伝子に変異を持つ異常造血幹細胞の増加を意味しているため、GPIアンカー膜蛋白欠損のない非PNH型造血幹細胞にも遺伝子異常がある可能性がある^{2,3)}。そこで今回我々は、PNH血球の有無による造血の質の違いを評価するために、多数の骨髓不全症例について、ヒトアンドロゲンレセプター (HUMARA) 遺伝子の不活化現象を利用することにより、末梢血顆粒球中にクローン性の細胞集団 (クロナリティ) があるか否かを検討し、さらにクロナリティの有無と免疫抑制療法に対する反応性との関係を検討した。

表1に患者背景を示す。EDTA加末梢血2~10mlから、Ficoll-Hypaqueを用いて単核球と顆粒球を分離した。単核球からはプラスチックプレート・SRBCを用いてT細胞を精製した。顆粒球・T細胞のそれぞれからDNAを抽出し、一部はHhaIにて酵素処理を行った。HhaI処理および未処理DNAを、蛍光標識 (6-FAM) したプライマーを用いて増幅し、その産物をABI-Prism 310で電気泳動した⁴⁾。増幅された各アレルのDNA量をgene scanにて測定後、顆粒球・T細胞それぞれにおけるX染色体不活化パターン

(X chromosome inactivation pattern; XCIP) の偏りを算定した。

出現するアレルを図1のようにA, B, A', B'と定め、XCIPの偏りの程度を $C = (A/B)/(A'/B')$ で表した。健常者の顆粒球とT細胞におけるXCIPの偏りの関係を図2に示す。70歳未満の比較的若年者 (図2c) では、顆粒球・T細胞間でXCIPの偏りに正の相関がみられた。したがって、T細胞を対照とすることにより、顆粒球における生理的および加齢に伴うXCIPの偏りを補正できると考えられた。このため、顆粒球におけるC値 (C_G) とT細胞におけるC値 (C_T) との比 (C_G/C_T) をとり、それが1より大きく離れている ($|\log C_G/C_T| = S$ 値が大きい) 場合にクロナリティがあると判定した。一方、70歳以上の高齢者 (図2d) では、両者に相関はみられるものの、加齢に伴う顆粒球の偏りのため、両者の間に解離を認める例が若年者より多かった。このためS値の正常値は、健常者70歳未満群の95%、70歳以上群の90%が含まれるように、70歳未満: S < 0.3, 70歳以上: S < 0.4と設定した。

本アッセイによるクロナリティの検出精度を調べるためミキシング実験を行った (図1b)。AML患者の白血病細胞由来DNAにHhaI処理を行ったところ、図1a上段に示すようにアレルBが完

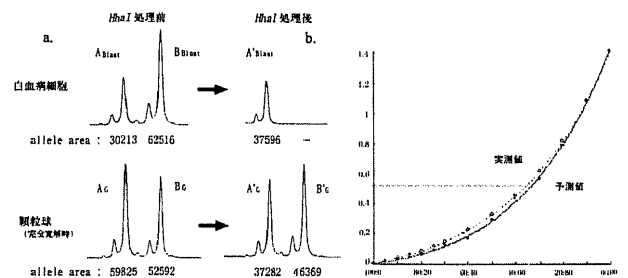


図1. HUMARAアッセイにより出現するアレルとクローン性造血の検出精度

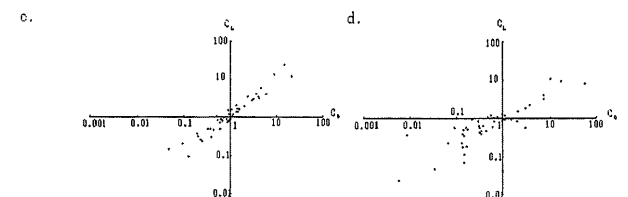


図2. 健常者顆粒球とT細胞におけるXCIPの関係

表1. 患者背景

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

表2. S値異常（クロナリティ）を示す例の割合

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

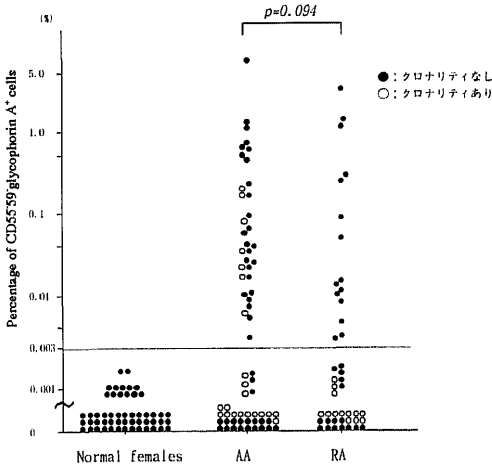


図3. 健常者及び骨髄不全患者におけるPNH顆粒球の割合とクロナリティ

全に消失した。このDNAと、同じ患者の完全寛解時の顆粒球DNAをさまざまな割合で混合した後、*HhaI*処理しC_G値を求めたところ、図1bのように実測値は理論上の値とほぼ一致した。T細胞に生理的偏りがない(C_G=1)場合、S=|logC_G|となる。したがってbに示す曲線から、S値が異常を示す検体には、70歳未満群で約35%以上、70歳以上群で約45%以上のモノクローナルな細胞集団が含まれていることになる。

骨髄不全患者112人、MDS-RAEB 4人、PNH 4人におけるクロナリティ解析の結果を表2に示す。RAEB例、PNH例では全例でS値は異常高値を示した。

図3に健常者及び今回検討した骨髄不全患者におけるPNH顆粒球の割合とクロナリティの関係を示す。AA群の49%、RA群の34%に有意(≧0.005%)なPNH血球の増加が見られた。モノクローナルな細胞を含む(クロナリティ陽性)患者の多くはPNH血球非増加群に含まれていた。

PNH血球増加例・非増加例の間でS値の分布を比較したところ、70歳未満の比較的若年群ではAA(51例)、RA患者(22例)ともにPNH血球増加群の方が非増加群よりもポリクローナルな造血を示す例の割合が有意に高かった(AA: 16% vs 47%, p=0.024, RA: 0% vs 33%, p=0.044)。また70歳以上の高齢者においても、RA群(22例)では同様の傾向が認められた(0% vs 53%, p=0.034)。

AA 42人、RA 15人の計57人に対して行われた抗胸腺細胞グロブリン(ATG)+シクロスポリン(CyA)あるいはCyA単独による免疫抑制療法の奏効率をクロナリティの有無で比較したところ、ATG+CyA療法を受けた例では、クロナリティ陰性例の方がク

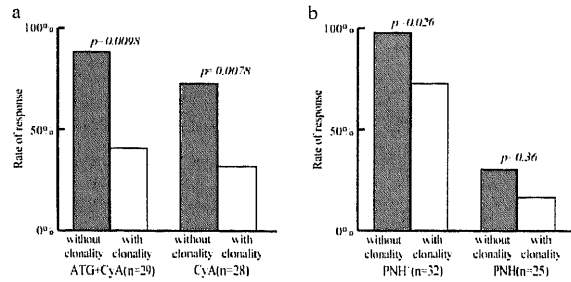


図4. 免疫抑制療法の奏効率
a, 治療法による比較; b, PNH血球の有無による比較

ロナリティ陽性例より奏効率が有意に高かった(83% vs 36%, 図4a)。また、PNH血球増加例の中でも、クロナリティ陰性例は陽性例に比べて免疫抑制療法の奏効率が有意に高かった(96% vs 67%, 図4b)。さらに、ATG+CyA療法を受けた5例について、11~16ヶ月にわたり経時的にクロナリティを調べたところ、改善の有無とは無関係にクロナリティの占める割合は個々の患者で一定していた。

以上のように、キャピラリーシーケンスにより定量性を向上させ、顆粒球のXCIPの偏りをT細胞のXCIPの偏りで補正することにより、70歳未満では約35%、70歳以上の高齢者では約45%以上のクローン性細胞集団をもつ「クロナリティ陽性」例を、それ以外の「クロナリティ陰性」例と区別することが可能であった。クロナリティ陽性例の頻度は、PNH血球増加患者よりもむしろPNH血球非増加患者で低率であり、一方免疫抑制療法の奏効率は、クロナリティ陰性群が陽性群に比べて有意に高かったことから、PNH血球を伴う骨髄不全例の多くは多クローン性造血を保持しており、造血の質は良好であることが示唆された。したがって、PNH血球に加えてクロナリティを検索することは、骨髄不全患者の免疫抑制療法に対する反応性を予測する上で有用と思われる。

文 献

- 1) Wang H, et al. Clinical significance of a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells in bone marrow failure syndrome. *Blood* 2001; 100: 3897-3902.
- 2) Maciejewski JP, et al. Relationship between bone marrow failure syndromes and the presence of glycoposphatidyl inositol-anchored protein-deficient clones. *Br J Haematol.* 2001; 115: 1015-1022.
- 3) Jin JY, et al. Myelodysplasia following aplastic anaemia-paroxysmal nocturnal haemoglobinuria syndrome after treatment with immunosuppression and G-CSF: evidence for the emergence of a separate clone. *Br J Haematol.* 1996; 94: 510-512.
- 4) Karasawa M, et al. Analysis of the Distribution of CAG Repeats and X-Chromosome Inactivation Status of HUMARA Gene in Healthy Female Subjects Using Improved Fluorescence-Based Assay. *Int J Hematol.* 2001; 74: 281-286.

Profile



所 属：金沢大学医学部附属病院 内科
 1998年3月 金沢大学医学部医学科卒業
 2003年6月 金沢大学大学院医学研究科（内科系専攻内科学第三）修了
 専 門：造血幹細胞移植，造血障害