

Studies on Hematopoietic Clonality in Patients with Hematopoietic Disorders: Analysis by Using Inactivation of X-linked Genes and DNA Fragment Length Polymorphism

メタデータ	言語: jpn 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/2297/8523

造血障害患者における造血クロナリティに関する研究

— X染色体関連遺伝子の不活化現象と DNA 長多型を利用した解析 —

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

山 口 正 木

造血の構築が単クローン性に行われているか、多クローン性に行われているかを決定することは、血液疾患患者の治療方針の決定や予後を推定する上で重要な意味を持つ。このような造血クロナリティの決定の意義を明らかにするため、造血障害患者および単クローン性の造血が疑われる腫瘍性の血液疾患患者について、造血細胞のクロナリティを解析した。対象としたのは再生不良性貧血 (aplastic anemia, AA) 19例, AA/発作性夜間血色素尿症 (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH) 症候群 3例, 骨髄異型成症候群 (myelodysplastic syndrome, MDS) 11例, 急性骨髄性白血病 (acute myelogenous leukemia, AML) 3例, 真性多血症 (polycythemia vera, PV) 1例, 慢性骨髄性白血病 (chronic myelogenous leukemia, CML) 1例の合計38例の女性血液疾患であった。クロナリティの解析は X染色体上の DXS255 領域 (M27 β), ホスホグリセレート・キナーゼ (phosphoglycerate kinase), ヒポキサンチン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ (hypoxanthine phosphoribosyltransferase) の3つの遺伝子の DNA 長多型と不活化現象を利用して行なった。38例中37例 (97.4%) がいずれかの遺伝子でヘテロ接合体で, 36例 (94.7%) が解析可能であった。AA 患者では解析できた18例中15例 (83.3%) が多クローン性パターン, 3例 (16.7%) が単クローン性パターンを示した。また MDS 患者11例中4例 (36.4%) が多クローン性パターンを, 7例 (63.6%) が単クローン性パターンを示した。前者の4例は French-American-British 分類で不応性貧血 (refractory anemia, RA) と診断されていたが, いずれも形態異常が軽微で, 染色体異常を伴っていなかった。AA/PNH 症候群, AML, PV, CML の患者はいずれも単クローン性パターンを示した。同種骨髄移植 (bone marrow transplantation, BMT) 後にドナー由来の造血の回復が遅延した CML 急性転化例でも, 造血は単クローン性であった。したがって単クローン性造血に至るような少数の造血幹細胞では, BMT 後の造血再構築が不完全な可能性がある。さらに AA に対する免疫抑制療法が PNH, MDS などの単クローン性疾患を発症する危険性を高めるか否かを明らかにするため, クロナリティの解析に加えて男性患者12例を含む, シクロスポリン (cyclosporine, CyA) 療法を受けた25例の AA 患者の末梢血多核白血球 (peripheral blood polymorphonuclear leukocytes, PBPMN) について, グリコシルフォスファチジルイノシトール (glycosyl-phosphatidylinositol, GPI) アンカー膜蛋白 (CD16, CD55 および CD59) の発現をフローサイトメトリー法により解析した。CyA 療法後の女性患者の造血は, CyA が無効であった2例を除いて, すべて多クローン性であり, GPI アンカー膜蛋白は CyA 反応群の男性患者1例を除くすべての患者で正常に発現していた。この1例では, GPI アンカー膜蛋白陰性の PBPMN が CyA 投与前より少数検出されていたが, その割合は CyA 投与後の4年間変化しなかった。これらの所見から, CyA 療法を行なった AA 患者, 特に CyA 反応群では単クローン性疾患を発症する危険性は少ないと考えられた。以上のように造血クロナリティの決定は, 造血患者障害の病態を把握し, 適切な治療方針を決定する上で重要と考えられた。

Key words clonality, M27 β , phosphoglycerate kinase, hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glycosyl phosphatidylinositol-anchored protein

ある細胞集団が単クローン性か多クローン性かを判定すること (クロナリティの決定) は, その細胞に染色体異常や DNA レベルでのマーカー (病遺伝子の変異, 免疫グロブリンや T 細胞受容体の再構成など) がない限り不可能とされてきた¹⁾。1987年, Vogelstein ら²⁾により, X染色体上の遺伝子の DNA 制限酵素断片長多型 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) と, この遺伝子の不活化現象を利用したクロナリティ

の検索方法が確立された。この結果, 女性患者についてのみではあるが, 特定のマーカーのない細胞についてもクロナリティの決定が可能となった。この方法は血液疾患患者の造血クロナリティの決定に有用であることが示されてきた³⁾⁻⁵⁾。造血状態が単クローン性か多クローン性かの鑑別は, 造血障害 (造血不全による血球減少) 患者の治療方針の決定や予後の推定の際に特に重要であることが予想される。これまでの疾患概念によれ

平成5年12月14日受付, 平成6年1月13日受理

Abbreviations: AA, aplastic anemia; ALG, antilymphocyte globulin; AML, acute myelogenous leukemia; ATG, antithymocyte globulin; BMMNC, bone marrow mononuclear cell; BMT, bone marrow transplantation; CML, chronic myelogenous leukemia; CyA, cyclosporine A; EDTA; ethylenediaminetetraacetic acid; FCM, flow cytometry; FITC, fluorescein isothiocyanate; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; G6PD,

ば、前者の代表的疾患として骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndrome, MDS) あるいは発作性夜間血色素尿症 (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PHN), 後者の代表として再生不良性貧血 (aplastic anemia, AA) があげられる。しかしこれらの疾患の区別は必ずしも明確ではなく、単クローン性と考えられる MDS や PHN について実際に DNA レベルで証明した報告は少ない。特に MDS の場合、骨髄細胞に染色体異常が認められれば診断は確実であるが、染色体異常がない場合は細胞形態の異常に拠らざるをえない。とくに MDS の中でも芽球の少ない不応性貧血 (refractory anemia, RA) は AA との鑑別が困難なことが多く、多クローン性疾患でありながら誤って RA と診断されている可能性がある。

同種骨髄移植 (bone marrow transplantation, BMT) 後にドナー由来の血液細胞が生着しながら、AA や MDS と同様の造

血不全 (生着不全) が持続することがある。この原因の一つに、移植された造血幹細胞数の不足が考えられるが、これを直接証明する事はこれまで困難であった。実際ヒト骨髄移植にどのくらいの造血幹細胞が必要かについてはほとんど明らかにされていない。Turnan ら⁶⁾は BMT 患者 2 例に、ドナー由来の単クローン性造血を証明しえたことから、ヒトにおいても正常な造血幹細胞が 1 個あれば造血の再構築が可能であることを示した。しかしさらに多くの BMT 後の患者を解析した報告⁷⁾は、単クローン性造血は全く認められなかったとしている。したがってヒト BMT 後の生着不全例が単クローン性造血を呈した場合、移植造血幹細胞数の不足が生着不全の原因である可能性がある。

一方、造血障害患者での単クローン性造血の検出は、MDS や PHN などの単クローン性疾患の早期診断に役立つ可能性がある。

Table 1. Characteristics of female patients examined and results of their clonal analysis

UPN	Age (year)	Diagnosis	Sample	Hematologic data at sampling				Clonality			Summary
				WBC ($\times 10^9/\mu\text{L}$)	Hb (g/dL)	PLT ($\times 10^9/\mu\text{L}$)	Karyotype*	M27 β	PGK (Probes)	HPRT	
1	22	MAA	PBL	2.2	6.4	21	46XX	POLY	NT	POLY	POLY
2	54	MAA	PBPMN	2.1	10.4	36	46XX	POLY	NT	NT	POLY
3	60	MAA	PBPMN	3.1	10.4	76	46XX	HOMO	POLY	NT	POLY
4	23	MAA	PBPMN	3.1	8.1	44	46XX	POLY	POLY	NT	POLY
5	22	MAA	PBPMN	2.9	11.0	100	46XX	NA	POLY	NT	POLY
6	54	SAA	PBPMN	4.2	8.1	34	46XX	HOMO	POLY	HOMO	POLY
7	40	MAA	PBPMN	4.4	11.9	84	46XX	NA	HOMO	POLY	POLY
8	56	MAA	PBPMN	3.6	10.1	62	46XX	POLY	HOMO	HOMO	POLY
9	50	SAA	PBPMN	4.7	10.9	47	46XX	NA	POLY	POLY	POLY
10	39	MAA	PBPMN	4.0	13.1	71	46XX	HOMO	POLY	NT	POLY
11	60	SAA	PBPMN	3.0	6.8	24	46XX	NT	POLY	POLY	POLY
12	29	SAA	PBPMN	2.5	12.6	53	46XX	HOMO	HOMO	POLY	POLY
13	52	SAA	PBPMN	2.2	7.2	10	46XX	POLY	POLY	HOMO	POLY
14	56	SAA	PBPMN	2.3	9.7	4	46XX	NA	HOMO	POLY	POLY
15	35	MAA	PBPMN	3.1	6.3	29	46XX	NA	NT	POLY	POLY
16	43	SAA	PBPMN	1.7	3.0	3	46XX	NT	MONO	NT	MONO
17	23	SAA	PBPMN	2.2	5.9	10	46XX	HOMO	MONO	NT	MONO
18	70	SAA	PBPMN	1.2	6.2	2	46XX	NA	MONO	HOMO	MONO
19	15	SAA	PBL	2.1	5.1	17	46XX	HOMO	HOMO	HOMO	ND
20	36	AA/PNH	PBPMN	3.4	9.4	76	46XX	HOMO	MONO	HOMO	MONO
21	70	AA/PNH	PBPMN	2.3	7.6	53	46XX	MONO	NT	HOMO	MONO
22	65	AA/PNH	PBPMN	2.4	6.5	31	46XX	NA	HOMO	HOMO	ND
23	50	RA	PBPMN	2.0	6.6	17	46XX	POLY	NT	NT	POLY
24	14	RA	PBPMN	3.0	5.9	11	46XX	POLY	NT	NT	POLY
25	40	RA	PBPMN	1.7	8.3	11	46XX	NA	POLY	NT	POLY
26	21	RA	PBPMN	3.2	10.4	47	46XX	POLY	NT	NT	POLY
27	24	RA	BMMNC	2.9	8.1	17	46XX	MONO	HOMO	NT	MONO
28	70	RA	PBL	2.0	7.2	111	46XX/47XX,+8	HOMO	MONO	MONO	MONO
29	52	RA	PBL	2.2	8.8	87	46XX,-20,+mar	MONO	NT	NT	MONO
30	9	RARS	PBPMN	2.3	9.4	76	46XX	MONO	NT	NT	MONO
31	50	RAEB	PBPMN	3.9	9.1	173	NT	MONO	HOMO	NT	MONO
32	56	RAEB	PBPMN	2.9	9.8	50	46XX	MONO	NT	NT	MONO
33	78	RAEB-t	PBPMN	4.9	6.9	12	46XX,1q-,22q-	MONO	NT	NT	MONO
34	47	AML	BMMNC	2.4	10.9	129	46XX	MONO	HOMO	MONO	MONO
35	56	AML	BMMNC	3.0	6.7	30	46XX	NT	MONO	NT	MONO
36	60	AML	BMMNC	5.0	7.4	23	46XX	NT	MONO	NT	MONO
37	62	PV	PBPMN	11.5	8.4	23	46XX,20q-	MONO	HOMO	NT	MONO
38	31	CML/BC	PBPMN	6.8	8.4	66	61XX**	MONO	HOMO	NT	MONO

UPN, unique patient number; MAA, moderate aplastic anemia; SAA, severe aplastic anemia; AA/PNH, aplastic anemia/paroxysmal nocturnal hemoglobinuria syndrome; RA, refractory anemia; RARS, RA with ringed sideroblasts; RAEB, RA with excess of blasts; RAEB-t, RAEB in transformation; AML, acute myelogenous leukemia; PV, polycythemia vera; CML, chronic myelogenous leukemia; BC, blastic crisis; PBL, peripheral blood leukocytes; PBPMN, peripheral blood polymorphonuclear leukocytes; BMMNC, bone marrow mononuclear cells; WBC, white blood cell count; Hb, hemoglobin value; PLT, platelet count; POLY, polyclonal; MONO, monoclonal; NA, not assessed because of 3 band pattern or no digestion by HpaII; NT, not tested; ND, not determined; Karyotype*, karyotypic analysis of bone marrow cells; 61XX**, 61XX, +4, +6, +8, +8, +10, +10, +12, +13, +15, +19, +19, +20, +21, t(9; 22) (q34; q11), +22q-, +22q-

glucose 6-phosphate dehydrogenase; GPI, glycosyl-phosphatidylinositol; HPRT, hypoxanthine phosphoribosyltransferase; mAb, monoclonal antibody; MDS, myelodysplastic syndrome; PBMNC, peripheral blood mononuclear cells; PBPMN, peripheral blood polymorphonuclear leukocytes; PBS, phosphate-buffered saline; PCR, polymerase chain reaction; PE, phycoerythrin; PGK, phosphoglycerate kinase; PHN, paroxysmal

ある。この単クローン性造血の検出の臨床的意義が最も高い疾患は、免疫抑制療法を受けたAAである。抗胸腺細胞グロブリン (antithymocyte globulin, ATG), 抗リンパ球グロブリン (antilymphocyte globulin, ALG) などの免疫抑制療法の進歩により, AA 患者の大部分で長期生存が得られるようになった⁹¹⁰。しかし, これらの免疫抑制療法を受けた長期生存者にPNH や MDS などの単クローン性疾患が高率に発症することが最近明らかになった¹⁰¹²。一方, T細胞に対する選択的な免疫抑制剤であるシクロスポリン (cyclosporine A, CyA) で治療されたAA患者が単クローン性の造血障害を発症する危険性が

た⁹¹⁰。しかし, これらの免疫抑制療法を受けた長期生存者にPNH や MDS などの単クローン性疾患が高率に発症することが最近明らかになった¹⁰¹²。一方, T細胞に対する選択的な免疫抑制剤であるシクロスポリン (cyclosporine A, CyA) で治療されたAA患者が単クローン性の造血障害を発症する危険性が

Table 2. Characteristics of CyA-treated patients and results of their clonal analysis

UPN	Age (year)	Sex	Disease severity before CyA therapy	Time from CyA therapy (Month)	Therapy at sampling	Hematologic data at sampling				Clonality (probes)
						Hb (g/dL)	Reticulocytes ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Platelets ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	
Responder*										
5	22	F	MAA	84	None	11.0	35	2.9	102	POLY(P)
6	54	F	SAA	22	CyA, PSL, Danazol	8.1	65	4.2	34	POLY(P)
7	40	F	MAA	16	Danazol	11.9	54	4.4	84	POLY(H)
8	56	F	MAA	15	CyA, PSL	10.1	46	3.6	62	POLY(M27 β)
9	50	F	SAA	9	CyA	10.9	57	4.7	47	POLY(H)
10	39	F	MAA	5	CyA, PSL	13.1	88	4.0	71	POLY(P)
11	60	F	SAA	1	CyA	6.8	64	3.0	24	POLY(P,H)
39	52	M	SAA	132	CyA	8.3	70	3.8	14	
40	28	M	SAA	41	CyA	10.7	76	3.5	102	
41	16	M	SAA	35	CyA	14.6	68	3.5	63	
42	27	M	MAA	21	Meptiostane	7.3	51	4.5	40	
43	22	M	MAA	16	None	15.8	77	2.2	56	
44	60	M	SAA	14	CyA	11.5	77	5.0	112	
45	64	M	MAA	6	CyA, PSL	10.1	71	4.8	67	
46	27	M	MAA	2	CyA	6.6	52	3.2	9	
Non-responder**										
12	29	F	SAA	80	None	12.6	80	2.5	53	POLY(H)
17	23	F	SAA	80	Danazol	5.9	24	2.2	10	MONO(P)
13	52	F	SAA	60	None	7.2	28	2.2	3	POLY(M27 β , P)
14	56	F	SAA	48	Danazol	9.7	75	2.3	4	POLY(H)
15	35	F	MAA	42	None	6.3	60	3.1	29	POLY(M27 β , H)
18	70	F	SAA	3	CyA, Danazol	6.2	7	1.2	2	MONO(P)
47	68	M	MAA	18	PSL, Meptiostane	9.5	75	2.6	39	
48	71	M	SAA	17	Meptiostane	5.9	30	2.3	15	
49	25	M	MAA	10	PSL	6.3	24	1.9	8	
50	15	M	SAA	7	None	10.8	88	2.4	17	

F, female; M, male; CyA, cyclosporine A; PSL, prednisolone; P, PGK; H, HPRT; Responder*, patients who don't require any transfusion and have got rises in their hemoglobin levels of 2g/dL or more by CyA therapy; Non-responder**, patients who are refractory to CyA therapy and don't meet the criteria of Responder.

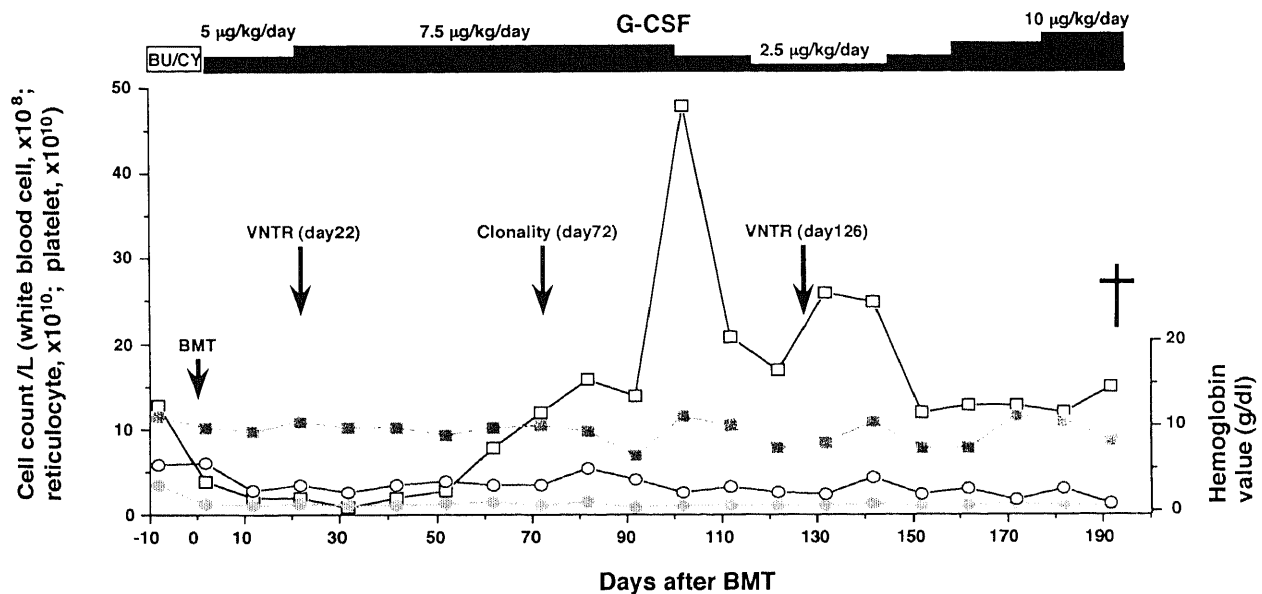


Fig. 1. Clinical course of a marrow-transplanted patient. The dates when bone marrow transplantation (BMT) was undergone and origin of peripheral blood leukocytes by amplifying a variable number of tandem repeat (VNTR) locus and clonality of them were analyzed are shown as arrows. □, white blood cell; ●, reticulocyte; ○, platelet; ×, hemoglobin; BU, busulfan; CY, cyclophosphamide; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; +, The patient ceased on day 193.

nocturnal hemoglobinuria; PV, polycythemia vera; RA, refractory anemia; RAEB, refractory anemia with excess of blasts; RFLP, restriction fragment length polymorphism; SDS, sodium dodecyl sulfate; SSC, saline sodium citrate; TE, tris-ethylenediaminetetraacetic acid; UPN, unique patient number; VNTR, variable number of tandem repeat; vWF, von Willebrand factor

あるか否かは不明である。

以上の問題点を明らかにするために、1) 単クローン性、非単クローン性および境界領域と考えられる血液疾患患者、2) BMT 後の造血回復が著しく遅延した造血不全例、3) CyA 療法を受けた AA 患者、について造血クロナリティを決定した。3) については前 PNH 状態の検出感度を高めるために、フローサイトメトリー (flow cytometry, FCM) 法を用いてグリコシルフォスファチジルイノシトール (glucosyl-phosphatidylinositol, GPI) アンカー膜蛋白欠損細胞 (PNH クローン) の検索も同時に行った^{13)~15)}。

対象および方法

1. 対 象

金沢大学医学部附属病院および関連施設における各種女性血液疾患患者38例、および BMT 後に生着不全を認めた女性患者1例を対象とした。女性血液疾患患者の特徴を表1に示す。うちわけは、AA 19例 (CyA による治療後の13例を含む)、AA/PNH 症候群3例、MDS 11例 [RA 7例、鉄芽球性貧血 (RA with ringed sideroblasts) 1例、芽球過多の不応性貧血 (RA with excess of blasts, RAEB) 2例、形質転換した不応性貧血 (RAEB in transformation) 1例]、治療前の急性骨髄性白血病 (acute myelogenous leukemia, AML) 3例、真性多血症 (polycythemia vera, PV) 1例、急性転化時の慢性骨髄性白血病 (chronic myelogenous leukemia, CML) 1例であった。AA 患者では、発症時より血液・骨髄像の鏡検および骨髄細胞での染色体を定期的に検査したが、MDS あるいは AML に一致する形態異常や染色体異常を呈したものはなく、PNH で陽性となる酸性溶血試験 (acid hemolysis test, Ham test) やシロ糖溶血試験 (sucrose hemolysis test) も陰性であった。AA の経過中に PNH に合致する検査所見を呈したものを AA/PNH 症候群とした。AML の3例はいずれも解析時、骨髄有核細胞の80%以上が白血病細胞で占められていた。

GPI アンカー膜蛋白の発現を検討した CyA 療法後の AA 患者25例 (女性13例、男性12例) の特徴を表2に示す。Camitta¹⁶⁾の基準によると、AA 発症時14例が重症、11例が中等症 AA であった。CyA (サンド薬品、東京) は5-6mg/kg/日を少なくとも1ヶ月以上経口投与し、輸血が不用となるとともに治療前よりヘモグロビン値が2g/dl 以上上昇した例を反応群、それ以外を非反応群とした。

II. BMT 後造血不全例

患者は30才女性で、フィラデルフィア染色体陽性の CML 急性転化期に、ヒト白血球型抗原 (human leukocyte antigen) 一致、混合リンパ球反応陰性の非血縁者女性ドナーより BMT を行った。BMT 後の経過を図1に示す。前処置としてブスルファン (日本リダリー、東京) 16mg/kg、サイクロフォスファミド (塩野義製薬、大阪) 120mg/kg を使用した。ドナーとの間に血液型の ABO major の不適合があったため、比重遠心法により骨髄細胞から赤血球を除いた後、 2.8×10^8 個 (患者体重当たり 5.5×10^7 個) の骨髄単核球 (bone marrow mononuclear cells, BMMNC) を輸注した。BMT 後1日目より顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF) (キリンビール、東京) $5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ を投与した。BMT 後早期には特に合併症を認めなかったが、4週間を経過した時点でも白血球の回復は全く見られず、骨髄でも幼若な造血細胞は皆無で

あった。移植片拒絶が疑われたが66日目によりやく好中球数が $500/\mu\text{l}$ を越えた。白血球数は110日目に一時的に $4000/\mu\text{l}$ を越えたが、その後再び汎血球減少と骨髄低形成が続ぎ、全身のアスペルギルス症により193日目に死亡した。剖検所見時の骨髄は著明な低形成を示していた。

III. 細胞分離

患者及び正常人よりヘパリン加末梢血を採取し、6%ヒドロキシエチルデンプン (ミドリ十字、大阪) を4分の1量加え、30分静置することにより末梢血白血球を分離した (デキストラン沈降法)。さらにこの白血球層をリンホブレップ (Nycomed Pharma AS, Oslo, Norway) に重層後 2000rpm で12分間遠心し、末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) と末梢血多核白血球 (peripheral blood polymorphonuclear leukocytes, PBPMN) とに分離した。顕微鏡下の観察で

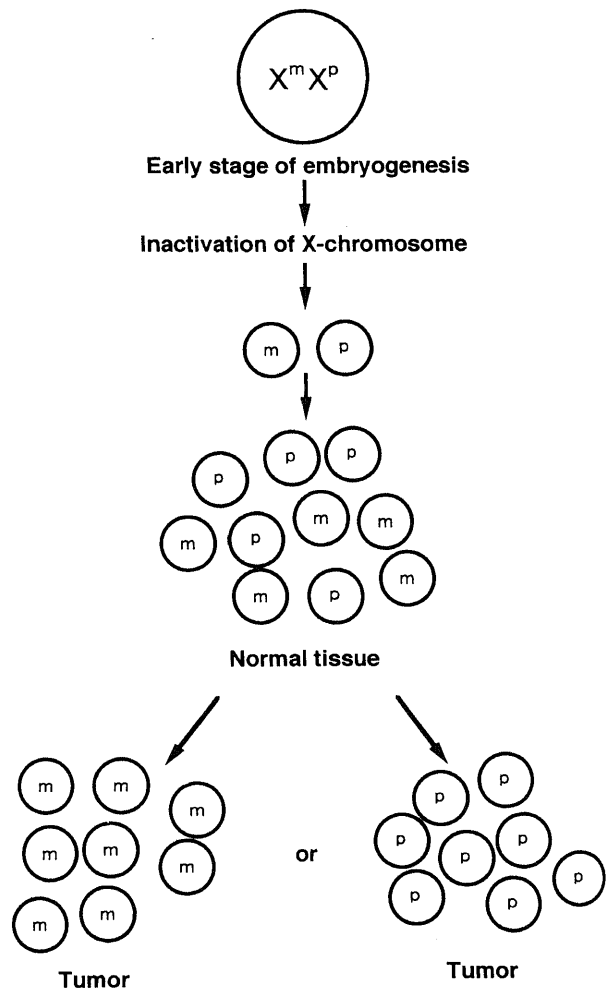


Fig. 2. A schema for the principle of analysis for clonality. A female cell has two X-chromosomes. One is derived from her mother (X^m) and the other from her father (X^p). Inactivation of one of them occurs randomly in each somatic cell in early stage of embryogenesis and is passed onto the progeny of the cell in a stable fashion. Therefore, a female has two kinds of cells after her birth, in one of which maternal X-chromosomes are activated (\textcircled{m}) and in the other of which paternal X-chromosomes are activated (\textcircled{p}). A normal tissue consists of these two kinds of cells. In contrast, tumor tissue consists of only one kind of cells.

は PBPMN の純度は常に90%以上であった。一部の患者については骨髓穿刺により骨髓液を採取後、末梢血と同様、リンホブレップによる比重遠心法を用いて BMMNC を分離した。PBPMN を用いたクロナリティの解析において、X 染色体の不活性化に偏り (単クローン性パターン) が認められた例については、PBPMN から 2-アミノエチルイソチオウロニウムブロマイド (2-aminoethyl isothiuronium bromide) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) 処理のヒツジ赤血球とのロゼット形成法¹⁷⁾にて分離した T 細胞のクロナリティを解析し、PBPMN の結果と比較した。さらに一部の患者については生理食塩水 500ml で強くうがいすることにより頬粘膜細胞を採取し、クロナリティを解析した。

IV. 高分子DNA の抽出

分離した細胞を Tris-エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) (Tris-EDTA, TE) 緩衝液 (10mM Tris-HCl pH8.3, 1mM EDTA) に浮遊させ、等量の 2 倍濃度の溶解緩衝液 (1% ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, SDS), 0.6M NaCl, 20mM EDTA, 20mM Tris-HCl, pH7.4) を加えて細胞を溶解させた。プロテイナーゼ K (ベリンガ・マンハイム山之内, 東京) を 10 μ g/ml となるように加え、37 $^{\circ}$ C で 6 時間でインキュベーションを行った後、等量のフェノールを加え攪拌後、3000rpm で 10 分間遠心し水層部分を抽出した。同様の抽出をフェノール・クロロホルム, クロロホ

ルムの順で繰り返し行った。次に 10 分の 1 量の 3M 酢酸ナトリウムと 2.5 倍量の 100% 冷エタノールを加えた後、-20 $^{\circ}$ C で 1 時間以上放置し、DNA を析出させた。4000rpm で 15 分間遠心後、沈殿した DNA を回収し 70% 冷エタノールで洗浄し TE 緩衝液に溶解した。吸光度計を用いて DNA 回収量を測定した。

V. クロナリティの解析

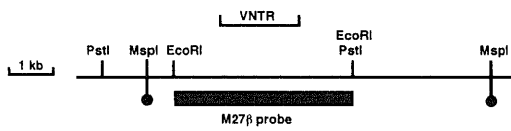
1. 原理

女性の 2 本の X 染色体のうち一方は母親由来で他方は父親由来である。胎生期の初期にこれらのうちの一方がランダムに不活化を受けるが、この不活化はほぼ均等におこり発生から成熟に至るまで維持される¹⁸⁾¹⁹⁾。つまり図 2 に示すように、正常組織では母親由来の X 染色体遺伝子を発現している細胞 (⊗) と父親由来の X 染色体遺伝子を発現している細胞 (⊙) がほぼ均等に存在する (多クローン性)。一方、腫瘍組織など、1 個の幹細胞に由来する細胞集団では、⊗, ⊙ どちらか 1 種類の細胞しか存在しないことになる (単クローン性)。

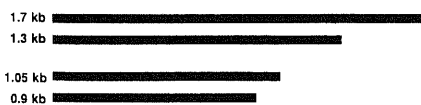
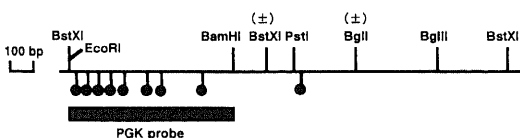
2. DXS255 領域遺伝子 (M27 β) による解析

図 3A に示すように DXS255 領域には高多型性反復配列構造 (variable number of tandem repeat, VNTR) 部位が存在することにより、RFLP が生じる。また図 4A に示すように DXS255 領域では 2 本の X 染色体の両対立遺伝子 (アレル) の片方がランダムにメチル化 (図中の m) を受け活性化し (Xa),

A DXS255 locus



B PGK gene



C HPRT gene

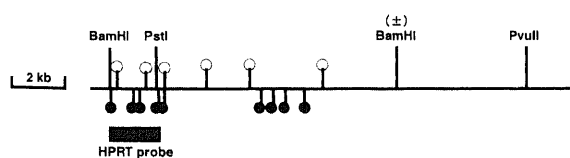
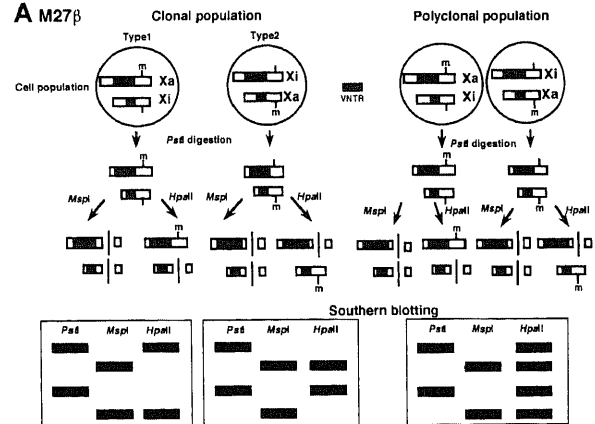


Fig. 3. Restriction maps of the three X-linked genes of DXS255 locus (A), phosphoglycerate kinase (PGK) (B), and hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) (C). Shaded bars show probes. VNTR shows the variable number of tandem repeat locus at DXS255 locus. (±) shows restriction fragment length polymorphism (RFLP). ●, HpaII sites; ○, HhaI sites.

A M27 β



B PGK/HPRT

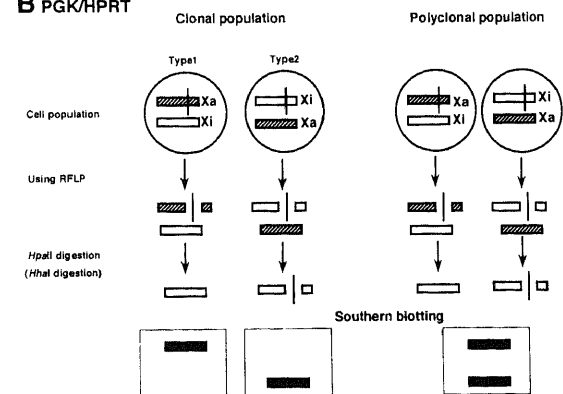


Fig. 4. Schematic outline of the Southern blot analysis for clonality. (A) A schema using a M27 β probe. Shaded bars show the VNTR loci. m, methylated allele; Xa, activated allele; Xi, inactivated allele. (B) A schema using a PGK or a HPRT probe. Hatched bars show activated (unmethylated) alleles. Xa, activated allele; Xi, inactivated allele; RFLP, restriction fragment length polymorphism.

もう片方のアレルはメチル化を受けず不活化しており (XI), VNTR 部分 (影の部分) の長さが両アレルで異なる場合 (ヘテロ接合体), 多クローン性の細胞集団では, タイプ 1, タイプ 2 の 2 種類の細胞から構成されるが, 単クローン性の細胞集団ではどちらか一方の細胞のみから構成されることになる。ヘテロ接合体では, この領域の DNA を *Pst*I で消化すると長さの異なる 2 本の DNA 断片が生じ, 次に *Msp*I で消化するとそれぞれの DNA 断片はさらに小さくなる。メチル感受性制限酵素 *Hpa*II は *Msp*I と同様に, 塩基配列 CCGG を認識して消化する酵素であるが, シトシン (C) がメチル化されていると消化できないという性質を持っている。よって *Msp*I の代わりに, *Hpa*II で消化した場合にはメチル化を受けている側の DNA 断片は消化されず *Msp*I で消化した場合と違った長さの DNA 断片が生じる。したがって単クローン性の細胞集団では, *Hpa*II 消化後はサザンブロットングにより 2 本のバンドが現われるが, 多クローン性の細胞集団場合では, 4 本のバンドが現われることになる (図 4A, 図 5A)。

3. ホスホグリセレート・キナーゼ (phosphoglycerate kinase, PGK) 遺伝子による解析

PGK は X 染色体上に局在し, 図 3B に示すように *Bst*XI, *Bgl*I 消化部位に関し RFLP が存在する。2 本のアレルのうち片方にみに, この消化部位が存在する場合 (ヘテロ接合体), この RFLP を利用し, 適当な制限酵素で消化すれば, 1.05kb (1.7kb) と 0.9kb (1.3kb) の 2 種類の DNA 断片が得られる。図 4B に示すように, さらに *Hpa*II で消化すると, 斜線で示したメチル化を受けていない (活性化している) 側のアレルは細かく消化されるが, メチル化を受けている (不活化している) 側の

アレルはそのまま残る。多クローン性の細胞集団では 2 種類の細胞が存在するため *Hpa*II 消化後は 1.05kb (1.7kb) と 0.9kb (1.3kb) の 2 種類の長さの DNA 断片が得られるが, 単クローン性の細胞集団ではどちらか 1 種類の細胞に由来しているため *Hpa*II 消化後は 1.05kb (1.7kb) あるいは 0.9kb (1.3kb) のいずれかの断片しか残らない (図 4B, 図 5B)。

4. ヒポキサンチン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ (hypoxanthine phosphoribosyltransferase, HPRT) 遺伝子による解析

HPRT は X 染色体上に局在し, 図 3C に示すように *Bam*HI の消化部位に関し RFLP が存在する。2 本のアレルのうち片方だけにこの消化部位が存在する場合 (ヘテロ接合体), この RFLP を利用し, 適当な制限酵素で消化すれば, 18kb と 12kb の 2 種類の DNA 断片が得られる。図 4B に示すように, さらにメチル感受性制限酵素 *Hpa*II あるいは *Hha*I で消化すると, PGK の場合と同様に, 多クローン性の細胞集団では 2 種類の細胞が存在するため 18kb と 12kb の 2 種類の長さの DNA 断片が得られるが, 単クローン性の細胞集団では, どちらか 1 種類の細胞に由来するため 18kb あるいは 12kb のいずれかの断片しか得られない (図 4B, 図 5C)。

5. サザンブロットハイブリダイゼーション

DXS255 領域 (M27 β) による解析では, 45 μ g の DNA を制限酵素 *Pst*I (東洋紡, 大阪) で消化した後 3 等分し, 一つは以後処理せず, 一つはさらに *Msp*I (東洋紡) で消化し, 残りの一つは *Hpa*II (東洋紡) で消化した。各検体は 0.7% のアガロースゲルを用いて 36-48 時間電気泳動した。PGK 遺伝子による解析では *Bst*XI の RFLP を利用した場合, 30 μ g の DNA をまず *Pst*I, *Bst*XI (東洋紡) で消化し, *Bgl*I の RFLP を利用した場合, 同量の DNA をまず *Eco*RI (東洋紡), *Bgl*I (東洋紡), *Bgl*III (東洋紡) で消化した。それぞれ, 次に検体を 2 等分し, 一方は以後処理せず他方はさらに *Hpa*II (東洋紡) で消化した。各検体は 1.5% のアガロースゲルを用いて 6 時間電気泳動した。HPRT による解析では 30 μ g の DNA をまず *Bam*HI (東洋紡), *Pvu*II (東洋紡) で消化した。次に検体を 2 等分し, 一つは以後処理せず, 他方はさらに *Hpa*II あるいは *Hha*I (東洋紡) で消化した。各検体は 0.9% アガロースゲルにて 12 時間電気泳動した。電気泳動での分子量マーカーには λ DNA-*Hind*III 消化物 (宝酒造, 東京) と ϕ x174DNA-*Hae*III 消化物 (宝酒造) を用いた。電気泳動後のゲルを 0.25M HCl, ついでアルカリ液 (0.4N NaOH, 0.6M NaCl), 中和液 (0.5M Tris-HCl pH7.5, 1.5M NaCl) でそれぞれ 15 分ずつ 2 回処理した後, Southern の方法²⁰⁾に従ってゲル中の DNA をナイロンメンブレンフィルター (Hybond-N+, Amersham, Aylesbury, U.K.) に転写した。DNA を吸着させたナイロンメンブレンフィルターは 80 $^{\circ}$ C で 1 時間ベーキングを行った後, ツールドパックに入れ, ハイブリダイゼーション液 (0.6M NaCl, 60mM Tris-HCl pH7.6, 5 倍濃度のデンハート溶液 (0.1% ウン胎児血清, 0.1% ポリビニルピロリドン, 0.1% フィコール), 2mM EDTA, 0.5% SDS, 100 μ g/ml 変性ニシン精子 DNA) を加えて 65 $^{\circ}$ C で 1 時間以上プレハイブリダイゼーションを行った。パック内の液を廃棄後, 新しいハイブリダイゼーション液と標識プローブ (2.5ng/ml) を加え, 65 $^{\circ}$ C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。フィルターは 2 倍濃度の標準食塩クエン酸緩衝液 (standard saline sodium citrate buffer, SSC) (SSC=0.15M NaCl, 0.015M クエン酸ナト

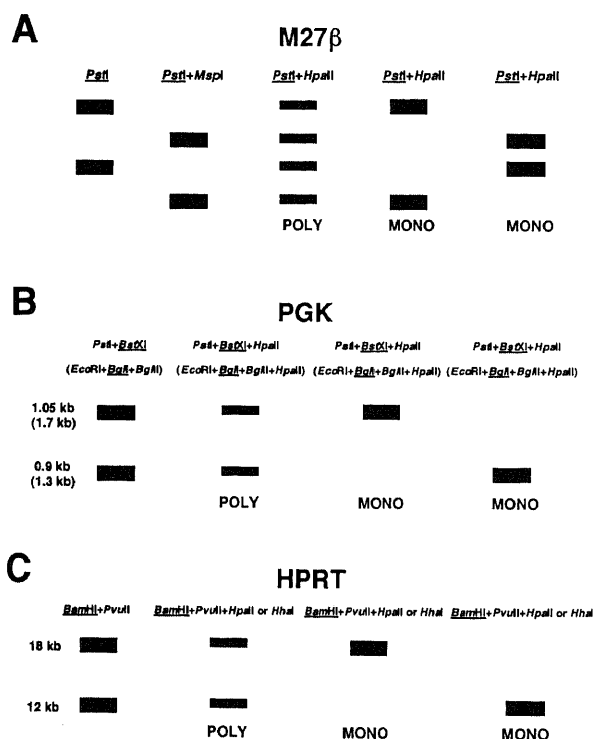


Fig. 5. A schema of band patterns for Southern blot analysis by using a M27 β probe (A), a PGK probe (B), and a HPRT probe (C). The underlines show the enzymes which are used for RFLP. POLY, polyclonal pattern; MONO, monoclonal pattern.

リウム), 1% SDS を用いて65°Cで15分洗浄した後, 0.1倍濃度の SSC, 1% SDS を用いてさらに15分洗浄した. 洗浄後のフィルターを-80°Cで2日から5日間感光させ, オートラジオグラフィを行った.

6. プローブ

M27 β プロローブは, Fraser 博士 (University of Oxford, UK) より供与されたプラスミド pUC9.19 を, *Escherichiae coli* HB101 コンピテントセル (宝酒造) を用いて増幅させ, 精製後 *EcoRI* で消化し, 2.3Kb のフラグメントとして用いた²¹⁾. PGK プロローブは, Singer-Sam 博士 (Geckman Research Institute of the City of Hope, USA) より供与されたプラスミド pSPT 19.1 を上記と同様に増幅させ, 精製後 *BamHI* と *EcoRI* で消化し, 0.8Kb のフラグメントとして用いた²²⁾. HPRT プロローブは, Sang-Hee Kim 博士 (University of California at San Diego, USA) より供与されたプラスミド pPB1.7.21 を上記と同様に増幅させ, 精製後 *PstI* と *BamHI* で消化し 1.7Kb のフラグメントとして用いた²³⁾.

VI. GPI-アンカー膜蛋白発現の解析

CyA 投与後の AA 患者, 正常人23例, および PNH 患者1例 (登録患者番号 (unique patient number, UPN) 21) より末梢血を採取した. CD16 あるいは CD55 の解析は, 末梢血 100 μ l をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) (136.9mM NaCl, 2.7mM KCl, 8.1mM リン酸-水素二ナトリウム, 1.5mM リン酸二水素カリウム, pH7.2) にて洗浄し上清を除去した後, 抗 CD16 モノクローナル抗体 (monoclonal antibody, mAb) (蛍光イソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識抗 Leu-11a mAb (Becton Dickinson, California, USA)) あるいは抗 CD55mAb (FITC 標識抗崩壊促進因子 (decay accelerating factor) mAb (和光純薬, 大阪) を添加し, 4°C暗所で30分反応させた. 次に0.84%の塩化アンモニウム (和光純薬) で赤血球を溶血させた後, PBS で2回洗浄し PBS に浮遊させ解析した. CD59 の解析は, 分離した PBPMN 4 \times 10⁵個を 100 μ l の PBS に浮遊し, 抗 CD59mAb (IF5 (名古屋市立大学, 岡田博士より供与)) を添加後, 4°C暗所で30分反応させた. PBS で2回洗浄した後, FITC 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Coulter, Florida, U.S.A.) を添加し, 4°C暗所でさらに15分反応させ, PBS で2回洗浄後, PBS の浮遊し解析した. 陰性コントロールとして FITC 標識モノクローナルマウス IgG₁(Becton Dickinson) とフィコエリスリン (phycoerythrin, PE) 標識抗モノクローナルマウス IgG₂(Becton Dickinson) を, 陽性コントロールとして抗 CD11b mAb (PE 標識抗 Leu-15mAb (Becton Dickinson)) を使用した. 解析は FACScan (Becton Dickinson) の Consort30 プログラム上で行い, PBPMN における各 GPI アンカー蛋白陰性細胞の割合を計算した.

VI. BMT 後の生着の確認

骨髄ドナーおよび BMT 後の患者の PBMNC から抽出した DNA におけるフォン・ヴィレブランド因子 (von Willebrand factor, vWF) 遺伝子内の VNTR 部位を, Peake ら²⁰⁾の方法に準じてポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction, PCR) により増幅した. まず2組のオリゴヌクレオチドプライマー (プライマー 1, 5'-AGCTATATATCTATTTATCAT-3'; プライマー 2, 5'-AGATACATACATAGATATAGG-3') を DNA 合成器 (Applied Bio-Systems, Foster, USA) を用いて

作成した. 1 μ g の被験 DNA を10倍濃度の反応液 (500mmol/L KCl, 100mmol/L Tris-HCl pH8.3, 20mmol/L MgCl₂, 0.1%ゼラチン) 10 μ l, 4種類のデオキシ三リン酸 (デオキシアデノシン三リン酸, デオキシシチジン三リン酸, デオキシグアノシン三リン酸, デオキシチミジン三リン酸) (宝酒造) 各 200 μ mol/L, プライマー各 25pmol, 2単位の耐熱性 DNA ポリメラーゼ (宝酒造) と混合し, さらに純水 (和光純薬) を加え 100 μ l とした. 増幅反応は 0.5ml のチューブ (Treff AG, Bern, Switzerland) を用い, 蒸発を防ぐためにミネラルオイル (Sigma, ST. Louis, USA) を一滴重層し, DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA) を用いて行なった. DNA 変性 (denaturation) 94°C・1分, アニールング (annealing) 48°C・1分, プライマー伸張 (extension) 72°C・30秒を1サイクルとして35サイクル施行後の PCR 産物を, 6%のポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し, エチジウムブロマイド (1 μ g/ml) で染色した DNA を紫外線照射下で観察した.

成 績

I. 各種血液疾患患者におけるクロナリティの解析

M27 β , PGK, HPRT の各遺伝子を用いて38例の血液疾患患者

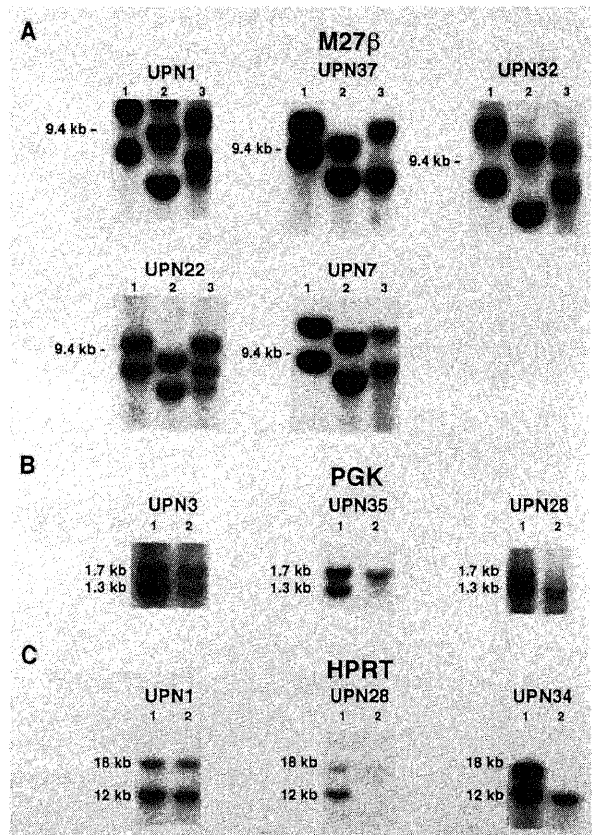


Fig. 6. Representative results of clonality analysis of the female patients with hematologic disorders. (A) M27 β analysis. Lane 1 shows *PstI* polymorphism, and lanes 2 and 3 show the results of subsequent *MspI* and *HpaII* digestion, respectively. (B) PGK analysis. Lane 1 shows *BglI* polymorphism and lane 2 the results of subsequent *HpaII* digestion. (C) HPRT analysis. Lane 1 shows *BamHI* polymorphism, and lane 2 the results of subsequent *HpaII* or *HhaI* digestion. UPN, unique patient number.

の造血クロナリティを検討した(表1)。38例中37例(97.4%)がいずれかの遺伝子でヘテロ接合体であり、36例(94.7%)が解析可能であった。各遺伝子別に見ると、M27 β の解析では、34例中26例(76.4%)が、PGKの解析では27例中16例(59.3%)が、HPRTの解析では16例中8例(50.0%)がヘテロ接合体であった。各遺伝子を利用した場合の代表的な結果を図6に示す。M27 β の解析ではUPN1は多クローン性パターン、UPN37、32は単クローン性パターンであった。またヘテロ接合体であっても、UPN22のようにHpaII消化により3バンドパターンを示す例や、UPN7のようにHpaIIで消化されない例が、M27 β でのヘテロ接合体26例中8例(30.8%)に認められ、実際にM27 β で解析可能であったのは34例中18例(54.2%)と少数であった。PGK遺伝子による解析では、UPN3は多クローン性パターン、UPN35、28は単クローン性パターンであり(図6B)、HPRT遺伝子による解析では、UPN1は多クローン性パターン、UPN28、34は単クローン性パターンであった(図6C)。疾患別にはAA(UPN1-19)で解析できた18例中15例(83.3%)が多クローン性パターンを示したが、3例(16.7%)は単クローン性

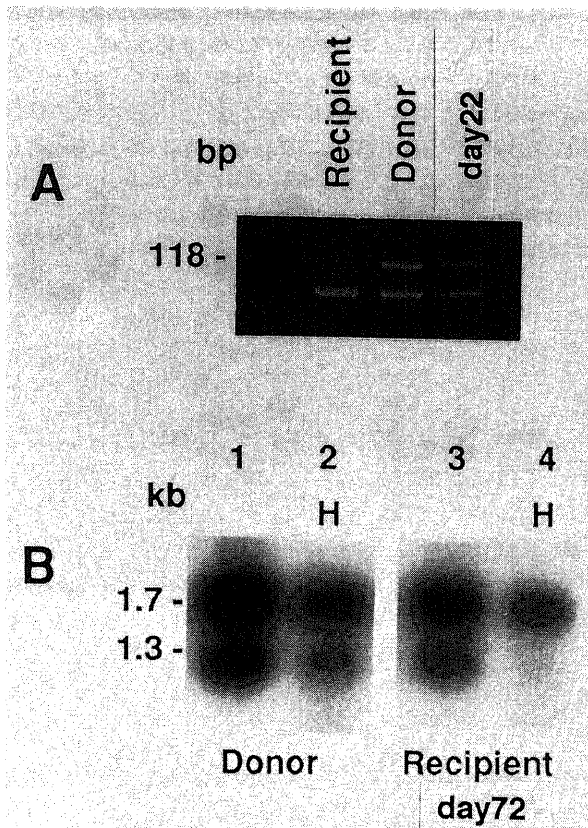


Fig. 7. Origin and clonality of peripheral blood leukocytes obtained after BMT. (A) Amplification of a VNTR locus at the von Willebrand factor gene using polymerase chain reaction. The pattern of alleles from the recipient's peripheral blood mononuclear cells on day 22 are identical to that of the donor, indicating engraftment of donor cells. (B) Southern blot analysis of DNA from peripheral blood polymorphonuclear leukocytes (PBPMN) using the PGK gene probe. Lane 1 and 3 show *Bgl*I polymorphism and lane 2 and 4 the results of subsequent *Hpa*II digestion (H). Disappearance of the smaller band (1.3 kb) after *Hpa*II digestion of DNA from the recipient's PBPMN on day 72 reveals clonal hematopoiesis.

パターンであった。AA/PNH症候群(UPN20-22)では解析できた2例ともに単クローン性パターンであった。MDS(UPN23-33)では11例中4例(36.4%)が多クローン性パターン、7例(63.6%)が単クローン性パターンを示した。MDSで多クローン性パターンを示した4例の診断はすべてRAであった。またAML・PV・CML(UPN34-38)の5例はいずれも単クローン性パターンを示した。

II. BMT後生着不全例における造血クロナリティの解析
移植片拒絶が疑われたため、BMT後22日目に採取した少数のPBMNCについてvWF遺伝子内のVNTR部位を解析した。その結果、BMT後のPBMNCのバンドパターンはドナー型であったことから、ドナー細胞の生着と判定した(図7A)。126日目の骨髓細胞のDNAで再び行ったVNTR検索でもド

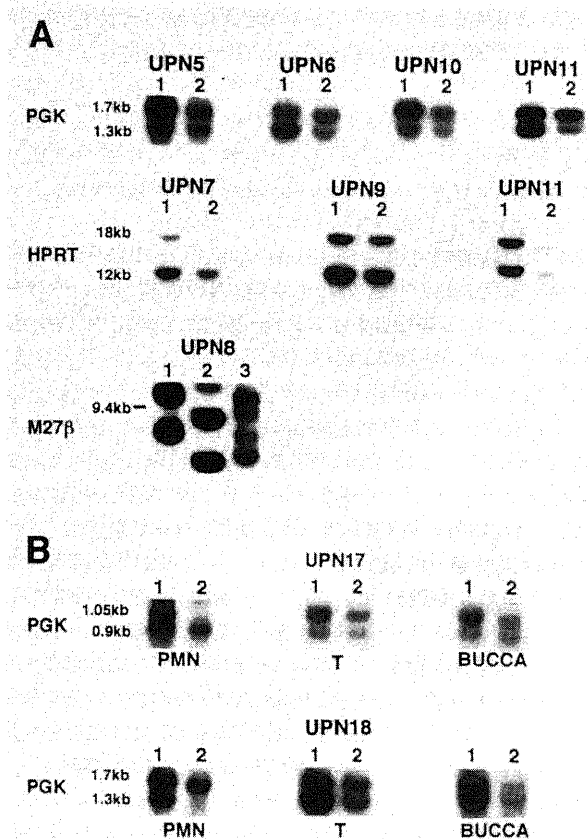


Fig. 8. Clonality analysis of CyA-treated AA patients. The probes used for clonal analysis are indicated in the left of corresponding blots. (A) Southern blots of 7 patients (UPN5 to UPN11) in remission showing a polyclonal pattern. In PGK analysis, lane 1 shows *Bgl*I polymorphism, and lane 2 the results of subsequent *Hpa*II digestion. In HPRT analysis, lane 1 shows *Bam*HI polymorphism, and lane 2 the results of subsequent *Hpa*II or *Hha*I digestion. In M27 β analysis, lane 1 shows *Pst*I polymorphism, and lanes 2 and 3 show the results of subsequent *Msp*I and *Hpa*II digestion, respectively. (B) Southern blots of 2 patients (UPN17 and UPN18) refractory to CyA therapy showing a monoclonal pattern in PBPMN (PMN), whereas T cells (T) and buccal mucosa cells (BUCCA) show a polyclonal pattern. In UPN 17, lane 1 shows *Bst*XI polymorphism, and lane 2 show the results of subsequent *Hpa*II digestion. In UPN 21, lane 1 shows *Bgl*I polymorphism, and lane 2 the results of subsequent *Hpa*II digestion.

ナー由来が確認された。造血状態の回復が遅延し不完全であったため、ドナー PBPMN と72日目の患者の PBPMN について PGK プローブを用いてクロナリティの解析を行った。図 7B に示すようにドナー DNA は多クローン性パターンであったが、患者の DNA では *HpaII* で消化後 1.3kb のバンドが消失しており、単クローン性パターンと判定された。

Ⅲ. CyA を投与したAA 患者における解析

1. クロナリティの解析

女性 AA 患者13例全員 (UPN5-15, 17, 18) が3つの遺伝子のうち少なくとも一つにおいてヘテロ接合体であったため、クロナリティの解析が可能であった。サザンブロッティングの結果、CyA に反応した7例 (UPN5-11) の患者はすべて多クローン性パターンを示した (図 8A)。CyA の反応しなかった6例のうち2例 (UPN17, 18) の PBPMN は単クローン性パターンを示した。この2例の T 細胞および頬粘膜細胞を同様の方法で検討したところ PBPMN とは対照的に、多クローン性パターンであった (図 8B)。

2. GPI-アンカー蛋白発現に関する検討

CyA を投与した AA 患者で検出された GPI アンカー蛋白陰性の PBPMN の割合を表3に、また代表的なヒストグラムを図9に示した。正常人コントロール23例において CD16, CD55, CD59 陰性 PBPMN の割合はそれぞれ $0.5 \pm 1.0\%$ (平均値±標準偏差), $0.2 \pm 0.4\%$, $0.5 \pm 0.8\%$ であった。同時に解析したPNH 患者 (UPN21) ではそれぞれ99%, 100%, 99%であった。これらの PNH 患者でも、陽性コントロールとして検索した GPI アンカー膜蛋白に属さない CD11b は正常に発現していた (図 9B)。AA 患者25例のうち24例の PBPMN は CD16, CD55,

Table 3. GPI-anchored membrane protein-deficient PBPMN in the CyA-treated patients and normals

UPN	Percentages of deficient PBPMN		
	CD16	CD55	CD59
Responder			
5	0	0	0
6	0	0	0
7	1	0	0
8	0	0	0
9	0	1	0
10	0	0	1
11	2	0	0
39	0	0	0
40	12	11	12
41	1	1	1
42	1	0	2
43	0	0	0
44	0	0	0
45	0	0	0
46	0	0	0
Non-responder			
12	0	0	0
17	0	0	1
13	0	0	2
14	2	0	0
15	2	0	0
18	2	0	0
47	0	1	2
48	0	0	0
49	0	1	0
50	4	0	0
Normal	$0.5 \pm 1.0^*$	0.2 ± 0.4	0.5 ± 0.8

GPI, glycosyl-phosphatidylinositol; Normal, normal adults; * mean±SD (n=23).

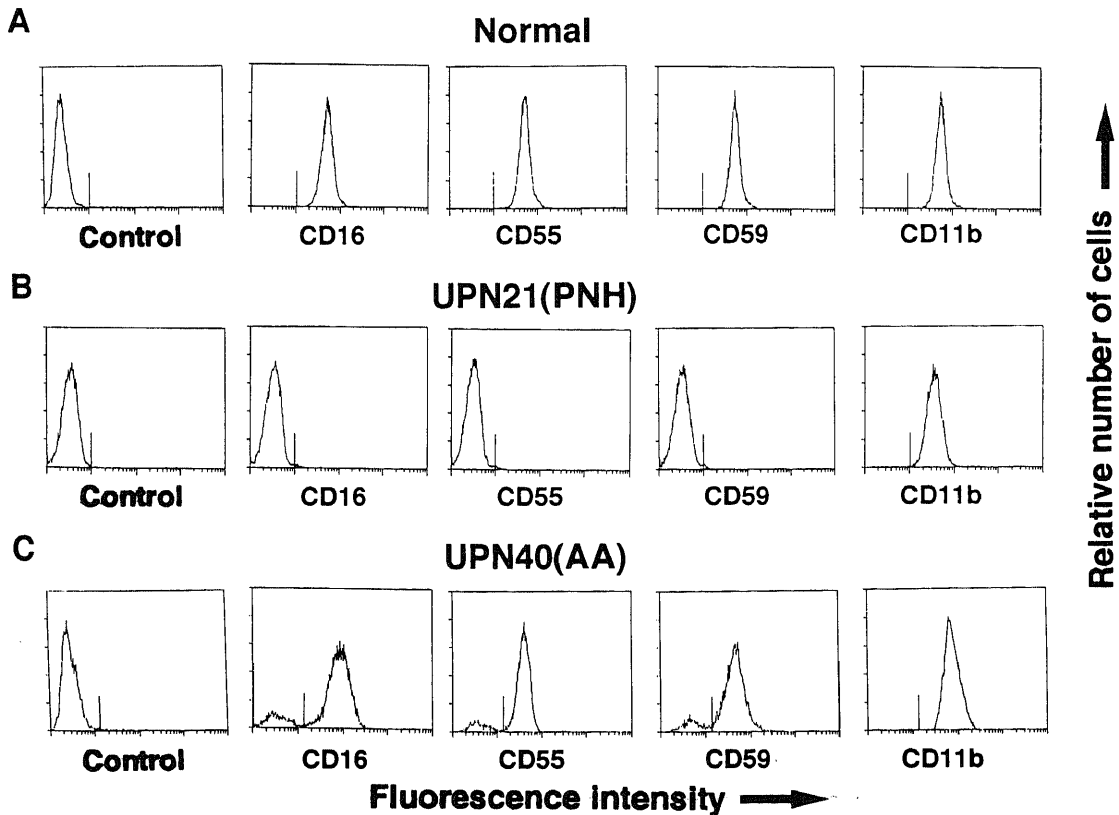


Fig. 9. Flow cytometric histograms showing expression of CD16, CD55, and CD59 on PBPMN from a normal, UPN21, and UPN40. The histograms of control and CD11b are presented as negative and positive controls, respectively.

CD59 のすべてを正常に発現していたが、CyA 反応群の 1 例 (UPN40) で、CD16, CD55, CD59 陰性 PBPMN がそれぞれ 12%, 11%, 12% 検出された (図 9C)。この患者では CyA 投与前より 16% の CD16 陰性 PBPMN が認められており、CyA 療法開始後 4 年間を経た解析時においても PNH クローンの割合は増加していなかった。また、同時に調べた単球でも CD55 陰性細胞が 12%、同じく GPI アンカー膜蛋白である CD14 の陰性細胞が 16% と PBPMN とほぼ同様の結果を示した。

考 察

血液疾患患者の造血クロナリティの解析は、従来より X 染色体上の遺伝子産物を利用することにより行われてきた。Fialkow ら²⁹⁾ はグルコース 6 リン酸脱水素酵素 (glucose 6-phosphate dehydrogenase, G6PD) のアイソザイムの多型性を利用することにより、女性 CML 患者の造血が単クローン性であることを初めて示した。しかし、G6PD に関するヘテロ接合体は黒人女性の極一部にしかみられないため応用範囲が限られていた。近年、DXS255 領域 (M27 β)、PGK、HPRT 遺伝子などのヘテロ接合体の割合が高い遺伝子を用いた造血クロナリティの解析方法が考案され、血液疾患にも応用されるようになった²¹⁶⁾⁻²³⁾。著者はこの 3 つの遺伝子を利用することにより、血液疾患患者 38 例中 37 例 (97.4%) が少なくとも一つの遺伝子についてヘテロ接合体であり、36 例 (94.7%) でクロナリティの解析が可能であることを示した。各遺伝子のヘテロ接合体の割合は M27 β で 77.1%、PGK で 59.3%、HPRT で 50.0% であった。Tsuge ら²⁴⁾ は日本人を対象とした解析で、M27 β 、PGK、HPRT のヘテロ接合体はそれぞれ 94%、40%、44% であったと報告した。Fraser ら²⁵⁾ は女性の 93% が M27 β の解析でヘテロ接合体であったとしている。著者の解析では M27 β のヘテロ接合体の割合はこれらの報告より低い。うえ、HpaII 消化後に 3 バンドパターンを示す例や HpaII で消化されない例がヘテロ接合体の 30.8% に認められたため、実際に M27 β で解析可能であったのは 52.9% に過ぎなかった。Gale ら²⁶⁾ は、白血病患者の 54% で、DXS255 領域のメチル化が過剰に起こっているために HpaII で消化できなかったと報告している。AA や MDS 患者の DXS255 領域でもこのようなメチル化が起こっている可能性がある。

疾患別では、AA 患者 18 例中 15 例 (83.3%) の造血は単クローン性であったが、3 例 (16.7%) は単クローン性であった。この 3 例 (UPN16-18) はいずれも重症 AA で、解析時には PNH や MDS を疑わせる所見は無かったが、初診時より形態異常のはっきりしない低形成性の MDS であった可能性や、AA から MDS など単クローン性疾患へ移行する過程であった可能性がある。これらの患者は AA に対する治療には反応しなかった。特に UPN17 は一卵性双生児のドナーから計 3 回の BMT を行ったにもかかわらず造血能の回復は得られなかった。また、AA/PNH 症候群のうち解析できた 2 例は単クローン性パターンを示した。この 2 例は、後に行った GPI アンカー蛋白の解析で、PBPMN の 99% 以上が PNH クローンであったことから、当然の結果と考えられる。MDS では 11 例中 4 例 (36.4%) が単クローン性パターン、7 例 (63.6%) が単クローン性パターンを示した。MDS で単クローン性パターンを示した 4 例 (UPN 23-26) はいずれも染色体異常を伴わない非寛解時の RA であった。RA では 7 例中 4 例 (57.1%) と高頻度に単クローン性

パターンを示した事になる。唐沢ら²⁹⁾ は RA 9 例中 3 例 (33.3%) に、Janssen ら⁴⁾ は RA 4 例中 1 人例 (25%) に、Tefferi ら⁵⁾ は RA 5 例中 1 例 (20%) に単クローン性パターンが認められたと報告している。RA は芽球増加のない MDS の一群であると定義されている。このため染色体異常の無い場合、診断は血球系統の形態異常のみに拠っている。RA で単クローン性パターンを呈する例が多いのは、形態異常の所見を取り過ぎて、単クローン性疾患を単クローン性疾患と誤認しているためと考えられる。あるいは、MDS の異常クローンがあっても、正常クローンとモザイク状態となっているため、典型的な単クローン性パターンを呈さなかった可能性もある。MDS と診断されたもののうち染色体異常を示す 3 例 (UPN28, 29, 33) はいずれも単クローン性パターンを示した。また AML \cdot PV \cdot CML はこれまでの報告³⁰⁾ により単クローン性パターンを示した。

BMT 後の症例が単クローン性造血を呈した原因の一つに、患者の原疾患が急性転化期の CML であり移植前の腫瘍量が多く、また既に骨髓の線維化があったため、ドナーの十分量の造血幹細胞の生着が妨げられたことが考えられる。また、赤血球を除く目的でドナー骨髓を繰返し遠心したために、増殖能を有する造血幹細胞の数が減少し、その結果単クローン性の造血となった可能性がある。この症例の経験から、単クローン性造血に至るような少数の造血幹細胞の移植では BMT 後の造血再構築は不完全であり、長期間、造血を維持することは困難である可能性が示された。BMT 後の生着不全患者にドナー由来の単クローン性造血が証明された場合には、速やかに 2 回目の BMT を施行すべきであろう³¹⁾。

CyA に反応した 7 例の女性 AA 患者の PBPMN はすべて単クローン性パターンであったが、無反応群の女性 AA 患者 6 例中 2 例 (33.3%) が単クローン性パターンを示した。このうちの 1 例 (UPN21) は CyA 投与前から単クローン性パターンを示していた。この 2 例の T 細胞および類粘膜炎細胞が多クローン性パターンであったことから、PBPMN でみられたバンドの偏りは生理的なものでなく、後天的に起こった単クローン性造血の結果と考えられる。van Kamp ら³²⁾ は ATG に反応した女性 AA 患者 11 例中 7 例 (63.6%) に単クローン性パターンが認められたと報告している。彼らの結果を Kaplan \cdot マイヤー (Kaplan-Meyer) 法³³⁾ で解析すると ATG 療法を受けた AA 患者の 85% が 7 年間で単クローン性の造血状態に至ると推定される。本研究の CyA 反応群の女性 AA 患者 7 例を同様に解析すると、7 年間で単クローン性造血に至る危険性は 0% である。両者をロングラント (long-rank) 検定で比較すると、ATG に反応した女性 AA 患者の方が単クローン性パターンを示す危険性が有意に高いということになる ($p < 0.001$)。このように単クローン性造血の危険性に差がみられることの原因として、ヨーロッパの AA 患者と比較して日本の AA 患者では、より多くの幹細胞が残存しているため、少数の幹細胞による造血の構築の機会が少ない可能性や、日本の AA 患者では単クローン性造血に至るような幹細胞の質的異常を持つ例が少ない可能性などが考えられる。あるいは、CyA と ALG/ATG に反応した患者間では、回復した造血に質的な相違があるのかもしれない。CyA には、ALG/ATG あるいは副腎皮質ステロイドに見られるような造血幹細胞に対する直接的な刺激作用は報告されていない。このため、真に免疫学的機序が関与した AA のみが CyA に反応する可能性がある³⁴⁾³⁵⁾。これに対して、ALG/ATG

は造血不全の機序とは無関係に顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子の産生を介して少数の造血幹細胞を刺激し増殖させることができるため、単クローン性造血に至る機会が多いのかもしれない³⁶⁾。

サザンブロットによるクロナリティの解析は感度が低いため、単クローン性に増殖している細胞が少数の場合には、異常としてとらえることができない。近年、PNHの診断法として、FCM法による GPI アンカー膜蛋白欠損の PNH クロンの検出が行われるようになった¹³⁾⁻¹⁵⁾。この方法は酸性溶血試験やシヨ糖溶血試験と比べて感度が高く、PNHの極初期であっても少数の PNH クロンを検出することができる。CyA で治療した AA 患者に PNH への進展の前兆がみられるかどうか明らかにするため、GPI アンカー膜蛋白の発現を解析したところ、UPN40 以外のすべての患者の PBPMN で CD16, CD55, CD59 はいずれも正常に発現していた。しかし UPN40 では、CyA 投与開始前より CD16 陰性の PBPMN の存在が確認されており、この陰性細胞の割合は投与開始後 4 年を経た解析時でも不変であった。したがって AA 患者に対する CyA 療法が PNH クロンの発生を促す、あるいは既に存在する少数の PNH クロンの増殖を促進する可能性は少ないと考えられる。AA 患者が少数の GPI アンカー蛋白陰性細胞を持っている場合、将来臨床的な PNH に進展する可能性が高いことが予想される¹⁵⁾。クロナリティの解析結果と合わせると、今回解析した CyA 投与後の AA 患者では PNH を発症する危険性は低いと考えられる。

De Planque ら¹²⁾は209例の AA 患者において ATG 投与後 7 年間での臨床的な PNH, MDS・AML の発症率はそれぞれ13%, 15%であると推定した。Tichelli ら¹¹⁾は103例の AA 患者において ALG 投与後 8 年間での臨床的な PNH・MDS・AML の発症率は57%であると推定した。一方、著者の解析した AA 患者 25例のうち、CyA 投与後 7 ヶ月から 12 年 (中央値 23 ヶ月) を経た現時点で臨床的な PNH・MDS・AML を発症したものは 1 例もない。本研究では観察期間が短いため、PNH・MDS・AML の発症率について、上述の ALG/ATG に関するヨーロッパの研究と比較するのは困難である。しかし、CyA 反応群の解析において、単クローン性パターンが認められなかったこと、GPI アンカー膜蛋白陰性細胞が存在しなかったこと、さらに CyA 投与前に少数存在した陰性細胞が投与後 4 年の時点で増加しなかったことなどから、CyA に反応した AA 患者では PNH, MDS, AML など単クローン性疾患を発症する危険性は少ないと考えられる。

以上のように、X 染色体関連遺伝子の不活化現象と DNA の長多型を用いたクロナリティの解析は女性血液疾患患者および BMT 後患者の造血の質を評価する上で非常に有用であった。特に染色体異常を伴わない RA と、CyA 療法を受けた AA については臨床上有用な興味深い知見が得られた。今後症例数を増やすとともに、長期に渡って経過を観察することにより造血不全患者の病態がさらに明らかになるとと思われる。

結 論

女性各種血液疾患患者、BMT 後造血能回復が遅延した患者、および CyA 投与 AA 患者に対する造血クロナリティの解析と、CyA 投与 AA 患者についての GPI アンカー膜蛋白発現の解析により以下の結果を得た。

1. 女性患者 38 人について DXS255 領域遺伝子、PGK 遺伝子、HPRT 遺伝子を用いて造血クロナリティの解析を行ったところ 38 例中 37 例 (97.4%) がいずれかの遺伝子でヘテロ接合体で、36 例 (94.7%) でクロナリティの判定が可能であった。3 つの遺伝子を利用することにより大多数の症例で解析が可能と考えられた。

2. AA 患者 18 例中 3 例 (16.7%) が単クローン性パターンを示したが、この 3 例は形態異常に乏しい低形成性の MDS、あるいは AA から MDS のような単クローン性疾患への移行過程であった可能性がある。また、MDS 患者 11 例中 4 例 (36.4%) が多クローン性パターンを示した。この 4 例の骨髄所見はいずれも形態異常が軽微な MDS (RA) で、染色体異常を伴わなかった。AA と診断すべき多クローン性の造血障害を形態異常のみから MDS に分類していた可能性がある。これに対して AA/PNH 症候群、AML, PV, CML はいずれも単クローン性パターンであった。

3. BMT 後、ドナー骨髄の生着が確認されたものの造血回復が著しく遅延した患者について造血クロナリティを解析したところ、単クローン性パターンが確認された。この患者は G-CSF 投与にもかかわらず、汎血球減少が進行し、BMT 後 193 日目に真菌感染のため死亡した。BMT 後に生着が確認された場合でも、造血能が悪く単クローン性造血を示した場合に、造血の再構築が不完全に終わる可能性があるため、再移植が必要と思われた。

4. CyA で治療した 25 例の AA 患者 (女性 13 例、男性 12 例) のうち CyA 反応群の女性患者 7 例の造血はいずれも多クローン性であったが、CyA 無反応群の女性患者 6 例中 2 例の造血は単クローン性であった。この 2 例のうちの 1 例は CyA 投与前の解析でも単クローン性であった。

5. CyA で治療した 25 人の患者における GPI アンカー膜蛋白の発現は反応群の 1 人を除く全員で正常であった。この患者は、CyA 投与前にすでに GPI アンカー膜蛋白陰性の PBPMN が少数みられ、CyA 投与後 4 年を経た時点でも増加傾向はなかった。

6. CyA を投与した AA 患者のうち、現時点で臨床的に PNH, MDS, AML などの単クローン性疾患を発症したものは無く、CyA 投与患者、特に CyA 反応群では ALG/ATG で治療した患者と比較して単クローン性疾患を発症する危険性は少ない可能性がある。ただし、正確な比較のためには CyA 投与患者の長期的経過観察が必要である。

7. X 染色体関連遺伝子不活化現象と DNA の長多型を用いたクロナリティの解析は女性血液疾患患者および BMT 後患者の造血の質を評価する上で極めて有用であると考えられた。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師松田 保教授に深甚なる謝意を捧げます。さらに終始、直接ご指導、ご助言をいただきました金沢大学医学部第三内科講師、中尾真二先生に厚く御礼申し上げますとともに、本研究の遂行に際し多大な御協力をいただきました金沢大学医学部第三内科免疫グループの各位に感謝の意を表します。

なお本研究の要旨は、第 54 回・第 55 回日本血液学会総会および第 34 回日本臨床血液学会総会において発表した。

文 献

1) Wainscoat, J. S. & Fey, M. F.: Assessment of

- clonality in human tumors: a review. *Cancer Res.*, **50**, 1355-1360 (1990).
- 2) Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Willard, H. F. & Michelson, A. M.: Clonal analysis using recombinant DNA probes from the X-chromosome. *Cancer Res.*, **47**, 4806-4813 (1987).
- 3) Morita, K., Tsukamoto, N., Karasawa, M. & Omine, M.: Molecular genetic approach to the analysis of clonal proliferation in hematologic disorders. *Acta Haematol. Jpn.*, **52**, 1414-1422 (1989).
- 4) Janssen, J. W. G., Buschle, M., Layton, M., Drexler, H. G., Lyons, J., van den Berghe, H., Heimpel, H., Kubanek, B., Kleihauer, E., Mufti, G. J. & Bartram, C. R.: Clonal analysis of myelodysplastic syndromes: evidence of multipotent stem cell origin. *Blood*, **73**, 248-254 (1989).
- 5) Tefferi, A., Thibodeau, S. N. & Solberg, L. A. Jr.: Clonal studies in the myelodysplastic syndrome using X-linked restriction fragment polymorphisms. *Blood*, **75**, 1770-1773 (1990).
- 6) Turnan, A. G., Humphries, R. K., Phillips, G. L., Eaves, A. C. & Eaves, C. J.: Clonal hematopoiesis demonstrated by X-linked DNA polymorphisms after allogeneic bone marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.*, **320**, 1655-1661 (1989).
- 7) Nash, R., Storb, R. & Neiman, P.: Polyclonal reconstitution of human marrow after allogeneic marrow transplantation. *Blood*, **72**, 2031-2037 (1986).
- 8) Nash, R., Storb, R., Torok-Storb, B. & Neiman, P.: Clonal hematopoiesis after bone marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.*, **321**, 1758-1759 (1989).
- 9) Young, N. S., Griffith, P., Brittain, E., Elfenbein, G., Gardner, F., Huang, A., Harmon, D., Hewlett, J., Fay, J., Mangan, K., Morrison, F., Sensenbrenner, L., Shaddock, R., Wang, W., Zaroulis, C. & Zuckerman, K.: A multicenter trial of antithymocyte globulin in aplastic anemia and related disease. *Blood*, **72**, 1861-1869 (1989).
- 10) Doney, K., Pepe, M., Storb, R., Bryant, E., Anasetti, C., Appelbaum, F. R., Buckner, C. D., Sanders, J., Sullivan, K., Weiden, P. & Hansen, J. A.: Immunosuppressive therapy of aplastic anemia: results of a prospective, randomized trial of antithymocyte globulin (ATG), methylprednisolone, and oxymetholone to ATG, very high-dose methylprednisolone, and oxymetholone. *Blood*, **79**, 2566-2571 (1992).
- 11) Tichelli, A., Gratwohl, A., Wursch, A., Nissen, C. & Speck, B.: Late hematological complications in severe aplastic anemia. *Br. J. haematol.*, **69**, 413-418 (1988).
- 12) De Planque, M. M., Bacigalupo, A., Wursch, A., Hows, J. M., Devergie, A., Frickhofen, N., Brand, A. & Nissen, C.: Long-term follow-up of severe aplastic anaemia patients treated with antilymphocyte globulin. *Br. J. haematol.*, **73**, 121-126 (1989).
- 13) Schubert, J., Alvarado, M., Uciechowski, P., Zielinska-Skowronek, M., Freund, M., Vogt, H. & Schmidt, R. E.: Diagnosis of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using immunophenotyping of peripheral blood cells. *Br. J. Haematol.*, **79**, 487-492 (1991).
- 14) van der Schoot, C. E., Huizinga, T. W. J., van't Veer-Korthof, E. T., Wijmans, R., Pinkster, & Kr. von dem Borne, A. E. G.: Deficiency of glycosyl-phosphatidylinositol-linked membrane glycoproteins of leukocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, description of a new diagnostic cytofluorometric assay. *Blood*, **76**, 1853-1859 (1990).
- 15) Hillmen, P., Hows, J. M. & Luzzatto, L.: Two distinct patterns of glycosylphosphatidylinositol (GPI) linked protein deficiency in the red cells of patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br. J. Haematol.*, **80**, 399-405 (1992).
- 16) Camitta, B. M., Thomas, E. D., Nathan, D. G., Gale, R. P., Kopecky, K. J., Rapoport, J. M., Santos, G., Gordon-Smith, E. C. & Storb, R.: A prospective study of androgens and bone marrow transplantation for treatment of severe aplastic anemia. *Blood*, **53**, 504-514 (1979).
- 17) Saxon, A., Feldhaus, J. L. & Robbins, R. A.: Single step separation of human T and B cells using AET treated SRBC rosettes. *J. Immunol.*, **12**, 285-290 (1976).
- 18) Martin, G. R., Epstein, C. J., Travis, B., Tucker, G., Yatziv, S., Martin, D. W. Jr., Clift, C. & Cohen, S.: X-chromosome inactivation during differentiation of female teratocarcinoma stem cells in vitro. *Nature*, **271**, 329-333 (1978).
- 19) Lyon, M. F. & The William Allan Memorial Award address: X-chromosome inactivation and the local and expression of X-linked genes. *Am. J. Hum. Genet.*, **42**, 8-16 (1988).
- 20) Southern, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517 (1975).
- 21) Fraser, N. J., Boyd, Y., Brownlee, G. G. & Craig, I. W.: Multi-allelic RFLP for M27 β , an anonymous single copy genomic clone at Xp11.3-Xcen [HGM9 provisional no. DXS255]. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 9616 (1987).
- 22) Keith, D. H., Singer-Sam, J. & Riggs, A. D.: Active X chromosome DNA is unmethylated at eight CCGG sites clustered in a guanine-plus cytosine rich island at the 5' end of the gene for phosphoglycerate kinase. *Molecular and Cellular Biology*, **6**, 4122-4125 (1986).
- 23) Jolly, D. J., Esty, A. C., Bernard, H. U. & Friedmann, T.: Isolation of a genomic clone partially encoding human hypoxanthine phosphoribosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5038-5041 (1982).
- 24) Peake, I. R., Bowen, D., Bignell, P., Liddell, M. B., Sadler, J. E., Atanden, G. & Bloom, A. L.: Family studies and prenatal diagnosis in severe von Willebrand disease by polymerase chain reaction amplification of a variable number tandem repeat region of the von Willebrand factor gene. *Blood*, **76**, 555-561 (1990).

- 25) Fialkow, P. J., Gartler, S. M. & Yoshida, A.: Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **58**, 1468-1471 (1967).
- 26) Tsuge, I., Kojima, S., Matsuoka, H., Abe, T., Kamachi, Y., Torii, S. & Matsuyama, T.: Clonal haematopoiesis in children with acquired aplastic anemia. *Br. J. Haematol.*, **84**, 137-143 (1993).
- 27) Fraser, N. J., Boyd, Y. & Craig, I.: Isolation and characterization of a human variable copy number tandem repeat at Xcen-p11.22. *Genomics*, **5**, 144-148 (1989).
- 28) Gale, R. E., Wheadon, H., Goldstone, A. H., Burnett A. K. & Linch D. C.: Frequency of clonal remission in acute myeloid leukaemia. *The Lancet*, **341**, 138-142 (1993).
- 29) 唐沢正光, 小峰光博: MDS におけるクローン性造血. *医学のあゆみ*, **160**, 274-278 (1992).
- 30) Anger, B., Janssen, J. W. G., Schrezenmeier, H., Hehlmann, R., Heimpel, H. & Bartram, C. R.: Clonal analysis of chronic myeloproliferative disorders using X-linked DNA polymorphisms. *Leukemia*, **4**, 258-261 (1990).
- 31) Bolger, G. B., Sullivan, K. M., Storb, R., Witherspoon, R. P., Weiden, P. L., Stewart, P., Sanders, P., Meyers, J. D., Martin, P. J., Doney, K. C., Deeg, H. J., Clift, R. A., Buckner, C. D., Appelbaum, F. R. & Thomas, E. D.: Second marrow infusion for poor graft function after allogeneic marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, **1**, 21-30 (1986).
- 32) van Kamp, H., Landegent, J. E., Jansen, R. P. M., Willemze, R. & Fibbe, W. E.: Clonal hematopoiesis in patients with acquired aplastic anemia. *Blood*, **78**, 3209-3214 (1991).
- 33) Kaplan, E. L. & Meier, P.: Nonparametric estimation from incomplete observation. *J. Am. Stat. Assoc.*, **53**, 457-481 (1958).
- 34) Honma, Y., Kasukabe, T., Okada, J. & Hozumi, M.: Glucocorticoid binding and mechanism of resistance in some clones of mouse myeloid leukemic cells resistant to induction of differentiation by dexamethasone. *J. Cell. Physiol.*, **93**, 227-236 (1977).
- 35) Hunter, R. F., Mold, N. G., Mitchell, R. B. & Huang, A. T.: Differentiation of normal marrow and HL60 cells induced by antithymocyte globulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4823-4827 (1985).
- 36) Nimer, S. D., Golde, D. W., Kwan, K., Lee, K., Clark, S. & Champlin, R.: In vitro production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in aplastic anemia: possible mechanisms of action of antithymocyte globulin. *Blood*, **78**, 163-168 (1991).

Studies on Hematopoietic Clonality in Patients with Hematopoietic Disorders: Analysis by Using Inactivation of X-linked Genes and DNA Fragment Length Polymorphism Masaki Yamaguchi, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **103**, 183—196 (1994)

Key words clonality, M27 β , phosphoglycerate kinase, hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glycosyl phosphatidylinositol-anchored protein

Abstract

It is important for laying the lines of treatment for the patients with hematologic diseases and predicting a prognosis to determine whether their hematopoietic constitution is monoclonal or polyclonal. To clarify the significance of determining such hematopoietic clonality, hematopoietic cells were analyzed for clonality in patients with hematopoietic failure syndromes and patients with hematologic malignancies who were suspected to have monoclonal hematopoiesis. They consisted of 38 female patients: 19 aplastic anemia (AA), 3 AA/paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) syndrome, 11 myelodysplastic syndrome (MDS), 3 acute myelogenous leukemia (AML), 1 polycythemia vera (PV), and 1 chronic myelogenous leukemia (CML). Clonality analysis was done by using a DNA length polymorphism and inactivation of the three X-linked genes of DXS255 locus (M27 β), phosphoglycerate kinase, and hypoxanthine phosphoribosyltransferase. Thirty seven of 38 patients (97.4%) were heterozygotes for at least one gene, and 36 (94.7%) were evaluable for clonality. Of 18 AA patients, 15 (83.3%) showed polyclonal hematopoiesis and the remaining 3 (16.7%) monoclonal hematopoiesis. Of 11 MDS patients, 4 (36.4%) showed polyclonal hematopoiesis, and 7 (63.6%) monoclonal hematopoiesis. All of 4 patients with polyclonal hematopoiesis who had been diagnosed as having refractory anemia by French-American-British classification had mild morphological abnormalities without chromosomal abnormalities. All patients with AA/PNH syndrome, AML, PV, and CML showed monoclonal hematopoiesis. An allogeneic marrow transplant recipient with CML in blastic crisis with slow recovery of donor-derived cells also exhibited monoclonal hematopoiesis. It was therefore suggested that hematopoietic reconstitution may be incomplete by a small number of hematopoietic stem cells leading to monoclonal hematopoiesis. Expression of glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane protein (CD16, CD55, and CD59) by flow cytometry as well as clonality of hematopoiesis was also analysed on peripheral blood polymorphonuclear leukocytes (PBPMN) of 25 cyclosporine A

(CyA)-treated AA patients including 12 male patients, to determine whether immunosuppressive therapy of AA is associated with an increased risk of developing clonal disorders such as PNH and MDS. Except for 2 patients refractory to CyA therapy, all CyA-treated female patients showed polyclonal hematopoiesis. GPI-anchored membrane proteins were normally expressed in all CyA-treated patients except for one CyA-responsive male patient who had a small proportion of GPI-anchored membrane protein-negative PBPMN before CyA therapy. The proportion remained unchanged 4 years after CyA therapy. These findings suggest that CyA-treated AA patients, especially those responsive to CyA therapy may not have a significant risk of developing clonal disorders. From these results, determining clonality of hematopoiesis was considered to be important in understanding the pathophysiology of hematopoietic disorders and choosing the appropriate therapy for them.