

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591032

研究課題名（和文） 微小PNH型血球陽性骨髄不全診断システムの開発

研究課題名（英文） Development of the diagnostic system of bone marrow failure with a minor population of PNH-phenotype cells

研究代表者

山崎 宏人（YAMAZAKI HIROHITO）

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号：50361994

研究成果の概要（和文）：PNH型血球は、骨髄不全における免疫病態のマーカーとして有用であるものの、陽性細胞が少数の場合には判定に迷うことが多い。このため研究開始時には、各ドットにおける蛍光強度の数学的定量化を試みたが、日常臨床への適応は困難であった。抗 GPI アンカー膜蛋白抗体の代わりに FLARE を用いることにより、PNH 型血球の正確な定量化が達成された。PNH 型血球が陰性でも免疫抑制療法が奏効する例があることから、さらに良いマーカーを探索したところ、血漿トロンボポエチン（TPO）値の高値が免疫病態と相関しており、PNH 型血球陽性例を包含していることが明らかになった。したがって血漿 TPO の測定は骨髄不全の病態診断に有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Although detection of PNH-type cells is useful as a marker for immune pathophysiology of bone marrow failure, it is often difficult when the percentage of PNH-type cells is less than 0.1%. We established an objective method of quantifying PNH-type with mathematical analysis of the fluorescent intensity of GPI-anchored protein dots on the flow cytometry dotgram, but the method was difficult to generalize. The use of fluorescent labeled aerolysin (FLARE) instead of monoclonal antibodies greatly improved the accuracy of detecting PNH-type cells. However, some patients without increased PNH-type cells respond to immunosuppressive therapy. To identify a better marker for immune pathophysiology of bone marrow failure, we examined a correlation of plasma thrombopoietin (TPO) levels with pathophysiology of bone marrow failure. Bone marrow failure patients showing TPO levels >320 pg/ml proved to have benign diseases with immune pathophysiology and virtually included all patients with increased PNH-type cells. The measurement of plasma TPO levels is therefore useful for diagnosing pathophysiology of bone marrow failure.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：血液内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：再生不良性貧血、PNH 型血球

1. 研究開始当初の背景

発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) 形質の血球 (PNH 型血球) は、骨髄不全における免疫病態を診断するための良いマーカーである。再生不良性貧血 (AA) 患者のうち、PNH 型血球陽性例では 90% が免疫抑制療法に反応して改善するのに対し、PNH 型血球陰性例では約 40% しか改善しない (Sugimori C, Yamazaki H, Nakao S, et al. Blood 2006)。低リスクの骨髄異形成症候群 (MDS) を対象とする前向き臨床試験においても、治療前の PNH 型血球の存在は免疫抑制療法の反応性を予測する有意なマーカーであった (Ishikawa T, Nakao S, et al. Int J Hematol, 2007)。このため、治療前の PNH 型血球検出は骨髄不全患者のマネジメントにおいても重要な検査の一つと考えられている。

しかし、微少な PNH 型血球を検出するためには精度の高いフローサイトメトリーを用いる必要があるため、現在のところ一部の施設でしか施行できない。検査会社や通常の研究室で行っているフローサイトメトリーでは、1% までの PNH 型血球は健常者でも検出されるため、1% 以上の PNH 型血球の存在を有意な増加と判定している。高精度のフローサイトメトリーを用いると、AA 患者全体の 60% に PNH 型血球が検出され、その中央値は 0.178% であった。したがって、0.1% 前後の PNH 型血球を正確に定量できなければ、PNH 型血球陽性骨髄不全の大部分を見逃すことになる。

2. 研究の目的

PNH 型血球は GPI アンカー型膜蛋白質が「欠失」している血球であるため、抗 GPI アンカ

ー型膜蛋白質抗体が結合しないという性質を利用してこの血球を検出している。しかし、細胞の抗体処理の過程で傷んだ細胞は抗 GPI アンカー型膜蛋白質抗体との結合性が弱くなるため、フローサイトメトリーのドットグラム上では、真の PNH 型血球と紛らわしいところに位置するようになる。このような偽の PNH 型血球集団を真の PNH 型血球と判別するには多くの経験に基づいた主観的な判断が必要であった。そこで、フローサイトメトリーへの習熟度合いに関係なく、微少な PNH 型血球を客観的に定量できるシステムの開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) フローサイトメトリー上のドットの蛍光強度をデータ解析ソフト (WinList) を用いて数値化し、その数値データを「最小 2 乗法」を用いて処理することによって、PNH 型血球の比率を客観的に算出する。

- ① FITC でラベルした CD55&CD59 の蛍光強度を X 軸、PE でラベルした glycophorin-A の蛍光強度を Y 軸として、2 次元に展開したフローサイトメトリー上に表示される各ドットの蛍光強度を、データ解析ソフト WinList (Varity Software 社) を用いて数値化し、各ドットを 2 次元座標 (x, y) で表示する。
- ② CD55&CD59 の蛍光強度を N 段階に分割し、各段階に含まれるドットの中で glycophorin-A の蛍光強度値が最も大きいドットを各段階の代表ドットとした N 組の 2 次元座標データ (Xi, Yi) (i=1~N) を選択する。
- ③ N 組のデータ (Xi, Yi) (i=1~N) に対し

て「最小2乗法」を適用し、1次式 $y = ax + b$ で示される近似直線を求める。こうして得られた1次式をCD55⁻CD59⁻分画における偽PNH型血球を識別するためのラインの候補とする。

- ④ CD55⁻CD59⁻分画に少数のドットを認めながら、従来の判定基準ではPNH型血球陰性と判定した健常者例を対象として、上記の方法で1次式を求め、CD55⁻CD59⁻分画における偽PNH型血球を識別するラインを決定する。

(2) Fluorescently labeled aerolysin

(FLAER) (GPI アンカー部分と結合する細菌由来のトキシンであるため、理論上ほとんどすべてのGPI アンカー型膜蛋白質を認識することができる) 抗体とデジタル波形処理可能なフローサイトメーター (FACSCanto) を用いて、ウサギATG+シクロスポリン療法を受けたstage 3以上のAA患者41例について検討した。

(3) AAでは高値となる血漿トロンボポエチン (TPO) 値の測定が、MDSを含めた骨髄不全の免疫病態の診断に有用か否かを検討した。

4. 研究成果

(1) 平成22年度はフローサイトメトリーへの習熟度合いに関係なく、微少なPNH型血球を客観的に定量できるようにするため、フローサイトメトリー上のドットの蛍光強度を、データ解析ソフト (WinList) を用いて数値化し、その数値データを「最小2乗法」を用いて処理することによって、PNH型血球の比率を客観的に算出する方法を検討した。しかし、この方法では症例毎に近似式の設定が必要となり、日常診療での応用は煩雑であることが判明した。

(2) 平成23年度は、ほとんどすべてのGPIアンカー型膜蛋白質を認識することができ

るFLAERと、デジタル波形処理可能なフローサイトメーターを用いた新たなPNH型血球検出システムを確立した。本検出法ではPNH型血球がドットグラム上で明瞭に描出されるため、従来法に比べて視認しやすく、主観的な判断でノイズを省く必要がないことが明らかになった。

ウマATGからウサギATGに変更されて以降、AAに対する免疫抑制療法の有効性については評価が分かれている。しかし、今回、ウサギATG+シクロスポリン療法を受けたstage 3以上のAA患者41例についてこのアッセイを用いて検討したところ、PNH型血球陽性例は25例、陰性例は16例で、それぞれの治療開始後6ヵ月時点でのPR以上の累積奏効率はPNH型血球陽性例で76%、陰性例で31%であった。免疫病態の存在を示唆するPNH型血球陽性のAAを対象を絞れば、ウサギATGの治療成績は、従来のウマATGを用いた場合と比べて遜色ないことが示唆された。したがってウサギATGを用いる際には本アッセイを用いてPNH型血球を検出することが特に重要と考えられた。

(3) PNH型血球が陰性であっても免疫抑制療法はしばしば奏効することから、PNH型血球が検出されないからと言って免疫病態を否定することはできない。そこでPNH型血球よりもさらに良いマーカーを見出すため、平成24年度は、AAでは高値となる血漿トロンボポエチン (TPO) 値の測定が免疫病態の診断に有用か否かを検討した。健常者50人と、AA (47人)、MDS (120人)、特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) (24人) を含む血小板減少 (10万/ μ L) 患者191人の血漿TPO値をELISA法により測定した。TPO値 (健常者 54.5 ± 21.1 pg/mL) はAAで 1254.6 ± 551.1 pg/mL と高く、ITP (63.5 ± 8.7 pg/mL) とMDS-RAEB (44.7 ± 85.2 pg/mL) では低値であった。ROC

解析の結果から、良性骨髄不全と相関する TPO 320 pg/mL 以上を TPO 高値 (TPO-H)、それ未満を TPO 低値 (TPO-L) と定義した。PNH 型血球陽性患者の占める割合は TPO-H 群 (45.8%) が TPO-L 群 (0%) より有意に高かった ($P=0.003$)。TPO-H 患者のうち 45 人が、ATG+シクロスポリン (CsA) もしくは CsA 単剤による免疫抑制療法を受けた。各々に対する反応率は TPO-H 群で 81.2%、85.3%であったのに対して、CsA 単剤療法を受けた TPO-L 群 7 人中改善したのは 1 人のみであった ($P=0.002$)。

今回の検討により、PNH 型血球陽性例は全てが TPO-H 群に包含されることが明らかになった。このため、血漿 TPO が高値であれば、PNH 型血球を検出する必要はない。血漿 TPO の測定は骨髄不全の病態診断に極めて有用であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Seiki Y, Sasaki Y, Hosokawa K, Saito C, Sugimori N, Yamazaki H, Takami A, Nakao S. Increased plasma thrombopoietin levels in patients with myelodysplastic syndrome: a reliable marker for a benign subset of bone marrow failure. *Haematologica*. 2013; in press. 査読有
DOI: 10.3324/haematol.2012.066217
- ② Ohata K, Iwaki N, Kotani T, Kondo Y, Yamazaki H, Nakao S. An Epstein-Barr virus-associated leukemic lymphoma in a patient treated with rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine for hepatitis-associated aplastic anemia.

Acta Haematol. 2012; 127: 96-99. 査読有

DOI: 10.1159/000333609

- ③ 山崎宏人. AA の病態と治療: 病態診断を活用した治療戦略. *臨床血液*. 52; 2011; 1507-1514. 査読無
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21971227>
- ④ Qi Z, Takamatsu H, Espinoza JL, Lu X, Sugimori N, Yamazaki H, Okawa, K, Nakao, S. Autoantibodies specific to hnRNP K: a new diagnostic marker for immune pathophysiology in aplastic anemia. *Ann Hematol*. 2010; 89: 1255-1263. 査読有
DOI: 10.1007/s00277-010-1020-3
- ⑤ 山崎宏人. AA の診断と治療: セカンドオピニオン外来で聞かれること. *臨床血液*. 51; 2010; 1441-1449. 査読無
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20962478>

[学会発表] (計 4 件)

- ① Yamazaki H. Thymoglobuline is as effective as Lymphoglobuline in Japanese patients with aplastic anemia possessing increased glycosylphosphatidylinositol-anchored protein (GPI-AP) deficient cells. 2011 ASH Annual Meeting. 2011.12.10, San Diego Convention Center (USA).
- ② 山崎宏人. AA の病態と治療: 病態診断を活用した治療戦略(教育講演). 日本血液学会学術集会. 2011年10月15日. 名古屋国際会議場(愛知県)
- ③ Yamazaki H. Thymoglobulin therapy for aplastic anemia: impact of PNH-type cells on the treatment outcome. 日本血液学会学術集会. 2011年10月14日. 名古屋国際会議場(愛知県)
- ④ 山崎宏人. AA の診断と治療: セカンドオピニオン外来で聞かれること(教育講演). 日本血液学会学術集会. 2010年9月25日. パシフィコ横浜(神奈川県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 宏人 (YAMAZAKI HIROHITO)
金沢大学・大学病院・講師
研究者番号：50361994

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

中尾 眞二 (NAKAO SHINJI)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号：70217660

小松崎 俊彦 (KOMATSUZAKI TOSHIHIKO)
金沢大学・機械工学系・准教授
研究者番号：80293372
(H22 のみ)