

博士(医学) 小林威夫

学位論文題名

骨髓異形成症候群における赤血球フェリチン

H, Lサブユニットの臨床的意義に関する研究

学位論文内容の要旨

目的

フェリチンは分子量約45万の鉄貯蔵蛋白で、H, L2種類のサブユニット24個によって構成されている。組織によりH, L両サブユニットの構成比率が異なり肝臓、脾臓由来のフェリチンではLサブユニットが多く、その荷電が塩基性を示すのに対し、心臓、脾臓、赤血球、胎盤及び悪性腫瘍由来のフェリチンではHサブユニットが多く、酸性を示すことが知られている。

骨髓異形成症候群(MDS)は、1982年FABグループにより提唱された疾患群で、これまで前白血病状態と考えられていた概念を総括したものである。

その内訳は、骨髓、末梢血中の芽球の比率により、5つのサブタイプに分けられる。これらのうち、慢性骨髓性白血病(CMML)を除くすべての病型は不応性貧血(RA)をその病態の基本とし、その異常は主に赤血球系にあるとされている。

私はこれまで、MDSのRAにおいて赤血球フェリチンの増加と、荷電の酸性化を明らかにし、これらが造赤血球能の異常および無効造血と関連することを報告してきた。この酸性フェリチンの増加がサブユニットレベルで、どのように変動しているかを明らかにする目的で、フェリチンH, Lサブユニットに対する单クローニング抗体を用いたELISA法を確立し、MDSにおける赤血球について各サブユニット量を直接測定し、その臨床的意義を検討し、さらに骨髓塗沫標本について同抗体を用いた免疫化学染色(APAAP法)による検索を行って検討した。

方法

1) 対象：対象は、MDS(RA23例、RAEB8例、CMML2例)33例その他各種血液疾患、および健常人で、原則として、未治療で輸血の既往がなく、重篤な感染症、肝障害のないものとした。

2) 被検赤血球溶血液：患者より得られたヘパリン加静脈血をBeutlerらの方法に従い microcrystalline cellulose と  $\alpha$ -celluloseを重量比1:1に混合したカラムを通して白血球および血小板を除去し、低張液処理による溶血の後、10,000G 20分間遠心し上清を検体とした。

3) ELISA法：ポリスチレン製マイクロタイヤープレート(Nunc社)を固相に用いた。50mM炭酸水素ナトリウム緩衝液pH 9.6に溶解した家兎抗ヒト胎盤フェリチン多クローニング抗体(IgG:コスモバイオ社)150  $\mu$ g/ml各wellに付着させ4°Cで24時間静置した。0.05%Tween-20, 0.1%ウシ血清アルブミン( BSA), 0.85%NaClを含むリン酸緩衝液で洗浄し、ついで1% BSAを含むリン酸緩衝液を加え、室温で1時間静置した。

洗浄後、赤血球溶血液を添加し37°C、2時間インキュベートし、再び洗浄後、单クローニング抗ヒトフェリチンHサブユニット抗体(rHO2; Ramco社)1 $\mu$ g/ml,

または単クローニ性抗ヒトフェリチンLサブユニット抗体 (LFO3; Ramco社) 2 $\mu$ g/mlを各wellに添加し, 37°C, 2時間インキュベートした。各wellを洗浄後, アルカリホスファターゼ標識家兎抗マウスIgG<sub>1</sub>またはIgG<sub>2b</sub>を加え, 室温で2時間静置した。再び洗浄後, 基質としてp-nitrophenylphosphateを37°C, 30分から2時間反応させ, EDTAにより反応を停止させ, 405nmで吸光度を測定した。

被検溶血液を還元しない状態で測定するために, 標準フェリチンとしてnativeの肝フェリチンを用いた。この肝フェリチンを, SDS-PAGE後coomassie brilliant blueで染色されたH, Lをデンシトメーターで測定するとH/L比が16:84であったので, ELISAの値はこれにより換算して各サブユニット値とした。有意差検定は, Student t-testにより行った。

4) 免疫化学染色 (APAAP法): DAKO社製AAPAAPキットを使用し, 一次抗体にELISA法で用いたRAMCO社製抗ヒトフェリチンH, Lサブユニット抗体を使用した。

## 結 果

健常人男性では, H 10.5 ± 1.3 attogram(ag)/cell(mean ± SE), L 5.9 ± 0.7 ag/cell, 女性ではH 5.4 ± 0.8 ag/cell, L 3.9 ± 0.5 ag/cellとH, Lとも女性は男性に比べ有意に低値を示した。RAではH 138.2 ± 72.0 ag/cell, L 57.0 ± 20.9 ag/cell, RAE BではH 97.4 ± 36.9 ag/cell, L 49.3 ± 18.4 ag/cell, AMLではH 69.8 ± 15.5 ag/cell, L 30.1 ± 9.7 ag/cellと男女合わせた健常人H 8.0 ± 0.8 ag/cell, L 4.8 ± 0.4 ag/cellに対し, いずれも有意な上昇を示した。両サブユニットの構成比を比較するためにH/L比を求めるとき, 健常人 1.8 ± 0.1に対し, RA 2.7 ± 0.5, AML 3.3 ± 0.8 と有意に高値を示した。このことからHサブユニットの相対的増加が示され, MDSにおける赤血球フェリチンの荷電の酸性化との関連が強く示唆された。

APAAP染色では, MDS患者の骨髄赤芽球の陽性率は, 正常検体に比してH, Lとも高値を示す傾向がみられた。また赤芽球系細胞でもその成熟段階により差異がみられ, より幼若な細胞ほど陽性度の強い傾向がみられた。症例数が少なく統計的検討はなされていないが, HがLに比較してやや高率に陽性を示す傾向がみられELISA法により測定した赤血球フェリチンH, Lサブユニット値の傾向とほぼ一致する結果であった。

## 考 案

血清フェリチンは, 体内貯蔵鉄を反映する指標として日常臨床の場で広く用いられている。しかし, その値が感染, 炎症, 組織破壊, 悪性腫瘍などの諸因子に少なからず影響を受ける点が問題とされる。赤血球フェリチンはこれらに影響されることが少なく, より正確に体内的鉄動態を反映すると考えられている。フェリチンの測定はこれまで, 抗肝または脾フェリチンを用いた塩基性フェリチンを用いる方法が主に利用されていた。しかし, この方法では悪性腫瘍と関連するとされる酸性フェリチンを測定しきれない可能性があった。さらに, 抗心, または抗HeLa細胞フェリチン抗体を用いて酸性フェリチンを測定する方法もあるが, 測定値に変動が多く実用には至っていない。その点H, Lサブユニットに対する単クローニ性抗体を用いた本測定法は, これらの問題点を解決し得るものと考えられる。正常赤血球では, 酸性フェリチンが塩基性フェリチンより多く, 種々の病態で変動することが知られている。私はこれまでに, MDSのRAにおいて赤血球フェリチンの著明な増加と荷電の酸性化を報告してきたが, 本測定法により両サブユニットがいずれもRA, RAE B, AMLで健常人に比べ有意に高値で, H/L比も有意に高値を示すことから, Hの増加が荷電の酸性化と関連があることが示唆された。MDSにおける赤血球フェリチンの増加の機序は不明であるが, 近年, 鉄の変動とは関係なくサイトカイン, ホルモン, および分化に際して, フェリチンHサブユニットの

mRNAの転写そのものが亢進することが明らかにされており今後の研究の進展が待たれる。

### 結 語

フェリチンH, Lサブユニットに対する单クローニ性抗体を用い, 2抗体サンドイッチELISA法を確立し, MDSにおける赤血球フェリチンについて検索したその結果, RAでH, L両サブユニットとも著明な増加を示し, H/L比の有意な増加から, Hサブユニットの相対的増加が示された。これらの変動はMDSにおける造赤血球能の異常, 無効造血と関係するものと考えられ, サブユニットレベルでの赤血球フェリチンの解析は, その病態を明らかにする上で有用なものと考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主査 教授 宮崎 保  
副査 教授 斎藤 和雄  
副査 教授 西 信三

## 学位論文題名

### 骨髓異形成症候群における赤血球フェリチン H, Lサブユニットの臨床的意義に関する研究

#### 目的

骨髓異形成症候群（MDS）は、1982年FABグループにより提唱された疾患群で、これまで前白血病状態と考えられていた概念を総括したものである。

その中で不応性貧血（RA）はその病態の基本とされ、その異常は主に赤血球系にあるとされている。著者はこれまで、MDSのRAにおいて赤血球フェリチンの増加と、荷電の酸性化を明らかにし、これらが造赤血球能の異常および無効造血と関連することを報告してきた。この酸性フェリチンの増加をサブユニットレベルで、明らかにする目的で、フェリチンH, Lサブユニットに対する单クローニ性抗体を用いたELISA法を確立し、MDSにおける赤血球について各サブユニット（H, L）量を直接測定し、その臨床的意義を検討し、さらに骨髓塗沫標本について同抗体を用いた免疫化学染色（APAAP法）による検索を行って検討した。

#### 方 法

1) 対象：対象は、MDS（RA 23例、RAEB 8例、CMML 2例）33例その他各種血液疾患、および健常人で、原則として、未治療で、輸血もされておらず、重篤な感染症、肝障害のないものとした。

2) 被検赤血球溶血液：患者より得られたヘパリン加静脈血をBeutlerらの方法に従い microcrystalline cellulose と  $\alpha$ -celluloseを重量比1:1に混合したカラムを通して白血球および血小板を除去し、低張液処理による溶血の後、10,000G 20分間遠心し上清を検体とした。

3) ELISA法：マイクロタイヤープレートに、多クローニ性抗胎盤フェリチン抗体を炭酸緩衝液に溶解後、付着させPBS Tweenで洗浄後BSAにてブロッキングを行い検体を添加した。つぎに、ラムコ社より入手した单クローニ性抗ヒトフェリチンHサブユニット抗体、またはLサブユニット抗体を加え反応させた。その後、アルカリホスファターゼ標識家兎抗マウスIgG<sub>1</sub>、またはIgG<sub>2b</sub>を添加し反応後、基質としてp-nitrophenylphosphateを反応させ、EDTAにより反応を停止させ、

405nmで吸光度を測定した。被検溶血液を還元しない状態で測定するため、標準フェリチンとしてnativeの肝フェリチンを用いた。これをSDS-PAGE後デンシトメーターで測定するとH, L比が16:84となりELISAの値はこれより換算し各サブユニット値とした。

4) 免疫化学染色（APAAP法）：DAKO社製AAPAPキットを使用し、

一次抗体にELISA法で用いたRAMCO社製抗ヒトフェリチンH, Lサブユニット抗体を使用した。

### 結 果

RAではH  $138.2 \pm 72.0$  ag/cell, L  $57.0 \pm 20.9$  ag/cell, RAE BではH  $97.4 \pm 36.9$  ag/cell, L  $49.3 \pm 18.4$  ag/cell, AMLではH  $69.8 \pm 15.5$  ag/cell, L  $30.1 \pm 9.7$  ag/cellと健常人H  $8.0 \pm 0.8$  ag/cell, L  $4.8 \pm 0.4$  ag/cellに対し、いずれも有意な上昇を示した。両サブユニットの構成比を比較するためにH/L比を求めるとき、健常人  $1.8 \pm 0.1$  に対し、RA  $2.7 \pm 0.5$ , AML  $3.3 \pm 0.8$  と有意に高値を示した。このことからHサブユニットの相対的増加が示され、MDSにおける赤血球フェリチンの荷電の酸性化との関連が強く示唆された。

APPAP染色では、MDS患者の骨髄赤芽球の陽性率は、正常検体に比してH, Lとも高値を示す傾向がみられた。さらに、赤芽球系細胞でもその成熟段階により差異がみられ、より幼若な細胞ほど陽性度の強い傾向がみられた。HがLに比較してやや高率に陽性を示す傾向がみられ、ELISA法により測定した赤血球フェリチンH, Lサブユニット値の傾向とほぼ一致する結果であった。

### 考 案

著者はこれまでに、MDSのRAにおいて赤血球フェリチンの著明な増加と荷電の酸性化を報告してきたが、本測定法により両サブユニットがいずれもRA, RAE B, AMLで健常人に比較して有意に高値で、H/L比も有意に高値を示すことから、Hの増加が荷電の酸性化と関連のあることが示唆された。MDSにおける赤血球フェリチンの増加の機序は不明であるが、近年、鉄の変動とは関係なくサイトカイン、ホルモン、および分化に関して、フェリチンHサブユニットのmRNAの転写そのものが亢進することが明らかにされてきており、今後の研究の進展が待たれる。

### 結 語

フェリチンH, Lサブユニットに対する单クローニング抗体を用い、両サブユニットを個々に測定するELISA法を確立し、MDSにおける赤血球フェリチンH, Lサブユニット値を測定して検討した。その結果、RAで両サブユニットとも著明な増加を示し、H/L比の有意な増加から、Hサブユニットの相対的増加が示された。骨髄塗沫標本に対する免疫化学染色においてもELISA法とほぼ一致する結果が認められた。これらの変動はMDSにおける造赤血球能の異常、無効造血と関係するものと考えられ、H, Lサブユニットレベルでの赤血球フェリチンの解析は、その病態を明らかにする上で有用なものと考えられた。

以上より、本研究は博士（医学）の学位論文として妥当なものと判断される。