

骨髓異形成症候群50例における赤血球膜蛋白および赤血球形態の検討

末盛 晋一郎

川崎医科大学内科学（血液），〒701-0192 倉敷市松島577

抄録 骨髓異形成症候群（myelodysplastic syndrome: MDS）における貧血の一因として、赤血球膜蛋白異常による溶血の関与を考え、その実態を明らかにする目的でMDS 50例の赤血球膜蛋白及び赤血球形態の評価を行なった。赤血球形態では、全症例に何らかの形態異常がみられ、90%の症例では複数の形態異常が混在してみられた。膜蛋白異常を有していたのは9例（18%）で、band 3単独部分欠損3例、P4.1単独部分欠損1例、P4.2単独部分欠損3例、band 7単独部分欠損2例であった。このうちband 3、P4.1単独部分欠損症例における膜蛋白異常と赤血球形態異常の関係は、先天性膜異常症のそれと同じであった。Band 3欠損症例3例についてband 3遺伝子検査を行なったところ、1症例に病因遺伝子変異と思われるミスセンス変異が同定された。

赤血球形態異常については、染色体異常20q⁻を有するMDS症例でelliptocytosisを呈する症例が存在することが報告されていることから検討を加えた。20q⁻を有する症例は8例存在し、そのうちelliptocytosisを呈していたのは6例（75%）であった。一方、20q⁻を有さない症例は38例で、そのうちelliptocytosisを呈していたのは24例（63.2%）であった。20q⁻の有無と末梢血のelliptocyteの割合について検定を行なった結果、有意差は認められず、20q⁻がelliptocytosisの病因である可能性は低いと考えられた。

（平成20年10月29日受理）

キーワード：骨髓異形成症候群，赤血球膜蛋白，赤血球形態，溶血性貧血，遺伝性球状赤血球症，バンド3

緒言

骨髓異形成症候群（myelodysplastic syndrome: MDS）は後天的な造血幹細胞レベルでの質的異常が病因とされている疾患である。本疾患では骨髓での造血は盛んであるにも関わらず、質的異常のため成熟途中で血球が破壊され、末梢血では血球減少を呈するいわゆる無効造血のパターンをとり、血球に様々な形態異常がみられることが特徴である。本疾患にみられる貧血は通常無効造血によるが、一部の症例では溶血所見がみられ、貧血の一因として溶血の関

与が示唆される。MDSの貧血における溶血の関与については、ヘモグロビン異常症の一つである α サラセミアと同様の所見を呈した症例の報告¹⁾や、赤血球膜蛋白異常症の一つである遺伝性橢円赤血球症（hereditary elliptocytosis: HE）と同様の所見を呈した症例の報告²⁾がなされている。

一方、赤血球膜蛋白異常については先天性膜蛋白異常症（遺伝性球状赤血球症、遺伝性橢円赤血球症、遺伝性有口赤血球の一部）において、膜蛋白異常と赤血球形態との関係について様々

別刷請求先
末盛晋一郎
〒701-0192 倉敷市松島577
川崎医科大学内科学（血液）

電話：086 (462) 1111
ファックス：086 (464) 1194
Eメール：suemori@med.kawasaki-m.ac.jp

な知見が得られている。遺伝性球状赤血球症 (hereditary spherocytosis: HS) での赤血球形態は有口～球状化 (stomatocytosis-spherocytosis) を特徴とし、これまでに spectrin, ankyrin, band 3, protein 4.2 (P4.2) に異常がみられることが判明している³⁾。また HE での赤血球形態は楕円化が特徴であり, spectrin, protein 4.1 (P4.1), band 3 に異常がみられることが知られている⁴⁻⁶⁾。遺伝性有口赤血球症 (hereditary stomatocytosis: HSt) では赤血球形態が有口化 (stomatocytosis) することが特徴である。その原因については未解明であるが, 一部の症例で band 7 部分欠損を呈することが知られている⁷⁾。

今回, MDS における溶血の原因として後天性赤血球膜蛋白異常に着目し, MDS 50 症例の赤血球膜蛋白及び赤血球形態の評価を行なった。さらに骨髓細胞染色体異常と赤血球形態の関係についても評価した。

対 象

2006年4月から2008年8月まで当科で経験した MDS 症例50例を対象とした (表1)。男性34例, 女性16例, 平均年齢は67.3歳であった。病型は FAB 分類⁸⁾ を用いた。

方 法

赤血球膜蛋白の調整

Ghost の調整は Dodge らの方法⁹⁾ に基づいて行ない, 溶血用緩衝液 (lysing buffer) [5 mmol/

1 Na₂HPO₄, 1 mmol/l EDTA, 0.2 mmol/l PMSF (pH 8.0)] に protease inhibitor として ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) と phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を加えた。赤血球を0.9%NaCl 溶液で3回洗浄後, 1容積の packed cell に対して30容積の lysing buffer を加えて低張溶血を行なった。5分間, 4℃にて静置した後, 30,000 × g, 10分, 4℃で遠心して赤血球膜蛋白成分とヘモグロビン成分を分離し, 上清のヘモグロビン成分を吸引除去した。この操作を6～7回繰り返していわゆる白色 ghost を獲得し, これを赤血球膜蛋白試料として以下の研究に使用した。

赤血球膜蛋白の分離と評価

各赤血球膜蛋白分画の分離は Fairbanks 法¹⁰⁾ (3.5～17% exponential gradient gel : アクリルアミド容量比3.5% : 17% = 35 : 8) による SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) を用いた。各膜蛋白分画の同定は SDS-PAGE 泳動後, ゲルを coomassie brilliant blue R-250 で染色し, 乾燥後, Protein+DNA Image Ware System (PDI-Toyobo Co., Tokyo, Japan) にて行なった。各膜蛋白の定量法は, 全膜蛋白分画 (band 1～7分画の総和) に対する各膜蛋白分画を百分率として表し, 対象症例と同時に同一ゲルで泳動を行なった健常コントロール3人の各分画染色濃度の平均値と比較して, 10%以上かつ2SD以上の減少を呈したものを膜蛋白欠損例とした。電気泳動に用いる赤血球膜蛋白量は25 μg/lane とし, 蛋白濃度の測定は, Lowry 法¹¹⁾ に基づく DC Protein Assay Kit (Bio Rad, CA) を使用し, 655 nm で測定した。

末梢白血球からの genomic DNA 抽出

ヘパリン加末梢血から buffy coat を採取し, 0.9%NaCl 溶液で3回洗浄した。Poncz らの方法¹²⁾ に従い, 溶血試薬液 (0.131 mol/l NH₄Cl, 0.9 mmol/l NH₄HCO₃) を加え, 赤血球を溶血させた後, 白血球分画に STE 溶液 [0.1 mol/l Tris,

表1 対 象

病型 (FAB分類)	RA	RARS	RAEB	RAEB-t	CMMoL	MDS → AML
症例数 (n)	36	3	6	0	1	4
性別 男 (n)	22	3	5	-	1	3
女 (n)	14	0	1	-	0	1
年齢平均 (歳)	66.5	65.3	70.5	-	77	69.0
範囲	32~90	53~81	62~80	-	-	63~72

RA: refractory anemia, RARS: refractory anemia with ring sideroblasts, RAEB: refractory anemia with excess of blasts, RAEB-t: refractory anemia with excess of blasts in transformation, CMMoL: chronic myelomonocytic leukemia, AML: acute myeloid leukemia

0.1 mol/l NaCl, 20 mmol/l EDTA (pH 7.5)] 9.5 ml, 10% SDS 0.5 ml, proteinase-K (10 mg/ml) 50 μ l を加え, 37°C で1晩静置した. 等量の10 mmol/l Tris-HCl (pH 8.0) 飽和フェノール溶液を加え, フェノール層を除去後, 1/25容積のイソアミルアルコールを加えたクロロホルムを等量加え, 水層を回収し, 3 mol/l sodium acetate (pH 5.2) を1/10容積加え, エタノールでDNAを沈殿させた. 70% エタノールで洗浄後, TE 緩衝液[10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA (pH 8.0)] に溶解して, 試料とした.

band 3遺伝子解析

末梢血白血球から抽出した genomic DNA を用いて, 20個の全エクソン領域ならびに周囲のイントロン領域, 及び promoter 領域につきそれぞれ PCR (polymerase chain reaction) を行い, 続いて PCR 産物のダイレクトシーケンスを行なった. 試薬として 20 pmol/ μ l の primer (sequence は文献13を参照), AmpliTag Gold (Applied Biosystems, USA) 1.25 U を用いた. Thermal cycler は GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) を用い, denaturation 95°C, 30 sec, annealing (温度は文献13を参照), 20 sec, extension 72°C, 30 sec, 35 cycle で PCR を行なった. なお exon7, 19では PCR の standard buffer に最終濃度が 2.4 mmol/l となるように MgCl₂ を追加した. また exon8 には MgCl₂ を最終濃度 2.4 mmol/l となるように追加し, さらに formamide を最終濃度 1% となるように追加した. 各 PCR 産物について BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) を用いてシーケンス用試料を調整し, ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) によりシーケンスを評価した.

末梢血赤血球形態の評価

末梢血赤血球形態評価の検体としてヘパリン加新鮮静脈血を用い, 1% glutaraldehyde 加 0.1 M リン酸 buffer (pH 7.4) による固定標本を作

表2 貧血, 溶血所見 (mean \pm SD)

赤血球数	302.6 \pm 89.3 ($\times 10^4/\mu$ L)
ヘモグロビン	10.0 \pm 2.8 (g/dL)
MCV	102.2 \pm 10.3 (fL)
MCH	33.2 \pm 4.0 (pg)
MCHC	32.4 \pm 1.3 (%)
網赤血球数	5.4 \pm 3.1 ($\times 10^4/\mu$ L)
血清間接ビリルビン	0.50 \pm 0.48 (mg/dL)

MCV: mean corpuscular volume, MCH: mean corpuscular hemoglobin, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration

製し, 走査電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察を行なった. 個々の症例で末梢血赤血球を無作為に500個観察し, Bessis の基準¹⁴⁾ に基づき細胞形態の評価を行なった. また健常人10人の固定標本を同様に作製, 観察し control とした. Poikilocytosis の定義は, 健常人10人の「形態異常のある赤血球の割合の平均値 + 2SD」以上存在する場合とし, 即ち stomatocytosis は stomatocyte \geq 12.6%, spherocytosis は spherocyte \geq 0.21%, 及び elliptocytosis は elliptocyte \geq 6.0% を満たすものとした.

個々の値は mean \pm SD で表記し, 2群間の有意差検定は t 検定を用いた.

なお, 本研究は川崎医科大学倫理委員会の承認を得たものである.

結 果

MDS 50症例の貧血, 溶血所見

MDS 50症例の貧血, 溶血所見のまとめでは中等度の貧血を呈し, 網赤血球は 5.4万 \pm 3.1万/ μ L とさほど減少はみられなかった (表2). 溶血を敏感に反映する血清ハプトグロビン値が感度未満であった症例が12例認められた.

溶血の評価には血清ハプトグロビン値, 網赤血球数を用い, 血清ハプトグロビン値感度未満 (血清ハプトグロビン値のみ48例解析), 網赤血球数 6万/ μ L 以上を溶血所見陽性とし, 血清ハプトグロビン値, 網赤血球数それぞれの度数分布を評価した (図1-A, B). 血清ハプトグロビン値が感度未満であったのは12例であり, 一方で網赤血球数 6万/ μ L 以上であったのは17例であった. さらに血清ハプトグロビン値感度未満かつ網赤血球数 6万/ μ L 以上を呈し,

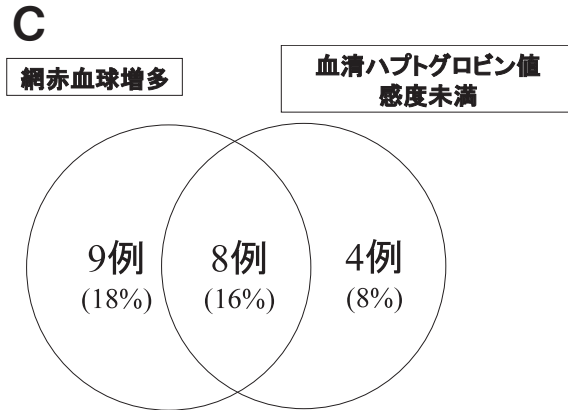
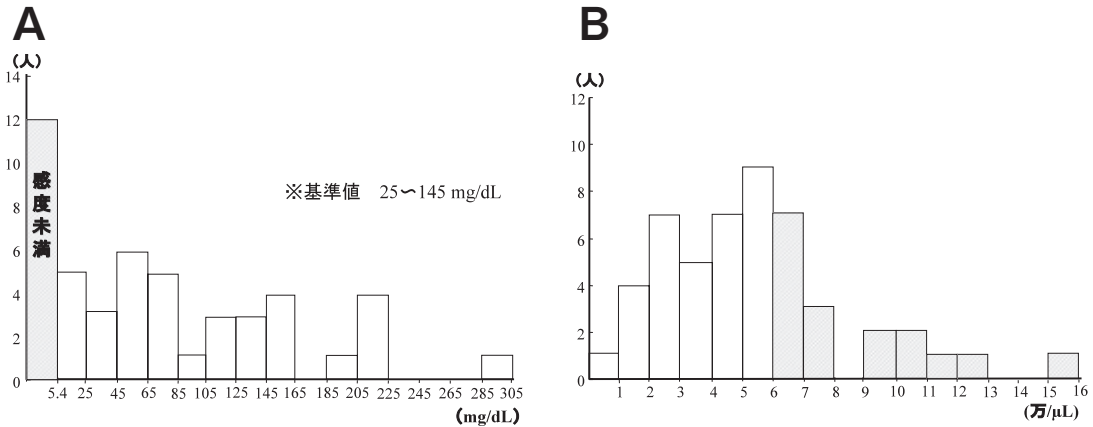


図1 溶血所見のまとめ
(A) 血清ハプトグロビン値度数分布 (B) 網赤血球度数分布 (C) 溶血所見の評価

表3 走査電子顕微鏡による赤血球形態評価 (mean ± SD)

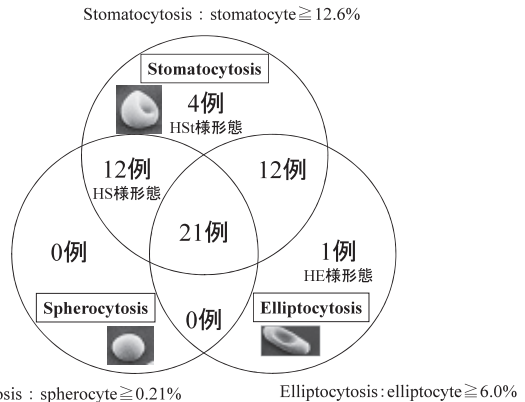
	Discocyte (%)	Stomatocyte (%)	Elliptocyte (%)	Spherocyte (%)	Leptocyte (%)	Echinocyte (%)	Schistocyte (%)	Target cell (%)	Tear drop cell (%)
健常人 (n=10)	89.0 ± 1.6	8.0 ± 2.3	2.2 ± 1.9	0.03 ± 0.09	0	0	0.18 ± 0.36	0	0
MDS (n=50)	46.8 ± 18.5	33.7 ± 14.5	12.3 ± 9.4	0.5 ± 0.6	1.9 ± 2.8	1.2 ± 3.2	2.9 ± 4.1	0.3 ± 0.4	0.03 ± 0.1
p=	<0.0001	<0.0001	0.0016	0.017	0.035	0.26	0.04	0.07	0.48

溶血の存在が強く示唆される症例は8例であった (図1-C).

走査電子顕微鏡による赤血球形態評価

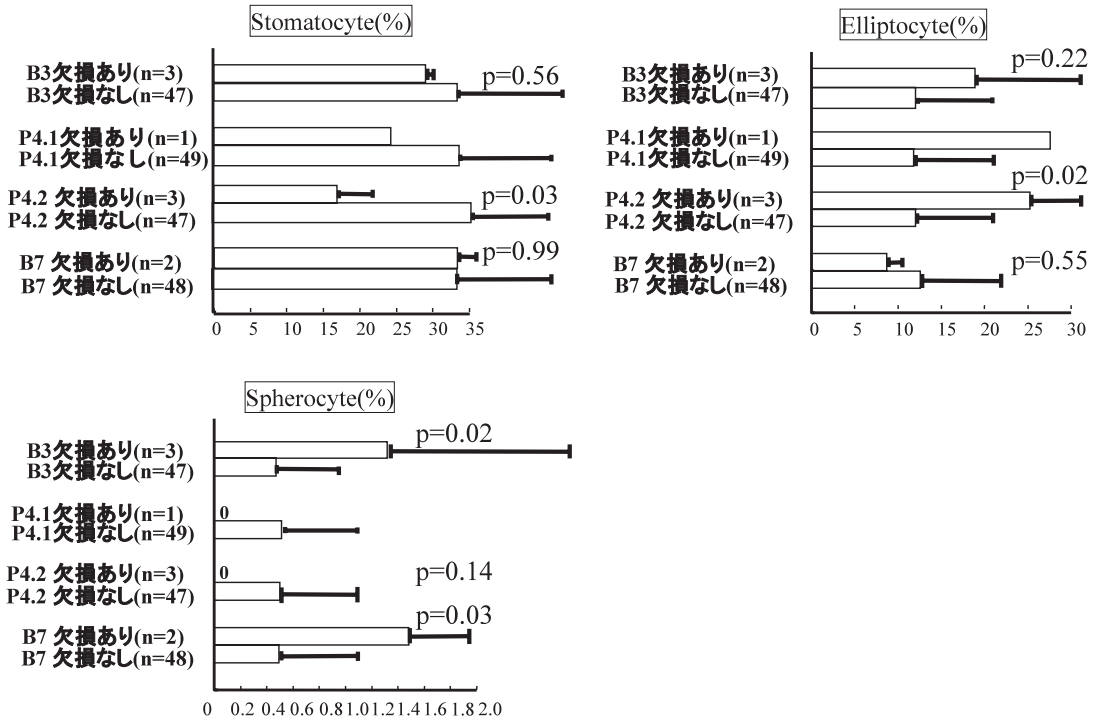
MDS 50症例の赤血球形態を走査電子顕微鏡を用いて健常人コントロール10例と比較検討した結果, MDS症例では正常な赤血球形態である discocyte の割合が低下しており, stomatocyte, elliptocyte, spherocyte, leptocyte, schistocyte の割合が増加していた (表3).

個々の症例の赤血球形態を評価した



Stomatocytosis : stomatocyte ≥ 12.6%
Spherocytosis : spherocyte ≥ 0.21%
Elliptocytosis : elliptocyte ≥ 6.0%
図2 MDS 50 症例の赤血球形態分類 (HS: 遺伝性球状赤血球症 HE: 遺伝性楕円赤血球症 HSt: 遺伝性有口赤血球症)

A



B

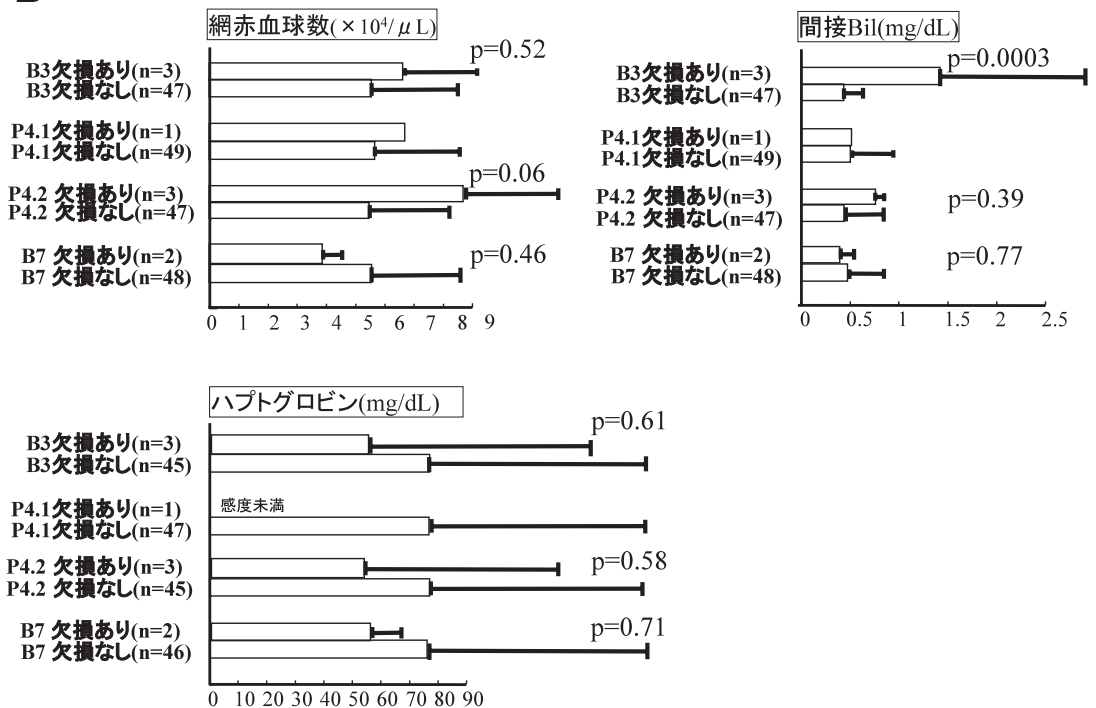


図3 (A) MDSにおける膜蛋白欠損と赤血球形態との相関
(B) MDSにおける膜蛋白欠損と溶血所見との相関

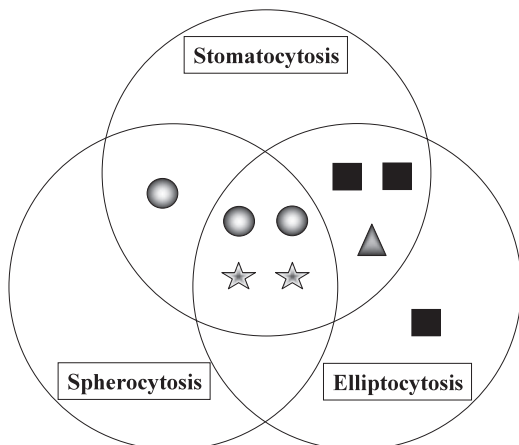
ところ、90%の症例で複数の赤血球形態異常が混在してみられた。このうち膜蛋白異常と関連する可能性のある赤血球形態である spherocyte, stomatocyte, elliptocyte について評価した(図2)。MDS 50症例のうち先天性膜異常症と同様の血球形態異常、即ち①球状赤血球症(stomatocyte~spherocyte)、②楕円赤血球症(elliptocyte)、③有口赤血球症(stomatocyte)がみられたのはそれぞれ12例(24%)、1例(2%)、4例(8%)であり、他の症例33例では異なった血球形態異常が混在していた。

SDS-PAGEによる赤血球膜蛋白解析

MDS 50症例全例に SDS-PAGE による赤血球膜蛋白解析を行なった結果、9例(18%)に先天性膜異常症でみられるような赤血球膜蛋白異常が認められた。その内訳は、band 3単独部分欠損3例、P4.1単独部分欠損1例、P4.2単独部分欠損3例、band 7単独部分欠損2例であった。

これらの膜蛋白欠損が先天性膜異常症と同様に赤血球形態異常と溶血に關与しているかどうかについて評価した。今回認められた MDS 50 症例の膜蛋白欠損と赤血球形態の相関を検討した結果、band 3単独部分欠損症例では球状化した赤血球の割合が増加し($p=0.02$)、HS 様であった。また P4.1欠損症例1例では楕円化した赤血球の割合が増加しており、HE 様であった。その一方で、P4.2単独部分欠損症例では有口化や楕円化した赤血球が増加し(それぞれ $p=0.03$, $p=0.02$)、band 7単独部分欠損症例では球状化した赤血球が増加しており($p=0.03$)、先天性赤血球膜異常症にみられる膜蛋白欠損と赤血球形態変化の關係とは一致していなかった(図3-A)。

次に MDS 症例の膜蛋白欠損と溶血所見について検討した。網赤血球数と各種膜蛋白欠損との間に有意な相関はみられなかったが、間接ビリルビン値については band 3欠損で高値を示していた($p=0.0003$)。血清ハプトグロビン値については P4.1欠損症例1例で感度未滿を呈していた(図3-B)。



● band 3単独部分欠損 ▲ P4.1単独部分欠損
■ P4.2単独部分欠損 ☆ band 7単独部分欠損
図4 膜蛋白欠損症例9例における赤血球形態評価

膜蛋白欠損症例9例における赤血球形態の評価

MDS 症例でみられた膜蛋白欠損と赤血球形態との關係について検討した結果、band 3単独部分欠損症例のうち1例の赤血球は、HS 様形態変化(stomatocyte~spherocyte)を呈し、他の2例はHS 様形態変化を示す血球に加え elliptocyte が混在していた。P4.1単独部分欠損症例の赤血球形態は elliptocyte と stomatocyte が混在していた。P4.2単独部分欠損症例の赤血球は elliptocytosis, stomatocytosis を呈しており、HS とは異なる形態変化を呈していた。Band 7単独部分欠損症例の赤血球は stomatocyte, spherocyte, elliptocyte が混在していた(図4)。

膜蛋白欠損症例9例における溶血所見及び赤血球形態の評価

膜蛋白欠損のみられた9例のうち血清ハプトグロビン値感度未滿かつ網赤血球数 $6 \text{ 万} / \mu\text{L}$ 以上と溶血所見を呈した症例は3例であり、これらにおける膜蛋白欠損のパターンは band 3, P4.1, P4.2単独部分欠損がそれぞれ1例ずつであった。このうち band 3欠損症例(図5-A)は赤血球形態においてHS 様形態変化である stomatocytosis~spherocytosis を呈していた。また P4.1欠損症例(図5-C)ではHE 様形態変化

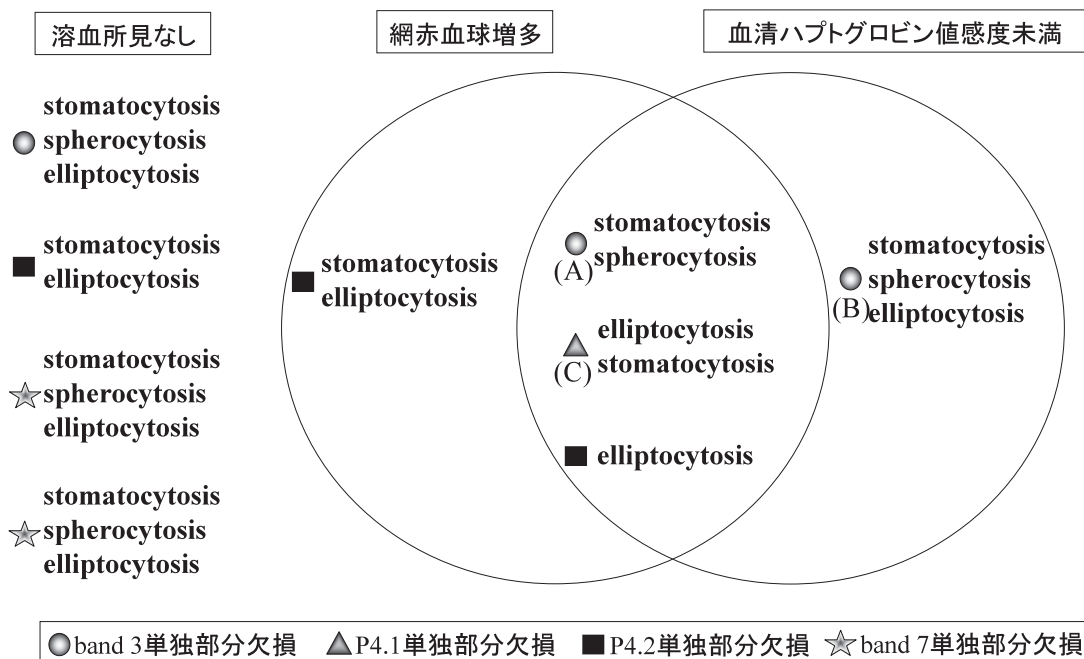


図5 膜蛋白欠損症例9例における溶血所見と赤血球形態

表4 band 3単独部分欠損を呈した3症例の検査所見

症例 No.	1	2	3
band 3遺伝子変異	E33G, heterozygote Y486C, heterozygote	病因遺伝子変異なし	IVS8, c → a, 65nt downstream end of Exon8, heterozygote
赤血球形態	stomatocytosis, spherocytosis	stomatocytosis, spherocytosis elliptocytosis	stomatocytosis, elliptocytosis, spherocytosis, leptocytosis, echinocytosis, schistocytosis, target cell (+)
溶血所見	ハプトグロビン感度未満 網赤血球数10.2万 / μL	ハプトグロビン感度未満 網赤血球数1.3万 / μL	ハプトグロビン164.5mg/dL 網赤血球数5.0万 / μL
band 3減少量	-14.0%	-14.0%	-11.0%
染色体検査	46, XX [20/20]	46, XY [20/20]	· 45, X, add(Y) (q11), -3, der(5)t(3;5)(q13;q13), del(7)(q?) [19/20] · 46, XY [1/20]
FAB分類	RA	RAEB	RAEB

RA: refractory anemia, RAEB: refractory anemia with excess of blasts

である elliptocytosis を呈していた。

次に網赤血球数増多はないものの血清ハプトグロビン値が感度未満で溶血の存在が示唆される症例の中に band 3単独部分欠損を有する症例(図5-B)が1例認められた。本例の赤血球形態はHS様形態変化である stomatocytosis~spherocytosis を呈していた。

一方、膜蛋白欠損がみられるものの、溶血所

見を呈していない症例が4例あり、その蛋白欠損のパターンは band 3, P4.2単独部分欠損がそれぞれ1例ずつ、band 7単独部分欠損が2例であった(図5)。

band 3単独部分欠損症例の解析

Band 3単独部分欠損を呈した3症例について遺伝子解析を行い、赤血球形態や臨床

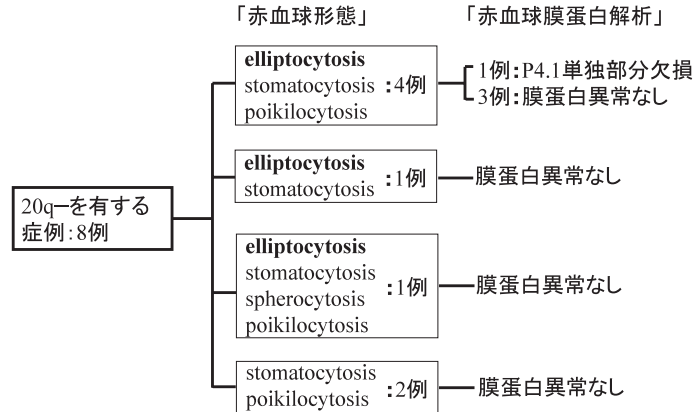


図6 20q⁻染色体異常と elliptocytosis, 膜蛋白異常との関係

像との相関について検討した(表4). 症例1は溶血所見が陽性で, 赤血球形態が stomatocytosis~spherocytosis を呈しており, HSと同様の所見であった. 本症例では band 3遺伝子解析にて, HSでは既報のないミスセンス変異が2種同定された. 症例2は, 溶血所見として血清ハプトグロビン値は感度未満であったが, 網赤血球数の増多はみられなかった. 赤血球形態についてはHS様形態変化を呈する血球と楕円化した血球とが混在してみられた. 遺伝子解析では病因となりうると考えられる band 3遺伝子変異はみられなかった. 症例3は band 3単独部分欠損を有していたものの, 溶血所見は認められなかった. また赤血球形態は stomatocytosis~spherocytosis を呈する血球とその他の形態変化を有する血球が混在してみられていた. 本例にはHSでの既報のない intron 領域の一塩基置換がみられた.

染色体異常と赤血球形態, 膜蛋白欠損との関連

G-band法による骨髓細胞染色体検査を施行し得たのは50例中46例であった. 膜蛋白欠損症例については, 各当該遺伝子座の存在する染色体の欠失は認められなかった. MDSにおける染色体異常と血球形態異常については20q⁻を有するMDS症例で elliptocytosis や P4.1異常を伴う症例が存在することが報告されている^{2,15-17)}. 20q⁻を有する8例について血球形態異常,

膜蛋白欠損を評価した(図6).

Elliptocytosisは6例(75%)でみられたものの, いずれの症例も他の血球形態異常を伴っていた. また, 20q⁻を有する症例のなかで P4.1単独部分欠損を有する症例が1例存在した. この症例の赤血球形態は elliptocyte, stomatocyte, その他の赤血球形態異常を有する赤血球が混在してみられた.

考察

MDS 50症例のうち, 血清ハプトグロビン値感度未満かつ網赤血球数増多と典型的な溶血所見を呈していたのは8例(16%)であった. しかしMDSでは骨髓不全の側面を有しているため, 溶血が存在する場合でも赤血球造血が不十分で網赤血球数が増加しえない可能性もありうる. このことを考慮すると, 血清ハプトグロビン値感度未満のみ呈している症例も溶血を伴っていると推測され, 最終的に溶血が存在する症例は12例(24%)と考えられた. 今回の検討では赤血球膜蛋白異常をその一因と考え, 膜蛋白解析を行なったところ膜蛋白異常を有する症例が9例みられた. MDSでみられる赤血球膜蛋白異常の報告としては症例報告しかなく, P4.1異常と楕円赤血球症を伴った症例の報告のみである^{2,16)}. 今回の検討では膜蛋白異常は band 3, P4.1, P4.2, band 7それぞれの単独部分欠損であり, P4.1異常以外の膜蛋白異常を呈する症例

が存在することが明らかとなった。

先天性膜蛋白異常と赤血球形態との関係については、まずHSでは赤血球形態は stomatocytosis~spherocytosis を特徴とし、これまでに spectrin, ankyrin, band 3, P4.2で膜蛋白異常がみられ³⁾、当該遺伝子異常に起因することが判明している。またHEでは赤血球形態は elliptocytosis を特徴として、spectrin, P4.1, band 3に膜蛋白異常がみられることが知られている⁴⁻⁶⁾。一方、HStでは stomatocytosis を呈することを特徴とするがその原因は未解明である。HStのなかでも hydrocytosis 型 HSt においては band 7部分欠損を呈することが報告されているが⁷⁾、病因としての band 7遺伝子異常によるものでなく、二次的な変化ととらえられている。今回 MDS で同定された膜蛋白異常を有する9例のうち、band 3単独部分欠損症例の赤血球形態は3例とも stomatocytosis~spherocytosis を呈し、HS でみられる赤血球形態変化と膜蛋白異常の関係と一致していた。うち2例は他の形態異常を伴っていたが、これは MDS が呈する多彩な形態異常の合併によるものと考えられた。P4.1単独部分欠損症例では、赤血球形態は elliptocytosis と stomatocytosis が混在していた。これは P4.1異常により HE と同様に elliptocytosis を呈し、それに MDS が呈する多彩な形態異常が合併したものと考えられた。P4.2欠損と先天性膜異常症との関係については、日本における HS 症例の45%で P4.2単独欠損を呈していることが報告されている¹⁸⁾。P4.2完全欠損症例は P4.2遺伝子異常に起因しているものの、P4.2部分欠損ではこれまでに調べられた症例においては、いずれも P4.2遺伝子異常に起因しておらず、一部の症例では band 3や ankyrin の遺伝子異常が同定されている^{12, 19)}。今回の MDS 症例でみられた P4.2部分欠損症例の赤血球形態は、spherocytosis を呈しておらず HS とは異なる形態変化を呈していた。以上のことから P4.2部分欠損そのものは spherocytosis に直接関与していないことが示唆される。Band 7については32 KDaのものは stomatin と呼ばれ、

HStの一部で欠損する例が認められている⁷⁾。しかしあくまで一部の症例にのみ見られること²⁰⁾、stomatin 遺伝子には変異が認められないこと²¹⁾、stomatin 減少を呈する症例でもその異常は末梢血の成熟細胞のみで、網赤血球では正常量が存在しているという報告²¹⁾や、stomatin の knock-out マウスでは有口赤血球症を呈しないと報告²²⁾されていることなどから、stomatin 減少が HSt の病因である可能性は低いと考えられている。今回 MDS 症例にみられた band 7欠損症例2例の赤血球形態は stomatocytosis を呈していたものの、spherocyte が混在している点で HSt とは異なっていた。今回検討した結果では、MDS 症例でみられた膜蛋白異常と赤血球形態異常の関係において、band 3, P4.1単独部分欠損症例3例では先天性膜蛋白異常症でみられる赤血球形態変化を伴っていることが明らかになった。また、いずれの膜蛋白欠損症例も形態変化の異なる赤血球が混在していたが、これは MDS が多彩な血球形態異常を有するという特徴が合併したものと考えられた。

また膜蛋白欠損と赤血球形態変化及び溶血所見について個々の症例について検討したところ、溶血所見が陽性でかつ膜蛋白異常と赤血球形態の関係が先天性膜蛋白異常症でみられるのと同じであったのは band 3単独部分欠損症例2例と P4.1単独部分欠損症例の3例であり(図5)、MDS 症例のなかに先天性膜蛋白異常症と同様の機序で溶血を呈する症例が存在することが明らかとなった。一方、P4.2単独部分欠損症例3例のうち溶血所見を呈していたのは1例のみであった。その赤血球形態は elliptocytosis を呈していて、膜蛋白異常と赤血球形態の相関が先天性膜蛋白異常症でみられる関係と異なっており、溶血の機序が先天性膜蛋白異常症とは異なっていることが示唆された。また band 7単独部分欠損症例2例についてはいずれも溶血所見を呈していなかった。さらに赤血球形態は stomatocyte と spherocyte, elliptocyte が混在していて、先天性膜蛋白異常症でみられる膜蛋白異常と赤血球形態の関係とは異なっていた。今

回の結果から少なくとも MDS でみられた band 7 単独部分欠損は、溶血には関与していないことが示唆された。

次に band 3 単独部分欠損を有する MDS 症例 3 例についてその詳細を検討した (表 4)。これら 3 例の赤血球形態はすべて stomatocytosis~spherocytosis を呈しており、赤血球形態と膜蛋白欠損の関連が HS 様であった。ただし、症例 2, 3 の赤血球形態はその他の形態変化も伴っており、これは他の要因が加わったためと考えられた。溶血所見がみられたのは症例 1, 2 で、HS 様形態変化に加えて溶血所見がみられ、貧血への関与が示唆される。このうち症例 1 は初診時に浸透圧抵抗試験で浸透圧抵抗の減弱が認められ、骨髓所見は異型性を伴わない赤芽球過形成を呈し、溶血所見、赤血球形態も含めて典型的な HS の所見を呈していた。その後、摘脾に不応性のため再検査したところ浸透圧抵抗試験は正常化しており、血液像は MDS RA (refractory anemia) の像に変化していた。本例は MDS の経過中に溶血クローンが一過性に無効造血クローンより優位に出現し、その後再び無効造血クローンが優位になったものと考えられた。次に症例 2 は初期に band 3 欠損を呈していたが、再検査には band 3 量が正常化していたことから、後天的に一過性に band 3 減少を呈したものと考えられた。症例 1, 2 にみられた異常はいずれも一過性であった。MDS は染色体異常を有していなくてもテロメア長に変化を生じていることがあり、テロメア長が短くなれば genome の不安定化を呈することが示唆されている²³⁾。今回経験した症例にみられた一過性の異常は、genome の不安定化を反映したものだったのかもしれない。一方、症例 3 では赤血球形態と膜蛋白欠損の関連は HS 様であったものの、溶血所見を呈していなかった。このことについて、現時点ではその原因は不明である。

Band 3 欠損症例については、全例に band 3 遺伝子解析を行なったところ、症例 1, 3 に遺伝子変異が同定された。症例 1 では Y486C、

E33G という HS では既報にないミスセンス変異のヘテロ接合体が認められた。現在までに報告されている HS における band 3 遺伝子のミスセンス変異は cytoplasmic domain (B3CD) に 6 種、transmembrane domain (B3MD) に 20 種と B3MD に多くみられている²⁴⁾。B3MD に位置するミスセンス変異については Quilty ら²⁵⁾ が 7 種のミスセンス変異について検討したところ、これらの変異 band 3 蛋白が赤血球膜に組込まれていないことを証明し、膜貫通部ドメインに生じた HS ミスセンス変異由来の変異蛋白は、膜に組み込まれないのではないかと推察している。今回認められた変異 Y486C は膜貫通部に位置しており、変異蛋白が赤血球膜に組み込まれなかったため band 3 量が減少した可能性がある。一方、E33G は B3CD に位置している。B3CD にはアンカー蛋白等の膜蛋白やヘモグロビン、解糖系酵素との結合部位が存在する。このうち膜蛋白との結合部位について、E33 は現在までに報告されている ankyrin との結合部位²⁶⁻²⁸⁾、P4.1 との結合部位²⁹⁾ には位置していない。また band 3 の P4.2 結合部位については、band 3 変異のうち P327R (B3 Tuscaloosa)³⁰⁾、E40K (B3 Montefiore)³¹⁾、G130R (B3 Fukuoka)³²⁾ で P4.2 量が減少することが知られていることから、これらの部位に P4.2 の結合部位が存在すると考えられるが、E33 はこれらの部位にも属しておらず、変異 E33G が相互の膜蛋白結合に影響を及ぼしている可能性は低いと思われる。

症例 2 では病因となりうる遺伝子変異はみられなかったが、今回行なったダイレクトシーケンスでは複数の exon にまたがるような広範囲な遺伝子の欠失を同定することが不可能である。実際に MDS では染色体レベルでの広範囲な遺伝子欠失をしばしば伴っていることから、十分に評価できていない可能性がある。また、epigenetic な要因が存在した可能性も否定できないと思われる。症例 3 では intron 8 に一塩基置換がみられ、スプライシング異常が生じた可能性が否定しえないが、今回はスプライシング異常の有無については検討できなかったため、

詳細は不明である。

MDSにおける染色体異常と赤血球形態異常については、20q⁻を有する症例で、膜蛋白異常がなく elliptocytosis を伴う例があることが報告されている¹⁵⁾。また、20q⁻と血球形態変化について Kurtin ら³³⁾ は、20q⁻を有する慢性骨髄増殖性疾患で、elliptocytosis, oval macrocyte や megaloblastoid maturation, dyserythropoiesis, ringed sideroblast がみられる症例があり、20q⁻が赤血球形態に何らかの影響を及ぼしていることを推測している。我々の検討では、20q⁻を有する症例が8例あり、そのうち elliptocytosis を伴う症例は75%にあたる6例であった。一方、20q⁻を伴わない症例は38例であり、これらのうち elliptocytosis を呈していたのは63.2%にあたる24例であった。20q⁻を有する症例と有しない症例の末梢血の elliptocyte の割合は、おのおの13.9% ± 8.0, 11.6% ± 9.8であった。20q⁻の有無と末梢血の elliptocyte の割合について有意差検定を行なったところ p=0.55で、20q⁻の有無と末梢血の elliptocyte の割合との間には有意な相関を認めず、20q⁻が elliptocytosis の病因である可能性は低いと考えられた。

今回の検討の結果、全症例に何らかの赤血球形態異常がみられ、90%の症例では複数の形態異常が混在してみられた。

またMDS 50症例のうち3例(6%)と少数ではあるが、後天的に先天性膜蛋白異常症にみられる蛋白異常と赤血球形態の関係、さらには溶血を呈する症例が存在することが明らかになった。家族歴が明らかでない症例や、高齢者の非免疫学的機序による溶血性貧血に遭遇した場合には、MDSの存在も考慮すべきと思われる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った川崎医科大学血液内科 杉原尚教授、和田秀穂教授、中西秀和講師に深甚なる謝意を表します。また、御援助を頂いた川崎医科大学血液内科 江田佐久良女史に深く感謝いたします。

なお、本研究は、川崎医科大学プロジェクト研究費

(17-206S, 18-213T, 19-211S, 20-203S) の援助により行われた。

引用文献

- 1) Steensma DP, Viprakasit V, Hendrick A, Goff DK, Leach J, Gibbons RJ, Higgs DR : Deletion of the α -globin gene cluster as a cause of acquired α -thalassemia in myelodysplastic syndrome. *Blood* 103 : 1518-1520, 2004
- 2) Hur M, Lee KM, Cho HC, Park YI, Kim SH, Chang YW, Kim YR, Cho HI : Protein 4.1 deficiency and deletion of chromosome 20q are associated with acquired elliptocytosis in myelodysplastic syndrome. *Clin Lab Haematol* 26 : 69-72, 2004
- 3) Eber S, Lux SE : Hereditary spherocytosis-defects in proteins that connect the membrane skeleton to the lipid bilayer. *Semin Hematol* 41 : 118-141, 2004
- 4) Lux SE, Palek J : Disorders of the red cell membrane. *In* : *Blood : Principles and practice of hematology* (eds by Handin RI et al) , Philadelphia, Lippincott. 1995, pp1701-1818
- 5) Yawata Y, Kanzaki A, Inoue T, Ata K, Wada H, Okamoto N, Higo I, Yawata A, Sugihara T, Yamada O : Red cell membrane disorders in the Japanese population : Clinical, biochemical, electron microscopic, and genetic studies. *Int J Hematol* 60 : 23-38, 1994
- 6) Gallagher PG, Forget BG, Lux SE : Disorders of the erythrocyte membrane. *In* : *Hematology of infancy and childhood* (eds by Nathan DG & Orkin SH). Philadelphia, WB Saunders. 1998, pp544-664
- 7) Lande WM, Thiemann PV, Mentzer WC Jr : Missing band 7 membrane protein in two patients with high Na, low K erythrocytes. *J Clin Invest* 70 : 1273-1280, 1982
- 8) Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C : Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 51 : 189-199, 1982
- 9) Dodge JT, Mitchell C, Hanahan DJ : The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 100 : 119-130, 1963
- 10) Fairbanks G, Steck TL, Wallach DFH : Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10 : 2606-2617, 1971
- 11) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ :

- Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 265-275, 1951
- 12) Poncz M, Solowiejczyk D, Harpel B, Mory Y, Schwartz E, Surrey S : Construction of human gene libraries from small amounts of peripheral blood : Analysis of β -like globin genes. *Hemoglobin* 6 : 27-36, 1982
 - 13) 賀来万由美 : 赤血球膜蛋白 protein 4.2異常症の病態分析と病因解析に関する研究 . 川崎医学会誌 24 : 243-260, 1998
 - 14) Bessis M, Weed RI, Leblond PF : Red Cell Shape : Physiology, Pathology, Ultrastructure. New York, Springer-Verlag. : 1973, pp1-25
 - 15) Ishida F, Shimodaira S, Kobayashi H, Saito H, Kaku M, Kanzaki A, Yawata Y, Kitano K, Kiyosawa K : Elliptocytosis in myelodysplastic syndrome associated with translocation (1;5)(p10;q10) and deletion of 20q. *Cancer Genet Cytogenet* 108 : 162-165, 1999
 - 16) Ideguchi H, Yamada Y, Kondo S, Tamura K, Makino S, Hamasaki N : Abnormal erythrocyte band 4.1 protein in myelodysplastic syndrome with elliptocytosis. *Br J Haematol* 85 : 387-392, 1993
 - 17) Rummens JL, Verfaillie C, Criel A, Hidajat M, Vanhoof A, Van den Berghe H, Louwagie A : Elliptocytosis and schistocytosis in myelodysplasia: report of two cases. *Acta Haematol* 75 : 174-177, 1986
 - 18) Yawata Y, Kanzaki A, Yawata A, Doerfler W, Özcan R, Eber SW : Characteristic features of the genotype and phenotype of hereditary spherocytosis in the Japanese population. *Int J Hematol* 71 : 118-135, 2000
 - 19) 中西秀和 : 日本人の遺伝性球状赤血球症における ankyrin 遺伝子変異の解析 . 川崎医学会誌 28 : 73-82, 2002
 - 20) Kanzaki A, Yawata Y: Hereditary stomatocytosis: Phenotypical expression of sodium transport and band 7 peptides in 44 cases. *Br J Haematol* 82 : 133-141, 1992
 - 21) Fricke B, Argent AC, Chetty MC, Pizzey AR, Turner EJ, Ho MM, Iolascon A, Düring M, Stewart GW : The "stomatin" gene and protein in overhydrated hereditary stomatocytosis. *Blood* 102 : 2268-2277, 2003
 - 22) Zhu Y, Paszty C, Turetsky T, Tsai S, Kuypers FA, Lee G, Cooper P, Gallagher PG, Stevens ME, Rubin E, et al. : Stomatocytosis is absent in "stomatin"-deficient murine red blood cells. *Blood* 93 : 2404-2410, 1999
 - 23) Ohyashiki JH, Iwama H, Yahata N, Ando K, Hayashi S, Shay JW, Ohyashiki K : Telomere stability is frequently impaired in high-risk groups of patients with myelodysplastic syndromes. *Clin Cancer Res* 5 : 1155-1160, 1999
 - 24) 八幡義人 : 10章 第VI期 : 解析の遅れた遺伝性球状赤血球症の謎 . 赤血球膜研究史 基礎科学と臨床医学が織りなす一世紀, 大阪, 医薬ジャーナル. 2007, pp170-204
 - 25) Quilty JA, Reithmeier RA : Trafficking and folding defects in hereditary spherocytosis mutations of the human red cell anion exchanger. *Traffic* 1 : 987-998, 2000
 - 26) Davis L, Lux SE, Bennett V : Mapping the ankyrin-binding site of the human erythrocyte anion exchanger. *J Biol Chem* 264 : 9665-9672, 1989
 - 27) Willardson BM, Thevenin BJ, Harrison ML, Kuster WM, Benson MD, Low PS : Localization of the ankyrin-binding site on erythrocyte membrane protein, band 3. *J Biol Chem* 264 : 15893-15899, 1989
 - 28) Ding Y, Kobayashi S, Kopito R : Mapping of ankyrin binding determinants on the erythroid anion exchanger, AE1. *J Biol Chem* 271 : 22494-22498, 1996
 - 29) Lombardo CR, Willardson BM, Low PS : Localization of the protein 4.1-binding site on the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3. *J Biol Chem* 267 : 9540-9546, 1992
 - 30) Jarolim P, Palek J, Rubin HL, Prchal JT, Korsgren C, Cohen CM : Band 3 Tuscaloosa : Pro327→ Arg327 substitution in the cytoplasmic domain of erythrocyte band 3 protein associated with spherocytic hemolytic anemia and partial deficiency of protein 4.2. *Blood* 80 : 523-529, 1992
 - 31) Rybicki AC, Qui JJ, Musto S, Rosen NL, Nagel RL, Schwartz RS : Human erythrocyte protein 4.2 deficiency associated with hemolytic anemia and a homozygous 40 glutamic acid → lysine substitution in the cytoplasmic domain of band 3 (band 3 Montefiore) . *Blood* 81 : 2155-2165, 1993
 - 32) Inoue T, Kanzaki A, Kaku M, Yawata A, Takezono M, Okamoto N, Wada H, Sugihara T, Yamada O, Katayama Y, et al. : Homozygous missense mutation (band 3 Fukuoka : G130R) : A mild form of hereditary spherocytosis with near-normal band 3 content and minimal changes of membrane ultrastructure despite moderate protein 4.2 deficiency. *Br J Haematol* 102 : 932-939, 1998
 - 33) Kurtin PJ, Dewald GW, Shields DJ, Hanson CA : Hematologic disorders associated with deletions of

chromosome 20q: a clinicopathologic study of 107

patients. Am J Clin Pathol 106 : 680-688, 1996

Analyses of red cell membrane proteins and red cell morphology in 50 patients with myelodysplastic syndrome

Shinichiro SUEMORI

Division of Hematology, Department of Medicine, Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan

ABSTRACT I hypothesize that, in part, the hemolysis in myelodysplastic syndrome (MDS) is the result of membrane protein disorders. I evaluated erythrocyte membrane protein and the shape of erythrocytes in 50 cases of MDS. All 50 MDS cases exhibited some changes in erythrocyte shape. Almost all of the cases (90%) had multiple changes in erythrocyte shape. There were nine cases (18%) with membrane protein disorders. Three of these nine cases showed a partial band 3 deficiency, one case showed a partial P4.1 deficiency, three cases showed a partial P4.2 deficiency, and two cases showed a partial band 7 deficiency. The shape of erythrocytes in the cases with a partial deficiency of band 3 and P4.1 was the same as that encountered in congenital erythrocyte membrane protein disorders. When we checked the band 3 gene of the three cases with band 3 partial deficiency, one case had a missense mutation that was supposed to be pathogenic. Some previous studies have reported the presence of elliptocytosis in some MDS cases with del (20q). When we checked the chromosome, eight cases had del (20q), and six of these eight (75%) showed elliptocytosis. However, 24 out of 38 cases (63.2%) without del (20q) also showed elliptocytosis. Therefore, it is suggested that del (20q) may not affect erythrocyte shape.

(Accepted on October 29, 2008)

Key words : Myelodysplastic syndrome , Red cell membrane protein , Red cell morphology , Hemolytic anemia , Hereditary spherocytosis , Band 3

Corresponding author
Shinichiro Suemori
Division of Hematology, Department of Medicine, Kawasaki
Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192,
Japan

Phone : 81 86 462 1111
Fax : 81 86 464 1194
E-mail : suemori@med.kawasaki-m.ac.jp