◆原 著◆

All-*trans* retinoic acid 治療中の急性前骨髄球性白血病 患者より分離した白血病細胞の組織因子及び トロンボモジュリンの変動に関する検討

小 口 淳* 森岡 真知子* 小 尾 直 美*
宮 本 博 史* 西 田 淳 二* 木 下 忠 俊*

Changes of Tissue Factor and Thrombomodulin Levels in Isolated
Leukemic Cells from a Patient with Acute Promyelocytic Leukemia
during All-*trans* Retinoic Acid Therapy

Atsushi OGUCHI, Machiko MORIOKA, Naomi OBI, Hirofumi MIYAMOTO,
Junji NISHIDA and Tadatoshi KINOSHITA

Key words : all-*trans* retinoic acid (ATRA), acute promyelocytic leukemia (APL),
disseminated intravascular coagulation (DIC), tissue factor (TF),
thrombomodulin (TM)

All-*trans* retinoic acid (ATRA) is an epoch-making agent for the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL), because the mechanism of remission induction is due to induce the differentiation of APL cells, but not to kill the cells. Noticeably, it rapidly improves complicating disseminated intravascular coagulation (DIC). This implies that ATRA may specifically affect the expression of procoagulant activity of APL cells.

We studied the changes of tissue factor (TF) activity, TF mRNA, thrombomodulin (TM) antigen, TM cofactor activity and plasminogen activator (PA) activity in leukemic cells of an ATRA-treated APL patient accompanied by DIC.

TF activity of the APL cells decreased by half and the TM cofactor activity showed twofold increase within 2 days after the ATRA treatment, as compared with pretreatment cells. The abnormalities of plasma coagulation-fibrinolytic parameters began to improve in accordance with these changes, and DIC was subsided by day 5. TF mRNA which was detected by RT-PCR in pretreatment leukemic cells, was undetectable on 4 days after ATRA treatment. Morphological changes of APL cells examined by light microscopy were not apparent until day 8.

These results demonstrate that DIC improvement is due to the synergistic effects of decrease of TF and increase of TM in the APL cells induced by ATRA. These phenomena

* 帝京大学医学部第一内科 [〒173 東京都板橋区加賀 2-11-1]; Department of First Internal Medicine, Teikyo University School of Medicine, Kaga, 2-11-1, Itabashi-ku, Tokyo, Japan
受付 : 1995. 11. 9, 受理 : 1996. 3. 8.

were observed in very early phase, and thus it is suggested that ATRA modulates directly the production of TF and TM in the leukemic cells, apart from the effect on cell differentiation.

緒 言

近年, 急性前骨髄球性白血病 (acute promyelocytic leukemia: APL) の治療に用いられるようになった all-trans retinoic acid (ATRA) は, 癌細胞の死滅を目的とする従来の抗癌剤とは異なり, 癌細胞の分化を促進して寛解導入を計る画期的な治療薬である¹⁾. ATRA の臨床応用は APL に限られるが, 初回寛解導入の成功率は 80% をこえている²⁾.

APL は染色体異常 t(15;17)(q22;q21) を特徴とし, 遺伝子再構成により生じたキメラ蛋白 PML/RAR α が幼若白血球(前骨髄球)の正常分化を妨げ, 白血病発症の要因になっていると推測されている³⁾. RAR α (retinoic acid receptor α) はレチノイドのレセプターとして, 細胞の分化増殖に関与する核内蛋白である⁴⁾が, APL では PML/RAR α が細胞質にまで分布し⁵⁾, これが本来のレチノイドの核内作用を妨げるバリアーになっていると考えられている. 大量の ATRA 投与はこの分化阻止機構を解除する方向に働いて, 白血病を治癒に導くと考えられている.

ATRA 投与によって APL 細胞が消失して寛解導入までに要する期間は 大野ら⁶⁾ の報告によると平均 29 日 (中央値) であるが, 合併する播種性血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation: DIC) は, ATRA 投与後ほぼ一週間以内に改善する⁷⁾. APL では初診時より DIC を合併して出血症状を呈することが多く⁸⁾, そのコントロールは APL 治療の成否を左右する.

白血病に合併する DIC の発症要因として, ①白血病患者細胞崩壊に伴う凝固・線溶系活性物質の放出⁹⁾, ②白血病患者細胞からの組織因子の分泌¹⁰⁾¹¹⁾, ③白血病患者由来のサイトカインによる血管内皮細胞の抗凝固的性状の変化¹²⁾¹³⁾ な

どが指摘されている. しかし DIC は, 抗癌剤投与後, 急激に白血病患者細胞が減少する際に増悪することが多く⁹⁾, これに伴う DIC 惹起物質の放出が, その発症主因と考えるのが妥当と思われる. なかでも組織因子 (tissue factor: TF) が, その代表的な惹起物質であることは, 既に多くの臨床研究によって明らかにされている¹⁴⁾¹⁵⁾. TF は, Ca イオンの存在下に第 VII 因子 (F.VIIa) と複合体を形成し, 第 IX 因子 (F.IX) 並びに第 X 因子 (F.X) を活性化して血液凝固反応を始動させる¹⁶⁾. APL 細胞には多量の TF が含有される¹⁷⁾ ため, APL に DIC は必発となる.

一方, トロンボモジュリン (thrombomodulin: TM) は, 血管内皮細胞¹⁸⁾ や, 白血病患者細胞にその発現が確認されており¹⁹⁾, トロンビンと結合してこれを不活性化するのみならず, プロテイン C を活性化して血液凝固反応を抑制する²⁰⁾. したがって白血病患者細胞において, TF 減少と TM 増加とが相乗的に作用した場合, DIC は速やかに改善すると推測される.

ATRA は, 培養ヒト血管内皮細胞²¹⁾ や APL 由来培養白血病患者細胞株²²⁾ において TF を減少させるとともに, TM を増加させる. De Stefano ら²³⁾ は APL 患者から得た骨髄の白血病患者細胞に ATRA を添加して培養すると, 白血病患者細胞の TF が減少することを報告している. これらの実験結果は, APL における ATRA の DIC 改善が, TF 減少及び TM 増加の相乗効果による事を強く示唆している.

最近, Falanga ら²⁴⁾ は ATRA 治療中の患者 APL 細胞を採取し, その凝固活性を①治療前, ②DIC の軽快した治療開始 7~10 日後, ③完全寛解に入った時期の計 3 点において測定し, 生体内においても, ATRA 治療後に APL 細胞の凝固活性が低下している事を示した. しかし, 1) ATRA 開始後のどの時点で APL 細胞の TF 減少が生じ, これが如何なる凝血学的パラメー

ターの変動と平行しているのか、II)凝固異常の改善と細胞分化の間にはどのような関連があるのか、といった問題点はなお明らかではない。

本研究において、われわれは ATRA 治療中の DIC 併発 APL 患者末梢血より APL 細胞を経時的に採取し、TF 活性の測定および TF mRNA の定量を行った。またこれに加えて TM 抗原の定量、TM 活性の測定を行い、これら APL 細胞の凝固・抗凝固活性の変動並びにその形態変化を観察し、DIC 改善との相互関係を検討したので報告する。

症例提示

1) 現病歴・既往歴

26 歳女性。平成 6 年 5 月上旬、口内炎とともに下腿に紫斑が出現し近医受診。末梢血液検査にて幼若白血球の出現を指摘され、同年 5 月 12 日当院紹介入院となった。学童期に中耳炎の既往がある以外に特記すべき既往歴はない。

2) 入院時現症・検査所見

身長 155 cm、体重 47 kg、体温 37.4°C。意識清明。口唇には点状出血が散在し、左眼瞼、右下腿に紫斑を認めた。不正性器出血が入院 2 日前より持続していた。入院時の末梢血の血液検査では白血球：5,100/ μ l（骨髓芽球：3%，前骨髓球：68%，骨髓球：3%，分葉好中球：2%，リンパ球：23%，好塩基球 1%）、血小板：1.0 $\times 10^4$ / μ l、血色素量：5.6 g/dl であった。骨髓穿刺では有核細胞数 16.6 $\times 10^4$ / μ l のうち 88.6% が前骨髓球で、これらは核の異形性が強く Azur 顆粒豊富で、一部の細胞には Auer 小体が認められた。

凝血学的検査では、プロトロンビン時間 (prothrombin time: PT): 14.3 秒、活性化部分トロンボプラスチン時間 (activated partial thromboplastin time: APTT): 34.8 秒、フィブリノゲン (fibrinogen: Fbg.): 115 mg/dl、可溶性フィブリンモノマー複合体 (soluble fibrin monomer complex: SFMC): 3+, トロンビン・アンチトロンビン III 複合体 (thrombin・anti-thrombin III complex: TAT): 29.6 μ g/l、フィブリノゲン・フィブリン分解産物 (fibrinogen and fibrin degradation products:

FDP): 114.5 μ g/l、プラスミン・プラスミンインヒビター複合体 (plasmin・plasmin inhibitor complex: PIC): 7.1 μ g/ml であった。骨髓細胞の染色体分析の結果は 46,XX, t(15;17)(q22;q21) であり、遺伝子解析により PML/RAR α キメラ遺伝子の存在を確認した。その他の検査所見を Table 1 に示す。

3) 経過

以上の結果より本例を DIC を合併した APL と診断し、家族の同意を得て直ちに ATRA 60 mg/日 (分 3) の経口投与を開始した。投与 8 日までは APL 細胞数やその形態に著明な変化は認められなかったが、凝血学的検査値は投与 2 日目より軽快傾向を示し始め、投与 5 日目には、PT: 13.5 秒、APTT: 30.8 秒、Fbg.: 250 mg/dl、SFMC: (－)、TAT: 8.0 μ g/l、PIC: 1.6 μ g/ml、FDP: 7.6 μ g/ml、血小板 6.9 $\times 10^4$ / μ l となった。この時点で DIC は改善したと判断した。以後 SFMC と FDP は正常値を維持していた (Fig. 1)。

しかし、第 10 病日に白血球が 21,600/ μ l に増加し、体温は 39°C に上昇、両肺野には淡い間質性陰影が認められたため retinoic acid syndrome²⁵⁾ の合併と診断し、メチルプレドニゾン 1 g を 3 日間連続で投与するとともに化学療法 (behenoyl Ara C: 200 mg $\times$ 3 日間および daunorubicin: 40 mg $\times$ 3 日間) を併用した。この間 ATRA は一時中止したが、その後再開し計 18 日間の投与後、末梢血より APL 細胞は消失した。骨髓検査においても骨髓芽球+前骨髓球の比率は 1%未満であり、細胞学的に完全寛解状態に入ったと判断した。この際、PML/RAR α の PCR 法による検出検査は施行していないが、染色体分析により 46,XX と正常核形に戻っている事を確認した。なお ATRA 投与中ヘパリン等の抗凝固療法は施行しなかった。

試薬および方法

1) 試薬

使用した試薬を記す。入手先は括弧 () 内に記載した。キットは「」で示した。ヒトウロキナーゼ、ヒトトロンビンおよびヒトアンチトロンビン III (ミドリ十字)、ヘパリンナトリウム

Table 1: Laboratory findings of the APL patient on admission

Hemogram		Coagulation/Fibrinolysis	
RBC	$173 \times 10^4 / \mu l$	PT	14.3 秒
Hb	5.6 g/dl	INR	1.25
Ht	15.8%	APTT	34.8 秒
platelet	$1.0 \times 10^4 / \mu l$	Fibrinogen	115 mg/dl
WBC	5,100 / μl	ATIII	86%
Myeloblast	3%	SFMC	3+
Promyelocyte	68%	TAT	29.6 $\mu g/l$
Metamyelocyte	3%	FDP	114.5 $\mu g/ml$
Neutrophil	2%	PIC	7.1 $\mu g/ml$
Lymphocyte	23%		
Basophil	1%		
Bone Marrow		Serological Examinations	
有核細胞数	$16.6 \times 10^4 / \mu l$	CRP	0.9 mg/dl
M/E=35.9		TPHA	(-)
Myeloblast	0.6%	STS	(-)
Promyelocyte	88.6%		
Myelocyte	2.8%		
Metamyelocyte	0.2%		
Neutrophil	1.2%		
Lymphocyte	4.0%		
Erythroblast	2.6%		
Urynalysis		Biochemistry	
yellowish brown, clear		T.P.	6.7 g/dl
O.B.:(-), RBC: 0-1/HPF		Albumin	3.9 g/dl
protein: (-), glucose: (-),		T.B.	0.4mg/dl
		AST	18 U
		ALT	13 U
		LDH	608 U
		Total Cho.	140 mg/dl
		Triglyceride	108 mg/dl
		BUN	12.9 mg/dl
		Creatinin	0.7 mg/dl
		Uric Acid	3.9 mg/dl

Peripheral blood count, bone marrow aspiration, urinalysis, biochemistry and serological examinations are shown. Both coagulation-fibrinolytic parameters indicate that complicated DIC was serious.

(持田製薬). Human protein C および Human activated protein C (Haematologic Technologies Inc.). 「TM 測定 ELISA キット」(三菱ガス化学). ウサギ脳トロンボプラスチンおよび Triton X-100(Sigma). ヒト F.X およびヒト F.VIIa (化学及び血清療法研究所). 牛 F.Xa および Hpa I, Xho I (New England Bio Labs). Lymphoprep, 牛 plasminogen および合成基質 S-2222, S-2251, S-2366 (第一化学薬品). ウサギ抗ヒト TF 抗体 (American diagnostica Inc.). Tween 80 (関東化学). Taq DNA polymerase, 「QuickPrep Micro mRNA Purification Kit」および「First Strand cDNA

Synthetic Kit」(Pharmacia Biothech). BamH I および EcoR I (Boehringer Mannheim). Hind III および dNTP Mixture (宝酒造). T3 -RNA polymerase および RQ 1-RNase-Free DNase (Promega). Hybond N+ Nylon membrane および「Nucleic acid labelling and detection systems」(Amersham).

2) APL 細胞の採取

患者末梢血より Lymphoprep を用いた比重遠心法で ATRA 治療前から経時的に単核球を採取し, May-Giemsa 染色を行い光学顕微鏡上で骨髓芽球, 前骨髓球および未熟骨髓球の合計が 70%以上のものを APL 細胞検体とした.

Fig. 1 Changes in peripheral blood leukemic cell counts and coagulation-fibrinolytic parameters during ATRA therapy.

- a) ● represents white blood cell (WBC) counts/ μ l of peripheral blood. APL cells are shown in gray shadow area. BHAC: behenoyl Ara C. DNR: daunorubicin. mPSL: methylprednisolon.
- b) ● and ○ represent TAT and PIC respectively. Beneath Fig. 1-b, results of SFMC are presented by (-), (+), (2+), (3+).
- c) ● and ○ represent Fbg. and FDP respectively.
- All these five markers of DIC were improved promptly after ATRA therapy, and DIC was subsided by day 5. But APL cells were found to be remained in peripheral blood even on day 10.

Fig. 2 Time course of APL cell TF activities during ATRA therapy.

TF activities of various sites in APL cells and these time courses during ATRA therapy are presented. ●, ■ and ○ represent whole cell TF activity, cytoplasmic TF activity, and cell surface TF activity respectively. Within one week of ATRA therapy, cytoplasmic and whole cell TF activities declined to less than 10% of the pretreatment level. Although cell surface TF activity increased transiently, it also decreased to the same level as other sites of APL cells, seven days after ATRA treatment. Procedures of TF activity assays are described in methods (4-①, ②, ③) in this article. Values are the average of duplicate measurement.

3) APL細胞のTM抗原並びに活性測定

3-① TM抗原の測定: TM抗原は, PBS (phosphate buffered saline: pH 7.5) に浮遊させた APL細胞 ($10^7/\text{ml}$) を超音波破碎して終濃度 1% の Tritonm X-100 により蛋白を溶出し, 「TM測定 ELISA キット」を用いて測定した。

3-② TM活性の測定: TM活性は Suzuki ら²⁶⁾の方法に準じ, 一定時間内に形成される activated protein C の量を基準に測定した。超音波破碎した細胞検体 $50\ \mu\text{l}$ にヒトトロンビン ($20\ \text{U}/\text{ml}$) $12.5\ \mu\text{l}$ および Human protein C ($60\ \mu\text{g}/\text{ml}$) $12.5\ \mu\text{l}$ を加えて 37°C で 30 分間インキュベーションし, activated protein C を形成させた。残存するトロンビン活性はヒトアンチトロンビン III ($3\ \text{U}/\text{ml}$) $25\ \mu\text{l}$ とヘパリンナトリウム ($75\ \text{U}/\text{ml}$) $25\ \mu\text{l}$ の添加により阻害した。遠心上清 $100\ \mu\text{l}$ に合成基質 S-2366 を $50\ \mu\text{l}$ 添加し, 37°C で 30 分間反応させた後, 50% の酢酸 $50\ \mu\text{l}$ で反応を停止して, 活性を 405 nm の吸光度により測定した。TM活性の標準物質として Human activated protein C を用い, $10\ \text{ng}/\text{ml}$ から $1,500\ \text{ng}/\text{ml}$ の範囲で測定可能であることを確認し, 検体はこの範囲で測定した。ATRA 使用前の検体 (10^8 cells) は 30 分間で $1,150\ \text{ng}$ の Human activated protein C を生

成する活性を有していた。これを TM活性 100% とし, 経時的な変動を観察した。

4) APL細胞のTF活性の測定

APL細胞の総 TF活性, 表面 TF活性および細胞内 TF活性は Roy ら²⁷⁾の合成基質を用いた方法に準じて測定した。TF活性の標準物質にはウサギ脳トロンボプラスチンを用い, その $2\ \text{mg}$ を 1 万単位と定めた。

4-①細胞総 TF活性測定: PBS に浮遊させた APL細胞 ($10^7/\text{ml}$) を超音波破碎して細胞ホモジェネートとした。TF活性は, ホモジェネート $50\ \mu\text{l}$ と F.X ($200\ \text{nM}$) $50\ \mu\text{l}$, F.VIIa ($14\ \text{nM}$, CaCl_2 $20\ \text{mM}$ 含有) $50\ \mu\text{l}$, および合成基質 S-2222 ($2.9\ \text{mg}/\text{ml}$) $50\ \mu\text{l}$ を混和し, 37°C で 20 分間インキュベーションの後, 50% の酢酸 $50\ \mu\text{l}$ を加えて反応を停止し, 遠心上清の吸光度 (O.D.405) を測定した。

4-②細胞表面 TF活性測定: APL細胞を PBS に浮遊 ($10^7/\text{ml}$) させた状態でこれを検体とし, 前述 4-①と同様に試薬と混和し, インキュベーションの後, 50% の酢酸により反応を停止し, 遠心上清の発色によって細胞表面 TF活性を測定した。

4-③細胞内 TF活性測定: ウサギ抗ヒト TF抗体 ($0.1\ \text{mg}/\text{ml}$) により 37°C で 30 分間, APL

Fig. 3 Changes in APL cell TF activity, TM antigen and TM cofactor activity during ATRA therapy.

● and ○ represent APL cell TF activity (whole cell) and APL cell TM antigen respectively. TM cofactor activity is presented by shadow column. TF activity decreased by half and TM antigen showed fivefold increase within two days after ATRA treatment. TM cofactor activity also showed twofold increase. TM cofactor activity was determined by the amount of human activated protein C production. 10⁸ APL cells before ATRA therapy produced 1,150 ng of human activated protein C, and it was assigned to 100% of TM cofactor activity. Procedures of TM antigen and activity assays are described in methods (3-①, ②) in this article. Values are the average of duplicate measurement.

細胞を前処理し、細胞膜表面の TF 活性を阻害した後に洗浄、超音波破碎して細胞ホモジェネート検体とした。この検体の TF 活性も 4-①と同様の方法で測定した。抗 TF 抗体処理で細胞表面の TF 活性抑制率が 90%以上であることは 4-②の方法で予め確認した。

5) PA 活性の測定

PA 活性の測定は浜²⁸⁾の合成基質を用いた方法に準じて行った。APL 細胞ホモジェネート検体 50 μ l と 0.1 M Tris (0.15% Tween 80 含有) 50 μ l, 牛 plasminogen (3.5 C.U./ml) 50 μ l, および合成基質 S-2251 (1.5 mM) 50 μ l を混和し 37°C で 1 時間反応の後、50%の酢酸 50 μ l を加えて反応を停止し、吸光度 (O.D.405) を測定した。標準物質にはヒトウロキナーゼを用いた。

6) APL 細胞中 TF mRNA の RT-PCR 法による分析

10⁷ 個の APL 細胞より、まず mRNA を抽出

(QuickPrep Micro mRNA Purification Kit 使用) した。TF mRNA は、Internal control を用いた Pögens ら²⁹⁾ の competitive RT-PCR 法に準じて、ATRA 治療前並びに治療 4 日目の APL 細胞の検体を定量した。

6-① TF standard RNA の作製: ヒト TF cDNA₍₁₈₀₋₇₁₂₎ を組み込んだプラスミド pBlue-script II KS(+) (以下 TFK₍₁₈₀₋₇₁₂₎ と略: 化学及び血清療法研究所より供与) を BamHI で切断し、T 3-RNA polymerase を用いて RNA を合成、RQ 1-RNase-Free DNase でプラスミド DNA を分解の後、RNA を精製して TF standard RNA とした。

6-② Internal control RNA の作製: pUCooCAT から EcoR I と Hind III により切り出した 0.25 kb の CAT gene 断片を、TFK₍₁₈₀₋₇₁₂₎ の Hpa I 制限酵素切断部位に挿入し、前述 6-①の方法と同様の手順で TF stan-

Fig. 4 Morphological changes of APL cells during ATRA therapy.

Light microscopic examination ($\times 1,000$) was performed for the observation of APL cell differentiation.

- (a) Before ATRA therapy: APL cells contain prominent Azur granules, and have pathological convoluted nuclei. Auer bodies were found in some of APL cells.
- (b) 2 days after ATRA therapy: There was no remarkable change in Azur granules and nuclei.
- (c) 4 days after ATRA therapy: Slight reduction of Azur granules was observed in a part of APL cells.
- (d) 8 days after ATRA therapy: Slight shape change of nuclei and slight reduction of Azur granules were observed in a part of APL cells.

dard RNA より 0.25 kb 長い RNA を合成した後, 精製してこれを Internal control RNA とした.

6-③ First strand cDNA の合成と RT-PCR: 5 pg の Internal control RNA を, TF standard RNA (3.125 pg より 8 段階の希釈系列) あるいは APL 細胞 (10^7 個) から抽出した mRNA の一部に添加して, first strand cDNA を合成 (First strand cDNA synthesis kit 使用) した. この際用いたプライマーは 5'-CCGGGCTGTCTGTACTCTTCCGGTT-3'

である. この後, forward primer に 5'-ACCCGTCAATCAAGTCTACTGTTC-3', reverse primer に 5'-GGCTGTCTGTACTCTTCC-3' を用いて PCR (RT-PCR) を施行した. PCR 条件は, 1) 熱変性: 95°C 1 分, 2) アニーリング: 65°C 1 分, 3) DNA 合成: 72°C 2 分で 32 サイクル施行した.

6-④ Southern blotting と Hybridization: PCR 産物を 1.5% アガロースで電気泳動の後, Nylon membrane に blotting した. TFK₍₁₈₀₋₇₁₂₎ を Xho I と Hpa I で切断し, 0.52

Fig. 5 Changes in leukemic cell PA activity during ATRA therapy.

PA activity began to increase one week after ATRA therapy, when DIC had already improved. This implies that the change of PA activity of APL cells is irrelevant to DIC improvement. Values are the average of duplicate measurement. Procedure of the assay of PA activity is described in methods (5) in this article.

Fig. 6(a) Analysis of TF-mRNA in APL cells by RT-PCR.

RT-PCR with constant amount of Internal control RNA (5 pg) and different amounts of TF standard RNA (lane 1: 3.125 pg, lane 2: 1.56 pg, lane 3: 0.78 pg, lane 4: 0.39 pg, lane 5: 0.195 pg, lane 6: 0.098 pg, lane 7: 0.049 pg, lane 8: 0.024 pg). APL sample before ATRA therapy is lane 9 and sample of 4 days after ATRA therapy is lane 10. PCR products were separated on gel, blotted and hybridized with an enhanced chemiluminescence (ECL) labeled TF specific probe. RT-PCR product from TF mRNA (0.54 kb) was detected at lane 9, but not at lane 10. This suggests that TF mRNA was promptly decreased less than the sensitivity level of this RT-PCR within 4 days after ATRA therapy.

Preparation of TF standard RNA and Internal control RNA was described in methods (6-①, ②) in this article.

(b) Standard curve of TF mRNA.

The amount of TF mRNA was determined from this standard curve. Horizontal axis shows the amount of full length of TF mRNA in 10⁷ APL cells converted from TF standard RNA. Vertical axis shows the ratio of the density of PCR products of 0.54 kb to 0.79 kb.

kb の DNA 断片を化学標識 (ECL direct nucleic acid labelling and detection systems 使用) してプローブとし, Southern blot hybridization を行って化学発光によりバンドを確認し解析した。

結 果

1) ATRA 投与による DIC の改善

Fig. 1-a に本症例の ATRA 投与後の末梢の白血球数と APL 細胞数の推移, **Fig. 1-b** と **Fig. 1-c** に凝血学的マーカーの変動を示す。症例は初診時より DIC を合併していたが, ATRA

投与直後より TAT, FDP, SFMC, Fbg. は速やかに正常化し始めた. ATRA 投与 5 日目には, SFMC は初めて陰性化し, FDP も $7.6 \mu\text{g/ml}$ と正常範囲に入った. その他異常を示していた TAT, PIC, Fbg. 等の検査値もほぼ正常化した (症例呈示の項参照).

2) APL 細胞 TF 活性と TM 抗原および活性の経時的変動と APL 細胞の分化

Fig. 2 は APL 細胞の局在別 TF 活性の経時的変動を示したものである. 細胞の総 TF 活性は 2 日後に半減し, 7 日後には治療前の約 10% にまで低下した. その変化は主に細胞質内 TF 活性の減少によるものであった. これに比し細胞膜表面 TF 活性は一時的に上昇した後に 5 日目より低下し, 10 日後には細胞質内 TF 活性と同様にほとんど検出されなくなった.

Fig. 3 に ATRA 投与後に経時的に採取した APL 細胞の総 TF 活性, TM 抗原並びに TM 活性の変動を対比させたグラフを示す. 細胞 TF 活性は ATRA 投与後 48 時間で約 50% に減少し, これと鏡面像的に TM 抗原は約 5 倍に増加し, TM 活性は約 2 倍の増加を示した.

Fig. 4 に末梢血白血病細胞の May-Giemsa 染色標本の光学顕微鏡写真 (1,000 倍) を示す. ATRA 投与 8 日後までの APL 細胞を光学顕微鏡的に観察した限りでは, それらの形態学的分化傾向, すなわち細胞質内のアズール顆粒の紫紅色の淡色化や核クロマチン構造の濃縮化,あるいは核の分葉傾向の程度は, 非常に弱かった.

3) APL 細胞の PA 活性の経時的変動

ATRA 投与後に経時的に採取した APL 細胞の PA 活性の変動を Fig. 5 に示す. 臨床上 DIC が改善傾向を示している時期, すなわち投与後 5 日以内には PA 活性の変動は認められず, その上昇は DIC が改善してから観察された.

4) ATRA 投与後の APL 細胞 TF mRNA の変動

Internal control RNA を用いた competitive RT-PCR の Southern blot hybridization の結果を Fig. 6-a に示す. A: レーン 1 から 8 まではそれぞれ [Internal control RNA (5 pg) +

TF standard RNA (3.125, 1.56, 0.78, 0.39, 0.195, 0.098, 0.049, 0.024 pg)] の RT-PCR 産物である. B: レーン 9 は [Internal control RNA (5 pg) + ATRA 治療前の APL 細胞抽出 mRNA], C: レーン 10 は [Internal control RNA (5 pg) + ATRA 治療 4 日目の APL 細胞抽出 mRNA] の RT-PCR 産物をそれぞれ示す. 検出されたバンドは 0.54 kb と 0.79 kb であった. 前者は TF standard RNA 並びに検体 TF mRNA の RT-PCR 産物であり, 後者は Internal control RNA の RT-PCR 産物である. 0.54 kb のバンドは, ATRA 治療前の検体には認められたが (レーン 9), 治療後 4 日目の細胞では観察されず (レーン 10), この時点で APL 細胞中の TF mRNA は既に消失している事が確認された.

Fig. 6-b に TF standard RNA の希釈系列より得た標準曲線を示す. Y 軸は Fig. 6-a のレーン 1 から 8 に相当する TF mRNA のバンド 0.54 kb と Internal control RNA のバンド 0.79 kb との density の比を示す. これは PCR において, 両者が競合 (compete) することを考慮したものである. X 軸には, TF standard RNA 量を full length の TF mRNA 量に換算して細胞 10^7 個あたりの TF mRNA の総量を表示した. この標準曲線より ATRA 治療前の APL 細胞の TF mRNA を $12.25 \text{ pg}/10^7 \text{ cells}$ と算出したが, 治療 4 日目の TF mRNA は検出感度 (0.1 pg) 以下であった.

考 察

APL 患者に ATRA を投与した場合の特徴は, I) 骨髄が一時的な過形成を呈することはあっても低形成に陥ることはなく, II) アウエル小体を有し核異形性のある好中球がしばしば観察され, III) PML/RAR α の遺伝子再構成は治療中の好中球にも認められるが, 完全寛解後には消失する, という 3 点に集約される³⁰⁾. これらの事実は, ATRA の作用機序が, APL 細胞の成熟好中球への分化誘導にあることを示唆している. また ATRA 治療が APL に合併する DIC を極く初期に改善させる⁷⁾ 事も特徴的な現象である.

ATRAによるDICの改善要因に関しては *in vitro* の実験²²⁾²³⁾ や、臨床検体の測定結果²⁴⁾ から、APL細胞のTF減少とTM増加が重要であることが既に示唆されている。われわれが患者から経時的に採取して測定したAPL細胞のTF活性も、ATRA投与わずか2日後で約半分に減少し、そのTM活性は約2倍に増加した。この結果はFalangaら²⁴⁾の研究結果と異なるものではないが、①臨床検体(APL細胞)のTF減少とTM増加がわずか48時間以内に観察され、②ほぼ同時にDICのマーカーであるFDP、TAT、SFMC、Fbgが改善した事実は、APL細胞のTFとTMの変動がDIC改善の要因である事をより明確に示すものと言える。

APL細胞のTF減少により血液凝固のトリガーは除去され、TM産生増加により凝固反応は抑制方向にシフトする。この二者の相乗効果がATRAにより惹起され、DICが改善すると解釈される。但し、ATRAは血管内皮細胞のTFやTM発現をも調節し得る²¹⁾³¹⁾ため、血管内皮細胞の性状変化もDIC改善に寄与していると考えられる。

ATRA投与前、APL細胞に認められたTF mRNAは投与4日後には消失した。AP-1(Jun/Fos複合体)はTFの転写活性因子の一つである³²⁾。ATRAは種々のAP-1応答遺伝子に対して負の調節因子として機能する³³⁾が、その機序はATRAに活性化されたRAR α がJunに結合して、AP-1のDNA(AP-1 response element)への結合を阻害する³³⁾ことにある。この阻害活性の発現において、RAR α 内にATRAの結合部位とRAR α 特有のDNA結合部位が必須であることも明らかにされている³³⁾。キメラ蛋白PML/RAR α にはATRA結合部位およびDNA結合部位がともに残存機能している³⁰⁾。したがって、ATRAはAPLにおいてもPML/RAR α を介してAP-1の転写活性を阻害し、TF抗原量を減少させると考えられる。

またTM遺伝子上流には、ATRAなどのレチノイド応答性遺伝子のプロモーター領域であるRAREs(retinoic acid responsive elements)が確認されている³⁴⁾。RAREsにはRAR α とRXR(retinoid X receptor)のヘテロダイマー

RAR α /RXRが直接結合する⁴⁾ので、これによりTM遺伝子の転写が調節されていると推察される。APLにおいては、キメラ蛋白PML/RAR α が細胞質に多く分布し⁵⁾、しかもRXRとのヘテロダイマー形成部位を保持している³⁰⁾ため、RXRの枯渇現象が生じ³⁵⁾、種々の転写活性を有するヘテロダイマーRAR α /RXRが減少して、TM産生が低下していると考えられる。レチノイン酸をAPL由来細胞株NB4に作用させると、細胞質に分布しているPML/RAR α は5日以内に核内へ移動する⁵⁾。移動したPML/RAR α とRXRのヘテロダイマーはTM遺伝子上流のRAREsに結合して、TM産生が増加すると考えられる。実際我々の測定でもTM抗原の上昇はほぼ1週間でプラトーに達していた。しかし、Saitoら³¹⁾の報告によると、初診時の白血病細胞のTMはAPLに限らず、比較的低値を取るものが多く、TM低値の原因をPML/RAR α 存在に伴うRAR α /RXRの減少のみで解釈する事はできない。

TFやTMはこのように遺伝子レベルで調節を受けている可能性が高いが、この現象と細胞分化誘導の機序とが関連しているのか、それとも別の現象なのかという点がわれわれの第二の疑問であった。ATRA投与後の時間的変化をみると、APL細胞のTF、TMの変動はATRA投与後48時間以内に認められたが、光学顕微鏡上その時点における細胞分化は判然としなかった。Kizakiら³⁶⁾は、HL60細胞の好中球への分化程度はATRA濃度(10^{-9} Mから 10^{-5} M)に依存しているが、TMの発現は抗原/活性ともに 10^{-7} M前後の極く狭い範囲でしか認められない事を明らかにしている。さらにSaitoら³¹⁾は、分化誘導療法の効果が認められないAPL以外の白血病細胞を、*in vitro*でレチノイン酸処理すると、TFの減少およびTMの増加が認められることを報告している。われわれの示した細胞分化とTF・TMの変動時期との乖離現象と、この2つの研究報告は、白血病の分化誘導の機序とTF・TMの発現調節機構とが異なる可能性が高いことを示唆している。

ATRA処理後、細胞表面におけるTF活性は一時的な上昇を示した。これは膜表面リン脂質

の組成変化による活性上昇や, TF 分泌現象の停止に伴うものと考えられる。この細胞表面 TF 活性の動態は DIC の改善と矛盾する現象であるが, この間, 総 TF 活性の減少に加えて TM の増加が相乗的に作用するので, 全体として DIC は改善に向かうものと解釈される。

DIC においては, 白血病細胞中の線溶活性は高値をとる事が多い³⁷⁾。したがって APL 細胞の PA 活性は, ATRA 投与と共に低下し, DIC の改善に寄与するものと予想されたが, 実際は DIC 改善期にはほとんど変化が認められなかった。その後 PA 活性は 5 倍に上昇したが DIC は再発しなかった。この事実は APL 細胞の PA 活性が DIC の病態の修飾要因として重要ではあるが, 発症の主因と考えるべきではない事を示すものと思われる。

われわれは本論文において, ATRA 使用により早期に DIC が改善し, その後完全寛解に到達した症例を報告した。ATRA 使用後 2 日目では, APL 細胞の形態学的分化傾向は全く認められなかったにも関わらず, その間に TF 活性は半減し, TM 活性は約 2 倍に上昇した。この TF および TM の鏡面像的な変動は, FDP, SFMC, TAT, Fbg. が正常化する時期と一致していた。これらの結果は, DIC の改善が APL 細胞の TF 減少及び TM 上昇の相乗作用に起因するものであり, 細胞分化誘導とは異なる現象である事を示している。

謝 辞 本研究の遂行にあたり, TF 活性測定ならびに TF プローブの作製に関して(財)化学及び血清療法研究所第三製造部の亀井慎太郎氏をはじめ多くの方々の御協力を頂きました。また, competitive RT-PCR の施行に関しては, 帝京大学細菌学教室の村山琮明講師より懇切丁寧なご指導を頂きました。ここに深謝し厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Smith MA, Parkinson DR, Cheson BD and Friedman MA: Retinoids in cancer therapy. J Clin Oncol **10**: 839-864, 1992.
- 2) Warrell RPJr, Maslak P, Eardley A, Heller G, Miller WHJr and Frankel SR: Treatment of acute promyelocytic leukemia with all-*trans* retinoic acid: an update of the New York experience. Leukemia **8**: 929-933, 1994.
- 3) Fagioli M, Grignani F, Ferrucci PF, Alcalay M, Mencarelli A, Nicoletti I, Grignani F and Pelicci PG: Effect of the acute promyelocytic leukemia PML/RAR α protein on differentiation and survival of myeloid precursors. Leukemia **8** Suppl 1: 7-11, 1994.
- 4) Wan Y-JY: Retinoic acid and its receptors. Am J Surg **166**: 50-53, 1993.
- 5) Weis K, Rambaud S, Lavau C, Jansen J, Carvalho T, Carmo-Fonseca M, Lamond A and Dejean A: Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR α in acute promyelocytic leukemia cells. Cell **76**: 345-356, 1994.
- 6) 大野竜三, 直江知樹, 福谷 久: レチノイン酸による急性前骨髄球性白血病の分化誘導療法. 癌と化学療法 **20**: 1016-1021, 1993.
- 7) Kawai Y, Watanabe K, Kizaki M, Murata M, Kamata T, Uchida H, Moriki T, Yokoyama K, Tokuhira M, Nakajima H, Honda M and Ikeda Y: Rapid improvement of coagulopathy by all-*trans* retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. Am J Hematol **46**: 184-188, 1994.
- 8) Dombret H, Scrobohaci ML, Ghorra P, Zini JM, Daniel MT, Castaigne S and Degos L: Coagulation disorders associated with acute promyelocytic leukemia: corrective effect of all-*trans* retinoic acid treatment. Leukemia **7**: 2-9, 1993.
- 9) 小口 淳, 森岡真知子, 山中秀之, 木下忠俊: 血中組織因子測定の臨床的意義. 臨床病理 臨時増刊 **98**: 65-74, 1994.
- 10) Kubota T, Andoh K, Sadakata H, Tanaka H and Kobayashi N: Tissue factor released from leukemic cells. Thromb Haemost **65**: 59-63, 1991.
- 11) Bona R, Lee E and Rickles F: Tissue factor apoprotein: intracellular transport and expression in shed membrane vesicles. Thromb Res **48**: 487-500, 1987.
- 12) Tallman MS, Hakimian D, Kwaan HC and Rickles FR: New insights into the pathogenesis of coagulation dysfunction in acute promyelocytic leukemia. Leuk Lymphoma **11**: 27-36, 1993.
- 13) Falanga A, Marchetti M, Giovanelli S and Bar-

- bui T: All-*trans*-retinoic acid counteracts endothelial cell procoagulant activity induced by a human promyelocytic leukemia-derived cell line (NB4). *Blood* **87**: 613-617, 1996
- 14) Andoh K, Kubota T, Takada M, Tanaka H, Kobayashi N and Maekawa T: Tissue factor activity in leukemia cells: special reference to disseminated intravascular coagulation. *Cancer* **59**: 748-754, 1987.
 - 15) Naitoh M, Andoh K, Sadakata H, Tanaka H and Kobayashi N: Prediction of disseminated intravascular coagulation in patients with leukemia. *Intern Med* **33**: 131-135, 1994.
 - 16) Nemerson Y: Tissue factor and hemostasis. *Blood* **71**: 1-8, 1988.
 - 17) Andoh K, Sadakata H, Uchiyama T, Narahara N, Tanaka H, Kobayashi N and Maekawa T: One-stage method for assay of tissue factor activity of leukemic cell with special reference to disseminated intravascular coagulation. *Am J Clin Pathol* **93**: 679-684, 1990.
 - 18) Dittman WA and Majerus PW: Structure and function of thrombomodulin: a natural anti-coagulant. *Blood* **75**: 329-336, 1990.
 - 19) Ito T, Ogura M, Morishita Y, Takamatsu J, Maruyama I, Yamamoto S, Ogawa K and Saito H: Enhanced expression of thrombomodulin by intracellular cyclic AMP- increasing agents in two human megakaryoblastic leukemia cell lines. *Thromb Res* **58**: 615-624, 1990.
 - 20) Esmon CT: The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J Biol Chem* **264**: 4743-4746, 1989.
 - 21) Ishii H, Horie S, Kizaki K and Kazama M: Retinoic acid counteracts both the downregulation of thrombomodulin and the induction of tissue factor in cultured human endothelial cells exposed to tumor necrosis factor. *Blood* **80**: 2556-2562, 1992.
 - 22) Koyama T, Hirosawa S, Kawamata N, Tohda S and Aoki N: All-*trans* retinoic acid upregulates thrombomodulin and downregulates tissue-factor expression in acute promyelocytic leukemia cells: distinct expression of thrombomodulin and tissue factor in human leukemic cells. *Blood* **84**: 3001-3009, 1994.
 - 23) De Stefano V, Teofili L, Sica S, Mastrangelo S, Di Mario A, Rutella S, Salutari P, Rumi C, d'Onofrio G and Leone G: Effect of all-*trans* retinoic acid on procoagulant and fibrinolytic activities of cultured blast cells from patients with acute promyelocytic leukemia. *Blood* **86**: 3535-3541, 1995.
 - 24) Falanga A, Iacoviello L, Evangelista V, Belotti D, Consonni R, D'Orazio A, Robba L, Donati MB and Barbui T: Loss of blast cell procoagulant activity and improvement of hemostatic variables in patients with acute promyelocytic leukemia administered all-*trans*-retinoic acid. *Blood* **86**: 1072-1081, 1995.
 - 25) 堀越 昶, 澤田滋正, 相磯ますみ, 河村雅昭, 飯塚芳一, 竹内 仁, 大島年照, 堀江孝至, 直江知樹, 大野竜三: Retinoic acid syndrome を発症したと考えられる急性前骨髄球性白血病の2例. *臨床血液* **34**: 1044-1049, 1993.
 - 26) Suzuki K, Kusumoto H, Deyashiki Y, Nishioka J, Maruyama I, Zushi M, Kawahara S, Honda G, Yamamoto S and Horiguchi S: Structure and expression of human thrombomodulin, a thrombin receptor on endothelium acting as a cofactor for protein C activation. *EMBO J* **6**: 1891-1897, 1987.
 - 27) Roy S, Hass PE, Bourell JH, Henzel WJ and Vehar GA: Lysine residues 165 and 166 are essential for the cofactor function of tissue factor. *J Biol Chem* **266**: 22063-22066, 1991.
 - 28) 浜 英永: 急性骨髄性白血病由来の細胞株 (KOHM-1) の樹立とその性状. *帝京医学雑誌* **15**: 393-405, 1992.
 - 29) Pötgens AJG, Lubsen NH, van Altena G, Schoenmakers JGG, Ruiter DJ and de Waal RMW: Measurement of tissue factor messenger RNA levels in human endothelial cells by a quantitative RT-PCR assay. *Thromb Haemost* **71**: 208-213, 1994.
 - 30) Grignani F, Fagioli M, Alcalay M, Longo L, Pandolfi PP, Donti E, Biondi A, Lo Coco F, Grignani F and Pelicci, PG: Acute promyelocytic leukemia: from genetics to treatment. *Blood* **83**: 10-25, 1994.

- 31) Saito T, Koyama T, Nagata K, Kamiyama R and Hirose S: Anticoagulant effects of retinoic acids on leukemia cells. *Blood* **87**: 657-665, 1996
- 32) Moll T, Czyz M, Holzmüller H, Hofer-Warbinek R, Wagner E, Winkler H, Bach F H and Hofer E: Regulation of the tissue factor promoter in endothelial cells: binding of NF κ B-, AP-1-, and Sp1-like transcription factors. *J Biol Chem* **270**: 3849-3857, 1995.
- 33) Schüle R, Rangarajan P, Yang N, Kliewer S, Ransone LJ, Bolado J, Verma IM and Evans RM: Retinoic acid is a negative regulator of AP-1-responsive genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 6092-6096, 1991.
- 34) Dittman WA, Nelson SC, Greer PK, Horton ET, Palomba ML and McCachren SS: Characterization of thrombomodulin expression in response to retinoic acid and identification of a retinoic acid response element in the human thrombomodulin gene. *J Biol Chem* **269**: 16925-16932, 1994.
- 35) 橋本祐一, 首藤紘一: PML-RAR α の機能. 血液・腫瘍科 **30**: 74-78, 1995.
- 36) Kizaki K, Ishii H, Horie S and Kazama M: Thrombomodulin induction by all-*trans* retinoic acid is independent of HL-60 cells differentiation to neutrophilic cells. *Thromb Haemost* **72**: 573-577, 1994.
- 37) Wada H, Kumeda Y, Ogasawara Z, Minamikawa K, Wakita Y, Nakase T, Kaneko T, Ohiwa M, Kageyama S, Kobayashi T, Deguchi K and Shirakawa S: Stimulation of tissue type plasminogen activator by leukaemic cell homogenates. *Blood Coagul Fibrinolysis* **4**: 591-597, 1993.