形質細胞系腫瘍

原田 浩徳, 河野 道生

広島大学原爆放射能医学研究所臨床第一（内科）研究部門

Plasma cell dyscrasias and normal plasma cells

Hironori Harada, Michio M. Kawano

Department of Internal Medicine, Research Institute for Nuclear Medicine and Biology,
Hiroshima University

We have recently shown that two-color analysis with fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-CD38 antibody could clearly distinguish myeloma cells (plasma cells) from other hematopoietic cells in the bone marrow. Myeloma cells (plasma cells) alone were located at CD38^{strong positive(+++)} fractions. We also identified two subpopulations among these myeloma cells: VLA-5⁻MPC-1⁻ myeloma cells and VLA-5⁺MPC-1⁺ myeloma cells. Morphological examination showed that VLA-5⁻ myeloma cells were mostly immature and VLA-5⁺ cells were mature myeloma cells. Furthermore, VLA-5⁻ myeloma cells proliferated markedly in vitro and responded to interleukin 6 (IL-6), while VLA-5⁺ myeloma cells showed very low proliferation and no response to IL-6 but secreted higher amounts of M-protein in vitro significantly. Therefore, we could clarify heterogeneity of human myeloma cells in the bone marrow with regard to the expression of VLA-5; VLA-5⁻ myeloma cells were proliferative immature cells and VLA-5⁺ cells were mature myeloma cells. To further distinguish normal plasma cells from mature myeloma cells phenotypically, we examined immunophenotypes of normal plasma cells and myeloma cells by two-color flow cytometry with FITC-anti-CD38 antibody and phycoerythrin (PE) staining with a given antibody. Normal plasma cells in the bone marrow, tonsil, spleen and lymph node were all CD19⁺CD56⁻. On the other hand, mature myeloma cells were mostly CD19⁻ and most of them were CD56⁺, and there were no myeloma cell with the CD19⁺CD56⁻ phenotype. According to this findings, we investigated the expression of CD19 and CD56 on plasma cells (CD38⁺⁺⁺ fractions) in benign monoclonal gammopathy (BMG). Both CD19⁺CD56⁻ and CD19⁻CD56⁺ plasma cells were detected, and were suggesting that BMG consisted of phenotypically normal plasma cells and myeloma cells. In order to investigate from where myeloma cells (plasma cells) originate, the phenotypes of B cell lineage in tonsils, lymph nodes and peripheral blood were analyzed by two-color analysis. In the tonsils and lymph nodes, germinal center B cells (GC-B cells) revealed CD38⁺VLA-5⁻MPC-1⁻CD24⁻CD10⁺

CD5⁻, while the phenotype of mantle zone B cells (MZ-B cells) were CD38⁻VLA-5⁺MPC-1⁺CD24⁺CD10⁻CD5⁺. On the other hand, we found CD38^{moderately positive(++)} cells in the peripheral blood and they revealed VLA-5⁻MPC-1⁻CD24⁻CD10⁺CD5⁻. Morphological examination showed that these cells were plasmacytoid. Therefore, we regarded the cells as precursor plasma cells. In conclusion, we could present here that 1) myeloma cells consisted of VLA-5⁻ immature and VLA-5⁺ mature myeloma cells, 2) normal plasma cells were clearly distinguished from mature myeloma cells phenotypically, 3) plasma cells in BMG contained both normal plasma cells and myeloma cells, 4) precursor plasma cells were identified in the peripheral blood.

Key words: myeloma, normal plasma cells, VLA-5, benign monoclonal gammopathy, precursor plasma cells

はじめに

形質細胞はBリンパ球系細胞の最終分化細胞であり、それが腫瘍化したものが骨髄腫と考えられる。最近、骨髄腫細胞の不均一性が増殖動態、骨髄ストローマ細胞との接着性および細胞表面抗原の発現より明らかにされつつある。また、表面抗原の発現の相違から骨髄腫細胞と正常形質細胞は識別でき、良性M蛋白血症の病態解明や骨髄腫の新たな診断手段として表面抗原解析は有用である。一方で、悪性リンパ腫と骨髄腫との境界領域の疾患についての病態認識が必要であると思われ、骨髄腫細胞(形質細胞)の由来を明らかにすることが重要となってきた。Bリンパ球から形質細胞への分化についての仮説を含めて、形質細胞系腫瘍における我々の最近の知見について述べる。

骨髄腫細胞(形質細胞)の表面抗原解析

—抗CD38抗体を用いた2カラー染色法—

多くの場合骨髄中の骨髄腫細胞の占める割合は低く、また特異抗体がないためフローサイトメーター、とりわけ1カラー染色による表面抗原の解析は困難であった。しかし、抗CD38抗体を用いた2カラー染色法により容易に行えるようになった。骨髄腫細胞はCD38を強陽性に発現しており、抗CD38抗体を使用した2カラー染色を行うことにより、CD38強陽性分画に展開される骨髄腫細胞の表面抗原発現の解析が可能である。この2カラー染色法にて正常骨髄中の1%程度の形質細胞でもCD38強陽性分画に的確に検出できる。さらに、正常骨髄単核球においてCD38中等度陽性分画はCD10陽性のpre-B細胞で、

CD38陰性から弱陽性分画は成熟B細胞であり、B細胞系を明瞭に識別することができる。またB細胞以外においては、CD56陽性のNK細胞とCD13陽性の骨髄球系細胞はCD38弱陽性分画に、CD3陽性のT細胞はCD38陰性から弱陽性の分画に、glycophorin A (GPA) 陽性の赤芽球はCD38陰性分画に展開される(図1)。

未熟骨髄腫細胞と成熟骨髄腫細胞

骨髄腫細胞はIL-6を増殖因子として増殖する²⁾。しかし、実際にはIL-6に反応し増殖する細胞は一部にすぎず、他の細胞は非増殖細胞と考えられる。すなわち、骨髄腫細胞はその増殖動態からみて不均一な(heterogeneous)細胞集団である。このheterogeneityを明らかにすることは、骨髄腫の発症機構を解明する上で極めて重要である。

われわれは抗CD38抗体との2カラーフローサイトメトリーを用いて、骨髄腫細胞における種々の表面抗原特に接着分子の発現を検討し、接着分子の発現の相違により骨髄腫細胞を亜群に分類できることを見いだした。 β 1インテグリンであるVLA-5の発現と、MPC-1抗原の発現により、VLA-5⁻/MPC-1⁻細胞とVLA-5⁺/MPC-1⁺細胞の亜群に分けられ(図2)、前者を未熟骨髄腫細胞、後者を成熟骨髄腫細胞と捉えることができる³⁾。MPC-1抗体はわれわれの樹立したモノクローナル抗体であり、成熟骨髄腫細胞に反応する⁴⁾。細胞自動分離装置(セルソーター)を使用し、CD38⁺⁺⁺/VLA-5⁻細胞とCD38⁺⁺⁺/VLA-5⁺細胞とを分取し、それぞれの細胞につきin vitro 増殖能(³H-thymidine 取り込み)、IL-6反応性、in vitro M蛋白分泌能および細胞形態を比較し

図1 抗CD38抗体を用いた2カラーフローサイトメトリー解析において、CD38の発現の強度の違いにより展開される、B細胞およびその他の細胞系列の位置を模式的に示す。

た¹⁾。両 fraction を有する症例を図3に示す。VLA-5⁺細胞は in vitro 増殖能が高く、IL-6 反応性が認められ、Ig 分泌能は低く、形態学的に immature myeloma cells (Greipp の分類⁵⁾) であった。一方、

VLA-5⁺細胞はほとんど non-growth fraction であり、IL-6 反応性はないが、Ig 分泌能は高く、形態学的にも mature myeloma cells であった。また、形質細胞性白血病や、末梢血中に循環する骨髓腫細胞

The expression of VLA-5 and MPC-1 on myeloma cells

図2 抗CD38抗体を用いた2カラーフローサイトメトリーによるVLA-5, MPC-1の発現を示す。VLA-5の発現に差がみられる。

および株化された骨髄腫細胞はVLA-5⁻/MPC-1⁻であり、逆に、多クローン性高γグロブリン血症および健常人の骨髄の形質細胞はほとんどVLA-5⁺/MPC-1⁺であった。したがって、VLA-5とMPC-1の発現で規定される未熟骨髄腫細胞(VLA-5⁻/MPC-1⁻)が実際にIL-6に反応して増殖する細胞群と考えられる。一方、VLA-5⁺/MPC-1⁺の成熟骨髄腫細胞は前者より分化した細胞であり、もはや増殖能がほとんどない細胞でいわば不死化状態(apoptosisを逸脱した)と考えられる(図4)。

VLA-5, MPC-1の発現は骨髄腫細胞の分化に関与していると思われるが、その細胞生物学的機能は不明である。VLA-5は接着分子の1つであり、そのリガンドはフィブロネクチンである⁶⁾。MPC-1も接着分子の可能性が示されつつある。骨髄腫細胞にお

いてVLA-5⁺細胞やMPC-1⁺細胞は骨髄ストローマ細胞に付着しやすいが、VLA-5⁻細胞やMPC-1⁻細胞は付着しにくい⁴⁾。骨髄腫細胞とストローマ細胞の付着は抗β1抗体(CD29)あるいは抗VLA-5抗体、抗MPC-1抗体により抑制されることや、一部の骨髄腫細胞がストローマ細胞に付着し長期培養が可能となることより、骨髄腫細胞がこれらの分子を介してストローマ細胞に接着し、分化のシグナルが伝達される可能性が考えられる。しかし、骨髄腫細胞にはCD11a, CD54, CD44およびCD56等の分子も発現しており⁷⁾、ストローマ細胞への接着およびシグナル伝達は複雑に絡み合っていると思われる。

正常形質細胞と骨髄腫細胞の識別

正常形質細胞と骨髄腫細胞とを識別できれば、良

VLA-5⁺ & VLA-5⁻ Myeloma Cells in Vitro Proliferation

図3 骨髄腫細胞が VLA-5⁻, VLA-5⁺ 両細胞からなる症例で, 両 fraction の増殖能 (³H-thymidine の取り込み) を測定した。

図4 接着分子の発現の相違による骨髄腫細胞の不均一性

性M蛋白血症から骨髄腫への移行機序や骨髄腫発症機序の解明が可能となる。正常質細胞と骨髄腫細胞における表面抗原の発現を抗 CD38抗体との2カ

ラーフローサイトメトリーを用いて行った。CD19とCD56の発現をみると, 約2/3の症例が CD19⁻/CD56⁺, 約1/3が CD19⁻/CD56⁻でごく一部が

Phenotypic Difference between Normal Plasma Cells and Malignant Plasma Cells

図5 CD19とCD56の発現パターンにより、正常形質細胞と骨髄腫細胞が識別できる。良性M蛋白血症においては、両者が存在している。

図6 BMGの形質細胞のclonality. CD19⁻ fractionに単一バンドを認める。

CD19⁺/CD56⁺であった(図5)。しかし、CD19⁺/CD56⁻の表面形質を有する骨髄腫はなかった。一方、骨髄、扁桃、脾臓およびリンパ節における正常形質

細胞の表面形質はすべてCD19⁺/CD56⁻であった。すなわち、正常形質細胞の表面形質はCD19⁺/CD56⁻であり、骨髄腫細胞においてこの表面形質を

Phenotype of MZ and GC B cell in Tonsil

図7 扁桃B細胞の2カラーフローサイトメトリー解析

GC B cell (✓) と MZ B cell (✓) が明瞭に識別できる。

有する症例が全くないことより、 $CD19^+/CD56^-$ の表面形質が正常形質細胞の特徴であると考えられる。

B細胞系抗原である $CD19$ は、今まで形質細胞には発現していないとされていたが、これはこれまでの報告が正常形質細胞の counter part として骨髓

腫細胞およびその細胞株における発現をみていたことに起因している。逆に骨髓腫細胞の大半が $CD19$ 陰性であることに、骨髓腫細胞における $CD19$ の生物学的役割が示唆される。また、骨髓腫細胞における $CD56$ の発現は上述のごとく骨髓ストローマ細胞

Plasmacytosis in PB and BM

図8 末梢血と骨髄で plasmacytosis を示した症例
正常形質細胞 (CD19⁺/CD56⁻) が著しく増加している。

との接着に関与している可能性がある。

骨髄腫の診断は骨髄腫細胞数、単クローン性免疫グロブリン (M成分) の量などによって行われている。時に、従来の診断基準では困難な形質細胞増多症やM蛋白血症に遭遇する。このような場合、Ig 遺伝子の再構成の有無などの遺伝子学的検索を行わなければならない。しかし、抗 CD38抗体による2カラーフローサイトメトリーを用い、CD19、CD56の発現を解析することにより容易に診断することが可能である。また、骨髄腫患者の治療が有効であった場合、骨髄腫細胞は減少し、正常形質細胞 (CD19⁺/CD56⁻細胞) を含めたB細胞系が回復してくる。すなわち、骨髄腫の治療効果の判定にもこの方法は有用である。今後、骨髄腫の診断および治療効果判断の新たな手段として骨髄腫細胞の表面抗原の解析はきわめて有用であると思われる。

良性M蛋白血症 (BMG) の形質細胞の解析

良性M蛋白血症における形質細胞の表面抗原の発現をみると、正常形質細胞の表面形質である CD19⁺/CD56⁻細胞と、上述の骨髄腫細胞でみられる

表面形質の細胞 (CD19⁻/CD56⁺細胞あるいは CD19⁻/CD56⁻細胞) が混在していた。さらに、両細胞群をそれぞれ分取してDNAを抽出した後、IgH 鎖遺伝子のVおよびJ primer によるPCR法を行ったところ、後者に単一バンドを認め (図6)、monoclonal 形質細胞であった。つまり、良性M蛋白血症の形質細胞には正常形質細胞と異常形質細胞 (骨髄腫細胞) の両者が存在しているといえる⁸⁾ (図5)。したがって、今後 BMG の悪性形質細胞の遺伝子発現等を明らかにすることが骨髄腫の発癌機構を明らかにする上で重要である。

Bリンパ球から形質細胞への分化過程

骨髄から出たB細胞は、まず抗原刺激によりリンパ節胚中心 (germinal center) へ入ると考えられる。リンパ組織のB細胞は mantle zone (MZ) B cell と germinal center (GC) B cell に大別できるとして両者の表面抗原をEロゼット法でT細胞を除去した後、抗 CD38抗体との2カラー染色を行い検索した (図7)。扁桃のB細胞は明瞭に2群に大別でき、一方は CD38⁺-VLA-5⁺-MPC-1⁺-CD24⁺-CD10⁻-CD5^{dim}

Development of Human B Lymphocytes (B₁ & B₂)

図9 B細胞系の形質細胞への分化過程（仮説）

positive(D+)Leu8⁺であり、他方は CD38⁺VLA-5-MPC-1-CD24⁺CD10⁺CD5⁺Leu8⁻であった。今までの報告から⁹⁾¹⁰⁾、前者が MZ B cell、後者が GC B cell といえる。

次に末梢血中で、胚中心B細胞から出て再び骨髄へ戻る運命にある、いわば前駆形質細胞の同定を試みた。末梢血単核球細胞を抗CD38抗体を用いて2カラー染色し、表面抗原解析を行うと、CD38抗原中等度陽性細胞が存在していた。この細胞の表面形質はCD19⁺CD56⁻VLA-4⁺VLA-5⁻MPC-1⁻で骨髄未熟形質細胞と酷似しており、末梢血中の前駆形質細胞と考えた。この細胞は健常人でも約0.1%存在し、強い炎症の存在（感染症、膠原病など）で増加して炎症の改善とともに減少した。また敗血症のような重症感染症ではこの細胞が末梢血中に10～20%も出現していた（図8）。

細胞表面抗原の解析から、B細胞から形質細胞にいたる過程に、骨髄のPre B細胞がリンパ組織(mantle zone, germinal center)を経て前駆形質細胞となり、末梢血から再び骨髄に入って未熟形質細胞(VLA-5⁻/MPC-1⁻細胞)となって、成熟形質細胞(VLA-5⁺/MPC-1⁺細胞)に分化する経路があると考えられる¹¹⁾。最後に、形質細胞をB細胞の最終分化段階として捉えたとき、現在われわれの考えている形質細胞への分化過程を示す(図9)。

ま と め

骨髄腫細胞は不均一な細胞集団であるが、接着分子の発現の相違により VLA-5⁻/MPC-1⁻の未熟骨髄腫細胞と、VLA-5⁺/MPC-1⁺の成熟骨髄腫細胞に大別される。正常形質細胞と悪性形質細胞（骨髄腫細胞）とは表面抗原の相違により識別でき、正常形

質細胞は CD19⁺/CD56⁻であり、骨髓腫細胞の多くは CD19⁻/CD56⁺で、CD19⁺/CD56⁻の骨髓腫細胞は認められない。良性M蛋白血症では、CD19⁺/CD56⁻の正常形質細胞と CD19⁻/CD56⁺あるいは CD19⁻/CD56⁻の悪性形質細胞が混在している。正常人末梢血中には、リンパ組織の胚中心B細胞から骨髓に入るいわば前駆形質細胞 (CD19⁺/CD56⁻/VLA-5⁻/MPC-1⁻) が存在する。

謝 辞

本研究において共同研究を頂いた三原圭一郎、黄

乃輝、原田結花、田中英夫、藏本 淳 (広島大学原医研内科)、岡田浩佑 (広島大学附属病院輸血部)、麻奥英毅、岩戸康治 (広島赤十字原爆病院)、坂井 晃 (国立大竹病院) の各先生にお礼申し上げます。また骨髓腫細胞株 NOP-2 を御供与いただいた名古屋大学第一内科永井利正先生に感謝致します。稿を終えるにあたり、発表の機会を与えていただいた白川茂会長ならびに座長の労をお取りいただいた高見剛、北 堅吉両先生に深謝申し上げます。

文 献

- 1) 原田浩徳, 河野道生, 藏本 淳: セルソーターによる前駆骨髓腫細胞の分離とその性状 Cytometry Research 3: s67-s73 1993
- 2) Kawano M, Hirano T, Matsuda T, Taga T, Horii Y, Iwato K, Asaoku H, Tang B, Tanabe O, Tanaka H, Kuramoto A, Kishimoto T: Autoocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. Nature 322: 83-85 1988
- 3) Kawano MM, Huang N, Harada H, Harada Y, Sakai A, Tanaka H, Iwato K, Kuramoto A: Identification of immature and mature myeloma cells in the bone marrow of human myelomas. Blood 82: 564-570 1993
- 4) Huang N, Kawano MM, Harada H, Harada Y, Sakai A, Kuramoto A, Niwa O: Heterogeneous expression of a novel MPC-1 antigen on myeloma cells: Possible involvement of MPC-1 antigen in the adhesion of mature myeloma cells to bone marrow stromal cells. Blood 82 (in press)
- 5) Greipp PR, Raymond NM, Kyle RA, O'Fallon WM: Multiple myeloma: Significance of plasmablastic subtype in morphological classification. Blood 65: 305-310 1985
- 6) Springer TA: Adhesion receptors of the immune system. Nature 346: 425-434 1990
- 7) Kawano M, Huang N, Tanaka H, Ishikawa H, Sakai A, Tanabe O, Nobuyoshi M, Kuramoto A: Homotypic cell aggregation of human myeloma cells with ICAM-1 and LFA-1 molecules. Br J Haematol: 583-588 1991
- 8) Harada H, Kawano MM, Huang N, Harada Y, Iwato K, Tanabe O, Tanaka H, Sakai A, Asaoku H, Kuramoto A: Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. Blood 81: 2658-2663 1993
- 9) Liu Y-J, Joshua DE, Williams GT, Smith CA, Gordon J, MacLennan ICM: Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. Nature 342: 929-931 1989
- 10) Holder MJ, Liu Y-J, Defrance T, Flores-Romo L, MacLennan ICM, Gordon J: Growth factor requirements for stimulation of germinal center B cells: evidence for an IL-2-dependent pathway of development. Int Immunol 3: 1243-1251 1991
- 11) Kipps TJ, Carson DA: Autoantibodies in chronic lymphocytic leukemia and related systemic autoimmune diseases. Blood 81: 2475-2487 1993