

骨髓不全症例の血清に検出される抗体が認識する 造血細胞抗原の SEREX 法による同定

矢 野 敏 雄

新潟大学大学院医歯学総合研究科

血液学分野

(主任：相澤義房教授)

Identification of Hematopoietic Cell Antigen which is Immunogenic in Patients with Bone Marrow Failure Using SEREX Method

Toshio YANO

Division of Hematology,

Niigata University Graduate School of

Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Yoshifusa Aizawa)

要 旨

難治性造血障害の代表疾患である再生不良性貧血や骨髓異形成症候群においては、自己免疫疾患と同様の免疫異常による骨髓不全、特に細胞障害性 T 細胞による造血幹細胞や前駆細胞に対する障害が原因である可能性が指摘されている。我々は造血細胞に発現している細胞障害性 T 細胞の標的抗原を明らかにする目的で、癌抗原研究の分野で有力な方法として発展してきた SEREX 法を用いて、再生不良性貧血症例血清中に検出される、骨髓細胞発現蛋白に対する自己抗体の同定を試みた。健常ドナー骨髓単核球より抽出した mRNA を、発現ベクターに組み込み cDNA ライブラリーを作成、約 10^6 個の phage plaque を、再生不良性貧血患者血清 IgG 分画でスクリーニングして、抗体で陽性になる clone を検索した。その結果 ZNF292 (KIAA0530) 遺伝子にコードされている Zinc finger モチーフを有する DNA 結合蛋白が同定された。この遺伝子発現の組織分布を Northern Blot 解析で調べたところ、胎盤、睪丸、前立腺、甲状腺で強い発現が認められた。一方造血組織である骨髓と末梢リンパ球細胞の発現は、Northern Blot では検出されなかったが RT-PCR で確認され、血液細胞の一部での発現が考えられた。さらに保存血清を用いて、同定された抗原蛋白に対する抗体の有無を Phage 法により検索したところ、骨髓不全を有する HLA DRB1*1501 陽性例において抗体陽性例が多く認められ、HLA と疾患の関連が示唆された。今後は同定された抗原蛋白と細胞性免疫の関連、そして造血障害の機序を明らかにする必要があると考えられる。

キーワード：骨髓不全症候群, SEREX 法, 再生不良性貧血, Zinc finger protein

Reprint requests to: Toshio YANO
Division of Hematology
Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences
1-757 Asahimachi - dori,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市旭町通り 1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科血液学分野（第一
内科） 矢野敏雄

はじめに

再生不良性貧血 (Aplastic anemia, AA) は、骨髄の低形成と汎血球減少を特徴とする難治性造血障害の代表的疾患のひとつである。造血障害は、何らかの原因により造血幹細胞あるいは造血前駆細胞の増殖分化の障害によって、正常な造血が行われなくなった状態で、免疫機構がその病態形成に深く関与していることが示唆されてきている^{1)~3)}。後天性発症で原因が特定できない特発性 AA においては、造血細胞障害の結果、造血幹細胞や造血前駆細胞の減少が確認されている^{4)~7)}。正常造血細胞障害の機序としては、これまでの *in vitro* の研究から、再生不良性貧血症例のリンパ球による造血幹細胞や造血前駆細胞に対する抑制作用⁸⁾⁹⁾、インターフェロン γ や TNF- α といった造血抑制性のサイトカインの産生増加¹⁰⁾¹¹⁾、活性化した抑制性 T 細胞の増加¹²⁾¹³⁾ といった研究結果が報告されてきた。さらに抗胸腺細胞グロブリン (ATG)、ステロイド、シクロスポリン (CsA) そしてサイクロフォスファミドといった、主に T リンパ球抑制を目的とした免疫抑制療法が、多くの特発性 AA 症例で治療効果を認めている^{14)~17)}。また最近、一部の骨髄異形成症候群 (MDS) 症例に対しても、ATG や CsA などの免疫抑制療法が治療効果を認め注目されている^{17)~20)}。これら *in vitro* のデータや臨床結果は、特発性 AA 症例や一部の MDS 症例における造血障害の原因は共通の機序として、T リンパ球を主とする免疫学的機序が重要であることを示唆している²¹⁾。実際 AA と MDS の両者間で鑑別困難な例が存在する。しかしこれまでのところ、これらの疾患における造血障害をもたらす T リンパ球が認識する抗原については全く不明である。

近年担癌患者の癌細胞に対する細胞性免疫作用が注目され、メラノーマ等固形癌を中心に T リンパ球が認識する癌抗原の同定が進んできた²²⁾。中でも 1995 年ドイツの Pfreundshuh と彼の共同研究者によって開発された、SEREX (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) 法は血清学的方法による癌抗原の

同定の道を切り開き、近年次々と癌抗原と想定される蛋白が同定されてきている²³⁾²⁴⁾。SEREX 法は患者 IgG 抗体が認識する癌蛋白を単離する方法である。したがってこの方法では、同定された抗原は少なくともヘルパー T 細胞に認識されることが保証されるが、細胞障害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) のターゲットとなる保証はないと考えられていた。しかし現実には CTL のクローニング法を利用して同定された癌抗原を SEREX 法でも検出できていることや、また反対に SEREX 法で同定された癌抗原が抗体産生と CTL を同時に誘導していることが報告されている²⁵⁾²⁶⁾。その結果、現在 SEREX 法を用いて癌抗原としての CTL 標的抗原を同定する方法は、最も有力な方法の一つとなっている。これらの成果からさらに SEREX 法は、自己免疫性疾患における自己抗体が認識する抗原を同定するためにも有用であることが報告されている²⁷⁾。

そこで今回我々は、特発性 AA 症例や MDS 症例の免疫異常における、造血障害の原因抗原を同定する目的で、AA 患者血清中の IgG クラス抗体を用いて、正常ヒト骨髄細胞から作成した cDNA ライブラリーを用いた SEREX 法を応用することで、AA 症例の血清中に検出される自己抗体が反応する、骨髄細胞に発現している自己抗原を検索した。その結果、造血障害を有する AA 症例や MDS 症例の一部で、Zinc finger モチーフを有する転写因子と考えられる蛋白が、共通する抗原蛋白として同定された。

方法と対象

1. cDNA library の作製

同系骨髄移植を行った AA 患者 (症例 15) の一卵性双生児の donor から同意を得て、採取した骨髄から guanidinium thiocyanate - CsCl 超遠心法にて total RNA を抽出した。Oligotex - dT30 <Super> Kit (Roche diagnostics) にて精製した mRNA 4 μ g から、Time Saver cDNA Synthesis Kit (Amersham pharmacia biotech) を用いて cDNA を合成した。 λ ZAP express vector (Stratagene)

に組み込み, phage に package して cDNA library を作製した.

2. 対象

今回抗体検索に用いた特発性骨髓不全症候群の対象症例は, 1993 年から 2001 年までに, 当院第一内科と関連施設で治療した 25 例である. 臨床診断としては, AA 症例 18 例 (厚生省重症度分類による重症 15 例, 中等症 3 例), 発作性夜間血色素尿症 (PNH)・AA 症候群 3 例 (重症 1 例, 中等症 2 例), AA と MDS (不応性貧血 RA) の鑑別困難な症例 (AA/MDS 例) 3 例 (重症 1 例, 中等症 2 例), MDS 5q-症候群例 1 例であった. また volunteer の健常人 17 例と, 造血幹細胞移植の目的で調べた HLA 検索で, HLA DRB1 1501 陽性の白血病症例 6 例の保存血清も抗体検索に用いた. 血液検体は, 採血後すぐに血清分離を施行, 小分けして -80°C で保存された. 保存血清を室温解凍して今回の assay に用いた.

3. Immunoscreening

SEREX 法で用いた AA 患者血清および Phage Plaque assay に用いた血清はすべて, あらかじめ大腸菌由来蛋白を結合させたカラムレジン吸着を施行して, 大腸菌に対する抗体を除去したものを使用した.

10mM MgSO_4 で competent cell とした XL1-blue MRF' に phage 溶液を加え, NZY 培地上で培養して plaque を形成させた. あらかじめ 10mM IPTG に浸しておいたニトロセルロース膜を plaque に載せ, 蛋白発現を誘導した. ニトロセルロース膜は blocking buffer (20 % FBS, 0.05 % Tween20) で非特異反応を低減させた後, alkaline phosphatase-conjugated goat antihuman IgG Fc γ secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Labs) を反応させてから NBT/BCIP で発色し, 偽陽性 plaque に印を付けておく. この膜を, 100 倍に希釈した血清と一昼夜反応させ, 再び secondary antibody, NBT/BCIP で発色させた. 先に印を付けておいた偽陽性 phage を除いて, 陽性 phage を検出し, さらに 2 次 screening を施行して陽性 clone を単離した.

4. clone の同定

陽性 clone を helper phage を用いて pBK-CMV vector (Stratagene) に組み換えた. Miniprep-ation で plasmid DNA を精製し, ABI Prism 310 DNA sequencer (Applied Biosystem) にて insert の核酸塩基配列を決定した. 陽性 Clone の insert 遺伝子配列から GenomeNet database (<http://www.genome.ad.jp/>) を利用して homology を認める遺伝子を検索した.

5. Northern blot analysis

陽性 clone (Clone56) plasmid DNA から切断した約 1.4kb の DNA 断片に ^{32}P を labeling して probe とし, poly A $^{+}$ RNA がプロットすみの Human Multiple Tissue Northern (MTN $^{\text{TM}}$) Blot I, II, III (CLONETECH Laboratories) を用いて Northern blot hybridization を行い, 各組織での発現を調べた.

6. RT-PCR

症例 1 と健常人の骨髓単核球, 造血器悪性腫瘍細胞株からの RNA 抽出には TRIZOL Reagent (GIBCO BRL) を用いた.

cDNA library 作製のもとにした症例 15 の donor の骨髓単核球, 急性白血病細胞株 HEL, 胎盤 (Human Placenta Total RNA, CLONETHCH Laboratories) の RNA を, それぞれ RT grade DNase (NIPPON GENE) で処理した後, Super Script First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) で cDNA を合成した. これらの cDNA を鋳型として, clone56 insert 内に設定した primer (clone56-sense; 5'-AGCAGAGACC-CAAAATACCC-3' (clone56 insert の 326 ~ 345 番目, ZNF292 gene の 3816 ~ 3835 番目), clone 56-antisense; 5'-CAGTATTCGGATGGTCTTTG-3' (clone56 insert の 2081 ~ 2100 番目, ZNF292 gene の 5571 ~ 5590 番目)) と Taq DNA polymerase (TaKaRa) を用いて thermal cycler (Perkin-Elmer) にて, 94°C 1 分, 60°C 1 分, 72°C 1 分の cycle で 30 cycle 反応させた後, 72°C 10 分の延長で反応させ PCR を行った. また, Database から得られた ZNF292 の塩基配列の中で, clone56 より 5'側に設定した各 primer,

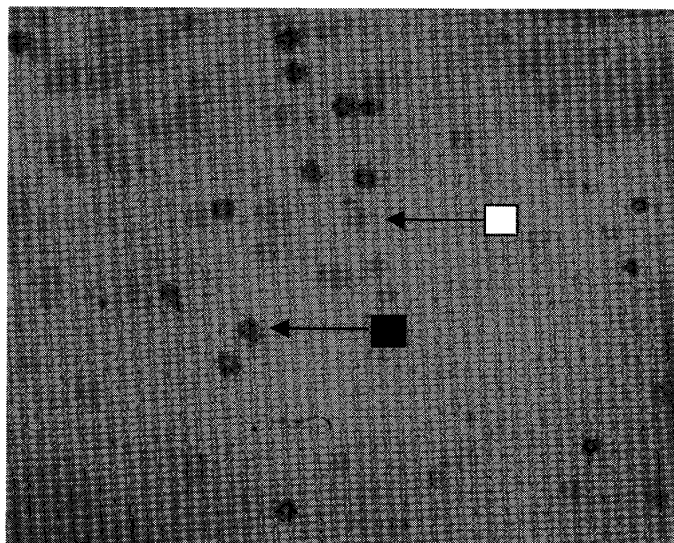


図1 Phage plaque assay

clone56 と cDNA library (negative control) の各々の phage を混合し蛋白を発現させ、plaque lifting した後、症例1の血清を反応させたニトロセルロース膜。陽性 plaque ■と陰性 plaque □が混在している。このようにコントラストを確認して、抗体陽性と陰性を検索した。

clone56 S1; 5'-CAAGGTGGTATGTTATGTTC-3' (ZNF292 gene の1405～1424番目)/AS1; 5'-GTAGTAAGTCATTCGTTGGA-3' (ZNF292 gene の2448～2467番目) と、clone56 S2; 5'-TCAAAC TCCAAACTTCCTC-3' (ZNF292 gene の2398～2417番目)/AS2; 5'-CGTAAAGCAGCAAACA TC-3' (ZNF292 gene の4097～4116番目) にて、94℃1分、55℃1分、72℃1分の cycle で30cycle 反応させた後72℃10分の延長で反応させた。

白血病細胞株 (YS-1, K562, KU812, NB4, HEL, Meg01, U937, Jurkat, Daudi, Raji, C2F8, TOM1, Molt3, Molt4) についても、同様の条件で clone56-sense/clone56-antisense primer にて RT-PCR を施行した。

7. Phage plaque assay

Allogenic の系で症例1より検出した陽性 clone (clone 56) について、他の患者および健康人血清における、抗体の有無を調べる目的で、陽性

clone phage を用いた phage plaque assay 法を施行した。

陽性 clone phage と、negative control として cDNA library を約 1:1 になるように混合した phage を XL 1-blue MRF' に組み込み、ニトロセルロース膜に plaque lifting させて、前述と同様に処理し 100 倍希釈した血清と反応させ、secondary antibodies, NBT/BCIP で発色させ、陽性 clone と陰性 clone が混在する条件で、血清中の抗体陽性と陰性を確認した (図1)。抗体陽性者の HLA DRB1*1501 の有無と、骨髓不全症候群の有無による 2 群間比較には Fisher の直接確率計算を用い、危険率 5%未満を有意とした。

結 果

1. AA 患者における自己抗原の同定

まず同系 (Syngeneic) の系 (症例15) で、一卵性双生児のドナー骨髓細胞を用いて作成した

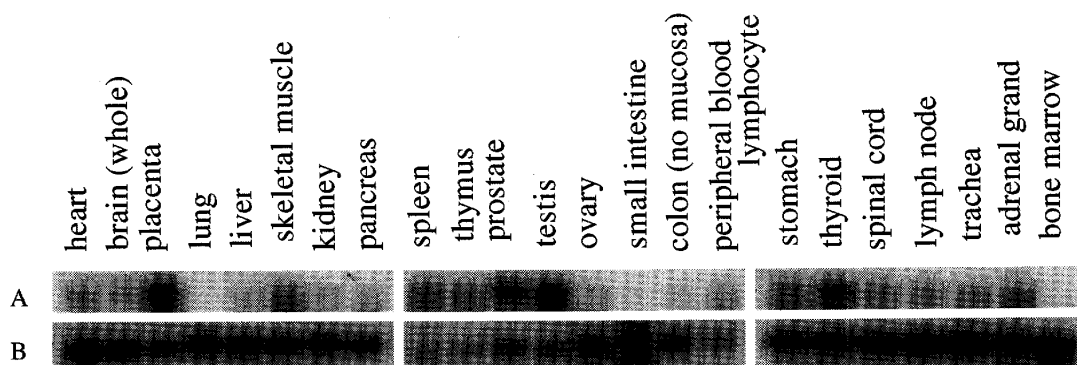


図2 Northern blot analysis のよる clone56 遺伝子の発現分布

A: Clone56 から 1.4kb 断片を probe として hybridization を行った. 9.5kb 程度の size のバンドが認められた. B: β -actin

cDNA library の, 約 1.5×10^6 個の phage plaque を screening したが, 陽性 plaque は全く得られなかった. そこで次に同種 (Allogenic) の系であるが, HLA DRB1*1501 genotype を持つ別の AA 患者 (症例 1) の血清で同じ cDNA library screening を施行した. Screening に用いた血清は, 症例 1 の治療前で輸血を含めた補充療法を受ける直前のものであった. その結果, 約 1×10^6 個の phage plaque のうち 4 個の陽性 plaque が得られた. それぞれの陽性 phage insert の塩基配列を決定したところ, いずれの核酸塩基配列も一致しており, 同一の遺伝子配列であった. そこでこの insert clone (clone56 と命名) について, 遺伝子 Database で検索したところ, KIAA0530 protein, また zinc finger protein (ZNF) 292 との homology が認められた. Clone56 insert は 2540bp の大きさで, その塩基配列は ZNF292 遺伝子の 3490 番目から 6029 番目に相当する配列と一致した. また ZNF292 遺伝子は, 第 6 染色体上 6q15 にマップされていた.

2. Clone56 遺伝子の発現

Clone 56 遺伝子の器官別発現分布を Northern blot 解析で解析した. その結果約 9.5kb 程度の single バンドが認められた. その発現強度は胎盤, 前立腺, 睪丸, 甲状腺において強く認められ, さらに心臓, 脳, 脾臓, 胸腺, 副腎, 骨格筋には弱い

発現が認められた (図 2). 一方 Northern blot 解析では, 骨髄と末梢血白血球の造血組織には発現をバンドとして検出できなかったことから, 造血細胞における発現を確認するために, clone56 領域内でのプライマーを用いた RT-PCR を施行した. Clone56 は全体が同一 exon 内であることから, DNase 処理を加えた RNA を用いて RT-PCR を施行した. その結果 donor 骨髄, 胎盤および白血病細胞株 HEL において, clone56-sense/ antisense primer で 1775kb のバンドが確認され, genomic DNA の増幅ではなく, 発現している RNA を検出した PCR product であることが確認された. さらに clone56 と ZNF292 の関連を確認するために, clone56 N5 末端より 5'側の primer S2 と clone56 内部の antisense primer:AS2, そしてさらに 5'側上流の S1/AS1 primer においても, それぞれに予想される 1719kb, 1063kb のバンドが得られた (図 3). このことから, clone56 は ZNF292 遺伝子の一部と考えられた. また造血細胞における発現を確認する目的で, 各種白血病細胞株での発現をみたところ, すべての細胞株で確認され, 特に白血病株の分化系との関連は認められなかった (図 4).

3. Phage 法による抗体陽性例の検出

血清保存されていた骨髄不全症例 25 例について, clone56 蛋白に対する抗体の有無を調べた.

症例の臨床診断はAA症例18例, PNH・AA症候群症例3例, MDSとAAの鑑別困難な症例3例, そしてMDS 5q-症候群例1例であった。HLAが確認できた例は23例, さらにHLA DRB1 genotypeも確認できた例は14例であった(表1)。そ

の結果HLA DR15(2)を持つ症例は23例中15例(65.2%)であった。この全骨髄不全症例25例のうち, Clone56に対する抗体が検出された例は7例であった(表1)。7例の中で, HLA DRB1*1501陽性は5例で, 1例はHLA不明, 1例はHLA DR15陰性であった。一方HLA血清型および遺伝子型から判断したHLA DRB1*1501陰性例11例の中で, 抗体陽性者は1例のみで, HLA DRB1*1501陽性9例中では5例の抗体陽性で統計学的に有意差を認めた($p < 0.05$)。一方同じHLA DRB1*1501を有する骨髄不全症候群以外の疾患症例, 急性骨髄性白血病2例, 急性リンパ性白血病3例, 慢性骨髄性白血病1例の計6例の血清においては, 全例抗体陰性であった($p < 0.05$)。ただし健常volunteer 17例中1例に抗体陽性者が観察された。

考 察

AAにおける造血障害は, 細胞障害性Tリンパ球(CTL)による幹細胞または前駆細胞に対する細胞障害が原因と考えられ, 治療としては, 非特異的Tリンパ球抑制を示す薬剤が使用されている。このような免疫抑制剤は高率に効果を認めるが, 副作用として重篤な免疫不全が懸念される。そこでCTLが認識する抗原を明らかにすることは, その発症機序の解明につながるとともに, 造血細胞障害をおこしているCTL特異的な治療に

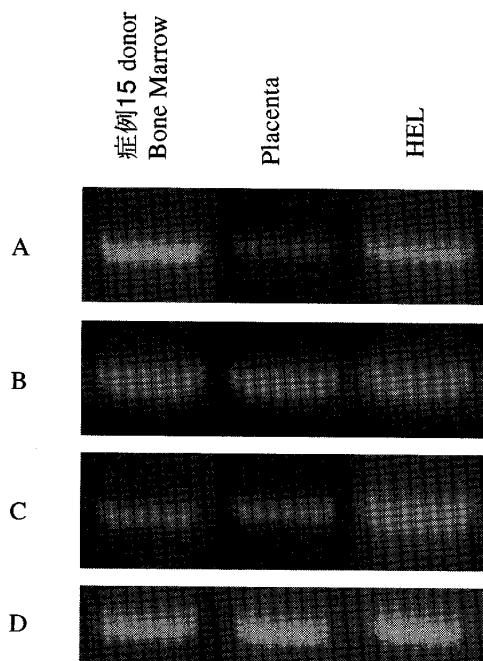


図3 DNase処理したRNAを用いたRT-PCRによるclone56遺伝子の発現。

A: clone56 sense/antisense primer.
B: clone56 S1/AS1.
C: clone56 S2/AS2.
D: GAPDH

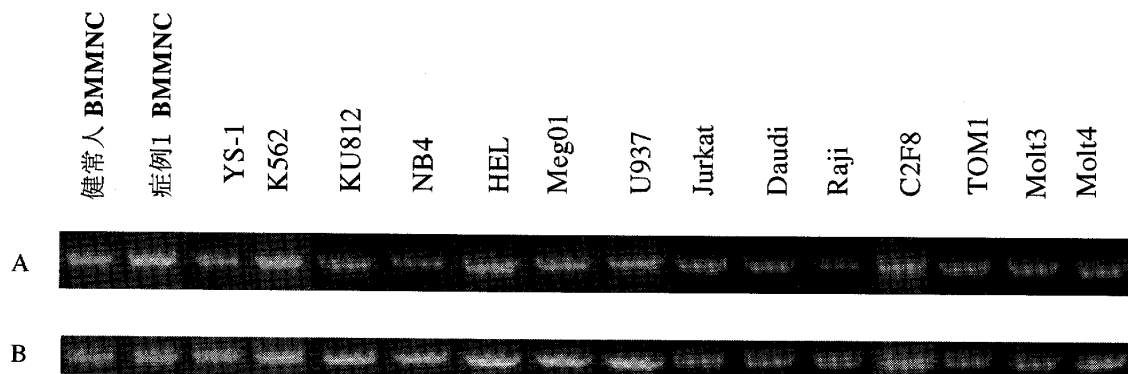


図4 RT-PCRによるclone56遺伝子の発現

A: Clone56 sense/antisense primerを用いたRT-PCR健常人, AA患者, 細胞株全てに, 1775bpのバンドが認められる。B: GAPDH

表 1 Phage plaque assay による抗体検査結果

症例	年齢/性	臨床診断	重症度	HLA DR	DRB1	Phage plaque assay
1	18/M	AA	重症	15, 4	1501, 0405	+
2	41/M	PNH/AA	重症	15, 15	1501, 1501	+
3	13/F	AA	重症	2, 9	1501, 0901	+
4	34/F	AA	中等症	15, 9	1501, 0901	+
5	52/M	AA/MDS RA	中等症	15, 4	1501, 0410	+
6	21/M	AA	重症	9, 13	NA	+
7	41/F	AA	重症	NA	NA	+
8	20/M	AA	重症	2, 9	1501, 0901	—
9	27/M	AA	重症	15, 9	1501, 0901	—
10	37/F	AA	重症	15, 15	1501, 1502	—
11	29/M	PNH/AA	中等症	2, 9	1501, 1509	—
12	27/M	AA	重症	2, 8	1502, 0802	—
13	18/M	AA/MDS RA	重症	2, 9	1502, 0901	—
14	27/F	AA	重症	2, 6	NA	—
15*	27/F	AA	重症	1, 4	NA	—
16	22/F	AA/MDS RA	中等症	15, 9	NA	—
17	45/F	AA	中等症	15, 4	NA	—
18	35/M	PNH/AA	重症	1,	NA	—
19	22/M	AA	重症	4, 13	NA	—
20	41/M	AA	重症	4, 8	NA	—
21	22/M	AA	重症	4, 9	NA	—
22	17/M	AA	中等症	4, 9	0405, 0901	—
23	17/F	AA	重症	9, 12	0901, 1201	—
24	48/M	AA	重症	NA	NA	—
25	47/F	MDS 5q—		15, 9	1502, 0901	—

M;男性、F;女性、AA;再生不良性貧血、PNH;発作性夜間血色素尿症、MDS;骨髓異形成症候群、RA;不応性貧血、5q—;5q—症候群、NA; 検査されておらず不明、+;陽性、—;陰性、MDS 5q—症候群の症例の重症度分類判定は不可。

結びつく可能性もある。

我々はそのような抗原同定のアプローチとして、SEREX 法による AA 患者血清中に検出される自己抗体を検出できるかを検索した。SEREX 法は autologous の系で施行することが原則である

が、AA 症例においては骨髓低形成のために、cDNA library を作成するのに十分な骨髓を得ることは困難である。そこで当初、syngeneic のドナー（遺伝的に同一と考えられる）が得られた AA 症例の血清を用いて、ドナー骨髓細胞 cDNA

library をスクリーニングしたが、陽性クローンはまったく得られなかった。そこで allogeneic の系になるが、別の AA 患者の輸血等補充療法が施行される直前の血清（すなわち同種抗原が形成される前の血清と考えられる）を用いてスクリーニングを施行した。その結果 4 plaque に陽性が得られ、その insert は全て同一配列であった。

得られた抗原遺伝子は、Northern 解析では一種類のバンドで約 10 kbp と大きな遺伝子であった。さらにこの遺伝子産物すなわち抗原蛋白は、データベースにおける情報から、ZNF292 遺伝子の一部であった。この蛋白は C2-H2 タイプモチーフの Zinc finger 蛋白であることから、転写因子である可能性が高い。そして今回 SEREX 法で同定された Clone56 のアミノ酸配列には Zinc finger モチーフが 6 個認められる。このように自己抗原が細胞内蛋白、特に DNA や RNA と結合する蛋白であるような例は、膠原病や傍腫瘍性神経症候群においても認められる²⁷⁾²⁸⁾。このような例の病態発症の機序としても、自己抗体ではなく、抗原蛋白に対する CTL の病体形成への関与が示唆されている²⁹⁾³⁰⁾。骨髄不全における ZNF292 抗体についても、抗体ではなく ZNF292 を認識する CTL が造血障害をきたす可能性を考えて、この蛋白の造血組織における働きとともに、今後の研究を進める必要がある。

ところで今回同定された clone56 蛋白に対する抗体が検出される骨髄不全症例には、HLA に偏りを有する傾向が認められた。以前から AA の中には、HLA クラス II の中で DR15 (DR2) を持つ例が多いことは知られていた³¹⁾。さらに DR2 の中でも HLA-DRB1*1501 を持つ例はシクロスポン治療に対する反応性が特に良く、また依存性になりやすいとの報告がある³²⁾³³⁾。さらに最近 MDS の中で免疫抑制療法に反応して改善した例の中にもこの HLA-DRB1*1501 ハプロタイプが高頻度に検出されることが報告され³⁴⁾、HLA-DRB1*1501 を有するハプロタイプには、自己免疫性骨髄不全の疾患感受性遺伝子を含んでいる可能性が示唆される。その意味でも今回同定された ZNF292 が、HLA 遺伝子群と同一の第 6 染色体上

にマップされ、この蛋白に対する抗体陽性者に HLA DRB1*1501 への偏りが観察されたことは大変興味深い。

謝 辞

最後に、本研究の御指導及び論文の御高閲を頂きました新潟大学大学院総合研究科循環器分野（第一内科）相澤義房教授、新潟大学医歯学総合病院・高密度無菌治療部古川達雄助教授に深謝いたします。本研究は科学研究費補助金・基盤研究 (C) (2)・課題番号 15590997 の補助を受けた。

参 考 文 献

- 1) Young NS and Maciejewski J: The pathophysiology of acquired aplastic anemia. *N Engl J Med* 336: 1365-1372, 1997.
- 2) Young NS, Abkowitz JL and Luzzatto L: New Insights into the Pathophysiology of Acquired Cytopenias. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 18-38, 2000.
- 3) Young NS: Acquired aplastic anemia. *Ann Intern Med* 136: 534-546, 2002.
- 4) Maciejewski JP, Anderson S, Katevas P and Young NS: Phenotypic and functional analysis of bone marrow progenitor cell compartment in bone marrow failure. *Br J Haematol* 87: 227-234, 1994.
- 5) Scopes J, Bagnara M, Gordon-Smith EC, Ball SE and Gibson FM: Haemopoietic progenitor cells are reduced in aplastic anaemia. *Br J Haematol* 86: 427-430, 1994.
- 6) Maciejewski JP, Selleri C, Sato T, Anderson S and Young NS: A severe and consistent deficit in marrow and circulating primitive hematopoietic cells (long-term culture-initiating cells) in acquired aplastic anemia. *Blood* 88: 1983-1991, 1996.
- 7) Schrezenmeier H, Jenal M, Herrmann F, Heimpel H and Raghavachar A: Quantitative analysis of cobblestone area-forming cells in bone marrow of patients with aplastic anemia by limiting dilution assay. *Blood* 88: 4474-4480, 1996.

- 8) Kagan WA, Ascensao JA and Pahwa RN: Aplastic anemia: presence in human bone marrow of cells that suppress myelopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 2890 - 2894, 1976.
- 9) Hoffman R, Zanjani ED, Lutton JD, Zalusky R and Wasserman LR: Suppression of erythroid - colony formation by lymphocytes from patients with aplastic anemia. *N Engl J Med* 296: 10 - 13, 1977.
- 10) Dufour C, Corcione A, Svahn J, Haupt R, Battilana N and Pistoia V: Interferon gamma and tumour necrosis factor alpha are overexpressed in bone marrow T lymphocytes from paediatric patients with aplastic anaemia. *Br J Haematol* 115: 1023 - 1031, 2001.
- 11) Nakao S, Yamaguchi M, Shiobara S, Yokoi T, Miyawaki T, Taniguchi T and Matsuda T: Interferon - gamma gene expression in unstimulated bone marrow mononuclear cells predicts a good response to cyclosporine therapy in aplastic anemia. *Blood* 79: 2532 - 2535, 1992.
- 12) Zoumbos NC, Gascon P, Djeu JY, Trost SR and Young NS: Circulating activated suppressor T lymphocytes in aplastic anemia. *N Engl J Med* 312: 257 - 265, 1985.
- 13) Herrmann F, Griffin JD, Meuer SG and Meyer zum Buschenfelde KH: Establishment of an interleukin 2 - dependent T cell line derived from a patient with severe aplastic anemia, which inhibits in vitro hematopoiesis. *J Immunol* 136: 1629 - 1634, 1986.
- 14) Rosenfeld SJ, Kimball J, Vining D and Young NS: Intensive immunosuppression with antithymocyte globulin and cyclosporine as treatment for severe acquired aplastic anemia. *Blood* 85: 3058 - 3065, 1995.
- 15) Rosenfeld S, Follmann D, Nunez O and Young NS: Antithymocyte globulin and cyclosporine for severe aplastic anemia: association between hematologic response and long - term outcome. *JAMA* 289: 1130 - 1135, 2003.
- 16) Ball SE: The modern management of severe aplastic anaemia. *Br J Haematol* 110: 41 - 53, 2000.
- 17) Young NS: Immunosuppressive treatment of acquired aplastic anemia and immune - mediated bone marrow failure syndromes. *Int J Hematol* 75: 129 - 140, 2002.
- 18) Molldrem JJ, Caples M, Mavroudis D, Plante M, Young NS and Barrett AJ: Antithymocyte globulin for patients with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 99: 699 - 705, 1997.
- 19) Sauntharajah Y, Nakamura R, Nam JM, Robyn J, Loberiza F, Maciejewski JP, Simonis T, Molldrem J, Young NS and Barrett AJ: HLA - DR15 (DR2) is overrepresented in myelodysplastic syndrome and aplastic anemia and predicts a response to immunosuppression in myelodysplastic syndrome. *Blood* 100: 1570 - 1574, 2002.
- 20) Sauntharajah Y, Nakamura R, Wesley R, Wang QJ and Barrett AJ: A simple method to predict response to immunosuppressive therapy in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood* 102: 3025 - 3027, 2003.
- 21) Barrett J, Sauntharajah Y and Molldrem J: Myelodysplastic syndrome and aplastic anemia: distinct entities or diseases linked by a common pathophysiology? *Semin Hematol* 37: 15 - 29, 2000.
- 22) Old LJ and Chen YT: New paths in human cancer serology. *J Exp Med* 187: 1163 - 1167, 1998.
- 23) Sahin U, Tureci O, Schmitt H, Cochlovius B, Johannes T, Schmits R, Stenner F, Luo G, Schobert I and Pfreundschuh M: Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 11810 - 11813, 1995.
- 24) Sahin U, Tureci O and Pfreundschuh M: Serological identification of human tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 9: 709 - 716, 1997.
- 25) Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Tureci O, Gure AO, Tsang S, Williamson B, Stockert E, Pfreundschuh M and Old LJ: A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1914 - 1918, 1997.
- 26) Jager E, Chen YT, Drijfhout JW, Karbach J,

- Ringhoffer M, Jager D, Arand M, Wada H, Noguchi Y, Stockert E, Old LJ and Knuth A: Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer - testis antigen NY - ESO - 1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA) - A2 - binding peptide epitopes. *J Exp Med* 187: 265 - 270, 1998.
- 27) Krebs P, Kurrer M, Sahin U, Tureci O and Ludewig B: Autoimmunity seen through the SEREX - scope. *Autoimmun Rev* 2: 339 - 345, 2003.
- 28) Darnell RB and Posner JB: Paraneoplastic syndromes involving the nervous system. *N Engl J Med* 349: 1543 - 1554, 2003.
- 29) Albert ML, Darnell JC, Bender A, Francisco LM, Bhardwaj N and Darnell RB: Tumor - specific killer cells in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Nat Med* 4: 1321 - 1324, 1998.
- 30) Tanaka M, Tanaka K, Tsuji S, Kawata A, Kojima S, Kurokawa T, Kira J and Takiguchi M: Cytotoxic T cell activity against the peptide, AYRARALEL, from Yo protein of patients with the HLA A24 or B27 supertype and paraneoplastic cerebellar degeneration. *J Neurol Sci* 188: 61 - 65, 2001.
- 31) Nimer SD, Ireland P, Meshkinpour A and Frane M: An increased HLA DR2 frequency is seen in aplastic anemia patients. *Blood* 84: 923 - 927, 1994.
- 32) Nakao S, Takamatsu H, Chuhjo T, Ueda M, Shiobara S, Matsuda T, Kaneshige T and Mizoguchi H: Identification of a specific HLA class II haplotype strongly associated with susceptibility to cyclosporine - dependent aplastic anemia. *Blood* 84: 4257 - 4261, 1994.
- 33) Ihan O, Beksac M, Arslan O, Ozcan M, Koc H, Akan H, Gurman G, Konuk N and Uysal A: HLA DR2: a predictive marker in response to cyclosporine therapy in aplastic anemia. *Int J Hematol* 66: 291 - 295, 1997.
- 34) Okamoto T, Okada M, Yamada S, Takatsuka H, Wada H, Tamura A, Fujimori Y, Takemoto Y and Kakishita E: Good response to cyclosporine therapy in patients with myelodysplastic syndromes having the HLA - DRB1*1501 allele. *Leukemia* 14: 344 - 346, 2000.

(平成16年1月21日受付)