

〔原 著〕

細胞死現象に基づいた貧血形態の分類，細胞増殖と分化とアポトーシス，および，成熟赤血球の細胞死

安河内太郎，澤田 賢一*，家子 正裕**，小泉 和輝*，小池 隆夫*

北海道医療大学医科学研究センター兼北海道医療大学保健管理センター
*北海道大学医学部第二内科講座
**北海道医療大学歯学部内科

(主任：安河内太郎教授)
*(主任：小池 隆夫教授)
**(主任：家子 正裕教授)

Classification of Types of Anemia on the Basis of Cell Death Phenomena. Cell-Proliferation, Cell-Differentiation and -Apoptosis, and Specification of Cell Death in Mature Red Cells

Taro YASUKOUCHI, Ken-ichi SAWADA*, Masahiro IEKO**,
Kazuki KOIZUMI* and Takao KOIKE*

The Research Institute of Medical Science, and Health Counseling and Assessment Center,
Health Sciences University of Hokkaido

*The Second Department of Internal Medicine, School of Medicine, Hokkaido University

**The Department of Internal Medicine, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

(Chief : Professor Taro YASUKOUCHI)
*(Chief : Professor Takao KOIKE)
**(Chief : Professor Masahiro IEKO)

Abstract

A classification of types of anemia on the basis of the cell death phenomena is proposed. The proposed classification accounts for recent developments in studies of hemopoietic mechanisms and new formulae for specifying cell death.

Cell-proliferation, cell-differentiation, and -apoptosis are understood to be divided into two different processes : cell proliferation accompanied by or not accompanied by cell differentiation. However, apoptosis is only frequent, when cell proliferation is accompanied by differentiation.

受付：平成11年3月31日

In anemia, apoptosis of immature cells in bone marrow may be incited by : disturbance of the bone marrow microenvironment, decreased supply of cell growth factors and hemopoietic factors, excess production of negative regulators of hemotopoiesis, lack of nutritious elements, inhibition of heme synthesis, and others.

Destruction of senescent red cells does constitute a type programmed cell death which, however, has been found to be different from patterns of apoptosis. Hemolytic anemia may be caused by mechanical damage, complement-mediated cell lysis, and highly toxic agents. Therefore, hemolysis may be classified to belong to the cell death type necrosis. However, mature red cells do not contain lysosomes which would give rise to inflammation. This provides justification for thinking that hemolysis of mature red cells should be differentiated from cell necrosis which is accompanied by inflammation of tissue.

The authors propose a classification of necrosis followed by inflammation as type I necrosis, while hemolysis which is not followed by inflammation is considered as type II necrosis.

Key words : Anemia, Classification, Proliferation, Differentiation Apoptosis, Hemolysis.

はじめに

Anemias (貧血症)とは赤血球容量比 (hematocrit, Ht),あるいは,全末梢血中の色素 (hemoglobin, Hb) 量の減少を来した状態で種々の血液疾患を含み,血液疾患以外の種々の疾患に随伴して現れる現象である。従来,貧血症は1.造血の障害(赤血球産生の低下),2.溶血の亢進(赤血球破壊の亢進),3.出血(赤血球の喪失)を来す疾患として分類されてきた。

一方,多様なすべての血液細胞がただ1種類のhematopoietic stem cell(造血幹細胞)からdifferentiation(分化)したものであることが明らかにされ^{1,2)},造血の障害による貧血疾患も造血幹細胞のproliferation(増殖)や分化の障害として取り上げられるようになってきた³⁾。

1972年Kerrらによってapoptosis(アポトーシス)の概念が提唱され^{4,5)},その発現機序も明らかにされてきている。また,貧血疾患とアポトーシスとの関係も検討されているので,造血機構と細胞死と貧血との関係について考察を加えた。

1. 造血機構

造血幹細胞(母細胞)は分化を伴わない増殖, self-renewal ability(自己再生能)を有し^{7,8)},すべての血液細胞に分化出来る能力, multipotentiality(多分化能)を有する細胞(pluripotent stem cell, 多能性幹細胞)で,細胞表面形質(cluster of differentiation: CD, など)によって特定される。すなわち,ヒト多能性幹細胞はCD34抗原陽性, CD33抗原陰性, CD38抗原陰性, HLA-DR陽性細胞, c-kit抗原陽性, (CD34+, CD33-, CD38-, HLA-DR+, c-kit+細胞)である⁹⁻¹³⁾。

造血幹細胞は造血器のhematopoietic-inductive microenvironment (HIM)¹⁴⁻²⁰⁾内で, stroma cells(間質細胞: reticular cells—アルカリホスファターゼ陽性の外膜性網状細胞¹⁴⁾, fat cells—前脂肪細胞性繊維芽細胞, endothelial cells—内皮細胞, macrophages—マクロファージ)とcell-to-cell contact(細胞間接触)することが必要とされる^{21,22)}。細胞間接触には幹細胞のvery late antigen 4 (VLA4)と間質

細胞の vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1)²³⁾ や fms-like tyrosin kinase-3 (Flt-3)²⁴⁾ と Flt-3 ligand (Flt-3L)²⁵⁾, ムチン受容体 CD164²⁶⁾, c-kit 抗原²³⁾ などが関与し, Flt-3L や 間質細胞から分泌される stem cell factor (SCF)²⁴⁾ や ホルモンとして供給される thrombopoietin (TPO)²⁴⁾ によって自己再生をする。

造血幹細胞 (多能性幹細胞) は 骨髄系の multipotential myeloid progenitor cell (多能性骨髄性前駆細胞) と リンパ球系の multipotential lymphoid progenitor cell (多能性リンパ球性前駆細胞) に分化・増殖し, さらに, committed (多能性を失った²⁵⁾) 前駆細胞, unipotent hematopoietic stem cells (単能性幹

細胞) に分化・増殖し, 成熟して末梢血にみられるような terminal mature cells (終末成熟細胞群) が生成される (図 1)。図 1 に示すように細胞の増殖・分化には cell growth factors や 特定のサイトカインとその受容体の出現が重要であり, これらの造血因子の欠乏や受容体の異常は種々の血液疾患の原因になる。

2. 赤血球系細胞の分化と増殖 (図 2)

多能性幹細胞から赤血球系前駆細胞, burst forming unit of erythrocyte (BFU-E) に分化する期間は 10~15 日を要すると考えられている。Stopkらはマウスの CD34+, Iin+ 細胞由来の BFU-E が EPO を産生すること, および, EPO

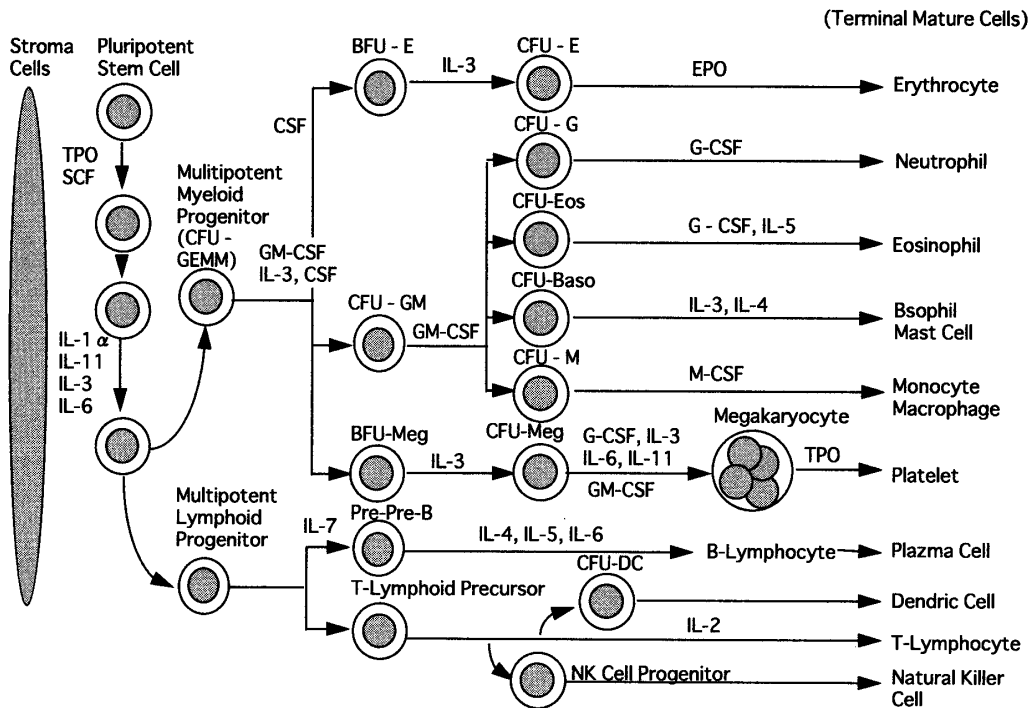


図 1 造血細胞の分化, 成熟の概要

Pluripotent Stem Cell (多能性幹細胞: 造血幹細胞) は 間質性上皮細胞上で self renewal (自己増殖) し, 一部の細胞が骨髄系とリンパ系細胞に分化しながら増殖して成熟する。これらの造血細胞の分化・増殖には骨髄の種々の間質細胞や接着因子のほかの組織や細胞から分泌される造血因子や成長因子が必要である。

造血因子: IL-1, ~7: interleukin-1, ~7, CSF: colony-stimulating factor, TPO=thrombopoietin, EPO: erythropoietin, G-CSF: granulocyte colony-stimulating factor, M-CSF: macrophage colony-stimulating factor.

造血細胞: CFU-GEMM: colony-forming unit granulocyte-erythrocyte-megakaryocyte, CFU-GM: granulocyte-erythroid-megakaryocyte, BFU-E: burst forming unit of erythrocyte, CFU-E: colony forming unit of erythrocyte, CFU-Eos: colony forming unit of eosinophil, CFU-Baso: colony forming unit of basophil, BFU-Meg: burst forming unit of megakaryocyte, Pre-Pre-B: Pre-Pre-B lymphocyte, CFU-DC: colony forming unit of dendrite cell, NK Cell Progenitor: natural killer cell

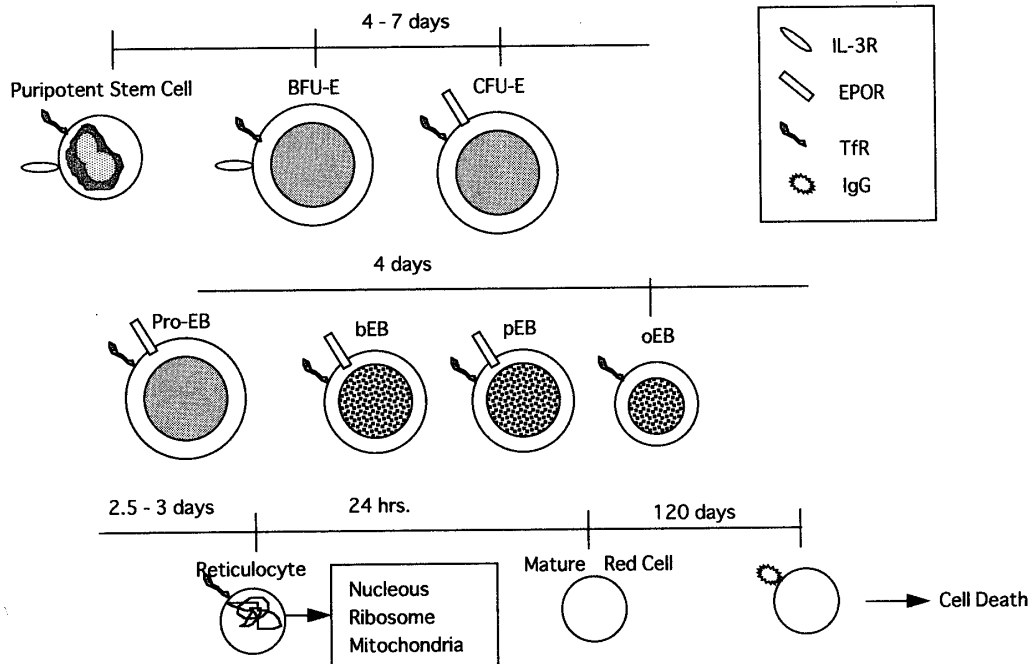


図2 赤芽球系幹細胞の分化と成熟

BFU-E: burst forming unit of erythrocyte, CFU-E: colony forming unit of erythrocyte, Pro-EB: basophilic proerythroblast, bEB: basophilic erythroblast, pEB=polychromatic erythroblast, oEB: orthochromatic erythroblast, Ret.: Reticulocyte, IL-3R: interleukin 3 receptor, EPOR: erythropoietin receptor, TfR: transferrin receptor.

receptor (EPOR) を表出していることから、EPO産生能があることが白血球系前駆細胞に対するBFU-Eの特質であると主張している²⁷⁾。しかしながら、Sawadaらによって確立されたBFU-E純化培養法²⁸⁾を用いたわれわれの研究ではBFU-Eの増殖にはEPOの関与は認められなかった^{29,30)}。従って、BFU-Eが産生する内因性のEPOやEPORの存在の意義は不明である。

BFU-EはSCF, および, interleukin-3 (IL-3) の存在下に増殖して後期の赤血球系前駆細胞, colony forming unit of erythrocyte (CFU-E) に分化するが, CFU-Eの増殖・分化はEPO依存性である^{29,30)}。

これらの研究ではBFU-E培養3日からEPO依存性に赤血球系前駆細胞 (CFU-E) の増殖がみられ, EPO無添加培地では5日目の赤血球系前駆細胞 (BFU-E) が激減している³⁰⁾。従って,

in-vitroの成績ではあるが, BFU-EからCFU-Eへの分化には72時間前後の時間 (約3日) を要するものと考えられる。Filmanowicz & Gornyはproerythroblast (前赤芽球) からorthochromatic erythroblast (正染色赤芽球) までの成熟に4日間, 正染色赤芽球から脱核して成熟赤血球のいたるにはさらに2日間を要することを明らかにしている³¹⁾。従って, BFU-Eから成熟赤血球に成熟する期間は約9日間を要する。成熟赤血球は末梢循環血に入って酸素・二酸化炭素の運搬に関与し, 老化して120日後脾臓で壊される。

3. アポトーシスの概略

前述したごとく, 1972年Kerrらによって核濃縮を来す細胞の死亡形態に対してアポトーシスという概念が提唱され, necrosis (ネクロシス: 壊死) による細胞死と区別されるように

なった^{4,5)}。

アポトーシスによる細胞死は胎児の成長につれて不要になった組織の排除に、また、生体にとって有害な細胞の排除に必須の自殺機構であり、計画された死「programmed cell death (PCD, 計画死)」であると云われていたが、PCDではないアポトーシスもあることが知られている。

アポトーシスの細胞形態の変化は細胞膜の棘状・鈍鋸歯状変化 (blebbing), 細胞収縮, クロマチンの濃縮と偏在化, 核DNAの断片化によって特徴付けられ^{32,33)}, 核クロマチンの約180塩基対のはしご型 (ladder pattern) DNAの断片化がアガロースゲル電気泳動によって証明される³⁴⁾。細胞内のDNAの断片やその他の封入体はそれぞれが核膜³⁵⁾や細胞表層の細胞膜などの断片で覆われてアポトーシス小体を形成する^{3,4,35)}。アポトーシス小体はただちに、近辺の単球・マクロファージ系細胞の貪食細胞, および、上皮細胞に貪食され処理される。

有核細胞のアポトーシスはCa²⁺, グルコルチコイド, 放射線, 活性酸素や細胞障害性TリンパやNatural Killer Cell (NK細胞) などによって誘導される³⁶⁻⁴¹⁾。アポトーシスの発現は、過剰の放射線照射などによってミトコンドリア膜の障害とミトコンドリア内のチトクロームCの減少による過酸化物質 (O₂⁻) の増加, さらに、放出されたチトクロームCによって最終的にcaspase 9が活性化されることに由来するもの⁴²⁾と、細胞膜に表出するFas⁴³⁻⁴⁵⁾/APO-1抗原⁴⁷⁾ (Fas抗原), tumor necrosis factor (TNF) receptor (TNF受容体), DR3/Apo3/Wsl1, DR1, 2, 4 or 5等のdeath receptorsにそれぞれのligandsが結合することによって最終的にはcaspase 8が活性化されることによるもの⁴⁷⁻⁴⁹⁾とが大別される⁵⁰⁾。例外的にはFas抗原によるミトコンドリアからのチトクロームCの放出もあるが、これはcaspase 8の効果を増強

するということである⁴²⁾。なお、Fas抗原の分子構造がnerve growth factor (NGF) receptorやTNF receptorに類似するので、FasはTNF and NGF receptor familyに含まれる^{47,51-54)}。一方、DNA障害がFas/Apo-1, TNFとそれらのligandsの結合に先行するとの報告もある⁵⁵⁻⁵⁹⁾。なお、Fas抗原を経由するシグナル伝達はTNF抗原を経由する場合よりも圧倒的に早くアポトーシスを結果することから、Fas抗原によるアポトーシスが重視されている。

細胞内アポトーシス誘導因子としてBax⁶⁰⁾, Bak⁶¹⁻⁶³⁾, Bad⁶⁴⁾, ICE⁶⁵⁾, c-myc⁶⁶⁾, p53⁶⁷⁾, E1A⁶⁸⁾などのoncogene (癌遺伝子) があるが、このようなアポトーシスのシグナル伝達もbcl-2^{69,70)}やbcl-xL⁷¹⁾, Al, MCL1などの細胞死抑制因子によって回避される。アポトーシス誘導因子と細胞死抑制因子とのバランスが細胞の生死を決定すると考えられているが、中でも、Rasの協調下でのc-mycとbcl-2のバランスが重視されている⁷²⁾。

未熟な造血幹細胞が増殖するか、アポトーシスに陥るかは細胞増殖過程に於けるcell cycle (細胞回転), すなわち、G0→G1→S→G2→M期への細胞回転におけるS期への移行停止 (G1 arrest)の時点で、細胞が増殖するかアポトーシスするかが決まる。アポトーシス誘導によって、DNAが損傷を受けるとS期への移行停止 (G1 arrest)かアポトーシスかが運命付けられるが、DNA修復をするinitiatorであるp53がG1期に働いて損傷を受けた細胞を生存させるか、DNA修復がうまく行かなければ、返って細胞をアポトーシスに導く^{73,74)}。この事はまた、G1期が細胞が増殖するかアポトーシスに到るかのチェックポイントであることを意味している。アポトーシスはこのほか、終末分化細胞や未分化な細胞に抗ガン剤投与によってG2/M期に起きることも知られている⁷⁵⁾。

なお、細胞回転に於けるG0, G1, S, G2, M

期とはG0期 (resting period, 休眠期), G1期 (period of cytoplasmic activity in preparation for cellular duplication, 細胞複製の準備のための細胞形質活性化の時期), S期 (synthethetic period covering DNA replication, DNA複製の合成期) G2期 (premitotic resting period of tetraploid cell, 染色体が4本ののまま安定している核分裂前期), M期 (mitotic period, 核分裂期) のことである。

4. 造血幹細胞の運命

母細胞である造血幹細胞は枯渇しないように、数を一定量に保つ必要がある。このために、一定量の造血幹細胞は分化しない状態で維持されなければならない。造血幹細胞の自己増幅は分化を伴わないと考えられており^{7,8)}、造血母細胞の自己増幅の最終段階で、c-kitやFlt3の発現が増強して少し性質が変わる。すなわち、この段階の造血幹細胞になって初めてstroma cells上で分化・増殖する事を示唆した²³⁾。また、正常の造血幹細胞の自己増幅段階でのアポトーシスし易いか否かは明らかにされていないように思われる。

c-kitやflt3の発現が増強している造血幹細胞は種々のサイトカインによってcommitted stem cellsに分化しながら増殖し、次第に増殖能が失われ、成熟する。この間、造血幹細胞は何らかの影響(例えば、cell growth factorの欠損など⁷⁵⁾)によって細胞は自殺(アポトーシス)する。

一方、白血病細胞はFas抗原を過剰に表出している⁷⁶⁾が、急性白血病ではアポトーシス抵抗性を有するとも云われ、分化しないで増殖する。その主要な理由はbcl-2が増加している⁷⁷⁻⁸⁰⁾ためと考えられている。

細胞増殖と分化とアポトーシスの関係であるが、造血母細胞は分化をとらなわない増殖であり、その下流の幹細胞はサイトカイン依存性に

増殖しながら分化し、増殖と分化は連結している。一方、増殖過程である細胞回転の場でアポトーシスが起ることもあるから、増殖とアポトーシスも密接な関係にあることを示唆している。実際に、アポトーシスを誘導するc-mycが休止期の細胞には出現しないが、増殖している細胞には認められること、アポトーシスを誘導するc-mycやadenovirus E1Aが細胞増殖のinducerであることからEvan & Littlewoodは増殖過程とアポトーシスの過程は連結していると述べている⁸¹⁾。他方、Bondurantらはc-mycに対するantisense oligonucleotideをEPO存在下のヒトCFU-Eの培地に添加すると、細胞増殖は抑制されるが、細胞分化やアポトーシスは影響されないことを認め、c-mycは細胞増殖に影響するが、細胞分化やアポトーシスには影響しないと推定している⁸²⁾が、CFU-Eの分化を誘導するEPO存在下の現象であることに留意しなければならない。ただ、この研究においても、増殖と分化が逆の方向性を示すことがあることを示唆している。

Okamuraらはtrans-retinoic acid (ATRA)を投与すると、骨髓性白血病に骨髓芽球を分化するが、Fas抗原が増加し、bcl-2は若干減少させ、アポトーシスを誘導すると報告している⁸³⁾。SundaresanらはATRAはnon-Hodgkin's lymphoma (リンパ肉腫)の増殖を抑えるが、ATRAにさらされるとbcl-2蛋白が半減すると報告している⁸⁴⁾。また、Miwaらは他の白血病細胞よりも分化している(8;21)転座の急性白血病でbcl-2蛋白量が少ないことを報告している⁸¹⁾。

また、正常者と同様に幼弱細胞が分化する慢性骨髓性白血病はアポトーシスを起こし易い⁸⁵⁾。また、分化誘導療法を施行した急性骨髓性白血病はアポトーシスを起こしやすくなる⁸⁶⁾。これは抗ガン剤(分化誘導剤)の分化刺激によって、自己複製(増殖)を困難にし、上手に分化

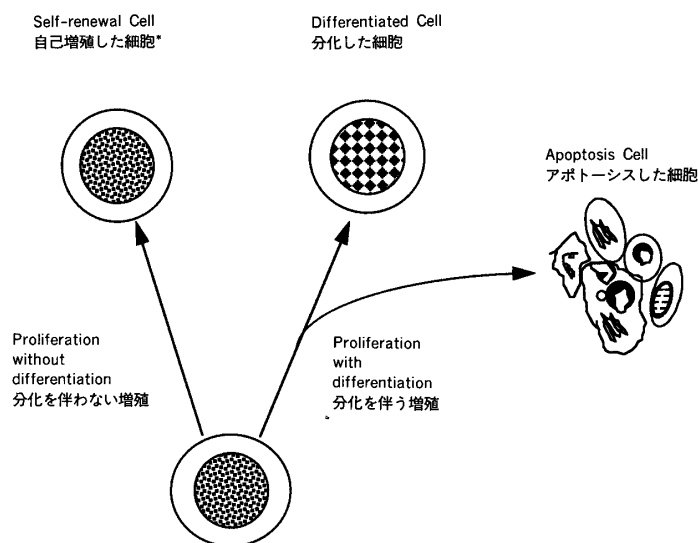


図3 造血幹細胞の運命，増殖と分化とアポトーシスとの関係

出来ない癌細胞をアポトーシスさせるためと解される。

以上の報告から推定される細胞増殖過程における細胞細胞の増殖と分化とアポトーシスの関係を図3に示す。すなわち，分化を伴わない増殖と分化を伴う増殖の二つおりの増殖があり，分化を伴う増殖の過程で，アポトーシスが起き易いが，分化を伴わない増殖課程でアポトーシスが起り易いという報告は無いように思われる。

5. 成熟赤血球の細胞死と溶血の問題

アポトーシスの証明のhallmark (認定項目)として核の断片化やアポトーシス小体の形成が重視されているが，無核細胞でもアポトーシスが起させることが出来る⁸⁷⁾。Schulze-Osthoftらはネズミの繊維肉腫細胞をcytochalasin Bを用いて脱核細胞を作り，薬物，および，Fas ligandなどを用いてアポトーシスを誘導したところ，脱核細胞はblebbingと細胞質の濃縮を来し死滅した。また，endonuclease阻害剤で，DNA断片化を阻害した有核細胞でもFasを引き金とするアポトーシスを免れないことから，DNAの断片

化は二次的な変化であると結論している⁸⁸⁾。このことは，成熟赤血球のような無核細胞においてもアポトーシスが起り得ること示唆している。しかしながら，新生児赤血球や老化赤血球がアポトーシスを来すという証明はない。成熟赤血球は血管内に120日間生存し，脾臓で処理されるが，酸化した細胞膜表面に生じるIgGを認識する単球・マクロファージ系によって，貪食される⁸⁹⁻⁹⁰⁾が，老化赤血球が単球・マクロファージにより貪食される前の赤血球は膨化して球状になることが知られている。

成熟赤血球は無核細胞であり，わずかなacid phosphatase (酸性ホスファターゼ)を含有するが，ミトコンドリアやendoplasmic reticulumなどのorganells (小器官)やを炎症の原因になるlysosome (リソゾーム)は含んでいない。新生児黄疸は重篤な場合には脳の核黄疸によって死の転帰をとることがあるが，赤血球破壊によって生じる高ビリルビン血漿のためと云われ，30 mg/dl以下のビリルビン血漿ではむしろ，抗酸化作用があり，細胞障害性はない⁹¹⁾。免疫性溶血性貧血，薬物による溶血などは血管内溶血を来たし，先天性球状赤血球症は血球が脾臓で機械的

に壊されることによって、発作的な貧血が生じるといわれ、軽度の黄疸を惹起するが、血管の炎症は起こさない。蛇毒（溶血毒）によって血管のアポトーシスが誘導されること⁹²⁾は興味深い。いずれにしても、このような溶血による成熟赤血球の破壊は溶血現象は細胞膜の破壊という点ではネクロシス類似の現象であるかも知れないが、細胞障害性ということでは従来のネクロシスの定義には合致しない。

ネクロシスは機械的な損傷、虚血、補体や毒素によって引き起こされる⁹³⁾ので、溶血もネクロシスの一つと考える事もできるが、細胞膜の破壊、分解酵素の活性化と放出により、強い炎症像を伴うものとされている⁷⁵⁾。したがって、従来の定義に相当するものを、ネクロシスのI型 (necrosis type I)、組織障害性のない溶血はネクロシスのII型 (necrosis type II) とし、区別した方がよいのではないかと考える (図4, 表1)。

細胞は通常核を有するものであるが、爬虫類の赤血球は核があるし、ヒトのyolk sack (卵黄囊) 由来の赤血球にも核が存在する。Moriokaらは妊娠したSyrian hamstarから得た妊娠10日から13日の胚芽性の赤血球系細胞について観察し、11日には核の濃縮を、12日にはDNAの崩壊を見たが、細胞質はむしろ拡大し、核のladderはアポトーシスのものとは異なって、核の偏在化やladder形成が明確でないこと、アポトーシス小体が見られないことなどから、その終末赤血球の死はアポトーシスとは云えないとの報告もある⁹⁴⁾。

6. 細胞死形態による貧血の分類 (表2)

現在、貧血疾患すべてに対して細胞死の形態が明らかにされているわけではないこと、および、表2に示すように、疾患や症候群の原因に多様性があることから、単一の原因によらない場合がある。

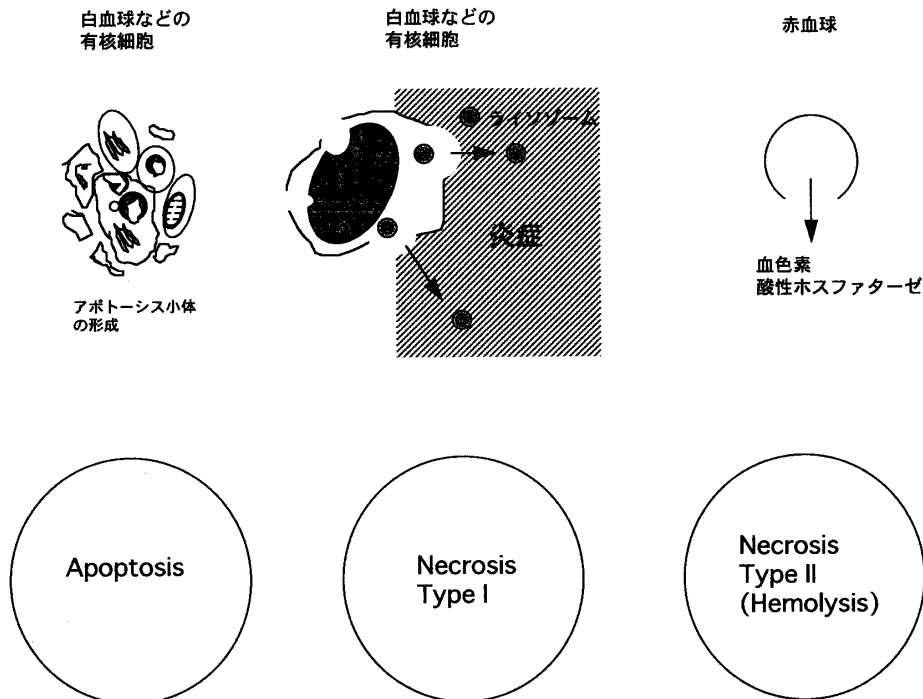


図4 細胞死形態の種類

表1 Types of Cell Death

1. Apoptosis	
2. Apoptosis-like Cell Death: destruction of terminal erythroid cells produced in the yolk sack	
3. Necrosis Type I :	followed by inflammation of tissue
4. Necrosis Type II :	not followed by inflammation of tissue: hemolysis of mature red cells, thrombocyto-penia (TP) accompanied by systemic lupus erythematosus (SLE), idiopathic thrombocyto-penia (ITP), and TP induced by iso-antibody formation (frequent blood transfusion)

注：アポトーシスは組織障害性がある。ネクローシス I 型は周辺の組織に炎症を起こす。ネクローシス II 型は通常組織障害性はない。むしろ、ビリルビンには抗酸化作用があって、組織の過酸化を抑制する。溶血性貧血のほとんどの疾患はネクローシス II 型に属するが、ビリルビン値が30mg/dl以上の高度の溶血を伴う新生児黄疸は組織障害性を結果するので、ネクローシス I 型に分類した方が良いかも知れない。

I. アポトーシスによると思われる貧血疾患

(1) 造血器間質障害, および, cell growth factorの分泌低下

① 造血器間質障害: Aplastic Anemia (再生不良性貧血) は脂肪細胞によって置換された造血細胞の欠損と汎血球減少症が持続する疾患であり, Sl/SI^d (95,96) マウスと同様の大球性貧血を来す間質細胞欠損がみられるものもある⁹⁷⁻¹⁰¹). ParchaidouらはMyelodysplastic anemia (骨髄異形成性症候群, MDS) においては脂肪細胞, 上皮細胞, 線維芽細胞のアポトーシスの頻度が高いことが造血の障害の一因であると報告している⁸²). Ershlerらはcongenital hypoplastic anemia (Diamond-Blackfan anemia: 赤芽球癆) の1例が Sl/SI^d マウスと同様の原因で起こったものと推定している¹⁰²).

② 間質細胞から分泌されるSCF, GM-CSF, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) などのcell growth factor分泌低下はアポトーシスの原因になるので, 上記の疾患に関与すると考えられる。

(2) 造血幹細胞の増殖・分化の障害

多能性幹細胞のgenome (ゲノム: 遺伝子群) 異常がアポトーシスに関係するか否かということについてHorikawarらはMDSや再生不良性貧血, paroxymal nocturnal hemoglobinuria (発作性夜間血色素尿症: PNH) の患者から得られた骨髄血CD34+細胞はアポトーシス抵抗性があると報告している¹⁰³).

MDSはpreleukemiaと同義語として用いられることが多い。MDS患者の骨髄は正形成, 末梢では細胞減少が見られることから, 造血細胞の成熟障害と考えられている疾患であると云われ, refractory anemia (RA: 鉄不応性貧血), RA with ringed sideroblast (RARS), RA with excess blast (RAEB), RAEB transformation (RAEB-t) を総称する疾患である。

われわれはMDS患者のCD34+細胞に種々のcell growth factorsを添加培養し, 骨髄細胞のin-vitro再構築に関する研究を施行した。その結果は正常コントロールと異なる成績で, 患者によって様々であったが, MDSに共通しているのは赤芽球系細胞の顕著な増殖低下であった¹⁰⁴). このことはMDSにおけるアポトーシス

表 2 Classification of Anemias

<p><u>I. Anemias due to apoptosis (AdA) and anemias suspected to depend on apoptosis (AsA)</u></p> <p>(1) Disturbance of hemopoiesis-inductive microenviroment (HIM) : Destruction, replacement of hemopoietic stem cells by fat, stroma cells or others, and decreased supply (lack or insufficiency) of stem cell growth factors like as Stem Cell Factor due to the disturbance of stroma cells of HIM : <i>Aplastic Anemia (AdA)</i>, <i>Myelodisplastic Syndrome (AdA)</i>, <i>Pure Red Cell Aplasia (AdA)</i></p> <p>(2) Disturbance of cell proliferation and differentiation of hemopoietic stem cells</p> <p>① Decreased supply (lack or insufficiency) of stem cell growth factors: Stem cell factor, Insulin-like growth factor-1, IL-6 IL-3, IL-11, TPO. <i>Anemia due to Cancer (AsA)</i></p> <p>② Increased supply of inhibitory cytokines (Fas ligand, TNF ligand, Interferon-γ, Interferon-α): <i>Myelodisplastic Syndrome (AdA)</i>, <i>Aplastic Anemia (AdA)</i>, <i>Viral Diseases (AdA)</i>, <i>Pure Red Cell Aplasia (AdA)</i></p> <p>③ Deficiency of nutritional factors. Synthetic disturbance of nucleic acid: vitamins, folic acid: <i>Megaloblastic Anemia (AsA)</i>, <i>Pernicious Anemia (AsA)</i></p> <p>(3) Disturbance of proliferation, differentiation and maturation of erythroid progenitor or precursor cells</p> <p>① Abnormality of erythropoietin (EPO) receptor: <i>Erythroleukemia (AdA)</i></p> <p>② Decreased supply of erythropoietin (EPO): <i>Renal Anemia (AdA)</i>, <i>Anemia due to some kinds of Cancer (AdA)</i></p> <p>③ Inhibition of heme synthesis:</p> <p>a) Decreased supply of iron: <i>Iron Deficiency Anemia (AdA)</i></p> <p>b) Disturbance of ferritin synthesis: copper (ferroxidase)</p> <p>c) Heme synthesis inhibitor: saccinyl acetone (SA), isonicotinic acid hydrazide (INA), heavy-chain ferritin (HF): <i>Sideroblastic Anemia (AdA)</i>, <i>Pyridoxal-response Anemia (AsA)</i></p> <p>d) Interference with release of iron from mononuclear phagocyte stores: <i>Anemia due to Bacterial Infections or Cancers (AsA)</i></p> <p>(4) Extrinsic factors:</p> <p>① Administration of glucocorticoids</p> <p>② X-ray radiation</p> <p><u>II. Anti-apoptotic cause of anemia:</u></p> <p>(1) Decreased area of hematopoiesis: <i>Anemia accompanied with acute Leukemia, Erythroleukemia</i></p> <p><u>III. Anemia not due to apoptosis</u></p> <p>(1) Increased erythrocyte destruction (hemolysis: Necrosis Type II)</p> <p>① Intrinsic abnormality</p> <p>a) Membrane abnormality: <i>Hereditary Spherocytic Anemia, Hereditary Elliptocytosis, Hereditary Acanthocytosis and Stomatocytosis</i></p> <p>b) Enzyme deficiency: <i>Glucose-6-phosphate dehydrokinase deficiency, Pyruvate kinase deficiency and other enzyme deficiency, Porphyria</i></p> <p>c) Globin abnormality: <i>Thalassemia, Sickle cell Disease and related disorders, Low Oxygen-affinity hemoglobin uria</i></p> <p>d) Compliment-mediated: <i>Paroximal Nocternal Hemoglobinuria</i></p> <p>② Extrinsic abnormalities</p> <p>a) Mechanical: <i>March Hemoglobinuria and sport anemia, Traumatic Cardiac Hemolytic Anemia, Microangiopathic Hemolytic Anemia</i></p> <p>b) Toxic anemia: <i>Hemolytic Anemia due to Snake Venom</i></p> <p>③ Antibody-mediated: <i>Immunological Hemolytic Anemia, Drug-induced Hemolytic Anemia, Cryopathic Hemolytic Syndrome</i></p> <p>④ Hypersplenism</p> <p>(2) Loss of red cells: <i>Hemorrhagic Anemia</i></p>
--

が多能性幹細胞のレベルでは起こりに難く、赤血球系前駆細胞に起こりやすいことを示唆している。

① Hemopoietic growth factors (造血幹細胞の受容体に働いて造血を調整するサイトカインを云う：細胞成長因子) の供給不足：Williamらは造血前駆細胞の培地からIL-5, G-CSFやGM-CSFを除くとアポトーシスが誘導され、CSFの血清levelを上げると、前駆細胞や成熟細胞が驚異的に増加することを認め、これらのサイトカインがアポトーシスを抑制することを明らかにした⁷⁶⁾。

臨床的に当てはまる疾患としては癌性貧血が考慮される。

② Inhibitory cytokineの供給増加：

MDSのCD34+細胞がアポトーシスを起こし易いことについては多くの論文が見られる。Geruskらは正常コントロールCD34+細胞には発現していないFas抗原がMDS患者のCD34+細胞に発現していること、MDS患者骨髄血清中にTNF- α が増えていると報告している¹⁰⁵⁾。RazaらのreviewによればMDS患者の造血細胞は細胞増殖率もアポトーシスもいずれも亢進しており、血清中のinterferon- α (IFN- α) の増加アポトーシスに関与するのを想定している¹⁰⁶⁾。ParkerらはMDS患者CD34+細胞のアポトーシスはRA, RAEBでは正常コントロールに比して高率に認められたが、RAEB-tではコントロール群より低率であり、Bax, Bad (proapoptotic factors) と bcl-2, bcl-xL (antiapoptotic factors) の比率から早期のMDSの方が進行したMDSよりもアポトーシスを起こし易いと報告している¹⁰⁷⁾。

再生不良性貧血の成因としてMarschはstromal cells上で再生不良性貧血の骨髄細胞のlong-term bone marrow culture (長期骨髄培養：LTBMC) を施行し、正常者骨髄CD34+細胞に比して再生不良性貧血患者CD34+細胞の

アポトーシスが増加していることを明らかにした¹⁰⁸⁾。Watanabe-FukunagaらはINF- γ やINF- α がFas抗原の細胞表面の表出を促進することをあきらかにした⁵³⁾が、Maciejewskiらは再生不良性貧血のCD34+細胞がFas抗原の表出が促進されていることを認めている¹⁰⁹⁾。Selleriらは骨髄の細胞障害性T細胞からINF- γ が分泌され、CD34+細胞に働いてCD34+細胞のアポトーシスを誘導すると報告している¹¹⁰⁾。

なお、INF- γ やINF- α はRetrovirus, Hepatitis Virus, Epstein-Barr Virusの感染によって産生が増強される。

③ DNA合成阻害

造血細胞のみならず、生体細胞のDNA合成に必要なビタミンB12, 葉酸, その他の栄養因子の欠乏は造血細胞のアポトーシスを来すことが想定される。

Kouryらは葉酸欠乏させたマウスについて検討し、葉酸欠乏によるmegaloblastic anemia (巨赤芽球性貧血) においてCFU-Eよりも成熟した段階の赤芽球がアポトーシスすると報告した¹¹¹⁾。また、Quadrosらはcobalamintanscobalamin II receptorの抗体によってK526細胞系の培養細胞の核の変化がcobalamintanscobalamin (ビタミンB12) 欠乏の巨赤芽球性貧血に類似すること、培養細胞が10~14日にアポトーシスすることを明らかにした¹¹²⁾。一方、IngramらはVitamin B12, および、葉酸欠乏患者について検討し、巨赤芽球性貧血の成因としてアポトーシスの関与は証明出来なかった¹¹³⁾。

(3) 赤芽球系幹細胞の分化・増殖の障害

① EPO受容体の異常によるもの：

EPO受容体の異常によってマウスやヒトのerythroleukemia (赤白血病) が起こる¹¹⁴⁻¹¹⁶⁾。

② EPOの供給不足：

MutaらはSCF, insulin-like growth factor 1 IL-3やEPOの供給不足により赤芽球系幹細胞のアポトーシスがoccurすることを明らかにし

た^{117,118}。EPOの供給が不足する疾患には腎性貧血や癌性貧血がある。肺ガン患者の貧血症の約80%に有効であると報告もある¹¹⁹。

③ Inhibitory cytokineの供給増加：

赤芽球癆に赤芽球性前駆細胞のアポトーシスがみられ、血清中のFas ligandが正常者よりも増加している¹²⁰。

我々はIFN- α が直接BFU-Eの増殖を阻害し、BFU-Eのアポトーシスを来すことを明らかにした¹²¹。前述したごとく、MDSのCD34+細胞再構築の研究においてMDSに共通する赤血球系細胞の産生低下に、IFN- α が関与しているのかも知れない。

④ ヘモグロビン合成阻害：

Mutaらは重鎖フェリチン、イソニコチンサン、サタシニールアセトンによって造血細胞のアポトーシスが誘発されることを確認し、イソニコチンサンによる薬剤性貧血や鉄芽球性貧血は造血細胞のアポトーシスによることを示唆している¹¹⁸。Yuanらはヘモグロビンの生合成が遺伝的に抑制される地中海貧血が赤芽球性前駆細胞のアポトーシスに由来することを報告している¹²²。このことは飽和鉄トランスフェリンの減少による鉄欠乏性貧血、先天性無トランスフェリン症、炎症性貧血や癌性貧血も造血細胞のアポトーシスによるものと推定される。

heme骨格のポルフィリン前駆体の合成に関与するVitamin B6欠乏症：pyridoxine-response anemia (Vitamin B6反応性貧血)も考慮される。

II. Anti-apoptoticな(アポトーシス抵抗性)原因：

急性白血病に見られる異常な幼弱細胞の果てしない増殖は造血臓器である骨髄を幼弱細胞によって占有し、正常の造血幹細胞の増殖・分化を抑制して、赤血球や血小板の産生を阻害し、貧血や出血、あるいは、腫瘍死の原因になる。

果てしない増殖を来す急性白血病は分化の障害を伴った異常な幼弱細胞がアポトーシスに抵抗性があることもその原因の一つであり、急性白血病は細胞分化を伴わないAnti-apoptoticな現象と云うことも出来るだろう。

III. 溶血性貧血(ネクローシスII型)：

疾患によって異なる様々な原因で、血管内や脾臓内で溶血が起きる。それぞれの疾患については省略するが、Efferthらは酵素欠損症であるブドウ糖・6・リン酸欠乏症の患者の白血球はアポトーシスし易いと報告している¹²³が、貧血の原因は溶血による。

IV. 出血性貧血：

出血性素因のほか腎炎や消化器疾患などがある。

おわりに

貧血疾患疾患が造血幹細胞のアポトーシスに由来すると考えられる場合、造血幹細胞の増殖、分化、および、アポトーシスの関係が重視される。ここで、最も重要なことは、細胞の増殖・分化・アポトーシスの研究が健康なヒトの造血幹細胞においても、マウスやヒト癌細胞由来の細胞での研究の結果と一致するか否かということであろう。前述した如く、Bondurantらは健康なヒトCFU-Eの分化を研究して、c-mycがアポトーシスを誘導せず、返って、細胞を増殖させると報告している⁸²。しかしながら、この研究においてはBFU-EよりもよりcommittedされたCFU-E細胞を用いたこと、CFU-Eを分化させるEPO存在下の研究である事などから、c-mycがEPO非依存性のCFU-Eよりも幼弱な細胞に対してはアポトーシスを誘導することを否定するものではないように思われる。

先天性の好中球減少症であるKastmann症候群における前骨髄球の分化の障害を伴った増殖

はgranulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) がG-CSF受容体に結合することによって、通常では前骨髄球からさらに分化・成熟するが、本疾患ではそのシグナル伝達の問題と考えられている¹²⁴⁾。すなわち、細胞核の有糸分裂 (mitosis) を誘導するjanus kinase (JAK) -2の磷酸化が分化・成熟のシグナル伝達に先行するために、成熟好中球に分化する前に前骨髄球が増殖することが原因であるとしている¹²⁵⁾。さらに、興味深いことは、本疾患の治療として、長期・大量のG-CSFを投与することによって、成熟好中球が産生され、種々の重篤な感染症を免れることである^{126,127)}。この際、骨髄ではpost-mitotic to mitotic ratio (P/M ratio: 骨髄球より幼弱な細胞に対する後骨髄球より成熟している好中球の比率) の上昇を認められ、増殖した前骨髄球が分化することが明らかにされている¹²⁸⁾。これらの報告はATRA以外の分化を誘導するサイトカインでも、細胞増殖因子(アポトーシス抑制因子) 量を減少させて細胞増殖を制御し、細胞を分化させると共にアポトーシスを誘導する可能性を示唆している。また、EPO受容体の異常によって赤白血病が生じることなどから、分化と増殖のアンバランスには種々のサイトカインとそれらの受容体の異常、あるいは、その後のシグナル伝達の異常が、関与していることを示唆している。さらに、増殖と分化とアポトーシスとの関係を明らかにするためには分化とアポトーシスのシグナル伝達の問題と分化とアポトーシスの直接的な関連が重視される。

白血球細胞は正常の造血幹細胞のように、分化やアポトーシスを起こさない分だけ、増殖刺激に反応してより著しい増殖を来すと考えられる。このような異常増殖に対する治療としては白血球細胞を生体障害性のあるネクローシスに導くよりもアポトーシスさせた方がよい。したがって、アポトーシスのメカニズムの詳細がわかれば、シグナル伝達系の操作によって癌を、

ひいては、癌性貧血の治療が可能になると考えられている。実際に、抗ガン剤であるalkylating agents, etoposide, doxorubicineなどの抗癌剤によってガン細胞のアポトーシスが誘導される¹²⁹⁾。

一方、貧血の治療は造血幹細胞の造血幹細胞の増殖・分化・アポトーシスの研究成果として、腎性貧血にEPOを、再生不良性貧血のG-CSF, EPO, TPOなどが臨床応用されて成果を挙げている。

参考文献

1. Till, J. E., and McCulloch, E. A.: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal bone marrow cells. *Radiation Research* **14**: 213-222, 1961.
2. Muller-Sieburg, C. E., Whitelock, C. A., Weissman, I. L.: Isolation of two early B lymphocyte progenitors from mouse marrow: a committed pre-pre-B cell and a clonogenic Thy-1 low hematopoietic stem cell. *Cell* **44**: 653-662, 1986.
3. Erslev, A. J.: Clinical manifestations and classification of erythrocyte disorders. In erythrocyte disorders: Classification and manifestations. Eds: Williams J. W., Beutler E., Erslev A. J., and Lichtman, M. A. *Hematology* (4th), McGraw-Hill Publishing Company-New York, St. Louis, San Francisco, Colorado Springs, Auckland, Bogota, Caracas, Hamberg, Lisbon, London, Madrid, Mexico, Milan, Montreal, New Delhi, Paris, San Juan, Sao Paulo, Singapore, Sydney, Tokyo, Toronto. pp. 423-429, 1990.
4. Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., and Currie, A. R.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* **26**: 239-257, 1972.
5. Kerr, J. F. R.: Definition of apoptosis and overview of its incidence. *Programmed Cell Death--The cellular and Molecular Biology of Apoptosis* Eds: Larvin, M., and Watters, D. Harwood Academic Publishers. Australia, China, France, Germany, India, Japan, Luxembourg, Malaysia, The Netherlands, Russia, Sin-

- gaporre, Switzerland, Thailand, United Kingdom, United States. pp. 1-15, 1993.
6. Dexter, T. M., Spooncer, E., Schfield, R., Lord, B. I., and Simmons, P.: Hemopoietic stem cells and problem of self-renewal. *Blood Cells* **10**: 315-339, 1984.
 7. Humphries, R. K., Eves, A. C., and Eves, C. J.: Self-renewal of hemopoietic stem cells during mixed colony formation in vitro. *Proceeding National Academy Science of USA* **78**: 3629-3633, 1981.
 8. Till, J. E., and McCulloch, E. A.: Hemopoietic stem cell differentiation. *Biochemica et Biophysica Acta* **605**: 431-459, 1980.
 9. Civin, C. I., Straus, L. C., Brovall, C., Fackler, M. J., Schwartz, J. F., and Shaper, J. H.: Antigenic analysis of hematopoiesis III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *The Journal of Immunology* **133**: 157-165, 1984.
 10. Berenson, B. J., Andrews, R. G., Besinger, V. I., Kalamasz, D., Knitter, G., Bucknor, C. D., and Bernstein, D.: Antigen CD34+ marrow cell s engraft lethally irradiated baboons. *Journal of Clinical Investigation* **81**: 951-955, 1988.
 11. Andrews, R. G., Singer, J. W., and Berstein, I. D.: Precursors of colony-forming cells in humans can be distinguished from colony forming cells by expression of the CD33 and CD34 antigens and light scatter properties. *Journal of Experimental Medicine* **169**: 1721-1731, 1989.
 12. Terstappen, L. W. M. M., Huang, S., Safibr, M., Lansdrop, P. M., and Iloken, M. R.: Sequential generations of hematopoietic colonies derive from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells. *Blood* **77**: 1218-1227, 1991.
 13. Papayanonopoulou, T., Brice, M., Broudy, V. C., and Zsebo, K. M.: Isolation of c-kit receptor-expressing cells from bone marrow, peripheral blood, and fetal liver: Functional properties and composite antigenic profile. *Blood* **78**: 1403-1412, 1991.
 14. Lichtman, M. A.: The ultrastructure of the hemopoietic environment of marrow: A review. *Experimental Hematology* **9**: 391-410, 1981.
 15. Weiss, L.: The Structure of bone marrow. Functional interrelationship of vascular and hematopoietic compartments in experimental hemolytic anemia. *Journal of Morphology* **117**: 467-536, 1965.
 16. Westen H, Bainton DF: Association of alkaline-phosphatase-positive reticulum cells in bone marrow with granulocytic precursors. *Journal of Experimental Medicine* **150**: 919-937, 1979.
 17. Curry, J. L., Trentin, J. J., and Wolf, N.: Hemopoietic spleen colony studies. II. Erythropoiesis. *Journal of Experimental Medicine* **125**: 703-719, 1967.
 18. Curry, J. L., and Trentin, J. J.: Hemopoietic spleen colony studies. I. Growth and differentiation. *Developmental Biology* **15**: 395-413, 1967.
 19. Quesenberry, P. J.: Hemopoietic stem cell, and growth factor. The concept of the hemopoietic stem cell. Eds: Williams J. V., Beutler E., Erslev A. J., and Lichtman, M. *Hematology* (4th Ed) McGraw-Hill Publishing Company. New York, St Luis, San Francisco, Colorado Springs, Auckland, Bogota, Caracas, Hamberg, Lisbon, London, Madrid, Mexico, Milan, Montreal, New Delhi, Paris, San Juan, Sao Paulo, Singapore, Sydney, Tokyo, Toronto. pp. 129-147, 1990.
 20. Lajtha, L. G.: The common ancestral cell. *Blood, Pure and Eloquent*. Ed.: Wintrobe, M. M. p81. McGraw-Hill, New York pp. 81-95, 1980.
 21. Bentley, S. A.: A close range cell: cell interaction required for stem cell maintenance in continuous bone marrow culture. *Experimental Hematology* **9**: 308-312, 1981.
 22. Papayannopoulou, T., Prestly, G. V., and Nakamoto, B.: Anti-VLA4/VCAM-1-induced mobilization requires cooperative signaling through the kit/mkit ligand pathway. *Blood* **91**: 2231-2239, 1998.
 23. Lyman, S. D., and Jacobsen, E. W.: c-kit ligand and Flt3 ligand: Stem/Progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* **91**: 1101-1134, 1998.
 24. Goff, J. P., Shields, D. S., and Greenberger, J. S.: Influence of cytokines on growth kinetics and

- immunophenotype of daughter cells resulting from the first division of single CD34⁺Thy-1⁺Iin⁻ cells. *Blood* **92** : 4098-4107, 1998.
25. Wolf, N. S. : The haemopoietic microenvironment. *Clinics in Haematology* **8** : 469-499, 1979.
 26. Verfaillie, C. M. : Adhesion receptors as regulators of the hematopoietic process. *Blood* **92** : 2609-2611, 1998.
 27. Stopka, T., Zivny, J. H., Stopkora, P., Prchal, J. F., and Prchal, J. T. : Human hematopoietic progenitors express erythropoietin. *Blood* **91** : 3766-3772, 1998.
 28. Sawada, K., Krantz, S. B., Dai C-H., Kouly, S. T., Horn, S. T., Glick, A. D., and Civin, C. I. : Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptors. *Journal of Cellular Physiology* **142** : 219-230, 1990.
 29. Sawada, K., Krantz, S. B., Dessypris, E. N., Sawyer, S. T. : Human colony-forming units-erythroid do not require accessory cells, but do require direct interaction with insulin-like growth factor 1 and/or insulin for erythroid development. *Journal of Clinical Investigation* **83** : 1701-1709, 1989.
 30. Sawada, K., Krantz, S. B., Dai C-H., Sato, N., Ieko, M., Sakurama, S., Yasukouchi, T., and Nakagawa, S. : Transitional change of colony stimulating factor requirements for erythroid progenitors. *Journal of Cellular Physiology* **149** : 1-8, 1991.
 31. Alles, A., Alley, K., Barrett, J. C., Buttyan, R., Columbano, A., Cope, F. O., Copelan, E. A., Duke, R. C., Farel, P. B., Gershenson, L. E., Goldgaber, D., Green, D. R., Honn, K. V., Hully, J., Isaacs, J. T., Kerr, J. F. R., Krammer, P. H., Lockshin, A., Martin, D. P., McConkey, D. J., Michaelson, J., Schulte-Herman, R., Server, A. C., Szende, B., Tomei, L. D., Tritton, T. R., Umansky, S. R., Valerie, K. and Warner, H. R. : Apoptosis. A general comment. *FASEB Journal* **5** : 2127-2128, 1991.
 32. Arends, M. J., and Wyllie, A. H. : Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *International Review of Experimental Pathology* **32** : 223-254, 1991.
 33. Raff, M. C. : Social controls on cell survival and cell death. *Nature* **356** : 397-400, 1992.
 34. Wyllie, A. H. : Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284** : 555-556, 1980.
 35. Kerr, J. F. R., and Harmon, B. V. : Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective. In apoptosis: *The Molecular Basis of Cell Death*. Eds: Tomei, L. D. and Cope, F. O. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. pp. 5-29, 1991.
 36. Lazebnik, Y. A., Cole, S., Cooke, C. A., Nelson, W. G., and Earnshaw, W. C. : Nuclear events of apoptosis in vitro in cell-free mitotic extracts: a model system for analysis of the active phase of apoptosis. *The Journal of Cell Biology* **123** : 7-22, 1993.
 37. McConkey, D. J., Orruenius, S., and Jondal, M. : Signal Transduction in thymocyte apoptosis. *Programmed Cell Death—The cellular and Molecular Biology of Apoptosis* Eds: Larvin, M., and Watters, D., Harwood Academic Publishers. Australia, China, France, Germany, India, Japan, Luxembourg, Malaysia, The Netherlands, Russia, Singapore, Switzerland, Thailand, United Kingdom, United States. pp. 19-30, 1993.
 38. Iwata, M., Iseki, R., and Kudo, Y. : Regulation of thymocyte apoptosis. Glucocorticoid-induced death and its inhibition by T-cell receptor/CD3 complex-mediated stimulation-Programmed Cell Death by T-cell receptor and molecular biology of Apoptosis. *Programmed Cell Death. The Cellular and Molecular Biology of Apoptosis*. Eds: Larvin, M., and Watters, D., Harwood Academic Publishers. Australia, China, France, Germany, India, Japan, Luxembourg, Malaysia, The Netherlands, Russia, Singapore, Switzerland, Thailand, United Kingdom, United States. pp. 31-44, 1993.
 39. Griffiths C. M., and Mueller C. : Expression of perforin and granzymes in vivo : Potential diagnostic markers for activated cells. *Immunology Today* **12** : 415-419, 1991.
 40. Cohen, J. J., Duke R. C., Fadok, V. A., Sellins, K. S. : Apoptosis and programmed cell death in

- immunity. *Annual Review of Immunology* **10** : 267-293, 1992.
41. Duke, R. C., Cohen, J. J., and Chernevenak, R. : Differences in target cell DNA fragmentation induced by mouse cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells *Journal of Immunology* **137** : 1442-1447, 1986.
 42. Green, D. R., and Reed, J. C. : Mitochondria and Apoptosis. *Science* **281** : 1309-1312, 1998.
 43. Nagata, S., and Suda, T. : Fas and Fas ligand : lpr and gld mutations *Immunology Today* **16** : 39-42, 1995.
 44. Nagata, S. : Fas and fas ligand : a death factor and its receptor *Advances in Immunology* **57** : 129-144, 1994.
 45. Yonehara, S., Ishii, A., and Yonehara, M. : A Cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *Journal of Experimental Medicine*. **169** : 1747-1756, 1989.
 46. Trauth, B. C., Klas, C., Peters, A. M. J., Matzku, S., Mller, P., Falk., Debatin, K-M., and Krammer, P. H. : Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* **245**, 301-305, 1989.
 47. Nagata, S., and Golstein, P. : The Death Factor. *Science* **267** : 1449-1456, 1995.
 48. Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. : Death receptors : signaling and modulation. *Science* **281** : 1305-1308, 1998.
 49. Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara M., Mizushima, SI., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., and Nagata, S. : The polypeptide encoded by cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* **66** : 233-243, 1991.
 50. Thronberry, N. A. and Lazebnik, Y. : Caspases : enemies within. *Science* **281** : 1312-1316, 1998.
 51. Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G., Klas, C., Li-Weber, M., Ricards, S., Dhein, J., Trauth, B. C., Ponstingl, H., and Krammer, P. H. : *J. Biol. Chem.* **267**, 10709, 1992.
 52. Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Itoh, N., Yonehara, S., Copeland, N. G., Jenkinkins, N. A., and Nagata, S. : The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *The Journal of Immunology* **148** : 1274-1279, 1992.
 53. Hengartner, M. O., and Horvitz, H. R. : C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2 *Cell* **76** : 665-676, 1994.
 54. Vaux, D. L., Weissman, I. L., and Kim, S. K. : Prevention of programmed cell death in Caenorhabditis elegans by human bcl-2. *Science* **258** : 1955-1957, 1992.
 55. Fulda, S., Sieverts, H., Friesen, C., Herr, I., Dabatin, K. M. : The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cell. *Cancer Research* **57** : 3823, 1997.
 56. Kasibahatla, S., Brunner T., Genestier L., Esheverri, F., Mahboubi, A., and Green, D. R. : DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Molecular Cell* **1** : 543-551, 1998.
 57. Müller, M., Strand, S., Hug, H., Heinemann, E-M., Walczak, H., Hofmann, W. J., Stremmel, W., Krammer, P. H., and Galle, P. R. : Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) Receptor/Ligand system and involves activation of wild-type p53. *Journal of Clinical Investigation* **99** : 403, 1997.
 58. Loss, M., Steven, P., Clarkin, K., and Wahl, G. M. : DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G₁ arrest and long-term induction of Cipl in normal human fibroblast. *Blood* **90** : 3118, 1997.
 59. Reap, E., Roop, K., Maynor, K., Borrero, M., Booker, J., and Cohen, P. L. : Radfiation and stress-induced apoptosis : a role for Fas/Fas ligand interactions. *Proceedings National Academy of Sciences of the United States of America* **94** : 5750-5755, 1997.
 60. Nuez, G., London, L., Hockenbery, D., Alexander, M., McKean, J. P. and Korsmeyer, S. J. : Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. *J. Immunol.* **144** : 3602-3610, 1990.
 61. Farrow, S. N., White, J. H. M., Martinou, I., Raven, T., Pun, K-T., Grinham, C. J., Martinou, J-C., and Brown, R. : *Nature* **374** : 731-733, 1995.

62. Chittenden, T., Harrington, E. A., Oconnor, R., Flemington, C., Lutz, R. J., Evan, G. I., and Guild, B. C.: Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature* **373** : 733-736, 1995.
63. Kiefer, M. C., Brauer, M. J., Powers, V. C., Wu, J. J., Umansky, S. R., Tomei, and Barr, P. J. : Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak : *Nature* **374** : 736-739, 1995.
64. Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L. H., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J. : Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death *Cell* **80** : 285-291, 1995.
65. Yuan J., Shaham, Ledoux, S., Ellis, H. M., and Horvitz, R. : *Cell* **75** : 641-653, 1993.
66. Sakamuro, D., Eviner, V., Elliot, K. J., Showe, L., White, E., and Prendergast, G. C. : c-Myc induces apoptosis in epithelial cells by both p53-dependent and p53-independent mechanisms. *Oncogene* **11** : 2411-2418, 1995.
67. Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A., and Ore, M. : Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* **352** : 345-347, 1991.
68. White, E. and Stillman, B. : Expression of adenovirus E1B mutant phenotypes is dependent on the host cell and on synthesis of E1A proteins *Journal of Virology* **61** : 426, 1987.
69. Hockenbery, D., Nuez, G., Milliman, C., Schreiber, R. D., and Korsmeyer, S. J. : Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* **348** : 334-336, 1990.
70. Oltvai, Z., Milliman, C. L., and Korsmeyer : Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax that accelerates programmed cell death. *Cell* **74** : 609-619, 1993.
71. Leonard, A. Di., Linke, S. P., Clarkin, G. M., and Wahl, G. M. : DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cipl in normal human fibroblast. *Genes & Development* **8** : 2540-2551, 1994.
72. Buckbinder, L., Talbott, R., Velasco-Miguel, S., Takenaka, I., Faha, B., Seizinger, B. R., Kley, N. : Induction of the growthn inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature* **377** : 646-649, 1995.
73. Neuberg, M., Bukbinder, L., seizinger, B., and Kley, N. : The p53/IGF-1 receptor axis in the regulation of programmed cell death. *Endocrine* **7** : 107-109, 1997.
74. Williams, G. T., Smith, C.A., Spooncer, E., Dexter, T. M., and Taylor, D. R. : Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature* **343** : 76-79, 1990.
75. 古川雄祐：分化とアポトーシス。ガン細胞の分化導入とアポトーシス——癌分化誘導療法——穂積本男, 齊藤正樹, 佐藤光信編。共立出版株式会社, 東京。pp.131-149, 1995
76. Munker, R., Zhao, S., Jiang, S., Snell, V., Andreeff, M., and Anderson, B. S. : Further characterization of cyclophosphamide resistance : expression of CD95 and of bcl-2 in a CML cell line. *Leukemic Research* **22** : 1073-1077, 1998.
77. Delia, D., Aiello, A., Soligo, D., Fontanella, E., Melani, C., Pezzella, F., Pierotti, M. A., and Della Porta, G. : bcl-2 protooncogene expression in normal and neoplastic human myeloid cells. *Blood* **79** : 1291-1298, 1992.
78. Bradbury, D. A., and Russell, N. H. : Comparative expression of bcl-2 by normal and leukemic cells. *British Journal of Haematology* **91** : 374-379, 1995.
79. Porwit-McDonald, A., Ivory, K., Wilkinson, S., Wheatly, K., Wong, L., and Janossy, G. : Bcl-2 protein expression in normal bone marrow precursors and in acute myelogenous leukemia. *Leukemia* **9** : 1191-1198, 1995.
80. M., Miwa, H., Nishi, K., Takahashi, T., Sekine, T., Mahmud, N., Nishikawa, M., Shiku, H., Kamada, N., and Kita, K. ; Low bcl-2 expression in acute leukemia with t (8;21) chromosomal abnormality *Leukemia* **13** : 358-368, 1999.
81. Evan, G., and Littlewood, T. : A matter of life and cell death. *Science* **281** : 1317-1322, 1998.
82. Bondurant, M. C., Yamashita, T., Muta, K., Krantz, S. B., and Koury, M. J. : C-myc expression affects proliferation but not terminal differentiation or survival of explanted erythroid progenitor cells. *Journal of Cellular Physiology*

- 168(2) : 255-263, 1996.
83. Sundaresan, A., Clypool, K., Mehta, K., Lopez-Berestein, G., Cabanillas, F., and Ford, R. J. Jr. : Retinoid-mediated inhibition of cell growth with stimulation of apoptosis in aggressive B-cell lymphoma. *Cell Growth and Differentiation* **10** : 1071-1082, 1997.
84. Okamura, T., Masuda, M., Arai, Y., Ishida, C., Shudou, K., and Mizoguchi, H. : All-trans retinoic acid modulates Fas antigen expression and affect cell proliferation and apoptosis in combination with anti-Fas monoclonal antibody in the human myeloma cell line, U266B1. *Experimental Hematology* **26** : 501-506, 1998.
85. Thiele, J., Zirbes, T. K., Lorenzen, J., Kasnika, H. M., Dresbach, S., Manich, B., Leder, L. D., Niederle, N., Diehl, V., and Fisher, R. : Apoptosis and proliferation (PCNA labeling) in CML—A comparative immuno-histological study on bone marrow biopsies following interferone and busulfan therapy. *Journal of Pathology* **181** : 316-322, 1997.
86. 穂積本男 : 癌分化誘導療法の開発の経緯と諸問題。ガン細胞の分化導入とアポトーシス——癌分化誘導療法——穂積本男, 斉藤正樹, 佐藤光信編。共立出版株式会社, 東京。 pp.1-17, 1995.
87. Cohen, G. M., Sun, X. M., Snowden, R., Dinsdale, D., and Skilleter, D. N. : Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochemical Journal* **286** : 331-334, 1992.
88. Schulze-Osthoff, K., Walczak, H., Drge, W., and Krammer, P. H. : Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *The Journal of Cell Biology* **127** : 15-20, 1994.
89. Shinozuka, T. : Changes in human red blood cells during aging in vivo. *Keio Journal of Medicine* **43** : 155-163, 1994.
90. Rettig, M. P., Low, P. S., Gimm, J. A., Mohandas N., Wang, J. and Christian, J. A. : Evaluation of biochemical changes during in vivo erythrocyte senescence in the dog. *Blood* **93** : 376-384, 1999.
91. Mireles, L. C., Lum, M. A., and Dennery, P. A. : Antioxidant and cytotoxic effects of bilirubin on neonatal erythrocytes. *Pediatric Research* **45** : 355-362, 1999.
92. Araki, S., Ishida, T., Yamamoto, T., Kaji, K., and Hayashi, H. : Induction of apoptosis by hemorrhagic snake venoms in vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **190** : 148-153, 1993.
93. Alnemri, E. S., and Litwack, C. : Glucocorticoid-induced programmed cell death (apoptosis) in leukemia and Pre-B cell cells. *Programmed Cell Death. The Cellular and Molecular Biology of Apoptosis*. Eds: Larvin, M., and Watters, D., Harwood Academic Publishers. Australia, China, France, Germany, india, Japan, Luxembourg, Malaysia, The Netherland, Russia, Singapore, Switzerland, Thailand, United Kingdom, United States. pp.99-110, 1993.
94. Morioka, K., Tone, S., Mukaida, M., and Takano-Ohmuro H. : The apoptotic and nonapoptotic nature of the terminal differentiation of erythroid cells. *Experimental Cell Research* **240(2)** : 206-217, 1998.
95. Bernstein, S., Russell, E., and Keigley, G. : Two hereditary mouse anemias (Sl/SI^d and W/W^v) deficient in response to erythropoietin. *Annals New York Academy of Science* **149** : 475-485, 1968
96. Ersherler, B. B., Ross, J., and Shahidi, N. T. : Bone marrow microenvironment defect in congenital hypoplastic anemia. *New England Journal of Medicine* **302** : 1321-1327, 1980.
97. Knospe, W. H., and Crosby, W. H. : Aplastic anemia: a disorder of the bone marrow sinusoidal micro-circulation rather than stem-cell failure? *The Lancet* **20** : 22, 1971.
98. Knopse, W. H., Blom, J., and Crosby, W. : Regeneration of locally irradiated bone marrow. II. Induction of regeneration in permanently aplastic medullary cavities. *Blood* **31** : 400-405, 1968.
99. Bannermann, R. M., Edwards, J. A., and Pinkerton, P. H. : Hereditary disorders of the red cell in animals. *Progress in Hematology* **8** : 131-179, 1973.
100. Ebbe, S., Phalen, E., and Stohlman, F. : Abnormalities in Sl/SI^d mice. *Blood* **42** : 865-871, 1973.
101. Parcharidou A., Raza, A., Econnomopoulos,

- T., Papageorgiou, E., Anagnostou, D., Papadaki, T., and Raptis, S.: Extensive apoptosis of bone marrow cells as evaluated by the in situ endolabelling (ISEL) technique may be the basis for ineffective haematopoiesis in patients with myelodysplastic syndromes. *European Journal of Haematology* **62**: 19-26, 1999.
102. Ersher, W. B., Ross, J., Finlay, J. L., and Shahidi, N. T.: Bone-marrow microenvironment defect in congenital hypoplastic anemia. *The New England Journal of Medicine* **302**: 1321-1327, 1980.
103. Horikawa, K., Nakamura, H., Kawaguchi, T., Iwamoto, N., Nagakura, S., Kagimoto, T., and Takatsuki, K.: Apoptosis resistance of blood cells from patients with paroxymal nocturnal hemoglobinuria, aplastic anemia, and myelodysplastic syndrome. *Blood* **90**: 2716-2722, 1997.
104. Sawada, K., Sato, N., Notoya, A., Tarumi, T., Hirayama, S., Takano, H., Koizumi, k., Yasukouchi, T., Yamaguchi, M., and Koike, T.: Proliferation and differentiation of myelodysplastic CD34+ cells: phenotypic subpopulations of marrow CD34+ cells. *Blood* **85**: 194-202, 1995.
105. Gersuk, G. M., Beckham, C., Loken, M. R., Kiener, P., Anderson, J. E., Farrand, A., Troutt, A. B., Ledbetter, J. A., and Deeg, H. J.: A role for tumor necrosis factor-alpha, Fas and Fas-ligand in marrow failure associated with myelodysplastic syndrome. *British Journal of Haematology* **103**: 176-188, 1998.
106. Raza, A., Mundle, S., Shetty, S., Alvi, S., Chopra, H., Span, L., Parcharidou, A., Dar, S., Venugopal, P., Borok, R., Gezer, S., Showel, J., Loew, J., Robin, E., Rifkin, S., Alston, D., Hernandez, B., Sha, R., Kaizer, H., and Gregorty, S.: Novel insights into the biology of myelodysplastic syndromes: excessive apoptosis and the role of cytokines. *International Journal of Hematology* **63**: 265-278, 1996.
107. Parker, J. E., Fishlock, K. L., Mijovic, A., Czepulkowski, B., Pagliuca, A., and Mufti, G. J.: Low-risk myelodysplastic syndrome is associated with excessive apoptosis and an increased ratio of pro-versus anti-apoptotic bcl-2-related proteins. *British Journal of Haematology* **103**: 1075-1082, 1998.
108. Marsh, J. C. W.: Long-term bone marrow cultures in aplastic anemia. *European Journal of Haematology* **57**(Suppl): 75-79, 1996.
109. Maciejewski, J. P., Selleri, C., Sato, T., Anderson, S., and Young, N. S.: Increased expression of Fas antigen on bone marrow CD34+ cells of patients with aplastic anemia. *British Journal of Haematology* **91**: 245-252, 1995.
110. Selleri, C., Maciejewski, J. P., Sato, T., and Young, N. S.: Interferon-gamma constitutively expressed in the stromal microenvironment of human marrow cultures mediated potent hematopoietic inhibition. *Blood* **87**: 4149-4157, 1996.
111. Koury, M. J., Horne, D. W., Brown, Z. A., Pietenpol, J. A., Blount, B. C., Ames, B. N., Hard, R., and Koury, S. T.: Apoptosis of late-stage erythroblast in megaloblastic anemia: association with DNA damage and macrocyte production. *Blood* **89**: 4617-4623, 1997.
112. Quandros, E. V., McLoughlin, P., Routhenberg, S., Morgan, A. C., Shikorska-Walker, M., and Walker, R.: Epitope specific monoclonal antibodies (mAbs) to human transcobalamin II (TC II) can induce apoptosis by inhibiting the cellular uptake of cobalamin (Cbl). *Blood* **86**(Suppl1): 125a, 1995.
113. Ingram, C. F., Davidoff, A. N., Maris, E., Sherman, G. G., and Mendelow, B. V.: Evaluation of DNA analysis for evidence of apoptosis in megaloblastic anaemia. *British Journal of Haematology* **96**: 576-583, 1997.
114. Yoshimura, A., Longmore, G., and Lodish, H. F.: Point mutation in exoplasmic domain of the erythropoietin receptor resulting in hormone-independent activation and tumorigenicity. *Nature* **647-648**, 1990.
115. Ward, J. C., Haris, K. W., Penny, L. A., Forget, B. G., and Kitamura, T.: A structurally abnormal erythropoietin receptor gene in human erythroleukemia cell line. *Experimental Hematology* **20**: 371-, 1992.
116. Longmore, G. D., Lododish, H. F.: An activating mutation in the murine erythropoietin receptor induces erythroleukemia in mice: a cytokine

- receptor superfamily oncogene. *Cell* **67** : 1089-1102, 1991.
117. Muta, K., and Krantz, S. : Inhibition of heme synthesis induces apoptosis in human erythroid progenitor cells. *Journal of Cellular Physiology* **163** : 38-50, 1995.
118. Muta, K., and Krantz, S. B. : Apoptosis of human erythroid colony-forming cells is decreased by stem cell factor and insulin-like growth factor 1 as well as erythropoietin. *Journal of Cellular Physiology* **156** : 264-271, 1993.
119. Beguin, Y. : Erythropoietin and anemia of cancer. *Acta Clinica Belgica* **51** : 36-52, 1996.
120. Perdahal, E. B., Naprtek, B. L., Wallace, W. C., and Lipton, J. M. : Erythroid failure in Diamond-Blackfan anemia is characterized by apoptosis. *Blood* **83** : 645-50, 1994.
121. Tarumi, T., Sawada, K., Sato, N., Kobayashi, S., Takano, H., Yasukouchi, T., Takahashi, T., Sekiguchi, S., and Koike, T. : Interferon- α -induced apoptosis in human erythroid progenitors. *Experimental Hematology* **23** : 1310-1318, 1995.
122. Yuan, J., Angelucci, E., Lucarelli, G., Aljurf M., Synder, L. M., Kiefer, C. R., Ma, L., and Schrier, S. L. : Accelerated programmed cell death (apoptosis) in erythroid precursors of patients with severe beta-thalassemia (Cooley's anemia). *Blood* **82** : 374-377, 1993.
123. Efferth, T., Fabry, U., Glatte, P., and Osieka, R. : Increased induction of apoptosis in mononuclear cells of a glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient patient. *Journal of Molecular Medicine* **73** : 47-49, 1995.
124. Dong, F., Hoefsloot, L. H., Schlen, A. M., Broeders, C. A. M., Meijer, Y., Veerman, A. J. P., Touw, I. P., and Loewenberg, B. : Identification of a nonsense mutation in the granulocyte-colony-stimulating factor receptor in severe congenital neutropenia. *Proceedings National Academy of Sciences of the United States of America* **91** : 4480-4484, 1994.
125. Tkatch, L. S., Rubin, K. A., Ziegler, S. F., and Tweardy, D. J. : Modulation of human G-CSF receptor mRNA and protein in normal and leukemic myeloid cells by G-CSF and retinoic acid. *Journal of Leukocyte Biology* **57** : 964-971, 1995.
126. Frampton, J. E., Lee, C. R., and Faulds, D. : Filgrastim. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in neutropenia. *Drug* **48** : 731-760, 1993.
127. Fleishman, R. A. : Southwest international medicine conference : clinical use of hemopoietic growth factors. *American Journal of Medical Science* **305** : 248-273, 1993.
128. Dale, D. C., Bonilla, M. A., Davis, M. W., Nakanishi, A. M., Hammond, W. P., Kutzberg, J., Wang, W., Jakubowski, A., Winton, E., Lalezari, P., Robinson, W., Glaspy, J. A., Emerson, S., Gabilove, J., Vincent, M., and Boxer, L. A. : A randomized controlled phase III trial of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (Filgrastim) for treatment of severe chronic neutropenia. *Blood* **81** : 2496-2502, 1993.
129. Kamesaki, H. : Mechanisms involved in chemotherapy-induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy. *International Journal of Hematology* **68** : 29-43, 1998.