

1 AML 幹細胞

Point

- ▶ 高度免疫不全マウスによる *in vivo* system の開発に伴い、ヒト造血幹細胞移植に関する研究は目覚ましい発展を遂げた。
- ▶ 1990年代に白血病幹細胞は、急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia: AML) の患者検体を用いて、初めて John Dick らのグループにより CD34⁺CD38⁻分画に濃縮されると報告され、がん幹細胞研究のブレイクスルーとなった。
- ▶ 移植実験において、CD34⁺CD38⁻分画以外にも、CD34⁺CD38⁺分画や CD34⁻分画から白血病が発症する症例もあることが報告されており、白血病幹細胞や症例の多様性を表している。
- ▶ 白血病幹細胞の維持や薬剤抵抗性の機構には骨髄微小環境が重要な役割を果たし、微小環境を構成する分子、細胞をターゲットとした白血病治療戦略も立てられている。

A 白血病幹細胞の発見

造血幹細胞は自己複製能と多分化能を有する細胞と定義され、造血前駆細胞を経て、生体内に存在する全ての血液細胞を供給している。正常造血システムと同様に、白血病を構成する一部の細胞が白血病幹細胞として自己複製を行い、白血病細胞全体を供給しながら白血病を発症させる階層性が提唱された。ヒトの血液システムにおいて幹細胞性質を証明することは困難であったが、免疫不全マウスにヒト細胞を移植することにより、正常造血・白血病発症の研究が行われてきた。免疫不全マウスについては、1962年のNudeマウスの発見以降、1983年、成熟T細胞とB細胞が欠損したSCIDマウスがつくられ¹⁾、SCIDマウスに胎児肝臓と胸腺を移植することにより、マウス体内でヒト造血幹細胞から成熟血球への分化を可能にし、SCID-huマウスが開発された²⁾。1994年にJohn Dickらは、

T細胞・B細胞など獲得免疫が不全状態を呈する SCID マウスに白血病細胞を移植する xenograft の系を用いることにより、AMLを発症させることができる細胞、すなわち白血病幹細胞の存在を初めて証明した³⁾。しかしながら、この研究では白血病の発症には膨大な数の細胞が必要な事やマウスで生着した白血病細胞が二次移植できないなどの問題点もあった。そこで、1型糖尿病のモデルマウスとして知られる NOD をバックグラウンドとして SCID マウスと交配させ、NK 活性やマクロファージ、さらには補体の活性が低下した NOD/SCID マウスが作製された⁴⁾。John Dick らは、1997 年、NOD/SCID マウスを用いて、FACS で純化した $CD34^+CD38^-$ 分画の細胞をドナー細胞として移植実験を行い、マウスの骨髄に AML 細胞の生着を確認した。さらに NOD/SCID マウス内で発症した AML 細胞を 2 次レシピエントマウスに移植しても同様に AML の発症を確認したことから、生着した白血病幹細胞の自己複製能が証明された⁵⁾。一方で、 $CD34^+CD38^-$ 分画と同様に移植前に AML-CFU (*in vitro* で白血病コロニーを形成する能力のある細胞)を有する $CD34^+CD38^+$ 分画や、 $CD34^-CD38^+$ 分画、 $CD34^-CD38^-$ 分画を移植したマウスでは AML 細胞の生着は得られなかった。以上より、 $CD34^+CD38^-$ 分画にごく僅かに存在する白血病幹細胞が、白血病発症における階層の機能的頂点に存在し、幹細胞以外の莫大な白血病細胞を生み出している事がわかった。この研究はヒトのがん幹細胞の存在を証明した初の報告であり、今日まで続くがん幹細胞を対象とした悪性疾患研究の出発点となった。

NOD/SCID マウスをレシピエントとして用いても、十分に生着しない白血病検体が存在したことから、並行して、レシピエントとなる免疫不全マウスのさらなる改良が必要と考えられた。特に、NOD/SCID マウスに残存する自然免疫系の細胞機能を低下させることで、さらなるヒト造血幹細胞の生着率が期待された。伊藤らは、NOD/SCID マウスに common γ 細胞外ドメイン欠損マウスをかけ合わせて、NOG マウスを作製した⁶⁾。Jackson 研究所からは、*IL2r γ* 遺伝子の完全な null 変異を持つ NSG マウスが開発された⁷⁾。同様に、NSG マウス、SCID マウスでは放射線感受性が高いため RAG2-null 変異と *IL2r γ* -null 変異を持たせた BALBc/Rag2KO/Il2r γ KO (BRG マウス)も作製された。いずれのマウスも NOD/SCID マウスの高度免疫不全に加えて NK 細胞が完全欠損しており、正常なヒト造血幹細胞の高い生着率と T, B, NK 細胞の再構築がみられ、ヒト造血幹

細胞移植の研究に広く用いられている。これらの高度免疫不全マウスの開発に加えて、骨髄内移植・新生仔を用いた経静脈的細胞輸注など異種移植技術の進歩により、患者由来白血病細胞の生着率が向上した。システムが白血病細胞の生着により鋭敏になり、白血病幹細胞は $CD34^+CD38^-$ 分画以外にも存在している事が報告されている^{8,9)}。2008年、ヒト臍帯血細胞、白血病細胞を NOD/SCID マウスに移植した際に、ソーティングで使用する抗 $CD38$ 抗体の Fc 領域を介して、抗体と結合した細胞がマウス内でクリアランスされてしまう事が示唆された。Fc 領域を介したクリアランスを避けるため、 $CD34^+CD38^+$ 分画の白血病細胞をマウスの骨髄内に直接投与する事で白血病細胞の生着が得られた¹⁰⁾。2011年には、NSGマウスの移植実験において、これまで白血病幹細胞は $CD34^+CD38^-$ 分画や lineage marker (Lin)-分画にのみ存在すると考えられてきたが、少数ながら Lin+ 分画や $CD38^+$ 分画にも白血病幹細胞を同定し、これらの分画は二次移植でも維持されていた¹¹⁾。白血病幹細胞は、従来考えられていた正常造血幹細胞同様の $CD34^+CD38^-$ 分画のみならず、さまざまな表現型を取る事が示された。この事は、白血病幹細胞の多様性や可塑性を表すと同時に、後述する白血病幹細胞を標的とした治療の難しさに繋がっている¹²⁾。

The Cancer Genome Atlas Research Networkにより、*de novo* AML 200例を対象とした次世代シーケンサーを用いた全ゲノムクエークエンス、全エクソンシーケンシングが行われ、AMLにおいて高頻度に見られる23種類の遺伝子変異・異常が同定された¹³⁾。23遺伝子には、*FLT3*, *c-KIT*, *RAS*などの細胞増殖に関わるkinaseの変異や *RUNX1-ETO*, *MLL* 融合遺伝子、*CEBPA*などの転写因子の変異に加えて、DNAメチル化・ヒストン修飾などのエピゲノム関連遺伝子、RNAスプライシング遺伝子、がん抑制遺伝子、コヒーシン複合体などの染色体複製に関わる遺伝子が含まれていた。これらの多様な遺伝子変異が協調し、白血病発症を引き起こすと考えられる。小川らは次世代シーケンサーを用いた全エクソンシーケンシングによって、異形成を伴う腫瘍で、RNAスプライシング経路に関与する遺伝子の変異、AMLを含む骨髄系の腫瘍で、コヒーシン複合体に関与する遺伝子の変異が高頻度であることを見つけた^{14,15)}。コヒーシンに生じる変異は、stem cellからprogenitorへの分化を抑制し、stemnessを強く維持することがマウスモデルからもわかってきた。すなわち、白血病発症におけるstemnessや幹細胞の意義が、

分子レベルで解明されつつある¹⁶⁾。白血病発症モデルの典型例は、まず造血幹細胞に initiating 変異として転写因子やエピゲノム制御に関連する遺伝子の変異が起こり、initiating clone となる。次いでクローンサイズを拡大した initiating clone に driver 変異として kinase 群等に変異が起き、細胞増殖シグナルが恒常的に活性化され、白血病発症へと至る。さらに複数の passenger 変異を獲得し、白血病内で多数のサブクローンが出現し、薬剤抵抗性や再発に関与すると考えられる。

B 白血病幹細胞制御と骨髄微小環境

血液・免疫系組織に限らず、各臓器ではそれぞれ固有の幹細胞が存在し、幹細胞の自己複製能および多分化能は組織の維持、修復、再生を担っている。生体組織では、ニッチと呼ばれる微小環境からのシグナルにより、幹細胞の多分化能・自己複製能の維持が行われている。ニッチを構成する周囲の細胞や、細胞外基質からのシグナル分子により、幹細胞は生体内の状況を把握し、各組織での恒常性および機能を維持している¹⁷⁾。特に、マウスの造血幹細胞に対するニッチ研究はさまざまな遺伝子組換えマウスを作製し、幹細胞のマーキングも含めて、精力的になされてきた。Scadden らは、骨髄の中でも、特に PTH/PTHrP 受容体の活性化により骨芽細胞が、Notch シグナルを介して正常造血幹細胞を制御していることを見出した¹⁸⁾。長澤らは、造血幹細胞の多くが CXCL12 陽性細胞の近傍に存在し、CXCL12-CCR4 シグナルは正常造血に重要な役割を果たす事を報告し、このニッチ細胞を CAR (CXCL-12Abundant Reticular) 細胞と名付けた¹⁹⁾。また、血管内皮細胞や血管周囲の細胞が造血幹細胞の維持を促進し、正常造血は交感神経支配である事も近年、報告されている^{20,21)}。骨の中の血液・血管・神経というシステムを構成する細胞同士が相互作用し、幹細胞の自己複製や多分化能を維持していることが確からしい。見方を変えると、骨髄ニッチの多様な構成要素に破綻が生じると、正常造血幹細胞の維持、制御に狂いが生じ、その結果、なんらかの血液疾患へと発展する危険性が否めない。実際に MDS では、MDS 細胞と周囲の微小環境が強調し合って、正常造血を抑制する事が知られており、これらをターゲットとした治療戦略の開発も進められている。

正常造血幹細胞と同様に AML 幹細胞の維持には骨髄ニッチが必要不可欠であり、骨髄ニッチは、AML 細胞周囲に存在する多様な細胞、細胞外基質、シグナ

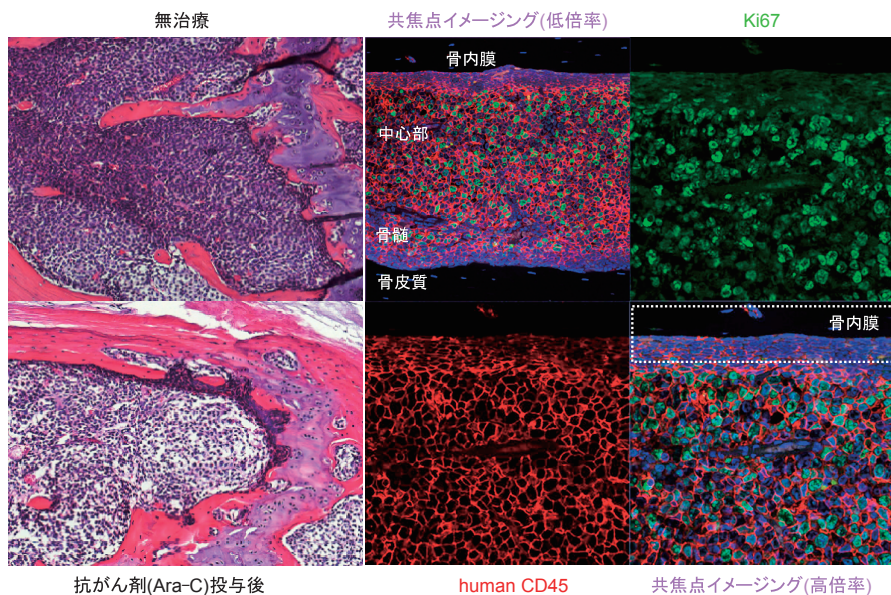


図 1 AML を発症したヒト化モデルマウスの骨髄

HE 染色: 無治療では骨髄に白血病細胞が充満している (左上図)。抗がん剤投与により白血病細胞は減少しているが、骨皮質近傍には白血病細胞が残存している (左下図)。

免疫蛍光染色: 骨髄の hCD45⁺白血病細胞 (赤) の多くは分裂細胞マーカーである Ki67 陽性 (緑) であるが、骨皮質近傍の AML 幹細胞は Ki67 陰性で細胞周期が静止している (点線部)。

ル分子, 生体内化学物質などから構成されている。以前に, われわれは, AML を免疫不全マウスに再現することにより, AML の CD34⁺CD38⁻分画は, CD34⁺CD38⁺分画や CD34⁻分画と比較して細胞周期が G0 期に静止している AML 細胞が多く, 骨皮質近傍に存在していることを報告した (図 1)。この場所特異性を有する細胞周期の特性は, シタラピンをはじめとする, 細胞周期依存的に細胞傷害作用を発揮する多くの抗がん剤に対する抵抗性に寄与していると考えられた²²⁾。また, 細胞周期静止による治療抵抗性に加えて, サイトカイン投与により静止期の細胞を細胞周期に乗せる事で薬剤感受性が高まることが確認された。ただし, 正常と白血病の幹細胞が同じ機構を用いて自己複製能を維持しているならば, より特異的分子の同定が重要と言えよう²³⁾。