

白血病幹細胞研究の進歩と新規治療開発

九州大学大学院医学研究院・病態修復内科

赤司 浩一

Key words : 急性骨髄性白血病, 白血病幹細胞, 分子標的治療

はじめに

生体において酸素運搬, 感染防御, 止血等の重要な役割を担う血液は, 多種の細胞によって成り立っている. このことは, 1877年Paul Ehrlichによるアニリン系色素による細胞染色法の開発により初めて視覚的に明らかにされた. これらの形態・機能が異なる血液細胞群の由来については, 一元論から多元論まで議論される時代が続いたが, 1961年に脾細胞コロニー法により多能性造血幹細胞の存在が証明され¹⁾, 1966年に*in vitro* colony形成法により各分化段階にある前駆細胞が検出できるようになり, 造血幹細胞を頂点とした階層性に基づく分化モデルが提唱された. 続いて白血病細胞もその一部だけが*in vitro*で芽球コロニーを形成できることが報告され, 「白血病幹細胞」の存在も示唆された. 造血幹細胞は自己再生しながら多系統の血液へ分化できるが, 白血病細胞はその分化能力を喪失し自己再生するクローンである. その後, フローサイトメトリーが開発され, 造血幹細胞²⁾や各系統に分化する過程にある造血前駆細胞³⁾, さらに白血病幹細胞⁴⁾が純化できるようになり, それらを用いて分化決定における転写因子等の働きとその異常による分化停止機構等が明らかにされた. ヒト造血幹細胞システムの*in vivo*の機能解析は,

免疫不全マウスを用いた異種移植システムにより進歩し, さらに次世代シーケンサーの開発によりヒト白血病発症に伴うゲノム異常についても解析が進み, ヒトにおける白血病幹細胞化の過程が明らかになりつつある. 様々な血液疾患は「造血幹細胞システムの破綻」によって生じると捉えることができる. 本講演では, 幹細胞コンセプトの導入によって進化した骨髄性白血病研究とそれに基づく最新治療について論じる.

1. ヒト白血病幹細胞システム

悪性腫瘍はモノクローナルに異常増殖する細胞集団と捉えられてきたが, シングルセルレベルでの解析が進み, 腫瘍は均一ではなく, 表現型や機能的に多様性を有する細胞集団により構成されることが明らかになった. この腫瘍組織の多様性を説明する概念として, がん幹細胞(cancer stem cell)が頂点となり自己複製を行いながら腫瘍組織を供給するという階層性モデルが提唱され, 急性骨髄性白血病において初めてその存在が証明された.

Dickらは, フローサイトメトリーでヒト急性骨髄性白血病細胞をCD34⁺CD38⁻, CD34⁺CD38⁺, CD34⁻の各分画に分け, それぞれ細胞免疫不全マウス(NOD-SCIDマウス)に移植したところ, CD34⁺CD38⁻分画のみがマウス内でヒト白血病を再構築することを報告した⁴⁾. さらに, ウイルスペクターを用いて遺伝子マーキングを

略歴は117頁に記載

行い、クローンを追跡すると白血病幹細胞集団も増殖能や自己複製能等機能的には不均一であることを証明した。即ち、正常造血幹細胞システム同様に、白血病集団においてもCD34⁺CD38⁻白血病幹細胞を頂点とする機能的階層性が存在し、骨髄の中で白血病造血を行い、ヘテロな白血病細胞集団を供給、維持していることが報告された。白血病幹細胞集団は、全芽球の0.1~10%程度に認められる少数の白血病細胞である。ヒト白血病幹細胞は、正常造血幹細胞とは異なる代謝特性や生存強化機構を持つことが知られ、例えば正常造血幹細胞が解糖系による嫌氣的代謝にエネルギー産生を依存するのに対して、白血病幹細胞はミトコンドリアでの酸化的リン酸化に強く依存している。また、異種移植後のマウス骨髄ではヒト白血病幹細胞は内骨膜ニッチに偏在し、特有の微小環境により支持されていると考えられる⁵⁾。このような一連の研究により「白血病化=白血病幹細胞化」というコンセプトが定着し、白血病幹細胞そのものの細胞生物学的解析が行われ、治療法開発につながっている。また、上記NOD-SCIDマウスにcommon- γ -chainノックアウトを導入しNK細胞を完全に除去したNOG、NSGマウス、さらにヒトCD47/ヒトSIRPAの結合による食欲抑制シグナルを惹起するためヒトSIRPAをノックインしたBRGS^{human}マウス⁶⁾等より高い生着効率を示すマウスが開発され、白血病幹細胞を含むがん幹細胞研究を支えている。

2. 白血病幹細胞化は造血幹細胞の異常を背景として起こる

白血病幹細胞化がゲノム異常やエピジェネティクス異常の集積の結果達成されるならば、造血幹細胞システムの中で、その集積の場は長期に亘り自己再生をする造血幹細胞のはずであり、**図1**のような白血病幹細胞成立機構が考えられてきた。2000年代になり、次世代シーケンサーによる経時的解析により、骨髄異形成症候群か

ら白血病に移行する際の、ヒト造血幹細胞における体細胞変異の蓄積過程が明らかにされた。また骨髄系腫瘍のみならず、急性リンパ性白血病、成熟リンパ系腫瘍と考えられてきた悪性リンパ腫や慢性リンパ性白血病等においても、先行する造血幹細胞のゲノム変異獲得を背景として発症していることが分かってきた⁷⁾。

また大規模シーケンスコホートにより、健常人においても遺伝子変異を有する造血幹細胞によるクローン性の正常造血が一定の頻度で出現し、その頻度が加齢に伴って増加することが報告された⁸⁾。この正常造血下でのクローン性造血はclonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP)と呼ばれ、造血器腫瘍に高頻度に認められるDNMT3A, TET2, ASXL1, JAK2, TP53, SF3B1等のゲノム変異を持つ。これらは急性白血病発症リスクを示すのみならず、化学療法関連二次性白血病発症リスクでもあり、白血病幹細胞化前段階を示していると考えられる。このように、多くの造血器腫瘍は、造血幹細胞のプロゲレッシブな遺伝子異常の蓄積を背景にして発症することは確実である。

さらに、CHIPが検出されることが高血圧より強い心血管系疾患のリスク因子であるという驚くべき事実⁹⁾が報告され、注目を集めている。TET2等の遺伝子変異を獲得したマクロファージでは、ケモカインやサイトカイン制御機能が破綻し、アテローム硬化性病変を促進させるとされており、今後CHIPに関しては、さらなる大規模コホートで広い領域の内科的疾患と関連させて研究が進むと考えられる。

3. 分子標的薬剤による白血病治療法の進歩

白血病治療は、「治癒とは白血病細胞を完全に体内から無くすこと」と定義するtotal cell kill理論に従って開発が進められ、作用機序の異なる抗癌薬を併用し、化学療法の投与間隔を短縮する方法が取られてきた。急性骨髄性白血病に対する薬物療法は、できるだけ早く深い寛解状

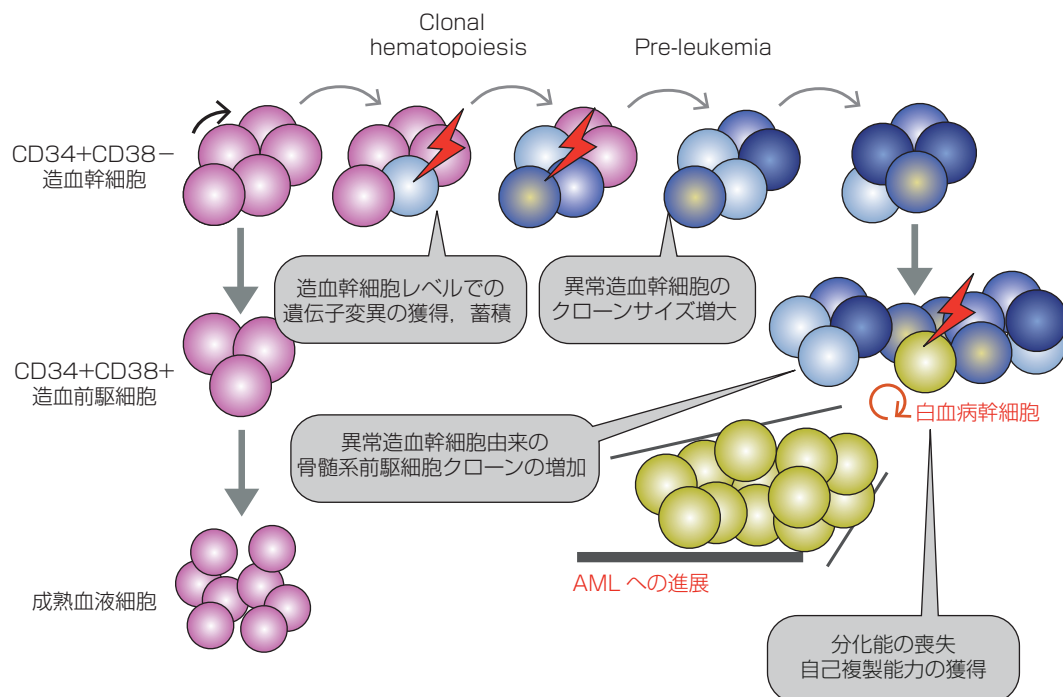


図 1. 造血幹細胞を起源とした多段階骨髄性白血病進展モデル

遺伝子変異を獲得した造血幹細胞は、自己複製を行いながらクローンを拡大する。このような異常クローンにおこるさらなる遺伝子異常の中で、クローンをさらに拡大できるものが選択され蓄積していく。このような異常幹細胞、もしくはそれから分化した骨髄系前駆細胞は数が増え、白血病幹細胞化の確率を上げ、最終的に自己複製能力の強化と分化停止を獲得することで白血病幹細胞化する。

態を目指すために、寛解導入療法、地固め療法、維持療法の各フェーズで、副作用の許す範囲で治療強度を高めてきたが、治療成績の改善は長らく頭打ちであった。

最近になって多剤併用化学療法が行えない高齢者等のunfit症例や再発難治例に対して様々な分子標的薬剤が開発され、白血病治療戦略にブレイクスルーが得られつつある。急性骨髄性白血病は、初発時から複数の遺伝子変異が複雑多様に組み合わせられたマルチクローンで構成されているため、治療標的となり得る変異(actionable mutation)を網羅的に検出し薬剤を投与するゲノム医療が実現しつつあり、FLT-3 阻害薬、IDH 1/2 阻害薬等が臨床現場で一定の効果を挙げている。World Health Organization (WHO)、米国のNational Comprehensive Cancer Network

(NCCN)、欧州のEuropean Leukemia Net (ELN) が提唱する診断・治療指針には多くのがんゲノム情報が掲載されているが、我が国では、造血器腫瘍ゲノムパネル検査が保険診療として実施できないのが現状であり、実現に向けての体制構築が喫緊の課題である。日本血液学会では2017年8月にゲノム医療部会を発足し、「造血器腫瘍ゲノム検査ガイドライン」を作成して近い将来のゲノム医療実現を後押ししている (<http://www.jshem.or.jp/genomgl/>)。

このようなactionable mutationに特異的に作用する新規分子標的薬剤に加え、遺伝子変異のタイプに依存せず、白血病細胞に共通する細胞生物学的特性を標的とした新規薬剤も数多く開発されている(図2)。注目されている薬剤に、BCL-2 阻害薬、SMO阻害薬等がある。これらの

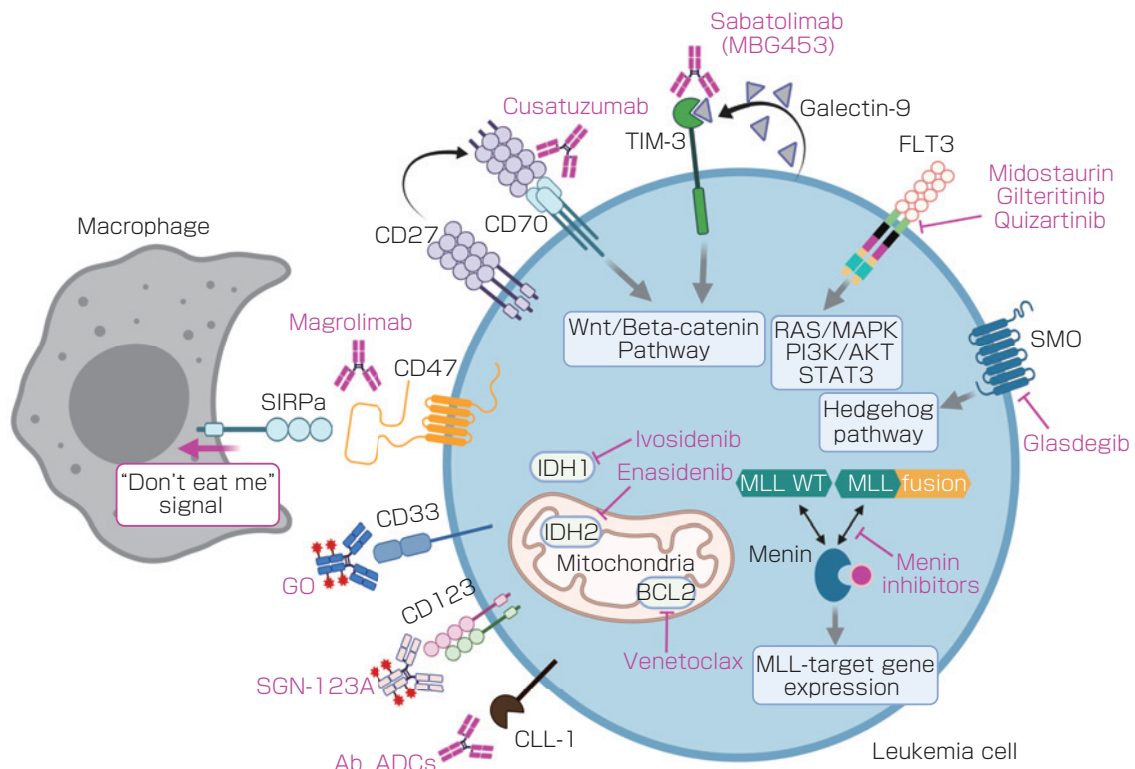


図 2. 急性骨髄性白血病に対する主な新規薬剤（開発中も含む）

薬剤は、特定のactionable mutationを有さないAMLサブクローンに対しても有効性を示す点がメリットであり、遺伝子変異特異的な治療を互いに補うことができる。ひいては、白血病治療戦略全体から既存の抗癌薬の使用を著しく減らすことが可能になると考えられる。

4. 白血病幹細胞を細胞標的とした新規治療法の開発

CD34⁺CD38⁻骨髄性白血病幹細胞は多くがG0期にあり、従来の細胞周期依存的な抗癌薬に抵抗性を示す⁹⁾。正常造血幹細胞に影響を与えず、白血病幹細胞のみを特異的に標的とする「魔法の弾丸」としての白血病幹細胞特異的標的分子の探索が続けられており、1)細胞表面抗原、2)自己複製関連分子、3)細胞生存関連分子、4)ニッチとの相互作用に関与する分子、5)細胞周期・

分化関連分子等が候補になるだろう。

我々は、CD34⁺CD38⁻白血病幹細胞とCD34⁺CD38⁻正常造血幹細胞をそれぞれ純化し、網羅的トランスクリプトーム解析を行い、正常造血幹細胞には全く発現せず、白血病幹細胞に特異的に高発現する細胞表面抗原としてT cell immunoglobulin mucin-3 (TIM-3)を同定した⁹⁾。前骨髄性白血病を除く急性骨髄性白血病の95%以上の症例において、その染色体異常や遺伝子変異や種類に関わらず、白血病幹細胞分画にTIM-3が発現していた(図3A)。TIM-3陽性の白血病幹細胞は、骨髄異形成症候群においても検出され、その初期から白血病発症に向けて次第に拡大していることから、白血病化の責任クローンと考えられた¹⁰⁾。

TIM-3は、膜一回貫通タンパクで、Tリンパ球に発現する免疫チェックポイント分子の1つで

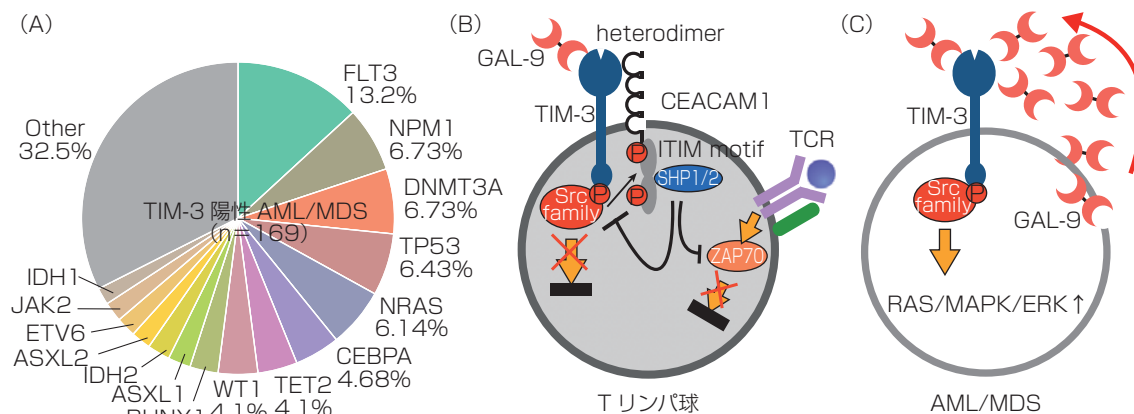


図 3. 白血病幹細胞特異的機能分子TIM-3

A: TIM-3 分子は遺伝子変異のサブタイプに依存せずに急性骨髄性白血病幹細胞に発現する。

B: TIM-3 分子は、T細胞においてはリガンドが結合するとCEACAM1 の抑制性シグナルモチーフを介し、T細胞性シグナルを抑制する。

C: TIM-3 分子は、ヒト白血病幹細胞においては単独で存在し、リガンドが結合するとSrc family kinaseを活性化し自己複製シグナルを惹起する。

ある。Tリンパ球上ではTIM-3はCEACAM1と結合し、ヘテロダイマーを形成し、TIM-3にリガンドであるGalectin-9 (GAL-9) が結合すると、CEACAM1のITIM motifが活性化され、T細胞受容体シグナルを抑制する (図3B)。ところが、Tリンパ球とは異なり、骨髄性白血病細胞はCEACAM1を発現しておらず、GAL-9との結合によりTIM-3の細胞内ドメインのチロシン残基がリン酸化され、SH2 motifを介してRAS/MAPK/ERK系シグナルを活性化する (図3C)。さらに白血病幹細胞自身がGAL-9を産生し自らの自己再生を刺激するオートクラインメカニズムを形成しており (図3C)、抗TIM-3抗体や抗GAL-9抗体等を投与することにより、異種移植したヒト白血病をマウス生体内で根絶できる¹⁰⁾。現在、複数の製薬会社によってTIM-3リガンドの結合を阻害する抗ヒトTIM-3中和抗体や、細胞毒をconjugateしたADC抗体等が開発中である。そのうち、中和抗体Sabatolimab (MBG453) は、米国を中心としてアザシチジン・デシタビン投与下の骨髄異形成症候群・難治性白血病を対象として臨床試験が進み、2020年6月のヨー

ロッパ血液学会でphase 1b試験における有効性 (high risk AML/MDSの完全寛解率 29/50%) と安全性が報告された。この結果を受け、欧米・アジアにおいて本薬剤のグローバル第3相試験が開始されている。この例にも見られるように、今後は、究極の標的である白血病幹細胞を直接叩くという戦略に基づいて、新規薬剤が開発され、評価されていくと考えられる。

おわりに

本稿では触れなかったが、言うまでもなく、造血幹細胞移植術そのものが造血幹細胞システムを理解した上で成立した治療法である。リンパ球系腫瘍に関しても治療に大きな進化が見られ、例えばCART (chimeric antigen receptor T-cell)、BiTE (bi-specific T-cell engager) 等新しい治療も臨床現場に導入され、大きな成果を挙げている。今後も造血幹細胞システムの理解を基盤として、次々と分子標的薬が開発され、抗癌薬を軸においた従来の治療戦略を変えていくと考えられる。

文 献

- 1) Till JE, McCulloch EA : A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14 : 213-222, 1961.
- 2) Spangrude GJ, et al : Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241 : 58-62, 1988.
- 3) Akashi K, et al : A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404:193-197, 2000.
- 4) Lapidot T, et al : A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367 : 645-648, 1994.
- 5) Ishikawa F, et al : Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nat Biotechnol* 25 : 1315-1321, 2007.
- 6) Jinnouchi F, et al : A human SIRPA knock-in xenograft mouse model to study human hematopoietic and cancer stem cells. *Blood* 135 : 1661-1672, 2020.
- 7) Kikushige Y, et al : Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 20 : 246-259, 2011.
- 8) Jaiswal S, et al : Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med* 371:2488-2498, 2014.
- 9) Kikushige Y, et al : TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. *Cell Stem Cell* 7 : 708-717, 2010.
- 10) Kikushige Y, et al : A TIM-3/Gal-9 Autocrine Stimulatory Loop Drives Self-Renewal of Human Myeloid Leukemia Stem Cells and Leukemic Progression. *Cell Stem Cell* 17 : 341-352, 2015.