

図1 ES細胞とEG細胞の由来

とが報告されている<sup>4,5)</sup>。

一方、マウスES細胞をフィーダー細胞やLIF非存在下で浮遊培養すると、胚様体を形成する。この胚様体内では、血島など卵黄嚢類似の組織構造や心筋細胞への分化が認められる。さらに、マウスES細胞を同系マウスや免疫不全マウスの皮下や精巣内などに移植すると、外胚葉、中胚葉、内胚葉の3胚葉に属する細胞が混在するテラトーマが形成される。

また、マウスES細胞を注入された胚盤胞を成体雌マウスの子宮に移植することにより、ES細胞由来の遺伝子を受け継いだキメラマウスが作られる。このキメラマウスの交配により、ES細胞由来の細胞からなる完全な動物個体ができる。このことは、ES細胞が、生殖細胞を含めたすべての組織細胞に分化可能であり、最終的には個体全体を形成することができることを示している。その意味において、ES細胞は全能性を有する幹細胞といわれている。

遺伝子操作を受けたES細胞でもキメラマウスの作製は可能であるため、マウスES細胞の全能性を利用して、遺伝子改変マウスをつくることができる。こうして作製された遺伝子改変マウス

は、種々の遺伝子の機能解析のための重要な手段として用いられてきた。

1992年には、マウス始原生殖細胞をLIFとbFGF(basic fibroblast growth factor)存在下で培養することにより、ES細胞と似た性質を有する胚性生殖細胞(embryonic germ cell:EG細胞)が樹立された<sup>6,7)</sup>(図1)。ES細胞とEG細胞の性状の差違については十分に解析されているわけではないが、EG細胞もES細胞と同様に全能性を有している。

## 2. ヒトES細胞の樹立

マウスばかりでなく、多くの動物で、ES細胞やEG細胞が樹立されてきたが、1998年に、ついにヒトES細胞とEG細胞の樹立が報告された<sup>8)</sup>。Wisconsin大学のThomsonらは、すでに霊長類(アカゲザルとマーモセット)の胚盤胞からES細胞を樹立していたが<sup>9,10)</sup>、同様の方法によりヒト胚盤胞からもES細胞の樹立に成功した。一方、Johns Hopkins大学のGearhartらのグループは、中絶胎児から単離した始原生殖細胞からヒトEG細胞の樹立に成功した<sup>11)</sup>。わが国においても、京都大学のグループが、カニクイザルES

細胞, さらにはヒト ES 細胞の樹立に成功している。

当然のことながら, 樹立されたヒト ES 細胞から完全な個体が作製できるか否かについて確認することなどできるわけもないが, ヒト ES 細胞を免疫不全マウスに移植すると, マウス ES 細胞と同様に, 3 胚葉由来の細胞を含むテラトーマを形成することより, ヒト ES 細胞も全能性を有していると考えられている。しかし, ヒト ES 細胞は, マウス ES 細胞と比較して, 栄養芽細胞に分化しやすい, マウス ES 細胞の維持に有用な LIF が効果がない, 発現されている分化マーカーに差違があるなど, マウス ES 細胞と異なる性質を有していることも指摘されている。

## ES 細胞の分化誘導

### 1. ES 細胞から機能細胞への分化誘導

ES 細胞が全能性を有するといっても, 現在のところ, その分化を完全に制御し, 自在に特定の機能細胞へ誘導できるわけではない。マウス ES 細胞から *in vitro* で分化誘導可能な細胞としては, 血液細胞<sup>12~14)</sup>, 血管内皮細胞<sup>15)</sup>, 神経細胞<sup>16)</sup>等が報告されている。

こうした誘導法の多くは胚様体を利用したもので, 胚様体を種々の条件で培養し, 胚様体内部の細胞分化を誘導する方法<sup>15, 16)</sup>, 初期胚様体から形成される芽細胞コロニーから分化誘導する方法<sup>13)</sup>等がある。また胚様体を用いない方法としては, ES 細胞を種々のストローマ細胞上で培養する方法<sup>12)</sup>, ある程度分化させた ES 細胞のなかから特定の分化能を有する細胞を, 細胞表面マーカー等により選別して分化させる方法<sup>14)</sup>等がある。

ヒト ES 細胞においても, 神経細胞<sup>15)</sup>, 心筋細胞<sup>16)</sup>, 膵臓  $\beta$  細胞<sup>17)</sup>, 内皮細胞<sup>18)</sup>等への分化誘導が報告されている。

さらに最近では, 種々の細胞分化に関わる転写因子の遺伝子を導入することにより ES 細胞を特定の機能細胞へ分化誘導しようという試みも行われている。たとえば, myoD により筋細胞へ, Hox11 により血液細胞へ, PDX-1 により膵  $\beta$  細

胞への分化誘導等が試みられている。

### 2. ヒト ES 細胞から造血幹細胞 / 血液細胞への分化誘導

ヒト ES 細胞から造血幹細胞や成熟血液細胞への分化誘導が可能となれば, 今日の造血幹細胞移植医療におけるドナー不足, あるいは, 輸血医療における輸血用血液製剤の不足や, 輸血用血液を介する感染の危険などの問題を解決することができるかもしれない。

これまでのところ, ヒト ES 細胞から血液細胞への分化誘導法としては, 主に, ストローマ細胞を用いた培養法<sup>19, 20)</sup>と, 胚様体を介する培養法<sup>21, 22)</sup>が報告されているが, そのいずれの方法でも, その血液細胞への分化誘導効率は必ずしも高くなく, また, 分化誘導された血液細胞が, 実際に臨床応用可能な機能を有しているか否かについても明らかにされていない。一方, ES 細胞から, 移植可能な, 長期造血再構築能を有する造血幹細胞への安定した分化誘導法に関しては, ヒトばかりでなく, マウスにおいても, いまだ確立された方法はない。

筆者らは, ES 細胞の造血幹細胞 / 血液細胞への分化誘導が, 従来の血液細胞の培養法では困難であった理由として, 胎生期を起源とする ES 細胞の造血幹細胞 / 血液細胞への分化誘導には, 胎生期の特定な時期に, 特定な部位で特異的に機能する分子による刺激が重要であるためと推測した。したがって, ES 細胞から造血幹細胞 / 血液細胞への分化誘導のためには, 胎生期の造血環境を再現することが重要であり, そのような胎生期造血機構を基盤とする, ヒト ES 細胞から造血幹細胞 / 血液細胞への分化誘導法の開発が可能ではないかと考えた。

しかし, ヒトの胎生期造血については, 必ずしもその詳細がわかっているわけではない。ただ, マウスの胎生期造血については, かなりのことが明らかになってきている (図 2)。

マウスの胎生期造血は, 胎生 7.5 日ころの胚体外の卵黄嚢に発生し, 胎生初期の造血を担う一次造血と, その後の一生にわたる造血を支えること

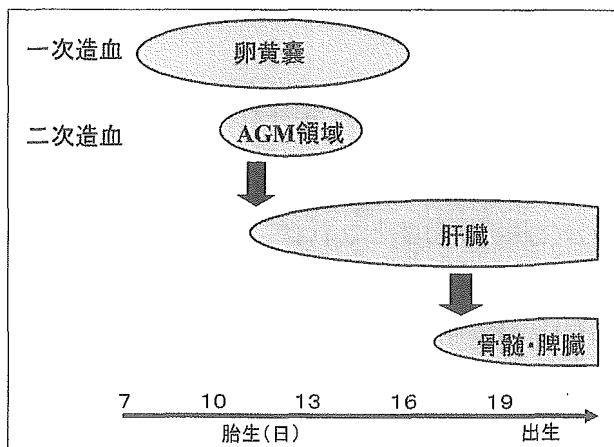


図2 マウスの胎生期造血

になる二次造血にわけられる。二次造血は、胎生10日の胚体内のAGM(aorta-gonad-mesonephros)領域に発生し、その後造血の場を胎仔肝に移し、爆発的に増幅したのち、脾臓、骨髄へ移動し、それ以降の一生にわたる造血を担うことになる。マウスと同じく哺乳類に属するヒトにおいても、基本的には、一次造血は卵黄囊に発生し、二次造血はAGM領域に相当する部位に発生し、胎児肝、骨髄へと移動すると考えられている。

一方、マウス造血組織由来のストローマ細胞のなかには、ヒト造血を支持できるものが多く報告されている。そこで筆者らは、マウス胎仔の造血臓器から樹立したストローマ細胞との共培養により、ヒトES細胞から造血幹細胞や血液細胞への分化誘導が可能ではないかと考え、ヒトES細胞を用いた研究計画「ヒト胚性幹細胞(ES細胞)から造血幹細胞への分化誘導法の開発」を、東京大学倫理審査委員会に提出した。本研究計画は、東京大学倫理審査委員会の承認を得たのち、2002年7月8日に文部科学省特定胚及びヒトES細胞研究専門委員会に申請した。同年12月20日には、本研究計画は同委員会により承認され、研究が開始された。

ヒトES細胞を、胎生14～15日のマウス胎仔の胎仔肝より培養されたストローマ細胞と共培養すると、培養3～5日目ころより、ヒトES細胞は分化を開始した。培養11～12日目ころには、未分化な造血細胞の増殖を示す、いわゆる cobble

stone area(CSA. 未分化な造血細胞がストローマ細胞下を這うようにして増殖する様子が、敷石を敷きつめたように観察されることから、この名称でよばれる)が出現し、その数はしだいに増加した。

CSAの数が最大となる培養14～16日目ころに、これらの培養細胞を採取し、エリスロポエチン、トロンボポエチン、interleukin(IL)-3, IL-6, SCF(stem cell factor), G-CSF(granulocyte colony-stimulating factor)存在下で、コロニー培養すると、赤血球コロニー、顆粒球・マクロファージコロニー、種々の血液細胞から構成される混合コロニー等、さまざまな血液細胞コロニーが形成された。これらのコロニーには、赤血球、好中球、マクロファージ、巨核球などの血液細胞が含まれていた。特に、赤血球では、成人型ヘモグロビンが合成されており、その酸素運搬能も確認することができた。

以上の結果は、筆者らの開発したマウス胎仔肝由来ストローマ細胞を用いた培養法により、ヒトES細胞から、多能性造血前駆細胞を含む種々の造血前駆細胞が分化誘導され、さらにそれらの前駆細胞から多くの、臨床応用可能な血液細胞への分化誘導が可能となったことを示している。

ただ残念ながら、免疫不全マウスであるNOD/SCIDマウスへの移植系で評価する限り、ヒトES細胞から、長期造血再構築能を有する造血幹細胞への分化誘導には、いまだ成功していない。その原因はまだよくわかっていないが、最近Wangらは、胚様体形成法を用いて誘導された細胞を、NOD/SCIDマウスの骨髄内に直接移植すると、ヒト造血が再構築されることを報告しており<sup>23)</sup>、われわれも今後、こうした造血幹細胞の評価系を含めて、さらに検討していく必要があると考えている。

## ES細胞を用いた再生医療

### 1. ES細胞を用いた再生医療の技術的問題

前述のように、ヒトES細胞から造血幹細胞や血液細胞への分化誘導はしだいに可能となりつつ

あるが、その臨床応用を実現するためには、解決されねばならないいくつかの問題がある。技術的な問題点としては、異種細胞や異種血清に依存しないヒト ES 細胞の維持培養法の開発、ヒト ES 細胞から目的とする細胞への特異的分化誘導法の確立、ヒト ES 細胞由来の細胞を用いた移植における移植免疫の克服等があげられる。

まず、現時点では、ヒト ES 細胞自身の維持に、マウス胎仔線維芽細胞やウシ胎仔血清が必要とされているという問題がある。実際にヒトに投与するということを考えれば、異種間感染を惹起する可能性のない、異種の細胞や血清に依存しない、ヒト ES 細胞の維持培養法が開発されねばならない。もちろん、こうした問題を解決するための方法も考案されつつあるが<sup>22)</sup>、まだ安定した維持培養システムを構築するには至っていない。

また、ヒト ES 細胞から種々の機能細胞が分化誘導されたといっても、ヒト ES 細胞の一部が分化誘導されたということであって、すべての ES 細胞を特定の機能細胞に分化させてしまうような分化誘導法が確立されているわけではない。この点では、筆者らが開発した分化誘導法も同様の問題をかかえている。もちろん目的とする細胞だけを選別して用いることは可能であろうが、未分化なヒト ES 細胞や、目的としない細胞への分化能を持った細胞の混入については十分に検討されねばならない。さらに臓器移植ということを考えれば、三次元構造を持った臓器を *in vitro* で構築する必要がある。

ES 細胞自身の有する遺伝子の正常性という問題もある。ES 細胞は正常 2 倍体核型という染色体の正常性を保持しつつ増殖可能ではあるが、そのことは遺伝子の正常性を保証するものではない。また仮に、ES 細胞が正常遺伝子を保持していたとしても、その分化制御を考える場合、正常発生とのエピジェネティックスの違いは考慮されねばならない。インプリンティングの影響を受ける遺伝子発現制御の異常により、分化誘導された細胞がなんらかの機能異常を有する可能性についても、十分に検討されねばならない。

## 2. 移植免疫の克服

ヒト ES 細胞から目的とする機能細胞が *in vitro* で分化誘導できたとしても、実際の移植医療に利用するためには、移植に伴う免疫反応が克服されねばならない。ただし、輸血用血液細胞にかぎっていえば、血液型を合わせるだけでよく、あまり大きな問題はない。また、造血幹細胞移植においても、臍帯血移植に用いられる造血幹細胞が、必ずしも、すべての HLA (human leukocyte antigen) を一致させる必要がないことを考えれば、ヒト ES 細胞から分化誘導された造血幹細胞を用いた移植においても、患者の HLA と完全に一致させなくてもよい可能性はあるし、あるいは、そのほうが GVL (graft versus leukemia) 効果という点では有利かもしれない。

しかし、現時点では、安全性という点を考慮すれば、HLA が完全に一致する ES 細胞を用意するのが妥当と考えられる。もちろん、外傷などにより損傷した組織の治療というような場合には、患者とまったく同じ遺伝子を持った ES 細胞を用意することが理想といえる。そうしたヒト ES 細胞由来の移植片を用いた移植における免疫学的問題を解決する方法としては、現在以下のようなことが考えられている。

### (1) ヒト ES 細胞バンク

現行の臍帯血バンクの成功を考えれば、さまざまな HLA を有するヒト ES 細胞を作製し、これをバンキングしておき、移植時にドナーと一致する HLA を持った ES 細胞から必要な移植片を作製するという方法が考えられる。しかし、仮に、用意する ES 細胞が臍帯血と同程度の HLA の一致度でよいとしても、実際には、多数のヒト ES 細胞の樹立と維持ということには、技術的にも、倫理的にも多くの困難が伴うと予想される。

### (2) ヒト ES 細胞の遺伝子改変

マウス ES 細胞で培われてきた遺伝子改変技術を駆使して、HLA の問題を解決しようという考えがある。方法としては、相同遺伝子組替えを利用して、ドナーの HLA 遺伝子をヒト ES 細胞に導入する方法、さらには内在する HLA 遺伝子を破壊したヒト ES 細胞を作製し、これに必要とさ

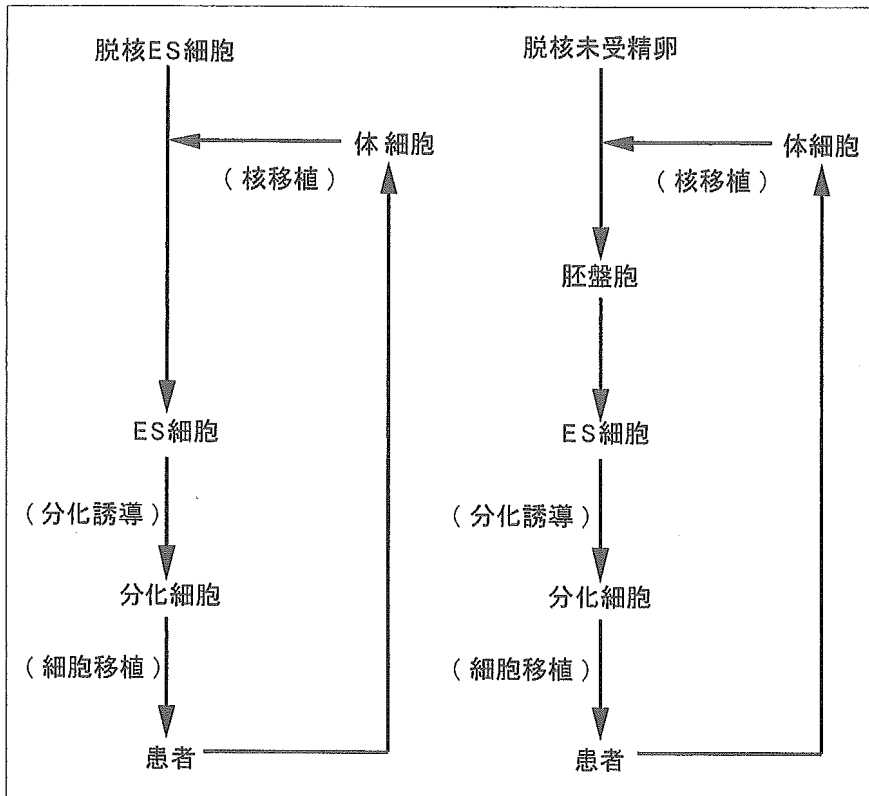


図3 ヒトES細胞と体細胞核移植

れる HLA 遺伝子を導入する方法等が考案されている。

### (3) 体細胞核移植の応用

あまりにも有名なヒツジのドリーの成功<sup>24)</sup>以来、体細胞核の未受精卵への移植によるクローン動物の作製技術は、畜産分野において著しい進歩を遂げた。この核移植技術を用いて、組織適合性の問題を解決しようという試みが提案されている。核移植のレシピエント細胞としては、ヒトES細胞自身とヒト未受精卵の2種類が考えられている(図3)。

前者においては、患者の体細胞核を移植されたES細胞を分化誘導して、患者と同じ遺伝子を持った移植片を得ることになるが、現在のところ、この方法には技術的にまだ困難な点が多い。

一方、後者においては、患者の体細胞核を移植されたヒト脱核未受精卵、いわゆるクローン胚から得られた胚盤胞により、患者本人の遺伝子を持つES細胞を樹立し、このES細胞から移植片を作製する。この方法は、少なくとも現時点では、前者よりも実現性は高いが、その過程で作製され

るクローン胚から得られた胚盤胞を、成人女性の子宮に移植すれば、理論的には、クローン人間の作製が可能であり、このことが、後述する倫理的問題をはらんでいる。

### (4) 細胞融合を用いた方法

ヒトES細胞を、患者の体細胞と細胞融合することにより、移植免疫を克服しようという試みも図られている。しかし、4倍体細胞の性状については不明な点も多く、その実現にはまだ時間が要すると予想される。

## 3. ヒトES細胞をめぐる倫理的問題

ヒトES細胞を用いた再生医療に関わる倫理的問題は、大きくは、ヒトES細胞の作製に必要とされるヒト胚に関わる問題と、ヒトクローン胚に関わる問題にわけられる。ただ、こうした倫理的問題の背景には、個人あるいは社会が抱えている宗教、思想、生命観の違いがあり、すべての人々が納得する回答はないともいえる。実際、これらの倫理的問題に対する取り組みには、世界各国でかなりの違いがある。

わが国においては、ヒトES細胞の作製と使用については、2001年に、文部科学省より「ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針」が示された。この指針では、ヒト胚を“生命の萌芽”と位置付け、慎重に扱われねばならないとしたうえで、同省の審査委員会の承認を得た研究については、ヒトES細胞の作製と使用が認められた。筆者らの研究についても、本指針を遵守して実施されている。

ヒトクローン胚研究については、2001年に成立した「ヒトに関するクローン技術等の規制に関する法律」(クローン技術規制法)により、クローン人間の誕生は法的に防止されている。しかし、クローン胚を用いた研究については、04年7月に、総合科学技術会議の生命倫理専門委員会により、基本的にはヒトクローン胚研究を認める最終報告書がまとめられた。ただし、この報告書に対しては批判も多く、現在のところ、クローン胚研究は、その科学的検証のための枠組みが整備されるまで、実質的にはモラトリアム状態にある。

倫理的問題について、最終的な正解を得られるなどということは、本来的にはありえないことだろう。結局のところ、こうした医学研究の正当性を最終的に保証するものは、研究者の倫理観でしかない。とすれば、ヒトES細胞をめぐる倫理的問題の多くは、医学者、研究者の良心が問われているのであり、われわれは研究の高い公開性・透明性を確保し、社会が常に厳しく監視できるような研究体制を構築していく必要がある。

## おわりに

遠い先のことように思われたヒトES細胞を用いた再生医療も、確実に現実の話として語られるようになりつつある。特に、薬剤の薬理効果を判定するためのテスト細胞の供給源として利用するというのであれば、その実現にさほど多くの時間を要することはないだろう。

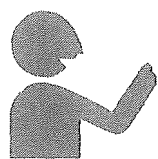
ただし、実際の細胞療法に用いるとなれば、話はまったく別で、解決されねばならない数多くの技術的・倫理的問題が山積している。われわれ

は、そうした現実について、絶えず社会に情報を提供し、その批判を真摯に受け止めながら、その一つひとつの問題を確実に解決していかねばならない。

## 文献

- 1) Evans MJ, Kaufman MH: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292 : 154-156, 1981.
- 2) Martin GR: Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78 : 7634-7638, 1981.
- 3) Smith AG, Nichols J, Robertson M, Rathjen PD: Differentiation inhibiting activity (DIA/LIF) and mouse development. *Dev Biol* 151 : 339-351, 1992.
- 4) Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai T, Katsuki M et al.: STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J* 18 : 4261-4269, 1999.
- 5) Niwa H, Miyazaki J, Smith AG: Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genet* 24 : 372-376, 2000.
- 6) Matsui Y, Zsebo K, Hogan BLM: Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 70 : 841-847, 1992.
- 7) Resnic JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ: Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 359 : 550-551, 1992.
- 8) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ et al.: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282 : 1145-1147, 1998.
- 9) Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris C et al.: Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 7844-7848, 1995.
- 10) Thomson JA, Marshall VS: Primate embryonic stem cells. *Cur Top Dev Biol* 38 : 133-165, 1998.
- 11) Shambloott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Liyyelfield JW et al.: Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 13726-13731, 1998.
- 12) Nakano T, Kodama H, Honjo T: Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* 265 : 1098-1101, 1994.
- 13) Kennedy M, Firpo M, Choi K, Wall C, Robertson S et al.: A common precursors for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature* 386 : 488-493, 1997.
- 14) Nishikawa SI, Nishikawa S, Hirashima M, Matsuyoshi N, Kodama H: Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1 + VE-cadherin + cells at a diverging point of endothelial and hematopoietic lineages. *Development* 125 : 1747-1757, 1998.
- 15) Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A: Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. *Nat Biotechnol* 18 : 399-404, 2000.
- 16) Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amira A et al.: Human embryonic stem cells can differentiate

- into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 108 : 407-414, 2001.
- 17) Suheir A, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Karl L et al.: Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 50 : 1691-1697, 2001.
  - 18) Levenberg S, Golub JS, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Langer R: Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 : 4391-4396, 2002.
  - 19) Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, Auerbach R, Thomson JA: Hematopoietic colony-stimulating cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Sci USA* 98 : 10716-10721, 2001.
  - 20) Vodyanik MA, Bork JA, Thomson JA, Slukvin II: Human embryonic stem cell-derived CD34 + cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood* 105 : 617-626, 2005.
  - 21) Wang L, Li L, Shojaei F, Levac K, Cerdan C, Menendez P et al.: Endothelial and hematopoietic cell fate of human embryonic stem cells originates from primitive endothelium with hemangioblastic properties. *Immunity* 21 : 31-41, 2004.
  - 22) Wang L, Li L, Menendez P, Cerdan C, Bhatia M: Human embryonic stem cells maintained in the absence of mouse embryonic fibroblasts or conditioned media are capable of hematopoietic development. *Blood* 105 : 4226-4234, 2005.
  - 23) Wang L, Menendez P, Shojaei F, Li L, Mazurier F et al.: Generation of hematopoietic repopulating cells from human embryonic stem cells independent of ectopic HOXB4 expression. *J Exp Med* 201 : 1603-1614, 2005.
  - 24) Wilmut I, Schnleke AE, McWhir J, Kind J, Campbell KHS: Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385 : 810-813, 1997.



## 話題

# JMMLに対する ビスフォスフォネートの効果\*

大塚 欣敏<sup>\*\*\*</sup> 辻 浩一郎<sup>\*\*</sup>

**Key Words** : juvenile myelomonocytic leukemia (JMML), RAS, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), bisphosphonate, zoledronic acid

### はじめに

近年、血液腫瘍に対する抗がん剤の開発、化学療法の進歩は目覚しく、白血病をはじめとした悪性腫瘍に対する治療成績は改善される傾向にある。しかしながら、これらの化学療法にはさまざまな副作用があり、予後改善には限界がある。そこで、近年、新たな治療戦略として、従来の抗がん剤とは異なった治療法として分子標的療法が注目されるようになってきた。分子標的療法として代表的なものとしては、*Abl* 特異的チロシンキナーゼ阻害剤である *imatinib mesylate* (STI571) があげられ、慢性骨髄性白血病の治療成績の向上に著明な変化をもたらした。現在も血液腫瘍に関連する多くのシグナル伝達物質が新たな分子標的療法のターゲットとして研究が進められている。

それらの中でも、RASシグナル伝達経路が注目されている。RASあるいはRAS関連タンパクの異常ががんの発生、増殖に密接に関連しており、そのメカニズムを明らかにすることで、新たな治療戦略の開発に結びつくものと期待されている。若年性骨髄単球性白血病 (juvenile myelomonocytic leukemia; JMML) は、近年の研究で、発症機序に顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte/macrophage colony-stimulating factor; GM-CSF)-RASシグナル伝達系の異常が関

与していることが明らかとなっており、RAS経路に関連したさまざまな薬剤が開発され、臨床研究が行われている。本稿では、RASおよびRAS関連タンパクに対し強力な阻害作用をもつビスフォスフォネート製剤 (BP) のJMMLに対する効果について、われわれの研究結果を中心に解説する。

### JMMLの病態と治療の現状

JMMLは乳幼児に好発する、骨髄異形成症候群と骨髄増殖性疾患の両方の性格を併せもつ疾患であり、顆粒球・単球系の増加だけでなく、赤血球・巨核球系の異常もしばしば観察され、これまでのクロナリティー解析などから、多能性造血幹細胞レベルの異常と考えられている<sup>1)~3)</sup>。以前は慢性骨髄性白血病や乳児モノソミー7症候群との鑑別などその異同について議論されていたが、現在はJMMLとして一括された疾患概念が提唱され、広く受け入れられている。表1に、Niemeyerらが提唱したJMMLの診断基準を示す<sup>4)</sup>。

JMMLの正確な発症率は不明であるが、日本小児血液学会の後方視的な調査<sup>5)</sup>で、JMMLは一次性骨髄異形成症候群174例中60例と30%以上を占めており、比較的頻度の高い病型であると考えられる。診断時年齢の中央値は1.8歳と2歳未満が60%以上を占める。性差は男女比が<sup>6)</sup>2~2.5:1と男児に多い傾向にある。JMMLの造血前駆細胞

\* Effect of bisphosphonate on juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) cells.

\*\* Yoshitoshi OTSUKA, M.D. & Kohichiro TSUJI, M.D., Ph.D.: 東京大学医科学研究所先端医療研究センター細胞療法分野 (〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1); Division of Cellular Therapy, Advanced Clinical Research Center, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo 108-8639, JAPAN

\*\*\* 兵庫医科大学医学部小児科



表1 JMMLの診断基準

診断を示唆する臨床症状
肝脾腫
リンパ節腫大
蒼白
発熱
皮疹
診断に必須の検査所見(3項目すべて必要)
Ph染色体およびbcr-abl再構成が検出されない
末梢血の単球絶対数 $>1,000/\mu\text{l}$
骨髄中の芽球の割合 $<20\%$
確定診断に必要な検査所見(2項目以上必要)
HbFの増加(年齢により補正が必要)
末梢血において骨髄系前駆細胞が存在
末梢血の白血球数 $>10,000/\mu\text{l}$
クローナルな異常(モノソミー7を含む)
<i>In vitro</i> でのGM-CSFに対する高感受性

(Niemeyer, et al. 1998より引用)

は造血因子無添加の条件下においてコロニー形成(spontaneous colony formation)をきたすことが、診断基準の一つにあげられているが、これは、JMML細胞がGM-CSFに対して高感受性を有することにより説明される。

JMMLに関連する遺伝的異常としては、*ras*遺伝子の変異、1型神経線維腫(neurofibromatosis type 1; *NF1*)遺伝子の変異、*PTPN11*遺伝子の変異が知られている。*ras*遺伝子の変異(*N-ras*や*K-ras*など)が15~30%のJMML患者<sup>67)</sup>に認められ、30%に活性型RASを不活化するGTP加水分解酵素であるneurofibrominをコード化している遺伝子*NF1*の突然変異があると報告されている<sup>8)</sup>。また、*PTPN11*遺伝子は、チロシンフォスファターゼであるSHP-2をコードし、GM-CSF受容体β鎖下流のシグナル伝達に関与しており、*PTPN11*遺伝子の変異により、SHP-2の脱リン酸化活性が亢進し、RAS/MAPK経路の活性化状態が持続すると考えられている。*PTPN11*遺伝子は以前からJMMLとの合併で知られていたNoonan症候群の半数以上に変異が認められる遺伝子であり、Taratagliaら<sup>6)</sup>はJMML 67例について解析を行い、Noonan症候群合併のJMML全例に加え、非Noonan症候群のJMML患者の31%においても*PTPN11*遺伝子の変異を認めた。これらの異常を合わせるとJMML症例の80%以上に、なんらかのGM-CSF受容体β鎖下流に位置するRAS経路のシグナル伝達の異常が

認められており、これらがJMML発症に大きく関与していると考えられている。こうした研究成果から、最新のJMMLの診断基準では、*PTPN11*、*NF1*、*ras*遺伝子の変異の検索が必須とされる傾向にある。これらの検索により、これまでの診断基準で問題となっていたJMML類似の病態を呈するウイルス感染症(HHV-6, CMV, EBVなど)の除外が可能となると思われる。

JMMLの経過は多様で、約1/3の症例が臓器腫大、骨髄不全など急激な経過をきたし、早期に死に至るのに対し、1/3は緩やかな経過をたどり、最小限の治療で症状の改善を認める。死因はCMLのように急性転化をきたすことは稀で、主に肺などへの臓器浸潤、感染合併、出血などによることが多い。

JMMLの治療に関してはこれまでの報告<sup>2)</sup>により、化学療法の有効性は証明されておらず、原則的には行われない。白血球増加など病勢コントロールが困難な症例には6-MP単剤か低用量Ara-Cの併用が試みられているが、効果は一時的で、徐々に治療抵抗性を示すようになる。現状では、造血幹細胞移植が根治を期待できる唯一の治療法で、造血幹細胞移植が行われない症例の生存期間の中央値は10か月である<sup>119)</sup>。Locatelliら<sup>10)</sup>のヨーロッパからの報告では、TBIを用いず、BU+CY+L-PAMの移植前処置にて同種造血幹細胞移植を施行した100例を解析し、5年無イベント生存率が、HLA一致血縁ドナーで57%、非血縁ドナーで46%であった。わが国でも1999年よりJMML 22例にBU+HDCA+CYを用いた前処置で造血幹細胞移植を行い、3年全生存率で50%と同等の成績が得られた。しかし、再発が30%に、生着不全が27%に認められ、とくに臍帯血移植に多くみられることより、移植ソースの選択や前処置の改良などさらなる検討が必要であり、いまだ予後不良と言わざるを得ない<sup>11)</sup><sup>12)</sup>。また造血幹細胞移植は乳児に多いため、移植関連合併症(晩期障害も含む)などのさまざまな問題もあり、新たな治療戦略の開発が望まれている。

### JMMLに対する分子標的療法

前述したようにJMMLでは約80%の症例にGM-CSF受容体下流に位置するRAS経路の異常が明ら

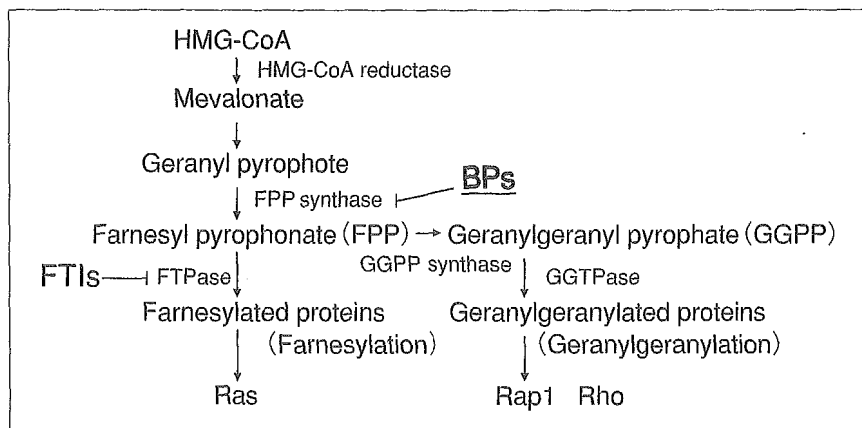


図1 メバロン酸代謝経路とビスフォスフォネート

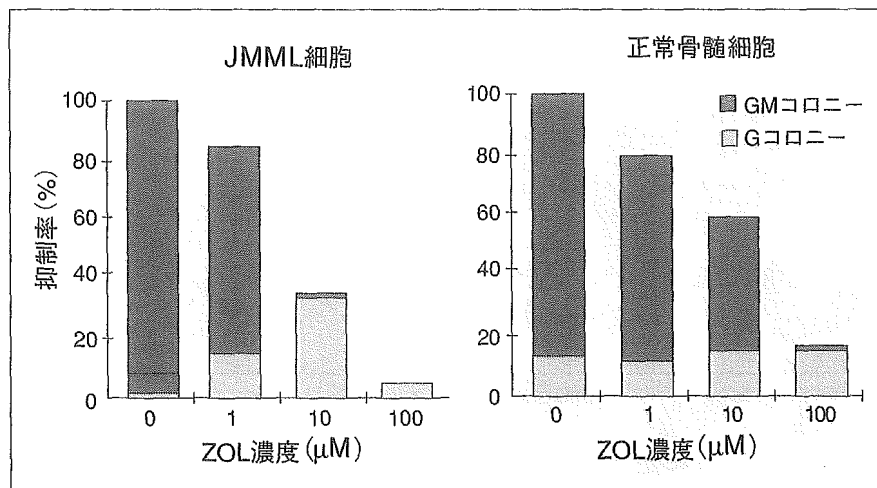


図2 ZOLがコロニー形成および構成細胞に与える影響(文献<sup>18)</sup>より引用改変)

かとなっていることから、RASの作用に必要なである farnesyl transferase の阻害薬 (FTI) である R115777, GM-CSF の作用を阻害し、アポトーシスを誘導する<sup>13)</sup>。また、ヒト GM-CSF アナログ (E21R), mTOR 阻害剤である rapamycin などの治療が開始、あるいは計画されており、その結果が待たれる。

一方、BP は破骨細胞による骨吸収の抑制作用をもち、これまでは骨粗鬆症の治療薬として使用されてきたが、近年 RAS 阻害剤としての効果が明らかとなり、新たな分子標的療法の一つとして注目されている<sup>14)</sup>。RAS 関連タンパクは翻訳後、メバロン酸代謝経路により合成されるファルネシルピロリン酸 (FPP) またはゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) が、これらのプレニル基を転移させる酵素の働きにより、C 末端のファルネシル化やゲラニルゲラニル化 (翻訳後修飾) を受け、細胞膜に局在することで、シグナル下流に伝達

する役目を果たしている。したがって、RAS 関連タンパクの活性化にはプレニル化が不可欠であり、その活性化を抑えるためには、転移に関する酵素、もしくはプレニル基そのものの合成を阻害するかの、いずれかが考えられ、前者の代表的な薬剤が FTI であり、後者の代表的薬剤が BP ということになる (図 1)。しかしながら、FTI は K-ras や N-ras などが GGTPase によっても修飾されるため、RAS のプレニル化を完全には抑えることができない。これに対して BPs は、ファルネシル化とゲラニルゲラニル化<sup>15)</sup> の抑制を通して、RAS の活性を阻害することにより、抗腫瘍効果を示しており、第 3 世代 BP である zoledronate (ZOL) は、さらに強い RAS 抑制活性<sup>16)</sup> を有することが示された。

ZOL の抗腫瘍効果としては、乳がんや多発性骨髄腫などに対する効果が報告され、抗腫瘍剤としても適応が拡大しつつある。近年、血液腫瘍

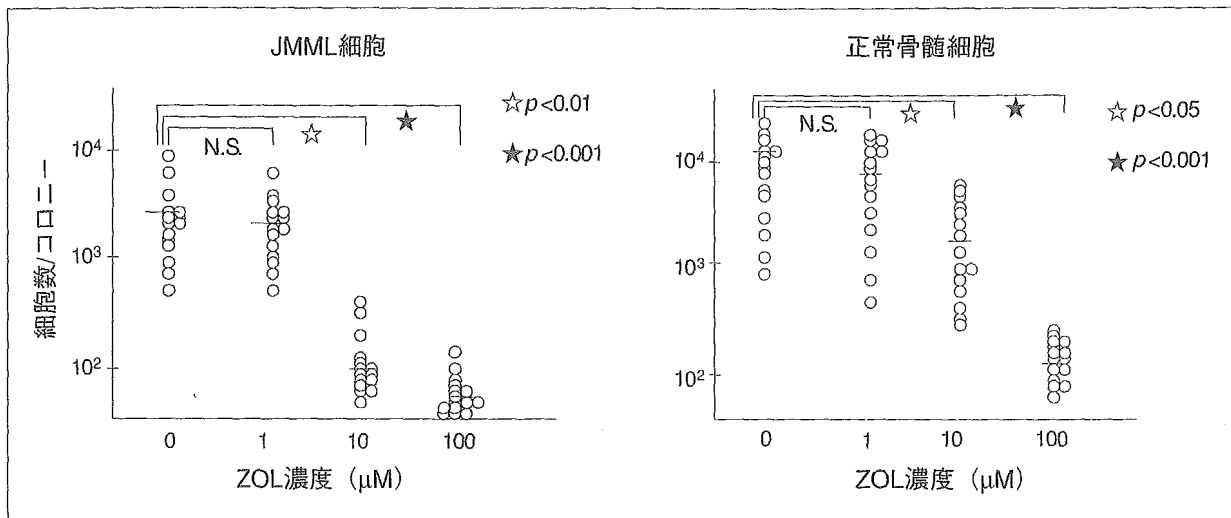
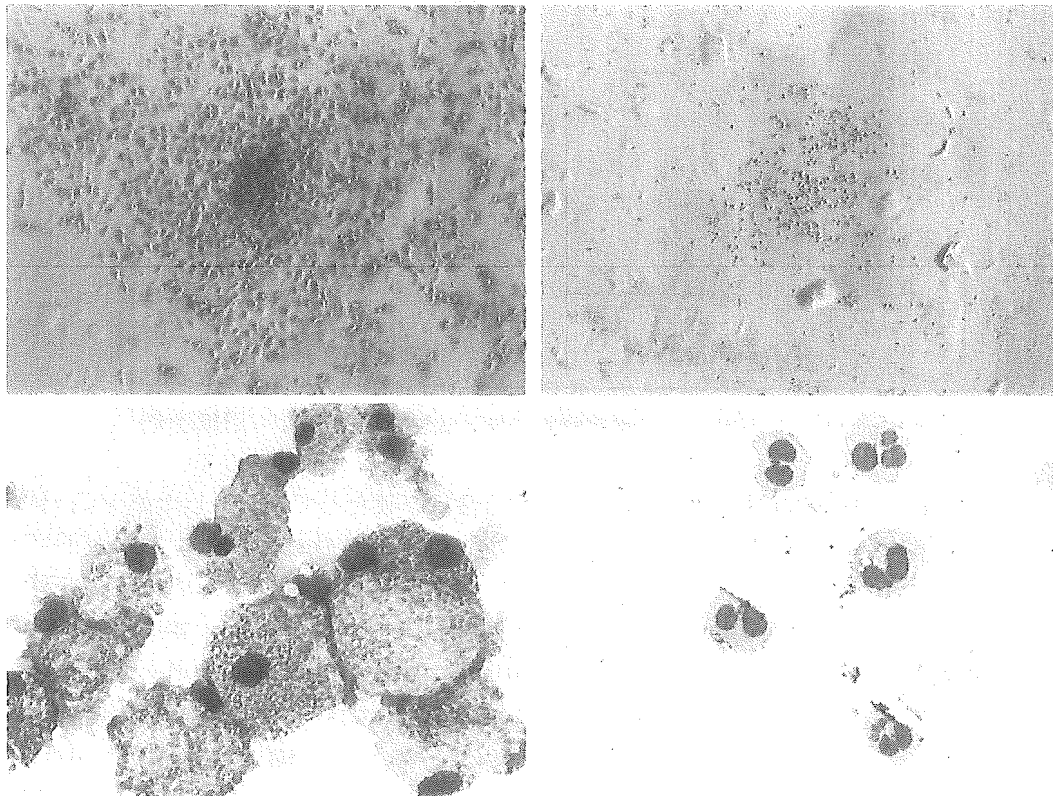


図3 コロニー構成細胞数にZOLが与える効果(文献<sup>18)</sup>より引用改変)



ZOL非添加で, JMML細胞から形成されたGMコロニー

ZOL添加で, JMML細胞から形成されたGコロニー

図4 JMML細胞から形成されたコロニー(上)とその構成細胞(下)(文献<sup>18)</sup>より引用改変)

では, 慢性骨髄性白血病における抗腫瘍効果が報告され<sup>17)</sup>, 分子標的療法としてSTI571との併用など新たな適応について臨床研究が進んでいる。そこで, われわれは, JMMLに対する抗腫瘍薬としてのZOLの可能性を評価するために, JMML細胞の増殖に対するZOLの効果<sup>18)</sup>を検討した。

### JMML細胞に対するZOLの効果

#### 1. コロニー形成に対するZOLの効果

診断基準<sup>4)</sup>からJMMLと診断された8症例の骨髄検体と, 同意の得られた成人の正常骨髄6例を用いて, そのコロニー形成能を, メチルセルロース法により検討した。8例のJMML全例にお

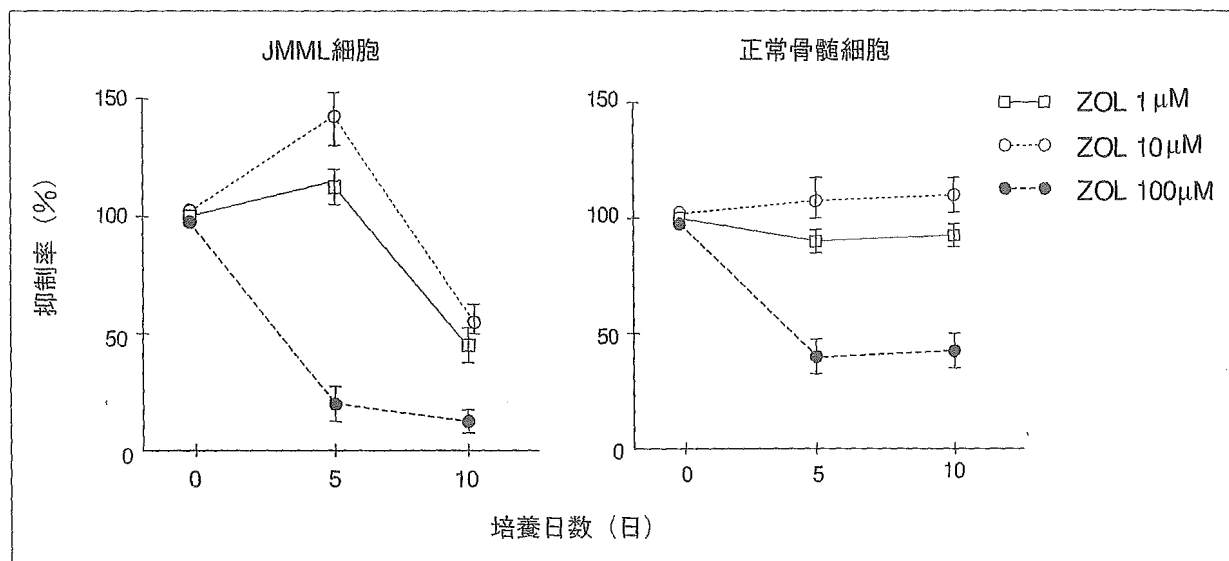


図5 液体培養下でのZOLが増殖に及ぼす効果(文献<sup>18)</sup>より引用改変)

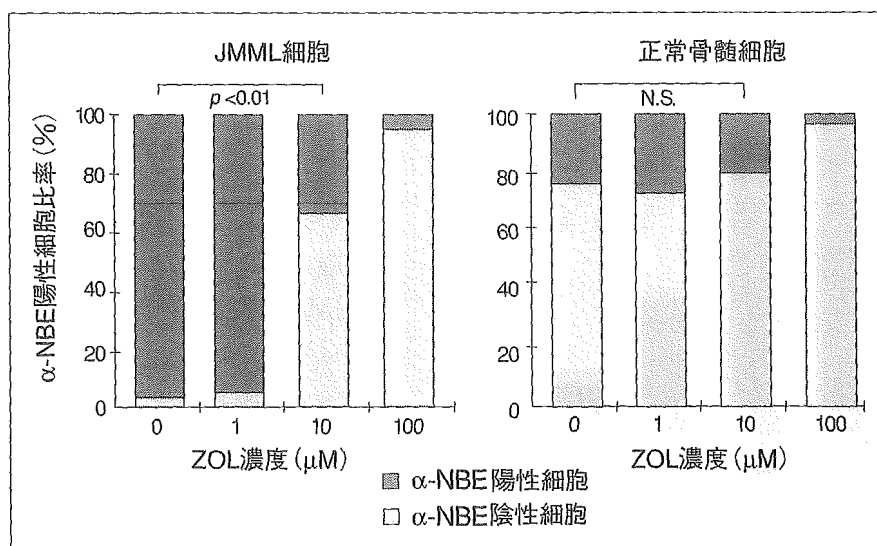


図6 液体培養下でのZOLが分化におよぼす影響(文献<sup>18)</sup>より引用改変)

いてspontaneous colony formationとGM-CSF高感受性を認めたのに対し、健常成人の骨髄細胞は、造血因子非存在下ではコロニー形成を認めなかった。この培養系にZOLを添加すると、ZOLは、JMML細胞と正常骨髄細胞のいずれに対しても、濃度依存的に、コロニー形成とコロニー構成細胞数を抑制したが、ZOLに対する感受性は、明らかにJMML細胞で高かった(図2, 3)。興味深いことに、JMML細胞から形成されるspontaneous colonyは、ZOLを10μM添加した群では、大型の顆粒球・マクロファージ(granulocyte/macrophage; GM)コロニーは減少し、大部分が小型の顆粒球(granulocyte; G)コロニーとなった

(図4)。

## 2. 液体培養におけるZOLの影響

液体培養にて、ZOLのJMML細胞と正常骨髄細胞の増殖分化に及ぼす影響を検討してみると、正常細胞では、10μM以下での増殖抑制効果は軽度であるのに対し、JMML細胞の増殖は著明に抑制された(図5)。また二重エステラーゼ染色(NBE)法を用いて検討すると、NBE陽性である単球マクロファージ細胞がJMML群において濃度依存的に著明に抑制されるのに対し、正常細胞における抑制効果はわずかであった(図6)。フローサイトメトリーによる検討でも、ZOLを添加すると、成熟マクロファージが著明に減少することが確

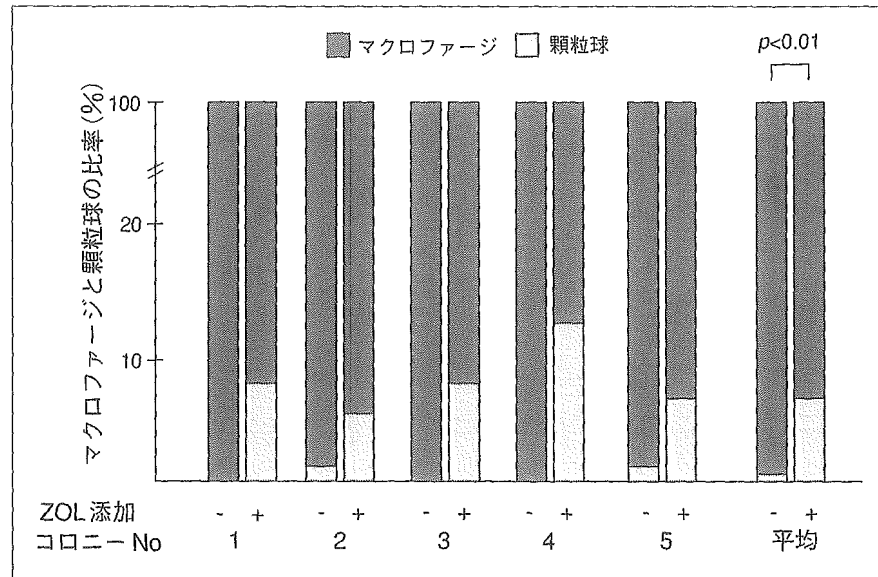


図7 単一コロニーでのクロナリティー解析におけるZOLの効果  
(文献<sup>18)</sup>より引用改変)

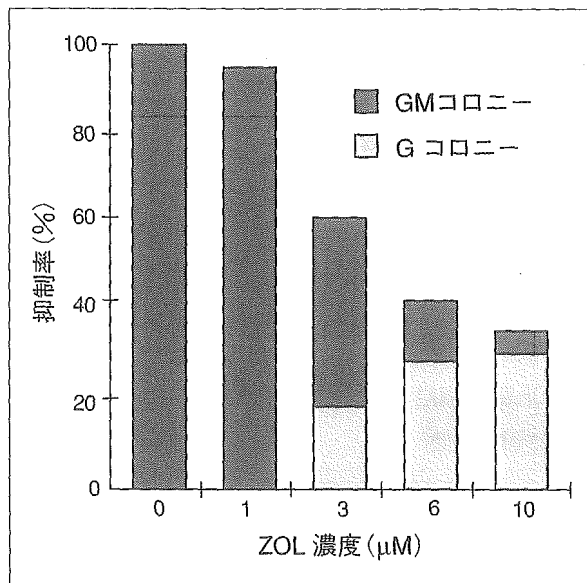


図8 ZOL低用量下(10μM以下)でのZOLの効果  
(文献<sup>18)</sup>より引用改変)

認められた。ただし、未分化なJMML細胞に対しては、10μM以下のZOLでは、大きな影響を及ぼさなかった。

コロニー形成と液体培養における結果は、JMML細胞において恒常的に活性化されたRASは、JMML細胞の増殖とマクロファージ系細胞への分化・成熟を促進しており、10μMのZOLは、正常細胞の分化・増殖に大きな影響を及ぼすことなく、JMML細胞における恒常活性化RASの作用を抑制することを示している。

### 3. JMML細胞コロニーのクロナリティー解析におけるZOLの効果

ZOLによる抑制効果が、確実にJMML細胞に働いていることを確認するために、ZOLのJMML細胞に対する作用をクローンレベルで解析した。JMML細胞をメチルセルロース培養し、培養5日目にspontaneous colonyを形成する100~200個前後の細胞集団をランダムに選択し、それぞれ半分をZOL添加、無添加に分けて、液体培養下にて、培養を継続した。ZOL無添加群ではほとんどが単球マクロファージに分化したのに対して(99±0%)、ZOL添加下群では、増殖が抑制されるとともに、顆粒球の明らかな存在(6±3%)を確認することができた(図7)。このことは、ZOLは、クローンレベルでも、JMML細胞の単球マクロファージ系への増殖分化を阻害することを示している。

### 4. 低用量下でのZOLのJMML細胞に対する効果

骨粗鬆症での検討から、ZOLの血中濃度は約3μMと報告されていることより、10μM以下の濃度におけるZOLのJMML細胞に対する効果について検討を行った。ZOLは、3μM以上で、JMML細胞からのspontaneous colony formationに対する抑制効果が認められ、GMコロニーの比率が低下し、Gコロニーの増加が確認できた。6μMでほぼ効果はプラトーに達しており、比較的低用量で効果を発揮することが確認できた(図8)。

## おわりに

第3世代ビスフォスフォネートであるZOLのJMML細胞に対する効果について検討を行い、その増殖、分化に対する抑制効果を確認することができた。抑制効果が認められた濃度は臨床的にも可能なものであり、今後の臨床応用への可能性を示すものであった。ZOLの*in vivo*における効果や、他剤との併用の有効性などについて、BPを含むJMMLの新たな治療戦略がJMMLの予後改善につながるよう、さらなる検討を進めている。

## 文 献

- 1) Niemyer CM, Arico M, Basso G, et al. Chronic myelomonocytic leukemia in childhood : a report of 110 cases. *Blood* 1997 ; 89 : 3534.
- 2) Emanuel PD. Myelodysplastic and myeloproliferative disorders in childhood : an update. *Br J Haematol* 1999 ; 105 : 852.
- 3) Arico M, Biondi A, Pui CH. Juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood* 1997 ; 90 : 479.
- 4) Pinkel D, Arico M, Biondi A, et al. Differentiating juvenile myelomonocytic leukemia from infectious disease. *Blood* 1998 ; 91 : 365.
- 5) 中畑龍俊, 小島勢二, 土田昌宏, ほか. 第1回MDS委員会活動報告. *日本小児血液学会雑誌* 2001 ; 15 : 54.
- 6) Tartaglia M, Niemyer CM, Song X, et al. Somatic PTPN11 mutations in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes, and acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 2003 ; 34 : 148.
- 7) Flotho C, Valcamonica S, Mach-Pascuala S, et al. Ras mutations and clonality analysis in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML). *Leukemia* 1999 ; 13 : 32.
- 8) Side LE, Emanuel PD, Taylor B, et al. Mutations of the NF1 gene in children with juvenile myelomonocytic leukemia without clinical evidence of neurofibromatosis, type1. *Blood* 1998 ; 92 : 267.
- 9) Stary J, Locatelli F, Niemyer CM. Stem cell transplantation for aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Bone Marrow Transplantation* 2005 ; 35 : S13.
- 10) Locatelli F, Nöllke P, Zecca M, et al. Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) : results of the EWOG-MDS/EBMT trial. *Blood* 2005 ; 105 : 410.
- 11) Manabe A, Okamura J, Yumura-Yagi K, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for 27 children with juvenile myelomonocytic leukemia diagnosed based on criteria of the international JMML Working Group. *Leukemia* 2002 ; 16 : 645.
- 12) 大塚欣敏, 矢部みはる, 岡村 純, ほか[会]. *日本小児血液学会雑誌* 2004 ; 18 : 268.
- 13) Emanuel PD, Richard C, Wiley ST, et al. Inhibition of juvenile myelomonocytic leukemia cell growth in vitro by farnesyltransferase inhibitors. *Blood* 2000 ; 95 : 639.
- 14) 木村晋也, 前川 平. ビスフォスフォネート製剤. *血液・腫瘍科* 2005 ; 50 : 68.
- 15) Jagdev SP, Coleman RE, Shipman CM, et al. The bisphosphonate, zoledronic acid, induces apoptosis of breast cancer cells : evidence for synergy with paclitaxel. *Br J Cancer* 2001 ; 84 : 1126.
- 16) Green JR. Chemical and biological prerequisites for novel bisphosphonate molecules : results of comparative preclinical studies. *Semin Oncol* 2001 ; 84 : 1126.
- 17) Kuroda J, Kimura S, Sagawa H, et al. The third-generation bisphosphonate zoledronate synergistically augments the anti-Ph<sup>+</sup> leukemia activity of imatinib mesylate. *Blood* 2003 ; 102 : 2229.
- 18) Ohtsuka Y, Manabe A, Tsuji K, et al. RAS-blocking bisphosphonate zoledronic acid inhibits the abnormal proliferation and differentiation of juvenile myelomonocytic leukemia cells in vitro. *Blood* 2005 ; 106 : 3134.