

総 説

多発性骨髄腫に伴う骨病変の発症機序とその治療

安倍 正 博

徳島大学大学院医学研究科生体情報医学講座生体情報内科学分野

(平成15年3月6日受付)

(平成15年3月14日受理)

1. 多発性骨髄腫

多発性骨髄腫は単クローン性形質細胞の骨髄内集積を特徴とする腫瘍性疾患である。大多数の症例は血中および尿中の単クローン性免疫グロブリン (M 蛋白) と広範な骨破壊性病変を伴っている。骨病変は進行性であり、骨痛や骨折のため患者の QOL は大幅に低下する。さらに進行すれば高カルシウム血症や脊髄麻痺などを併発し、生命予後を悪化させる。従って、この骨病変の成立機序を解明し、その予防・治療法を確立することが患者の QOL や予後の改善からも重要な課題である。

1) 骨髄腫骨病変の病態

骨髄腫は主に赤色髄を侵すため、骨病変は頭蓋骨、肋骨や胸・腰椎等の躯幹骨に多く、画像上頭蓋骨の打ち抜き像、骨粗鬆症や脊椎の圧迫骨折などが出現する。ヒト骨髄腫細胞株 ARH77 を SCID マウスに静脈内投与すると ARH77 細胞が骨髄に浸潤・増殖し、骨髄腫患者の骨病変と類似した骨融解性病変を形成するという報告¹⁾や、骨髄腫細胞を家兎骨髄細胞と共培養すると酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP) 陽性の多核細胞である破骨細胞の数および骨吸収窩の形成を共に促進することにより、骨髄腫細胞の存在が破骨細胞の形成・活性化を促すことが理解される。骨代謝動態を検討すると、殆どの症例で骨吸収マーカーの尿中デオキシピリジノリン排泄量が高値であり、骨形成マーカーの血清オステオカルシン値が低値であり (図 1)、骨吸収が骨形成に比べ相対的に優位であった。また、画像上骨病変の認められない第 1 臨床病期においても骨吸収が亢進している例がみられ、骨髄腫のきわめて初期から骨吸収の過剰状態がはじまっていると考えられた。一方、骨形成マーカーは多くの例でより初期の分化段階の骨芽細胞で産生が認められる骨

型 ALP は上昇していたが、その終末分化段階のマーカーであるオステオカルシンは減少していた。骨髄腫にみられる骨形成の抑制は骨芽細胞の終末分化が抑制されることにより相対的に骨形成が低下することによりもたらされる可能性が示唆される。

2) 骨髄腫骨病変形成機序

本症における骨破壊は、骨髄腫細胞由来の液性因子および骨髄腫細胞と骨髄微小環境との相互作用による骨吸収の促進に基づくと考えられている。骨髄腫細胞との相互作用により骨髄微小環境に産生されるサイトカインの多くが、破骨細胞活性化因子としての活性を有しており、骨髄腫骨病変の形成は複数の因子が関与していると考え

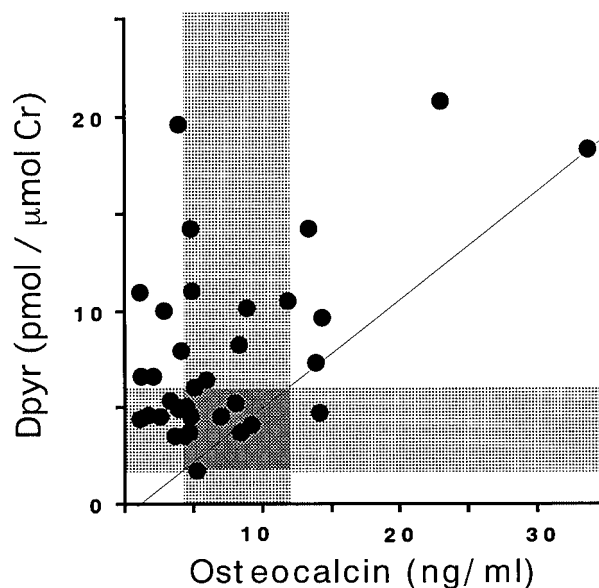


図 1 骨吸収と骨形成の関係
骨髄腫患者の治療前の骨代謝マーカーを測定した。骨形成マーカーとして血中オステオカルシン (OC) 濃度を、また骨吸収マーカーとして尿中デオキシピリジノリン (DPYR) 排泄量を測定した。

られる。一方、破骨細胞の形成と機能は間質細胞や骨芽細胞に誘導される破骨細胞分化因子 (RANKL/ODF) が、破骨細胞前駆細胞上のそのレセプターである RANK に接着を介して作用することにより促進する²⁾。また、多くの細胞から産生される可溶性 decoy receptor である osteoprotegerin (OPG/OCIF) が RANKL の作用を阻害する³⁾。この様に破骨細胞の形成と機能は RANKL と OPG とのバランスで微妙に調節されている。骨髄腫患者の骨髄における RANKL と OPG の発現の検討では、間質細胞の RANKL の免疫活性および mRNA の発現が亢進し、OPG の免疫活性は低下している⁴⁾。また、骨髄腫細胞は培養間質細胞の RANKL mRNA の発現を誘導し、OPG mRNA の発現を抑制した^{4,5)}。従って、骨髄腫骨髄微小環境では骨髄腫細胞により RANKL/OPG 系の調節異常を来していると考えられる。さらに、骨髄腫動物モデルに OPG や RANK Fc を投与すると骨吸収マーカーの上昇と骨破壊病変の形成促進を著明に抑制することより骨破壊病変の形成促進における RANKL 作用の亢進の重要な関与が証明されている^{4,6)}。骨髄腫細胞に由来する RANKL の発現を亢進する因子が、骨病変形成の原因因子と考えられる。この骨病変形成の原因因子の候補として、これまで IL 6, IL 1 β , lymphotoxin, TNF α などの骨吸収性サイトカインや PGE₂, PTH 関連蛋白などの生理活性物質などが提唱された。しかしながら、我々や他のグループの検討でその何れもが僅かな例外を除いて骨髄腫細胞からは産生されていないことが示され、骨病変形成の原因因子は不明のままであった。

我々は、広範な骨破壊性病変を有する患者骨髄血より単離した骨髄腫細胞の大部分より CC ケモカインの Macrophage inflammatory protein (MIP) 1 α および β が構成的により多量に産生されていることを見出した (図 2)。さらにこれらの産生能は、患者骨吸収マーカー値と正の相関を認め、これらの因子が多くの患者の骨病変形成の原因あるいは促進因子であることが示唆された。実際、家兎骨髄細胞を用いた破骨細胞形成系を用いた検討では、骨髄腫細胞による骨細胞の形成・機能の促進は、MIP 1 α , β に対する中和抗体を同時添加により大部分が消失し、MIP 1 α , β は、骨髄腫の主要な骨吸収促進因子であることが明らかになった⁷⁾ (図 3)。MIP 1 α , β はともに間質細胞における RANKL mRNA の発現を誘導し、破骨細胞形成を促進した。また、骨髄腫細胞上には MIP 1 受容体である CCR 1 や CCR 5 が発現しており、骨髄腫細胞から分泌された MIP 1 α , β は、骨

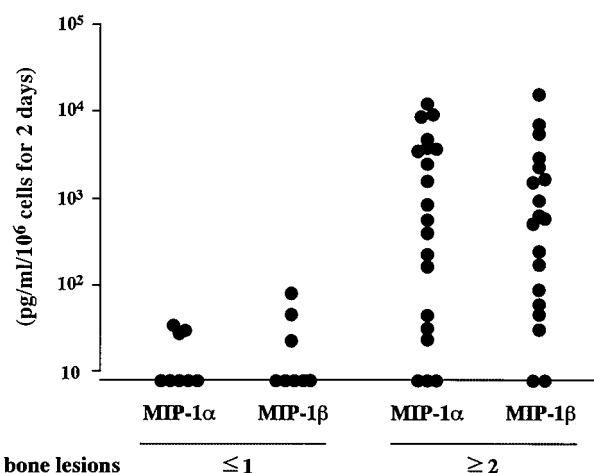


図 2 単離骨髄腫細胞の MIP 1 産生能
骨病変は多系統の骨 X 線写真, 骨 CT, 骨 MRI, 骨シンチグラフィにより, bone scale (日本骨髄腫研究会) に基づき評価した。単離骨髄腫細胞の培養上清中への MIP 1 α , β 産生量を ELISA で測定した。

髄腫細胞に作用し VLA 4 などの接着分子を介する間質細胞との接着を亢進すると同時に VLA 4 を介する VCAM 1 との接着は骨髄腫細胞からの MIP 1 α , β の産生を亢進する。このように MIP 1 α , β は骨髄腫細胞由来の RANKL 発現の重要な促進因子と考えられる⁷⁾ (図 4)。一方、骨髄腫による OPG の産生抑制に関しては我々は骨髄腫細胞上清に強い抑制活性を見出しているが、未だその抑制因子は同定されていない。

3) 破骨細胞による骨髄腫細胞の生存, 増殖の促進

骨髄腫細胞は骨髄内で限局した増殖, 進展を示すことから、骨髄腫細胞と骨髄微小環境内の細胞との接触やそれらの相互作用により産生が亢進するサイトカインにより骨髄腫細胞の生存・増殖が促進されると考えられる。骨髄腫細胞により形成が促進される破骨細胞は、骨髄腫骨髄微小環境の主要な構成要素である。骨髄腫動物モデルで破骨細胞形成に必須の因子である RANKL の抑制薬である RANK-Fc や OPG の投与により破骨細胞による骨吸収の抑制のみならず患者由来の骨髄腫細胞の増殖を抑制することから、骨髄腫細胞がもたらす破骨細胞の形成・機能の亢進は骨髄腫の進展に重要な役割を演じていることが強く示唆されている。実際、骨破壊性病変の近傍では骨髄腫細胞の増殖は活発であることから骨髄腫細胞により誘導された破骨細胞が骨髄腫骨髄微小環境の主要な構成要素として骨髄腫細胞の生存, 増殖に好適な環境を提供していることが考えられる。

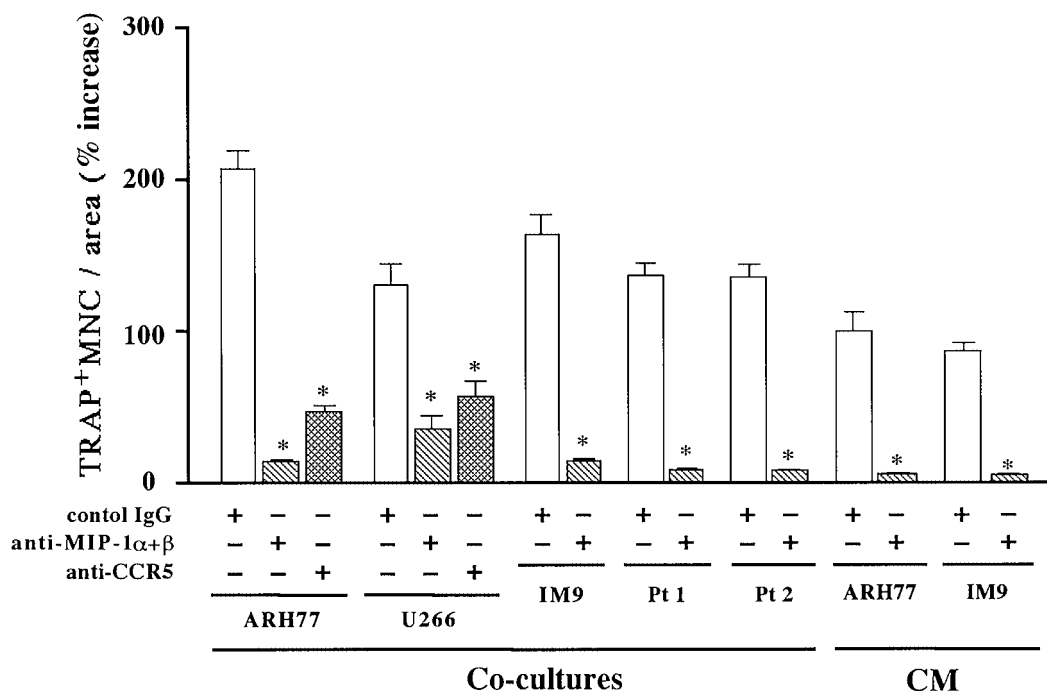


図3 骨髄腫細胞による破骨細胞形成の促進に対する抗 MIP 1α, β 抗体の影響

骨髄腫細胞株 (ARH77, U266, RPM18226) ならびに患者単離骨髄腫細胞を家兔骨髄細胞と共培養した。また、骨髄腫細胞株の培養上清 (20%) を家兔骨髄細胞に添加した。破骨細胞の形成は酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP) 陽性多核細胞数で測定した。骨髄腫細胞共存およびその培養上清 (CM) による骨細胞の形成の促進は、MIP 1α, β に対する中和抗体を同時添加およびにより MIP 1α, β の共通の受容体の CCR5 に対する抗体の添加で大部分が消失した。

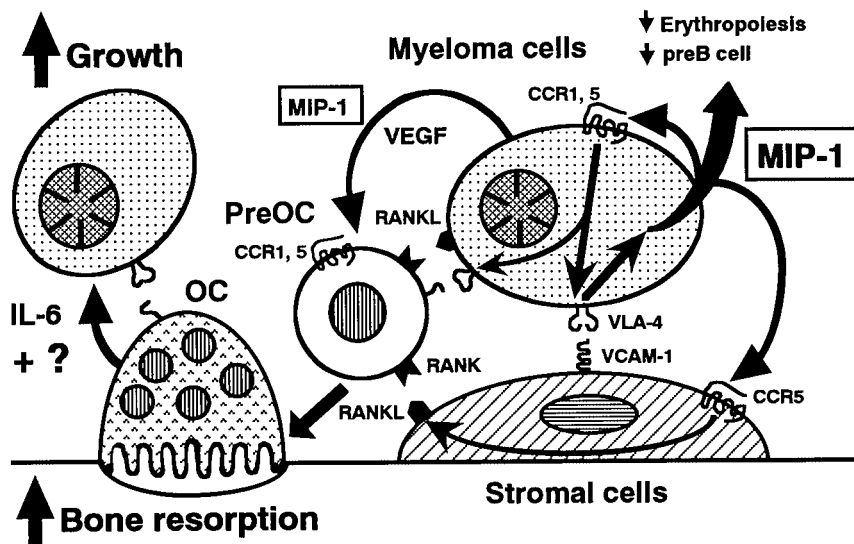


図4 骨破壊機序および細胞間相互作用
骨髄腫細胞由来 MIP 1は骨髄腫細胞にオートクリン的に作用し骨髄腫細胞に強発現している VLA 4 を活性化し間質細胞との接着を促進する。この接着により骨髄腫細胞からの MIP 1の分泌はさらに亢進すると共に、分泌された MIP 1が間質細胞により効率よく作用できるようになる。この MIP 1は間質細胞に RANKL 発現を誘導し、また一部の骨髄腫細胞は破骨細胞の分化に必須である M-CSF 作用を代替する VEGF を分泌すると共に細胞表面上に RANKL を発現している。MIP 1は骨髄腫細胞の破骨細胞との接着も促進する。このようにして骨髄腫細胞由来 MIP 1は骨吸収を著明に亢進すると考えられる。

しかしながら、破骨細胞系の細胞を骨髄腫細胞との細胞間相互作用については、ヒト破骨細胞の単離が非常に困難であったためこれまで詳細な検討が殆どなされていない。最近破骨細胞の分化、活性化のメカニズムが明らかにされ、*in vitro* で破骨細胞が形成されるようになった。

た。即ち、ヒト末梢血単核細胞に可溶性 RANKL と M-CSF を添加することにより機能的に成熟した破骨細胞を形成することができる。そこで、我々はこのようにして形成された破骨細胞を用い、破骨細胞系の細胞の骨髄腫細胞の生存・増殖に対する影響について検討した。そ

の結果、破骨細胞は骨髄腫細胞の共存下では間質細胞に比べ遙かに効率よく骨髄腫細胞の生存、増殖を支持できることが示された(図5)。さらに、この生存、増殖の促進は両者の接触により産生が亢進するIL 6とそれ以外の未知の因子によりもたらされることが示唆された。その因子の候補の一つとして破骨細胞から多量に分泌されるOPNが考えられた。

2. 骨吸収抑制薬の開発

骨髄腫の亢進した骨吸収を抑制するためには、MIP 1作用の抑制あるいはRANKL/RANK系の抑制が理論上有用と考えられ、MIP 1の中和抗体やアンチセンスを用いた基礎的検討やRANKLの阻害因子であるosteoprotegerinによる臨床試験が開始されている。現在、癌の骨転移と同様に破骨細胞を直接抑制するbisphosphonateが骨髄腫においても臨床応用されている。我々は、本法で開発された最も強力な骨吸収抑制活性を持つミノドロネート(YM529)の連日経口投与による臨床試験を行った。以下にbisphosphonateの基礎と骨髄腫骨病変に対する有用性について概説する。

1) bisphosphonateの基礎

bisphosphonate (BP)はPCP結合と二つの側鎖を基本構造とし、骨ミネラルへの高い親和性を保持したまま生体内で酵素による代謝を受けなくしたピロリン酸の化学的誘導体である(図6)。R1側鎖を変えることにより種々の骨吸収抑制活性を示すBPが開発されている。R1側鎖の違いによりBPは窒素を含まない第一世代、窒素を含むが環状構造をとらない第二世代、窒素を含み

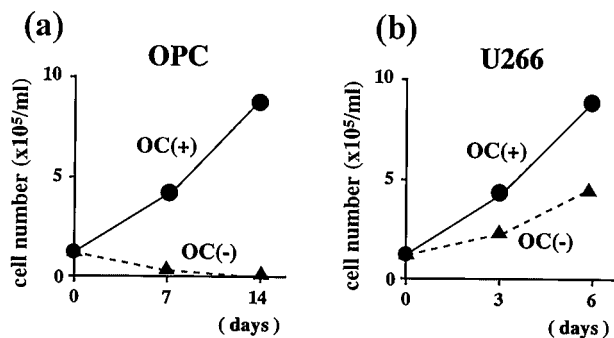


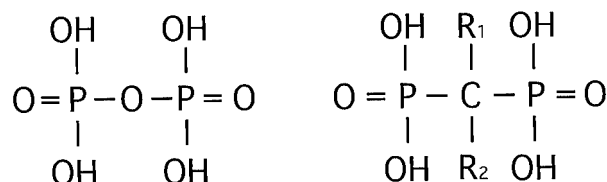
図5 破骨細胞による骨髄腫細胞の増殖促進
末梢血単核細胞より形成した破骨細胞は、IL 6依存性、非IL 6依存性骨髄腫細胞株それぞれOPC (a), U266 (b)の増殖を促進した。

環状構造をとる第三世代に分類できる。骨吸収抑制活性は第三世代が最も強い。BPは投与後数分という極めて短時間の内に骨に沈着する。一方、骨にとりこまなかったBPは尿に速やかに排泄されるためBPは骨に特異的に分布する。骨に沈着したBPは骨吸収過程で破骨細胞の波状縁下の骨吸収窩に溶出され破骨細胞に取り込まれ、破骨細胞の骨吸収機能の抑制や破骨細胞のアポトーシスを誘導する。側鎖にアミノ基を持つBPは、メパロン酸代謝経路のファルネシルピロリン酸やゲラニルゲラニルピロリン酸への変換を阻害する⁸⁾。この結果、Ras, Rho, Racなどの小分子GTP結合蛋白のプレニレーションが阻害され、これらの蛋白の細胞膜へ結合が抑制されこれらの蛋白の本来の機能が発現されなくなりアポトーシスが誘導される⁹⁾。

2) 骨髄腫骨病変に対する bisphosphonate の有用性

化学療法によって腫瘍量が減少したプラトー期においても骨病変は進行性であり、化学療法に加えて骨病変に対する対策が必要である。実際、広汎な骨病変を有する患者に化学療法単独で治療した場合、化学療法によりM蛋白の減少が持続し腫瘍が抑制されていると考えられる時期にも骨吸収マーカーは上昇傾向を示した(図7)。また、繰り返し化学療法を受けている骨髄腫患者の長期観察では骨吸収マーカーの尿中遊離デオキシピリジノリン排泄量はM蛋白が25%以上減少した化学療法反応群において減少傾向を示したが、多くの症例で化学療法によるM蛋白の推移とは相関を認めなかったと報告されている¹⁰⁾。骨髄腫は化学療法により骨髄腫細胞の消失が困難であるため、残存する骨髄腫細胞により破骨細胞は活性化され、骨吸収は持続的かつ進行性であると考えられる。

本邦においてパミドロネートの100倍以上の骨吸収抑制活性を持つ強力なBPであるミノドロネート(YM529)



ピロリン酸

ビスフォスフォネート

図6 bisphosphonateの基本構造

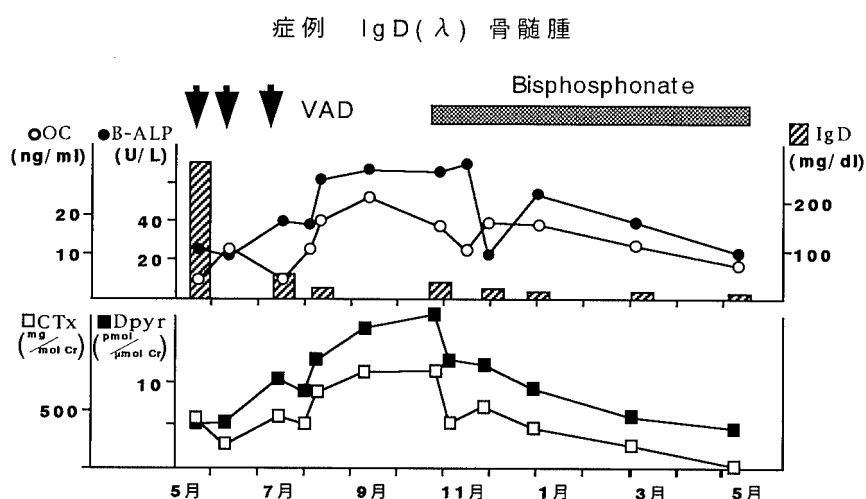


図7 治療経過における骨代謝マーカーの変化

の連日経口投与の骨髄腫骨病変に及ぼす影響を明らかにするための臨床試験が行われた。第 I / II 相試験では忍容性、安全性に問題はなかった。6 mg の投与により一週後すでに骨吸収マーカーは前値に比べ著明に低下した。一方、骨形成マーカーはわずかな低下にとどまっていた。また、6 カ月後の全身骨塩量は上昇しており、特に 9 mg 投与群で 2 % と最も上昇した。さらに、一部の症例では骨病変部の石灰化を認め、また化学療法なく M 蛋白の減少を認めた (図 7)。ミノドロネートの連日経口投与が骨髄腫骨病変の有効な治療になると考えられる。

強力な骨吸収抑制活性を有する BP は、骨破壊の防止だけでなく、それに伴う骨からの IGF 1 などの増殖因子の放出や破骨細胞に依存した骨髄腫細胞の増殖も抑制するなど破骨細胞がもたらす骨髄腫細胞の生育・増殖に好適な骨髄微小環境を変化させ骨髄腫の進展を抑制する可能性がある。また、パミドロネート、インカドロネートやアレンドロネートなどの窒素含有 BP が GTP 結合蛋白のプレニレーションを抑制することにより培養骨髄腫細胞にアポトーシスを誘導する^{11,12)}ことが示され、またパミドロネートが同系マウスに移植した骨髄腫の腫瘍形成を濃度依存的に抑制するという報告¹³⁾や骨髄腫の主たる増殖因子である IL 6 のストローマ細胞からの産生を抑制するという報告もある¹⁴⁾。最近、窒素含有 BP が $\gamma\delta$ T 細胞に抗原として認識されことにより、 $\gamma\delta$ T 細胞が活性化され抗腫瘍効果を発揮することが報告されている^{15,16)}。実際、一部の症例においては BP の単独投与のみで腫瘍量の減少を認めることもある¹⁷⁾。

3. まとめ・考察

多発性骨髄腫では RANKL/OPG 系の調節異常を来とし、骨破壊をもたらす。しかし、骨髄腫における RANKL/OPG 系の調節異常をもたらす機序については不明な部分が多く残されており今後さらなる検討が必要である。さらに、この様にして形成・活性化された破骨細胞がまた骨髄腫細胞との接触を介し骨髄腫細胞の増殖を促進する。即ち、骨髄腫細胞と破骨細胞は相互に増殖、活性化を促進することにより、骨破壊性病変を進行させつつ骨髄内で悪循環を形成していると考えられる。従って、BP や RANKL の抑制薬の投与は骨髄腫骨病変および腫瘍の進展を抑制する有効な治療となる可能性が示唆される。しかしながら、BP は、骨髄腫患者の QOL の改善をもたらすものの骨融解病変の進展防止にはまだまだ不十分である。BP の投与開始時期や至適投与量の設定や骨融解病変形成に対する予防効果の有無、また長期投与の成績、さらには抗腫瘍効果や生命予後への影響など BP 療法に関して解明すべき点が多く残されている。今後よくデザインされた大規模臨床試験が進むことにより、BP の有用性が更に明らかになるものと期待される。骨髄腫骨病変のさらなる改善のためには腫瘍に対する治療成績の向上が必須であるが、今後より強力な BP の開発とともに osteoprotegerin など異なった機序の骨吸収抑制薬の開発ならびにこれらの併用などが必要と思われる。

文 献

- 1) Alsina, M., Boyce, B., Devlin, R.D., Anderson, J.L.,

- et al.* : Development of an *in vivo* model of human multiple myeloma bone disease. *Blood* ,87 : 1495 , 1996
- 2) Khosla, S. : Minireview : the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* ,142 : 5050 2001
 - 3) Kostenuik, P.J., Shalhoub, V. : Osteoprotegerin : a physiological and pharmacological inhibitor of bone resorption. *Curr. Pharm. Des.*, 7 : 613 2001
 - 4) Pearse, R.N., Sordillo, E.M., Yaccoby, S., Wong, B.R., *et al.* : Multiple myeloma disrupts the TRANCE / osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* ,98 : 11581 2001
 - 5) Giuliani, N., Bataille, R., Mancini, C., Lazzaretti, M., *et al.* : Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. *Blood* ,98 : 3527 2001
 - 6) Croucher, P.I., Shipman, C.M., Lippitt, J., Perry, M., *et al.* : Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Blood* , 98 : 3534 2001
 - 7) Abe, M., Hiura, K., Wilde, J., Moriyama, K., *et al.* : Critical roles of macrophage inflammatory protein (MIP) 1α and β in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *Blood* ,100 : 2195 2002
 - 8) Russell, R.G., Rogers, M.J., Frith, J.C., Luckman, S.P., *et al.* : The pharmacology of bisphosphonates and new insights into their mechanisms of action. *J. Bone Miner. Res.*, 14(Suppl 2) : 53 ,1999
 - 9) Coxon, F.P., Helfrich, M.H., Van't Hof, R., Sebti, S., *et al.* : Protein geranylgeranylation is required for osteoclast formation, function, and survival : inhibition by bisphosphonates and GGTI 298. *J. Bone Miner. Res.*, 15 : 1467 2000
 - 10) Pecherstorfer, M., Seibel, M.J., Woitge, H.W., Horn, E., *et al.* : Bone resorption in multiple myeloma and in monoclonal gammopathy of undetermined significance : quantification by urinary pyridinium cross-links of collagen. *Blood* ,90 : 3743 ,1997
 - 11) Shipman, C.M., Croucher, P.I., Russell, R.G., Helfrich, M.H., *et al.* The bisphosphonate incadronate (YM175) causes apoptosis of human myeloma cells *in vitro* by inhibiting the mevalonate pathway. *Cancer Res.*, 58 : 5294 ,1998
 - 12) Fisher, J.E., Rogers, M.J., Halasy, J.M., Luckman, S.P. *et al.* : Alendronate mechanism of action : geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* ,96 : 133 ,1999
 - 13) Muller, M.. The bisphosphonate pamidronate (Aredia) inhibits the growth of a murine myeloma cell line in syngeneic mice. *Blood* ,88 : 586a ,1996
 - 14) Derenne, S., Amiot, M., Barille, S., Collette, M., *et al.* : Zoledronate is a potent inhibitor of myeloma cell growth and secretion of IL 6 and MMP 1 by the tumoral environment. *J. Bone Miner. Res.*, 14 : 2048 , 1999
 - 15) Kunzmann, V., Bauer, E., Feurle, J., Weissinger, F., *et al.* : Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood* ,96 : 384 2000
 - 16) Das, H., Wang, L., Kamath, A., Bukowski, J.F. : Vgamma2Vdelta2 T-cell receptor-mediated recognition of aminobisphosphonates. *Blood* ,98 : 1616 2001
 - 17) Dhodapkar, M.V., Singh, J., Mehta, J., Fassas, A., *et al.* : Anti-myeloma activity of pamidronate *in vivo*. *Br. J. Haematol.*, 103 : 530 ,1998

Mechanism of generation of bone disease in multiple myeloma and its treatment

Masahiro Abe

Department of Medicine and Bioregulatory Sciences, The University of Tokushima, Tokushima, Japan,

SUMMARY

Multiple myeloma (MM) is characterized by accumulation of monoclonal plasma cells in the bone marrow and formation of devastating lytic bone lesions. In these lesions MM cells reside in the proximity of stromal cells and osteoclasts (OCs). We have found that C-C chemokines, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α and MIP-1 β , secreted from most of MM cells potently enhance OC formation and activation. These effects are mostly abrogated by neutralizing antibodies against MIP-1 α and MIP-1 β in combination, suggesting critical roles for these chemokines in the development of lytic bone lesions. These chemokines induce expression of RANK ligand, a key molecule of osteoclastogenesis, by marrow stromal cells. Furthermore, OC formation and activation induced by MM cells as well as MIP-1 α and MIP-1 β are almost completely blocked by a surplus of osteoprotegerin, a soluble inhibitor for RANK ligand. These results demonstrate that the osteolytic effects of MM cells are mediated by MIP-1 in a RANK ligand-dependent manner. Interestingly, OCs generated from peripheral blood mononuclear cells enhance survival and growth of MM cells *in vitro*. The OC effects are only partially inhibited by anti-IL-6 but strongly by contact inhibition between MM cells and OCs, suggesting involvement of IL-6-independent contact-mediated mechanism(s). Taken together, a cellular interplay between MM cells and OCs stimulates their growth and activity, thereby forming a vicious cycle that leads to extensive bone destruction and MM expansion. Bisphosphonates are a potent anti-bone resorptive agent and show effective palliation of bone pain and improvement of quality of life in patients with an advanced disease. Clinical trials with newly developed anti-resorptive agents are ongoing. However, their role in prophylaxis, long-term efficacy and optimal therapeutic schedules remain to be established from well-designed clinical trials.

Key words : multiple myeloma, osteoclast, MIP-1 α , MIP-1 β , RANK ligand, bisphosphonate