

200924041A

厚生労働科学研究費補助金
第3次がん総合戦略研究事業

**成人T細胞白血病がん幹細胞の同定とそれを
標的とした革新的予防・診断・治療法の確立**

平成21年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 渡邊 俊樹

平成22年(2010年)5月

厚生労働科学研究費補助金
第3次がん総合戦略研究事業

成人T細胞白血病のがん幹細胞の同定とそれを標的と

した革新的予防・診断・治療法の確立

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 渡邊 俊樹

平成22(2010)年 5月

目 次

I. 総括研究報告	
成人 T 細胞白血病のがん幹細胞の同定とそれを標的とした 革新的予防・診断・治療法の確立	1
渡邊俊樹	
II. 分担研究報告	
1. ヒト ATL-CSC 研究グループによる ATL 患者中のがん幹細胞の同定と 特性解析およびその分子メカニズムの解明に関する研究	25
渡邊俊樹	
2. ヒトの ATL 患者検体を用いたがん幹細胞の同定に関する研究	34
中内啓光	
3. HTLV-1 Tax トランスジェニックマウスを用いた ATL 様 腫瘍幹細胞の同定と解析	37
浜口 功	
4. ATL マウスモデルおよびヒト ATL 検体を用いた 白血病細胞浸潤メカニズムの解析	49
長谷川秀樹	
5. ATL におけるゲノム異常の解析	54
小川誠司	
6. ATL の臨床・分子病態と新規治療法開発の研究	57
塚崎邦弘	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	62
IV. 研究成果の刊行物・別刷	67

成人 T 細胞白血病のがん幹細胞の同定とそれを標的とした
革新的予防・診断・治療法の確立
(H21-3 次がん-一般-002)

研究代表者 渡邊 俊樹 東京大学大学院 新領域創成科学研究科 教授

研究要旨

本研究課題は、ATL のがん幹細胞様細胞(CSC)を同定して、その分子細胞生物学的な特性を明らかにし、新規治療法や早期診断・発症予防法の開発を目指すものである。本年度は研究初年度として、以下に要約する検討を行った。1) ATL-CSC 同定の為の SCID-mouse による移植—継代系の確立を目指し、Tax-Tg モデル ATL 様細胞を用いて手技の確認をした。NOG/SCID マウスへの ATL 検体の移植実験から、EBV 陽性 B 細胞が高頻度に増殖する事、B 細胞除去検体を移植する必要性を明らかにした。NOJ/SCID および Rag2-/Jak3-DK/SCID マウスの新生児を用いた移植系を立ち上げ、有効であるとの予備の結果を得て追試を行っている。2) FACS による細胞表面マーカー解析および side-population(SP)細胞同定の基礎検討として、JSPFAD の ATL 患者検体 4 例で SP 解析を行った結果、1 例でのみ明確な SP が検出された事から ATL 検体の SP には症例間で差があることが予想された。3) Tax-Tg マウス脾臓の ATL 様腫瘍細胞は NOD/SCID マウスで造腫瘍性を示した。また、連続3回の継代移植が成功したこと、および約 0.03%の割合で存在する CD38-/CD71-/CD117+の細胞は、100 個で造腫瘍性が見られ、CSC が含まれる事が示唆された。4) マウス ATL モデルとヒト ATL 患者組織を用いて検討し、ATL 細胞の浸潤には SDF-1a/CXCR4 経路が関与すること、その阻害剤 AMD3100 が ATL 細胞浸潤を抑制する新規治療薬の候補である事が示唆された。5) ATL 細胞およびその CSC のゲノム解析基礎検討として、ATL 検体で同定した標的遺伝子候補の解析を行ったほか、次年度以降に実施予定である高速シーケンサーを用いた網羅的かつ効率的な遺伝子変異解析に向け、実験技術の確立と検討を行った。5) ATL のがん幹細胞と臨床病態との関連を検討するために、JSPFAD への患者および HTLV-1 キャリア検体のバンキングを継続しつつ、ATL の臨床病態および予後因子の検討を行った。ATL のがん幹細胞を想定した薬剤として、MDM2 阻害剤 Nutlin-3a とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 LBH586 について検討した。

研究分担者：

中内 啓光 東京大学医科学研究所教授
濱口 功 国立感染症研究所 部長
長谷川秀樹 国立感染症研究所 室長
小川 誠司 東京大学医学部特任准教授
塚崎 邦弘 長崎大学大学院 准教授

A. 研究目的

ATL は HTLV-1 感染によって発症する最も治療困難な白血病の1つであり、日本では 120 万人のキャリアから毎年 1000 人が発病・死亡する予後の極めて不良の

疾患である。その、発症、病態および薬剤耐性のメカニズム解明が喫緊の課題である。

本研究課題は、ATL のがん幹細胞様細胞(CSC)を同定して、その分子細胞生物学的な特性を明らかにし、新規治療法や早期診断・発症予防法の開発を目指すものである。本年度は研究開始初年度として、1) ATL-CSC 同定の為の SCID-mouse による移植—継代系の確立、2) FACS による細胞表面マーカー解析および side-population (SP)同定の基礎検討、3) Tax-Tg マウスモデルの ATL 様腫瘍細胞の CSC 同定、4) ATL 細胞の浸潤メカニズムの解析、5) ATL 細胞およびその CSC のゲノム解析基礎検討、6) JSPFAD への臨床検体の登録、indolent ATL の病態解析と薬剤感受性の検討などを行った。

B. 研究方法

1. ATL 患者由来の PBMC の移植法の確立の試み

我々は、この目的のために大きく2点について検討した。マウスの種類とマウスの週齢である。

マウスの種類は、Adult のマウスで ATL 末梢血検体の生着報告移植がある NOG マウスを中心に検討した。NOG マウスは NOD SCID マウスと IL-2 γ receptor null マウスを掛け合わせによって得られるが、実験中央研究所からの購入可能なのは6週齢以上のみであり、新生児マウスは使用できない。そこで、他の系として、IL-2 γ receptor 直下のシグナル伝達分子 Jak3 をノックアウトしたマウスと NOD SCID マウスの掛け合わせで得られた NOJ マウスを、熊本大学岡田教授より供与頂いて使

用した。NOJ マウスも NOG マウス同様に SCID-hu が作成可能であることが報告されており、(Int J Hematol 2008; 88:476)腫瘍の移植実験に使用可能である事が期待された。さらに、岡田教授より同様の性質を持つと考えられる Rag2-/Jak3-の Double Knockout mouse (DK)も供与頂いた。これらのマウスを東京大学医科学研究所動物センターにて繁殖を行いその新生児を移植対象とした。従って移植するマウスの対象は以下になる。

1, NOG/SCID マウスの6-10週齢

2, NOJ/SCID の新生児マウス

3, Rag2-/Jak3-DK の新生児マウス

免疫不全マウスに生着した臓器の一部は病理診断を依頼して腫瘍か否か同定を行った。

2. ATL 患者由来 PBMC の表面マーカー解析と SP 解析

2-1. 細胞表面マーカー解析の基礎検討
ATL 患者より採取された末梢血単核球を用いて種々の細胞表面マーカーに対する抗体を用いた FACS 解析により、末梢血中の ATL 細胞の細胞膜抗原の基礎的解析を進めた。以下の様な抗体のパネルを用いた。CD3, CD4, CD7, CD8, CD14, CD25, CD45RA, CD62L, CCR4 等。これまで多数の論文で報告されて来た情報の確認を行うとともに、基礎的な技術と解析法を確認した。

2-2. SP 分画の解析

1) 細胞の分離および染色

採血後数時間以内に、末梢血から Ficoll-Paque で単核細胞分画を分離した。これらの細胞を HBSS (Gibco)/2%FBS (Invitrogen)/10 mM HEPES (Gibco) (pH 7.4) に懸濁し、verapamil (Sigma) の存

在下と非存在下で、いくつかの濃度の Hoechst33342 (Sigma) でインキュベートした (37、60 分間)。インキュベート終了後、細胞を直ちに on ice に移し、これ以降は 4 度すべての操作を行なった。Ice-cold PBS(-) (Sigma) で細胞を洗浄した後、propidium iodide (PI) を添加した PBS(-) に細胞を懸濁し、フローサイトメトリーで解析した。

2) フローサイトメトリーによる side population (SP) 解析

side population (SP) 解析は、UV レーザー (波長 350 nm) を装備した MoFlo (Beckman-Coulter 社) で行った。

3. Tax-Tg ATL 様腫瘍細胞に含まれる CSC の解析

1) 動物

移植実験には 6 から 12 週齢の NOD/SCID マウス (NOD.CB17-Prkdcscid/J, Jackson Laboratory) を用いた。

2) 移植実験

最初の ATL 様の白血病/リンパ腫は凍結保存された Tax-Tg マウスの脾腫細胞 (splenic lymphomatous cells: SLCs) 10^5 個を NOD/SCID マウスに腹腔内投与により確認された。NOD/SCID マウスへの移植 40 日後、初代の SLCs 由来の ATL 様リンパ腫細胞が脾臓で増殖し、脾腫が再生する。SLCs は、この NOD/SCID マウスへの連続移植システムにより維持された。我々は 4 継代目の凍結保存 SLCs を用いて、3 回連続移植を行った。 10^5 個の SLCs を腹腔内投与により NOD/SCID マウスへ移植し、

(1 回目 $n=12$ 、2 回目 $n=5$ 、3 回目 $n=7$) 脾腫の再生を確認した。同時に、分取された新鮮な SLCs を限界希釈法を用いて 10^6 個 ($n=5$)、 10^5 個 ($n=4$)、 10^4 個 ($n=3$)、

10^3 個 ($n=5$)、 10^2 個 ($n=7$) に段階希釈して移植し、CSC 候補細胞のリンパ腫形成能力の評価を行った。次に我々は 100 個の SLCs ($n=11$)、CSCs (CD38-/CD71-/CD117+; $n=9$)、non-CSCs (CD38+/CD71+/CD117-; $n=11$)、をそれぞれ移植し、リンパ腫形成能力を比較した。

3) フローサイトメトリーと SP 分析

SLCs 中の CSCs 候補細胞の SP 細胞分析を行った。SLCs を 2% ウシ血清アルブミン (fetal bovine serum: FBS) と 10 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid buffer を添加した Hanks balanced salt solution medium (Invitrogen) に懸濁し、Hoechst 33342 dye (2.5 μ g/mL, Invitrogen, H-3570) で 37°C で 60 分染色した。ヘキスト染色を行った細胞の一部には確認のため verapamil (Sigma-Aldrich) を加えた。Hoechst 33342 で染色した後、あるいは染色していない細胞も含めて以下の抗体により 4°C で 30 分間染色を行った。phycoerythrin-(PE)-conjugated anti-mouse/rat Foxp3 (clone FJK-16s), PE anti-mouse CD3e (145-2C11), PE anti-mouse CD8 (53-6.7), PE anti-mouse CD127 (clone A7R34), PE anti-mouse CD38 (clone 90), fluorescein isothiocyanate (FITC) anti-mouse Sca-1 (clone D7), FITC anti-mouse CD2 (RM2-5), FITC anti-mouse CD4 (RM4-5), FITC anti-mouse CD123 (clone 5B11), FITC anti-mouse CD24 (clone 30-F1), FITC anti-mouse CD71 (clone R17217), allophycocyanin (APC) anti-mouse CD25 (clone PC61.5), APC anti-mouse CD133 (clone 13A4), APC anti-mouse CD117 (clone ACK2), APC anti-mouse CD25 (PC61.5), purified anti-mouse CD44 (IM7)。染色後、

2mg/mL の propidium iodide (BD Biosciences)を加えてサンプルを準備した。抗体は全て eBioscience のものを使用し、フローサイトメトリー解析と細胞のソーティング、また 350-nm UV レーザーによる SP 解析には JSAN (Bay Bioscience) を使用した。また、分取した細胞からサイトスピン標本を作製し、Wright/Giemsa 染色を行った。

4) PAS-ヘマトキシリン(periodic acid - Schiff-hematoxylin)染色

NOD/SCID マウスの脾臓、骨髄(BM)、肝臓、肺、リンパ節、表皮組織は Bouin 溶液 (Sigma-Aldrich) または 4%-パラホルムアルデヒド -phosphate-buffered saline (PBS: pH 7.5)溶液により 4°C で 24 時間固定した。エタノール系列とキシレンによる脱水後、パラフィンに置換、包埋した。4mm の半薄切片を作製し、組織切片は methyl-amino-silane (MAS) コートしたスライドガラス上に乗せ、Periodic acid-Schiff (PAS)陽性の ATL 細胞を判別した。脾臓の白血病/リンパ腫は PAS-ヘマトキシレン染色にて確認した。

5) 免疫組織化学

Anti-mouse CD3 抗体 (ab5690; Abcam)、anti-mouse CD44 抗体 (IM7;BioLegend)、anti-mouse/human CD117 抗体(C-19; Santa Cruz Biotechnology)、anti-mouse CD4 抗体 (RM4-5; eBioscience) を 1 次抗体とし、ビオチン標識した goat anti-rat IgG-B 抗体 (SC-2041, Santa Cruz Biotechnology)、またはビオチン標識した goat anti-rabbit IgG-B 抗体 (SC-2040, Santa Cruz, Biotechnology) を二次抗体として使用した。染色は 3%-BSA 入りの PBS でブロッキングを行った切片 (4-mm 厚) に anti-CD3, -CD4,

-CD44, -CD117 抗体(each diluted 1:200) を 4°C で一晩反応した。シグナル検出には VectastainABC Elite Kit (Vector Laboratories)を使用し、核は Gill III-ヘマトキシリンで染色した。

6) 遺伝子発現の定量

Poly (A)+ RNA は 5×10^3 個の CSCs (CD38-/CD71-/CD117+)または non-CSCs (CD38+/CD71+/CD117-) から Micro-Fast Track 2.0 Kit (Invitrogen)を用いて抽出し、cDNA は SMART PCR cDNA synthesis kits (Clontech)を使用して調整した。Real-time PCR には SYBR PreMix ExTaq (Takara Shuzo) と Light Cycler (Roche Diagnostics)を使用した。使用したプライマーは以下のとおりである。

Notch1 (5'-CGTGGTCTTCAAGCGTGATG-3' と 5'-AGCTCTTCCTCGTGGCCATA-3')、CD44(5'-AGCTGACGAGACCCGGAAT-3' と 5'-CGTAGGCACTACACCCCAATC-3')、Rex1(5'-TGTGCTGCCTCCAAGTGTG-3' と 5'-ATCCGCAAACACTGCTTTT-3')、N-cadherin (5'-CACAGCCACAGCCGTCATC-3' と 5'-GCAGTAACTCTGGAGGAT TGTC-3')。

Tax, CD117, Bmi1, SCL/tal-1 と β -actin は参考文献参照のこと。内部標準には β -actin を使用した。94°C : 1 分、60°C : 25 秒(2-ステップ)で 40 サイクル行った。発現レベルはマウス b-actin との比により計算した。

7) ゲノム DNA の回収と PCR による Tax-遺伝子挿入部位のマッピング

ゲノム DNA は Tax-Tg 由来の脾腫細胞を移植した、もしくは移植していない NOD/SCID マウスの 5×10^6 個の脾臓あるいは骨髄の単核細胞から DNeasy Blood &

Tissue Kit system (QIAGEN) を使用して抽出した後、RNaseA(100 mg/mL)により処理した。また、PCR プライマーは、NOD/SCID マウスの 4 番染色体上に挿入されている Tax 遺伝子を検出できるように作製した。NOD/SCID マウス用 (5'-TGTTCATACAGGAAGCCCA-3' と 5'-GCGGTACAGTGTGTGCTTTGA G-3') と Tax-Tg マウス用 (5'-GACACAGCATAGGCTACCTGGC-3' と 5'-GCGGTACAGTGTGTGCTTTGAG-3')。PCR 反応には ExTaq (Takara) を使用し、増幅産物は 2% アガロースゲル電気泳動により Tax 遺伝子の有無を確認した。

8) データ解析

遺伝子発現分析の有意差は、Student's t 検定を用いて計算し、統計分析には GraphPad Prism (Version 5, GraphPad Software) と Excel 2008 (Microsoft Japan) を使用した。

4. ATL の白血病細胞浸潤メカニズムの解析

1) 検体細胞の調整

Tax-Tg マウス由来の腫瘍細胞 1×10^6 個を RPMI1640 medium に懸濁して、SCID マウスの腹腔内に接種し、約 28 日後マウスが白血病を発症した時点で腹水及び脾臓を回収した。再びこれを SCID マウスに腹腔内接種で継代し、これを繰り返す事で腫瘍細胞のみの集団にした。更に Percoll を用いて腫瘍細胞を分離し、この集団を mouse ATL leukemic cell (mATL 細胞) として実験に用いた。mATL 細胞の培養は RPMI 1640 medium (10% Fetal Bovine Serum, b-mercaptoethanol) で行なった。

2) 免疫組織化学

組織は中性緩衝ホルマリンで固定の後、

パラフィン包埋後、切片を作成し HE 染色を行なった。免疫組織化学染色では、組織切片はキシレンにて脱パラフィン処理後、エタノール脱水し、0.01M クエン酸バッファー (pH6.0) に浸して圧力釜で 2 分間加熱し、抗原賦活化処理を行なった。マウス組織は 0.3% 過酸化水素水で室温 15 分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼを不活化し、ブロッキング液 A (Histofine; Nichirei Bioscience) を用いて室温で 60 分間ブロッキング反応を行なった。一次抗体反応は 4°C overnight で行い、ブロッキング液 B (Nichirei Bioscience) で 10 分間ブロッキング後、Universal Immuno-peroxidase Polymer (Nichirei Bioscience) を 10 分間反応させた。シグナルは di amino-3,3'-diaminobenzidine を用いて検出した。ヒト組織は peroxidase block solution (DAKO) で 5 分間ブロッキング後、10% ヤギ血清 (Nichirei Bioscience) を室温 60 分反応させた。一次抗体は 4°C overnight で反応させ、その後 labeled polymer-HRP anti-mouse conjugation (Envision system; DAKO) を 90 分反応させた。発色は di amino-3,3'-diaminobenzidine で行なった。

一次抗体として用いた抗マウス SDF-1a 抗体、抗ヒト SDF-1a 抗体はいずれも Peprotech EC より購入した。

3) AMD3100 による in vivo での白血病細胞浸潤抑制実験

それぞれ 5×10^2 , 5×10^3 , 5×10^4 個/頭の AMD 前処理を加えた mATL 細胞 (AMD+) あるいは AMD 未処理の mATL 細胞 (non-treated: NT) を 6 週齢の SCID マウス 5 頭に腹腔内投与した。AMD+ 群では mATL 細胞は 20mg/ml の AMD3100 を含

む RPMI (0.3%FCS) で 37 度 30 分間前処理した。AMD+ mATL 細胞を移植した群では、一頭あたり 300mg の AMD3100 を週に 5 回、3 週間にわたり腹腔内投与した。NT mATL 細胞を移植した群では、PBS を AMD+群と同じ頻度で腹腔内投与した。mATL 細胞移植後 23 日目にマウスを安楽死させ、肝臓、肺から DNA を抽出し、Tax 遺伝子と b-actin 遺伝子のコピー数を QuantiTect Probe PCR キットを用い定量 PCR で測定した。SCID マウス組織中に存在する mATL 細胞の数を反映する値として、Tax 遺伝子のコピー数と b-actin 遺伝子のコピー数の比を算出した。Tax 遺伝子の定量には 5'-AGGCAGATGACAATGACCATGA-3' と 5'-TTTTCACTCCCAGGCTCTAAGC-3' と Tax probe: 5'-FAM-CCC CAAATATCCCCCGGG-TAMRA-3' を用い、b-actin 遺伝子の定量には 5'-CACCGATCCACACAGAGTACTTGG-3' と 5'-CAGTGCTGTCTGGTGGTACCA-3 と b-actin probe: 5'-FAM-CAGTAATCTCCTTCTGCATCCTGTCAGCAA-TAMRA-3' を用いた。すべての動物実験は国立感染症研究所実験動物委員会の承認の元に行われた。

5. ATL におけるゲノム異常の解析

本分担研究では、ATL 患者中の腫瘍細胞やがん幹細胞の特性をゲノムの視点から明らかにするために、最先端のマイクロアレイ技術・高速リシーケンス技術を用いたゲノム異常の解析を行う。初年度である平成 21 年度の研究では、以下の 2 点について検討した。

(1) これまでに実施した 170 例の ATL 患者検体のマイクロアレイによるゲノムコピー数解析から、14 番染色体長腕に位置する遺伝子(仮称 ATL-1)において高頻度

にゲノム異常の集積が確認されている。この遺伝子について ATL 細胞株における遺伝子発現を調べ、FISH によりゲノム構造を解析した。

(2) ATL 患者中の腫瘍細胞や CSC 分画細胞について、網羅的かつ効率的に遺伝子変異探索する方法として、Agilent 社の Sure Select と、Genome Analyzer (illumina 社) を使用する。本年度は検討実験として骨髄異形成症候群の腫瘍細胞ゲノムと正常対照のゲノムを用い、エクソン領域の濃縮と高速シーケンス技術の確立を試みた。

6. ATL の臨床・分子病態と新規治療法開発の研究

1) JSPFAD バンキング：ATL 患者および HTLV-1 キャリアの全国コホート研究/バイオマテリアルバンク (JSPFAD) に長崎県内の関連病院とともに参加し、バンキングを行った。

2) indolent ATL の長期予後と臨床・分子病態：急性転化するまでは watchful waiting が標準治療とされてきた慢性型とくすぶり型の indolent ATL の長期予後はこれまで不明であったので、1974 年から 2003 年に当科で診断された indolent ATL 90 例を解析した。病型分類は、Japan Clinical Oncology Group (JCOG) リンパ腫班による規準によった。

3) MDM2 阻害剤 Nutlin-3a とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 LBH586 による ATL 細胞のアポトーシス誘導：がん抑制遺伝子 p53 または p15/p16 のゲノム異常は、お互い排他的に aggressive ATL の過半数で認めるが indolent ATL では稀であること、indolent ATL の急性転化時に高頻度で出現することから、ATL 多段階発がんの後期の重要なイベントである。indolent

ATL の大多数と p15/p16 変異を有する aggressive ATL は p53 変異を有さない。そこで p53 を生理的に分解する MDM2 の阻害剤である Nutlin-3a の ATL 由来細胞株および HTLV-1 感染細胞株に対する効果を検討した。

エピジェネティックな遺伝子発現とクロマチンのリモデリングに関与するヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の阻害剤は、種々のがん細胞の増殖停止と分化による抗がん剤として期待されている。これまでの HDAC 阻害剤よりも低濃度での抗腫瘍効果が示されつつある Hydroxamic acids 系薬剤の LBH589 の ATL に対する有用性を検証するため、ATL 細胞株とプライマリー ATL 細胞を *in vitro* とマウスで検討した。

(倫理面への配慮)

渡邊：研究計画書は、臨床研究に関する倫理指針 (平成20年厚生労働省告示第415号)、および東京大学医科学研究所で定めた倫理規定を遵守して作成した。研究計画書は、研究開始前に東京大学大学院新領域創成科学研究科 研究倫理審査委員会、東京大学医科学研究所・倫理審査委員会に提出し、承認を得た。患者に研究計画書、および採血以上の危険はないことや個人情報保護されることを文書で説明し、同意 (インフォームド・コンセント) を得た後採血した。すべての動物実験は、東京大学医科学研究所実験動物委員会および国立感染症研究所実験動物委員会の承認の元に行われた。

C. 研究結果

1. ATL 患者由来の PBMC の移植法の確立の試み

1-1. 渡邊研における Tax-Tg マウス ATL 様細胞を用いた SCID マウス移植系の技術的検討

移植手技の確立のため共同研究グループである濱口らが開発した TaxTg マウス ATL 様腫瘍細胞を用いた移植系の確認を行った。その結果、濱口らの結果を再現出来る事が確認されたので、以後、ヒトの ATL 細胞を用いた移植系の確立に取り組んだ。

1-2. ATL 患者由来の PBMC を用いた移植系の試行

①NOG/SCID マウスへの移植結果

37例の移植例のうち明確に CD4 陽性の細胞群が生着したのは3例であった。一方、移植細胞が生着しても生じた腫瘍が CD20 陽性の B リンパ球で、EB ウイルスのマーカーである EBER が陽性であることが確認された (図1)。

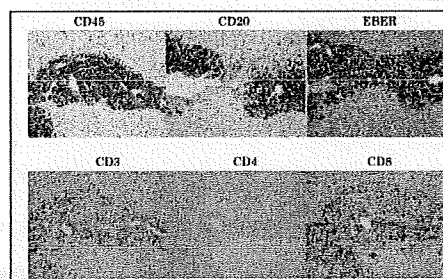


図1 ATL 患者検体を NOG マウスに移植後に発症した Lymphoma

CD4 陽性と CD8 陽性細胞が生着した例では、脾臓細胞で CD45 陽性細胞が 96%、うちの CD4 陽性あるいは CD8 陽性の T 細胞が 90%以上で、HTLV1 の Provirus load が CD4 分画で約 19%、CD8 は 0.8%であった (図2 a)。ATL の生着例と考え、腫瘍細胞の継代移植を試みたところ、CD19 陽

性 B 細胞の割合が、2代目は 51.7%、3代目で 90%以上となった(図2b)。他の、CD4 陽性細胞生着例でも B 細胞の増殖が認められたため、NOG マウスに対する移植には B 細胞を除去した分画を移植する必要があったと考えた。

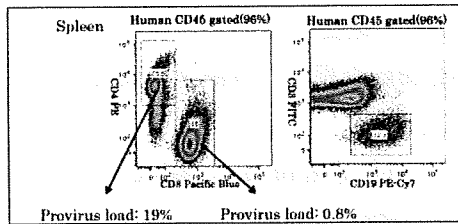


図2a ATL末梢血検体をNOGマウスに移植49日後脾臓単核球のFACS解析

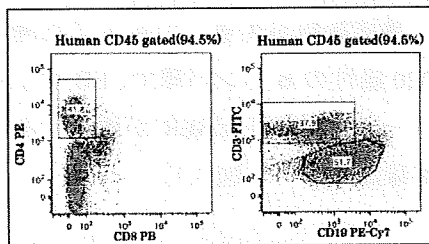


図2b ATL末梢血検体をNOGマウスに移植49日後脾臓単核球のFACS解析

次に、CD4 陽性細胞をソーティングして移植を行った。その結果、移植後58日で、脾臓の肥大が確認された。この脾臓細胞をFACS解析したところ、ヒトCD45陽性細胞のほぼ全てがCD4陽性であることが確認された(図3)。現在は、この細胞を継代移植中である。

②NOJ/SCID および Rag2-/Jak3-DK/SCID 新生児への移植

現在検討中である。平成21年9月にNOJマウスおよびRag2-/Jak3- Double Knock outマウスを岡田博士より供与頂き、クリーニング後東大医科研のマウス移植施設に移した。これらを12週齢で

繁殖させ平成22年2月に新生児を誕生させるところまでに至った。

現在、以下の検体を用いて移植条件の検討を行っている。

- a) FACSでB細胞のみ除去したもの
- b) MACSでT細胞を濃縮したもの
- c) PBMCをそのまま移植したもの

現在のところ、新生児への生着率は著明に高く、2代目までの継代にも成功している。

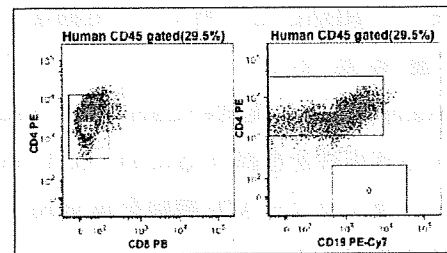


図3 ATL末梢血検体のCD4 sorting後の細胞を移植して58日後の脾臓分離単核球のFACS解析

2. ATL患者由来PBMCの表面マーカー解析とSP解析

渡邊と中内は共同で、FACSを用いてprimaryのATL細胞における表面マーカー解析の基礎検討とSP分画の解析系を検討し、技術の確認を行うとともに解析の経験を蓄積した。多数の論文において報告されている、ATL細胞の膜抗原発現の特徴が確認されたが、結果の詳細は省略する。

SP解析を行った4名の末梢血単核細胞のうち、3名(JSPFAD-13021291、46031597、13021137)の末梢血ではSPは検出されなかった。1名(IMSUT-P1)では、Hechst Blue (424/44) / Hechst Red (585/42) 両陰性の領域に有意な頻度細胞が検出された。この分画の細胞はHoechstの濃度を高め

ると、SP分画の頻度が減少した。

まとめると、検討した4検体中、再発例の1例においてSP細胞が検出され、他の3検体においては明確なSP細胞は同定できなかった(図4)。

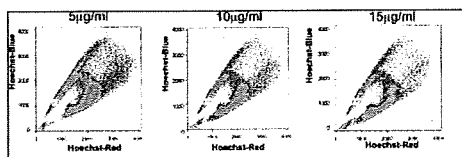


図4 ATL患者由来PBMCのSP解析

3. Tax-Tg ATL 様腫瘍細胞のCSCの解析

1) HTLV-1Tax-Tg マウス由来の腫瘍脾臓細胞(SLC)の解析: CD38-/CD71-/CD117+分画に細胞が0.03%存在することが判明した。そしてそれは多剤耐性能を持つSP細胞と高い割合(50%以上)で重複していた。そこで我々はこれをCSC候補細胞と考えた。

2) CSCs (CD38-/CD71-/CD117+細胞)の移植: NOD/SCID マウスの腹腔内へこれらの細胞を100個移植すると、約60日で腫瘍が再形成され、CSC細胞集団とSP分画の細胞数も維持されていた。このことからCSC細胞集団がSelf-Renewalを繰り返していることが示唆された。

3) 骨髄浸潤: ATL様腫瘍細胞の浸潤は骨髄でも認められ、また骨髄中にも0.05%のCSC細胞集団が存在していることが判明した。興味深いことにCD117陽性細胞が造血幹細胞のニッチとされる領域に局在することが観察された。脾臓においても腫瘍細胞が巨核球周辺に集積してい

る状態が時折見られることから、CSCも他の組織幹細胞と同様に、幹細胞性を維持するためのニッチが存在することも推察された。

4. ATLの白血病細胞浸潤メカニズムの解析

1) マウスとヒト肝臓におけるSDF-1 α 蛋白質の局在: SDF-1 α の組織内局在を調べるため、マウスとヒトそれぞれのSDF-1 α に対する抗SDF-1 α 抗体を用いて、免疫組織化学染色を行なった。マウスの肝臓では胆管上皮細胞にSDF-1 α の弱い陽性像が認められた(図5A, B)。HTLV-1 TaxTg マウスでは、SDF-1 α 陽性の胆管周囲組織に、白血病細胞が浸潤する像がみられた(図5C, D)。ATL患者肝臓でもTax-Tg マウスと同様に、胆管上皮細胞にSDF-1 α は陽性で、その周囲に白血病細胞が浸潤する像がみられた(図5E-H)。コントロールの正常ヒト肝臓組織でも、門脈域の胆管上皮細胞がSDF-1 α 陽性に染色された(図5I, J)。

2) AMD3100によるin vivoでのmATL細胞浸潤抑制実験: SCID マウスに移植したmATL細胞の臓器浸潤がCXCR4拮抗薬のAMD3100の投与によりin vivoで抑制されるかを検討した。各臓器へのmATL細胞の浸潤の程度は、mATL細胞が有するTax遺伝子を定量PCRで測定することで行なった。5 $\times 10^2$ 個のmATL細胞を移植した場合、肝臓ではAMD3100投与群、非投与群のいずれでもTax遺伝子は検出されなかった(図6A)。肺ではAMD非投与群の5頭中一頭の肺組織にTax遺伝子が検出されたが、それ以外のマウスの肺からはTax遺伝子は検出されなかった(図6B)。5 $\times 10^3$ 個のmATL細胞を移植した場

合、肝臓と肺のいずれでも Tax 遺伝子量が有意に AMD3100 投与群で低値を示した (図 6 A, B)。特に AMD 非投与群の肝臓では 5 頭すべてに Tax 遺伝子が検出されたのに対し、AMD 投与群の肝臓では Tax 遺伝子は検出されなかった (図 6 A)。 5×10^4 個の mATL 細胞を移植した場合は AMD 投与群、非投与群の間で有意差はみられなかった (図 6 A, B)。このように、AMD3100 は in vivo で mATL 細胞の肝臓、肺への浸潤を抑制すると考えられ、またその効果は、最初に移植した mATL 細胞の数の影響を受けると考えられた。

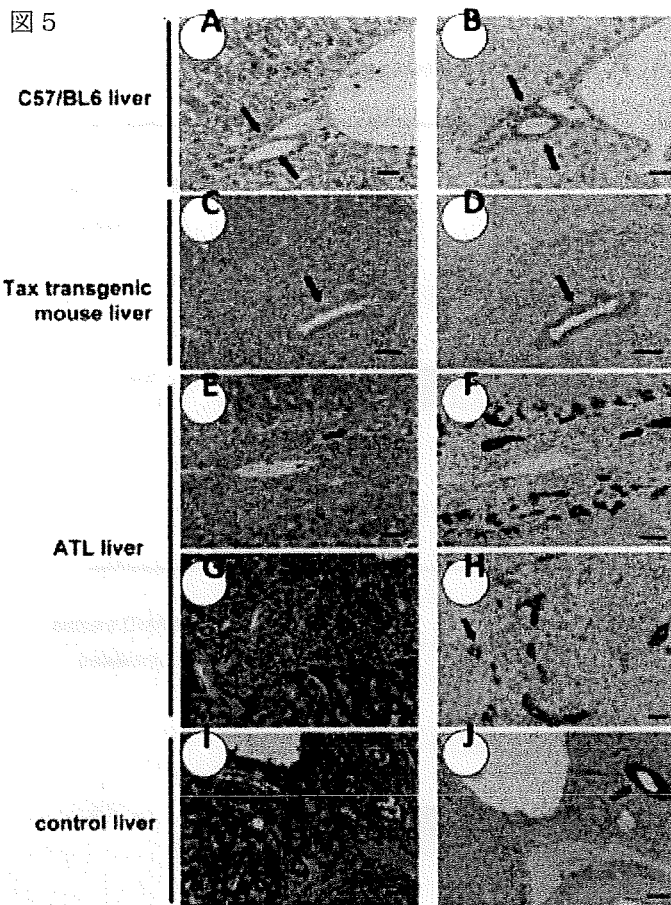


図 5 肝組織におけるSDF-1aの発現。A, C, E, G, I; HE染色、B, D, F, H, J; SDF-1aの免疫組織化学染色。C57BL6マウス肝臓(A, B)、HTLV-1 Taxトランスジェニックマウス肝臓(C, D)、ATL患者の肝臓(E-H)、非ATLのヒト肝臓(I, J)。いずれの肝組織においても肝内胆管上皮細胞がSDF-1a陽性である。ATL細胞浸潤のみられる肝臓(C, D: HTLV-1 Taxトランスジェニックマウス、E-H: ヒトATL患者)では、SDF-1a陽性の胆管上皮の周囲に浸潤したATL細胞が集中している。

図 6

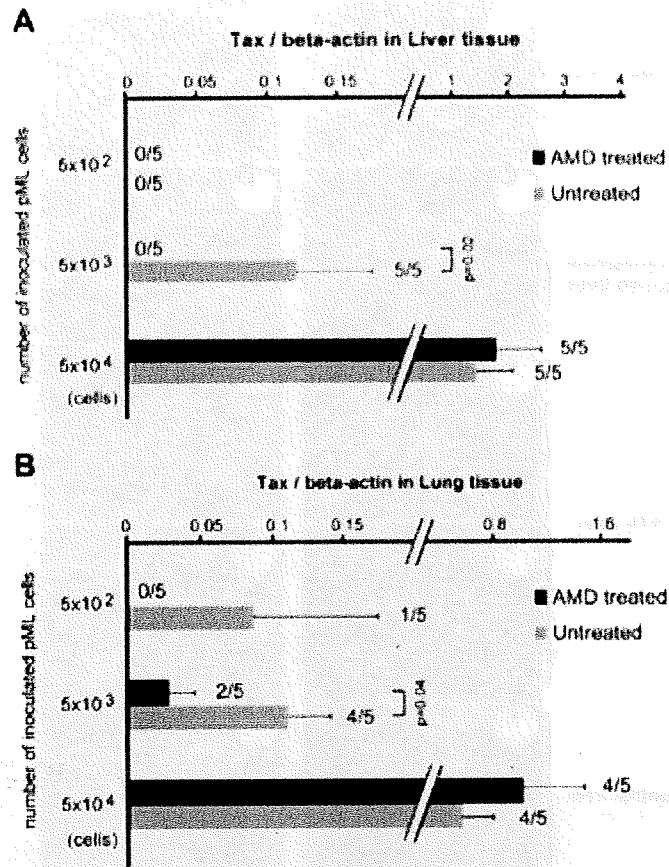


図 6 MD3100によるmATL細胞のin vivoでの浸潤抑制。mATL細胞の肝臓(A)と肺(B)への浸潤が抑制された。5x10², 5x10³, 5x10⁴個のmATL細胞をSCIDマウスに移植し、AMD3100(AMD treated)あるいはPBS(Untreated)を3週間(週5回)にわたり投与した。mATL細胞の肝臓および肺への浸潤の程度はHTLV-I Tax遺伝子の定量PCRで検討した。Beta-actin遺伝子量に対する相対的なTax遺伝子量を比で示す。

5. ATLにおけるゲノム異常の解析

1) ATL で高頻度にゲノム異常が確認された遺伝子 ATL-1 (仮称) については、同遺伝子領域にゲノム異常を有する 2 種類の ATL 細胞株(ST-1, ATL-43T)において遺伝子の発現があることが RT-PCR により確認された。同遺伝子は本来末梢血細胞での発現が無いこと、ゲノム異常のない細胞株では発現が見られなかったことから、異所的発現はゲノム異常により誘導された可能性がある。そこで、FISH によりゲノムの構造異常を調べた。今回同一染色体上の TCR 領域との転座の可能性を検討したが、いずれの細胞株でも TCR 領域との転座は見られなかった。

2) 網羅的かつ効率的な遺伝子変異探索技術の検討実験においては、ExonCapture の技術を用いることにした。実際に ExonCapture の手技を SureSelect を用いて検討したところ、exon 領域が 65 倍に濃縮され、特異的なキャプチャが実現されている事が確認された。さらにこれらの検体を Genome Analyzer でシーケンスを行った結果、少なくとも 1 回読まれた領域は 97.5%であり、Affymetrix の SNP アレイを用いた genotyping 結果との一致率は 99.62% であった。また腫瘍ゲノムのデータについて dbSNP データベースとの比較を行った結果、4,365 箇所の変異あるいは未知の SNP と考えられる locus が検出された。さらに正常対照との比較を行った結果、203 箇所の変異候補が見つかった。

6. ATL の臨床・分子病態と新規治療法開発の研究

1) JSPFAD バンキング：収集した検体は細胞と血漿に分離され、ATL のがん幹細胞と臨床病態との関連を明らかにする研

究に用いられるまで冷凍バンキングされた。

2) indolent ATL の長期予後と臨床・分子病態：indolent ATL90 例 (慢性型 65 例、くすぶり型 25 例)の生存期間中央値は 4.1 年であり、12 例が 10 年以上生存していた。推定 5 年、10 年、15 年生存割合はそれぞれ 47%、25%、14%であり、生存曲線にプラトーは認めなかった。死因は、約 75% が ATL であり、その他は重複がん、慢性肺疾患、日和見感染症、自己免疫性疾患などであった。予後不良因子は全身状態、好中球数、LDH 値、節外病変数、総病変数であった。一部の症例ではゲノム異常が解析され、染色体異常またはがん抑制遺伝子 p53、p15/p16 異常を有する場合は早期に急性転化し、予後不良であった。

3) MDM2 阻害剤 Nutlin-3a とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 LBH586 による ATL 細胞のアポトーシス誘導：Nutlin-3a は、p53 変異を有する ATL/非 ATL 細胞株に何ら影響を及ぼさなかったが、p53 変異を有さない細胞株には p53 活性化とアポトーシスまたは細胞周期停止をもたらした。p53 ではなく p15/p16 変異を有する ATL 由来細胞株では、SA-beta-gal 染色陽性で同定されるセネッセンスを認めた。このセネッセンスに伴う p53 関連分子の発現変化を調べたところ、Tp53-induced glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR) の亢進を認め、その siRNA はアポトーシス/セネッセンスを抑制した。

LBH586 は、nM のレベルで ATL 細胞株と Primary ATL 細胞にアポトーシスを誘導し、SCID マウスに移植した ATL 腫瘍を縮小した。網羅的発現アレイ解析と特異的 siRNA 解析により、このアポトーシ

スは、ATL での変異が報告されている FAS や p53 経路を介することなく、RAIDD と caspase-2 が重要な役割を担っていることが明らかとなった。

D. 考察

我々は、ATL のがん幹細胞(CSC)の同定に向けて、患者末梢血の Primary ATL 細胞の免疫不全マウスへの移植系の確立を試みた。従来の報告では、ATL 細胞は NOG/SCID マウスへの移植が可能とされていたので、この系を検討する事から開始した。また、NOG/SCID マウスでは新生児を入手出来ないため、熊本大学岡田博士より供与された2種類の SCID マウス(NOJ/SCID および Rag2-/Jak3-DK)を東京大学医科学研究所実験動物施設で繁殖し実験に用いる体制を整えた。

NOG/SCID の系での予備実験から明らかになった事は、末梢血単核球(PBMC)検体を移植すると高頻度にEBV感染B細胞腫瘍が増殖し、ATL 細胞に対応する CD4 陽性 T 細胞の腫瘍形成は1割程度にとどまると言うことである。従って、この系を用いるには少なくとも B 細胞を排除した細胞集団を移植する必要がある事が明らかになった。

NOJ/SCID および Rag2-/Jak3-DK の SCID マウスの系のメリットは、新生児を用いて移植実験が出来る事である。現在、予備実験が進行中であるが、生着率が飛躍的に高まっており、ATL CSC 同定の実験系は、このマウスの系が適していると考えられた。

ATL 細胞の膜表面抗原解析と SP 分画の解析は、渡邊研と中内研とが共同で行った。

膜表面抗原解析は、基礎的な技術的検討を行い、更に検体の解析を進めたが、既知の ATL 細胞の表現型が確認された。今後は、CSC を特徴づける可能性のある抗原についての検討を進める予定である。

SP 細胞の解析は、条件検討を含めて、ATL 患者4例の検体を解析した。今回調べた4名の ATL 患者の細胞のうち、3名では SP は認められなかった。残りの1名では Hoechst で染色されない分画が検出されたが、本解析では ABC トランスポーターの阻害剤である verapamil の効果を確認しておらず、真に SP を検出したかは現時点では不明である。

SP 解析は、幹細胞に特異的に発現する ABC トランスポーターにより低分子物質が細胞外に排出される性質を利用した、幹細胞の検出法として注目された方法である (Zhou S. et al., Nat Med. 2001;7:1028)。最初に研究が進められたマウス骨髄では、それまで知られていた造血幹細胞の表面マーカー (CD34^{c-kit}^{Sca-1}^{lineage}) ともある程度一致した結果が得られ、マーカーが判明していないその他の組織幹細胞の同定にも利用できる性質ではないかとして注目された。しかしながらその後の研究では、SP が必ずしも幹細胞のみを含んでいるわけではないこと、SP に属さない幹細胞も存在することが報告された (Morita Y, et al., Blood. 108(8): 2850-2856, 2006)。また、マウスと異なり、ヒトの細胞では実験の再現性が難しいことも知られている。

今回のヒト ATL 細胞を用いた SP 解析は少数例に留まっており、SP 分画が存在するか確認するためには、さらに解析数を増やして検証する必要がある。

また、SP 解析自体が幹細胞研究の手段として適切であるのか、多くの疑問が投げかけられている。今後 ATL 由来がん幹

細胞の有無を調べる際には、他のマーカーも視野に入れて検討する必要がある。先に述べた急性骨髄性白血病では正常な造血幹細胞におけるより幼弱な細胞のマーカーである CD34⁺CD38⁻ががん幹細胞であるとの報告があり、このような通常用いられている分化マーカーの網羅的解析についても、今後の検討課題である。

Tax-Tg の ATL 様腫瘍細胞(mATL)の CSC を同定し、CD38⁻/CD71⁻/CD117⁺分画に含まれる事を明らかにした。骨髄のニッチェに相当する部分に CSC 様細胞が存在する事は、ヒトの ATL の解析においても重要な問題であると考えられる。マウスの系での情報をヒト ATL CSC 解析に有効に利用する事が期待される。

ATL 患者では多臓器への ATL 細胞の浸潤が特徴的である。しかし、ATL 細胞の浸潤メカニズムは十分明らかになっていなかった。今回の解析で、ケモカインレセプターの一つである CXCR4 が、そのリガンドである SDF-1 α が高濃度に発現する肝臓への浸潤に関与する事が示された。腫瘍微小環境の構築を阻害する AMD3100 は、同時に投与した場合に他の抗腫瘍薬の抗腫瘍効果を増強する機能が期待できると考えられる。今回の実験では、AMD3100 が mATL 細胞の肝臓と肺への浸潤を SCID マウス体内で抑制することを示したが、その効果は最初に移入する mATL 細胞の数に異存していた。移入細胞数が大量の場合、AMD3100 による ATL 細胞の浸潤抑制効果が認められなくなる可能性がある。この観点からも、AMD3100 は単独ではなく、別の機序の抗がん剤を併用することにより、より効果的に抗腫瘍効果を発揮する可能性が示された。

ATL 細胞のゲノム異常解析を進めた。これらの知見は、ATL CSC 集団が同定された際に、CSC 特異的な異常を明らかにする上で必須の基礎情報である。更に検体数を増やして、コピー数異常の詳細な情報を得るとともに、特異的な異常を示す遺伝子の機能解析についても検討を進める予定である。

ATL CSC の遺伝子異常を質的に解析するには、exon における変異を集中的に解析する事が有効である。今回は、SureSelect を用いたターゲットキャプチャーシステムを検証し、読み込みエラーを避ける為に、10 回以上の読み取りを 90%以上得るためには最低 3 回のシーケンスが必要であることが判った。また、ATL 細胞及び CSC に特異的な変異を未知の SNP と分離して検出するためには、正常細胞の解析を併せて行う必要があると考えられる。これらの基礎データに基づいて、次年度以降 ATL 検体や ATL-CSC 分画の網羅的変異解析を行う。

ATL CSC 様細胞の分子細胞学的特性に基づく診断と治療法の開発を目的としているが、そのためには、多様な臨床病態をとる ATL の病態解析情報が必須である。基礎研究の基盤となる ATL 細胞のバンクを JSPFA を通じて進めるとともに、ATL の臨床および分子病態解析を進めた。

今回の解析では、積極的な治療対象とされてこなかった indolent ATL の予後解析を行い、長期予後が不良である事を明らかにした。欧米では ATL の標準治療の 1 つとして汎用されていて比較的毒性が低いインターフェロン α とジドブジンの併用療法、さらにはより毒性が低いとされる分子標的療法の臨床開発が期待される。今回の indolent ATL の解析で予後因子であった節外病変としては、皮膚病変

が最多であった。indolent ATL の中から皮膚型 ATL を独立させることも提唱されており、層別化治療の観点からも分子病態を含めて今後の検討課題である。

ATL のがん幹細胞に予想されるゲノム異常とエピジェネティックな異常を標的とした新規治療法として、それぞれ MDM2 阻害剤 Nutlin-3a と HDAC 阻害剤 LBH586 について検討し、ATL 細胞にセネッセンスまたはアポトーシスを誘導する事を明らかにした。以上の結果を踏まえて、高齢者に多く多段階発がんによる ATL に対する新規治療法の開発は、今後、Indolent ATL の時期からの検討が必要である事が示された。

E. 結論

ATL CSC の同定の基盤となる SCID マウスの移植系を、既報の論文を元に構築する事を試みたが、再現性に乏しく、EBV 感染 B 細胞腫瘍の増殖が高頻度に認められた。従って、新たな SCID マウスの移植系を検討中である。このため、当初研究計画で、初年度に予定していた ATL CSC 様細胞の同定が遅れて研究計画の一部変更を余儀なくされている。しかし、新たな移植系は順調に進んでいる事から、次年度には当初計画にある ATL CSC の分子細胞生物学的解析が可能になると考えられる。

ATL 由来がん幹細胞の存在を調べる目的で SP 解析を行なったが、結論は得られなかった。今後は検体数を増やして検討するとともに、他の細胞表面マーカーの解析などを幅広く検討する必要がある。

今後モデルマウスにおける、この腫瘍幹細胞の分子生物学的もしくは細胞生物学的特性の解析を進めるとともに、*in vivo* での腫瘍幹細胞の動態を追跡することに

よって、いまだ不明な点が多い、ATL 病態の把握と発症に至るメカニズムの解明を行っていく。

マウス ATL モデルとヒト ATL 患者の肝臓組織において、浸潤した白血病細胞に取り囲まれるように肝内胆管上皮細胞で SDF-1a の高発現を認めた。また CXCR4 阻害剤である AMD3100 の投与により SCID マウス肝臓、肺においてマウス ATL 細胞の浸潤を *in vivo* で抑制することができた。

これらのことから、SDF-1a と CXCR4 の相互作用が ATL 細胞の浸潤メカニズムに重要であり、AMD3100 は白血病細胞の浸潤を抑制することで有効な ATL 治療薬の候補になるものと考えられた。

ATL のゲノムコピー数解析から同定された標的遺伝子候補について、遺伝子発現とゲノム構造の異常を調べた。実験の結果、異所的発現が確認されたが、その直接の原因となるゲノムの構造異常は同定されていない。また、網羅的かつ効率的な遺伝子変異探索技術の確立については、検討実験を行った。exon 領域の特異的なキャプチャが実現され、シーケンス結果を正常検体と比較することで腫瘍細胞の変異候補を同定することができた。次年度以降はこの基礎データを基に、ATL 細胞及び ATL-CSC 分画を用いた解析を行う予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwanaga M, Watanabe T, Utsunomiya A, Okayama A, Uchimaru K, Koh K-R, Ogata M, Kikuchi H, Sagara Y, Uozumi K, Mochizuki M, Tsukasaki K, Saburi Y, Yamamura M, Tanaka J, Moriuchi Y, Hino S, Kamihira S, Yamaguchi K, for the Joint Study on Predisposing Factors of ATL Development (JSPFAD) investigators. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) proviral load and disease progression in asymptomatic HTLV-1 carriers: a nationwide prospective study in Japan. **Blood** (in press)
- 2) Sasaki D, Doi Y, Hasegawa H, Yanagihara K, Tsukasaki K, Iwanaga M, Yamada Y, Watanabe T, Kamihira S. High Human T Cell Leukemia Virus Type-1 (HTLV-1) provirus load in patients with HTLV-1 carriers complicated with HTLV-1-unrelated disorders. **Virology** (in press)
- 3) Masuda M, Ohta T, Maruyama T, Ito A, Hayashi T, Tsukasaki K, Kamihira S, Yamaoka S, Hoshino H, Yoshida T, Watanabe T, Stanbridge E-J, Murakami Y. Cadm1 interacts with tiam1 and promotes invasive phenotype of Human T-cell Leukemia Virus type I (HTLV-1) transformed cells and Adult T-cell Leukemia (ATL) cells : possible involvement of Cadm1 in pathogenesis of ATL. **J Biol Chem**, (in press)
- 4) Misawa A, Katayama R, Koike S, Tomida A, Watanabe T, Fujita N. AP-1-dependent miR-21 expression contributes to chemoresistance in cancer stem cell-like SP cells. **Oncology Research** (in press)
- 5) Nishino T, Miyaji K, Ishiwata N, Arai K, Yui M, Asai Y, Nakauchi H, Iwama A. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by a small-molecule agonist of c-MPL. **Exp Hematol**. 37:1364-77, 2009.
- 6) Okabe M, Otsu M, Ahn DH, Kobayashi T, Wakiyama Y, Morita Y, Onodera M, Eto K, Ema H, Nakauchi H. Definitive proof for direct reprogramming of hematopoietic cells to pluripotency. **Blood**. 114:1764-7, 2009.
- 7) Matsumoto K, Isagawa T, Nishimura T, Ogaeri T, Eto K, Miyazaki S, Miyazaki J, Aburatani H, Nakauchi H, Ema H. Stepwise development of hematopoietic stem cells from embryonic stem cells. **PLoS ONE**. 4:e4820, 2009
- 8) Sogo T, Kawahara M, Ueda H, Otsu M, Onodera M, Nakauchi H, Nagamune T. T cell growth control using hapten-specific antibody/interleukin-2 receptor chimera. **Cytokine**. 46:127-36, 2009
- 9) Yashiro Y, Bannai H, Minowa T, Yabiku T, Miyano S, Osawa M, Iwama A, Nakauchi H. Transcriptional profiling of hematopoietic stem cells by high-throughput sequencing. **Int J Hematol**. 89:24-33, 2009
- 10) Yamazaki J, Mizukami T, Takizawa K, Kuramitsu M, Momose H, Masumi A, Ami Y, Hasegawa H, Hall WW, Tsujimoto H, Hamaguchi I, Yamaguchi K. Identification of cancer stem cells in a