

- Tax-transgenic (Tax-Tg) mouse model of adult T-cell leukemia/ lymphoma. **Blood**. 114:2709-2720, 2009.
- 1) Kawaguchi A, Orba Y, Kimura T, Iha H, Ogata M, Tsuji T, Ainai A, Sata T, Okamoto T, Hall W.W, Sawa H, Hasegawa H. Inhibition of the SDF-1 $\alpha$ -CXCR4 axis by the CXCR4 antagonist AMD3100 suppresses the migration of cultured cells from ATL patients and murine lymphoblastoid cells from HTLV-I Tax transgenic mice. **Blood** 114:2961-2968, 2009.
  - 2) Kato M, Sanada M, Kato I, Sato Y, Takita J, Takeuchi K, Niwa A, Chen Y, Nakazaki K, Nomoto J, Asakura Y, Muto S, Tamura A, Iio M, Akatsuka Y, Hayashi Y, Mori H, Igarashi T, Kurokawa M, Chiba S, Mori S, Ishikawa Y, Okamoto K, Tobinai K, Nakagama H, Nakahata T, Yoshino T, Kobayashi Y, Ogawa S. Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. **Nature**. 459:712-716, 2009.
  - 3) Sanada M, Suzuki T, Shih LY, Otsu M, Kato M, Yamazaki S, Tamura A, Honda H, Sakata-Yanagimoto M, Kumano K, Oda H, Yamagata T, Takita J, Gotoh N, Nakazaki K, Kawamata N, Onodera M, Nobuyoshi M, Hayashi Y, Harada H, Kurokawa M, Chiba S, Mori H, Ozawa K, Omine M, Hirai H, Nakauchi H, Koeffler HP, Ogawa S. Gain- of-function of mutated C-CBL tumor suppressor in myeloid neoplasms. **Nature**. 460:904-908, 2009.
  - 4) Takasaki Y, Iwanaga M, Imaizumi Y, Tawara M, Joh T, Kohno T, Yamada Y, Kamihira S, Ikeda S, Miyazaki Y, Tomonaga M, Tsukasaki K. Long-term study of indolent adult T-cell leukemia-lymphoma (ATL). **Blood** (in press)
  - 1) Kamihira S, Terada C, Sasaki D, Yanagihara K, Tsukasaki K, Hasegawa H, Yamada Y. Aberrant p53 protein expression and function in a panel of hematopoietic cell lines with different p53 mutations. **Eur J Haematol**. 82:301-307, 2009.
  - 2) Hasegawa H, Yamada Y, Iha H, Tsukasaki K, Nagai K, Atogami S, Sugahara K, Tsuruda K, Ishizaki A, Kamihira S. Activation of p53 by Nutlin-3a, an antagonist of MDM2, induces apoptosis and cellular senescence in adult T-cell leukemia cells. **Leukemia** 23:2090-2101, 2009.
- (総説)
- 1) 渡邊俊樹、社会問題となった疾患と病理学<感染>「14. HTLV-1」病理と臨床【臨時増刊号】27 : 207-216、2009
  - 2) 渡邊俊樹、「成人T細胞白血病とウイルス感染」、*Biotherapy* 23:215-223, 2009年5月
  - 3) Yamazaki S, Nakauchi H. Insights into signaling and function of hematopoietic stem cells at the single-cell level. *Curr Opin Hematol*. 16:255-258, 2009.
  - 4) 塚崎邦弘 : 【Current Organ Topics】「Hematologic Malignancies / Pediatric Malignancies 血液,リンパ,腫瘍—T細胞系腫瘍」 . 成人T細胞白血病／リンパ腫の治療.癌と化学療法 36:756-761, 2009

- 5) 塚崎邦弘：【特集 悪性リンパ腫の治療の進歩—限局期症例は治療可能か—】悪性リンパ腫の予後因子. *Current Therapy*. 27: 676-680, 2009
- 6) 福島卓也、塚崎邦弘： . 成人T細胞白血病・リンパ腫. (直江知樹編集、現場で役立つ血液腫瘍治療プロトコール集、医薬ジャーナル社、東京、pp91-97所収) 2009.
- 7) 塚崎邦弘：【シンポジウム Lymphomas in Asia】Lymphoma in Asia:Smoldering ATLの治療戦略. *Skin Cancer* 24:199-205, 2009.
- 8) 石塚賢治、塚崎邦弘： . 白血病 G.成人病T細胞白血病／リンパ腫 (ATLL) 3.ATLに対するインターフェロン+抗レトロウイルス剤の位置づけは？(金倉譲、木崎昌弘、鈴木律朗、神田善伸編集、2010-2011 EBM 血液疾患の治療、中外医学社、東京、pp271-274、所収) 2009.
- 9) 塚崎邦弘：44. 造血・リンパ組織の腫瘍 5. 慢性リンパ性白血病と類縁疾患. (日本臨床腫瘍学会編集、新臨床腫瘍学—がん薬物療法専門医のために—改訂第2版、南江堂、東京、pp703-707, 2009.
- 10) 塚崎邦弘： 悪性リンパ腫—治療の実際— 1. 病型別治療方針—標準的治療、研究的治療 E. 成人T細胞白血病／リンパ腫 (ATL). (飛内賢正、堀田知光、木下朝博編集、悪性リンパ腫治療マニュアル 改訂第3版、南江堂、東京、pp188-193、所収) 2009.
- 11) 塚崎邦弘：[特集・難治性悪性リンパ腫の治療戦略]5. 成人T細胞白血病・リンパ腫. *血液フロンティア*20:187-195, 2010
2. 学会発表 (国際学会)
- 1) Tsuji T, Kanbe M, Ainai A, Okamoto T, Sata T, Hall W.W, Hasegawa H: Therapeutic effect of novel NF-kappa B inhibitor, Bay65-1942, in mouse ATLL model 14th International Conference of Human Retrovirology: HTLV and related retroviruses”, Jul., 2009, Salvador, Brazil
- 2) Kawaguchi A, Orba Y, Kimura T, Iha H, Ogata M, Tsuji T, Sata T, Okamoto T, Hall W.W., Sawa H, Hasegawa H. Inhibition of the SDF-1 $\alpha$ -CXCR4 axis by the CXCR4 antagonist AMD3100 suppresses the migration of human ATLL cells and murine lymphoblastoid cells from HTLV-I Tax transgenic mice. 14th International Conference of Human Retrovirology: HTLV and related retroviruses”, Jul., 2009, Salvador, Brazil
- 3) Takahashi R, Ando T, Nakano K, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Watanabe T. Possible dysfunction of NMD in ATL cells. 14th International Conference of Human Retrovirology: HTLV and related retroviruses”, Jul., 2009, Salvador, Brazil.
- 4) Nakano K, Matsubara A, Muto S, Kato M, Takita J, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Yamada Y, Oshima K, Ogawa S, Watanabe T. Combined Genetic Profiling of Gene Expression and Genome Copy Numbers in Adult T-Cell Leukemia. 14th International Conference of Human Retrovirology: HTLV and related retroviruses”, Jul., 2009, Salvador, Brazil.
- 5) Iwanaga M, Watanabe T, Utsunomiya A, Uozumi K, Ogata M, Uchimaru K, Okayama A, Koh K-R, Kamihira S,

- Yamaguchi K, for the Joint Study on Predisposing Factors of ATL Development (JSPFAD). Sequential monitoring of HTLV-1 provirus load and clinical data in HTLV-1 infected individuals in the Joint Study on Predisposing Factors of ATL Development (JSPFAD). 14th International Conference of Human Retrovirology: HTLV and related retroviruses”, Jul., 2009, Salvador, Brazil.
- 6) Seto M, Umino A, Utsunomiya A, Oshiro Nakagawa A, Takeuchi I, Ohshima K, Tsukasaki K, Nakagawa M, Nakamura S : Jul. 1, 2009 : 14th International Conference on Human Retrovirology : HTLV and Related Retroviruses : Salvador-Bahia-Brazil : Oral Presentations ”Molecular Pathogenesis ATLL” : OP-19 Distinct Genome Profiles of Acute and Lymphoma Type ATLL : An Indication for two Subtypes in Acute Type ATLL.
- 7) Utsunomiya A, Yamamoto K, Tsukasaki K, Tobinai K, Uike N, Uozumi K, Tomonaga M, Matsushima K, Shitara K, Akinaga S, Ueda R : Jul. 1 - Jul. 4, 2009 : 14th International Conference on Human Retrovirology : HTLV and Related Retroviruses : Salvador -Bahia-Brazil : Oral Presentations “ATLL Therapy” : A Novel Anti-Tumor Therapeutic Antibody, Kw-0761, Against Adult T-cell Leukemia-Lymphoma (ATL).
- (国内学会)
- 1) 「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」、浜口 功、第 2 回 HTLV-1 研究会・合同班会議 (2010 年 08 月 30 日、東京大学医科学研究所)
- 2) 「TSLC1 を分子標的とする組換えウイルスを用いた新規 ATL 療法の開発」、大隈 和、本嶋 藍、森下 和広、山本 直樹、山口 一成、浜口 功、第 2 回 HTLV-1 研究会・合同班会議 (2010 年 08 月 30 日、東京大学医科学研究所)
- 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」、滝澤和也、水上拓郎、山崎淳平、倉光球、百瀬暖佳、益見厚子、長谷川秀樹、浜口 功、山口一成、第 71 回日本血液学会学術集会 (2010 年 10 月 23 日、国立京都国際会館)
- 4) 川口晶、辻隆裕、大場靖子、木村享史、相内章、伊波英克、緒方正男、佐多徹太郎、澤洋文、長谷川秀樹 CXCRA アンタゴニスト(AMD3100)を用いた SCID マウスにおける Tax トランスジェニックマウス由来腫瘍細胞の組織浸潤抑制 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 2009 年 10 月、東京
- 5) 川幡亮一郎、加藤元博、真田 昌、佐藤康晴、竹内賢吾、滝田順子、野本順子、朝倉義崇、渡邊俊樹、吉野 正、小林幸夫、小川誠司、「悪性リンパ腫における NFκB 経路制御遺伝子の変異解析」、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 1 日 (2009 年 10 月 1 日～3 日)、パシフィコ横浜
- 6) 浅沼里実、渡邊俊樹、中野和民、山岸 誠、小川誠司、山口一成、宇都宮與、「血球系特異的転写因子 Helios の ATL における発現パターンの異常」、第 68 回日本癌学

- 発現パターンの異常」、第68回日本癌学会学術総会、2009年10月1日（2009年10月1日～3日）、パシフィコ横浜
- 7) 矢持忠徳、浜口 功、中内啓光、長谷川秀樹、小川誠司、山口一成、宇都宮與、渡邊俊樹、「成人性T細胞性白血病におけるがん幹細胞の同定への試み」、第68回日本癌学会学術総会、2009年10月1日（2009年10月1日～3日）、パシフィコ横浜
- 6) 松原亜以子、加藤元博、真田 昌、滝田順子、千葉 滋、林 泰秀、小俣政男、小林幸夫、渡邊俊樹、石川雄一、吉野 正、小川誠司、「各種腫瘍における高密度SNPアレイを用いた網羅的ゲノムプロファイリング」、第68回日本癌学会学術総会、2009年10月3日（2009年10月1日～3日）、パシフィコ横浜
- 7) 松原亜以子、武藤早紀、加藤元博、真田昌、田村 梓、Yuan Chen、滝田順子、宇都宮與、山口一成、山田恭輝、大島孝一、渡邊俊樹、小川誠司、「Genome-wide analysis of adult T-cell leukemia/lymphoma」、第71回日本血液学会学術集会、2009年10月23日（2009年10月23日～25日）、京都
- 8) 矢持忠徳、浜口 功、中内啓光、長谷川秀樹、小川誠司、山口一成、宇都宮與、渡邊俊樹、「Search for Cancer Stem Cell in Adult T-cell leukemia」、第71回日本血液学会学術集会、2009年10月24日（2009年10月23日～25日）、京都
- 9) 浅沼里実、中野和民、山岸 誠、山口一成、小川誠司、宇都宮與、渡邊俊樹、「Abnormal expression patterns of a lymphoid -specific transcriptional factor Helios in adult T-cell leukemia (ATL) cells」、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月9日（2009年12月9日～12日）、横浜
- 10) Tsukasaki Kunihiro：平成21年10月23日（金）～25日（日）：第71回日本血液学会学術集会：京都国際会議場：発表：23日（金）・1日目：シンポジウム3 / 13:30-16:10 : SY3-3 "International consensus on the management of ATL".
- 11) 山岸 誠、中野和民、三宅在子、加賀美弥生、包 明久、宇都宮與、山口一成、内丸薫、渡邊俊樹、「ATL細胞におけるmicroRNA発現異常の解析：miR-31の発現低下とNF-κBシグナル伝達系に及ぼす影響」、第2回HTLV-1研究会・合同班会議、2009年8月30日（2009年8月29日～30日）、東京大学医科学研究所
- 12) 石渡 優、矢持忠徳、山岸 誠、中野和民、渡邊俊樹、「植物アルカロイドセファランチンによる、HTLV-1感染細胞に対する抗腫瘍効果」、第2回HTLV-1研究会・合同班会議、2009年8月29日～30日、東京大学医科学研究所
- 13) 浅沼里実、渡邊俊樹、中野和民、山岸 誠、小川誠司、山口一成、宇都宮與、「成人T細胞白血病（ATL）での血球系特異的転写因子Heliosの発現異常」、第2回HTLV-1研究会・合同班会議、2009年8月29日～30日、東京大学医科学研究所
- 14) 浅沼里実、渡邊俊樹、中野和民、山岸 誠、小川誠司、山口一成、宇都宮與、「血球系特異的転写因子HeliosのATLにおける発現パターンの異常」、第68回日本癌学会学術総会、2009年10月1日（2009年10月1日～3日）、パシフィコ横浜
- 15) 中野和民、松原亜以子、宇都宮與、山口一成、内丸 薫、渡邊俊樹、「HTLV-1キャリアの遺伝子発現プロファイリン

- グによるATLバイオマーカー遺伝子とリスク・インディケーター遺伝子同定の試み」、第68回日本癌学会学術総会、2009年10月1日（2009年10月1日～3日）、パシフィコ横浜
- 16) 矢持忠徳、浜口 功、中内啓光、長谷川秀樹、小川誠司、山口一成、宇都宮與、渡邊俊樹、「成人性T細胞性白血病におけるがん幹細胞の同定への試み」、第68回日本癌学会学術総会、2009年10月1日（2009年10月1日～3日）、パシフィコ横浜
- 17) 山岸誠、黒川直也、副島あい、石田尚臣、中野和民、渡邊俊樹、「ATL, HTLV-1感染細胞におけるEZH2の発現及び機能的解析」、第68回日本癌学会学術総会、2009年10月1日（2009年10月1日～3日）、パシフィコ横浜
- 18) 三宅在子、山岸 誠、中野和民、加賀美弥生、包 明久、宇都宮與、山口一成、内丸 薫、渡邊俊樹、「ATL患者でのマイクロアレイ技術を用いたマイクロRNA発現異常の解析」、第68回日本癌学会学術総会、2009年10月2日（2009年10月1日～3日）、パシフィコ横浜
- 19) 石渡 優、矢持忠徳、山岸誠、中野和民、渡邊俊樹、「ビスコクラウリン型アルカイド製剤セファランチンによる、HTLV-1感染細胞に対する細胞毒性効果」、第68回日本癌学会学術総会、2009年10月2日（2009年10月1日～3日）、パシフィコ横浜
- 20) 山岸 誠、三宅在子、中野和民、加賀美弥生、包 明久、宇都宮與、山口一成、内丸 薫、渡邊俊樹、「MicroRNA Expression Profiling and Abnormal MicroRNA Expression in Adult T-Cell Leukemia」、第71回日本血液学会学術集会、2009年10月23日（2009年10月23日～25日）、京都
- 21) 松原亜以子、武藤早紀、加藤元博、真田昌、田村 梓、Yuan Chen、滝田順子、宇都宮與、山口一成、山田恭輝、大島孝一、渡邊俊樹、小川誠司、「Genome-wide analysis of adult T-cell leukemia/lymphoma」、第71回日本血液学会学術集会、2009年10月23日（2009年10月23日～25日）、京都
- 22) 中野和民、松原亜以子、宇都宮與、山口一成、内丸 薫、渡邊俊樹、「Potential Biomarker and Risk-Indicator Genes of ATL in Gene Expression Profiling of HTLV-1 Carriers」、第71回日本血液学会学術集会、2009年10月23日（2009年10月23日～25日）、京都
- 23) 矢持忠徳、浜口 功、中内啓光、長谷川秀樹、小川誠司、山口一成、宇都宮與、渡邊俊樹、「Search for Cancer Stem Cell in Adult T-cell leukemia」、第71回日本血液学会学術集会、2009年10月24日（2009年10月23日～25日）、京都
- 24) 山岸 誠、中野和民、三宅在子、加賀美弥生、包 明久、宇都宮與、山口一成、内丸 薫、渡邊俊樹、「ATL細胞におけるmicroRNA発現異常の解析：miR-31の発現低下とNF-κBシグナル伝達系に及ぼす影響」、第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月27日（2009年10月25日～27日）、東京
- 25) 中野和民、山岸 誠、三宅在子、加賀美弥生、包 明久、宇都宮與、山口一成、内丸 薫、渡邊俊樹、「ATL患者におけるmicroRNA発現異常の解析：miR-31の発現低下がNIKおよびNF-κBシグナル伝達

- 系に及ぼす影響」、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月9日(2009年12月9日～12日)、横浜
- 26)浅沼里実、中野和民、山岸 誠、山口一成、小川誠司、宇都宮與、渡邊俊樹、「Abnormal expression patterns of a lymphoid-specific transcriptional factor Helios in adult T-cell leukemia(ATL) cells」、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月9日(2009年12月9日～12日)、横浜
- 27)塚崎邦弘：シンポジウム3 SY3-2 smoldering ATLの治療戦略、平成21年5月23日：第25回日本皮膚悪性腫瘍学会学術集会：岡山コンベンションセンター
- 28)塚崎邦弘：シンポジウム2「ATLとHTLV-1研究の最前線」－演題1「ATLの臨床分子病態、治療戦略」第49回日本リンパ網内系学会総会：平成21年7月10日：淡路夢舞台国際会議場
- 29)今泉芳孝、今西大介、田口潤、福島卓也、波多智子、宮崎泰司、塚崎邦弘、朝長万左男、小川大輔、新野大介、大島孝一：ポスターセッション「リンパ節病変にクリプトコッカス感染症を伴った成人T細胞白血病リンパ腫」第49回日本リンパ網内系学会総会：平成21年7月11日：淡路夢舞台国際会議場
- 30)長谷川寛雄、佐々木大介、塚崎邦弘、山田恭暉、上平憲：「白血病細胞株におけるMDM2阻害剤Multinによるp53活性化と細胞死決定のメカニズム」第18回日本アポトーシス研究会学術集会(日本Cell Death学会設立記念学術集会)：平成21年8月1日(土)：長崎大学医学部「良順会館」
- 31)塚崎邦弘：キートンレクチャー：「ATL治療の現状」第2回HTLV-1研究会・合同班会議：平成21年8月29日(土)：東京大学医科学研究所・大講堂
- 32)海野 啓、中川雅夫、片山直之、宇都宮與、塚崎邦弘、瀬戸加大：「急性型ATLLにおける多クローンの証明と末梢血腫瘍細胞のクローンの解析」第2回HTLV-1研究会・合同班会議：平成21年8月30日(日)：東京大学医科学研究所・大講堂。
- 33)長谷川寛雄、山田恭暉、塚崎邦弘、森 直樹、朝長万左男、上平 憲：「ATL細胞に対する新規HDAC阻害剤LBH589の効果」、第2回HTLV-1研究会・合同班会議：平成21年8月30日：東京大学医科学研究所・大講堂。
- 34)池田柊一、種岡 新、塚崎邦弘、今泉芳孝：「蔓延地区におけるHTLV-1キャリア率の年代変化」第2回HTLV-1研究会・合同班会議：平成21年8月29日(土)・30日(日)：東京大学医科学研究所・大講堂。
- 35)Hasegawa H, Yamada Y, Tsukasaki K, Mori N, Sasaki D, Usui T, Atogami S, Ishikawa C, Machijima Y, Sawada S, Tomonaga M, Kamihira S：“LBH589, a deacetylase enzymes inhibitor, induces apoptosis in adult T-cell leukemia/lymphoma cells”, 第71回日本血液学会学術集会：平成21年10月23日：京都国際会議場。
- 36)糸永英弘、宮崎泰司、田口 潤、今泉芳孝、福島卓也、波多智子、塚崎邦弘、朝長万左男：「同種造血幹細胞移植後のATL及びAML,ALL症例で生じたCMV抗原血症の後方視的比較検討」第71回日本血液学会学術集会：平成21年10月23日：京都国際会議場。
- 37)佐々木大介、今泉芳孝、山田恭暉、尾坂明美、長谷川寛雄、塚崎邦弘、朝長万左男、鶴田一人、柳原克紀、上平 憲：「成

人T細胞白血病・リンパ腫 (ATLL) におけるEZH2高発現の病的意義」第71回日本血液学会学術集会：平成21年10月24日：京都国際会議場.

## 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

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  
研究協力者：矢持 忠徳 東京大学大学院新領域創成科学研究科 特任研究員

### 研究要旨

癌幹細胞は免疫不全マウスに連続移植可能な細胞集団である。そこで ATL において連続で移植可能な細胞集団が存在するか否かを検討するために、ATL 患者検体の免疫不全マウスに対する移植モデルの開発を行っている。まず、手技の確認として、先行研究である Tax Transgenic mouse の腫瘍を用いて移植を行ったところ、報告通り腫瘍が生着し、SP 細胞や癌幹細胞が同定することが可能であった。またこれは新しい知見であるがこの SP 分画の細胞と CSC の細胞が 50% 以上オーバーラップすることも明らかになった。

そこで JSPFAD の ATL 患者検体を用いて移植を行う前に 4 例の検体において SP 解析を行った。その結果 4 例中 1 例において明確な SP が検出されたが残りの 3 例においては検出できなかった。このことより ATL の検体における SP は個人差があることが予想された。

次に JSPFAD の検体を用いて NOG マウスに移植したところ 3 例において CD4 陽性の T 細胞が有意に生着したがそのうちの 2 例は一部 B 細胞が存在していた。その 2 例について継代移植を行ったところ CD19 陽性の細胞が全体の 50% 程度に増加してしまった。

そこで上記の 3 例中の残り 1 例では B 細胞を除去するために CD4 でソーティングしたところ脾臓に生着していた細胞は 96% が CD4 陽性であった。また B 細胞はほとんど検出できていない。現在 2 代目に移植して結論は出ていないが、NOG マウスの移植の系においては B 細胞をのぞく方法が望ましいと考えている。現在さらなる移植モデル検討のために免疫不全マウスの新生児に移植を行っている。

### A. 研究目的

成人 T 細胞白血病 (ATL) は、HTLV-1 の感染後数十年を経て発症する極めて悪性度の高い末梢性 T 細胞腫瘍である。HTLV-1 は、全世界で約 3000 万人のキャリアがおり、そのうち日本には約 120 万人が存在する。国内の 120 万人のキャリアから今後約 5 万～10 万人の ATL の発症が推定されるにもかかわらず、現時点では有効な治療手段・発症予防法が全く知られていない。従って、ATL 発症高危険群の診断法と発症予防法の開発および根治療法の開発

が緊急の要請であり、本疾患の克服は我が国の医療・行政上の極めて重要な課題である。最近 ATL モデルマウスにおいて発症する腫瘍において癌幹細胞が存在することが当研究グループの濱口により明らかになった。我々はこの知見より ATL の発症予防と画期的根治療法の新たなターゲットとして、ATL の「がん幹細胞」に着目した。癌幹細胞は白血病 (AML) で発見され FACS で分画された CD34+/CD38- の分画に濃縮されていた。この報告以降、固形腫瘍も含め予後不良の腫瘍疾患において癌幹



細胞の存在を示唆する報告が数多くなされてきた。しかしながら癌幹細胞は、この名前から概念は混乱を来している。現在はそのことからTumor Initiating Cell (TIC) という言葉を使う研究グループも多く存在する。我々が使用する癌幹細胞の概念は幹細胞ががん化するものを指すものではなくTICについて示すものである。その定義は以下の4点と考えている。

- 1, 腫瘍原性のある少数の細胞集団
2. 免疫不全マウスに連続移植可能
- 3, 腫瘍原性のない細胞とマーカーで区別できる
- 4, その細胞が分裂・増殖した際に、再び腫瘍原性のあるものとないものからなる集団を生じる

我々は上の4点を満たす細胞集団を探索するためにはまず免疫不全マウスへの移植系の確立が必須であると考えた。従ってJSPFADより得られるATL患者由来PBMCを免疫不全マウスに移植し、癌幹細胞の存在の可能性について検討することが今年度の第一目的と考えた。

次に、移植するマウスの系統の選択は非常に重要であることが最近明らかになりつつある。Melanomaでは以前から癌幹細胞が存在すると報告されていた。そこでQuintanaらはNOD SCIDマウスとNOGマウスを用いてその癌幹細胞の数を比較計測した。用いた方法は癌幹細胞が存在する指標であるLimiting Dilutionである。これにより腫瘍形成能を有する細胞が何個中に1個存在するかを示すことができる。NOD SCIDマウスでは検体によりばらつきがあり10の4乗から10の7乗個に1個であった。一方NOGマウスにおいては4個に1個であることが明らかになった(Nature 2008; 456: 593)。このことよりマウスの腫瘍モデルによって腫瘍の生着パターンが大きく異なりより生着しやすい方がよりヒ

ト腫瘍周辺の微少環境に類似しているとQuintanaらは考えている。

一方、ATL患者由来のPBMCの移植はSCIDマウス、NOD-SCIDマウスなどの免疫不全マウスには困難である。しかし最近使用されてきた前述のNOGマウスを用いると生着することが明らかになっている(Int. J. Cancer 2007; 121: 2205)。さらにNOD/SCID/Beta 2 microglobulin Null mouseの新生児に移植するとATL患者由来のPBMCで生着が成功するがAdultのマウスでは生着していないことが報告されている (Leukemia 2005, 19, 1384)。またATL細胞株MT-2を用いてSCIDマウスへ移植すると5週齢のマウスではほとんどが腫瘍死を起こすが、7週齢以上のマウスでは起こさないことが報告されている(Laboratory Investigation 2004; 84: 263)。このことはマウスの種類だけでなく年齢も重要な因子であることを強く示唆している。

このような背景よりATLのマウスへの移植には十分な検討が必要であるので初年度はATL患者由来のPBMCの免疫不全マウスへの移植条件を中心に検討を行うことにした。

## B. 研究方法

### 1 Tax Transgenic Mouse 由来の腫瘍の解析

まず我々は自身の移植技術を確認するために先行研究で行われていた (Blood 2009; 114: 2709) Tax Transgenic Mouse 由来の腫瘍  $1 \times 10^6$  個をNOD-SCID mouseに移植し生着した腫瘍において報告通り Cancer Stem Cell 分画(CD38-, CD71-, CD117+), SP分画が同定可能か検討を行った。Tax Transgenic mouseの腫瘍は班員である長谷川秀樹先生より供与していただいた。SPの分析はGoodellの方法に準じ、東大医科研中内研に所属する守田助教に指導をして頂いた。詳細な方法は中内グループの報告に記述されている。

### 2 ATL 患者由来 PBMC の SP 解析

JSPFADで得られる患者PBMCの4例についてSP解析を行った。

### 3ATL 患者由来の PBMC の移植法の確立の試み

我々はATL由来PBMCの移植法を確立するために大きく2点について検討することにした。

- 1 マウスの種類
- 2 マウスの週齢

まずマウスの種類であるが ATL 末梢血検体の移植が Adult で生着報告がある 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  $\gamma$  receptor null マウスを掛け合わせたマウスであるが、このマウスは実験中央研究所から購入できるが6週齢以上のものでなければ購入できない。従って NOG マウスの新生児マウスは使用できない。そこで IL-2  $\gamma$  receptor の直下のシグナル伝達物質である Jak3 をノックアウトしたマウスと NOD SCID マウスを掛け合わせた NOJ マウスを用いることにした。このマウスも 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)腫瘍の移植に適していることが予想される。そこで作成者である熊本大学医学部岡田誠治先生に供与をお願いしたところ、NOJ と同様に SCID-hu が作成可能なマウスである Rag2-/Jak3- のダブルノックアウトマウスも供与して頂けることになった。従って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ようになる。

- 1, NOG マウスの6-10 週齢
- 2, NOJ マウスの新生児マウス
- 3, Rag2-/Jak3- Double Knockout mouse 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。

#### (倫理面への配慮)

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。

### C. 研究結果

#### 1 Tax Transgenic Mouse 由来の腫瘍の解析

移植手技の確認のため先行研究である Tax Transgenic mouse の腫瘍を論文報告通りの条件で移植を行い40日目に解剖を行ったところ脾臓の肥大や臓器に腫瘍の浸潤が確認された(図1a)。

次に脾臓の腫瘍を SP 解析後に CD38, CD71, CD117 で染色後 FACS 解析を行った。その結果

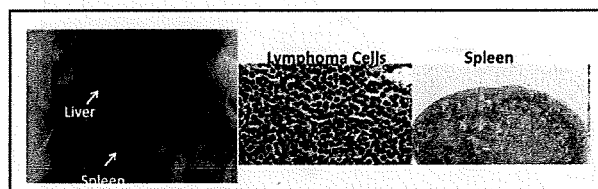


図 1a Tax Transgenic Mouse 由来腫瘍の移植後の生着腫瘍

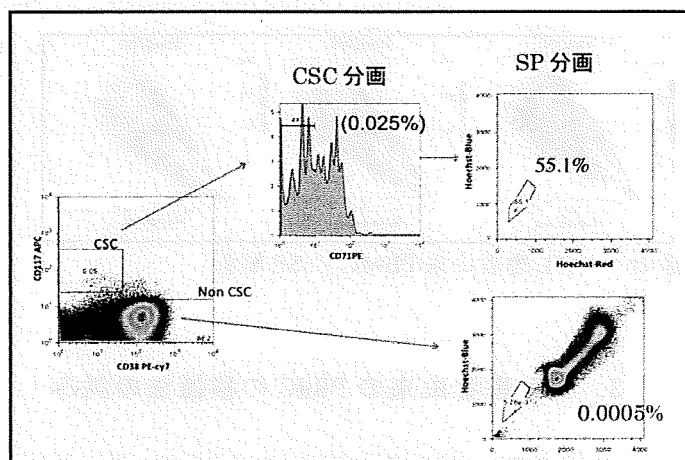


図 1b. Tax Transgenic マウス由来 CSC 分画と SP の関係

CSC 分画である CD38-, CD71-, CD117+の細胞は0.025%でありそのうちの55%がSP細胞であった(図1b)。

また、Non CSC 分画にはSP細胞はほとんど見あたらなかった。逆にSPに相当する細胞は0.029%でそのうちの60%がCSCに相当した

(Data not shown)。以上より CSC 分画の細胞(論文上では 0.03%)および SP 細胞(論文上では 0.06%)ともに報告に類似していることが確認された。我々はこの手技の確認後ヒト ATL の PBMC を用いた移植を行うことにした。

### 2 ATL 患者由来 PBMC の SP 解析

我々は移植の前に ATL 患者由来の PBMC において SP 細胞の存在の有無を調べた。その結果 3 検体において明確な SP 細胞は同定できなかった(図 2 a)。しかし再発例の 1 例において明確な SP 細胞が検出された(図 2 b)。

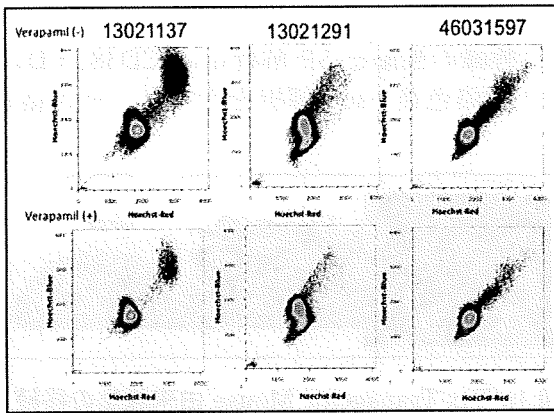


図 2a ATL 患者由来 PBMC の SP 解析

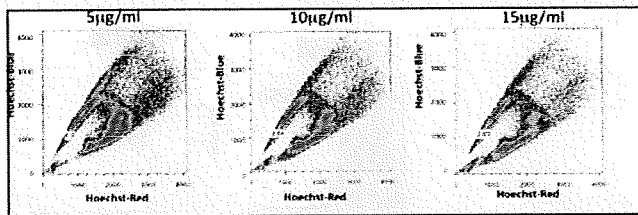


図 2b ATL 患者由来 PBMC の SP 解析

### 3. ATL 患者由来の PBMC の移植法の試み

ATL 患者由来の PBMC をまず NOG マウスに移植した。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。一方生着しても CD4 陽性細胞がほとんど含まれて

いない例を経験した。それを病理の解析に出したところこれらの組織に CD20 陽性の細胞が含まれこの細胞集団に 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 3 a b)。

EB ウイルスは B 細胞 の不死化に大きく関

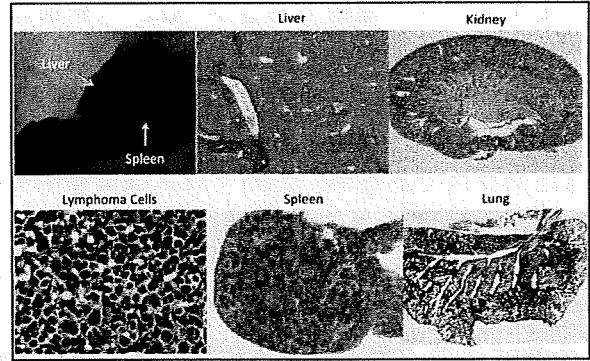


図 3 a ATL 患者検体を NOG マウスに移植後に発症した Lymphoma

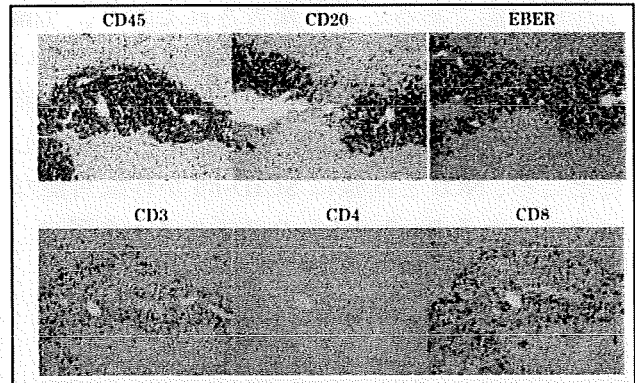


図 3 b ATL 患者検体を NOG マウスに移植後に発症した Lymphoma

わるウイルスで感染後 LMP を発現して Bcl-2 の発現を誘導することが分かっている。また EB-Associated Lymphoma は AIDS 患者において発症することが報告されており、NOG での B 細胞の増殖はこのケースに類似しているのかもしれない。

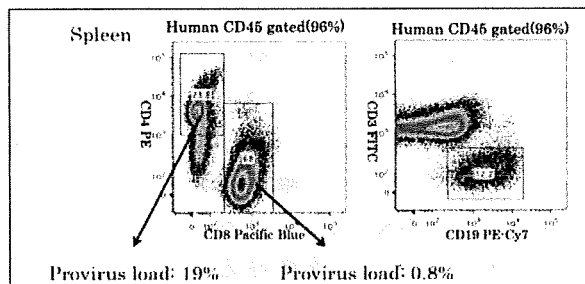


図 4a ATL 末梢血検体を NOG マウスに移植 4 9 日後の脾臓単核球の FACS 解析

次に CD4 陽性、CD8 陽性細胞が生着した例を示すとこれはマウスの脾臓から分離した PBMC で CD45 陽性細胞が 96%でそのうちの CD4 陽性と CD8 陽性をあわせると 90%以上が T 細胞になり CD4 分画には HTLV1 の Provirus load が約 19%存在することが確認された。ちなみに CD8 は 0.8%であった(図 4 a)。この移植例は ATL の生着例と考えた。そこでこの細胞の NOG マウスへの連続移植を試みたところ次の代には CD4 は 37.9%で CD19 は 51.7%と B 細胞の割合が大きくなってしまった(図 4 b)。さらに 3 代目には 90%以上が B 細胞であった。この例のように類似した B 細胞の増殖が別の CD4 陽性細胞が生着した 1 例でも認められた。このことから NOG マウスに対する移植には B 細胞をのぞいて移植する必要があると考えた。

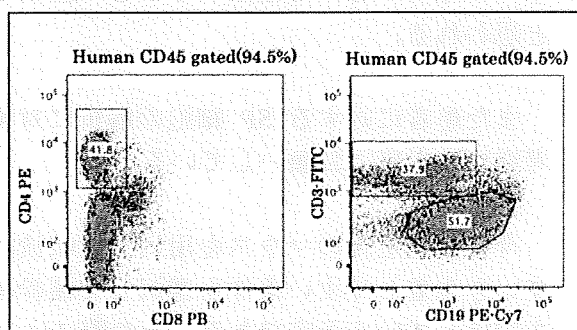


図 4b ATL 末梢血検体を NOG マウス移植 64 日後の脾臓単核球の FACS 解析

次に ATL のマーカーである CD4 陽性細胞をソーティングして移植を行うことにした(図 5)。

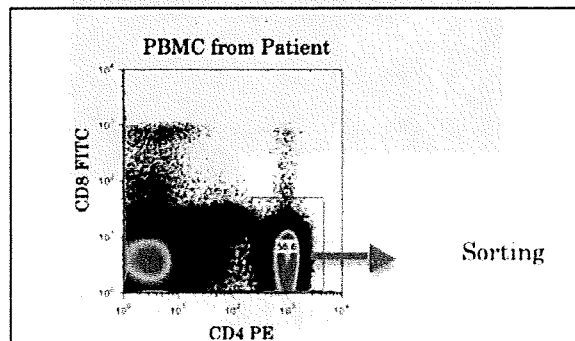


図 5 ATL 末梢血検体の CD4 陽性細胞

移植後 58 日で解剖したところ、脾臓の肥大が確認された(図 6 a)。またこの脾臓から単離された単核球を FACS 解析したところヒト CD45 陽性細胞のほぼ全ての細胞が CD4 陽性である

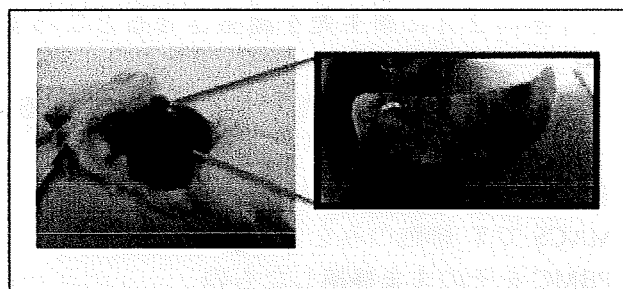


図 6a ATL 末梢血検体の CD4 ソーティング後の細胞を移植後 5 8 日目の脾臓

ことが確認された(図 6 b)。しかしながら腫瘍の継代に全ての細胞を用いたため HTLV-1 ウイルスが陽性かどうかは不明である。現在はこのマウスを 2 代目に移植中である。

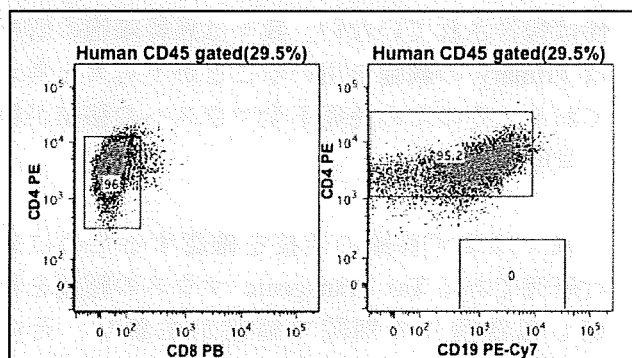


図 6b ATL 末梢血検体の CD4 sorting 後の細胞を移植して 5 8 日後の脾臓分離単核球の FACS 解析

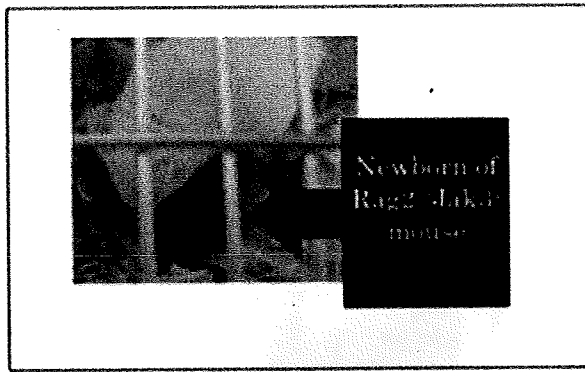


図7 Rag2-/Jak3- Double knockout mouse  
の新生児

新生児に対する移植は現在検討中である。9月にNOJマウスおよびRag2-/Jak3- Double Knock outマウスを岡田先生から供与頂き、クリーニング後東大医科研のマウス移植施設に移すことができた。これらを12週齢で繁殖させ今年の2月に新生児を誕生させることまでに至った(図7)。

現在以下の条件で移植の検討を行っている。

FACSでB細胞のみ除去したもの  
MACSでT細胞のみをPurifyしたもの  
PBMCをそのまま移植したもの

#### D. 考察

ATLにおける癌幹細胞に関する報告は1報のみ行われているが用いられた対象はATLの細胞株でありSP解析が中心であった。彼らはこの論文では癌幹細胞を見つけることはできなかったと報告している(BBRC 2007; 364: 808)。またATLのマーカであるCD4やCD25、CCR4等のマーカを発現する細胞に対する造腫瘍性は報告されていない。我々は癌幹細胞の解析はPrimaryの細胞を用いることが不可欠と考えており、そのため免疫不全マウスへの移植が第一目的と考えた。

我々はまず移植の手技を確認するために先行研究であるTax Transgenicマウスの腫瘍を移植し報告通りの期間で腫瘍が生着し、そのPopulationにおいて癌幹細胞が同定できることを確認した。

その後ATLの移植条件を検討することにした。ATLの移植においては8-10週齢のNOGマウス(Int. J. Cancer 2007; 121: 2205)あるいはNOD/SCID/Beta 2 microglobulin Null mouse(Leukemia 2005, 19, 1384)の新生児に移植すると生着することが報告されている。これはNOGではNK細胞がほとんど存在しないこと、新生児では免疫寛容を通して免疫のターゲットからすり抜けるなどといった免疫学的要因が重要なものかもしれない。また、あるいはマウス自体が提供する腫瘍周囲の微少環境が重要である可能性もある。これらの背景を考えて移植の条件を検討することにした。そのため比較としてはNOGマウスのアダルトと新生児にすることを当初は考えていたが実験中央研究所からはNOGの新生児は入手できなかった。そのため研究方法のところで述べたようにNOJマウスおよびRag2-/Jak3- Double Knockout mouseの新生児をNOGマウスのアダルトと比較検討することにした。これらは我々の実験動物センターで繁殖後、移植させたため今回は結果が出るころまでに至らなかった。NOGマウスの結果については6週齢から10週齢のマウスを使用した。これらの移植の結果ATL患者のPBMCを移植後、継代していくうちにCD19陽性のB細胞が増殖してしまうことを経験した。したがってこのNOGマウスの系ではこのB細胞をソーティング等でのぞいて移植することが望ましいと思われる。

また患者に対するSP細胞の解析に対する考察は中内班にお願いしている。

今後は新生児のマウスを用いて比較検討していき生着しやすい条件を選択して癌幹細胞を同定していく予定である。その際にはATLでマーカとして定義されている腫瘍の分画に造腫瘍性があるのかあるいはSP細胞は造腫瘍性を有するのかを中心に検討していき癌幹細胞分画を同定していく予定である。

#### E. 結論

ATL患者由来末梢血のNOGマウスの移植に

はソーティングやMACSを用いてB細胞をのぞいて移植を行うことが望ましい。

## F. 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** 7:81, 2010
- 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)

### (総説)

- 1) 渡邊俊樹、「14. HTLV-1」, 病理と臨床【臨時増刊号】第2部社会問題となった疾患と病理学<感染>、27:207-216、2009

- 2) 渡邊俊樹、「成人T細胞白血病とウイルス感染」, *Biotherapy*、23(3):215-223、2009年5月

### 2. 学会発表

#### (国際学会)

- 1) Takahashi R, Ando T, Nakano K, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Watanabe T. Possible dysfunction of NMD in ATL cells. 14th International Conference of Human Retrovirology: HTLV and related retroviruses”, Jul., 2009, Salvador, Brazil.
- 2) Nakano K, Matsubara A, Muto S, Kato M, Takita J, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Yamada Y, Oshima K, Ogawa S, Watanabe T. Combined Genetic Profiling of Gene Expression and Genome Copy Numbers in Adult T-Cell Leukemia. 14th International Conference of Human Retrovirology: HTLV and related retroviruses”, Jul., 2009, Salvador, Brazil.
- 3) Iwanaga M, Watanabe T, Utsunomiya A, Uozumi K, Ogata M, Uchimaru K, Okayama A, Koh K-R, Kamihira S, Yamaguchi K, for the Joint Study on Predisposing Factors of ATL Development (JSPFAD). Sequential monitoring of HTLV-1 provirus load and clinical data in HTLV-1 infected individuals in the Joint Study on Predisposing Factors of ATL Development (JSPFAD). 14th International Conference of Human Retrovirology: HTLV and related retroviruses”, Jul., 2009, Salvador, Brazil.

#### (国内学会)

- 1) 山岸 誠、中野和民、三宅在子、加賀美弥生、包 明久、宇都宮與、山口一成、内丸 薫、渡邊俊樹、「ATL細胞におけるmicroRNA発現異常の解析：miR-31の発現低下とNF-κBシグナル伝達系に及ぼす影響」、第2回HTLV-1研究会・合同班会議、2009年8月30日(2009年8月29日～30日)、東京大学医科学研究所
- 2) 石渡 優、矢持忠徳、山岸 誠、中野和民、渡邊俊樹、「植物アルカロイドセフェラン



チンによる、HTLV-1 感染細胞に対する抗腫瘍効果」、第 2 回 HTLV-1 研究会・合同班会議、2009 年 8 月 29 日～30 日、東京大学医科学研究所

- 1) 浅沼里実、渡邊俊樹、中野和民、山岸 誠、小川誠司、山口一成、宇都宮與、「成人 T 細胞白血病 (ATL) での血球系特異的転写因子 Helios の発現異常」、第 2 回 HTLV-1 研究会・合同班会議、2009 年 8 月 29 日～30 日、東京大学医科学研究所
- 2) 浅沼里実、渡邊俊樹、中野和民、山岸 誠、小川誠司、山口一成、宇都宮與、「血球系特異的転写因子 Helios の ATL における発現パターンの異常」、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 1 日 (2009 年 10 月 1 日～3 日)、パシフィコ横浜
- 3) 中野和民、松原亜以子、宇都宮與、山口一成、内丸 薫、渡邊俊樹、「HTLV-1 キャリアの遺伝子発現プロファイリングによる ATL バイオマーカー遺伝子とリスク・インディケーター遺伝子同定の試み」、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 1 日 (2009 年 10 月 1 日～3 日)、パシフィコ横浜
- 4) 矢持忠徳、浜口 功、中内啓光、長谷川秀樹、小川誠司、山口一成、宇都宮與、渡邊俊樹、「成人性 T 細胞性白血病におけるがん幹細胞の同定への試み」、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 1 日 (2009 年 10 月 1 日～3 日)、パシフィコ横浜
- 5) 山岸誠、黒川直也、副島あい、石田尚臣、中野和民、渡邊俊樹、「ATL, HTLV-1 感染細胞における EZH2 の発現及び機能的解析」、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 1 日 (2009 年 10 月 1 日～3 日)、パシフィコ横浜
- 6) 三宅在子、山岸 誠、中野和民、加賀美弥生、包 明久、宇都宮與、山口一成、内丸薫、渡邊俊樹、「ATL 患者でのマイクロアレイ技術を用いたマイクロ RNA 発現異常の解析」、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 2 日 (2009 年 10 月 1 日～3 日)、パシフィコ横浜
- 7) 石渡 優、矢持忠徳、山岸誠、中野和民、渡邊俊樹、「ビスコクラウリン型アルカイド製剤セファランチンによる、HTLV-1 感染細胞に対する細胞毒性効果」、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 2 日 (2009 年 10 月 1 日～3 日)、パシフィコ横浜
- 8) 山岸 誠、三宅在子、中野和民、加賀美弥生、包 明久、宇都宮與、山口一成、内丸薫、渡邊俊樹、「MicroRaNA Expression Profiling and Abnormal MicroRNA Expression in Adult T-Cell Leukemia」、第 71 回日本血液学会学術集会、2009 年 10 月 23 日 (2009 年 10 月 23 日～25 日)、京都
- 9) 松原亜以子、武藤早紀、加藤元博、真田 昌、田村 梓、Yuan Chen、滝田順子、宇都宮與、山口一成、山田恭輝、大島孝一、渡邊俊樹、小川誠司、「Genome-wide analysis of adult T-cell leukemia/lymphoma」、第 71 回日本血液学会学術集会、2009 年 10 月 23 日 (2009 年 10 月 23 日～25 日)、京都
- 10) 中野和民、松原亜以子、宇都宮與、山口一成、内丸 薫、渡邊俊樹、「Potential Biomarker and Risk-Indicator Genes of ATL in Gene Expression Profiling of HTLV-1 Carriers」、第 71 回日本血液学会学術集会、2009 年 10 月 23 日 (2009 年 10 月 23 日～25 日)、京都
- 11) 矢持忠徳、浜口 功、中内啓光、長谷川秀樹、小川誠司、山口一成、宇都宮與、渡邊俊樹、「Search for Cancer Stem Cell in Adult T-cell leukemia」、第 71 回日本血液学会学術集会、2009 年 10 月 24 日 (2009 年 10 月 23 日～25 日)、京都
- 12) 山岸 誠、中野和民、三宅在子、加賀美弥生、包 明久、宇都宮與、山口一成、内丸薫、渡邊俊樹、「ATL 細胞における microRNA 発現異常の解析：miR-31 の発現低下と NF- $\kappa$ B シグナル伝達系に及ぼす影響」、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 27 日 (2009 年 10 月 25 日～27 日)、東京
- 13) 中野和民、山岸 誠、三宅在子、加賀美弥生、包 明久、宇都宮與、山口一成、内丸薫、渡邊俊樹、「ATL 患者における microRNA 発現異常の解析：miR-31 の発現低下が NIK および NF- $\kappa$ B シグナル伝達系に及ぼす影響」、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日 (2009 年 12 月 9 日～12 日)、

横浜

- 14) 浅沼里実、中野和民、山岸 誠、山口一成、小川誠司、宇都宮與、渡邊俊樹、「Abnormal expression patterns of a lymphoid-specific transcriptional factor Helios in adult T-cell leukemia(ATL) cells」、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日 (2009 年 12 月 9 日～12 日)、横浜

### G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他



## 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

分担研究者：中内啓光 東京大学医科学研究所 教授  
研究協力者：守田陽平 東京大学医科学研究所 特任助教

### 研究要旨

本分担研究では、ヒトのATL患者検体を用いて、ATLのがん幹細胞(ATL-CSCs)の同定を行う事を目的に、Taxトランスジェニックマウスモデルで明らかにされたCSC分画の特性を利用し、FACSを用いてATL患者検体およびSCIDで造腫瘍性を示す細胞集団のside population(SP)解析や網羅的な表面抗原の解析を進めてCSC候補集団を同定し、そのバイオマーカーを明らかにする。本年度は、基本的な実験条件検討を開始し、Tax-TgのATL様細胞の移植系の表面抗原解析検討を行った他、ATL患者4検体についてSP解析を行った。SP解析の結果4例中1例で著明なSP分画が存在する事が確認されたが、3例ではSPが同定出来ず、症例間の多様性が示唆された。

### A. 研究目的

ATLは、我が国に110万人存在するHTLV-1の無症候性キャリアーから毎年1,000人ほど発症する極めて悪性度の高いT細胞腫瘍である。急性骨髄性白血病などと異なり、ATLの多剤併用化学療法は薬剤耐性の出現などの理由で未だに予後は極めて不良であり、早急な診断・発症予防・革新的治療法の開発が急務である。ところで、急性骨髄性白血病の一部では、がん幹細胞と思われる分画が同定され(CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>)、この分画が免疫不全マウスに腫瘍死をもたらすことが示されている(Bonnet D. and Dick J.E. Nat. Med. 3: 730-737, 1997)。がん幹細胞は治療に抵抗性であることが示唆されており、この分画をターゲットとした薬剤の開発が進められている。

研究代表者の渡邊俊樹らは、Taxトランスジェニックマウスで得られた所見から、ヒトのATLでもがん幹細胞(ATL-CSCs)が存在することを予想した。そこで渡邊はATL-CSCsの存在を明かにし、ATLの治療戦略や無症候性キャリアーからのATL発症予知に役立てることをめざしたプロジェクトチームを結成した。我々は本年度の研究で、種を超えた幹細胞のマーカー

ーとして知られているside population(SP)(Goodell M.A. et al. Nat Med. 3: 1337, 1997)をヒトのATL患者検体で検出できるか試み、Taxトランスジェニックマウスで得られたCSCsに関する所見が再現できるか検討した。

### B. 研究方法

#### 1) 患者検体の採取および倫理面への配慮

患者および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)に登録されている3名と、東京大学医科学研究所・血液腫瘍内科の患者1名から末梢血を採取(ヘパリン添加)した。

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、研究開始前に本研究所・倫理審査委員会に提出し、承認を得た。患者に研究内容、採血以上の危険はないこと、および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。

#### 2) 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°C、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°C ですべての操作を行った。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、フローサイトメーターで解析した。

### 3) フローサイトメーターによる side population (SP) 解析

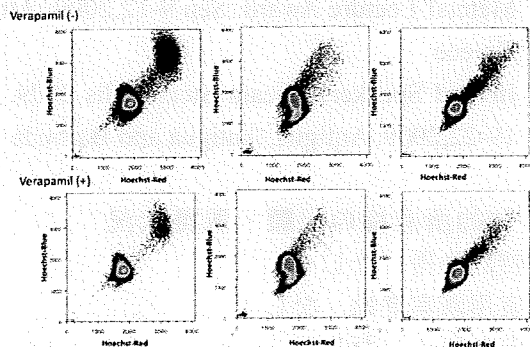
side population (SP) 解析は、UV レーザー (波長 350 nm) を装備した MoFlo (Beckman-Coulter 社) で行った。

## C. 研究結果

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。

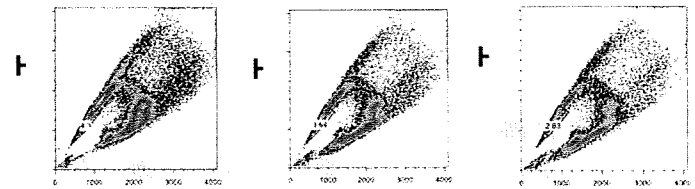
### 図 1 ATL 細胞の side population 解析 (1)

解析した 4 名の ATL 患者から得られた ATL 細胞のうち、3 名の細胞には SP 分画は認められなかった。



### 図 2 ATL 細胞の side population 解析 (2)

解析した 4 名の ATL 患者から得られた ATL 細胞のうち、1 名の細胞には SP 分画に有意な頻度の細胞が認められた。



## D. 考察

### 考察

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<sup>c</sup>-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>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である CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>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の網羅的解析なども必要と考えられる。

## E. 結論

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の解析などを幅広く検討する必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) Sanada M, Suzuki T, Shih LY, Otsu M, Kato M, Yamazaki S, Tamura A, Honda H, Sakata-Yanagimoto M, Kumano K, Oda H, Yamagata T, Takita J, Gotoh N, Nakazaki K, Kawamata N, Onodera M, Nobuyoshi M, Hayashi Y, Harada H, Kurokawa M, Chiba S, Mori H, Ozawa K, Omine M, Hirai H, Nakauchi H, Koefler HP, Ogawa S. Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms. *Nature.* 460:904-8, 2009.
- 3) 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.
- 4) 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
- 5) 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

- 6) 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

### 2. 学会発表

(国際学会/Nakauchi H)

- 1) Invited Speaker: USA-Japan Cooperative Cancer Workshop. Mar 27-29, 2009. Hawaii, USA
- 2) Invited Speaker: Symposium on Molecular Mechanisms of Adult Stem cell Aging. May 21-24, 2009. Reischensburg, Germany
- 3) Invited Speaker: International PhD Program in Immunology, Cell Biology and Biochemistry 2008-2009 Lecture Course "Molecular regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and dormancy". May 28, 2009 Switzerland
- 4) Invited Speaker: 7th Catholic Int. Stem Cell Symposium in Seoul. June 10-12, 2009. Seoul, Korea
- 5) Invited Speaker: Korean Association for Laboratory Animal Science. Aug 26-28, 2009. Chungnam Cheonan-si, Korea
- 6) Invited Speaker: The 2009 ISEH Donald Metclaf Lecture Award. Sep 9-12, 2009. Athens, Greece
- 7) Invited Speaker: Abcam Stem Cells 2009. Nov 19-22, 2009. Antigua, Antigua and Barbuda

## G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

## 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

研究分担者：浜口 功 国立感染症研究所・血液安全性研究部

研究協力者：大隈 和 国立感染症研究所・血液安全性研究部

滝澤和也 国立感染症研究所・血液安全性研究部

水上拓郎 国立感染症研究所・血液安全性研究部

### 研究概要

成人T細胞白血病(ATL)はヒトT細胞白血病ウイルスI型(HTLV-1)の感染によって引き起される最も治療困難な白血病の1つであり、日本では120万人のキャリアが存在し、毎年1000人が発病し、病態のメカニズム解明が喫緊の課題である。

成人T細胞白血病リンパ腫(ATL)様の病態を再現するHTLV-1 Tax トランスジェニックマウス(Tax-Tg)はLckプロモータの制御下で、ヒトT細胞白血病ウイルスI型(HTLV-1)の非構造蛋白p40tax(Tax)遺伝子を発現する。このマウスを用いて、ATL様腫瘍幹細胞の同定を試みた。Tax-Tg由来の脾臓細胞(SLC)を免疫不全マウス(NOD/SCID)マウスの腹腔内に移植すると、約30~60日で腫瘍形成が認められた。また、NOD/SCIDマウスにおいて形成された腫瘍細胞を新たなNOD/SCIDマウスに移植することにより、連続3回にわたり腫瘍が再形成されることが確認された。この結果はSLC中に腫瘍再構築能を有するCSCが存在していることを示唆していた。また、CD38-/CD71-/CD117+の分画に0.03%程度の細胞集団が存在し、100個の当細胞をNOD/SCIDマウスに移植した。すると約60日で腫瘍が再形成された。現在さらに詳細な解析を行っている。

### A. 研究目的

成人T細胞白血病リンパ腫(ATL)はヒトT細胞白血病ウイルスI型(HTLV-1)の感染によって引き起される最も治療困難な白血病の1つであり、日本では120万人のキャリアが存在し、毎年1000人が発病する。HTLV-1感染細胞からATL発症のプロセスにおいて、腫瘍幹細胞の発生の可能性も考えられる。成人T細胞白血病リンパ腫(ATL)様の病態を再現するHTLV-1 Tax トランスジェニックマウス(Tax-Tg)を用い、腫瘍幹細胞の同定を試みた。

### B. 研究方法

#### 1) 動物

移植実験には6から12週齢のNOD/SCIDマウス(NOD.CB17-Prkdc<sup>scid</sup>/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<sup>5</sup>個をNOD/SCIDマウスに腹腔内投与することにより確認された。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