

植を行った。10<sup>5</sup>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<sup>6</sup>個(n=5)、10<sup>5</sup>個(n=4)、10<sup>4</sup>個(n=3)、10<sup>3</sup>個(n=5)、10<sup>2</sup>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 (2.5µg/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、2µg/mLのpropidium iodide (BD Biosciences)を加えてサンプルを準備した。抗体は全てeBioceience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、骨髓(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。4µm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グラス上に乗せ、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-µm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<sup>3</sup>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、  
*Notch1* (5'-CGTGGTCTTCAAGCGTGATG-3' と 5'-AGCTCTTCCTCGTGGCCATA-3')、  
*CD44*(5'-AGCTGACGAGACCCGGAAT-3' と 5'-CGTAGGCACTACACCCCAATC-3')、  
*Rex1*(5'-TGTGCTGCCTCCAAGTGTG-3' と 5'-ATCCGCAAACACCTGCTTTT-3')、  
*N-cadherin*(5'-CACAGCCACAGCCGTCATC-3' と 5'-GCAGTAACTCTGGAGGAT TGTC-3')。Tax、*CD117*、*Bmi1*、*SCL/tal-1*と $\beta$ -actinは参考文献参照のこと。内部標準には $\beta$ -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 $\beta$ -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 $5 \times 10^6$ 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'-TGT TGC ATA CAG GAA GCC CA-3'と5'-GCG GTA CAG TGT GTG CTT TGA G-3')とTax-Tgマウス用(5'-GAC ACAGCA TAG GCT ACC TGG C-3'と5'-GCG GTA CAG TGT GTG CTT TGA G-3')。PCR反応にはExTaq(Takara)を使用し、95°C:2分に続けて、94.0°C:30秒 58°C:30秒 72°C:30秒。で40サイクル行った。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。

### C,D.研究結果および考察

#### 1.HTLV-1Tax-TG マウス由来の腫瘍脾臓細胞

(SLC)を解析した結果、非常にマイナー集団である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Multi-drug Resistance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)を100個、NOD/SCIDマウスの腹腔内へ移植すると、およそ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認められた。

3. 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。

### E.結論

HTLV-1 Tax TGマウスにおいて自然発症するATL様の脾腫細胞(SLC)は、NOD/SCIDマウスの腹腔内に移植することにより、およそ30-60日で腫瘍が再形成される。我々はこの脾腫細胞中のCD38-/CD71-/CD117+分画に腫瘍再形成能を有する腫瘍幹細胞(CSC)が存在することを明らかにした(Blood, 2009)。この発見はHTLV-1感染細胞からATLを発症する過程において、腫瘍幹細胞が生み出され、これが悪性腫瘍化に大きく関与していることを示唆するものであった。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。

### F.研究発表

#### 1.論文発表

1) Jumpei Yamazaki, Takuo Mizukami, Kazuya Takizawa, Madoka Kuramitsu, Haruka Momose,

Atsuko Masumi, Yasushi Ami, Hideki Hasegawa, William W. Hall, Hajime Tsujimoto, Isao Hamaguchi, and Kazunari Yamaguchi. Identification of cancer stem cells in a Tax-transgenic (Tax-Tg) mouse model of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*. 2009;114:2709-2720

## 2.学会発表

- 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)

## H.知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## 参考文献

- 1) Hasegawa H, Sawa H, Lewis MJ, et al. Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. *Nat Med*. 2006;12(4):466-472.
- 2) Mizukami T, Kuramitsu M, Takizawa K, et al. Identification of transcripts commonly expressed in both hematopoietic and germ-line stem cells. *Stem Cells Dev*. 2008;17(1):67-80.

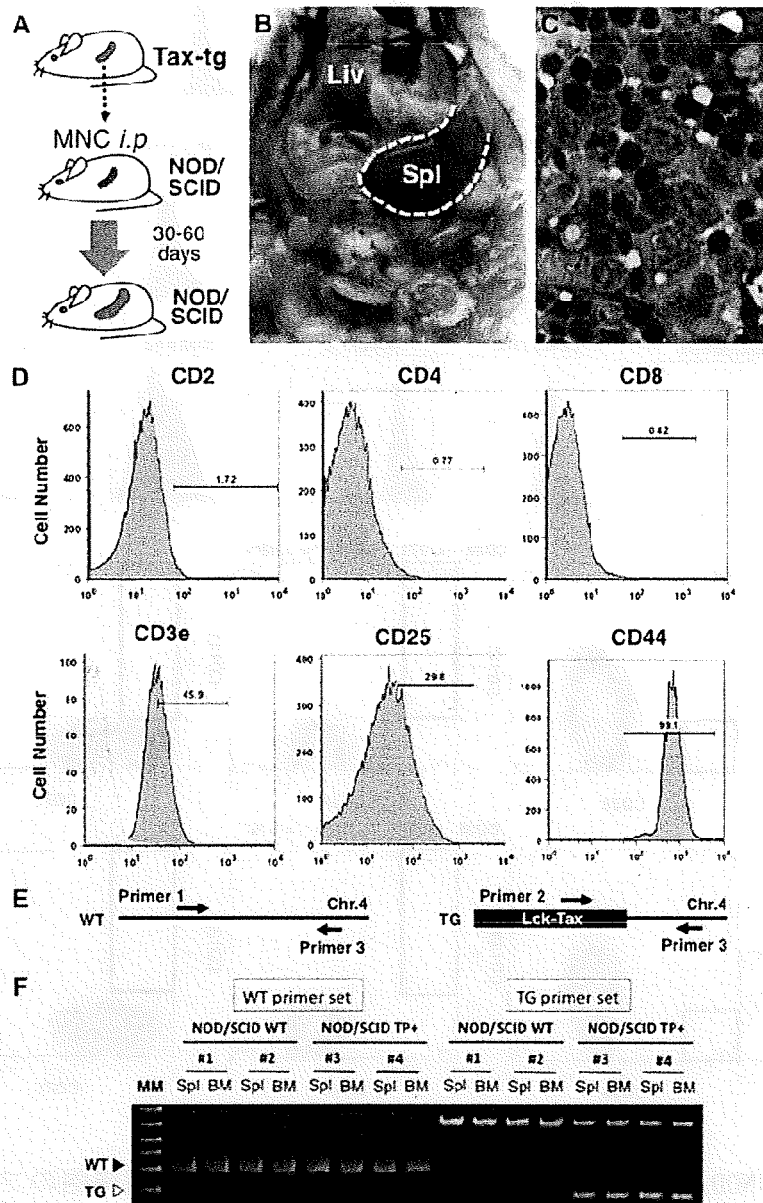


図 1. NOD/SCID マウスへの Tax-TG マウス由来脾臓単核細胞の移植

(A) 移植実験の概要図、(B) NOD/SCIDにおいて観察されたリンパ腫再構築能力を持つ脾臓細胞。Spl: 脾臓、Liv: 肝臓。(C) 再構築されたリンパ腫から回収された脾臓細胞のサイトスピン標本。(D) 脾臓のリンパ腫細胞の表面マーカー解析。(E) 導入遺伝子を確認するためのPCRの図式、Lck-Tax導入遺伝子は、初代のトランスジェニック動物の4番染色体 (Chr. 4) 上にタンデムに挿入されている。(F) 脾臓と骨髄の細胞におけるゲノタイピング。WTの増幅産物(300 bp)、Tax-Tg (TG)の増幅産物(200 bp)。TP+: 非移植

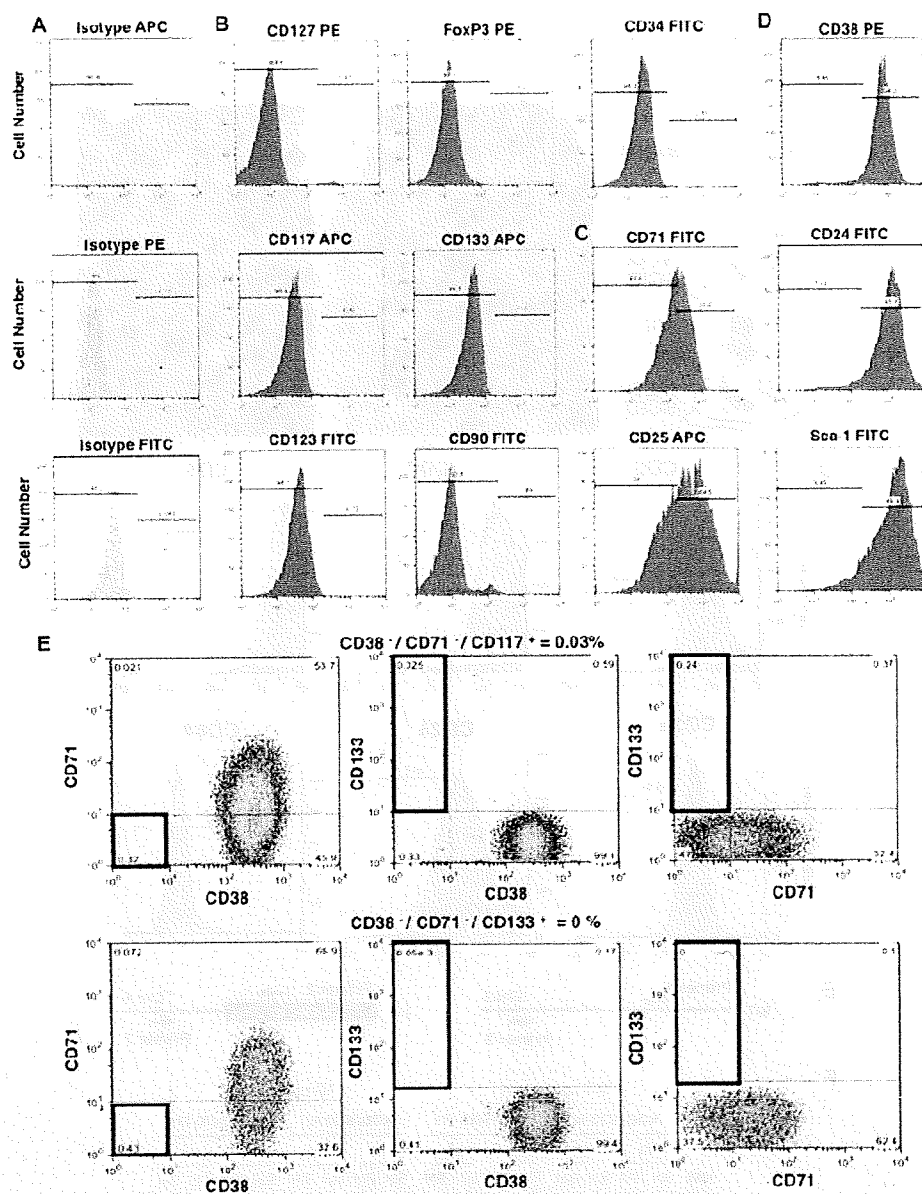


図 2. NOD/SCID マウスに再生した ATL 様リンパ腫細胞のフローサイトメトリー解析

(B) 部分的あるいは低い発現型: CD127、CD117、CD123、FoxP3、CD133、CD90、CD34 の SLCs における発現は低レベルであった。(C) Heterogeneous な発現型: CD71 と CD25 は Heterogeneous な発現を示した。(D) 主要型: CD38、CD24、Sca-1 は SLCs において高い発現を示した。個々の部分母集団のパーセンテージは、各アイソタイプのコントロールによって評価される解析結果から測定した。(E) SLCs における CD38、CD71、CD117 または CD133 のトリプル染色。総 SLCs に占める CD38<sup>-</sup>/CD71<sup>-</sup>/CD117<sup>+</sup>細胞の割合は 0.03%、CD38<sup>-</sup>/CD71<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>細胞の割合は 0%であった。

表 1. NOD/SCID マウスに再生した ATL 様リンパ腫細胞の表面マーカー解析

Phenotype	Frequency (%)
<b>CD38-/CD71-/CD117+</b>	<b>0.03-0.05</b>
CD38-/CD71-/CD33+	0
CD38-/CD71-	0.3-0.5
CD38-/CD117+	0.10
CD71-/CD117+	0.15
CD38-/CD133+	< 0.01
CD71-/CD133+	< 0.01
<b>Side Population cells*</b>	<b>0.03-0.06</b>
Aldehyde dehydrogenase activity*	0

Summary of surface marker combination analysis of ATL-like lymphoma cells in the NOD/SCID mouse.

CD38-/CD71-/CD117+ cells were overlapped with side population cells. \*Functional assay.

表 2. 限界希釈法による腫瘍幹細胞 (CSCs) の評価

No. of cells	Whole Spleen Cells (SLCs)	CSCs (CD38-/CD71-/CD117+)	Non-CSCs (CD38+/CD71+/CD117-)
<b>Short term incubation (40 days)</b>			
10 <sup>6</sup>	5/5	NT	NT
10 <sup>5</sup>	3/4	NT	NT
10 <sup>4</sup>	3/3	NT	NT
10 <sup>3</sup>	1/5	NT	NT
10 <sup>2</sup>	0/7	0/6	NT
<b>Long term incubation (60days)</b>			
10 <sup>2</sup>	0/11	9/9	0/11

Assessment of stem cell activity in the ATL-like lymphoma cell using limiting dilution assay of transplantation cells. One CSC was thought to exist in 104 SLCs. At long-term incubation, only CSC fractions can repopulate and regenerate original ATL-like lymphoma in the NOD/SCID mouse. NT indicates no transplantation.

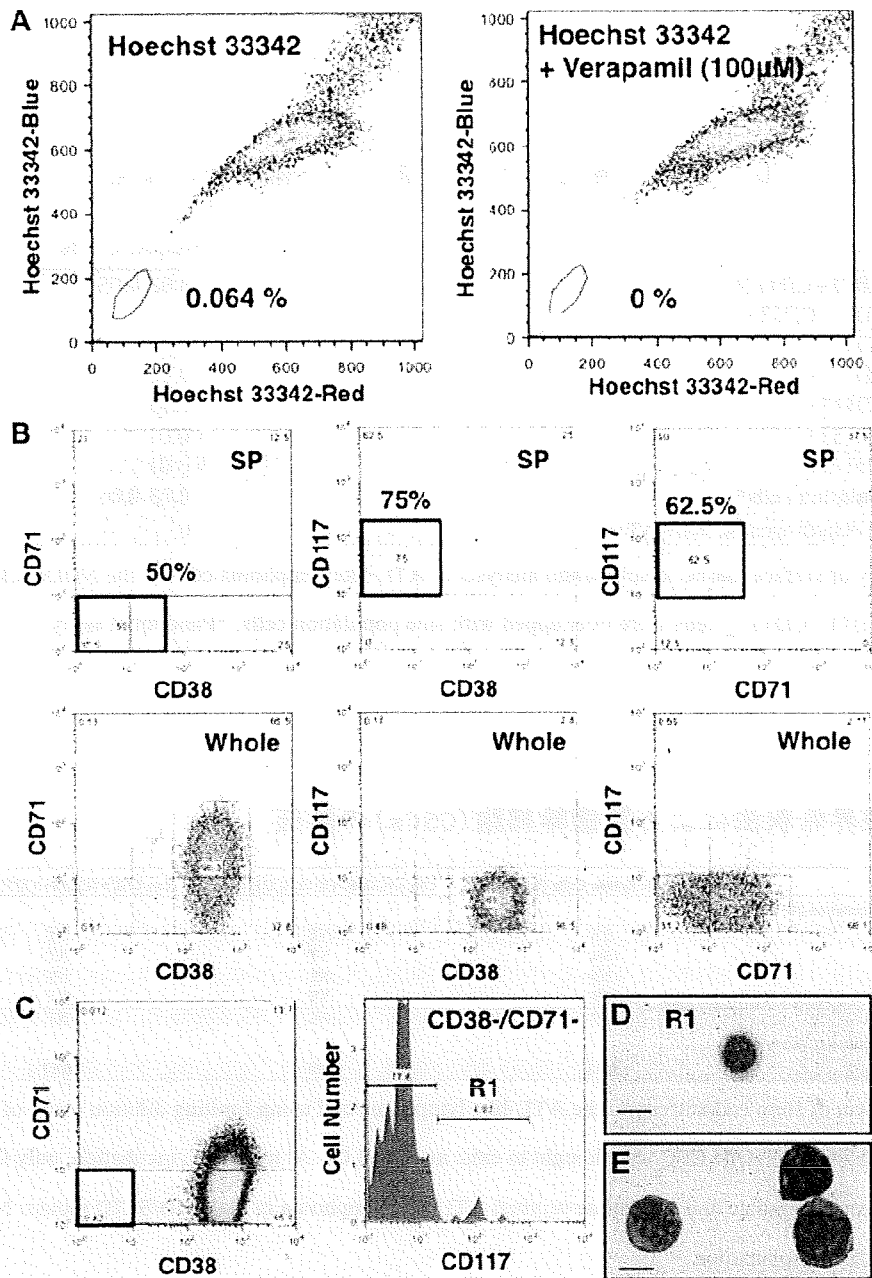


図 3. NOD/SCID マウスに再生した ATL 様リンパ腫細胞の機能解析

(A) NOD/SCIDマウスに再生したATL様リンパ腫細胞のSP細胞。SP分画は各パネル上の台形によって示す。SLCのおよそ0.064%でSP分画が観察された(左のパネル)。SP分析の後、Verapamil (100M) で処理するとSP分画が消失した。(右パネル)。(B) SP分画中のCD38、CD71、CD117によるトリプル染色分析。CD38-/CD71-/CD117+細胞の50%以上が、SP分画と一致した。(C) CD38-/CD71-/CD117+とCD38-/CD71-/CD117-細胞集団のFACS像。(D) CSC候補細胞(CD38-/CD71-/CD117+)と(E) Non-CSC細胞(CD38+/CD71+/CD117-)集団のサイトスピン標本のWright/Giemsa染色像。

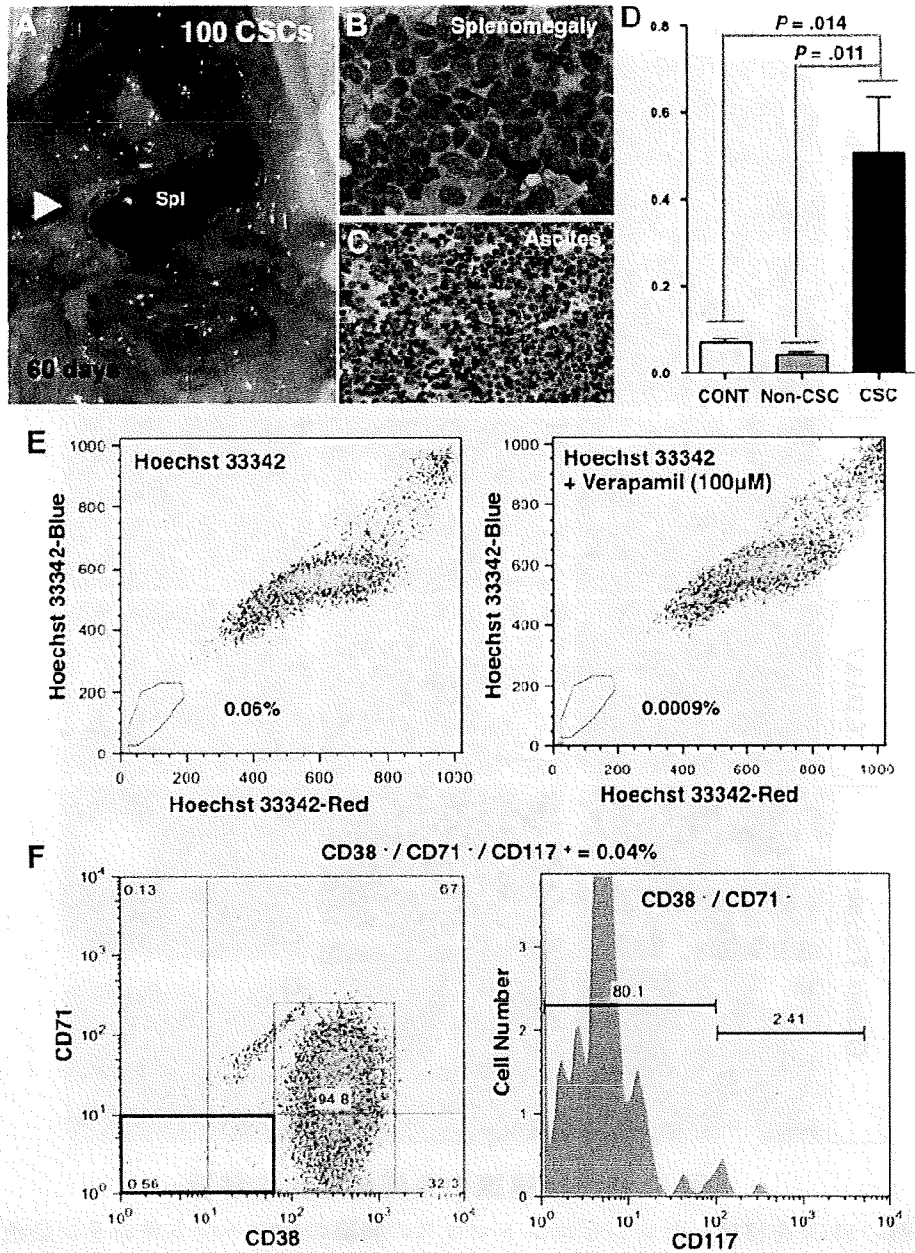


図 4. 100 個の腫瘍幹細胞 (CSCs) の ATL 様リンパ腫の再生能力

(A) NOD/SCID マウスに、100 個の CSCs を移植した後、60 日で ATL 様リンパ腫が再生された。(B) 顕著な脾腫が NOD/SCID レシピエントマウスで観察された。(C) NOD/SCID レシピエントマウスでは腹水も観察された。(D) 総脾臓重量は、CSC を移植した NOD/SCID マウスでのみ大幅に増加した。(E) 100 個の CSC 移植後、総計 0.066% の SP 分画が存在した (左のパネル)。SP 分画のドットは、100M の Verapamil で処理すると消失した (右パネル)。(F) 100 個の CSC 移植によって再生したリンパ腫細胞の表面マーカー解析。CSC 候補細胞 (CD38<sup>-</sup>/CD71<sup>-</sup>/CD117<sup>+</sup>) もまた、100 個の CSC 移植の後に再生されていることが確認された。



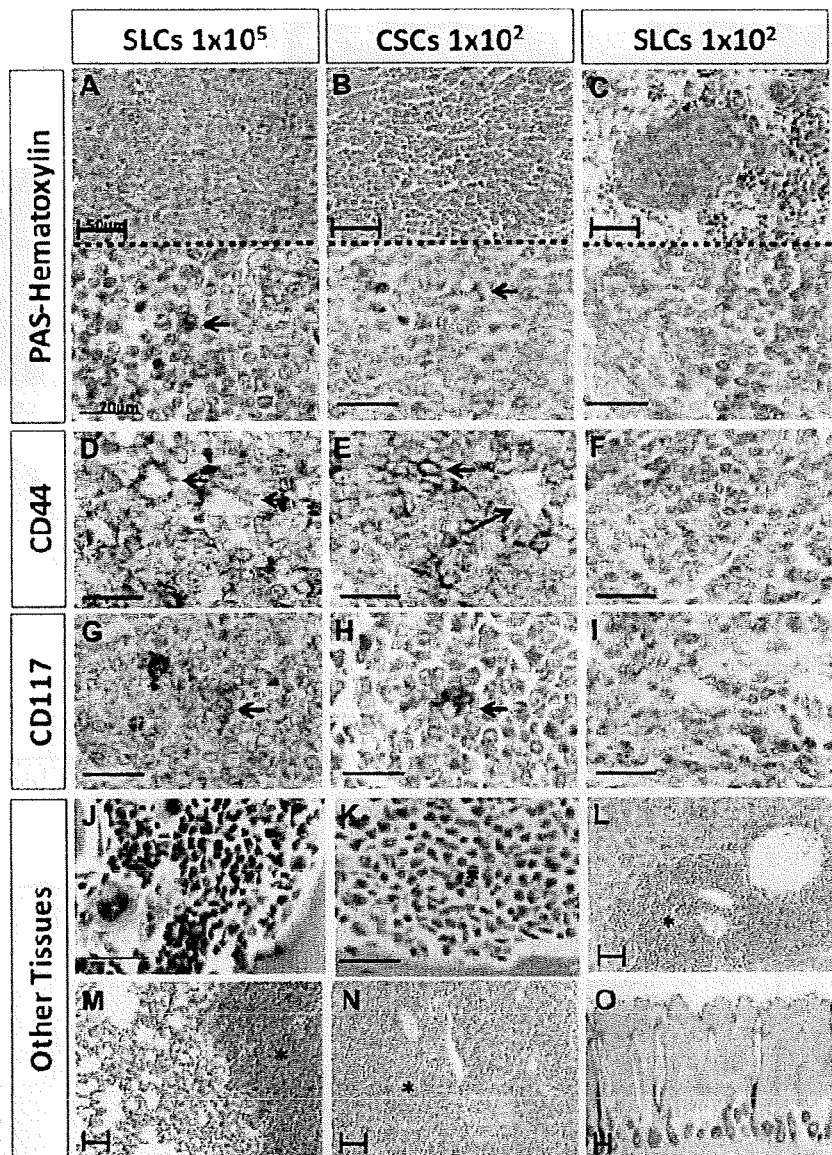


図 5. 移植後脾臓の免疫組織化学解析

(A)  $10^5$ 個の SLCs を移植したレシピエントマウスの脾臓のPAS-ヘマトキシリン染色像。低倍率(上段のパネル)、高倍率(下段のパネル)。(B) 100 個の CSCs を移植したレシピエントマウスの脾臓のPAS-ヘマトキシリン染色像。(C) 100 個の Non-CSCs を移植したレシピエントマウスの脾臓のPAS-ヘマトキシリン染色像。(D-I) CD44 と CD117 に対する免疫組織化学。(D, G)  $10^5$  個の SLCs を移植したレシピエントマウスの脾臓。(E, H) 100 個の CSCs を移植したレシピエントマウスの脾臓。(F, I) 100 個の Non-CSCs を移植したレシピエントマウスの脾臓。(J) 正常な NOD/SCID マウスの骨髄 (BM) のヘマトキシリン-エオシン (H&E) 染色像 (K) リンパ腫を再生した NOD/SCID マウスの骨髄のヘマトキシリン-エオシン (H&E) 染色像 (L) 肝臓にもリンパ腫細胞の浸潤が見られた。(M) 肺へのリンパ腫細胞の浸潤。(N) リンパ節へのリンパ腫細胞の浸潤。(O) 上皮組織へのリンパ腫細胞の浸潤は見られなかった。

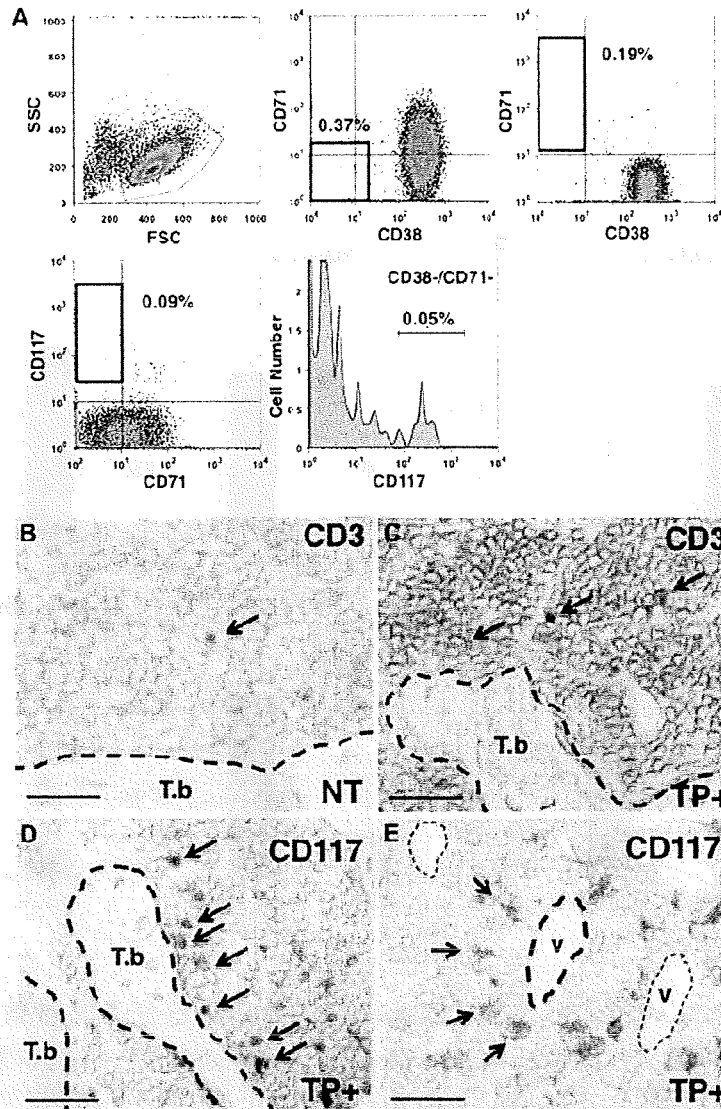


図 6. NOD/SCID 骨髄中のリンパ腫細胞のフローサイトメトリー解析と免疫組織化学解析

骨髄から回収した生着リンパ腫細胞。(A) BM-SLCsのCD38、CD71、CD117によるトリプル染色分析。脾臓に見られたようなCSC候補細胞が骨髄でも認められた。(B) NOD/SCIDマウス骨髄中のATL様リンパ腫細胞の組織学的解析。正常なNOD/SCIDマウスの骨髄中ではCD3陽性細胞は稀な集団であるが(黒い矢印)、(C)再構築したNOD/SCIDマウス骨髄中ではCD3陽性細胞が容易に観察された。(D) CSCマーカーの代用として用いたCD117陽性細胞は骨梁(trabecular bone)のosteoblastic nicheにおいて検出された。(E) 髄質部(medullary region)のCD117陽性細胞は、vascular nicheにおいても認められた。T.b, 骨梁の骨内膜領域；V, 血管；TP+, 移植マウス；NT, 非移植マウス。

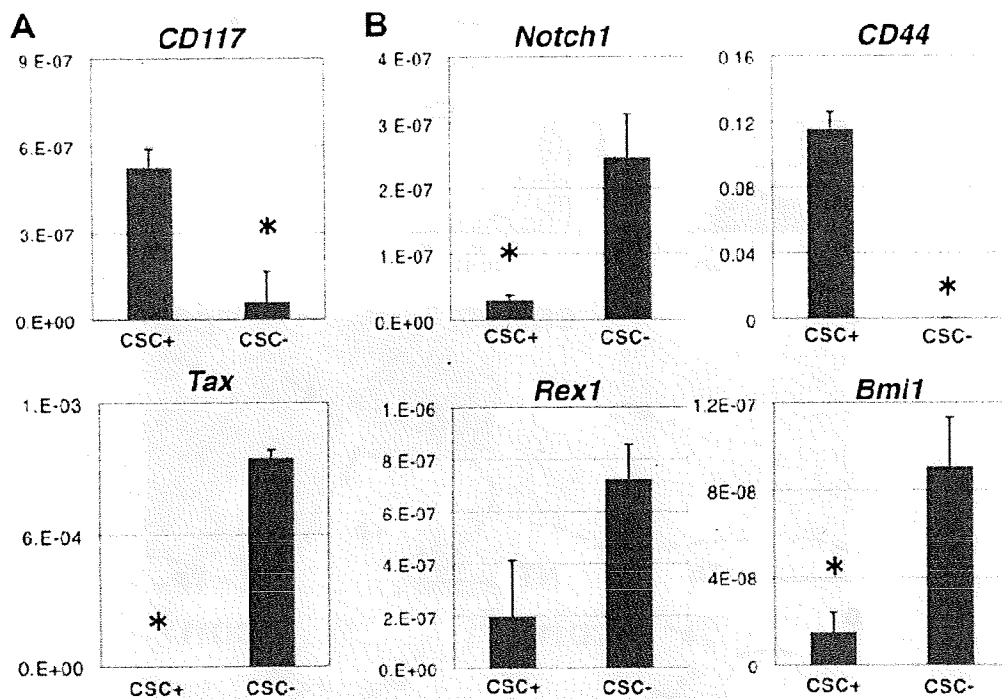


図 7. CSCs と Non-CSCs 細胞に見られる分子的特徴

FACSソーティングにより分取された5000個のCSCsとNon-CSCsからRNAを精製し、cDNAを合成した。遺伝子発現レベルは対 $\beta$ actin比により決定された。(A) *CD117*の発現は細胞ソートの有効性を評価するのに使用したが、*CD117*の発現はNon-CSCsに比べ、CSCsでより高かった(上段のパネル)。Tax遺伝子の発現はCSCsでは検出されなかった(下段のパネル)。(B) *Notch1*と*Bmi1*の発現はCSCsで抑制されており、*CD44*の発現はCSCsで亢進されていた。*Rex1*、*Flt3*、*SCL/tal-1*、*Ncadherin*、*Oct-4*、*Nanog*の発現はCSCsとNon-CSCの間に差は見られなかった。\* $P < .05$  (有意)。

## 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

分担研究者：長谷川秀樹（国立感染症研究所、感染病理部）

研究協力者：辻 隆裕（国立感染症研究所、感染病理部）

### 研究要旨

我々は、HTLV-1 の Tax 遺伝子の発現を lck proximal promoter でコントロールすることで、ヒト ATLL に類似した白血病・リンパ腫を発症するトランスジェニックマウスを作成した。白血病を発症したマウスではヒト ATLL と同様、血管周囲性に著明な白血病細胞の浸潤を認めた。そこでマウス ATL モデルとヒト ATL 患者組織を用い、免疫細胞の誘走に深く関係するケモカイン SDF-1a とそのレセプター CXCR4 の相互作用が ATL 細胞の組織浸潤にどのように関与しているか検討した。SDF-1a 蛋白質は免疫組織化学的にマウスおよびヒト ATL 患者の肝臓で白血病細胞の浸潤を伴った胆管上皮細胞に高発現していた。また ATL マウスモデルの白血病細胞を SCID マウスに移植し、CXCR4 拮抗薬である AMD3100 を投与したところ、肺、および肝臓への白血病細胞浸潤が *in vivo* で抑制された。以上のことから ATL 細胞の浸潤には SDF-1a/CXCR4 経路が深く関わっており、その経路を阻害する AMD3100 は、ATL 細胞浸潤を抑制する新しい治療薬の候補となると考えられた。

### A. 研究目的

ATLL における白血病細胞の浸潤メカニズムを明らかにし、そこをターゲットとした新しい治療法を開発することを目的とする。

### B. 研究方法

#### 材料と方法：

#### ・細胞

Tax トランスジェニックマウス由来の白血病/リンパ腫細胞  $1 \times 10^6$  個を RPMI に懸濁し、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 medium (10% Fetal Bovine

Serum,  $\beta$ -mercapt ethanol) で行なった。

#### ・免疫組織化学

組織は中性緩衝ホルマリンで固定後、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) でブロッキング反応を室温で 60 分間行なった。一次抗体反応は 4 度 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 diamin-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 度 overnight で反応させ、その後 labeled polymer-HRP antimouse conjugation(Envision system; DAKO)を 90 分反応させた。発色は diamino-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。

#### ・ AMD3100 による in vivo での白血病細胞浸潤抑制実験

それぞれ  $5 \times 10^2$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^4$  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 20ug/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 300ug 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 beta-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 Beta-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-CCCCAAATATCCCCCGGG-TAMRA-3' を用い、beta-actin 遺伝子の定量には 5'-CACCGATCCACACAGAGTACTTG-3' と 5'-CAGTGCTGTCTGGTGGTACCA-3 と beta-actin probe: 5'-FAM-CAGTAATCTCCTTCTGCATCCTGTCA GCAA-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。

## C. 結果

### 1.マウスとヒト肝臓における SDF-1a 蛋白質の局在

SDF-1a の組織内局在を調べるため、マウスとヒトそれぞれの SDF-1a に対する抗 SDF1a 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-1a の弱い陽性像が認められた (図 1A, B)。HTLV-I TaxTg マウスでは、SDF-1a 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 1C, D)。ATL 患者肝臓でも TaxTg マウスと同様に、胆管上皮細胞に SDF-1a 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 1E-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-1a 陽性に染色された (図 1I, 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 2A)。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 2B)。  $5 \times 10^3$  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 2A, 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 2A)。  $5 \times 10^4$  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 2A, 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。

## D. 考察

進行した ATL 患者では皮膚、骨髄、脾臓、肝臓、肺および脳等の多臓器へ白血病細胞が浸潤することが知られている。しかし、ATL 細胞の浸潤メカニズムはこれまでほとんどわかっていなかった。ケモカインは白血球およびその他の細胞の遊走と活性化に関わる分泌蛋白質で、7回膜貫通型の G 蛋白質であるケモカインレセプターと相互作用することによりその効果を示す。ケモカインは正常白血球のみならず、いくつかの悪性腫瘍においても、腫瘍細胞の生存や増殖、あるいは転移に関与することが知られている。たとえば、CXCR4 を発現するある種の乳癌細胞は、転移した部位に高濃度の SDF-1a が認められることが報告されている。SDF-1a と CXCR4 の相互作用が前立腺癌の骨髄転移に関係するとする報告もある。

これまでの我々の研究で CXCR4 は mATL 細胞表面で発現が認められる一方、SDF-1a はマウス肝臓、肺、脳、脾臓等の臓器で発現がみられるものの mATL 細胞自身には発現していないことがわかっている。今回、白血病を発症したマウスおよびヒト ATL 患者の肝臓で、SDF-1a を高発現する胆管上皮周囲へ集中的に白血病細胞浸潤が認められたことから (図 1)、SDF-1a/CXCR4 の経路が ATL 細胞の浸潤に重要な役割を果たしていると考えられた。

また白血病での腫瘍微小環境の構築には、骨髄間葉系細胞の発現する SDF-1a と、白血病細胞や白血病幹細胞が発現する CXCR4 が大きな役割を果たしていると言われている。この微小環境は腫瘍細胞を薬剤誘導性の細胞死から保護するように機能していると言われている。AMD3100 は腫瘍微小環境の構築を阻害するように働くため、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 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 細胞の数による影響を受けていた。最初に移入する mATL 細胞数が大量になれば、AMD3100 による白血病細胞の浸潤抑制効果が及ば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ものと考えられる。

## E. 結論

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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yamazaki J, Mizukami T, Takizawa K, Kuramitsu M, Momose H, Masumi A, Ami Y, Hasegawa H, Hall W. W, Tsujimoto H, Hamaguchi I, Yamaguchi K Identification of Cancer Stem Cells in a Tax-transgenic (Tax-Tg) Mouse Model of Adult T- Cell Leukemia / lymphoma (ATL). **Blood** 2009 Sep 24;114(13):2709-20. Epub 2009 Jul 7
- 2) 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** 2009 Oct 1;114(14):2961-8. Epub 2009 Aug 5.

### 2. 学会発表

- 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) 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 CXCR4 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

G. 知的財産権の出願、登録状況  
なし

図1

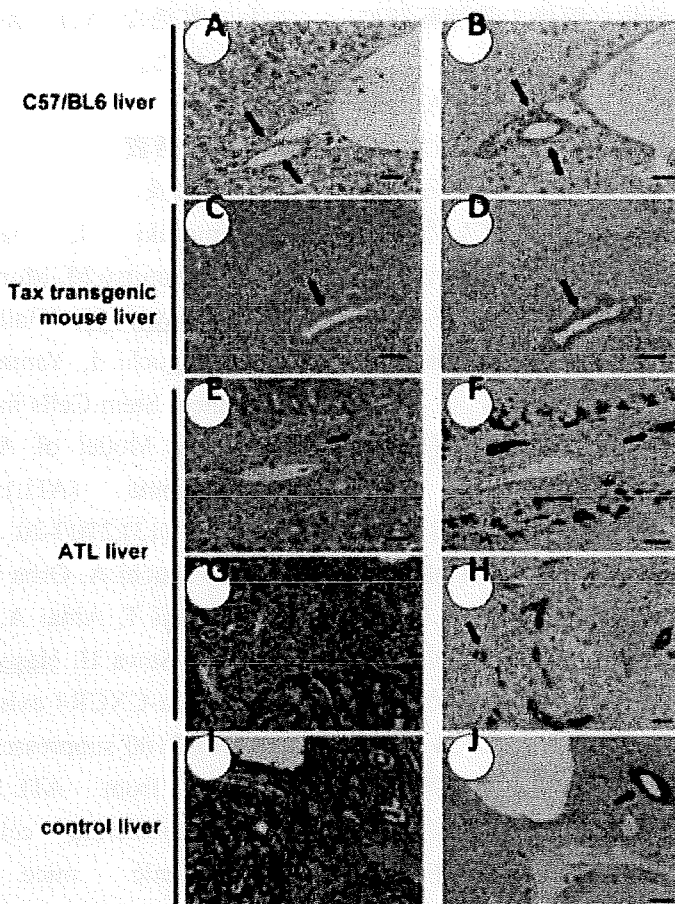


図1: 肝組織におけるSDF-1 $\alpha$ の発現。A, C, E, G, I; HE染色, B, D, F, H, J; SDF-1 $\alpha$ の免疫組織化学染色。C57BL6マウス肝臓(A, B), HTLV-I Taxトランスジェニックマウス肝臓(C, D), ATL患者の肝臓(E-H), 非ATLのヒト肝臓(I, J)。いずれの肝組織においても肝内胆管上皮細胞がSDF-1 $\alpha$ 陽性である。ATL細胞浸潤のみられる肝臓(C, D: HTLV-I Taxトランスジェニックマウス, E-H: ヒトATL患者)では、SDF-1 $\alpha$ 陽性の胆管上皮の周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

図2

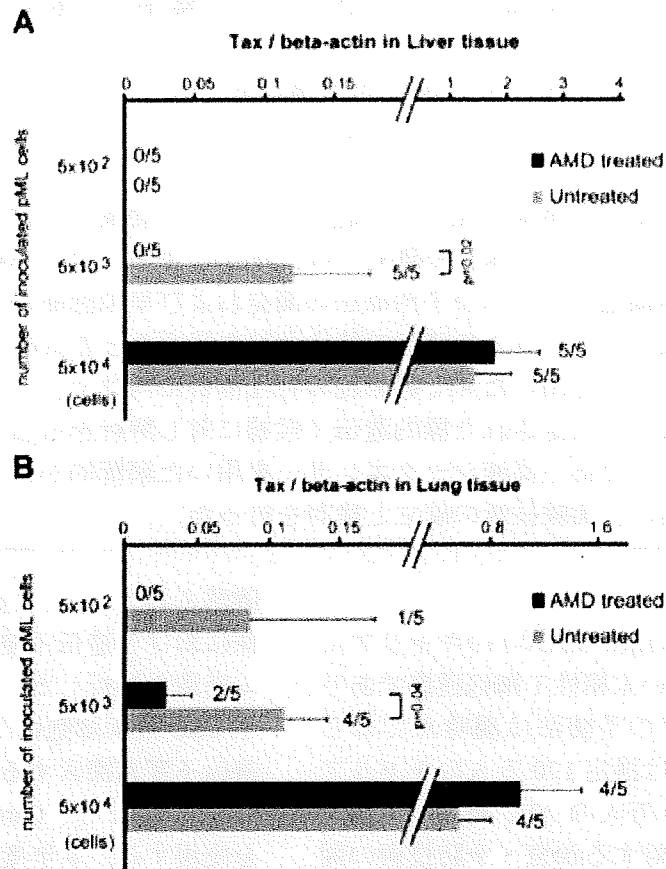


図2: AMD3100によるmATL細胞のin vivoでの浸潤抑制。mATL細胞の肝臓(A)と肺(B)への浸潤が抑制された。 $5 \times 10^2$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^4$ 個のmATL細胞をSCIDマウスに移植し、AMD3100(AMD treated)あるいはPBS(Untreated)を3週間(週5回)にわたり投与した。mATL細胞の肝臓および肺への浸潤の程度はHTLV-I Tax遺伝子の定量PCRで検討した。Beta-actin遺伝子量に対する相対的なTax遺伝子量を比で示す。



## ATLにおけるゲノム異常の解析

分担研究者：小川誠司 東京大学医学部附属病院がんゲノミクスプロジェクト特任准教授

### 研究要旨

ATLは、HTLV-1感染不死化T細胞に5つ以上の変異が蓄積された結果発症すると考えられている。本分担研究では、HTLV-1キャリアに出現する腫瘍化T細胞/ATL幹細胞に対する分子治療法の開発および早期診断の基盤構築をめざし、ゲノムの視点からこれらの細胞の特性解析を行うことを目的とする。本年度は、マイクロアレイを用いたATL幹細胞の特性解析に向けて、これまでにATL検体を用いた研究で同定された標的遺伝子候補に対し解析を行ったほか、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。

### A. 研究目的

成人T細胞白血病(ATL)はHTLV-1のキャリアに発症する悪性度の高い末梢性T細胞腫瘍であり、有効な治療法や発症の予防法は現時点で知られていない。日本では推定120万人のキャリアから今後新たに5-10万人のATL発症が予測されており、本疾患に対する治療・予防技術の開発を行うことは医療・行政上極めて重要かつ緊急の課題である。

本分担研究では、ATLの早期診断・画期的根治療法開発に向けた基盤構築を目的とし、ATL患者中の腫瘍細胞及びがん幹細胞特性を有した細胞群(ATL-CSCs)について、マイクロアレイ及び高速シーケンス技術を用いた実験によりゲノムの視点から特性解析を行う。

### B. 研究方法

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、(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(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。

### (倫理面への配慮)

本研究は東京大学の倫理委員会の承認を得ている。本分担研究で用いた検体はインフォームドコンセントを得た後に連結可能匿名化を施して検討に用いた。

### C. 研究結果

(1)ATLで高頻度にゲノム異常が確認された遺伝子ATL-1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、SureSelectにより 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た。さらに 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。

#### D. 考察

ATL の腫瘍細胞で特異的かつ高頻度にゲノム異常を来す ATL-1 については、遺伝子の異所的発現が認められた。この原因となるゲノム異常として、他の遺伝子のプロモーター領域が、転座によって ATL-1 遺伝子の upstream に位置するようなゲノムの構造異常が考えられたため、ATL-1 と同一染色体上に位置する TCR 領域との転座を調べた。2種類の細胞株においては TCR 領域との転座は認められず、直接の原因となるゲノムの構造異常は同定されなかった。今後この遺伝子の機能解析を行うことで、癌化との関連を検討する予定である。

SureSelect を用いたターゲットキャプチャーシステムにより exon を濃縮することで、アミノ酸置換を伴う変異や exon 近傍のスプライシングサイトの変異が効率的に検出可能となった。読み取りのエラーをさけるためには同じ locus について複数回の読み取りが不可欠であるが、検討実験から 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 細胞及びがん幹細胞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。

#### E. 結論

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. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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*. 2009;459:712-716.
- 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, Koeffler HP, Ogawa S. Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms. *Nature*. 2009;460:904-908.

##### 2. 学会発表

(国内学会)

- 1) 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

- 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) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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

SNP アレイを用いたゲノムコピー数解析ツール  
CNAG のライセンス提供(タカラバイオ)

## ATL の臨床・分子病態と新規治療法開発の研究

分担研究者：塚崎邦弘 長崎大学医歯(薬)学総合研究科 准教授

### 研究要旨

ATL のがん幹細胞と臨床病態との関連を明らかにするために、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た。

急性転化するまでは watchful waiting が標準治療とされてきた indolent ATL の長期予後の解析結果は、推定5年、10年、15年生存割合がそれぞれ47%、25%、14%であり、生存曲線にプラトーは認めず、不良であった。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。また、一部の症例で解析されたゲノム異常が陽性的の場合も予後不良であった。

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 とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 LBH586 について検討した。両剤ともが、それぞれ特徴的な分子の活性化を引き起こして ATL 細胞にアポトーシスまたはセネッセンスを誘導した。このような分子標的療法は、現在 ATL に対する標準治療とされる同種造血幹細胞移植療法や多剤抗がん剤併用療法と比べて毒性が低いとされており、臨床開発が期待される。

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望まれる。

### A. 研究目的

ATL のがん幹細胞の特性に着目しつつ、多様な臨床病態をとる本疾患の分子病態に基づいて、候補となる新規治療法を見出すことを目的とする。

### B. 研究方法

#### 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（急性型またはリンパ腫型の

aggressive ATL になること）するまでは watchful waiting（無治療または対症療法のみで観察）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