

201019004A

厚生労働科学研究費補助金
第3次対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22年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 渡邊 俊樹

平成23年（2011年）5月

厚生労働科学研究費補助金
第3次対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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 渡邊 俊樹

平成23(2011)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 渡邊俊樹	----- 1
II. 分担研究報告	
1. 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 渡邊俊樹	----- 14
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 中内啓光	----- 22
3. HTLV-1 Tax トランスジェニックマウスを用いた ATL 様がん幹細胞の 同定と解析 浜口 功	----- 27
4. 質量分析計を用いたマウス ATL 幹細胞特異的分子の同定 長谷川秀樹	----- 43
5. ATL におけるゲノム異常の解析 小川誠司	----- 49
6. ATL の臨床・分子病態と新規治療法開発の研究 塚崎邦弘	----- 51
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 60
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 62

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2年度目として、以下に要約する検討を行った。1) 患者ATL細胞を用いてNOD/SCID/Jak3KO (NOJ)マウスにおける連続移植系の確立を検討した。その結果、CD4とCCR4でSortした細胞集団から連続移植可能な細胞集団を得た。また3代目の凍結保存細胞からも腫瘍の生着を確認した。がん幹細胞分画の同定のために網羅的な細胞表面マーカーの解析とSP解析を用いたがん幹細胞の同定作業を進めている。2) HTLV-1 Tax トランスジェニックマウス (Tax-Tg) のATL様がん幹細胞 (CD38-/CD71-/CD117+) 集団を標的として、発現遺伝子プロファイル解析を行い、ATL様がん幹細胞における遺伝子発現の特徴を明らかにした。3) ATL様がん幹細胞の発生メカニズムの解析を目指し、種々の月齢のTax-Tgマウスから胸腺、脾臓、骨髄の各組織の細胞を採取し、ATL様がん幹細胞の発生する時期と場所を解析した。その結果、生後早期から各種臓器に腫瘍形成能を備えた細胞集団が存在している事が示され、特に骨髄において高い割合でATL様がん幹細胞が存在している事を明らかにした。4) がん幹細胞を標的とした新規ATL治療法の開発を目指し、マウスモデルのmATLがん幹細胞に特異的に発現する治療標的候補分子の同定を質量分析計による定量的解析法を用いて試みた。その結果、mATLがん幹細胞に高発現している細胞接着膜タンパク質を同定することに成功した。5) キャリアの感染細胞中の腫瘍化T細胞あるいはATL幹細胞の早期検出、また分子治療法の開発のため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った。ATL検体の解析でゲノム異常の集積がみられたTCR経路に着目し、機能解析を開始した。そのほか、同経路に含まれる遺伝子の変異解析を行い、新規の変異を1例確認した。6) 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た。7) ATLの臨床病態の解析を継続し、急性転化するまではwatchful waitingが標準治療とされてきたindolent ATLの多数例で長期予後を解析し、全身抗がん剤療法の開始時期はほぼ均一で急性転化した時期に一致しており、その後の予後は不良である事を明らかにした。従って、新規治療法の開発はindolent ATLの時期からの検討が必要であることを示した。

8) 追加交付課題：「HTLV-1 総合対策」(平成22年12月20日HTLV-1特命チーム決定)においては、重点施設のひとつである相談支援(カウンセリング)の中で、HTLV-1キャリアやATL、HAM患者に対する相談体制を構築する等とされており、HTLV-1情報サイトおよびパンフレット等は、当該総合対策の一環として、他の研究班との協同で対応する事が求められた。そのため、追加交付課題として下記の課題を遂行することになり、新たな分担研究者を加えて実施した。① 国内におけるHTLV-1キャリア相談窓口の実態と機能に関する調査、② HAM患者相談窓口との協調と連携、③ セカンドオピニオン窓口の整備と連携を目指した調査、④ 患者とその家族の意向を踏まえた「ATL患者向け」および「ATL患者家族向け」のパンフレットの整備。

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、日本では約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2年度として、1) NOD/SCID/Jak3KO (NOJ)マウスにおける連続移植系の確立と連続移植可能な細胞集団の網羅的な細胞表面マーカーの解析とSP解析を用いたがん幹細胞の同定作業、2) HTLV-1 Tax トランスジェニックマウス (Tax-Tg) のATL様がん幹細胞(CD38-/CD71-/CD117+) 集団の発現遺伝子プロファイル解析、3) Tax-TgのATL様がん幹細胞の発生メカニズムの解析、4) Tax-TgのATLがん幹細胞に特異的に発現する治療標的候補分子の同定を質量分析計による定量的解析、5) ATL検体の解析でゲノム異常の集積がみられたTCR経路の機能解析、6) 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の継続、7) ATL各病型の臨床病態の解析の継続、更に、8) 追加交付課題として、平成22年12月20日HTLV-1特命チーム決定に基づく「HTLV-1総合対策」の遂行のため、分担研究者を追加して以下の課題を遂行した。① 国内におけるHTLV-1キャリア相談窓口の実態と機能に関する調査、② HAM患者相談窓口との協調と連携③ セカンドオピニオン窓口の整備と連携を目指した調査、④ 患者とその家族の意向を踏まえた「ATL患者向け」および「ATL患者家族向け」のパンフレットの整備。

B. 研究方法

1. ATL細胞のがん幹細胞の探索

1) 免疫不全マウスへのヒト細胞の移植実験系の作製、および連続継代後の移植ヒト細胞の採取

研究代表者の研究グループにより、前記

倫理審査委員会で承認をえて採取したATL患者由来末梢血細胞(PBMC)はFicoll-Paqueで単核細胞分画分離をして得られたものである。ソーティングを行う場合はMoFloで行った。これをNOD/SCID/Jak3KO (NOJ)の新生児(Day0-7)に移植した。連続継代には脾臓のFragmentを腹腔に移植した。またNOJマウスは熊本大学医学部岡田誠治先生より供与頂いた。またその扱いは東京大学医科学研究所・動物実験施設で飼育し、同施設の動物実験指針にしたがい、動物愛護の精神に基づいた。

2) マウス脾臓からのヒト細胞の分離およびside population (SP) 染色

4回連続継代後のマウスより脾臓を摘出し、直ちに細胞懸濁液を作製し、Ficoll-Paqueで単核細胞分画を分離した。Ice-cold PBS(-) (Sigma)で細胞を洗浄した後、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、Hoechst33342 (Sigma, 5 μg/ml)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℃ですべての操作を行なった。Ice-cold PBS(-)で細胞を洗浄した後、APC-Cy7標識抗ヒトCD45抗体で細胞を染色した(4℃、20分間)。Ice-cold PBS(-)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、SP解析は、UVレーザー(波長350 nm)を装備したFACS SORP Aria (Becton Dickinson社)で行った。

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ATL患者細胞の表面マーカーの解析

ATL患者から末梢血を採取し、直ちにFicoll-Paqueで単核細胞分画を分離した。Ice-cold PBS(-)で細胞を洗浄した後、蛍光標識抗体を用いて染色した(4℃、20分間)。Ice-cold PBS(-)で細胞を洗浄した後、これらの細胞をIce-cold PBS(-)に懸濁し、FACS Canto II (Becton Dickinson社)で表面マーカーの解析を行った。

4) 病理標本の作製および解析

病理標本の作製および解析は昭和大学第2病理学教室に依頼した。

2. HTLV-1 Tax-Tgマウスを用いたATL

様がん幹細胞の同定と解析

1) 動物 Tax-Tg マウスは *lck* 遺伝子のプロモーター制御の下で HTLV-1Tax を発現するヒト ATL 様病態のモデルマウスである。レシピエントには 6 から 12 週齢の NOD/SCID マウスを用いた。

2) 移植実験

生後、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月目の Tax-Tg マウスより胸腺、脾臓、骨髄の各組織の細胞を分離し、抗体による染色を行って FCM で解析した後、FACS で目的の細胞集団を分取した。CSC (CD38-, CD71-, CD117+) 分画細胞は 1000 細胞を接種した。また、コントロールとして脾臓腫瘍細胞 (SLC)、 1×10^7 細胞を NOD/SCID マウスの腹腔内に接種した。

3) レンチウイルス感染

Tax-Tg マウスの SLC を用いて GFP を発現する レンチウイルスベクター (shLuc-GFP) を感染させ NOD/SCID マウスの腹腔内に接種した。初回接種後は腫瘍細胞より GFP 細胞をソートして 1 匹当たり 1×10^5 細胞を腹腔内に接種し、連続移植実験を行った。

4) フローサイトメトリー解析

SLC を 2%FBS/PBS に懸濁し、anti-mouse CD16/32-blocks Fc binding (Clone 93) でブロッキングを行った後、各種の抗体により 4°C で 30 分間染色を行った。染色後、 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ の propidium iodide (BD Biosciences) を加えてサンプルとした。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には JSAN (Bay Bioscience) を使用した。

5) マイクロアレイ解析

脾臓中の CSC 分画細胞と CSC 以外の分画、骨髄中の CSC 分画細胞と CSC 以外の分画を分取し、RNAlater®Soln (Ambion) 中で -80°C にて保存した。Total RNA の抽出は RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) を使用し、クオリティーチェックを行った後、cDNA を作製した。Affymetrix® 社製 GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array を使用し、Affymetrix® GeneChip® Command Console® Software (Affymetrix) 及び GeneSpring GX Version 10.0.2 (Agilent Technologies) を用いて遺伝子発現量の標準化と Fold Change の算出を行った。また、クラスタリング解析には GSEA v2.06、及び Cluster 3.0 を使用し

た。

6) Quantitative-PCR

アレイ解析に用いた total RNA の一部から SMART PCR cDNA synthesis kits (Clontech) を使用して cDNA を調整した。Real-time PCR には SYBR PreMix ExTaq (Takara Shuzo) と Light Cycler (Roche Diagnostics) を使用した。内部標準には β -actin を使用し、遺伝子の発現レベルはマウス β -actin との比により計算した。

3. 質量分析計を用いたマウス ATL 幹細胞特異的分子の同定

1) 材料 (細胞)

Tax-Tg マウス由来の腫瘍細胞を、SCID マウスへの腹腔内接種で継代を繰り返す事で腫瘍細胞を純化した。Percoll を用いて腫瘍細胞を分離し、これを mouse ATL leukemic cell (mATL 細胞) として実験に用いた。mATL 細胞のがん幹細胞の分取は、Yamazaki らの論文 (Blood 114:2709, 2009) に準じて行った。JSAN セルソーターにて CSC 分画と非 CSC 分画を分取した。この実験は国立感染症研究所の実験動物委員会の承認のもとに実施した。

2) 質量分析計による定量解析

CSC (3.6×10^5 cells) と、非 CSC (1×10^6 cells) を用いて細胞質画分を調整後、質量分析計 Thermo SCIENTIFIC 社 LTQ Orbitrap Velos へアプライした。また、膜分画のタンパク質を溶出し再解析を行った。

3) フローサイトメトリー

SLC (1×10^8 cells) を 1,500 rpm, 3 min, 4°C で遠心し、2 ml の 2% fetal bovine serum (FBS) 含有 phosphate buffered saline (PBS) で洗浄後、1,500 rpm, 3 分, 4°C で遠心し、100 μl の 2% FBS 含有 PBS に懸濁した。これらの細胞を各種の染色し細胞はフローサイトメトリー (FACS CantoII) および Flow jo をも用いて解析した。

4. ATL におけるゲノム異常の解析

1) TCR シグナル経路が感染細胞の腫瘍化に重要な役割をもつという仮説に基づき、同経路の重要性を機能的な側面から検討するために、ATL 細胞株において TCR シグナル経路を抑制する系の構築を開始した。TCR シグナルの抑制には TCR 経路に関係する複数の遺伝子に対する shRNA を用いる。導入

にはレンチウイルスないしレトロウイルスを用い、効率的なノックダウンを目指す。これまでに 4 遺伝子に対し各々複数の shRNA 発現ベクターが完成しており、現在ウイルスを用いた導入実験を行っている。

2) 既に、TCR シグナルに関与する主要な標的候補である細胞膜表面レセプターについて変異解析を行ったが、コピー数異常以外に腫瘍特異的な変異は検出されていない。本年度は新たに、コピー数解析で 170 例中 3 例にゲノム異常 (欠失) が確認された遺伝子について、遺伝子変異解析を行った。

5. 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 の長期予後と関連する臨床・分子病態

慢性型とくすぶり型の indolent ATL の長期予後を検討するため、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。特に今後の臨床試験への登録症例の規準の参考とするため、全身化学療法の開始に至る際の病状を解析した。

3) ポリコム (PC) 遺伝子 EZH2 による ATL 細胞増殖を標的としたヒストンメチル化阻害剤 DZNep とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 LBH586 によるエピジェネティック療法

Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) は、polycomb repressive complex 2 (PRC2) を構成しヒストン H3 のメチル化酵素である。ヒストンメチル化阻害剤の DZNep とヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤の LBH586 を用いて、その抗腫瘍効果を ATL 細胞株とプライマリー ATL 細胞を用いて検討した。

C. 研究結果

1. ATL 細胞のがん幹細胞の探索

1) NOJ マウス新生児を用いた移植系の検討

本年度は NOJ マウス新生児を用いて、ATL

患者由来の PBMC を肝臓内に移植する事で生着率の著明な向上が見られた。また、継代移植に際しては、腫瘍細胞が組織と強固に接着している事が明らかになったため、細胞懸濁液の代わりに脾臓断片を移植する方式で安定した結果を得た。この方式で、キャリア、くすぶり型、慢性型、急性型を含む 13 例の検体で 2 代以上の継代が可能となった。3 代連続移植が可能であったくすぶり型 ATL 検体では、生着した CD45 陽性細胞の 90%以上が CD4 陽性であった (2 代目 Fig1A)。

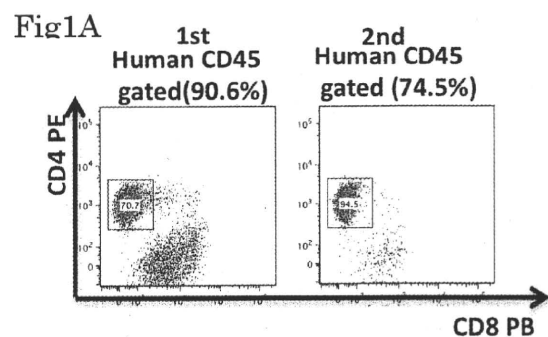


Fig1B

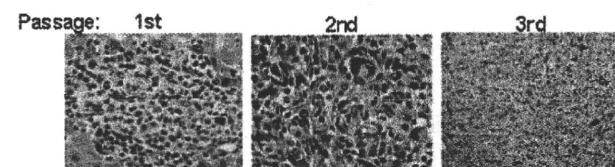


Fig1. ATL smoldering type の Patient 1st Passage は投与後 37 日 2nd Passage は 21 日 3rd Passage は 66 日後に解剖を行った。A: 1st と 2nd Passage の脾臓細胞の単核球を FACS 解析した。

B: 1st, 2nd, 3rd Passage の Liver の HE 染色写真

しかし、継代が進むにつれて腫瘍形成までの所用時間が延長し、4 代目では生着が確認出来なかった。また継代につれてウイルスロードの上昇が認められ、PBMC の移植前が 15% 1 代目 170%、2 代目が 770%であった。また組織像は継代をする度に Spindle shape の形をした細胞が増加した (Fig1B)。以上より、この場合は典型的な腫瘍の増殖と判断出来ないと考えた。

2) NOJ マウス新生児を用いた継代移植系の確立

次に、慢性型 ATL 患者検体 (ウイルスロ

ード 28.5%) を用いて、CD4 と CCR4 でソーティングし、その他の分画および分画前の PBMC とを、それぞれ NOJ の新生児マウスの肝臓に移植した。その結果、CD4+CCR4+分画では 4 代目まで継代が可能であったが、他の分画および未分画検体では初回のみ生着し、継代は出来なかった。継代可能な腫瘍細胞の CD45+細胞は CD3-CD4+であり、ウイルスロードは 3 代目で 260%であった。この 3 代目の腫瘍細胞は凍結保存後も移植により腫瘍が形成された。病理形態学的には、紡錘形細胞は少なく瀰漫性リンパ腫の形態を示した。(Fig2)。これらの腫瘍細胞は、表面マーカー解析で、生着能のある細胞とない細胞の分離が可能であることが明らかとなっており、今後、がん幹細胞の同定に使用可能であると考えられた。

Fig. 2

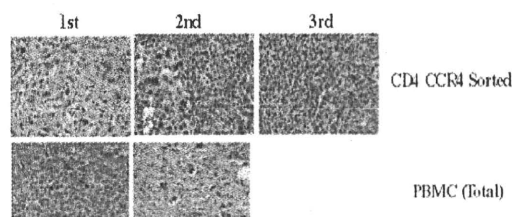


Fig. 2. ATL Chronic type の Patient の PBMC の Sorting 後 NOJ マウスに投与し生着かが確認された Liver の HE 染色写真

3) NOJ マウス連続継代腫瘍細胞の解析

NOJ マウスで 4 回連続継代した後、マウス脾臓から細胞懸濁液を作製し、Ficoll により単核細胞を分離し、SP 分画および細胞表面マーカー解析を行った。

①SP 分画の解析：細胞を Hoechst33342 存在下でインキュベート後、APC-Cy7 標識 C 抗ヒト D45 抗体で染色し、FACS SORP Aria で解析した (図 1)。マウス脾臓より得られた全細胞中には Hechst Blue (424/44) / Hechst Red (585/42) 両陰性の領域に有意な頻度の細胞が検出され、この分画は verapamil の添加により消失した。しかしながら、ヒト CD45 陽性細胞中には、有意な頻度の SP 細胞は検出されなかった。

②継代移植細胞の表面マーカーの網羅的解析の予備実験：急性型 ATL 患者検体の CD4 陽性細胞の表面抗原の網羅的解析を行った。その結果、汎 T 細胞マーカーである CD3 (弱陽性) と CD5 は、陽性であった。もし、ATL

細胞の階層性を示唆するマーカーは、陰性～弱陽性～陽性と、幅広い発現レベルを示すことが期待される。今回の解析の結果、CD18、CD28、CD38、CD45RO、CD62L、CD71、CD86、CD132、CD279、および CXCR4 がそのような、幅広い発現レベルの分布を示した。

2. HTLV-1 Tax トランスジェニックマウスを用いた ATL 様がん幹細胞の同定と解析

1) CSC の発現プロファイル解析

SLC 移植により脾腫を発症した NOD/SCID マウスの脾臓、および骨髄より CSC (CD38-/CD71-/CD117+) と Non-CSC (CD38+/CD71+/CD117-) を回収し、発現遺伝子のプロファイルリングを行った (図 1B)。その結果、脾臓と骨髄中に存在する ATL 様がん幹細胞が、おおむね近い発現プロファイルを示すものの、中には異なった挙動を示すものが認められた。両者でともに発現が亢進している遺伝子には造血幹細胞で発現する遺伝子が多く認められ、CD133, CD44, Tie2, Hoxa9, Meis1, Mpl, Ctla2a 及び Ctla2b などが含まれた。中でも CD133, CD44, Tie2 は造血幹細胞 (HSC; CD34-/kit+/Lin-/Sca-1+) よりも高い発現が認められた。(図 3A)。Hoxa9, Meis1, Mpl, Ctla2a の発現は Non-CSC よりは高く、造血幹細胞よりも低いレベルであった。これらの結果、ATL 様がん幹細胞では Myeloid 系の分化が抑制され、Lymphoid 系の前駆細胞にコミットしていることが示唆された。Lymphoid 系前駆細胞に発現している AA4.1, Gata3 などの他、B 細胞分化に関わる遺伝子、CD20, Blnk, CD19, Pax5 などと T 細胞分化に関わる遺伝子、Cxc19, CD4, CD8a, CD8b などが、同時に発現上昇していることが明らかとなり (図 3C)、ATL 様がん幹細胞の発現プロファイルが、CLP (Common lymphoid progenitor) に類似していることが示唆された。更に詳細に検討した結果、ATL 様がん幹細胞は CLP よりやや分化した T 細胞前駆細胞に近い遺伝子プロファイルを持つ細胞である事が示唆された。

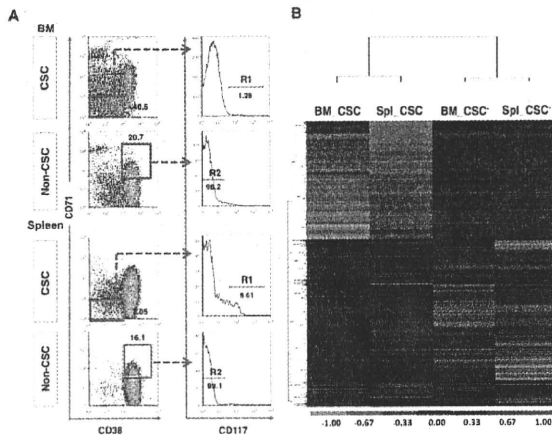


Fig. 3. 脾臓及び骨髄における CSC のマイクロアレイ解析。A : CSCs 及び Non-CSCs のサンプリング。磁気ビーズにより CD38 細胞のポジティブ、ネガティブの Duplation を行った後、CSC 分画 (R1: CD38-, CD71-, CD117+) と Non-CSC 分画 (R2: CD38+, CD71+, CD117-) でのソーティングを行った。B : 階層クラスタリング解析によるヒートマップ。BM_CSC と Spl_CSC、BM_CSC- と Spl_CSC- が近い階層にあることが分かる。BM_CSC: 骨髄内 ATL 様がん幹細胞; BM_CSC-: 骨髄内非 ATL 様がん幹細胞; Spl_CSC: 脾臓内 ATL 様がん幹細胞; Spl_CSC-: 脾臓内非 ATL 様がん幹細胞

2) ATL-CSC の発生メカニズムの解析

生後 1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月の Tax-Tg マウスより胸腺、脾臓、骨髄の各組織の細胞を分取し、CSC 分画の存在を FACS および、腫瘍形成能を検討した。その結果、各組織には、1 ヶ月という早期から ATL-CSC 様の細胞が存在する事をしめすものである。また、FACS 解析より、これらの ATL 様がん幹細胞の割合、実数ともに若齢個体では骨髄に多く存在している事が明らかとなり、骨髄において ATL 様がん幹細胞が潜伏・増殖している可能性が示唆された。

3) がん幹細胞の in vivo での動態解析

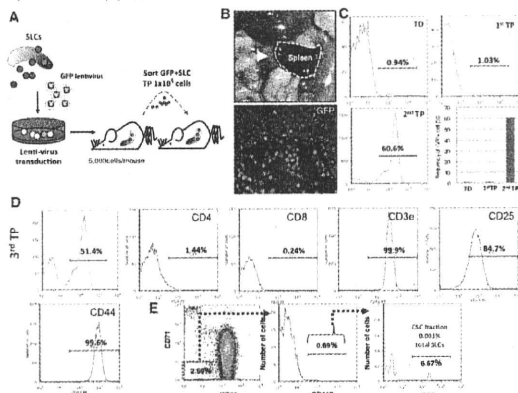


Fig. 4. レンチウイルスベクターを用いた腫瘍細胞への GFP 導入。A : レンチウイルスベクターを用いて SLC へ GFP を導入し、NOD/SCID マウスへの連続移植実験により GFP 細胞を濃縮した。B : 移植により発症した脾腫像 (上段: 明視野、下段: GFP)。C : GFP 陽性細胞率の変化。TD : ウイルス感染後、1stTP : 初回移植後の脾臓中、2ndTP : 2次移植後の脾臓中。D : FACS による GFP 陽性脾腫細胞の表現型解析。E: 脾腫細胞中の CSC 分画細胞の GFP 陽性率。連続移植により組織内の GFP 陽性細胞率は増加していくが、腫瘍細胞の表現型に変化は認められない。

がん幹細胞を可視化し、周辺組織、特にニッチとの関連を解析するため、レンチウイルスベクターを用いて GFP 標識した SLC を作成し、NOD/SCID マウスに移植した (Fig. 4A)。移植後再形成された脾腫細胞に、約 1% 程度の GFP 陽性の細胞が定着することを確認した。これらの GFP 陽性細胞を分取し、2 次移植し、計 4 回の連続移植を経ても脾腫を再生することが可能な GFP 陽性の細胞集団を得ることができた (Fig. 4B)。脾腫を形成した脾臓細胞では約 60~90% が GFP 細胞で占められ (Fig. 4C)、連続移植によってがん幹細胞が濃縮されている事が示唆された。

3. 質量分析計を用いたマウス ATL (mATL) 幹細胞特異的分子の同定結果

mATL 細胞を移植した SCID マウスの脾臓から 1.5×10^9 cells の mATL 細胞を分離し、MACS を用いて CD38 陰性細胞を濃縮して 1.2×10^8 cells の細胞を得、ソーティングにより 3.6×10^5 cells の CD38(-), CD71(-), CD117(+) の mATL-CSC 細胞を得た。これらの細胞を用いて質量分析計による定量解析を行った。細胞質画分の解析では、がん幹細胞では 86 個のペプチド、非がん幹細胞では 208 個のペプチドが同定され、Progenesis で定量解析した結果、236 個のタンパク質の比較定量解析を行う事ができた。膜画分の解析では、がん幹細胞では 197 個のペプチド、非がん幹細胞では 533 個のペプチドが同定され、Progenesis で定量解析した結果、517 個のタンパク質の比較定量解析を行う事ができた。以上の解析から、がん幹細胞で発現の高い分子の候補として表 1 のようなタンパク質が同定された。

この結果を元に、フローサイトメトリーによる発現確認を行った。がん幹細胞の表

面マーカーになりうる分子として膜タンパク質を選択した所、細胞接着に関わる膜タンパク質が同定された。同分子の特異的抗体を用いてフローサイトメトリーにより細胞表面での発現を解析した所、がん幹細胞の分画で発現が高い事が確認された。

53 proteins: CSC/Non-CSC > 2.0	
Protein	Ratio CSC/Non-CSC
Alpha-internexin	2.13
TMED1	2.18
Rab8b	2.43
Rab3c	2.47
Tubb1	2.51
RapGEF1	3.26
Tpm1	3.71
Gelsolin	3.90
Vitamin D-binding protein	4.38
Phospholipase D4	7.08
Cell adhesion membrane protein	9.28
Integrin-linked protein kinase	10.85
Amyloid beta A4 precursor protein-binding family A member 3	13.94

表1 mATL癌細胞特異的に発現する分子

4. ATLにおけるゲノム異常の解析

1) TCR シグナル経路を抑制する系の構築については、4 遺伝子の shRNA 発現ベクターを構築した。効率の良いノックダウンの実現に向けて遺伝子導入を検討中である。

2) TCR シグナル経路の制御に関与する 1 遺伝子の活性化部位に対して、ATL 検体を用いた変異解析を行った結果、1 症例において片アレルの欠失が確認された。

5. ATL の臨床・分子病態と新規治療法開発の研究

1) JSPFAD バンキングに協力し、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検討する研究に備えて冷凍バンキングした。

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 年であった。推定 10 年生存割合は 25%であり、生存曲線にプラトーは認めなかった。

くすぶり型・慢性型 ATL から全身化学療法に移行した 44 例中、急性型または予後不良因子を持つ慢性型へ移行していなかったのは、リンパ節病変の悪化と皮膚膿瘍を認めた慢性型の 1 例のみであった。くすぶり型は全例で、リンパ節病変の出現を伴って急性転化していた。全身療法開始後の予後は、極めて不良であった。

3) ポリコーム (PC) 遺伝子 EZH2 による ATL 細胞増殖に対するヒストンメチル化阻害剤 DZNep とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 LBH586 によるエピジェネティック療法を検討した。ATL 細胞の発現アレイ解析では、EZH2 に加えて同じく PC 遺伝子の RING2 と YY1 の発現が亢進していたが、EZH2 の高発現は予後不良因子であった。ATL 細胞株では EZH2 高発現は、miR-101 と miR-128a の発現と関連していた。ヒストンメチル化阻害剤 DZNep とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 LBH586 は、ATL 細胞株に対して相乗的に殺細胞効果を認めた。

D. 考察

本年度は、ATL のがん幹細胞(CSC)の同定に向けて、昨年度までの実績を元に、患者末梢血の Primary ATL 細胞の免疫不全マウスへの連続移植系の確立を試み、確かな手掛りを得ることができた。NOJ マウス新生児を用いる事で、生着率の著明な向上を得たが、継代移植を可能にするためには、CD4 陽性細胞分画を分取して移植する事が有効である事が明らかになった。この方法により、これまで4代までの継代移植が可能になり、3代の移植腫瘍は凍結保存した細胞でも造腫瘍性を示す事が明らかになった。この結果は、ATL 患者末梢血中にごん幹細胞の性質を有する細胞群が存在する事を強く示唆する結果であり、現在、症例数を増やして、再現性を確認する作業を進めている。

移植した細胞に比べ、継代移植した腫瘍細胞では、HTLV-1 プロウイルスコピー数が上昇することが確認された。従って、マウス内での腫瘍細胞への HTLV-1 の再感染の可能性について検討が必要である。

継代腫瘍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ている。多数の抗体を用いて multicolor による解析を進めて、細胞集団で発現レベルの heterogeneity を示す抗原を検索中である。予備実験として、急性型 ATL 末梢血を用いた表面抗原解析では、幾つかの抗原が heterogeneity を示すことが確認出来た。この結果を参考に、継代移植腫瘍細胞の解析を進めている。

SP 分画の解析では、継代移植細胞で、SP 分各に該当する細胞集団が確認出来なかつ

た事から、抗原解析と並行して更に検討を進める予定である。

Tax-Tg の ATL 様腫瘍細胞(mATL)の CSC を対象にした解析では、遺伝子発現プロファイルによる CSC の特徴の解析、マウスの週齢における各種臓器の CSC の存在の検討から、CSC は早期から各臓器に分布すること、幼弱時には骨髄に比較的多い事明らかになり、CSC の self-renewal の部位と腫瘍性増殖の部位に関して更に検討を進める。

mATL-CSC に発現するタンパク質の質量分析計による解析から、CSC に特異的に発現すると考えられる接着分子が同定された。今後、この分子が mATL-CSC のマーカーとなりうるか検討を進める。

ATL 細胞のゲノム異常解析の結果から、TCR のシグナル伝達に関与する分子群に商店を絞り検討を進めている。変異の認められる分子も同定されているため、更に検討を進める。

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 細胞のバンクングを 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、ATL 細胞で過剰発現するポリコームの構成分子であるヒストンメチル化酵素 EZH2 の阻害剤の抗腫瘍効果を検討し、HDAC 阻害剤 LBH586 との併用で、相乗効果が有る事を明らかにした。

E. 結論

ATL CSC の同定の基盤となる SCID マウスでの継代移植系をほぼ確立した。系の確立までに時間がかかった事で、ヒト ATL のがん幹細胞同定の予定が遅れている。しかし、解析系の確立が進んでおり、マウスでの解析も大きな進展を見る事が出来た。

ヒトの ATL 幹細胞集団が同定出来ると、遺伝子発現解析、ゲノム解析、表面抗原解析を速やかに進めて、情報を統合して解析し、その細胞集団を特徴づけるバイオマーカーとなる分子の同定を優先して進め、多数の患者検体を用いて in vivo におけるその動態を明らかにする予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 追加交付課題に対する取り組み

(追加分担研究者：山野嘉久、内丸薫)

「HTLV-1 総合対策」(平成22年12月20日 HTLV-1 特命チーム決定)においては、重点施設のひとつである相談支援(カウンセリング)の中で、HTLV-1 キャリアや ATL、HAM 患者に対する相談体制を構築する等とされており、HTLV-1 情報サイトおよびパンフレット等は、当該総合対策の一環として、他の研究班との協同で対応する事が求められた。そのため、追加交付課題として下記の課題を遂行することになり、新たな分担研究者を加えて実施した。① 国内における HTLV-1 キャリア相談窓口の実態と機能に関する調査、② HAM 患者相談窓口との協調と連携③ セカンドオピニオン窓口の整備と連携を目指した調査、④ 患者とその家族の意向を踏まえた「ATL 患者向け」および「ATL 患者家族向け」のパンフレットの整備。

具体的には以下の様な取り組みを行った。①～③ HTLV-1 キャリアおよび ATL 患者と家族に対する相談機能の整備

全国の1310の医療機関へ ATL/HTLV-1 の診療実態調査を行った。そのうち血液内科216施設と皮膚科242施設の診療内容を集計し、今年度中に公開予定のホームページ(HTLV-1 情報サービス)に掲載を予定している。

④ 患者とその家族の意向を踏まえた「ATL 患者向け」および「ATL 患者家族向け」の

パンフレットの整備

ATL患者・家族の方々が疾患をよりよく理解し、医療機関で診療を適切に受けることができるように、他の厚生労働科学研究費のHTLV-1関連疾患の研究に関わる研究班と協同で、パンフレットを作成した。

この「ATL患者向け」および「ATL患者家族向け」のパンフレットを血液内科および皮膚科を対象に、全国約450施設へ配布した。なお、協同で作業をしたキャリア向けパンフレットについては、

都道府県関連：136箇所

医療機関（神経内科、血液内科、皮膚科、産科（病院））：1479施設

難病相談・支援センター：47箇所へ配布した。

関連情報を掲載したHPを立ち上げて、情報提供と広報の便宜を図った

((<http://www.htlv1joho.org/>))。

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*. 116(8):1211-1219. 2010.
- 2) 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* 115(22): 4337-4343. 2010.
- 3) Yamamoto K, Utsunomiya A, Tobinai K, Tsukasaki K, Uike N, Uozumi K, Yamaguchi K, Yamada Y, Hanada S, Tamura K, Nakamura S, Inagaki H, Oshima K, Kiyoi H, Ishida T, Shitara K, Akinaga S, Ogura M, Tomonaga M, Ueda R. Phase I study of KW-0761, a defucosylated humanized anti-CCR4 antibody, in relapsed patients with adult T-cell leukemia-lymphoma and peripheral T-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 28(9):1591-1598. 2010.
- 4) Masuda M, Maruyama T, Ohta T, Ito A, Hayashi T, Tsukasaki K, Kamihira S, Yamaoka S, Hoshino H, Yoshida T, Watanabe T, Stanbridge EJ, Murakami Y. CADM1 interacts with Tiam1 and promotes invasive phenotype of human T-cell leukemia virus type I-transformed cells and adult T-cell leukemia cells. *J Biol Chem*.;285(20):15511-22. 2010.
- 5) Sasaki D, Imaizumi Y, Hasegawa H, Osaka A, Tsukasaki K, Choi YL, Mano H, Marquez V, Hayashi T, Yanagihara K, Moriwaki Y, Miyazaki Y, Kamihira S, Yamada Y. Overexpression of enhancer of zeste homolog 2 with trimethylation of lysine 27 on histone H3 in adult T-cell leukemia/lymphoma as a target for epigenetic therapy. *Haematologica*. 2011 Jan 12. [Epub ahead of print]
- 6) Hasegawa H, Yamada Y, Tsukasaki K, Mori N, Tsuruda K, Sasaki D, Usui T, Osaka A, Atogami S, Ishikawa C, Machijima Y, Sawada S, Hayashi T, Miyazaki Y, Kamihira S. LBH589, a deacetylase inhibitor, induces apoptosis in adult T-cell leukemia/lymphoma cells via activation of a novel RAIDD-caspase-2 pathway. *Leukemia*. 2011 Jan 18. [Epub ahead of print]
- 7) Hieshima K, Nagakubo D, Shigeta A, Tanaka Y, Hoshino H, Tsukasaki K, Yamada Y, Yoshie O. c-Maf suppresses human T-cell leukemia virus type 1 Tax by competing for CREB-binding protein. *Cancer Sci*. 2011 Jan 18. [Epub ahead of print]
- 8) Morita Y, Iseki A, Okamura S, Suzuki S, Nakauchi H, Ema H. Functional characterization of hematopoietic stem cells in the spleen. *Exp Hematol*. 2010 Dec 24. [Epub ahead of print]
- 9) Ogawa S, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koeffler HP, Sanada M. Deregulated intracellular signaling by mutated c-CBL in myeloid neoplasms. *Clin Cancer Res*. 2010 16:3825-31. Epub 2010
- 10) Nakahata S, Yamazaki S, Nakauchi H, Morishita K. Downregulation of ZEB1 and overexpression of Smad7 contribute to resistance to TGF-beta1-mediated growth suppression in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Oncogene*. 2010 29:4157-69. Epub 2010

- 11) Ogawa S, Sanada M, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koeffler HP. Gain-of-function c-CBL mutations associated with uniparental disomy of 11q in myeloid neoplasms. *Cell Cycle*. 2010
- 12) Watters KM, Dean J, Hasegawa H, Sawa H, Hall W, Sheehy N Cytokine and growth factor expression by HTLV-1 Lck-tax transgenic cells in SCID mice. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2010 26(5):593-603.
- 13) El Hajj H, El-Sabban M, Hasegawa H, Zaatari G, Ablain J, Saab ST, Janin A, Mahfouz R, Nasr R, Kfoury Y, Nicot C, Hermine O, Hall W, de Thé H, Bazarbachi A. Therapy-induced selective loss of leukemia-initiating activity in murine adult T cell leukemia. *J Exp Med*. 2010 207(13):2785-92.
- 14) Nakashima M, Ishii Y, Watanabe M, Togano T, Umezawa K, Higashihara M, Watanabe T, Horie R. The side population, a precursor of Hodgkin and Reed-Sternberg cells, as a target for NF- κ B inhibitors in Hodgkin lymphoma. *Cancer Sci* 101(11):2490-6, 2010
- 15) 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* 19, 23-33, 2010
- 16) 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. *Virol J* 7:81, 7pp. 2010

(総説)

- 1) 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(2), 187-195, 2010
- 2) 塚崎邦弘: 「特集 白血病の治療」成人T細胞白血病リンパ腫に対する薬物療法の進歩. *Medical Science Digest* 36(7):876-879, 2010.
- 3) 塚崎邦弘: [白血病治療の進歩]成人T細胞白血病に対する新規治療. *Bio Clinica* 25(7):602-607, 2010
- 4) 塚崎邦弘: [特集: リンパ系腫瘍研究におけるわが国からの情報発信と今後の課題]ATL診療に関する国際的合意形成とATL臨床研究の今後の方向性. *血液・腫瘍科* 61(1): 7-14, 2010
- 5) 塚崎邦弘: [第71回日本血液学会学術集会シンポジウム3 Recent Progress in Pathogenesis and Treatment for T/NK-cell Malignancies]ATL診療に関する国際的合意. *臨床血液* 51(7): 493-499, 2010
- 10) 塚崎邦弘: [血液疾患における分子標的治療 ドラッグラグ解消に向けて] II. 悪性リンパ腫 B. 我が国で開発中もしくは開発予定の新規分子標的薬 11. IMiD (レナリドミド) によるATLを含むT細胞リンパ腫の治療と開発状況. *血液フロンティア別冊* 20(S1): 1635-1640, 2010
- 7) 塚崎邦弘: [第72回日本血液学会学術集会教育講演 プログレッシブP-4]ATL. *臨床血液* 51(10): 1595-1606, 2010
- 8) 今泉芳孝, 塚崎邦弘: [エビデンスに基づくリンパ腫の治療とあらたな展開]成人T細胞白血病リンパ腫. *医学のあゆみ* 235(5): 531-536, 2010

(和文書籍)

- 1) 塚崎邦弘、朝長万左男: 【2 白血球系疾患】6. 成人T細胞白血病・リンパ腫. *臨床病態学 第一巻 第四版* (北村聖総編集, ヌーヴェルヒロカワ(東京), p618-619 所収) 2010
- 2) 塚崎邦弘、今泉芳孝: 16CASE 皮疹と白血球増多を指摘された56歳男性. *血液疾患BLOOD DISEASES* (嘉数直樹、岡本真一郎編集, 日本医事新報社(東京), p 160-167所収) 2010
- 3) 今泉芳孝、塚崎邦弘: X III-3リンパ腫. *診療ガイドライン UP-TO-DATE 2010-2011* (門脇 孝、小室一成、宮地良樹監修、(株)メディカルレビュー社 (大阪), p609-615所収) 2010
- 4) 今泉芳孝、塚崎邦弘: [III. 血液腫瘍の治療・予後の現状]3. 慢性リンパ性白血病と成人T細胞白血病・リンパ腫. *血液疾患の病診連携*. (鈴宮淳司、竹尾高明、伊豆津宏二編集、(株)医薬ジャーナル社 (大阪・東京), p78-88所収) 2010
- 5) 塚崎邦弘: [II. T細胞リンパ腫]3. 成人T細胞白血病・リンパ腫の臨床病態と治療法の選択. *血液診療エキスパート 悪性リンパ腫*. (金倉讓監修、鈴木律朗、

- 伊豆津宏二、山口素子編集、(株)中外医学社(東京)、pp176-184所収)2010.
- 6) 塚崎邦弘: 50歳のATLリンパ腫型. 血清カルシウム値が16ml/dlある. さてどうしよう? 造血器腫瘍治療2版 これは困ったぞ, どうしよう! (押味和夫監修、木崎昌弘、松村 到編集、(株)中外医学社(東京)、pp158-159所収)2010.
- 7) 塚崎邦弘: [VI. 造血器がんB. リンパ腫]6. ATLに対する治療のエビデンス. 日本独自のエビデンスは? 2011-2012 EBM がん化学療法・分子標的治療法(西條長宏監修、大津 敦、古瀬純司、中川和彦、徳田 裕、南 博信、畠 清彦、田村和夫編集、(株)中外医学社(東京)、pp521-525所収)2010.
- 8) 塚崎邦弘: [IX章 血液・造血器系の症状・徴候と疾患 2. 血液・造血器系疾患]M. 成人T細胞白血病/リンパ腫(ATL/ATLL). NURSING看護学テキスト疾病と治療II(総編集 松田 暉、萩原俊男、難波光義、鈴木久美、林 直子総編集、(金倉 譲担当編集)、(株)南江堂(東京)、pp267-268所収)2010.
2. 学会発表
(国際学会)
- 1) Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, Kagami Y, Tsutsumi A, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimar K, Watanabe T, "Loss of miR-31 links NF- κ B activation in Adult T-cell leukemia", Viruses, Genes and Cancer-2010, Venezia, Italy, Sep. 30, 2010 (Sep. 29 – Oct.1, 2010)
- 2) Watanabe T, "Molecular pathogenesis of ATL", The Japanese Society of Hematology / EHA Joint Symposium (Hematology-in -Focus session), The 15th Congress of the European Hematology Association (EHA), Barcelona, Spain, June 12, 2010 (Invited talk)
- (国内学会)
- 1) Cai Y, Nakano K, Yamagishi M, Matsubara A, Kagami Y, Tsutsumi A, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimar K, Watanabe T, "Exploring biological significance of microRNA-451 up-regulation in ATL leukemogenesis" 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、神戸、2010年12月9日(2010年12月7日~10日)
- 2) Asanuma S, Nakano K, Yamagishi M, Ogawa S, Yamaguchi K, Utsunomiya A, Watanabe T, "Over-expression of dominant-negative Helios isoforms in adult T-cell leukemia (ATL) cells", 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、神戸、2010年12月9日(2010年12月7日~10日)
- 3) 山岸誠、中野和民、三宅在子、加賀美弥生、包明久、宇都宮興、山口一成、内丸薫、小川誠司、渡邊俊樹、「ATL細胞におけるエピジェネティックな異常は、miR-31 発現低下を介して NF- κ B の恒常的活性化に寄与する」、第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月8日(2010年11月7日~9日)
- 4) 渡邊俊樹、「ATLの発症予防と新たな治療法開発を目指す研究の現状」、第10回北海道白血病研究会、札幌、2010年11月5日(招待講演)
- 5) Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, Kagami Y, Tsutsumi A, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimar K, Watanabe T, "Loss of miR-31 links NF- κ B activation in adult T-cell leukemia", 第72回日本血液学会学術集会、横浜、2010年9月25日(2010年9月24日~26日)
- 6) Yamochi T, Morita Y, Yamochi T, Sasaki Y, Watanabe N, Ogawa S, Utsunomiya A, Hamaguchi I, Uchimar K, Nakauchi H, Watanabe T, "Search for cancer stem cells in ATL", 第72回日本血液学会学術集会、横浜、2010年9月25日(2010年9月24日~26日)
- 7) Matsubara A, Kato M, Sanada M, Takita J, Chiba S, Hayashi Y, Kobayashi Y, Watanabe T, Yoshino T, Koeffler H, Bartram C, Ogawa S, "Genome-wide analysis using high-density SNP microarrays in various types of hematologic malignancies", 第72回日本血液学会学術集会、横浜、2010年9月26日(2010年9月24日~26日)
- 8) Iwanaga M, Watanabe T, Utsunomiya A, Okayama A, Uchimar K, Koh K-R, Ogata M, Kikuchi H, Sagara Y, Uozumi K, Mochizuki M, Tsukasaka K, Saburi Y, Yamamura M, Tanaka J, Moriuchi Y, Hino S, Kamihira S, Yamaguchi K, JSPFAD investigators, "HTLV-1 proviral load and

- the relation to disease progression in carriers: a nationwide cohort study”, 第 72 回日本血液学会学術集会、横浜、2010 年 9 月 26 日 (2010 年 9 月 24 日～26 日)
- 9) 三沢彩、片山量平、小池清恵、富田章弘、渡邊俊樹、藤田直也、「AP-1 依存的な MiR-21 の発現亢進によるがん幹細胞様 SP 細胞の抗がん剤耐性化」、第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月 24 日 (2010 年 9 月 22 日～24 日)
 - 10) 渡邊俊樹、「HTLV-1 感染と ATL の治療：現状と問題点」、腫瘍別シンポジウム (造血器腫瘍)、第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月 22 日 (2010 年 9 月 22 日～24 日) (招待講演)
 - 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 細胞におけるエピジェネティックな異常による miR-31 の発現低下と NF- κ B 活性化機構」、第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月 22 日 (2010 年 9 月 22 日～24 日)
 - 12) 村上善則、増田万里、丸山智子、太田力、伊藤彰彦、林徳眞吉、塚崎邦弘、上平憲、山岡昇司、星野洪郎、吉田輝彦、渡邊俊樹、「成人 T 細胞性白血病における細胞接着分子 CADM1 と Tiam1 の結合と浸潤促進作用」、第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月 22 日 (2010 年 9 月 22 日～24 日)
 - 13) 萩原剛志、斉藤愛記、宇都宮與、渡邊俊樹、山岡昇司、「A20 は成人 T 細胞白血病における NF- κ B 依存性転写活性を増強する」、第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月 22 日 (2010 年 9 月 22 日～24 日)
 - 14) 中野和民、松原亜以子、矢持忠徳、宇都宮與、山口一成、内丸薫、渡邊俊樹、「ATL リスク・インディケーター遺伝子同定の試みと、ATL 発症における機能解析」、第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月 22 日 (2010 年 9 月 22 日～24 日)
 - 15) 浅沼里実、中野和民、山岸誠、小川誠司、山口一成、宇都宮與、渡邊俊樹、「成人 T 細胞白血病に置ける Helios のドミナントネガティブ型アイソフォームの過剰発現」、第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月 22 日 (2010 年 9 月 22 日～24 日)
 - 16) 矢持忠徳、守田洋平、矢持淑子、佐々木陽介、小川誠司、宇都宮與、渡辺信和、浜口功、内丸薫、中内啓光、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 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月 22 日 (2010 年 9 月 22 日～24 日)
 - 17) 矢持忠徳、守田洋平、矢持淑子、佐々木陽介、中内啓光、内丸薫、濱口功、宇都宮與、渡邊俊樹、「成人性 T 細胞白血病における Tumor Initiating Cell 同定への試み」、第 14 回日本がん分子標的治療学会学術集会、東京、2010 年 7 月 6 日～8 日
 - 18) 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、「成人 T 細胞白血病 (ATL) 患者での microRNA 発現異常の実態」、第 50 回日本リンパ網内系学会総会、新潟、2010 年 6 月 18 日 (2010 年 6 月 18 日～19 日)
 - 19) 山岸 誠、中野和民、三宅在子、矢持忠徳、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 miR-31 発現低下による NF- κ B の恒常的活性化機構」、第 50 回日本リンパ網内系学会総会、新潟、2010 年 6 月 19 日 (2010 年 6 月 18 日～19 日)
 - 20) 矢持忠徳、守田洋平、矢持淑子、佐々木陽介、中内啓光、内丸 薫、小川誠司、渡邊俊樹、「成人 T 細胞性白血病における Tumor Initiating Cell の探索の試み」、第 50 回日本リンパ網内系学会総会、新潟、2010 年 6 月 19 日 (2010 年 6 月 18 日～19 日)
- (招待講演他)
- 1) 渡邊俊樹、「HTLV-1 の基本的な事項と ATL について」、厚生労働省 HTLV-1 母子感染予防対策全国研修会、東京、2011 年 3 月 2 日 (招待講演)
 - 2) 渡邊俊樹、「ATL 研究の歩みとこれからの展望」、JST 地域関連事業 ATL (成人 T 細胞白血病・リンパ腫) シンポジウム 2011 in 福岡、福岡、2011 年 2 月 27 日 (基調講演とパネルディスカッション)
 - 3) 渡邊俊樹、「HTLV-1 母子感染予防対策」、東京都 HTLV-1 母子感染予防に関する

る専門職向け研修会、東京、2011年2月
24日（招待講演）

- 4) 渡邊俊樹、「HTLV-1感染症の最近の話題：ATL発症予防と新規治療薬開発に向けて」、第6回大分血液・腫瘍セミナー、大分大学、由布、2011年1月20日（招待講演）

F. 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

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

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

渡邊・中内班の分担研究の目的は、ATL患者の検体を用いてATLのがん幹細胞(ATL-CSCs)を同定することにある。Taxトランスジェニックマウスモデル(Tax-Tg)で明らかにされたCSC分画の特性を利用し、FACSを用いてATL患者の検体およびSCIDで造腫瘍性を示す細胞集団のside population(SP)解析や表面抗原の網羅的解析を進める。それにより、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。平成22年度、我々はがん幹細胞の存在を明らかにする目的で免疫不全マウスにおける連続移植系の確立を検討してきた。その結果、ATLマーカーであるCD4とCCR4でSortした細胞集団からNOD/SCID/Jak3KO (NOJ)マウスにおいて連続移植できる細胞集団を得ることができた。この細胞集団の3代目のウイルスロードは260%で現在は5代目まで移植を行っている。また3代目の凍結保存された細胞からも腫瘍の生着を確認できた。このことより、このHTLV1陽性の細胞集団の中に自己更新能を有するがん幹細胞が存在する事が強く示唆された。我々はそのがん幹細胞分画の同定のために網羅的な細胞表面マーカーの解析とSP解析を用いてがん幹細胞の同定を行う予定である。22年度はその前段階として中内グループに網羅的解析とSP解析の指導を受け解析を行った(中内グループ参照)。

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。我々は、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

こで我々は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。

まず我々はがん幹細胞を以下の4点に定義した。1, 腫瘍原性のある少数の細胞集団、2 連続移植可能な細胞集団 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らないものからなる集団を生じる

そこで ATL 患者末梢血中にごん幹細胞の存在の有無を検証するために免疫不全マウスにおいて連続移植を試みた。

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2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) 免疫不全マウスへのヒト細胞の移植実験系の作製、および連続継代後の移植ヒト細胞の採取

研究代表者の研究グループにより、前記倫理審査委員会承認をえて採取した ATL 患者由来末梢血細胞(PBMC)は Ficoll-Paque で単核細胞分画分離をして得られたものである。ソーティングを行う場合は MoFlo で行った。これを NOD/SCID/Jak3KO (NOJ) の新生児(Day0-7)に移植した。連続継代には脾臓の Fragment を腹腔に移植した。また NOJ マウスは熊本大学医学部岡田誠治先生より供与頂いた。またその扱いは東京大学医科学研究所・動物実験施設で飼育し、同施設の動物実験指針にしたがい、動物愛護の精神に基づいた。

3) マウス脾臓からのヒト細胞の分離および解析

マウスより脾臓を摘出し、直ちに細胞懸濁液を作製し、Ficoll-Paque で単核細胞分画を分離した。Ice-cold PBS(-) (Sigma) で細胞を洗浄した後、Ice-cold PBS(-)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。

5) フローサイトメーターによる ATL 患者細胞の表面マーカーの解析

ATL 患者から末梢血を採取し、直ちに Ficoll-Paque で単核細胞分画を分離した。Ice-cold PBS(-)で細胞を洗浄した後、蛍光標識抗体を用いて染色した(4°C、20分間)。Ice-cold PBS(-)で細胞を洗浄した後、これらの細胞を Ice-cold PBS(-)に懸濁し、FACS Canto II (Becton Dickinson 社)で表面マーカーの解析を行った。

6) 病理標本の作製および解析

病理標本の作製および解析は昭和大学第2病理学教室に依頼した。

C. 研究結果

我々は ATL 患者末梢血中にごん幹細胞の存在の有無を検証するために免疫不全マウスにおいて連続移植を試みた。

21年度は NOD/SCID/IL2ryK (NOG)マウスで検討したが連続移植の確立はできなかった。22年度は NOJ マウスの新生児において移植を試みた。移植は ATL 患者由来の PBMC を肝臓内に投与した。また継代移植には後述の理由から細胞懸濁液を用いる代わりに脾臓の断片を移植した。実は ATL 患者由来の PBMC を移植すると生着後の脾臓は正常のものとは異なり、白色の組織成分が存在して(Fig1A)、これが Debris として残ってしまう(Fig1B)。これを昭和大学第2病理学教室で解析して頂いたところ、Debris に大量の細胞が残存していることが明ら

かになった (Fig1C)。以上の方法を用いること
によって 13 例の Carrier, Smoldering, Chronic,
Acute を含む様々な検体において 2 代以上の継
代が可能となった。

その中でも 3 代連続移植が可能となった
Smoldering 由来の検体には生着した CD45 陽性
細胞の 90%以上が CD4 陽性であった (2 代目
Fig2A)。ただ 1 代目 2 代目は 40 日以内に生着
がみられたが 3 代目は 66 日かかり 4 代目
においては 150 日以上過ぎているが今も生存
している。またウイルスロードは PBMC の移植
前が 15% 1 代目 170%、2 代目が 770%であ
った (表 1)。以上のことよりこれは典型的な腫瘍
の増殖とはいえなかった。また組織像は継代を
する度に Spindle shape の形をした細胞が増加
した (Fig2B)。

次にこのマウスの移植系ががん幹細胞を同
定に使用できるかどうか検討することにし
た。さきほどがん幹細胞の定義 3 で述べたよ
うにがん幹細胞がもし存在すれば腫瘍原性
のある細胞とない細胞に細胞表面マーカー
で分けることができるはずである。そこで
ATL のマーカー CD4 と CCR4 でソーティ
ングしたものと、そのマーカーで Depletion
したものと、さらにその分離前の PBMC
をそれぞれ NOJ マウスに移植した (Fig3)。
その投与した細胞は Chronic type ATL 患
者由来で、ウイルスロードは 28.5% を示
した。この 2×10^7 個の細胞から sorting
されてきた細胞は CD4 CCR4 sorted cell
(Sorted) が 1.7×10^5 、CD4 CCR4 depleted
cell (Depleted) 6.3×10^6 個であった。
これらの分離後の細胞と分離前の 1×10^7
個の PBMC (Total) を NOJ の新生児マウ
スの肝臓に移植した (Fig3)。

その結果 Total と Depleted が元々移植
した細胞数が多いため 1 代目 2 代目は先
に生着が確認

された。しかしこれらはこれ以降の生着は
確認されていない。一方 Sorted は 1 代
目の生着は 80 日以上を要したが 3 代目
さらに 4 代目も生着が確認されその生着
日数は 30 日以内であった (表 2)。また
そのウイルスロードは 3 代目で 260%
であった。次に FACS 解析では生着した
CD45 陽性細胞は CD4 陽性 CD3 陰性を
示した。さらにこの 3 代目の細胞を凍結
保存した後に移植しても生着が確認され
た。また病理学的解析によると Total は
Fig2b と類似して継代する度に Spindle
shape の細胞が目立つようになっていく
が Sorted は 1 代目には Spindle shape
の細胞が目立っていたが 2 代目には減
少し始め 3 代目にはほとんど目立たな
くなってしまった (Fig3b)。またこの 3
代目の細胞は核に異型性が見られ腫瘍
細胞である可能性が高いことが指摘され
た。以上よりこの生着した細胞は連続
移植が可能で HTLV1 陽性の腫瘍細胞集
団と考えた。またこのことよりこのマウ
スモデルはマーカーで生着能のある細胞
とない細胞の分離が可能であることを示
しておりこれからのがん幹細胞の同定
に使用が可能であることを示している。

Fig1

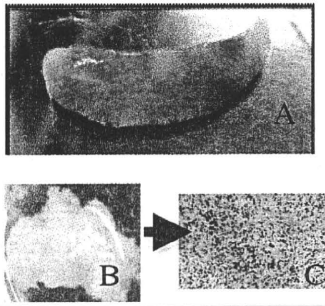


Fig1 A: Patient acute type の PBMC NOG マウス投与後 1 日後の脾臓, B: 脾臓細胞分離後の Debris, C: Debris の HE

表 1

Passage	Proviral load
Patient P19 PBMC	15.20%
1st Passage	170%
2nd Passage	770%

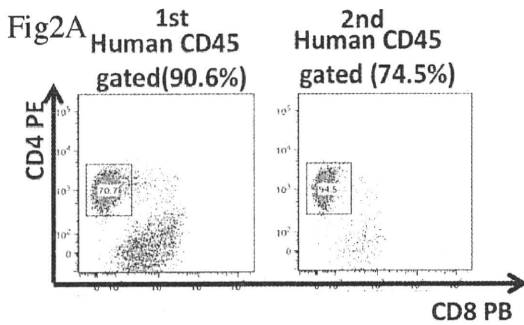


Fig2B

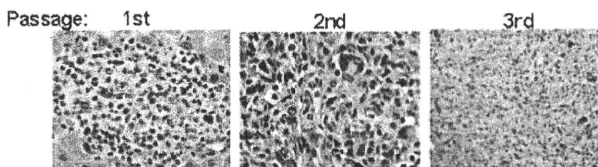


Fig2 ATL smoldering type の Patient 1st Passage は投与後 1 日後 2nd Passage は 21 日 3rd Passage は 3 日後に解剖を行った。A: 1st と 2nd Passage の脾臓細胞の単核球を FACS 解析した。B: 1st, 2nd, 3rd Passage の Liver の HE 染色写真

Fig3

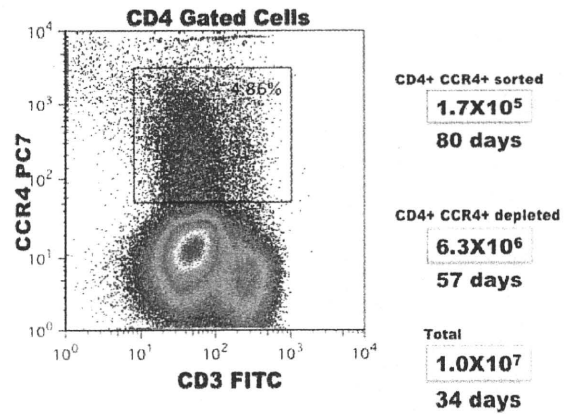


Fig3a ATL Chronic type の Patient の PBMC の Sorting を行った。右に書かれている緑が背景の数字は sorting により得られた細胞数を示す。

表 2

	1st	2nd	3rd	4th
CD4 CCR4 Sorted (1.7X10 ⁵)	80	37	21	13
CD4 CCR4 Depleted (6.3X10 ⁶)	34	23	Alive	
Total (1.0X10 ⁷)	34	65	Alive	

表 2、ATL Chronic type の Patient の細胞を Sorting 後 NOJ マウスに投与した。表中の数字は生着が確認された日数を示している。

Fig3b

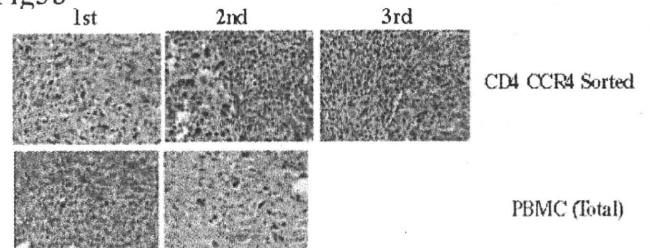


Fig3b ATL Chronic type の Patient の PBMC の Sorting 後 NOJ マウスに投与し生着が確認された Liver の HE 染色写真