

D. 考察

我々は ATL 患者検体にがん幹細胞が存在することを証明するために連続移植継代の確立を目指してきた。現在までに、がん幹細胞の存在の証明法としてもっとも信頼性のある方法は、がん細胞を免疫不全マウスに移植して連続継代が可能であることを示すことである。したがって今回 4 回連続移植が可能になった事はがん幹細胞の存在を極めて強く示唆するものである。

平成 21 年度から平成 22 年度の半ばまで患者の PBMC で連続移植系の確立を検討してきた。その結果二代以上にわたる継代は可能となったが 4 代目以上の Passage や Cell suspension による継代は不可能であった。この際のウイルスロードは極めて高く (Fig2) 病理学的な細胞の形態も Lymphoma とは異なる Spindle Shape の形態を示すものが特徴であった。これらは宮崎大の岡山先生が (Intervirology 2010;53(4):229-39) で示唆されているように、ウイルスの反応性の増殖を反映している可能性があるのかもしれない。

一方 CD4 CCR4 で Sorting したマウスの移植例 (Sorted) は連続移植が可能となったがその元となる Total PBMC (Total) は 3 代目で停滞している。このことは先述の PBMC を移植した例と極めて類似している。さらにこのことは Sorted の細胞集団にとって Total PBMC 中の他の細胞が生着能に影響を及ぼすことを示唆している。

また病理学的な形態は 3 代目では lymphoma type の細胞集団が有意であった。またこの 3 代目の細胞集団は HTLV1 陽性であることから

HTLV1 陽性の lymphoma type の腫瘍細胞の連続移植が可能となったと見なしている。さらにこのことは極めて重要であるが Sorted の細胞集団の中にがん幹細胞が存在する事が強く示唆された。また以上のことより単に連続移植あるいは二代以上の継代ができることががん幹細胞の存在を示すことではなく腫瘍の増殖の様式も重要な Factor であることも強く強調したい。今後はこの HTLV-1 陽性腫瘍細胞の連続移植モデルが ATL 患者のモデルになり得ることをさらに示していくことが必要である。その中でも最も大事なことはこの生着能を有する細胞集団つまりがん幹細胞分画の同定である。この目的を達成するためにこのマウス移植モデルは極めて有用であり、これを用いて今後は網羅的な細胞表面マーカーの探索と SP 解析を Approach していく予定である。今年度はすでにその方法に関して準備しており中内班が報告する。

E. 結論 NOJ マウスおよび ATL マーカー CD4 CCR4 で分画した細胞集団を用いることによって ATL 末梢血由来の HTLV-1 陽性の細胞集団の連続移植系を作成できた。このことより ATL 患者由来の細胞集団にがん幹細胞が存在する事が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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

- 2) 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
- 3) 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, 7pp. 2010
2. 学会発表
- 1) Cai Y, Nakano K, Yamagishi M, Matsubara A, Kagami Y, Tsutsumi A, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru 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, Uchimaru 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)
- 6) Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, Kagami Y, Tsutsumi A, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru 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)
- 7) Yamochi T, Morita Y, Yamochi T, Sasaki Y, Watanabe N, Ogawa S, Utsunomiya A, Hamaguchi I, Uchimaru 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)
- 8) 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)

- 9) 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, 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)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 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)
- 13) 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)
- 14) 萩原剛志、齊藤愛記、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)
- 15) 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)
- 16) 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)
- 17) 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)
- 18) 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
- 19) 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）

- 20) 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-kB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）
- 21) 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）
- 22) 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)

(その他)

- 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）

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

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

研究要旨

本分担研究の目的は、ATL患者の検体を用いてATLのがん幹細胞（ATL-CSCs）を同定することである。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、研究代表者らはATL細胞を免疫不全マウス（NOJ）に移植して4回連続継代に成功したが、我々は連続継代後の移植ヒト細胞のSP解析を行った。その結果、ヒト細胞中には有意な頻度のSP分画は確認できなかった。つぎに、継代後の移植ヒト細胞の表面マーカーの網羅的解析の予備実験として、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、CD5などの汎T細胞マーカーが陽性であったほか、CD62Lなどいくつかのマーカーで階層性を示唆するような幅広い発現レベルの分布が検出された。これらの所見をもとに、次年度は連続継代後の移植ヒト細胞における表面マーカーの網羅的解析、および候補集団のNOJマウスへの移植実験を行う。

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⁺CD38⁻）、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。本年度の研究で、研究代表者らはATL細胞を免疫不全マウス（NOJ）に移植して4回連続継代に成功し、ATL-CSCsの存在を示唆する所見を得

たが、我々は連続継代後の移植ヒト細胞の SP 解析を行った。さらに、連続継代後の移植ヒト細胞の表面マーカーの網羅的解析の予備実験として、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。

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、および個人情報は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で承認をえて採取した ATL 細胞を免疫不全マウス（NOJ）に移植して4回連続継代に成功した。連続継代後のマウスより脾臓を摘出し、ヒト血液細胞を分離して実験に使用した。免疫不全マウス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て扱った。

3) 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、5μg/ml) 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°C、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、フローサイトメーターで解析した。

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

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。

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網羅的解析

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、表 1 に示すような蛍光標識抗体の組み合わせで染色した (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。

表 1 ATL 細胞の表面マーカーの網羅的解析に使用した蛍光標識抗体の組合せ

これらの抗体の他、すべての組合せに PerCP-Cy5.5 標識抗 CD4 抗体も染色した。

FITC	PE	APC
CD14	CD5	CD3
CD49b	CD13	CD62L
CD57	CD16	CD45RO
CLA	CD19	CD235a
CD138	CD20	CD14
Annexin V	CD27	CD152
CD66b	CD56	CD1a
CD8	CD61	CD11c
Perforin	CD62L	CD11b
CD44	CD69	CD38
CD86	CD127	CD41a
CD105	CD152	CD90
CD34	CD154	CD133
CD31	CD133	CD18
CD107	CXCR4	CCR5
CD66	CD105	CD132
CD3	CDw125	Frizzled 1
Granzyme B	CD3e	Frizzled 3
CD61	CD83	CD98
CD28	IFN- γ	IL-2
CD41a	CD132	CD45
CD41b	CD41	CD279
CD69	CD271	CD8 α
iNKT	CD13	MP1
CD34	CD49f	cCD79a
CD71	CD40	CD8 β
CD33	CD117	
CD38		

C. 研究結果

ATL 細胞を 4 回連続継代後、マウスより脾臓を摘出して細胞懸濁液を作製し、Ficoll により単核細胞を分離した。この細胞を Hoechst33342 存在下でインキュベートした後、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。

図 1 4 回連続継代後のマウス脾臓より分離したヒト細胞の side population 解析

4 回連続継代後のマウス脾臓より分離した細胞を HBSS/2%FBS/10 mM HEPES (pH 7.4) に懸濁し、verapamil (Sigma) の存在下と非存在下で、Hoechst33342 (Sigma, 5 μ g/ml) でインキュベートした (37 $^{\circ}$ 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、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 $^{\circ}$ C、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、フローサイトメーターでヒト CD45 マーカー (A) とともに、SP 解析 (B) を行なった。

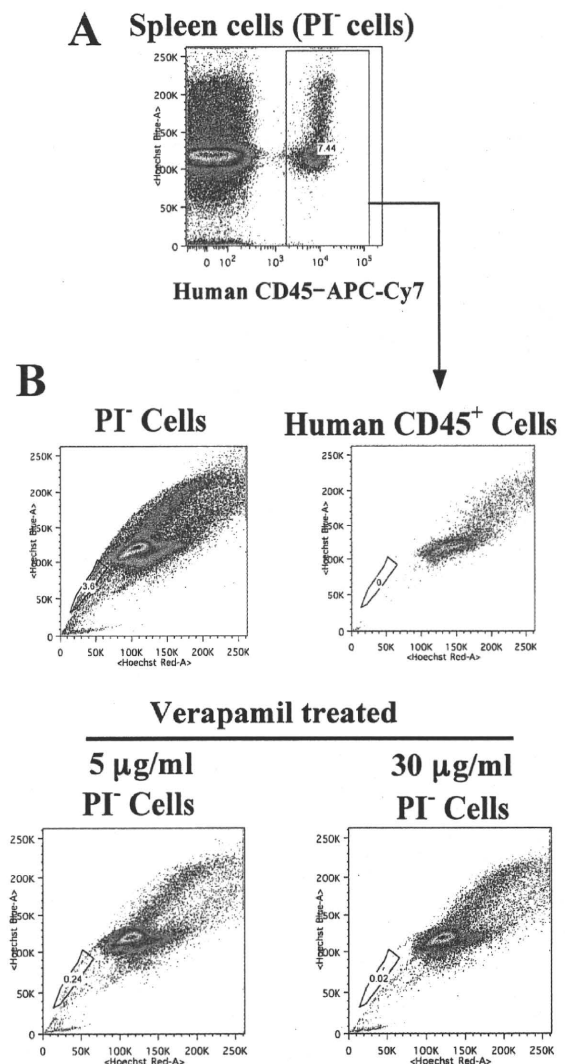
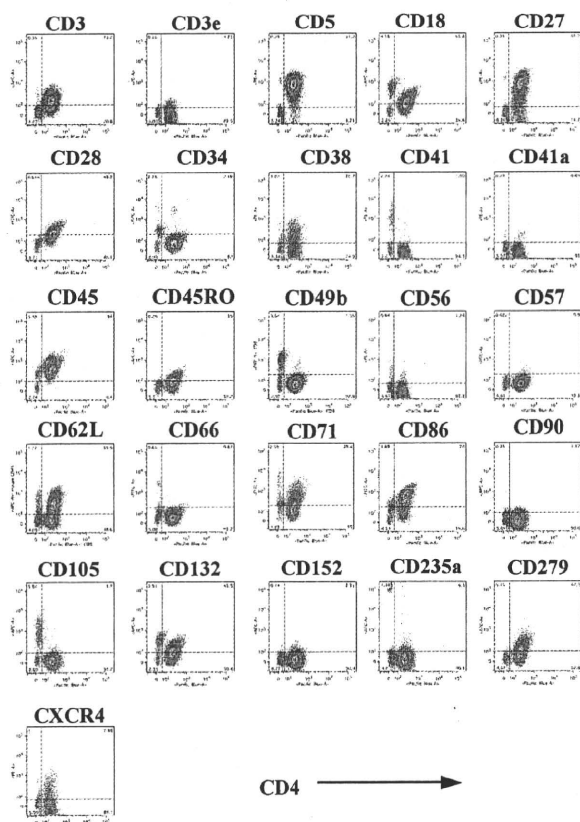


図2 ATL 細胞の表面マーカーの網羅的解析

急性型の ATL 患者 (Proviral load: 74.5%) 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、表1に示すような蛍光標識抗体の組み合わせで染色した (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 で表面マーカーの解析を行った。

図の横軸は、すべて CD4 である。



D. 考察

考察

現在までに、がん幹細胞の存在の証明法としてもっとも信頼性のある方法は、がん細胞を免疫不全マウスに移植して連続継代が可能であることを示すことである。その意味で、研究代表者らが ATL 細胞を免疫不全マウス (NOJ) に移植して 4 回連続継代に成功したことは、ATL

のがん幹細胞 (ATL-CSCs) の存在を強く示唆する所見で極めて意義深い。我々は、その連続継代後の移植ヒト細胞を使用して SP 解析を行った。その結果、マウス脾臓中に存在するヒト細胞分画には、SP 細胞は確認できなかった。

昨年患者由来 ATL 細胞における SP 解析においても述べたが、ヒト細胞における SP 解析は不安定で、マウス骨髄細胞におけるそのように安定した結果が出にくい特徴がある。当該年度には連続継代後の移植ヒト細胞の SP 解析は 1 回しか行なっていないので、SP 細胞の存在について結論を出すには、さらに多くの実験を行なう必要がある。つぎに、継代後の移植ヒト細胞の表面マーカーの網羅的解析の予備実験として、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 細胞の階層性を示すようなマーカーがあるとするならば、それらはすべて陰性、あるいはすべて陽性というような染まり方ではなく、陰性～弱陽性～陽性的のように、幅広い発現レベルを示すことが予想される。今回の解析の結果、CD18、CD28、CD38、CD45RO、CD62L、CD71、CD86、CD132、CD279、および CXCR4 で、幅広い発現レベルの分布が検出された。これらの所見をもとに、次年度は連続継代後の移植ヒト細胞における表面マーカーの網羅的解析、および候補集団の NOJ マウスへの移植実験を行う。

E. 結論

4 回連続継代に成功した移植ヒト細胞分画で、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、検出されなかった。今後は検体数を増やして SP 解析を検討するとともに、

今回 ATL 患者検体の ATL 細胞の表面マーカー解析で候補に挙げたマーカーを、連続継代した細胞で解析する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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]
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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 9

2. 学会発表

なし

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 様がん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

研究要旨

成人 T 細胞白血病 (ATL) の病態発症機構には不明な点が多く、その解明を進める糸口として、近年、腫瘍再形成能を有するがん幹細胞が注目されている。我々は HTLV-1 Tax トランスジェニックマウス (Tax-Tg) に自然発症する脾腫細胞中に存在する **ATL 様がん幹細胞** (CD38⁻/CD71⁻/CD117⁺) 集団を標的として、マイクロアレイによる発現遺伝子プロファイルリング比較を行った。その結果、ATL 様がん幹細胞においては細胞の腫瘍化、もしくは腫瘍の増殖に関連する遺伝子、あるいは組織腫瘍マーカーの発現が増加しているだけでなく、複数の造血幹細胞の機能維持に関連する遺伝子も発現していることが判明した。また逆に癌抑制因子や正常な造血細胞分化に機能する遺伝子の幾つかが抑制されており、がん幹細胞を特徴付けると考えられる候補分子が示されると同時に、機能的な遺伝子群を詳細に検討することにより ATL 発症に至るメカニズム解明に寄与することが期待される知見が得られた。また、B 細胞系列の遺伝子が抑制され、T 細胞分化に関わる遺伝子が高発現していたことから、これらの ATL 様がん幹細胞は T 細胞分化にコミットした幹細胞であることが推測された。我々はまた、ATL 様がん幹細胞の発生メカニズムを解析するため、病態発症前 (1、3、6 ヶ月齢) 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、これらの細胞を NOD/SCID マウスに移植することにより 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 1 ヶ月後には、脾臓、骨髄、胸腺のいずれの組織にも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。

A. 研究目的

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: Human Adult T Cell Leukemia Virus-I) の感染によって引き起される悪性腫瘍であり、治療困難な白血病の 1 つである。日本では約 108 万人の HTLV-1 キャリアが存在すると推定され、最終的にその 5%、毎年約 1100 人が新たに発症しており、発症の予防と根本的な治療法の確立が望まれている。

ATL は数十年という長い潜伏期間を経て、悪性転化するが、HTLV-1 感染から腫瘍化、さらに ATL 病態発症に至るまでの機構は不明な点が多い。またウイルス感染と ATL の関連疾患の関係についても十分に解明されていない。

近年、造血器腫瘍や固形癌に対する化学療法において、薬剤耐性を持ったがん幹細胞 (CSC; **Cancer Stem Cell**) の存在が再発の原因として注目されるようになった。ATL においても HTLV-1 感染から病態発症のプロセスにおいて、がん幹細胞が存在している可能性が考えられた。そこで我々はヒトの 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) を用いて、ATL 様がん幹細胞の同定を試みた。その結果、HTLV-1 Tax Tg マウスの脾臓に発症する腫瘍細胞 (SLC: splenic lymphomatous cells) 中に高い腫瘍再形成能を有する ATL 様がん幹細胞集団が存在することを発見した (Yamazaki, et al., Blood, 2009)。

そこで本研究課題では、ATL 様がん幹細胞の特性を解明するため、ATL 様がん幹細胞の発現遺伝子のプロファイリングを行い、ATL 様がん幹細胞に特異的に発現している新たな分子を同定し、造血幹細胞との違い等を明らかにした。また ATL 様がん幹細胞の発生機序を明らかにするため生後初期の Tax-Tg マウスより細胞を

分離し、NOD/SCID マウスへの移植実験を行い、腫瘍形成能が何時の段階で認められるか、ATL 様がん幹細胞が何時発生するかを明らかにした。

B. 研究方法

1) 動物

ドナーとして用いた Tax-Tg マウスは胸腺 T 細胞で特異的に発現する lck (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase) 遺伝子のプロモーター制御の下で、HTLV-1 の非構造蛋白 p40 tax (Tax) 遺伝子を発現する、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 (NOD.CB17-Prkdc^{scid}/J, Jackson Laboratory) 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た後、FCM で解析した後、FACS (JSAN, ベイバイオサイエンス) により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 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

凍結保存された Tax-Tg マウスの SLC を融解し、20% fetal calf serum (FCS) と SCF (100ng/ mL), IL-6 (100ng/ mL), IL-3 (20ng/ mL), TPO (100ng/mL) の 4 つのサイトカインを添加した 200 μ L の α MEM 中に 1×10^5 細胞を分注し、5% CO₂ インキュベーター内において 37°C で 1 晩 Pre-stimulation した。その後、Retronectin でコー

ティングした96wellプレートに細胞を移し、レンチウイルスベクター (shLuc-GFP) を約MOI.10程度になるよう加え、37°Cで16時間感染させた。洗浄した後、500 μ lの同様の培地に懸濁し、更に2日間培養した。感染から3日目の細胞、約5000個を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)により4°Cで5分間ブロッキングを行った後、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 CD2 (clone RM2-5)、anti-mouse CD3e (clone 145-2C11)、anti-mouse CD4 (clone RM4-5)、anti-mouse CD8a (clone 53-6.7)、anti-mouse CD25 (clone PC61.5)、anti-mouse CD41 (clone MWReg30)、anti-mouse CD44 (clone IM7)、anti-mouse CD45 (clone 30-F11)、anti-mouse CD127 (clone A7R34)、anti-mouse CD71 (clone R17217)、anti-mouse B220(clone RA3-6B2)、anti-mouse Ter119(clone TER-119)、anti-mouse CD11b (clone M1/70)、anti-mouse Gr1(clone RB6-8C5)。Allophycocyanin (APC) anti-mouse CD38 (clone 90)、anti-mouse Sca-1 (clone D7)。APC-eFluor®780 anti-mouse CD117(clone ACK2)。染色後、2 μ g/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 (Spl_CSCs: CD38-/CD71-/CD117+: 2×10^5 個)とCSC以外の分画 (Spl_Non-CSCs: CD38+/CD71+/CD117-: 9.7×10^5 個)、骨髄中のCSC分画細胞 (BM_CSCs: 5×10^4 個)とCSC以外の分画 (BM_Non-CSCs: 9.4×10^5 個)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、WT-Ovation™ Pico RNA Amplification System VERSION 1.0 (NuGEN)を使用してcDNAの増幅を行った。またDNAの断片化とラベリング処理、及び精製には、FL-Ovation™ cDNA Biotin Module V2 (NuGEN)とAffymetrix® GeneChip® Hybridization Wash and Stain Kit (Affymetrix)及び、QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN)を添付のプロトコールに従って使用した。アレイ解析用のプローブには、Affymetrix®社製GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Arrayを使用し、解析ソフトに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。Real time PCRに使用したプライマーは以下の通りである

(表 1)。内部標準には β -actinを使用し、94°C : 1分、60°C : 25秒 (2-ステップ) で40サイクル行った。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。

C. 研究結果

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(図 1 A)、発現遺伝子のプロファイルリングを行った(図 1 B)。その結果、骨髄中に存在する ATL 様がん幹細胞も、脾臓中に存在する ATL 様がん幹細胞も遺伝子プロファイル的に近距離にある事が明らかとなった。また脾臓、及び骨髄のがん幹細胞において発現が大きく変動している遺伝子が多数認められた(表 2 A 及び B)。これらのうち、3倍以上の発現上昇、発現抑制をしているものを抽出し、real time-PCR にて発現量を確認し、DNA マイクロアレイの結果と相関する事を明らかにした(図 2 A 及び B)。

脾臓、骨髄共に ATL 様がん幹細胞において発現が亢進している遺伝子には造血幹細胞において発現しているものも多く認められ、**CD133, CD44, Tie2, Hoxa9, Meis1, Mpl, Ctla2a** 及び **Ctla2b** などが高く発現していた。さらに、これらの分子のうち、**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。また、**Angpt1** の発現レベルは造血幹細胞と同等であった(図 3 A)。**Hoxa9, Meis1, Mpl, Ctla2a** の発現は Non-CSC より高い発現ではあったが、造血幹細胞よりも低いレベルであった。これらの遺伝子は巨核球や赤血球分化に関わる事が分かっていることから、

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。そこで Myeloid 系の遺伝子を詳細に検証すると、同様に **Hlf, Sox4, Gata2, Myct1, Runx1, Evf1** および **Pbx1** などの発現が造血幹細胞に比べて抑制されていることが明らかとなった(図 3 B)。一方で、発現上昇が認められた遺伝子として 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、**Cxcl9, 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 3 C)、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。ところが CSC と Non-CSC で比較した場合、B 細胞系列の分化に関わる遺伝子は有意に発現抑制されており、T 細胞系列の遺伝子の発現上昇のみが認められた(図 2 A, B)。以上の事から、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推察される。

2) ATL-CSC の発生メカニズムの解析

Tax-Tg マウスでは生後約 10~23 ヶ月でリンパ節、及び脾臓においてリンパ腫を発症するが、CSC がどの段階で発生するかは不明であった。そこで、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 により解析した。その結果、脾臓では 1 ヶ月で 1.07%、3 ヶ月で 0.7%、6 ヶ月で 0.73%のがん幹細胞分画が認められた。同様に骨髄では 1 ヶ月で 3.09%、3 ヶ月で 5.08%、6 ヶ月で 4.14%のがん幹細胞分画が認められ、胸腺においては 1 ヶ月で 0.2%、

3ヶ月で0.14%、6ヶ月で0.08%のがん幹細胞分画が認められた(図4A)。成長に伴い骨髄でのCSC分画の増加傾向が認められるが、脾臓や胸腺では増加が認められなかった(図4B)。これは細胞10万個当たりのCSC実数においても同様の傾向が認められた(図4C)。そこでこれらのCSC分画にある細胞が腫瘍再形成能を有しているかをNOD/SCIDマウスへの移植実験により検討することとした(図5A)。

まず脾臓中に腫瘍形成能を持った細胞が存在するかを明らかにするため、脾臓の全細胞から、 1×10^7 個の細胞を移植した。その結果、全ての月齢のマウスにおいて脾臓での腫瘍形成が認められた(図5B)。そこで、1~3ヶ月齢のマウス骨髄由来のCSC、脾臓由来のCSC、胸腺由来のCSCをそれぞれ1000細胞ずつ移植した結果、全ての個体で脾臓において腫瘍の再構築に伴う巨脾像が認められた(図5B及びC)。これらの病的な外観所見は我々が継代している脾臓由来腫瘍細胞(SLC)の移植の系と全く同じであった。ところがこれらの表面抗原による表現型をFACSで解析した結果、CD4陽性、CD8陰性、CD3陽性、CD25陰性、CD44陽性の細胞集団である事が明らかとなった(図5D)。これらの結果はTax Tgマウスの脾臓、骨髄、胸腺の中に、生後早期の段階で既に腫瘍原性を有する細胞が発生していることを示唆するものであった。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った(図4B及びC)。骨髄、脾臓、胸腺におけるATL様がん幹細胞は、同等の腫瘍再構築能を有する事から、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る。

このことは、ヒトATLの発症、とりわけ長

い潜伏期間とその機序を解明するにあたり、非常に重要な知見であると考えられる。

3) がん幹細胞の *in vivo* での動態解析

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(図6A)。ウイルス感染後、約5,000細胞を移植し、脾腫が再形成される移植後45日目にFACS解析を行った。その結果、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 1×10^5 個を分取し、NOD/SCIDマウスに2次移植した。この系により計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(図6B)。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(図6C)、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。表現抗体による解析結果も自然発症したTax-Tgマウスの腫瘍細胞と一致したが(図6D)、CSC分画の比率は通常の1/10以下であり(図6E)、ATL様がん幹細胞中のGFP陽性率も6%前後と低かった。

D. 考察

本研究課題においてTax-Tgマウス由来のATL様がん幹細胞において発現上昇している遺伝子を同定することに成功した。その中には造血幹細胞において発現している分子も多く、がん幹細胞性を維持するのに造血幹細胞と同じメカニズムを用いている可能性が示唆された。また、造血幹細胞との比較により、Myeloid系の遺伝子発現が抑制され、T細胞、B細胞に関わる分子の発現が上昇していることが明らかとなった。また、CSCとNon-CSCとの比較によ

り、B細胞系の遺伝子発現が抑制されており、これらのCSCがT細胞系列にコミットしたが、がん幹細胞である事が明らかとなった。

今後、これらのデータを元に、CSC特異的なマーカーを同定することで、CSCを更に高純度に分取する事が可能となると共にATLのモニタリング、悪性腫瘍化に関与する分子標的として治療法の開発に応用可能であると考えられる。

今回我々は、NOD/SCIDマウスへの移植系を用いてTax-Tgマウス内でCSCの自然発生する時期と場所を解析した。その結果、生後1ヶ月目には移植したすべての組織において腫瘍を起こす能力を備えた細胞が存在することが確認された。このことはATL様がん幹細胞が生後早い段階で形成されている可能性を示唆している。また、NOD/SCIDマウスへの移植系を用いた場合、Tax-Tgマウスでの自然発症に比べ、より短期間で病態を発症することから、免疫不全状態においてはATL様がん幹細胞からの腫瘍形成が促進されると考えられ、腫瘍化においては、レシピエントの免疫による抑制状態が強く関与していることを示唆している。

通常、Tax-Tgマウスで自然発症する腫瘍細胞の表現型はCD4陰性、CD8陰性、CD3e陽性、CD25陽性であるが、今回我々が自然発症前の各組織の細胞を用いて行った移植実験では、脾腫を再形成したほとんどの細胞はCD4陽性、CD8陰性、CD3e陽性、CD25陰性であった。この差異に関しては、2007年にOhsugiらが分化成熟したT細胞系統においても発現するLck末端のプロモーターを用いてTax Tgマウスを作出した際、発症したリンパ腫がCD4陽性、もしくはCD8陽性の成熟したT細胞の表現型を示すこと、またCD4陽性、CD25陽性の細胞が認

められたのは63系統中の1例だけであったことが報告されており、Tax発現による多段階的な腫瘍化と病態の多様性がモデルマウス内で機能するLckプロモーターの活性に伴うTaxの発現量・部位・時期に起因している可能性が示唆されている。またヒトATLにおいても、症例の多くはCD4陽性、CD8陰性、CD3e陽性、CD25陽性の腫瘍細胞であるが、少ないながらCD4陽性、CD8陰性や、CD4陰性、CD8陽性、あるいはCD4陰性、CD8陰性といった腫瘍細胞が現れる症例が報告されている。今回我々は生後初期のTax-Tgマウスの組織中に腫瘍再構成能を持つ細胞集団を同定し、異なる表現系の腫瘍を認めたが、これらを用いる事でこのような稀なATLのモデルとしても解析が可能であると考えられる。また、幼若なATL様がん幹細胞(未成熟なCSC)を移植したモデルでは完全な腫瘍が誘導されていない事から、これらのCSCではなんらかの腫瘍形成の抑制が起こっている可能性がある。今後は幼若型CSCと成体型CSCを比較することで、腫瘍を抑制するキー分子を同定する事が可能であると考えられる。

前年度の報告において我々は脾臓内だけでなく、骨髄中の腫瘍細胞にもCSCが存在し、特にCD117陽性細胞が造血幹細胞のニッチとされる領域に局在していることを明らかにした。同時に、脾臓においても腫瘍細胞が血管内皮などニッチと言われる場所に集族している状態が観察されることから、CSCに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のではないかと推察された。今回我々はレンチウイルスベクターを用いて腫瘍細胞にGFP標識を行い、NOD/SCIDマウスへの移植により継代が可能なGFP陽性腫瘍細胞を得ることができた。また脾臓の腫瘍細胞中に

CSC 分画にも GFP 陽性の細胞が存在しており、この細胞を用いた *in vivo* イメージングを行うことで、がん幹細胞からどのように腫瘍が形成されていくのか、またがん幹細胞が組織内のどの細胞と関係を持つ事によって幹細胞特性を維持しているのか明らかにする有用なツールとなると考えられる。

E. 結論

今回のマイクロアレイによる発現遺伝子のプロファイリング結果から、ATL 様がん幹細胞特異的に発現している機能的遺伝子群が同定されたことにより、今後よりの確に ATL 様がん幹細胞を分取することが可能になるものと考えられる。また同時に、それらの遺伝子は新たな治療ターゲット分子候補としても有用であると考えられる。本研究の成果より、不明な点が多い ATL の病態発症機構の解明が進み、より有効な ATL 診断、発症予防、治療法の確立に寄与するものと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 滝澤 和也、水上 拓郎、山崎 淳平、倉光 球、百瀬 暖佳、益見 厚子、大隈 和、長谷川 秀樹、浜口 功、山口 一成、「HTLV-1 Tax-Tg マウス由来 ATL 様がん幹細胞の発現遺伝子解析」、第 72 回日本血液学会学術集会 (2010 年 09 月 25 日、パシフィコ横浜)
- 2) 大隈 和、深川 耕次、高馬 卓也、森下 和弘、高浜 洋一、山本 直樹、山口 一成、浜口 功、「ヒト CRTAM を発現する組換えウイルス

VSV の HTLV-1 感染細胞及び ATL 細胞に対する殺傷効果」、第 3 回 HTLV-1 研究会・合同班会議 (2010 年 08 月 29 日、東京大学医科学研究所)

- 3) 大隈 和、「ATL 新規表面マーカー TSLC1 を分子標的とした抗 ATL 治療の開発」、2010 年度 HTLV-1 関連合同班会議 (2011 年 02 月 19 日、国立感染症研究所 共用第一会議室)

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表 1:リアルタイムPCRに使用したプライマー

Gene Symbol	Primer Sequence (5'-3')	
	Forward	Reverse
AA4.1/CD93	TGGAACAGGATCTCTGGCAATA	GAGCAGTTGAAGGTCTGGAGGT
Angpt1	CAAACGCTTTCTTTAACGGG	CCTATGTGAGTCAGAATGGC
Bex1	CATCATGACCACCATGATGAG	GGTTCACAATAGGTAATACGG
Blnk	GGAGCAGTGGTCAGATGACTT	ATCTACATACTCGCCCCTCGT
CD117/Kit	TATGCGTGTGGGTGAGTTGT	GAAAACCGTGAAGGCAACAT
CD133	CAGAGTACAACGCCAAACCA	AAATCACGATGAGGGTCAGC
CD19	CTGGAGATCCCAGATGGTGT	CCGGCTTCAGAGAATTTGAG
CD22	GAAAGCAAGAGGCACTGTCC	CATCCGTTCTGTCTGCTCA
CD38	TGGTAAACCTGAGGTCATAGGG	TGCTCAAAGTTATCAGGGACG
CD4	CTGTGGAGCTAGTCCAGGC	TTTGAAACCAGAATGGCTCC
CD44	GAACAAGGAACCATCAGAGACC	AATGGCGTAGGGCACTACAC
CD8a	GATTGGACTTCGCCTGTGAT	CCTGTGGTAGCAGATGAGAGTG
CD8b	CTGCTTTGAACTGCTGCAAG	GGAAGAGTACATGGTGGCGT
Ctla2a	GCCTTGGAAGTCTTCTGTCTC	AATGTGCCTCAGAGTTTACACC
Ctla2b	ACAATGCAGACTATGAGCGG	ACACATTGAGCTTCCACAGC
Cxcl9	CAGTCAAAAACGTTGTCCACC	AAAAATTACACGGGCTTTGG
Eppk1	CAGTATGGGTACCCCTGGTTT	ATTTAGTACTCCCGCCTCCAG
Evl1	GGACTGTAAGGAATGTGACCG	CCTTGGCACAGTTTTTCACAC
Fras1	GGAAAGAAGATGCCTGTACCC	ATTCATCCTGGTACCGCAG
Gata2	CATGAAGAAGGAAGGGATCCAG	GGCGGTGACTTCTCTTGAT
Gata3	TCCAAAAAGTGCAAAAAGGTG	ATACTGGAAGGGTGGTGAAGT
HLF	ACTTGCTTCCTACTGAGGGCT	CACACAAACACACATTCACC
HoxA9	GCTGGAAGTGGAGAAGGAGTT	AGCCCCTAAAAGGCTCACTC
Meis1	GCATGCAGCCAGGTCCAT	TAAAGCGTCATTGACCGAGGA
Mpl	CTGTATGCCTACCGAGGAGAGAAG	GTTCCAAAGTGGGCACACT
Ms4a1/CD20	GGCAGAAACGCTGAAGAATC	CTTCTGCTGTAAGTCTGATGG
Myct1	AAGGGAAGGAAGTGAAGCA	AACTGAGGCTGAGGATAGGG
Pax5	GAGACAGGAAGCATCAAGCC	GATCCTGTTGATGGAGCTGAC
Pbx1	CCTGCCTTCCTCTCCTTTCT	GGAAGGGTGTGACTCCAAA
Runx1	CTGTTTGCATCTGGGTGGT	CCCAAAGCTGTAGCTGTCTCT
Sall1	TGTTCCTTACAAGACAAATGC	TTAAAGAAATTGGACCCCCC
Sox4	AGACCGAAGGAATCTTTCCC	CCAGAGCCTTCTTCTGTCTTC
Tie2/TEK	GGATGACTTGTGCAGAACTCTACGA	GGACACCAATATCTGGGCAAATG
Tnfrsf19	CATAGGAGCTGGCATTCTGA	CTCCATCTTGTCTGGCTTC
β -actin	CAGCCTTCCTTCTTGGGTATGG	CTGTGTTGGCATAGAGGTCTTTACG

表 2 A : マイクロアレイ解析結果(CSC で発現が上昇している遺伝子)

UP		
Gene Symbol	Gene Title	Fold change
Pbx1	pre B-cell leukemia transcription factor 1	489.2
Ctla2a	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 alpha	341.8
Bex1	brain expressed gene 1	333.1
Angpt1	angiopoietin 1	268.4
Sox4	SRY-box containing gene 4	267.7
Kit	kit oncogene	151.4
Hoxa9	homeo box A9	133.4
Ctla2b	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 beta	123.4
Myct1	myc target 1	123.0
Mpl	myeloproliferative leukemia virus oncogene	122.8
Cd34	CD34 antigen	89.3
Hlf	hepatic leukemia factor	82.2
Cd93 (AA4.1)	CD93 antigen	78.1
Evi1	ecotropic viral integration site 1	74.2
Gata2	GATA binding protein 2	74.0
Ikzf2	IKAROS family zinc finger 2	52.7
Il7r	interleukin 7 receptor	43.8
Tek (Tie2)	endothelial-specific receptor tyrosine kinase	38.6
Cxcl2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	34.7
Cxcl9	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	32.6
Bcl6	B-cell leukemia/lymphoma 6	31.4
Serpina3g	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3G	22.1
Cd8a	CD8 antigen, alpha chain	19.1
Flt3	FMS-like tyrosine kinase 3	19.1
Tal1	T-cell acute lymphocytic leukemia 1	18.9
Cd4	CD4 antigen	12.5
Mrpl19	mitochondrial ribosomal protein L19	11.3
Meis1	Meis homeobox 1	10.0
Gata1	GATA binding protein 1	9.1
Psmc8	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 8	8.4
Tie1	tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1	7.9
Runx1	Runx1 mRNA, partial cds, C-terminal exon region	5.4
Pram1	PML-RAR alpha-regulated adaptor molecule 1	5.1
Gata3	GATA binding protein 3	3.9
Trnfap3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	3.6
Mcpt8	mast cell protease 8	3.5
Cd44	CD44 antigen	3.5
Msi2	Musashi homolog 2 (Drosophila)	3.4
Hoxb4	homeo box B4	3.3
Tax1bp3	Tax1 (human T-cell leukemia virus type I) binding protein 3	3.1

表 2 B : マイクロアレイ解析結果(CSC で発現が抑制されている遺伝子)

Down		
Gene Symbol	Gene Title	Fold change
Sall1	sal-like 1	-48.7
Tnfrsf19	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19	-29.6
Blnk	B-cell linker	-29.0
Fras1	Fraser syndrome 1 homolog	-23.6
Wnt10b	wingless related MMTV integration site 10b	-21.2
Cd19	CD19 antigen	-21.1
Pax5	paired box gene 5	-17.8
Bcar3	breast cancer anti-estrogen resistance 3	-16.2
Eppk1	epiplakin 1	-16.1
Ms4a1(Cd20)	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1	-13.1
Wnt10a	wingless related MMTV integration site 10a	-10.0
Cd38	CD38 antigen	-9.9
Cd22	CD22 antigen	-9.8
Brcal	breast cancer 1	-3.7
Asf1b	ASF1 anti-silencing function 1 homolog B	-3.2
Lck	lymphocyte protein tyrosine kinase	-3.2

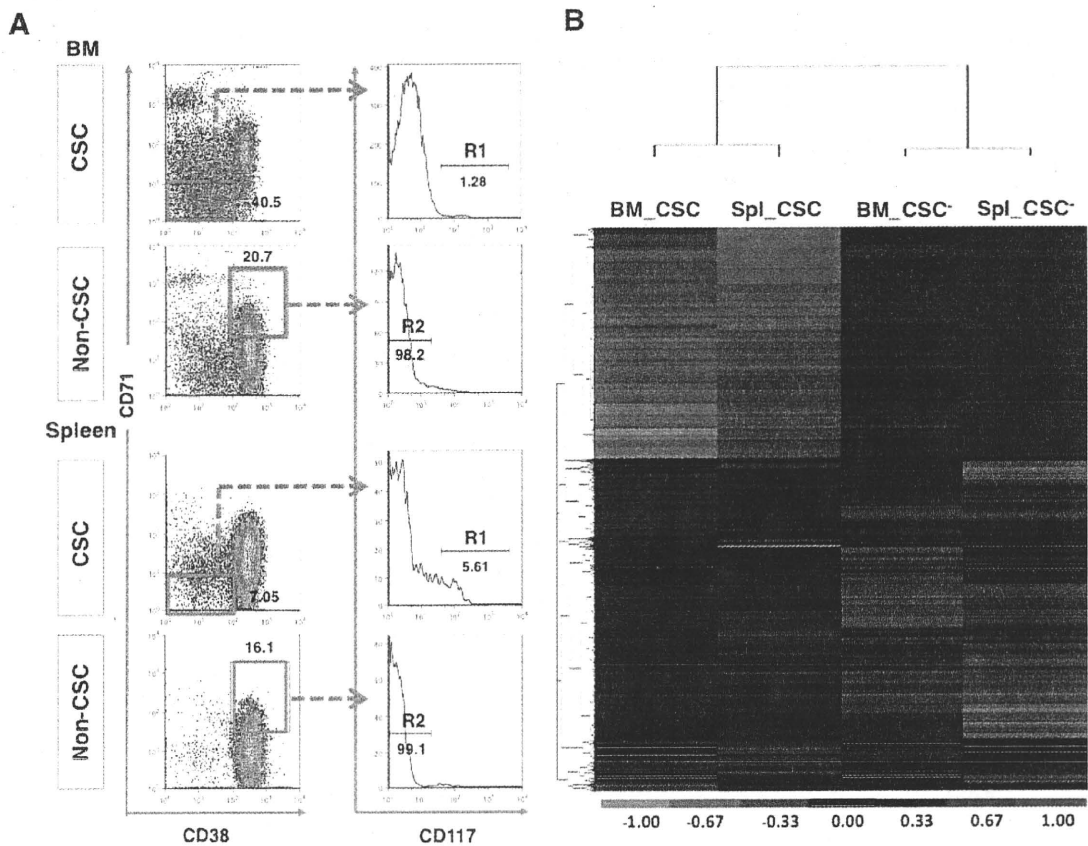


図1：脾臓及び骨髄における CSC のマイクロアレイ解析。A：CSCs 及び Non-CSCs のサンプリング。磁気ビーズにより CD38 細胞のポジティブ、ネガティブの Duplation を行った後、CSC 分画 (R1: CD38-,CD71-,CD117+) と Non-CSC 分画 (R2: CD38+,CD71+,CD117-) でのソーティングを行った。B：階層クラスタリング解析によるヒートマップ。BM_CSC と Spl_CSC、BM_CSC- と Spl_CSC- が近い階層にあることが分かる。BM_CSC: 骨髄内 ATL 様がん幹細胞; BM_CSC-: 骨髄内非 ATL 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