

20118002A

厚生労働科学研究費補助金第3次がん総合戦略研究事業
(H21-3次がん—一般—002)

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

平成21～23年度
総合研究報告書

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

平成24(2012)年5月

厚生労働科学研究費補助金
第3次がん総合戦略研究事業
(H21 - 3次がん—一般— 002)

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

平成21～23年度
総合研究報告書

研究代表者
渡邊 俊樹

平成24(2012)年5月

目 次

I. 総合研究報告書	
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	9
渡 邊 俊 樹	
II. 資 料	37
資料 1：ATL/HTLV-1 についての情報サイト（医療機関等相談窓口を紹介）	
資料 2：成人 T 細胞白血病 (ATL) の治療を受けられる患者さんと そのご家族向け小冊子	
資料 3：HTLV-1 について正しく理解していただくための HTLV-1 キャリア向け小冊子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	95
IV. 研究成果の刊行物・別刷	103

I. 総合研究報告書

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。研究計画は、1) マウスモデルを用いた「マウス ATL のがん幹細胞 (mATL-CSC)」の同定と解析 (浜口、長谷川)、2) 免疫不全マウスを用いたヒト ATL のがん幹細胞 (ATL-CSC) の探索と解析 (渡邊、中内) 3) 末梢 ATL 細胞の分子病態解析 (渡邊、小川) 4) ATL 患者の臨床病態解析 (塚崎)、の4つの柱から構成されている。3年間の研究計画に基づいて、以下の研究成果を挙げた。1) NOD/SCID/Jak3KO (NOJ) マウスによる新たな腫瘍細胞連続移植系を確立した。2) 末梢血中 ATL 細胞の中のがん幹細胞 (CSC) を同定し、分子細胞学的解析を行っている。3) 末梢血 ATL 細胞のゲノム異常と遺伝子発現異常の網羅的解析を行い、データベースを構築した。4) 末梢血 ATL 細胞における特異的 miRNA 発現異常の分子機構とその生物学的意義を明らかにし、新たな分子標的療法開発の基盤を提供した。5) As203 と $INF\alpha$ の併用により、mATL-CSC を選択的に抑制出来る可能性を示した。6) マウスモデルにおいて mATL-CSC の同定と特異的抗原の同定を行った。mATL-CSC の表面に特異的に発現するカドヘリンファミリーの膜タンパクをショットガン法による LC-MS/MS で同定した。7) mATL-CSC のニッチを同定した。mATL-CSC は脾臓においては類洞の血管付近、骨髄においては骨内膜領域に存在した。mATL-CSC で特異的な発現を示す分子を同定しその機能解析を行った。8) マウス ATL モデルとヒト ATL 患者の SDF-1 α 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。9) indolent type ATL (chronic と smoldering) の長期予後が不良である事を明らかにし、新たな治療戦略の必要性を示した。10) 急性型 ATL の末梢血とリンパ節の ATL 細胞の CGH 解析から、リンパ節が ATL 細胞の主たる増殖とプログレッションの場であることを見出した。11) エピジェネティクスを標的とした新規治療法として、幾つかの阻害剤を検証し有用性を確認した。

研究分担者：

中内啓光 東京大学医科学研究所 教授
濱口 功 国立感染症研究所 部長
長谷川秀樹 国立感染症研究所 室長

小川誠司 東京大学医学部 特任准教授
塚崎 邦弘 長崎大学大学院 准教授

A. 研究目的

ATL は HTLV-1 感染によって発症する最も治療困難な白血病の 1 つであり、日本では約 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。研究計画は、1) マウスモデルを用いた「マウス ATL のがん幹細胞 (mATL-CSC)」の同定と解析 (浜口、長谷川)、2) 免疫不全マウスを用いたヒト ATL のがん幹細胞 (ATL-CSC) の探索と解析 (渡邊、中内) 3) 末梢 ATL 細胞の分子病態解析 (渡邊、小川) 4) ATL 患者の臨床病態解析 (塚崎)、の 4 つの柱から構成されている (図 1)。

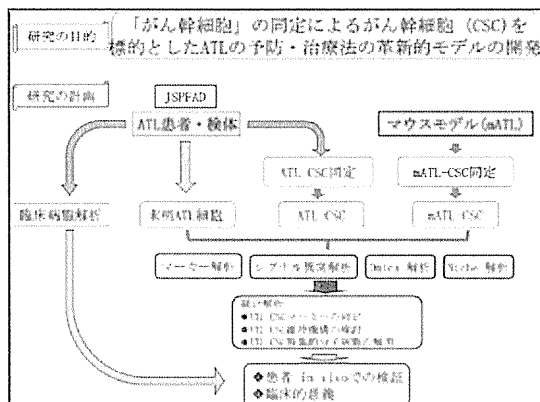


図 1 研究計画の全体像

本研究班は、これらの解析を統合して、ATL がん幹細胞 (ATL-CSC) の同定とその細胞学的特徴を明らかにし、臨床病態との比較検討を行って、新たな発症予防および治療戦略の確立へ貢献することを目指すものである。

また、本研究班では、平成 22 年 12 月に首相官邸「HTLV-1 特命チーム」によって策定された「HTLV-1 総合対策」に基づき、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。

B. 研究方法

(I) Tax トランスジェニックマウス ATL (mATL) を用いたがん幹細胞の解析

(A) マウス ATL モデルのがん幹細胞の同定、分子病態解析および「がんニッチ」の同定

1. 動物および細胞

長谷川秀樹博士 (国立感染症研究所 感染病理部) から供与された HTLV-1 Tax トランスジェニックマウス (Tax-Tg) 由来腫瘍細胞を用いて検討した。また、腫瘍細胞に GFP を強制発現させた移植モデルを作成し、腫瘍細胞のビジュアル化を試みた。移植実験には 6-12 週齢の NOD/SCID マウス (NOD. CB17-Prkdcscid/J, Jackson Lab) を用いて行った。

2. 腫瘍構築実験

Tax-TG 由来腫瘍細胞を 1×10^6 個腹腔内接種する。接種後 3 週間程で腫瘍が形成されるので末梢血・体重を測定し、末梢血で 10 万以上の WBC になった個体を腫瘍形成個体としてサンプリングした。腫瘍形成が認められる脾臓より細胞を分取し、再度、別の NOD/SCID マウスに移植し、3 回の連続移植実験を行った。また限界希釈実験として、 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 の細胞数を準備し接種し、腫瘍構成能を検討した。

3. フローサイトメトリーを用いた表面抗原解析と SP 解析

腫瘍細胞中の ATL-CSCs 探索の目的での SP 細胞解析を行った。Tax-TG 由来腫瘍細胞を Hoechst 33342 dye ($2.5 \mu\text{g/mL}$, Invitrogen, H-3570) で 37°C で 60 分染色した。Hoechst 染色を行った細胞の一部は verapamil (Sigma-Aldrich) を加えて実験コントロールとした。Hoechst 33342 で染色した後、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 /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、 $2 \mu\text{g/mL}$ の propidium iodide (BD Biosciences)を加えて解析サンプルとした。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、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. 組織学的解析

腫瘍細胞接種後、約 3 週間で腫瘍が形成されるので安楽死し、剖検後、脾臓重量を測定し、0.3g 以上の巨脾像が認められた個体を選別して各組織（骨・脾臓）を Bouin' s Solution (SIGMA)によって固定した。固定したサンプルは脱水系列を通してパラフィン包埋 (Fisher Scientific)した。パラフィンブロックはミクロトーム (ヤマト光機リターム) で $4 \mu\text{m}$ 切片を作成し、風乾後、免疫組織化学を行った。組織切片は methyl-amino-silane (MAS) コートしたスライドガラス上に乗せ Periodic acid-Schiff (PAS) 陽性の ATL 細胞を判別した。脾臓の白血病/リンパ腫は PAS-ヘマトキシレン染色にて確認した。

5. 免疫組織化学

各種マーカー染色

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 5%-BSA 入りの PBS でブロッキングを行った切片 ($4\text{-}\mu\text{m}$ 厚) に anti-CD3, -CD4, -CD44, -CD117 抗体(共に 1:200) を 4°C で一晩反応した。シグナル検出には Vectastain ABC 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. ATL-CSCs ニッチの同定実験

免疫組織化学に用いた抗体は以下の通り。Rat anti mouse CD71 (BD), Rat anti mouse CD38 (LIFESP), Goat anti mouse c-kit (R&D), Chick anti GFP (Abcam)。これらの抗体を至適濃度 (1:50-1:1200) で希釈し Blocking Solution (Roche) でブロッキングした後の切片にて反応させた (4°C , 一晩)。PBST で洗浄後、再度、5%BSA/ PBS で洗浄し、それぞれの 2 次抗体として Donkey anti Rat IgG DyLight 488, Donkey anti chick IgG DyLight 488, Donkey anti rabbit IgG DyLight488, Donkey anti Goat IgG Dylight 488, Donkey anti Rat IgG DyLight 549, Donkey anti chick IgG DyLight 549, Donkey anti rabbit IgG DyLight549, Donkey anti Goat IgG Dylight 549 (全て Jackson Immuno Research Inc)を組み合わせて用いた。核染には Hoechst33342 (Invitrogen)を用いた。封入には ProLong Anti Fading reagent (Invitrogen)を用いた。OLYMPUS BX53 を用いて観察し、写真撮影を行った。写真は Aperture (Apple Inc)にて管理した。

7. DNA マイクロアレイ解析

脾臓中の ATL-CSCs 分画細胞 (Sp1_CSCs: CD38-/CD71-/CD117+: 2×10^5 個) と CSCs 以外の分画 (Sp1_Non-CSCs: CD38+/CD71+/ CD117- : 9.7×10^5 個)、骨髄中の CSCs 分画細胞 (BM_CSCs : 5×10^4 個) と

CSCs 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。

8. Q-PCR による遺伝子発現のバリデーション

Poly (A) RNA は 5×10^3 個の ATL-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。内部標準には β -actin を使用した。 94°C : 1分、 60°C : 25秒 (2-ステップ) で 40 サイクル行った。発現レベルはマウス β -actin との比により計算した。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。

9. 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 2011 (Microsoft Japan) を使用した。

(B) マウス ATL がん幹細胞の細胞特性解析と特異的分子の同定

1. 材料 (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 1×10^6 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。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. AMD3100 による in vivo での白血病細胞浸潤抑制実験

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

3. がん幹細胞の分取

mATL 細胞の癌幹細胞の分取は、

Yamazaki らの論文 (Blood 2009 Sep 24;114(13):2709-20.) に準じて以下のように行った。まず SCID マウスの脾臓から mATL 細胞を分離し、次に細胞を抗 CD16/32 抗体および抗 CD38-PE 抗体、続いて抗 PE マイクロビーズと反応させ MACS カラムで CD38 陰性分画を濃縮した。CD38 陰性細胞を抗 CD71-FITC 抗体、抗 CD117-APC 抗体で染色し、JSAN セルソーターにて CD38 陰性、CD71 陰性、CD117 陽性分画の細胞を集めた。非癌幹細胞集団として、CD38 陽性、CD71 陽性、CD117 陰性も同時に集めた。集めた細胞はセルバンカーに浮遊させ、 -80°C で保存した。

4. 質量分析計による定量解析

癌幹細胞 (3.6×10^5 cells)、非癌幹細胞 (1×10^6 cells) から調整した $1 \mu\text{g}$ 分のペプチドを液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 Thermo SCIENTIFIC 社 LTQ Orbitrap Velos へアプライした。解析結果は Thermo SCIENTIFIC 社 Proteome Discoverer 検索にてペプチドを同定し、Progenesis によりタンパク質発現差異解析を行った。

5. フローサイトメトリー

SCID マウスの脾臓から分離した mATL 細胞 (1×10^7 cells) $1,500 \text{ rpm}$, 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、 $1,500 \text{ rpm}$, 3 min , 4°C で遠心し、 $100 \mu\text{l}$ の 2% FBS 含有 PBS に懸濁した。抗 CD16/32 抗体を添加、混和し、30 分間、 4°C 、暗所で反応させた。その後 2 ml の 2% FBS 含有 PBS で洗浄した。続いて抗 CD38-PacificBlue 抗体、抗 CD71-PE-Cy7 抗体、抗 CD117-PerCP-Cy5.5 抗体、抗 CD44-FITC 抗体、抗 Cadherin 抗体を添加、混和し、30 分間、 4°C 、暗所で反応させた。その後 2 ml の 2% FBS 含有 PBS で洗浄した。続いて抗ウサギ IgG-APC 抗体を添加、混和し、30 分間、 4°C 、暗所で反応させた。処理した細胞はフローサイトメトリー (FACS CantoII) を用いて解析した。

6. mATL 細胞 SCID マウス移植実験

SCID マウスの脾臓から mATL 細胞を分離し、次に細胞を抗 CD16/32 抗体および

抗 Cadherin 抗体もしくはコントロールウサギ IgG と反応させ、続いて抗ウサギ IgG マイクロビーズと反応させ MACS カラムで抗体陽性分画を除去した。Cadherin 陽性細胞およびコントロール抗体陽性細胞を除去した細胞集団を 1×10^6 個/頭で 6 週齢の SCID マウス 5 頭に腹腔内投与した。mATL 細胞移植後 35 日目にマウスを安楽死させ、脾臓の重量測定と末梢血中の白血球数計測を行った。

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。

(II) 免疫不全マウスを用いたヒト ATL のがん幹細胞 (ATL-CSC) の探索と解析

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、 $5 \mu\text{g/ml}$) 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、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、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。

ATL の CD4 CCR4 分画由来の連続移植継代株の Frozen Stock をマウスに移植後約 40 日後に脾臓を採取し、Ficoll-Paque で単核細胞分画を分離した。塩化カルシウム添加 Ice-cold Tris 緩衝液で細胞を洗浄・懸濁した後、蛍光標識抗体および Annexin V の組み合わせで染色した (4°C、20 分間)。同バッファーで細胞を洗浄・懸濁し、上記の様に表面マーカーの解析を行った。CD4 陽性細胞における FSC 高分画 CD5 強陽性分画、および FSC 小分画 CD5 弱陽性分画をソーティングし、所定の細胞数をそれぞれ免疫不全マウスに移植した。

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。

(III) 末梢血 ATL 細胞の分子病態解析

1. 末梢ATL細胞の遺伝子発現解析

mRNA と miRNA の発現解析には、Agilent Technologies 社の 4x44K Whole Human Genome Oligo Microarray と Human miRNA microarray kit v2 を用いた。mRNA 発現解析では ATL 検体数 50 検体、コントロール 22 検体を用い、miRNA 発現解析

は ATL 40 検体、コントロール 22 検体を用いた。定量 RT-PCR には TAKARA の SYBRGreen システムを用いた。また、Mature miRNA assays キットは Applied Biosystems 社から購入した。

2. 末梢ATL細胞のゲノムコピー数解析

JSPFAD マテリアルバンクに登録された ATL 患者 168 例の末梢血単核球より抽出した染色体 DNA を用いた。解析には Affymetrix 社の Affymetrix GeneChip Human Mapping 250K Nsp Array を用い、得られた結果の解析には CNAG/AsCNAR プログラムを用いた。

3. miRNAの標的遺伝子解析

標的遺伝子の同定には、4種類のアプローチによるコンピュータ解析に *in vitro* における検証を加えた。レポーターアッセイには pMIR-REPORT firefly plasmid (Ambion) を用いた。

4. シグナル伝達および細胞増殖・細胞死解析

NF- κ B 経路の解析には ウェスタンブロット、EMSA、ルシフェラーズアッセイ等を用い、細胞増殖と細胞死の解析には、Annexin V の FACS 解析等を用いた。培養細胞や *ex vivo* ATL 細胞への遺伝子導入には レンチウイルスベクター (CS-H1-EVBsd) (理研より供与) を用いた。

5. ポリコーン機能およびエピジェネティクス解析

メチル化ヒストン抗体等を用いた ChIP アッセイによりポリコーンの集積、ヒストンメチル化と DNA 結合タンパク質の解析を行った。siRNA を用いて YY1 のノックダウンの効果等も検証した。

6. ATL 細胞のゲノム異常の解析

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、マイクロアレイ技術・高速シーケンシング技術を用いたゲノム異常の解析を行う。(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)また TCR シグナル経路に関与する遺伝子において、シグナル経路の上流である細胞膜表面のレセプター、シグナル伝達、遺伝子発現制御を行う遺伝子を含む、9 遺伝子でゲノムコピー数の異常(高度増幅、増加、欠失)の集積が確認されており、T 細胞腫瘍である ATL の腫瘍化において、TCR シグナル経路が重要な役割を果たしていることが示唆された。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目的とし、4 遺伝子に対し各々複数の shRNA 発現ベクターを構築し、ウイルスを用いた導入実験を行った。(3)腫瘍特異的な変異を同定するためには患者固有の多型を除外する必要があり、ATL 患者 1 例について腫瘍検体と同一患者からの正常検体を Agilent 社の Sureselect を用いて全エクソン領域を濃縮し、次世代シーケンサー HiSeq (Illumina 社) を用いて網羅的な遺伝子変異解析を行った。

(IV) ATL 患者の臨床病態解析

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. ATL の臨床病態解析

1) 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 ATL90 例を解析した(英文文献 17)。病型分類は、Japan Clinical Oncology Group (JCOG) リンパ腫病によ

る規準によった。

2) ポリコーム (PC) 遺伝子 EZH2 を標的とした治療法の検討

PC 遺伝子の 1 つである Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) は、polycomb repressive complex 2 (PRC2) を構成しヒストン H3 のリシン 27 をトリメチル化することにより、エピジェネティックな遺伝子発現抑制とクロマチンのリモデリングに関与する。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 は、EZH2 ほかに抑制し、種々のがん細胞の増殖停止と分化による抗がん剤として期待されている。両剤について ATL 細胞株とプライマリー ATL 細胞を用いて検討した。

3) 急性型 ATL の末梢血とリンパ節病変のゲノム異常の比較

ATL の多様な臨床病態をより詳細に解明するために、13 名の急性型 ATL 患者の末梢血とリンパ節の ATL 細胞のゲノム異常をオリゴ・アレイでの Comparative genomic hybridization (CGH) 法で比較した。

(V) 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

本班研究 2 年目に国の HTLV-1 総合対策が示されたことを受けた追加課題によって、全国の医療機関への診療実態調査と患者・家族向けのパンフレット作成を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、JSPFAD の研究の一部として遂行された。JSPFAD の研究計画は、東京大学においては平成 14 年度と平成 19 年度、および平成 23 年度に承認されている(平成 14 年 12 月 16 日付け東京大学医科学研究所倫理審査委員会承認 受付番号 14-5、平成 19 年度東京大学大学院新領域創成科学研究科研究倫理審査委員会承認、承認番号 07-07、平成 23 年度年度東京大学大学院新領域創成科学研究科研究倫理審査委員会承認、受付番号 10-50)。

マウスの取り扱いは東京大学医科学研究所・動物実験施設あるいは国立感染症研究所動物実験施設で飼育し、これらの施設の動物実験指針にしたがい、実験計画の承認を受けて動物愛護の精神に基づいて行われた。

C. 総合結果

(I) Tax トランスジェニックマウス ATL (mATL) を用いたがん幹細胞の解析

1. mATL-CSC の同定：

1) HTLV-1Tax-Tg マウス由来の腫瘍脾臓細胞 (SLC) の解析：CD38-/CD71-/CD117+ 分画に細胞が 0.03% 存在することが判明した。そしてそれは多剤耐性能を持つ SP 細胞と高い割合 (50%以上) で重複していたことからこれを CSC 候補細胞と考えた (図 2)。

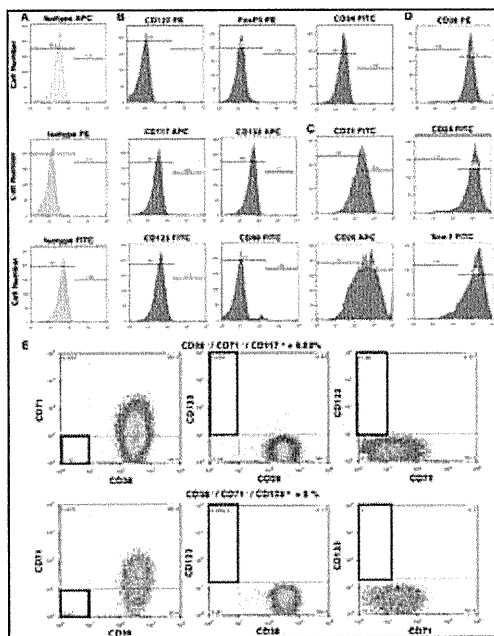


図 2. mATL 細胞のフローサイトメトリ解析。(B) 部分的あるいは低い発現型：CD127、CD117、CD123、FoxP3、CD133、CD90、CD34 の mATL 細胞における発現は低レベルであった。(C) Heterogeneous な発現型：CD71 と CD25 は Heterogeneous な発現を示した。(D) 主要型：CD38、CD24、Sca-1 は mATL 細胞において高い発現を示した。個々の部分母集団のパーセンテージは、各アイソタイプのコントロールによって評価される解析結果から測定した。(E) mATL 細胞における CD38、CD71、CD117 または CD133 のトリプル染色。総 mATL 細胞に占める CD38-/CD71-/CD117+細胞の割合は

0.03%、CD38-/CD71-/CD133+細胞の割合は 0% であった

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

2. mATL-CSC の niche の同定

mATL モデルにおける ATL-CSCs の臓器局在の解析を通じて mATL-CSC の niche の検討を行った。

mATL 細胞移植マウスの組織を CD38、CD71、CD117 抗体を用いて免疫組織化学的に検討し ATL-LSCs の局在を調べた。その結果、脾臓中の約 80% の細胞が CD38 及び CD71 陽性であることが明らかとなった。ATL-LSCs 候補 CD117 Single Positive 細胞を探索した結果、脾臓に於いては赤碑随 (RP : Red pulp) 及び白脾随 (WP : White Pulp) 共に存在している事が明らかとなった。共に頻度は 1~1.5% 前後であったが、頻度は赤碑随の方が高かった。SP 細胞は血管内皮近傍にあることが多く、脾臓内では血管内皮ニッチが ATL 癌幹細胞と深く関わっていることが示唆された。

免疫染色による解析ではレシピエント (NOD/SCID) マウス由来の正常 CD38、CD71、CD117 発現細胞が存在し、腫瘍細胞の局在の正確な把握が困難であるため、GFP 強制発現 mATL 細胞を作製して移植実験で検証した。その結果、腫瘍細胞は脾臓中の赤碑随、白脾随ともに存在していた。GFP 陽性細胞中の CD117 細胞陽性細胞を ATL-CSCs と仮定して GFP 抗体と CD117 抗体による二重染色で検討した。その結果、GFP 陽性/CD117 陽性 (DP: 二重陽性細胞) は赤脾随、白脾随共に存在している事が明らかとなった。またそれらの頻度は、CD38-/CD71-/CD117+細胞よりも低く、GFP+/CD117+/DP 細胞が ATL-CSCs である事が示唆された。

同様に、骨髄におけるニッチを同定する目的で、GFP 陽性の ATL 細胞移植後約 3 週間の脾臓と骨髄を、GFP と CD117 の

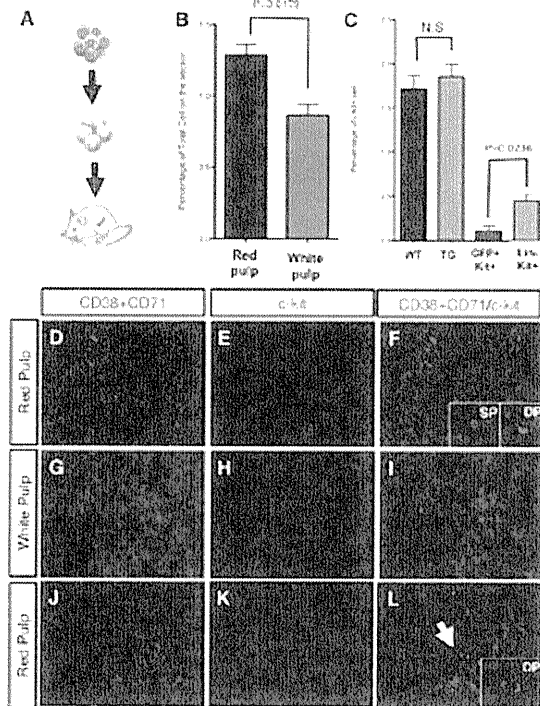


図3. 脾臓における ATL 癌幹細胞の局在 A)GFP 強制発現 ATL 細胞の作成と移植実験 B) 赤脾髄、白脾髄における CD38-/CD71-/CD117+ 細胞の割合 C)GFP+CD117+細胞の頻度 D-F)赤脾髄における CD38-/CD71-/CD117+細胞 G-I)白脾髄における CD38-/CD71-/CD117+細胞 J-L)赤脾髄における GFP+/CD117+細胞の局在

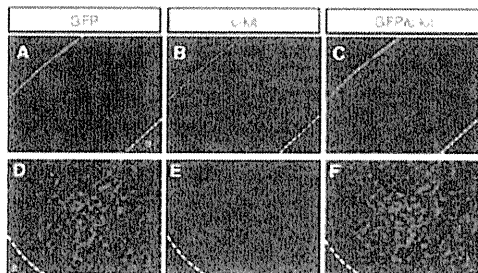


図4. 骨髄における ATL 癌幹細胞の局在 A-C) GFP+CD117+細胞の局在 骨内膜に沿った領域に GFP 陽性細胞が週族集簇している。一方 CD117SP 細胞は骨髄腔中心部に多い。D-F) 骨梁領域における GFP+CD117+細胞の局在

二重染色で検討した。その結果、ATL 細胞 (GFP 陽性細胞) は骨髄中の管腔側にあまり存在せず、骨内膜に沿った形で存在している事が明らかとなった。CD117 との二重染色では、レシピエント由来の CD117 陽性造血幹細胞は骨髄管腔側に多数存在していた。一方、DP 細胞は骨内膜に近い場所に存在している事が明らかとなった。特に骨梁領域では殆どの細胞が骨内膜に接した形で存在している事が明らかとなった (図3、4)。

3. mATL-CSC の統制解析と特異分子同定

1) mATL-CSC の細胞特性の解析

マウスモデルの臓器浸潤に SDF-1a/CXCR4 経路が関与し、その阻害薬 AMD3100 が細胞浸潤抑制能を示す事を明らかにした (Kawaguchi et al., Blood 114:2961, 2009)。As203 と INF α の併用により、mATL-CSC を選択的に抑制出来る可能性を示した (El Hajjet et al., J Exp Med 207:2785, 2010)。

2) mATL-CSC 特異分子の同定

mATL 細胞を移植した SCID マウスの脾臓から 1.5×10^9 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 の細胞を得たのち、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幾つかのタンパク質が同定された。その中の Cadherin 分子について注目し、mATL-CSC の表面マーカーである CD38、CD71、CD117、CD44 の発現と Cadherin 発現との相関性をマルチカラーフローサイトメトリーに

より解析した。その結果、Cadherin は CD38(-), CD71(-), CD117(+), CD44(+) の mATL-CSC でもっとも高発現していた (図 5)。

3) Cadherin 発現細胞除去による In vivo 白血病形成能の検討

Cadherin 発現細胞除去が SCID マウス移植した mATL 細胞の白血病形成能に与える影響を検討した。1×10⁶ 個の Cadherin 発現細胞除去 mATL 細胞検体の移植後、約 1 ヶ月で白血病を発症した。しかし末梢血中のリンパ球数は Cadherin 発現細胞除去件対投与群において低い傾向が見られた。

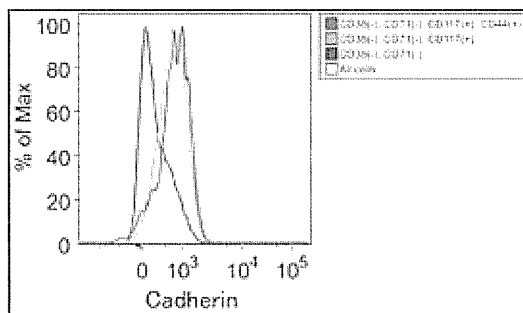


図 5. 各細胞集団における Cadherin の発現

(II) 免疫不全マウスを用いたヒト ATL のがん幹細胞 (ATL-CSC) の探索と解析

1. ヒト ATL 腫瘍細胞移植系の確立

1) NOJ マウス新生児を用いた移植系の検討と確立

NOJ-SCID への ATL 患者末梢血検体の移植では、効率に EBV 感染 B 細胞腫瘍が生じ、T 細胞の生着効率が著しく低く、継代移植も不可能であるが明らかになった。そこで、NOJ マウス新生児を用いた移植系を検討した。その結果、ATL 患者末梢血単核球の肝臓内移植で生着率の著明な向上が得られ、継代移植に際しても、細胞懸濁液の代わりに脾臓断片の移植で安定した結果が得られることが明らかになった。更に、患者検体の移植に際して、CD3, CCR4 等のマーカーで予めソーティングすることで著明に生着率が向上し、連続継代移植が可能になった。少なくとも 100 個の移植細胞数で腫瘍形成が可能であることが明らかになった。

これらの結果は、ATL 患者末梢血単核球

分画に免疫不全マウスでの造腫瘍性と連続継代移植を可能にする「がん幹細胞」の特性を有する細胞集団が存在することを明確に示している。

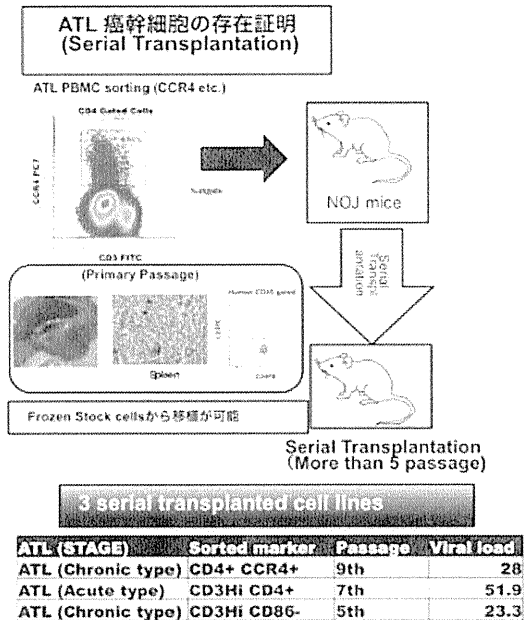


図 6. 患者 ATL 検体の移植系と生着腫瘍のウイルスロード

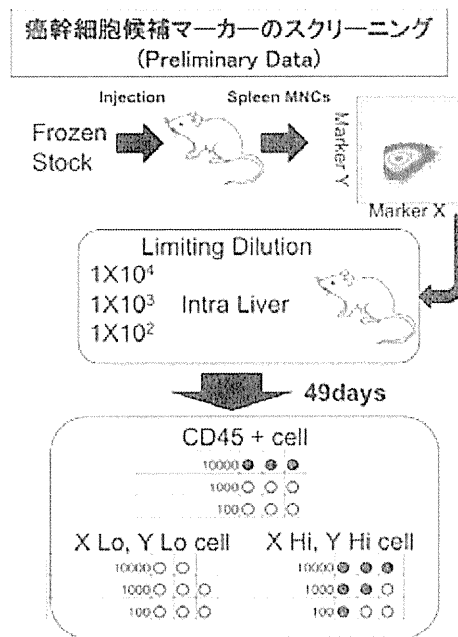


図 7. 患者 ATL 検体の移植系と表面マーカーによるソーティング、および限界希釈法 (Limiting dilution) による ATL-CSC の検証 (いずれも予備実験のデータである)

NOJ マウス生着細胞群の HTLV-1 感染の状況とクローナリティは、プロウイルス DNA の定量 Realtime PCR と Inverse PCR を用いて検討した。その結果、移植検体と生着腫瘍検体で、細胞当たりのプロウイルスコピー数（ウイルスロード）は、同等かやや増加していること、プロウイルス組み込み部位から見たクローン解析では、継代移植細胞株が検体の ATL クローンであることが確認出来た（図 6、7）。

(III) 末梢血 ATL 細胞の分子病態解析

1. ATL における miRNA 異常

我々は HTLV-1 感染者コホート共同研究班 JSPFAD (<http://www.htlv1.org/>) の全面的協力を得て、世界で初めて ATL 患者由来腫瘍細胞の DNA, mRNA, miRNA の大規模な統合解析を完了した。miRNA 解析のサンプルにはプロウイルス量の多い (=腫瘍細胞の割合が高い) 40 例の ATL 患者由来細胞を用い、さらにコントロール群には ATL 群と年齢を一致させた健常人 CD4+ T 細胞 22 例を用いた。アジレント社の 723 種のヒト miRNA と 76 種のウイルス由来 miRNA を網羅した microarray を用い、非常に厳しい検定をかけて異常 miRNA を割り出した結果、ATL では 61 種の異常 miRNA のうち 59 種の miRNA が正常 T 細胞に比べて著しく低値を示すことがわかった。これは、腫瘍細胞は miRNA の発現が低下傾向にあるという他のがん研究の結果と一致している。減少している miRNA には、すでに癌抑制性 miRNA として報告されている Let-7 ファミリーや miR-101 など含まれていた。これらの 61 種の miRNA は ATL 細胞の新たな分子マーカーであり、また一つひとつが機能的に腫瘍細胞の特徴に寄与していると考えられる。

2. miR-31 の機能と欠損の分子機構とその意義

ATL 細胞で見つかった 61 種の発現異常 miRNA のうち、miR-31 が例外なくすべての ATL 患者で減少し、且つ減少のレベルが著しいことが明らかになった (0.00403 倍, $p = 2.85 \times 10^{-25}$)。

標的遺伝子の同定には、ATL 細胞の mRNA 発現プロファイルの結果と統合し、in vitro の複数の実験によって検証した。その結果、miR-31 の新規標的遺伝子として NIK を同定した。NIK の過剰発現は ATL 細胞の恒常的 NF- κ B 活性化の基盤となっている（英文文献 XX）。実験の結果、正常 T 細胞では miR-31 の発現が比較的高く NIK の発現を抑制しているが、miR-31 の異常な発現低下が NIK の発現誘導とそれに伴う NF- κ B 経路の恒常的活性化を誘発することがわかった。

さらに ATL 細胞株及び新鮮 ATL 細胞に対して miR-31 を再導入すると細胞死が誘導された。

発現低下のメカニズムを明らかにするため、ATL 臨床検体を詳細に解析した結果、miR-31 の発現欠失はゲノムの欠損と Polycomb ファミリー依存的なエピジェネティックな異常によって、すべての ATL 患者で認められることが明らかになった。さらに、Polycomb ファミリーが miR-31 を抑制することによって NIK-NF- κ B 経路を活性化する分子機構は、ATL だけでなく乳がん細胞や B 細胞における免疫応答反応においても保存されていることを明らかにした。Polycomb ファミリー-NF- κ B 経路、miR-31 はそれぞれが単独で多彩な機能を有しており、細胞の恒常性や分化などの様々な機能に必須であると同時に、さらにクロストークを形成することによって、より複雑な遺伝子発現制御ネットワークを形成していると考えられる（図 8）。

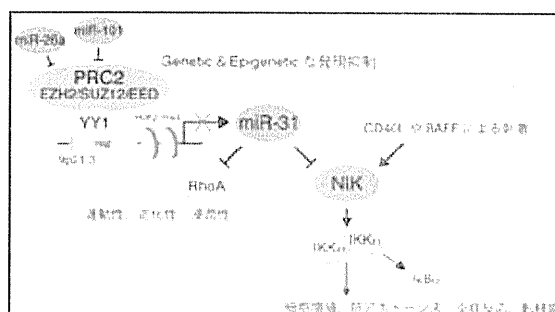


図 8. ATL 細胞における miR-31 を取り巻く分子メカニズム

この実験結果は、ATL 細胞がこの分子ネットワークに依存していることを示しており、エピジェネティックの制御、もしくは miR-31 の補充による新たな治療法の開発につながると期待される。

3. ATL 細胞におけるゲノム異常

(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) 作成された 4 遺伝子の shRNA 発現ベクターについて、至適な感染条件を模索し効率のよいノックダウンの実現を目指したが、明らかな差は認めなかった。TCR シグナル経路の制御に参与する 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。

(3) 腫瘍側、正常側ともに平均して 110 回の深度で全エクソン領域が読まれ、解析の感度は十分と考えられた。エクソン領域の濃縮率は 72% であり、20 回以上読めている領域は全体の 85% であった。正常検体と比較し、77 個の腫瘍特異的な変異が同定された (図 9)。

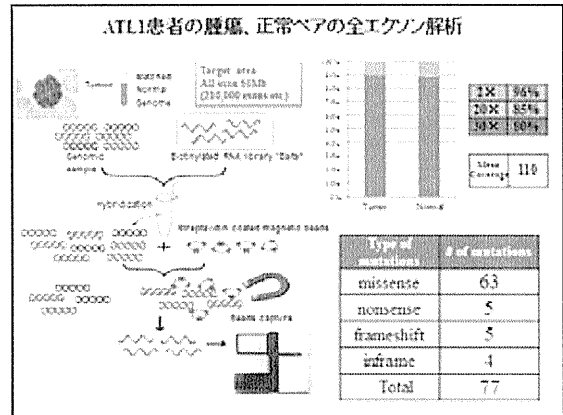


図 9. 全エクソン解析の例

(IV) ATL 患者の臨床病態解析

1. Indolent ATL の長期予後の解明

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

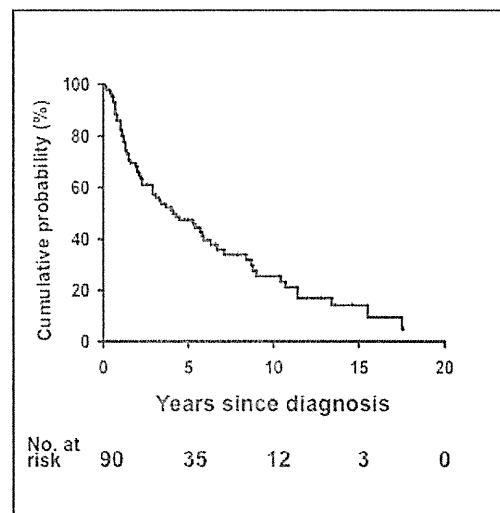


図 10. Indolent type ATL の長期予後 ((Takasaki Y, Tsukasaki K, et al; Blood 2011)

2. ポリコム等エピジェネティクスを標的とした治療法の検討

CD4 磁気ビーズで純化したプライマリー ATL 細胞を用いた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 細胞株におけるヒストン H3 のトリメチル化を伴う EZH2 高発現は、miR-101 と miR-128a の発現と関連していた。さらに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。

3. ATL 細胞の生体内プログレッションの解明

13 例中 9 例では、末梢血とリンパ節のゲノムに、共通した異常に加えて、異なる増幅・欠失を認めた。その全てにおいて、リンパ節での異常がより複雑であった。さらには末梢血にみられる homozygous な欠失領域がリンパ節ではみられないことを 13 例中 5 例に認めたが、その逆は全く認められなかった。T 細胞受容体のサブプロット解析では、上記の複数のサブクローンは共通のクローンから進展していることが明らかとなった。以上より急性型 ATL ではリンパ節内でゲノム異常の異なるクローンが生じ、そのうちの一部分が末梢血に出現していると推定できた (図 11)。

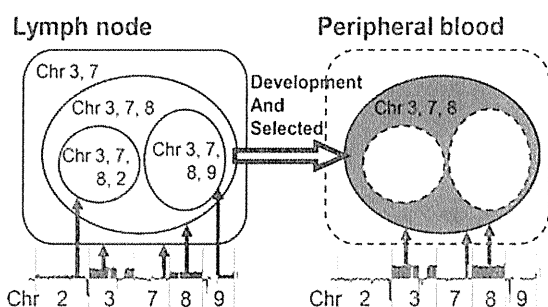


図 10. 代表的な急性型 ATL 症例におけるリンパ節に複数存在するサブクローンと末梢血に出現したそのうちの 1 つのサブクローン。

(V) 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、ホームページ (HTLV-1 情報サービス) に掲載した。

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、パンフレットを作成した。(本文末の別項参照)

D. 考察

3 年間の研究期間において遂行する研究の構造は既に記載した様に、

- 1) マウスモデルを用いたが「マウス ATL のがん幹細胞 (mATL-CSC)」の同定と解析 (浜口、長谷川)、
- 2) 免疫不全マウスを用いたヒト ATL のがん幹細胞 (ATL-CSC) の探索と解析 (渡邊、中内)
- 3) 末梢 ATL 細胞の分子病態解析 (渡邊、小川)
- 4) ATL 患者の臨床病態解析 (塚崎)

の 4 つの柱から構成されている。それぞれの領域において、上記の様な成果が得られているが、領域ごとに検討すると以下の様になる。

1) マウスモデルを用いたが「マウス ATL のがん幹細胞 (mATL-CSC)」の同定と解析

mATL の病態形成に関わるケモカイン系の存在と治療標的としての検討、および、As203 と INFa の併用による CSC 特異的な細胞障害性を示唆するデータは、ヒトの ATL 患者の治療法を考える上で示唆に富む結果である。

mATL-CSC およびその niche の同定は大変大きな進歩であると考えられる。脾臓のみならず、骨内膜近傍に存在することは、ATL の臨床的な特徴の一つであるこうカルシウム血症と骨病変形成のメカニズムを理解する上でも示唆に富む知見である。Niche の解析が進むことは、ATL-CSC を標的とした治療法開発に必須の知見をもたらすことが期待される。

mATL-CSC 特異的に発現する分子として Cadherin ファミリーの分子が同定された。

CSCの臓器分布、nicheとの相互作用を検討する上で、重要な情報が得られたと考えられる。

マウスモデルの解析は、モデル動物の利点を生かして、種々の重要な知見をもたらしたと言える。今後更に新たな情報を生み出すことが期待される。

2) 免疫不全マウスを用いたヒト ATL のがん幹細胞(ATL-CSC)の探索と解析

当初計画に比べて一部研究の進捗が遅れがちであった。その最大の理由は、ATL細胞を移植する免疫不全マウスの選定に多くの作業を要したことによる。論文発表によると、NOG-SCIDが利用されているが、患者末梢血単核球の移植では、EBV感染Bリンパ球の腫瘍が形成され、T細胞性の腫瘍形成は稀であった。形成されたT細胞腫瘍は、連続継代移植が出来ず、また、何代か継代で来た場合でもHTLV-1プロウイルスコピー数が著しく増加し、*in vivo*での新規ウイルス感染が示唆された。これらの結果から、NOG-SCIDに変わる新規の移植系の確立が必要となり、熊本大学岡田誠治博士より供与されたNOJマウスを用いることで、安定した移植系を確立することに成功した。この系では、結果で示す様に、患者末梢血単核球をT細胞マーカーでソーティングした検体を用いることで、ほぼ全例腫瘍形成が認められ、長期に連続継代移植が可能であった。さらに、生着した腫瘍細胞を凍結保存した後でも、移植により腫瘍形成が認められた。以上の結果は、ATL患者の末梢血中に「がん幹細胞(CSC)」の性質を持った細胞が存在することを明確に示すものである。

この系を用いて、際着腫瘍細胞のクローナリティ、感染HTLV-1のプロウイルスコピー数、表面マーカーの詳細な解析を行い、生着腫瘍がATL細胞に由来すること、マウスの*in vivo*での新規ウイルス感染は無いか有ってもごく低レベルであることを明らかにした。現在、ATL-CSCの細胞特性の解析に加えて、臓器組織での分布の解析を行い、Nicheの同定を目指した解析を進めている。

3) 末梢 ATL 細胞の分子病態解析

JSPFADの共同研究組織とマテリアルバンクを利用して、幾つかの重要な情報を得た。JSPFADの共同研究では、キャリア末梢血中の感染細胞がATL発症の独立したリスクファクターであることを証明して報告している(Iwanaga et al., Blood)。本研究課題では、ATL-CSCの分子病態を理解する基礎情報を得ると言う位置付けで、末梢血ATL細胞の分子病態解析を進めて来た。mRNAとmiRNAの発現プロファイルデータベースの確立と、先に共同研究者の小川らと確立したゲノム異常のデータベース情報を基盤として、ATL細胞における特異的なmiRNA発現異常を見いだした。今回明らかにしたmiR-31の発現欠損と下流のNF- κ B活性化、および発現抑制の分子機構は世界で初の知見であり、出版されたCancer Cell誌において、別途コメントリーの記事が掲載された。更に、当該研究で証明されたmiR-31補充によるATL細胞死の誘導は、全く新たな分子標的療法開発への道を開く知見である。

4) ATL患者の臨床病態解析

長崎大学を中心としたATL患者の臨床解析の結果、重要な情報が明らかにされた。indolent type ATL (chronic と smoldering)の長期予後が不良である事の証明は、新たな治療戦略の必要性を示すものである(Takasaki et al., Blood 115:4337, 2010)。更に、リンパ節がATL細胞のclonal evolutionあるいはprogressionの場であるとの知見は、ATLの発生と増悪の機構を検討する上で新たな基盤を提供する情報である(Umino et al., Blood 117:5473, 2011)。また、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の基礎検討結果は、今後の治療薬開発に貢献することが期待される(Sasaki et al. 96:712, 2011他)。

E. 結論

基礎研究者と臨床家が協力して、ATLのがん幹細胞の探索を目的に、動物モデルからゲノム科学までを利用した共同研

究は、大きな成果を上げた。

本研究で得られた基礎的な実験系と基礎及び臨床的な知見は、今後の ATL 発症予防と来ん治療法開発の重要な情報基盤を提供した。

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.htlv1.joho.org/>))。

以上の活動による制作物は資料に示す。

H. 研究発表

1. 論文発表

(査読付き)

1. Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, Yamochi T, Kagami Y, Tsutsumi A, Matsuda Y, Sato-Otsubo A, Muto S, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaruk K, Ogawa S, Watanabe T. Polycomb-mediated loss of miR-31 activates NIK-dependent NF- κ B pathway in adult T-cell leukemia and other cancers. **Cancer Cell**, 21(1):121-135, 2012
2. Uota S, Dewan MZ, Saitoh Y, Muto S, Itai A, Utsunomiya A, Watanabe T, Yamamoto N, Yamaoka S. An I κ B kinase 2 inhibitor IMD-0354 suppresses the survival of adult T-cell leukemia cells. **Cancer Sci**, 103(1):100-106, 2012
3. Yoshida K, Sanada M, Shiraiishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M, Chalkidis G, Suzuki Y, Shiosaka M, Kawahata R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Ishiyama K, Mori H, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Sugano S, Haferlach C, Koeffler HP, Shih LY, Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. **Nature** 478:64-69, 2011
4. Watanabe T. Current status of HTLV-1 infection. **Int J Hematol**. 94(5):430-434,

- 2011
5. Hasegawa H, Tsukasaki K, et al. LBH589, a deacetylase inhibitor, induces apoptosis in adult T-cell leukemia/lymphoma cells via activation of a novel RAIDD-caspase-2 pathway. **Leukemia**, 25(4) : 575-587, 2011.
 6. Hieshima K, Tsukasaki K, et al. c-Maf suppresses human T-cell leukemia virus type 1 Tax by competing for CREB-binding protein. **Cancer Sci**, 102(4) : 890-894, 2011.
 7. Umino A, Tsukasaki K, et al. Clonal evolution of adult T-cell leukemia/lymphoma takes place in lymph node. **Blood**, 117(20):5473-5478, 2011.
 8. Sasaki D, Tsukasaki K, et al. 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** 96(5): 712-719, 2011.
 9. Hasegawa H, Tsukasaki K, et al. Aberrant overexpression of membrane-associated mucin contributes to tumor progression in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. **Leuk Lymphoma**. 52(6):1108-1117, 2011.
 10. Ishitsuka K, Tsukasaki K, et al. Interferon alfa and antiretroviral agents: a treatment option for adult T-cell leukemia/lymphoma. **Drugs Today (Barc)** 47(8):615-23, 2011.
 11. Chagan-Yasutan H, Tsukasaki K, et al. Involvement of osteopontin and its signaling molecule CD44 in clinicopathological features of adult T cell leukemia. **Leuk Res**. 35(11):1484-1490, 2011.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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**. 96(5): 712-719, 2011
 17. 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**. 25(4):575-587, 2011
 18. 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