

2011/8002B

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23年度
総括・分担研究年度終了報告書

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 23 年度
総括・分担研究年度終了報告書

研究代表者
渡邊 俊樹

平成 24 (2012) 年 5 月

目 次

I. 総括研究年度終了報告	
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	9
渡邊 俊樹	
II. 分担研究年度終了報告	
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.....	35
渡邊 俊樹	
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.....	43
中内 啓光	
3. 脾臓及び骨髄における ATL 癌幹細胞ニッチの同定	49
浜口 功	
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.....	55
長谷川 秀樹	
5. ATL におけるゲノム異常の解析.....	61
小川 誠司	
6. ATL の臨床・分子病態と新規治療法開発の研究.....	65
塚崎 邦弘	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	69
IV. 研究成果の刊行物・別刷.....	73

I. 総括研究報告書

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。本年度は研究3年度目として、以下に要約する検討を行った。1) NOD/SCID/Jak3KO (NOJ) マウス ATL 細胞移植系を用いたて、ATL 患者末梢血単核球の CD4+CCR4+細胞集団に加え、CD3Hi CD4+, CD3Hi CD86-の分画で連続移植継代に成功した。この連続移植継代株は凍結保存後も生着が可能であり、ATL-CSC 候補細胞と考えられた。これらの継代移植可能細胞株のプロウイルスの組み込み部位の解析から患者 ATL 細胞に由来することを確認した。2) CD4+CCR4+分画由来連続移植継代株の CD5++CD4+細胞分画が継代移植可能であり、この分画が ATL-CSCs であることが示唆された。3) 末梢血 ATL 細胞の分子病態解析により、ATL 細胞における特異的な miR-31 の発現欠損とそれによる NF- κ B の恒常的活性化が細胞増殖と細胞死抵抗性に必須であること、ポリコームによるヒストンのメチル化を介したエピジェネティック制御が発現低下の原因であることを明らかにし、世界で初めてポリコーム-miRNA-NF- κ B のリンケージを発見した。4) マウス ATL モデルのがん幹細胞 (mATL-CSC) の組織分布を CD38, CD71, CD117 抗体を用いた多重染色で検討し、赤脾髄及び白脾髄に存在し、特に赤脾髄に多く、血管内皮ニッチに隣接して存在している事を明らかにした。骨髄では骨内膜に沿った形で ATL 細胞及び ATL-CSC が局在し、骨内膜ニッチが腫瘍の形成、増殖に関与する事が示唆された。5) mATL-CSC 特異的な治療標的候補分子となる細胞膜タンパク質として Cadherin を質量分析計による定量的解析法により同定した。また、抗体による治療効果の検証を開始した。6) マイクロアレイを用いた ATL-CSC の特性解析、コピー数異常の集積がみられた TCR 経路に着目した抑制系の機能解析、高速シーケンス技術を用いた全エクソン解析による網羅的な遺伝子変異解析により ATL 腫瘍化に関与する多岐にわたるゲノム異常を同定した。7) 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。8) 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アレイ CGH 法を用いて解析し、リンパ節内でクローンが進展し、その一部が末梢血に出現していること、急性型 ATL では複数のクローンがリンパ節に存在することを明らかにした。これらの成果を元に、今後更に詳細な表面マーカー解析、遺伝発現解析等を通じて ATL-CSC の存在とその性状を明らかにする。

研究分担者： 長谷川秀樹 国立感染症研究所 室長
中内 啓光 東京大学医科学研究所 教授 小川 誠司 東京大学医学部 特任准教授
浜口 功 国立感染症研究所 部長 塚崎 邦弘 長崎大学大学院 准教授

A. 研究目的

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

研究計画3年目となる本年度の研究計画は、前年度までの成果を受けて、ヒトATLでは、ATL-CSCの同定と解析を更に進め、マウスモデルのがん幹細胞(mATL-CSC)については、細胞特性の更に詳細な解析と、骨髄内のCSCの幹細胞機能を支持するNicheの可能性についての検討する事とした。ヒトATL-CSCの分子細胞生物学的な特徴を詳細に解析し、CSCとの比較解析の基盤としてATL細胞全体の遺伝子発現解析とゲノムコピー数の詳細な基礎情報解析を目指した。この目的のため、末梢血ATLの分子病態解析は、これまでJSPFADのマテリアルバンク検体を用いて、ゲノムコピー数異常の解析、mRNA発現プロファイル、および、miRNA発現プロファイルを解析しデータベース化して来た。最終年度は、これらの情報を基盤として、ATL細胞における特徴的な分子病態を明らかにすることを目指した。

B. 研究方法

1. ATL細胞のがん幹細胞の探索

1)連続継代後の移植ヒト細胞の採取

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、直ちに 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、FACS Canto II (Becton Dickinson 社; 488、633、および 407 nm の 3 レーザーを装備) で表面マーカーの解析を行った。解析の結果、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。

2. 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ATL40検体、コントロール22検体を用いた。定量RT-PCRにはTAKARAのSYBR Green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種類のアルゴリズム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-κB経路の解析にはウエスタンブロット、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) ポリコーム機能解析

ChIPアッセイによりポリコームの集積、ヒストンメチル化の解析を行った。siRNAを用いてYY1のノックダウンの効果等も検証した。

3. 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) 動物および細胞

国立感染症研究所長谷川秀樹博士(感染病理部)より供与頂いた HTLV-1 Tax-Tg マウス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、ATL 腫瘍細胞のビジュアル化を試みた。腫瘍細胞は NOD/SCID マウスに移植し、約 3 週間後に腫瘍形成を確認した。

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。

3) 組織学的解析

剖検後、脾臓重量を測定し、0.3g 以上の巨脾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マイクロトーム (ヤマト光機リタトーム) で 4 μ m 切片を作成し、風乾後、免疫組織化学を行った。

4) 免疫組織化学

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 $^{\circ}$ C, 一晚)。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。

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

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。

2) 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 rpm, 3 min, 4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C で遠心し、100 μ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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。

3) 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。

5. ATL におけるゲノム異常の解析

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るため、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。

6. 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) 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。

(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)。

マウスの取り扱いに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. 研究結果

1. ATL細胞のがん幹細胞の探索

昨年度に作成したCD4 CCR4 sorted 連続移植継代株に引き続き、継代株の作成を試みた。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、これらの細胞をPBS(-)に懸濁し、MoFloで表面マー

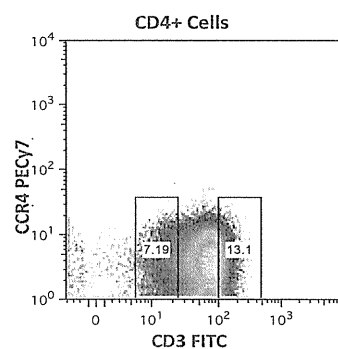


図1 ATL患者末梢血CD4CD3陽性細胞の解析とソーティング

カーの解析を行った。当初はATL細胞と非ATL細胞と分けるためにCD4+ CCR4+とCD4+ CCR4-の差でソーティングを行う予定であったがCCR4の発現がほとんど確認できなかった(図1)。

そこでATL細胞はCD3が減弱することが報告されているため CD3 の強弱でソーティングを行うことにした。CD4 陽性細胞でゲーティングを行った後図の CD3HICCR4-分画 および CD3Lo CCR4-分画をソーティングし、免疫不全マウスに移植した。その結果、非 ATL 分画である CD3Hi の分画に生着が確認された。そこでそのマウスの脾臓片を継代するために移植を行った。その結果、表1に示すように連続移植継代が可能であった。生着した細胞集団の CD3 の発現はすでに減弱しており、ATL細胞における特徴の一つと類似している。

また別のソーティングマーカーとして

	Primary	Second	Third	4th	5th	6th	7th	8th	9th
CD4 CCR4 sorted	80	37	22	25	23	26	21	21	21
CD3hi CD4 Sorted	61	37	60	28	24	25	25		
CD3HI CD86-	31	24	30	52	79				

表1 マウスへの移植実験結果

図1における CCR4 陰性 CD3 強陽性分画 (CD3Hi)、Annexin V 陰性 CD3 弱陽性分画 (CD3Lo)、およびヒト白血球分画 (CD45) を免疫不全マウスの肝臓内に投与した。継代は Primary から 7th まで行い表中の数字は該当の継代から次の代に要した日数を示す。

CD3HI CD86-においても5代目まで連続移植継代が可能であった。次にこれらの細胞に HTLV-1 ウイルスゲノムの有無を Inverse PCR と Realtime PCR を用いて検討を行った。その結果、Realtime PCR では全ての Sorting した分画においてウイルスゲノムが検出された。また Inverse PCR では CD4+ CCR4+分画から連続移植継代したものは Frozen Stock から7代目も8代目もメジャーバンドは同一であった。CD3HI CD4 は患者 Original のバンドが4代目、5代目

Number	Name	Proviral load
1	CD4 CCR4 Frozen cell injection	131
2	CD4 CCR4 7 th Passage	174
3	CD4 CCR4 8 th Passage	181
4	Original cell from ATL patient	28.5
5	CD3Hi CD4 sorted 4 th Passage	181
6	CD3Hi CD4 sorted 5 th Passage	369
7	Original cell from patient	51.9

表2 継代株と患者末梢血由来の Mononuclear Cells のウイルスロード

まで維持されている事が示唆された。このことは患者末梢血中に存在する ATL 細胞が移植マウス中にも存在する事を強く示唆するデータである。またウイルスロードに着目すると CD4 CCR4 でソーティングしたもの由来の連続移植継代株は Frozen Stock から7代目8代目までウイルスロードは100から200までに抑えられた。一方 CD3HI CD4+でソーティングした継代株ではウイルスロードは4代目と5代目の比較では181と369で約2倍に上昇している(表2)。

次に癌幹細胞が存在するかどうか検討するために CD4 CCR4 分画由来の連続移植継代株の細胞集団において Cell Heterogeneityがあるか検討を行った。これらのデータは Preliminary であるがこの継代株の網羅的細胞染色から候補を選択した。その結果 T 細胞マーカー CD5 でソーティングを行うと明らかに生着に差があるものが得られている。

連続移植継代株移植マウスから脾臓を採取し、直ちに Ficoll-Paque で単核細胞分画を分離した。PBS(-)で細胞を洗浄した後、蛍光標識抗体の組み合わせで染色した。PBS(-)で細胞を洗浄した後、これらの細胞を PBS(-)に懸濁し、MoFlo で表面マーカーの解析を行った。

図1における CD5 強陽性分画 (CD5Hi)、CD5 弱陽性分画 (CD5Lo)、およびヒト白血球分画 (CD45) を免疫不全マウスの肝臓内に投与した。投与した細胞数は各分画それぞれ 10000、1000、100 個である。49 日目にマウスの状態を検討した。現時点での予備実験データを図2に示す。

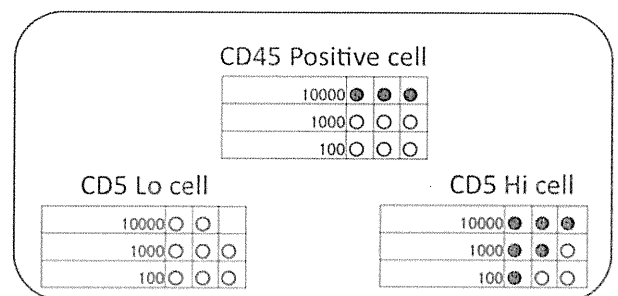


図2. マウスへの移植結果 (予備実験データ)

○はヒト細胞が生着しなかったマウス、●は生着したマウスを示す。

2. 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、それまでに報告されていた上記の miRNA パターンと異なり、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 リストには、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, $p = 2.85 \times 10^{-25}$)。miR-31 の発現減少は、乳がんにおける転移、浸潤過程において重要であることが報告されている。miR-31 の著しい減少が ATL 細胞の特徴を反映していると考え、ATL 細胞の mRNA 発現プロファイルの結果と統合し、さらに *in vitro* の複数の実験を経て、miR-31 の新規標的遺伝子として、ATL 細胞における NF- κ B 活性化の原因遺伝子である NIK を見いだした。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(図 3)。

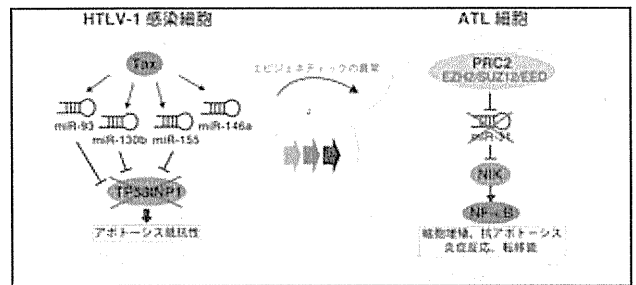


図 3. HTLV-1 感染細胞と ATL 細胞における miRNA の異常

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。このことは、miR-31 の細胞内レベルが腫瘍細胞の表現型に直接影響していることを意味し、新しい分子標的としての有用性が示された。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 4)。

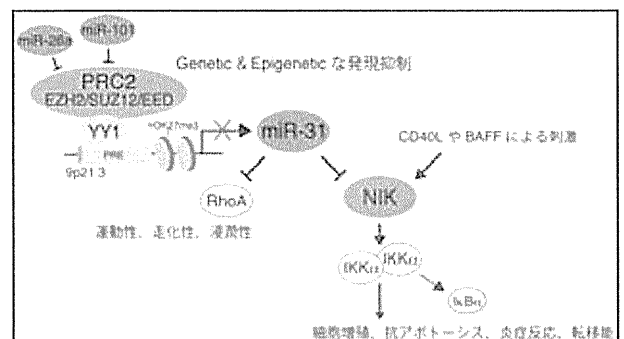


図 4. ATL 細胞における miR-31 を取り巻く分子メカニズム

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. 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. 脾臓における ATL-CSCs の同定

mATL 細胞移植で腫瘍を生じた約 3 週間後の脾臓での ATL-LSCs の局在を CD38, CD71, CD117 抗体を用いた免疫染色で検討した。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 (図 1 D)。ATL-LSCs 候補 CD117 Single Positive 細胞を探索した結果、脾臓に於いては赤脾髄 (RP: Red pulp) 及び白脾髄 (WP: White Pulp) 共に存在している事が明らかとなった(図 1 F 及び I)。共に頻度は 1~1.5% 前後であったが、頻度は赤脾髄の方が高かった(図 1 B)。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。

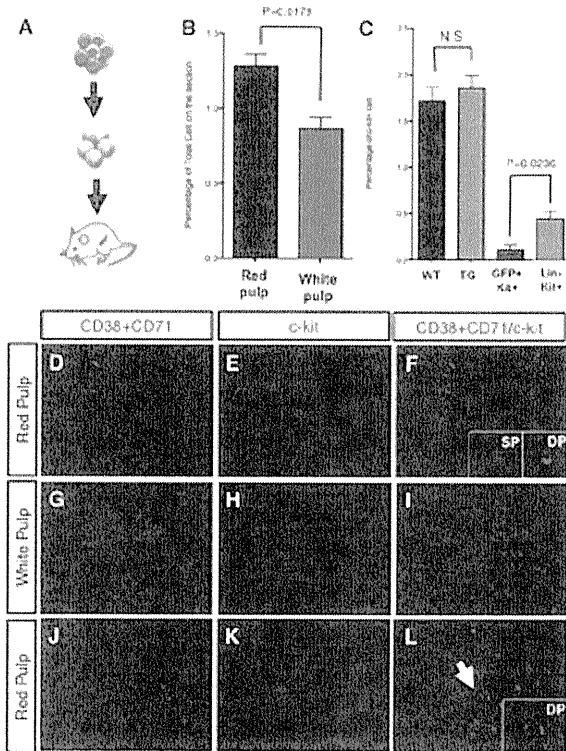


図 5. 脾臓における ATL 癌幹細胞の局在 A)GFP 強制発現 ATL 細胞の作成と移植実験 B)赤脾髄、白脾髄における CD38-/CD71-/CD117+ 細胞の割合 C)GFP+CD117+ 細胞の頻度 D-F)赤脾髄における CD38-/CD71-/CD117+ 細胞 G-I)白脾髄における CD38-/CD71-/CD117+ 細胞 J-L)赤脾髄における GFP+/CD117+ 細胞の局在

2. GFP モデルを用いた脾臓における

ATL-CSCs の同定

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、腫瘍細胞の局在を正確に把握する事は困難である。そこで、GFP 強制発現 mATL 細胞を作製して移植実験を行った (図 1 A)。その結果、腫瘍細胞は脾臓中の赤脾髄、白脾髄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) は赤脾髄、白脾髄共に存在している事が明らかとなった(図 1 L)。またそれらの頻度は、CD38-/CD71-/CD117+細胞よりも低く (図 1 C)、GFP+/ CD117+/ DP 細胞が ATL-CSCs である事が示唆された。

3. GFP モデルを用いた骨髄における ATL-CSCs の同定

次に、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 (図 2 A)。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

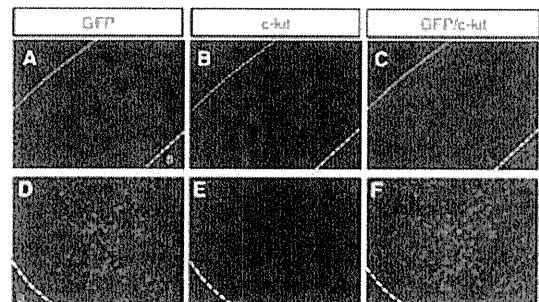


図 6. 骨髄における ATL 癌幹細胞の局在 A-C) GFP+/CD117+ 細胞の局在 骨内膜に沿った領域に GFP 陽性細胞が週集集簇している。一方 CD117SP 細胞は骨髄腔中心部に多い。D-F) 骨梁領域における GFP+/CD117+ 細胞の局在

所に存在している事が明らかとなった(図2F)。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。

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

1) フローサイトメトリーによる表面抗原解析

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7)。

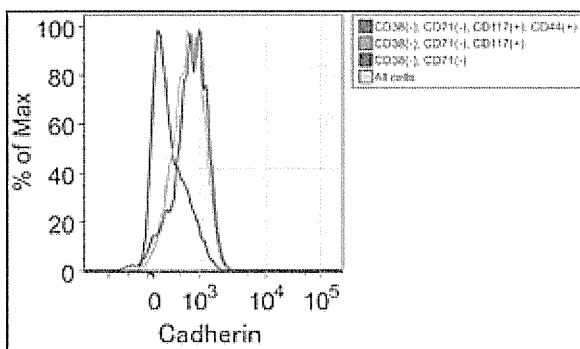


図7. 各細胞集団における Cadherin の発現

2) 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8)。

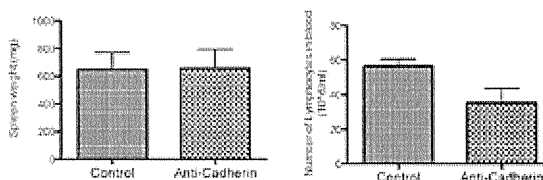


図8. mATL 細胞移植マウスの脾臓の重量と末梢血中リンパ球数

5. ATL におけるゲノム異常の解析

(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。

(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)。

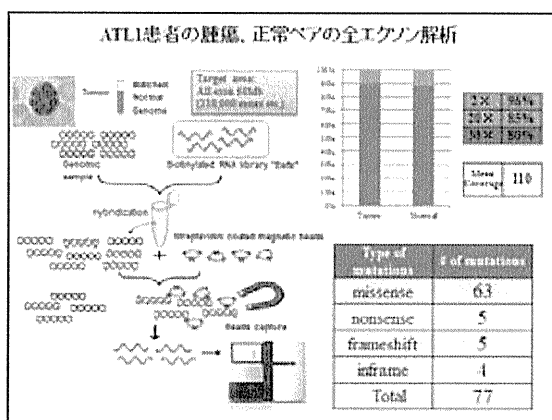


図9. 全エクソン解析の例

6. ATLの臨床・分子病態と新規治療法開発の研究

1) 急性型ATLの末梢血とリンパ節病変のゲノム異常の比較

解析した13例中9例では、末梢血とリンパ節のゲノムに、異なる増幅・欠失を認め、その全例で、リンパ節での異常がより複雑であった。また13例中5例にhomozygousな欠失領域がリンパ節ではみられず、その逆は無かった。上記の複数のサブクローンが共通のクローンに由来することをT細胞受容体の組み替え解析で確認した。これらのデータは、急性型ATLではリンパ節内で腫瘍細胞のプロゲレッション認められ、その一部が末梢血に出現していることが示唆された。

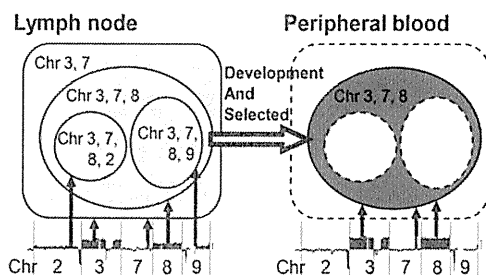


図10. 代表的な急性型ATL症例におけるリンパ節に複数存在するサブクローンと末梢血に出現したそのうちの1つのサブクローン。

D. 考察

1) ヒトATL-CSCの探索

NOJ免疫不全マウスを用いたヒトATL細胞の移植系の確立を受けて、本年度は、ATL-CSCの同定にほぼ成功した。検体の単核球を表面マーカーを用いて分画した後に移植することで、効率に生着および連続移植が可能になった。移植腫瘍はHTLV-1プロウイルスを持ち、一部のT細胞(CD4+, CD5+)マーカーが陽性であった。今年度の研究でCD4陽性細胞のうちCD5強陽性細胞細胞はわずか100個の細胞の移植でマウスに生着することが判明した。一方、CD4陽性細胞のうちCD5弱陽性細胞細胞は10000個移植してもマウスに生着しない。この結果は、CD5ががん幹細胞マーカーである条件を満たすことを示している。また、HTLV-1プロウイルス組み込み部位解析から移植したATL細胞に由来することが確認された。CSC集団を特徴付けるマーカーの絞り込みが行われており、Nicheの同定後に論文投稿する予定である。

2) 末梢ATL細胞の分子病態解析

ATL細胞のmRNA及びmiRNAの発現プロファイル解析とゲノムコピー数解析のデータベース構築に続いて、miR-31のATL細胞における特異的な発現低下のメカニズムと腫瘍細胞における分子病態学的な意義を明らかにしたことは、病態解析に大きな進歩をもたらした。ATL細胞へmiR-31を導入することでアポトーシスを誘導出来ることが示されて意味は大きい。正常細胞ではmiR-31のは正常であり、その発現によるアポトーシスの細胞はATL細胞に特異的である。標的分子を利用したドラッグデリバリーによって、新規な治療法開発につながるであろう。

3) マウスモデルによるmATL-CSC解析

本研究において、CD38, CD71, CD117

抗体を用いる事で、ATL-CSCs の局在を明らかにする事に成功した。ATL-CSCs は赤脾髄、白脾髄共に存在し、特に内網系に隣接して存在している事が明らかとなった。また、GFP 導入した Tax-Tg 由来 ATL 細胞を用いた検討でも同様の結果が認められた。更に、骨髄においても、骨内膜ニッチと深く関わっている事が示唆された。

4) マウス ATL 幹細胞特異的分子の同定

mATL-CSC は CD38(-), CD71(-), CD117(+)という特徴を持っている事が示されていたが、本研究では、質量分析計を用いた定量解析で Cadherin を新たな mATL-CSC の特異的マーカーとして同定した。この cadherin は非古典的カドヘリンに分類され、正常の血球幹細胞などでの発現は報告されていない。次に、治療応用の可能性を検討したが、現時点では cadherin 発現細胞を除去による腫瘍系性能の低下は認められて無かった。実験に用いた 1×10^6 個の mATL 細胞中には約 300 個の癌幹細胞が存在するが、今回の処理では全ての癌幹細胞が除去できていないと考えられた。今後、cadherin を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製とそれを用いた検討が必要と考えられる。

5) ATL におけるゲノム異常の解析

ゲノムコピー数解析に加え、全エクソン解析を行うことで点突然変異など従来の手法では同定できなかった多数の変異を同定した。これらには挿入、欠失や nonsense 変異も含まれており、これらの遺伝子については機能解析を行うことで腫瘍との関連を解明することが期待される。また解析症例数を増やすことで腫瘍発症に関連があると考えられる遺伝子変異の頻度を検討する必要があると考えられる。

6) ATL の臨床・分子病態と新規治療

法開発の研究

本研究では、ATL のがん幹細胞の特性に着目しつつ、多様な臨床病態をとる本疾患の分子病態に基づいて、候補となる新規治療法を見出すことを目的とし JSPFAD バンキングを継続した。

また、急性型 ATL の末梢血とリンパ節病変のゲノム異常の比較結果から、急性型 ATL の多くではリンパ節でクローン進展が起き、そのうち一部のクローンが末梢血に出現することが明らかとなった。このように複数のクローンがリンパ節に存在することは、WHO 分類で記載されている ATL リンパ節病変の病理形態の多様性、さらには本疾患が多剤抗がん剤による化学療法に難反応性であることにかかわっている可能性が示唆された。

E. 結論

今年度の研究により、以下の事柄が明らかになった。

- ① ATL 患者由来の細胞において、CD5 強陽性の CD4 陽性細胞が ATL-CSCs であることが示唆された。
- ② 末梢 ATL 細胞における遺伝子発現とゲノムコピー数異常のデータベースが作製された。
- ③ 末梢 ATL 細胞では miR-31 の発現欠損が恒常的 NF- κ B 活性化の基盤であり、miR-31 補充により ATL 細胞がアポトーシスを起こす。これは、新たな分子標的治療戦略の基盤となる情報である。
- ④ CD38, CD71, CD117 抗体を用いる事で、ATL-LSCs の局在を明らかにする事に成功した。ATL-LSCs は赤脾髄、白脾髄共に存在し、特に内網系に隣接して存在している事が明らかとなった。また、骨髄においては、骨内膜ニッチと深く関わっている事が示唆された。
- ⑤ mATL-CSC 癌幹細胞に高発現している細胞接着膜タンパク質 cadherin が、他

の表面マーカーに比べ mATL 癌幹細胞特異的である事が明らかになった。

⑥ ATL 患者検体を用いたゲノムコピー数解析から TCR 経路への異常の集積が確認され、ATL における同経路の重要性が示唆された。またマイクロアレイによるコピー数解析で既に確認されているゲノム異常以外に、次世代シーケンサーによる網羅的変異解析により、多数の新規の変異遺伝子が確認された。

⑦ 急性型 ATL ではリンパ節でクローン進展が起こることで多様性を生じ、進展したクローンの一部が末梢血中に出現していることが示された。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

研究代表者：渡邊俊樹

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, Uchimaru K, Ogawa S, Watanabe T. Polycomb-mediated loss of miR-31 activates NIK-dependent NF-κB pathway in adult T-cell leukemia and other cancers. *Cancer Cell*, 21(1):121-135, Jan. 2012
- 2) Uota S, Dewan MZ, Saitoh Y, Muto S, Itai A, Utsunomiya A, Watanabe T, Yamamoto N, Yamaoka S. An IκB kinase 2 inhibitor IMD-0354 suppresses the survival of adult T-cell leukemia cells. *Cancer Sci*, 103(1):100-106, Jan. 2012

(Review)

- 1) Watanabe T. Current status of HTLV-1 infection. *Int J Hematol*. 94(5):430-434, 2011 Oct.

(和文)

- 1) 渡邊俊樹、特集 分子病態からみた血液疾患診療の進歩:「ATL の分子病態と治療の新展開」、血液内科、62 (4) : 455-462、2011 年 4 月
- 2) 渡邊俊樹、特集 感染に由来するヒトの腫瘍—その現状と対策:「成人 T 細胞白血病ウイルスと白血病/リンパ腫」、臨床と微生物、38 (3) : 241-248、2011 年 5 月
- 3) 山岸誠、渡邊俊樹、「成人 T 細胞白血病から明らかになったクロストーク異常とがん」、ライフサイエンス新着論文レビュー、2012 年 2 月 <http://first.lifesciencedb.jp/archives/4367>

(著書)

- 1) 渡邊俊樹 (分担執筆)、「第 1 章 3 腫瘍ウイルス(HTLV, HPV, EBV など)」、がん生物学イラストレイテッド (411 ページ)、43-49、羊土社、2011 年 7 月
2. 学会発表 (国際学会)
 - 1) Yamagishi M, Nakano K, Yamochi T, Miyake A, Kagami Y, Tsutsumi A, Otsubo A, Ogawa S, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, Watanabe T, “Genetic and Epigenetic Loss of miR-31 Activates NIK-dependent NF-κB Pathway in Adult T-cell Leukemia”, The 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, Lueven, Belgium, June 5-8, 2011
 - 2) Asanuma S, Kawanami K, Nakano K,

- Yamagishi M, Yamaguchi K, Utsunomiya A, Watanabe T, “Over-expression of dominant-negative Helios isoforms in adult T-cell leukemia (ATL) cells”, The 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, Lueven, Belgium, June 5-8, 2011
- 3) Firouzi S, Aoki S, Suzuki Y, Yamochi T, Nakano k, Sugano S, Watanabe T, “Development of a New High-throughput Method to Investigate T-cell Clonality in the HTLV-1 Infected Individuals by Enrichment of the HTLV-1 Integration Site”, The XV International Congress of Virology, Sapporo, Sep. 13, 2011 (Sep. 11-16, 2011)
- 4) Yamagishi M, Nakano K, Yamochi T, Miyake A, Kagami Y, Tsutsumi A, Matsubara A, Ogawa S, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, Watanabe T, “Genetic and Epigenetic Loss of miR-31 Activates NIK-dependent NF-κB Pathway in Adult T-cell Leukemia”, The XXV Symposium of the International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Diseases, Tokyo, Sep. 15-17, 2011
- 5) Asanuma S, Kawanami K, Yamagishi M, Nakano K, Yamaguchi K, Utsunomiya A, Watanabe T, “Novel Helios variants found in ATL cells hamper functions of Ikaros family proteins and induce T cell proliferation”, The XXV Symposium of the International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Diseases, Tokyo, Sep. 15-17, 2011
- 6) Watanabe T, “Risk factors for developing ATL in HTLV-1 carriers”, The Fourth Annual T-CELL Lymphoma Forum, San Francisco, USA, Jan. 27, 2012 (Invited Talk)
- (国内学会)
- 1) 矢持忠徳、守田陽平、矢持淑子、佐々木陽介、Firouzi Sanaz、中島誠、渡辺信和、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 4 回 HTLV-1 研究会・合同班会議、東京、2011 年 9 月 18 日～19 日
- 2) Firouzi Sanaz、青木桜、鈴木穰、矢持忠徳、中野和民、中井謙太、菅野純夫、渡邊俊樹、“Development of a new high-throughput method to investigate T-cell-clonality and integration site preference among HTLV-1 infected individuals”、第 4 回 HTLV-1 研究会・合同班会議、東京、2011 年 9 月 18 日～19 日
- 3) 山岸誠、中野和民、矢持忠徳、宇都宮與、山口一成、内丸薫、渡邊俊樹、「Polycomb 依存的なエピジェネティック異常による miR-31 の発現低下と NF-κB 活性化機構」、第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋、2011 年 10 月 3 日 (2011 年 10 月 3 日～5 日)
- 4) 浅沼里実、川波克明、山岸誠、中野和民、山口一成、宇都宮與、渡邊俊樹、「新規 ATL 型 Helios は Ikaros 転写因子ファミリーの機能を阻害し、T 細胞の増殖を促進する。」、第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋、2011 年 10 月 4 日 (2011 年 10 月 3 日～5 日)
- 5) 矢持忠徳、守田洋平、矢持淑子、佐々木陽介、Sanaz Firouzi、中島誠、渡辺信和、宇都宮與、中内啓光、渡邊俊樹、「成人性 T 細胞白血病におけるがん幹細胞の同定への試み」、第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋、2011 年 10 月 4 日 (2011 年 10 月 3 日～5 日)

- 6) 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、「cMyb 変異体発現パターンの変化が細胞の恒常性と腫瘍化に及ぼす影響の解析」、第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月5日(2011年10月3日～5日)
- 7) Yamagishi M, Nakano K, Yamochi T, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, Watanabe T, “Polycomb-Mediated Epigenetic Silencing of miR-31 Activates NF-κB Signaling in Adult T-cell Leukemia”, 第73回日本血液学会学術集会、名古屋、2011年10月14日(2011年10月14日～16日)
- 8) 藤川 大, 山岸 誠, 黒川直也, 副島あい, 石田尚臣, 中野和民, 渡邊俊樹,”HTLV-1 viral protein Tax mediates epigenetic deregulation by interaction with a Polycomb group protein, EZH2”, 第34回日本分子生物学会年会、横浜、2011年12月14日(2011年12月13日～16日)
- 9) 浅沼里実, 川波克明, 山岸 誠, 中野和民, 山口一成, 宇都宮 與, 渡邊俊樹、「新規 ATL 型 Helios は Ikaros 転写因子ファミリーの機能を阻害し、T細胞の増殖を促進する」、第34回日本分子生物学会年会、横浜、2011年12月14日(2011年12月13日～16日)
- 10) 青木 桜, ふいるじ さな一ず, 矢持忠徳, 中野和民, 鈴木 穰, 中井謙太, 菅野純夫, 渡邊俊樹、「次世代シーケンサーを用いた HTLV-1 感染細胞 clonality 解析システムの構築」、第34回日本分子生物学会年会、横浜、2011年12月13日(2011年12月13日～16日)
- 1) 山岸 誠、「ATL における Polycomb-miRNA-NF-κB 経路」、GCOE 特別セミナー<医科学教育セミナー>、第3回疾患医科学ミニシンポジウム HTLV-1 と疾患、東京、2011年5月20日(招待講演)
- 2) 渡邊俊樹、「HTLV-1 ウイルス学と感染細胞研究の新たな展開」、第9回 HAM 治療研究会、大阪、2011年7月29日(招待講演)
- 3) Watanabe T, “Polycomb-microRNA-signal transduction linkage in adult T-cell leukemia (ATL)”, Todai Forum 2011"Forum on Systems Biology and Genomic Medicine"-Hormone Receptor and Intracellular Signaling: From Chromatin to Clinic, Lyon, France, Oct. 20 & 21, 2011
- 4) 山岸誠、「成人 T 細胞白血病における エピジェネティック 依存的な microRNA 異常と NF-κB シグナル」、日本大学歯学部セミナー、東京、2012年2月9日(招待講演)
- 5) 渡邊俊樹、「ATL 細胞の増殖の仕組みと新たな治療法の開発」、ATL シンポジウム in 沖縄、沖縄、2012年3月10日(招待講演)

分担研究者：中内啓光

1. 論文発表

1. Takayama N, Eto K, Nakauchi H. [Potential usefulness of human iPS cells on the generation of platelets]. *Nihon Rinsho*. 2011 Dec;69(12):2161-5. Japanese.
2. Kobayashi T, Nakauchi H. [From cell therapy to organ regeneration therapy: generation of functional organs from pluripotent stem cells]. *Nihon Rinsho*. 2011 Dec;69(12):2148-55. Japanese.

(その他)

3. Ito H, Kamiya A, Ito K, Yanagida A, Okada K, Nakauchi H. In vitro expansion and functional recovery of mature hepatocytes from mouse adult liver. *Liver Int.* 2012 Jan 4. doi: 10.1111/j.1478-3231.2011.02741.x. [Epub ahead of print]
4. Umeyama K, Saito H, Kurome M, Matsunari H, Watanabe M, Nakauchi H, Nagashima H. Characterization of the ICSI-mediated gene transfer method in the production of transgenic pigs. *Mol Reprod Dev.* 2011 Dec 15. doi: 10.1002/mrd.22015. [Epub ahead of print]
5. Yamazaki S, Ema H, Karlsson G, Yamaguchi T, Miyoshi H, Shioda S, Taketo MM, Karlsson S, Iwama A, Nakauchi H. Nonmyelinating schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell.* 2011 Nov 23;147(5):1146-58.
6. Suzuki N, Yamazaki S, Ema H, Yamaguchi T, Nakauchi H, Takaki S. Homeostasis of hematopoietic stem cells regulated by the myeloproliferative disease associated-gene product Lnk/Sh2b3 via Bcl-xL. *Exp Hematol.* 2011 Nov 17. [Epub ahead of print]
7. Umemoto T, Yamato M, Ishihara J, Shiratsuchi Y, Utsumi M, Morita Y, Tsukui H, Terasawa M, Shibata T, Nishida K, Kobayashi Y, Petrich BG, Nakauchi H, Eto K, Okano T. Integrin $\alpha_v\beta_3$ regulates thrombopoietin-mediated maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood.* 2011 Nov 16. [Epub ahead of print]
8. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Kakuta S, Iwakura Y, Takayama N, Ooehara J, Otsu M, Kamiya A, Petrich B, Urano T, Kadono T, Sato S, Aiba A, Yamashita H, Sugiura S, Kadowaki T, Nakauchi H, Eto K, Nagai R. In vivo imaging visualizes discoid platelet aggregations without endothelium disruption and implicates contribution of inflammatory cytokine and integrin signaling. *Blood.* 2011 Nov 16. [Epub ahead of print]
9. Okaji Y, Tashiro Y, Gritli I, Nishida C, Sato A, Ueno Y, Del Canto Gonzalez S, Ohki-Koizumi M, Akiyama H, Nakauchi H, Hattori K, Heissig B. Plasminogen deficiency attenuates postnatal erythropoiesis in male C57BL/6 mice through decreased activity of the LH-testosterone axis. *Exp Hematol.* 2011 Nov 3. [Epub ahead of print]
10. Watanabe M, Kurome M, Matsunari H, Nakano K, Umeyama K, Shiota A, Nakauchi H, Nagashima H. The creation of transgenic pigs expressing human proteins using BAC-derived, full-length genes and intracytoplasmic sperm injection-mediated gene transfer. *Transgenic Res.* 2011 Oct 25. [Epub ahead of print]
11. Watabe Y, Baba Y, Nakauchi H, Mizota A, Watanabe S. The role of Zic family zinc finger transcription factors in the proliferation and differentiation of retinal progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Nov 11;415(1):42-7. Epub 2011 Oct 15.
12. Nishino T, Wang C, Mochizuki-Kashio M, Osawa M, Nakauchi H, Iwama A. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by garcinol, a potent inhibitor of histone acetyltransferase. *PLoS One.* 2011;6(9):e24298. Epub 2011 Sep 12.

13. Ishihara M, Nishida C, Tashiro Y, Gritli I, Rosenkvist J, Koizumi M, Okaji Y, Yamamoto R, Yagita H, Okumura K, Nishikori M, Wanaka K, Tsuda Y, Okada Y, Nakauchi H, Heissig B, Hattori K. Plasmin inhibitor reduces T-cell lymphoid tumor growth by suppressing matrix metalloproteinase-9-dependent CD11b(+)/F4/80(+) myeloid cell recruitment. *Leukemia*. 2011 Sep 20. [Epub ahead of print]
14. Saito R, Nakauchi H, Watanabe S. Serine/threonine kinase, Melk, regulates proliferation and glial differentiation of retinal progenitor cells. *Cancer Sci*. 2011 Sep 16. [Epub ahead of print]
15. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi 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, Koefler HP, Shih LY, Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011 Sep 11;478(7367):64-9
16. Okada K, Kamiya A, Ito K, Yanagida A, Ito H, Kondou H, Nishina H, Nakauchi H. Prospective Isolation and Characterization of Bipotent Progenitor Cells in Early Mouse Liver Development. *Stem Cells Dev*. 2011 Oct 18. [Epub ahead of print]
17. Hamanaka S, Yamaguchi T, Kobayashi T, Kato-Itoh M, Yamazaki S, Sato H, Umino A, Wakiyama Y, Arai M, Sanbo M, Hirabayashi M, Nakauchi H. Generation of germline-competent rat induced pluripotent stem cells. *PLoS One*. 2011;6(7):e22008. Epub 2011 Jul 15.
18. Kawahara M, Chen J, Sogo T, Teng J, Otsu M, Onodera M, Nakauchi H, Ueda H, Nagamune T. Growth promotion of genetically modified hematopoietic progenitors using an antibody/c-Mpl chimera. *Cytokine*. 2011 Sep;55(3):402-8. Epub 2011 Jun 22.
19. Yokoi T, Kobayashi H, Shimada Y, Eto Y, Ishige N, Kitagawa T, Otsu M, Nakauchi H, Ida H, Ohashi T. Minimum requirement of donor cells to reduce the glycolipid storage following bone marrow transplantation in a murine model of Fabry disease. *J Gene Med*. 2011 May;13(5):262-8
20. Onozuka I, Kakinuma S, Kamiya A, Miyoshi M, Sakamoto N, Kiyohashi K, Watanabe T, Funaoka Y, Ueyama M, Nakagawa M, Koshikawa N, Seiki M, Nakauchi H, Watanabe M. Cholestatic liver fibrosis and toxin-induced fibrosis are exacerbated in matrix metalloproteinase-2 deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Feb 12. [Epub ahead of print]
21. Tanimura S, Tadokoro Y, Inomata K, Binh NT, Nishie W, Yamazaki S, Nakauchi H, Tanaka Y, McMillan JR, Sawamura D, Yancey K, Shimizu H, Nishimura EK. Hair follicle stem cells provide a functional niche for melanocyte stem cells. *Cell Stem Cell*. 2011 Feb 4;8(2):177-87.
22. 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]

23. Nishimura K, Sano M, Ohtaka M, Furuta B, Umemura Y, Nakajima Y, Ikehara Y, Kobayashi T, Segawa H, Takayasu S, Sato H, Motomura K, Uchida E, Kanayasu-Toyoda T, Asashima M, Nakauchi H, Yamaguchi T, Nakanishi M. Development of defective and persistent sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. *J Biol Chem*. 2011 Feb 11;286(6):4760-71. Epub 2010 Dec 7.

2. 学会発表

Nakauchi H:

1. Invited Speaker:Keystone Symposia. March 27-April 1,2011.Keystone, USA. “Non-myelinating schwann cells in the mouse bone marrow niche maintain hematopoietic stem cell hibernation through TGF-beta signaling”
2. Invited Speaker: Hematopoietic Stem Cell Hibernation, May 18, 2011. Uulm, Germany “Bone Marrow Niche Signaling that regulates”
3. Invited Speaker: 3rd Else Kröner-Fresenius Symposium on Molecular Mechanisms of Stem Cell Aging, May 20, 2011.Uulm, Germany
4. Invited Speaker: Seminar Series on Stem Cells, May 24, 2011. Uulm. “Generation of functional organs from ES/iPS cells”
5. Invited Speaker: ESHG Symposium, May 29, 2011. Amsterdam “Generation of Rat Pancreas in Mouse: toward the next generation of regenerative medicine”
6. Invited Speaker: The Oklahoma Center for Adult Stem Cell Research (OCASCR), June 14, 2011. Oklahoma City. “Non-myelinating Schwann cells in the

mouse bone marrow niche maintain hematopoietic stem cell hibernation through TGF-b signaling”

7. Invited Speaker: 12th International Congress on Reproductive Biomedicine & 7th International Congress on Stem Cell Biology and Technology, Sep 7, 2011.Tehran, Iran “Generation of functional organs from iPS cells”
8. Invited Speaker: 12th International Congress on Reproductive Biomedicine & 7th International Congress on Stem Cell Biology and Technology, Sep 9, 2011. Tehran, Iran. “Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment”
9. The 12th Royan International Research Award 受賞, Sep 8. 2011, Tehran, Iran
10. Invited Speaker: Cold Spring Harbor Conferences Asia & ISSCR, Oct 26, 2011. 蘇州, 中国.
11. Invited Speaker: The Chulalongkorn University Annual Stem Cell Conference, Jan 11, 2012. Bangkok, Thailand. “Generation of Rat Pancreas in Mouse: toward the next generation of regenerative medicine.”

分担研究者：浜口 功

1. 論文発表

- 1) Luc S, Luis TC, Boukarabila H, Macaulay IC, Buza-Vidas N, Bouriez-Jones T, Lutteropp M, Woll PS, Loughran SJ, Mead AJ, Hultquist A, Brown J, Mizukami T, Matsuoka S, Ferry H, Anderson K, Duarte S, Atkinson D, Soneji S, Domanski A, Farley A, Sanjuan-Pla A, Carella C, Patient R, de Bruijn M, Enver T, Nerlov C, Blackburn C, Godin I, Jacobsen SE. The earliest thymic T cell progenitors sustain B cell