

- and myeloid lineage potential. *Nat Immunol*. 2012 Feb 19. *in press*.
- 2) Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, Wang R, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T, Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Blood*. 2012 Jan 18.
  - 3) Tsuruno C, Ohe K, Kuramitsu M, Kohma T, Takahama Y, Hamaguchi Y, Hamaguchi I, Okuma K. HMGA1a is involved in specific splice site regulation of human immunodeficiency virus type 1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Mar 25;406(4):512-7. Epub 2011 Feb 15.
  - 4) Tsuruno C, Okuma K, Takahashi Y, Tanaka R, Tanaka Y, Takahama Y, Hamaguchi Y, Hamaguchi I, Yamaguchi K. A recombinant vesicular stomatitis virus encoding HIV-1 receptors and human OX40 ligand efficiently eliminates HIV-1-infected CD4-positive T cells expressing OX40. *Hum Immunol*. 2011 Apr;72(4):295-304. Epub 2011 Jan 21.
2. 学会発表
- 1) 水上拓郎、滝沢和也、倉光球、狭間俊介、百瀬暖佳、益見厚子、山崎淳平、長谷川秀樹、山口一成、浜口功. 脾臓及び骨髄由来の ATL 癌幹細胞の性状解析. 第4回 HTLV-1 研究会, 2011年9月19日 東大弥生講堂
  - 2) Mizukami T, Takizawa K, Kuramitsu M, Momose H, Mausmi A, Yamazaki J, Hasegawa H, Hall W, Yamaguchi K, Hamaguchi I. Identification and Characterization of Bone Marrow-derived Leukemic Stem Cells in a Tax-transgenic Mouse Model of Adult T-Cell Leukemia / Lymphoma. XXV IACRLRD Symposium Tokyo. 17 Sept, 2011.
  - 3) 水上拓郎、滝沢和也、山崎淳平、倉光球、百瀬暖佳、益見厚子、長谷川秀樹、山口一成、浜口功. HTLV-1 Tax トランスジェニックマウスを用いた ATL 癌幹細胞及びそのニッチの同定. 第152回日本獣医学会 大阪 2011年9月21日
  - 4) Mizukami T, Takizawa K, Kuramitsu M, Momose H, Mausmi A, Yamazaki J, Hasegawa H, Hall W, Yamaguchi K, Hamaguchi I. Identification of cancer stem cell niche in Adult T-Cell Leukemia / lymphoma (ATL) model mouse, 73<sup>rd</sup> Japanese Society of Hematology, Nagoya, 14-16 Oct, 2011
- 分担研究者：長谷川秀樹
1. 論文発表
    1. Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T. Mechanism of Drug Resistance of Hemagglutinin of Influenza Virus and Potent Scaffolds Inhibiting Its Function. *ACS Chem Biol*. 2012 Jan 13.
    2. Aina A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine. *J Med Virol*. 2012 Feb;84(2):336-44.
    3. Nakao R, Hasegawa H, Ochiai K,

- Takashiba S, Ainai A, Ohnishi M, Watanabe H, Senpuku H. Outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* elicit a mucosal immune response. **PLoS One**. 2011;6(10):e26163. Epub 2011 Oct 14.
4. Suzuki T, Ainai A, Nagata N, Sata T, Sawa H, Hasegawa H. A novel function of the N-terminal domain of PA in assembly of influenza A virus RNA polymerase. **Biochem Biophys Res Commun**. 2011 Nov 4;414(4):719-26. Epub 2011 Oct 6.
  5. Fukumoto H, Kanno T, Hasegawa H, Katano H. Pathology of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection. **Front Microbiol**. 2011;2:175. Epub 2011 Aug 25.
  6. Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Iiduka T, Nakazato I, Hino Y, Hamamatsu A, Horiguchi H, Tanaka T, Hasagawa A, Kanaya Y, Oku R, Oya T, Sata T. Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection. **Mod Pathol**. 2012 Jan;25(1):1-13. Epub 2011 Aug 26.
2. 学会発表
1. 長谷川秀樹、成人 T 細胞性白血病 (ATL)モデルマウスを用いた新規治療法の試み 第100回日本病理学会総会 2011年4月横浜
  2. 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹、熊坂利夫、羽田悟、田中伸哉、笠井孝彦、鄭子文、飯塚利彦、仲里巖、樋野陽子、濱松晶彦、堀尚、田中智之、長谷川章雄、尾矢剛志、佐多徹太郎 2009H1N1 パンデミック インフルエンザウイルス感染症 20 剖検例の臨床病理学的解析 第 100 回日本病理学会総会 2011 年 4 月横浜
3. Akira Ainai, Ryo Ito, Hideki Asanuma, Tadaki Suzuki, Takeshi Tanimoto, Takato Odagiri, Shin-Ichi Tamura, Tetsutaro Sata, Masato Tashiro, Hideki Hasegawa Intranasal administration of 2009/10 annual influenza vaccine induce the cross-protection against 2009 pandemic influenza virus infection, XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
  4. Elly van Riet, Akira Ainai, Ryo Ito, Tadaki Suzuki, Shin-Ichi Tamura, Masato Tashiro, Hideki Hasegawa, Influenza specific iga producing serum memory b cells correlate to protective antibodies in the serum as well as local iga responses, XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
  5. Ryo Ito, Akira Ainai, Hideki Asanuma, Tadaki Suzuki, Joe Chiba, Shin-Ichi Tamura, Masato Tashiro, Tetsutaro Sata, Hideki Hasegawa. Analysis of the immune responses after intranasal booster influenza vaccine with heterologous virus priming. XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
  6. Hideki Hasegawa, Akira Ainai, Elly van Riet, Tadaki Suzuki, Ryo Ito, Takeshi Tanimoto, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Tetsutaro Sata, Takeshi Kurata, Shin-Ichi Tamura, Intranasal administration of an inactivated whole-virion influenza vaccine effectively induces the neutralizing antibodies both in the

- serum and the nasal wash in human XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
7. Hideki Asanuma, Mina Nakauchi, Kayoko Sato, Eri Nobusawa, Akira Ainai, Norio Yamamoto, Nami Konomi, Hideki Hasegawa, Masato Tashiro comparison of influenza a/h1n1 pdm09 vaccine productions in eggs versus cell cultures and the protective immune responses induce in mice. XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
  8. Tadaki Suzuki, Akira Ainai, Noriyo Nagata, Tetsutaro Sata, Hideki Hasegawa Role of the n-terminal region of the pa subunit in nuclear import and assembly of influenza a virus rna polymerase XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
  9. Tatsuya Yamazaki, Yasutomo Teshima, Daisuke Ninomiya, Maria Nagashima, Yuka Arai, Akira Fujimoto, Akira Ainai, Hideki Hasegawa, Joe Chiba. Passive immunotherapy against influenza virus infection using the expression of neutralizing anti-hemagglutinin monoclonal antibodies from plasmids by hydrodynamics-based procedure XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
  10. Hidekatsu Iha, Emi Ikebe, Akira Kawaguchi, Shinya Taguchi, Akira Nishizono, Yuetsu Tanaka, Hirofumi Sawa, Masao Ogata, Mitsuo Hori, Jun-Ichi Fujisawa, Hideki Hasegawa. Molecular chaperon inhibitor-based treatment against ATL: its in vitro and in vivo evaluation XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
  11. Masayuki Saijo, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Noriyo Nagata, Naoko Yoshikawa, Hideki Hasegawa, Shuetsu Fukushi, Tetsuya Mizutani, Tetsutaro Sata, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa. Immune responses against EEV and IMV in non-human primates infected with monkeypox virus or vaccinated with a highly attenuated smallpox vaccine lc16m8 and protection from lethal monkeypox. XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
  12. Noriyo Nagata, Naoko Iwata, Hideki Hasegawa, Yuko Sato, Shigeru Morikawa, Tetsutaro Sata. Interferon gamma protects adult balb/mice from lethal respiratory illness after mouseadapted sars-cov infection. XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
  13. 長谷川秀樹 感染防御に効くインフルエンザワクチンを目指して 第 15 回日本ワクチン学会学術集会 2011 年 12 月東京
  14. 相内章、浅沼秀樹、谷本武史、小田切孝人、田村慎一、田代真人、長谷川秀樹 2009/10 季節性インフルエンザワクチンの経鼻投与による A/H1N1pdm09 ウイルスの感染防御 第 15 回日本ワクチン学会学術集会 2011 年 12 月東京
- 分担研究者：小川誠司
1. 論文発表
    - 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**. 2012;21:121-35
- 2) Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, Wang R, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T, Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. **Blood**. 2012 Jan 18
  - 3) Hirabayashi S, Flotho C, Moetter J, Heuser M, Hasle H, Gruhn B, Klingebiel T, Thol F, Schlegelberger B, Baumann I, Strahm B, Stary J, Locatelli F, Zecca M, Bergstraesser E, Dworzak M, van den Heuvel-Eibrink MM, De Moerloose B, Ogawa S, Niemeyer CM, Wlodarski MW. Spliceosomal gene aberrations are rare, coexist with oncogenic mutations, and are unlikely to exert a driver effect in childhood MDS and JMML. **Blood**. 2012 Jan 11
  - 4) Shiba N, Hasegawa D, Park MJ, Murata C, Matsubara A, Ogawa C, Manabe A, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. CBL mutation in chronic myelomonocytic leukemia secondary to familial platelet disorder with propensity to develop acute myeloid leukemia (FPD/AML). **Blood**. 2011 Dec 2
  - 5) Kao HW, Sanada M, Liang DC, Lai CL, Lee EH, Kuo MC, Lin TL, Shih YS, Wu JH, Huang CF, Ogawa S, Shih LY. A high occurrence of acquisition and/or expansion of C-CBL mutant clones in the progression of high-risk myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. **Neoplasia**. 2011;13:1035-42
  - 6) Koren-Michowitz M, Sato-Otsubo A, Nagler A, Haferlach T, Ogawa S, Koefler HP. Older patients with normal karyotype acute myeloid leukemia have a higher rate of genomic changes compared to young patients as determined by SNP array analysis. **Leuk Res**. 2011 Nov 7
  - 7) Shiba N, Park MJ, Taki T, Takita J, Hiwatari M, Kanazawa T, Sotomatsu M, Ishii E, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. CBL mutations in infant acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Haematol**. 2012;156:672-674
  - 8) Katagiri T, Sato-Otsubo A, Kashiwase K, Morishima S, Sato Y, Mori Y, Kato M, Sanada M, Morishima Y, Hosokawa K, Sasaki Y, Ohtake S, Ogawa S, Nakao S. Frequent loss of HLA alleles associated with copy number-neutral 6pLOH in acquired aplastic anemia. **Blood**. 2011;118:6601-9
  - 9) 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;478:64-9
  - 10) Seo S, Nakamoto T, Takeshita M, Lu J, Sato T, Suzuki T, Kamikubo Y, Ichikawa M, Noda M, Ogawa S, Honda H, Oda H, Kurokawa M. Crk-associated substrate

lymphocyte type regulates myeloid cell motility and suppresses the progression of leukemia induced by p210Bcr/Abl. **Cancer Sci.** 2011;102:2109-171.

- 11) Thoennissen NH, Lasho T, Thoennissen GB, Ogawa S, Tefferi A, Koeffler HP Novel CUX1 missense mutation in association with 7q- at leukemic transformation of MPN. **Am J Hematol.** 2011 ;86:703-5
- 12) Takita J, Chen Y, Okubo J, Sanada M, Adachi M, Ohki K, Nishimura R, Hanada R, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Aberrations of NEGR1 on 1p31 and MYEOV on 11q13 in neuroblastoma. **Cancer Sci.** 2011 Sep;102:1645-50

## 2.学会発表

- 1) Yasunobu Nagata MS, Kenichi Yoshida, Ayana Kon , Aiko Sato, Naoshi Obara, Ken Ishiyama, Shuichi Miyawaki, Jyunko Takita, Shigeru Chiba, Lee-Yung Shih, H.Phillip Koeffler, Seishi Ogawa., Mutational spectrum analysis of interesting correlation and interrelationship between RNA splicing pathway and commonly targeted genes in Myelodysplastic syndrome The 53rd annual meeting of American Society of Hematology. 2011
- 2) Kenichi Yoshida MS, Yasunobu Nagata, Ryoichiro Kawahata, Motohiro Kato, Aiko Matsubara, Jyunko Takita, Hiraku Mori, Ken Ishiyama, Takayuki Ishikawa, Shuichi Miyawaki, Naoshi Obara, Shigeru Chiba, Seishi Ogawa. Frequent Pathway Mutations of Splicing Machinery in Myelodysplasia The 53rd annual meeting of American Society of Hematology. 2011

- 3) Yasunobu Nagata MS, Kenichi Yoshida, Ayana Kon , Aiko Sato, Naoshi Obara, Ken Ishiyama, Shuichi Miyawaki, Jyunko Takita, Shigeru Chiba, Lee-Yung Shih, H.Phillip Koeffler, Seishi Ogawa. Profiling of multiple gene mutations in myelodysplastic syndromes using high-throughput resequencing combined with barcode labeling. Annual meeting American association for cancer research 2011
- 4) Kenichi Yoshida MS, Yasunobu Nagata, Ryoichiro Kawahata, Motohiro Kato, Aiko Matsubara, Jyunko Takita, Hiraku Mori, Ken Ishiyama, Takayuki Ishikawa, Shuichi Miyawaki, Naoshi Obara, Shigeru Chiba, Seishi Ogawa. Whole Exome Analysis of Myelodysplastic Syndromes 16th Congress of the European Hematology Association (EHA). 2011.
- 5) Yasunobu Nagata MS, Kenichi Yoshida, Ayana Kon , Aiko Sato, Naoshi Obara, Ken Ishiyama, Shuichi Miyawaki, Jyunko Takita, Shigeru Chiba, Lee-Yung Shih, H.Phillip Koeffler, Seishi Ogawa. Next-generation sequencing technology combined with multiplexed barcoded samples of myelodysplastic syndromes reveals an abundance of target gene mutations. MDS 2011 Symposium, 2011.

分担研究者：塚崎邦弘

### 1. 論文発表 英文雑誌

1. Ishida T, Tsukasaki K, et al. Defucosylated Anti-CCR4 Monoclonal Antibody (KW-0761) for Relapsed Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma: A Multicenter Phase II Study. **J Clin Oncol.** [Epub ahead of print], 2012.

2. Tsukasaki K, Tobinai K, Clinical Trials and Treatment of ATL in “HTLV-1 Infection and Its Associated Diseases”, **Leukemia Research and Treatment**, 2012.
  3. Norimura D, Tsukasaki K, et al. Gastric involvement by mantle cell lymphoma observed by magnified endoscopy with narrow-band imaging. **Gastrointest Endosc.** 75(2):421-2, 2012.
  4. Tsukasaki K, et al. Lymphoma Study Group of JCOG. **Jpn J Clin Oncol.** 42(2):85-95, 2012.
  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. Chou T, Tsukasaki K, et al. the Lymphoma Study Group (LSG) of Japan Clinical Oncology Group (JCOG), Japan: Melphalan-Prednisolone and Vincristine-Doxorubicin -Dexamethasone Chemotherapy followed by Prednisolone/Interferon Maintenance Therapy for Multiple Myeloma: Japan Clinical Oncology Group Study, JCOG0112. **Jpn J Clin Oncol**, 41(4):586-589.2011.
  7. 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.
  8. 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.
  9. 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.
  10. 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):1108-17,2011.
  11. 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.
  12. Watanabe T, Tsukasaki K, et al. Phase II/III Study of R-CHOP-21 Versus R-CHOP-14 for Untreated Indolent B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma: JCOG 0203 Trial. **J Clin Oncol.** 2011 Oct 20;29(30):3990-3998.
- 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):1484-90,2011.
- 和文雑誌
1. 塚崎邦弘 : 【悪性リンパ腫 (かかりつけ医から専門医への質問)】成人 T 細胞白血病リンパ腫の抗がん剤治療について教えて下さい.治療 93(4 月増刊号) : 1156-1158,2011.
  2. 塚崎邦弘 : HTLV-1 母子感染予防対策について ATL について. 日本医師会雑誌 140(4) : 805-807,2011.
  3. 塚崎邦弘 : 【トピックス I. 病因・病

- 態—最近の知見】4. リンパ系腫瘍とウィルス. 日本内科学会雑誌 100(7): 1781-1786,2011.
4. 高崎由美、塚崎邦弘ほか:【特集 リンパ系腫瘍診療の research questions】くすぶり型・慢性型成人 T 細胞白血病リンパ腫に対する無治療経過観察は適切な選択か? 血液内科 63(1): 40-45,2011.
  5. 塚崎邦弘:【特集(1): HTLV-1 感染の検査と臨床】4. ATL の病態と治療. 医療と検査機器・試薬 34(4):467-471, 2011.
  6. 塚崎邦弘:【特集 身近になる血液疾患の治療—専門医から実地医家へ】成人 T 細胞白血病/リンパ腫と抗体薬治療. 日本医師会雑誌 140(7): 1465-1469,2011.
  7. 塚崎邦弘:【73 回日本血液学会学術集会 教育講演 S-2 基本シリーズ】ATL に対する臨床試験の現状と患者参加促進. 臨床血液 52(10)別冊: 1448-1453,2011.
  8. 今泉芳孝、塚崎邦弘:【特集 ウィルス感染による造血器疾患の病態と治療】ATL の予後による層別化と治療の進歩. 血液内科 63(4): 399-405,2011.
  9. 糸永英弘、塚崎邦弘ほか:【症例報告】顆粒リンパ球増多症に続発した急性単芽球性白血病 臨床血液 52(12): 1870-1875,2011.
  10. 塚崎邦弘:【特集 成人 T 細胞白血病 (ATL)】6. ATL に対する化学療法. 血液フロンティア 22(2): 215-221,2012.
  11. 森脇裕司、塚崎邦弘:【特集 成人 T 細胞白血病 (ATL)】8. 症例提示 1)CCR4 抗体投与後の late and long responder. 血液フロンティア 22(2): 231-233,2012.
- 和文書籍
1. 上平 憲、塚崎邦弘ほか: 成人 T 細胞白血病(ATL)の深まる理解と新たな謎. (上平 憲編著者,仲井里枝、越智康浩、田中千晶編集,㈱シスメックス(神戸))2011.
  2. 今泉芳孝、塚崎邦弘: 成人 T 細胞白血病・リンパ腫. 専門医のための薬物療法 Q&A 血液(小松則夫,片山直之, 富山佳昭編集, ㈱中外医学社(東京),265-272,2011.
  3. 福島卓也、塚崎邦弘: IV. 成人 T 細胞白血病・リンパ腫. 現場で役立つ血液腫瘍プロトコール集 改訂版 (直江知樹編集, ㈱医薬ジャーナル社(大阪・東京), 95-101,2011.
  4. 塚崎邦弘: [II. 白血病と白血球異常] 8. 成人 T 細胞白血病/リンパ腫～その白血病細胞形態の多様性～ (溝口秀昭、齊藤英彦、吉田彌太郎、小澤敬也編集、私のこの一枚 標本に学ぶ血液疾患症例 ㈱医薬ジャーナル社 (大阪) ,113-118,2012.
2. 学会発表
1. 牧山純也、塚崎邦弘ほか: 骨髄の再検査で診断した Hepatosplenic T cell lymphoma (HSTL). 第 51 回日本リンパ網内系学会総会, 2011
  2. Ishida T, Tsukasaki K, et al : A Multicenter Phase II Study of KW-0761 for Relapsed ATL, 第 9 回日本臨床腫瘍学会学術集解, 2011
  3. 塚崎邦弘: ATL に対する臨床試験の現状と患者参加促進. 第 73 回日本血液学会学術集会, 2011
  4. Nagai H, Tsukasaki K, et al : 第 73 回日本血液学会学術集会: Phase I Study of Forodesine in Patients with Relapsed or Refractory T/NK-Cell

- Malignancies,2011
5. Taniguchi H, Tsukasaki K, et al : Outcome of adult T-cell leukemia-lymphoma(ATL)after salvage therapy, 第 73 回日本血液学会学術集会, 2011
  6. Uchimaru K, Tsukasaki K, et al : Nation-wide survey of the management of adult T-cell leukemia and HTLV-1 carrier, 第 73 回日本血液学会学術集会, 2011.
  7. Yamamoto K, Tsukasaki K, et al. : Plenary Session. Phase II/III trial of RCHOP-21 vs. RCHOP-14 in untreated advanced indolent B-cell lymphoma : JCOG0203, 第 73 回日本血液学会学術集会, 2011
  8. Makiyama J, Tsukasaki K, et al : Methotrexate-associated lymphoproliferative disorders in patients with rheumatoid arthritis, 第 73 回日本血液学会学術集会, 2011
  9. Maruyama D, Tsukasaki K, et al : Phase I study of forodesine(BCX1777),an oral purine nucleoside phosphorylase inhibitor in patients with relapsed or refractory T/NK-cell malignancies, T-CELL LYMPHOMA FORUM, 2011.
  10. Tsukasaki K : Pathogenesis of Adult T cell Leukemia-Lymphoma. XI Simpósio Internacional sobre HTLV no Brasil, 2011.
  11. Tsukasaki K : International consensus on the management of ATL. XI Simpósio Internacional sobre HTLV no Brasil, 2011.
  12. Tsukasaki K : Clinical Trials for the Treatment of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) by the Japan Clinical Oncology Group (JCOG). XI Simpósio Internacional sobre HTLV no Brasil, 2011.
  13. Utsunomiya A, Tsukasaki K, et al : Promising Results of an Anti-CCR4 Antibody, KW-0761, for Relapsed Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma(ATL). 15th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, 2011
  14. K. Tobinai, , Tsukasaki K, et al: Promising Results of an Anti-CCR4 Antibody, KW-0761, for Relapsed Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma(ATL), 11th International Conference on Malignant Lymphoma, 2011.
  15. Katsuya H, Tsukasaki K, et al: A Prognostic Index for Acute and Lymphoma Type Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. 53<sup>rd</sup> ASH Annual Meeting, 2011.
  16. Fukushima T, Tsukasaki K, et al. Characterization of Long Term Survivors and a Predictive Model for Aggressive Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma(ATL):An Ancillary Study by the Japan Clinical Oncology Group,JCOG0902A. 4<sup>th</sup> Annual T-cell Lymphoma Forum, 2012.
  17. Fukushima T, Tsukasaki K, et al. Characterization of Long Term Survivors and a Predictive Model for Aggressive Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma(ATL):An Ancillary Study by the Japan Clinical Oncology Group,JCOG0902A. 53<sup>rd</sup> ASH Annual Meeting, 2011.
  18. Tsukasaki K, et al. JCOG studies for ATL. 4<sup>th</sup> Annual T-cell Lymphoma Forum, 2012.



**G.知的財産権の出願・登録状況**

1. 特許取得（出願） なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

## II. 分担研究報告書

## 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：渡邊俊樹 東京大学新領域創成科学研究科 教授

### 研究要旨

成人性T細胞性白血病は極めて予後が悪く化学療法耐性を示す疾患であるが、現在までに具体的な治療対策が確立されておらず、深刻な研究課題の対象となっている。最近このような化学療法耐性の疾患に癌幹細胞が存在する事が白血病から固形腫瘍を含む多くの疾患で報告されているが、ATLにおいては明らかになっていない。我々は現在までにATL患者末梢血から得られた単核球からCD4 CCR4をソーティングして免疫不全マウス(NOJマウス)に連続移植継代を成功させた。このことはATLにおいても癌幹細胞が存在することを強く示唆している。我々はさらにATL患者末梢血単核球からCD3Hi CD4+, CD3Hi CD86-の分画をソーティングして連続移植継代を成功させた。また連続移植継代株はFrozen Stockにおいても生着が可能であることが分かり、再現性の高い移植実験が可能となった。次にこれらを用いてHTLV1のIntegration siteを調べたところ、CD3HiCD4+由来のIntegration Siteは5代目の連続移植継代株においても患者由来のものと同一のものを有していた。またCD4 CCR4由来連続移植継代株のFrozen Stockを移植したNOJマウスの脾臓単核球からT cellマーカーCD5発現の強弱でソーティングを行うと生着能に差が見られた(中内班と共同研究)。以上のことはATL患者末梢血のT細胞分画において癌幹細胞が存在する事をさらに補強するデータとなり、今後の治療対象として検討していくことが必要とされる。また、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- $\kappa$ 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- $\kappa$ Bのリンケージを発見し、新たな治療法開発の標的を明らかにした。

### 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。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の存在を明らかにし、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。研究代表者らは平成21年度の研究で、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、さらに平成22年度にはCCR4 CD4共陽性細胞をソーティングして安定した連続継代が可能であることを示した。平成23年度、それらの結果をもとに、連続継代後の移植ヒト細胞を候補の表面マーカーで染色してソーテ

イングし、それらの免疫不全マウスでの増殖を観察した。

## 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) 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) に登録されている患者から末梢血を採取 (ヘパリン添加) 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 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。

(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

	Primary	Second	Third	4th	5th	6th	7th	8th	9th
CD4 CCR4 sorted	60	37	22	25	23	25	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。

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。また生着した細胞集団の CD3 の発現はすでに減弱していた。これは ATL 細胞における特徴の一つと類似している。

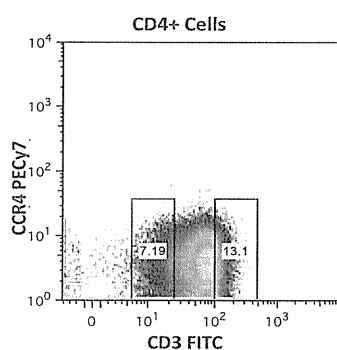


図 1 ATL 患者末梢血 CD4CD3 陽性細胞の解析とソーティング

また別のソーティングマーカーとして 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 HTLV1 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 代目まで維持されている事が示唆された。このことは患者末

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

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)。

このことはこの株ではウイルス感染も含まれる可能性が示唆されており、今後次世代高速シーケンサーを用いて詳細なインテグレーションサイトの解析を検討する予定である。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(中内グループデータ参照)。

## 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に気がついた (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 (62, 63)。我々は、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- $\kappa$ 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- $\kappa$ B 経路の恒常的活性化を誘発することがわかった (図 2)。

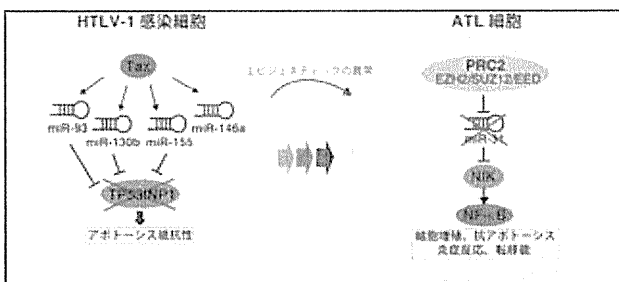


図 2. HTLV-1 感染細胞と ATL 細胞における miRNA の異常

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 患者で起こっていることがわかった。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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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 3)。

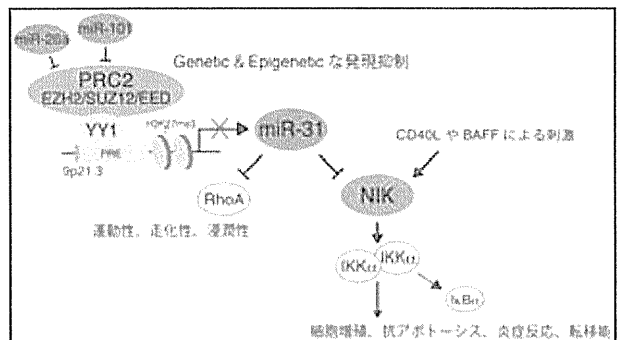


図 3. ATL 細胞における miR-31 を取り巻く分子メカニズム

## D. 考察

### 1. ATL 細胞のがん幹細胞の探索

我々は ATL 患者末梢血で CD4+CCR4+(Chronic type), CD3HI CD4+(Acute type), CD3HI CD86-(Acute Type) という極めて T 細胞が存在する可能性が高い分画から連続移植継代株の作成に成功した。連続継代はそれぞれ 9 代、8 代、5 代行ったが、これ以上も可能であるはずであるが、意図的にこの代で停止させた。またこれら全ての継代株においてに HTLV-1 が陽性であった。また Acute Type の患者末梢血由来である CD3HI CD4+分画の連続移植継代株は患者と同一の Integration site を持っていたこと

からも患者由来の腫瘍細胞が免疫不全マウス内で腫瘍化していることを強く示唆している。また CD4 CCR4sort 分画由来の連続移植継代株を T cell マーカー CD5 強弱の差でソーティングを行うと生着能に差が見られることから癌幹細胞は T 細胞由来であることが予想される。

現在までに、ATL に関する免疫不全マウスの移植系は数多くの研究グループが報告している。最近では CD34 陽性の Hematopoietic Stem cell を NOD/SCID に移植し CD4 陽性の lymphoma like cells にまで誘導が可能となったことを Feuer グループ (Blood 115 2640) が報告している。一方、CD4 陽性の T 細胞由来で連続移植継代を可能としたのは京都大学の高折博士らのグループのみである (JJCR 87, 887)。彼らは 14 代まで連続移植継代を行っている。しかしながら 1996 年当時は癌幹細胞という発想が無くそれに関する報告はない。

ATL の発症に関する報告としては 20 年間の Follow up study で HTLV-1 キャリアの 2% においてサザンブロット法を用いると HTLV-1 を検出することが可能であるが、そのうち 40% 以上が ATL を発症することが報告されている (Blood 105, 903)。また ATL 患者末梢血から発症時と同じインテグレーションサイトを有する感染細胞が 8 年前から末梢血に見られることが報告されている (Int J Cancer 110 621)。

以上を簡単にまとめると CD34HPC が HTLV-1 感染により T 細胞まで分化する可能性があるがその分化した T 細胞はキャリアの時から確認され、それが 8 年後に腫瘍白血病細胞になった事例が存在する。我々は JSPFAD に深く関わっており、キャリアのフォローアップの観点からもまず患者末梢血中の T 細胞に腫瘍化能があるのか、またその中に癌幹細胞があるのかを検討してきた。その結果、患者末梢血中の T 細胞分画より癌幹細胞活性を有する細胞集団が存在する事を強く示唆する結果を有した。これは今後の患者に対する治療方針に大きく影響する結果と考える。

## 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。

## E. 結論

① 3 名の ATL 患者末梢血から連続移植継代株を作成することができた。これらの腫瘍は HTLV-1 陽性で、一部の T 細胞 (CD4+, CD5+) マーカーが陽性であった。また Cell Heterogeneity を有することが示唆された。② ATL 細胞における特異的 miRNA 発現異常を明らかにし、新たな分子標的治療法開発の可能性を開いた。

## F. 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, Uchimaruru K, Ogawa S, Watanabe T. Polycomb-mediated loss of miR-31 activates NIK-dependent NF- $\kappa$ B 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 I $\kappa$ B 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, Uchimar K, Watanabe T, “Genetic and Epigenetic Loss of miR-31 Activates NIK-dependent NF-κB Pathway in Adult T-cell Leukemia “, The 15<sup>th</sup> 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 15<sup>th</sup> 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, Uchimar 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, Uchimarui 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)
- (その他)
- 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)
- 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患者の検体およびそれらを移植した免疫不全マウス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年度までの研究で、研究代表者らはATL細胞を免疫不全マウス（NOJ）に移植して連続継代に成功した。しかしながら、マウス体内で継代されるヒト細胞にはSP分画は検出されなかった。一方、CD4CCR4共陽性細胞をソーティングして移植すると、プロウイルス量が増加せずに安定した継代が可能であった。平成23年度、ATL細胞の表面マーカーの網羅的解析の結果などをもとに、CD4 CCR4 分画由来連続移植継代株からCD5強陽性CD4陽性細胞をソーティングして移植を行った。その結果、免疫不全マウスでATL細胞の性状を保ちながら連続継代が可能であった。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。

### 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<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>）、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。研究代表者らは平成21年度の研究で、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、さらに平成22年度にはCCR4 CD4共陽性細胞をソーティングして安定した連続継代が可能であることを示した。平成23年度、それらの結果をもとに、連続継代後の移植ヒト細胞を候補の表面マーカーで染色してソーティングし、それらの免疫不全マウスでの増殖を観察した。

### 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）に登録されている患者から末梢血を採取（ヘパリン添加）した。

研究計画書は、臨床研究に関する倫理指針（平

成20年厚生労働省告示第415号)、および東京大学医科学研究所で定めた倫理規定を遵守して作成し、研究開始前に本研究所・倫理審査委員会に提出し、承認を得た。患者に研究内容、採血以上の危険はないこと、および個人情報保護されることを文書で説明し、同意(インフォームド・コンセント)を得た後採血した。

## 2) 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とソーティング

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、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。

## C. 研究結果

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

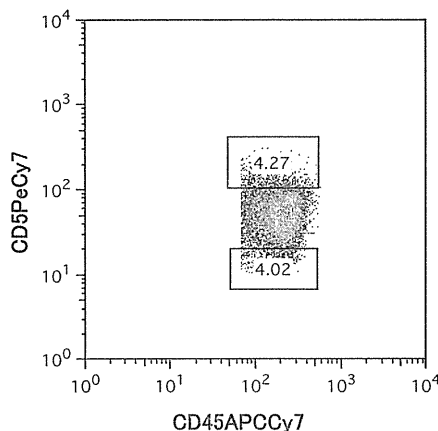


図 1 ATL 患者末梢血 CD4 陽性細胞の解析とソーティング

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。図の CD5 強陽性分画 (CD5Hi)、CD5 弱陽性分画 (CD5Lo)、をソーティングし、免疫不全マウスに移植した。

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。○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(Preliminary Data)。

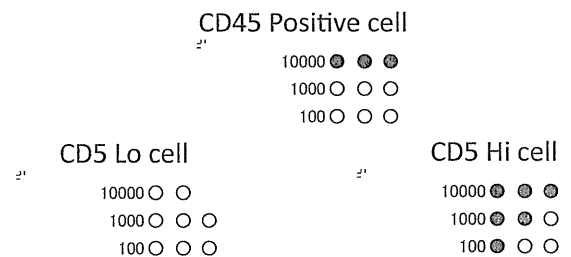


図 2 マウスへの移植実験結果

## D. 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、その連続継代を可能にする ATL 細胞中の集団の同定をめざしたが、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。

このことは、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。

## E. 結論

患者末梢血 CD4 陽性細胞のうち CD5 強陽性 CD4 陽性細胞をソーティングして移植を行った。その結果、免疫不全マウスで ATL 細胞の性状を保ちながら連続継代が可能であった。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。

## F. 研究発表

### 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.
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, Nakauchi 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.