

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, Koeffler 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. Ulm, 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. Ulm, Germany
4. Invited Speaker: Seminar Series on Stem Cells, May 24, 2011. Ulm. “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- β 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.”

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

脾臓及び骨髄における ATL 癌幹細胞ニッチの同定

研究分担者

浜口 功 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 部長

協力研究者

水上拓郎 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 第4室 室長

滝澤和也 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 第4室 研究員

研究要旨

成人 T 細胞白血病 (ATL) はヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-1) の感染によって引き起される白血病の 1 つであり、化学療法による治療効果が低い。近年、様々な腫瘍において化学療法後の再発要因として癌幹細胞 (LSCs) の存在が示唆されていた。我々は ATL モデルマウスである Tax トランスジェニックマウス (Tax-TG) に注目し LSCs の同定を試みた。その結果、腫瘍細胞中に約 0.03% の SP 細胞が存在する事が明らかとなり、その SP 細胞の約 70% が CD38- / CD71- / CD117+ の細胞分画に存在し、腫瘍再形成能を有することを明らかにした。また、CD38, CD71, CD117 抗体を用いた多重染色の結果、ATL-LSCs は赤脾髄及び白脾髄に存在し、特に赤脾髄に多く認められた。またこれらの細胞は血管内皮ニッチに隣接して存在している事が明らかとなった。一方骨髄においては骨内膜に沿った形で ATL 細胞及び ATL-LSCs の局在が認められ、骨内膜ニッチが腫瘍の形成、増殖に関わっている事が示唆された。今後はこれらのニッチの分子基盤を明らかにし、ニッチ分子を標的とした新規治療法の開発を試みる。

A. 研究目的

成人 T 細胞白血病 (ATL) はヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-1) の感染によって引き起される白血病の 1 つであり、化学療法による治療効果が低い。近年、様々な腫瘍において化学療法後の再発要因として癌幹細胞 (LSCs) の存在が示唆されており、LSC を標的とした治療法の研究・開発が急がれている。そこで我々は ATL

モデルマウスである Tax トランスジェニックマウス (Tax-TG) に注目し LSCs の同定を試みた。その結果、腫瘍細胞中に約 0.03% の SP 細胞が存在する事が明らかとなり、その SP 細胞の約 70% が CD38- / CD71- / CD117+ の細胞分画に存在し、腫瘍再形成能を有することが明らかとなった。近年、様々な腫瘍幹細胞がニッチ (微小環境) に存在し、薬剤耐性、細胞周期の制御等を

受けている事が明らかとなっている。また、これらのニッチの変化が、腫瘍の進展、転移にも関わっている事が示唆され、腫瘍幹細胞のみならず、腫瘍ニッチを明らかにする事は腫瘍を根絶する上で非常に重要になってくる。

そこで本研究課題では、これらの ATL 細胞や ATL 癌幹細胞が脾臓や骨髄中のどのようなニッチに存在しているか、バイオイメージング技術を用いて明らかにすると共に、ニッチ細胞の同定を試みた。

B. 研究方法

1. 動物および細胞

国立感染症研究所長谷川秀樹先生(感染病理部)より供与頂いた Tax-TG (HTLV-1 Tax トランスジェニックマウス)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。

C. 研究結果

1. 脾臓における ATL-LSCs の同定

Tax-Tg 由来の腫瘍細胞を 1×10^6 個腹腔内接種し、約 3 週間後の脾臓における ATL-LSCs の局在を明らかにする目的で CD38, CD71, CD117 染色を行った。予備実験の結果より、CD38 及び CD71 は 1:50、CD117 は 1:200 で最適な染色像を示したので、これら 3 種抗体ミックス液を作成し、脾臓切片にて反応させた。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 は CD38-/ CD71-/ CD117 陽性なので、CD117 Single Positive 細胞が ATL-LSCs 候補となる。そこで CD117SP 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 1~1.5%前後の存在率であったが、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。

2. GFP モデルを用いた脾臓における ATL-LSCs の同定

CD38, CD71, CD117 染色を行った場合は Tax-TG 由来腫瘍細胞以外にもレシピエント (NOD/SCID) マウス由来の正常 CD38, CD71, CD117 発現細胞も混入してくるので、腫瘍細胞

の局在を正確に把握する事は難しい。そこで、Tax-Tg 由来 ATL 細胞に GFP を強制発現させた細胞を用いて、同様の移植実験を行った (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る事が明らかとなった。そこで GFP 陽性細胞中の CD117 細胞陽性細胞を ATL-LSCs と仮定して GFP 抗体と CD117 抗体による二重染色を行った。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-LSCs 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-LSCs の同定

次に、腫瘍が浸潤し、尚かつ腫瘍再構築能を持つ ATL-LSCs が存在する骨髄におけるニッチを同定する目的で、GFP 陽性の ATL 細胞を NOD/SCID マウスに移植し、約 3 週間後の脾臓と骨髄を採取し、GFP と CD117 の二重染色を行った。その結果、驚く事に 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 との二重染色を行うと、骨髄の管腔側では SP 細胞が多数存在していることが明らかとなった。これらの細胞はレシピエント由来の CD117 陽性造血幹細胞と考えられる。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 (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。

D. 考察

本研究において、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、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。

一般的に、腫瘍幹細胞のニッチは、骨の場合、造血幹細胞と同様に骨内膜の骨芽細胞ニッチであることが少なくない。また、腫瘍の転移や EMT (Epithelial- Mesenchymal Transition) においては血管内皮ニッチが重要な役割を果たしている。我々は、骨内膜及び血管内皮ニッチが ATL の浸潤、増殖に深く関わっている事を示した。今後は、このようなニッチが腫瘍形成のどの時点で発生するのか、あるいはニッチを抑制する事で ATL の進展を阻止できるかを検討し、ニッチ形成の分子メカニズムを解明する事で、新しい ATL-LSCs ニッチを標的とした分子標的の探索に貢献するものと考えられる。また、ヒトの ATL においても同様の現象が認められるのかについて検討する。

E. 結論

本研究において、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。同時に、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。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。

F. 研究発表

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 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, 73rd Japanese Society of Hematology, Nagoya, 14-16 Oct, 2011

G.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

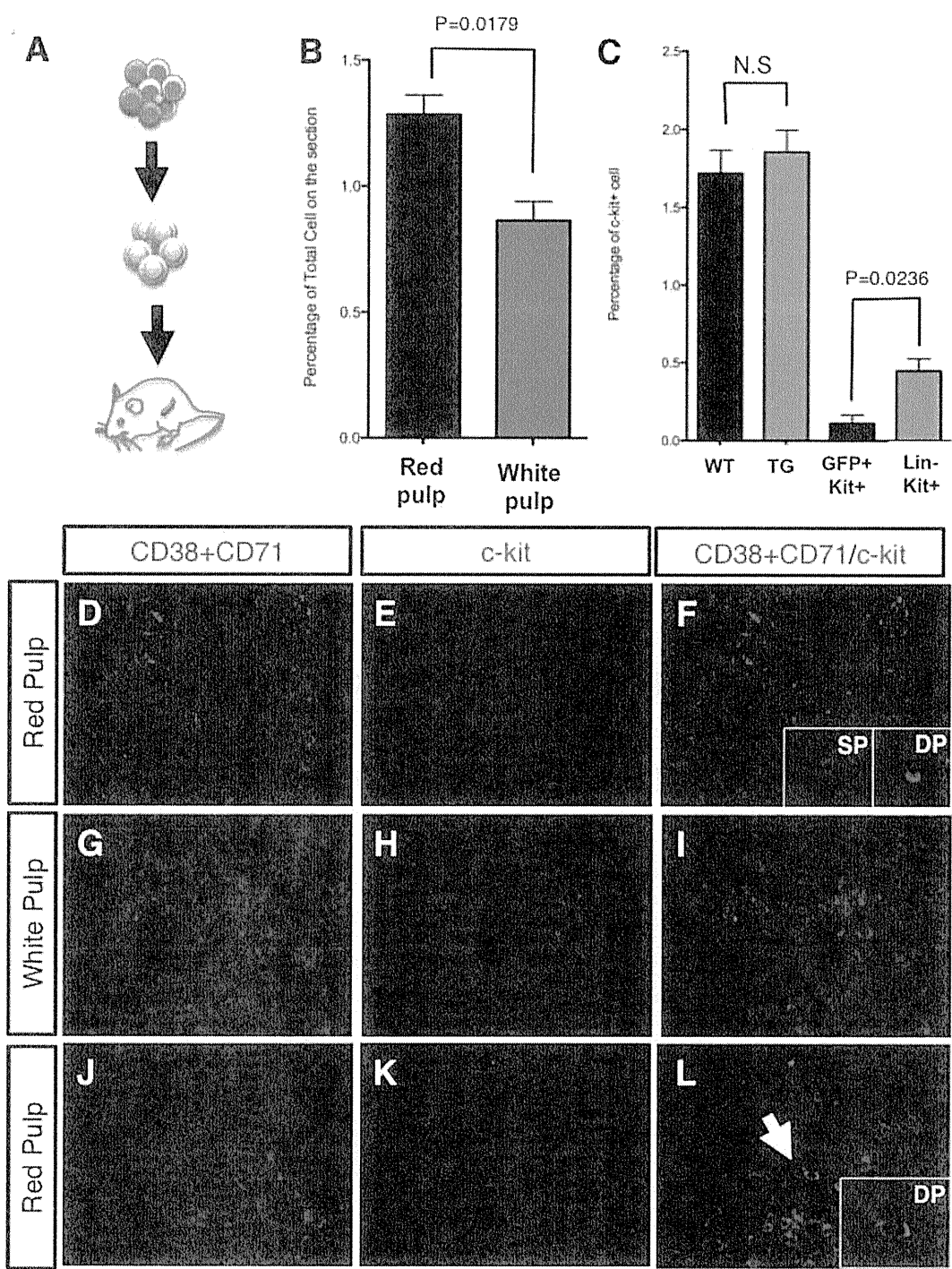


図1 脾臓における ATL 癌幹細胞の局在 A)GFP 強制発現 ATL 細胞の作成と移植実験 B) 赤脾髄、白脾髄における CD38-/CD71-/CD117+細胞の割合 C)GFP+CD117+細胞の頻度 D-F) 赤脾髄における CD38-/CD71-/CD117+細胞 G-I)白脾髄における CD38-/CD71-/CD117+細胞 J-L) 赤脾髄における GFP+/CD117+細胞の局在

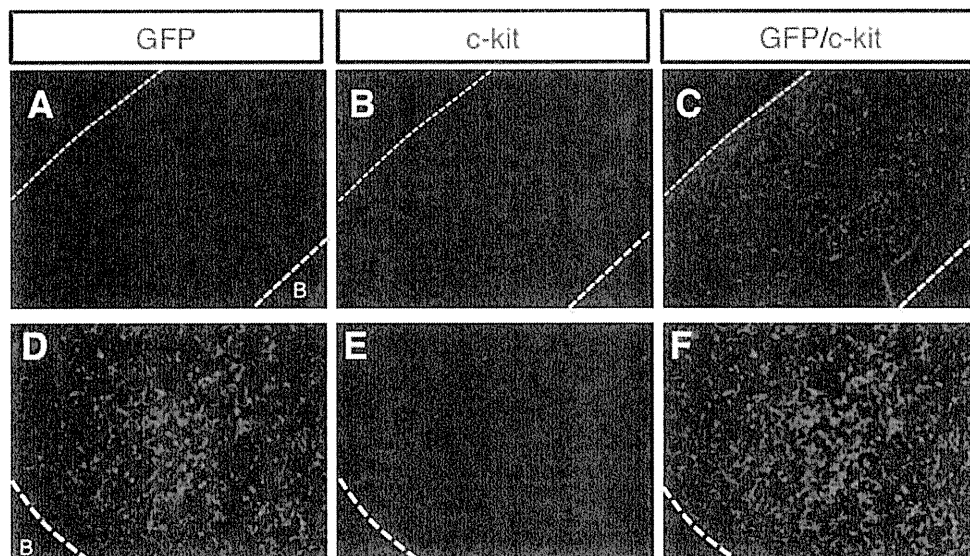


図 2 骨髄における ATL 癌幹細胞の局在 A-C) GFP+CD117+細胞の局在 骨
 内膜に沿った領域に GFP 陽性細胞が集簇している。一方 CD117SP 細胞は骨髄腔
 中心部に多い。D-F) 骨梁領域における GFP+CD117+細胞の局在

質量分析計を用いたマウス ATL 幹細胞特異的分子の同定

分担研究者：長谷川 秀樹（国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター）
研究協力者：鈴木 忠樹（国立感染症研究所 感染病理部）

研究要旨

HTLV-1感染により引き起こされる成人T細胞白血病(ATL)のモデルマウスであるTaxトランスジェニックマウスで起こる白血病の腫瘍細胞(mATL細胞)には癌幹細胞が存在する。癌幹細胞を標的とした新規ATL治療法の基礎を確立するため、マウスモデルのmATL癌幹細胞に特異的に発現する治療標的候補分子となる細胞膜タンパク質を質量分析計による定量的解析法により同定した。その分子を発現する細胞集団は以前同定された他の癌幹細胞のマーカーと関連していた。そこで、抗体を用いてこの膜タンパク質発現細胞除去によるIn vivo白血病形成能の検討を行った所、処理群において血中異型リンパ球数が低下する傾向が見られたが、有意な差が見られなかった。今後、特異的なモノクローナル抗体を製し、持続投与による治療実験を試みる必要があると考えられた。

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。我々は、HTLV-1のtax遺伝子をlck近位プロモーター下に発現させるトランスジェニックマウスを作成し、このマウスではATLと同様の白血病を発症することを報告している(Hasegawa et al., Nat Med. 2006;12(4):466-72)。

最近、この白血病細胞中に癌幹細胞(CSC)が存在していることが報告され、新たな治療標的として有望視されている。癌幹細胞を標的とした治療法を開発するためには、正常の細胞、幹細胞に極力影響を与えないような癌幹細胞特異的な機構を標的とすることが重要でありことから、我々は癌幹細胞で特異的に発現している分子を同定するために白血病細胞の中から癌幹細胞を集め質量分析計によるタンパク質発現差異解析を行った。前年度までの研究により、癌幹細胞に発現量の多い膜タンパク質分子として Cadherin を同定する事に成功した。今年

度は、この Cadherin の発現と他の癌幹細胞表面マーカーとの関係性を精査するとともに、SCID マウスを用いた移植実験を行い、この分子を標的とした治療法開発の可能性を検討した。

B. 研究方法

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) フローサイトメトリー

SICD 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℃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℃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℃、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℃、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℃、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。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。

C. 研究結果

1) フローサイトメトリーによる表面抗原解析

mATL 癌幹細胞の表面マーカーとして同定されている CD38、CD71、CD117、CD44 の発現と Cadherin 発現との関係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(+) という細胞集団で発現量が一番高かった (図 1)。さらに、造血前駆細胞のマーカーとして知られる CD117 発現と非常に高い相関を示した (図 2)。

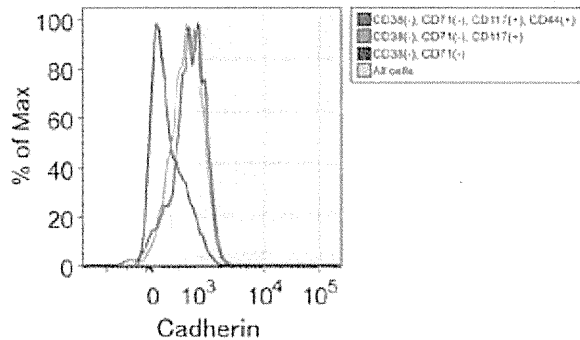


図 1 各細胞集団における Cadherin の発現

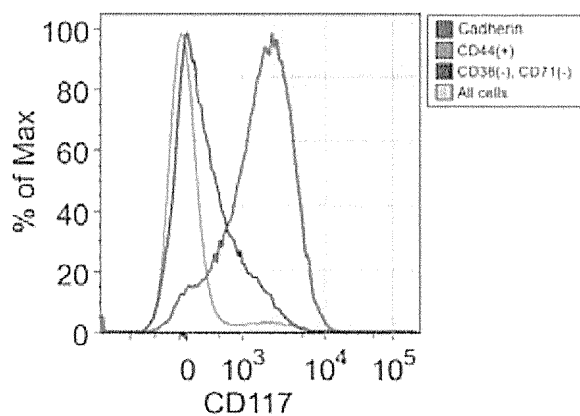


図 2 各細胞集団における CD117 の発現

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

SCID マウスに移植した mATL 細胞の白血病形成能が Cadherin 発現細胞除去により抑制されるかを検討した。

1×10^6 個の Cadherin 発現細胞を除去した mATL 細胞を移植した場合も移植後、約 1 ヶ月で白血病を発症し、脾臓内に異型リンパ球の浸潤が認められた。しかしながら、明らかな有意差はないものの末梢血中のリン

パ球数はコントロール群に比べ Cadherin 発現細胞除去群において低い傾向が見られた (図3)。 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。

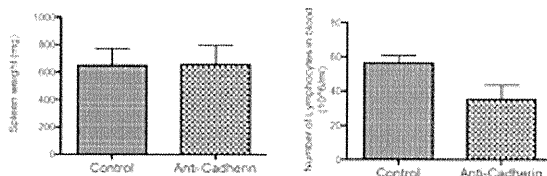


図3 mATL 細胞移植マウスの脾臓の重量と末梢血中リンパ球数

D. 考察

近年、さまざまな固形腫瘍、血液腫瘍において「腫瘍内において自己複製能と腫瘍を構成するさまざまな分化系統の癌細胞を生み出す能力をあわせもつ細胞」と定義される癌幹細胞(Cancer Stem Cell; CSC)の存在が報告されている。この癌幹細胞の本態の解明・治療抵抗性の克服は「がん」に対する治療を飛躍的に改善する可能性を秘めており、癌幹細胞を標的とする研究は世界中で盛んに行われている。がん根治を目指す癌幹細胞を標的とした治療法は、癌幹細胞の自己複製に必要な分子を阻害する、癌幹細胞特異的に発現する細胞表面抗原に対する抗体医薬により癌幹細胞を免疫学的に除去する、化学療法に抵抗性であった癌幹細胞の感受性を上げる、などの方法での開発が行われている。これらの方法の要となるのはいずれも正常の細胞、幹細胞に極力影響を与えないような癌幹細胞特異的な分子／機構を同定することである。

mATL 細胞の癌幹細胞は CD38(-), CD71(-), CD117(+)という特徴を持っている事が明らかになってきたが、我々は、質量分析計を用いた定量解析により Cadherin を新たな mATL 癌幹細胞のマーカとして同定した。

Cadherin は非癌幹細胞での発現がほとんど見られず、mATL 癌幹細胞に特異的に発現していた。また、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。このような理由から、mATL 細胞によって起こる白血病の良い治療標的になることが考えられた。そこで、cadherin 発現細胞を除去した mATL 細胞を用いて in vivo での白血病形成能を検討したが、今回の実験では明らかな白血病形成抑制効果は認められなかった。細胞除去に用いた抗体はポリクローナル抗体であり、特異性が低い事が考えられる事と、全ての癌幹細胞を除去する事ができなかった可能性が考えられる事から、今後、cadherin を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製し、この抗体を用いた治療実験を試みる必要があると考えられる。

E. 結論

mATL 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。

F. 研究発表

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 Suzuki, 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
- G.知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得（出願）
特許第 4817625 号 粘膜免疫誘導アジュバントを含む新規ワクチン 登録日平成 23 年 9 月 9 日
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

ATLにおけるゲノム異常の解析

分担研究者：小川誠司 東京大学医学部附属病院がんゲノミクスプロジェクト特任准教授

研究要旨

ATLはHTLV-1感染不死化T細胞に遺伝子変異が蓄積した結果発症する多段階発癌が示唆されている。本分担研究においては、キャリアの感染細胞中の腫瘍化T細胞あるいはATL幹細胞の早期検出、また分子治療法の開発のための基盤構築をめざし、ゲノムの視点からこれらの細胞の特性解析を行う。昨年度に引き続き、ゲノム異常の集積がみられたTCR経路に着目し、同経路が感染細胞の腫瘍化に重要な役割を果たしているという仮説のもと機能解析を継続した。本年度は、新たに次世代シーケンサーを用いて全エクソン解析を行い、網羅的な遺伝子変異解析により多数の変異遺伝子を同定した。

A.研究目的

成人T細胞白血病(ATL)はHTLV-1のキャリアに発症する末梢性T細胞腫瘍である。有効な治療法や発症予防法は現時点で知られておらず予後は極めて不良である。日本では推定120万人のキャリアから今後5-10万人のATL新規発症が予測されており、本疾患に対する画期的な治療法及び発症予防技術の開発を行うことは極めて重要かつ緊急の課題である。

本分担研究は、ATLの早期診断・画期的根治療法開発のための基盤構築に向けて、ATL患者中の腫瘍細胞及びがん幹細胞特性を有する細胞群(ATL-CSCs)について、マイクロアレイならびに高速シーケンス技術を用いたゲノム解析を行い、特性を明らかにすることを目的とする。

B.研究方法

本分担研究では、ATL患者中の腫瘍細胞ならびにがん幹細胞(ATL-CSCs)について最先端のゲノム解析法を用いた実験を行う。既に実施された170例のATL患者検体のSNPアレイによるゲノムコピー数解析から、多数の異常集積領域が同定されている。中でも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る。

そこで本年度は、(1)TCRシグナル経路が感染細胞の腫瘍化に重要な役割をもつという仮説に基づき、同経路の重要性を機能的な側面から検討するために、ATL細胞株においてTCRシグナル経路を抑制する系の構築を目的とした。これまでに4遺伝子に対し各々複数のshRNA発現ベクターが完成しており、ウイルスを用いた導入実験を行った。(2)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。

(倫理面への配慮)

本研究は東京大学の倫理委員会の承認を得ている。本分担研究で用いた検体はインフォームドコンセントを得た後に連結可能匿名化を施して検討に用いた。

C. 研究結果

(1)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ている。

(2)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。

D. 考察

TCRに關与する分子については引き続き効率的なノックダウンを行う方法を検討する必要があると考えられた。

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關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。

E. 結論

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。これらについて機能的実験を進めると同時に多数の変異遺伝子の中から腫瘍発症に直接關わる遺伝子の同定も今後必要な課題と考えられた。将来への展望としては、全ゲノム解析を行い、転座や逆位などの構造異常を見出すことでさらなる病態解明につながることを期待される。

F. 研究発表

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- κ B 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, Koeffler 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, 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.**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 Syndromes16th 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.

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

ATL の臨床・分子病態と新規治療法開発の研究

分担研究者：塚崎邦弘 長崎大学医歯薬学総合研究科 准教授

研究要旨

ATL のがん幹細胞と臨床病態との関連を明らかにするために、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。

ATL の多様な臨床病態をより詳細に解明するために、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 法で比較した。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。その全例で末梢血よりもリンパ節での異常がより複雑であり、homozygous な欠失の存在は逆に末梢血で優位であったことから、リンパ節内でクローンが進展し、そのうちの一部が末梢血に出現していることが示された。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は、その病理形態の多様性と治療難反応性にかかわっていることが示唆された。

A. 研究目的

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する。

B. 研究方法

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（英文文献 8）。

（倫理面への配慮）

ヘルシンキ宣言およびヒトゲノム・遺伝子解析研究、疫学研究、臨床試験に関するわが国の

倫理指針に従って研究を実施した。

C. 研究結果

1) JSPFAD バンキング

収集した約 100 例の検体は細胞と血漿に分離された後に、一部は ATL のがん幹細胞と臨床病態との関連を明らかにする研究に用いられ、残りは冷凍バンキングされた。

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

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、そのうちの一部が末梢血に出現していると推定できた。

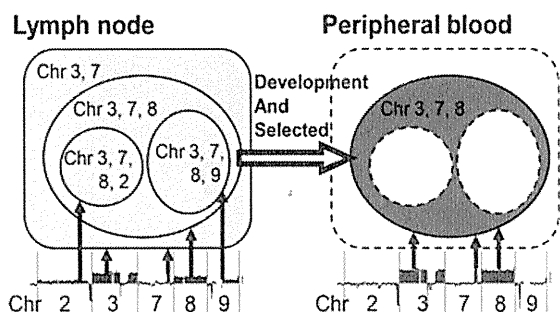


図1. 代表的な急性型 ATL 症例におけるリンパ節に複数存在するサブクローンと末梢血に出現したそのうちの1つのサブクローン。

D. 考察

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。

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。

本研究班の分担研究者として、他の HTLV-1 関連疾患についての研究班とも共同し、継続的な HTLV-1 の総合対策にあたった。

E. 結論

ATL のがん幹細胞と臨床病態との関連を明らかにするために JSPFAD バンキングを継続した。

急性型 ATL ではリンパ節でクローン進展が起こっている。そして多様性を生じ、進展したクローンの一部が末梢血中に出現している。

F. 研究発表

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. リンパ系腫瘍とウイルス。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 ウイ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る謎。(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：骨髓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