

II. 分担研究報告書

miRNA 細胞内輸送担体としての単鎖抗体作製

研究分担者 津本 浩平 東京大学医科学研究所・教授

研究協力者 長門石 暁 東京大学医科学研究所
疾患プロテオミクスラボラトリー
西田 亜季 東京大学大学院新領域創成科学研究科
メディカルゲノム専攻病態医療科学分野

研究要旨：

成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (Adult T-cell leukemia/lymphoma:ATLL, 以下 ATL) における網羅的 miRNA の解析により、発現異常プロファイルと著しい miR-31 の低下が報告され、レンチウイルスベクターによる miR-31 の ATL 患者由来の腫瘍細胞への導入はアポトーシスを誘導し、miRNA が ATL において新規治療標的となりうる可能性が示された(Yamagishi *et al.*, *Cancer Cell* 21(1):121, 2012)。今回我々は、ATL における miRNA を治療標的とした新規治療薬の基礎研究にあたり、miRNA の細胞内輸送担体として miRNA-単鎖抗体(scFV)複合体に着目した。miRNA 結合部位(カチオン性ペプチド)を付加したペプチド融合 scFV は、大腸菌発現システムより発現、リフォールディング、精製に成功した。表面プラズモン共鳴(SPR)の解析から、ペプチド融合 scFv は抗体の特性である高い親和性と遅い解離速度を保持していることが確認された。今後このペプチド融合 scFV と miRNA の結合を確認し、ATL 細胞への miRNA 細胞内輸送効果と miRNA による ATL 特異的障害性を評価していく。

A. 研究目的

成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (Adult T-cell leukemia/lymphoma:ATLL, 以下 ATL) は、HTLV-1 (ヒト T 細胞白血病ウイルス) 感染を原因とする、末梢性 T 細胞腫瘍である。本邦に 120 万人の HTLV-1 キャリアーが存在すると推定され、2.5-5.0%程が生涯に ATL を発症するとされている(Iwanaga *et al.*, *Blood*, 116(8):1211, 2011)。ATL はくすぶり型、慢性型、リンパ腫型、急性型に分類され、全病型の生存期間中央値は 9 ヶ月でありその予後は極めて不良とされている(Shimoyama *et al.*, *Br. J. Haematol.*, 79(3):428, 2012)。

現時点でもっとも良好な治療成績が示された modified LSG15 レジメン (Tsukasaki *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 25:5458, 2007) においても、生存期間中央値は 12.7 ヶ月、3 年の全生存率 24%と報告されており、予後は極めて不良である。現在、

造血幹細胞移植の長期生存や治癒の可能性を示唆する有効性が示されているが(Fukushima *et al.*, *Leukemia*, 19(5):829, 2005)、治療早期における治療関連死亡の問題や発症年齢の中央値から、高齢者では治療法を選択できる対象患者は限定されてしまうことなどの課題がある。近年、新薬として抗 CCR4 抗体の単剤での有効性が示され(Ishida *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 30(8):837, 2012)、2012年5月に本邦でも発売となり臨床での使用が可能となった。現在 modified LSG15 療法と抗 CCR4 抗体との併用療法の有効性が国内後期第二相臨床試験として実施され有効性が期待されている。

既存の抗腫瘍活性を持つモノクローナル抗体療法では、細胞表面マーカーを標的とし放射性同位元素標識や抗癌剤等の細胞障害性物質を結合させたものが臨床応用されているが、IgG 抗体の組織移行性の問題が残されており、細

胞への内在化の問題から治療標的として注目されている低分子 RNA、エピゲノム修飾、転写因子などの細胞内分子を治療標的とする事は困難である。

この中でマイクロ RNA(miRNA)は 18-25 bp の non-coding RNA で、生物学的な機能として標的遺伝子の mRNA 3'側非翻訳領域に結合することにより、その発現を負に制御することで遺伝子発現を調節している分子である。この miRNA の発現異常が様々な悪性腫瘍において報告され、新規治療標的としての可能性が示されている。患者検体を用いた網羅的 miRNA 解析により、ATL における miRNA の発現異常が明らかとなり、正常細胞との比較で全体的に著しい発現低下が特徴的であり、特に miR-31 が顕著な発現低下を認めることが示された。さらに、レンチウイルスベクターによる miR-31 の ATL 患者由来の腫瘍細胞への導入はアポトーシスを誘導し、また同様の処理は正常の末梢血の単核球もしくは T 細胞に対しては効果が軽微であり、各 miRNA の存在量のバランスの異常が成人 T 細胞白血病細胞の生存に重要であることが示された。以上の結果は miR-31 が ATL 細胞に特異的な細胞障害性をもつことを示しており、ATL 細胞に特異的な miRNA 導入法を開発することにより ATL の新規治療法につながる可能性が示唆された (Yamagishi *et al.*, *Cancer Cell*, 21(1):121, 2012)。

目的の miRNA や Toxin を ATL へ効率的に届ける場合には、低分子量の担体の方が好ましい。また ATL 癌幹細胞を特異的に認識できる生体分子として、抗体の有用性は高い。特に単鎖抗体(scFv)は最小単位のモノクローナル抗体で、IgG のような完全抗体に比べて低分子であり、組織移行性に優れリンパ節や臓器浸潤した ATL 細胞にも有効であると考えられた。また、低分子であることから Fab と比較して化学的修飾が容易であり、また抗体の内在化効率に優れており、miRNA の細胞内輸送担体として有効と考えた。また scFV を用いて siRNA の細胞内輸送を試みた報告もある (Kumar *et al.*, *Nature*, 448:39, 2007. / Kumar *et al.*, *Cell*, 134(4):577, 2008. / Yao YD *et al.*, *Sci. Transl. Med.*, 4(130):130ra48, 2012 / Xuguang Li *et al.*, *Cancer Gene Therapy*, 8:555, 2001)。以上のことから我々は、ATL における miRNA を治療標的とした新規治療薬の基礎研究にあたり、miRNA の細胞内輸送担体として miRNA-単鎖抗体複合体に着目

した。

そこで本研究において、ATL 癌幹細胞特異的に miRNA を安定的に細胞内輸送するために、ATL 癌幹細胞表面抗原を認識する単鎖抗体(scFv)と、miRNA をキャリアーできるカチオン性ペプチドを融合させたタンパク質合成を試みた。

B. 研究方法

1、可変領域の配列決定と発現ベクターの作成

単鎖抗体(scFV)作成に必要な重鎖(VH)と軽鎖(VL)の可変領域の配列は 5'RACE 法を用いてハイブリドーマよりクローニングを行い決定した。標的とする表面抗原は研究班内で候補として挙げられた、OX40 (CD134)、CD5、TSLC1 を選択した。ハイブリドーマより total RNA を抽出し、Oligo-Cap を 5'末端に付加し、RT-PCR 法にて cDNA を合成し、Oligo-cap に設定した primer と VH と VL の定常域に特異的な reverse primer で可変領域を増幅し、シークエンス(ダイターミネータ法)にて配列を決定した。ペプチド融合 scFV は、簡便かつ大量製造を目指すために、大腸菌発現系によるリコンビナント scFv から作製を開始した。融合させるカチオン性ペプチドは、アルギニンやリジン残基を多く含んだ RNA 結合能が知られているペプチド(9 mer Arg、Protamine)を採用した。発現ベクターは、N 末端よりシグナルペプチド配列(PeIB)、VH、リンカー、VL、miRNA 結合ペプチド、ヒスチジンタグの順に設計した。

2、抗原分子の塩基配列決定と発現ベクター作成

抗体との相互作用解析に用いる細胞表面抗原の塩基配列を正常ヒト末梢血単核球と T 細胞株、ATL 感染細胞、ATL 由来細胞株から total RNA を抽出し、RT-PCR 法にて cDNA 合成を行った。抗原特異的なプライマーを設計し、細胞外ドメインを PCR にて増幅し、シークエンス(ダイターミネータ法)にて配列を決定した。決定した細胞外ドメインの配列を N 末端からヒスチジンタグ、TEV プロテアーゼ認識配列、抗原の順に配置し発現ベクターを作成した。

3、大腸菌発現システムを用いた発現と精

製

大腸菌発現システムにて発現したペプチド融合 scFv は、可溶性画分からの精製が可能なのは Ni アフィニティーカラムクロマトグラフィー精製、サイズ排除カラムクロマトグラフィーにより最終精製を行った。可溶性画分からの最終精製でモノマー体での精製が困難であったものは、変性剤(グアニジン塩酸塩)を用いて可溶化し、Ni アフィニティーカラムクロマトグラフィー精製、巻き戻し操作を経て、サイズ排除カラムクロマトグラフィーにより最終精製を行った。

抗原も同様に発現確認を行い、可溶性画分での精製が可能であったため、Ni アフィニティーカラムクロマトグラフィー精製、サイズ排除カラムクロマトグラフィーにより最終精製を行った。

4、融合単鎖抗体の物性機能解析

得られた scFv の抗体機能を確認するために、表面プラズモン共鳴 SPR(Biacore)による抗原との結合解析を施行した。抗原をアミンカップリング法にてセンサーチップに固定化し、比較対照として intact IgG、非融合 scFv、ペプチド融合 scFv を用いて評価を行った。

C. 研究結果

1、可変領域の配列決定と発現ベクターの作成

可変領域の配列決定は、5'RACE 法により、OX40 と CD5 のクローニングと発現ベクター作成が終了した。融合ペプチドとして、9 mer Arg (9R)と protamine を選択し、発現ベクターはペプチド融合 scFv と非融合 scFv の作成が終了した。

2、抗原分子のクローニングとベクター作成

OX40 の配列決定と発現ベクター作成が完了し、CD5 は現在クローニングを行っている。

3、大腸菌発現システムを用いた発現と精製

anti-OX40 scFv と anti OX40 scFv 9R について大腸菌での可溶性・不溶性画分の発現確認を行い、非融合 scFv は可溶性画分から精製が可能で

あり、融合ペプチド(9R)については不溶性画分から変性剤を用いて可溶化させ精製を行い、最終的にモノマー体で高純度の抗体を調製することができた。また OD 値、温度、回収時間等の培養条件の検討により、温度と適切な回収時間での発現量増加を得ることができた。anti-CD5 scFv については現在発現確認を行っている。

発現量と比較した最終精製量を考慮した場合に、収量が期待された量を下回り、何らかの因子が精製を阻害している可能性が考えられた。Ni アフィニティーカラムクロマトグラフィー精製後の吸光度測定で、 A_{260}/A_{280} が高値を示したことから、miRNA との結合のために付加したカチオン性ペプチドは、大腸菌由来の DNA や RNA と結合し、カチオン性ペプチド-ヒスチジンタグまでの荷電残基に核酸が大量に存在していることが、Ni アフィニティーカラムクロマトグラフィー精製やモノマー体での存在を阻害している因子と考えられた。

抗原は発現確認で、可溶性画分の発現を得られたため、Ni アフィニティーカラムクロマトグラフィー精製、サイズ排除カラムクロマトグラフィーにより最終精製を行い、モノマー体で得ることができた。

4、融合単鎖抗体の物性機能解析

anti-OX40 IgG、scFv、scFv 9R について SPR を用いた相互作用解析を行った。抗原結合解析の結果、IgG は非常に強力な親和性と遅い解離速度を有していることが確認され、同様に scFv とペプチド融合 scFv も抗体の特性である高い親和性と遅い解離速度を有していることが確認された。

D. 考察

ペプチド融合 scFv は、大腸菌発現系より巻き戻し操作を駆使することにより作製可能であることから、異種のカチオン性ペプチド融合 scFv の発現・調製も可能であることが期待された。また精製した scFv はモノマー体にて調製できたことより、変性剤による可溶化と巻き戻し操作が、修飾を加えた scFv 作製の有効な手法であることが示された。miRNA 結合のために付加したカチオン性ペプチドの特徴として、強い細

胞膜透過性の他に、静電相互作用により核酸に結合することが知られており、このことがヒスチジンタグによるアフィニティー精製と構造の維持やモノマー体での存在を阻害している可能性が示唆された。発現量の増加は培養条件の検討で改善を得ることができたが、今後の収量増加については塩濃度や nuclease 処理などの条件検討をさらに行う必要がある。

さらにペプチド融合 scFv の抗原結合能は、単鎖抗体として十分な結合親和性を保持していることが示唆され、今後 scFv と miRNA との結合を確認し、細胞内への miRNA 輸送効果と細胞障害性について詳細な検討を行っていく。

E. 結論

ATL 細胞特異的に miRNA を細胞内輸送する担体を設計するために、カチオン性ペプチドを融合させた単鎖抗体 scFv を設計した。大腸菌発現系より調製したペプチド融合 scFv は、抗体としての特性を保持して抗原と結合することが確認できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yumura K, Ui M, Doi H, Hamakubo T, Kodama T, Tsumoto K, Sugiyama A. Mutations for decreasing the immunogenicity and maintaining the function of core streptavidin (Article). **Protein Sci.** 22(2), 213-221, 2013
- 2) Kudo S, Caaveiro JM, Miyafusa T, Goda S, Ishii K, Matsuura T, Sudou Y, Kodama T, Hamakubo T, Tsumoto K. Structural and thermodynamic characterization of the self-adhesive properties of human P-cadherin (Article). **Mol. Biosyst.** 8(8), 2050-2053, 2012

2. 学会発表

(国際学会)
該当なし

(国内学会)

- 1) 工藤 翔太, 岩成 宏子, 浜窪 隆雄, 児玉 龍彦, 松浦 正, 須藤 幸夫, 津本 浩平, “2種の

異なる homo-dimer を形成する P-cadherin の物性,構造,機能解析”, 第 12 回日本蛋白質科学会年会、名古屋国際会議場、2012 年 6 月 20 日

- 2) 湯村 恭平, 宇井 美穂子, 岡本 未央, 土井 洋文, 杉山 暁, 浜窪 隆雄, 児玉 龍彦, 津本浩平, “低免疫原性ストレプトアビジンを用いた融合抗体の構築”, 第 12 回日本蛋白質科学会年会、名古屋国際会議場、2012 年 6 月 20-21 日
- 3) 木吉 真人, 岡本 未央, 中木戸 誠, Jose M. M. Caaveiro, 曾我 真司, 白井 宏樹, 河畑 茂樹, 中村 春木, 津本浩平, “抗原抗体相互作用における親和性創出機構の精密解析”, 第 12 回日本蛋白質科学会年会、名古屋国際会議場、2012 年 6 月 20-21 日
- 4) 木吉 真人, 岡本 未央, 中木戸 誠, 曾我 真司, 白井 宏樹, 河畑 茂樹, 中村 春木, 津本浩平, “抗原抗体相互作用における親和性創出機構の精密解析”, 第 6 回バイオ関連化学シンポジウム、北海道大学、2012 年 9 月 6-8 日
- 5) 湯村 恭平, 宇井 美穂子, 岡本 未央, 土井 洋文, 杉山 暁, 浜窪 隆雄, 児玉 龍彦, 津本浩平, “低免疫原性ストレプトアビジン変異体の機能検討”, 第 6 回バイオ関連化学シンポジウム、北海道大学、2012 年 9 月 6-8 日
- 6) 木吉 真人, 三浦 恵梨, 岡本 未央, 中木戸 誠, Jose M. M. Caaveiro, 曾我 真司, 白井 宏樹, 河畑 茂樹, 中村 春木, 津本浩平, “抗原抗体相互作用における親和性創出機構の精密解析”, 第 85 回日本生化学会大会、福岡国際会議場、2012 年 12 月 14-16 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし

2. 実用新案登録
該当なし

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

研究分担者 中内啓光 東京大学医科学研究所・教授
研究分担者 矢持淑子 昭和大学医学部・准教授
研究分担者 矢持忠徳 東京大学大学院新領域創成科学研究科・特任研究員

研究要旨：

本分担研究では分担者らが先行研究で示した、ATL患者末梢血リンパ球を用いたNOJ免疫不全マウスへの連続移植継代可能な細胞集団の存在を元に、がん幹細胞としての性質を示す細胞集団の表現型の詳細な解析とマーカーの同定を目指した。2系統の連続移植細胞系を詳細に検討した所、以下の様な特異な性質を示す事が明らかになった。1) 当初移植に用いた細胞分画の表面抗原の発現が、継代に伴い変化する事。具体的にはCCR4陽性集団細胞のCCR4陰性化やCD3高発現細胞集団の低発現へのシフト等である。2) 連続継代可能な細胞集団の表現型に対応する細胞分画が患者末梢血中にも存在し、それらが免疫不全マウスでの生着能を持つ事。つまり、ATL患者末梢血中のCD3低発現分画の細胞が、生着に時間を要するが生着可能である事、である。これらの知見は、従来報告されている白血病がん幹細胞の性質とは異なるものであり、その細胞学的意義と分子機構について。現在詳細に解析中である。一方、生着腫瘍細胞の組織分布、増殖動態を明らかにする目的で、腫瘍細胞が生着した免疫不全マウスを病理組織学的に解析した。腫瘍細胞移植後の浸潤臓器の特定および死因を検討した結果、腫瘍細胞は主に多形性で核形不整の強いTリンパ球であるが、肝臓、脾臓、肺、骨髄等を含む全身臓器の血管周囲を中心に、結節状～びまん性に浸潤していた。死因は腫瘍死とともに、特に肺に関しては腫瘍細胞浸潤が顕著で既存の肺胞構築破壊に伴う呼吸不全が推察された。今後、腫瘍細胞の臓器分布を更に検討すると共に、がん幹細胞のNicheの存在についても、検討を進める予定である

A. 研究目的

ATLは、我が国に108万人存在する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。

近年、固形がんや急性骨髄性白血病の一部では、「がん幹細胞」とされる細胞集団の存在が報告されており、この様な性質を示す細胞分画の存在が、治療抵抗性やがんの再発の元になっ

ているとの考えが受け入れられている。定義としては、免疫不全マウスに腫瘍として生着能を有するものをさしており、がん幹細胞の定義は幹細胞ががん化したものではなく、いわゆるTumor Initiating Cellを指しており、免疫不全マウスに腫瘍として生着能を有するものを示している。

ATLについてがん幹細胞の存在を直接に証明した報告は無いが、Tax-transgenicのATLマウスモデルにおいては、がん幹細胞様の性質を持つ細胞分画の報告がある（Yamazaki J, et al., Blood 114:2709, 2009）。一方、分担研究者らは、

先行研究において、ATL 患者末梢血から得られた単核球から CD4 CCR4 等のマーカーを用いて分画した細胞集団が免疫不全マウス(NOJ マウス)に生着し、連続移植継代が可能である事を示し、ATL におけるがん幹細胞様の細胞集団が存在することを示して来た。

これらの背景から、本研究では ATL のがん幹細胞集団の同定作業を更に推進し、それらの細胞の表現型の詳細な解析を通じて、ATL がん幹細胞のバイオマーカーを同定しする事を目指す。得られたがん幹細胞の特性に関する情報は、単鎖抗体を用いた ATL がん幹細胞特異的な miR-31 の導入を可能にする基盤となることが期待される。

B. 研究方法

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。

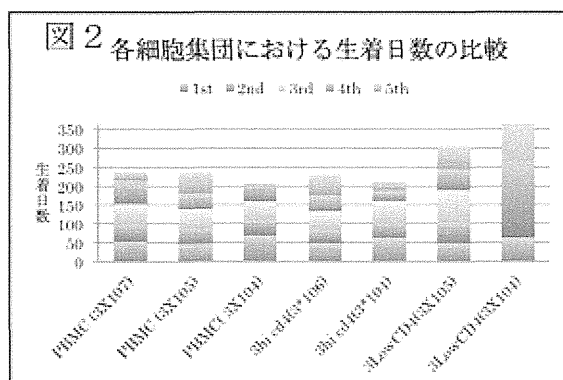
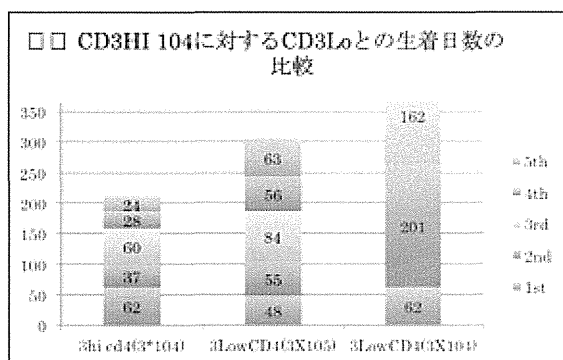
C. 研究結果

1) 連続移植継代細胞の細胞表現型の変遷 (中内、矢持忠徳)

先行研究の結果、ATL 末梢血患者(Chronic type)の CD4+CCR4+の細胞分画が免疫不全マウス(NOJ マウス)に連続移植継代可能である事、一方、連続移植継代は 9 題まで可能であることを確認したが、その 3 代目以降の生着細胞集団の表現型が、CD4+ CCR4-となる事を観察した。更に、連続移植継代の 4 代目の脾臓由来単核球を CD5 の発現レベルで分画して移植した所、CD5 陽性分画の細胞が生着し、CD5 陰性細胞分画は生着しなかった。従って、特定の表面抗原

の発現が変化した 3 代目以降の腫瘍細胞集団内にも Cell Heterogeneity が存在することを示す。一方、更に継代された 5 代目の細胞集団では、CD5 陽性及び陰性細胞の両方で生着のうに差が認められなくなった。

別の症例由来の ATL 細胞を、CD3 の発現レベルで分画して NOJ マウスへ移植した所、ATL 細胞の特徴とされる CD3Lo の分画では無く、CD3Hi の分画で生着が見られ、5 代以上の連続継代移植が可能であった (図 1, 2)。さらに生着した細胞集団は連続移植継代の 2 代目以降はほとんどが CD3Lo へ移行していた。この結果は CD3Hi の細胞集団が CD3Lo へ移行すること、その細胞集団内に tumor initiating cell を含む事を示している。ほとんどが CD3Lo である生体内 ATL 細胞集団内に、生着能を持つ細胞が存在する可能性を検討したところ、CD3Hi 分画より時間を要するが、確かに生着する事が確認できた (図 1)。



これらの実験結果は、継代移植中に表面抗原の発現が変化する事、および、特定の膜抗原の発現レベルと造腫瘍能との関係が継代中に変遷する事を示している。このような現象自体が興味深いものであり、その機構の解析も大きな課

題であるが、一方で、生体内の ATL 細胞のがん幹細胞集団あるいは tumor initiating population を特定するバイオマーカーの同定が非常に困難である事も示唆している。

2) NOJ マウス内の移植腫瘍組織の解析 (矢持忠徳、矢持淑子)

我々は、 $CD4^+/CCR4^+$ 細胞分画由来の継代腫瘍細胞画分を移植し 30 日経過した ATL xenigraft マウスにおける終末病態を病理組織学的に解析を行った。その結果、現在までに死因と主たる腫瘍浸潤部位が決定された。

まず、当該腫瘍細胞の形態学的特徴として、核小体を有し紡錘形または類円形、多形性の核形不整の強い T リンパ球であり、多核の細胞も認められることが明らかになった。この腫瘍細胞のマウス臓器・組織における浸潤を評価するため、パラフィン包埋切片を作製し HE 染色とともに human vimentin に対する免疫組織化学的染色を実施し、形態観察を行った。

その結果、これまでに以下の様な知見を得た (図 3、図 4)。

①マウスの死因：腫瘍細胞が肝臓、脾臓、膵臓、腎臓 (および腎周囲被膜)、肺、骨髄、リンパ節を含む全身臓器の血管周囲を中心に、結節状～びまん性に浸潤したことによる腫瘍死と結論付けることができた。

②腫瘍の臓器分布：食道、胃、腸管等の消化管への腫瘍細胞浸潤は少ない。肺は腫瘍細胞浸潤が顕著で既存の肺胞構築を破壊しており、呼吸不全を惹起していたと推測される。

③共通する腫瘍浸潤部位：肝臓、肺、脾臓、骨髄の 4ヶ所を同定した。いずれの組織も血管周囲を中心とした腫瘍細胞の増殖が顕著であった。

これらの結果に基づき、蛍光ラベルした腫瘍細胞を用い、移植初期における細胞の組織別生着部位を凍結切片上でモニターしている。

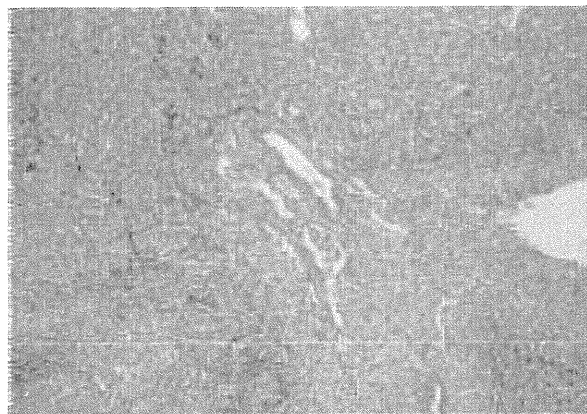


図 3 X10 $CD4+CCR4+$ 由来 6 代目の肝臓
血管周囲を中心に腫瘍細胞の結節状増殖がみられる。

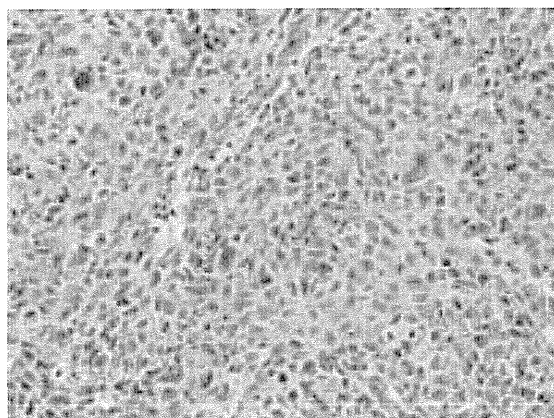


図 4 X40 $CD4+CCR4+$ 由来 6 代目の肝臓
X40;腫瘍細胞は類円形～多形性の強い細胞である。

D. 考察

先行研究で確立した NOJ 免疫不全マウスを用いる継代移植系に生着・継代されている腫瘍細胞を用いて、がん幹細胞を特徴付ける表面マーカーの同定を目指して、細胞膜抗原の発現様態の詳細な解析を行った。

今年度の解析によって得られた知見は以下の様に要約出来る。

- 1) 当初移植に用いた細胞分画の表面抗原の発現が、継代に伴い変化する事。
- 2) 連続継代可能な細胞集団の表現型に対応する細胞分画が患者末梢血中にも存在し、それらが免疫不全マウスでの生着能を持つ事。
- 3) 移植腫瘍細胞は多数の臓器に浸潤し、マウスに腫瘍死をもたらす事。

1) の知見は想定外であり、ATL がん幹細胞

のマーカーを同定する当研究課題の目的を複雑且つ困難にしている。生着した移植細胞集団の分画時に高発現を示したCCR4やCD3等の抗原発現が低下した状態で継代移植能を示す事が明らかになった。原因として、細胞分画時に混入した少数の細胞が造腫瘍性を示した可能性は、そのような表現型の細胞を多数含むコントロール群で生着あるいは継代培養が成功しなかった事から否定できる。従って、継代移植に伴い、その発現が低下したと考えられるが、そのメカニズムと意義は今後の検討課題である。少なくとも、現状では、生体内ATL細胞の中のがん幹細胞分画を特徴付けるマーカーは未だに不明である。

2) 通常のATL細胞ではCD3の発現は低下している事が知られている。一方、今回の解析ではCD3Hiの分画が生着し、且つ継代移植が可能であった。しかし、結果に記載した様に、継代と共に腫瘍細胞におけるCD3の発現は低下し、CD3Lo集団が継代可能な細胞の表面抗原の特徴となった。このため、生体内のATL細胞内のCD3Lo分画に生着能があるかどうかを検討した所、腫瘍形成に時間がかかるが、生着が可能である事は示された。現在、この腫瘍細胞が何代まで継代移植可能であるかを検討中である。

以上の知見は、いずれも従来報告されている白血病がん幹細胞の性質とは異なるものであり、その細胞学的意義と分子機構について。現在詳細に解析中である。

3) 移植マウスの臓器を病理組織学的に解析し、生着腫瘍細胞の組織分布、増殖動態を検討した。結果に記載した様な情報が得られたが、最も興味のあるがん幹細胞のNicheがどこに存在するかと言う問題にはまだアプローチ出来ていない。蛍光標識腫瘍細胞を移植した後のトレース解析が可能になれば貴重な情報が得られると期待される。

E. 結論

免疫不全マウスを用いたATL細胞移植系で、連続継代可能な細胞集団の表面抗原の解析から、移植に伴い発現動態に変化が生ずる事が明らかになり、ATLの「がん幹細胞」集団は、他

の固形癌あるいは白血病とはかなり異なる性質を持つ事が明らかになった。がん幹細胞のNicheの解析は現在進行中である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakamaki T, Fukuchi K, Nakashima H, Ariizumi H, Maeda T, Saito B, Yanagisawa K, Tomoyasu S, Homma M, Shiozawa E, Yamochi-Onizuka T, Ota H. CD20 gene deletion causes a CD20-negative relapse in diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Haematol.* 89(4): 350-355, 2012
- 2) 塩沢英輔, 本間まゆみ, 矢持淑子, 瀧本雅文, 太田秀一, 「悪性リンパ腫組織アトラス 菌状息肉症(図説)」、昭和医学会雑誌、72(1) : 94-95、2012
- 3) 塩沢英輔, 本間まゆみ, 矢持淑子, 瀧本雅文, 太田秀一, 「悪性リンパ腫組織アトラス 原発性皮膚CD30陽性T細胞増殖性疾患(図説)」、昭和医学会雑誌、72(1) : 98-99、2012
- 4) 梅村宜弘, 本間まゆみ, 塩沢英輔, 矢持淑子, 瀧本雅文, 太田秀一, 「Diffuse large B-cell lymphomaにおける細胞周期関連タンパク質発現の免疫組織化学的検討」、昭和医学会雑誌、72(1) : 108-117、2012
- 5) 塩沢英輔, 本間まゆみ, 矢持淑子, 瀧本雅文, 太田秀一, 「悪性リンパ腫組織アトラス 血管内大細胞型B細胞リンパ腫(図説)」、昭和医学会雑誌、72(2) : 209-211、2012
- 6) 塩沢英輔, 本間まゆみ, 矢持淑子, 瀧本雅文, 太田秀一, 「悪性リンパ腫組織アトラス 中枢神経系原発びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫 (図説)」、昭和医学会雑誌、72(2) : 213-215、2012
- 7) 猿田祐輔, 矢持淑子, 野呂瀬朋子、九島巳樹、瀧本雅文、太田秀一、本間まゆみ、塩沢英輔, 「炎症性皮膚疾患と鑑別を要する皮膚T細胞性リンパ腫の免疫組織化学および分子生物学的解析」、昭和医学会雑誌、72(2) : 246-258、2012
- 8) 塩沢英輔, 本間まゆみ, 矢持淑子, 瀧本雅文, 太田秀一, 「悪性リンパ腫組織アトラス 高齢者EBV陽性びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(図説)」、昭和医学会雑誌、72(3) : 319-322、2012

- 9) 塩沢英輔, 本間まゆみ, 矢持淑子, 瀧本雅文, 太田秀一、「悪性リンパ腫組織アトラス芽球形質細胞様樹状細胞腫瘍(図説)」、昭和医学会雑誌、72(3) : 323-325、2012
- 10) 塩沢英輔, 本間まゆみ, 矢持淑子, 瀧本雅文, 太田秀一、「悪性リンパ腫組織アトラス原発性滲出リンパ腫 (図説)」、昭和医学会雑誌、72(4) (In press)
- 11) 塩沢英輔, 本間まゆみ, 矢持淑子, 瀧本雅文, 太田秀一、「悪性リンパ腫組織アトラス組織球肉腫 (図説)」、昭和医学会雑誌、72(4) (In press)
- 12) 塩沢英輔, 本間まゆみ, 矢持淑子, 瀧本雅文, 太田秀一、「悪性リンパ腫組織アトラスヘアリー細胞白血病 (図説)」、72(4) (In press)
- 13) 猿田祐輔, 宇野裕和, 中田土起丈, 秋山正基, 飯島正文, 塩沢英輔, 矢持淑子、「両下肢に色素斑,紫斑を呈し,慢性色素性紫斑を疑ったCD8陽性皮膚T細胞リンパ腫の1例」、臨床皮膚科、66(10) : 801-805、2012
- 14) 石原里美、本間まゆみ、佐々木陽介、塩沢英輔、野呂瀬朋子、矢持淑子、瀧本雅文、「濾胞性リンパ腫におけるユビキチンリガーゼ Skp2の発現に関する免疫組織化学的検討」、昭和医学会雑誌、72(5) (In press)

2. 学会発表

- 1) 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”, 平成24年度東京大学医科学研究所研究成果発表会、東京大学医科学研究所、2012年5月31日-6月1日
- 2) 矢持忠徳、守田洋平、矢持淑子、佐々木陽介、渡辺信和、Sanaz Firouzi、内丸薫、宇都宮與、渡邊俊樹、「成人T細胞性白血病におけるTumor Initiating Cellの探索の試み」、第5回HTLV-1研究会・シンポジウム、東京大学医科学研究所、2012年8月26日 (2012年8月25日-8月26日)
- 3) 相良康子、井上由紀子、後藤信代、長野冬子、入田和男、清川博之、矢持忠徳、渡邊俊樹、JSPFAD、「HTLV-1感染者における産生抗体の性状解析 -プロウイルス量との関

連について」、第5回HTLV-1研究会・シンポジウム、東京大学医科学研究所、2012年8月26日 (2012年8月25日-8月26日)

- 4) 矢持忠徳、守田陽平、矢持淑子、サナズ フィルジ、佐々木陽介、渡辺信和、内丸 薫、宇都宮與、渡邊俊樹、太田 力、「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71回日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月20日 (2012年9月19日- 9月21日)
- 5) 長村蔵人、濱田和俊, 秋山正基, 飯島正文, 中牧剛, 矢持淑子. 慢性リンパ性白血病/小細胞性リンパ腫(CLL/SLL)に合併した毛包性ムチン沈着症の1例. 第75回日本皮膚科学会東京支部学術大会、京王プラザホテル、平成24年2月18,19日
- 6) 本間まゆみ, 塩沢英輔, 矢持淑子, 瀧本雅文, 太田秀一.B細胞性リンパ腫における Skp2、p27の発現に関する免疫組織化学的検討.第101回日本病理学会総会、京王プラザホテル、平成24年4月26~28日
- 7) 佐々木陽介, 岸本浩次, 北村隆司, 本間まゆみ, 野呂瀬朋子, 塩沢英輔, 矢持淑子, 九島巳樹, 光谷俊幸, 瀧本雅文. 新たな時代を担う若手技師企画による診断困難症例の検討ボジキンリンパ腫再発との鑑別を要した濾胞性リンパ腫の一例.第51回日本臨床細胞学会秋期大会、朱鷺メッセ他、平成24年11月9日

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

網羅的解析を基盤とした新規分子標的の探索

研究分担者 内丸 薫 東京大学医科学研究所附属病院 血液腫瘍内科・准教授
山岸 誠 東京大学大学院新領域創成科学研究科・特任研究員

研究協力者 小林誠一郎 東京大学医科学研究所（先端医療研究センター
分子療法分野）・助教
中野和民 東京大学大学院新領域創成科学研究科・助教

研究要旨：

ATL に対する新たな分子標的を創出する上で、ATL 検体を用いた分子レベルの詳細な解析が必須である。本研究では ATL 検体を用いた大規模解析データの解析と、遺伝子発現及びシグナル伝達に関する詳細な検討を行い、ATL 細胞の新たな分子病態の理解を進めることを目的とした。

ATL 及び HTLV-1 キャリアにおける病態進行の解析については、CD7/TSLC1 の発現パターンで細胞を分取する新たな系の構築に成功した。この系を用いて各集団における遺伝子発現レベルを検討したところ、急性型 ATL だけでなくくすぶり型や HTLV-1 キャリアに存在する感染不死化細胞の段階で遺伝子発現の異常が認められ、さらに miR-31 の発現が激減していることがわかった。

シグナル伝達系の解析では、p38 経路が NF- κ B 経路の活性化に関与していること、また NF- κ B 経路の恒常的な活性化が miR-31 の発現抑制に関わる EZH2 の発現誘導に寄与していることを明らかにした。また ATL における新たな分子異常として EVC と Helios の発現異常とその機能的役割を明らかにした。さらにレンチウイルスベクターを用いた Tax の機能解析から、Tax がエピジェネティックな異常に関わることを明らかにした。

A. 研究目的

成人 T 細胞白血病(adult T cell leukemia, ATL)は human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)の感染によって引き起こされる T 細胞性白血病/リンパ腫である。50~60 年という長い潜伏期間に HTLV-1 感染末梢血 T 細胞に複数の遺伝子異常が蓄積し腫瘍化が引き起こされる。現在日本では約 120 万人の感染者が存在し毎年約 1000 人を超える感染者が ATL を発症するが、予後は極めて不良であり、有効な治療法は未だに存在しない。今後 5 万人の感染者が予後不良の ATL を発症すると算出されており、ウイルスの根絶と白血病の予防、治療戦略の研究が必須である。HTLV-1 は世界的にみても感染者が日本に密集しており、日本から先進的な研究成果を発信すべき非常に重要な研究課題である。これまでの多くの研究成果から、HTLV-1 感染

細胞及び ATL 腫瘍細胞における恒常的な NF- κ B シグナルの活性化が腫瘍細胞の増殖、生存の鍵として機能していることが明らかであり、治療戦略を立てる上で分子レベルでの理解が急務であった。NF- κ B 活性化とその重要性は、ATL 以外にも種々の悪性リンパ腫や多発性骨髄腫、乳がんなどの多くの固形癌で報告されており、癌研究における有効な治療標的を同定する上で、異常な活性化シグナルの分子メカニズムの解析が極めて重要である。最近我々は ATL 細胞におけるマイクロ RNA(miRNA)の発現異常が NF- κ B の恒常的な活性化の原因であることを突き止めた。

miRNA は 18-25 bp の non-coding RNA で、生物学的な機能として標的遺伝子の mRNA 3'側非翻訳領域に結合することにより、その発現を負に制御することで遺伝子発現を調節している

分子である。この miRNA の発現異常が様々な悪性腫瘍において報告され、新規治療標的としての可能性が示されている。我々は ATL 患者検体を用いた網羅的 miRNA 解析により、ATL における miRNA の全体的な発現低下を明らかにした。さらに miR-31 が顕著な発現低下が NIK の過剰発現を誘導し、恒常的な NF- κ B 経路の活性化を引き起こすことを明らかにした (Yamagishi *et al.*, *Cancer Cell*, 2012)。この研究における重要な発見として、レンチウイルスベクターを用いて ATL 患者由来の腫瘍細胞へ miR-31 を導入すると、効果的にアポトーシスを誘導することがわかった。また同様の処理は健康人の末梢血単核球もしくは T 細胞に対しては効果が軽微であり、miRNA の存在量のバランスの異常が成人 T 細胞白血病細胞の生存に重要であることが示された。以上の結果は miR-31 が ATL 細胞に特異的な細胞障害性をもつことを示しており、ATL 細胞に特異的な miRNA 導入法を開発することにより ATL の新規治療法につながる可能性が示唆された。この研究は ATL における NF- κ B の活性化機序を明らかにしたと同時に、Polycomb-miRNA- NF- κ B という新たなクロストークを発見につながった。それぞれの因子が様々な遺伝子発現制御を介して生物学的活性に寄与しているが、これまで独立に機能していると考えられてきた因子が、クロストークを形成することによってより複雑なネットワークを形成していると考えられる。我々のこれまでの網羅的解析から ATL 細胞のゲノムのコピーナンバー、mRNA 発現異常、miRNA の発現異常の全体像が明らかになったが、個々の遺伝子の機能的解析は不十分であり、また新たな治療標的の創出を目指す上でさらに詳細な解析が必要である。そこで本研究では、*Cancer Cell* に報告した研究の分子レベルの理解の発展と臨床応用への検討を目的とし、以下の研究を行った。その結果、ATL 腫瘍細胞の新たな特徴を明らかにし、さらに HTLV-1 感染から腫瘍化までの変遷における新たな知見を得ることができた。

B. 研究方法

1. ATL の網羅的解析データの集約、mRNA の詳細な解析、及び pathway 解析
研究に使用した ATL 検体は JSPFAD の協力を得て利用した。miR-31 の発現レベルは Applied

Biosystems 社の TaqMan real-time PCR によって定量を行った。遺伝子発現解析は、発現アレイのデータ解析及び real-time PCR により検討を行った。Helios mRNA の発現パターンは、合成した cDNA から全長の mRNA を検出する PCR により検討を行った。発現アレイデータを用いた pathway 解析は、NCI の Pathway Interaction Database を用いた。

2. miR-31 の標的遺伝子予測と実験的検討

miR-31 の標的遺伝子の検索は、TargetScan program を用いた。上位の標的候補遺伝子に特異的なプライマーを作成し、定量実験を行った。miR-31 の過剰発現細胞はレンチウイルスベクターを用いて作成した。また miR-31 を阻害した細胞は miR-31 の antisense RNA を用いた。さらに shRNA を用いて Dicer のノックダウンを行い、上昇する mRNA の検索も行った。

3. EZH2 の発現制御機構の解析

正常休止期 T 細胞は末梢血単核球から磁気ビーズを用いて分取した。T 細胞の活性化は抗 CD3/CD28 抗体、PHA、及び PMA+Ionomycin を用いた。EZH2 の発現レベルは real-time PCR 及び Western blot によって定量を行った。また EZH2 のプロモーター活性は EZH2 のプロモーター配列を搭載した luciferase レポーターを用いた。

4. ATL 細胞におけるシグナル伝達経路と表現型の解析

p38 MAPK の阻害剤は SB203580 及び SB239063 を用いた。また GLI の阻害剤は GANT61 を用いた。ATL の細胞株は TL-Om1、MT1 を用いた。また HTLV-1 感染細胞として MT-2 及び HUT102 を用いた。ノックダウンアッセイは、標的遺伝子に特異的な shRNA を設計し、理化学研究所バイオリソースセンター三好浩之教授が開発したレンチウイルスベクターを用いて恒常的に shRNA を発現する細胞を作成し、検討を行った。細胞の生存能、増殖能は WST-8 アッセイで評価を行った。またアポトーシス細胞の検出は Annexin V の染色によって行った。NF- κ B 経路の活性化レベルは、Western blot 及び EMSA によって評価した。

5. レンチウイルスベクターを用いた Tax 導入 PBMC の解析

Tax cDNA を上記の Venus を搭載したレンチウイルスベクターに挿入し、VSV-G を用いて高濃度のレンチウイルス液を調製した。Tax の変異体についても同様のウイルスを調製した。末梢血単核球を PHA で活性化させたのち、Tax 発現レンチウイルスを感染させ、IL-2 存在化で 1 年間培養を継続した。Tax 発現細胞の割合は Venus をフローサイトメーターで検出することで行った。経時的にサンプルを保存し、遺伝子発現レベル、及びヒストンメチル化の解析を行った。

C. 研究結果

1. miR-31 の発現レベルの再検証と病態との関連について

まず本研究課題の中心となる miR-31 の発現レベルについて、ATL と正常細胞、また他の細胞種について検討を行った。miR-31 は休止期 T 細胞で発現が高く、抗原刺激やマイトジェンによる活性化により発現が若干低下することがわかった。NIK の発現が高い B 細胞では miR-31 の発現は比較的強く、さらに B 細胞リンパ腫では miR-31 の発現が減少していることも明らかになった。

ATL 検体について各病型で比較したところ、急性型では多くの検体が検出限界以下まで大きく発現が低下していた。慢性型は急性型よりも低下の度合いが小さいが、正常 T 細胞に比べて 1/100 以下の発現量であった。くすぶり型や HTLV-1 キャリアでは末梢血中に正常細胞が多く混入し、そのまま測定しても感染不活化細胞における miR-31 の発現レベルの定量が困難であった。そこで内丸らがこれまでに開発を進めてきた multi-color FACS を用いた HTLV-1 感染細胞/ATL 細胞の病態の進行の解析を進めた。この CD7/TSLC1(CADM1) の発現により HTLV-1 感染細胞/ATL 細胞を解析する系では、HTLV-1 感染細胞/ATL 細胞は TSLC1(-)/CD7(+) (=P)、TSLC1(+)/CD7(dim) (=D)、TSLC1(+)/CD7(-) (=N) の 3 つの集団に分画される。この系を用いて HTLV-1 無症候性キャリア 10 例、くすぶり型、慢性型、急性型 ATL 各 5 例の解析を行った。健常人コントロールでは TSLC1 強陽性の細胞はほとんど認められない

が、キャリア、ATL 患者では TSLC1(+) の細胞集団が出現し、これらの細胞は CD7 の発現が dim~negative に低下している (D、N)。くすぶり型から慢性型、急性型と病態が進行するに連れて、これら TSLC1(+) の集団が増加するとともにその中での D と N の比率が変化し、病態の進行とともに N が増加、急性型では多くの症例でほとんどが N の集団であった。これら D、N の集団を inverse PCR で解析すると major clone band が認められ、この集団の主体をなすのは clonal に増殖している感染細胞と考えられた。さらにキャリアのうち末血中プロウイルス量が多く、異常リンパ球が増加している症例でもこの D、N 分画は増加しており、FACS 上はくすぶり型と区別がつかない症例が見られた。これら各病型の P、D、N をソーティングし、miR-31 の発現量を検討したところ、いずれの ATL 及びキャリアにおいても TSLC1 陽性の D 及び N の集団で、すでに大幅に減少していることを見いだした。さらにこれらの分画について発現アレイ解析を行った結果、キャリアを含めて病型に関わらず D と N は同じクラスターに分類されたことから、HTLV-1 無症候性キャリアのうち、末血中プロウイルス量が高い発症ハイリスク症例の中には一部すでに ATL の腫瘍化過程を進行しているクローンが存在すること、またこれらの集団においてすでに miR-31 の発現の高度の抑制が見られることから本研究による miR-31 の delivery による治療薬はハイリスクキャリアの一部の症例に投与することにより early intervention としての発症予防に使用できる可能性を示唆し、本研究の成果が ATL の治療のみでなく発症予防に有益である可能性を示した。また興味深いことに、miR-31 が減少している感染不活化細胞では miR-31 の発現減少に寄与する EZH2 の発現がすでに上昇していることも明らかになった。このことは、腫瘍化以前の感染細胞集団においてもエピジェネティックな異常の蓄積があることを示唆している。

2. miR-31 の新規標的遺伝子の同定

miR-31 の標的遺伝子は、我々が同定した MAP3K14 (NIK) の他に、RhoA や E2F ファミリーなどの様々な遺伝子が同定されている。

miRNA は遺伝子発現のブレーキとして機能するため、重要な標的 mRNA は細胞種によって異なると考えられ、ATL 細胞における miR-31 の発現減少が招く遺伝子発現異常の実態は、実験的に検証する必要がある。

まず miR-31 の標的候補の絞り込みを Targetscan を用いて行った。次に予測の上位に位置する遺伝子群について、miR-31 の導入、もしくは miR-31 の阻害によって変動する遺伝子を real-time PCR で決定した。その結果、NIK の他に、PKC ϵ という遺伝子が ATL 細胞において miR-31 の標的となることが分かった。PKC ϵ の発現は Dicer のノックダウンによっても上昇することから、miRNA の制御されていることが示唆される。ATL 細胞では miR-31 の発現が減少することにより、PKC ϵ の発現が上昇し、細胞に影響を与えることが考えられる。現在 ATL 細胞における PKC ϵ の役割について検討を進めている。

3. miR-31 の発現を抑制する EZH2 の過剰発現の分子メカニズム

miR-31 の発現を負に制御する EZH2 は多くのがん細胞で過剰に発現しており、細胞の増殖、生存、転移、悪性化に関わる。一方で正常細胞の分化や幹細胞性維持においても中心的な役割を果たす重要な因子である。EZH2 の過剰発現は主に RNA レベルで観察されるが、EZH2 のプロモーター上には NF- κ B を含む様々な転写因子の結合配列があり、実際の腫瘍細胞では複雑な転写活性化が背景にあると考えられる。

まず健康人末梢血から磁気ビーズを用いて休止期 T 細胞を分取し、抗 CD3/CD28 抗体、PHA、PMA+Ionomycin を用いて活性化を誘導し、遺伝子発現レベルを検討した。その結果、EZH2 の発現は T 細胞受容体からの活性化シグナルによって劇的に誘導されることがわかった。さらに阻害剤の併用実験から、NF- κ B 及び Ca⁺シグナルが EZH2 の誘導に重要であることが示唆された。一方で TNF- α 刺激による NF- κ B 経路の単独の活性化では EZH2 の発現が誘導されなかったことから、EZH2 の発現には複雑なシグナル活性化が一定レベル必要であり、NF- κ B の強烈的な活性化がそれを増強していると考えられた。そこで NF- κ B の恒常的な活性化が見られる

様々な ATL 細胞株に対して NF- κ B 阻害剤を処理したところ、EZH2 の発現レベルが低下することがわかった。従って ATL 細胞では NF- κ B の強烈的な活性化が EZH2 の過剰発現に寄与していることが示唆された。現在 ATL 検体を用いた検討と、詳細な分子メカニズムの検討を進めている。

4. Pathway 解析を用いた ATL 細胞の新たな分子異常の解明-ATL細胞の生存シグナルに与える p38 経路の役割の検討-

ATL 細胞で観察される特徴的な遺伝子発現異常から更なる特徴を見いだすため、ATL 検体の大規模発現アレイデータについて NCI database を用いて Pathway 解析を行った。その結果、細胞の生存や増殖に関わる様々なシグナル伝達系の異常の存在が明らかになった。その中で特に異常を示したのが p38 MAPK 経路であった。p38 経路は固形癌においてはがん抑制因子として機能しているが、リンパ球細胞における活性化が細胞にどのような影響を与えるかは不明な点が多い。そこで ATL 細胞の生存に与える影響を調べるために、p38 のリン酸化を阻害する 2 種類の阻害剤を用いて ATL 由来細胞株及び ATL 患者由来細胞の生存率を検討したところ、腫瘍細胞の生存率が著しく低下する事が分かった。さらにこの細胞死の詳細を検討したところ、p38 のリン酸化レベルが低下することで ATL 細胞に強力なアポトーシスを誘導することがわかった。そこでシグナル伝達経路の解析したところ、p38 阻害により、NF- κ B の活性化レベルが大きく低下することがわかった。以上のことから、ATL 細胞においては様々な遺伝子発現異常によって誘導される p38 のリン酸化が NF- κ B 経路の活性化を誘導し、アポトーシス抵抗性の獲得に寄与していることが明らかになった。

5. ATL 細胞における EVC 遺伝子の過剰発現とシグナル伝達系への影響の解析

ATL 検体の網羅的発現解析から、正常 T 細胞に比べて著しく過剰に発現している新規遺伝子が複数明らかになった。その中でも EVC1 及び EVC2 は正常 T 細胞に比べて 10~100 倍過剰に発現しており、ATL 細胞の特徴に寄与していると

考えられた。また EVC の発現は Tax によっても誘導されることがわかった。

EVC は元々 Hedgehog 経路の活性化に関与することが示されているが、その分子メカニズムは不明な点が多く、また T 細胞においては通常は EVC の発現が低いいためその機能も不明であった。そこで EVC1 及び EVC2 をノックダウンする shRNA を設計し、ATL 細胞に対して処理したところ、Hedgehog 経路に応答する遺伝子発現が低下し、さらに細胞にアポトーシスを引き起こすことがわかった。さらに Hedgehog 経路の転写因子である GLI の阻害剤を処理することにより ATL 患者由来細胞がアポトーシスを起こすことがわかった。以上のことから、ATL 細胞における EVC の過剰発現は、Hedgehog 経路の活性化を介して腫瘍細胞の生存に寄与していることが示唆された。EVC の発現量は ATL において非常に高く、現在腫瘍細胞マーカーとしての利用可能性を検討している。

6. ATL 細胞における Helios のスプライシング異常と細胞へ影響の解析

腫瘍細胞における遺伝子発現は、発現レベルだけでなく、スプライシング異常による mRNA 構造の異常が散見される。我々は ATL 検体 168 例のコピーナンバー解析から明らかになった Helios 遺伝子欠損の意義を検討する過程で、ATL 細胞において Helios mRNA のスプライシング制御が高頻度に異常を示すことを明らかにした。これは各病型を含む 37 症例中 32 例 (86.4%) と非常に高頻度に認められ、ヘテロな ATL 細胞に共通する重要な分子背景の一つであると考えられた。またゲノムの欠損は急性型及びリンパ腫型でのみ検出されており、progression に重要なゲノム異常だと考えられた。実験的に検証を行った結果、ATL で観察される異常アイソフォームは DNA 結合ドメインを大きく欠損しており、転写因子として機能しないことがわかった。さらに二量体化能を有しているために正常の Helios や Ikaros に対してもドミナントネガティブとして働き、ATL 細胞では Helios による正常な遺伝子制御が損なわれていることを明らかにした(現在 revision 中)。

Helios ファミリーは Ikaros 転写因子などと共に血球細胞の増殖や分化の制御に重要な因子で

あり、マウスを使った解析から Notch pathway の抑制因子として働くことが報告されている。Helios が抑制する遺伝子には Hes1 などの T 細胞の増殖に関わる遺伝子が多く含まれており、従って Helios の機能異常は細胞増殖に影響を与えると考えられた。そこで Helios のノックダウンもしくは ATL 型 Helios の過剰発現を Jurkat 細胞に誘導すると、細胞増殖能が上昇することがわかった。さらにこれらの細胞の遺伝子発現を網羅的に解析し、Helios の下流で制御される遺伝子の同定に成功した。Pathway の結果から、T 細胞の増殖やホーミングに重要な S1P pathway の活性化に関わっていることがわかった。

7. 宿主エピゲノムに与える HTLV-1 Tax の影響の解析

我々がこれまでに行った ATL 検体の解析から、ATL 細胞の背景にはエピジェネティックな異常の蓄積があることは明らかである。特に Polycomb ファミリーによる遺伝子発現異常は miR-31 を含む重要な遺伝子群の発現抑制を介して細胞に重大な影響を与えていると考えられる。また上記のように、HTLV-1 感染不死化細胞においても miR-31 の発現が減少している事実は、感染細胞の段階で既に Polycomb 依存的なエピジェネティックな異常の蓄積が始まっていることが示唆している。

我々はこれまでに HTLV-1 Tax が宿主エピジェネティック因子群と相互作用し、影響を与える事を明らかにしてきた。Polycomb ファミリーの活性中心である EZH2 についても SET ドメインを介して Tax と結合することを観察している。しかし自立増殖する細胞株を用いた実験系ではエピジェネティックへ与える影響の解析が困難であった。そこで、Tax の恒常的な発現を誘導するレンチウイルスベクターを構築し、健康者 PBMC 及び CD4+T 細胞への導入実験を行った。Tax 導入後、ベクターにコードされた Venus タンパク質を FACS で検出することにより Tax 発現細胞をモニターした。さらに NF- κ B や CREB を活性化できない変異体 Tax を発現するベクターの同時に作成し、比較検討を行った。その結果、野生型 Tax のみが効率よく PBMC を不死化したことから、Tax が宿主に与える初期

のイベントにはNF- κ BとCREB経路の活性化が必須であることが分かった。

Tax 導入から継時的にサンプリングを行い、1年以上培養した結果、最終的に得られた不死化細胞では、H3K27トリメチル化で抑制されることが知られているp21の発現が正常T細胞に比べて著しく減少していることが分かった。さらにmiR-31の発現抑制も培養後期に観察され、エピジェネティックな異常が蓄積していることが示唆された。またこの細胞はEZH2の阻害剤であるDZNep処理によってアポトーシスを起こすことから、Polycomb依存的な生存が獲得されていることが明らかになった。

D. 考察

がん研究において、miRNAの発現異常とその機能的意義が次々と発見がされている。miR-31の発現減少ははじめに乳がんの転移能に関わることが報告され、その後ATLを含む様々な腫瘍細胞での発現減少が報告され、現在ではmiR-31はがん抑制性miRNAとして認識され始めている。miR-31の標的として多くの遺伝子が報告されており、ATLにおけるmiR-31の発現減少はNIKを始めとする様々に遺伝子発現レベルに影響し、腫瘍細胞の特徴に寄与していると考えられる。また我々がATLで明らかにしたPolycombによるエピジェネティックなmiR-31抑制メカニズムが、乳がん、前立腺がん、メラノーマなどで保存されていることが次々と報告されており、我々が提案したPolycomb-miR-31-NF- κ Bという新しい概念が広く適用されることも示唆されている。

本年度の大きな成果として、表面マーカーを用いたATL及びHTLV-1キャリアの細胞集団解析から、HTLV-1感染後、腫瘍化以前の不死化細胞の段階でmiR-31の発現が著しく減少していることが明らかとなった。これまでの多数例の検討においてもmiR-31の発現減少は例外がなく、分子レベルでのATL細胞の絶対的な特徴として位置づけられる。このことは、本申請研究の課題であるmiR-31のデリバリーを考える上で、有効な対象として急性型ATLだけでなくすぶり型やHTLV-1キャリア中に存在する感染細胞もmiR-31によって選択的に叩く事ができると期待される。またmiR-31の発現減

少は多くのがんの共通する特徴であるため、より拡大した適用も可能性がある。

ATLにおいて、miR-31と並んで発現異常を示す重要な遺伝子としてEZH2が挙げられる。PolycombによるH3K27のトリメチル化酵素として必須であり、治療標的として古くから注目されている。しかしながらその過剰発現の分子機構は、ある特定のがんにおいて解析されるのみであり、ATLや他のリンパ腫におけるEZH2の過剰発現の分子メカニズムは不明であった。本研究の結果、リンパ球特異的受容体からの活性化刺激によりEZH2の転写レベルが亢進することが明らかになった。ATL細胞ではNF- κ Bの恒常的な活性化がEZH2の過剰発現に寄与しており、NF- κ Bの阻害によって効果的にEZH2の発現を抑制することができることがわかった。このことは、①EZH2によるmiR-31の発現抑制、②miR-31の減少によるNIKの発現亢進とNF- κ Bの活性化、③NF- κ Bの活性化によるEZH2の発現誘導、というFeed-forward loopの存在を示唆する。さらにこれらの要素はそれぞれが独立した重要な働きを持っており、ATL細胞におけるこれらの異常の恒常性が細胞の生存、増殖、浸潤能に寄与していると考えられる。中心要素であるmiR-31を導入することにより、NF- κ Bを抑制するだけでなく、このFeed-forward loopによる悪循環を効果的に止めることが可能かもしれない。また重要な事は、これらの相互関係のいずれかが異常をきたすと、すぐに永続的にシグナルが破綻するわけではなく、他の様々なシグナル伝達系の異常とのクロストークもATL細胞らしさを規定する重要な要因であると考えられる。

Taxによるエピジェネティックな異常の誘導は、HTLV-1感染とATL腫瘍細胞の特徴をつなぐ重要な発見であった。エピジェネティックな異常の実態は細胞株を用いた検討だけでは明らかにするのが困難であり、明らかにされていなかった。Tax導入によって維持されるエピジェネティックな異常蓄積のモデルは、感染細胞のprogressionを検討する上で有用であると考えられる。miR-31の発現減少の誘導メカニズムだけでなく、TaxによるNF- κ B活性化を介したEZH2の過剰発現誘導についても新たな情報を得る事ができると考えられる。ウイルスという外来

性因子が宿主のエピジェネティックに影響を与える実験事実は学術的にも重要な発見であった。

本年度は miR-31 関連だけでなく、ATL の網羅的な統合解析から、p38 経路の活性化とその下流のイベントが見いだされ、さらに EVC と Helios という病態に関与する重要な遺伝子の発現異常が明らかになった。実験的検証の結果、EVC の過剰発現は Hedgehog 経路を活性化し、Helios は Notch pathway や S1P pathway の活性化に関わり、どちらも細胞増殖や生存に関わることが示唆された。いずれの経路も ATL 研究においてはこれまでに報告がなく、新たな治療標的として有用であると考えられる。NF- κ B 経路の活性化との関連も含めて今後さらに検討する必要がある。

ATL 検体を用いた詳細な分子レベルの解析から、miR-31 の発現異常に加え、EZH2 を介したエピジェネティックな異常や、シグナル伝達系を活性化させる様々な遺伝子発現異常が明らかになった。これらは HTLV-1 感染から腫瘍化への変遷についても重要であり、さらなる検討を進めている予定である。

E. 結論

ATL 細胞は miR-31 を始めとする様々な遺伝子発現異常が特徴であり、これらを標的にすることによって革新的な治療法の開発につながると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Asanuma S, Yamagishi M, Kawanami K, Nakano K, Sato-Otsubo A, Muto S, Sanada M, Yamochi T, Kobayashi S, Utsunomiya A, Iwanaga M, Yamaguchi K, Uchimaru K, Ogawa S, Watanabe T. Adult T-cell leukemia cells are characterized by abnormalities of Helios expression that promotes T-cell growth. *Cancer Sci* 104(5), 32pp, 2013, in press (doi: 10.1111/cas.12181)
- 2) Kobayashi S, Tian Y, Ohno N, Yuji K, Ishigaki T, Isobe M, Ohfuchi-Tsuda M, Oyaizu N, Watanabe E, Watanabe N, Tani K, Tojo A and Uchimaru K. The CD3 versus CD7 plot in multicolor flow cytometry reflects progression

of disease stage in patients infected with HTLV-I. *PLoS One* 8: e53728, doi:10.1371/journal.pone.0053728, 2013

- 3) Yamagishi M, Watanabe T. New Paradigm of T cell Signaling: Learning from Malignancies (Review Article). *J Clin Cell Immunol*. S12:007, 15pp, 2012.
- 4) Yamagishi M, Watanabe T. Molecular Hallmarks of Adult T Cell Leukemia (Review Article). *Front Microbiol*. 3: 334. Sep. 2012.

(総説)

- 1) 山岸誠、渡邊俊樹、特集/血液疾患におけるエピゲノム異常と治療「ATL 発症におけるエピゲノム解析の進歩 (The State of the Art in Epigenomics of Adult T Cell Leukemia)」、血液内科、66(2)、2013年2月
- 2) 内丸 薫 「成人T細胞白血病・リンパ腫」成人病と生活習慣病 42: 743-747, 2012
- 3) 山岸誠、Person 人と研究「成人 T 細胞白血病の分子レベルの全体像と、Polycomb-miR-31-NF- κ B 経路の異常」、Trends in Hematological Malignancies、4(3) : 16-19、Dec. 2012.
- 4) 山岸誠、渡邊俊樹、特集 : microRNA の発現制御の異常と疾患「成人 T 細胞白血病(ATL)における microRNA の発現異常」、細胞、44(10) : 15-22、2012年9月
- 5) 山岸誠、渡邊俊樹、特集 : ATL の基礎と臨床「ATL 細胞のゲノム エピゲノム異常と発現異常」、細胞、44(8) : 18-22、2012年7月
- 6) 山岸誠、渡邊俊樹、総説「2.HTLV-1 感染症と miRNA」、ウイルス、62(1) : 9-18、2012年6月

2. 学会発表

- 1) 山岸誠、中野和民、宇都宮與、山口一成、内丸薫、小川誠司、渡邊俊樹、「成人T細胞白血病から明らかになった新たなクロストーク : Polycomb-miR-31-NF- κ B経路の異常とがん」、平成24年度東京大学医科学研究所研究成果発表会、東京大学医科学研究所、2012年5月31日-6月1日 (ポスター発表)
- 2) 小林誠一郎、中野和民、渡辺恵理、石垣知寛、大野伸広、渡辺信和、東條有伸、内丸薫 : 患者検体を用いたCD7とTSLC1/CADM1のFACS解析はATLの多段階発癌を反映す

- る 第1回ATL シンポジウム 東京 2012
- 3) 石垣知寛、小林誠一郎、大野伸広、渡辺恵理、田野崎隆二、渡辺信和、東條有伸、内丸薫：TSLC1/CD7を用いた造血細胞移植後のATL細胞のモニタリング 第5回HTLV-1研究会 2012 東京
 - 4) 矢持忠徳、守田洋平、矢持淑子、佐々木陽介、渡辺信和、Sanaz Firouzi、内丸薫、宇都宮與、渡邊俊樹：成人T細胞白血病における tumor initiating cell の探索の試み 第5回HTLV-1研究会 2012 東京
 - 5) 大野伸広、田野崎隆二、小林誠一郎、石垣知寛、渡辺信和、内丸薫：同種造血幹細胞移植を見据えたATLの治療戦略：その後方視的解析 第5回HTLV-1研究会 2012 東京
 - 6) 笹島悟史、中野和民、内丸薫、渡邊俊樹：成人T細胞白血病(ATL)における新規TIAM2変異体の同定と遺伝子発現の解析 第5回HTLV-1研究会 2012 東京
 - 7) 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タンパク質TaxとPolycombタンパク質との新規相互作用がT細胞に与える影響の解析 第5回HTLV-1研究会 2012 東京
 - 8) 山岸誠、渡邊俊樹、「多機能性分子miR-31の発現低下とがん関連シグナル伝達」、第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月20日 (2012年9月19日—9月21日)
 - 9) Kobayashi S, Watanabe E, Ishigaki T, Ohno N, Yuji K, Tsukada Y, Ohmoto A, Shimada N, Watanabe N, Tojo A, and Uchimaru K. CD7 vs CADM1 in FACS reflects multi-step oncogenesis of ATL and discriminates HTLV-1 infected cells. 第74回日本血液学会学術集会 2012 京都国際会議場、2012年10月19日 (2012年10月19日—10月21日)
 - 10) 石垣知寛、小林 誠一郎、大野伸広、田野崎隆二、渡辺信和、内丸薫、東條有伸、中内啓光: Monitoring ATL cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with CADM1 and CD7. 第74回日本血液学会学術集会 2012 京都
 - 11) 大野伸広、小林誠一郎、渡辺信和、石垣知寛、湯地晃一郎、東條有伸、内丸薫: CD3とCD7の展開による急性型ATL細胞の同定:治療後のCD3dimCD7(-)分画のクローナリティ解析第74回日本血液学会学術集会 2012 京都
 - 12) Yamagishi M, Takahashi R, Nakano K, Asanuma S, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, Ogawa S, Watanabe T, “Molecular hallmarks of adult T cell leukemia: miRNA epigenetics and emerging signaling abnormalities”, 第74回日本血液学会学術集会、京都国際会議場、2012年10月19日 (2012年10月19日—10月21日)
 - 13) Yamagishi M, Katano H, Nakano K, Ota Y, Hishima T, Okada S, Watanabe T, “miRNA signature and its functional involvement in aggressiveness of diffuse large B cell lymphoma”, 第74回日本血液学会学術集会、京都国際会議場、2012年10月20日 (2012年10月19日—10月21日)
 - 14) Asanuma S, Nakano K, Yamagishi M, Ogawa S, Yamaguchi K, Utsunomiya A, Watanabe T, “Aberrantly spliced Helios variants in ATL cells induce T cell proliferation”, 第74回日本血液学会学術集会、京都国際会議場、2012年10月20日 (2012年10月19日—10月21日)
 - 15) 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タンパク質TaxはPolycombタンパク質EZH2との相互作用を介してエピジェネティクスの脱制御を誘導する」、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪国際会議場、2012年11月14日 (2012年11月13日—11月15日)
- 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

網羅的解析を基盤とした新規分子標的の探索

研究分担者 中内 啓光 東京大学大学院医学系研究科・教授
研究協力者 渡辺 信和 東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター・
病態解析領域・特任准教授
石垣 知寛 東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター・
クリニカルリサーチフェロー

研究要旨：

医学の進歩とともに血液腫瘍に対する化学療法は進歩してきた。しかし、血液腫瘍に対し化学療法を施行し、完全寛解に至った場合においても、その後再発する場面に直面することは決して少なくはない。血液腫瘍は均一な細胞集団と思われてきたが、現在では癌幹細胞 (Cancer Stem Cell、以下 CSC) を頂点としたヒエラルキーを持った heterogeneous な集団と考えられている。特に、成人 T 細胞白血病(ATL)は、抗癌剤治療に抵抗性の難治疾患であるが、治療抵抗性の原因の一つと疑われている CSC はいまだに同定できていない。また従来の研究では、CD4 陽性細胞全体の解析となっていることが多く、ATL 細胞に限定して詳しく細胞表面抗原を解析した研究はほとんどない。

本研究では、従来の CD4 ゲーティング法より詳細な、CD4+CD7N ゲーティング法を用いて、ATL 細胞の細胞表面抗原を網羅的に解析することにより、ATL 細胞の表面抗原について詳細に調べ、治療抵抗性の原因の一つと疑われている CSC の同定や新たな診断法の確立を目指し、将来的には ATL に対するよりよい治療法の開発につなげることを目標としている。

A. 研究目的

ATL は、レトロウイルスであるヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) が原因となって発症する末梢性 T 細胞リンパ腫 (PTCL) である。PTCL は非ホジキンリンパ腫の中で予後不良の疾患であるが、急性型 ATL はその中で最も予後不良の疾患である。

急性型 ATL には mLSG15 療法等の複数の抗癌剤を組み合わせた多剤併用化学療法が行われる。しかし、多剤併用化学療法にて治療強度を増しているため、重症感染症や骨髄抑制をはじめとした副作用もより一層強く出現する。また、治療の奏効率も低く、早急な診断・革新的治療法の開発が急務である。抗 CCR4 抗体 (Mogamulizumab) に代表されるような、ATL 細胞で高率に発現しているような細胞表面抗原

に対する新たな分子標的療法の開発も必要である。さらには、癌幹細胞 (Cancer Stem Cell、以下 CSC) 特異的な細胞表面抗原に対する新たな分子標的療法の開発も期待される。

しかし、急性型 ATL の細胞表面抗原を詳細に解析した研究は極めて少なく、また、大部分の研究は CD4 陽性細胞を対象としており、健全な CD4 陽性細胞も評価対象に含まれ、ATL 腫瘍細胞に限局した研究ではない。

そのため、我々は、急性型 ATL 患者の末梢血検体を用い、より細かなゲーティングをした上で、より詳細に、ATL 細胞における細胞表面抗原の網羅的解析をおこなった。

B. 研究方法

1) 患者検体の採取及び倫理面への配慮

東京大学医科学研究所附属病院に入院し、下山分類により急性型 ATL と診断された患者 3 名、ならびに比較対象として健常人 2 名より末梢血を採取（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、ならびに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。

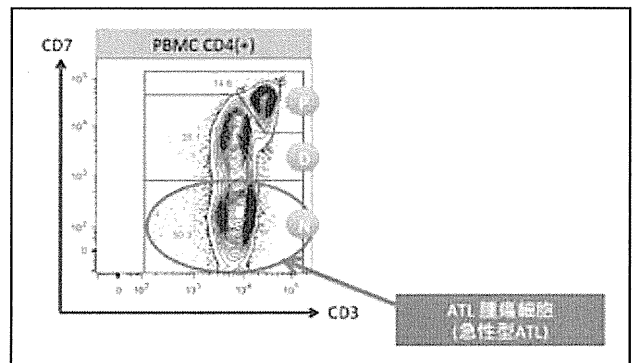
2) フローサイトメーターによる ATL 患者細胞ならびに健常人細胞における細胞表面抗原の網羅的解析

患者検体ならびに健常人検体から、比重遠心法（Ficoll-Paque 法）を用いて単核細胞分画を分離した。Ice-cold PBS（Sigma）で細胞を洗浄後、抗ヒト CD3 抗体（APC-Cy7 標識 / BD Pharmingen）、抗ヒト CD4 抗体（Pacific Blue 標識 / BioLegend）、抗ヒト CD7 抗体（APC 標識 / eBioScience）あるいは抗ヒト CD7 抗体（PE 標識 / BD Pharmingen）、抗ヒト CD14 抗体（Pacific Orange 標識 / CALTAG）を用いて染色した。これらの他に、細胞系マーカー（lineage marker）・活性化 T 細胞マーカー・ケモカインレセプター・細胞接着因子など 103 の抗原（FITC 標識、PerCP-Cy5.5 標識、PE-Cy7 標識、PE 標識）を各々加えて染色した。評価する細胞表面抗原に対する抗体が PE 標識である場合は APC 標識の抗ヒト CD7 抗体を、評価する細胞表面抗原に対する抗体が APC 標識である場合は PE 標識の抗ヒト CD7 抗体を用いた。4℃にて 20 分インキュベート後、Ice-cold PBS にて細胞を 1 回染色し、propidium iodide (PI) を添加した PBS に細胞を懸濁し、マルチカラーフローサイトメーター FACS Aria² (Beckton Dickinson 社) にて測定し、解析用ソフトウェア FlowJo (Tree Star 社) を用いて解析した。各評価抗原に対しては、適切なアイソタイプコントロールを別途用意し、陰性コントロールとした。

3) ATL 腫瘍細胞に限局して解析する方法

ATL における CSC が未だに同定できない理由の一つは、大部分の研究が依然として CD4 陽性分画を対象としていることにあると考えられる。CD4 陽性分画には ATL 腫瘍細胞以外にも正常なリンパ球も含まれているため、ATL 細胞を詳細に解析するためにはより正確に ATL 細胞を同定する必要がある。我々は、東京大学医科学研究所附属病院 血液腫瘍内科と共同研究のもと、ATL における CD4 陽性細胞が、CD3 ならびに CD7 を軸とした展開により、CD3positive/CD7positive (CD7P)、CD3dim/CD7dim (CD7D)、CD3dim/CD7negative (CD7N) の 3 つの分画に分類できることを発見した（図 1）。

<図 1>



さらに、TCR Vβ レパトアや inverse PCR 等を用いたクローナリティー解析により、急性型 ATL において ATL 腫瘍細胞は CD7N の分画に高度に濃縮されることをすでに報告している。TCR Vβ レパトアを用いた解析からは、CD7N における腫瘍細胞の占める割合はほぼ 100% であり、急性型 ATL においては、末梢血中の腫瘍細胞と CD7N 細胞はほぼ同義であるといえる。

従って、この方法を用いて、ATL 腫瘍細胞に限局して各細胞表面抗原の解析をおこなった。具体的には、FSC-Area/PI により死細胞を除去し、FSC-Width/FSC-Area ならびに SSC-Width/SSC-Area によりダブレットを除去し、CD14/SSC-Area にて単球を除去した上で、CD4/CD3 展開にて CD4 陽性細胞を選択した。さらに CD4 陽性細胞を図 1 のとおり CD7 ならびに CD3 にて展開し、CD3dim/CD7negative の領