

**厚生労働科学研究費補助金  
(がん対策推進総合研究事業(革新的がん医療実用化研究事業))  
分担研究報告書**

**フローサイトメーターによるATL細胞、免疫細胞、および  
HLA-A発現の同時解析に関する研究**

**研究分担者 渡辺信和 東京大学医科学研究所 特任准教授**

**研究要旨**

我々は成人 T 細胞白血病 (ATL) に対する樹状細胞療法の臨床試験 (ATL-DC1-L1) において、フローサイトメーター (FCM) を使用した ATL 細胞と制御性 T 細胞 (Treg) の解析を行ない、治療前後の ATL 細胞と Treg 動態のモニタリングに成功した。これら先行研究の結果を踏まえ、今年度は新しい樹状細胞療法 (ATL-DC1-101) における ATL 細胞、Treg、末梢血リンパ球、および HLA-A 発現をより詳細に解析するマルチカラーの染色組合せを考案した。健常人血を用いて一部の染色方法で予備実験を行ない、Treg における表面マーカー、および Foxp3 や CTLA-4 など細胞内機能分子の同時解析が可能であることが示された。FCM を使用した本解析システムは、ATL-DC1-101 における病態のモニタリングとメカニズムの解明の手段として、有用なツールとなることが期待される。

**A. 研究目的**

ATL-DC1-101 において ATL 細胞、Treg、末梢血リンパ球および HLA-A 発現レベルをより詳細に解析するマルチカラーFACS 解析システムを確立し、樹状細胞療法における病態のモニタリングとメカニズムの解明を目指す。

**B. 研究方法**

先行研究の結果を踏まえ、今年度は新しい樹状細胞療法 (ATL-DC1-101) におけるマルチカラーの染色組合せを考案した。

また、一部の染色方法については健常人末梢血を使用し、目的とする解析が実施可能であるのか検証した。

**(倫理面への配慮)**

平成 26 年 12 月までの時点で、ATL-DC1-101 の患者登録は行なわれなかった。したがって、今回の予備実験では、健常人ボランティアからの末梢血検体を使用した。解析結果は内部コントロールとして、学会や論文での発表は行なわない。

**C. 研究結果**

副次評価項目として「CD4陽性CD25陽性Foxp3陽性細胞数」と「末梢血リンパ球表面マーカー」の解析を、付随研究として「HLA-A発現」を解析するための蛍光標識抗体の組合せを考案した。

1. 副次評価項目

1) 目的・意義

CD4陽性CD25陽性Foxp3陽性細胞数

ATL細胞は、免疫抑制機能を持つTregのフェノタイプや機能を持つことが報告されている。また、一般にがん患者ではTreg活性が亢進し、がんに対する免疫反応を抑制することが知られている。したがって、本臨床試験においては、治療効果判定のためのATL細胞の検出に加え、ATL細胞以外のTregフェノタイプを判別して解析する。また、Tregフェノタイプが真のTregであるのか確認する目的で、細胞内Foxp3とCTLA-4も同時に解析する。これらの解析により、免疫療法の評価判定とTreg動態を明らかにする。

末梢血リンパ球表面マーカー

ポテリジオ投与やDC療法前後の末梢血免疫細胞を測定し、これらの治療に伴う影響をモニタリングする。

2) 染色方法

CD4陽性CD25陽性Foxp3陽性細胞数

末梢血単核細胞をCD3、CD4、CD7、CD14、CD25、CD45RA、CD127、CCR4、TSLC-1、Foxp3、および CTLA-4に対する蛍光標識抗体の組合せで染色する (表1、Stain 1)。

末梢血リンパ球表面マーカー

T細胞およびNK細胞関連マーカーとして、末梢血単核細胞をCD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD14、CD16、CD25、CD56、CD235a、

およびTSLC-1に対する蛍光標識抗体の組合せで染色する(表1、Stain 2)。

また、B細胞および造血幹・前駆細胞関連マーカーとして、末梢血単核細胞をCD3、CD10、CD11c、CD14、CD19、CD20、CD34、CD45、およびCD235aに対する蛍光標識抗体の組合せで染色する(表1、Stain 3)。

## 2. 付随研究

### 1) 目的・意義

樹状細胞(DC)療法では、DC表面上のHLA-A\*02:01、HLA-A\*11:01、あるいはHLA-A\*24:02にTax由来ペプチドを結合させて患者に投与するが、ATL細胞表面のこれらのHLAがダウンレギュレーションして免疫機構からエスケープする可能性もある。よって、ATL細胞表面の当該HLAの発現レベルも解析する。

### 2) 染色方法

末梢血単核細胞をCD3、CD4、CD7、CD14、CD235a、HLA-2、HLA-A9、HLA-A11、およびTSLC-1に対する蛍光標識抗体の組合せで染色する(表1、Stain 4)。

## 3. 検体採取ポイント

スクリーニング(Day -28 ~ Day -14)、Day -7、治療期間(ATL-DC-101投与0週目、2週目、4週目)、後観察期間(6週目、8週目)、追跡調査(24週目までは4週間毎に来院、24週目以降は8週間毎に来院)の各ポイントで採血する(図1)。スクリーニング期間からDC療法後2年間までの間でトータル21回、147 mlの採血量となる。Day -7では「末梢血リンパ球表面マーカー」解析のみ行ない、「Treg解析」は行なわない。中止となった場合は、中止時の採血を行なう。

## 4. 検体採取法

EDTA添加、静脈血採血。

## 5. 検体量

7 ml。

## 6. 搬送法(温度、搬送時間制限)

常温の宅急便で送付する。採血後24時間以内に解析を開始する。

## 7. 検体管理・保存条件

必要と認められた場合はATL細胞フェノタイプをソーティングして、医科研の保存施設において液体窒素に凍結保存する。

## 8. 報告所用日数

検体受け取り後3日以内に、末廣陽子医師にメールでご報告する。

## 9. 責任者および検査機関

渡辺信和

東京大学医科学研究所 臨床検体専用FACSコアラボラトリー(臨床FACSコアラボ、1号館2階)

〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1

Phone: 03-5449-5765、Fax: 03-5449-5750、Mail: nwatanab@ims.u-tokyo.ac.jp

## 10. 予備実験

健常人の末梢血を使用し、表1のStain 1の染色組合せで細胞を染色した。健常人血であるため、ATL細胞マーカーであるCD7とTSLC-1による染色は行なわなかった。

一般に活性のあるTreg分画と見なされているのは、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞のFoxp3<sup>+</sup>CD45RRA<sup>-</sup>分画(青のドット)である。これらの活性型Treg分画はCD25、CCR4、およびCTLA-4が陽性に染まり、活性型のTregとして一致する所見が得られた。

## D. 考察

平成26年12月の時点で、本治験はまだ患者登録が行なわれていないことから、本年度はフローサイトメトリー解析における蛍光標識抗体の組み合わせを考案するに留まった。

Tregの解析方法に関しては、今だに多くの相反する意見があり、フローサイトメトリー解析のみで真のTregを同定することは困難が伴う。しかしながら、ATL細胞と正常CD4<sup>+</sup>T細胞を判別した上で、Treg活性の本質につながるFoxp3とCTLA-4を解析する我々の方法は、現時点で可能な最善の解析方法と思われる。

## E. 結論

FCMを使用した本解析システムは、ATL-DC1-101における病態のモニタリングとメカニズムの解明の手段として、有用なツールとなることが期待される。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Ishigaki T, Zaike Y, Nojima M, Kobayashi S, Ohno N, Uchimaru K, Tojo A, Nakauchi H, Watanabe N. Quantification of adult T-cell leukemia/lymphoma cells using simple four-color flow cytometry. Clin Chem Lab Med. 53(1):85-93,2015
2. Kobayashi S, Nakano K, Watanabe E, Ishigaki T, Ohno N, Yuji K, Oyaizu N, Asanuma S, Yamagishi M, Yamochi T, Watanabe N, Tojo A, Watanabe T, Uchimaru K. CADM1 expression and stepwise downregulation of CD7 are

closely associated with clonal expansion of HTLV-I-infected cells in adult t-cell leukemia/lymphoma. Clin Cancer Res. 20(11): 2851-2861, 2014.

## 2. 総説と著書

1. 佐藤奈津子、渡辺恵理、石垣知寛、渡辺信和：BD FACS™を用いたマルチカラー解析による ATL 患者のモニタリング（著書）、BD Science Avanzato、Vol. 9、1-8、2014。
2. 渡辺恵理、佐藤奈津子、渡辺信和：臨床への応用 -患者の病態をリアルタイムで可視化する-（著書）直伝！フローサイトメトリー（実験医学別冊、中内啓光監修・清田純編集、羊土社）110-121、2014。

## 3. 学会発表

1. 渡辺恵理、佐藤奈津子、末廣陽子、崔日承、末廣陽子、鵜池直邦、渡辺信和：12 カラー・フローサイトメトリーによる ATL に対する樹状細胞療法後の ATL 細胞と免疫細胞の同時解析、第 76 回日本血液学会、ポスター発表、2014 年 11 月 1 日（大阪国際会議場、大阪）
2. Ishigaki T, Kobayashi S, Ohno N, Ota Y, Watanabe N, Tojo A, Nakauchi H, Uchimaru K. Establishment of a stroma-dependent ATL cell-line and analysis of its proliferation in vivo. Oral, The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Nov 1, 2014, Osaka.
3. 佐藤奈津子、渡辺信和、渡辺恵理、崔日承、鵜池直邦：キメリズム解析・HLA-Flow 法による臍帯血移植後の生着、ATL 細胞、および ATL 細胞の HLA クラス I 欠失の解析、第 1 回日本 HTLV-1 学会、口頭発表、2014 年 8 月 24 日（東京大学医科学研究所、東京）
4. 石垣智寛、小林誠一郎、大野伸広、中野伸亮、宇都宮與、山崎聡、渡辺信和、東條有伸、中内啓光、内丸薫。急性型 ATL における細胞表面抗原のクラスタリング解析と ATL 幹細胞マーカーの検索、第 1 回日本 HTLV-1 学会、口頭発表、2014 年 8 月 24 日（東京大学医科学研究所、東京）
5. 渡辺恵理、佐藤奈津子、渡辺信和、末廣陽子、鵜池直邦。ATL に対する樹状細胞療法後の ATL 細胞と免疫細胞のマルチカラー FACS 解析、第 1 回日本 HTLV-1 学会、口頭発表、2014 年 8 月 23 日（東京大学医科学研究所、

東京）

6. 渡辺信和、佐藤奈津子、渡辺恵理、崔日承、鵜池直邦。ATL に対する臍帯血移植後の ATL 細胞と免疫細胞の 12 カラー FACS 解析、第 1 回日本 HTLV-1 学会、口頭発表、2014 年 8 月 23 日（東京大学医科学研究所、東京）
7. 佐藤奈津子、渡辺恵理、石垣智寛、渡辺信和。キメリズム解析 / HLA-Flow 法の臨床応用、第 24 回日本サイトメトリー学会、口頭発表、2014 年 6 月 28 日（関西医科大学、枚方市）
8. 渡辺恵理、佐藤奈津子、末廣陽子、鵜池直邦、渡辺信和。12 カラー FCM による ATL に対する樹状細胞療法後の ATL 細胞と免疫細胞の同時解析、第 24 回日本サイトメトリー学会、口頭発表、2014 年 6 月 28 日（関西医科大学、枚方市）

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表1 ATL-DC-101染色組合せ

[Fresh PBMCs]											
Stain 1: Treg/Foxp3/CTLA-4											
FITC	PE	PE-Cy5	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	PE-TR	APC	AF700	APC-Cy7	V450	V500	BV605
CCR4①	(Foxp3)③		CD45RA①	Biotin-TSLC-1①	CD4①	(CD152)③	CD14①	CD3①	CD7	CD127①	CD25①
LDG0411031	E11466-1633		B145933		910872A	29768	B131136	09317	2153618	B173326	B158071
10 µl	5 µl		5 µl	1 µl	2 µl	5 µl	7 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
e-Bioscience						BD Pharmingen					

Stain 2: Lymphocyte markers (T cells and NK cells)											
FITC	PE	PE-Cy5	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	PE-TR	AF647	AF700	APC-Cy7	V450	V500	BV605
CD2	CD5	CD235a/PI	CD8	CD25	CD16	TSLC-1	CD56	CD3	CD7	CD4	CD14
B166331	27053	B126613/-	B129722	51531	910872A	Lab	B131136	09317	2153618	B173326	B158071
5 µl	12 µl	1 µl / 1 µl	5 µl	5 µl	2 µl	1 µl	7 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

Stain 3: Lymphocyte markers (B cells, Stem cells and others)											
FITC	PE	PE-Cy5	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	PE-TR	APC	AF700	APC-Cy7	AF405	V500	BV605
CD19	CD34	CD235a/PI	CD20	CD10	CD11c	TSLC-1①		CD3	CD45	CD14	
68976	-----	B126613/-	B171352	62232		3079922		09317	773984A		B158071
12 µl	12 µl	1 µl / 1 µl	5 µl	5 µl		20 µl		5 µl	5 µl		5 µl

Stain 4: HLA											
FITC	PE	PE-Cy5	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	PE-TR	AF647	AF700	APC-Cy7	V450	V500	BV605
HLA-A9①	HLA-A2①	CD235a①/PI		Biotin-HLA-A11①		TSLC-1①		CD3①	CD7①	CD4①	CD14①
017	79836	B126613/-		51531		Lab		09317	2153618	B173326	B158071
10 µl	12 µl	1 µl / 1 µl		5 µl		1 µl		5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

Stain 5: Isotype for Stain 4											
FITC	PE	PE-Cy5	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	PE-TR	AF647	AF700	APC-Cy7	V450	V500	BV605
IgG2b①	IgG2b①	CD235a①/PI		Biotin-IgM①		TSLC-1①		CD3①	CD7①	CD4①	CD14①
B159582	-----	B126613/-		3168672		Lab		09317	2153618	B173326	B158071
12 µl	12 µl	1 µl / 1 µl		5 µl		1 µl		5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

図1 ATL-DC-101における採血のタイミング

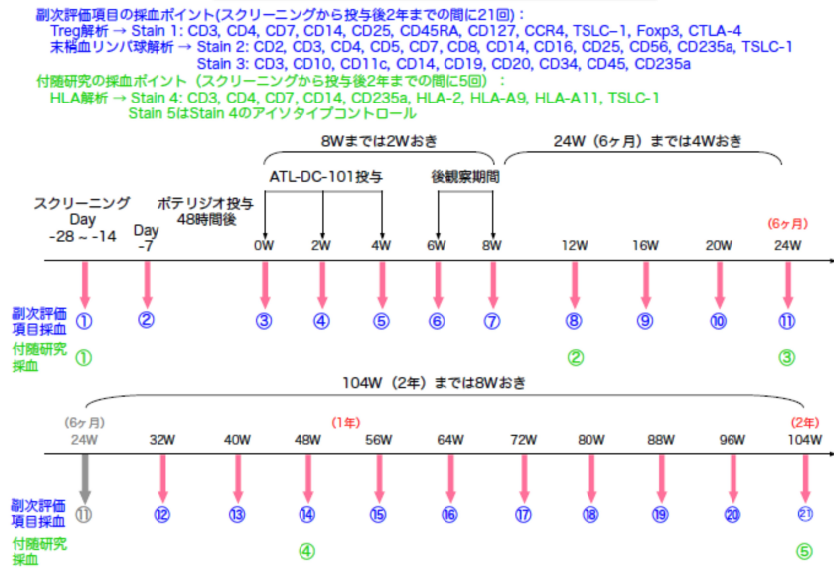


図2 「CD4陽性CD25陽性Foxp3陽性細胞数」の解析

