

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09833

研究課題名(和文) HBZトランスジェニックマウスにおけるATL癌幹細胞の同定と分子基盤の解明

研究課題名(英文) Characterization of ATL stem cell candidates in HBZ transgenic mouse model

研究代表者

水上 拓郎 (Mizukami, Takuo)

国立感染症研究所・血液・安全性研究部・室長

研究者番号：60415487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：HTLV-1はT細胞に感染し、ヒトT細胞白血病(ATL)を発症するレトロウイルスである。近年、CCR4抗体であるMogamulizumab等の開発がなされているが、いまだに化学療法等に関し予後が悪い。我々は、ATLにおいて癌幹細胞の存在を想定し、Taxをマウスに導入したTax-Tgモデルマウスの腫瘍細胞より、薬剤抵抗性を示す癌幹細胞候補(ATLSCs)を同定した。本研究課題では、さらにHBZ-Tgモデルマウスにおいても同様のATLSCsを同定し、それがc-kit-SCFシグナリングにより制御され、また癌幹細胞微小環境として、特殊なサイトカイン状況を生み出していることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題により、HTLV-1の2つの遺伝子TaxとHBZによって誘導されたATL細胞において、ATL癌幹細胞(ATLSCs)特性をもった細胞が存在していることin vivoで証明した。特に、共通して発現するc-kit/SCFシグナリングを抑制することで、ATLの進展を抑えることを明らかにし、ATLSCsを標的とすることで、新規治療法の開発に応用可能であることが示唆された。また、ATLSCsの維持に関し、特殊なサイトカイン環境が形成されていることを突き止め、このような微小環境を標的とした治療法の開発も可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Human T cell leukemia virus-1 (HTLV-1) is a T cell tropic retrovirus that causes Adult T cell leukemia (ATL). ATL has worse prognosis than other T cell malignancies. We hypothesized the existence of chemotherapy resistant cancer stem cell in ATL. In previous studies, we have newly identified ATL stem cells (ATLSCs) candidate in the Tax transgenic (Tg) mouse model (Blood, 2009). In this study, we also found HBZ-Tg derived ATLSCs could not colonize and proliferate in the c-kit ligand, membrane bound SCF mutant mouse (SI/SId) and in the presence of SCF neutralizing antibody ACK2. These data clearly suggested that SCF-c-kit signaling is essential to colonize and initiating ATL in the mouse model. We also found CCL3, CCL4, IL-4, IL-9, and IL-10 are highly produced in the ATLSCs microenvironment. These data suggested that these cytokines environment synergistically regulate ATLSC function and leukemic niche.

研究分野：血液内科学

キーワード：HTLV-1 ATL Tax HBZ モデルマウス c-kit/SCF 癌幹細胞 微小環境 (ニッチ)

1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病 (ATL) は HTLV-1 の感染によって引き起こされる T 細胞系の白血病である。感染後、50 年前後の長期の潜伏期間を経て、ポリクロナールな ATL 腫瘍集団が、クロナールエポレーションを起こし、最終的にモノクロナールな ATL 腫瘍となる特徴を有する。また治療に関しては、抗がん剤による初回寛解率は低いものの、再発することが多く、再発後の奏功率は極めて悪い悪性腫瘍である。

2. 研究の目的

我々は、このようなクロナールエポレーションを基調としたモノクロナールな腫瘍の発生機序、再発性・抗がん剤抵抗性の悪性度の高い ATL に関し、近年、様々な癌で報告されている癌幹細胞の存在を仮定し、ATL のマウスモデルである Tax トランスジェニックマウスを用いて癌幹細胞特性を有する ATL 癌幹細胞 (ATLSCs) の同定に世界で初めて成功した (Yamazaki and Mizukami, *Blood*. 2009; 114: 2709-2720)。

そこで本研究ではすでに構築してきた TAX-Tg マウスモデルに加えて、近年、京都大学の松岡らによって作製された HBZ トランスジェニックマウス (HBZ-Tg) を用いて、ATL 癌幹細胞の同定を試みることで、ATL 癌幹細胞仮説の普遍性を高め、ATL 癌幹細胞の発生・維持に必須な分子基盤を明らかにし、それらの分子基盤を元に、新規治療標的となる分子の探索を行うことを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題では、HBZ-Tg を用いて ATL 癌幹細胞の同定を試み、その分子機序、発生機序の解明を通して、ヒトで応用可能な治療分子標的を明らかにすることを目的としている。まず、HBZ-Tg 脾臓における ATL 腫瘍細胞内の癌幹細胞特性細胞の評価を行う。次に SP 解析等を用いて癌幹細胞特性細胞の同定を行う。同定された候補細胞分画に関し、癌幹細胞の特性を *in vitro* 及び *in vivo* で検証し、機能的にも癌幹細胞を特定する。次に、ATL 癌幹細胞に共通してみられる分子に着目し、解析を行い、ATL 癌幹細胞における分子標的候補を同定する。さらに、それらの微小環境 (ニッチ) の探索を行い、微小環境を標的とした治療開発が可能か検討する。

4. 研究成果

京都大学の松岡雅雄先生が作出した HBZ-Tg マウスより分離した腫瘍細胞 (Ht48) を用いて解析を行った。

まず、HBZ-Tg 由来の腫瘍細胞 (Ht48) に癌幹細胞の特徴である連続移植・腫瘍再構築能を有する細胞が存在しているかを検証した。腫瘍細胞 (Ht48) を 1×10^7 細胞、腹腔内に接種した場合、おおよそ 15~25 日で、腫瘍を形成し、その特徴である巨脾を示すことがわかった。検証した 13 代に渡り、同様の結果が得られ、腫瘍細胞 (Ht48) 中に、連続して腫瘍を再構築する癌幹細胞特性を有した細胞が存在していることが明らかとなった。

そこで癌幹細胞のもう一つの特性である薬剤耐性能を指標とした癌幹細胞の検証を行った。腫瘍細胞 (Ht48) をヘキストで染色し、フローサイトメトリーで解析した結果、Side Population (SP) 細胞が存在していることが明らかとなった。腫瘍細胞 (Ht48) 由来の SP 細胞は、Verapamil の添加により、消失することから、腫瘍細胞 (Ht48) 由来の SP 細胞が ABCG2 などの薬剤排出トランスポーターを有する細胞であることが示唆された。

次に、SP 細胞中の細胞を様々な表面マーカーの表現解析をした結果、約 60% の細胞が c-kit を発現していることが明らかとなった。そこで、50 細胞、500 細胞、5,000 細胞の c-kit 陽性細胞をレシピエントマウスに移植したところ、細胞濃度依存的に腫瘍形成期間が短縮され、5,000 細胞の移植では、 1×10^7 細胞の腫瘍細胞 (Ht48) の移植と同様の腫瘍を、ほぼ同期間で再構築した。

そこで、c-kit 陽性細胞をさらに複数の表面抗原で細分画すると、CD4 陰性、CD8 陰性、c-kit 陽性細胞 (kit-DN 細胞) が SP 細胞に高頻度に濃縮されていることを明らかにした。さらに、kit-DN 細胞を *in vitro* で培養すると、kit 細胞、DN 細胞と比較して極めて増殖活性が高いことを明らかにした。

そこで、これらの細胞の分化マーカーによる表現系と、実際の特性の違いを明らかにするため、正常マウス由来の SP 細胞、c-kit 陽性細胞、kit-DN 細胞と、HBZ-tg 由来の同様の分画の遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより解析した。その結果、SP や kit-DN は、初期前駆 T 細胞 (ETP) や造血幹細胞 (HSC) と同じような分子基盤を保有していることが明らかとなった。

網羅的遺伝子発現解析および表面抗原解析により、HBZ-tg 由来にせよ、Tax-tg 由来にせよ、ATL 癌幹細胞候補は c-kit を発現していることが明らかとなった。

そこで、in vitro で SCF を除いた環境で ATL 癌幹細胞候補を培養すると、増殖活性が低下することが明らかとなった。さらに SCF 存在下で、中和抗体である ACK2 を添加した場合も同じような効果が認められた。in vitro の結果を、in vivo で検証するために、マウスの第 10 染色体にある Steel (Sl) 遺伝子座に二つの突然変異遺伝子を持つ SCF の変異マウス (Sl/Sl^d マウス) をレシピエントとして、ATL 癌幹細胞の移植実験を行ったところ、ATL 癌幹細胞候補の腫瘍再構築能が著しく低下することが明らかとなった。

以上の結果より、c-kit/SCF シグナリングが ATL 癌幹細胞候補の癌幹細胞性の維持や増殖に必須であることが明らかとなった。また、ATL 癌幹細胞候補の存在する脾臓の微小環境を調べると、CCL3, CCL4, IL-4, IL-9 や IL-10 などの局所の過剰産生が認められ、特殊な環境が ATLSCs の分化・発生・維持に重要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 水上拓郎、野島清子、浜口功	4. 巻 74(3)
2. 論文標題 HTLV-1感染予防法の開発	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 血液内科	6. 最初と最後の頁 356-362
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuribayashi W, Takizawa K, Sugata K, Kuramitsu M, Momose H, Sasaki E, Hiradate Y, Furuhashi K, Asada Y, Iwama A, Matsuoka M, Mizukami T, Hamaguchi I.	4. 巻 7(32)
2. 論文標題 Impact of the SCF signaling pathway on leukemia stem cell-mediated ATL initiation and progression in an HBZ transgenic mouse model	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 51027-51043
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.10210.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takuo Mizukami, Wakako Kuribayashi, Kiyoko Nojima, Yuki Hiradate, Eita Sasaki, Madoka Kuramitsu, Haruka Momose, Kenji Sugata, Atsushi Iwama, Masao Matsuoka, Isao Hamaguchi.
2. 発表標題 Characterization of the ATL stem cell (ATLSC) niche and cytokine environment in an ATL mouse model.
3. 学会等名 第79回 日本血液学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takuo Mizukami, Wakako Kuribayashi, Kiyoko Nojima, Yuki Hiradate, Eita Sasaki, Madoka Kuramitsu, Haruka Momose, Kenji Sugata, Atsushi Iwama, Masao Matsuoka, Isao Hamaguchi.
2. 発表標題 Characterization of the ATL stem cell (ATLSC) niche and cytokine environment in an ATL mouse model.
3. 学会等名 第79回 日本血液学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 水上拓郎, 栗林和華子, 滝澤和也, 倉光球, 佐々木永太, 平舘裕希, 浅田善久, 岩間厚志, 松岡雄雅, 瀧口功.
2. 発表標題 成人T細胞白血病 (ATL) モデルマウスにおけるATL癌幹細胞の発生維持機構におけるc-kit-SCFシグナルの重要性の解明
3. 学会等名 第159回 日本獣医学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 栗林和華子, 水上拓郎, 滝澤和也, 倉光球, 浅田善久, 岩間厚志, 松岡雄雅, 瀧口功.
2. 発表標題 HBZ-TgマウスモデルにおけるATL癌幹細胞の発生機序解明を目指した分子基盤の解明とその機能解析
3. 学会等名 第3回 日本HTLV-1学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 uribayashi W, Mizukami T, Takizawa K, Sugata K, Kuramitsu M, Nojima K, Momose H, Iwama A, Matsuoka M, Hamaguchi I.
2. 発表標題 The essential role of c-kit-SCF signaling in the leukemic stem cells mediated ATL cell propagation and drug resistance.
3. 学会等名 The 5th JCA-AACR Special Joint Conference
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Kuribayashi W, Mizukami T, Takizawa K, Sugata K, Kuramitsu M, Nojima K, Momose H, Iwama A, Matsuoka M, Hamaguchi I
2. 発表標題 The c-kit-SCF signaling in the leukemic stem cells development and differentiation in ATL model mice.
3. 学会等名 RIKEN IMS Summer Program (RISP) 2016
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----