

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591414

研究課題名(和文) ヒト化マウスを用いたATL腫瘍幹細胞の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of ATL cancer stem cells using a humanized mice

研究代表者

浜口 功 (Hamaguchi, Isao)

国立感染症研究所・その他部局等・その他

研究者番号：90348780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：NOD/SCID/JAK3 KOマウスの新生仔肝臓にヒト臍帯血造血幹細胞を移植したところ、ヒトCD4陽性T細胞の増加が認められた。HTLV-1感染細胞株MT2をヒト化マウスの腹腔内に移植したところ、肝臓、脾臓および骨髄においてHTLV-1感染細胞が存在すること、非感染マウスの脾臓では見られない細胞が多数存在することから、ATL幹細胞のニッチは脾臓に存在することを示唆された。また、本モデルマウスを用いて、HTLV-1感染細胞を標的とした新規HTLV-1候補薬剤の効果検証を行ったところ、末梢血におけるヒトリンパ球数の抑制、ウイルス量の抑制などの効果が検証でき、モデルマウスの有用性も示せた。

研究成果の概要(英文)：At the first step, we developed humanized mice by using NOJ (NOD/SCID/JAK3 KO) mouse. After CD34 positive hematopoietic stem cells were transplanted into a neonatal liver of NOJ mice, in the course of 10 weeks 30-70% human CD45 cells had been revealed. At the point of 16 weeks, enough amount of CD4 positive T cells existed. For the HTLV-1 infection, MMC treated MT-2 cells (2.5x10⁶) were inoculated into the humanized mouse peritoneum. HTLV-1 infected T cells were increased in the mouse liver, spleen, bone marrow. These data suggested that there might be a ATL stem cell niche in the spleen. Moreover we analyzed the efficacy of new drug candidate of anti-HTLV-1 infection by using with this mouse model. This drug led to the suppression of proviral load of HTLV-1 in the peripheral blood and of infected T cell growth in the mouse model. These data suggested that the mouse model would be an effective tool for the new drug candidate.

研究分野：血液内科

キーワード：HTLV-1感染モデル ヒト化マウス ATL幹細胞

1. 研究開始当初の背景

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こされる末梢性T細胞の腫瘍性疾患である。一旦ATLを発症すると抗癌剤での治療が困難となる場合が多く、他のリンパ腫/白血病と比較しても予後が悪い。また発症までの長い潜伏期間の間、(1)ウイルス感染がどのような臓器で拡大するのか、また(2) 潜伏期間中の病態、(3) 発症のメカニズムについては不明な点が多い。これまでの疫学研究において潜伏期にあるキャリアの数は国内で推定108万人との報告がなされた(平成23年度厚生労働科学研究山口班)。キャリアの5%が生涯にATLを発症する危険性があり、病気を発症させないもしくは、病気の発症の原因となる細胞を集中的に治療する等の新しい戦略が望まれる。

近年、様々な腫瘍や固形癌において、化学療法後の再発原因として腫瘍幹細胞の存在が示唆されており、腫瘍幹細胞を対象にした治療法も新しく開発されつつある。腫瘍幹細胞を対象にした治療法の最大のメリットは、問題となる腫瘍幹細胞のみに選択的に攻撃を仕掛けることにより、治療効果を上げるとともに、周辺の細胞への影響を最小限に抑えることができる。ATLの治療には多剤併用化学療法が用いられてきたが、奏効率は他の悪性リンパ腫に比べ極めて悪い。また、ATLへの抗癌剤治療後再発をおこすケースも多く、異なるタイプの他の白血病で同定されている白血病幹細胞(LSC)に近い機能を持つ特殊な細胞の存在を強く示唆する。またATL細胞染色体へのHTLV-1の組み込み状況から、腫瘍細胞がモノクローナルな増殖を行っていることを示しており、腫瘍形成にかかわる前駆細胞の存在を強く示唆する。

我々はこれまでにHTLV-1ウイルスゲノム中にコードされている非構造タンパク質Tax遺伝子を組み込んだ遺伝子組換えマウス(Tax-T

g)の腫瘍細胞集団の中から非常に高い腫瘍再構築能を持つATL腫瘍幹細胞(ATL-LSC)を同定する事に成功した(*Blood*. 2009, 114(13):2709-20. corresponding author)。本Tax-TgマウスモデルはATL-LSCの発生、薬物投与後の動態及び腫瘍発生に伴う宿主側の因子を明らかにするのに非常に適したモデルであるといえる。新しい治療法開発のために、モデルマウス内のLSCの動態をさらに詳細に解析しなければならないが、実際にヒトATL患者において、マウスATL-LSCに相当する特殊な細胞の同定は喫緊の課題である。

2. 研究の目的

近年、腫瘍幹細胞に発現している分子を標的とした抗体治療の結果から、Total LSC Killを目指した治療法の確立が急がれている。申請者はこれまでにマウスのATLモデルより腫瘍幹細胞の同定に成功した。本研究課題においてヒト化マウスにおいてATLモデルを作製し、腫瘍幹細胞及びその腫瘍幹細胞ニッチの同定を行うと共にヒトATLモデルにATL治療薬投与を行い、ATL腫瘍幹細胞及びそのニッチにおける薬物病態モデルの解析を行い、治療法の開発の基礎データを収集する。

3. 研究の方法

ヒト化マウス作製法の確立

臍帯血由来造血幹細胞を高度免疫不全 NOJ (NOD/SCID/Jak3-/-) マウスの骨髄および新生仔肝臓内に移植し、ヒトT細胞が十分に分化増殖可能なマウスの開発を行う。

ヒト化マウスへのHTLV-1感染手順の確立

HTLV-1感染細胞株であるMT-2細胞をヒト化の完了したNOJマウス腹腔に接種することによりHTLV-1感染細胞を成立させる。本実験は国立感染症研究所村山庁舎、P3実験施設内で実施し、病原体の拡散を防止する。

ATL腫瘍幹細胞の解析

ATL 腫瘍幹細胞がどのようにして生体内で発生し増殖するかについては不明な点が多い。また、これまでにマウスモデル (Tax-Tg マウス) においては、脾臓および骨髄において腫瘍細胞が著明に増殖しており、ATL 腫瘍幹細胞の局在も組織学的解析から明らかにしている (*Blood*. 2009, 114(13):2709-20.)。そこで免疫組織化学を用いた組織学的解析法を用いて肝臓および脾臓における存在を明らかにする。

HTLV-1 感染に対する新規薬剤の効果解析

ヒト化 HTLV-1 感染マウスに治療効果が高く期待される新規薬剤を投与し、モデルマウスにおいてどのような変化が起こるかを解析する。治療効果を脾臓等の臓器について、組織学的解析法を用いて明らかにする。

4. 研究成果

ヒト化マウス作製法の確立

免疫不全マウスである NOD/SCID/JAK3 KO マウス (NOJ マウス) 1 匹あたり $3 \sim 4 \times 10^5$ 個のヒト CD34 陽性細胞を尾静脈より移植した場合、移植後 1 ヶ月目には既に末梢血リンパ球細胞のおよそ 15 ~ 55% にヒト CD45 陽性細胞が認められたが、50% 以上が B 細胞 (CD19 陽性) であり、T 細胞 (CD3 陽性) は見られなかった。しかし移植後 3 ヶ月目から 4 ヶ月目にかけて CD3 陽性 CD4 陽性または CD3 陽性 CD8a 陽性の分化したヒト T 細胞の増加が認められ (およそ 10 ~ 30%)、相対的に B 細胞の割合は減少した (およそ 15 ~ 30%)。またより効率的なヒト化マウスを作製するため、NOJ マウスの新生仔肝臓にヒト臍帯血より分離した CD34 陽性造血幹細胞を移植したところ、移植 10 週目には、移植マウスの末梢血リンパ球のおよそ 30 ~ 70% がヒト CD45 陽性細胞に置き換わり、移植後 16 週目には HTLV-1 感染実験に用いるために十分な CD4 陽性 T 細胞の増加が認められた。

ヒト化マウスへの HTLV-1 感染手順の確立

ヒト CD45 陽性 CD3 陽性細胞が末梢血リンパ球細胞の 10% 以上となり、かつ 50% 以上の CD4 細胞の分化が認められたマウスを選別して、HTLV-1 感染モデルの作製を試みた。マイトマイシン C を添加した培養培地 37、1 時間処理した HTLV-1 感染細胞株 MT2 をヒト化マウスの腹腔内に 2.5×10^6 個移植した。現在、移植したマウスの末梢血を FACS と Real-time PCR により解析し、*in vivo* で HTLV-1 感染 T 細胞が増殖することを確認した。なお、MMC 処理した MT-2 細胞はマウス体内において、移植後 2 週間後には検出されないことも確認できた。

ATL 腫瘍幹細胞の解析

各臓器を解析したところ、肝臓、脾臓および骨髄において HTLV-1 感染 CD4+CD25+ T 細胞が存在した。特に、脾臓は有為に体積が増加しており、HTLV-1 感染 CD4+CD25+ T 細胞の集積が見られた。さらに、非感染ヒト化マウスの脾臓では観察されない細胞が多数存在することが明らかとなった。マウスでは成体においても脾臓は造血組織であり、造血幹細胞を支持するニッチが存在することが知られている。このことから、HTLV-1 感染ヒト化 NOJ マウス脾臓から得られた結果は、ATL 幹細胞のニッチは脾臓に存在することを示唆する。

HTLV-1 感染に対する新規薬剤の効果解析

開発を行った高頻度に ATL 様病態を示すモデルマウスを用いて、HTLV-1 感染細胞を標的とした新規 HTLV-1 候補薬剤の効果検証を行った。その結果、この候補薬剤は 1) 感染マウス末梢血におけるウイルス量の抑制、2) 感染マウスにおけるヒトリンパ球数増加の抑制、3) 感染マウス末梢血で増加したヒトリンパ球数の減少、4) 感染マウスの脾臓の肥大抑制、などの効果があることが検証できた。このように、本研究で構築した HTLV-1 感染ヒト化マウスは新規薬剤の効果検証に

においても有用なツールとなることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Kuramitsu M, Okuma K, Yamagishi M, Yamochi T, Firouzi S, Momose H, Mizukami T, Takizawa K, Araki K, Sugamura K, Yamaguchi K, Watanabe T, Hamaguchi I, Identification of TL-Om1, an Adult T-Cell Leukemia (ATL) Cell Line, as Reference Material for Quantitative PCR for Human T-Lymphotropic Virus 1. *J. Clin. Microbiol.* 53:587-96. 2015. (corresponding author)

〔学会発表〕(計7件)

Takuo Mizukami, Kazuya Takizawa, Shunsuke Hazama, Madoka Kuramitsu, Haruka Momose, Atsuko Masumi, Hideki Hasegawa, Kazunari Yamaguchi and Isao Hamaguchi, The Role of osteoclasts during the ATL stem cell niche formation. 日本血液学会, 京都, 2012年10月

Takuo Mizukami, Kazuya Takizawa, Madoka Kuramitsu, Haruka Momose, Junpei Yamazaki, Atsuko Masumi, William W Hall, Hideki Hasegawa, Kazunari Yamaguchi, Isao Hamaguchi, Identification of Leukemic Stem Cells and Their Niche in Adult T Cell Leukemia Using the Tax-Transgenic Mouse Model, アメリカ血液学会, アトランタ, 2012年12月

Wakako Kuribayashi, Kazuya Takizawa, Madoka Kuramitsu, Asada Yoshihisa, Masao Matsuoka, Takuo Mizukami, Isao Hamaguchi, Identification of cancer stem cell candidates in ATL mouse model of HBZ-transgenic mouse, 日本血液学会, 札幌, 2013年10月

Wakako Kuribayashi, Takuo Mizukami, Masao Matsuoka, Isao Hamaguchi, Identification of cancer stem cell candidates in ATL mouse

model of HBZ transgenic mouse, 横浜, 2013年10月

Takuo Mizukami, Kazuya Takizawa, Junpei Yamazaki, Wakako Kuribayashi, Madoka Kuramitsu, Ryuji Hiramatsu, William W Hall, Hideki Hasegawa, Kazunari Yamaguchi, Isao Hamaguchi, The osteoclast targeting therapy in bone metastasis for amouse model of adult T cell leukemia, アメリカ血液学会, ニューオーリンズ, 2013年12月

栗林和華子、水上拓郎、滝澤和也、倉光球、浅田善久、岩間厚志、松岡雅雄、浜口功、HTLV-1モデルマウスであるHBZ-Tgマウスにおける癌幹細胞の同定と機能解析、日本HTLV-1学会、東京、2014年8月

Wakako Kuribayashi, Takuo Mizukami, Kazuya Takizawa, Madoka Kuramitsu, Asada Yoshihisa, Iwama Atsushi, Masao Matsuoka, Isao Hamaguchi, Identification and characterization of cancer stem cells in an HBZ transgenic mouse model of ATL, 大坂, 2014年10月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: HTLV-1 プロウイルス検出のためのプライマーセット及びそれを用いた検出方法
発明者: 倉光球、浜口功、大隈和
権利者: 倉光球、浜口功、大隈和
種類: 特許
番号: 特願 2013-196247
出願年月日: 2013年9月20日
国内外の別: 国内

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 浜口 功 (HAMAGUCHI ISAO)
国立感染症研究所 血液・安全性研究部長
研究者番号：90348780

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：