

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461440

研究課題名(和文)成人T細胞白血病の骨浸潤における破骨細胞の新しい機能の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文)The Role Of Osteoclasts In the developing Leukemic Stem Cell Niche in a Mouse Model of Adult T-Cell Leukemia

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：成人T細胞白血病はHTLV-1の感染によって引き起こされる悪性腫瘍で、予後が非常に悪く、その原因として癌幹細胞の存在が示唆されていた。我々はATLマウスモデルを用い、ATL癌幹細胞が腫瘍再構築能を有し、ホーミングアッセイの結果から、脾臓や骨髄に存在し、特に骨髄の骨梁領域に多数存在していることを明らかにした。この領域では破骨細胞が同時に増加しており、ニッチ細胞と考えられたので、破骨細胞の阻害剤と抗がん剤の併用治療を行なった。その結果、骨髄においては劇的なATL細胞の減少が認められた。これらの結果より、破骨細胞を標的とした治療法がATLの進展を阻止するのに有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Adult T cell leukemia (ATL) is a lymphoproliferative disorder caused by infection with HTLV-1. Although various chemotherapies have shown significant complete remission rates, most of the treated patients relapse. These data indicate the existence of leukemic stem cells (LSCs) and a specific niche that protects from chemotherapies. We identified that ATL-LSCs have reproduced the original tumor. Using homing assay, we found that more than 60% of first colonized cells in the spleen and BM were AT-LSCs and ATL-LSCs were also attached to the reticular cells in the trabecular bone. We also found the number of osteoclast was significantly increased at the trabecular region. To clarify the role of osteoclast, we treated osteoclast inhibitor Zoledronic acid. As a result, ATL cells were dramatically reduced in the BM and extend the mouse survival rate significantly in this treatment. These data suggest osteoclast have a potential therapeutic target in the mouse model of ATL.

研究分野：血液内科学

キーワード：癌幹細胞 ニッチ 微小環境 破骨細胞 骨浸潤抑制 Zoledronic acid

## 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 型の感染によって引き起こされる白血病の 1 つであり、化学療法での治療効果が著しく低い。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及びそのニッチ(癌微小環境)の存在が示唆されており、ATL 癌幹細胞を標的とした治療法の研究・開発が急がれていた。

## 2. 研究の目的

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 ATL 癌幹細胞の同定に試み、連続移植が可能な細胞集団を機能的に同定し、さらに Side population 中に含まれる CD38-/CD71-/CD117+ の細胞が、ATL-LSCs であることを明らかにした (Yamazaki et al., Blood 2009)。そこで、このモデルを用い、ATLSCs のニッチを同定し、治療法標的として使用可能か、検討することとした。

## 3. 研究の方法

ATL 癌幹細胞を含む GFP を導入した ATL 腫瘍細胞 (2x10<sup>6</sup> 細胞) を NOD/ SICD マウスに腹腔内移植し、移植後 16 時間、3 日、7 日、14 日の各組織の移動・定着率と ATL 癌幹細胞の割合を調べ、またニッチについて検討した。次に、ATL 癌幹細胞および ATL 細胞の増殖に関し、ニッチ標的治療として破骨細胞に注目し、ZOMETA (Zoledronic acid) (ZOL) 投与モデルを構築し、その有効性について検討した

## 4. 研究成果

まず、GFP を導入した Tax-Tg 由来腫瘍細

胞の局在解析から、ATL 癌幹細胞が脾臓の赤脾髄の類洞血管付近に存在している事を明らかにした。また、骨髄では骨芽細胞および血管内皮系と近接して存在している事を示してきた(2011 年 HTLV-1 研究会)。さらに詳細な migration assay を実施した結果、16 時間後には脾臓と骨髄のみに GFP 陽性 ATL 細胞が存在し、他の組織においては殆ど検出されなかった。また移植後 16 時間後には ATLSCs が骨梁に集簇していることを明らかにした。ATL 癌幹細胞は脾臓および骨髄で増加し、14 日になってはじめて ATL 細胞の増殖が認められるようになった。また末梢血中にはいずれも時期においても ATL 癌幹細胞は認められなかった為、脾臓および骨髄で増加した ATL 細胞が胸腺やリンパ節に移行していることが示唆された。

次に、ATL 癌幹細胞および ATL 細胞の増殖に関するニッチについて検討した結果、細網細胞がこれらの ATL 癌幹細胞の増殖に合わせて脾臓および骨髄で増加する事を突き止めた。特に骨髄では骨内膜の骨芽細胞領域に多数の細網細胞が増加しており、ニッチ細胞の可能性が高いと考えられる。一方、同領域では破骨細胞が増加していることを突き止め、さらに骨の  $\mu$ CT 解析の結果、骨量の減少とカルシウムの上昇が認められた。そこで、ATLSCs の定着、増殖、幹細胞の維持に破骨細胞が関与している可能性が示唆されたので、破骨細胞の阻害剤である、ZOMETA (Zoledronic acid) (ZOL) を投与した上で、抗がん剤を投与した。その結果、骨髄における ATLSCs の存在はほとんど認められず、また、骨量も回復した。以上の結果から、破骨細胞を標的としたニッチ療法を行うことで、骨浸潤を抑え、さらに高カルシウム血症の抑制に繋がることを突き止めた。

## 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3件)

Kuribayashi W, Takizawa K, Sugata K, Kuramitsu M, Sasaki E, Hiradate Y, Furuhashi K, Asada Y, Iwama A, Matsuoka M, Mizukami T\*, Hamaguchi I\*. Impact of the SCF signaling pathway on leukemia stem cell-mediated ATL initiation and progression in an HBZ transgenic mouse model, *Oncotarget*, 7(32), 51027-51043, 2016. \*corresponding author

Kuramitsu M, Okuma K, Yamochi T, Sato T, Sasaki D, Hasegawa H, Umeki K, Kubota R, Sobata R, Matsumoto C, Kaneko N, Naruse I, Yamagishi M, Nakashima M, Momose H, Araki K, Mizukami T, Mizusawa S, Okada Y, Ochiai M, Utsunomiya A, Koh KR, Ogata M, Nosaka K, Uchimarui K, Iwanaga M, Sagara Y, Yamano Y, Satake M, Okayama A, Mochizuki M, Izumo S, Saito S, Itabashi K, Kamihira S, Yamaguchi K, Watanabe T, Hamaguchi I. Standardization of Quantitative PCR for Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 in Japan: a Collaborative Study. *J Clin Microbiol*. 2015; 53: 3485-3491.

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-0m1, an adult T-cell leukemia (ATL) cell line, as reference material for quantitative PCR for human T-lymphotropic virus 1. *J Clin Microbiol*. 2015; 53: 587-596.

[学会発表](計15件)

Kuribayashi W, Mizukami T\*, Takizawa K, Sugata K, Kuramitsu M, Nojima K, Momose H, Iwama A, Matsuoka M, Hamaguchi I\*. The c-kit-SCF signaling in the leukemic stem cells development and differentiation in ATL model mice. RIKEN IMS Summer Program (RISP) 2016, 6月10-17日、横浜、2016年

Kuribayashi W, Mizukami T\*, Takizawa K, Sugata K, Kuramitsu M, Nojima K, Momose H, Iwama A, Matsuoka M, Hamaguchi I\*. The essential role of c-kit-SCF signaling in the leukemic stem cells mediated ATL cell propagation and drug resistance. The 5th JCA-AACR Special Joint Conference, 東京, 7月13-15日, 2016年

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, 濱口功\*. 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, 第3回日本 HTLV-1 学会、鹿児島、8月26-28日

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, 濱口功\*. 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. 第158回日本獣医学会, 日本大学(藤沢市), 9月6日-8日, 2016

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, 濱口功\*. ATL モデルマウスにおけるがん幹細胞の c-kit-SCF の機能解析, Kyoto T cell conference (KTCC) 2015, 京都 2015年5月

Wakako Kuribayashi, Takuo Mizukami\*, Kazuya Takizawa, Kenji Sugata, Madoka

Kuramitsu, Kiyoko Nozima, Haruka Momose, Yoshihisa Asada, Astushi Iwama, Masao Matsuoka, Isao Hamaguchi\*. Identification of leukemic stem cell candidates in an atl mouse model of hbz transgenic mice. European Hematology Association (EHA) Congress, 2015, 12 June, Vienna

Wakako Kuribayashi, Takuo Mizukami\*, Kazuya Takizawa, Kenji Sugata, Madoka Kuramitsu, Haruka Momose, Atsushi Iwama, Isao Hamaguchi\*. Identification of ATL stem cells in an ATL model HBZ transgenic mouse. International Society of Experimental Hematology, Kyoto. August, 2016

Wakako Kuribayashi, Takuo Mizukami\*, Masao Matsuoka, Isao Hamaguchi\*. The c-kit-SCF signaling in the leukemic stem cells development and differentiation in ATL model mice. 日本癌学会、2015年10月、名古屋 (In English)

Wakako Kuribayashi, Takuo Mizukami\*, Kazuya Takizawa, Kenji Sugata, Madoka Kuramitsu, Kiyoko Nozima, Haruka Momose, Yoshihisa Asada, Atsushi Iwama, Masao Matsuoka, Isao Hamaguchi\*. The c-kit-SCF signaling in the leukemic stem cells development and differentiation in ATL model mice. 第77回日本血液学会, 金沢, 2015年10月18日

Wakako Kuribayashi, Takuo Mizukami\*, Kazuya Takizawa, Madoka Kuramitsu, Iwama Atsushi, Yoshihisa Asada, Masao Matsuoka, Isao Hamaguchi\*. Identification of cancer stem cells in an HBZ transgenic mouse model of ATL. 第76回日本血液学会 2014年10

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、松岡雄雅、濱口功\*. 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. 第1回日本 HTLV-1 学会 2014年8月

水上拓郎: 東京大学応 第26回用動物科学セミナー 幹細胞システムを応用した次世代癌幹細胞治療法の開発 2014年7月  
(\*corresponding author)

## 6. 研究組織

### (1) 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