

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 18 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790454

研究課題名（和文）ATL マウスモデル白血病の癌幹細胞に高発現する細胞間接着分子の解析

研究課題名（英文）Analysis of intercellular adhesion molecules expressed in cancer stem cells of a Tax-transgenic mouse ATL model

研究代表者

鈴木 忠樹（SUZUKI TADAKI）

国立感染症研究所・感染病理部・研究員

研究者番号：30527180

研究成果の概要（和文）：

成人 T 細胞白血病（ATL）は、HTLV-1 の感染後数十年を経て発症する極めて悪性度の高い末梢性 T 細胞腫瘍である。HTLV-1 の tax 遺伝子を 1ck 近位プロモーター下に発現させるトランスジェニックマウスは ATL と同様の白血病（mATL）を発症する。本研究では、ATL マウスモデルに存在する白血病の癌幹細胞に焦点を当て、癌幹細胞に特異的に発現する治療標的候補分子を探索した。その結果、膜タンパク質カドヘリンの一分子を癌幹細胞特異的分子として同定することに成功した。同定されたカドヘリンは正常の幹細胞での発現は報告されていないことから、Tax により誘導される白血病に対する癌幹細胞特異的治療法の標的分子の候補となると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Adult T-cell leukemia (ATL) is a T-cell malignancy caused by human T lymphotropic virus type I. The HTLV-I transactivator, Tax, initiates ATL-like disease (mATL) both in Tax transgenic mice (Tax-Tg). Recently, the candidates CSCs of mATL were identified in splenic lymphomatous cells (SLCs). The candidate CSCs could consistently regenerate the original lymphoma, suggesting that the eradication of cancer stem cells will be necessary to improve the outcome of treatment for mATL. In this study, a proteomic approach was used to identify proteins differentially present in CSCs of mATL. The CSCs of mATL were analyzed by liquid chromatography tandem mass spectrometry to compare protein profiles in CSCs and no-CSCs. This comparative proteomic analysis revealed that expression of one membrane protein was increased in CSCs, which might become a new target of antibody-based therapy. Flowcytometry validated expression of the membrane protein. Taken together, the data presented provide a significant new protein-level insight into the biology of cancer stem cells of mATL, a key population of cells that are also involved in mATL development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	0	3,400,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：疾患モデル動物・成人 T 細胞白血病モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病（ATL）は、HTLV-1 の感染後数十年を経て発症する極めて悪性度の高い末梢性 T 細胞腫瘍である。HTLV-1 は、全世界

で約 3000 万人のキャリアがおり、そのうち日本には約 120 万人が存在し、今後約 5 万～10 万人の ATL の発症が推定されている。ATL には多くの病型が知られているが、急性型の生

存期間中央値は1年未満であり極めて予後不良の血液悪性腫瘍である。

HTLV-1 感染細胞の不死化と形質転換には HTLV-1 ゲノムの pX 領域にコードされる Tax 遺伝子が重要な働きをしており、Tax 遺伝子を lck 近位プロモーター下に発現させるトランスジェニックマウスは白血病を発症することが報告されている (Hasegawa et al., Nat Med. 2006;12(4):466-72)。このマウスの腫瘍は盛んな分裂像を伴うびまん性大細胞性リンパ腫の像を呈し、末梢血中にみられる白血病細胞は画に深い切り込みのくびれをもつ ATL に特徴的ないわゆる flower cell 様の形態を呈していた。この腫瘍細胞《Mouse ATL (mATL) 細胞》は、細胞質内 CD3(+), CD4(-), CD8(-) の pre-T 細胞由来の腫瘍であったが、ATL で強発現している CD25, CD69 も陽性であり、さらに、この細胞においては HTLV-1 による形質転換に重要な働きをしている NF- κ B が活性化しているなどヒトで起こる ATL と非常に良く似た病態を呈し、ATL の良い病態モデルになると考えられている。

このマウスでは白血病発症まで長期の潜伏期間があるが、この mATL 細胞を免疫不全マウス (SCID マウス) へ移植すると、1ヶ月程度で白血病を発症する。この腫瘍細胞移植実験系は短期間で腫瘍形成能を評価する事ができ、治療効果判定の実験に有用である。長谷川らはこの実験系を用いて、NF- κ B 阻害剤の安全性と病気の治療効果についての研究を行ってきており、これまでに、mATL 細胞に高発現しているケモカインレセプターである CXCR4 は mATL 細胞の遊走能に関係しており CXCR4 阻害剤はこれを完全に抑制できることや、mATL 細胞の NF- κ B の活性化を抑制する NF- κ B 阻害剤は、mATL 細胞にアポトーシスを誘導する事ができることを示してきた (Kawaguchi et al., Blood. 2009;114(14):2961-8)。しかしながら、いずれの薬剤も *in vitro* においては効果的であるものも *in vivo* の実験であるマウスへの移植実験での効果は限定的であり、白血病の発症を完全には抑制できない事が明らかになった。これらの結果より mATL 細胞の中には腫瘍細胞の Major population とは異なる細胞表面マーカーを持ち、薬剤に耐性のある Minor population が存在し、その集団が腫瘍の拡大に寄与しているのではないかという仮説が考えられた。

近年、さまざまな固形腫瘍、血液腫瘍において「腫瘍内において自己複製能と腫瘍を構成するさまざまな分化系統の癌細胞を生み出す能力をあわせもつ細胞」と定義される癌幹

細胞 (Cancer Stem Cell; CSC) の存在が報告されている。この癌幹細胞の本態の解明・治療抵抗性の克服は癌に対する治療を飛躍的に改善する可能性を秘めており、癌幹細胞を標的とする研究は世界中で盛んに行われている。

最近、このマウスモデルで発生する免疫不全マウスに繰り返し移植する事ができる mATL 細胞中に高い腫瘍再構築能を持った癌幹細胞 (CSC) が存在していることを明らかにした。この研究により、mATL 細胞の癌幹細胞は CD38(-), CD71(-), CD117(+) という特徴を持っている事が分かった (Yamazaki et al., Blood. 2009;114(13):2709-20)。

2. 研究の目的

癌根治を目指す癌幹細胞を標的とした治療法は、癌幹細胞の自己複製に必要な分子を阻害する、癌幹細胞特異的に発現する細胞表面抗原に対する抗体医薬により癌幹細胞を免疫学的に除去する、化学療法に抵抗性であった癌幹細胞の感受性を上げる、などの方法での開発が行われている。これらの方法のキーとなるのは正常の細胞、幹細胞に極大影響を与えないような癌幹細胞特異的な機構を同定することである。

そこで、我々は mATL 細胞の中から CD38(-), CD71(-), CD117(+) という特徴を持つ細胞集団を集め、質量分析計を用いた定量解析により癌幹細胞で特異的に発現している分子の同定を試みた。その結果、癌幹細胞では非癌幹細胞に比べ、カルシウム依存的な細胞間接着分子であるカドヘリンファミリーのある分子の発現が高いことが分かった。本研究では、ATL モデルマウスである Tax トランスジェニックマウス由来の mATL 細胞の癌幹細胞に高発現している細胞間接着分子カドヘリンに着目し、この分子と癌幹細胞の関係性を明らかにすることを目的としている。さらに、このカドヘリン分子が、Tax により誘導される白血病に対する癌幹細胞特異的な治療法標的候補分子になり得るかどうかを検討し、新たな ATL 治療法の開発の可能性を探索する。

3. 研究の方法

(1) 材料 (細胞)

Tax トランスジェニックマウス由来の白血病/リンパ腫細胞 1×10^6 個を RPMI に懸濁し、SCID マウスの腹腔内に接種し、約 28 日後マウスが白血病を発症した時点で腹水及び脾臓を回収した。再びこれを SCID マウスに腹腔内接種で継代し、これを繰り返す事で腫瘍細胞のみの集団にした。更に Percoll を用いて腫瘍細胞を分離し、この集団を mouse ATL

cell (mATL 細胞)として実験に用いた。この実験は国立感染症研究所の実験動物委員会の承認のもとに実施した。

(2) 癌幹細胞の分取

mATL 細胞の癌幹細胞の分取は、SCID マウスの脾臓から mATL 細胞を分離し、次に細胞を抗 CD16/32 抗体および抗 CD38-PE 抗体、続いて抗 PE マイクロビーズと反応させ MACS カラムで CD38 陰性分画を濃縮した。CD38 陰性細胞を抗 CD71-FITC 抗体、抗 CD117-APC 抗体で染色し、JSAN セルソーターにて CD38 陰性、CD71 陰性、CD117 陽性分画の細胞を集めた。非癌幹細胞集団として、CD38 陽性、CD71 陽性、CD117 陰性も同時に集めた。集めた細胞はセルバンカーに浮遊させ、 -80°C で保存した。

(3) 質量分析計による定量解析

がん幹細胞 (3.6×10^5 cells)、非がん幹細胞 (1×10^6 cells) を 1ml PBS で 3 回洗浄後、100 μl の 10% TCA を加えて氷上でインキュベートした。細胞質画分の溶出のために 20 μl の Lysis buffer (4 M urea, 2 M Thiourea, protease and proteasome inhibitor) を加えて sonication (UCD250 にて 5 分間 (30 sec, 30 sec interval)) を行った。終濃度 10 mM DTT を加え 30 分間、室温にて振盪した。次に終濃度 10 mM ヨードアセトアミドを加え 30 分間、室温にて振盪した。得られた lysate を Quant-iT protein Assay Kit (Invitrogen) を用いてタンパク質量の定量を行った。液量を 25 μl に揃え、Lys-C を 1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ に調整し、サンプルに 1 μl ずつ添加した。37 $^{\circ}\text{C}$ にて 3 時間インキュベートし、500 mM の TEAB (iTRAQ 試薬に付属のもの) を 75 μl 加え、ウレアの終濃度を 1 M にし、PH 試験紙で PH8~9 にある事を確認した。トリプシンを各サンプルに 1.25 μg ずつ添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ にて 12 時間インキュベートした。10 μl 30% TFA を加え、トリプシンの反応を止めた。C18 (逆相交換体) STAGE Tip (5) で精製し、精製物を 2%ACN/0.1%TFA 溶解タンパクとして 1 μg 分のペプチドを液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 Thermo SCIENTIFIC 社 LTQ Orbitrap Velos にアプライした。続いて、以下のように膜分画のタンパク質を溶出し再解析を行った。細胞に 20 μl Lysis buffer (4 M urea, 2 M Thiourea, 4% デオキシコール酸ナトリウム, protease and proteasome inhibitor) を加えて Grinding Kit (GE healthcare) のビーズでホモジナイズし、遠心後上清を回収した。遠心後のペレットに 20 μl Lysis buffer を加え、sonication (UCD250 にて 5min (30 sec, 30 sec interval))

を行った。上清とペレットと混ぜ合わせ、終濃度 10 mM DTT を加え 30 分間、室温にて振盪した。次に終濃度 10 mM ヨードアセトアミドを加え 30 分間、室温にて振盪した。得られた lysate を Quant-iT protein Assay Kit (Invitrogen) を用いてタンパク質量の定量を行った。液量を 25 μl に揃え、Lys-C を 1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ に調整し、サンプルに 10 μl ずつ添加した。37 $^{\circ}\text{C}$ にて 3 時間インキュベートし、500 mM の TEAB (iTRAQ 試薬に付属のもの) を 150 μl 加え、ウレアの終濃度を 1 M にし、PH 試験紙で PH8~9 にある事を確認した。トリプシンを各サンプルに 2 μg ずつ添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ にて 16 時間インキュベートした。8 μl 30% TFA を加え、トリプシンの反応を止めた。200 μl の酢酸エチルを加え、遠心後、上清を廃棄し、スピードバックにてペレットを乾燥させた。C18 (逆相交換体) STAGE Tip (5) で精製し、精製物を 2%ACN/0.1%TFA 溶解タンパクとして 1.6 μg 分のペプチドを液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 Thermo SCIENTIFIC 社 LTQ Orbitrap Velos にアプライした。解析結果は Thermo SCIENTIFIC 社 Proteome Discoverer 検索にてペプチドを同定し、Progenesis によりタンパク質発現差異解析を行った。

(4) フローサイトメトリー

SCID マウスの脾臓から分離した mATL 細胞 (1×10^7 cells) 1,500 rpm, 3 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ で遠心し、2 ml の 2% fetal bovine serum (FBS) 含有 phosphate buffered saline (PBS) で洗浄後、1,500 rpm, 3 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ で遠心し、100 μl の 2% FBS 含有 PBS に懸濁した。抗 CD16/32 抗体を添加、混和し、30 分間、4 $^{\circ}\text{C}$ 、暗所で反応させた。その後 2 ml の 2% FBS 含有 PBS で洗浄した。続いて抗 CD38-PacificBlue 抗体、抗 CD71-PE-Cy7 抗体、抗 CD117-PerCP-Cy5.5 抗体、抗 CD44-FITC 抗体、抗カドヘリン抗体を添加、混和し、30 分間、4 $^{\circ}\text{C}$ 、暗所で反応させた。その後 2 ml の 2% FBS 含有 PBS で洗浄した。続いて抗ウサギ IgG-APC 抗体を添加、混和し、30 分間、4 $^{\circ}\text{C}$ 、暗所で反応させた。処理した細胞はフローサイトメトリー (FACS CantoII) を用いて解析した。

(5) 抗カドヘリンモノクローナル抗体の作成
モノクローナル抗体作成用の抗原としてコムギ無細胞タンパク質合成系を用いてカドヘリンの N 末領域を作成した。コムギ無細胞タンパク質合成系は WEPRO[®] 7240H expression kit を用い、全自動タンパク質合成装置 Protomist[®] DT II により行った。合

成したタンパク質を抗原として常法によりマウスモノクローナル抗体を作成した。

(6) mATL 細胞 SCID マウス移植実験

SCID マウスの脾臓から mATL 細胞を分離し、次に細胞を抗 CD16/32 抗体および抗カドヘリン抗体もしくはコントロールウサギ IgG と反応させ、続いて抗ウサギ IgG マイクロビーズと反応させ MACS カラムで抗体陽性分画を除去した。カドヘリン陽性細胞およびコントロール抗体陽性細胞を除去した細胞集団を 1×10^6 個/頭で 6 週齢の SCID マウス 5 頭に腹腔内投与した。mATL 細胞移植後 35 日目にマウスを安楽死させ、脾臓の重量測定と末梢血中の白血球数計測を行った。これらの動物実験は国立感染症研究所実験動物委員会の承認のもとに行われた。

4. 研究成果

2×10^6 cells の mATL 細胞を SCID マウスに腹腔内投与し、1 ヶ月経過した SCID マウスの脾臓から 1.5×10^9 cells の mATL 細胞を分離した。MACS を用いて CD38 陰性細胞を濃縮した所、 1.2×10^8 cells の細胞が得られた。得られた細胞を全て使いソーティングした結果、 3.6×10^5 cells の CD38(-), CD71(-), CD117(+) の mATL 細胞を得る事ができた。これらの細胞から細胞質分画および膜分画のタンパク質を抽出し質量分析計によるタンパク質発現差異解析を行った。細胞質画分の解析では、がん幹細胞では 86 個のペプチド、非がん幹細胞では 208 個のペプチドが同定され、Progenesis で解析した結果、236 個のタンパク質の定量比較解析を行う事ができた。一方、膜画分の解析では、がん幹細胞では 197 個のペプチド、非がん幹細胞では 533 個のペプチドが同定され、Progenesis で解析した結果、517 個のタンパク質の定量比較解析を行う事ができた。これらの膜タンパク質の中から、癌幹細胞表面に発現している可能性のある膜タンパク質カドヘリンの 1 分子を新たな mATL 癌幹細胞のマーカーとして同定した。そこで、mATL 癌幹細胞の表面マーカーとして同定されている CD38、CD71、CD117、CD44 の発現とカドヘリン発現との関係性をマルチカラーフローサイトメトリーにより解析したところ、カドヘリンは CD38(-), CD71(-), CD117(+) CD44(+) という細胞集団で発現量が一番高く、造血前駆細胞のマーカーとして知られる CD117 発現と非常に高い相関を示した。このカドヘリンは非古典的カドヘリンに分類され、正常の幹細胞での発現は報告されていない。また、我々の実験系においても、このカドヘリンは非癌幹細胞での発現がほとんど見られず、mATL 癌幹細胞に特異的に発現している。このような理由から、mATL 細胞に

よって起こる白血病の良い治療標的になることが考えられた。

そこで、このカドヘリンの *In vivo* における白血病形成への影響を評価するために SCID マウスに移植した mATL 細胞の白血病形成能がカドヘリン発現細胞除去により抑制されるかを検討した。 1×10^6 個のカドヘリン発現細胞を除去した mATL 細胞を移植した場合も移植後、約 1 ヶ月で白血病を発症し、脾臓内に異型リンパ球の浸潤が認められた。しかしながら、明らかな有意差はないものの末梢血中のリンパ球数はコントロール群に比べカドヘリン発現細胞除去群において低い傾向が見られた。 1×10^6 個の mATL 細胞中には約 300 個の癌幹細胞が存在するが、今回の処理では全ての癌幹細胞が除去できていないと考えられた。

上記の実験の細胞除去に用いた抗体はポリクローナル抗体であり特異性が低く全ての癌幹細胞を除去する事ができなかった可能性が考えられた。そこで、カドヘリンを標的としたモノクローナル抗体による治療実験を行うために、カドヘリン特異的マウスモノクローナル抗体の作成を試みた。まず、モノクローナル抗体を作成するためにコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて、抗原となるカドヘリンの合成を試みた。カドヘリンは巨大な膜タンパク質であり抗原を得ることが難しいことから、活性に重要な N 末領域のみを合成した。条件を至適化し、大量合成をして最終的に 3.6mg の精製タンパク質を得た。さらに、このタンパク質をマウスに免疫し、常法によりモノクローナル抗体を作成した。一次スクリーニングとして免疫に用いたタンパク質を抗原とした ELISA を行い、41 クローンのモノクローナル抗体を得た。更に細胞膜上に存在する分子を認識する抗体を選択するために 293T 細胞の細胞表面上にカドヘリンの N 末領域を発現させ、フローサイトメーターによってモノクローナル抗体の選択を行った。その結果、計 12 クローンのモノクローナル抗体を得ることに成功した。今後、SCID マウスに移植した mATL 細胞の白血病形成に対する治療実験など更なる解析が必要となるが、これらのモノクローナル抗体はマウスにて mATL 発症を抑制することが期待され、カドヘリンを標的としたヒト ATL の新たな治療法の開発につながる可能性が考えられた。

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 8 件)

①鈴木 忠樹, 長谷川 秀樹: HTLV-1 と白血

2013 査読無

② Sasaki I, Hoshino K, Sugiyama T, Yamazaki C, Yano T, Iizuka A, Hemmi H, Tanaka T, Saito M, Sugiyama M, Fukuda Y, Ohta T, Sato K, Aina A, Suzuki T, Hasegawa H, Toyama-Sorimachi N, Kohara H, Nagasawa T, Kaisho T. Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development. Blood. 2012 Dec 6;120(24):4733-43. 査読有 doi: 10.1182/blood-2012-06-436527

[学会発表] (計5件)

① Tadaki Suzuki, Akiko Okayama, Takahiro Tsuji, Akihide Ryo, Hisashi Hirano, Tetsutaro Sata, William W. Hall, Hideki Hasegawa. Comparative proteomic analysis of cancer stem cells in a Tax-transgenic (Tax-Tg) mouse model of adult T-cell leukemia/lymphoma. The 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Retroviruses, Belgium, June 4-8, 2011. Oral presentation.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 忠樹 (SUZUKI TADAKI)

国立感染症研究所・感染病理部・研究員

研究者番号: 30527180

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし