

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700982

研究課題名(和文) 血管免疫芽球性T細胞リンパ腫(AITL)のがん幹細胞探索と病態解明

研究課題名(英文) A cancer stem cells search and pathogenesis elucidation of AITL

研究代表者

伊藤 旭(Ito, Asahi)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00571762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：我々は免疫不全マウスであるNOGマウスにAITLの新鮮患者検体を移植したAITLモデルマウスを樹立した。このモデルはヒトAITLの多彩な病像を非常によく反映していた。AITL新鮮腫瘍細胞をNOGマウスに移植し継代移植をする過程でAITLの腫瘍細胞と共に再現されたガンマグロブリン産生やBリンパ球・形質細胞の増殖は観察できなくなり、腫瘍細胞のみが増殖してくることがわかった。すなわちAITLの多彩な病像を観察できるのは最初に移植した初代のモデルマウスのみということが明らかになった。継代移植をする過程で、より生着する力の強い腫瘍細胞本体のみが生き残り、それ以外の部分は失われていくものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We established the AITL model mouse which transplanted fresh patient samples of AITL to the NOG mouse which was an immunodeficiency mouse. This model reflected various condition of human AITL very well. We could not observe a gamma globulin production and the growth of B lymphocyte, plasma cells reproduced with tumor cells of AITL in a process that AITL fresh tumor cells were transfused into NOG mouse and made transplantation, and only tumor cells were found to grow. In other words, as for that we could observe various pictures of AITL, a thing only the first model mouse which we transplanted was found first. Only the strong tumor cells main body of the power to engraft more in a process to make transplantation survived it, and it was thought that other part were lost.

研究分野：腫瘍生物学

科研費の分科・細目：若手研究(B)

キーワード：AITL NOGマウス モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

近年の幹細胞生物学の進歩に伴い、発がん過程を正常組織と同様に幹細胞システムという観点からとらえる考え方が脚光を浴びており、がん細胞の源となる“がん幹細胞”(Cancer Stem Cell: CSC)の存在が多くのがん種で証明されている。一方、成熟リンパ系腫瘍の悪性リンパ腫幹細胞 (lymphoma stem cell: LSC) システムは、いまなお解明の糸口さえ得られてない。成熟リンパ系腫瘍細胞は、正常造血システムのリンパ球分化の比較的后半の細胞と同様のフェノタイプを有しており、分化したリンパ球が腫瘍化し LSC として機能していることが推定される。ゆえに、これまでによく解析されている造血幹細胞周辺細胞の正常造血システムと、成熟リンパ系腫瘍の LSC システムが大きく異なることが推定され、そのことが成熟リンパ系腫瘍の LSC の探索・同定を困難にしている最大の要因と考えられる。末梢 T/NK 細胞リンパ腫の一型である血管免疫芽球形 T 細胞リンパ腫 (angioimmunoblastic T-cell lymphoma: AITL) は、その臨床像や組織像において特徴的な所見をしめす。全身のリンパ節腫脹や発熱の他に、多クローン性の高 γ グロブリン血症や肝脾腫、自己免疫疾患の合併など多彩な臨床症状・所見を呈し、また病理組織学的にも、腫瘍細胞である単クローン性の T 細胞の他に、多クローン性の B 細胞や形質細胞など種々の細胞が出現する。治療法に定まったものはなく、悪性リンパ腫の化学療法として一般的な CHOP 療法等が行われ、ときに自家末梢血幹細胞移植併用の大量化学療法が選択される。しかし治療には反応するものの、早期に再発して治療抵抗性となることが多く、全生存期間の中央値は 15~36 ヶ月と予後不良である。一方この AITL の発生母地として近年注目されているのが、リンパ節の濾胞胚中心に存在し B リンパ球のクラススイッチと抗体産生を助けている濾胞ヘルパー T 細胞 (Follicular helper T cell: Tfh) である。この Tfh の作用のため AITL ではポリクローナルな高 γ グロブリン血症を伴うとされている。申請者らのグループは、難治性成熟 T 細胞性腫瘍の病態解析およびこれに対する分子標的治療の開発研究を行っている。(研究業績 3, 5, 6, 7, Br J Haematol. 140:586-9, 2008., Int J Cancer. 120:2052, 2007., Clin Cancer Res. 13:6494, 2007., Leuk Res. 31: 915, 2007., Mod Pathol. 20:648, 2007., Int J Cancer. 118:3054, 2006., Cancer Res. 66:5716, 2006., Leukemia. 20:2162, 2006., Clin Cancer Res. 11:

2327-36, 2005., Cancer Sci, 97: 1139, 2006., Int J Hematol. 82:148, 2005., Clin Cancer Res. 10:7529, 2004., Clin Cancer Res. 10:5494, 2004., Cancer Res. 64:2127, 2004., Clin Cancer Res. 9:3625, 2003.)

申請者らのグループが協和発酵キリン(株)との産学共同研究で開発した低フコース型 CCR4 抗体(KW-0761)は、申請者らのグループを中心に 2006 年 7 月から再発性/難治性 CCR4 陽性 T 細胞性腫瘍に対する臨床第 I 相試験を開始するに至った (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00355472)。悪性腫瘍に対する抗体薬の臨床応用が欧米諸国に先駆け、日本で開始されたのは本 CCR4 抗体が初めてのことであり、その後も現在に至るまで例がない。さらに本臨床試験は、次世代型低フコース抗体が悪性腫瘍の治療に使用された世界初の臨床試験という点でも世界中の注目を集めた。2008 年 8 月に本第 I 相臨床試験の全患者登録が終了し、第 II 相臨床試験の推奨用量を 1.0 mg/kg に決定した (**J Clin Oncol. 28:1591-8 2010**)。第 II 相試験は 2009 年 6 月より開始されている (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00920790)。これらの成果が基盤となり、2009 年 5 月からは CCR4 抗体の難治性 T 細胞性腫瘍に対する臨床第 I/II 相試験 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00888927) が米国で開始となった。

この難治性成熟 T 細胞性腫瘍に対する新規抗体療法開発のトランスレーショナルリサーチの過程で、抗体薬の前臨床 in vivo 評価システム確立のため申請者らは、重度免疫不全マウス、NOD/Shi-scid, IL-2R γ ^{null}(NOG) マウスを用いて複数の成熟リンパ系腫瘍モデルを作成した(業績 3, 6, 7)。これらの腫瘍モデルから得られた腫瘍細胞を 2 次、3 次移植しモデルを再現する実験を行った。

そして申請者らは、AITL 患者のリンパ節由来の腫瘍細胞を NOG マウスに移植・生着させ、AITL モデルマウスを樹立することに成功した。このモデルマウスでは、腫瘍であるモノクローナルな T リンパ球が肝臓・脾臓・骨髄など全身の臓器に浸潤し、その組織には、ヒトの AITL 組織でみられるのと同じく、反応性の B 細胞や形質細胞がみとめられ、血清でヒト γ グロブリンの産生をみとめた。また、腫瘍細胞は、AITL の発生母地として報告されている Tfh のマーカーである bcl-6 が陽性であった。このように、ヒトの AITL の多彩な病像を忠実に再現できるモデルマウスの樹立に成功した。

2. 研究の目的

治療法の改善には病態の解明が不可欠である。本研究は、AITL のがん幹細胞を探索し、病態を解明することにより、その病態に沿った有効な治療法の開発につなげることを目的とした。すなわちこの NOG マウスを用いた移植継代を基盤実験手法として、未だ明らかになっていない AITL のがん幹細胞を同定し、病態を解明することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

H24 年度

(1) AITL モデルマウスの作製

本研究の第一段階は免疫不全マウスでの AITL モデルの作製と解析である。申請者らの研究計画の特徴はあくまでも患者由来の腫瘍細胞を用い、『細胞株』を用いた実験を行わないことである。正常造血幹細胞の維持には『ニッチ』といわれる微小環境が必須であり、がん幹細胞にもニッチが必要であると推定される。患者由来の悪性リンパ腫細胞をカルチャーフラスコ内で培養すると、通常数日で死に至るが、その最大の要因はカルチャーフラスコ内にニッチが存在しないことと考えられる。細胞株はカルチャーフラスコの中で、増殖・維持が可能であり、ニッチがなくとも自己複製が可能な特殊な細胞群といえる。したがって申請者らの研究では、患者由来の悪性リンパ腫腫瘍細胞を用いる。従来までの免疫不全マウス (SCID マウス、NOD/SCID マウス) では、患者由来の悪性リンパ腫細胞を生着させ、そのモデルを作製するのは極めて困難であった。ゆえに、患者由来の腫瘍細胞を用いた悪性リンパ腫の *in vivo* での病態解明には限界があった。しかしながら、より免疫不全の強いマウスの開発が、それを比較的高率に可能とした。NOD/Shi-*scid*, IL-2R^{nu1} マウス (NOG マウス) の開発である。NOG マウスは、従来までの免疫不全マウスと比較して、多様なヒト細胞が分化・増殖することが可能である。申請者らは既に複数の患者由来の悪性リンパ腫細胞と、NOG マウスを用いて、継代可能な NOG/患者由来悪性リンパ腫モデルマウスを作製してきた (研究業績 3)。申請者らはこれらのモデルマウスが、悪性リンパ腫細胞を提供下さった患者の臨床像をほぼ忠実に再現することを確認している。

そして今回、AITL のモデルマウスも、その腫瘍細胞のみならず、B 細胞や形質細胞、そして血清中のヒト グロブリンの産生など、AITL 患者の病態を忠実に再現していることが確認できた。

したがって H24 年度は、さらに新たな AITL 患者の検体も用いて NOG マウスモデ

ルを作成し、再現できた腫瘍組織の解析を行う。

(2) 長期間にわたる造腫瘍能の高い AITL 腫瘍細胞集団の同定、単離

これまでの NOG/患者由来悪性リンパ腫モデルマウス作製の経験から、NOG マウスにおけるヒト悪性リンパ腫細胞の浸潤臓器には、悪性リンパ腫の組織型毎の、あるいは患者の臨床像毎での特定の傾向が示唆されている。はじめに申請者らは、『がん幹細胞』を維持する生物学的適所であるニッチに注目し、NOG マウス体内での悪性リンパ腫細胞の浸潤臓器に焦点をあて、悪性リンパ腫細胞を分離する。すなわち、NOG 体内の悪性リンパ腫細胞を、リンパ組織、骨髄、末梢血、その他の臓器、など存在臓器別細胞群に分離する。これらの細胞群を NOG マウスに移植し、造腫瘍能を評価する。この際、造腫瘍能の強い細胞群のなかにより多くの LSC が存在すると考えられる。次に造腫瘍能の強い細胞群と造腫瘍能の弱い細胞群において、複数のリンパ球関連抗原の発現プロファイルをフローサイトメトリー法で解析、比較する。この際、より造腫瘍能の強い細胞群で強く発現し、また健常リンパ球の分化抗原と対比し、より未熟な細胞群で発現の強い抗原を選定する。仮にここまでの実験で選定した表面抗原を A, B, C, D, E, F, G とする。そして、先の移植実験で同定した『造腫瘍能の強い細胞群』をさらに A, B, C, D, E, F, G の発現の強弱あるいは有無により群分けし、NOG マウスで継代実験を行い、造腫瘍能を評価する。すなわち H24 年度に、長期間にわたる造腫瘍能の高い悪性リンパ腫腫瘍細胞集団を同定、単離する。

H25 年度

H25 年度に同定、単離した、NOG マウスにおいて長期間にわたる造腫瘍能の高い AITL 腫瘍細胞集団とそれ以外の集団の genetic な相違を cDNA micro array, SNP array で比較、解析する。

健常 HSC においては、自己複製能・生存に必須の遺伝子として *PML*, *Bmi1*, シグナルとして *Notch*, *Wnt/ -catenin*, *Sonic hedgehog* などが知られている。最も未熟な段階の細胞である健常 HSC を維持するこれらの遺伝子やシグナルが、成熟リンパ球まで分化した細胞の腫瘍である悪性リンパ腫の『がん幹細胞』と共通するか否かは不明である。これら HSC に必須な遺伝子、シグナル経路を、cDNA micro array, SNP array の結果と考え合わせ、AITL の『がん幹細胞』を規定する遺伝子候補をいくつか同定する。これらの遺伝子について、shRNA または siRNA による遺伝子ノックアウト、またはレト

ロウウイルスなどによる遺伝子ノックインにより、それらの遺伝子の機能を詳細に解析し、成熟リンパ系腫瘍である AITL の『がん幹細胞』を同定する。

なお、申請者等はここに申請する研究に必要な、NOG マウスの扱い、細胞分離、分子生物学的な解析等に必要な学問的・技術的基盤を有している。

4. 研究成果

以前のモデルや新たなモデルマウスの各続き由来の腫瘍を打ち分けたモデルを作成し、造腫瘍能の高い AITL 腫瘍細胞集団を同定、単離して、造腫瘍能の高くない AITL 腫瘍細胞集団との遺伝子的な相違について、比較・解析する予定であったが、継代移植をする過程で AITL の腫瘍細胞とともに再現されたガンマグロブリン産生や、B リンパ球・形質細胞の増殖は観察できなくなり、腫瘍細胞のみが増殖してくることがわかった。すなわち AITL の多彩な病像を観察できるのは最初に移植した初代のモデルマウスでのみということが明らかになった。継代移植をおこなう過程で、より生着する力の強い腫瘍細胞本体のみが生き残り、それ以外の部分は失われていくものと考えられた。つまりガンマグロブリンや B リンパ球・形質細胞の増殖は少なくともマウス体内での増殖には必須ではなく、腫瘍細胞の中にあるがん幹細胞による働きで AITL 腫瘍細胞単独での生存・増殖が可能であることが示された。

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 1 件)

Sato F, Ishida T, Ito A et al.
Angioimmunoblastic T-cell lymphoma mice model. Leuk Res. 2013
Jan;37(1):21-7.
DOI : 10.1016/j.leukres.2012.09.009

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 旭 (Ito Asahi)
名古屋市立大学医学研究科・助教
研究者番号 : 00571762