

博士論文

論文題目

マルチカラーフローサイトメトリーを用いた

成人 T 細胞白血病の病態解析

氏名 石垣 知寛

目次

1. 要旨	5
2. 序文	6
2-1. 本研究の背景	
2-1-1. 当研究が対象とする成人 T 細胞白血病/リンパ腫について	6
2-1-2. ATL 細胞数を定量する事の困難と、従来法の問題点	9
2-1-3. 基礎研究における ATL 細胞の分画法の確立の必要性	12
2-1-4. ATL 細胞の細胞表面抗原の特徴	12
2-1-5. ATL における病態進行の評価法の必要性	13
2-1-6. 腫瘍と癌幹細胞モデル	14
2-1-7. マウス間葉系細胞とヒト細胞の共培養系	17
2-1-8. CADM1 という細胞表面抗原について	18
2-2. 本研究の目的と着眼点	19
3. 材料と方法	21
3-1. 患者検体	21
3-2. 末梢血単核細胞 (PBMC) 分離	22
3-3. マルチカラーフローサイトメトリーを用いた細胞表面 抗原の網羅的解析	22
3-4. 細胞表面抗原の網羅的解析以外のフローサイトメトリー	26
3-5. フローサイトメトリーのソーティング	27
3-6. フローサイトメトリー結果の解析	27
3-7. 細胞培養 (共培養) と、培養後の ATL 細胞数の評価	28
3-8. Inverse PCR 法	30
3-9. HTLV-1 プロウィルス量 (PVL) の算定	31

3-10. HTLV-1 bZIP factor (HBZ) の PCR	32
3-11. 臨床検査法としての解析	33
3-12. フローサイトメトリーにて定量する ATL 細胞数と 形態学的に評価する異常リンパ球数の相関性の解析	37
3-13. 生存期間 (Disease-specific survival) の解析	37
3-14. サイトスピンとライトギムザ染色	38
3-15. 統計学的解析	38
4. 結果	39
4-1. ATL における CD4 陽性細胞は主に 3 画分に分類される	39
4-2. CD4 陽性細胞における CD7 vs. CADM1 プロットは、 病態の進行を反映する	41
4-3. 急性型 ATL において異常リンパ球は CD7N ¹⁶ 画分に 高度に濃縮される	41
4-4. 急性型 ATL において末梢血の CD7N ¹⁶ 細胞数は、熟練した 検査者が評価する異常リンパ球数と高度に相関する	42
4-5. 急性型 ATL において化学療法前後の末梢血 CD4 陽性 細胞における CD7N ¹⁶ 細胞割合の変化は、化学療法感受性 や予後を反映する	43
4-6. ATL 細胞は他の CD4 陽性細胞と比較し、特徴的な 細胞表面抗原抗原の発現パターンをとる	44
4-7. 急性型 ATL 細胞は MS-5 なしでは生存・増殖不可能である	45
4-8. 2 週間の共培養結果に影響を与える因子として、 CD71、CD25、CD62L がある	46
4-9. MS-5 上で生存・増殖可能な細胞は主に CD4+CADM1+/CD71-CD25+ (S 画分) に濃縮される	47
4-10. S 画分の細胞は化学療法抵抗性である	49
4-11. 細胞ヒエラルキー解析 (SPADE 解析) と S 画分	49

5. 図表とその説明	51
図 1	51
図 2	55
図 3	57
図 4	59
図 5	61
表 1	63
図 6	64
図 7	68
図 8	71
図 9	74
図 10	78
図 11	80
6. 考察	82
7. 謝辞	94
8. 引用文献	96

1：要旨

成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (ATL) は、HTLV-1 感染を原因として発症する予後不良の疾患であり、その詳細な解析法の確立や、増殖機序の解明・新規治療法の開発が求められている。

本研究では、基礎的検討によりマルチカラーフローサイトメトリーを用いた ATL の分画法を確立し、臨床検査、病態解析、基礎研究に応用した。

この分画法を用いて作り上げた臨床検査法は急性型 ATL 患者末梢血の腫瘍細胞を定量可能とし、化学療法感受性や予後の評価も可能であった。

また、この分画法を用いて急性型 ATL の ATL 細胞のみを取り出し、2週間培養した結果、間葉系細胞上にて生存・増殖可能な細胞は CD4+CADM1+CD71-CD25+ の画分に主に濃縮され、様々な検討からこれらは ATL 前駆細胞である可能性が示唆された。

2：序文

2-1：本研究の背景

2-1-1：当研究が対象とする成人 T 細胞白血病/リンパ腫(ATL)について

成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (Adult T-cell leukemia/lymphoma、ATL) (1)は末梢性 T 細胞リンパ腫(PTCL)の一つであり、レトロウィルスであるヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) の感染が原因である (2-6)。PTCL は非ホジキンリンパ腫の中で予後不良の疾患であるが、ATL はその中で最も予後不良の疾患であり (7)、造血器腫瘍の国際分類 (WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues 4th Edition) においても独立した病型として定義されている。加えて日本に特に多い疾患であり、世界にさきがけて、その詳細な増殖メカニズムの解明や、新たな治療法の開発が求められている。

母乳感染や経胎盤・経産道感染にて多くは出生時に HTLV-1 感染後、平均約 50-60 年という長い潜伏期を経て、キャリアの約 5% が ATL を発症する。ATL は下山分類 (表 a) により、くすぶり型、慢性型、リンパ腫型、急性型に分類され (8)、この分類は診断や治療にも広く用いられている。また、急性型やリンパ腫型と予後不良因子 (血清 BUN 高値、血清 LDH 高値、血清アルブミン低値) を持つ慢性型は Aggressive ATL に分類され、それ以外の慢性型やくすぶり型は Indolent

ATL と呼ばれる。Aggressive ATL の予後は極めて不良であり、急性型 ATL の平均生存期間はわずか 6.2 ヶ月、4 年生存率はわずか 5%であった(8) (図 a)。

Aggressive ATL は治療の対象となるが、従来の化学療法では予後の改善が認められず、そのため、強い副作用と引き換えに細胞毒性を強めた多剤併用化学療法が施行される(9, 10)。標準的な治療としては、mLSG15 (VCAP-AMP-VECP) 療法(11)があるが、これらの治療にて一時的に寛解を得られたとしても寛解状態が続くことはまれで、すぐに治療抵抗性となり早期に再発をすることも多い。そのため、平均生存期間はわずか 10.9 ヶ月である(11)。唯一の長期生存可能な根治術は造血幹細胞移植であるが、発症者に高齢者が多いため適応とならないことが多く、移植前に病勢を抑えきれず移植にたどりつかない場合も少なくない、移植にたどりついていても治療死する場合が一定数存在するなど、多数の問題が存在しているのが現状である。

過去の臨床データの蓄積から、東京大学医科学研究所附属病院において、造血幹細胞移植可能な症例に関しては、化学療法にて病勢をコントロール後、造血幹細胞移植を施行するのが基本治療指針となっているが、それには化学療法感受性や予後、病勢を評価する正確な方法の確立が必要であった。また、上述の通り、急性型 ATL は抗癌剤治療に抵抗性の難治疾患であり、急性型 ATL を根

治するためには、新たな治療法の開発が強く求められている。

表 a : ATL の診断基準 : 下山分類 (8)

	くすぶり型 (Smouldering type)	慢性型 (Chronic type)	リンパ腫型 (Lymphoma type)	急性型 (Acute type)	
抗 HTLV-1 抗体	陽性				
リンパ球数 [μ L]	4000 未満	4000 以上 (a)	4000 未満	※	
異常リンパ球 (%)	5%以上	あり (b)	1%以下	あり	
Flower cell / 花細胞	時折	時折	なし	あり	
LDH	正常上限の 1.5 倍以下	正常上限の 2 倍以下	※	※	
補正 Ca 値 [mEq/L]	正常	正常	※	※	
組織で確認された リンパ節病変	なし	※	あり	※	
腫瘍病変	皮膚病変	※※	※	※	※
	肺病変	※※	※	※	※
	リンパ節腫大	なし	※	あり	※
	肝腫大	なし	※	※	※
	脾腫大	なし	※	※	※
	中枢神経	なし	なし	※	※
	骨	なし	なし	※	※
	腹水	なし	なし	※	※
	胸水	なし	なし	※	※
	消化管	なし	なし	※	※

※ : ほかの病型で規定される条件以外の制約はない。

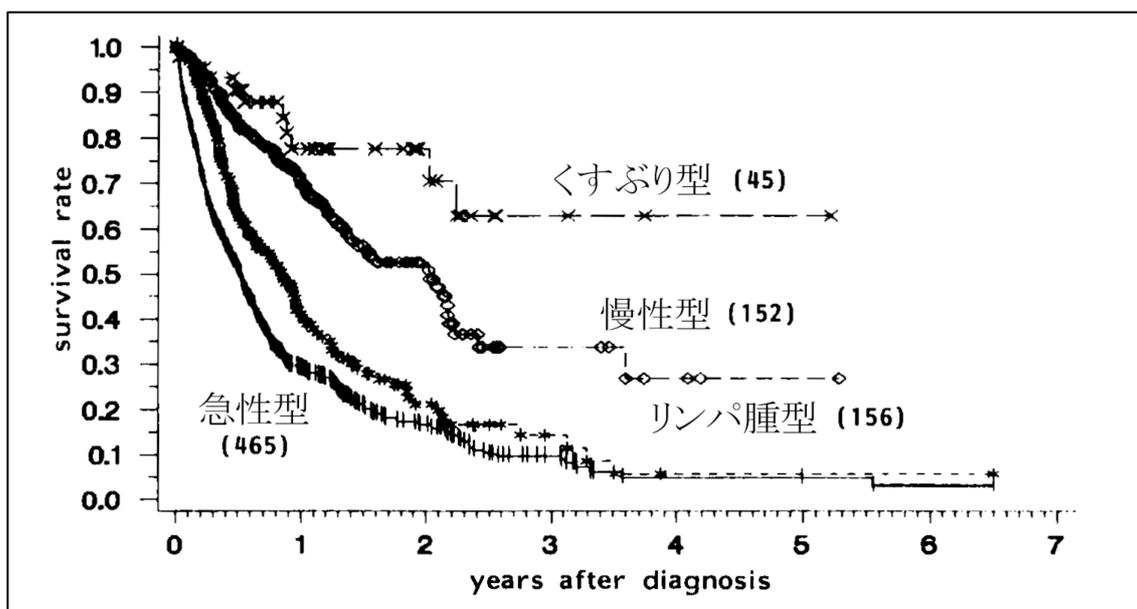
※※ : 他の条件を満たせば必須ではない。しかし、異常リンパ球が末梢血で 5 %

以下の場合、組織で確認される腫瘍病変が必要である。

(a) : Tリンパ球の増加 ($3500/\mu\text{L}$) を伴うことが必要である。

(b) : 異常リンパ球が5%以下の場合、組織で確認される腫瘍病変の存在が必要である。

図 a : 成人 T 細胞白血病の各分類と予後 (8) (原著論文より引用/一部改変)



2-1-2 : ATL 細胞数を定量する事の困難と、従来法の問題点

臨床・治療の場において、Aggressive ATL を化学療法にて治療し、その治療効果を評価するにあたって、末梢血中の ATL 細胞数の測定は重要かつ本質的な評価である。形態学的に、核に特有な花弁状の切れ込みを持つ異常リンパ球

(Flower Cell) が ATL 細胞の特徴ではあるが (図 b)、ATL 細胞は典型的な Flower Cell にならない事も多く、症例間でも形態に差があるのが特徴である。また、ATL の病理像においても、サイズや形態に多様性を持つ異常リンパ球の増殖が大きな特徴である (12)。

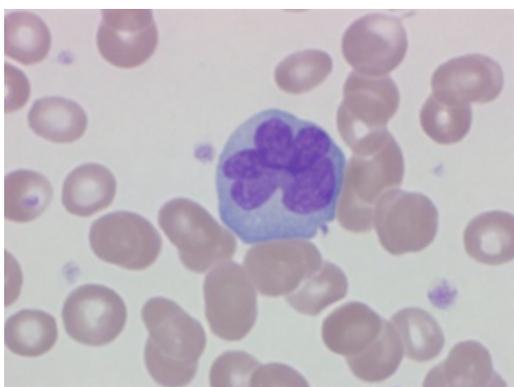


図 b:ATL 患者の末梢血に認められる Flower Cells

このような理由にて、目視での異常リンパ球の診断、特に反応性の異型リンパ球と ATL 細胞の判別はしばしば困難であり、それ故に検者間誤差も生じやすい。実際に、病院 (検査者) 間で異常リンパ球の割合の報告が大きく異なる経験をする事も少なくなく、ATL においては、正確な腫瘍細胞数の評価すら困難な状況であり、形態学的に評価する異常リンパ球数よりも、より正確な評価方法の開発が求められていた。

また、ATL 細胞数を正確に評価することは不可能であったが、様々な研究者が

ATL 細胞数を反映するようなマーカーを探し、検討を重ねてきた(13-19)。その中で、現在最も用いられているのは、リアルタイム PCR 法を用いて定量する末梢血単核細胞(Peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中の HTLV-1 プロウイルス量(Proviral Load, PVL)である(15-19)。PVL の単位は[copies/100 PBMCs]であり、患者 PBMC における HTLV-1 感染細胞率を反映するマーカーではあるが、いくつかの問題点をはらんでいる。

第 1 に、PVL は PBMC 中の HTLV-1 陽性細胞の割合であり、絶対数ではないため、PBMC の他画分の細胞数に影響を受けてしまう。第 2 に、PVL は HTLV-1 感染の指標であるため、HTLV-1 感染細胞の ATL 細胞への進展や ATL 細胞の割合を評価できない。第 3 に、まれではあるが ATL 細胞に複数の HTLV-1 が感染することが報告されており、その場合、PVL は HTLV-1 陽性細胞数や ATL 細胞数を過大評価することとなる。第 4 に、何よりも PVL の測定値が測定施設によって大きく異なるという大きな問題があり、より一層の標準化が必要な状態である(20)。加えて、Real-time PCR を用いた定量法は時間も労力もかかり、臨床の場で頻用するのは困難である。

2-1-3 : 基礎研究における ATL 細胞の分画法の確立の必要性

基礎研究においても、HTLV-1 感染 ATL 細胞と非感染 CD4 陽性 T リンパ球の識別・分離は重要である。患者体内においては、進展した一部の ATL 細胞を除いて、CD4 陽性 T 細胞に感染する HTLV-1 のコピー数は一般に 1 copy/cell であり PVL が 100 [copies/100 PBMCs] を越えることはまず無い。しかし、*in vitro* モデルや *in vivo* モデルを用いて HTLV-1 感染 ATL 細胞と非感染リンパ球を共培養させると、患者体内で見られないような異常な HTLV-1 感染をおこし、200% を越えるような PVL 高値を引き起こすことや、非腫瘍細胞由来のセルライン (HTLV-1 transformed cell-line) 樹立が報告されており、HTLV-1 感染細胞のみを正確に取り出すことが、培養上も重要と考えられた。

2-1-4 : ATL 細胞の細胞表面抗原の特徴 (フェノタイプ)

ATL で発現レベルが低下する細胞表面抗原としては、CD7、CD26(21)、発現が見られるものとしては、CD4、CD25、CD30(22)、CD70(23)、CD134/OX40(24)、CD194/CCR4(25)、TSLC-1(26)、TCR $\alpha\beta$ 、NY-ESO-1(27)などが報告されていた。しかし、これらの細胞表面抗原は他の健常リンパ球でも発現しているか、あるいは、症例や ATL 細胞によって発現が多様であると考えられており、HTLV-1 感

染 ATL 細胞と非感染リンパ球を明瞭に分類するような細胞表面抗原は報告されていなかった。

2-1-5 : ATL における病態進行の評価法の必要性

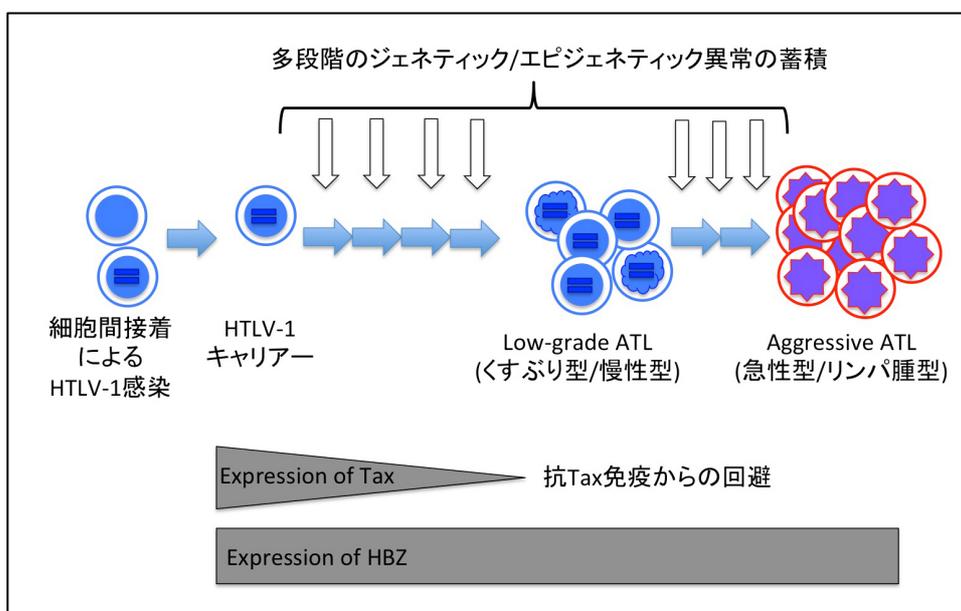
また、HTLV-1 キャリアから、くすぶり型や慢性型 ATL などの indolent ATL を経て、リンパ腫型や急性型などの Aggressive ATL へと至る病期の進行には、遺伝子異常やエピジェネティックな異常の蓄積による多段階発癌が疑われている (図 c)。統計学的には、5 ステップ以上の異常の蓄積が想定されているが、そのメカニズムは未だによく分かっていない。加えて、ATL 発症の原因となる遺伝子異常や脆弱性遺伝子も未だに同定されていない。

臨床の場合においても、HTLV-1 キャリアや indolent ATL 患者は、現在の治療の必要はないが、その中の一部が将来的に aggressive ATL を発症する可能性があり、注意深く外来で経過観察をする必要がある。しかし、病態の進行の評価は困難であり、臨床の場合においても病期の進行を評価する方法の開発も求められていた。HTLV-1 キャリアにおいては PVL 4%以上の症例が ATL 発症のリスクが高いという報告 (28) がされ、ATL の急性型やリンパ腫型においては予後指標 ATL-PI (prognostic index) が考案され、 $0.65(\text{if stage= III or IV}) + 0.35(\text{if$

$ECOG\ PS > 1) + 0.016 \times age\ (years) - 0.36 \times albumin\ (g/dL) + 0.37 \times \log_{10}\ (sIL-2R\ [U/mL])$

とやや煩雑な計算式によりおおまかに3群に分けられることが報告されたが(29)、いずれも予後との関連を評価したものであり、病態の進行を評価するものではなかった。

図c HTLV-1感染からATLの発症まで



2-1-6 : 腫瘍と癌幹細胞モデル

従来、腫瘍は均一な細胞集団と思われてきたが、現在、多くの腫瘍は癌幹細胞 (Cancer Stem Cell)を頂点としたヒエラルキーを持った集団であると考えられており、様々な腫瘍において癌幹細胞画分の存在とそれらのマーカーが報告

されている（表 b）。

血液腫瘍も同様にヒエラルキーを持った集団であるとする、血液腫瘍を根治するには、癌幹細胞由来の大多数の腫瘍細胞ではなく、癌幹細胞そのものを殺傷することが必要である。しかし、癌幹細胞は各種の抗癌剤に耐性を示すと考えられており、化学療法によって腫瘍細胞の減少に成功しても、生き残った癌幹細胞による増殖の再開とともに再発する可能性がある。急性骨髄性白血病の一部においては、癌幹細胞マーカーの候補がいくつか同定されているが(30)、ATLをはじめとした多くの血液腫瘍において、特に成熟リンパ系腫瘍においては患者プライマリ細胞を用いて未だに癌幹細胞の同定にさえ成功していない。

表 b : 血液腫瘍以外の癌における既報の癌幹細胞のマーカーと画分

腫瘍の種類	癌幹細胞画分	画分割合	移植マウス	文献	年
脳腫瘍 (神経膠腫)	CD133+	19~29%	NOD/SCID	Nature (31)	2004
脳腫瘍 (髄芽腫)	CD133+	6~21%	NOD/SCID	Nature (31)	2004
頭頸部扁平上皮癌	CD44+	0.4~35.1%	RAG2/ γ C DKO NOD/SCID	PNAS (32)	2007
乳癌	CD44 ⁺ /CD24 ^{-/low}	11~35%	NOD/SCID	PNAS (33)	2003
乳癌	ALDH1+	3~10%	NOD/SCID	Cell Stem Cell (34)	2007
肺癌	CD133+	0.3~22%	SCID	Cell Death Diff (35)	2008
肝臓癌	CD90+/CD44+	0.74~6.2%	BALB/C-nu/nu	Cancer Cell (36)	2008
肝臓癌	CD133+/CD13+	2.0~15.4%	NOD/SCID	JCI (37)	2010
膵臓癌	CD44+/CD24+/ESA+	0.2~0.8%	NOD/SCID	Cancer Res (38)	2007
膵臓癌	CD133+(/CXCR4+)	1.1~3.2%	NMRI-nu/nu	Cell Stem Cell (39)	2007
腎癌 (腎細胞癌)	CD105+	4.8~11.4%	SCID	FASEB J (40)	2008
大腸癌	CD133+	1.8~24.5%	NOD/SCID	Nature (41)	2007
大腸癌	CD133+	0.7~6.1%	SCID	Nature (42)	2007
大腸癌 (結腸直腸癌)	EpCAM ^{high} /CD44 ⁺	0.03~38%	NOD/SCID	PNAS (43)	2007
悪性黒色腫	ABCB5+	1.6~20%	NOD/SCID	Nature (44)	2008
悪性黒色腫	CD271+	2.5~41%	RAG2/ γ C DKO	Nature (45)	2010
子宮癌 (子宮内膜癌)	CD133+	1.3~62.6%	NOD/SCID	Clin Cancer Research (46)	2009
卵巣癌	CD44+/CD117+	0.14~0.2%	BALB/c-nu/nu	Cancer Res (47)	2008
卵巣癌	CD133+	0.3~35%	NOD/SCID	Stem Cells (48)	2009
膀胱癌	CD44+/CK5+/CK20-	6.0~34.5%	RAG2/ γ C DKO	PNAS (49)	2009

2-1-7 : マウス間葉系細胞とヒト細胞の共培養系

急性型 ATL 由来の腫瘍細胞は液体培養下では増殖できない。また IL-2 などのサイトカインを加えても増殖ができないことが知られている。しかし、MS-5 (マウス間葉系セルライン) との共培養下において、大部分の細胞が死滅するものの、一部の細胞が Cobble Stone (敷石) 様の形態をとりながら増殖することが報告されていた (50)。

MS-5 は放射線照射した 8 週齢の C3H/HeNS1c マウスの骨髄由来の、骨髄間葉系細胞株である (51, 52)。ヒト細胞とマウス間葉系細胞 (HESS5、FBMD-1、MS-5 等) を用いた共培養については、過去にも正常造血幹/前駆細胞やヒト白血病細胞を増殖・分化させることができるという報告 (51, 53-55) があり、最近では、ヒトリンパ腫細胞が Cobble Stone 様の形態をとりながら増殖するという報告 (56) もある。他にも間葉系細胞との共培養を用いた Cobble Stone Assay は様々な幹細胞/前駆細胞の割合を計算する際に用いられている。

ゆえに、ATL 細胞と MS-5 との共培養において死滅せずに増殖する細胞が、ATL 前駆細胞、あるいはそれに近い性質を持った細胞と考えられた。

2-1-8 : CADM1 という細胞表面抗原について

本研究で利用した CADM1 (cell adhesion molecule 1) は、TSLC1、Nectin-2、SynCAM1、SgIGSF、IGSF4A と呼ばれる分子であり、免疫グロブリンスーパーファミリー細胞接着分子群 (IgCAM) に属する細胞間接着分子である。

TSLC1 (tumor suppressor in lung cancer 1) という別名が示す通り、CADM1 遺伝子はもともと非小細胞肺癌において失活する癌抑制遺伝子として同定され (57)、現在では上皮系の多くの癌でも癌抑制遺伝子として機能することが知られているが、成人 T 細胞白血病 (ATL) の末梢血リンパ球では高発現していることが 2005 年に報告されていた (26)。

正常組織では、mRNA の発現はリンパ球を除く大部分の臓器で検出され、上皮細胞において発現が認められる。特に肺、脳、精巣で上皮細胞間接着に関わっている (58)。

細胞表面の CADM1 は隣接細胞との接着部位に強く発現し、隣接細胞の CADM1 とホモ二量体を形成する。CADM1 を高発現させると細胞凝集能が亢進し (59)、逆に siRNA を用いて CADM1 をノックダウンすると接着能が低下し上皮系構造が失われる (60) ことから、上皮組織では細胞接着因子としての役割が研究においても確認されている。

2-2 : 本研究の目的と着眼点

本研究の目的は、まず、HTLV-1 感染細胞や、ATL 細胞の細胞表面に発現する抗原の特徴を明らかにし、マルチカラーフローサイトメトリーを用いて、ATL 細胞と非感染リンパ球をきちんと分離できる解析法（ゲーティング法）を作り上げることである。

そして、その方法を実際の臨床の場で、臨床検査・病態解析に用い、実際の臨床の場で有用な解析法であることを示す必要がある。また、臨床の場で頻用可能なフローサイトメトリーを用いて予後を規定する因子の同定を試みようとした。

さらには、この方法を基礎研究に用いて、腫瘍そのものの増殖を評価し、急性型 ATL のモデルを構築し、その増殖メカニズムを解明することを目標に研究を開始した。ほぼ全ての先行研究は CD4 陽性細胞全体、あるいは PBMC 全体を対象としており、2-1-3 に記載の通りの理由で、患者体内では見られないような異常な HTLV-1 ウィルス依存性の増殖を排除できていないと思われた。特に、NOD/SCID/IL-2R γ null (NOG) マウスや NOD/SCID/JAK3null (NOJ) マウス等の免疫不全マウスへの移植においては、HTLV-1 感染モデルにならないように最新の注意と工夫が必要である。

また、急性型 ATL 細胞の *ex vivo* / *in vitro* での培養は困難ではあるが、2-1-7 に記載のようなアッセイ法がすでに報告されており、ATL 細胞と MS-5 との共培養において死滅せずに増殖する細胞を ATL 前駆細胞、あるいはそれに近い性質を持った細胞と考え、この画分の同定を進めようと考えた。ATL の治療抵抗性の原因の一つと疑われている ATL 前駆細胞の同定が進めば、新たな診断・分類法につながり、将来的に ATL に対するより良い治療法の開発にもつながると考えられる。

3：材料と方法

3-1：患者検体

本研究は、患者の末梢血検体を用いる研究であり、その遂行にあたっては、東京大学医科学研究所附属病院ならびに研究協力病院の今村病院分院において、以下の通り、各病院における倫理審査による承認を得た上で研究を開始した。文書による説明および患者同意の上で検体が採取され、これらの同意書に基づき解析をおこなった。また、患者の末梢血採取は治療上必要な採血日に限定され、検体採取目的に余分に針をさすことはしなかった。本研究はヘルシンキ宣言を遵守して遂行された。

● 東京大学医科学研究所/附属病院 倫理審査 承認済 (承認番号 23-39)

「ATL 細胞表面抗原の網羅的解析と ATL 前駆細胞の同定」

(申請責任者 当研究協力者 内丸薫)

● 研究協力病院 今村病院分院 倫理審査 承認済 (承認番号 12-01)

「ATL 細胞表面抗原の網羅的解析と ATL 前駆細胞の同定」

(申請責任者 宇都宮與)

- 東京大学医科学研究所/附属病院 倫理審査 承認済 (承認番号 22-3)

「Multi-color FACS を用いた急性型成人 T 細胞白血病細胞の解析」

(申請責任者 当研究協力者 内丸薫)

3-2 : 末梢血単核細胞 (PBMC) 分離

VENOJECT II EDTA-2Na 7ml 採血管あるいは Heparin-Na 10mL 採血管 (TERUMO) を用いて採取された患者末梢血から、リンホセパール I (免疫生物研究所) を用いて比重遠心分離法にて単核細胞を分離した。分離した単核細胞は 5%FBS 入り PBS で 1 回洗浄した上で以下の解析に用いた。

3-3 : マルチカラーフローサイトメトリーを用いた細胞表面抗原の網羅的解析

健常人 2 名、典型的な急性型 ATL 患者 3 名の PBMC をブロッキング後、細胞を等分し、下記の組合せで免疫染色した。染色後は PBS にて洗浄し、測定前に PI を加えたうえで、FACS Aria II SORP (BD 社) を用いて解析した。

蛍光抗体・染色の組合せは、図 d の通りで、APC-Cy7 標識抗ヒト CD3 抗体 (BD Pharmingen)、Pacific Blue 標識抗ヒト CD4 抗体 (Biolegend)、Pacific Orange 標識抗ヒト CD14 抗体 (CALTAG)、抗ヒト CD7 抗体 [PE 標識 (BD Biosciences) あ

るいは APC 標識 (eBioscience)] を基本に、以下のいずれか (複数) を解析フ
 イルターが重複しないように組み合わせた。抗体はいずれも抗ヒト抗体であり、
 FITC、PE、PerCP(-Cy5.5)、PE-Cy7、APC、AF647、いずれかの標識がされている。
 評価対象とする抗原の抗体が APC 標識の場合は PE 標識の抗 CD7 抗体を (図 d 上)、
 評価対象とする抗原の抗体が PE 標識の場合は APC 標識の抗 CD7 抗体を (図 d 下)
 用意した。細胞表面抗原の発現は、対応する色素の isotype control (IgG) を別
 途用意し、細胞表面抗原の発現陽性率を評価するためのコントロールとした。

図 d : 蛍光色素の組合せ (網羅的解析)

[PE CD7 Pattern] Blue Laser					Red Laser		Violet Laser	
FITC	PE	PerCP	PI	PE-Cy7	APC	APC-Cy7	Pacific Blue	Pacific Orange
○	CD7	○	PI	○	○	CD3	CD4	CD14

[APC CD7 Pattern] Blue Laser					Red Laser		Violet Laser	
FITC	PE	PerCP	PI	PE-Cy7	APC	APC-Cy7	Pacific Blue	Pacific Orange
○	○	○	PI	○	CD7	CD3	CD4	CD14

【蛍光抗体リスト】

APC 標識抗 CD1a 抗体、PE 標識抗 CD2 抗体、PE 標識抗 CD5 抗体、PE-Cy7 標識抗

CD8 抗体、PE-Cy7 標識抗 CD10 抗体、FITC 標識抗 CD11a(integrin α L) 抗体、APC 標識抗 CD11b(integrin α M) 抗体、APC 標識抗 CD11c(integrin α X) 抗体、PE 標識抗 CD13 抗体、FITC 標識抗 CD16 抗体、APC 標識抗 CD18(integrin β 2) 抗体、PerCP 標識抗 CD19 抗体、PE 標識抗 CD20 抗体、APC 標識抗 CD25(IL-2R α) 抗体、PE 標識抗 CD26 抗体、PE 標識抗 CD27 抗体、FITC 標識抗 CD28 抗体、FITC 標識抗 CD29(integrin β 1) 抗体、PE 標識抗 CD30(Ki-1) 抗体、FITC 標識抗 CD31(PECAM-1) 抗体、PE-Cy7 標識抗 CD33 抗体、PE-Cy7 標識抗 CD34 抗体、PerCP 標識抗 CD38 抗体、PerCP 標識抗 CD40 抗体、PerCP 標識抗 CD41(Integrin α IIb) 抗体、FITC 標識抗 CD44(H-CAM) 抗体、PerCP 標識抗 CD45 抗体、FITC 標識抗 CD45RA 抗体、FITC 標識抗 CD45RO 抗体、PerCP 標識抗 CD47 抗体、PE 標識抗 CD49a(Integrin α 1) 抗体、FITC 標識抗 CD49b(Integrin α 2) 抗体、PE 標識抗 CD49c(Integrin α 3) 抗体、PE 標識抗 CD49d(Integrin α 4) 抗体、PE 標識抗 CD49e(Integrin α 5) 抗体、FITC 標識抗 CD49f(Integrin α 6) 抗体、PerCP 標識抗 CD50(ICAM-3) 抗体、FITC 標識抗 CD51(Integrin α V) 抗体、PE 標識抗 CD52(CAMPATH-1) 抗体、FITC 標識抗 CD54(ICAM-1) 抗体、PE-Cy7 標識抗 CD56(NCAM) 抗体、FITC 標識抗 CD57 抗体、FITC 標識抗 CD61(Integrin β 3) 抗体、FITC 標識抗 CD62L(L-Selectin) 抗体、FITC 標識抗 CD66b 抗体、PE 標識抗 CD69 抗体、PE 標識抗 CD70 抗体、PE 標識抗 CD71

抗体、PE 標識抗 CD79a 抗体、PE 標識抗 CD79b 抗体、PE 標識抗 CD80 抗体、FITC 標識抗 CD86 抗体、PerCP 標識抗 CD90 抗体、APC 標識抗 CD94 抗体、PE 標識抗 CD95 抗体、FITC 標識抗 CD102 (ICAM-2) 抗体、FITC 標識抗 CD104 抗体、FITC 標識抗 CD105 抗体、FITC 標識抗 CD107a 抗体、PE 標識抗 CD117(c-kit) 抗体、PE 標識抗 CD120a (TNF-R) 抗体、PE 標識抗 CD123 抗体、AF647 標識抗 CD127 抗体、PE 標識抗 CD132 抗体、APC 標識抗 CD133 抗体、APC 標識抗 CD135 抗体、FITC 標識抗 CD138 抗体、APC 標識抗 CD144 (VE-Cadherin) 抗体、PE 標識抗 CD146 (Me1-CAM) 抗体、APC 標識抗 CD152 抗体、PE 標識抗 CD154 抗体、APC 標識抗 CD161 抗体、FITC 標識抗 CD183 (CXCR3) 抗体、PE 標識抗 CD184 (CXCR4) 抗体、PerCP 標識抗 CD185 (CXCR5) 抗体、PE-Cy7 標識抗 CD194 (CCR4) 抗体、APC 標識抗 CD195 (CCR5) 抗体、APC 標識抗 CD196 (CCR6) 抗体、PE 標識抗 CD197 (CCR7) 抗体、APC 標識抗 CD199 (CCR9) 抗体、FITC 標識抗 CD235ab 抗体、PE 標識抗 CD243 (MDR-1) 抗体、PE 標識抗 CD253 (TRAIL) 抗体、PE 標識抗 CD261 (DR4/TRAIL-R4) 抗体、PE 標識抗 CD262 (DR5/TRAIL-R5) 抗体、PE 標識抗 CD271 (NGF-R) 抗体、PE 標識抗 CD278 (ICOS) 抗体、PE 標識抗 CD279 (PD-1) 抗体、PE 標識抗 CD325 (N-Cadherin) 抗体、PE 標識抗 CD357 (GITR) 抗体、PE 標識抗 CD358 (DR6) 抗体、PE 標識抗 CCR10 抗体、FITC 標識抗 CLA 抗体、PE 標識抗 DR3 抗体、AF488 標識抗 HLA-ABC 抗体、PerCP 標識抗 HLA-DR 抗体、APC

標識抗 Integrin β 6 抗体、PE 標識抗 Integrin β 7 抗体、APC 標識抗 Integrin β 8 抗体、APC 標識抗 MUC1 抗体、APC 標識抗 OB-Cad 抗体、AF647 標識抗 CADM1 抗体

3-4 : 細胞表面抗原網羅的解析以外のフローサイトメトリー

典型的な急性型 ATL 患者の PBMC をブロッキング後、蛍光免疫染色した。染色後は PBS にて洗浄し、測定前に PI を加えたうえで、FACS Aria II SORP を用いて解析した。

染色の組合せは、PerCP-Cy5.5 標識抗 CD7 抗体、AF647 標識抗 CADM1 抗体、APC-Cy7 標識抗 CD3 抗体、Pacific Blue 標識抗 CD4 抗体、V500 標識抗 CD14 抗体を基本に、他の抗体を解析フィルターが重複しないように組み合わせた。頻用した染色の例を図 e に示す。

図 e : 蛍光色素の組合せ (ATL 細胞解析例)

Blue Laser						Red Laser			Violet Laser		
FITC	PE	PerCP	PI	PE-Cy5	PE-Cy7	AF647	APC-Cy7	AF700	Pacific Blue	V500	BV605
CD62L	CD71	CD7	PI	CD235a	CD25	CADM1	CD3	CD8	CD4	CD14	CD20

3-5 : フローサイトメトリーのソーティング

上記の蛍光免疫染色後、BD FACS Aria II SORP を用いて、細胞の解析ならびにソーティングを行った。生細胞率や正確な細胞数が、研究結果に大きく影響を与えるため、解析ならびにソーティングに際しては、慎重に設定した。具体的には、FSC-H, FSC-W, SSC-H, SSC-W で完全にダブレット（重複細胞・細胞集塊）を除去した上で、PI vs. FSC-A プロットを用いて死細胞を除去し、シングルレット生細胞を解析対象とした。基本的な陽性画分・陰性画分の評価は、Isotype Control と比較して設定した。また、ソーティングによる細胞傷害を防ぐため、全てのソーティングにおいて、ノズルは 100 μ m のものを使用し、Flow rate は基本的に 1.0 とし（細胞濃度が薄く回収に時間がかかる場合でも 2.5 程度まで）、Sorting Precision は Purity・4-way Purity・Single cell sorting のいずれかとした。ソーティング後に細胞培養をする場合の検体は凍結保存検体を用いず、単核細胞分離後すぐに染色・ソーティングした。

3-6 : フローサイトメトリー結果の解析

測定・記録後のデータ解析は、Flow Jo (Tomy Digital Biology) ならびに Fluidigm Cytobank (CytoBank) を用いて解析した。一部のデータは、

spanning-tree progression analysis of density-normalized events (SPADE)

解析(61)や、viSNE 解析(62)をおこなった。

3-7 : 細胞培養(共培養)と、培養後 ATL 細胞数の評価

マウス骨髄由来の間葉系細胞 MS-5 は、長崎大学の長井一浩先生(50)より供与頂いた。共培養前1週間前～前日までに EDTA-Trypsin を用いて細胞剥離後、24-well plate (細胞数に応じて 96-well plate や 48-well plate も使用) に播種し、共培養当日には約 70%~95%コンフルエントになるようにした。MS-5 単独の培養液には Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)に最終濃度 10%になるように Fetal bovine serum(FBS)添加したものを、ATL 細胞と MS-5 の共培養の培養液には Roswell Park Memorial Institute medium 1640(RPMI-1640)に 20% FBS を添加したものをを用いた。

先述の通り、死細胞やダブレット細胞を完全に除去した上で、SSC vs. CD14 プロットを用いて CD14 陽性の単球を除去し、CD4 vs. CD3 プロットを用いて CD4 陽性画分を取り出し、CD7 vs. CADM1 プロットを用いて CADM1 陽性画分(ATL 細胞)を取り出した。その後、対象とする細胞表面抗原の発現レベルにて ATL 細胞を細分化し、各画分をソーティングにて取り出した。前もって IMDM(10%FBS)

と共に MS-5 を播種したプレートの培養液を RPMI-1640 (20%FBS) に換えた後、対照画分も含め、同数をプレートソーティングにて直接プレートに播種した。細胞数は各ウェル 1 万個までとした。

共培養中は、週 2 回のペースで 20%FBS 添加 RPMI-1640 を交換した。培養液は静かに回収し、遠心の上で上清を除去し、沈降成分を全てもとのウェルに戻した。共培養中に IL-2 を加える場合、recombinant human IL-2 (PEPROTECH 社) をウェル内に最終濃度 40ng/mL になるように添加し、培養液交換と同じタイミングで添加を繰り返した。

共培養から約 14 日後、MS-5 と ATL 細胞は Accutase (Innovative Cell Technologies) 等を用いてウェルから剥がした上で、丁寧にもれなく全量を回収した。1 回洗浄をかけた後、5%FBS を添加した Phosphate buffered saline (PBS) に溶解し、全量を約 500 μ L とした。PBS (5%FBS) の比重は 1.0018 であったので、正確な液量 [μ L] は細胞回収前後の容器の重量の差 [mg] を 1.00 で割ることにより算出した。また、その一部 (150 μ L) を ATL 細胞数の定量に用いた。残りは必要に応じて、通常フローサイトメトリー解析 (フェノタイプ解析) に用いた。

共培養後に ATL 細胞数だけを評価する方法は次の通りである。まず、ロットにより異なるが約 5 万個前後の既知量のビーズが入っている TruCount チューブ

(BD)に FITC 標識抗マウス CD9 抗体と PerCP 標識抗ヒト CD45 抗体（あるいは Pacific Blue 標識抗ヒト CD4 抗体）を前もって入れた。次に、先述の細胞溶液 150 μ L をいれ、よく混ぜたうえで、20 分間室温にて放置した。その後、洗浄操作を加えず、よく攪拌し PI を加えた上で、フローサイトメトリー解析した。測定データのビーズとヒト CD45 陽性細胞の比から、ウェル内の ATL 細胞数を算出した。2 週間後のヒト CD45 陽性細胞数の多かった画分群の結果の平均値を 100% としてグラフ化した。

3-8 : Inverse PCR 法

腫瘍細胞のクローナリティーを評価するためには、ヒトゲノムへの HTLV-1 プロウイルスのインテグレーションサイトが異なる事を利用した。HTLV-1 プロウイルスの一部とその組み込み部位に隣接したヒトゲノム DNA を Inverse PCR 法 (63) を用いて増幅し、評価した。

具体的には、ソーティングにて回収した細胞よりキットを用いて DNA 抽出後、ゲノム DNA (1 μ g) を、*Pst*I あるいは *Eco*RI (Takara) を用いて 37° C で 12 時間制限酵素処理し、調整した DNA 溶液全量を T4 ligase (Takara) により 4° C で 16 時間反応させ、断片化したゲノム DNA の Self-ligation を行った。

Self-ligation 反応後、PCR の鋳型とした。PCR は、94° C で 2 分インキュベ
ート後に、94° C で 30 秒、68° C で 8 分を 35 サイクル行い、72° C で 10 分
というプログラムを行った。

用いたプライマーセットは以下の通りである。

(*Pst*I 処理後)

Forward 5' -CAGCCCATTCTATAGCACTCTCCAGGAGAG-3'

Reverse 5' -CAGTCTCCAAACACGTAGACTGGGTATCCG-3'

(*Eco*RI 処理後)

Forward 5' -TGCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACGTCTTTG-3'

Reverse 5' -AGTCTGGGCCCTGACCTTTTCAGACTTCTGTTTC-3'

全ての PCR は独立に 3 回ずつ行った。Inverse PCR 産物は、0.8%アガロース
ゲル電気泳動で 100V、50 分泳動し解析を行った。

3-9 : HTLV-1 プロウィルス量 (PVL) の算定

対象画分の HTLV-1 感染細胞率の評価には、HTLV-1 PVL を利用し、その測定は、
既報の論文報告 (28) と同様におこなった。

簡潔にまとめると、ソーティングにて回収した細胞より NucleoSpin Tissue XS

(タカラバイオ)等を用いて DNA を抽出後、プロウイルスのコピー数を Taqman 法によるリアルタイム PCR 法により、ABI Prism 7000 (Applied Biosystems) を用いて計測した。定量 PCR は、2 種類のプライマーセット (HTLV-1 プロウイルス pX 領域と、RNase P enzyme をコードする遺伝子) を用いた Multiplex PCR 法により行った。RNase P をコードする遺伝子に対するプライマーとプローブは、Applied Biosystems から購入した。

HTLV-1 プロウイルスに対するプライマーとプローブは以下の通り。

Forward 5' -CGGATACCCAGTCTACGTGTT-3' 、

Reverse 5' -CAGTAGGGCGTGACGATGTA-3' 、

FAM-labeled probe 5' -CTGTGTACAAGGCGACTGGTGCC-3'

また、同時に PVL が 100% であることが知られている HTLV-1 感染細胞株の TL-0m1 (2copy / 4n) をポジティブコントロールに用いて、結果が 100% になるように比例法にて補正した。

3-10 : HTLV-1 bZIP factor (HBZ) の PCR

対象画分の HTLV-1 感染細胞の有無の評価には、HTLV-1 bZIP factor (HBZ) 遺伝子の PCR を用いて既報の通り (64, 65)、行った。コントロールとして、 β -actin

遺伝子 (ACTB) を用いた。それぞれに対するプライマーは次の通り。

(HBZ)

Forward 5' -CGCTGCCGATCACGATG-3'

Reverse 5' -GGAGGAATTGGTGGACG-3'

(ACTB)

Forward 5' -CGTGCTCAGGGCTTCTT-3'

Reverse 5' -TGAAGGTCTCAAACATGATCTG-3'

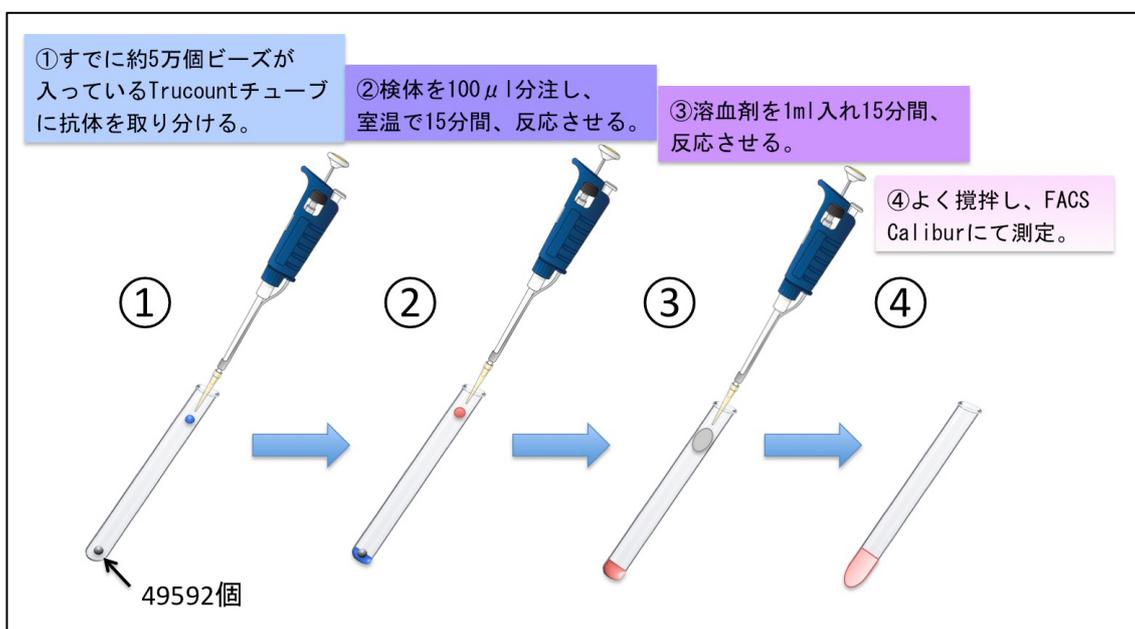
3-1 1 : 臨床検査法としての解析

基礎的な研究成果から臨床の場における先述のフローサイトメトリー解析法の有用性が示された後、当該解析法を臨床検査として検査部で運用可能な形に変更後、附属病院検査部に実際に導入した。なお、対象患者は、2011年6月より2012年12月までの間に当院に入院していた急性型 ATL 患者で、前もって書面にて同意を得られた患者とした。一部の患者は、他院にて化学療法を受けた後に当院に転院していた。また、過去に造血幹細胞移植をうけた患者は対象外とした。ATL 患者の末梢血を、治療前あるいは化学療法各コース直前の時点で、評価した (計 14 名、のべ 49 回)。

この検査用に新たな採血を追加することはなく、バキュテイナ EDTA-2K 採血管 (BD) を用いて採血された末梢血の、通常の数算測定に用いられた残りを用いた。臨床検査の手順は図 f の通りである。

詳細は、まず、既知量のビーズが入っている TruCount チューブ (BD) に前もって抗ヒト CD3 抗体、抗ヒト CD4 抗体、抗ヒト CD7 抗体、抗ヒト CD14 抗体を入れ準備した。採血管をよく攪拌の上、その中から 100 μ L を取り出し、TruCount チューブへ入れ、ピペッティングにてよく攪拌し、室温にて 15 分反応させた。その後、10 倍希釈した FACS Lysing Solution (BD) を 500~1000 μ L 加え、よく攪拌し、室温にて 15 分反応させた。その後、洗浄等の操作を加えず、よく攪拌後すぐに FACS Calibur (BD) にて測定・記録した。

図 f : 臨床検査法の手順

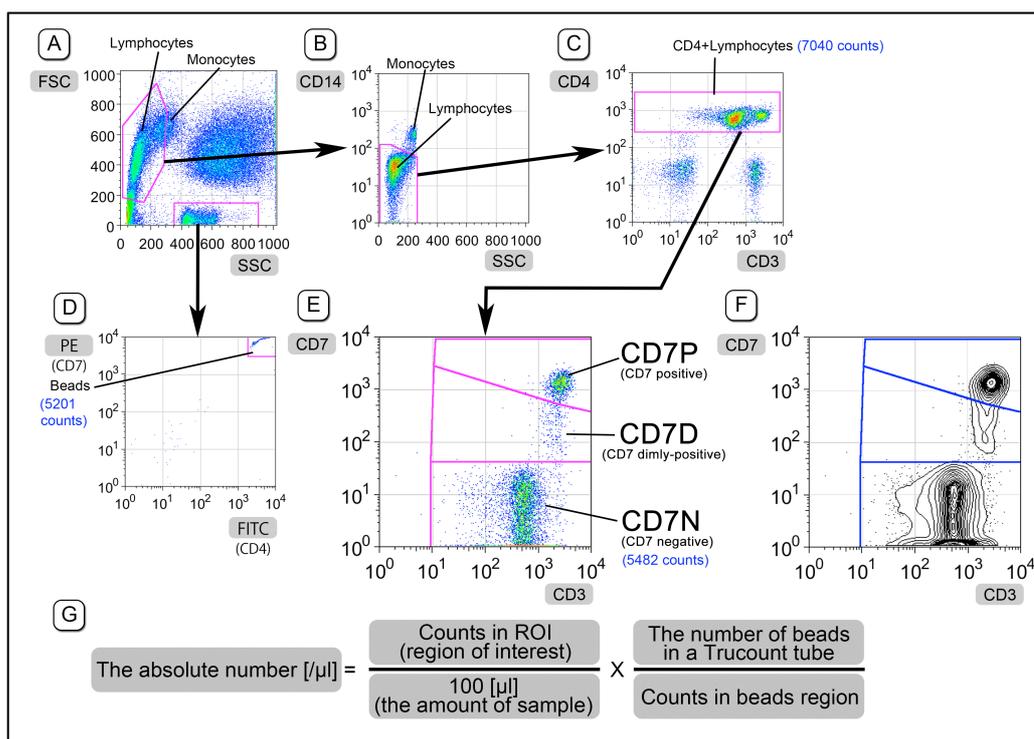


記録データは Flow Jo を用いて解析し、急性型 ATL で腫瘍細胞が濃縮される
と考えられる (63)、CD7N^{IG} (後述) 画分を取り出した。詳細な gating は次の通
りである。FSC vs. SSC プロットにてリンパ球画分を広めに取り (図 f-A)、次に、
CD14 vs. SSC プロットにて単球を除去した (図 f-B)。さらに、CD4 vs. CD3 プロ
ットにて CD4 陽性リンパ球を取り出し (図 f-C)、それらを CD7 vs. CD3 プロット
で展開し、等高線プロットをもとに、CD7P^{IG}、CD7D^{IG}、CD7N^{IG} の 3 画分に分類した
(図 f-E/F)。なお、ビーズは、その性質から FITC vs. PE プロットにて取り出
した (図 f-D)。また、CD7N^{IG} の絶対数は、図 f-G に記載の計算式を用いて、算

出した。

同時に、白血球数を XE-2100 (Sysmex)にて測定し、ライトギムザ染色後、当院の熟練した臨床検査技師により顕微鏡下に目視にて計 300~400 個の有核細胞を分類し、異常リンパ球割合を算出した。末梢血白血球数と異常リンパ球割合をかけることによって異常リンパ球絶対数[/ μ L]を算出した。

図 f : 臨床検査において用いたフローサイトメトリ解析の分画法



3-1 2 : フローサイトメトリーにて定量する ATL 細胞数と形態学的に評価する

異常リンパ球数の相関性の解析

フローサイトメトリーにて定量する ATL 細胞数と形態学的に評価する異常リンパ球数はどちらも対数正規分布であったため、対数変換の上で解析をおこなった。その後、この2つの相関性は、Pearson(ピアソン)の相関係数、Spearman(スピアマン)の順位相関係数、級内相関係数 (intraclass correlation coefficients, ICC) を用いて評価した。また、2つの手法の差を Bland-Altman プロットにて評価した。患者間の評価回数の違いが上記の解析に影響を与える可能性は、IPW(Inverse Probability Weighting)法にて評価した。

3-1 3 : 生存期間 (Disease-specific survival) の解析

上記臨床検査法 (3-11 記載) の対象患者 14 名のうち、化学療法前後の測定のある 12 名を対象とした。観察期間における初回の化学療法前後の様々なパラメータの変化にて 2 群に分け、化学療法後評価日からの生存期間 (Disease-specific survival) を Kaplan-Meier 法で描出し、logrank 検定にて評価した。評価項目としては、CD7P^{1G}・CD7D^{1G}・CD7N^{1G} (後述) の割合や絶対数、異常リンパ球の割合や絶対数、LDH・可溶性 IL-2R (sIL-2R) など従来の治療評価

項目の化学療法前後の変化を用いた。

化学療法後の CD7N^{1G} の割合の変化においては、化学療法後の CD7N^{1G} の割合を基準として 95%未満に減少した場合を CD7N^{1G} 割合減少とし、100%を越えた場合を CD7N^{1G} 割合増加、どちらにも該当しない場合を CD7N^{1G} 割合変化無しと評価した。

3-1 4 : サイトスピンとライトギムザ染色

3-1 1 同様の方法にて染色後、FACS Aria II SORP (BD)を用いて解析し、ソーティングにて各画分の細胞を取り出した。回収した細胞はサイトスピン (20G 5分) にてスライドガラスに固定し、ライトギムザ染色を行い、形態学的に評価した。

3-1 5 : 統計学的解析

統計学的解析には、Graphpad Prism (Graphpad 社) ならびに IBM SPSS 20 (IBM 社)を用いた。統計学的有意差は、右のように示した。

*	$P \leq 0.05$
**	$P \leq 0.01$
***	$P \leq 0.001$

4：結果

4-1：ATLにおけるCD4陽性細胞は主に3画分に分類される

ATL細胞の特徴は、CD4陽性であり、CD3やCD7の発現が落ちることが知られている。そのため、CD4陽性細胞をCD7ならびにCD3のプロットで展開すると、細胞密度を用いた等高線プロット解析からATL患者におけるCD4陽性細胞は主に $CD3^{Positive}CD7^{Positive}$ (CD7P^{1G})、 $CD3^{Dimly-positive}CD7^{Dimly-positive}$ (CD7D^{1G})、 $CD3^{Dimly-positive}CD7^{Negative}$ (CD7N^{1G}) の3つの画分に分類されることが分かっていた (図1A)。

さらに、ATL細胞ではCADM1を発現していることが分かり、CD4陽性細胞をCD7ならびにCADM1のプロットで展開すると、ATL患者におけるCD4陽性細胞は主に $CADM1^{Negative}CD7^{Positive}$ (CD7P^{2G})、 $CADM1^{Positive}CD7^{Dimly-positive}$ (CD7D^{2G})、 $CADM1^{Positive}CD7^{Negative}$ (CD7N^{2G}) の3つの画分に分けられることがわかった (図1B)。これらの2つの分画法を比較するため、図1BのCD7P^{2G}、CD7D^{2G}、CD7N^{2G}の各細胞集団をCD7ならびにCD3のプロットに展開すると、それぞれが主に図1AのCD7P^{1G}、CD7D^{1G}、CD7N^{1G}の画分に描出され (図1C)、2つの分画法を用いたCD7P・CD7D・CD7N画分はそれぞれがおおまかに対応することが確認された。そこで、CD7P^{2G}、CD7D^{2G}、CD7N^{2G}の各画分をソーティングにて取り出し、各画分のHTLV-1 Proviral Load

を評価すると、HTLV-1 感染細胞は主に CD7D^{2G} ならびに CD7N^{2G} の画分に濃縮されることが分かった(図 1D)。また、同様に各画分から抽出した DNA を PCR にて HTLV-1 bZIP factor (HBZ) の有無を評価した結果においても、HTLV-1 感染細胞は主に CD7D^{2G} ならびに CD7N^{2G} の画分に濃縮されることが分かった(図 1E)。なお、Positive コントロールとして TL-om1 (HTLV1 感染細胞株のセルライン)、Negative コントロールとして健常人の PBMC を用いている。また、T-cell receptor (TCR) V β レパトアの多様性を利用して、HTLV-1 感染細胞の多様性を評価した。当患者では Major clone が TCRV β 17 を発現していたため、各画分の TCR V β 17 の発現をフローサイトメトリーにて評価したところ、ATL major clone は CD7D^{2G} ならびに CD7N^{2G} の画分に濃縮される事が分かった (図 1F)。なお、CD7P^{2G} 画分にも 5.5% の TCR V β 17 陽性細胞を認めたが、それらの TCR V β 17 の発現レベルは CD7D^{2G} や CD7N^{2G} 画分の発現レベルと異なり、健常リンパ球において偶然同じレパトア型を持っているリンパ球を見ていると考えられた。また、各画分のクローナリティーを Inverse PCR 法を用いて評価したところ、ATL major clone は主に CD7D^{2G} ならびに CD7N^{2G} の画分に濃縮される事が分かった (図 1G)。

以上のことから、HTLV-1 感染 ATL 細胞は主に CD7D^{2G} ならびに CD7N^{2G} の画分に濃縮される事が分かった。この現象は、くすぶり型、慢性型、急性型のいずれ

においても同様の結果であった。

4-2 : CD4 陽性細胞における CD7 vs. CADM1 プロットは病態の進行を反映する

また、図 1 で示した CD7P^{2G}、CD7D^{2G}、CD7N^{2G}、各画分の割合は、下山分類による分類ごとに大きく異なることが分かった。健常人における CD4 陽性細胞は基本的に CD7P^{2G} が主体であるが、HTLV-1 キャリア、くすぶり型、慢性型、急性型と病態がすすむにつれて CD7P^{2G} の割合 (図 2 A) が減り、CD7N^{2G} の画分の割合 (図 2 B) が増えていくことが分かった (図 2 C)。なお、急性型においては、基本的に、CADM1 陽性画分の中で CD7N^{2G} 画分が主体であり、CD7D^{2G} 画分の割合は低値であった。

4-3 : 急性型 ATL において異常リンパ球は CD7N^{1G} の画分に高度に濃縮される

次に、以下の研究では、対照症例を典型的な急性型 ATL に絞って解析をおこなった。典型的な急性型 ATL 患者の CD7P^{1G}、CD7D^{1G}、CD7N^{1G} 各画分をソーティングにて取り出し、サイトスピンを用いて標本固定後、ライトギムザ染色し、形態を評価したところ、異常リンパ球は CD7N^{1G} の画分に濃縮されることが分かった (図 3 A)。また、CD7D^{1G} にも少数の割合で異常リンパ球の混在を認めたが、急

性型 ATL においては CD4 陽性リンパ球における CD7D¹⁶ 自体の割合が小さく (図 3 B)、このことから、急性型 ATL における異常リンパ球は主に CD7N¹⁶ に濃縮される事が分かった。なお、図 3 A の例においても、CD7D¹⁶ に含まれる異常リンパ球の絶対数は CD7N¹⁶ に含まれる異常リンパ球数の約 1000 分の 1 であった [(0.017 × 0.06) / (0.956 × 0.99)]。

4-4 : 急性型 ATL において末梢血の CD7N¹⁶ 細胞数は、熟練した検査者が評価する異常リンパ球数と高度に相関する

次に、実際の急性型 ATL 患者の検体を用いて、ATL 細胞 (CD7N¹⁶ 細胞) の定量化を試みた。また、フローサイトメトリーを用いて定量する ATL 細胞 (CD7N¹⁶ 細胞) の絶対数 [/ μ L] を、当院の ATL 細胞の形態分類に熟練した検査者が評価する異常リンパ球の絶対数 [/ μ L] と比較して、のべ 49 測定で評価したところ、Pearson ・ Spearman ・ 級内相関係数 (ICC) を用いたいずれの相関性解析においても強い相関性をもつことが明らかになった。Pearson の相関係数 R は 0.963、Spearman の相関係数は 0.921、ICC は 0.962 であった。また、原点回帰条件下での線形回帰係数 (β) は 1.013 (95%CI : 0.991-1.034) であり、異常リンパ球数と CD7N¹⁶ 細胞数の強い相関性が示唆された (図 4 A)。また、2つの方法の測定誤差

を Bland-Altman Plot を用いて評価したが、2 群に有意な系統誤差を認めなかった (図 4B)。

4-5 : 急性型 ATL において化学療法前後の末梢血 CD4 陽性細胞における CD7N¹⁶ 細胞割合の変化は、化学療法感受性や予後を反映する

次に、急性型 ATL 症例の化学療法前後の CD4 陽性細胞における CD7 vs. CD3 プロットの変化を追ったところ、その変化は化学療法抵抗性例と感受例において大きく異なることが繰り返し観察された。

化学療法感受性例においては、CD7N¹⁶ 細胞数の絶対数が大きく現象するのに加えて、CD7 vs. CD3 プロットが大きく変化した。具体的には CD7P¹⁶ の割合が有意に上昇し、CD7N¹⁶ の割合が減少した。一方で、多く見られる化学療法抵抗性においては、一時的に CD7N¹⁶ 絶対数が改善する事はあったが、CD7 vs. CD3 プロットはほとんど変わらなかった。このことから、化学療法前後の CD7 vs. CD3 プロットの変化は、化学療法感受性を反映していた (図 5A)。

また、表 1 に示す 12 症例において、観察期間内における初回の化学療法 1 コースの前後の CD4 陽性細胞における CD7N¹⁶ 割合の変化にて、CD7N¹⁶ 割合が改善した群と、改善を認めない群とに分けて Kaplan-Meier 曲線を用いて、

Disease-specific survival (DSS)を評価した。その結果、CD7N¹⁶ 割合の改善した群において予後が有意に良い結果が得られた。Log-rank テストにて評価したところ、2群のDSSの間に有意な差を認めた(p=0.003) (図5B)。

4-6 : ATL 細胞は他の CD4 陽性 T 細胞と比較し、特徴的な細胞表面抗原の発現パターンをとる

急性型 ATL 患者における CD7⁺ (CD7P¹⁶ ならびに CD7D¹⁶ 群)と CD7N¹⁶ 群の細胞表面抗原の発現を健常人と比較した。その結果を、統計学的階級クラスタリング解析を用いて評価したところ、急性型 ATL 患者における ATL 細胞 (CD7N¹⁶ 細胞) は一つの Major Cluster を構築することが分かった (図6A)。

また、CD4 陽性 T リンパ球は、CD45RA vs. CD62L あるいは CCR7 プロットにて、ナイーブ T 細胞・セントラルメモリー T 細胞・エフェクターメモリー T 細胞・エフェクター T 細胞に分類される事が知られているため、急性型 ATL 細胞においての CD45RA・CD62L・CCR7 の発現の結果を、それらの分類と照らし合わせた (図6B)。急性型 ATL (CD7N¹⁶) 細胞は、CD45RA⁻、CD45RO⁺、CCR7⁻であり、CD62L は陽性から陰性まで幅広く分布していた。この結果からは、ATL 細胞は、セントラルメモリー T 細胞やエフェクターメモリー T 細胞のフェノタイプを持つと考えられ

た。

また、図 6 A の結果を基に、CD7N^{1G} (ATL) 細胞に特徴的な発現パターンを持ち、CD7N^{1G} (ATL) 細胞においてその発現が陽性、弱陽性から陰性まで幅広く分布するものを ATL 前駆細胞マーカーの候補として取り出した。その中の例として、CD71、CD25、CD62L の結果を、図 6 C~E に示した。

4-7: 急性型 ATL 細胞は MS-5 なしでは生存・増殖不可能である

CD4+CADM1+細胞を取り出し、同数、MS-5 の有無で 2 週間の細胞培養を繰り返した。代表的な結果を図 7 A に示すとおり、急性型 ATL 細胞は MS-5 なしでは生存・増殖不可能であることが分かった。そのため、今後の実験では MS-5 との共培養系を用いることとした。

また、試みた全例において MS-5 なしでは IL-2 (40ng/ml) を添加しても生存・増殖は認めなかったが、約半数の症例においては MS-5 との共培養下において IL-2 反応性の増殖が認められた (図 7 A)。

また、IL-2 反応性増殖を認めた症例において、MS-5 との共培養下で、IL-2 (40ng/ml) 添加の有無でわけ、FSC (Forward Scatter) を用いて、細胞径を評価した。IL-2 添加で急激な増殖をきたした場合は、添加しない場合に比べて細

胞径が大きな細胞が目立った（図7B）。他のリンパ球同様、細胞の増殖を繰り返すにつれ、ATL細胞も細胞径が大きくなる特徴を持つと考えられた。

さらに、実際の患者サンプルを用いて、同一患者における化学療法前後の細胞径を比較した（図7C）。まず、CADM1の発現とFSC（細胞径）はおおまかに比例することが分かった。また、化学療法後にも一部のCD4+CADM1+細胞は残存していたが、細胞径が大きくCADM1発現の強い細胞が消失しており、細胞径の小さな細胞は化学療法抵抗性であることが示唆された。

4-8：2週間の共培養結果に影響の与える因子としてCD71, CD25, CD62Lがある

4-5で選び出した様々な細胞表面抗原を用いて、CD4+CADM1+(ATL)細胞をヒストグラム展開し、それらの抗原の発現レベルにてATL細胞を分類した。様々な画分をソーティングにて取り出し、MS-5における共培養を繰り返し、*in vitro*における細胞生存・増殖能を評価した。その結果、CD62L強陽性画分、CD71陰性画分、CD25陽性画分、CD7陰性画分の2週間後の細胞数が、各々の対照画分よりも有意に多いことが複数例において確認された（図8A）。

そこで同一症例において、CD71（陽性画分、陰性画分）、CD25（陽性画分、陰性画分）、CD7（陽性画分、陰性画分）、CD62L（強陽性画分、弱陽性画分、陰性画分）

を同数、MS-5 と共培養し、2 週間後の細胞数の差を評価した。有意な画分の細胞数を、同じ染色の対象画分の細胞数で割り、どれだけの差が生じるかを評価した。CD71 陰性画分は CD71 陽性画分と、CD25 陽性画分は CD25 陰性画分と、CD7 陰性画分は CD7 陽性画分と、CD62L 強陽性画分は CD62L 弱陽性画分・陰性画分の平均値と比較した。有意差を与えない抗原として CD271 を選び、CD271 陰性画分は CD271 陽性画分と比較した。

その結果、CD25 ならびに CD71 の発現が、ATL 細胞における 2 週間の細胞培養結果に最も影響を与える 2 つであることが分かった (図 8 B)。

4-9 : MS-5 上で生存・増殖可能な細胞は主に CD4+CADM1+/CD71-CD25+(S 画分)

に濃縮される

4-8 の結果より、この後の研究では、CD25 ならびに CD71 の 2 軸を組み合わせ、MS-5 上で生存・増殖可能な ATL 細胞の、更なる濃縮を試みることにした。

化学療法未治療あるいは 1 コース程度であり、典型的な急性型 ATL 症例を対象をしばった。また、下山分類上は急性型に分類される症例でも、慢性型からゆっくりと進展した急性型症例や、慢性型と類似の経過をたどる症例は除外した。その上で、急性型 ATL 患者の末梢血の CD4+CADM1+細胞を CD71-CD25+画分と

それ以外の画分に分類し、それぞれ同数を MS-5 と共培養するということを繰り返した。その結果、CD4+CADM1+CD71-CD25+以外の CD4+CADM1+画分の細胞はほとんど全てが絶滅した (図 9 A)。MS-5 上に生存・増殖可能な細胞は CD4+CADM1+/CD71-CD25+の画分に濃縮されることが分かった。このデータは、複数例において確認された。CD4+CADM1+CD71-CD25+画分の細胞は、MS-5 共培養下において、典型例では図 9 B に示すような Cobble Stone Area を作りながら増殖を示した。

CD4+CADM1+/CD71-CD25+ 画分の更なる細分化を目指し、CD4+CADM1+/CD71-CD25+画分と、CD4+CADM1+/CD71-CD25+CD62L++画分の比較も行ったが、2 週間後の細胞数はほとんど変わらず、有意差を認めなかった (図 9 C)。

また、CD4+CADM1+CD71-CD25+画分と、それ以外の CD4+CADM1+画分の細胞径ならびに、CADM1 の発現を評価した (図 9 D)。CD4+CADM1+CD71-CD25+画分の細胞は細胞径が小さく、CADM1 の発現がやや低いのに対し、対照画分の細胞は細胞径が大きく、CADM1 の発現も高かった。

さらに、CD4+CADM1+CD71-CD25+画分の細胞は、MS-5 共培養下 2 週間後にフェノタイプを解析すると、もともとあった他の画分 (CD71+や CD25-/dim の画分) を作り上げられることが分かった (図 9 E 左)。さらに、MS-5 上で IL-2 反応に増

殖を示す症例ではこの傾向が顕著であり、2週間後の ATL (CD4+CADM1+) 細胞のほとんどが CD71-CD25+以外のフェノタイプを示した (図 9E 右)。

4-10 : S 画分の細胞は化学療法抵抗性である

次に、CD4+CADM1+細胞における S 画分 (CD71-CD25+画分) の割合を同一患者の化学療法前後で評価した。典型例においては、化学療法後に残存している CD4+CADM1+のほとんどが CD71-CD25+画分であった (図 10A)。化学療法後には CD4+CADM1+細胞における CD71-CD25+画分の割合は高度に高くなることが繰り返し観察され (図 10B)、CD71-CD25+画分は化学療法後には相対的に濃縮されている。このことから、CD4+CADM1+/CD71-CD25+細胞は化学療法抵抗性であることが示唆された。

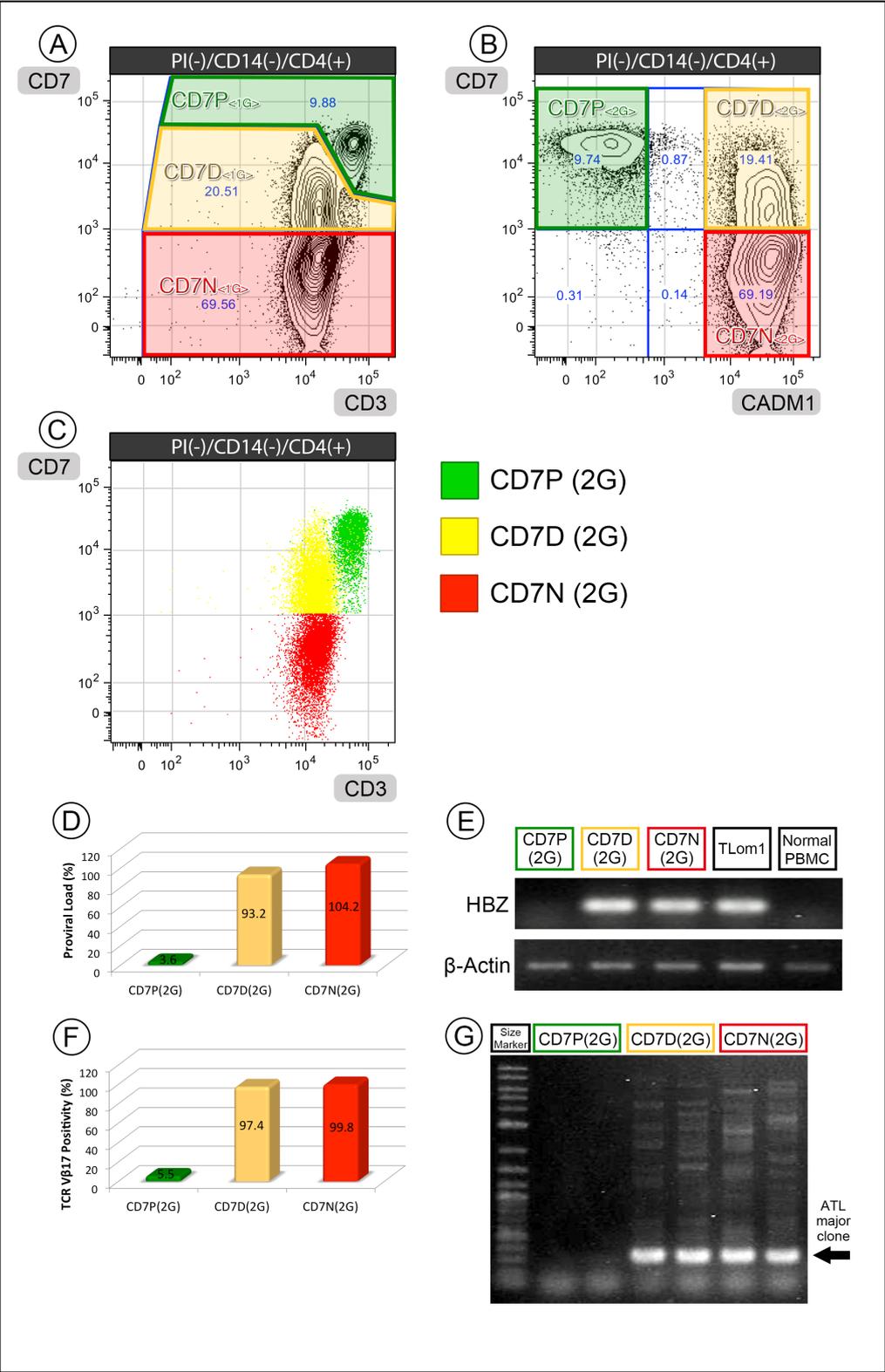
4-11 : 細胞ヒエラルキー解析 (SPADE 解析) と S 画分

また、Flow cytometry や CyTOF mass cytometry を用いた解析結果から、様々な細胞集団の同定やその集団内におけるヒエラルキーを描出する手法として Spanning-tree progression analysis of density-normalized events (SPADE) という手法が確立され、最近、様々な解析に用いられている (61, 66-69)。そこ

で、当研究においてもこの手法を用いて、急性型 ATL 患者の PBMC のマルチカラーフローサイトメトリーの結果を解析し、S 画分がどのように描出されるか検討をおこなった。その結果、急性型 ATL 患者の PBMC 中の B 細胞、単球、CD8 陽性 T 細胞、CD4 陽性 T 細胞がそれぞれ別の細胞集団としてきれいに区分され、CD4 陽性 T 細胞のなかでも HTLV-1 非感染の健常リンパ球と ATL 細胞が別々の細胞集団として分離された。さらには、S 画分 (CD4+CADM1+CD71-CD25+画分) の細胞は ATL 細胞集団の根本に位置するように描出され、SPADE 解析の結果は他の ATL 細胞が S 画分に起源する可能性を示唆していた (図 1 1)。

5 : 図とその説明

図 1 : ATL 患者の CD4 陽性リンパ球の 3 画分と、それらの画分の詳細な評価



indolent ATLにおいても、aggressive ATLにおいても、同様の結果が得られたが、ここでは、3画分がきれいに描出される慢性型 ATL 症例を例として、図 1A～G まで同一症例のデータをここに示した。

A. CD4 陽性リンパ球は CD7 ならびに CD3 を 2 軸とした展開にて、
 $CD3^{Positive}CD7^{Positive}$ (CD7P^{1G}) < 緑 >、 $CD3^{Dimly-positive}CD7^{Dimly-positive}$ (CD7D^{1G}) < 黄 >、
 $CD3^{Dimly-positive}CD7^{Negative}$ (CD7N^{1G}) < 赤 > の 3 つの画分に分類される。なお、死細胞による非特異染色や単球 (CD4 弱陽性) 細胞の混在を防ぐため、PI 染色 (PI vs. FSC-Area プロット) により死細胞を除き、CD14 染色 (CD14 vs. SSC-Area プロット) にて単球を除いた上で、CD4 陽性細胞を CD7 と CD3 で展開し、等高線プロットにて表示した。

B. CD4 陽性リンパ球は CD7 ならびに CADM1 を 2 軸とした展開にて、主に
 $CADM1^{Negative}CD7^{Positive}$ (CD7P^{2G}) < 緑 >、 $CADM1^{Positive}CD7^{Dimly-positive}$ (CD7D^{2G}) < 黄 >、
 $CADM1^{Positive}CD7^{Negative}$ (CD7N^{2G}) < 赤 > の 3 つの画分に分類される。CD7P^{2G}、
CD7D^{2G}、CD7N^{2G} の画分は概して CD7P^{1G}、CD7D^{1G}、CD7N^{1G} は対応する。なお、上記同様の理由にて、PI 染色 (PI vs. FSC-Area プロット) により死細胞を除き、CD14 染色 (CD14 vs. SSC-Area プロット) にて単球を除いた上で、CD4 陽性細胞を展開した。

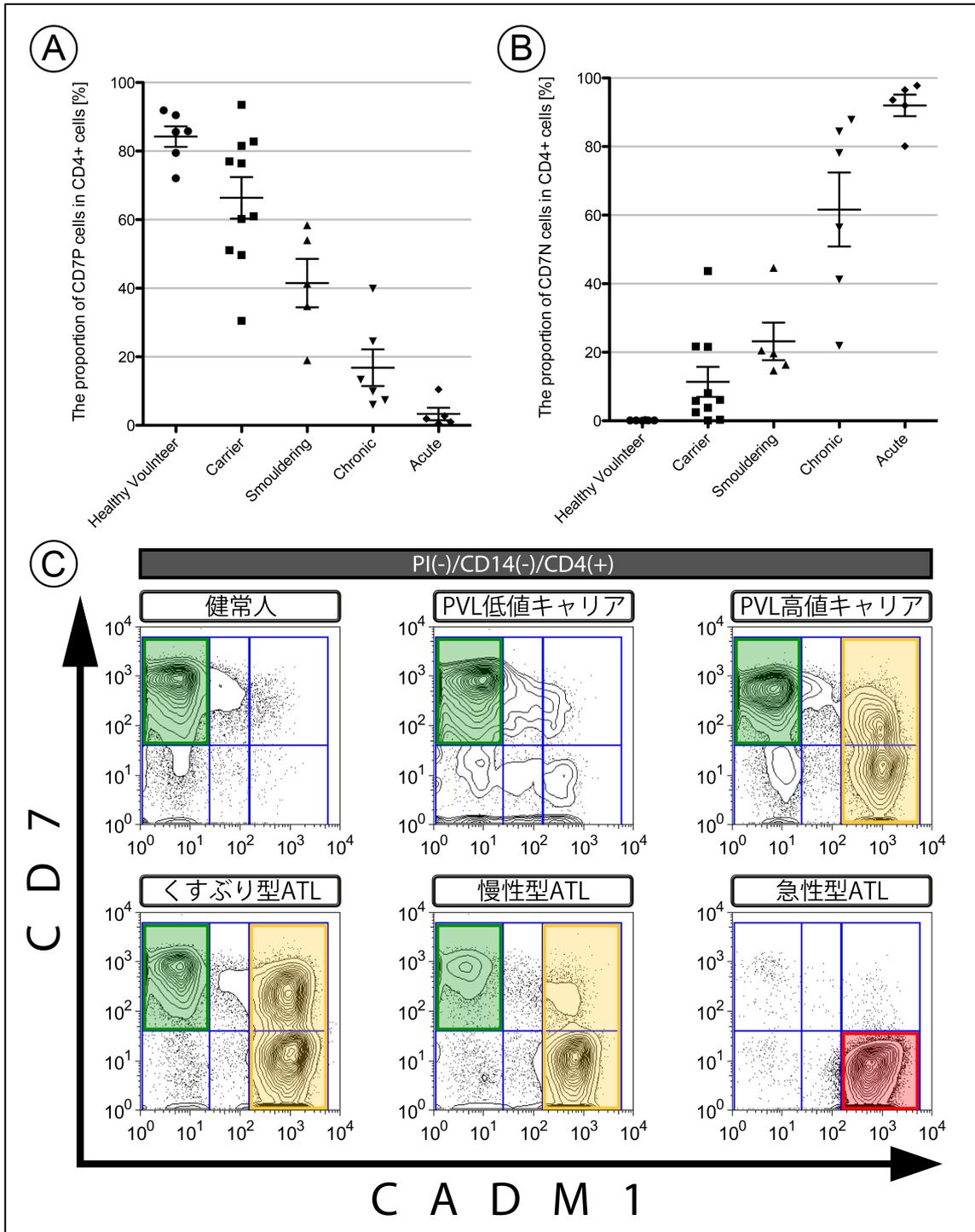
- C. 図 1B の CD7P^{2G}<緑>、CD7D^{2G}<黄>、CD7N^{2G}<赤>の各画分を CD7 ならびに CD3 を軸とするプロットにて展開し直すと、それぞれが主に、図 1A で定義した CD7P^{1G}<緑>、CD7D^{1G}<黄>、CD7N^{1G}<赤>の画分にプロットされた。
- D. CD7P^{2G}、CD7D^{2G}、CD7N^{2G} 各画分をソーティングにて取り出し、DNA 抽出後、Real-time PCR 法を用いて HTLV-1 Proviral Load (PVL)を評価したところ、CD7D^{2G}、CD7N^{2G}画分の値はほぼ 100% (1 copy / cell) であったが、CD7P^{2G}画分には有意な HTLV-1 感染を認めなかった。
- E. CD7P^{2G}、CD7D^{2G}、CD7N^{2G}各画分をソーティングにて取り出し、DNA 抽出後、PCR にて HTLV-1 bZIP factor (HBZ) 遺伝子の有無を評価した所、CD7D^{2G}、CD7N^{2G}において HBZ を認めた。なお、ポジティブコントロールとして HTLV-1 感染細胞株の TL-om1 を、ネガティブコントロールとして健常人末梢血単核細胞 (PBMC)を用いた。β-actin 遺伝子を internal control として用いた。
- F. CD7P^{2G}、CD7D^{2G}、CD7N^{2G} 各画分を形成する細胞のクローナリティーを T-cell receptor (TCR) Vβ レパトアの多様性を利用して、フローサイトメトリーにて評価した。TCR Vβ レパトアスクリーニングの結果、当患者では Major clone が TCRVβ 17 を発現していることが分かり、各画分の TCR Vβ 17 の発現を評価したところ、CD7D^{2G}、CD7N^{2G}画分の値はほぼ 100%であったが、CD7P^{2G}画分は

5.5%と低値であった。また、CD7P 画分に含まれる TCR V β 17 はその発現レベルが CD7D^{2G} や CD7N^{2G} 画分の TCR V β 17 発現レベルと異なるため、偶然同じレパトア型を持っている健常リンパ球を見ていると考えられた。

G. CD7P^{2G}、CD7D^{2G}、CD7N^{2G} 各画分をソーティングにて取り出し、DNA 抽出後、inverse PCR 法を用いてクローナリティーを評価した。HTLV-1 ウィルスのヒトゲノムへの組込み位置 (HTLV-1 integration site) がクローンによって異なる事を利用し、クローナリティーの評価に用いている。Inverse PCR 法による非特異バンドを評価するため、同じ検体を 2 重に評価している。ATL major clone は主に CD7D^{2G} ならびに CD7N^{2G} の画分に濃縮される事が分かった。また、CD7P^{2G} の画分には明らかな HTLV-1 の integration を認めなかった。

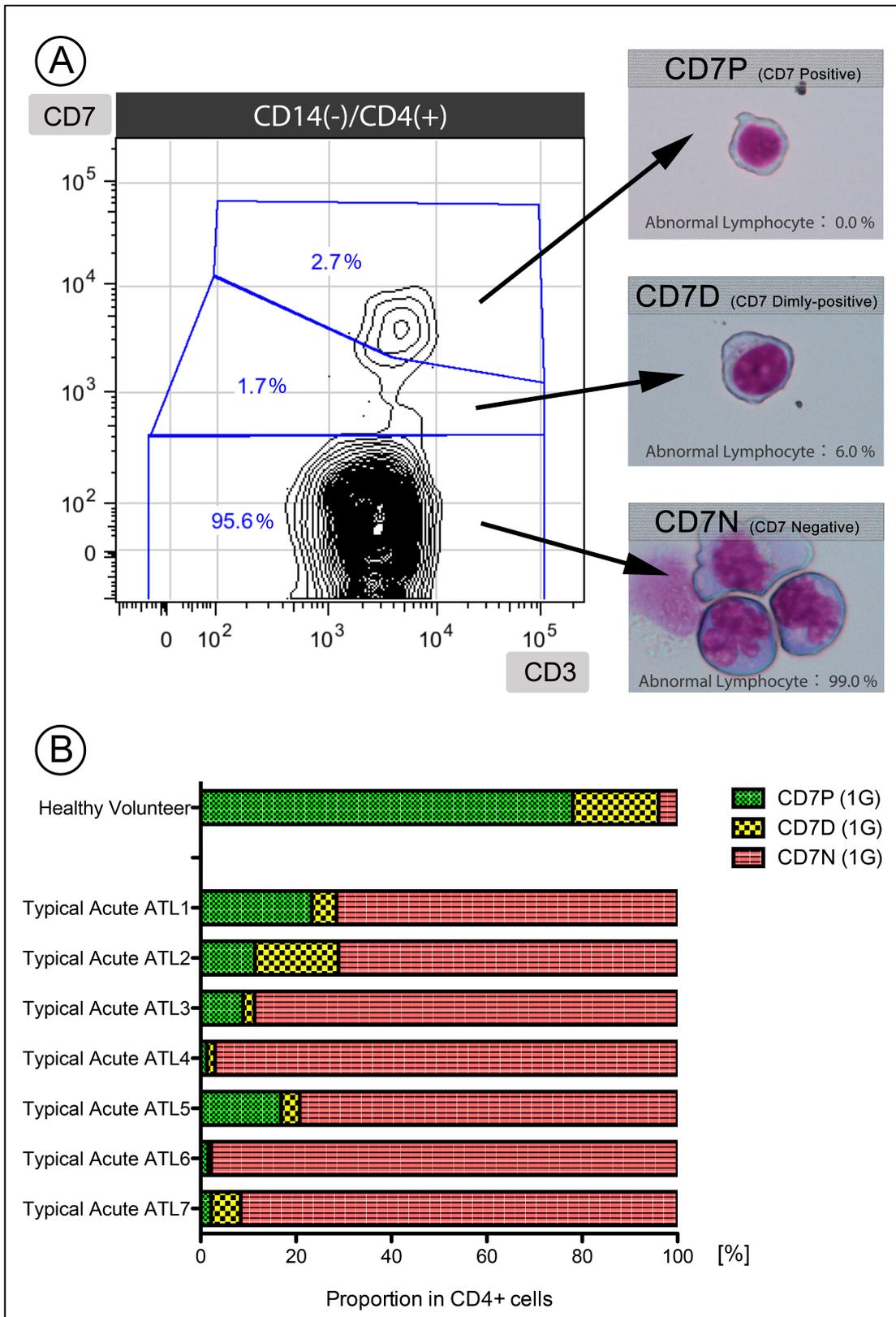
図 2 : 健常人、HTLV-1 キャリア、各分類の ATL 患者の CD4 陽性細胞における CD7

と CADM1 の発現



- A. 健常人 (Healthy Volunteer)、HTLV-1 キャリア (Carrier)、くすぶり型 ATL (Smouldering)、慢性型 ATL (Chronic)、急性 ATL (Acute) 患者末梢血の CD4 陽性細胞における CD7P^{2G} の割合を示した。図中には平均値と SEM (standard error of the mean) を示した。いずれも、死細胞、CD14 陽性単球を除去した上で CD4 陽性画分を CD7 と CADM1 にて展開し、等高線プロットにて Gating した。
- B. 健常人 (Healthy Volunteer)、HTLV-1 キャリア (Carrier)、くすぶり型 ATL (Smouldering)、慢性型 ATL (Chronic)、急性 ATL (Acute) 患者末梢血の CD4 陽性細胞における CD7N^{2G} の割合を示した。いずれも、死細胞、CD14 陽性単球を除去した上で CD4 陽性画分を CD7 と CADM1 にて展開し、等高線プロットにて Gating した。
- C. 健常人、キャリア (HTLV-1 proviral load 低値)、キャリア (HTLV-1 proviral load 高値)、くすぶり型 ATL、慢性型 ATL、急性型 ATL の代表例をここに示す。病状がすすむにつれて、CADM1 陽性細胞、ならびに CD7 陰性細胞が増えていくことが分かる。すなわち、病態の進行とともに、順に CD7D^{2G}、CD7N^{2G} の画分の割合が高くなっていき、やがて CD7N^{2G} 画分が主体となる。

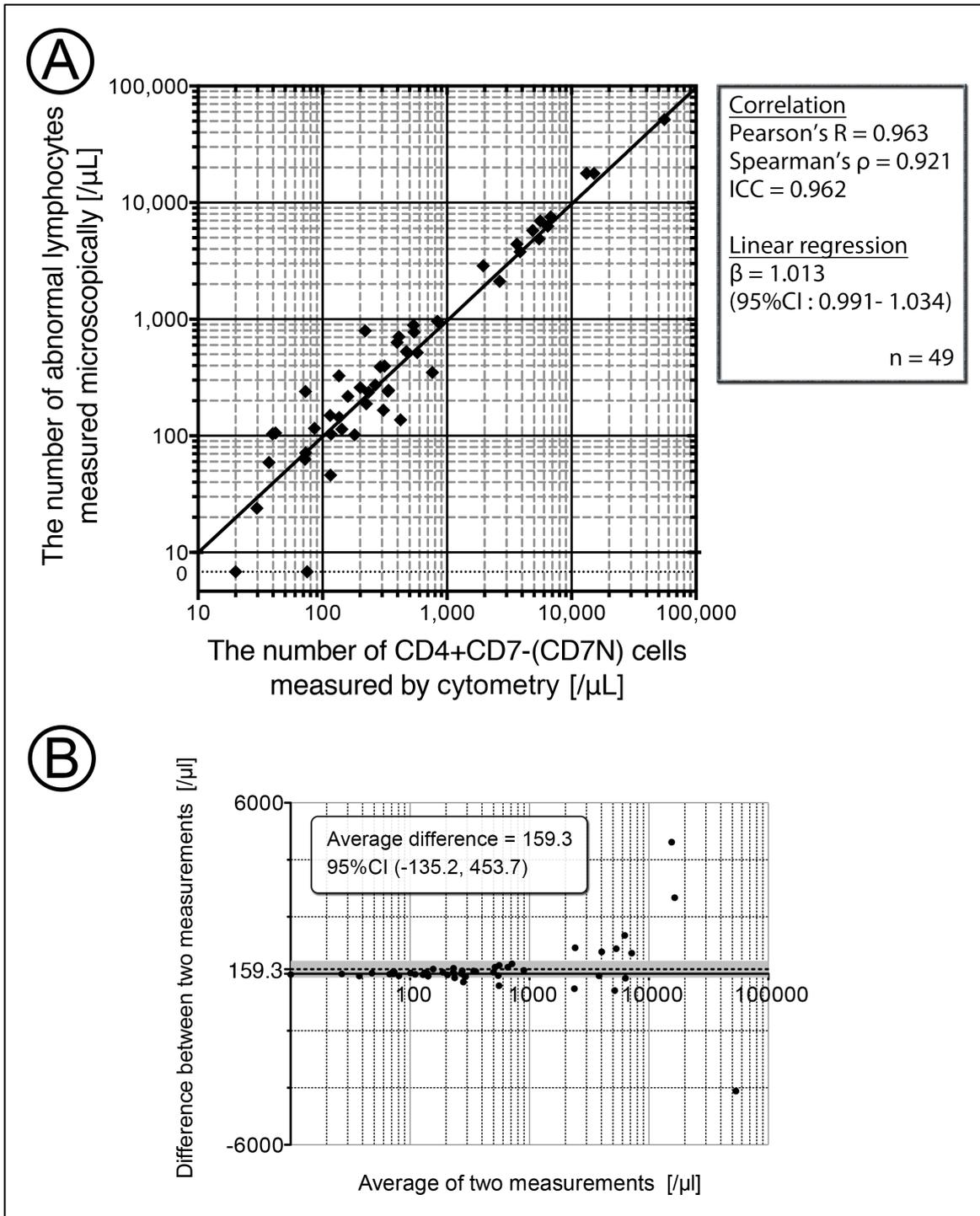
図3：急性型 ATL 患者における CD4 陽性リンパ球の3つの画分と形態異常



- A. 死細胞、ダブレット、CD14 陽性単球を順次取り除いた後、CD4 陽性画分を抽出し、CD7 と CD3 にて展開し、CD7P¹⁶・CD7D¹⁶・CD7N¹⁶ 各画分をソーティングにて取り出した。すぐにサイトスピン標本を作り、ライトギムザ染色の上で異常リンパ球の形態を評価した。その結果、CD7P¹⁶、CD7D¹⁶、CD7N¹⁶ 各画分中の異常リンパ球の割合は 0.0%(0/50)、6.0%(6/100)、99.0%(198/200)であった。なお、Gating ならびに Sorting の特性上、CD7N¹⁶ 画分の細胞が一部 CD7D¹⁶ 画分に混在した可能性は完全には否定できなかった。
- B. 健常人 1 例、ならびに化学療法の影響・修飾のない典型的な急性型 ATL 症例 7 例において、先述の臨床検査法（3-11 記載）を用いて、CD4 陽性細胞における CD7P¹⁶・CD7D¹⁶・CD7N¹⁶ の 3 画分の割合を評価し、棒グラフにて示した。健常人においては CD7P¹⁶ の画分が大部分を占めるのに対し、典型的な急性型 ATL においては、CD7D¹⁶ の割合は CD7N¹⁶ に比して少なかった。

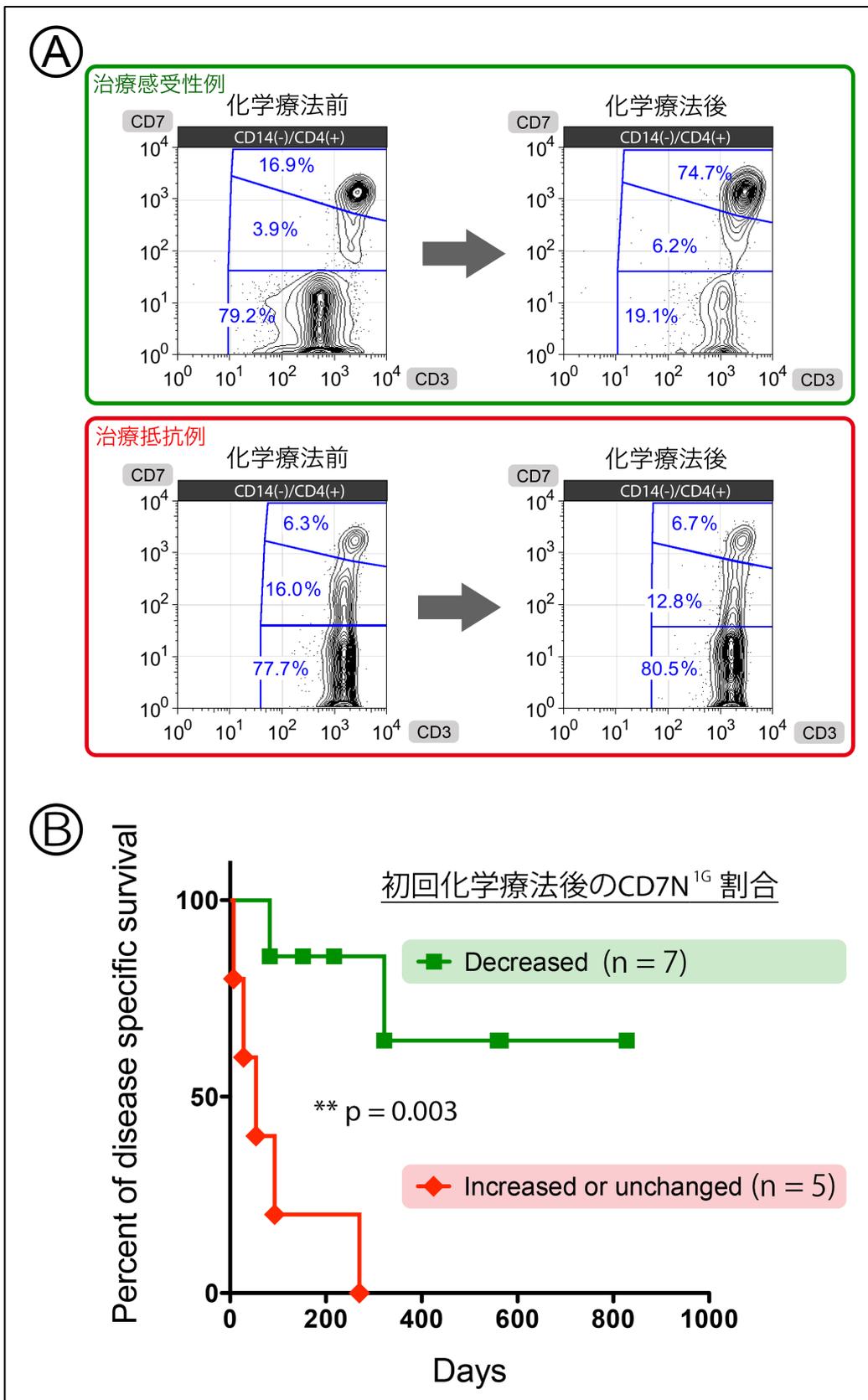
図4：フローサイトメトリーを用いて定量する CD7N¹⁶ 細胞数と熟練した検査者が

が評価する異常リンパ球数の相関



- A. 東京大学医科学研究所附属病院検査部において、XE-2100 を用いて測定した白血球数 (μL) に、ATL 細胞の形態分類に熟練している検査者が分類した異常リンパ球の割合をかけ、目視による異常リンパ球の絶対数 ($/\mu\text{L}$) とし、縦軸とした。また、同時に、全く同じサンプルを用いて、確立したフローサイトメトリー検査法を用いて ATL 細胞 (CD7N¹⁶ 細胞) の絶対数 ($/\mu\text{L}$) を定量し、横軸にプロットした。のべ 49 サンプルにおけるこの 2 つの相関を、Pearson・Spearman・ICC の相関性解析にて評価したところ、いずれにおいても強い相関性をもつことが明らかになった。Pearson の相関係数 R は 0.963、Spearman の相関係数 ρ は 0.921、級内相関係数 (ICC) は 0.962 であった。また、原点回帰条件下での線形回帰係数 (β) は 1.013 (95%CI:0.991-1.034) であった。これらの結果から、熟練した検査者が目視にて評価する異常リンパ球数と CD7N¹⁶ 細胞数との間に、強い相関性ならびに相同性が示唆された。
- B. 目視による異常リンパ球の絶対数と、フローサイトメトリーを用いて評価する ATL 細胞 (CD7N¹⁶ 細胞) 数、これら 2 つの方法の測定誤差を Bland-Altman Plot を用いて評価したが、2 群に有意な差を認めなかった。

図 5 : 化学療法前後の CD7N¹⁶ 画分割合の変化と化学療法感受性・予後との関連



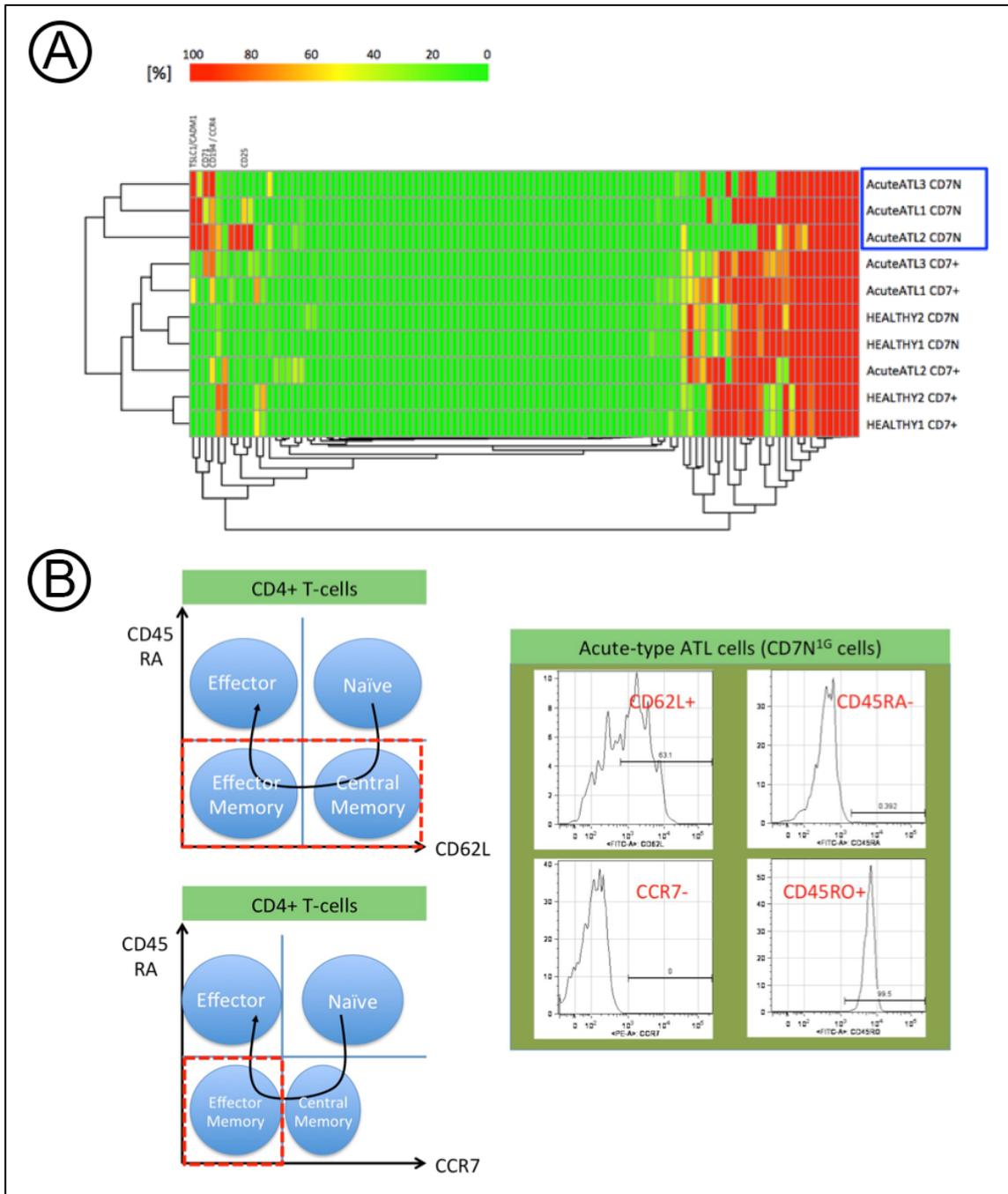
- A. 確立したフローサイトメトリー臨床検査法を用いて、CD4 細胞における CD7 vs. CD3 パターンの変化を化学療法の前後(ともに化学療法各コースの Day1)で評価した。その結果、それらの変化は化学療法抵抗例と感受例で大きく異なることが分かった。具体的には、化学療法抵抗例(図下部・赤にて表示)では化学療法前後で CD7 vs. CD3 パターンがほとんど変わらないのに対し、化学療法感受性例(図上部・緑にて表示)では CD7 vs. CD3 パターンが大きく変わり、CD7^{P16}の割合の増加、CD7^{N16}の割合の減少が認められる。CD4 陽性細胞における CD7 vs. CD3 パターンの変化は化学療法の感受性を反映していた。
- B. また、観察期間の初回化学療法 1 コース前後の CD4 陽性細胞における CD7^{N16} 画分の割合の変化を用いて、CD7^{N16} 割合減少群と CD7^{N16} 割合変化無し・増加群に分け、Kaplan-Meier 生存曲線を用いて Disease-specific survival (DSS) を評価したところ、CD7^{N16} 割合減少群の予後が有意に良好であった。少数例の解析ではあるにも関わらず 2 群の差は有意であり、CD4 陽性細胞における CD7^{N16} 割合の変化は急性型 ATL 患者の予後を予測できた。

表 1 : 化学療法前後の各指標の変化

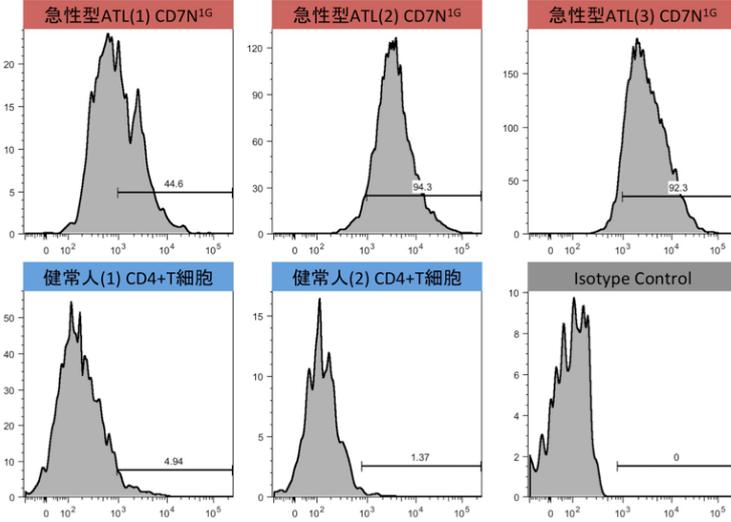
患者 ID	観察期間初回 化学療法前				観察期間初回 化学療法後				化学療法後の CD7N 割合の変化	観察期間後の造血幹細胞移植有無	転帰 (初回化学療法後評価日からの日数)
	CD7N 割合 [%]	CD7N 絶対数 [/ μ l]	LDH [IU/l]	sIL-2R [U/ml]	CD7N 割合 [%]	CD7N 絶対数 [/ μ l]	LDH [IU/l]	sIL-2R [U/ml]			
1	91.6	538.0	774	22600	96.1	115.2	651	-	Increased	-	ATL にて死亡 (7)
2	97.8	15144.9	272	24100	97.4	5479.9	108	27700	Unchanged	-	ATL にて死亡 (93)
3	44.1	200.9	376	4200	37.6	72.8	273	7420	Decreased	+	ATL にて死亡 (322)
4	48.5	116.9	446	4040	60.7	181.2	717	22200	Increased	-	ATL にて死亡 (28)
5	77.7	838.5	405	6450	80.5	265.3	347	9950	Increased	-	ATL にて死亡 (54)
6	68.3	13191.0	633	11700	57.9	2640.0	283	3500	Decreased	+	ATL にて死亡 (83)
7	79.2	544.6	718	73300	19.1	73.1	242	1490	Decreased	+	完全寛解にて生存 (828)
8	38.9	290.3	259	3500	30.9	796.5	200	2300	Decreased	-	ATL は寛解だが感染にて死亡 (152)
9	97.0	6442.3	655	17200	96.2	3859.2	392	21400	Unchanged	+	ATL にて死亡 (270)
10	71.1	1951.4	582	15500	65.2	577.1	238	2840	Decreased	+	完全寛解にて生存 (565)
11	71.5	397.8	251	6340	59.6	335.6	169	1420	Decreased	-	完全寛解にて生存 (559)
12	25.9	115.7	293	5230	14.3	29.7	452	7820	Decreased	-	ATL は寛解にて転院 (217)

図6：マルチカラーフローサイトメトリーを用いた ATL 細胞の詳細な網羅的細胞表面抗原解析

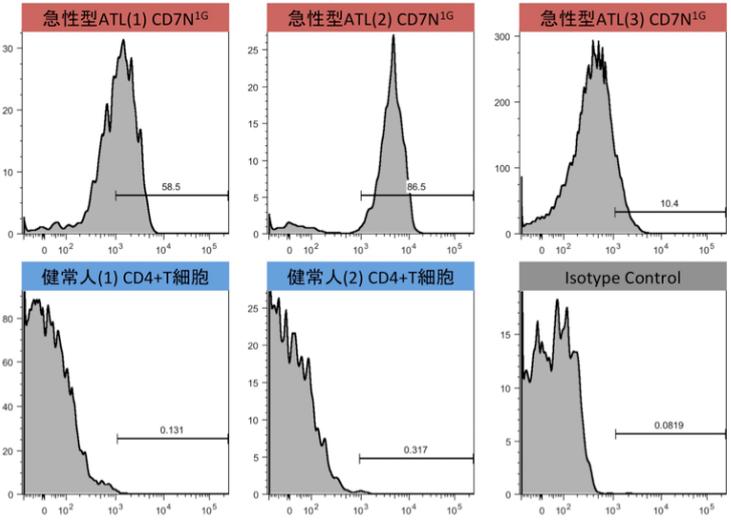
細胞表面抗原解析



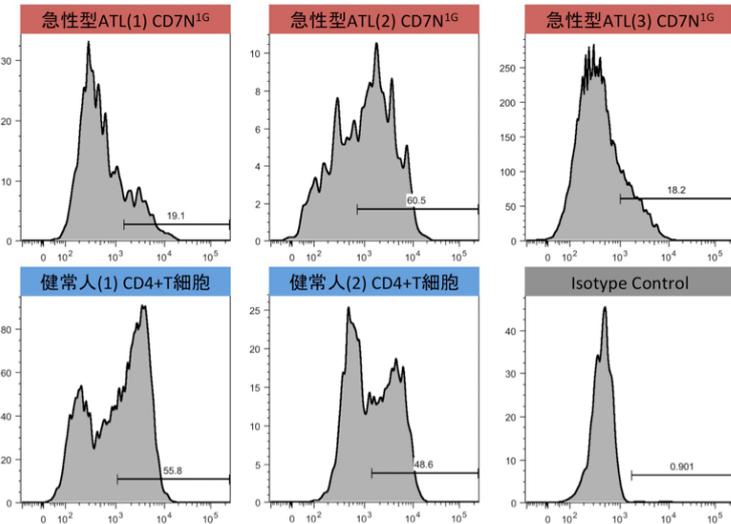
© CD71



© CD25



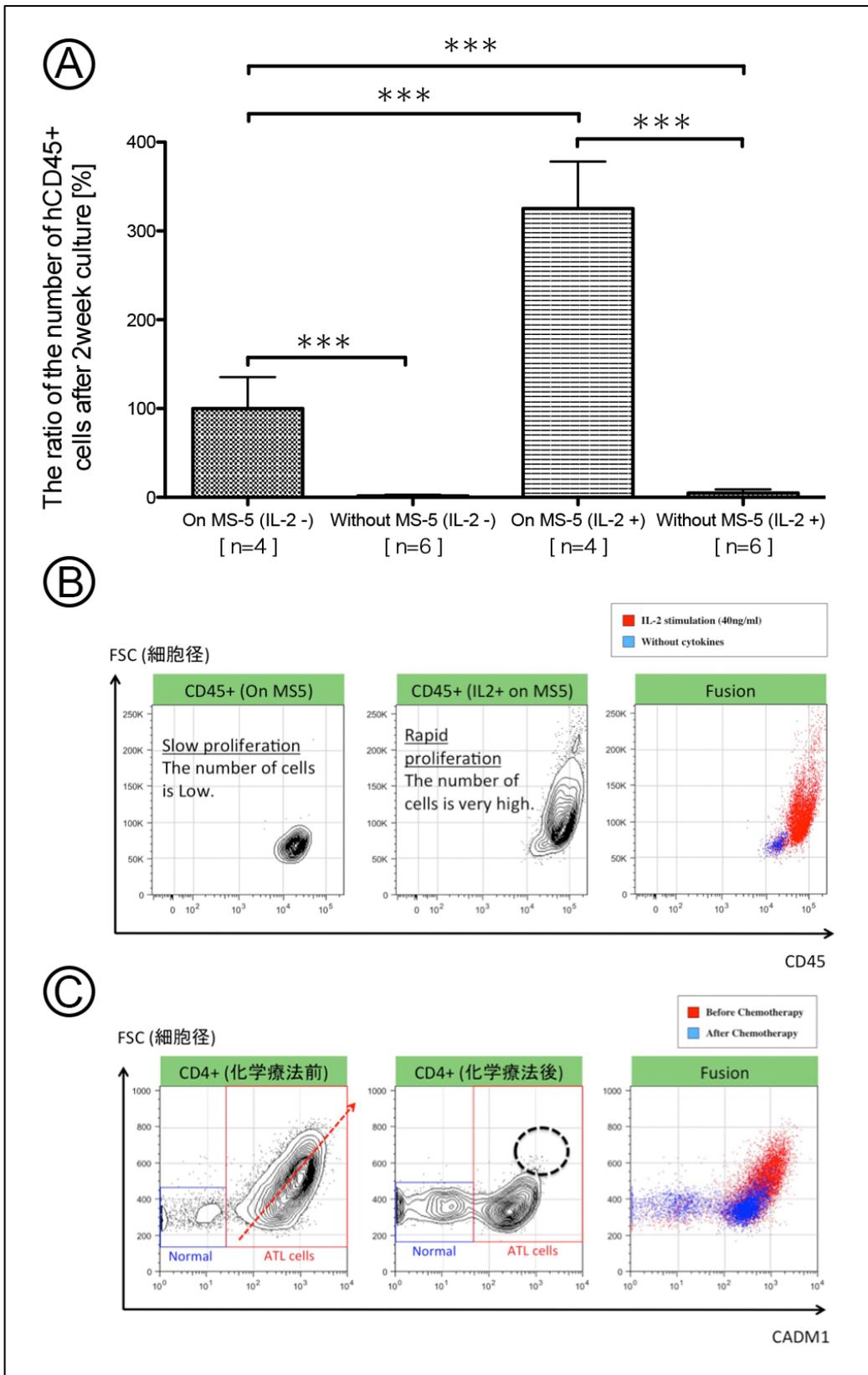
© CD62L



- A. 急性型 ATL 患者における CD7⁺ (CD7P¹⁶ ならびに CD7D¹⁶) 群と CD7N¹⁶ 群の細胞表面抗原の発現を健常人と比較した。各抗原の発現は同色のアイソタイプコントロールと比較して陽性画分を設定し、その発現陽性率を求めた。同一抗原においては、サンプル間で異なる事のない同じ蛍光抗体を用いた。この表は、各行が細胞集団、各列一つ一つが異なる細胞表面抗原となっている。統計学階級クラスタリング解析を施行した結果、急性型 ATL 患者における CD7N¹⁶ (ATL) 細胞は一つの Major Cluster を形成した。なお、Acute ATL 患者 1 ならびに Acute ATL 患者 3 はいわゆる「白血病型」で末梢血の腫瘍細胞循環が多くリンパ節腫脹は比して軽かったが、Acute ATL 患者 2 は逆に「リンパ節腫脹型」で、リンパ節腫脹の程度が末梢血の腫瘍細胞循環に比して強い患者であった。Acute ATL 患者 1 と Acute ATL 患者 3 の CD7N¹⁶ (ATL) 細胞は一つの小さなクラスタを形成した。
- B. CD7N¹⁶ (ATL) 細胞は、CD45RA 陰性、CD45RO 陽性、CD62L 陽性～陰性、CCR7 陰性であった。CD4 陽性 T 細胞の一般的な 4 区分と照らし合わせると、ATL 細胞の細胞表面抗原の発現は、CD45RA vs. CD62L プロットでは、セントラルメモリー T 細胞やエフェクターメモリー T 細胞に、CD45RA vs. CCR7 プロットでは、エフェクターメモリー T 細胞に相当した。

- C. 急性型 ATL 3 例 (CD7N^{1G} 細胞)、健常人 2 例 (CD4+細胞全体) における CD71 の発現を比較した。右下のアイソタイプコントロールをもとに、陽性画分を設定した。急性型 ATL 症例の CD7N^{1G} (ATL) 細胞画分においては、健常人 CD4+細胞画分と異なり、CD71 陽性細胞の割合が大きく上昇していた。
- D. 急性型 ATL 3 例 (CD7N^{1G} 細胞)、健常人 2 例 (CD4+細胞全体) における CD25 の発現を比較した。右下のアイソタイプコントロールをもとに、陽性画分を設定した。急性型 ATL 症例の CD7N^{1G} (ATL) 細胞画分においては、健常人 CD4+細胞画分と異なり、CD25 陽性細胞の割合が上昇していたが、CD25 の発現が低い細胞も認められた。
- E. 急性型 ATL 3 例 (CD7N^{1G} 細胞)、健常人 2 例 (CD4+細胞全体) における CD62L の発現を比較した。右下のアイソタイプコントロールをもとに、陽性画分を設定した。急性型 ATL 症例の CD7N^{1G} (ATL) 細胞画分においても、健常人 CD4+細胞画分においても、CD62L の発現は陽性～陰性まで幅広く分布した。

図 7 : *in vitro* モデルにおける急性型 ATL 細胞の生存・増殖能の評価

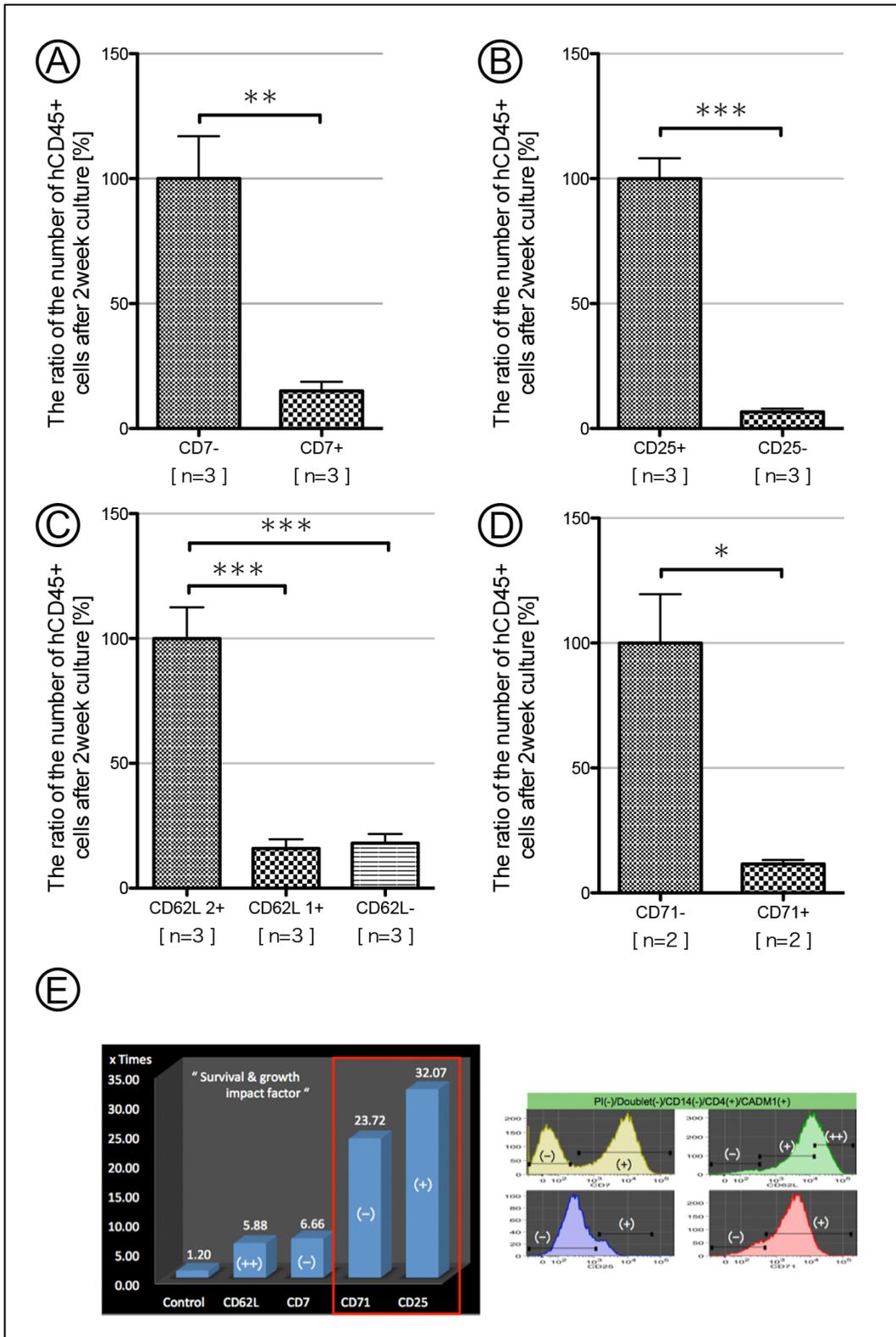


- A. CD4+CADM1+細胞をソーティングにて取り出し、MS-5 の有無、recombinant human IL-2(最終濃度 40ng/ml)添加の有無にて4群（各群 n=4~6）に分け、それぞれにおける2週間後のATL細胞数（ヒトCD45陽性細胞数）を比較した。MS-5上でのIL-2添加無しの結果の平均値を100%とし、グラフ化した。データは平均値とSDで示している。急性型ATL細胞はMS-5のない液体培養下ではほぼ全てが死滅したが、MS-5との共培養下においては生存・増殖可能であることが分かった。一部の急性型症例においては、MS-5培養下にIL-2添加にて更なる増殖を認めた。MS-5の無い状況では、IL-2を添加しても全例において生存・増殖を認めなかった。
- B. CD4+CADM1+細胞をソーティングにて取り出し、IL-2(40ng/ml)の有無で2群に分け、2週間MS-5と共培養をした後、ヒトCD45陽性細胞の細胞径を、FSCを用いて評価し、Fusionにて重ね合わせ評価した。非常に強い増殖をした場合(IL-2添加)において、より細胞径の大きなATL細胞の出現を認めた。実験にはスクリーニングにてMS-5上でのみIL-2反応性を認めた症例を用いた。
- C. 同一患者における、CD4陽性細胞全体の細胞径を化学療法前後でFSCを用いて評価し、Fusionにて重ね合わせ評価した。CD4+CADM1+のATL細胞画分において、化学療法後に、細胞径の大きな細胞の消失を認め、細胞径の小さな細

胞が主体に残存していた。

図 8 : MS-5 との共培養において、急性型 ATL 細胞の生存・増殖に影響を与える

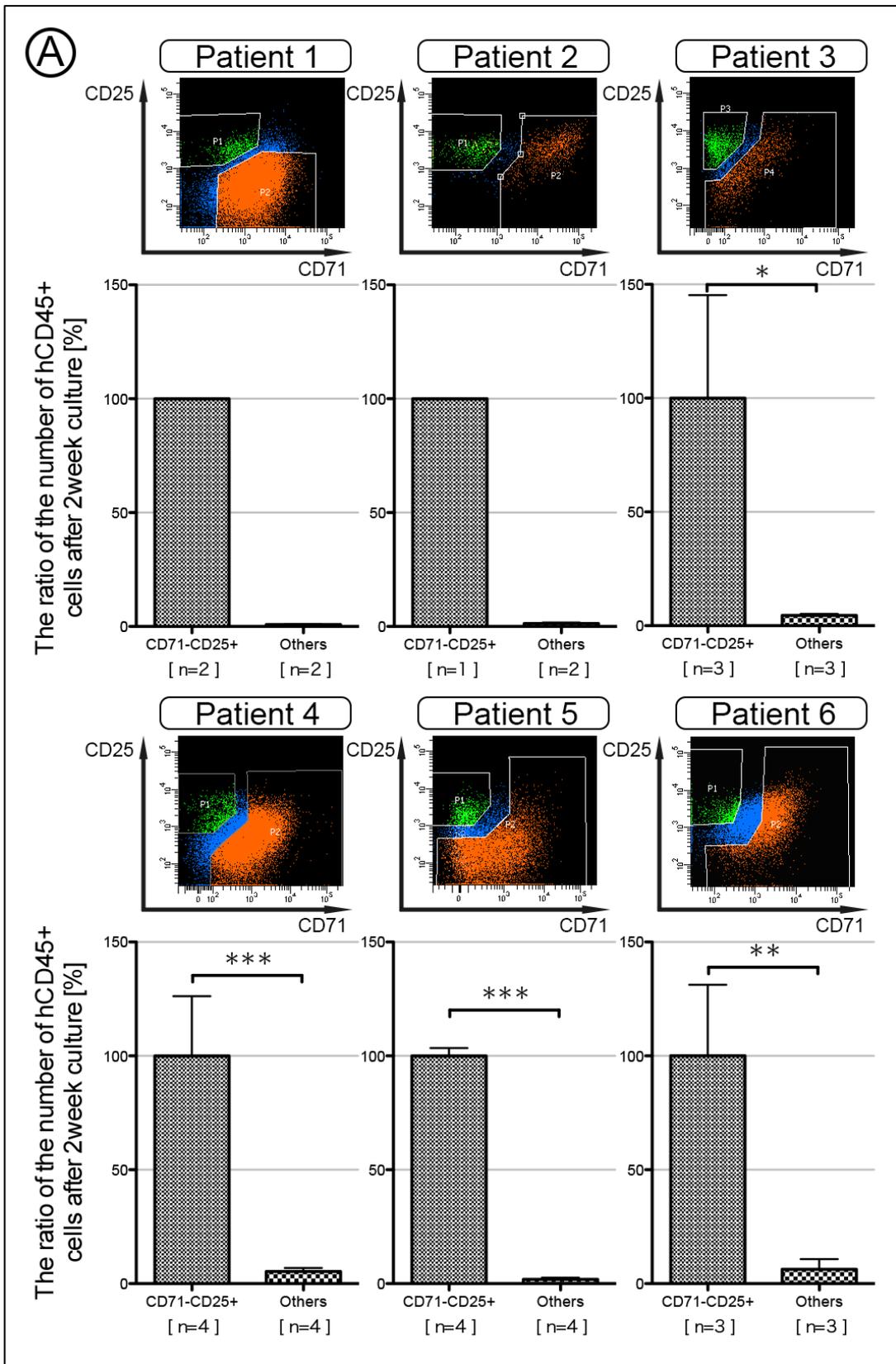
細胞表面抗原の探索

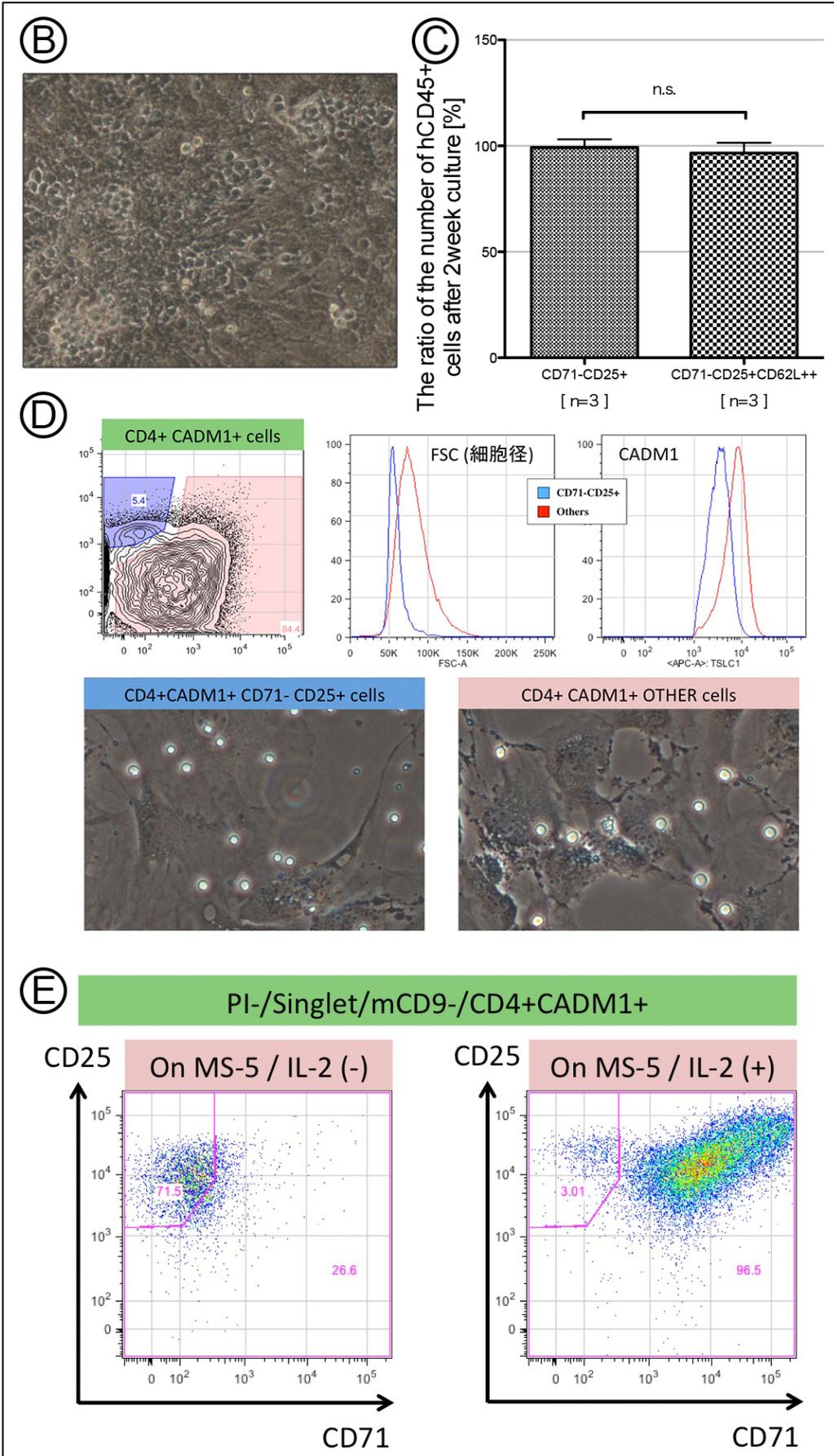


- A. CD4+CADM1+細胞を様々な抗原でヒストグラム展開し、細分化した上で、ソーティングにて同数取り出し、MS-5 と共培養し、2 週間後のヒト CD45 細胞数を比較した。以下、全て CD4+CADM1+細胞が対象である。2 週間後にヒト CD45 細胞数の多かった群の平均値を 100%とし、グラフ化した。データは平均値と SD で示している。CD7-群の 2 週間後の細胞数は CD7+群の結果より有意に多かった。
- B. CD25+群の 2 週間後の細胞数は CD25-群の結果より有意に多かった。
- C. CD62L++(強陽性)群の 2 週間後の細胞数は、CD62L+(弱陽性)群や、CD62L-群の結果より有意に多かった。
- D. 同様に、CD71-群の 2 週間後の細胞数は、CD71+群より有意に多かった。
- E. 複数例において CD62L 強陽性画分、CD71 陰性画分、CD25 陽性画分、CD7 陰性画分が最も生存・増殖が強いことが確認されたため、同一症例において、CD71(陽性画分、陰性画分)、CD25(陽性画分、陰性画分)、CD7(弱陽性画分、陰性画分)、CD62L(強陽性画分、弱陽性画分、陰性画分)、CD271(陽性画分、陰性画分)を同数、MS-5 と共培養し、2 週間後の細胞数を評価した。優位な画分の結果(平均値)を、対照群の結果で割ることにより、”Survival & growth impact factor”を求め、MS-5 との共培養系において、各細胞表面抗

原が、急性型 ATL (CD4+CADM1+) 細胞の生存・増殖に与える影響の強さ・重要性を比較した。CD71 陰性画分は CD71 陽性画分と、CD25 陽性画分は CD25 陰性画分と、CD7 陰性画分は CD7 陽性画分と、CD62L 強陽性画分は CD62L 弱陽性画分・陰性画分の平均値と比較した。有意差を与えない抗原として CD271 を選び、CD271 陰性画分を CD271 陽性画分と比較した。優位な群を青色のバー上に示した。その結果、CD25 (陽性) ならびに CD71 (陰性) の発現が、CD4+CADM1+(ATL) 細胞における 2 週間の細胞培養結果に最も影響を与えることが示された。

図 9 : MS-5 上において生存・増殖可能な ATL 細胞画分の同定

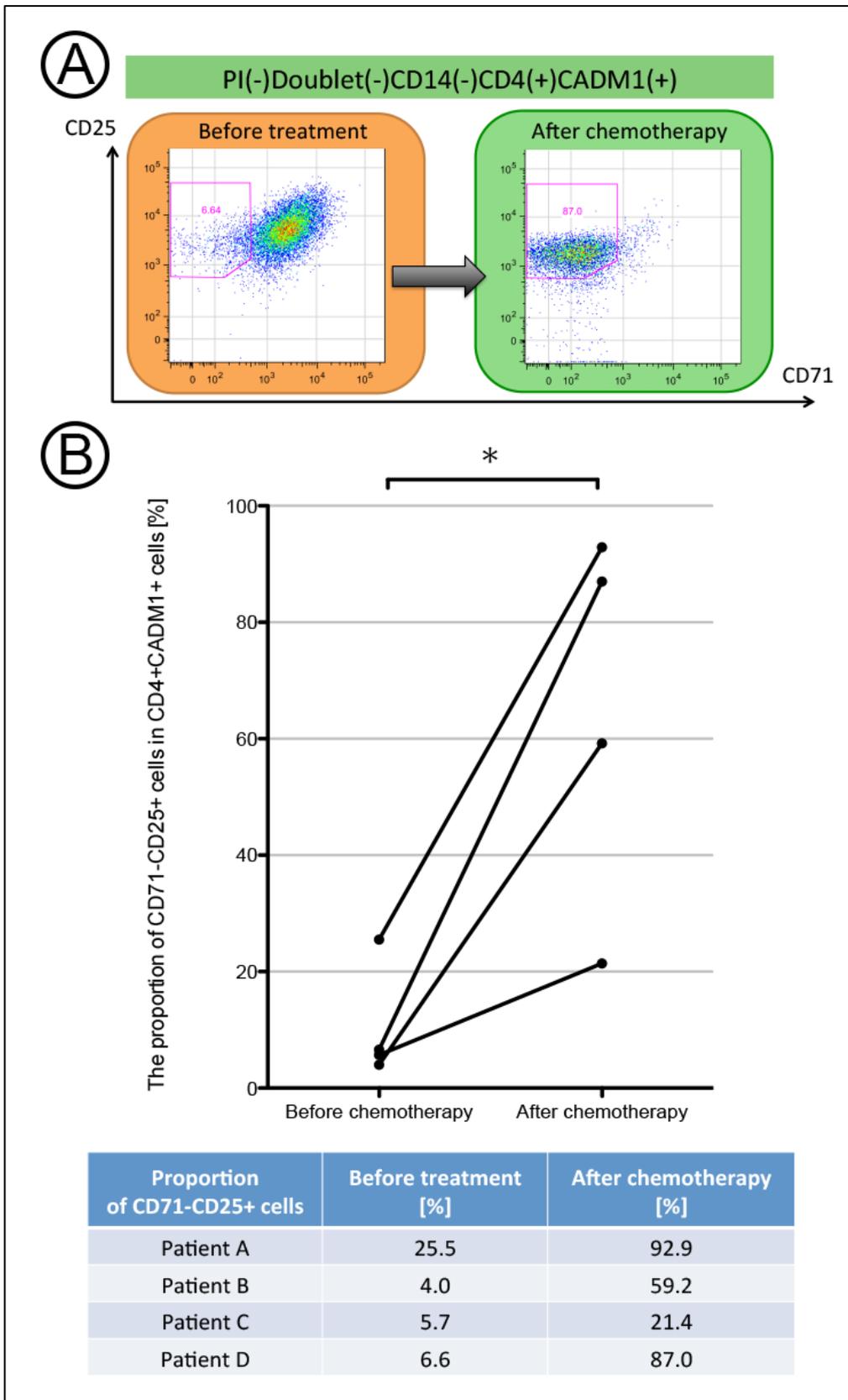




- A. CD4+CADM1+細胞を CD71-CD25+細胞（緑色にて示す）とそれ以外の対照画分（橙色にて示す）に分類し、それぞれ同数をソーティングにて取り出し、MS-5 と共培養するということを繰り返した。その結果、2 週間後、対照画分の細胞はほとんど全てが絶滅した。MS-5 上に生存・増殖可能な細胞は CD4+CADM1+/CD71-CD25+の画分に濃縮されることが分かった。
- B. CD4+CADM1+CD71-CD25+画分の細胞を MS-5 と共培養を行ったところ、典型例では 10 日後に、図に示すような cobble stone area（敷石像）を形成した。
- C. CD4+CADM1+ CD71-CD25+細胞と、CD4+CADM1+ CD71-CD25+CD62L++細胞を、それぞれ同数、ソーティングにて取り出し、MS-5 と共培養したが、2 週間後の細胞数に有意差を認めなかった。
- D. CD4+CADM1+CD71-CD25+画分と対照画分の FSC（細胞径）ならびに CADM1 の発現を評価した。CD4+CADM1+CD71-CD25+画分の細胞は、対照画分と比較して、細胞径が小さく、CADM1 が陽性ではあるものの、発現がより低かった。ソーティングにて 2 つの画分を取り出し、実際に倒立顕微鏡にて写真撮影したところ、CD4+CADM1+CD71-CD25+画分の細胞は実際に小さな細胞であることが確認された。
- E. CD4+CADM1+CD71-CD25+画分の細胞のみをソーティングにて取り出し、MS-5

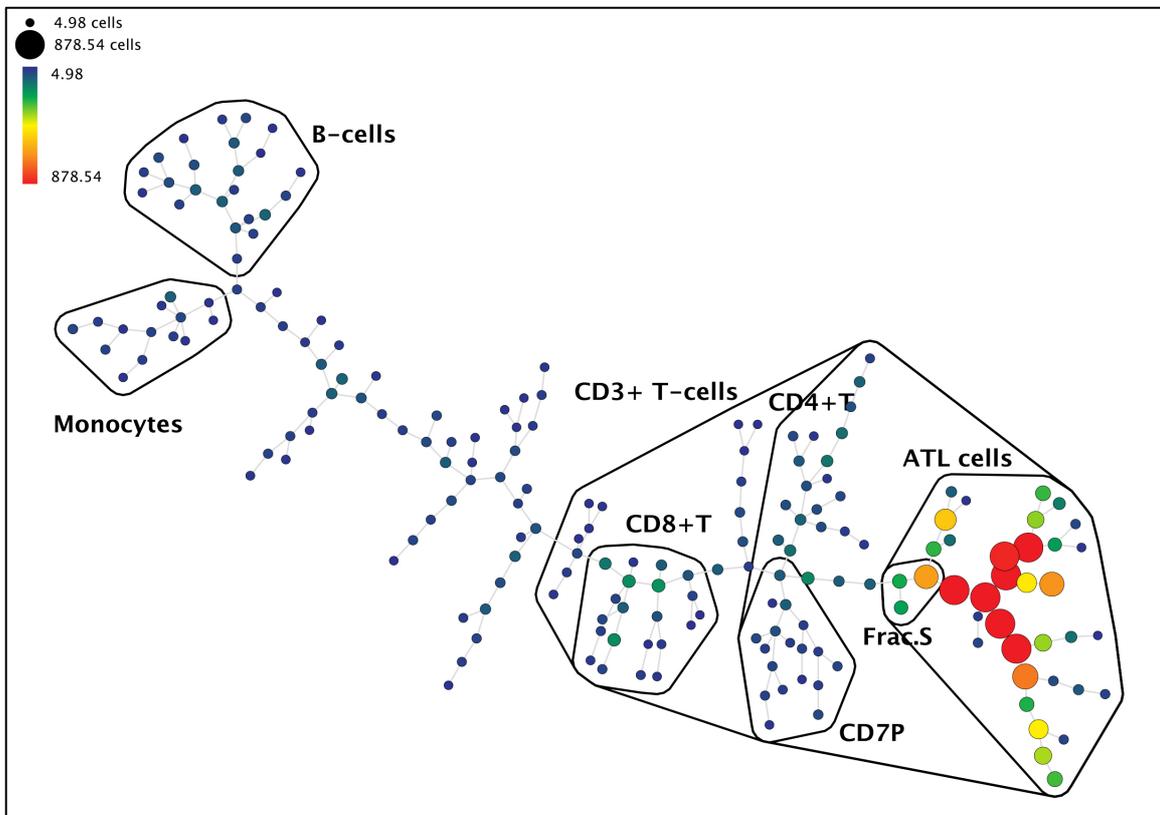
と共培養を行った。14 日後、細胞を回収し、フローサイトメトリーにて、
フェノタイプを評価した。死細胞を PI 染色で除去した後、MS-5 をマウス
CD9 の染色で除外し、CD4+CADM1+ gating で ATL 細胞だけに絞って、CD71 な
らびに CD25 の発現を解析した。左に示すようにサイトカインを加えなくと
も、*in vitro* においても、CD71-CD25+細胞は、CD71 陽性の細胞や、CD25-/dim
の細胞を作りあげていた。また、IL-2 反応症例では rhIL-2(最終濃度
40ng/ml)の添加にて急速な増加を引きおこし、右に示す通り 2 週間後の ATL
細胞は CD71-CD25+以外の細胞が大部分を占めていた。

図 1 0 : CD4+CADM1+CD71-CD25+画分と化学療法の影響



- A. 化学療法が著効し、ATL 細胞数が著明に減少した症例において、化学療法前後の CD4+CADM1+細胞をフローサイトメトリーで評価した。CD4+CADM1+細胞における CD71-CD25+細胞の割合は、6.6%から 87.0%と約 1 ヶ月で大きく増加した。なお、アイソタイプコントロールを元に、CD71-CD25+画分を設定した。
- B. 典型的な急性型 ATL 4 例において、化学療法前後の CD4+CADM1+細胞における CD71-CD25+細胞の割合の変化を評価したところ、化学療法後にその割合は上昇を認めた。Paired t-test を用いて評価したところ、その上昇は有意であった。

図 1 1 : 細胞集団ヒエラルキー解析と CD4+CADM1+CD71-CD25+画分



急性型 ATL 患者の PBMC を 12 色のマルチカラーフローサイトメトリー（図 e 記載の抗体の組合せ）で評価し、死細胞・ダブレットを除去した。シングレット生細胞を解析対象とし、それらの細胞集団のヒエラルキーを Spanning-tree progression analysis of density-normalized events (SPADE) 解析にて検討し、各集団の細胞数 (Population Count) をここに示した。その結果、急性型 ATL 患者の PBMC 中の B 細胞、単球、T 細胞 (CD8 陽性 T 細胞・CD4 陽性 T 細胞) がそれぞれ別の細胞集団として描出され、CD4 陽性 T 細胞のなかでも CD7P で示す CD4 陽性健常リンパ球と ATL 細胞が別々の細胞集団としてきれいに分離された。ま

た、ATL 細胞集団の中では CD4+CADM1+CD71-CD25+(図中 Frac. S)細胞が集団の根本に位置した。なお、図中の CD7P は CD4+CADM1-CD7+(CD7P^{2G})画分、CD4+は CD3+CD4+細胞、CD8+は CD3+CD8+細胞、ATL cells は CD3+CD4+CADM1+細胞に対応する。

7：考察

当研究では、ソーティングを用いた各画分の基礎的検討をもとに、マルチカラーフローサイトメトリーを用いて ATL 細胞を高純度に分離するゲーティング法を確立した。今までも ATL 細胞の細胞表面抗原の特徴は様々な研究者により報告されていたが(22, 23, 25, 26, 70)、ATL 細胞を高純度で取り出す方法はなく、今回確立したこれらの方法は有用な方法であると考えられた。図 1 に示した通り、CD4+CADM1+細胞と HTLV-1 感染 ATL 細胞はほぼ 1 対 1 に対応する。さらに、CADM1 は正常血液細胞では発現が見られず、CCR4 陽性の末梢性 T 細胞リンパ腫非特異型 (PTCL-NOS) という例外を除いては他の血液腫瘍細胞において発現が見られないのが大きな特徴であった。また、CD4 陽性細胞は CD7 vs. CD3 プロットあるいは CD7 vs. CADM1 プロットを用いて、CD7P・CD7D・CD7N と 3 画分に分けられることが分かった。そして、これらの基礎的検討の結果を、臨床検査、臨床病態解析、基礎研究に応用した。

まずは、臨床検査についてである。特に、急性型 ATL では ATL 細胞が CD7N 画分に高度に濃縮されることを利用し、CD4+CD7N^{lg} gating を用いて、ATL 細胞を定量化できる臨床検査手法を作り上げ、東京大学医科学研究所附属病院検査部にて運用した。今回確立したフローサイトメトリーを用いた臨床検査には、様々

な検査上の長所があった。必要な採血量はわずか100 μ Lと少なく、通常の血算測定に用いた後の残余検体のみで検査可能であるため、別途、検査用の採血を必要とせず、患者負担も少ない(無い)。また、実際の臨床の場での活用を念頭に方法を最大限簡易化しており、手間もあまりかからない検査である。加えて、目視法で見られるような検者間誤差や誤りも少ない。さらには、目視分類では多くとも200~300個の白血球分類が実務上の限界であるが、フローサイトメトリーを用いることで10000個以上の白血球を容易に正確に評価・分類できる。

従来から、形態学的に評価する異常リンパ球数よりもより正確な評価方法や、ATLの病態を反映するような新たなマーカーが様々な研究者により検討されていたが(13-19)、フローサイトメトリーを用いるATL細胞の定量はやはり簡便であり正確であるというメリットがある。また、フローサイトメトリーは感度に優れ、髄液など細胞数の少ない検体でも、ATL細胞を検出可能であり、髄液・腹水・胸水などへの細胞浸潤を容易に評価可能であった。感度に優れるフローサイトメトリーは今までも微小残存病変(Minimal Residual Disease, MRD)の評価に用いられてきており、ATLにおいても、CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD25、CD26、CD27等多数の抗原をまとめて評価する事で、フローサイトメトリーでMRDの有無を評価可能だという報告(70)はあったが、症例毎に異なる抗原を用いる必要

があったり、定量は不可能などの問題があり、十分に簡便であるとは言えなかった。実際に ATL 細胞の細胞表面抗原の発現はサブタイプ毎に少しずつ異なるため、今回確立した方法では、急性型 ATL に対象をしぼった。また、CD3、CD4、CD7、CD14 のみを用いて、多重ゲーティングを利用してゲーティング法を工夫することで、十分に簡便な方法を作り上げた。背景に記載した通り、ATL 細胞数を正確に評価する方法は存在せず、形態診断にて評価する ATL 細胞数は検者により大きな誤差を示し、PVL など他の代替検査も検査施設により大きな誤差を生じてしまう。しかし、ATL 細胞の形態診断に熟練した検査者が評価する異常リンパ球数は、現在までの ATL 細胞数の評価法の中では最も正確と考えられたため、従来 of 検査法として、ATL 細胞の形態診断に熟練した検査者が評価する異常リンパ球数を用いた。そして、真の ATL 細胞数を求められない以上、どの検査法が優れているか評価することは不可能であるので、フローサイトメトリーで定量する CD7N¹⁶ 細胞数を、ATL 細胞の形態診断に熟練した検査者が評価する異常リンパ球数と比較して、2つの相関性を評価する事とした。その結果、これら2つの間には極めて強い相関性が示され、原点回帰条件下での線形近似係数も 1.0 に極めて近かった。このように、フローサイトメトリーを用いて評価する ATL 細胞数は ATL 細胞の形態診断に熟練した検査者が評価する異常リンパ球数と同

等以上であることが示されたが、一方で、フローサイトメトリーを用いた当検査においても、いくつかの問題点が明らかになった。第1に、造血幹細胞移植後においては正常の CD4 陽性細胞においても CD7 の発現レベルの低下を認めるため(71)、造血幹細胞移植後には ATL 細胞を正確に評価ができない。また、CD4 を欠損したり CD7 を発現している稀な急性型 ATL 症例ではこの臨床検査手法を用いることができないので、初回のフローサイトメトリーを用いた定量の前に、簡単なフェノタイプの確認が必要である。加えて、CD7 vs. CD3 プロットで展開する CD7P と CD7D の境界は斜めであることもあって時に境界線を引くのが困難であった。その一方で、CD7 vs. CADM1 で展開する gating を用いると、造血幹細胞移植後に CD7 の発現が落ちた HTLV-1 非感染正常リンパ球 (CD4+CADM1-CD7Negative) と ATL 細胞 (CD4+CADM1+CD7Negative) を区別することができ、CD7P と CD7D の細胞集団の境界も垂直な直線で明瞭かつ容易である。現在は、より精緻な CD4+CD7N^{2G} (CD4+CADM1+CD7negative) gating を用いた臨床検査に切り替えることで、造血幹細胞移植後であっても ATL 細胞を検出できるようにし、症例数の蓄積を進めている。

次に、臨床病態解析においてもこのゲーティング法は有用であった。CD4 陽性細胞における化学療法前後の CD7 vs. CD3 パターンを評価することで、化学療

法感受性例と、治療抵抗性例を明確に区別することができた。現在、臨床の場において、化学療法の効果判定には、LDH や sIL-2R が用いられているが、これらは、溶血や感染・炎症の影響も受けるため、ATL に特異的ではない。また、病状の悪化・再発時の前には、前もって CD7 vs. CD3 パターンが悪化し CD7N¹⁶ の割合が上昇することが繰り返し観察され、CD4 陽性細胞における CD7 vs. CD3 パターンの follow up は再発を早期に検出する上でも有用であると考えられた。

また、症例数は限られるが、様々な指標と、予後との関連も Disease-specific survival を用いて、評価をおこなった。少数例の解析にも関わらず、CD7N¹⁶ の化学療法後の割合の変化を追うことにより、Disease specific survival に有意差を認め、急性型 ATL の予後を予知できることが示された。一方で、CD7P¹⁶ 割合や CD7N¹⁶ 絶対数、従来の指標 (LDH や sIL-2R) の化学療法前後の変化が予後に与える影響は、今回の解析においては有意ではなかった。急性型 ATL の予後は極めて不良であり、現時点で長期生存可能な治療法は造血幹細胞移植のみである。化学療法の感受性や予後を CD7 vs. CD3 パターンで評価しながら、予後不良群は早期に造血幹細胞移植へ持って行くなど、今後の治療指針の改善が期待される。また、CD4 陽性細胞における CD7 vs. CADM1 パターンを用いると、急性型症例に限らず、HTLV-1 キャリアから indolent ATL を経て aggressive ATL へ

至る病態進行も評価できる事が示唆された。図 1 D・E の結果が示す通り、CD4 陽性細胞を CADM1 で 1 軸(ヒストグラム)展開するだけでも CD4 陽性細胞における HTLV-1 感染細胞と HTLV-1 非感染細胞の分離は可能であるので、CD4 と CADM1 を用いるだけでも病態進行の評価はある程度は可能かもしれない。しかし、図 1・2B で見たように、CADM1 陽性細胞は CD7 の発現レベルで CD7D と CD7N の 2 つの細胞集団にさらに分類できるので、CD7 を加えた CD7 vs. CADM1 プロットで展開することで、HTLV-1 キャリアからくすぶり型や慢性型 ATL を経て急性型 ATL へと進展する病態をより明瞭に描出可能となった。また、先述の通り、急性型 ATL における化学療法感受性や予後进行评估する際には CD4+CD7Negative の細胞集団の割合が重要であった。このように、病期の進行や化学療法感受性評価などの臨床病態解析において、CD7 発現の有無は重要な役割を担っていると考えられた。一方で、くすぶり型や慢性型 ATL など indolent ATL において認める CD7N 細胞と、急性型 ATL など aggressive ATL における CD7N 細胞は異なるものであると考えられ、これらを識別できるような細胞表面抗原の同定が今後の課題である。

さらに、このゲーティング法は基礎研究にも用い、ATL 細胞だけに絞り込んだ詳細な解析をおこなった。ATL は HTLV-1 感染後 50~60 年かけて発症する腫瘍で

あり、また様々な染色体異常や遺伝子異常を引き起こすにも関わらず、腫瘍化に必要な遺伝子異常は今までに1つも同定されていない。そのため、何をもって HTLV-1 感染細胞が腫瘍化し ATL 細胞となったと考えるか、ATL 細胞の厳密な定義は極めて困難である。しかし、あえて定義するのであれば、ATL 細胞はヒトゲノムにモノクローナルな HTLV-1 の組込みを認める腫瘍細胞であり、急性型 ATL では末梢血の HTLV-1 感染細胞は Major Clone が主体になっていることを利用し、当研究では CD4+CADM1+細胞を ATL 細胞と定義した。当研究を通じて、ATL 細胞の培養には様々な問題が存在することが分かった。*in vitro* モデルにおいても、*in vivo* モデルにおいても、培養に際しては、正常リンパ球と HTLV-1 感染細胞の共培養は、患者体内で見られないような異常な HTLV-1 感染や変性につながる 경우가多く、実際に腫瘍細胞由来でない様々な HTLV-1 “transformed” T-cell lines の樹立が報告されている。患者プライマリ ATL 細胞の腫瘍性増殖の評価には HTLV-1 感染 ATL 細胞だけを取り出すことが必要であった。そして、共培養系を用いた細胞培養を様々な「急性型 ATL」のサンプルを用いて繰り返したが、下山分類で同じ急性型と分類される患者においても、細胞培養の結果は臨床経過同様、様々であった。この多様性の理由の一つは、原因ウイルスである HTLV-1 に感染後 50-60 年かけた上で、多段階発癌の上で発症するからであると考えら

れるが、一方で、診断基準の更なる細分化が必要とも考えられた。今回の研究（細胞培養）では、化学療法を繰り返し施行した後の再発症例や病期が極めて進んだ急性型症例では細胞培養においても異なる結果を示したため、研究対象を初期の急性型 ATL 症例に絞り、化学療法未治療（あるいは1コース程度）で慢性型の既往や類似する経過が無く、典型的な急性型 ATL 患者の末梢血検体に絞って解析をおこなった。そして、ATL 細胞(CD4+CADM1+細胞)とマウス由来間葉系細胞(MS-5)との共培養モデルを利用し探索を進め、マウス由来間葉系細胞(MS-5)上で生存・増殖可能な画分(S画分:CD4+CADM1+CD71-CD25+)の同定に成功した。急性型 ATL 患者複数例にて、この再現性も確認した。加えて、*in vitro*においても、S画分の細胞は細胞表面抗原上、この画分以外のフェノタイプを持った他の ATL 細胞を作ることを確認した。残念ながらプライマリ ATL 細胞の増殖を *in vitro* で再現することは困難であり、MS-5 との共培養系においても ATL 細胞だけを抽出しサイトカインを添加しない場合には、患者内における増殖を十分に再現できたとはいえなかった。しかし、MS-5 上で IL-2 などサイトカインを添加した際の ATL 細胞の増殖は非常に急速であり、MS-5 のない液体培養下ではサイトカインを添加しても一切の増殖をしなかった事を考慮すると、MS-5 上で生存・増殖可能な ATL 細胞は実際の患者内においても重要な役割を担うと考

えられた。また、液体培養の実験結果から急性型 ATL 細胞は IL-2 反応性がないと考えられていたが、当研究では間葉系細胞上では IL-2 反応性を示すことを初めて明らかにした。MS-5 上で ATL 細胞が IL-2 反応性を示すのは約半数例であり、全症例で反応するサイトカインの同定には至らなかったが、患者体内で ATL 細胞は間葉系細胞を土台に IL-2 をはじめとした様々なサイトカインや周囲の他細胞との相互作用の影響を受けながら増殖していると考えられる。また、図 7B・C で見たとおり、ATL 細胞はその増殖とともに細胞径が大きく CADM1 の発現が強くなっていくのが特徴であるが、CD4+CADM1+/CD71-CD25+(S 画分)の細胞は、細胞径が小さく CADM1 の発現が低く、裏を返せば S 画分の細胞は急速に増殖する前の細胞であると考えられる。一般に、幹細胞の持つ多数の特徴の 1 つとして小さな細胞径が挙げられるが(72, 73)、図 9D で見たように S 画分は他の ATL 細胞と比べ、その特徴を満たしていた。また、細胞集団の同定やそれらの集団におけるヒエラルキーを解析する上で有用な解析方法として SPADE 解析が報告され(61)、最近の様々な研究にて前駆細胞集団の解析や腫瘍の進展を評価するのに用いられている(66-69)。そこで、当研究においても、SPADE 解析を用いて急性型 ATL 患者の末梢血を解析すると、S 画分の細胞は ATL 細胞集団の根本に描出され、S 画分の細胞は急性型 ATL 細胞の起源であることを示唆する結果であった。

さらに、実際の患者内における同画分の化学療法前後の割合の変化を追ったところ、化学療法後にこの画分が相対的に高度に濃縮され、これらの細胞が実際に化学療法抵抗性であることが示された。このように、S画分の細胞は細胞径やCADM1の発現、細胞集団のヒエラルキー解析、化学療法抵抗性の性質からATL前駆細胞である可能性が考えられたが、この画分が、従来の癌幹細胞の定義を満たすかどうかに関しては、免疫不全マウスへの移植を用いた更なる解析が必要である。

いまだに急性型ATLにおいて、さらには他の成熟リンパ系腫瘍においても、癌幹細胞が存在するかは議論の余地があるところである。その存在を検討するもう一つの方法は、正常のリンパ球の発生系列に照らし合わせ検討することであると考えた。ATLを、造血幹細胞からCD4陽性T細胞までのヒエラルキーに沿って検討すると、まず骨髄の造血幹・前駆細胞(CD34+CD38+やCD34+CD38-画分)レベルにはMajor clone自体が検出されないという学会報告もある。また臨床の場においても、骨髄穿刺や骨髄生検において、末梢血以上に骨髄にATL細胞の浸潤や集塊がみられることは少ない。また、ATL患者において胸線が腫脹することもない。加えて、図1Eに示した通り、HTLV-1感染ATL細胞のT-cell receptor (TCR)には多様性は無くほぼ均一であり、急性型ATLの起源はTCR再構成後の胸

腺後 (post-thymic) リンパ球にあると考えるのが自然である。仮に、慢性リンパ性白血病 CLL で報告されているように発症要因の一部がすでに造血幹細胞や前駆細胞など上流にあったとしても (74)、ATL 前駆細胞が存在するのであれば、それは胸腺後リンパ球であろうと考えた。そこで、図 6B に示した通り、CD45RA、CD62L、CCR7 等を用いて、すでに報告されているヘルパー T 細胞のナイーブ T 細胞からエフェクター T 細胞までの 4 画分 (75, 76) とフェノタイプを照らし合わせることも行ったが、急性型 ATL 細胞画分には CD45RA 陽性細胞集団を認めず、さかのぼれてもセントラルメモリーフェノタイプまでであった。CD62L は凍結保存にて発現が失われることがあるため (76, 77)、単核細胞分離直後の検体を用いて、また、CD45RA と CD62L を同時に染色して、急性型 ATL (CD4+CD7N^{LG}) 細胞を CD45RA vs. CD62L にプロットすることも行ったが、結果は同様であった。また、ATL の半数では細胞内の FoxP3 が検出され、フェノタイプ上は制御性 T 細胞 (Treg) と類似するため (78)、既に報告されている制御性 T 細胞の分化 (79) と照らし合わせることも行ったが、急性型 ATL 細胞画分に CD45RA 陽性細胞がほとんどいない以上、胸腺から移行する CD45RA 陽性の nTreg (naive Treg) 細胞集団を認めないという同様の結論に至った。

今回、当研究では、確立したゲーティング法を用いて、急性型 ATL 細胞の中

に存在する CD4+CADM1+CD71-CD25+画分という今まで知られていない細胞集団の存在を明らかにした。今後、この画分を免疫不全マウスへ移植することにより造腫瘍形成能を評価し、同画分の性質をより明確にしていきたいと考えている。

また、化学療法を何コースも繰り返した後に再発した患者症例では、MS-5 上で生存・増殖できる細胞の割合がかなり高く、増殖もより激しい別の増殖モデルをとるといふこともわかってきており、こちらに関しては別途構築した *in vitro* / *in vivo* モデルを用いて、今後、詳細に評価したいと考えている。

8：謝辞

成人 T 細胞白血病 (ATL) の診療ならびに研究に携わる機会を与えて頂き、共同研究をさせて頂いた東京大学医科学研究所・附属病院 ATL 研究グループの先生方（内丸薫先生、渡辺信和先生、大野伸広先生、小林誠一郎先生）に深く御礼申し上げます。

また、当研究は、基礎研究結果と臨床経過を常に照らし合わせることで実現したものであり、ベンチとベットサイドを自由に行き来できるクリニカルリサーチフェローという制度を作り上げて下さった東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センターの先生方（中内啓光先生、東條有伸先生、北村俊雄先生）に深く感謝の意を表します。

加えまして、当基礎研究に多大な助言を頂きました渡邊俊樹先生（東京大学大学院 病態医療科学分野）、基礎研究を元に作り上げた臨床検査を検査部に導入するにあたりましてご許可を頂きました小柳津直樹先生（東京大学医科学研究所附属病院 前検査部長）・磯尾直之先生（同 現検査部長）、統計学的解析に多大な助言を頂きました野島正寛先生（東京大学医科学研究所 TR・治験センター）、貴重な検体の解析機会をご提供頂きました宇都宮與先生・中野伸亮先生（今村病院分院 血液内科）にも厚く御礼申し上げます。また、研究にご協力頂きま

した崔日承先生（九州がんセンター 血液内科）、高起良先生（大阪鉄道病院 血液内科）、下村泰三先生（くまもと森都総合病院 血液内科）にも厚く御礼申し上げます。最後に、当院ならびに研究協力病院にて ATL の診療に従事されました全ての診療・医療スタッフ、サンプル提供にご同意頂きました患者の皆様、基礎研究にご意見・ご協力を頂いた幹細胞治療研究センターならびに病態解析領域の皆様、全ての方々に御礼申し上げます。

9 : 引用文献

1. Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* 1977;50:481-92.
2. Matsumoto M, Nomura K. [Clinical and hematological features of adult T cell leukemia in southern part of Kyushu, Japan (author's transl)]. [Rinsho ketsueki] *The Japanese journal of clinical hematology* 1979;20:1040-7.
3. Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1982;79:2031-5.
4. Poesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1980;77:7415-9.
5. Hinuma Y, Nagata K, Hanaoka M, Nakai M, Matsumoto T, Kinoshita KI, et al. Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1981;78:6476-80.
6. Miyoshi I, Kubonishi I, Yoshimoto S, Akagi T, Ohtsuki Y, Shiraishi Y, et al. Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T cells. *Nature* 1981;294:770-1.
7. Vose J, Armitage J, Weisenburger D, International TCLP. International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2008;26:4124-30.
8. Shimoyama M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma

- Study Group (1984-87). *British journal of haematology* 1991;79:428-37.
9. Ishitsuka K, Tamura K. Treatment of adult T-cell leukemia/lymphoma: past, present, and future. *European journal of haematology* 2008;80:185-96.
 10. Tsukasaki K, Tobinai K. Clinical Trials and Treatment of ATL. *Leukemia research and treatment* 2012;2012:101754.
 11. Yamada Y, Tomonaga M, Fukuda H, Hanada S, Utsunomiya A, Tara M, et al. A new G-CSF-supported combination chemotherapy, LSG15, for adult T-cell leukaemia-lymphoma: Japan Clinical Oncology Group Study 9303. *British journal of haematology* 2001;113:375-82.
 12. Ohshima K. Pathological features of diseases associated with human T-cell leukemia virus type I. *Cancer science* 2007;98:772-8.
 13. de Souza JG, Fonseca FG, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Martins CP, Carvalho LD, et al. Diagnostic tool based on an HTLV-1-Tax expression system in eukaryotic cells using a poxvirus vector. *Journal of virological methods* 2010;166:65-71.
 14. Sadamori N. Clinical and biological significance of serum tumor markers in adult T-cell leukemia. *Leukemia & lymphoma* 1996;22:415-9.
 15. Kamihira S, Dateki N, Sugahara K, Hayashi T, Harasawa H, Minami S, et al. Significance of HTLV-1 proviral load quantification by real-time PCR as a surrogate marker for HTLV-1-infected cell count. *Clinical and laboratory haematology* 2003;25:111-7.
 16. Waters A, Oliveira AL, Coughlan S, de Venecia C, Schor D, Leite AC, et al. Multiplex real-time PCR for the detection and quantitation of HTLV-1 and HTLV-2 proviral load: addressing the issue of indeterminate HTLV results. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2011;52:38-44.
 17. Moens B, Lopez G, Adui V, Gonzalez E, Kerremans L, Clark D, et al. Development and validation of a multiplex real-time PCR assay for simultaneous genotyping and human T-lymphotropic virus type 1, 2, and 3 proviral load determination. *Journal of clinical microbiology* 2009;47:3682-91.
 18. Takenouchi H, Umeki K, Sasaki D, Yamamoto I, Nomura H, Takajo

I, et al. Defective human T-lymphotropic virus type 1 provirus in asymptomatic carriers. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2011;128:1335-43.

19. Altamirano NA, Rocco C, Aulicino P, Sen L, Mangano A. Quantitation of HTLV-I proviral load by a real-time PCR assay using SYBR Green: comparison of two methods for DNA isolation. *Journal of virological methods* 2010;170:160-4.

20. Kamihira S, Yamano Y, Iwanaga M, Sasaki D, Satake M, Okayama A, et al. Intra- and inter-laboratory variability in human T-cell leukemia virus type-1 proviral load quantification using real-time polymerase chain reaction assays: a multi-center study. *Cancer science* 2010;101:2361-7.

21. Tsuji T, Sugahara K, Tsuruda K, Uemura A, Harasawa H, Hasegawa H, et al. Clinical and oncologic implications in epigenetic down-regulation of CD26/dipeptidyl peptidase IV in adult T-cell leukemia cells. *International journal of hematology* 2004;80:254-60.

22. Ohtsuka E, Kikuchi H, Nasu M, Takita-Sonoda Y, Fujii H, Yokoyama S. Clinicopathological features of adult T-cell leukemia with CD30 antigen expression. *Leukemia & lymphoma* 1994;15:303-10.

23. Baba M, Okamoto M, Hamasaki T, Horai S, Wang X, Ito Y, et al. Highly enhanced expression of CD70 on human T-lymphotropic virus type 1-carrying T-cell lines and adult T-cell leukemia cells. *Journal of virology* 2008;82:3843-52.

24. Imura A, Hori T, Imada K, Kawamata S, Tanaka Y, Imamura S, et al. OX40 expressed on fresh leukemic cells from adult T-cell leukemia patients mediates cell adhesion to vascular endothelial cells: implication for the possible involvement of OX40 in leukemic cell infiltration. *Blood* 1997;89:2951-8.

25. Yoshie O, Fujisawa R, Nakayama T, Harasawa H, Tago H, Izawa D, et al. Frequent expression of CCR4 in adult T-cell leukemia and human T-cell leukemia virus type 1-transformed T cells. *Blood* 2002;99:1505-11.

26. Sasaki H, Nishikata I, Shiraga T, Akamatsu E, Fukami T, Hidaka T, et al. Overexpression of a cell adhesion molecule, TSLC1, as a possible molecular marker for acute-type adult T-cell leukemia. *Blood*

2005;105:1204-13.

27. Nishikawa H, Maeda Y, Ishida T, Gnjjatic S, Sato E, Mori F, et al. Cancer/testis antigens are novel targets of immunotherapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 2012;119:3097-104.

28. Iwanaga M, Watanabe T, Utsunomiya A, Okayama A, Uchimaru K, Koh KR, et al. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) proviral load and disease progression in asymptomatic HTLV-1 carriers: a nationwide prospective study in Japan. *Blood* 2010;116:1211-9.

29. Katsuya H, Yamanaka T, Ishitsuka K, Utsunomiya A, Sasaki H, Hanada S, et al. Prognostic index for acute- and lymphoma-type adult T-cell leukemia/lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2012;30:1635-40.

30. Ishikawa F, Yoshida S, Saito Y, Hijikata A, Kitamura H, Tanaka S, et al. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nature biotechnology* 2007;25:1315-21.

31. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004;432:396-401.

32. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104:973-8.

33. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:3983-8.

34. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell stem cell* 2007;1:555-67.

35. Eramo A, Lotti F, Sette G, Piloizzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, et al.

Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell death and differentiation* 2008;15:504-14.

36. Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Lau CK, Yu WC, Ngai P, et al. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer cell* 2008;13:153-66.

37. Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, Tanaka F, Ohkuma M, Kim HM, et al. CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells. *J Clin Invest* 2010;120:3326-39.

38. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer research* 2007;67:1030-7.

39. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell stem cell* 2007;1:313-23.

40. Bussolati B, Bruno S, Grange C, Ferrando U, Camussi G. Identification of a tumor-initiating stem cell population in human renal carcinomas. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2008;22:3696-705.

41. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007;445:106-10.

42. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007;445:111-5.

43. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104:10158-63.

44. Schatton T, Murphy GF, Frank NY, Yamaura K, Waaga-Gasser AM, Gasser M, et al. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 2008;451:345-9.

45. Boiko AD, Razorenova OV, van de Rijn M, Swetter SM, Johnson DL, Ly DP, et al. Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve

growth factor receptor CD271. *Nature* 2010;466:133-7.

46. Rutella S, Bonanno G, Procoli A, Mariotti A, Corallo M, Prisco MG, et al. Cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the CD133 antigen in human endometrial tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009;15:4299-311.

47. Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai HC, Matei D, Schilder JM, et al. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer research* 2008;68:4311-20.

48. Curley MD, Therrien VA, Cummings CL, Sergent PA, Koulouris CR, Friel AM, et al. CD133 expression defines a tumor initiating cell population in primary human ovarian cancer. *Stem cells* 2009;27:2875-83.

49. Chan KS, Espinosa I, Chao M, Wong D, Ailles L, Diehn M, et al. Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009;106:14016-21.

50. Nagai K, Jinnai I, Hata T, Usui T, Sasaki D, Tsukasaki K, et al. Adhesion-dependent growth of primary adult T cell leukemia cells with down-regulation of HTLV-I p40Tax protein: a novel in vitro model of the growth of acute ATL cells. *International journal of hematology* 2008;88:551-64.

51. Itoh K, Tezuka H, Sakoda H, Konno M, Nagata K, Uchiyama T, et al. Reproducible establishment of hemopoietic supportive stromal cell lines from murine bone marrow. *Experimental hematology* 1989;17:145-53.

52. Zhou B, Tsaknakis G, Coldwell KE, Khoo CP, Roubelakis MG, Chang CH, et al. A novel function for the haemopoietic supportive murine bone marrow MS-5 mesenchymal stromal cell line in promoting human vasculogenesis and angiogenesis. *British journal of haematology* 2012;157:299-311.

53. Hubin F, Humblet C, Belaid Z, Lambert C, Boniver J, Thiry A, et al. Murine bone marrow stromal cells sustain in vivo the survival of hematopoietic stem cells and the granulopoietic differentiation of more

mature progenitors. *Stem cells* 2005;23:1626-33.

54. Drzeniek Z, Siebertz B, Stocker G, Just U, Ostertag W, Greiling H, et al. Proteoglycan synthesis in haematopoietic cells: isolation and characterization of heparan sulphate proteoglycans expressed by the bone-marrow stromal cell line MS-5. *The Biochemical journal* 1997;327 (Pt 2):473-80.

55. Takagi M. Cell processing engineering for ex-vivo expansion of hematopoietic cells. *Journal of bioscience and bioengineering* 2005;99:189-96.

56. Medina DJ, Abass-Shereef J, Walton K, Goodell L, Aviv H, Strair RK, et al. Cobblestone-area forming cells derived from patients with mantle cell lymphoma are enriched for CD133+ tumor-initiating cells. *PloS one* 2014;9:e91042.

57. Murakami Y. Involvement of a cell adhesion molecule, TSLC1/IGSF4, in human oncogenesis. *Cancer science* 2005;96:543-52.

58. Murakami Y. [Involvement of a cell adhesion molecule, CADM1/TSLC1 in oncogenesis and spermatogenesis]. *Seikagaku The Journal of Japanese Biochemical Society* 2008;80:81-93.

59. Masuda M, Yageta M, Fukuhara H, Kuramochi M, Maruyama T, Nomoto A, et al. The tumor suppressor protein TSLC1 is involved in cell-cell adhesion. *J Biol Chem* 2002;277:31014-9.

60. Sakurai-Yageta M, Masuda M, Tsuboi Y, Ito A, Murakami Y. Tumor suppressor CADM1 is involved in epithelial cell structure. *Biochem Bioph Res Co* 2009;390:977-82.

61. Qiu P, Simonds EF, Bendall SC, Gibbs KD, Jr., Bruggner RV, Linderman MD, et al. Extracting a cellular hierarchy from high-dimensional cytometry data with SPADE. *Nature biotechnology* 2011;29:886-91.

62. Amir el AD, Davis KL, Tadmor MD, Simonds EF, Levine JH, Bendall SC, et al. viSNE enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity of leukemia. *Nature biotechnology* 2013;31:545-52.

63. Tian Y, Kobayashi S, Ohno N, Isobe M, Tsuda M, Zaike Y, et al. Leukemic T cells are specifically enriched in a unique CD3(dim) CD7(low)

subpopulation of CD4(+) T cells in acute-type adult T-cell leukemia. *Cancer science* 2011;102:569-77.

64. Nakahata S, Morishita K. CADM1/TSLC1 is a novel cell surface marker for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Journal of clinical and experimental hematopathology : JCEH* 2012;52:17-22.

65. Kobayashi S, Nakano K, Watanabe E, Ishigaki T, Ohno N, Yuji K, et al. CADM1 expression and stepwise downregulation of CD7 are closely associated with clonal expansion of HTLV-I-infected cells in adult t-cell leukemia/lymphoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2014;20:2851-61.

66. Arendt LM, Keller PJ, Skibinski A, Goncalves K, Naber SP, Buchsbaum RJ, et al. Anatomical localization of progenitor cells in human breast tissue reveals enrichment of uncommitted cells within immature lobules. *Breast cancer research : BCR* 2014;16:453.

67. Saadatpour A, Guo G, Orkin SH, Yuan GC. Characterizing heterogeneity in leukemic cells using single-cell gene expression analysis. *Genome biology* 2014;15:525.

68. Qiu P. Inferring phenotypic properties from single-cell characteristics. *PloS one* 2012;7:e37038.

69. Nolan GP. Flow cytometry in the post fluorescence era. *Best practice & research Clinical haematology* 2011;24:505-8.

70. Shao H, Yuan CM, Xi L, Raffeld M, Morris JC, Janik JE, et al. Minimal residual disease detection by flow cytometry in adult T-cell leukemia/lymphoma. *American journal of clinical pathology* 2010;133:592-601.

71. Leblond V, Othman TB, Blanc C, Theodorou I, Choquet S, Sutton L, et al. Expansion of CD4+CD7- T cells, a memory subset with preferential interleukin-4 production, after bone marrow transplantation. *Transplantation* 1997;64:1453-9.

72. Ratajczak MZ, Suszynska M, Pedziwiatr D, Mierzejewska K, Greco NJ. Umbilical cord blood-derived very small embryonic like stem cells (VSELs) as a source of pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Pediatric endocrinology reviews : PER* 2012;9:639-43.

73. Wagner JE, Collins D, Fuller S, Schain LR, Berson AE, Almici C, et al. Isolation of small, primitive human hematopoietic stem cells: distribution of cell surface cytokine receptors and growth in SCID-Hu mice. *Blood* 1995;86:512-23.
74. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, et al. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer cell* 2011;20:246-59.
75. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999;401:708-12.
76. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nature reviews Immunology* 2012;12:191-200.
77. Weinberg A, Song LY, Wilkening C, Sevin A, Blais B, Louzao R, et al. Optimization and limitations of use of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells for functional and phenotypic T-cell characterization. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 2009;16:1176-86.
78. Kohno T, Yamada Y, Akamatsu N, Kamihira S, Imaizumi Y, Tomonaga M, et al. Possible origin of adult T-cell leukemia/lymphoma cells from human T lymphotropic virus type-1-infected regulatory T cells. *Cancer science* 2005;96:527-33.
79. Miyara M, Sakaguchi S. Human FoxP3(+)CD4(+) regulatory T cells: their knowns and unknowns. *Immunology and cell biology* 2011;89:346-51.