

論文の内容の要旨

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

成人 T 細胞白血病／リンパ腫 (Adult T-cell Leukemia/Lymphoma、ATL) は、レトロウイルスであるヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) の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、増殖メカニズムの解明・新規治療法の開発が求められている。

母乳感染や経胎盤・経産道感染にて主に出生時に HTLV-1 に感染しキャリアとなる。その後、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 は下山分類により、くすぶり型、慢性型、リンパ腫型、急性型に分類されるが、この分類は診断ならびに治療にも広く用いられている。予後不良因子を持つ慢性型、リンパ腫型、急性型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、mLSG15 (VCAP-AMP-VECP) 療法をはじめとした多剤併用化学療法が施行される。

臨床の場において、化学療法などの治療効果を判定する際に、末梢血中 ATL 細胞数の評価は重要かつ本質的な評価である。ATL 細胞は、形態学的に核に特有な切れ込み (花弁状核) を持つ異常リンパ球 (Flower Cell) が特徴的ではあるが、ATL 細胞は典型的な Flower Cell

にならない事も多い。そのため、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、検者間誤差も生じやすいことが知られていた。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い。そのため、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が求められていた。

また、基礎研究においても、HTLV-1 感染 ATL 細胞と非感染リンパ球の識別は重要である。*in vitro* モデルにおいても、*in vivo* モデルにおいても、HTLV-1 感染 ATL 細胞と非感染リンパ球の共培養は、患者体内で見られないような異常な HTLV-1 感染を引き起こすため、HTLV-1 感染 ATL 細胞だけを取り出すことは重要であるが、そのような方法は今まで知られていなかった。

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て ATL における分画法を確立した。また、その分画法を臨床検査、臨床病態解析、基礎研究に応用した。

ATL 患者の 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 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。また、同様に ATL 患者の CD4 陽性細胞を CD7 ならびに CADM1 のプロットで展開すると、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。2 つの分画法を用

いた CD7P・CD7D・CD7N 画分はそれぞれが概ね対応する。加えて、各画分をソーティングにて取り出し、HTLV-1 Proviral Load (PVL) や、HTLV-1 bZIP factor (HBZ) の PCR を用いて評価したところ、HTLV-1 感染 ATL 細胞は CD7D および CD7N の画分に濃縮されることが分かった。また、急性型 ATL においては CD7D の画分は極めて少なく、ソーティングを用いた形態評価の結果、ATL 腫瘍細胞は CD7N の画分に主に濃縮されることが分かった。

そこで、CD4+CD7N¹⁶gating を応用した臨床検査手法を確立し、実際に東京大学医科学研究所附属病院検査部に導入し、急性型 ATL 患者 14 名の延べ 49 サンプルを化学療法のコース事に評価した。その結果、フローサイトメトリーを用いて定量した末梢血の CD7N¹⁶ 細胞数は、ATL 細胞の形態診断に熟練した検査者による異常リンパ球数と高度に相関し、この臨床検査は ATL 細胞数を容易に評価できることが分かった。また、CD4 陽性細胞における CD7 vs. CD3 プロットの変化を化学療法毎に追ったところ、CD7 vs. CD3 プロットの化学療法前後の変化は化学療法感受性例と化学療法抵抗例で異なることが分かった。さらに、観察期間における初回の化学療法前後の CD4 陽性細胞における CD7N¹⁶ 画分の割合の変化を用いて、CD7N¹⁶ 画分割合減少群と CD7N¹⁶ 画分割合変化無/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、CD7N¹⁶ 画分割合減少群の予後が有意に良好であった。少数例の解析 (n=12) にも関わらず、化学療法前後の CD4 陽性細胞の CD7N¹⁶ 画分割合の変化は、急性型 ATL 患者の予後を予測できた。

また、急性型 ATL における ATL 細胞の細胞表面抗原の発現を、フローサイトメトリーを

用いて詳細に解析し、健常 CD4 陽性リンパ球と比較しながら、統計学的階級クラスタリング解析にて評価した。すると、急性型 ATL 患者の末梢血における CD7N^{lg}(ATL)細胞は、他の CD4 陽性リンパ球と比較し、特徴的な細胞表面抗原の発現パターンをとることが分かった。そこで、それらの細胞表面抗原を用いて、急性型 ATL 患者の末梢血の CD4+CADM1+(ATL)細胞を分類し、間葉系細胞 MS-5 との共培養系を用いて、ATL 細胞の中で生存・増殖可能な画分の同定を試みた。その結果、MS-5 上に生存・増殖可能な細胞は CD4+CADM1+/CD71-CD25+画分(S 画分)に主に濃縮されることが分かった。そして、これらの画分の細胞は、*in vitro*においても、CD71+や CD25dim/-といった他のフェノタイプの ATL 細胞を作り出せることを確認した。ATL 細胞はその増殖につれて CADM1 の発現がより強く、細胞径がより大きくなっていく特徴が認められたが、S 画分の細胞は CADM1 の発現が低く、細胞径も小さかった。また、Spanning-tree progression analysis of density-normalized events (SPADE) 解析からも、同画分の細胞は ATL 細胞集団の根元に描出され、ATL 前駆細胞であることが示唆された。加えて、化学療法後には、全体の ATL 細胞数が減少しているにもかかわらず、ATL 細胞における S 画分の割合が高度に高くなることが繰り返し観察され、S 画分の細胞は化学療法抵抗性であることが示唆された。当研究において同定した細胞画分が、急性型 ATL における癌幹細胞(ATL-initiating cells)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等を用いた更なる解析が必要である。